

## 한국 小兒尿의 遊離아미노酸에 대한 研究

서울大學校 醫科大學 生化學教室

金昇元 · 金永國 · 朴壽勳 · 崔 榮

=Abstract=

### A Study on the Free Amino Acids in the Urine of the Korean Children

by

Sung-Wun Kimm, Yung-Kuk Kim, Soo-Hun Park, Yung Choi

*Department of Biochemistry, School of Medicine, Seoul University,  
Seoul, Korea*

In order to establish a new biochemical parameter to evaluate nutritional status, the present paper presents a paper chromatographic procedure, which enables clear separation of the essential and nonessential free amino acids in the urine without desalting the sample prior to chromatographic analysis

The children of school age, showing difference in their body physiques, from the rural and urban areas in Korea were selected in collecting the 24 hour urine specimens, with the following conclusions.

(1) A new procedure utilizing paper chromatographic analysis, without desalting the urine, was proposed to establish a new biochemical parameter for nutritional status by analyzing the ratio of the nonessential to the essential free amino acids in urine.

(2) According to the present procedure, the ratio obtained with the urban children was proved to be  $1.33 \pm 0.18$ , whereas that with the rural children was  $1.59 \pm 0.24$ ; suggesting the lower the ratio, the superior the body physiques and nutritional status.

(3) The ratio had a statistically significant correlation with the body and sitting heights as well as the body weight, but not with the girth.

오늘 날 蛋白營養不足이 小兒死亡率에 있어서 큰 比重을 차지하고있으며 (Bengoa, Jelliffe, & Perez, 1959) 따라서 蛋白質不足疾患인 Kwashiorkor는 물론이고 marasmus 其他 臨床의 症候는 深刻한 것이 많다 (Scrimshaw & Béhar, 1961) 成長하는 小兒의 蛋白質不足에는 칼로리 不適이 隨伴되는 까닭에 單一한 臨床症候로서 觀察되는 것이 아니며 蛋白質缺乏과 餘他 營養素 缺乏이 複合하여 臨床의 重症度를 決定하고 있는 것이다 (Jelliffe, 1959). 이와같은 경우 血清

蛋白, 特히 albumin의 減少와 함께  $\beta$ -globulin이 減少하고  $\alpha_2$ -globulin은 增加가 있다고 報告되어있으며 (Béhar 等, 1956)  $I^{127}$ -albumin을 使用한 實驗에 의하면 (Gittlin 等, 1958) albumin이 減少하는 것은 이의 異化率減少보다는 合成率이 낮기 때문인 것으로 알려져있다.

한편 血漿內의 總 아미노窒素는 大部分의 아미노酸 含量이 減少되기 때문에 역시 떨어지게되고, 그중 가장 많은 減少가 tryptophan, cystine, valine, tyros-

ine, methionine 등 必須 아미노酸의 含量에서 일어나며 血中 및 尿中の urea 濃度에 減少가 오는 것으로 보아 蛋白質代謝 效率이 또한 減少되고있음을 가리키고 있다.

이밖에도 尿中에 排泄되는 purine 誘導體로서의 窒素가 顯著히 增加하는 것은 細胞成分의 分解를 意味한다고 보고있다. (Scrimshaw & Béhar, 1961). 또한 尿中の 異常物質로서는 重要한 代謝經路의 障害로 말미암은  $\beta$ -aminobutyric acid 나 ethanolamine 등의 出現으로 알려지고있다 (Edozien, Phillips & Collins, 1960). 이 뿐만 아니라 Waterlow & Weisz (1956)에 의하면 肝組織의 DNA에 對한 窒素의 比率이 떨어진다고 하는바 이는 말할 것도 없이 細胞質 窒素含量이 減少하는데 起因하는 것임은 分明하다.

이와같은 蛋白營養不足 내지는 缺乏에 起因하는 諸生化學的變化는 發育에 關與하는 여러가지 外的因子, 即, 地域, 季節, 社會, 및 經濟的 與件의 不適合 함께 一般營養의 不適合을 들 수 있는 바이며, 白과 金 (1969)이 報告한 바와같이 比較的 營養狀態가 좋은 都市의 學童에 비해 그렇지 아니한 農村의 學童에 있어서 各種 體格指數가 減退하고 있음을 아울러 考察컨데 都市와 農村學童의 蛋白 및 아미노酸營養에 差異가 있어 前者가 後者에 比하여 우수한 印象을 주고있다.

이러한 事實에 着眼하여 著者들은 白, 金(1969)의 報告에 대한 生化學的 뒷받침을 얻기 위하여 本論文에서 尿中の 遊離아미노酸 分析을 施行하고 이로써 營養學的 指標를 얻으려한 것이다. 왜냐하면 아미노酸은 甚한 Kwashiorkor때만이 아니라 不適食餌로서 成長하고있는 小兒의 경우라 할지라도 臨床症候가 나타나기 훨씬 以前에 가장 먼저 imbalance를 보이게 됨으로 尿中の 遊離 아미노酸을 都市와 農村學童에서 檢索함으로써 새로운 營養學的 診斷의 指標로 삼을 수 있을 것이기 때문이다. 그러기 위하여 著者들은 本研究中에서 尿中遊離 아미노酸을 쉽게 screen할 수 있는 方法, 即尿의 脫鹽過程을 거치지 아니하고도 쉽게 paper chromatography에 의해서 그 必須 및 非必須 아미노酸의 比率을 分析할 수 있는 方案을 試案하여 報告하는 바이다.

## 實驗方法

### (1) 分析對象

本研究는 1971年 2月부터 1972年 8월에 이르는 사이 서울市內 私立國民學校學童 49名(男30名, 女19名)과 嶺南一帶의 農村國民學校學童 46名(男27名, 女19

名)을 對象으로 하였으며, 材料選擇을 함에 있어서 不具兒와 過去에 發育에 큰 障害가 있었거나 現在疾患을 앓고있는 學童을 除外하였다.

### (2) 尿採取 및 處理

24時間尿를 toluene下에 pool하여 採取하고 냉장하였다가 分析에 提拱한 것이다.

採取한 24時間尿를 Whatmann 3MM 濾紙에 적셔서 風乾한 다음 100°C~120°C에서 20分間 加熱處理함으로써 蛋白質이나 oligopeptide는 濾紙의 cellulose fiber에 融着되도록한다. 그리고 直徑 5mm인 圓形의 wick를 만들어 두었다가 chromatography用 濾紙에 역시 같은 크기의 圓孔을 punch로 뚫고 끼어 맞춘다.

### (3) 試藥

Chromatography溶媒: 120ml n-BuOH, 30ml 冰醋酸, 및 50ml H<sub>2</sub>O.

Ninhydrin: 0.2%(w/v) acetone溶液을 사용하였다. 即, 1 gm.의 ninhydrin을 500ml의 acetone에 溶解하여 만들었다.

Ethanol性 copper nitrate 溶液: 100ml의 absolute ethanol에 10%(v/v) 窒酸 0.2ml를 加한 溶液에 copper nitrate를 1ml 加하여 사용하였다.

Chromatography用 濾紙, Whatmann 3MM의 濾紙를 machine方法으로 展開하도록 切取하여 使用하였다.

### (4) Chromatography

前記와같이 處理한 試料(圓形 wick)를 chromatography用 濾紙의 圓形孔에 끼어둠으로써 試料의 塗沫을 代身한 것이므로 이를 그대로 前記溶媒를 使用하여 約 20時間 上昇展開하고 風乾後 ninhydrin溶液을 spray하고 100°C에서 5分間 加熱하여 아미노酸의 ninhydrin spot를 發色케 하였다.

다음 chromatogram을 알콜性 copper nitrate 溶液에 담구었다가 곧 역시 風乾하였으며 이때 아미노酸의 ninhydrin에 의한 靑紫色은 연한 분홍으로 變化하였다. (第1圖)

第1圖의 典型的인 chromatogram에서 알 수 있듯이 Rf 0.6~0.8의 leu, i-leu, phe, val, met, tyr의 spot 群을 I 群 spot, Rf 0.5를 中心으로한 pro, ala, glu, asp, gly, ser 등의 spot 群을 II 群 spot, 그리고 Rf 0.1을 中心으로한 arg, his, lys 등을 III 群 spot로 나누어 보는데 I + III 群은 必須 아미노酸群이며 II 群은 非必須 아미노酸群이었으므로 I + III 群 spot와 II 群 spot를 各各 切取하여 이를 試驗管에 옮기고 4ml 의 methanol을 加하여 振盪하여 1時間 抽出한다음

509nm의 波長에서 Spectronic-20를 利用하여 extinction을 測定하였다. 이때 盲檢用으로는 溶媒에 丹 담구었던 Whatmann 3MM을 같은 要領으로 處理하여 얻은 methanol 溶液을 使用한 것이며 I + III群의 spot에서 얻어진 必須 아미노酸의 extinction에 대하여 III群 spot에서 얻은 그것의 比로써 比率를 算出하였다.

### 結果 및 考察

第1圖의 chromatogram에서 보는 바와 같이 本實驗條件下에서는 分明히 尿中の 遊離 아미노酸을 必須 아미노酸과 非必須아미노酸으로 區別分離할 수가 있었음을 알수 있다. 即, 그 I 및 III群은 必須 아미노酸이었는데 對해 II群은 非必須 아미노酸이었음이 標準 아미노酸의 Rf值와의 比較로써 分明하였다. 따라서 本實驗에서의 chromatography 條件은 尿中の 遊離 아미노酸 分離에 매우 簡便한 方法이 됨을 알았다. 이와같이 함으로써 尿의 脫鹽操作等 번거로운 術式이나 이온交換 chromatography 等 비교적 重裝備로 長時間 分析치 아니하여도 所期의 目的을 達成할 수가 있었다.

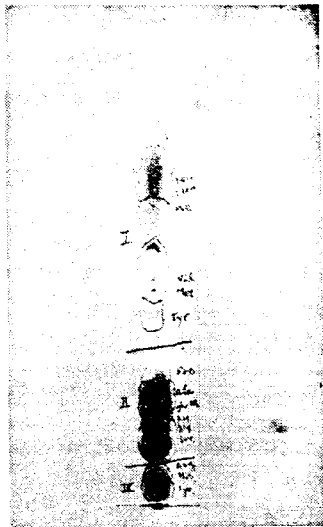


Fig. 1, A typical paper chromatogram of the urine free amino acids, showing separation of essential (I + III) and non-essential amino acids (II).

한편 實驗에 動員된 volunteer들의 體格을 都市와 農村別로 比較한 結果는 第I表에 要約한 바와같았다.

即, 身長이나 胸圍, 座高 및 體重等에 있어서 表示된 바와같이 農村보다 都市의 小兒들이 若干 優越

Table I. Comparison of the body physiques of the urban and rural children (6~7 years of age).

	Urban	Rural
Height	115.1±4.8	112.2±4.8
Girth	56.8±2.9	55.4±2.4
Sitting height	64.6±2.3	62.5±2.2
Weight	19.5±2.2	18.5±1.9

한 指數를 보였다. 이와같은 結果는 白, 金(1969)이 結論한 內容과 같은 것으로서 都市의 小兒(學童)들이 農村의 小兒에 比하여 營養의 優位에 있음을 示唆하는 事實이라하겠다. 身長과 體重에 있어서 韓國의 小兒發育標準值(大韓小兒科學會, 1967)와 比較하여 보아도 都市小兒는 優位를, 그리고 農村小兒는 劣勢를 나타내고 있었다. 이를 다시 日本文部省의 報告와 比較하건데 (文部省, 1965) 역시 都市小兒라할 지라도 身長과 體重에서 劣勢를 보이고 있음은 이미 權(1968)에 의해서도 指摘되었듯이 本實驗의 結果와 아울러 보건데 韓國小兒가 日本의 小兒에 比할 때 文化的 諸要因을 비롯해서 營養攝取 그리고 여유있는 환경과 기회가 缺如 되어있다고 白, 金(1969)이 指摘하고 있으나 成長完了期에 이르러서는 다시 優越해지는 點으로보아 (白, 金, 1969) 韓國小兒가 日本보다 先天的으로 劣勢에 있는 것은 아니라고 思料된다.

이와같은 體格差가 있는 兩群의 小兒의 尿中 遊離 아미노酸은 역시 그 必須 아미노酸含量에 있어서 都市가 農村보다 優越함은 第2表에서 보는 바와같다. 即, 必須아미노酸에 對한 非必須아미노酸의 比率 (以

Table II. Ratios of the non-essential amino acids to the essential amino acids in the urine specimens of the urban and rural children.

Urban	Rural
1.33±0.18	1.59±0.24

下 아미노酸의 非必比)를 보건데 農村이 1.59±0.25 임에 比해 都市의 그것은 1.33±0.18로써 必須아미노酸含量이 높은 것을 間接적으로 보여주고 있는 것이다.

事實 蛋白質營養 不足이나 缺乏이 있는 境遇에는 血中の 遊離아미노酸中에서도 特別 必須아미노酸의

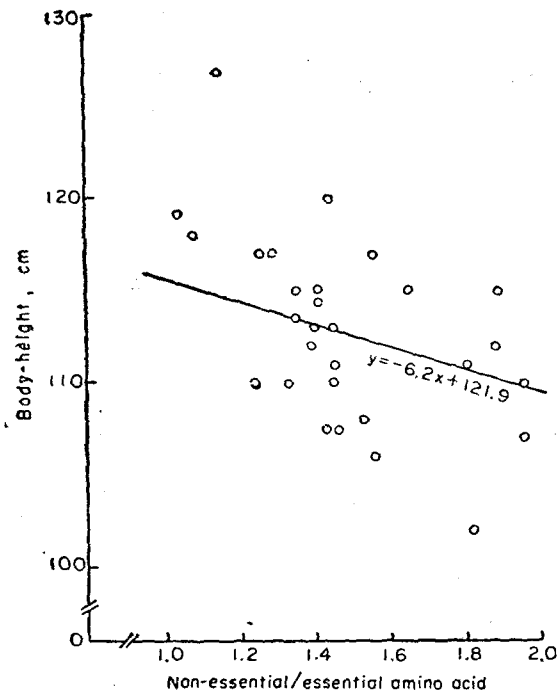


Fig. 2. Correlation of the body-height with the ratio of the non-essential to the essential amino acids in the urine of the urban and rural children

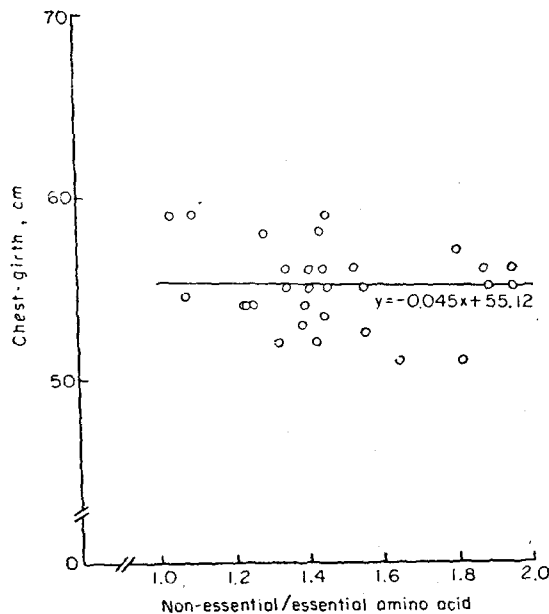


Fig. 3. Correlation of the chest-girth with the ratio of the non-essential to the essential amino acids in the urine of the urban and rural children

함량이 減少되는 것이 報告되어있다 (Norton, 1960) 이와 같은 現象은 Arrogava 等 (1962)의 報告에서도 分明하다. 이들의 報告에 의하면 蛋白質 缺乏이 있으면 血中  $\alpha$ -아미노酸은 그 含量이 거의 半減한다는 것이었다. 특히 必須아미노酸中 가장 많은 減少가 일어나는 것은 tyrosine, cystine, 그리고 arginine이라고 하였다. 그리고 이들의 報告에 의하면 15日間 蛋白質이 完全히 缺如된 食餌를 攝取한 小兒에서는 急激히 血中 必須 아미노酸이 減少하는 대신 代償性으로 非必須아미노酸이 增加한다는 것이다. 그렇다면 이와같은 代謝의 영향은 血中뿐만 아니라 尿中の 遊離 아미노酸에서도 反映될 것이며 따라서 蛋白營養이 不適하면 本實驗의 parameter인 非必 아미노酸 比率이 增加될 것이 豫想되는 것이요, 또한 本實驗結果(第2表)에서도 分明하듯이 하나의 營養學的 診斷의 指標가 成立될 수 있음을 알 수 있다. 특히 Christensen과 Streicher (1948)이 覓진 報告한 바 있듯이 아미노酸을 添加한 食餌로써 成長이 促進된다는 事實을 想起하면 本實驗의 非必아미노酸 比率은 分明히 하나의 成長에 關한 營養學的의 지표라 할 수 있겠다.

그 根據로써 第2圖에서 알 수 있듯이 이 非必 아미노酸의 比率과 身長間에는 農村都市 가릴 것없이 統計的으로 매우 義意있는 相關關係( $r=0.60$ )를 보이고 있어 이 比率의 高低는 身長의 高低과 關聯을 갖고 있음을 본다, 即, 尿中の 比率이 낮은, 即, 必須아미노酸이 非必須아미노酸에 비해 높은 경우는 身長이 큰을 보는 것이다.

이와같은 關係는 胸圍에 있어서는 나타나지 아니하였으나 (第3圖), 座高 (第4圖)와 體重 (第5圖)의 경우에는 역시 相關關係가 義意있는 總計的結果를 보이고 있다( $r=0.81$ ,  $r=0.78$ ) 即, 이 尿中の 非必아미노酸 比率이 낮아서 必須아미노酸의 尿中 含量이 높을수록 座高와 體重은 크게 나타남을 알 수 있다. 그러나 胸圍에 있어서만은 이러한 相關關係가 없음은 매우 興味있는 일이라 하겠다.

正常을 벗어난 이와같은 比率은 結局 生體內的 아미노酸의 imbalance가 있는 結果이겠으며 이러한 imbalance는 Arrogava 等 (1962)도 報告하고 있으며 血中の imbalance가 終乃는 尿中에 여러가지로 反映되고 있음을 보는 것이다. 이러한 imbalance는 組織의 質實細胞內로의 아미노酸의 傳達에마저도 障害를 招來할 可能性이 있는 것이며 그리하여 細胞內的 遊離 아미노酸의 pool에 있어서의 非必아미노酸 比에도 變化를 가져올 것이며 尿中の 遊離아미노酸에도 그 變

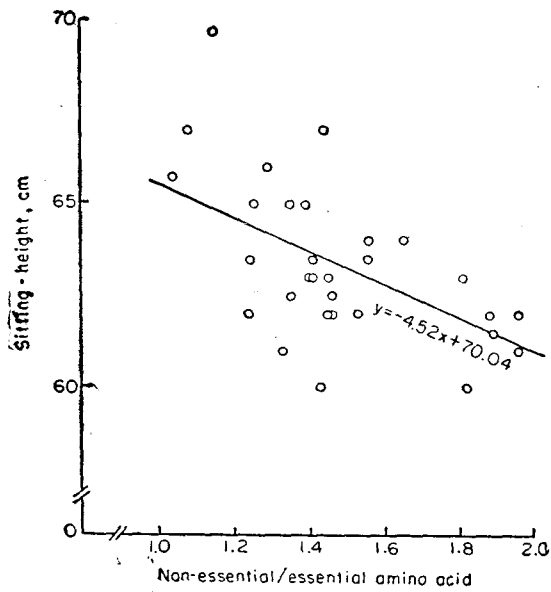


Fig. 4. Correlation of the sitting height with the ratio of the non-essential to the essential amino acids in the urine of the urban and rural children

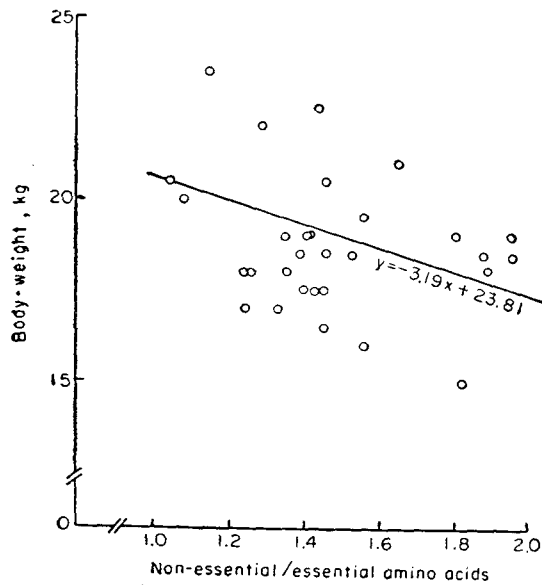


Fig. 5. Correlation of the body-weight with the ratio of the non-essential to the essential amino acids in the urine of the urban and rural children

화가 온 것임을 알 수 있을 것이다.蛋白質의 正常의 體內에서의 生合成은 適當한 아미노酸들이 混合해져서 基質이 되어야하는 것이고 低濃度の 아미노酸만이 問題되는 것은 아니다. 그러기 때문에 蛋白質攝取의 不足내지는 不適當성이 蛋白質 生合成에 크게 影響을 주게되고 이것이 結局은 成長의 저해로 나타나는 것인만큼 本實驗에서의 尿中 遊離 必須아미노酸에 對한 非必須 아미노酸의 比率檢索은 蛋白質營養障害을 診斷하는데 커다란 診斷的價値를 가지고 있음을 알 수 있으며, 本實驗에서 試案한 chromatography의 分析法의 簡便한 點은 이의 應用에 한層 밝은 展望을 주는 것으로 思料 된다.

### 結 論

尿中遊離아미노酸을 paper chromatography에 依해서 分析하고 그 必須아미노酸과 非必須아미노酸의 含量比率을 算出함으로써 새로운 營養學的 指標로 삼으려는 意圖로서, 體格에 差異가 있는 都市와 農村의 學童小兒의 1日尿를 採取分析하고 다음과 같은 結論을 얻었다.

(1) 尿를 脫鹽 過程을 거치지 아니하고도 一次元 上昇展開로써 그 遊離아미노酸의 必須와 非必須 아미노酸을 分離하여 含量比를 얻을 수 있는 새로운 方法을 試案하였다.

(2) 이 方法에 의한 都市와 農村의 學童小兒의 尿中 必須에 대한 非必須 아미노酸의 比率은 前者가  $1.33 \pm 0.18$ 인데 比하여 後者는  $1.59 \pm 0.24$ 로서 體格이 優越하면 이 比率이 낮음을 알 수 있다.

(3) 이 比率과 身長, 體重, 座高는 매우 統計的으로 義意있는 相關關係를 보였으나 胸圍만은 이러한 關係가 없었다.

### REFERENCES

- Arrogava, G., Wilson, D., de Funes, C. and Béhar, M.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 11, 517 (1952)
- Pengoa, J.M., Jelliffe, D.B. and Perez, C.; *Am. J. Clin. Nutr.*, 7, 714 (1959)
- Béhar, M., Arrogava, G., Tejada, C., Viteri, F., Scrimshaw, N.S.; *Rev. Col. Med. Guatenala*, 7, 221 (1956)
- Christensen, H. N. and Streicher, J.A.; *J. Biol. Chem.* 175, 95 (1948)
- 大韓 小兒科 學會誌; 大韓 小兒科 學會發行(1967)
- Edo'jen, J.C., Phillips, E.J., Collins, W.R.F.;

- Lancet*, 1, 615 (1960)
- Gittlin, D., Cravioto, J., Frenk, S., Montano, E.L., Ramos-galván, R., Gómez, F., Janeway, C. A.; *J. Clin. Invest.*, 37, 682(1958)
- Jelliffe, D. B.; *J. Ped.*, 54, 227(1959)
- 權彝赫; 成長發育에 關한 調査, 서울大學校 醫科大學 保健所(1968)
- 日本 文部省 發行: 學校保健統計調査 報告書(1965)
- Norton.P.M.; *Proceedings of the 5th International Congress on Nutrition*, P. 7(1960)
- Scrimshaw, N.S.& Béhar, M.; *Science*, 133, 2039 (1961)
- Waterlow, J.C. & Weisz, T; *J Clin. Invest.*, 35, 346(1956)