

생체 시료 중 아세틸콜린 및 콜린에 대한 효소-분광학적 정량분석

남명화 · 이성호* · 김기택 · 한영희#

상명대학교 화학과, *상명대학교 그린생명과학과

(Received June 20, 2012; Revised August 10, 2012; Accepted August 17, 2012)

Enzymatic Spectrophotometric Determinations of Acetylcholine and Choline in the Biological Samples

Myung Hwa Nam, Sung-Ho Lee*, Ketack Kim and Younghee Hahn#

Department of Chemistry, Sangmyung University,

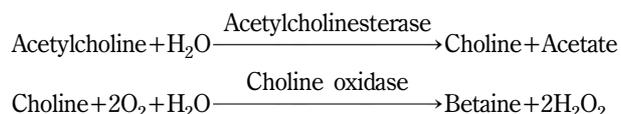
*Department of Green Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

Abstract — In order to determine acetylcholine and choline in the biological samples, the specific enzymes of acetylcholinesterase (AChE) and choline oxidase (ChO), which utilize acetylcholine and choline as substrates, were employed to convert substrates to H_2O_2 . The produced H_2O_2 was coupled to 4-aminoantipyrine/phenol with peroxidase (PO) yielding quinoneimine dye which was measured at 508 nm. In the present enzymatic spectrophotometric analysis the product at the equilibrium state was measured considering accuracy, precision, time and cost of the analysis. The developed analytical method yielded good linearity (calibration curve; $A_{508} = 9534[\text{acetylcholine}] + 0.009$, correlation coefficient (R^2); 0.999) with detection limit of $1.11 \times 10^{-7} M$, reasonable precision (relative standard deviation; 0.10~1.62% at $2.5 \times 10^{-6} M \sim 1.25 \times 10^{-4} M$) and accuracy (relative error; -0.24~0.97% at $4.13 \times 10^{-6} M \sim 1.01 \times 10^{-4} M$) for acetylcholine chloride standard solution. The concentrations of acetylcholine and choline in human serum were found as $3.20 \times 10^{-5} M$ and $1.14 \times 10^{-4} M$, respectively. The brain tissues of Sprague-Dawley strain rat contained 9.82 $\mu g/g$ of acetylcholine and 6.53 $\mu g/g$ of choline in the cerebrum, while 7.37 $\mu g/g$ of acetylcholine and 5.34 $\mu g/g$ of choline in the cerebellum.

Keywords □ acetylcholine, choline, enzymatic spectrophotometric analysis

아세틸콜린(acetylcholine)은 콜린성(부교감) 신경 말단부에서 분비되는 신경전달물질로서 콜린성 신경세포 간 접합부(cholinergic synapse)의 작용에 매우 중요하다.^{1,2)} 중추신경계에서 콜린성 기능의 손실은 아세틸콜린의 농도가 저하되는 알츠하이머 치매질환을 유발하며,³⁾ 도파민의 방출이 감소되는 파킨스 병에서는 아세틸콜린 농도가 선조체(striatum)에서 증가된다.⁴⁾ 이러한 질병의 기전이나 치료약을 개발하기 위해서는 뇌의 세포외액에서 아세틸콜린의 농도를 측정하는 것이 중요하다. 아세틸콜린에 대한 분석방법으로는 GC/MS,⁵⁾ HPLC/ECD,⁵⁻⁸⁾ 전기화학발광 검출(electrochemiluminescent detection)⁹⁾과 HPLC/tandem MS^{4,10)}가 문헌에 보고된 바 있다. Uutela와 공동연구자들은 쥐(rat) 뇌의 전두엽 피질(prefrontal cortex)로부터 채취한 미량투석(microdialysis) 시료에 대하여 LC/MS/MS를 시행하여 아세틸콜

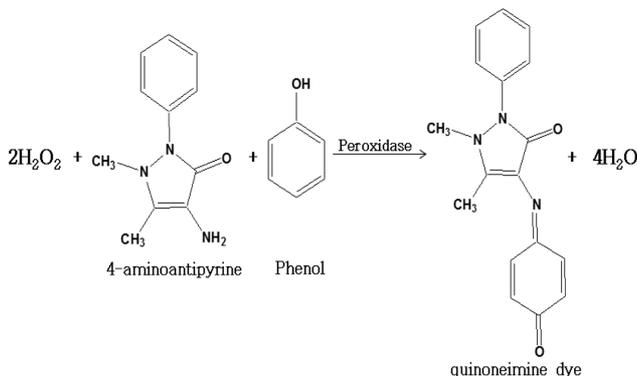
린과 콜린을 분리 분석하였으며 아세틸콜린은 시냅스 열(synaptic cleft)에서 acetylcholinesterase 효소에 의하여 콜린(choline)과 acetate로 신속하게 대사되므로 뇌의 세포외액에서는 acetylcholine의 농도는 nM 농도로 낮는데 반하여 choline의 농도는 μM 수준의 높은 농도로 측정된다고 언급하였다.⁴⁾ 일반적으로 실험쥐의 뇌 세포외액에서 아세틸콜린을 추출하기 위해 미량투석법(microdialysis)을 활용하여 HPLC/ECD 또는 LC/MS/MS로 검출한다. HPLC/ECD 분석법에서는 부동화(immobilized) acetylcholinesterase(AChE)와 choline oxidase(ChO) 반응기(reactor)를 LC 칼럼 다음에 연결하여 다음과 같이 아세틸콜린을 H_2O_2 로 전환시킨 후 백금 전극에서 H_2O_2 를 측정하였다.



AChE/ChO 부동화 효소 칼럼은 고농도의 AChE와 ChO가 요구되므로 비싼 가격으로 시판되고 있다. 미량투석법과 병용하여

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2287-5283 (팩스) 02-2287-0070
(E-mail) yhahn@smu.ac.kr

HPLC/tandem MS로 아세틸콜린을 정량하는 경우 효소를 사용하지 않고 nM 수준의 낮은 농도까지 검출할 수 있으나 고가의 장비를 필요로 한다. 다양한 물질들이 공존하는 생체시료를 정확하게 분석하는 방법 중의 하나는 분석하고자 하는 물질(기질)과 특이적으로 반응하는 효소를 시약으로 사용하는 것이다. 효소반응을 이용하여 기질을 분석할 때 초기 효소 반응속도를 활용 하던가 또는 효소반응이 평형상태에 도달한 후에 화학량론적으로 생성된 화합물의 농도를 측정하여 기질의 농도를 구하는 방법이 있으며 후자가 전자에 비하여 분석조건이 수월하고 감도가 높아 효소의 양을 적게 사용할 수 있는 장점을 제공한다. 본 연구에서와 같이 AChE 효소와 ChO 효소를 사용하여 아세틸콜린을 분석할 때, 생성되는 H₂O₂의 농도를 전류법으로 직접 측정할 수 있으나 H₂O₂가 산화되는 전위에서 아민류와 비타민 C 등이 산화될 수 있어서 이러한 물질들의 사전 제거가 필수적이다. 이러한 단점을 보완하기 위해 H₂O₂를 peroxidase(PO) 효소를 활용하여 전극활성 물질 또는 발색단으로 전환될 수 있는 물질과 반응시켜서 측정할 수 있다. 비교적 저렴한 효소인 PO를 고가의 AChE와 ChO보다 다량으로 사용하면 PO 효소반응은 신속하게 진행되어 전체 효소 반응 속도는 느린 효소반응인 AChE 반응과 ChO 반응에 의하여 결정되며 PO 반응 생성물질은 acetylcholine과 choline의 농도에 비례한다. 과산화수소와 반응시키는 물질의 선택에 따라 분광광도법,¹¹⁻¹³⁾ 형광광도법,^{14,15)} 전위차법¹⁶⁾ 또는 전류법^{17,18)}으로 각각 측정할 수 있다. Allain과 공동연구자들은 혈청 중의 cholesterol esters와 free cholesterol을 분석하기 위하여 cholesterol ester hydrolase와 cholesterol oxidase를 사용하여 이들의 기질들을 H₂O₂로 전환시키고 peroxidase 효소를 사용하여 생성된 H₂O₂를 신속하게 다음과 같이 4-aminoantipyrene/phenol 시약에 반응시켜 만들어진 quinoneimine dye를 분광광도법¹⁹⁾으로 측정하였다.



생체시료 중 아세틸콜린의 함량을 측정하기 위하여 본 연구에서와 같이 AChE, ChO 및 PO 효소와 4-aminoantipyrene/phenol 시약을 사용하여 분광광도법으로 분석법을 개발한 논문은 현재까지 문헌상에 발표된 바 없었다. 본 연구에서는 생물학 분야에

서 널리 활용되고 있는 분광광도계를 활용하여 생체 시료 중 아세틸콜린과 콜린의 농도를 정확하고 비교적 저렴한 비용으로 정량할 수 있는 새로운 분석법을 개발하고자 하였다. 세 가지 AChE, ChO 및 PO 효소반응들이 비교적 적은 농도에서 평형에 도달할 수 있는 조건들을 조사하고 개발한 분석방법의 정확도, 정밀도, 직선 농도 범위, 검출 한계 및 안정도를 조사하여 아세틸콜린과 콜린에 대한 효소-분광학적 분석법을 검증하고 생체시료 중 이들 물질들의 농도를 측정하는 방법을 제시하고자 한다.

실험방법

시약 및 용액

시약은 모두 1급 이상 분석용 시약을 사용하였으며 용액은 초순수 제조장치(ELGA Purelab Classic, UK)를 통과시켜 물의 전기저항이 18.0 MΩ 이상인 초순수를 사용하여 제조하였다. pH 7.0 인산염 완충용액은 Sigma-Aldrich(U.S.A.)에서 구입한 sodium phosphate dibasic(FM 141.96) 7.85 g, potassium phosphate monobasic(FM 136.09) 4.71 g을 초순수로 녹여 전체 용액의 부피가 1.00 l가 되도록 제조하였다. 1.0×10⁻²M~1.5×10⁻²M 4-aminoantipyrene, 1.0×10⁻²M~1.5×10⁻²M phenol, 1.0×10⁻³M hydrogen peroxide, 6.25×10⁻⁴M choline chloride, 7.5×10⁻⁴M acetylcholine chloride, 2.0~2.4 U/ml choline oxidase(from *Alcaligenes* sp.), 2.4 U/ml acetylcholinesterase(from *Electrophorus electricus*, Type VI-S) 및 70.0~105.0 U/ml peroxidase(from horseradish, Type I) 용액은 모두 Sigma-Aldrich(U.S.A.) 제품으로 pH 7.0 인산염 완충용액을 사용하여 제조하였으며 효소 용액들은 냉동 보관하였다. 기타 시약 용액들은 냉장 보관 하였고 methanol과 사람 혈청(from human male AB plasma)도 Sigma-Aldrich(U.S.A.) 제품이였다.

기기

흡광도 측정은 DU[®] 730 UV/VIS Spectrophotometer(Beckman)와 quartz cell(JM.CQ002, 10×10 mm)을 사용하였고 단백질은 소용돌이 혼합기(vortex mixer: Vortex-Genie 2, SI-0256), 원심분리기(Allegra[®] X-15R Centrifuge)와 주사용 여과지(0.45 μm, 25 mm Waters)를 사용하여 침전을 제거하였다. 효소반응에 사용하였던 항온조는 Eyela SB-9이었다.

사람의 혈청시료 중 acetylcholine 및 choline의 정량분석

사람 혈청에 함유된 acetylcholine과 choline의 함량은 표준물 첨가법을 사용하여 다음과 같이 정량 분석하였다. 먼저 acetylcholine과 choline의 총 농도를 분석하기 위하여 혈청시료를 10 ml 용량 플라스크 5개에 각각 1 ml씩 배분하고 각 혈청시료에 표준용액인 5.00×10⁻⁴M acetylcholine chloride 용액을 0,

0.5, 1, 2, 3 ml로 첨가한 후 최종 농도가 4-aminoantipyrine과 phenol은 2.5×10^{-3} M 되도록, peroxidase는 17.5 U/ml, choline oxidase는 0.4 U/ml 그리고 acetylcholinesterase는 0.4 U/ml가 되도록 첨가하고 각 각의 용량 플라스크의 눈금까지 pH 7.0 인산염 완충용액을 첨가하였다. 각각의 용량 플라스크의 용액을 30°C에서 25분간 반응 시킨 후 methanol²⁰⁾을 혈청 부피의 2배가 되도록 첨가하여 단백질을 침전시키고 소용돌이 20초, 냉장 20분 방치(~4°C)후 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하고 상층 액을 0.45 µm 주사용 여과지를 이용하여 거른 뒤 흡광도를 측정하였다. 마찬가지로 choline의 농도만을 분석하기 위해 위와 동일한 방법으로 혈청 시료를 1 ml씩 5개로 나누어 각 혈청시료에 표준 용액인 5.00×10^{-4} M choline chloride 용액을 0, 0.5, 1, 2, 3 ml로 첨가한 후 acetylcholinesterase를 제외한 4-aminoantipyrine, phenol, peroxidase와 choline oxidase 용액들을 첨가하고 각 용액을 pH 7.0 인산염 완충용액으로 10 ml로 희석시킨 후 30°C에서 25분간 효소반응을 진행시켰다. 그 후 용액의 단백질을 침전시킨 후 상층 액의 흡광도를 측정하였다.

흰쥐의 대뇌, 소뇌 조직 중 acetylcholine 및 choline의 정량 분석

상명대학교 실험동물 사육장에서 18~22°C로 일정하게 유지되는 온도와 일정한 광주기(12시간 조명, 12시간 소등) 하에서 먹이와 물의 접근을 자유롭게 사육한(ad libitum) Sprague-Dawley(SD) 종의 3개월 된 수컷 흰쥐를 실험에 사용하였다. 희생시킨 흰쥐에서 대뇌 와 소뇌를 적출하여 조직과 완충용액의 비율이 1:3이 되도록 pH 7.0 인산염 완충용액을 넣어 파쇄기(homogenizer: IKA, Germany)를 사용해 조직을 분쇄한 후 분석 전까지 -80°C에서 보관하였다. 대뇌와 소뇌의 분쇄한 조직 중 acetylcholine 및 choline의 농도를 정량 분석하는 방법은 사람의 혈청시료를 분석하는 방법과 동일하게 진행 시켰으나 생체시료는 각 0.5 ml씩 사용하여 5.00×10^{-4} M acetylcholine chloride 표준용액(또는 5.00×10^{-4} M choline chloride 표준용액) 0.5 ml를 한번만 첨가하였다. 사람 혈청시료를 분석하는 방법과 동일하게 효소반응과 단백질 침전 후 상층 액의 흡광도를 측정하였다.

실험결과 및 고찰

최적 흡수파장

1.0×10^{-4} M H_2O_2 용액, 1.0×10^{-2} M 4-aminoantipyrine, 1.0×10^{-2} M phenol 및 70.0 U/ml peroxidase 용액들을 1:1:1:1의 부피비율로 혼합하여 5분간 상온에서 반응시킨 후 발색된 색소 용액을 분광광도계를 사용하여 370~800 nm 파장범위에서 주사시킨 결과는 Fig. 1과 같았다. 최대 흡광도는 508 nm에서 나타났고 이 파장은 pH 6.8 인산염 완충용액을 사용하여 cholesterol

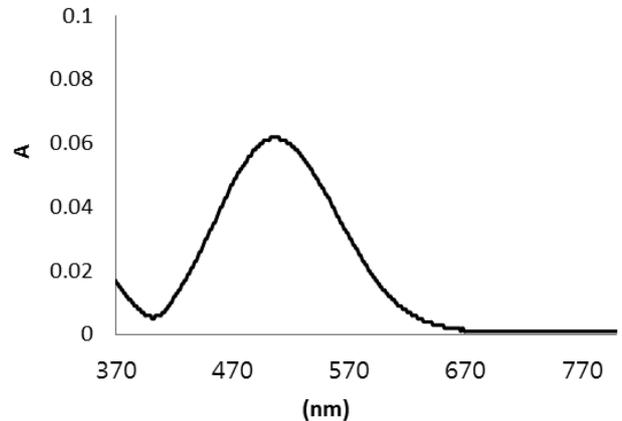


Fig. 1 – Absorption spectrum of the quinoneimine dye produced by the peroxidase reaction.

oxidase 반응에서 생성된 H_2O_2 를 peroxidase 존재 하에 4-aminoantipyrine/phenol 시약에 효소반응으로 연결시켜 500 nm에서 측정된 quinoneimine 색소의 파장¹⁹⁾과 같음을 확인 할 수 있었으며 pH 7.0 인산염 완충용액을 사용하는 본 실험에서는 508 nm를 quinoneimine 색소를 정량하는 최적의 흡수 파장으로 선정하였다.

분석에 적절한 효소의 농도(PO, ChO, AChE)와 시간을 검토하기 위하여 세 가지 효소반응 과정을 연구하였다.

Peroxidase 효소반응 과정

1.0×10^{-3} M H_2O_2 , 1.0×10^{-2} M 4-aminoantipyrine, 1.0×10^{-2} M phenol 및 70.0 U/ml peroxidase 용액들을 각각 1 ml씩 순서대로 혼합하여 상온에서 즉시 시간 변화에 따른 흡광도를 측정하였다. 혼합 용액에서의 4-aminoantipyrine과 phenol의 최종 농도는 각각 2.5×10^{-3} M이었고 peroxidase의 농도는 17.5 U/ml이

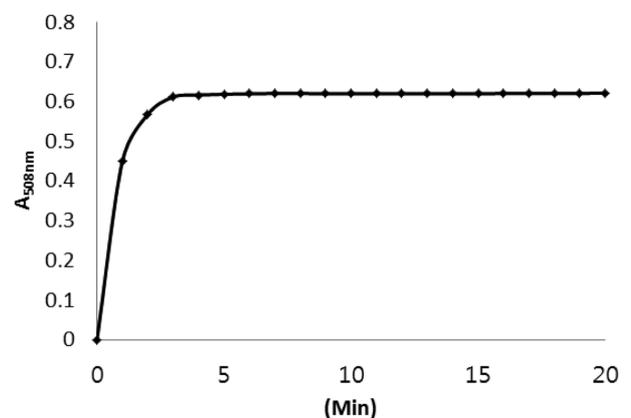


Fig. 2 – Enzymatic kinetics of peroxidase reaction. 2.5×10^{-4} M H_2O_2 , 2.5×10^{-3} M 4-aminoantipyrine, 2.5×10^{-3} M phenol and 17.5 U/ml peroxidase in the pH 7.0 phosphate buffer; room temp.

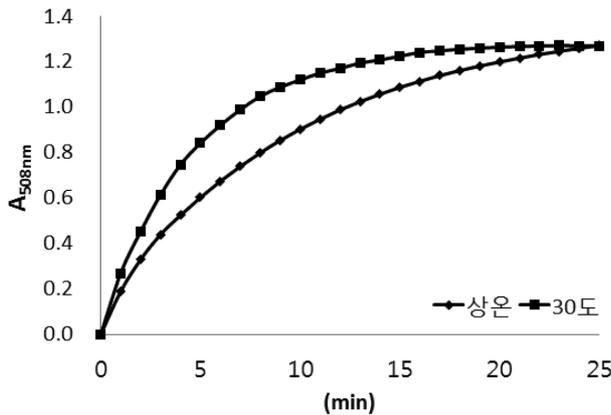


Fig. 3 – Enzymatic kinetics of choline oxidase reaction. 1.25×10^{-4} M choline chloride, 2.5×10^{-3} M 4-aminoantipyrine, 2.5×10^{-3} M phenol, 17.5 U/ml peroxidase and 0.4 U/ml choline oxidase in the pH 7.0 phosphate buffer; room temp. and 30°C.

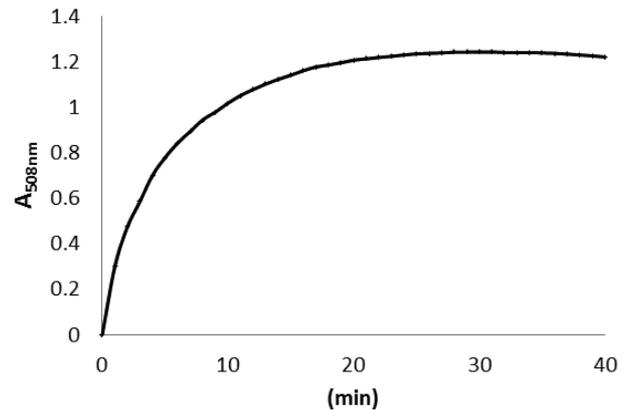


Fig. 4 – Enzymatic kinetics of acetylcholinesterase reaction. 1.25×10^{-4} M acetylcholine chloride, 2.5×10^{-3} M 4-aminoantipyrine, 2.5×10^{-3} M phenol, 17.5 U/ml peroxidase, 0.4 U/ml choline oxidase and 0.4 U/ml acetylcholinesterase in the pH 7.0 phosphate buffer; temp. at 30°C.

었다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 4분 이 지난 후 반응이 평형에 도달함을 알 수 있었다. H_2O_2 용액의 최종농도가 2.5×10^{-6} M~ 1.25×10^{-4} M인 범위에서 앞서 표기한 대로 H_2O_2 , 4-aminoantipyrine, phenol 및 PO 용액들을 각각 1 ml씩 순서대로 혼합하여 상온에서 4분간 반응시키고 측정된 508 nm에서의 흡광도를 H_2O_2 농도에 대하여 도시하였을 때, H_2O_2 몰농도와 흡광도와의 관계식은 $A_{508} = 4908.8[H_2O_2] + 0.0035$ 이었고 상관계수의 제곱(R^2)이 0.9998로서 좋은 직선 성을 나타내었다.

Choline oxidase 효소반응 과정

6.25×10^{-4} M choline chloride, 1.25×10^{-2} M 4-aminoantipyrine, 1.25×10^{-2} M phenol, 87.5 U/ml peroxidase 및 2.0 U/ml choline oxidase 용액들을 각각 1 ml씩 순서대로 혼합하여 상온과 30°C에서 즉시 시간 변화에 따른 흡광도를 측정된 결과가 Fig. 3에 있다. 실온보다는 30°C에서 평형(20분 이후)에 더 빨리 도달하는 것을 확인하였다. 혼합 용액에서 4-aminoantipyrine, phenol과 PO의 최종 농도는 PO 효소반응 과정에서의 농도와 같았으며 choline chloride는 1.25×10^{-4} M이었고 ChO는 분석 비용을 감안하여 0.4 U/ml로 유지시켰다. Choline chloride의 최종농도가 2.5×10^{-6} M~ 1.25×10^{-4} M 범위에서 앞서 표기한 대로 choline chloride, 4-aminoantipyrine, phenol, PO 및 ChO 용액들을 각각 1 ml씩 순서대로 혼합하여 30°C에서 20분간 반응시킨 후 농도에 따른 흡광도를 측정하여 검량곡선을 작성한 결과 $A_{508} = 9418[\text{choline}] + 0.0123$, 상관계수의 제곱(R^2)이 0.9996으로서 좋은 직선 성을 보였다.

Acetylcholinesterase 효소반응 과정

7.5×10^{-4} M acetylcholine chloride, 1.5×10^{-2} M 4-aminoanti-

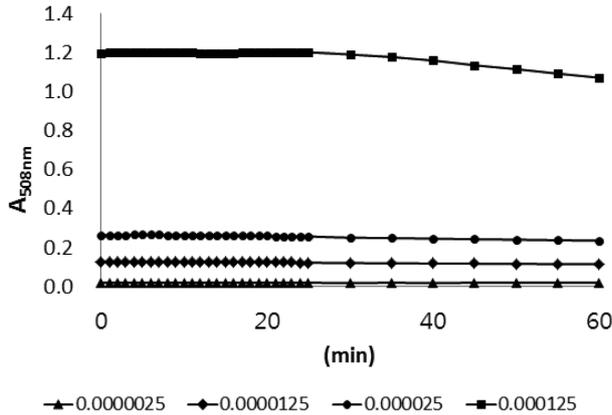
pyrines, 1.5×10^{-2} M phenol, 105.0 U/ml peroxidase, 2.4 U/ml choline oxidase 및 2.4 U/ml acetylcholinesterase 용액들을 각각 1 ml씩 순서대로 혼합하여 30°C에서 즉시 시간 변화에 따른 흡광도를 측정된 결과가 Fig. 4에 있다. 혼합용액 중의 4-aminoantipyrine, phenol, PO와 ChO의 최종 농도는 ChO 효소반응 과정에서의 농도와 같았고 acetylcholine chloride의 최종 농도는 1.25×10^{-4} M, AChE의 경우 최종 농도가 0.4 U/ml가 되도록 첨가하였다. 30°C를 유지하면서 효소반응 시킨 결과 25분 이후에 반응이 평형에 도달하였고 40분까지 quinoneimine 색소의 농도는 분해되지 않았음을 확인하였다. Acetylcholine chloride의 최종농도가 2.5×10^{-6} M~ 1.25×10^{-4} M 범위에서 앞서 표기한 대로 acetylcholine chloride, 4-aminoantipyrine, phenol, PO, ChO 및 AChE 용액들을 각각 1 ml씩 순서대로 혼합하여 30°C에서 25분간 반응시킨 후 농도에 따른 흡광도를 측정하여 검량곡선을 작성한 결과 $A_{508} = 9534.8[\text{acetylcholine}] + 0.0049$, 상관계수의 제곱(R^2)이 0.9995로서 좋은 직선 성을 보였다. 적절한 분석시간과 분석비용을 감안하여 생체 시료 중 아세틸콜린 및 콜린에 대한 효소-분광학적 정량분석에 관한 본 연구에서 PO의 최종 효소농도는 17.5 U/ml, ChO와 AChE의 최종 효소농도는 모두 0.4 U/ml로 고정하였고 발색 반응 온도와 시간은 각각 30°C와 25분으로 정하였다.

검량곡선, 정밀도, 검출한계 및 안정도

Table I에 나타난 바와 같이 pH 7.0 인산염 완충용액으로 제조한 2.5×10^{-6} M~ 1.25×10^{-4} M인 범위의 acetylcholine chloride 용액을 본 연구에서 개발한 효소-분광학적 분석법으로 각 농도에 대하여 7회 반복 측정하여서 정밀도를 검사하였을 때 상대 표준편차(relative standard deviation; RSD)는 2.5×10^{-6} M에서는

Table I – Absorbance values with different concentrations of acetylcholine chloride

Conc. (M)	Absorbance	
	Ave.±SD (n=7)	RSD (%)
2.50×10^{-6}	$0.022 \pm 0.354 \times 10^{-3}$	1.62
1.25×10^{-5}	$0.128 \pm 0.354 \times 10^{-3}$	0.27
2.50×10^{-5}	$0.264 \pm 0.834 \times 10^{-3}$	0.32
1.25×10^{-4}	$1.199 \pm 1.246 \times 10^{-3}$	0.10

**Fig. 5** – Stability of the present enzymatic-spectrophotometric analysis. concentration range; 2.5×10^{-6} M ~ 1.25×10^{-4} M acetylcholine chloride. X-axis; the delayed time after color forming reaction time (25 min)

1.62%이었고 그 외 1.25×10^{-5} M, 2.5×10^{-5} M, 1.25×10^{-4} M에서는 RSD가 각각 0.27%, 0.32%, 0.10%인 좋은 정밀도를 나타내었다. 각 농도에 따른 평균 흡광도로 검량곡선을 작성한 결과 $A_{508} = 9534[\text{acetylcholine}] + 0.009$, R^2 이 0.999로서 좋은 직선성을 보였다. 최소 검출 농도는 7회 반복 측정된 가장 낮은 농도의 acetylcholine chloride 용액에 대한 흡광도 표준편차 신호의 3배를 선형 검정 곡선의 기울기로 나눈 값(3 s/m)으로 계산하였다.²¹⁾ pH 7.0 인산염 완충용액에서의 acetylcholine chloride의 검출한계 농도는 1.11×10^{-7} M이었다. 개발한 효소-분광학적 분석법의 안정도를 검사하기 위하여 2.5×10^{-6} M ~ 1.25×10^{-4} M 범위의 acetylcholine chloride 용액을 각각 발색시약과 효소시약들을 첨가하고 30°C에서 25분간 발색 반응 시킨 후 시간을 60분간 더 연장시키면서 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 5와 같았다(Fig. 5상에서 0분; 발색반응 완료시점). 발색반응이 끝난 후 더 연장된 25분까지는 생성된 quinoneimine 색소는 안정적이고 농도 변화는 없었으나 그 이후 60분까지 서서히 흡광도가 감소되었다. 발색반응 후 25분 이내에 흡광도를 측정할 수 있는 일상적인 분석 시간을 고려할 때 본 연구의 분석법은 안정적이다.

정확도

본 연구의 효소-분광학적 분석법의 정확도를 조사하기 위해 임

Table II – Accuracy of the present enzymatic-spectrophotometric analysis

True conc. (M)	Experimental conc. (M)		Er (%)
	Ave.±SD (n=7)	RSD (%)	
4.13×10^{-6}	$4.17 \times 10^{-6} \pm 5.81 \times 10^{-8}$	1.39	0.97
2.10×10^{-5}	$2.12 \times 10^{-5} \pm 2.57 \times 10^{-8}$	0.12	0.95
8.19×10^{-5}	$8.17 \times 10^{-5} \pm 1.22 \times 10^{-7}$	0.15	-0.24
1.01×10^{-4}	$1.01 \times 10^{-4} \pm 8.39 \times 10^{-8}$	0.08	0.00

의로 4.13×10^{-6} M, 2.10×10^{-5} M, 8.19×10^{-5} M 및 1.01×10^{-4} M acetylcholine chloride 용액에 각각 발색시약과 효소시약들을 첨가하고 30°C에서 25분간 반응 시킨 후 5회 반복 측정하였다. 측정된 용액의 흡광도와 검량곡선을 이용하여 각 용액의 농도를 계산하였으며 각 용액에 대하여 5회 계산한 실험적으로 구한 농도를 평균하여 참 농도(제조한 농도)와 비교하였다(Table II). 각 농도에 따른 상대 오차(Er)는 다음과 같았다; 4.13×10^{-6} M는 0.97%, 2.10×10^{-5} M는 0.95%, 8.19×10^{-5} M는 -0.24%, 1.01×10^{-4} M는 0.00%로서 비교적 좋은 정확도를 나타내었다. 각 용액에 대하여 5회 반복 측정하여 구한 실험적인 농도 값에 대한 상대 표준편차(RSD)는 0.08~1.39%이었다.

사람의 혈청시료 중 acetylcholine 및 choline의 함량

실험방법에 표기한 바와 같이 표준물 첨가법으로 5개의 혈청시료 각 1 ml에 5.00×10^{-4} M acetylcholine chloride 표준용액을 0, 0.5, 1, 2, 3 ml의 서로 다른 부피로 각각 첨가한 후 발색시약과 효소시약들을 첨가하고 총 부피가 10 ml가 되도록 pH 7.0 인산염 완충용액을 가하여(최종농도; 4-aminoantipyrine과 phenol은 2.5×10^{-3} M, PO는 17.5 U/ml, ChO와 AChE는 각각 0.4 U/ml) 30°C에서 25분간 반응시킨 후 methanol을 혈청 부피의 2배(2 ml)로 첨가하여 단백질을 침전시킨 후 상층액을 0.45 μm 주사용 여과지를 이용하여 거른 뒤 흡광도를 측정하였다. 첨가한 5.00×10^{-4} M acetylcholine chloride 표준용액의 부피에 대한 흡광도는 Table III과 같았으며 흡광도를 표준용액의 부피(Vs)에 대하여 도식하였을 때 $A_{508} = 0.426 Vs(\text{ml}) + 0.124$ ($R^2 = 0.999$)의 관계식을 나타냈으며 이 식의 기울기 값($m = 0.426$), 접점 값($a = 0.124$), 표준용액의 농도($Cs = 5.00 \times 10^{-4}$ M)와 시료부피($Vx =$

Table III – Absorbance values with different volumes of 5.00×10^{-4} M acetylcholine chloride in the standard addition method of human serum

Acetylcholine chloride volume (ml)	$A_{508\text{nm}}$
0	0.136
0.5	0.336
1	0.550
2	0.954
3	1.423

Table IV – Absorbance values with different volumes of 5.00×10^{-4} M choline chloride in the standard addition method of human serum

Choline chloride volume (ml)	A_{508nm}
0	0.078
0.5	0.291
1	0.489
2	0.845
3	1.255

1 ml)를 이용하여 혈청 시료 중 acetylcholine과 choline의 총 농도(Cx)는 $Cx=(a/m)(Cs/Vx)$ 의 식²²⁾으로 계산한 결과 1.46×10^{-4} M이었다. 혈청시료 중에 함유되어있는 acetylcholine은 AChE와 ChO에 의해 H_2O_2 로 전환되고 choline는 ChO에 의해 H_2O_2 로 전환되므로 효소시약으로 AChE와 ChO가 동시에 첨가된 경우에는 시료 중의 acetylcholine과 choline을 합한 총 농도가 분석된다. 혈청 시료 중 choline의 농도만을 분석하기 위해 사람의 혈청시료를 1 ml씩 5개로 나누어 각 혈청시료에 표준용액인 5.00×10^{-4} M choline chloride 용액을 0, 0.5, 1, 2, 3 ml로 첨가한 후 AChE 효소를 제외한 나머지 시약들을 acetylcholine과 choline의 총 농도 분석 시와 동일한 방법으로 첨가하고 30°C에서 25분간 반응시킨 후 methanol을 2 ml 첨가하여 단백질을 침전시킨 후 흡광도를 측정하였다. 마찬가지로 5.00×10^{-4} M choline chloride 표준용액의 부피에 대한 흡광도는 Table IV에 기록되어 있으며 흡광도를 표준용액의 부피(Vs)에 대하여 도시 하였을 때 $A_{508}=0.386 Vs(ml)+0.088(R^2=0.9992)$ 의 관계식을 나타냈으며 choline의 농도를 계산하였더니 1.14×10^{-4} M이었다. 혈청 시료 중 acetylcholine과 choline의 총 농도와 choline의 농도 차이는 혈청 중 acetylcholine의 농도이며 3.20×10^{-5} M로 계산되었다. Choline의 함량은 acetylcholine과 비교하여 3.6배 높았다.

쥐의 대뇌, 소뇌 중 acetylcholine 및 choline의 함량

실험방법에서 기술한 바와 같이 자유롭게 사육한 수컷 흰쥐를 희생시켜 1.0406 g의 대뇌조직을 pH 7.0 인산염 완충용액에 넣고 분쇄하여 시료 4.16 ml를 제조하였다. 대뇌 조직 시료를 0.5 ml씩 4개로 나누어 acetylcholine과 choline의 총 농도를 구하기 위해 2개의 시료에 각각 5.00×10^{-4} M acetylcholine chloride 표준용액을 0, 0.5 ml로 첨가하고 choline의 농도만을 분석하기 위해 다른 2개의 시료에 5.00×10^{-4} M choline chloride 용액을 각각 0, 0.5 ml로 첨가하였다. 사람의 혈청시료는 1 ml를 사용했던 반면에 대뇌 조직 시료는 0.5 ml를 사용한 관계로 모든 시약들의 부피를 1/2로 축소하여 첨가하였고 혈청시료 분석하는 방법과 동일하게 효소반응을 진행 시키고 methanol을 가하여 단백질을 침전시킨 후 상층 액의 흡광도를 측정한 결과는 Table V 및 Table VI과 같았다. 대뇌 조직 시료가 충분하지 않아서 단일 표준물첨가법으로 acetylcholine과 choline의 농도를 다음과 같이 계산하였

Table V – Absorbance values of single 5.00×10^{-4} M acetylcholine chloride standard solution added to cerebrum sample

Acetylcholine chloride volume (ml)	A_{508nm}
0	0.161
0.5	0.220

Table VI – Absorbance values of single 5.00×10^{-4} M choline chloride standard solution added to cerebrum sample

Choline chloride volume (ml)	A_{508nm}
0	0.037
0.5	0.101

다: $Cx=(A_1CsVs/A_2Vt-A_1Vx)$, 여기서 Cx; 시료 중 acetylcholine과 choline의 총 농도 또는 choline의 농도, Cs; 첨가한 표준용액의 농도, Vs; 첨가한 표준용액의 부피, Vx; 시료의 부피, Vt; 흡광도 측정 시 총 부피(6 ml), A_1 ; 표준용액을 첨가하지 않았을 때 (0 ml)의 흡광도, A_2 ; 표준용액을 0.5 ml 첨가했을 때의 흡광도이다. 실험에 사용한 쥐의 대뇌 중 acetylcholine($C_7H_{16}NO_2^+$, 146.21)과 choline($C_5H_{14}NO^+$, 104.17)의 총 농도는 3.25×10^{-5} M이었고 choline의 농도만은 1.57×10^{-5} M로 산출되어 acetylcholine의 농도는 1.68×10^{-5} M로 계산된다. 따라서 pH 7.0 인산염 완충용액 4.16 ml에 분쇄된 1.0406 g의 대뇌 조직 안에는 acetylcholine($C_7H_{16}NO_2^+$, 146.21)이 10.22 μ g, 즉 9.82 μ g/g의 양이 함유되어 있었고 choline($C_5H_{14}NO^+$, 104.17)은 6.80 μ g, 즉 6.53 μ g/g의 양이 함유되어 있었다. 희생시킨 흰쥐의 소뇌조직 0.5223 g을 pH 7.0 인산염 완충용액 2.09 ml에 넣고 분쇄하여 시료를 제조하였다. 소뇌 조직을 0.5 ml씩 4개로 대뇌 조직시료와 동일하게 효소반응을 진행시키고 단백질을 침전시킨 후 상층 액의 흡광도를 측정한 결과를 Table VII과 Table VIII에 수록하였으며 마찬가지로 단일 표준물첨가법에 의해 acetylcholine과 choline의 농도를 계산하였다. 실험에 사용한 쥐의 소뇌 중 acetylcholine과 choline의 총 농도는 2.54×10^{-5} M이었고 choline의 농도만은 1.28×10^{-5} M로 산출되어 acetylcholine의 농도는 1.26×10^{-5} M로 계산된다. 따라서 pH 7.0 인산염 완충용액

Table VII – Absorbance values of single 5.00×10^{-4} M acetylcholine chloride standard solution added to cerebellum sample

Acetylcholine chloride volume (ml)	A_{508nm}
0	0.113
0.5	0.195

Table VIII – Absorbance values of single 5.00×10^{-4} M choline chloride standard solution added to cerebellum sample

Choline chloride volume (ml)	A_{508nm}
0	0.071
0.5	0.237

2.09 ml에 분쇄된 0.5223 g의 소뇌 조직 안에는 acetylcholine이 3.85 µg, 즉 7.37 µg/g의 양이 함유되어 있었고 choline은 2.79 µg, 즉 5.34 µg/g의 양이 함유되어 있었다. 결과적으로 소뇌보다는 대뇌에 조직시료 g당 acetylcholine과 choline이 더 많이 함유되어 있음을 확인하였다.

결 론

생체 시료 중 아세틸콜린 및 콜린에 대한 정량분석 방법으로 이러한 기질들과 특이적으로 반응하는 효소인 acetylcholinesterase (AChE)와 choline oxidase(ChO)를 사용하고 AChE와 ChO 효소반응에서 생성된 H₂O₂를 peroxidase(PO) 존재 하에 4-aminoantipyrine/phenol 시약에 신속하게 효소반응으로 연결시켜 quinoneimine 색소를 만들어 508 nm에서 측정하는 효소-분광학적 분석법을 개발하였다. 본 연구에서 PO의 최종 효소농도는 17.5 U/ml, ChO와 AChE의 최종 효소농도는 모두 0.4 U/ml로 고정하였고 반응 온도와 시간은 각각 30°C와 25분으로 정하였다. Acetylcholine chloride 표준용액(2.5×10⁻⁶ M~1.25×10⁻⁴ M)에 대한 검량곡선식은 A₅₀₈=9534[acetylcholine]+0.009이었고 상관 계수의 제곱(R²)이 0.999로서 좋은 직선 성을 나타내었고, 정밀도는 2.5×10⁻⁶ M에서는 1.62%, 그 외 1.25×10⁻⁵ M, 2.5×10⁻⁵ M, 1.25×10⁻⁴ M에서는 RSD가 각각 0.27%, 0.32%, 0.10%인 합리적인 정밀도를 나타내었으며 검출한계농도는 1.11×10⁻⁷ M이었다. 정확도는 4.13×10⁻⁶ M~1.01×10⁻⁴ M 농도범위에서 상대 오차(Er)가 -0.24~0.97%로서 좋은 정확도를 나타내었다. 본 연구의 효소-분광학적 분석법으로 사람의 혈청 시료를 분석한 결과 acetylcholine과 choline의 농도는 각각 3.20×10⁻⁵ M과 1.14×10⁻⁴ M이었다. 흰쥐의 대뇌 조직 및 소뇌 조직 중 acetylcholine 함량은 각각 9.82 µg/g과 7.37 µg/g이었고 choline 함량은 각각 6.53 µg/g과 5.34 µg/g이었다.

감사의 말씀

흰쥐의 대뇌 및 소뇌조직 시료를 만들어 주신 상명대학교 그린생명과학과 발생생리학 실험실의 전 은영 에게 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Jamal, M., Ameno, K., Wang, W., Kumihashi, M., Ameno, S., Ikuo, U., Shinji, A. and Ijiri, I. : Inhibition of acetaldehyde metabolism decreases acetylcholine release in medial frontal cortex of freely moving rats. *Brain Research* **1039**, 90 (2005).
- 2) Hrdina, P. D. : Metabolism of brain acetylcholine and its modification by drugs. *Drug Metab. Rev.* **3**, 89 (1974).
- 3) Chang, Q. and Gold, P. E. : Switching memory system during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. *J. Neurosci.* **23**, 3001 (2003).
- 4) Uutela, P., Reinil, R., Pippinen, P., Ketola, R. A. and Kostianen, R. : Analysis of acetylcholine and choline in microdialysis samples by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 2950 (2005).
- 5) Frolich, L., Dirr, A., Gotz, M. E., Gsell, W., Reichmann, H., Riederer, P. and Maurer, K. : Acetylcholine in human CSF: methodological considerations and levels in dementia of Alzheimer type. *J. Neural Transm.* **105**, 961 (1998).
- 6) Niwa, O., Horiuchi, T., Morita, M., Huang, T. and Kissinger, P. T. : Determination of acetylcholine and choline with platinum-black ultramicroarray electrodes using liquid chromatography with a post-column enzyme reactor. *Analytica Chimica Acta* **318**, 167 (1996).
- 7) Guerriere, A. and Palmisano, F. : An acetylcholinesterase/cholineoxidase-based amperometric biosensor as a liquid chromatography detector for acetylcholine and choline determination in brain tissue homogenates. *Anal. Chem.* **73**, 2875 (2001).
- 8) Yamamoto, K., Sato, K., Chikuma, T. and Kato, T. : A highly sensitive and stable detection of acetylcholine by HPLC-osmium-horseradish peroxidase redox polymer electrode coated on a gold radial flow ring disk. *Analytica Chimica Acta* **521**, 209 (2004).
- 9) Godoy, S., Leca-Bouvier, B., Boullanger, P., Blum, L. J. and Girard-Egrot, A. P. : Electrochemiluminescent detection of acetylcholine using acetylcholinesterase immobilized in a biomimetic Langmuir-Blodgett nanostructure. *Sensors and Actuators B* **107**, 82 (2005).
- 10) Hows, M. E. P., Organ, A. J., Murray, S., Dawson, L. A., Foxton, R., Heidebreder, C., Hughes, Z. A., Lacroix, L. and Shah, A. J. : High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the rapid high sensitivity measurement of basal acetylcholine from microdialysates. *J. Neuroscience Methods* **121**, 33 (2002).
- 11) Campanella, L., Bonanni, A., Magri, A. L., Sorbo, A. and Tomassetti, M. : Determination of choline containing phospholipids in serum, bile and amniotic fluids by the derivative enzymatic-spectrophotometric method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35**, 399 (2004).
- 12) Elnemma, E. M. : Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide by a hydroquinone-aniline system catalyzed by molybdate. *Bull. Korean Chem. Soc.* **25**, 127 (2004).
- 13) Atsubara, C., Kudo, K., Kawashita, T. and Takamura, K. : Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide with

- titanium reagent and its application to the determination of serum glucose using glucose oxidase. *Anal. Chem.* **57**, 1107 (1985).
- 14) Huana, H., Kuan, J. W. and Guilbault, G. G. : Fluorometric enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* **21**, 1605 (1975).
- 15) Lazaro, F., Luque de Castro, M. D. and Valcarcel, M. : Individual and simultaneous determination of ethanol and acetaldehyde in wines by flow injection analysis and immobilized enzymes. *Anal. Chem.* **59**, 1859 (1987).
- 16) Czaban, J. D. and Rechnitz, G. A. : Fabrication and evaluation of glass microbulb electrodes. *Anal. Chem.* **47**, 1792 (1975).
- 17) Vreeke, M., Maidan, R. and Heller, A. : Hydrogen peroxide and β -nicotinamide adenine dinucleotide sensing amperometric electrodes based on electrical connection of horseradish peroxidase redox centers to electrodes through a three-dimensional electron relaying polymer network. *Anal. Chem.* **64**, 3084 (1992).
- 18) Willian, F. Brunsman, A., Huntigton, J., Johnson, J. and Newman, D. : *Amperometric-oxidase enzyme probes for biochemical analysis*. Yellow Springs, Ohio, U.S.A. (1976).
- 19) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C. : Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**, 470 (1974).
- 20) Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V. and Grant, R. : Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **785**, 263 (2003).
- 21) Harris, D. C. : *Quantitative Chemical Analysis*, 7th Ed., Freeman and Company, New York, U.S.A. p. 86 (2007).
- 22) Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. and Crouch, S. R. : *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8th Ed., Thomson, U.S.A. p. 793 (2004).