

¹H NMR에 의한 γ -Aminobutyric Acid의 간단하고 신속한 정량분석법 확립과 고수 (*Coriandrum sativum* L.) 현탁배양세포로부터 γ -Aminobutyric Acid의 생산

김석원¹, 유장렬²

한국생명공학연구원, 생물자원센터¹, 식물유전체연구센터²

Establishment of a Simple and Rapid Method for Quantitative Determination of γ -Aminobutyric Acid Using ¹H NMR and Production of γ -Aminobutyric Acid in Cell Suspension Cultures of *Coriandrum sativum* L.

Suk Weon Kim^{1*} and Jang R. Liu²

¹Biological Resource Center and ²Plant Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and
Biotechnology (KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT This study describes a simple and rapid method for quantitative determination of γ -aminobutyric acid (GABA) using ¹H NMR spectroscopy from whole cell extracts of plant suspension cultures. When 9 cell lines derived from 8 species of higher plants maintained in liquid Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were subjected to ¹H NMR, a cell line of *Coriandrum sativum* L. exhibited the highest level of GABA. The level reached up to 16.9 mg/dry wt when cells were cultured in MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D after 3 weeks of incubation. The method for quantitative determination of GABA using ¹H NMR established in this study could be applied to high-throughput screening of various plant resources for GABA production and the cell suspension culture system of *C. sativum* could be further developed for commercial production of GABA.

서 론

GABA (γ -aminobutyric acid)는 자연계에 분포하는 비단백질성 아미노산의 일종으로 고등 동물에서는 뇌에 존재하는 신경 전달 물질로 뇌의 대사 항상 치료제나 고혈압 저하 효과 및 이뇨효과 등 여러 생리작용이 보고된 대표적인 기

능성 물질이다. 식물에서 GABA의 생합성은 주로 glutamate decarboxylase (EC 4.1.1.15)에 의해 합성되지만 일부는 putrescine의 산화과정에서 만들어지기도 한다.

현재까지 GABA의 생합성은 여러 생물학적 또는 환경적 스트레스 (anoxia, hypoxia, 저온, 고온, 암 처리, 접촉, 상처, 염분, 병원균 침입 등)에 의해 촉진된다 (Bown and Shelp 1989, Satyanarayan and Nair 1990, Shelp et al. 1995, Ratchiffe 1995, Reggiani et al. 1988, Menegus et al. 1989, Chung et al.

*Corresponding author Tel 042-860-4647 Fax 042-860-4677

E-mail: kimsu@kribb.re.kr

1992). 식물세포에서 GABA의 축적은 스트레스에 의한 식물세포의 산성화과정에 대한 적응 및 방어기작으로 여겨지지만 아직까지 식물체내에서 GABA의 정확한 생리적 기능은 명확하지 않다.

또한 GABA는 주로 발아현미, 녹차 및 콩잎 등에 많이 함유되어있으며 상업적 활용을 위한 많은 생산성 향상 연구들이 이루어지고 있으나 신뢰할만한 간단하고 신속한 정량분석 방법이 개발되지 못하여 보다 다양한 식물자원으로부터 GABA의 대량생산을 위한 체계적인 접근이 이루어지지 못하고 있다.

GABA의 정량 및 정성분석은 일반적으로 흡광도측정법 (Guojin and Alan 1997)과 아미노산 추출 후 HPLC를 이용하는 HPLC분석법 (Jarret et al. 1986) 등이 일반적으로 이용되고 있다. 그러나 이들 분석방법은 사전 준비과정이 복잡하고 시간이 많이 소요될 뿐 아니라 측정 시료간의 재현성이 높지 않다. 따라서 보다 신속하고 재현성이 높은 GABA의 정량분석 방법이 확립된다면 GABA의 대량생산 연구에 효율적인 활용이 가능할 것으로 기대된다.

NMR 분석방법은 대부분의 생물 시료에 존재하고 있는 ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{32}P 원소를 포함하고 있는 화합물의 화학적 특이성에 따른 metabolic fingerprints를 제공하는 분석 방법이다 (Bligny and Douce 2001). 특히 proton NMR spectroscopy는 상대적으로 높은 감수성 및 다양한 대사산물을 측정할 수 있어 여러 생체 내 및 기내 시료의 비파괴적인 측정 수단으로 활용이 되고 있다. NMR를 이용한 대사산물의 정량분석은 매우 의미 있는 생화학적인 정보를 제공하고 있으며 (Ward et al. 2003) 특히 임상시료의 경우 질병관련 대사산물을 탐색하는데 널리 이용되고 있다 (Gavaghan et al. 2000). 최근

^1H NMR spectroscopy는 분석기기의 분해능이 크게 향상됨으로써 생물의학 및 생체 내 대사산물의 정량분석에 널리 활용되고 있다 (Choi et al. 2003, Kim et al. 2004, Stephenson and Bell 2005, Kim et al. 2007).

본 연구에서는 ^1H NMR spectroscopy를 이용하여 식물세포 내 GABA의 정량분석체계를 확립하고 이를 활용하여 여러 식물세포주로부터 GABA 함량이 높은 세포주를 선발하고 현탁배양세포의 배양환경조건 규명을 통해 고수의 현탁배양세포로부터 GABA의 대량생산에 미치는 영향을 규명하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

본 연구에 사용된 9개의 식물세포주 목록은 Table 1에 제시하였다. 각각의 식물세포주는 성장조절제의 영향을 제거하기 위하여 모두 동일한 1 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 액체배지에서 100 rpm으로 25°C 항온기에서 암배양하였다. 또한 계대배양시기의 차이에 따른 성장상태의 효과를 최소화시키기 위하여 각각의 식물세포주별로 2-3회 계대배양을 통해 활발한 증식이 이루어지도록 조정된 후 GABA를 분석하였다. GABA 분석을 위해 활발한 증식이 이루어지고 있는 각각의 세포주 (생중량 약 2 g)를 동일한 배지 (1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 액체배지)가 50 mL씩 첨가한 Erlenmeyer flask에 옮긴 다음 100 rpm으로 25°C 항온기에서 2주간 암배양하였다. 배양 후 각각의 현탁배양세포를 수거하여 멸균수로 수세한

table 1. Plant cell lines subjected to quantitative determination of GABA using ^1H -NMR

Order	Family	Genus	Species	Cultivar	KCTC No ¹
Solanales	Convolvaceae	<i>Ipomoea</i>	<i>batatas</i>	Yulmi	10093
Campanulales	Campanulaceae	<i>Platycodon</i>	<i>grandiflorum</i>		10200
Gentianales	Apocynaceae	<i>Catharanthus</i>	<i>roseus</i>	Little Bright Eye	10556
Umbellales	Araliaceae	<i>Acanthopanax</i>	<i>senticosus</i>		10494
		<i>Panax</i>	<i>ginseng</i>		10223
	Umbelliferae	<i>Coriandrum</i>	<i>sativum</i>		10060
		<i>Dacus</i>	<i>carota</i>		10195
Graminiae		<i>Oryza</i>	<i>sativa</i>	Taebak	10117
		<i>Oryza</i>	<i>sativa</i>	Hwasunchal	10119

¹Korean Collection for Type Culture deposit number

다음 액체질소에 넣고 급속 냉동하였으며 막자사발을 이용하여 분쇄하였다. 분쇄된 분말은 동결건조 후 -70°C 초저온 냉동고에 보존하였다.

현탁배양세포주로부터 ¹H NMR 스펙트럼 조사

식물 현탁배양세포주로부터 ¹H NMR 분석을 위해 동결 건조된 각각의 세포주 분말 15 mg을 취하여 Eppendorf tube (1.5 mL)로 옮긴 다음 1 mL의 D₂O:CD₃OD (80:20, 0.005% w/v TSP-*d*4:sodium salt of trimethylsilyl-propionic acid 첨가)를 첨가하여 잘 혼합하였다. Eppendorf tube를 50°C 수조에 넣고 10분간 반응시킨 후 whole cell extract를 13,000 rpm에서 5분간 상온에서 원심분리한 다음 상층액 750 μ l를 5 mm NMR tube로 옮겨 각각 ¹H NMR 스펙트럼을 조사하였다. ¹H NMR 스펙트럼은 Varian Unity 500 NMR spectrometer를 사용하여 조사하였으며 수분 peak는 presaturation pulse를 통해 제거하였다. 각 스펙트럼은 60회 반복 측정하여 평균스펙트럼을 확보하였으며 시료에 첨가된 TSP-*d*4를 이용하여 ¹H NMR chemical shifts를 0.00 ppm으로 조정하였다. 각 시료당 3개의 반복구를 준비하여 ¹H NMR 스펙트럼을 조사하였다.

¹H NMR 스펙트럼 데이터의 전처리 및 GABA의 정량분석 모델 확립

각 식물세포주로부터 얻어진 ¹H NMR 스펙트럼 데이터의 processing 및 normalization은 ADVASP Lite (short version of ADVASP package, Umatek Inc.)를 이용하여 ASCII 파일로 전환하였으며 각 스펙트럼의 세기는 internal standard로 첨가한 TSP-*d*4의 peak 세기를 기준으로 각 시료의 peak scale을 조정하였다. 각각의 ¹H NMR 스펙트럼의 data 간격은 12.0에서 0 ppm으로 조정하였다. 이와 같이 가공된 ¹H NMR 스펙트럼 데이터는 Matlab (version 6.5)에 도입하여 GABA의 정량분석을 수행하였다.

GABA의 정량분석 모델 확립을 위해 GABA (Sigma Co) standard를 1 mL의 D₂O:CD₃OD (80:20, 0.005% w/v TSP-*d*4:sodium salt of trimethylsilylpropionic acid 첨가) 혼합 용액에 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL 농도로 첨가한 다음 5 mm NMR tube로 옮겨 ¹H NMR 스펙트럼을 조사하였다. 순수 GABA standard의 ¹H NMR 스펙트럼 조사 및 데이터 가공은 상기의 식물세포주로부터 ¹H NMR 스펙트럼 데이터 가공방법과 동

일한 방법을 사용하였으며 각 시료당 3개의 반복구를 준비하여 ¹H NMR 스펙트럼을 조사하였다. 순수 GABA의 ¹H NMR 스펙트럼 조사 결과 1.89, 2.29, 3.01 ppm에서 GABA의 고유한 chemical shift 값을 알 수 있었으며 이를 통해 GABA의 ¹H NMR 스펙트럼 데이터로부터 정량분석을 위한 standard의 calibration curve를 조사하였다.

고수 현탁배양세포주로부터 배지의 2,4-D의 농도 및 배양기간이 GABA 함량 변화에 미치는 영향

고수 현탁배양세포주로부터 배지내 2,4-D 농도가 세포내 GABA의 함량변화에 미치는 영향을 조사하였다. 계대배양 후 2주 경과된 현탁배양세포를 수거하여 배양세포 약 2 g (생중량)을 상기와 동일한 액체배지로 옮겼으며 배지내 2,4-D 농도는 각각 0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 10 mg/L로 조정하였다. 동일한 배양조건에서 배양을 유지하였으며 배양 초기에는 GABA의 양적변동이 미미하므로 배양 2주, 3주, 4주 경과된 배양세포를 수거하였다. 현탁배양세포의 배양, 동결 및 분말 준비과정 그리고 whole cell extract 제조과정은 상기 단계와 동일한 방법으로 준비하였다. ¹H NMR 스펙트럼 조사 및 스펙트럼 데이터 가공 및 GABA 정량분석 역시 상기한 바와 동일한 방법으로 조사하였다.

또한 고수 배양세포를 이용하여 배양기간에 따른 세포내 GABA의 함량변화를 조사하기 위하여 계대배양 후 2주 경과된 현탁배양세포를 수거하여 배양세포 약 2 g (생중량)을 상기의 동일한 액체배지로 옮겨 동일한 배양조건에서 배양을 유지하였다. 계대배양 개시 후 각각 3, 7, 10, 14, 21, 28일째 배양세포를 수거하였으며 각 처리구당 3개의 반복구를 준비하였다. 이후 현탁배양세포의 동결 및 분말 준비과정 그리고 whole cell extract 제조과정은 상기 단계와 동일한 방법으로 준비하였다. ¹H NMR 스펙트럼 조사 및 스펙트럼 데이터 가공 및 GABA 분석 역시 상기와 동일한 방법으로 조사하였다.

결과 및 고찰

¹H NMR 스펙트럼 데이터로부터 GABA의 정량분석 모델

GABA의 ¹H NMR 스펙트럼 데이터 (Figure 1)로부터 정량분석 모델을 확립하기 위하여 순수 GABA standard의 농도

별 스펙트럼데이터로부터 calibration curve를 조사하였다. 먼저 순수 GABA standard의 ¹H NMR 스펙트럼을 조사한 결과 GABA의 ¹H NMR상에서 주요 proton signal은 chemical shift 1.89, 2.29, 3.01 ppm에서 peaks를 나타냈으며 고유 chemical shift 1.89, 2.29, 3.01 ppm에서 peak intensity를 적분하여 실제 GABA 농도와 선형회귀 모델을 제작하였다 (Figure 2). 이는 ¹H NMR 스펙트럼상의 1.89, 2.29, 3.01 ppm에서 peak intensity의 적분값이 조사된 용액내 GABA의 농도를 정확하게 반영하고 있음을 의미하는 것으로 상기의 선형회귀모델을 이용하여 식물시료로부터 GABA 함량의 상대적인 정량분석이 가능함을 제시하고 있다.

현재까지 GABA의 정량 및 정성분석은 흡광도측정법 (Guojin

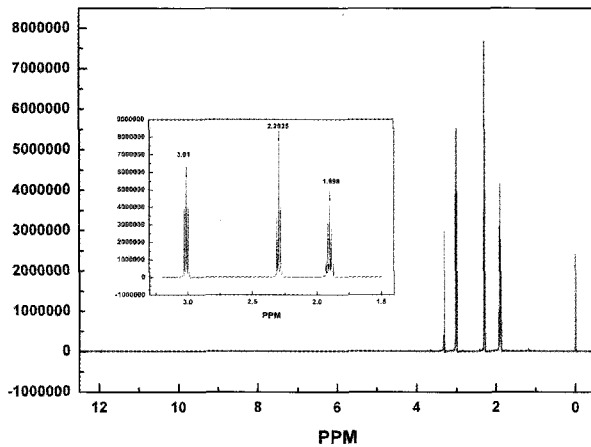


Figure 1. ¹H NMR spectrum of a GABA standard and enlarged view of proton signals of GABA.

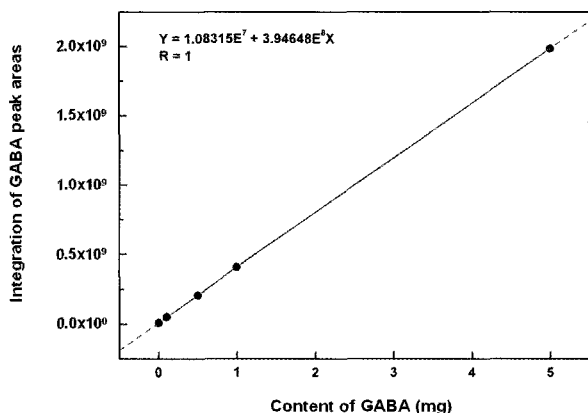


Figure 2. Calibration curve of GABA standards from ¹H-NMR spectrum data of four cocentrations (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/ml) of GABA.

and Alan 1997)과 아미노산 추출 후 HPLC를 이용하는 HPLC 분석법 (Jarret et al. 1986) 등이 일반적으로 이용되고 있다. 그러나 이들 분석방법은 사전 준비과정이 복잡하고 시간이 많이 소요될 뿐 아니라 측정 시료간의 재현성이 높지 않다. 본 연구에서는 GABA 함량 분석을 위해 whole cell extract로부터 얻어진 ¹H NMR 스펙트럼 데이터의 통계분석 기법을 활용함으로써 여러 식물세포주로부터 간편하며 재현성과 정확성이 높은 GABA 정량분석법을 확립할 수 있었다.

식물 현탁배양세포주로부터 GABA의 상대적 정량분석

식물 현탁배양세포주로부터 ¹H NMR 스펙트럼을 조사한 결과 9개의 식물세포주의 전체적인 대사물질의 패턴은 상이하였으며 특히 GABA의 proton signal은 큰 차이를 보였다 (Figure 3). ¹H NMR 스펙트럼상의 peak intensity가 화합물의 양적 변화와 상관관계가 높으므로 ¹H NMR 스펙트럼만으로도 GABA의 정성적 정량적 분석이 가능하다.

식물 현탁배양세포주로부터 GABA의 정량분석을 위해 상기의 GABA standard의 ¹H NMR 스펙트럼 데이터 processing과 동일한 방법으로 데이터 가공 후 상기 단계에서 확립한 GABA 정량모델을 이용하여 각 세포주 별 정량분석 결과 고수가 건조량 약 1 g 당 13 mg으로 가장 높았으며 다음으로 가시오갈피였고 고구마가 9개의 식물세포주중에서 가장 낮았다 (Figure 4). 따라서 9개의 식물세포주 가운데서 고수 세포주를 선발하였으며 이후 고수 배양세포주로부터 GABA 함량 분석을 실시하였다.

고수 현탁배양세포주로부터 배지의 2,4-D의 농도 배양기간이

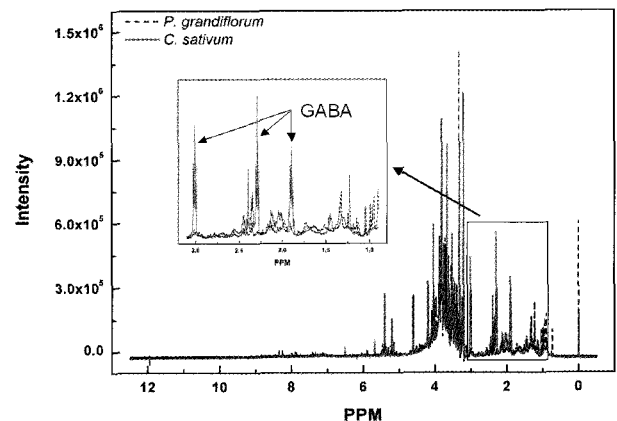


Figure 3. Representative ¹H-NMR spectrum of *Platycodon grandiflorum* (dotted line) and *C. sativum* (solid line) and enlarged view of proton signals of GABA.

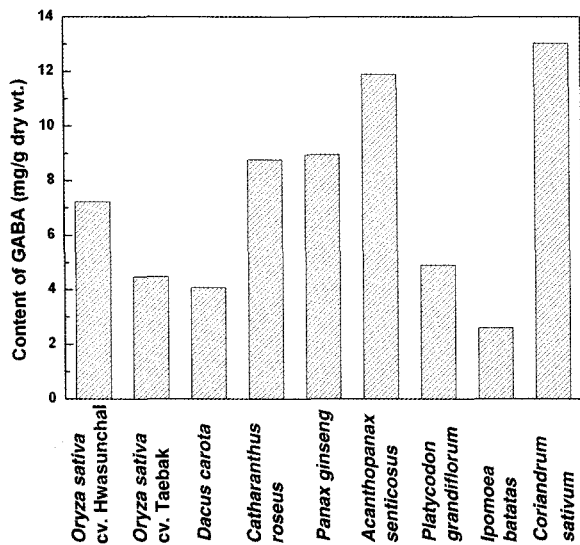


Figure 4. Comparison of GABA contents from various plant cell lines using a calibration curve of GABA standards.

GABA 함량 변화에 미치는 영향

배지내 2,4-D 농도가 고수 배양세포내 GABA 함량변화에 미치는 영향을 조사한 결과 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 3주간 배양된 세포에서 GABA의 함량이 건중량 1 g 당 16.9 mg으로 가장 높았으며 다음으로 1 mg/L 2,4-D 처리구 3주 배양세포에서 14 mg 이었다 (Figure 5). 3 mg/L 이상의 고농도 2,4-D 처리구에서는 배양기간이 지속될수록 GABA 함량이 감소가 보다 빠른 속도로 진행되었다. 반대로 0.3 mg/L 이하의 저농도 2,4-D 처리구에서는 배양 3주에서 GABA 함량이 최대가 되며 이후 4주까지 GABA 함량이 유지되었다. 따라서 본 연구를 통하여 고수의 현탁배양세포를 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 3주간 배양된 현탁배양세포를 이용할 경우 GABA 함량이 건중량 1 g 당 16.9 mg으로 가장 높게 생산됨을 알 수 있었다. 고수 현탁배양세포로부터 GABA의 함량은 본 연구그룹에서 발아 현미내 GABA의 함량을 동일 분석방법으로 비교분석한 결과 약 7.4배 정도 증가한 것이다(데이터 미제시). 따라서 고수 배양세포로부터 배양환경 조건 개선을 통해 GABA의 대량생산을 통한 상업화가 가능할 것으로 예상된다.

고수 현탁배양세포의 배양기간에 따른 ¹H NMR 스펙트럼 조사결과 계대배양 초기에는 GABA의 양적 변동이 거의 이루어지지 않는 상태로 약 2주간 유지되지만 배양 3주부터 GABA의 함량이 건중량 1 g 당 9.3 mg으로 약 2 배가량 증

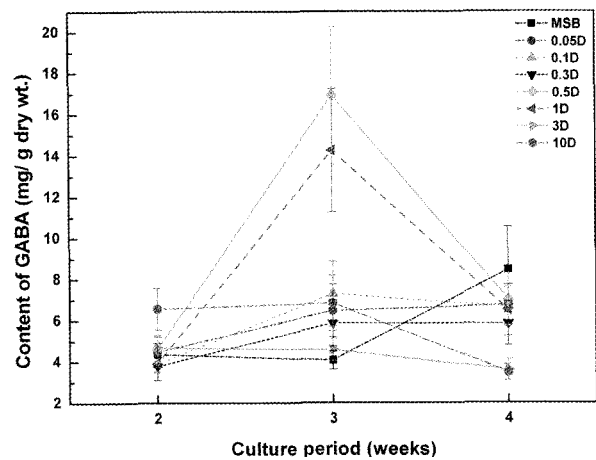


Figure 5. Effects of 2,4-D concentration and culture period on GABA productivity in cell suspension cultures of *C. sativum*. MSB, 0.05D, 0.1D, 0.3D, 0.5D, 1D, 3D, and 10D indicate MS medium supplemented with 0, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, and 10 mg/L 2,4-D. Vertical bars indicate standard deviations (n=3).

가된다 (Figure 5). 아울러 배양기간이 4주에 달하게 되면 거의 원래 수준으로 낮아졌다. 일반적으로 식물배양세포에서 배양 3주는 배지내에서 세포의 증식이 극에 달하여 더 이상의 세포 증식이 이루어지지 않는 정체기 단계로 사료된다. 따라서 배양 3주 세포에서 GABA의 함량증가는 세포밀도 증가에 따른 양분 결핍이 주요한 스트레스원으로 작용하여 GABA 함량 증가에 관여하였고 고수 현탁배양에서 GABA의 함량이 최대가 되는 시기는 정체기인 것으로 추측된다.

본 연구를 통하여 식물 현탁배양세포의 whole cell extract로부터 ¹H NMR 스펙트럼 데이터의 통계분석기법을 이용하여 간단하고 신속하게 GABA를 정량적으로 분석할 수 있는 모델을 확립하였으며 고수 현탁배양세포로부터 GABA의 생산성 변화에 미치는 배지내 성장조절제 (2,4-D) 및 배양기간의 영향을 규명하였다. 본 분석방법으로 다양한 식물자원에서 GABA의 생산성을 초고속탐색 (high-throughput screening)할 수 있을 것이며 고수 현탁세포배양법으로 GABA의 상업적 대량생산이 가능할 것으로 전망된다.

적 요

식물현탁배양세포의 whole cell extract의 ¹H NMR 스펙트럼 데이터로부터 통계분석기법을 활용하여 GABA의 간단하고 신속한 정량분석방법을 확립하였다. 이 기술을 활용하여 고등식물 8종의 9개 세포주를 MS 배지에 1 mg/L

의 2,4-D를 첨가한 배지에 유지하였을 때 고수 (*Coriandrum sativum* L.)가 가장 많은 양의 GABA를 생산하였다. 고수 현탁배양세포로부터 2,4-D농도 및 배양기간에 따른 GABA의 생산성 변화를 조사한 결과 현탁배양세포를 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 3주간 배양된 현탁배양세포를 이용할 경우 GABA 함량이 건중량 1 g 당 16.9 mg으로 가장 높게 생산되었다. 본 연구에서 확립된 간단하고 신속한 분석법으로 다양한 식물자원으로부터 GABA의 생산성을 초고속탐색 (high-throughput screenig)할 수 있을 것이며 고수 현탁세포 배양법으로 GABA의 상업적 대량생산이 가능할 것으로 전망된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 유전자원지원활용사업 (BDW0800723) (김석원)과 농촌진흥청 바이오그린21 사업 (유장렬), 과학재단 SRC의 경희대 식물대사연구센터 (유장렬), 한국생명공학연구원 기관고유사업 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

- Bligny R, Douce R (2001) NMR and plant metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 4: 191-196
- Bown AV, Shelp BJ (1989) The metabolism and physiological roles of 4-aminobutyric acid. *Biochemistry* 8: 21-25
- Choi YH, Choi H-K, Hazekamp A, Bermejo P, Schilder YDC, Erkelens C, Verpoorte R (2003) Quantitative analysis of bilobalide and ginkgolides from *Ginkgo biloba* leaves and *Ginkgo* products using ^1H NMR. *Chem Pharm Bull* 51: 158-161
- Chung I, Bown AW, Shelp BJ (1992) The production and efflux of 4-aminobutyrate in isolated mesophyll cells. *Plant Physiol* 99: 659-666
- Gavaghan CL, Holmes E, Lenz E, Wilson ID, Nicholson JK (2000) An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: application to the C57BL10J and Alpk: ApfCD mouse. *FEBS Lett* 484: 169-174
- Guojin Z, Alan WB (1997) The rapid determination of γ -aminobutyric acid. *Phytochemistry* 44:1007-1009
- Jarret H W, Coosky K D, Ellis B and Anderson J M (1986) The separation of α -phtalaldehyde derivatives of amino acids by reversedphase chromatography on octylsilica column. *Anal Biochem* 153: 189-198
- Kim HK, Choi YH, Lujendijk TJC, Vera Rocha RA, Verpoorte R (2004) Comparison of secologanin extraction methods and quantitative analysis of secologanin from *Symphoricarpos albus* by using ^1H -NMR. *Phytochem Anal* 15: 257-261
- Kim SW, Ban SH, Jeong SC, Chung HJ, Ko S, Yoo OJ, Liu JR (2007) Genetic discrimination between *Catharanthus roseus* cultivars by metabolite fingerprinting using ^1H -NMR spectra of aromatic compounds. *J Plant Biol* (accepted)
- Menegus F, Cattaruzza L, Chersi A, Fronza G (1989) Differences in the anaerobic lactate-succinate production and in the changes of cell sap pH for plants with high and low resistance to anoxia. *Plant Physiol* 90: 29-32
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-49
- Ratcliffe RG (1995) Metabolic aspects of the anoxic response in plant tissue. In "Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation" (N Smirnov ed), Bios Scientific, Oxford, pp. 111-127
- Reggiani R, Cantu CA, Brimaballa I, Bertani A (1988) Accumulation and interconversion of amino acids in rice roots under anoxia. *Plant Cell Physiol* 29: 981-987
- Satyanarayan V, Nair PM (1990) Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29: 367-375
- Shelp BJ, Walton CS, Snedden WA, Tuin LG, Oresnik IJ, Layzell DB (1995) Gaba shunt in developing soybean seed is associated with hypoxia. *Plant Physiol* 94: 219-221
- Stephenson NA, Bell AT (2005) Quantitative analysis of hydrogen peroxide by ^1H NMR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 381: 1289-1293
- Ward JL, Harris CH, Lewis J, Beale MH (2003) Assessment of ^1H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62: 949-957

(접수일자 2007년 7월 16일, 수리일자 2007년 8월 10일)