

Ferrothiocyanate법에 의한 혈청 Lipid Hydroperoxide정량

백태홍 · 박찬식 · 천현자

한양대학교 자연대 화학과

Quantitative Determination of Lipid Hydroperoxide in Human Blood Serum by Ferrothiocyanate Method

Paik, Taik-Hong · Park, Chan-Sik · Chun, Hyun-Ja

Dept. of Chemistry, Hanyang University

(Received April 5, 1988)

ABSTRACT

In order to develop the method of quantitative determination of lipid hydroperoxide in human blood serum, we tried the ferrothiocyanate method to total lipids extracted by Bligh-Dyer method and obtained the results as follows.

1. The maximum absorbance showed at the concentration of Mohr's solution, 0.127M at pH 1.70 and ammonium thiocyanate solution, 3.95M in the ferrothiocyanate method.
2. When hydrogen peroxide, cumene hydroperoxide, and oxidized linoleic acid were added to serum, and extracted them by Bligh-Dyer method to examine the extraction efficiency, we confirmed that cumene hydroperoxide and oxidized linoleic acid were extracted in CHCl₃ phase, and hydrogen peroxide in MeOH-H₂O phase, respectively.
3. The concentration of lipid hydroperoxide of total lipids extracted from normal adult serum was 2.0x10⁻⁵ M, and increased proportionally the concentration of lipid hydroperoxide by increasing the amount of serum.
4. When we compared the total lipids extracted by Bligh-Dyer method and total lipids extracted after lipoprotein is precipitated by Yagi method in human blood serum, the concentration of lipid hydroperoxide was showed nearly the same value.

From our results, we concluded that the concentration of lipid hydroperoxide in human blood serum could be determined quantitatively by ferrothiocyanate method.

I. 서 론

과산화지질(lipid peroxide)이란 지질과 산소가 결합하여 생성된 peroxide(-O-O-) 구조를 가진

각종 산화생성물을 말하며 여기에는 2차 산화생성물이 포함되는 경우도 있어 어떤 특정 화합물을 뜻하는 것은 아니며, 지질의 성분인 불포화지방산에 산소가 결합되어 생성된 화합물을 총칭한다.

생체내에서 생성된 과산화지질은 노화현상을 비롯

하여 여러가지 퇴행성 변화를 수반하는 각종 질병^{1~4)}과 관계가 있어 최근에는 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있으며, 과산화지질이 갖는 생리적 및 병리적 작용이 밝혀짐에 따라 그 임상적인 중요성의 의의가 점차 널리 인식되었고, 따라서 생체내의 lipid hydroperoxide 정량은 중요하게 되었다.

Lipid peroxide의 정량법으로는 hydroperoxide 자체를 정량하는 iodometry 법,⁵⁾ polarography 법,⁶⁾ indophenol 법,⁷⁾ thiocyanate 법⁸⁾ 등이 있으나 양적인 제한, 시료의 취급 및 감도 등에 문제가 있어 생체시료에는 거의 이용되고 있지 않다.

한편, 간접적으로 정량하는 방법으로는 over test,⁹⁾ U.V.,¹⁰⁾ E.S.R.¹¹⁾ 법 등이 있으나, oven test는 산소의 소모량을 측정하는 방법이며, U.V., E.S.R. 법은 불포화 지방산의 구조적 변화를 측정하는 방법으로 생체조직 중의 시료에 관하여는 정성적 범위를 벗어날 수가 없다.

또한, 분해방법으로는 TBA 법¹²⁾이 생체시료에 대하여 많이 이용되고 있다. 그러나 TBA 법은 과산화지질에서 생성되는 malondialdehyde 뿐만 아니라 여러가지 aldehyde류, sialic acid, sugar 및 pyruvic acid 등과도 비 특이적으로 반응하기 때문에 반응의 감도가 낮으며 또한, lipid hydroperoxide 양 자체를 측정하는 것이 아니라 2차 산화 생성물의 과산화화물의 양을 측정하기 때문에 문제점이 있다.

생체 중의 lipid peroxide 양의 지표로 가장 적당한 것은 lipid hydroperoxide 자체이므로 생체내의 lipid hydroperoxide 자체를 정량할 수 있는 분석법의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 혈액중의 lipid hydroperoxide 자체를 정량하는 방법을 개발하고자 혈청에서 total lipid를 Bligh-Dyer 법으로 추출하여 과산화물의 정량법인 ferrothiocyanate 법을 이용하여 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 조제

1) Mohr 염 및 ammonium thiocyanate 용액¹²⁾

Mohr 염 1.25g을 25ml 메스플라스크에 넣고 3.5% HCl 수용액으로 녹여 pH 1.70인 0.125M의 Mohr

염을 만들고, ammonium thiocyanate 7.5g을 25ml 메스플라스크에 넣고 증류수를 가하여 최종농도가 3.95 M의 ammonium thiocyanate를 만들어 사용하였다.

2) 혈청의 분리

29세 건강한 남자로 부터 혈액을 취하여 3,000rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 혈청을 4℃ 냉장고에 보관하면서 시료로 사용하였다.

2. 실험 방법

1) Ferrothiocyanate법의 최적조건 결정

Mohr 염 용액의 최적농도 및 pH와 ammonium thiocyanate 용액의 농도를 결정하기 위하여 각 농도별, pH별 용액을 만들어 각각 0.1ml씩 넣고 상온에서 정확히 3분간 방치한 후 spectronic 20으로 500nm에서 10초이내에 흡광도를 측정하였다.

2) 농도별 H₂O₂ 흡광도 측정

각 농도별로 만든 H₂O₂ 용액 0.1ml를 취하여 9.5% ethanol 4.7ml에 녹인 다음 3.95M ammonium thiocyanate 용액 0.1ml와 0.127M Mohr 염 0.1ml를 가하여 혼합하고 정확히 3분간 방치한 후 10초이내에 spectronic 20을 사용하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Cumene의 농도결정

본 실험에 사용한 cumene hydroperoxide 용액의 농도를 알기 위하여 hydroperoxide 양을 요오드적정법¹³⁾으로 적정하였다.

즉, cumene hydroperoxide 용액 0.005g에 chloroform 10ml와 acetic acid 15ml 및 포화 KI 용액 1ml를 가하고 1분간 심하게 흔들어 어두운 곳에 5분간 방치한 다음 증류수 75ml를 가하여 혼합한 후 1% 녹말용액을 지시약으로 사용하여 0.01N Na₂S₂O₃ 용액으로 적정하였다.

적정한 결과 표준물질로 사용한 cumene hydroperoxide 용액의 농도는 81%였다.

4) Cumene hydroperoxide 용액의 표준곡선 및 몰 흡광계수 측정

각 농도별 cumene hydroperoxide 용액을 chloroform에 녹여 만든 후 ferrothiocyanate 법으로 각 농도에 따른 흡광도를 500nm에서 측정하여 그래프를 작성하였으며, 몰 흡광계수는 농도별 cumene hydroperoxide 용액의 흡광도 값을 사용하여 Lambert-Beers 법칙에 의해 계산하였다.

5) 혈청 Lipid의 추출

① Bligh-Dyer 법¹⁴⁾에 의한 total lipid 추출

혈청 자체를 물로 보고 시험관에 넣어 CHCl_3 -MeOH- H_2O (1:2:0.8, v/v/v) 혼합용액을 가한 다음 15분간 방치한 후 CHCl_3 - H_2O 를 가하여 CHCl_3 -MeOH- H_2O 의 부피가 1:1:0.9(v/v/v)로 되도록 한다. 이 용액을 원심분리하여 CHCl_3 층을 분리하고 질소가스 존재 하에서 건조하여 total lipid를 얻었다.

② Yagi 법¹⁵⁾에 의해 분리한 Lipoprotein 으로부터 Lipid 추출

혈청 0.1ml에 N/12 H_2SO_4 8.0ml와 phosphotungstic acid 1ml를 가한 후 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 lipoprotein 의 침전물에 증류수를 가하고 0.8ml가 되게하여 위와 동일한 방법으로 lipid를 추출하였다.

6) Lipid hydroperoxide의 측정

Bligh-Dyer 법으로 추출한 혈청 total lipid 중에서 lipid hydroperoxide는 ferrocyanate 법¹⁶⁾으로 측정하였다.

즉, 혈청 0.1ml에서 추출한 total lipid를 95% ethanol 4.8ml에 녹인 다음 3.95M ammonium thiocyanate 용액 0.1ml와 0.127M Mohr 염 0.1ml를 가하여 혼합하고 정확히 3분간 방치한 후 10초 이내에 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Hydrogen peroxide, Cumene hydroperoxide 및 산화된 Linoleic acid를 첨가한 혈청에서의 Lipid hydroperoxide의 정량

각 혈청 0.1ml에 1×10^{-2} % H_2O_2 용액, 1×10^{-3} M cumene hydroperoxide 용액, 3.6×10^{-2} M linoleic acid 용액을 각각 넣고 Bligh-Dyer 법에 의해 추출하여 혈청과 동일하게 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Ferrocyanate법의 최적조건

Ferrocyanate법의 최적조건을 알기 위하여 ammonium thiocyanate 용액과 Mohr 염 용액의 농도를 검토한 결과 3.95M ammonium thiocyanate와 pH 1.70인 0.127M Mohr 염 용액일때 최대 흡광도를 나

타냈으므로 모든 실험은 이 조건에서 실시하였다.

2. 농도별 H_2O_2 용액의 흡광도

H_2O_2 의 농도에 따른 흡광도의 변화를 알아보기 위하여 5×10^{-4} %~1% H_2O_2 용액의 흡광도를 측정한 결과는 Table 1과 같이 H_2O_2 의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 크게 증가하였다.

이는 산성하에서 hydrogen peroxide 농도가 증가함에 따라 Mohr 염 용액의 Fe^{2+} 는 Fe^{3+} 로 많이 산화되어 thiocyanate 이온과 반응하여 착이온을 생성하기 때문에 흡광도가 크게 증가하는 것으로 생각된다.

한편, Bligh-Dyer 법으로 추출할 경우 H_2O_2 용액이 CHCl_3 층과 MeOH- H_2O 층의 두층 중 어느층에서 추출되는지를 알아보기 위하여 두층의 흡광도를 측정한 결과 Table 2에서와 같은 H_2O_2 용액은 MeOH- H_2O 층에서 추출됨을 알 수 있었다.

Table 1. Absorbance on each concentration of hydrogen peroxide

| Concentration (%) | Absorbance | Concentration (%) | Absorbance |
|--------------------|------------|--------------------|------------|
| 5×10^{-4} | 0.00 | 5×10^{-4} | 0.43 |
| 1×10^{-3} | 0.01 | 1×10^{-1} | 0.90 |
| 5×10^{-3} | 0.05 | 1×10^0 | Scale out |
| 1×10^{-2} | 0.09 | - | - |

3. Cumene hydroperoxide의 표준곡선 및 몰흡광도 계수

Bligh-Dyer 법으로 추출할 경우 cumene hydroperoxide 용액이 CHCl_3 층과 MeOH- H_2O 층의 두층 중 어느 층에서 추출되는지 알기 위하여 두층의 흡광도를 측정한 결과 Table 2에서와 같이 cumene hydroperoxide 용액은 CHCl_3 층에서 추출됨을 알 수 있었다.

또한, cumene hydroperoxide 용액의 흡광계수를 구하기 위하여 표준곡선을 구한 결과는 Fig.1 (Table 3)와 같이 1×10^{-4} M에서 8×10^{-4} M 농도 사이에 좋은 직선관계를 나타내었다.

이 표준곡선으로 부터 계산한 cumene hydroperoxide의 몰흡광계수는 $0.63 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었다.

Table 2. The comparison of absorbance on CHCl₃ and MeOH-H₂O phase by Bligh & Dyer method

| Sample | Phase | Absorbance |
|--|-----------------------|------------|
| Serum | CHCl ₃ | 0.013 |
| | MeOH-H ₂ O | 0.00 |
| H ₂ O ₂ ^a | CHCl ₃ | 0.00 |
| | MeOH-H ₂ O | 0.11 |
| Serum + H ₂ O ₂ ^b | CHCl ₃ | 0.013 |
| | MeOH-H ₂ O | 0.04 |

The concentration of hydrogen peroxide added was 1 × 10⁻² %.

H₂O₂^a : 0.8ml H₂O₂

H₂O₂^b : 0.1ml H₂O₂

Table 3. The change of absorbance on each concentration of cumene hydroperoxide

| Conc. of CHPO* (10 ⁻⁴ M) | Absorbance (A ₄₅₀) | Conc. of CHPO* (10 ⁻⁴ M) | Absorbance (A ₄₅₀) |
|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1.0 | 0.07 | 5.0 | 0.31 |
| 2.0 | 0.14 | 6.0 | 0.37 |
| 3.0 | 0.19 | 7.0 | 0.43 |
| 4.0 | 0.25 | 8.0 | 0.49 |

* CHPO: cumene hydroperoxide

This date was used for the standard curve(Fig. 1).

4. 혈청 중의 Lipid hydroperoxide의 정량

혈청 0.1ml를 Bligh-Dyer법으로 추출하여 CHCl₃ 층과 MeOH-H₂O 층을 ferrothiocyanate법으로 측정 한 결과 혈청중의 lipid hydroperoxide는 CHCl₃ 층에서 추출됨을 알 수 있었으며 그 흡광도는 0.013이었으므로 혈청 0.1ml 중에 함유된 lipid hydroperoxide 양은 lipid hydroperoxide 농도 0.1ml serum

$$= \frac{0.013}{(0.63 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})(\text{cm})} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M} \text{ 이었다.}$$

5. Hydrogen peroxide, Cumene hydroperoxide 및 산화된 Linoleic acid 첨가 혈청에서의 흡광도

혈청내에 존재하는 hydrogen peroxide와 lipid

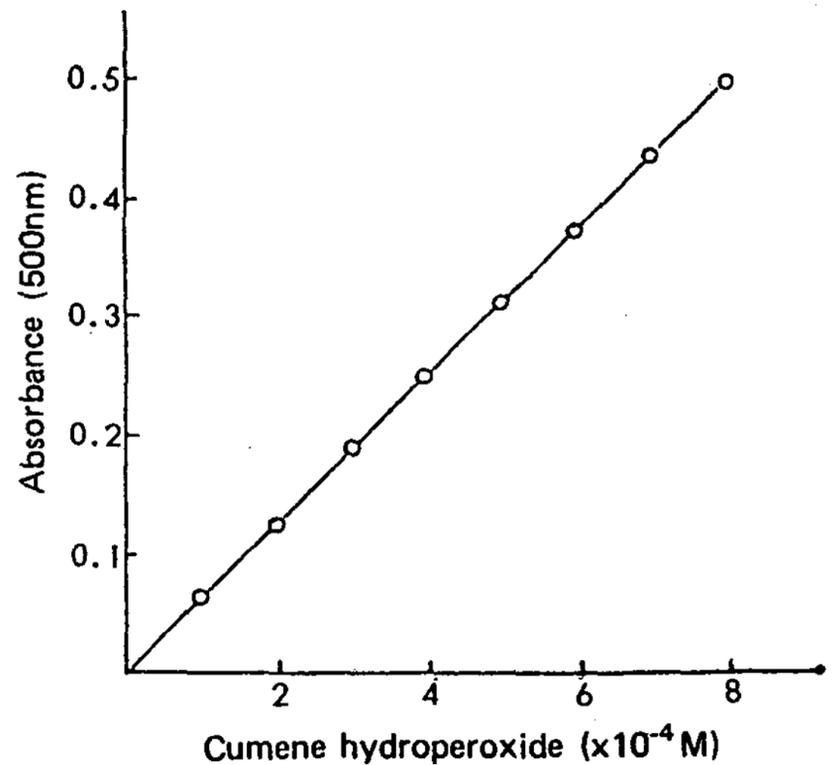


Fig. 1. The standard curve of curve of cumene hydroperoxide.

hydroperoxide를 Bligh-Dyer법으로 추출하였을 때 CHCl₃ 층과 MeOH-H₂O 층의 두층 중 hydrogen peroxide, cumene hydroperoxide 및 산화된 lipid acid를 첨가한 model 실험을 실시한 결과는 다음과 같다.

1) Hydrogen peroxide 첨가 혈청

1 × 10⁻² % H₂O₂ 용액과 1 × 10⁻² % H₂O₂ 용액을 첨가한 혈청을 Bligh-Dyer법으로 추출하여 흡광도를 측정한 결과 Table 2에서와 같이 H₂O₂는 MeOH-H₂O 층에서 추출되고 혈청중의 lipid hydroperoxide는 CHCl₃ 층에서 추출되는 것을 알 수 있었다. H₂O₂가 첨가된 혈청에서 MeOH-H₂O 층에서의 흡광도가 이론값보다 적게 나타난 것은 실험중에 H₂O₂의 일부가 분해된 결과라고 생각된다.

2) Cumene hydroperoxide 첨가 혈청

1 × 10⁻³ M cumene hydroperoxide 용액과 1 × 10⁻³ M cumene hydroperoxide 용액을 첨가한 혈청을 Bligh-Dyer법으로 추출하여 흡광도를 측정한 결과 Table 4에서와 같이 cumene hydroperoxide와 혈청중의 lipid hydroperoxide가 CHCl₃ 층에서 추출되는 것을 알 수 있었다. 자체 cumene hydroperoxide에서 CHCl₃ 층에서의 흡광도가 이론값보다 적게 나타난 것은 cumene hydroperoxide 일부가 MeOH-H₂O 층으로 추출된 결과라고 생각된다.

3) 산화된 Linoleic acid 첨가 혈청

산화된 3.6×10^{-2} M linoleic acid 용액과 산화된 3.6×10^{-2} M linoleic acid 용액을 첨가한 혈청을 Bligh-Dyer 법으로 추출하여 흡광도를 측정한 결과는 Table 5에서와 같이 산화된 linoleic acid 용액 중의 linoleic acid hydroperoxide와 혈청 중의 lipid hydroperoxide는 CHCl_3 층으로 추출되는 것을 알 수 있었다.

위의 결과로 부터 혈청속에 존재하는 lipid hydroxide는 CHCl_3 층에서 추출되며, hydrogen peroxide는 $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 층에서 추출됨을 알 수 있었고, 이 결과로 부터 ferrothiocyanate 법에 의해 측정되는 것은 혈액내에 존재하는 hydrogen peroxide는 제외된 lipid hydroperoxide라는 것을 알 수 있었다.

6. 혈청에서 추출한 Total lipid와 Lipoprotein에서의 Lipid hydroperoxide 양의 비교

혈청에서 Bligh-Dyer 법으로 total lipid를 추출한 시료와 Yagi¹²⁾의 TBA값 측정시 사용한 침전법을 적용하여 같은 양의 혈청에서 lipoprotein을 침전시킨 후 Bligh-Dyer 법으로 lipid를 다시 추출하여 혈청 lipid hydroperoxide 양을 ferrothiocyanate 법으로 측정한 결과 혈청 0.1ml와 0.2ml를 사용하였을 때 Table 6에서와 같이 거의 동일한 값을 나타내었다.

이와 같은 결과는 혈청 lipid hydroperoxide 양을 정량할 때 혈청에서 Bligh-Dyer 법으로 total lipid를 추출하여 시료로 사용하거나 lipoprotein을 분리하여 lipid hydroperoxide 양을 측정하거나 동일함을 알 수 있었으며, 혈청에서 lipid hydroperoxide를 정량할 때 혈청에서 직접 Bligh-Dyer 법으로 total lipid를 추출하여 측정하는 것이 간편하다는 것을 확인할 수 있었다.

7. 혈청량과 Lipid hydroperoxide 양의 함수관계

혈청내에 존재하는 lipid hydroperoxide 양을 ferrothiocyanate 법으로 측정한 결과 흡광도가 낮았으므로 혈청량을 증가시킴에 따라 흡광도가 현저하게 증가되는가를 알아보기 위하여 혈청 0.1ml에서 1.0ml까지 흡광도를 측정해 본 결과 Table 7에서와 같이

Table 4. The comparison of absorbance on CHCl_3 and $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ phase by Bligh & Dyer method

| Sample | Phase | Absorbance |
|--------------|---------------------------|------------|
| CHPO* | Total | 0.67 |
| CHPO | CHCl_3 | 0.54 |
| | $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ | 0.09 |
| Serum + CHPO | CHCl_3 | 0.56 |
| | $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ | 0.095 |

The concentration of cumene hydroperoxide added was 1×10^{-3} M.

* CHPO: Cumene hydroperoxide

Table 5. The comparison of absorbance on CHCl_3 and $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ phase by Bligh & Dyer method

| Sample | Phase | Absorbance |
|--------------|---------------------------|------------|
| Serum | CHCl_3 | 0.013 |
| | $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ | 0.00 |
| L.A. | CHCl_3 | 0.47 |
| | $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ | 0.00 |
| Serum + L.A. | CHCl_3 | 0.49 |
| | $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ | 0.00 |

L.A.: Oxidized linoleic acid.

Table 6. The comparison of lipid hydroperoxide concentrations in blood serum according to the different extraction method

| Serum ($\times 10^{-1}$ ml) | Method | Absorbance | Concentration (M) |
|------------------------------|--------|------------|----------------------|
| 1.0 | A | 0.013 | 2.0×10^{-5} |
| | B | 0.015 | 2.4×10^{-5} |
| 2.0 | A | 0.029 | 4.6×10^{-5} |
| | B | 0.029 | 4.6×10^{-5} |

Method A: Total lipids were extracted on Bligh & Dyer method.

Method B: Total lipids were extracted on Bligh & Dyer method after lipoprotein is precipitated by Yagi method.

Table 7. The concentration of lipid hydroperoxide in blood serum

| Serum(ml) | Absorbance | Concentration(M) |
|-----------|------------|-----------------------|
| 0.1 | 0.012 | 2.0×10^{-5} |
| 0.2 | 0.020 | 3.2×10^{-5} |
| 0.3 | 0.032 | 5.1×10^{-5} |
| 0.6 | 0.068 | 10.8×10^{-5} |
| 0.0 | 0.125 | 19.8×10^{-5} |

혈청량에 비례하여 증가되었으며 혈청 1.0ml 중에 함유된 lipid hydroperoxide 량은 0.125의 큰 흡광도를 보였다.

이상의 결과로 부터 혈청 중의 lipid hydroperoxide 량은 ferrothiocyanate 법으로 직접 정량할 수 있음을 알 수 있음을 알았다.

IV. 결 론

혈액 중의 lipid hydroperoxide 량을 직접 정량하는 방법을 개발하기 위하여 혈청을 Bligh-Dyer 법으로 추출한 후 과산화물을 ferrothiocyanate 법으로 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Ferrothiocyanate법의 최적조건을 알기 위해 Mohr 염 용액과 ammonium thiocyanate 용액의 농도를 검토한 결과 최적농도는 pH 1.70인 0.127M Mohr 염 용액과 3.95M ammonium thiocyanate 용액일 때 최대 흡광도를 나타내었다.

2. Hydrogen peroxide, cumene hydroperoxide 및 산화된 linoleic acid를 혈청에 첨가하여 Bligh-Dyer 법으로 각각 추출하였을 때 cumene hydroperoxide와 산화된 linoleic acid는 CHCl_3 층으로 추출되었으며, hydrogen peroxide는 $\text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$ 층으로 추출되었다.

3. 정상인의 혈청을 사용하여 Bligh-Dyer 법으로 total lipid를 추출하여 lipid hydroperoxide 량을 측정한 결과 $2.0 \times 10^{-5}\text{M}$ 이었고 혈청 중의 lipid hydroperoxide 량은 혈청의 양에 비례하여 증가하였다.

4. 혈청에서 Bligh-Dyer 법으로 total lipid를 추출한 시료와 Yagi 법으로 lipoprotein을 침전시켜 Bligh-Dyer 법으로 lipid를 추출한 시료를 비교하여 본 결과 lipid hydroperoxide 량은 거의 동일한 값을 나타내었다.

이상의 결과로 보아 ferrothiocyanate법을 사용함으로써 혈청 중의 lipid hydroperoxide 량을 직접 정량할 수 있었다.

문 헌

1. A.L. Tappel, Federation Proceedings, 32, 8 (1973)
2. Hartroft, W.S., In Metabolism of Lipids as Related to Atherosclerosis, ed. F.A. Kummerow, Springfield, Thomas, 18 (1965)
3. Black, H.S., and J.T. Chan, J. Invest., Dermatol, 65, 412 (1975)
4. Goldstein, B.D., and O.J. Balchum, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 126, 356 (1967)
5. Ablert, W. Girotti, James, P. Thomas and John, E. Jordan, Arch. Biochem. Biophys., 236, 235-251 (1985)
6. Ricciuti, C., Coleman, J.E. and Willits, C.O., Anal. Chem., 27, 405-407 (1955)
7. Hartman, S. and Gravind J., Acta. Chem. Scand., 3, 954-958 (1949)
8. J.A. Starkorich and W.T. Roubal, J. Food Sci., 34, 194 (1969)
9. Hochstein, P. and Ernster, L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 388-394 (1963)
10. Waller, R.L. and Recknagel, R.O., Lipids, 12, 914-921 (1977)
11. Roubal, W.T., Lipids, 6, 176 (1971)
12. Yagi, K., Vitamin, 49, 403 (1975)
13. 황재순 외 2인, 분석화학, 338~346 (1980)
14. W.W. Catristie, Lipid Analysis, 17 (1982)
15. Yagi, K., Biochem. Med., 15, 212-216 (1976)
16. 安本教傳, 岩見會和, 宋養と食糧, 19, 210 (1966)