

## 고정화 효소컬럼을 이용한 콜레스테롤 측정용 Flow Injection Analysis 시스템의 개발

신 민 철 · 김 학 성  
한국과학기술원 생물공학과

### Development of Flow Injection Analysis System for Amperometric Determination of Cholesterol Using Immobilized Enzyme Columns

Min-Chol Shin and Hak-Sung Kim

Department of Biotechnology, Korea Advanced Institute of Science and Technology  
373-1, Kusung-Dong, Yusung-Ku, Taejon 305-701, Korea

#### ABSTRACT

A flow injection analysis(FIA) system was developed for the determination of cholesterol using immobilized cholesterol oxidase and cholesterol ester hydrolase. The enzymes were immobilized on controlled pore galss(CPG) by the glutaraldehyde method. The glass columns packed with immobilized enzymes were found to contain 3-5 I. U. for each enzyme. A hydrogen peroxide sensitive electrode was constructed and applied to the FIA system. The operational conditions for FIA response were investigated and optimized with variation of sampling volume, flow rate and composition of carrier solution. The FIA response were linear upto 60 and 400mg/ml for free cholesterol and cholesterol ester, respectively. All samples were analyzed with a good precision(<2.5% CV) and accuracy. 23 samples were measured succesively within about an hour. Intermittent assays of more than 500 times caused 50% decrease in response sensitivity.

#### 서 론

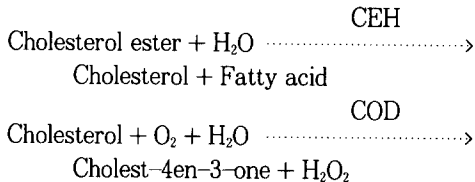
콜레스테롤은 여러 스테로이드계 호르몬과 담즙산 그리고 비타민 D 등의 전구체로서, 인체 내 대사에서 중요한 역할을 맡고 있다. 그러나 혈청 내 콜레스테롤 농도가 높으면 심장혈관질환(cardiovascular de-sease) 발생률도 높아짐(1)은 이미 주지된 사실이다. 그러므로 심장질환, 동맥경화, 고혈압 등 여러 질병의 진단에서 혈청 내 콜레스테롤의 양은 매우 중요한 지표가 되고 있다(2).

정상적인 성인의 경우, 하루 약 110mg의 스테롤(sterol)을 분비하며, 이 중 식이섭취를 제외한 약

850mg의 콜레스테롤이 간과 장에서 생합성되어진다. 그의 장기, 세포에서는 생합성이 없이 혈액을 통해 운반된 콜레스테롤을 흡수하여 대사하게 된다. 이 경우 콜레스테롤의 물에 대한 낮은 용해도 때문에, 생체 내에서는 lipoprotein이란 복합체의 형태로 운반되어진다. Lipoprotein의 구조는 친수성을 증대시키기 위하여 표면에는 인지지방질, 단백질, 유리콜레스테롤이 위치하며, 내부는 triacylglycerol, 콜레스테롤 에스테르로 구성되어 있다. 이러한 콜레스테롤은 유리된 형태와 에스테르 형태가 4 : 6의 비율로 존재한다(3).

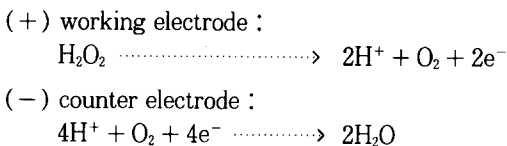
콜레스테롤은 초기의 화학반응을 이용한 발색정량

법으로부터, HPLC, GC 등을 통해 분석되어 왔으나, 효소 반응을 이용함으로써 콜레스테롤만의 특이적 정량(4)이 가능하게 되었다. 사용되는 효소는 콜레스테롤 산화효소(cholesterol oxidase, COD)와 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소(cholesterol ester hydrolase, CEH)이며, 그 반응기작은 다음과 같다.



즉 생성된 과산화수소(hydrogen peroxide)를 colorimetry(4), fluorimetry(5), chemiluminescence(6) 등의 원리를 이용하여 콜레스테롤 양을 측정할 수 있다.

그러나 생체시료는 여러 가지 간섭물질(interference compounds)이 포함되어 있어 정확한 분석에 장애가 된다(7). 흡광 측정 원리를 이용할 경우는 시료의 혼탁도와 흡광의 중첩 등이 문제가 되며, 형광 측정법 역시 형광 또는 소광 간섭이 항존하게 된다. 그러나 전기화학적 원리를 응용하게 되면 이러한 간섭현상을 최소화시킬 수 있다(8-11). 즉 일정한 전위차(potential difference) 하의 두 전극 사이에서, 산화효소에 의해 생성된 과산화수소는 다음과 같이 비가역적으로 산화반응을 일으키게 된다(12).



이때 적절하게 결정된 전위차에서 양극 산화(anodic oxidation)시 발생하는 확산전류(diffusion current)는 과산화수소의 농도에 비례하게 된다. 이러한 전류법(amperometry) 측정은, 다른 분석방법에서 추가로 필요시되는 시약이 불필요하여 경제적이며, 분석의 감지도가 우월하고, 소형화 및 자동화가 가능하다(7).

본 연구에서는 고정화 효소를 이용하여 전기화학적 방법으로 콜레스테롤을 간편하고 정확하게 측정하는 장치를 개발하고자 하였으며, 이를 위해 FIA(flow injection analysis) 시스템을 도입하여 신속하고 재현성이 높은 분석조건을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

사용된 효소는 cholesterol oxidase(E. C. 1.1.3.6 ; 2.7 International Unit(I. U.)/mg ; Sigma Chemical Co.), cholesterol ester hydrolase(E. C. 3.1.1.13 ; 25 I. U./mg ; Boehringer Mannheim GmbH) 그리고 horseradish peroxidase(E. C. 1.11.1.7 ; 250 U./mg ; Boehringer Mannheim)이었다. 콜레스테롤과 cholesterol linoleate은 Sigma사로부터 구입하였고, 고정화 담체인 controlled pore glass(CPG, pore size 200 Å, 120~240mesh)는 Serva사에서 구입하였다. 4-aminoantipyrine, sodium cholate, 3-aminopropyltriethoxysilane, glutaraldehyde 그리고 Triton X-100은 모두 Sigma사의 제품을 이용하였다. 또한 실제 혈청분석 가능성을 살펴보기 위하여, control serum의 일종인 Accutrol(Sigma Chemical Co.)를 분석에 사용하였다. 그의 실험에 사용된 시약은 모두 analytical grade이었다.

### 표준용액의 제조

콜레스테롤과 그 에스테르의 물에 대한 낮은 용해도 때문에 그 standard solution의 제조는 항상 어려움을 갖는다. 콜레스테롤의 경우, 먼저 400mg을 Triton X-100 용액(20% v/v in 0.1M potassium phosphate 완충용액, pH 7.0)에 녹인 후 100ml로 희석하였다. Cholesterol linoleate는 400mg을 20ml의 Triton X-100에 넣어 뜨거운 물에서 중탕으로 하여 맑은 용액이 얻어지면 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)을 사용하여 100ml로 희석하였다. 이런 방법으로 쉽게 침전물이 형성되지 않는 고농도의 표준용액을 얻게 되었다.

### 효소의 고정화

분석용 고정화 효소 컬럼에 쓰이는 충전재는 주로 controlled pore glass(CPG), silica gel 등과 같은 무기 담체(inorganic supports)가 선호된다(7, 13). 그 이유는 FIA 시스템 내에서의 압력 강화에 대한 저항성이 크므로, dead volume이 생기지 않게 되어 시료층의 확산현상이 최소화되기 때문이다. 아울러 요구되는 공유결합을 통한 고정화는 운영시 안정성을 증진시키는 효과를 주며, pore에 의해 비표면적이 증대되므로 고정화시 활성 회수율이 높다. 무기 담체에 유기물을 공유결합을 시키는데 가장 광범위하게 쓰이는 방법(14)으로서 silanization을 채택하

였다. 아세톤으로 희석된 2%의 3-aminopropyltriethoxysilane 용액 5ml에 1g CPG를 상온에서 10분간 침지시킨 후, 과량의 여액을 제거한 후 80°C에서 6시간 동안 가열하여 propylamine CPG을 얻었다. 이를 다시 아세톤으로 수회 세척한 뒤, 120°C에서 12시간 건조시킨 후 질소하에서 보관하였다. 효소를 고정화시키는 단계에서는, 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)으로 구성된 0.1%(v/v) glutaraldehyde용액 2ml에 200mg propylamine CPG를 침지시킨 후 바로 진공상태에서 15분 처리하고 다시 상온에서 45분간 정치하였다. 이를 과량의 증류수로 세척한 뒤, 0.5ml의 효소용액을 가하고 10분간 진공을 유지시켰다. 서서히 교반을 하며 12시간 동안 효소를 고정화시킨 후, 반응에 참여하지 않은 효소를 증류수로 세척 제거하여 얻어진 고정화 효소는 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)에서 4°C로 보관하였다.

#### 과산화수소 특이 전극과 Flow-through cell의 제작

백금 sheet(5×5×0.3mm)를 이용하여 과산화수소 특이전극을 제작하였다. 전극의 특성을 살펴보기 위해 구성된 삼 전극계에서는, saturated calomel electrode(S. C. E., TOA, HS-205C)를 표준전극으로 이용하였다. 전극 사이의 전위차를 일정하게 유지시켜 주는 포텐시오스텔(potentiostat)은 EG & G사의 Scanning Potentiostat Model 362를 사용하였고, 이를 통해 전기화학반응을 측정하였다. 구성된 전극을 FIA시스템에서 응용하기 위해, Fig. 1과 같은 flow-through cell을 구성하였다. Flow cell에

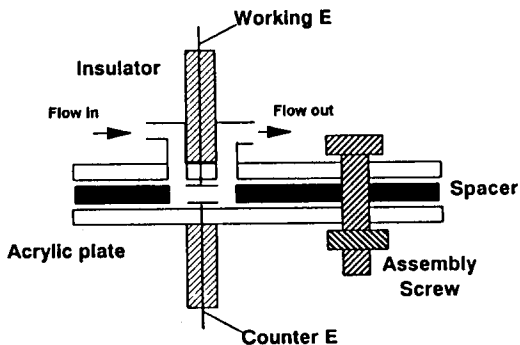


Fig. 1. Schematic diagram of flow-through cell. Spacer was a silicon sheet(thickness, 2mm) and solution inlet and outlet were made of stainless tubing.

서 얇은 실리콘판에 의해 만들어지는 내부의 부피(internal volume)은 약 80  $\mu$ l이었다. 측정시 back ground noise를 줄이기 위해 inlet쪽의 스테인레스관을 전기적으로 접지시켰다.

#### FIA시스템의 구성

고정화 효소 컬럼을 이용하여 콜레스테롤 분석을 하는 FIA 시스템을 Fig. 2에서 도식적으로 나타내었다. FIA의 각 구성요소를 서로 연결하는데 이용된 모든 connector와 관(Teflon, ID 0.8mm)은 Alltech사에서 구입하였다. 시료주입기(Rheodyne, 5020, Teflon Rotatory Valve)에서 주입된 시료는, 캐리어 용액을 구동시키는 펌프(peristaltic pump, Eylea MP3)에 의해 고정화 효소 컬럼을 통과하여 flow cell을 지나면서 분석이 된다. 유리 콜레스테롤 분석 때는 COD 컬럼만을, 총콜레스테롤 측정시는 CEH, COD 컬럼을 순차적으로 연결시켜서 FIA 시스템을 구성하였다. 고정화 효소 컬럼은, 효소가 고정화된 CPG를 유리관(내경 2.5mm, 길이 2.5cm)에 충전시키고 그 양 끝을 nylon nets로 지지하여 만들었다. 또한 mixing coil(length, 50cm)을 설치하여 캐리어 용액 내의 Triton X-100이 시료 중 lipoprotein에 존재하는 콜레스테롤을 보다 잘 분산(emulsification)시킬 수 있도록 하였다. 펌프에 의해 생기는 연동현상(pulsation)은 flow cell에서 측정을 불안정하게 하므로, damper를 도입하였다. 또 flow cell의 outlet 쪽의 튜빙을 길게 하여 그 끝을 waste 용액 내에 담그므로써, flow cell에서 발생하는 pulsation을 줄일 수 있었다. 모든 FIA 분석은 37°C 항온하에서 수행되었고 캐리어 용액의 조성은,

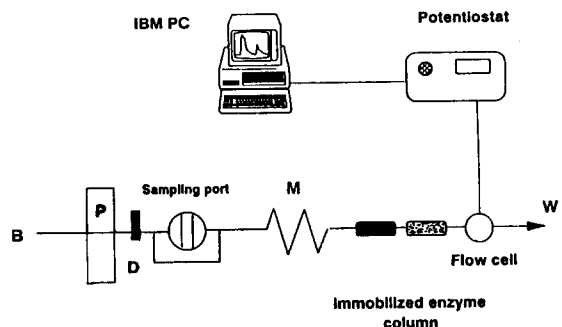


Fig. 2. Schematic diagram of FIA manifold; B, carrier buffer; P, peristaltic pump; D, damper; M, mixing coil(length, 50cm); W, wastes.

1.0% Triton X-100의 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)이었다.

### 자료 처리

FIA시스템에서의 측정결과를 처리하기 위해, PC-Lab Card(PCL 812, Advantech Co.)를 이용하여, 포텐시오스텔의 출력을 마이크로 컴퓨터(IBM-PC/XT compatible)로 접속(interfacing)하였다. 그리고 전극 응답의 처리분석과정에서 Boxcar averaging method(15)을 이용하여 측정시 발생하는 noise를 줄임으로써, 보다 안정된 결과를 얻을 수 있었다. 전극으로부터 발생하는 전류는 초당 일회씩 측정되었고, 이때 발생하는 전극응답의 최대값(peak height)으로부터 모든 시료의 농도를 알 수 있었다.

### 기타 분석방법

Allain 등(4)의 방법을 수정하여, COD, CEH의 활성을 정량하였다. 즉 발색시약의 조성은, 4-aminoantipyrine 0.116g/l, phenol 1.2302ml/l, peroxidase 250 P. U./ml, 0.5% Triton X-100의 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)의 발색시약 3ml에 100  $\mu$ l의 5g cholesterol/l ethanol의 기질을 가하여 섞은 후, 37°C에서 COD 일정량을 첨가하여 정해진 시간 후의 흡광도를 500nm에서 측정하여 활성을 구하였다. CEH 경우는, 50 I. U./l의 COD와 1.2947g/l의 sodium cholate가 추가된 발색시약을 사용하였고, 기질은 2g cholesteryl linoleate/l isopropanol이었다. 고정화 효소의 경우도 같은 방법으로 그 활성을 측정하였다(8). 아울러, 효소의 고정화 때, 고정화되지 않고 상등액에 남게 되는 효소량은 Bradford's method(16)로 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### CPG의 효소 결합능력과 활성 회수율

일정량의 CPG에 효소량을 변화시키면서 고정화시켰을 때, 효소가 고정화되는 정도를 살펴보았다. 가해지는 효소량이 200mg CPG 당 단백질량으로 약 2mg에서 7mg으로 증가하는 동안, 결합되는 단백질의 양은 선형적으로 증가하였다. 그때 5mg/200mg CPG 이상을 가한 조건하에서는 60% 내외의 일정한 고정화 수율을 얻었다. 본 연구에서 고정화의 목적이 분석에 있다는 점을 상기할 때, 혈청 콜레스테롤의 농도 범위에서 측정이 가능하도록 충분한 역가의 효소

가 고정화되는 조건을 찾는 것이 중요하다. 일반적으로 혈청시료 내에는 100  $\mu$ l 당 0.67  $\mu$ mole의 총 콜레스테롤이 존재하므로, 고정화 효소 컬럼에서 9 I. U. 이상의 활성도가 유지된다면 1ml/min의 유속에서 기질 모두가 과산화수소로 전환되는 좋은 분석 조건이 유지될 것이다. 본 연구에서는 200mg CPG의 담체에 효소 7mg을 반응시켜서, 약 16 I. U.의 활성을 갖는 고정화 담체를 얻었다. 이를 유리관에 충전시켜서 3~5 I. U. 내외의 활성을 갖는 고정화 효소 컬럼을 구성할 수 있었다. COD와 CEH 모두 위 조건으로 각각 고정화되었다.

### 전극간 전위차의 결정

형성된 전위차에 따라 전극반응에 참여할 수 있는 화학종이 구별되며 발생전류(anodic current)의 안정성과 감도가 변화하게 된다(12). 과산화수소가 선택적이며 안정적인 전극반응(anodic oxidation)을 일으키는 전위차를 알아보기 위해, 표준전극(S. C. E.) 대비 지시전극의 전위차를 +0.5mV/sec의 scan rate로 변화시키면서 생성되는 전류를 측정하였다. 서로 다른 과산화수소 농도에서 얻어지는 전류전압 곡선(current-potential curve)을 관찰하였을 때, +850mV 전후의 전위차에서 확산 전류현상이 관찰되었다. 이에 상응하는 보조전극(auxiliary electrode) 대비 지시전극(working electrode)의 전위차는 +600mV였으므로, 차후 flow-through cell의 이 전극계 경우에는 +600mV의 전위차에서 분석을 수행하였다.

### Flow-through cell에서 전극응답에 대한 시료량의 영향

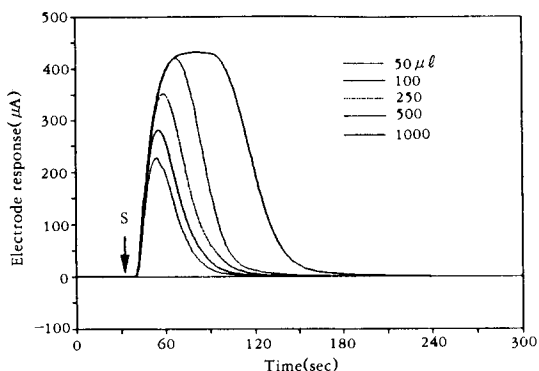
정지 또는 교반되는 상태에서의 측정(measurement in static cell)과는 달리, FIA 시스템에서는 시료층이 flow cell을 지나는 동안만 순간적인 측정(peak height mode)이 이루어지게 된다(13). 그러므로 주입되는 시료량이 증가할수록 발생신호도 따라 증가하게 되고, 일정량 이상에서는 정상상태의 응답이 얻어진다. 그러나 시료처리속도를 높이기 위해 시료분석의 감도를 적절하게 조절할 필요가 있다. Fig. 3(A)에서 1ml/min로 고정된 유속하에서 1,000  $\mu$ l의 과산화수소 시료는 정상상태의 신호를 보이나, 측정에 소요되는 시간(peak width)이 매우 오래 걸리는 것을 알 수 있다. 시료량을 감소시키에 따라 신호는 작아지고 peak width도 줄어드는 경향이 관찰되었다. 그러므로 전극응답 특성 분석(char-

acterization)에 이용된 시료량은  $100 \mu\ell$  로 고정되었다.

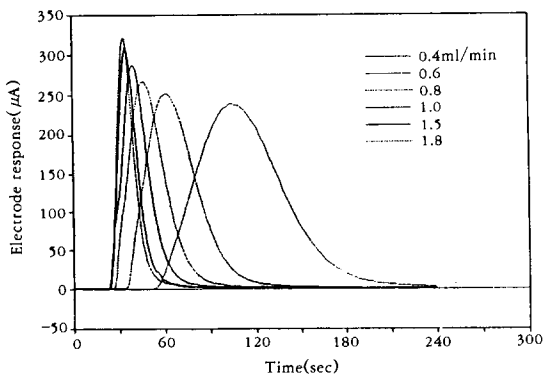
**Flow-through cell에서 전극응답에 대한 유속의 영향**

시료량과 캐리어 용액의 유속이 응답에 미치는 효과는 본질적으로 서로 같다. 즉 시료량이 많고 유속이 낮을수록, 시료층의 확산 정도는 감소하게 되고 detector에서 머무르는 시간이 증가하여 큰 신호가 발생된다. 그러나 다른 측정원리와는 달리 flow cell

에서 반응(electrochemical reaction)이 수반되므로, 유속에 따른 과산화수소의 응답변화를 관찰하였다. (Fig. 3(B)) 약 1.5ml/min 이상에서는 유속 변화에 따른 응답 차이가 크게 줄었으며, 아울러 측정 소요 시간도 비슷한 수준으로 유지되었다. 유속이 높아질수록 응답이 커지는 현상은 시료용액의 흐름에서 전극 표면으로의 물질전달이 빨라지기 때문이다. 또 0.8mm의 비교적 큰 내경을 가진 관이 사용되었으므로 시료층에 일어나는 확산현상이 전반적으로 큰 것도 그 이유의 하나로 들 수 있다.



(A)



(B)

**Fig. 3. Electrode response for  $H_2O_2$  under various operating conditions.**

(A) Effect of injected sample volume.

Flow rate was fixed at 1ml/min. Arrow indicates sampling point.

(B) Effect of flow rate of carrier buffer.

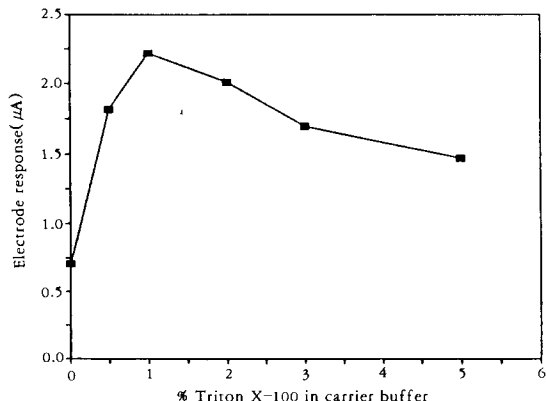
Sampling volume was  $100 \mu\ell$ .

**응답에 대한 Triton X-100의 영향**

혈청내 lipoprotein에 존재하는 콜레스테롤 에스테르가 효소반응을 받으려면, Triton X-100과 같은 계면활성제(surfactants)의 도움으로 용액 내로 잘 분산되어야 한다. 그러나 계면활성제는 효소활성과 안정성을 해치고, 아울러 전극반응도 방해할 수 있다. Fig. 4에서 보여지듯이 1.0% 이상의 Triton X-100 농도에서는, 유사 생체시료인 control serum에 대한 전극응답이 지속적으로 감소하였다. 그러므로 캐리어 용액에서의 농도를 최대 응답을 보이는 1.0%로 결정하였다.

**캐리어 용액의 유속에 따른 응답의 변화**

캐리어의 유속은 시료층의 확산을 지배하며, 고정화 효소 컬럼에서의 반응시간(retention time)을 규정한다. 일정량의 콜레스테롤과 cholesteryl linoleate을 FIA 시스템으로 분석하였을 때, 유속이 변화함에 따라 Fig. 5과 같은 응답 양상이 보여졌다. 500



**Fig. 4. Effect of triton X-100 concentration in carrier buffer on the electrode response for Accutrol.**

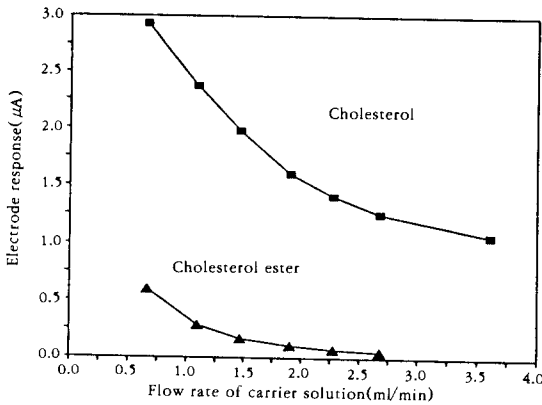
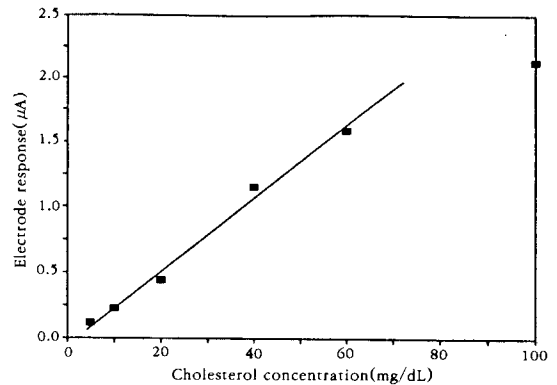


Fig. 5. Effect of flow rate of carrier buffer on electrode response. Symbols are: (■) 50mg/dL free cholesterol, (▲) cholesteryl linoleate.

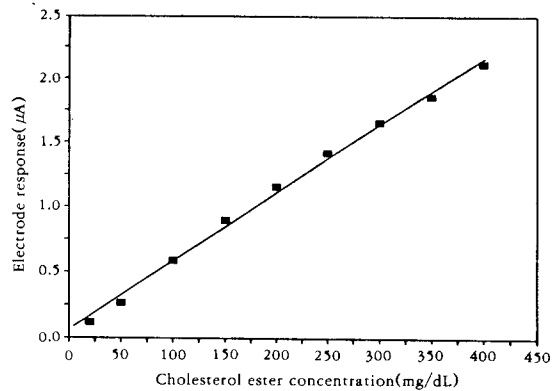
mg/dL의 비교적 낮은 시료 농도에도 불구하고 응답이 유속에 대해 의존성이 큰 원인은, 고정화 효소의 활성이 충분하지 못해서 전환율이 작기 때문이다. 에스테르 분석시 유속에 의존하는 경향이 보다 크며, 50mg/dL 에스테르에 상당하는 동일한 몰 농도의 유리 콜레스테롤이 보이는 신호의 20% 수준에 불과한 작은 신호가 얻어졌다. 이는 CEH 고정화 효소 컬럼에서 시료층의 확산(dispersion)이 추가로 발생하며, CEH가 고정화된 컬럼의 전환율이 작은 데서 대부분이 기인한다. 낮은 유속에서의 분석은 감도가 우월하지만 측정소모시간(peak width)이 4~7분 정도로 매우 길어지므로, 차후 모든 분석은 1.5ml/min에서 수행되었다.

**콜레스테롤에 대한 Calibration curves**

시료량이 100 µl 이며 캐리어 용액의 유속이 1.5 ml/min일 때, 콜레스테롤이 농도와 응답과의 연관성을 살펴보았다. 먼저 유리 콜레스테롤의 경우, 약 60 mg/dL의 농도까지 선형적인 응답을 보였고, 이때 상관계수는 0.994였다. 이론적으로 계산된 최소 측정 한계는 S/N(signal to noise) ratio가 3일 때 1.2mg/dL이었고, 실제 측정도 비슷한 몰 농도범위(0.387 mg/dL)까지 가능했다. 총콜레스테롤 분석의 경우, 400mg/dL까지의 응답이 선형성을 나타냈고, 좋은 상관계수(r=0.998)가 얻어졌다. S/N ratio가 3일 때의 그 최소 측정한계는 6.12mg/dL로서 임상진단에서 요구되는 10mg/ml의 감도를 얻을 수 있었다.



(A)



(B)

Fig. 6. Calibration curve for free cholesterol(A) and cholesteryl linoleate(B).

Fig. 6의 (A)와 (B)에서 각각 유리 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르 표준용액에 대한 calibration curve를 보였다. 아울러 혈청 내 존재하는 총콜레스테롤이 130~260mg/dL임(2)을 고려할 때, 본 FIA 시스템은 시료희석 등의 전처리과정 없이 분석이 가능한 장점을 지녔다고 생각된다.

**분석의 정밀성(precision)과 정확성(accuracy)**

서로 다른 여러 농도에서 그 신호를 관찰하였다. (Table 1) 모든 시료가 연속적인 주입으로 10회 분석되었다. 그외 다른 농도 모두 coefficient of variation(CV)이 2.5% 이하인 것으로 조사되었다. 또한 least square method에 의한 상관관계식에서의 계산치와 실제 농도값 역시 그 차이가 2.5% 이내였다. 이러한 분석의 정밀성과 정확성은 미국 National In-

**Table 1. Precision and accuracy of FIA results.**

Concentration (mg/dL)	Mean ( $\mu$ A)	SD* ( $\mu$ A)	CV** (%)	Recovery (%)
Free cholesterol				
10	0.2270	0.0052	2.29	99.2
60	1.5857	0.0391	2.47	102.2
100	2.2186	0.0530	2.49	—
Cholesterol linoleate				
100	0.5866	0.0114	1.94	98.6
250	1.4157	0.0113	0.80	100.2

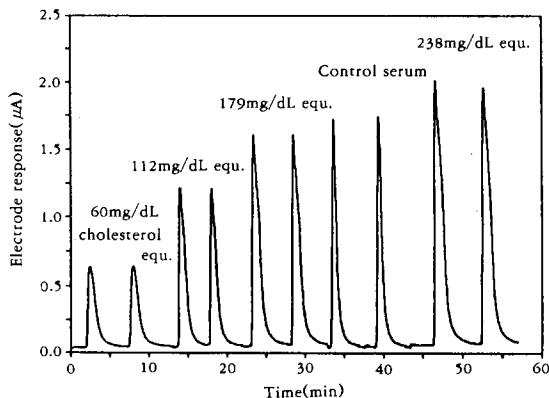
\*SD: standard deviation

\*\*CV: coefficient of variation

stitute of Health의 산하 위원회인 Laboratory Standardization Panel on Blood Cholesterol에 의해 규정된 요건(<3%)(2)에 부합되는 좋은 결과이다.

### 그외의 고찰

개발된 FIA에서의 전형적인 응답은 Fig. 7과 같다. 주어진 시스템에서 응답의 안정성은 고정화 효소 컬럼의 활성에 크게 의존한다. 고정화 효소는 4°C, 0.1M potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)에서 보관할 경우 FIA 시스템에서의 응답이 6개월 이상 유지(>95%)되었으나, 약 500회 이상의 간헐적 분석에서 FIA 응답은 50~70% 수준으로 감소하였다. 고정화 효소 컬럼을 이용한 콜레스테롤 측정용 FIA 경우, 시간당 10~20회의 분석처리속도가 보고된 바 있다(3, 8, 10). 본 시스템에서는 총콜레스테롤 분석시 carry-over를 1%로 허용하는

**Fig. 7. Typical response pattern of FIA.**

최대 시료처리속도(sampling frequency)는 23 samples/hr로서 보다 신속한 분석이 가능했다. 유리 콜레스테롤 분석의 경우 고정화 컬럼이 가진 역가와 시료량에 상관없이 약 60~80mg/dL까지의 응답만이 선형적이었으나, 총콜레스테롤 분석은 400mg/dL 내외의 농도까지 선형응답을 하였다. 이는 Fig. 5에서 알 수 있듯이 두 컬럼 모두 충분치 못한 활성을 가지고 있으나, CEH 컬럼에서 소량(약 20%) 전환되어진 유리 콜레스테롤이 COD 컬럼에서 상대적으로 큰 전환율을 갖고 과산화수소를 생성하기 때문이라 생각된다. 따라서 같은 몰농도의 유리 콜레스테롤과 그 에스테르에서의 신호가 본 FIA 시스템에서의 경우처럼, 서로 차이를 보이기도 한다(8). 그러므로 CEH가 상대적으로 과량 고정화된 컬럼이 도입하는 것이 필요하다고 판단된다.

### 요 약

고정화 효소를 이용하여 콜레스테롤을 신속, 정확하게 측정할 수 있는 Flow injection analysis(FIA) 시스템을 개발하였다. 콜레스테롤 산화효소와 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소를 controlled pore glass과 glutaraldehyde를 사용해 얻어진 고정화 효소를, 유리관에 충전해 얻어진 컬럼은 약 3-5 I. U.의 활성을 나타내었다. 백금을 이용해 구성된 전극은 +600mV에서 효소반응 결과 생성된 과산화수소에 대해 특이적으로 응답하였다. 구성되어진 FIA 시스템의 분석능을 향상시키기 위하여 시료량, 캐리어 용액의 유속과 조성 등의 변화에 따른 응답을 조사하였다. 최적화된 운영조건하에서 유리 콜레스테롤과 콜레스테롤 에스테르 표준용액에 대한 응답은 각각 60, 400mg/ml까지 선형성( $r=0.994$  및  $0.998$ )을 나타내었다. 모든 시료의 분석은 정확, 정밀(<2.5%)한 것으로 조사되었다. 시간당 23회의 분석이 가능하였고, 500회의 간헐분석 후에 응답감도가 약 반으로 감소하였다.

### 참고문헌

1. R. I. Levy(1981), *Clin. Chem.*, **27/5**, 653.
2. Laboratory Standardization Panel(1988), *Clin. Chem.*, **34**, 183.
3. M. Masoom and A. Townshend(1985), *Anal. Chim. Acta.*, **174**, 293.
4. C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W.

- Richmond and P. C. Fu(1974), *Clin. Chem.*, **20/4**, 470.
5. T. Trettnak and O. S. Wolfbeis(1990), *Anal. Biochem.*, **184**, 124.
  6. N. L. Malavolti, D. Pilosof and T. A. Nieman (1985), *Anal. Chim. Acta.*, **170**, 199.
  7. T. Yao(1989), Chapter 11 in *Applied Biosensors*(Butterworths).
  8. I. Karube, K. Hara, H. Matsuoka and S. Suzuki(1982), *Anal. Chim. Acta.*, **139**, 127.
  9. T. Tatsuma and T. Watanabe(1991), *Anal. Chim. Acta.*, **242**, 85.
  10. T. Yao, M. Sato, Y. Kobayashi and T. Wasa (1985), *Anal. Biochem.*, **149**, 387.
  11. B. F. Y. You Hin and C. R. J. Lubrano (1992), *Sensors and Actuators*, **B7**, 339.
  12. G. G. Guibault and G. J. Lubrano(1973), *Anal. Chim. Acta.*, **64**, 439.
  13. E. A. H. Hall(1991), *Current Opinion in biotechnology*, **2**, 9.
  14. H. H. Weetal and M. J. Lee(1989), *Appl. Biochem, Biotechnol.*, **22**, 311.
  15. G. Dulaney(1975), *Anal. Chem.*, **47**, 28A.
  16. M. M. Bradford(1976), *Anal. Biochem.*, **50**, 2188.