

화학발광법에 의한 수용액 중의 퀴닌 정량

이현숙 · 김태연* · 최경혜** · Mohammad Mainul Karim** · 배현숙 · 이상학†

Determination of quinine in aqueous solution by chemiluminescence method

Hyun Sook Lee, Tae Yeon Kim*, Kyoung Hye Choi**, Mohammad Mainul Karim**,
Hyun Sook Bae, and Sang Hak Lee†

Abstract

A method to determine quinine in aqueous solution by chemiluminescence method using a stopped flow system has been studied. The method is based on the increased chemiluminescence intensity with the addition of quinine to a solution of lucigenin and hydrogen peroxide. The effects of KOH concentration, flow rate of reagents, H₂O₂ concentration used for the masking of quinine on the chemiluminescence intensity have been investigated. The calibration curve for quinine was linear over the range from 1.0×10^{-7} M to 1.0×10^{-3} M, coefficient of correlation was 0.993 and the detection limit was 3.0×10^{-8} M under the optimal experimental conditions of 1.0 M, 1.5 M, 3.0 mL/min for the concentration of H₂O₂, KOH and flow rate of reagents, respectively.

Key Words : chemiluminescence, quinine, flow-injection analysis

1. 서 론

퀴닌은 키나나무껍질의 키나알킬로이드의 주 성분인 퀴닌, 퀴니딘, 신코닌, 신코니딘 중 한 성분이다^[1,5]. 퀴닌은 키나알킬로이드에서 분리하며, 퀴니딘과 입체 이성질체를 이루고 있으며 전체 키나알킬로이드의 70-90%를 이룬다. 처음에는 키나나무껍질에서 추출한 퀴닌으로 대부분 항말라리아제로 사용하였으며, 퀴닌의 가격이 저렴하고, 응용범위가 넓기 때문에 1970년대 호프만-라 로체 회사에서 합성퀴닌을 생성하여 심장 부정맥 억제작용, 근육성 진통제, 해열제 및 유기합성 촉매제로 이용되었다^[2-4]. 또한, 퀴닌은 음료수나 식품에서 매운 쓴맛을 나타낸다. 최근에 퀴닌은 퀴닌과 비타민 B₆가 반응하여 피부부에 효과가 있다는 것을

발견함으로써 저자극성 화장품 및 헤어 제품에 이용되고 있다^[5]. 이와 같은 퀴닌의 특성 때문에 산업, 의학 및 실생활 분야 등에 연구가 활발히 진행되고 있다.

퀴닌의 정량분석에 많이 사용된 방법에는 형광분광법(spectrofluorometry)^[7], 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)^[1,5-6], 가스크로마토그래피(gas chromatography, GC)^[1,8], 얇은층 크로마토그래피(thin-layer chromatography, TLC)^[1,5], 모세관 전기영동법(capillary electrophoresis, CE)^[12], 화학발광법(chemiluminescence, CL)^[9] 및 동시 형광분광법(fluorimetric synchronous technique^[7,10] 등이 있다. 화학발광법은 화학발광을 일으키는 화학종의 수가 적기 때문에 비교적 제한된 화학종에만 이용되고 있지만, 분석과정이 단순하며, 특히 광원을 이용하지 않고 들뜨는 데 필요한 에너지를 화학반응을 통해 얻으므로 신호 대 잡음비(S/N ratio)가 작아서 검출한계가 낮다는 장점을 가지고 있기 때문에 최근에는 화학발광법을 많이 이용하고 있다^[12].

본 연구에서는 자동흐름분석법을 이용하여 lucigenin 과 H₂O₂에 의한 화학발광을 이용하여 quinine을 정량하는 방법에 대하여 조사하였다. 시료용액에 주입되는

경북대학교 공과대학 센서 및 디스플레이공학과(Department of Sensor and Display Engineering, Kyungpook National University)

*경북대학교 교육대학원 화학교육과(Department of Chemistry Education, Graduate School of Education, Kyungpook National University)

**경북대학교 자연과학대학 화학과(Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Kyungpook National University)

†Corresponding author: shlee@knu.ac.kr

(Received : January 26, 2006, Accepted : March 10, 2006)

KOH의 농도, H_2O_2 의 농도 및 자동흐름 주입장치에서 주입되는 시약들의 흐름속도가 화학발광에 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 분석 최적조건에서 화학발광 방법으로 quinine을 정량 할 때의 검정곡선을 얻었으며 검출한계를 구하였다.

2. 실험

2.1. 시약

화학발광 시약으로는 1.0×10^{-4} M Bis-N-methylacridium nitrate(lucigenin, guaranteed reagent, Aldrich, USA) 저장용액을 제조한 후에 묽혀서 사용하였다. 화학발광 반응이 일어날 때 pH를 조절하기 위하여 KOH(Duksan Pure Chemical Co. Ltd) 수용액을 사용하였다. 산화제로는 H_2O_2 (guaranteed reagent, Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)를 사용하였고, quinine의 저장용액으로는 $C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot HCl$ (Sigma Chemical Co., USA)을 사용하여 제조하였다. 본 실험에서 사용한 다른 시약들은 특급 시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 모든 용액의 제조는 Millipore사(Bedford, MA, USA)의 Milli-Q water system으로 얻은 탈이온수를 사용하였으며, 표준 용액은 실험 직전에 적당한 농도로 묽혀서 사용하였다.

2.2. 기기

본 실험에서 사용한 화학발광 장치와 자동흐름 분석 장치의 개략도를 그림 1에 나타내었다.

본 실험에서 사용한 주입용 연동펌프(Ismatec, Model 404, Switzerland)는 H_2O_2 , KOH 및 lucigenin 및 시료를 흐름셀에 자동으로 운반하는 데에 이용하였고, 배출용 연동펌프(MS-4 Reglo/6-100, Switzerland)는 흐름셀

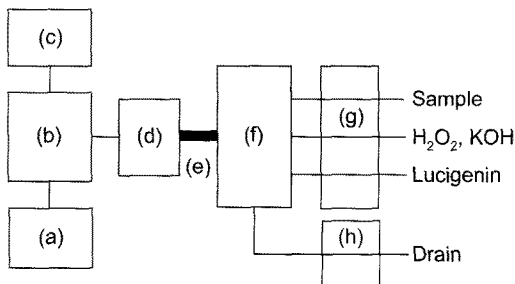


그림 1. 화학발광 장치의 개략도

Fig. 1. Schematic diagram of the flow system for chemiluminescence: (a), personal computer; (b), PMT; (c), power supply; (d), monochromator; (e), fiber optic bundle; (f), cell compartment; (g) and (h), peristaltic pump.

에서 측정이 마친 용액과 세척용액의 배출에 이용하였다. 연동펌프를 이용하여 4개의 주입관에 시료와 화학발광을 위한 3가지 시약을 각각 0.3 mL씩 취한 후에 이들을 흐름속도로 3.5 mL/min(22 rpm)의 흐름속도로 작동시켜 흐름셀에 주입하였다. 흐름셀의 용량이 4 mL 이고, 이러한 방법으로 주입한 하였을 때 주입되는 용액의 전체 부피는 1.2 mL이었다. 주입이 완료되면, 일정시간동안 연동펌프를 정지한 상태에서 방출되는 화학발광을 광섬유다발(Oriel, Model 77800, USA)을 통하여 단색화장치를 거치도록 하였으며, 화학발광 세기의 측정하기 위하여 photomultiplier tube(PMT, Hamamatsu, Model R928, USA)를 사용하였다. PMT의 전압은 950 V로 고정하였다. 측정이 끝나면 시료의 측정을 위한 방법과 같은 방법으로 4개의 주입관에 탈기한 탈이온수를 취하여 주입하여 세척하였다.

2.3. 실험 방법

본 실험에서 사용한 용액은 다음과 같이 제조하였다. Quinine 용액은 1.0×10^{-2} M quinine 저장용액을 제조한 후에 묽혀서 사용하였다. H_2O_2 용액과 KOH 용액은 각각 3.0 M의 저장용액을 탈이온수로 제조한 수에 묽혀서 사용하였다. 흐름셀에 연동펌프를 이용하여 22 rpm 속도로 1.0 M의 H_2O_2 용액과 1.5 M KOH 용액 및 3.5×10^{-3} M lucigenin 용액을 도입하고, 시료용액을 주입하였다. 흐름셀에서 발생하는 화학발광은 491.0 nm로 고정된 단색화장치를 통과시킨 후 측정하였다. 검출한계를 구할 때의 신호 대 잡음비는 3으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 화학발광 스펙트럼

Quinine 용액에서 측정파장에 따른 화학발광 세기를 알아보기 위하여 측정파장을 변화시키면서 1.0×10^{-2} M quinine 용액, 1.0 M H_2O_2 용액, 1.0 M KOH 용액 및 1.0×10^{-4} M lucigenin 용액을 사용하였고, 흐름셀에 주입하여 화학발광의 세기를 측정하였다. 그 결과는 그림 2에 나타내었다.

그림 2에서 볼 수 있듯이 lucigenin의 방출세기는 491.0 nm에서 가장 크게 나타났다. 이 파장은 lucigenin의 파장 범위인 430.0 nm~530.0 nm 포함된다. 따라서 이 이후의 실험에서는 방출파장을 491.0 nm로 고정시켜 실험하였다.

3.2. Lucigenin 농도의 영향

Quinine 용액에서 lucigenin의 농도에 따른 화학발광

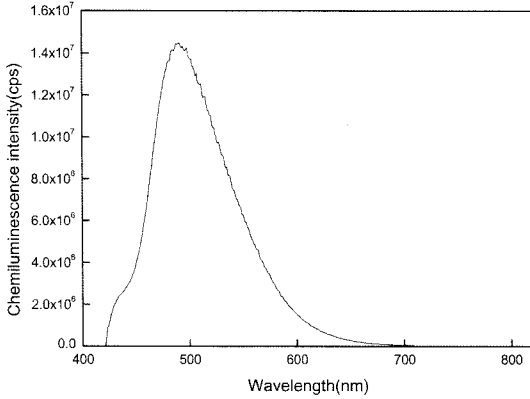


그림 2. Lucigenin의 화학발광 spectrum
Fig. 2. Chemiluminescence spectrum of lucigenin in aqueous solution containing hydrogen peroxide: [lucigenin], 1.0×10^{-4} M; $[H_2O_2]$, 1.0 M; [KOH], 1.0 M; flow rate, 2.5 mL/min.

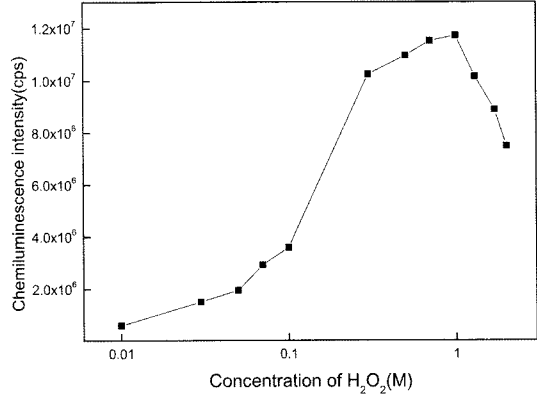


그림 4. 화학발광 세기에 미치는 H_2O_2 농도의 영향
Fig. 4. Effects of H_2O_2 concentration on chemiluminescence intensity: [quinine], 1.0×10^{-2} M; [lucigenin], 3.5×10^{-3} M; [KOH], 1.0 M; flow rate, 2.5 mL/min; λ_{em} , 491.0 nm.

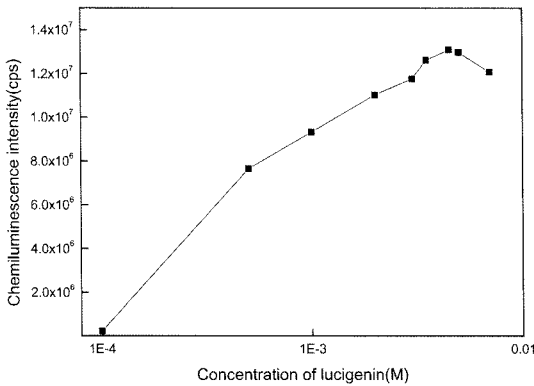


그림 3. 화학발광 세기에 미치는 lucigenin 농도의 영향
Fig. 3. Effects of lucigenin concentration on chemiluminescence intensity: [quinine], 1.0×10^{-2} M; [KOH], 1.0 M; $[H_2O]$, 1.0 M; flow rate, 2.5 mL/min; λ_{em} , 491.0 nm.

세기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흐름셀에 주입되는 흐름속도를 2.5 mL/min로 하고, 1.0×10^{-2} M quinine 용액, 1.0 M KOH 용액 및 1.0 M H_2O_2 용액으로 고정하고, lucigenin의 농도를 변화시키면서 화학발광의 세기를 측정하였고, 그 결과를 그림 3에 나타내었다.

그림 3에서 볼 수 있듯이 lucigenin의 농도는 3.5×10^{-3} M에서 화학발광 세기가 가장 큰 세기를 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서 lucigenin의 농도를 3.5×10^{-3} M로 고정하여 실험하였다.

3.3. H_2O_2 농도의 영향

Quinine 용액에서 H_2O_2 가 주입되는 농도에 따른 화

학발광 세기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흐름셀에 주입되는 흐름속도를 2.5 mL/min로 하고, 1.0×10^{-2} M quinine 용액, 1.0 M KOH 용액 및 3.5×10^{-3} M lucigenin 용액으로 고정하고, H_2O_2 의 농도를 변화시키면서 화학발광의 세기를 측정하였고, 그 결과를 그림 4에 나타내었다.

그림 4에서 볼 수 있듯이 H_2O_2 의 농도가 1.0 M에서 최대의 화학발광 세기를 보이고, 그 이상의 농도에선 화학발광 세기가 감소함을 알 수 있다. 1.0 M까지 화학발광 세기가 계속 증가하는 이유는 lucigenin의 산화되는 양이 증가하기 때문이고, 그 이후의 부피에서는 산화제의 양이 과량으로 존재하게 되어 화학발광 시약의 농도가 묽어지기 때문에 화학발광 세기가 감소하였다고 생각된다. 따라서 3.5×10^{-3} M lucigenin에 주입되는 H_2O_2 의 최적의 농도는 1.0 M로 하여 모든 실험을 행하였다.

3.4. KOH 농도의 영향

Quinine의 정량에서 주입되는 KOH의 농도가 화학발광 세기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흐름셀에 주입되는 시약의 흐름속도를 2.5 mL/min로 고정하고, 3.5×10^{-3} M lucigenin, 1.0×10^{-2} M quinine 표준용액 및 1.0 M H_2O_2 의 농도로 고정하고, KOH의 농도를 변화시키면서 화학발광의 세기를 측정하였고, 그 결과를 그림 5에 나타내었다.

그림 5에서 볼 수 있듯이 KOH의 농도는 1.5 M에서 가장 큰 세기를 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서 KOH 농도를 1.5 M로 고정하여 실험하였다.

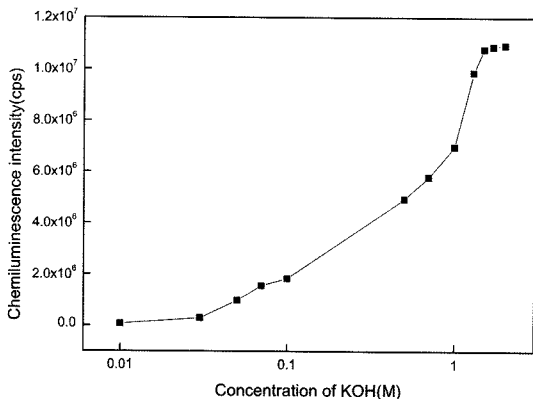


그림 5. 화학발광 세기에 미치는 KOH 농도의 영향
 Fig. 5. Effects of KOH concentration on chemiluminescence intensity: [quinine], 1.0×10^{-2} M; [lucigenin], 3.5×10^{-3} M; [H₂O₂], 1.0 M; flow rate, 2.5 mL/min; λ_{em} , 491.0 nm.

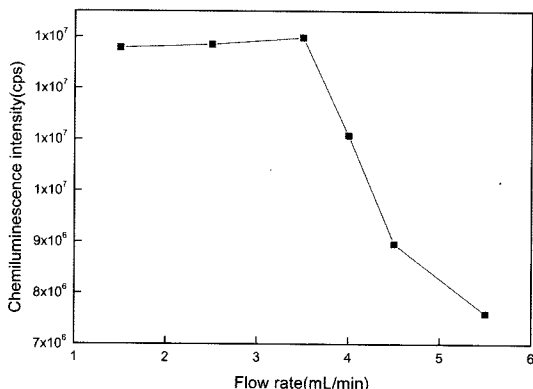


그림 6. 화학발광 세기에 미치는 흐름 속도의 영향
 Fig. 6. Effects of flow rate concentration on chemiluminescence intensity: [quinine], 1.0×10^{-2} M; [lucigenin], 3.5×10^{-3} M; [H₂O₂], 1.0 M; [KOH], 1.5 M; flow rate, 2.5 mL/min; λ_{em} , 491.0 nm.

3.5. 흐름속도의 영향

화학발광 시약의 주입 속도가 화학발광에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3.5×10^{-3} M lucigenin, 1.5 M KOH 용액, 1.0 M H₂O₂ 용액 및 1.0×10^{-2} M quinine 용액의 농도를 고정하고, 연동펌프의 흐름속도를 1.0 mL/min~5.5 mL/min로 변화시키면서 화학발광의 세기를 측정하였다. 그 결과를 그림 6에 나타내었다.

그림 6에서 볼 수 있듯이, 3.5 mL/min까지는 흐름속도가 증가할수록 화학발광 세기는 증가함을 알 수 있다. 따라서 이후 실험에서는 흐름속도를 3.5 mL/min로 고정하여 실험하였다.

3.6. Quinine의 검정곡선

Quinine의 정량을 위하여 흐름셀에 주입되는 시약의 흐름속도를 3.5 mL/min로 하여, 1.5 M KOH 용액, 3.5×10^{-3} M lucigenin 및 1.0 M H₂O₂ 용액의 농도를 고정하고, quinine 용액의 농도를 변화시켜가며 농도에 따른 화학발광세기를 측정하여 검정곡선을 얻었다. 그 결과를 그림 7에 나타내었다.

그림 7 볼 수 있듯이 검정곡선의 직선성이 성립하는 범위는 1.0×10^{-7} M에서 1.0×10^{-3} M이었다. 이 농도 범위에서의 상관계수는 0.993이었고, 검출한계는 3.0×10^{-8} M이었다.

3.7. 방해이온에 대한 영향

본 실험에서는 quinine의 정량을 위하여 방해효과를 나타내는 이온들을 조사하였다. 조사 대상은 soft drink 중에 주로 존재하는 이온들로 ascorbic acid, Fe⁺, glu-

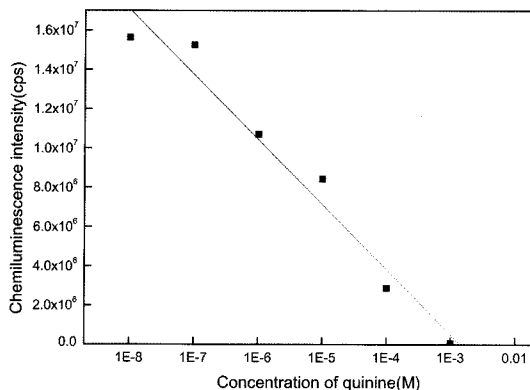


그림 7. Quinine의 검정곡선
 Fig. 7. Calibration curve for quinine: [lucigenin], 3.5×10^{-3} M; [H₂O₂], 1.0 M; [KOH], 1.5 M; flow rate, 3.5 mL/min; λ_{em} , 491.0 nm.

표 1. 방해물질이 퀴닌의 정량에 미치는 영향

Table 1. Effect of interferent species on the determination of quinine ($50 \mu\text{gmL}^{-1}$): [quinine], 1.0×10^{-2} M; [lucigenin], 3.5×10^{-3} M; [H₂O₂], 1.0 M; [KOH], 1.5 M; flow rate, 3.5 mL/min; λ_{em} , 491.0 nm, RSD: relative standard deviation

Substances	Concentration added (μgmL^{-1})	Recovery (%)
Ascorbic acid	100	99.3
Fe ²⁺	100	105
Glucose	100	102
Catechin	100	97.3

cose, catechin 등을 조사하였다. 이러한 이온들의 방해 효과는 표 1에 나타내었다.

방해효과는 <5%이면 분석물질에 영향을 미치지 못한다. 표 1에서 볼 수 있듯이 ascorbic acid, Fe⁺, glucose, catechin은 quinine의 정량에 큰 방해효과를 나타내지 않았다.

4. 결 론

Quinine을 화학발광을 이용한 자동흐름분석법으로 정량하기 위하여 lucigenin, H₂O₂ 및 KOH의 최적조건을 구하였다. 최적조건은 흐름셀에 주입되는 시약의 흐름속도를 3.5 mL/min로 하고, lucigenin 용액은 3.5×10⁻³ M, H₂O₂ 용액은 1.0 M 및 KOH 용액은 1.5 M이며, 방출파장은 491.0 nm이었다. 이러한 최적 조건 하에서 quinine의 농도에 대한 화학발광 세기를 측정하여 검정곡선을 얻었고, 직선성이 성립하는 범위는 1.0×10⁻⁷ M에서 1.0×10⁻³ M이었다. 이 농도 범위에서 상관계수는 0.993이었고, 검출한계(3σ)는 3.0×10⁻⁸ M이었다. 방해이온들은 quinine의 정량에 크게 방해효과를 미치지 못하였다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 중점연구소(KRF-2004-005-C00009) 지원으로 수행되었음.

참고 문헌

[1] D. V. McCalley, "Analysis of the cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques", *J. Chromatogr. A*, vol. 967, no. 1, pp. 1-19, 2002.

[2] J. L. Margitfalvi, E. Talas, E. Tfirst, C. V. Kumar, and A. Gergly, "The role of cinchona alkaloids in enantioselective hydrogenation reactions: Are they modifiers or hosts involved in supramolecular heterogeneous catalysis", *Appl. Catal. A*, vol. 191, no. 1,2, pp. 177-191, 2000.

[3] H. N. Tho and G. Sirois, "Comparison of two spec-

trofluorometric procedures for quinidine determination in biological fluids", *J. Pharm. Sciences*, vol. 66, no. 4, pp. 591-592, 1977.

[4] M. D. Edstein, A. Prasitthipayong, A. Sabchareon, T. ChongsuphaJisiddhi, and H. K. Webster, "Simultaneous measurement of quinine and quinidine in human plasma, whole blood, and erythrocytes by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *Ther. Drug Monit.*, vol. 12, no. 5, pp. 493-500, 1990.

[5] R. Gatti, M. G. Gioia, and V. Cavriani, "Determination of cinchona alkaloids and vitamin B6 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *Anal. Chim. Acta*, vol. 512, no. 1, pp. 85-91, 2004.

[6] D. V. McCalley, "Analysis of cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.*, vol. 260, pp. 184-188, 1983.

[7] J. A. Murillo Pulgarín and A. Alañón Molina, "Direct determination of quinidine in urine", *Anal. Chim. Acta*, vol. 317, pp. 359-364, 1995.

[8] M. Verzele, G. Redant, S. Qureshi, and P. Sandra, "High-temperature quantitative glass capillary gas chromatography. Analysis of piperine and of quinine-quinidine", *J. Chromatogr.*, vol. 199, pp. 105-112, 1980.

[9] B. Li, Z. Zhang, and M. Wu, "Flow-injection chemiluminescence determination of quinine using on-line electrogenerated cobalt (III) as oxidant", *Talanta*, vol. 51, no. 99, pp. 515-521, 2000.

[10] J. A. Murillo and A. Alañón, "Matrix isopotential synchronous fluorescence direct determination of gentisic acid in urine", *Anal. Chim. Acta*, vol. 296, pp. 87-97, 1994.

[11] K. Robarrds and P. J. Worsfold, "Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence", *Anal. Chim. Acta*, vol. 266, pp. 147-173, 1992.

[12] S. Zaugg and W. Thormann, "Capillary electrophoretic separation, immunochemical recognition and analysis of the diastereomers quinine and quinidine and two quinidine metabolites in body fluids", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 24, pp. 785-799, 2001.

**이 현 숙**

- 1974년 대구가톨릭대학교 대학원 약학과 졸업(약학석사)
- 현재 경북대학교 대학원 센서및디스플레이공학과 석사과정
- 주관심분야 : 화학 및 바이오센서, 한약 재료 분석법

김 태 연

- 1998년 경일대학교 화학공학과 졸업 (학사)
- 현재 경북대학교 교육대학원 화학교육전공 석사과정

**최 경 혜**

- 2004년 영남대학교 화학과 졸업(학사)
- 현재 경북대학교 대학원 화학과 석사과정
- 주관심분야 : 화학 및 바이오센서

**Mohammad Mainul Karim**

- 2001년 방글라데시 다카대학교 졸업
- 현재 경북대학교 대학원 화학과 박사과정
- 주관심분야 : 화학 및 바이오센서

**배 현 숙**

- 2000년 대구가톨릭대학교 보건과학대학원 졸업(석사)
- 2005년 경북대학교 대학원 센서및디스플레이공학과 박사수료
- 현재 경북외국어테크노대학 메디컬스킨케어과 교수

이 상 학

- 『센서학회지 제13권 제3호』 pp. 169 참조
- 현재 경북대학교 자연과학대학 화학과 교수