

## Column-Switching System을 이용한 우유속의 D-아미노산의 미량정량

李善行\* · 金耕希 · 李暎繼 · 金相泰†

경북대학교 사범대학 화학교육과

†육군 제3사관학교 화학과

(1994. 11. 25 접수)

## Micro-Determination of D-Amino Acids in Milk by using Column Switching System

Sun Haing Lee\*, Kyoung Hee Kim, Young Cheol Lee, and Sang Tae Kim†

Department of Chemistry Education, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

†The Third Military Academy

(Received November 25, 1994)

**요 약.** 시중에 시판되고 있는 우유를 전처리하여 이 우유에 포함된 유리 아미노산을 dansyl-chloride로 유도체화시켜 C-18 컬럼을 이용한 역상 LC법으로 분리한 다음 표준물 첨가법으로 정량했다. 미량의 D-아미노산의 분리에서는 LC의 Column-Switching System을 이용하였으며 비키랄 컬럼을 통과한 단일 D/L-아미노산에 Cu(*N*-benzyl-L-proline)<sub>2</sub>를 이동상에 첨가한 키랄 분리를 수행하여 L-아미노산에서 D-아미노산을 분리 정량했다. 이 방법은 우유시료 중에 존재하는 16가지 아미노산의 정량이 가능하며 이중에 12가지의 D-아미노산이 column switching 방법을 통한 키랄 분리로 정량이 가능하다. 우유 100 mL에 총 유리 아미노산이 41.00 mg 포함되어 있음을 확인했으며, D-아미노산은 D-glutamic acid가 2.05%, D-alanine 2.93%만이 포함되어 있음을 확인했다.

**ABSTRACT.** Free amino acids were isolated from milk and their absolute amounts were determined by reversed phase high performance liquid chromatography after derivatization with dansyl chloride. The determination of D- and L-amino acids was based on achiral separation on a C<sub>18</sub> column. It was found that milk contained totally 41.00 mg DL-amino acids in 100 mL milk. The level of D-amino acids to L-amino acids was determined by a column-switching system combining an achiral reversed phase separation and chiral chelate additive. The chiral separation was carried out with addition of the chiral Cu(*N*-benzyl-L-proline)<sub>2</sub> chelate to the mobile phase in reversed phase liquid chromatography. It was found that the determination of 16 different amino acids is feasible in the milk sample with a C<sub>18</sub> column separation and 12 D-amino acids out of the 16 amino acids can be determined via the column-switching system with chiral separation. 2.05% of D-glutamic acid and 2.93% of D-alanine were found in milk.

### 서 론

단백질의 기본 요소인 아미노산은 D형과 L형의 거울상 이성질체를 가지며 이중 L형만이 단백질의 구성성분으로 알려져 왔다.<sup>1</sup> 그러나, 1939년에 Kogli와 Erxleben이<sup>2</sup> 종기의 단백질에서 D-아미노산이 존재한다고 주장한 이래 D-아미노산은 동물

이나 인체내에서 조금씩 검출된다고 보고되어 왔다. 많은 학자들은 L-아미노산이 산의 가수분해 과정에서 라세미화(racemization)에 의해 D-아미노산이 생긴다고 믿어 왔으나, 이에 대한 논란이 수십년 동안 계속되고 있다.<sup>3,4</sup>

한편, D-아미노산의 존재에 대한 연구를 살펴보면

다음과 같다. Bada와 그의 공동연구자들은<sup>86</sup> 인간의 치아와 눈동자에서 aspartic acid가 연령에 따라 라세미화가 일어난다고 발표하였고, 그 후 Man과 공동연구자들은<sup>7</sup> 인간의 뇌속에서도 D-aspartic acid가 존재하며 연령에 따라 다르다는 것을 보고했다. 이들 분석법은 aspartic acid를 *N*-Trifluoroacetyl-L-prolyl-D,L-aspartic acid methyl ester로 유도체화를 시켜 GC로 분리 분석한 것으로 높은 온도 때문에 라세미화의 가능성이 있다. Nagata와 그의 공동연구자들은<sup>89</sup> 분광광도법으로 아미노산을 정량하여 신장환자의 D-아미노산이 정상인보다 더 높다는 사실을 보고했으며, Konno와 그의 공동연구자들은<sup>10,11</sup> 이온교환법으로 아미노산을 추출하고 자동 아미노산 분석기로 분석하여 D-amino acid oxidase(DAO) 효소 활성이 부족한 돌연변이 쥐의 소변속에 D-아미노산의 농도가 정상쥐보다 더 높다는 사실을 확인하여 발표하였다. 최근에는 키랄정지상 분리법을 적용하여 Armstrong<sup>12</sup> 등이 사람의 체액(혈장, 소변, 척수액, 양수액)에 미량의 D-아미노산이 존재한다고 발표하였다. 그러나, 현재까지도 동물이나 인간의 체내에 존재하는 D-아미노산의 근원과 생성 메커니즘은 알려져 있지 않다. 이 분야의 연구는 아직 초기단계로 현재로서는 소변에서 분비되는 D-아미노산과 여러가지 질병이 관련이 있을 것이라고 예상되고 있다. 따라서 동물이나 인간의 체내에 들어 있는 D-아미노산의 출처를 밝히는 일은 매우 중요하며 동물이나 인간의 체내에 들어 있는 D-아미노산의 출처를 밝히기 위해서는 개인의 음식물과 생체액내의 D-아미노산을 측정하여 그 상관관계를 조사하고, 생체액에 존재하는 D-아미노산의 출처를 확인할 수 있다면 사람의 건강이나 질병상태의 진단, 또는 질병의 예방 등에 응용이 가능 할 것이다.

식품속에 들어 있는 D-아미노산에 관한 연구로는 Gerardo Palla와 그의 공동 연구자들이<sup>13</sup> L-Phenylalanine-3-O-trioxaundecanoyl-tetramide(L-Phe-3-O-TA)를 키랄 정지상으로 한 GC를 이용하여 우유에서 D-alanine 3~4%, D-aspartic acid 2~3%, D-glutamic acid 2~3%가 검출되었다고 발표하였으나 이 결과는 GC로 분석한 결과로써 유도체화 반응의 정량성의 문제와 분리과정에서의 높은 온도 영향으로 인한 라세미화(racemization)의 가능성을

배제할 수 없다. 실제 시료속에 들어 있는 미량의 D-아미노산을 검출해 내기 위한 연구방법으로 중요한 것은 아미노산의 거울상 이성질체의 분리이며, 분리가 불완전 하면 L-아미노산의 과량이 미량의 D-아미노산을 중첩시키므로 정량분석이 곤란하다. 따라서, 완전한 분리(바탕선 분리)가 이루어져야 한다. 또 미량의 D-아미노산을 검출하기 위해서는 검출의 감도가 높아야 하고, 실험 전 과정에서 라세미화가 일어나지 않아야 한다. 이런 요구조건에 잘 부합하는 것으로서 최근에 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)가 각광을 받기 시작했다. 액체 크로마토그래피를 이용하여 아미노산의 거울상 이성질체를 분리하는 방법으로는 키랄 정지상법(Chiral Stationary Phase Method, CSP),<sup>14,15</sup> 키랄 이동상첨가법(Chiral Mobile Phase Additive, CMPA),<sup>16,17</sup> 키랄 코팅정지상법(Coated Chiral Stationary Phase, CCSP)<sup>18,19</sup> 등이 있다. 특히, 키랄 시약을 이동상에 첨가하는 키랄 이동상법은 기술적으로 적용하기가 용이하고, 최적의 분리조건을 찾기 위해서 이동상의 조성을 쉽고 빠르게 변화시킬 수 있는 장점이 있다.

Armstrong은<sup>12</sup> 사람의 체액속에 들어 있는 미량의 D-아미노산을 column-switching system을 이용하여 RP-HPLC로 정량하는 방법을 발표하였다. 이 연구에서는 아미노산을 두 가지의 유도체화 시약으로 유도체화 시키는데, 하나는 post column detection을 위해 OPA(o-phthalaldehyde)로 유도체화 시켰고 또 하나는 주입하기 전에 FMOC-Cl(9-fluorenylmethyl chloroformate)로 유도체화 시켜 분리하였다. 그 결과 사람의 체액속에서 phenylalanine, pipercolic acid, proline, tryptophan, tyrosine, leucine과 같은 C<sub>10</sub> 컬럼에서 주로 머무름 시간이 긴 6가지의 아미노산을 검출할 수 있었으나, 그 이외의 머무름 시간이 짧은 아미노산의 검출을 위해서는 다른 분석 방법이 필요하게 되었다.

본 실험에서는 식품인 우유에 들어 있는 아미노산을 시료 전처리 과정을 통하여 추출해 낸 다음 dansyl-chloride(DNS-Cl)<sup>20</sup>로 유도체화 시켜서 각 아미노산을 1차 비키랄 분리(achiral separation)하여 여러가지 matrix 효과를 줄이고, 분리된 각 아미노산 봉우리를 column-switching system<sup>12</sup>을 이용하여

바로 키랄분리(chiral separation)를 위한 컬럼으로 주입시켜 동시 키랄분리하고자 한다. 먼저 1차 비키랄 분리 단계에서는 유도체화된 아미노산을 C<sub>18</sub> 컬럼으로 비키랄 분리를 해서 표준물 첨가법(standard addition method)으로 정량하고, 그리고 2차 키랄분리 단계에서는 *N*-benzyl-L-proline<sup>21</sup>을 리간드로 한 구리 킬레이트를 이동상에 첨가하여 거울상이성질체의 바탕선 분리가 이루어지는 아미노산을 선택하여 미량의 D-아미노산을 정량하고, 그 미량 정량 분석법의 타당성을 조사하고자 한다.

## 실 험

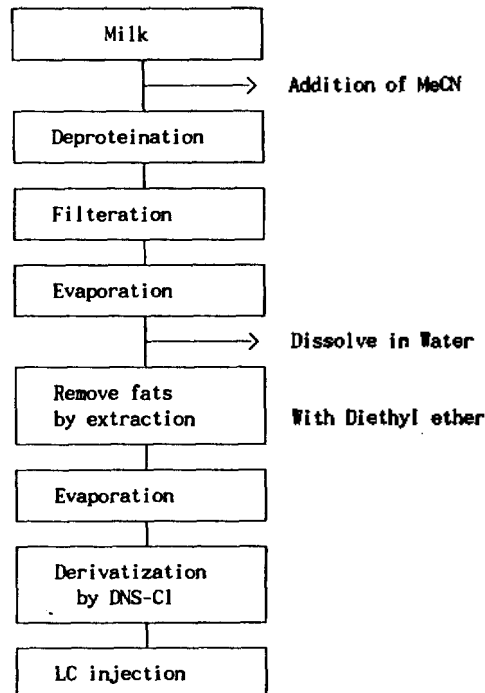
**기 기.** 본 실험에서 사용한 고성능 액체 크로마토그래프(HPLC)는 영인과학 Model 910 LC Pump, D520B의 적분기와 Waters Model 510 liquid pump, Spectra-Physics Chromjet 적분기를 사용했고, 형광 검출기로는 Varian Fluorichrom( $\lambda_{ex}$ : 352 nm,  $\lambda_{em}$ : 500 nm)과 Waters Model 420 Fluorescence Detector( $\lambda_{ex}$ : 325 nm,  $\lambda_{em}$ : 425 nm)를 사용했다. 시료 주입은 Rheodyne 7125 injector를, switching valve는 Rheodyne 7000을 사용했다. 본 연구에 사용한 컬럼은 Alltech Co.(Illinois, USA)의 Lichrosorb RP-18 (250 mm×4.6 mm i.d., 10  $\mu$ m)와 Varian Micro Pak SP C<sub>18</sub>(150 mm×2 mm i.d., 5  $\mu$ m)를 이용했다. 이동상의 pH는 DMS digital pH/ion meter Model DP-215를 사용하여 조절하였다.

**시 약.** 시료로 사용한 우유는 S사 제품을 시장에서 구입하여 사용하였으며, 표준물질로 이용한 각 아미노산 및 아미노산 유도체화 시약(dansyl-chloride)은 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용했다. 용매로 사용한 acetonitrile (MeCN), methanol(MeOH)은 1급 시약을 정제하여 사용했으며, 추출에 사용한 diethyl ether는 1급 시약을 그대로 사용했다. 키랄 리간드로 이용된 *N*-benzyl-L-proline은 실험실에서 합성하여 사용하였으며, 킬레이트 금속으로 사용된 copper(II) sulfate는 Merck Co.(Rahway, N. J., USA)사 제품을, ammonium acetate는 Shinyo Pure Chemicals Co.(Osaka, Japan) 제품을, sodium hydrogen carbonate는 Yakuri Pure Chemicals Co.(Osaka, Japan) 제품을 구

입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 물은 1차 증류수물 ELGA Co.(U.K.)의 water purification system으로 탈이온화시켜 사용하였다.

**실험과정.** 표준아미노산의 유도체화 반응은 각 표준 아미노산을 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 용액에 녹여  $1 \times 10^{-3}$  M로 만들고 유도체화 시약인 dansyl-chloride는 acetonitrile에 녹여  $2 \times 10^{-3}$  M이 되게 한 다음 표준 아미노산 용액 1 mL와 유도체화 시약 용액 1 mL를 각각 혼합하여 50°C 물 중탕에서 약 4시간 동안 흔들어서 반응시켰다.<sup>21</sup>

우유에 들어 있는 여러가지 성분 중에서 미량성분인 유리 아미노산만을 추출하는 과정은 다음과 같다<sup>22-26</sup>(Scheme 1). 먼저 시판우유 100 mL에 acetonitrile 400 mL를 첨가하여 단백질을 침전시키고 여과한 다음 증발시킨다. 남은 고체를 50 mL 물에 다시 녹여 diethyl ether 각 50 mL로 3회 추출하여 지방을 제거한 다음 물층을 회전식 진공증발기로 증발시키고 남은 고체를 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 용액 2 mL에 녹인다. Dansyl-chloride 약 0.04 g을 acetonitrile 2 mL에 녹인 용액을 이 용액에 첨가하여 아미노산을 단결



Scheme 1. Sampling process of amino acids from milk.

Table 1. Three separation steps for the DNS-amino acids

Amino acids		Mobile phase compositions
A Group	Aspartic acid	10% ACN
	Glutamic acid	90% H <sub>2</sub> O(0.01 M NH <sub>4</sub> Ac, pH=6.6)
B Group	Asparagine	15% ACN
	Glutamine	
	Serine	85% H <sub>2</sub> O(0.01 M NH <sub>4</sub> Ac, pH=6.6)
	Threonine	
	Glycine	
C Group	Alanine	
	Tyrosine	20% ACN
	Proline	
	Lysine	80% H <sub>2</sub> O(0.01 M NH <sub>4</sub> Ac, pH=6.6)
	Arginine	
Valine		
Methionine		
Isoleucine		
Leucine		
Tryptophan		
Phenylalanine		

화시키고, 최종 부피를 5 mL로 맞추어서 HPLC로 분리 정량했다.

*N*-benzyl-L-proline 리간드의 합성은 친핵성 치환반응인 아민의 알킬화 반응으로 염기성인 물-에탄올 혼합용매에서 합성하였다.<sup>21</sup> 아미노산의 정성 및 정량은 Cysteine을 제외한 19종의 표준 DNS-아미노산을 LC의 chromatogram에서 서로 겹치지 않도록 3 group(Table 1, Fig. 2.)으로 나누어서 동용매 용리로 분리하였으며, 이동상은 0.01 M NH<sub>4</sub>Ac 완충용액(pH=6.6)과 acetonitrile 혼합 용매를 사용했고, 이동상의 흐름속도는 0.5 mL/min으로 하였다. 우유시료(Fig. 3.)에서는 먼저 20% MeCN 이동상으로 C group을 분리한 다음 용리되지 않은 불순물을 100% MeCN으로 30분간 용리시킨 다음 15% MeCN 이동상으로 B group을 분리하고, 100% MeCN으로 용리되지 않은 아미노산을 용리시키고, 10% MeCN 이동상으로 A group을 분리하였다. 우유시료에서 아미노산의 정성확인용 우유에 표준 아미노산을 첨가하여 각 봉우리를 확인하였으며, 정량은 우유 100 mL에 107.2 mg에서 214.5 μg 범위의 각 아미노산을 적당량 첨가하여 정정곡선을 얻었다.

Fig. 1은 아미노산의 거울상이성질체를 분리하기 위한 column-switching system을 도식적으로 보여준다.<sup>12</sup> 컬럼(I)과 컬럼(II)는 모두 C<sub>18</sub>컬럼을 사용하였으며 컬럼(I)에서의 이동상의 조성 및 흐름속도는

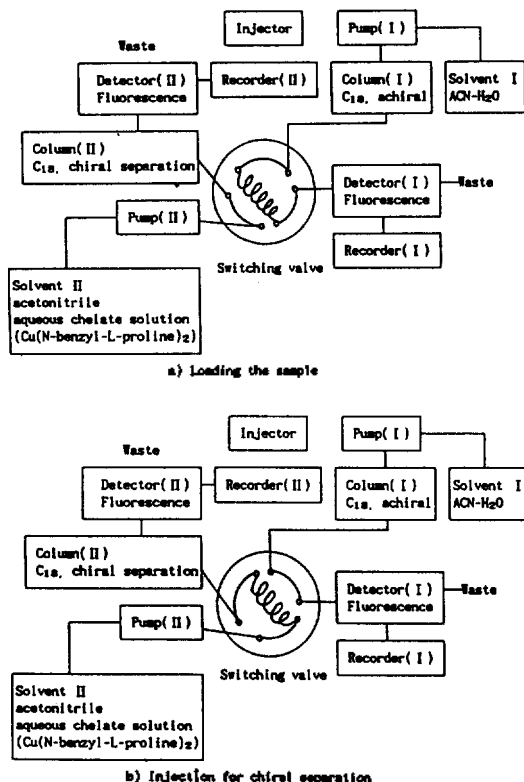


Fig. 1. Schematic diagram of column switching system.

위의 각 아미노산 정성확인 조건과 같고 여러가지 시료 matrix로부터 각 아미노산이 분리된다. 컬럼(II)에서는 Cu(II)(*N*-benzyl-L-proline)<sub>2</sub>을 리간드로 한 키랄 이동상 첨가법에 의해 각 아미노산의 거울상이성질체가 분리된다. Load 위치에서는 이동상(I)은 액체 펌프(I)에 의해 컬럼(I)을 통과하여 검출기(I)으로 흐르게 된다. 시료를 주입하면 컬럼(I)에서 여러가지 시료 matrix로부터 각 아미노산이 분리되어 검출기(I)에서 각 아미노산 봉우리가 감지되며 표준물 첨가법으로 각 아미노산을 정량했다. 검출기(I)에서 각 아미노산의 봉우리가 최대 감지되었을 때 switching valve를 injection 위치로 switching함으로써 컬럼(I)에서 분리된 아미노산은 이동상(II)에 의해 switching valve의 sample loop를 지나 컬럼(II)로 흐르게 되어 각 아미노산이 각각 거울상이성질체로 분리된다. 기록기(II)에서 크로마토그램의 D-아미노산과 L-아미노산의 피크 면적을 이용하여 D-아

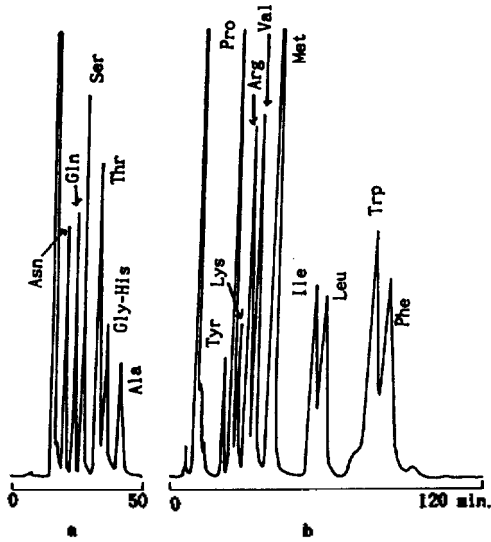


Fig. 2. Chromatograms of the DNS-amino acids. Mobile phases contain (a) 15% acetonitrile and 85% aqueous solution, (b) 20% acetonitrile and 80% aqueous solution. The aqueous solutions contain 0.01 M ammonium acetate at pH 6.6. Flow rates are 0.5 mL/min.

미노산의 백분율을 계산했다.

### 결과 및 고찰

Fig. 2는 Cysteine을 제외한 19종의 표준 DNS-아미노산을 3 group으로 나누어서 등용매 용리(isocratic elution) 조건하에서 분리한 크로마토그램이다. 많은 아미노산을 한꺼번에 분리할 때는 주로 기울기 용리(gradient elution)을 많이 이용하는데, 기울기 용리는 재현성이 좋지 않아서 본 실험에서는 등용매 용리로 분리하였다. Glycine-Histidine, Isoleucine-Leucine, Tryptophan-Phenylalanine 쌍을 제외한 대부분의 아미노산은 바탕선 분리가 가능하였다. 특히 다른 논문<sup>27,28</sup>에서 분리능이 좋지 않았던 Aspartic acid-Glutamic acid 쌍은 이 분리 조건하에서는 분리능이 좋았다. Fig. 3은 우유에서 추출한 아미노산을 단일화시켜 표준 DNS-아미노산과 같은 용매조건하에서 분리한 크로마토그램이며, 우유시료에서 각 아미노산 봉우리의 확인은 우유에 표준 아미노산을 첨가하여 확인한 결과 aspartic acid, phenylalanine, cysteine을 제외한 16종의 아미노산의 존재를 확인할

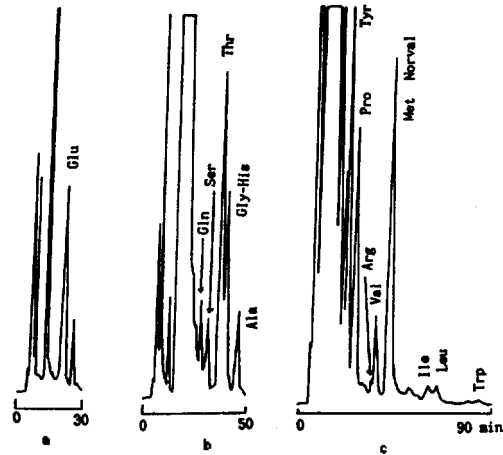


Fig. 3. Chromatograms of the DNS-amino acids derivatized from milk. The mobile phases contain (a) 10% acetonitrile and 90% aqueous solution, (b) 15% acetonitrile and 85% aqueous solution, (c) 20% acetonitrile and 80% aqueous solution. The aqueous solutions contain 0.01 M ammonium acetate at pH 6.6. Flow rates are 0.5 mL/min.

수 있었다.

표준 아미노산과 우유에 존재하는 각 아미노산을 반복 주입하여 머무름 시간과 피크면적의 재현성을 살펴본 결과, 아미노산의 머무름 시간은 편차계수(C.V.)가 0.005%에서 0.7%의 범위를 가지며 평균 0.03%로 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 표준 아미노산의 피크면적은 편차계수가 1.3%에서 6.4%의 범위를 가지며 평균 3.7%를 나타낸데 비해서 우유 시료에서의 피크면적은 편차계수가 2.6%에서 9.1%의 범위를 가지며 평균 5.2%로 표준 아미노산보다 높은 수치를 나타냈으나, 재현성 있는 결과를 나타냈으므로 정량적 가치가 있는 것으로 생각된다.

Table 2는 우유 100 mL에 들어 있는 각 아미노산을 표준물 첨가법으로 정량한 결과이며 적은 tryptophan이 0.035 mg, 가장 많은 glutamic acid가 26.14 mg으로 총 41.00 mg이 들어 있는 것으로 나타났다. Bruckner와 그의 공동 연구자들의 보고서<sup>28</sup>는 우유 100 g에 아미노산이 총 36.8 mg이 들어 있다고 발표하였다. 이러한 연구 결과의 차이는 분석한 시료가 서로 다르기 때문이라고 생각한다. 또한, Table 2는 시료 전처리 과정과 유도체화 과정 동안 아미노산의

Table 2. Content of D-amino acid in milk

Amino acid	Mean (mg/100 mL) (N <sup>c</sup> =6)	S.D.	Recovery <sup>b</sup> (%)	Linearity of response <sup>c</sup>	Detection limit (× 10 <sup>-7</sup> M)
Glutamic acid	26.140	1.440	81.0	0.997	23.9
Asparagine	0.283	0.028	86.2	0.988	7.0
Glutamine	0.082	0.012	92.8	0.996	6.9
Serine	0.221	0.022	102.7	0.990	7.5
Threonine	4.702	0.447	90.3	0.999	9.7
Glycine <sup>d</sup>	1.418	0.123	85.8	0.985	13.9
Alanine	0.693	0.108	90.7	0.990	10.9
Tyrosine	7.140	0.535	95.2	0.980	14.4
Proline	0.017	0.001	95.3	0.996	3.3
Lysine	0.014	0.002	91.5	0.990	42.9
Arginine	0.053	0.008	91.3	0.998	4.2
Valine	0.021	0.003	91.3	0.998	3.6
Methionine	0.003	0.000	92.2	0.998	3.4
Isoleucine	0.041	0.005	90.3	0.992	5.8
Leucine	0.130	0.009	99.4	0.988	8.7
Tryptophan	0.035	0.002	79.8	0.980	9.9

<sup>a</sup>Number of data. <sup>b</sup>Recovery of standard amino acids added to milk (107.2 mg-214.5 µg). <sup>c</sup>Linear regression coefficients of standard amino acids. <sup>d</sup>Glycine = glycine + histidine, calculated as glycine.

손실정도를 알아보기 위해 우유 100 mL에 107.2 mg에서 214.5 µg 범위의 각 아미노산을 첨가하여 아미노산의 회수율을 조사한 결과로 tryptophan과 glutamic acid를 제외하고는 대부분의 아미노산이 85.8%에서 102.7%의 좋은 회수율을 보였으며, 또 아미노산의 유도체화 반응이 정량적으로 일어나는 지를 확인하기 위해 표준 DNS-아미노산의 직선감응 범위를 조사한 결과 표준 DNS-아미노산은 4.16 µM에서 56.0 µM의 범위에서 상관계수가 0.980에서 0.999의 범위로 대체로 좋은 직선감응을 보였다. 또한 표준 DNS-아미노산의 검출한계는 신호 대 잡음의 비를 2로 하여 결정하였으며,  $3.3 \times 10^{-7}$  M ~  $42.9 \times 10^{-7}$  M의 범위를 나타냈다(Table 2). 이 결과로부터 본 실험방법이 실제 시료속에 존재하는 아미노산의 정량분석에 적합하다고 판단되어진다.

표준 DNS-아미노산을 Fig. 2에 있는 용리 조건을 이용하여 비키랄 분리를 행하고 각 아미노산 봉우리의 최고점에서 column-switching하여 Cu(N-benzyl-L-proline)<sub>2</sub>를 이동상으로 한 키랄 이동상 첨가법으로 키랄 분리를 수행한 결과가 Fig. 4(A), (B)와 Table 3에 나와있다. Armstrong과 그의 공동연구자가 분리했던 아미노산 이외에 10가지의 아미노산을

추가하여 모두 12가지 아미노산의 키랄 분리가 가능하였는데 그 중에서 Tyrosine을 제외한 다른 아미노산은 모두 분리능이 1.5 이상인 바탕선 분리가 가능하였으므로, 실제 우유 시료에 존재하는 미량의 D-아미노산을 상대적으로 과량인 L-아미노산으로부터 분리, 정량이 가능할 것으로 생각된다.

Fig. 5은 실제 우유 시료에 존재하는 아미노산을 표준 시료와 같은 방법으로 키랄 분리를 수행하여 크로마토그램으로 2가지의 D-아미노산 즉 D-Glutamic acid와 D-Alanine이 들어 있는 것으로 확인되었으며 크로마토그램에 나타난 D-아미노산과 L-아미노산의 봉우리 면적을 보고 % D-AA를 결정하여 D-아미노산을 정량하였다. 그 결과를 Table 4에 나타냈다. 결과를 보면 우유에는 D-Glutamic acid/D-L-Glutamic Acid가 2.05%, D-Alanine/D-L-Alanine이 2.93%가 들어 있는 것으로 나타났다. 우유에서 검출이 안된 D-아미노산이 검출기의 검출 한계보다 더 적은 양인가를 조사하기 위해 표준 아미노산으로 우유 100 mL에 들어 있는 각 아미노산 양의 1%에서 10%의 D-아미노산 용액을 만들어서 LC에 주입하여 D-아미노산의 검출한계를 조사한 결과, glutamic acid, threonine, tyrosine은 원래 우유에 들어 있는

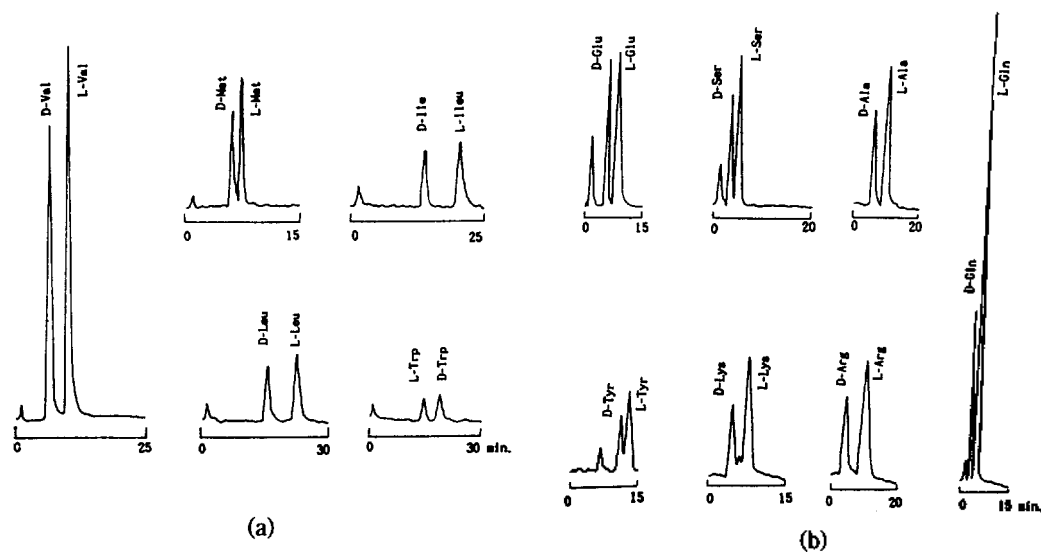


Fig. 4. (A) Chromatograms of DNS-amino acids by a coupled-column switching method with a chiral mobile phase additive. The mobile phase contains 25% acetonitrile and 75% aqueous chelate solution including  $5 \times 10^{-3}$  M  $\text{Cu}(N\text{-benzyl-L-proline})_2$  and 0.01 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  at pH 6.5. Columns are ODS columns. Flow rate is 0.5 mL/min. (B) Chromatograms of DNS-amino acids by a coupled-column switching method with a chiral mobile phase additive. The mobile phase contains 20% acetonitrile and 80% aqueous chelate solution including  $5 \times 10^{-3}$  M  $\text{Cu}(N\text{-benzyl-L-proline})_2$  and 0.01 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  at pH 6.5. Columns are ODS columns. Flow rate is 0.5 mL/min.

Table 3. Chromatographic parameters of DNS-amino acids

Amino acid	$k'$	$\alpha$	$R_s$	Amino acid	$k'$	$\alpha$	$R_s$
Glu <sup>a</sup>	D	5.29	1.64	1.53	Val <sup>b</sup>	D	8.03
	L	8.68				L	12.31
Gln <sup>a</sup>	D	2.49	1.84	1.79	Met <sup>b</sup>	D	6.03
	L	4.58				L	8.40
Ser <sup>a</sup>	D	3.55	1.55	1.68	Ile <sup>b</sup>	D	16.56
	L	5.49				L	24.95
Ala <sup>a</sup>	D	7.45	1.51	1.88	Leu <sup>b</sup>	D	18.92
	L	11.26				L	26.61
Tyr <sup>a</sup>	D	12.12	1.19	1.20	Trp <sup>b</sup>	D	16.42
	L	14.45				L	21.09
Lys <sup>a</sup>	D	4.71	1.86	1.55	Arg <sup>c</sup>	D	20.17
	L	8.74				L	25.23

Mobile phases contain <sup>a</sup>20% acetonitrile and 80% aqueous chelate solution, <sup>b</sup>25% acetonitrile and 75% aqueous chelate solution. Aqueous chelate solutions contain  $5 \times 10^{-3}$  M  $\text{Cu}(N\text{-benzyl-L-proline})_2$  and 0.01 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  at pH 6.5. Column is  $\text{C}_{18}(150 \times 2.0 \text{ mm i.d.})$ . Flow rate is 0.5 mL/min.

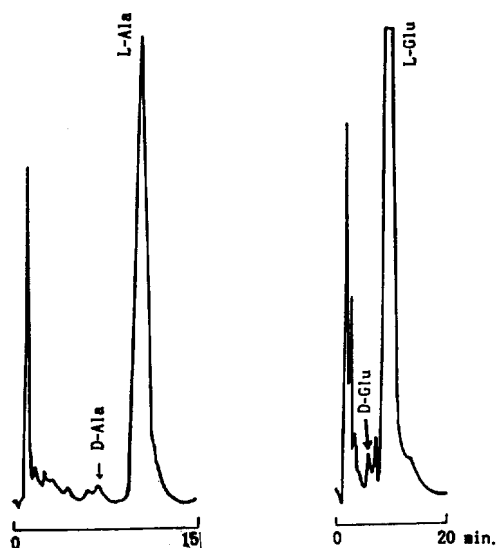


Fig. 5. Chromatograms of DNS-amino acids derivatized in milk by a coupled-column switching method with a chiral mobile phase additive. The mobile phase contains 20% acetonitrile and 80% aqueous chelate solution including  $5 \times 10^{-3}$  M  $\text{Cu}(N\text{-benzyl-L-proline})_2$  and 0.01 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  at pH 6.5. Columns are ODS columns. Flow rate is 0.5 mL/min.

아미노산의 양이 많기 때문에 0.1% 이상의 D-아미노산이 들어 있으면 D-아미노산의 검출이 가능했다. 그러므로 D-threonine이나 D-tyrosine이 검출되지 않은 것은 우유에 들어 있는 D-아미노산이 0.1% 이하이거나 또는 우유에 D-아미노산이 거의 함유되어 있지 않은 것으로 생각하며 lysine, methionine, tryptophan은 우유에 함유되어 있는 아미노산의 양이 검출 한계 이하이거나 또는 함유되어 있지 않은 것으로 생각한다. Table 4에는 다른 연구자들이 보고한 결과와 비교한 것으로 Data A는 우유에 들어 있는 아미노산을 L-phenylalanine-3-O-trioxaundecanoyl tetramide(L-Phe-3-O-TA)를 키랄 정지상으로 한 GC를 이용하여 분석한 결과이며,<sup>13</sup> Data B는 아미노산을 OPA와 *N*-Isobutyryl-L-Cysteine으로 유도체화시켜 HPLC로 분석한 결과이다.<sup>28</sup> 이들 자료를 비교해 볼 때 결과가 모두 서로 다른 것을 알 수 있다. 이러한 결과의 차이는 분석한 시료(우유)의 생산자가 서로 다르고, 또 시료의 전처리 방법이나 유도체화 과정의 차이에 인한 것일 수도 있다고 생각되어진다.

Table 4. Content of D-amino acid in milk

Amino acids	D/L Amino acids	% D-amino acid <sup>a</sup>			
		Detection limit	Sample (N <sup>b</sup> =3)	Data A <sup>c</sup>	Data B <sup>d</sup>
Glutamic acid	26.140	0.1	2.05 ± 0.13	2~3	8.9
Aspartic acid	—	n	—	2~3	6.5
Asparagine	0.283	n	—	—	—
Glutamine	0.082	3.0	—	—	—
Serine	0.221	0.9	—	—	3.0
Threonine	4.702	0.1	—	—	—
Alanine	0.693	0.4	2.93 ± 0.17	3~4	3.0
Tyrosine	7.140	0.1	—	—	—
Proline	0.017	n	—	—	—
Lysine	0.014	e	—	—	—
Arginine	0.053	3.4	—	—	—
Valine	0.021	5.0	—	—	—
Methionine	0.003	e	—	—	—
Isoleucine	0.041	4.6	—	—	—
Leucine	0.130	2.2	—	—	—
Tryptophan	0.035	e	—	—	—

<sup>a</sup>% D-AA =  $\text{D-AA} / (\text{D-AA} + \text{L-AA}) \times 100$ . <sup>b</sup>Number of data. <sup>c</sup>Data A was taken from ref 12. <sup>d</sup>Data B was taken from ref 28. The dash (-) means lower content of D-AA than detection limit or not present. n; Not detected. e; More than 10%.



## 결 론

1차 비키랄 분리 단계에서는 우유에서 16종의 아미노산을 정량분석할 수 있었으며, 우유 100 mL에는 tryptophan이 0.035 mg, glutamic acid가 26.14 mg으로 각종 아미노산이 포함되어 있으며 전체 아미노산의 총량은 41.00 mg으로 확인되었으며, 평균 91.0%의 회수율을 나타내었다. 각 유도체화된 아미노산(DNS-AA)은 4.16  $\mu$ M에서 56.0  $\mu$ M의 범위에서 직선감응을 보였으며 이 실험방법이 우유에 포함된 유리 아미노산을 정량분석하는데 이용될 수 있다고 생각하며, 2차 키랄 분리 단계에서는 우유에 들어 있는 16종의 아미노산 중에서 Armstrong과 공동연구자가 분리했던 아미노산 이외에 10가지의 아미노산을 추가하여 모두 12가지 D-아미노산의 정량분석이 가능하였으나, 실제 시중 우유속에 존재하는 D-아미노산의 정량에는 2종류만 나타났다. L-아미노산에 대한 D-아미노산의 상대적인 % 농도를 알 아본 결과, D-Glutamic acid/D.L-Glutamic Acid가 2.05%, D-Alanine/D.L-Alanine이 2.93%로 확인되었으며, 이 분석법은 우유시료 이외의 다른 시료 즉, 식품 등의 시료에도 적용이 가능 할 것으로 생각된다.

이 연구는 1992년 한국과학재단의 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 깊은 감사를 드린다.

## 인 용 문 헌

1. Hoepflich, P. D. *J. Biological Chem.* **1965**, *240*, 1654.
2. Kogl, F.; Erxleben, H. *J. Physiol. Chem.* **1939**, *258*, 57.
3. Kogl, F. *Experientia.* **1949**, *5*, 173.
4. Miller, J. A. *Cancer. Res.* **1950**, *10*, 65.
5. Helfman, P. M.; Bada, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **1975**, *72*, 2891.
6. Masters, P. M.; Bada, J. L.; Zigler, J. S. *Nature.* **1977**, *268*, 71.
7. Man, E. H.; Sandhouse, M.; Burg, J.; Fisher, G. *H. Science.* **1983**, *220*, 1407.
8. Nagata, Y.; Akino, T.; Ohno, K.; Kataoka, Y.; Ueda, T.; Sakura, T.; Shiroshita, K.; Yasuda, T. *Clinical Sci.* **1987**, *73*, 105.
9. Nagata, Y.; Konno, R.; Yasmura, Y.; Akino, T. *J. Biochem.* **1989**, *257*, 291.
10. Konno, R.; Nagata, Y.; Niwa, A.; Yasmura, Y. *J. Biochem.* **1989**, *261*, 85.
11. Konno, R.; Isobe, K.; Niwa, A.; Yasmura, Y. *Metabolism.* **1988**, *37*, 1139.
12. Armstrong, D. W.; Gasper, M.; Lee, S. H.; Zukowski, J.; Ercal, N. *Chirality.* **1993**, *5*, 375.
13. Palla, G.; Marchelli, R.; Dossena, A.; Casnati, G. *J. Chromatogr.* **1989**, *475*, 45.
14. Pirkle, W. H.; House, D. W.; Finn, J. M. *J. Chromatographia.* **1980**, *2*, 143.
15. Hinze, W. H.; Riehl, T. E.; Armstrong, D. W. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 33.
16. Hare, P. E.; Gil-Av, E. *Science.* **1979**, *204*, 1226.
17. Gilon, C.; Leshem, R.; Tapuhi, Y.; Grushka, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7612.
18. Tapuhi, Y.; Miller, N.; Karger, B. L. *J. Chromatogr.* **1981**, *205*, 325.
19. Davankov, V. A.; Bochkov, A. S.; Belov, Y. P. *J. Chromatogr.* **1981**, *218*, 547.
20. Marquez, F. J.; Quesada, A. R.; Sanchez-Jimenez, F.; Nunez de Castro, I. *J. Chromatogr.* **1986**, *380*, 275.
21. Lee, S. H.; Oh, T. S.; Kim, B. E. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1988**, *9*, 341.
22. Bruckner, H.; Hausch, M. *Milchwissenschaft.* **1990**, *45*, 357.
23. Bruckner, H.; Hausch, M. *Milchwissenschaft.* **1990**, *45*, 421.
24. Bruckner, H.; Hausch, M. *J. High Resolution Chromatogr.* **1989**, *12*, 680.
25. Bruckner, H.; Hausch, M. *Amino Acids.* **1990**, *1172*.
26. Bruckner, H.; Hausch, M. *Chirality and Biological activity.* **1990**, *129*.
27. Oray, B.; Lu, H. S.; Gracy, R. W. *J. Chromatogr.* **1983**, *270*, 253.
28. Martin, P.; Polo, C.; Cabezudo, M. D.; Dabrio, M. V. *J. Liq. Chromatogr.* **1984**, *7*, 539.
29. Bruckner, H.; Jaek, P.; Langer, M.; Godel, H. *Amino Acids.* **1992**, *2*, 271.