

Dansyl 유도체화와 역상 고성능액체크로마토그래피에 의한 아미노산의 정량

나혜경 · 전덕영[†] · 홍윤호
전남대학교 식품영양학과

Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatographic Determination of Amino Acids after Precolumn Derivatization with 1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl chloride

Hye-Kyeong Na, Deok-Young Jhon[†] and Youn-Ho Hong

Dept. of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Abstract

This experiment was carried out to determine the separation condition of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulfonyl(Dansyl) derivatives of amino acids by reverse-phase high performance liquid chromatography with Nova-Pak C₁₈ column. Determined solvent system was solvent A (200mM phosphate buffer pH 6.8 15%, acetonitrile 11%, water 74%) and solvent B (acetonitrile 65%, methanol 28%, water 7%). Linear gradient of solvent B was applied from 12% to 80% for 50min. Complete separation of 20 amino acids including asparagine and glutamine which constitute protein was achieved within 50min. As the detection limit was the range of picomole, the resolution power was excellent. Reproducibility of the retention time was less than mean \pm 0.05min. According to the above optimum chromatographic conditions, the amino acid composition of some food and human blood was examined. The most affluent amino acid was alanine in human blood, aspartic acid and glutamic acid in soy sauce, alanine and threonine in soy milk and proline in milk and yoghurt.

Key words : dansylation, amino acid analysis, reverse-phase high performance liquid chromatography

서 론

최근들어 식품과 사료 등의 공급에 있어 양질의 단백질 확보가 중요한 요건으로 제기되고 있으며, 생물학 및 생명공학분야에서 효소나 single cell protein의 생산 같은 연구분야에 많은 노력을 기울여 왔다. 이와같은 단백질의 연구에 있어 그 구성 요소인 아미노산의 분석은 영양학적인 측면 뿐 아니라 기초과학적 측면에서도 매우 중요하다고 할 수 있다.

1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulfonylchloride (Dansyl-Cl)¹⁻³⁾는 방향족 화합물로서 아미노산, 아민^{4,5)}, 그리고 펩티드^{6,7)}를 분석하는데 이용되며, 아미노산의 이성질체^{8,9)}를 분리하는데 전 컬럼 유도체화 시약으로 사용되고 있다. Tapuhi¹⁰⁾방법으로 유도체화 할 경우,

높은 수율로 반응이 이루어지므로 정량적인 분석이 가능하다. 또한 반응과정은 신속하면서도 용이하며, 빛이 차단된 상태에서 상당기간 안정하여 picomole 수준의 분석도를 갖는다¹⁰⁻¹³⁾. Tapuhi 등¹⁰⁾은 형광검출기를 사용할 경우 femtomole 정도의 sensitivity를 갖는다고 보고하였다.

Dansyl 유도체화에 의한 아미노산 분석방법으로, Supelcosil LC-18 컬럼과 0.6% 초산 0.008% 트리에틸아민 및 메탄올 용매를 이용한 분리¹⁴⁾, Lichrosorb RP-18 마이크로컬럼과 0.13M 초산 암모늄, 아세트오니트릴을 이용한 분리¹⁵⁾, Ultrasphere ODS C₁₈ 컬럼과 25mM 나트륨 인산염 완충용액 (pH 7.0), 25mM 초산과 아세트오니트릴 (86 : 14) 및 순수한 아세트오니트릴을 이용한 분리¹⁶⁾ 등이 보고 되었다. 그러나, 이들이 사용한 분리 조건에서는 Leu, Phe, Arg 및 Thr 등 여러 아미노산의 분리가 선명치 못하거나 장시간 소요된다는 단점이 제

[†]To whom all correspondence should be addressed

기되어 왔다. 또한 아미노산 자동분석기와 같은 값비싼 기기와 어려운 유도체화 과정, 복잡한 용매조성 및 값비싼 시약 등은, 실험실에서 쉽게 아미노산을 분석하는데 문제점으로 지적되고 있다.

따라서 본 연구에서는, 신속하면서도 분리능력이 있는 역상 고정능액체크로마토그래피로 Dansyl-Cl로 유도체화된 아미노산을, 유기용매 혼합물을 이용하여 Nova-Pak C₁₈ 컬럼을 통해 분리하는데, 신속하고 경제적이며 재현성 있는 최적 분리조건을 찾고자 하였다. 그리고 이 방법의 정량적인 사용 가능성 여부를 아미노산 조성이 알려진 대장균 글루타민 합성효소의 가수분해산물을 분석하므로써 검토하였으며, 이 조건을 이용하여 혈청, 간장, 두유, 우유 및 요구르트 등의 유릭 아미노산의 분석에 적용하였다.

재료 및 방법

시약

Dansyl-Cl와 Dansyl-아미노산은 Sigma제품으로서, Dansyl-아미노산은 메탄올에 용해하고 (1mg/ml) 빛을 차단한 채로 -20°C에 보관하였다. 아미노산 혼합물 표준품은 His, Gly를 함유하지 않은 것으로서 각종 아미노산이 2.5mM (Cystine의 경우만 1.25mM)인 미국 Pierce사 제품을 사용하였으며 His와 Gly은 Sigma제품이었다. 황산암모늄은 미국 Tedia사, 단백질 가수분해용 6N HCl은 미국 Pierce사, 아세트니트릴은 독일 Merck사 것이었다. 순수 정제된 대장균 글루타민 합성효소 (EC 6.3.1.2)는 전남대학교 김강화 박사로부터 제공받았다.

장비

고성능 액체크로마토그래피 장치는 Waters (U.S.A.) U6K Universal Liquid Multiwavelength Injector, Waters 490 Programmable Multiwavelength Detector (254nm, AUFS : 1.0), Waters 745/745B Data Module (chart speed : 0.25cm/min, attenuation : 1)로 이루어진 Waters 600E Multi-solvent delivery system을 사용하였다. Dansyl-아미노산의 분리는 Part No. 11695 Waters 제품의 Nova-PakTMC₁₈ (3.9mm × 15cm, 4μm particle diameter stainless steel column) 역상컬럼을 사용하여 실온에서 분리하였다.

유도체화 과정

유도체화는 Tapuhi[®]방법을 이용하여 실시하였다.

즉 40mM Li₂CO₃완충용액 (pH 9.5)에 녹아 있는 표준 아미노산 혼합액 200μl에 Dansyl-Cl용액 (1.5mg/ml 아세트니트릴) 100μl를 첨가하여, 잘 섞은 후 25°C에서 35분간 빛을 차단한 채로 반응시킨 다음 이 시료에 2% 염화메틸아민용액 10μl를 첨가함으로써 반응을 종결시켰다.

크로마토그래피 조건

분석 조건을 얻기위한 표준 시료로는 표준 아미노산 혼합액과 Dansyl-아미노산을 사용하였다. Dansyl-아미노산 혼합액에 없는 Gly, His와 암모니아는 Tapuhi[®] 방법으로 유도체화하여 Dansyl-아미노산 혼합액에 각각 첨가하였다. 이동상은 인산완충액을 사용하고 여기에 아세트니트릴-메탄올 (7 : 3, v/v)용액이 함유되도록 제조하였으며 헬륨탈기장치를 이용하여 기포발생 현상을 제거하였다. 아세트니트릴-메탄올 (7 : 3, v/v) 15%부터 시작하여 9분에는 20%, 24분에는 30%, 33분에는 43%로 시작하며, 54분에는 75%로 시작하여, 75분까지 계속되는 분리조건에, 몇개씩 조합한 Dansyl-아미노산 혼합용액 20μl를 주입하여, elution순서를 결정하였다. 또한 아세트니트릴-메탄올 (7 : 3, v/v) 15%, 20%, 30%, 43%, 75%의 isocratic한 이동상에 Dansyl-아미노산 혼합용액을 주입하여 각각의 이동상에서 Dansyl-아미노산의 머무름 시간을 조사하였다.

아세트니트릴-메탄올 (7 : 3, v/v) 함량과 각각의 아미노산의 분리시간과의 관계를 고려하면서 앞의 gradient profile을 조절하였으며, 메탄올 함량을 조절하므로써 최종적인 표준 아미노산의 분리조건을 찾았다. 이 조건을 사용하여 Tapuhi[®]방법으로 유도체화된 표준 아미노산이 분리되는 시간의 재현성과, 아미노산 농도 증가에 따른 peak 면적의 변화를 조사하였으며, 농도 계산은 표준 아미노산의 peak 면적과 시료 아미노산의 peak 면적을 비교하여 결정하였다.

시료제조 방법

대장균 글루타민 합성효소의 가수분해

대장균 글루타민 합성효소 90μl (10mg/ml)를 취하여 진공 반응유리관 (10mm × 100mm, 5ml volume, Pierce)에 넣어 진공상태로 건조시킨 다음, 여기에 6N HCl 1ml를 첨가하여 진공펌프로 공기를 제거한 후 질소 가스를 채웠다. 질소 가스가 충전된 상태로 150°C에서 (Reacti-ThermTM Heating Module, Pierce) 1시간 동안 가열하였으며, 남아있는 HCl을 제거하기 위해 1시간 30분동안 진공상태에서 건조시켰다^(7,18). Li₂CO₃

완충용액 (pH 9.5) 1ml를 첨가하여 건조물을 용해하고 여과 후 (Millipore 0.45 μ m) 유도체화 하였다.

혈청

사람의 혈액을 채취하여 2,000 \times g에서 5분간 원심 분리하였다. 상등액 100 μ l에 400 μ l 메탄올을 첨가하여 잘 혼든 후 3,000 \times g에서 5분 동안 다시 원심분리하였다. 여기서 얻은 상등액을 용기에 옮기고 남아 있는 단백질을 침전물에 메탄올-물 (4 : 1, v/v) 혼합액 100 μ l를 첨가하여 3,000 \times g에서 5분동안 원심분리하였으며 이 과정을 3번 반복하였다. 이 과정에서 얻은 상등액 모두를 합한 다음 메탄올을 제거하기 위해 80 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분동안 가열시켰다. 가열하고 남은 70 μ l 상등액에 40mM Li₂CO₃ 완충용액 (pH 9.5)를 첨가하여 10배 희석한 후 유도체화 하였다¹⁴⁾.

간장

시판 간장을 Millipore Swinnex X-25로 여과시킨 다음 2 μ l를 취하여 40mM Li₂CO₃완충용액 (pH 9.5)으로 10,000배 희석한 후 유도체화하였다¹⁵⁾.

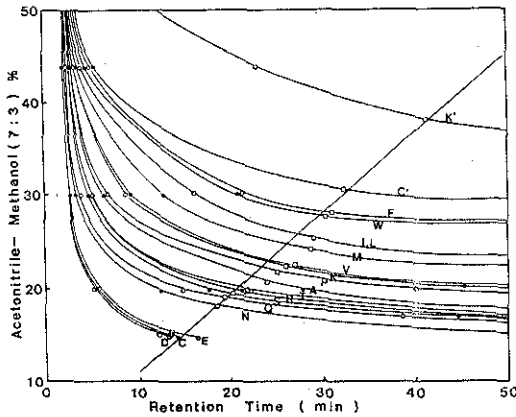


Fig. 1. Relationship between the retention time of dansyl-amino acids and the isocratic mobile phase composition.

Column was Nova-Pak C₁₈ column (3.9mm \times 15cm, 4 μ m). The solvent system used was ; acetonitrile/methanol (7 : 3), 200mM phosphate buffer (pH 6.8) /water (1 : 7). Legends : D ; aspartic acid, C ; cysteine acid, E ; glutamic acid, N ; asparagine, Q ; glutamine, S ; serine, R ; Arginine, T ; threonine, A ; alanine, P ; proline, K ; ξ -lysine, V ; valine, M ; methionine, I ; isoleucine, L ; leucine, W ; tryptophan, F ; phenylalanine, C' ; di-dansyl-cystine, K' ; di-dansyl-lysine. Open rectangles indicate retention times of all amino acids analysed by gradient program based on the shown slope.

두유, 우유, 요구르트

시판되고 있는 두유, 우유, 요구르트를 0 $^{\circ}$ C에서 40분 동안 45,000 \times g로 원심분리 (Sorvall OTD-75B Ultracentrifuge)하여 지방층과 침전물을 제거한 다음 40분 동안 원심분리 (25,000rpm, 0 $^{\circ}$ C Beckman TL-100 Ultracentrifuge)하였다. 여기서 상등액을 취하여 여과시켰으며 (Millipore 0.45 μ m) Li₂CO₃ 완충용액으로 100배 희석한 후 유도체화하였다.

결과 및 고찰

아세토니트릴-메탄올 (7 : 3, v/v) 15%, 20%, 30%, 43%, 75%의 isocratic한 이동상에 Dansyl-아미노산 혼합물을 주입하여 각각의 isocratic한 이동상에서, Dansyl-아미노산의 머무름 시간을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 이 자료를 근거로 하여 gradient profile을 아세토니트릴-메탄올 (7 : 3, v/v) 함량이 0~50분까지 15%에서 75%, 50~55분까지는 75%, 55~60분까지 15%가 되도록 용매조건을 선택했을 때 Dansyl-아미노산들이 잘 분리되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 2). 각각의 아미노산 유도체들의 머무름 시간을 Fig. 1에 나타낼 때 이들이 농도구배와 유사한 형태를 나타냄을 알

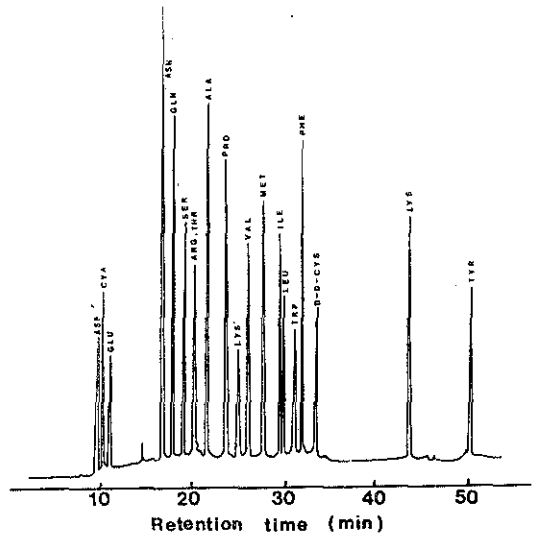


Fig. 2. Separation of dansyl-amino acids on Nova-Pak C₁₈ column (3.9mm \times 15cm, 4 μ m).

The solvent system used was ; (A) acetonitrile, (D) methanol (7 : 3), (B) 200mM phosphate buffer pH 6.8), (C) water.

The gradient program consisted of linear ; from 15% (A)- (D), 11% (B), 7% (C) to 75% (A)-(D), 3% (B), 22 % (C) at 50min ; 75% (A)-(D), 3% (B), 22% (C) at 55 min ; 15% (A)-(D), 11% (B), 74% (C) at 60min. Flow rate : 1ml/min. Wavelength of UV detection : 254nm

수 있었다. 시료주입 10분 후에 Glu가 분리되었으며, 46분에 Tyr이 분리됨으로써, Arg와 Thr을 제외한 모든 아미노산이 분리되었다. Arg와 Thr의 분리를 위해 초기 메탄올 농도를 변화시키는 새로운 gradient를 도입하였다. 아세트니트릴-메탄올 (7 : 3, v/v) 함량이 있어 초기 메탄올 농도를 zero로 한 아세트니트릴 11%에서 시작하여 50분까지 아세트니트릴-메탄올 (7 : 3, v/v) 함량이 75%, 50~55분까지 75%, 55분 이후 2분 동안 초기상태로 되돌아가도록 프로그래밍된 조건에서, 유도채화된 His, Gly, 암보니아가 첨가된 Dansyl-아미노산 혼합용액을 주입한 결과 모든 아미노산이 분리되었다. 이 조건에서 TapuhiTM방법으로 유도채화한 표준 아

Table 1. Chromatographic conditions for HPLC analysis of dansyl-amino acid derivatives

Duration (min)	Flow rate (ml/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Gradient profile
initial	1	88	12	
50	1	20	80	Linear
52	1	0	100	Linear
54	1	88	12	Linear

Solvent A : 15% 200mM phosphate buffer (pH 6.8)
11% Acetonitrile 74% Water

Solvent B : 65% Acetonitrile
28% Methanol 7% Water

Wavelength of UV detection : 254nm

Column : Nova-Pak C18 (3.9mm × 15cm, 4μm particle diameter)

Table 2. Retention time of dansyl-amino acids after dansylation of standard amino acid mixture

Compound	Retention time*(min)
Dansyl-Asp	4.04 ± 0.01
Dansyl-Glu	4.44 ± 0.04
Dansyl-Asn	9.49 ± 0.03
Dansyl-Gln	10.94 ± 0.03
Dansyl-Ser	12.38 ± 0.02
Dansyl-Arg	13.16 ± 0.02
Dansyl-Thr	13.57 ± 0.02
Dansyl-Gly	14.41 ± 0.02
Dansyl-Ala	15.22 ± 0.01
Dansyl-Pro	16.80 ± 0.01
Dansyl-Val	19.13 ± 0.01
Dansyl-Met	20.78 ± 0.01
Dansyl-Ile	22.16 ± 0.01
Dansyl-Leu	22.60 ± 0.01
Dansyl-Trp	24.08 ± 0.01
Dansyl-Phe	24.69 ± 0.01
Dansyl-Cys	26.24 ± 0.02
Dansyl-Lys	35.84 ± 0.02
Dansyl-His	37.12 ± 0.02
Dansyl-Tyr	42.37 ± 0.02

*Mean ± SD (N=10)

미노산 혼합액 (Asn, Gln, ξ -Lys이 포함되어 있지 않음)을 HPLC의 injector에 주입하여 컬럼을 통과시킨 결과 17개의 아미노산이 모두 분리되었다. 그러나 이들 아미노산의 머무름 시간의 재현성이 표준편차 0에서 0.5분 범위로 좋지 못하여 4개의 용매 system (아세트니트릴, 메탄올, 인산완충용액, 물)을 용매 조성의 변화없이 2개의 용매 system으로 바꾸었으며, 분석시간을 줄이기 위해 gradient에 변화를 주었다. 즉, 200mM 인산완충용액 (pH 6.8) 15%, 아세트니트릴 11%, 물 74%로 구성된 용매 A와 아세트니트릴 65%, 메탄올 28%, 물 7%로 구성된 용매 B를 각각 88%, 12%에서 시작하여 50분 동안 20%, 80%까지 (flow rate : 1.0ml/min) linear하게 전개시켰으며, 컬럼 washing을 위해 2분 동안 용매 B를 100%까지 증가시켰다. 다음 sample을 주입하기 전에 초기 조건에서 10분 동안 컬럼을 평형화함으로써 총 전개시간이 65분 소요되었다 (Table 1).

위의 조건하에 TapuhiTM방법으로 유도채화한 표준 아미노산을 주입 분석한 결과 (Fig. 3), 50분 이내에 17개의 아미노산이 완전히 분리 되었으며 최대 감지 수준은 picomole 정도로 해상력 또한 우수하였다. Mackey와 Beck¹⁰⁾이 사용한 조건에서는 cysteic acid와 Asp, Lys과 His이 다소 겹치는 부분이 있었으며, Márquez 등¹⁸⁾이 사용한 조건에서 Dansyl-아미노산을 분석한 결과에 따르면 Ile과 Phe이 겹치며 baseline이 불안정 하였으며 분석 시간이 75분 소요되었다. Negro 등¹⁶⁾의 보고에 의하면 Arg, Thr 및 Gly의 분리가 좋지 못하였다.

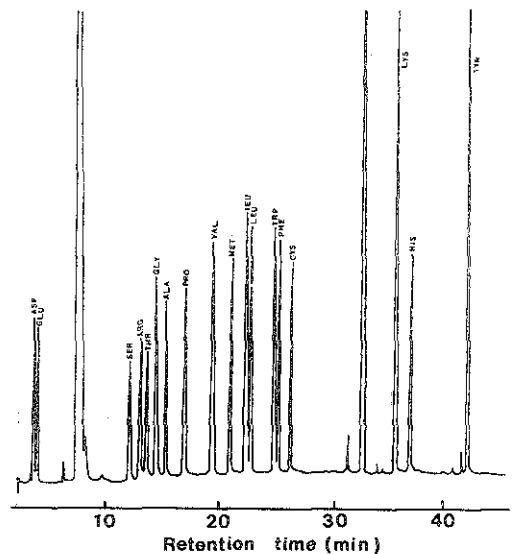


Fig. 3. Separation of standard amino acid mixture according to the conditions described in Table 1 after dansylation.

Table 2는 유도체화한 표준 아미노산의 양을 점점 늘려가면서 머무름 시간을 분석한 결과이다. 표준편차 0.01~0.04분 범위로 4개의 용매 system의 것 보다 재현성이 뛰어났으며, 이것은 똑같은 용매 조성이라 할지라도 용매가 혼합되는데 있어 기계 자체상 발생되는 오차인 것으로 추정 할 수 있다. Negro 등¹⁶⁾의 보고와 비교해 볼 때 대부분의 아미노산의 머무름 시간의 재현성이 이들의 결과와 차이가 없었지만 Asp, Glu 그리고 His에 있어 상당한 차이가 있었다. 이방법으로 정량할 수 있는 Dansyl-아미노산의 함량 범위를 알기 위하여 아미노산 농도 증가에 따른 peak 면적의 변화를 실험한 결과(Fig. 4 A, B), Lys과 Tyr을 제외한 아미노산들의 경우 아미노산 농도 16nmole까지는, 아미노산 농도가 증가할수록 linear하게 peak 면적도 증가하였다. 과량의 Dansyl-Cl가 Dansyl-아미노산과 반응하여 Dansyl-아미노산을 분해시키며, 몇몇 아미노산의 유도체 수율이 아미노산에 대한 Dansyl-Cl양에 상대적으로 영향 받는다는 보고가 있으나 Tapuhi 등¹⁰⁾에 의하면 quencher인 아민이 남아 있는 Dansyl-Cl와 반응하여, Dansyl-아미노산 분해반응을 최소화시키며, 유도체화의 수율은 아미노산에 대한 Dansyl-Cl의 비율에 독립적이라 하였다. 따라서 이 방법으로 적용할 수 있는 Dansyl 아미노산 양의 최고 한계는 10nmole 수준임을 알 수 있었다.

이러한 결과를 근거로, 앞의 최적 분리 조건을 이용하여 대장균 글루타민 합성효소 중의 아미노산을 정량하였다. Table 3은 글루타민 합성효소의 아미노산 조

성을 DNA sequence로 부터 추정된 아미노산 조성파 amino acid analysis법을 가지고 분석한 결과와 비교한 것이다. 가수분해한 글루타민 합성효소를 분석한 결과는, 각각의 아미노산에 상응하는 peak 면적과 표준 아미노산 혼합액의 분석 결과 나타난 peak 면적의 비로

Table 3. Amino acid composition of *Escherichia coli* glutamine synthetase analyzed by various methods

Amino acid	DNA ²⁰⁾	Amino acid ²¹⁾ analysis	Dansyl-method (This experiment)
Asp	31		
Asn	19		
Asx		49.3	44.2
Glu	36		
Gln	10		
Glx		44.4	55.3
Thr	20	19.9	19.3
Ser	29	28.3	35.1
Pro	27	23.9	30.5
Gly	36	37.1	36.0
Ala	44	43.6	42.8
Cys	4	4~5	2.3
Val	32	29.1	28.9
Met	17	14.5	17.2
Ile	26	24.1	26.7
Leu	32	32.4	35.3
Tyr	17	17.3	13.4
Phe	23	23.0	30.5
Trp	2	2.1	
His	16	16.2	12.3
Lys	24	22.3	23.5
Arg	23	21.7	21.3
Total	468	453.2 454.2	474.6

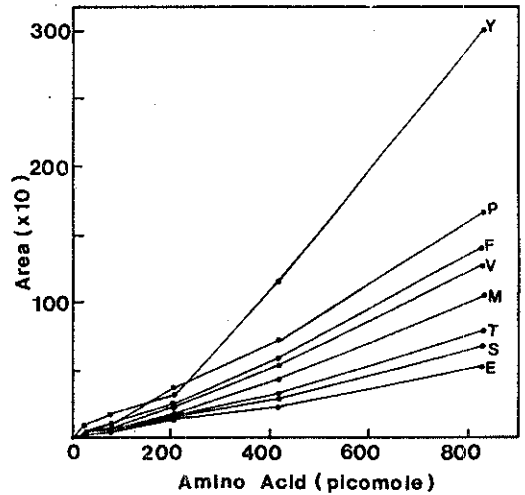
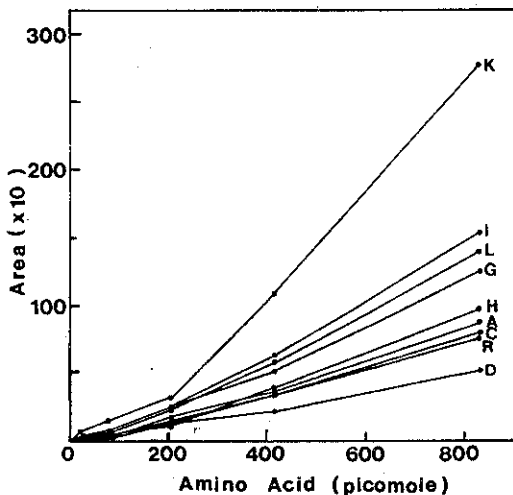


Fig. 4. Relationship between the amount of standard amino acid mixture and peak area generated by the corresponding dansyl derivatives after reverse-phase high performance liquid chromatography separation. Legends for various amino acids are the same with those described in Fig. 1.

부터 산출된, Gly 값을 36으로 하여 나머지 값을 환산하였다. 총 아미노산 잔기수는 474.6으로 DNA sequence 값인 468에 매우 근사하였으며, Trp을 제외한 각각의 아미노산 잔기수도 DNA sequence의 값에 근접하였으며, Met과 Ile의 경우 17.2와 26.7로 amino acid analysis 보다 실제치인 17과 26에 근접하였다. 이 결과로 볼때 본 연구에서 사용한 조건으로 실제의 식품 영양성분의 분석에 이용이 가능할 것으로 생각된다.

혈청, 간장 중의 아미노산을 Tapuhi¹⁰⁾방법으로 유도체화한 후 이들 유도체를 분리한 결과 몇몇 미확인된 조그마한 peak도 있으나 표준 아미노산에 해당하는 아미노산 분리에는 어려움이 없었다. 혈청의 경우 Dansyl-아미노산의 크로마토그램을 근거로 Gln과 Trp을 확인하였으나, 이들 아미노산이 표준 아미노산 혼합액에 포함되지 않아 정량은 할 수 없었으며, Asp가 감지되지 않았는데, Fürst 등²³⁾의 보고에서 제시한, 크로마토그램의 결과와 일치하였다. 간장의 경우 Trp과 cysteine이 감지되지 않은 것으로 보아 산분해 간장임을 추정할 수 있었으며, 아미노산 자동분석기를 사용하여 분석한 고와 전²³⁾의 결과에서도, 이들 아미노산이 감지되지 않아 간장의 제조시 사용하는 HCl에 의해 파괴됨을 알 수 있었다고 보고하였다.

두유, 우유, 요구르트 중의 유리 아미노산에 해당하는 유도체의 크로마토그램은 혈청이나 간장과는 달리 복잡한 결과를 보여주었다. 특히 두유와 요구르트에

있어 많은 미확인된 크고 작은 peak가 나타났으며, Arg과 Thr의 분리가 좋지 않았다. 고와 장²⁶⁾의 연구에서 제시한 크로마토그램에서는 Lys, His이 서로 분리, 동정되지 않았으나 본 실험에서는 이들 아미노산의 분리, 정량이 가능하였다.

Table 4에는 이들 5가지 시료의 각 아미노산 농도들이 제시되어 있다. 혈청의 경우 Ala이 22.54nmol/ml로 제일 높았으며, Met이 0.92nmol/ml로 낮은 함량을 보였다. Fürst 등²³⁾의 보고에 의하면 사람의 혈청중 Gln 함량이 493.1±56.9nmol/ml로 가장 높고, Ala이 339.9±51.5nmol/ml순이며 Glu 함량이 가장 낮은 것으로 보고되었으며, Stegink와 Baker²⁹⁾에 따르면 Asp가 가장 높게 정량되었다. Gln이 본 실험의 표준 아미노산 혼합액에 빠져 있어, 정량이 불가능한 점을 미루어 볼 때 위의 결과와 일치함을 알 수 있다. 원료배합과 만드는 방법에 따라 성분상의 차이가 있는 간장의 경우 맛성분인 Glu가 9.07nmol/ml로 Asp 다음으로 높은 농도를 나타내었으며, Met 함량이 0.24nmol/ml로 가장 낮았다. 고와 전²³⁾의 시판 간장 중 아미노산 조성에 관한 연구에 의하면 Glu 함량이 가장 많고 Leu, Asp 순서로 본 실험의 결과와 차이가 있음을 알 수 있다. 두유의 경우 제조원료 뿐 아니라 가공처리 방법에 따라 아미노산 함량에 차이가 있으나 Ang와 Kwik²⁶⁾의 보고에 의하면 시판 두유의 경우 Glu가 2.8mg/ml로 가장 많고 Asp 1.8mg/ml, Lys, Arg순이며, 김²⁷⁾의 문헌에 따르면

Table 4. Amino acids concentration in plasma, soy sauce, soy milk, milk and yogurt

Amino acid	(nmol/ml)				
	Plasma	Soy sauce	Soy milk	Milk	Yogurt
Asp	ND	12.04±1.46	3.21±0.39	ND	ND
Glu	15.00±0.50	9.07±0.15	4.36±0.62	6.69±0.04	9.7 ±1.04
Ser	11.22±0.13	5.03±0.04	1.50±0.00	0.92±0.00	6.79±0.07
Arg	4.75±0.12	3.44±0.02	1.03±0.00	ND	6.25±0.00
Thr	10.37±0.12	3.20±0.02	6.73±0.01	7.18±0.01	1.89±0.00
Gly	16.66±0.30	4.82±0.05	2.88±0.01	4.86±0.03	11.55±0.14
Ala	22.54±0.67	5.84±0.04	7.20±0.04	2.59±0.02	7.43±0.06
Pro	10.46±0.11	4.90±0.09	2.15±0.03	8.29±0.06	20.25±0.23
Val	18.19±0.13	3.68±0.06	2.87±0.05	0.73±0.00	17.29±0.25
Met	0.92±0.01	0.24±0.01	1.95±0.29	0.18±0.00	5.36±0.18
Ile	5.37±0.05	2.94±0.03	1.57±0.28	0.28±0.00	4.57±0.20
Leu	10.90±0.05	5.90±0.03	1.99±0.19	0.32±0.00	0.49±0.01
Phe	5.28±0.09	2.53±0.01	1.79±0.04	0.14±0.01	1.88±0.06
Cys	2.55±0.01	ND	ND	ND	ND
Lys	11.80±0.17	4.15±0.03	1.32±0.01	1.06±0.02	1.07±0.05
His	4.15±0.03	1.06±0.02	0.92±0.02	0.21±0.00	2.14±0.00
Tyr	4.84±0.01	0.94±0.01	1.42±0.01	0.15±0.00	1.13±0.23

*Mean±SD (N=3) ND : not detectable

Gln 11.18mg/ml, Asn 6.55mg/ml, Arg 3.64mg/ml인데 반해, 본 실험에서는 Ala이 7.20nmol/ml로 가장 많았으며 Thr, Glu 순이었다. 우유의 경우 생산한 동물종에 따라 유리 아미노산의 함량에 차이가 있으며, 우유와 비교해 볼 때 Tamime과 Robinson²⁹⁾에 의하면 우유 중 Glu가 1.48~3.90 μ g/ml로 가장 높으며, Gly 0.30~0.53 μ g/ml, Asp 0.23~0.52 μ g/ml를 함유하고 있으며, Renner³⁰⁾는 Glu, Leu, Pro 순으로 이들 모두 Glu 함량이 가장 높다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 Pro이 8.29nmol/ml로 가장 높고 Thr, Glu 순이었다. 요구르트는 제조 원료 및 저장 온도에 따라 유리아미노산 함량에 변화가 있으며 제조 과정 동안 유리아미노산 함량이 증가하며 특히 Pro에 있어 현저하다는 보고가 있었다³⁰⁾. 또한 Tamime과 Robinson²⁹⁾에 의하면 요구르트 중 Pro 5.40~7.05 μ g/ml, Glu 4.80~7.06 μ g/ml, Ser 1.50~2.90 μ g/ml 함유되어 있다고 하였다. 본 실험의 결과, Pro 함량이 20.25nmol/ml로써 다른 아미노산 농도에 비해 높아 위의 보고 내용과 유사하다고 할 수 있다. 각각의 시료에서 분석된 아미노산 양과 문헌에서 인용한 수치와의 차이는 시료를 구성하는 원료, 시료 처리방법 및 각각의 아미노산에 대응하는 peak의 인지에서 발생되는 오차로 사료된다.

앞의 여러 결과로 미루어, 본 실험에서 수행한 Dansyl아미노산의 역상 고성능액체크로마토그래피의 분리조건은 적절한 유도체화 과정, 높은 순도의 유기용매, 일정한 완충용액의 농도 및 산도, 적절한 시료처리 및 컬럼의 선택, 컬럼의 오염 정도를 고려하고, 기기를 취급하는 사용자의 능숙함 등으로 기기 자체에서 생길 수 있는 오차를 최대한 줄인다면, 단백질 가수분해물, 생체액, 식품류에 적용하여 간단하고 신속하게 아미노산을 정성, 정량 할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

고성능 액체크로마토그래피를 이용하여 간편하고 신속하며 경제적인 아미노산의 정량방법을 연구한 결과, Nova-Pak C₁₈ 역상컬럼을 통한 아미노산의 Dansyl유도체의 분리조건을 결정하였다. 용매 A(인산 완충용액(200mM, pH 6.8) 15%, 아세토니트릴 11%, 물 74%)와 용매 B(아세토니트릴 65%, 메탄올 28%, 물 7%)를 각각 88%, 12%에서 시작하여 20%, 80%까지 50분 동안 linear하게 용매를 전개 시킨 결과 Asn과 Gln을 포함한 단백질을 구성하는 20개 아미노산의 완전한 분리가 50분내에 이루어졌으며, 최대 감지 수준

은 picomole 정도로 해상력 또한 우수하였고, 머무름 시간의 재현성은 평균 \pm 0.05분 이하였다. 이러한 조건으로 글루타민 합성효소의 산 가수분해물의 아미노산 조성을 분석하여 아미노산 정량의 타당성을 검토하였다. 그리고 혈청, 간장, 두유, 우유 그리고 요구르트 중의 유리 아미노산 조성을 조사한 결과, 사람의 혈청에서는 Ala이 가장 높게 검출되었고, 간장에서는 Asp와 Glu, 두유의 경우 Ala과 Thr 그리고 우유와 요구르트에서는 Pro이 가장 높게 나타났다.

문 헌

1. Roach, M. C., Ungar, L. W., Zare, R. N., Reimer, L. M., Pompliano, D. L. and Frost, J. W. : Optical activity and ultraviolet absorbance detection of dansyl L-amino acids separated by gradient liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **59**, 1059 (1987)
2. Khayat, A., Redenz, P. K. and Gorman, L. A. : Quantitative determination of amino acids in food by high-pressure liquid chromatography. *Food Technology*, **6**, 46 (1982)
3. Rutledge, J. C. and Rudy, J. : HPLC qualitative amino acid analysis in the clinical laboratories. *Am. J. Clin. Path.*, **87** (5), 614 (1987)
4. Seiler, N. and Knödgen, B. : Determination of di- and polyamines by high performance liquid chromatographic separation of their 5-dimethylamino naphthalene-1-sulfonyl derivatives. *J. Chromatogr.*, **145**, 29 (1978)
5. Saeki, Y., Uehara, N. and Shirakawa, S. : Sensitive fluorimetric method for the determination of putrescine, spermidine and spermine by high performance liquid chromatography and its application to human blood. *J. Chromatogr.*, **145**, 221 (1978)
6. Levina, N. B. and Nazimov, L. V. : High-performance liquid chromatography of Dns-amino acids in the purity control of peptides. *J. Chromatogr.*, **286**, 207 (1984)
7. Stehle, P., Albers, S., Pollack, L. and Fürst, P. : *In vivo* utilization of cystine containing synthetic short-chain peptides after intravenous bolus injection in the rat. *J. Nutrition*, **118**, 1470 (1988)
8. Tapuhi, Y., Miller, N. and Karger, B. L. : Practical considerations in the chiral separation of Dns-amino acids by reversed-phase liquid chromatography using metal chelate additives. *J. Chromatogr.*, **205**, 325 (1981)
9. Lam, S. : Stereoselective analysis of D and L dansyl amino acids as the mixed chelate copper (II) complexes by HPLC. *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 416 (1984)
10. Tapuhi, Y., Schmidt, D. E., Lindner, W. and Karger, B. L. : Dansylation of amino acids high-performance liquid chromatography analysis. *Anal. Biochem.*, **115**, 123 (1981)

11. Gray, W. R. : Dansyl chloride procedure. In "Methods in enzymology" Hirs, C. H. W.(ed.), Academic Press, New York and London, Vol.11, p.139(1967)
12. Perrett, D. : Liquid chromatography of amino acids and their derivatives. In "Chemistry and biochemistry of the amino acids" Barrett, G. C.(ed.), Chapman and Hall, New York, p.426(1985)
13. Gray, W. R. : End-group analysis using dansyl chloride. In "Method in enzymology" Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. M.(eds.), Academic press, Vol.25, p. 121(1972)
14. Márquez, F. J., Quesada, A. R., Jiménez, S. and Núñez de Castro, I. : Determination of 27 dansyl amino acid derivatives in biological fluids by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **380**, 275(1986)
15. Takeuchi, T., Yamazaki, M. and Ishii, D. : Micro high-performance liquid chromatography of 5-dimethylaminonaphthalenesulphonyl-amino acids. *J. Chromatogr.*, **295**, 333(1984)
16. Negro, A., Garbisa, S., Gotte, L. and Spina, M. : The use of reverse-phase high-performance liquid chromatography and precolumn derivatization with dansyl chloride for quantitation of specific amino acids in collagen and elastin. *Anal. Biochem.*, **160**, 39(1987)
17. Benson, J. R., Louie, P. C. and Bradshaw, R. A. : Amino acid analysis of peptides. In "The peptides" Gross, E. and Mezonehofer, J.(eds.), Academic press, New York, Vol.182, p.243(1981)
18. Ozols, J. : Amino acid analysis. In "Methods in enzymology" Deutscher, M. P.(ed.), Academic press, Vol. 182, p.587(1990)
19. Mackey, L. N. and Beck, T. A. : Quantitative high-performance liquid chromatographic determination of sulfur amino acids in protein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, **240**, 455(1982)
20. Colombo, G. and Villafranca, J. J. : Amino acid sequence of *Escherichia coli* glutamine synthetase deduced from the DNA nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.*, **261**(23), 10587(1986)
21. Orr, J., Keefer, L. M., Keim, P., Nguyen, T. D., Wellem, T., Henrikson, R. L. and Haselkorn, R. : Purification, physical characterization, and NH₂-terminal sequence of glutamine synthetase from the *Cyanobacterium anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.*, **256**(24), 13091(1981)
22. Fürst, P., Pollack, L., Graser, T. A., Godel, H. and Stehle, P. : Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high performance liquid chromatographic determination of free amino acids biological materials. *J. Chromatogr.*, **499**, 557(1990)
23. 김영수, 전명진 : 시판 및 재래식 간장의 일반성분 및 아미노산 성분연구. 대한가정학회지, **24**(4), 105(1986)
24. 김영수, 장정옥 : 모유 및 우유의 아미노산 조성에 관한 비교연구. 대한가정학회지, **24**(4), 51(1986)
25. Stegink, L. D. and Baker, G. L. : Infusion of protein hydrolysates in the newborn infant plasma amino acid concentrations. *J. Pediatrics*, **78**(4), 595(1971)
26. Ang, H. G. and Kwik, W. L. : Development of soy milk-A review. *Food Chemistry*, **17**, 235(1985)
27. 김오섭 : Soybean milk의 품질관리. 식품과학, **14**(1), 39(1981)
28. Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. : *Yoghurt science and technology*. Pergamon Press, New York, p. 314(1985)
29. Renner, E. : *Milk and dairy products in human nutrition*. Volkswirtschaftlicher Verlag, München, p.95(1983)
30. Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. : *Yoghurt*. Technical Dairy Publishing House, Denmark, p.71(1978)

(1993년 8월 23일 접수)