

## Gas-chromatography에 의한 Amino酸의 分析

N-TFA-*n*-Butyl Ester를 中心으로

梁 仲 益

(Received June 2, 1974)

Chung Ik Yang: Analysis of Amino acids by Gas-chromatography  
by N-TFA-*n*-Butyl ester Derivatives of Amino acids.

아미노酸은 現在 보통 이온교환크로마토그래피에 의하여 分析되고 있지만 많은 사람들의 연구에 의해서 gas-chromatograph(이하 GLC)에 의한 정성은 물론, 정량까지도 가능하기에 이르렀다.

이와같은 사실은 GLC가 아미노산자동분석기(amino acid autoanalyzer)와 마찬가지로 펩타이드와 蛋白質의 분석에 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

GLC에 의한 아미노酸分析은 試料의 전처리가 복잡하다는 단점을 가지고 있지만 또한 정확성, 정밀성, 재현성등이 높은 장점을 가지고 있다. 또 하나의 長點은 여러가지 물질의 분석에 사용되는 다양한 용도의 기계이며 아미노酸分析에 있어서도 아미노산자동분석기에 비하여 경제적인 분석방법이다.

Table I은 GLC에 의한 아미노산의 분석결과와 아미노산자동분석기에 의한 분석결과와의 비교이다.

그렇지만 GLC에 의한 아미노酸 분석 방법이 완성되기까지는 많은 세월이 흘렀으며 그 이유는 비휘발성인 아미노산을 GLC에 적용할 수 있을정도로 휘발성을 주는 방법이 어려웠기 때문이다. 그러나 지금은 蛋白質成分 아미노산은 물론 非蛋白質成分 아미노산 30여종까지도 정량적으로 揮發性 유도체로 변화시킬 수 있게 되었으며, GLC에 의한 아미노산 분석에 하나 남아 있는 문제라고 한다면 單一 column을 사용하여 위의 아미노산 유도체를 정량적으로 유출시키고 분리시키는 것이라 하겠다.

지금부터 아미노산을 정량적으로 안정한 휘발성 유도체로 전환시키는데 포함된 문제들과 정확한 반응조건 유도체의 물리적, 화학적 성질 및 column system에 대하여 살펴보고자 한다.

Table I—amino acid Analysis of bovine serum albumin<sup>(a)</sup>.

Amino acid	w/w %			Av.	Ion exchange <sup>(c)</sup>
	Gas chromatography <sup>(b)</sup>				
Alanine	5.71	5.53	5.67	5.67	5.64
Valine	5.55	5.69	5.50	5.58	5.44
Isoleucine	2.29	2.32	2.22	2.28	2.38
Glycine	1.63	1.53	1.66	1.61	1.70
Leucine	11.61	12.26	11.85	11.90	11.68
Threonine	5.43	5.31	5.30	5.34	5.46
Proline	4.79	4.71	4.72	4.74	4.78
Serine	3.81	4.11	3.65	3.86	4.05
Methionine	0.71	0.68	0.59	0.66	0.70
Phenylalanine	6.47	6.50	6.37	6.44	6.42
Aspartic acid	10.39	10.36	10.19	10.31	10.27
Glutamic acid	17.04	16.75	16.70	16.83	16.43
Tyrosine	5.21	4.97	5.33	5.17	5.24
Lysine	12.31	12.21	12.03	12.18	12.16
Arginine	5.55	5.11	5.40	5.35	5.69
Histidine	3.38	3.44	3.30	3.38	3.64
Cystine	5.37	5.45	5.40	5.41	5.65
				106.71	107.33

(a) Protein hydrolyzed for 18hrs 105° in a sealed tube with constant-boiling HCl.

(b) *n*-Butyl stearate used as internal standard.

(c) Each value represents an average of two independent determinations, norleucine as internal standard.

**揮發性誘導體의 選擇**— Amino酸을 揮發性유도체로 變換시키는 方法은 GLC의 개발과 더불어 많이 연구되어 왔다.

처음에 몇개의 지방족 아미노酸을 Ninhydrin으로 化酸시켜 aldehyde로 變換시킨 후 GLC를 行하는 方法이 여러 사람들에 의하여 시도 되었다<sup>1,2)</sup>

그후 Bier와 Teitel-Baum<sup>3)</sup>이 아미노酸을 탄산산화시켜 아민으로 變換시켜서 GLC를 行하였고, Bayer, Reuter 그리고 Born<sup>4)</sup> 등은 아미노산의 메칠에스테를 제조한 후 分析하는데 성공하였으며, Youngs<sup>5)</sup>는 아미노酸을 N-acetyl-*n*-butyl ester로 轉換시켜 GLC를 行하였다. 또 Liberty<sup>6)</sup>는 아미노酸을 아질산과 反應시켜  $\alpha$ -hydroxy acid로 만들고 다시 methyl ester로 하여 얻은 chromatogram을 발표한 바 있고 Melamed와 Renard<sup>7)</sup>는 지방족 monocarboxylic amino acid들을  $\alpha$ -chloro amino acid로 變換시키고 다시 diazomethane으로 methylester로 하여 silicone stearic acid column에서 chromatograph를 行하였다.

Rühlmann과 Giesecke<sup>8,9)</sup>는 아미노산과 trimethyl chlorosilane과의 反應 또는 N-trimethylsilyl-dialkylamine과의 反應으로 얻어진 N-trimethylsilylamino acid trimethylester를 GLC

에 적용시켰다. 이것은 지금도 가끔 사용되는 방법이며 현재 검토 중인 TMS 化法으로는 BSA, BSTFA에 의한 방법이 있으며, 이 방법으로는 1회로 아미노酸을 처리할 수 있다는 장점이 있으나 arginine에 대한 반응성이 문제가 되어 연구 중에 있다.

그외에도 Saroff와 Karmen<sup>10)</sup>은 N-trifluoroacetyl amino acid의 methyl ester를 polyethyl-ene glycol adipate의 column을 사용하여 分析하였으며, Jensen<sup>11)</sup> 등은 33가지의 아미노酸을 N-acetyl-*n*-amyl amino acid ester로 변화시켜 GLC를 행하고 있다.

그후 Gehrke<sup>12)</sup> 등은 N-TFA-*n*-methyl, N-acetyl-*n*-butyl, N-TFA-*n*-butyl, N-acetyl-*n*-butyl의 각 유도체로 valine, phenylalanine, glutamic acid, lysine 등을 변화시키고 GLC에 적용한 결과를 비교하고 있다. 그에 의하면 N-TFA化合物은 相當하는 acetyl化合物보다도, 또 methyl ester는 butyl ester보다 揮發性이 높았으며 N-acetate化合物은 lysine 등의 경우 tailing이 심하고 分析에 高溫을 要하였으며 流出하지 않는 경우도 있음을 보고하고 있다. 또한 휘발성이 높은 유도체는 감압농축時의 損失率이 높다. Table II에서 보는 바와같이 N-TFA-*n*-butyl化合物로 된 valine, glycine, alanine들의 수율이 97~100%로써 다른 유도체에 비하여 精量적인 수율을 나타내고 있다. 여기서 valine, glycine, alanine의 유도체는 다른 아미노산의 유도체에 비하여 훨씬 휘발성이 높다.

Table II —Volatilities of methyl and *n*-butyl N-trifluoroacetyl esters of amino acids.

	Peak area, sq. in.		
	Before evaporation	After evaporation <sup>(a)</sup>	Recovery %
Methyl N-TFA val	0.495 <sup>(b)</sup>	0.316	64
<i>n</i> -Butyl N-TFA val	1.255	1.243 <sup>(c)</sup>	99
<i>n</i> -Butyl N-TFA ala	1.71	1.708 <sup>(c)</sup>	100
<i>n</i> -Butyl N-TFA gly	1.37	1.327 <sup>(c)</sup>	97

(a) At room temperature (26) and about 4mm of mercury.

(b) Average of four independent determinations.

(c) Corrected with internal standard.

Table III은 N-TFA 유도체가 N-acetyl유도체보다 휘발성이 크며 *n*-methyl유도체가 *n*-butyl 유도체보다 휘발성이 큰 것을 나타낸다. 또 methyl-N-acetyl유도체는 lysine의 경우 유출하지 않으며 *n*-butyl-N-acetyl유도체인 경우는 tailing이 생기는 것으로 보아 일반적으로 N-acetyl 유도체로 GLC를 행하는 것이 어렵다는 것을 알 수 있다.

Gehrke등이 이들 유도체들에 대하여 검토한 결과에 의하여 GLC를 행하는데 가장 적합한 유도체로는 N-TFA-*n*-butyl ester임을 알 수 있겠다.

**Table III**—Retention temperatures of four N-acyl esters prepared from each of four amino acids.

Amino acid	Retention temperature of derivative <sup>(a)</sup>				
	Methyl N-trifluoroacetyl <sup>(b)</sup>	Methyl N-acetyl <sup>(b)</sup>	<i>n</i> -Butyl <sup>(b)</sup>	N-trifluoroacetyl <sup>(c)</sup>	<i>n</i> -Butyl N-acetyl <sup>(c)</sup>
Valine	56	65	109	71	110
Phenylalanine	133	141	167	130	156
Glutamic acid	123	137	180	144	170
Lysine	200	(d)	209	173	216(tailed)

(a) 5 $\mu$ l of a 2.00ml CHCl<sub>3</sub> sol. containing derivatives. Prepared from 10.0mg of amino acid were injected directly on the chromatographic column without the use of a flash heater.

(b) Instrument: F & M Model 400. Column: 100 $\times$ 0.3cm. i.d. borosilicate glass packed with 2.00% (w/w) NPGS on 80-100 mesh acid washed Chromosorb W, Col. Temp.: 41° for 3.0 min., then programmed at 3.3° per min. to 218°C, then isothermal for 15 min. Other conditions as described for (c).

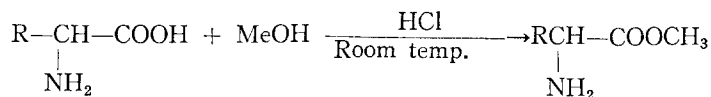
(c) Column: 100 $\times$ 0.3cm i.d. borosilicate glass packed with 1.00% (w/w) NPGS on 60-80 mesh Gas Chrom. A Flow rate: 38ml. per/min. N<sub>2</sub>, Column Temp.: 67° for 6.0 minutes, then programmed at 3.3°C per min. to 218°, Sample size: 5.0 $\mu$ l of a 2.00ml CHCl<sub>3</sub> sol. containing derivatives prepared from 10.0mg of each amino acid.

(d) Not eluted under the chromatographic conditions employed.

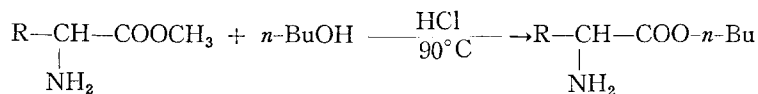
**Amino acid N-TFA-*n*-butyl ester의 製造**— Amino산을 GLC로 분석하는데 있어서 가장 어려운 문제는 tryptophan, histidine, cystine, arginine을 정량적으로 N-TFA-*n*-butyl ester로 만드는 어려움이다.

Gehrke<sup>13)</sup> 등은 20가지 amino酸을 정량적으로 N-TFA-*n*-butyl ester(이하 N-TFA-*n*-Bu)로 변화시키는 방법을 개발했으며 이는 다음의 3단계로 구분된다.

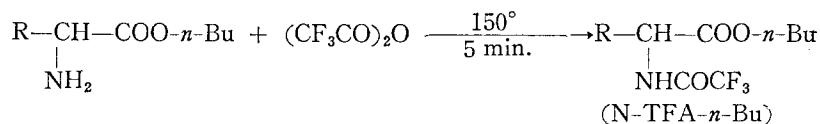
i. Esterification with methanol



ii. Interesterification with *n*-butanol



iii. Acetylation of amino radicals with trifluoroacetic anhydride



이 방법의 가장 큰 특징은 封管(sealed tube)를 사용함으로써 arginine과 tryptophan을 정

량적으로 유도체로 변화시킬 수 있다는 것이다.

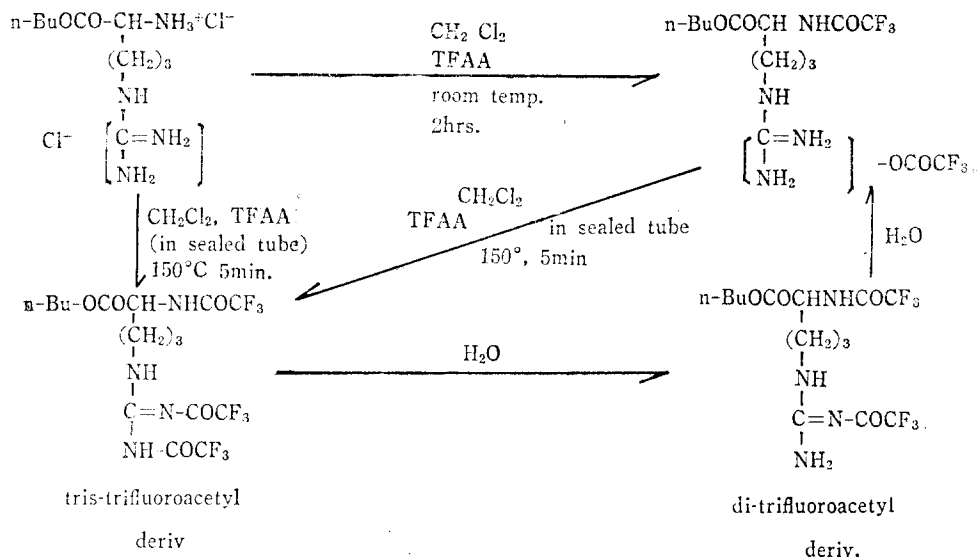
ii의 반응단계에 의하여 다음 반응인 N-TFA화 반응 과정중에서 휘발에 의한 손실을 막을 수 있다. 또한 *n*-BuOH에 난용인 염기성 아미노酸과 glutamate, tyrosine, cystine 등은 직접 butyl ester로 변화시킬 수 없으므로 먼저 methyl ester로 한 후 interesterification시킴으로써 용이하게 이루어질 수 있다. 封管中の 반응으로 tryptophan은 정량적으로 di-trifluoroacetyl유도체로 되나 其他의 방법으로는 mono-trifluoroacetyl유도체가 생김으로써 긴 retention time을 가진 또 하나의 peak를 chromatogram上에 생성시키므로 정량적인 취급이 곤란하다.

Arginine의 경우도 封管中の 반응으로 쉽게 tris-trifluoroacetyl유도체로 변화되나, 이 반응은 특히 수분과의 접촉을 피해야 한다. 왜냐하면 arginine의 tris-trifluoroacetyl유도체는 공기中の 미량의 수분과도 반응하여 di-trifluoroacetyl 유도체로 분해되며 이 유도체는 column으로부터 유출되지 않으므로 GLC를 행할 수 없다.

Arginine이 TFAA (trifluoroacetyl anhydride)와의 상온에서의 반응으로 얻은 유도체 (di-trifluoroacetyl유도체)를 가지고 GLC를 행할 수 없는 이유도 이때문이다(Scheme 1).

Histidine 또한 封管中에서 쉽게 di-trifluoroacetyl유도체로 변하나, 이 유도체로는 다른 아미노산과는 달리 chromatogram을 얻을 수 없으며 mono-유도체라야만 GLC를 행할 수 있다.

따라서 histidine은 di-유도체를 mono-유도체로 다시 전환시켜야 하며 이 전환은 di-유도



Scheme 1—Preparation and hydrolysis of tris-trifluoroacetyl derivatives of arginine.

체의 試料를 GLC에 注入한 후 30초 이내에  $0.1\mu\text{l}$ 의 *n*-ButOH를 다시 GLC에 주입시킴으로써 column中에서 정량적으로 mono-유도체로 변하여 단일 peak를 얻을 수 있다.

其他의 amino酸에 對하여는 常溫에서 1~2시간의 반응으로도 완전히 N-TFA-*n*-Bu로 전환되기 때문에 封管中에서  $150^\circ$ , 5분(또는  $100^\circ$ , 1시간)의 반응조건에 문제가 생기지 않는다.

유도체의 제조에 있어 고려되어야 할 중요한 點으로는 반응액의 금속과의 접촉을 피하여야 한다. 그 이유는 아미노산의 금속 chelate가 형성됨으로써 휘발성 유도체의 형성을 방해하기 때문이다. 따라서 유도체의 제조때 사용되는 rotary evaporator와 같은 기구는 all-glass, 혹은

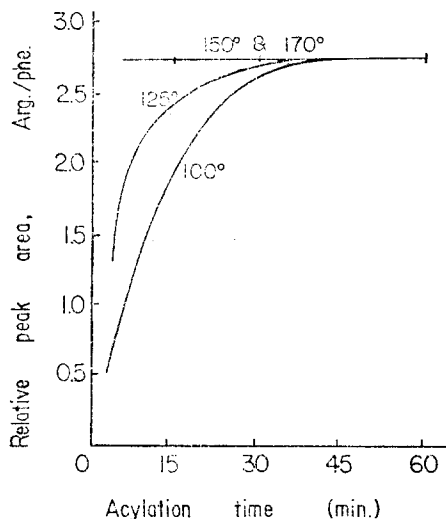


Fig. 1 -Acylation of arginine as a function of time.

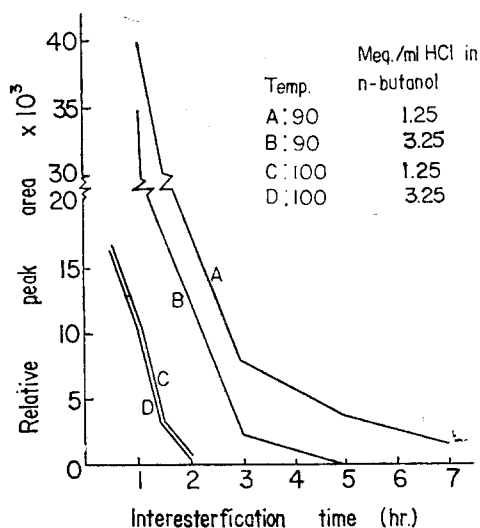


Fig. 2. -Conversion of methyl ester of cystine to n-butyl ester.

은 all-teflon으로 되어 있는 것이 좋다.

또 모든 기구는 반응에 사용되기 전에 진한 염산으로 세척하고 건조시켜야 하며 특히 철과 반응액과의 접촉을 절대 피하여야 한다. 왜냐하면 methionine과 철과의 결합은 불용성 염을 형성하고 methionine의 산화를 촉진하기 때문에 鐵이온의 존재시에는 methionine의 peak를 얻기가 힘들다. Acylation에 사용되는 封管은 Gehrke등에 의하여 Fig.3과 같은 구조의 유리기구가 개발되었으며 그외에도 Corning glass Co.의 teflon을 lining한 screw cap을 가진 culture tube (No. 9826, 16×75mm)를 사용하여도 만족한 결과를 얻을 수 있다.

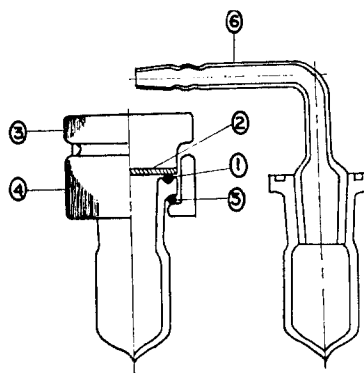


Fig. 3-Acylation tube

- |                                         |                                           |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1. Teflon-coated Neoprene O-ring gasket | 2. Teflon disk (2mm thick)                |
| 3. & 4. Metal binder                    | 5. Cushion made of silicone rubber O-ring |
| 6. Adaptor for on aspirator             |                                           |

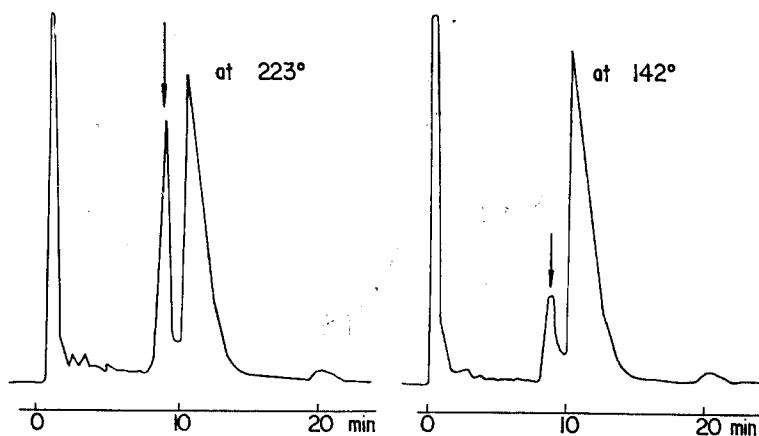
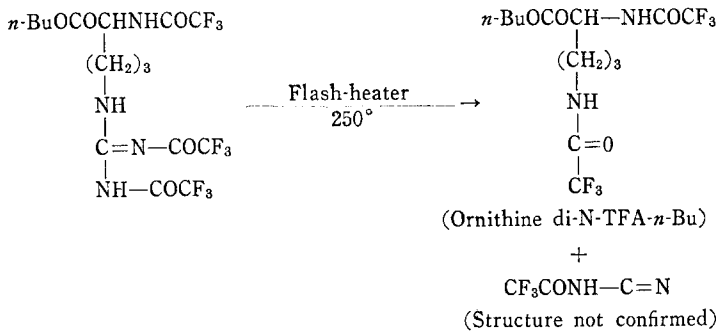


Fig. 4-Thermal decomposition of the N-TFA-n-Bu of threonine as influenced by flash-heater temperature.

Column: 1% NPGS on 60-80 mach Gas-Chrom A (100×0.39cm i.d. stainless steel column)

**N-TEA-*n*-Bu의 安定性**— N-TFA-*n*-Bu는 injection port의 metal flash-heater에 의하여 분해된다. Fig. 4는 threonine의 N-TFA-*n*-Bu를 주입하고 얻은 chromatogram이다. flash-heater의 온도를 223°에서 142°로 낮춤으로써 분해물에 의하여 생긴의 면적이 감소하는 것을 볼 수 있다(Fig. 4). 이와같이 대부분의 아미노산은 flash-heater에 의해서 분해되므로 on-column injection을 행하여야만 이와같은 분해를 막을 수 있다.

Scheme 2는 arginine의 flash-heater에 의한 분해의 양상을 나타내는 그림이다.



**Scheme 2**—Decomposition of arginine N-TFA-*n*-Bu in flash-heater.

대부분의 amino산 유도체는 경시적으로 대단히 안정하여 無水의 조건에서 1주일까지도 보관할 수 있으나 methionine의 경우는 acylation후 즉시 분해하기 시작하므로 試料는 적어도 2시간 이내에 분석되어야 한다. 그러나 methionine의 *n*-butyl ester는 하루 정도의 보관은 변화가 없으므로 N-TFA-*n*Bu의 제조시 고려하는 것이 좋겠다.

유도체들은 철저한 無水인 조건에서 보관해야 하며 그렇지 못할 경우 arginine histidine, tyrosine, serine등의 유도체는 쉽게 가수분해한다. 그리고 acylation후에 용매인 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>나 미반응의 TFA 및 반응생성물인 TFA를 완전히 제거하려고 할 필요는 없으며 이들은 amino산의 chromatogram에 아무런 영향도 주지 않는다.

**Column System**—고정상 (stationary phase)로 어떤 물질을 사용하느냐 하는 것은 GLC를 행하는데 중요한 요인이 된다.

N-TFA-*n*-Bu에 대하여 1962년 Zomzely<sup>14)</sup> 등은 NPGS 1%의 stainless steel column을 사용하여 22개의 amino酸의 분석을 시도한 일이 있고 1965년에는 Gehrke<sup>15)</sup> 등이 NPGS의 glass-column으로 chromatogram을 얻고 있다. 또 1965년 Marcucci<sup>16)</sup> 등은 11개의 Amino산 에대

하여 NPGS 1%, EGSS-X 1%, carbowax 20M 1%을 서로 비교 실험하여 carbowax 20M의 우수성을 보고한 바 있다.

1966년 Stalling과 Gehrke<sup>17)</sup>에 의하여 arginine의 유도체화가 가능하게 된 후 Gehrke등<sup>18)</sup>



은 N-TFA-n-Bu의 분석에 영향을 주는 요인들을 분석하였는데 이들의 연구의 목적은 20가지의 amino산을 완전히 분리시켜 정량적인 취급을 할 수 있는 단일 column을 발견하는데 있었다. 여러가지 복잡한 실험을 행한 후 20가지의 N-TFA-n-Bu의 혼합물을 완전히 분리할 수 있는 column으로 DEGS/EGSS-X의 0.75/0.25% (W/W)의 혼합 liquid phase를 고정상으로 선택하고 있다. 그러나 이 column은 arginine, cystine, histidine에 對하여 재현성 있는 결과를 얻을 수 없었으며, 또한 계속 사용에 의하여 glycine과 isoleucine의 분리가 좋지 않게 된다.

Stefanovic등<sup>19)</sup>은 0.65%의 EGA column을 사용하여 20여가지의 amino酸을 분석하였으나 arginine, histidine, cystine에 대하여는 매우 작은 peak를 보고하고 있다. 아마도 이것은 극성인 liquid phase와의 접촉으로 N-TFA-n-Bu가 분해되던가 아니면 화학적으로 반응하는지도 모른다. 이들의 실험중 재미있는 것은 liquid phase의 농도의 변화에 따른 retention time의 변화이다. Fig. 5에서 보는 것처럼 liquid phase의 농도에 따라 methionine, phenylalanine, hyprosi의 peak의 위치가 변하고 있다.

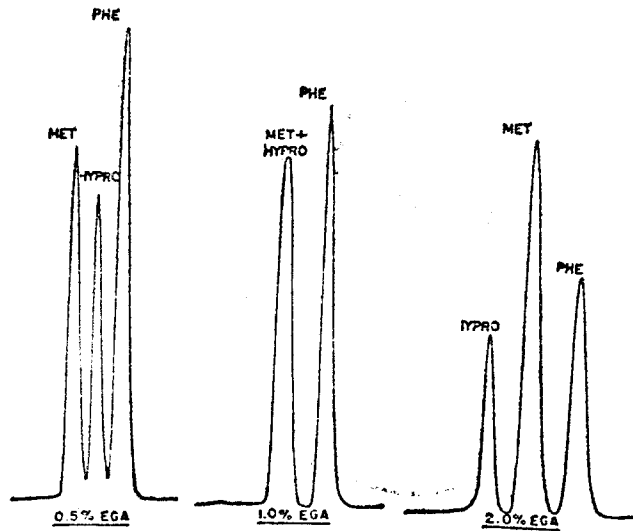


Fig. 5- Effect of stationary phase-support ratio on location of hydroxyproline in elution sequence.

McBride등<sup>20)</sup>은 1.2%의 phenyldiethanolamine succinate polyester를 liquid phase로 사용하였지만 역시 arginine, histidine, cystine에 대하여는 보고하지 않고 있다.

그후 1969년 Gehrke등<sup>21)</sup>은 arginine, histidine, cystine의 분리가 가능한 column으로 1.5% OV-17의 고정상을 발견함으로써, tyrosine arginine, tryptophan, histidine, cystine에 대하

여는 OV-17 기타의 amino산에 대하여는 0.325% EGA의 column을 사용한 소위 dual column 방식을 도입함으로써 全amino산의 GLC에 의한 정량에 있어서 그 精度를 현저히 향상시키고 있다.

Fig.6은 20까지 amino酸에 대한 dual column 방식에 의한 分析例 이다.

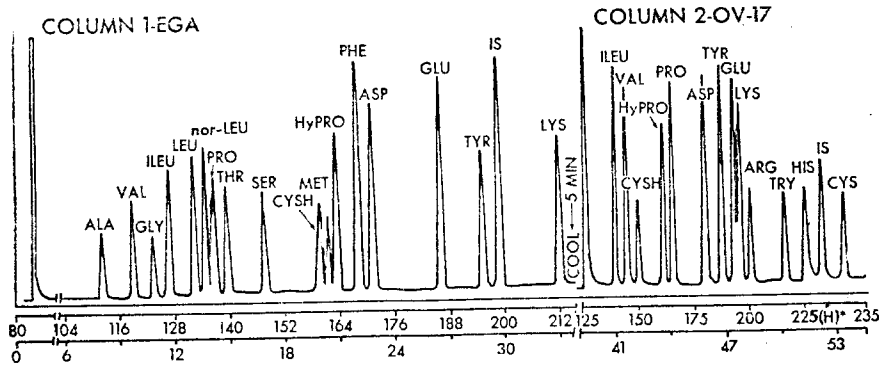


Fig. 6—Separation all twenty protein amino acids with a dual column system.

Column 1: 0.325 w/w% Ethylene glycol adipate on 800/100 mesh a.w. H.T. Chromosorb G, 1.5m×4mm I.D. glass, initial temp. 80°C, program 4°C/min., N<sub>2</sub> flow 60ml/min. Column 2: 1.5 w/w% OV-17 on 80/100 mesh H.P. Chromosorb G, 1.0m×4mm I.D. glass, initial temp. 125°C, program 6°C/min, N<sub>2</sub> flow 70ml/min. The injected mixture contained ca. 0.02μ Mol of each amino acid (~2μg). \* Hold at 235°C.

지금까지 살펴왔던 바와같이 GLC에 의한 amino산의 분석은 Gehrke등의 dual column 방식에 의하여 거의 완성되었다고 할 수 있다.

그러나 單一 column을 사용한 분석방법은 계속 탐구되고 있으며, 최근에는 아미노산자동 분석기의 발달에 따라 GLC에 의한 amino산분석의 시간을 단축시킬려는 노력이 계속되고 있다.

## 文 獻

1. A. Zlatkis, *et al.*, *Anal. Chem.*, **30**, 1156 (1958), **32**, 162 (1960)
2. Hunter, *et al.*, *Chem. and Ind.* (London), **1956**, 294
3. Bier, *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **72**, 641(1959)
4. Bayer, *et al.*, *Angew. Chem.*, **69**, 640(1957)
5. Youngs, *Anal. Chem.*, **31**, 1019 (1959)
6. A. Liberti *Gas Chromatography*, D. H. Desty, ed., Butterworths Scientific Publications, London, **1958**, p-341
7. Melamed, *et al.*, *J. Chromatog.*, **4**, 339 (1960)
8. K. Ruhlmann, *J. Prak.Chem.*, **4**, 86, 315 (1959)
9. K. Ruhlmann *et al.*, *Angew. Chem.*, **73**, 113 (1961)
10. H. A. Saroff, *et al.*, *Anal. Biochem.*, **1**, 34 (1960)

11. D. E. Johnson, *et al.*, Abstracts of Papers, *Am. Chem. Soc.*, Chicago, III, 1961, p-48C
12. Gehrke, *Internation. Symposium on Biochemical Applications of Gas Chromatography, in Tokyo, 1967*
13. Gehrke *et al.* *Anal Chem.*, **37**, 383 (1965)
14. Zomzely, *et al.*, *Anal. Chem.* **34**, 1414 (1962)
15. Gehrke, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**, 328 (1965)
16. Marcucci, *et al.*, *J. Chromatog.*, **18**, 487 (1965)
17. Stalling, *et al.*, *Biochem. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 329 (1966)
18. Gehrke *et al.*, *Anal. Biochem.*, **15**, 97 (1966)
19. Stefanvic, *et al.*, *Anal. Chem.*, **39**, 710 (1967)
20. McBride, *et al.*, *Anal. Biochem.*
21. Gehrke, *SHIMADZU S.I News*, **2**, 1 (1969)