

Achiral/Chiral Coupled Column법에 의한 식품 중의 D-아미노산의 정량분석

이선행[†] · 장윤희 · 이광필

경북대학교 화학교육과

(1995. 10. 12. 접수)

Micro-Determination of D-Amino Acids in Food by Using Achiral/Chiral Coupled Column Method

Sun-Haing Lee[†], Youn-Hee Chang, Kwang-Pill Lee

Department of Chemistry Graduate School, Kyungpook National University, Taegu, Korea

(Received Oct. 12, 1995)

요약 : 식품 중의 몇몇 유리 D-아미노산이 column switching method에 의해 검출되었다. D-아미노산과 L-아미노산의 총량의 정량은 C₁₈ 컬럼을 사용한 비키랄 분리에 근거한다. L-아미노산에 대한 D-아미노산의 수준은 o-phthalaldehyde로 유도체화된 아미노산의 postcolumn reaction detection을 포함하는 column switching system에 의해 정량되었다. Postcolumn detection system의 키랄 분리는 chiral crown ether 컬럼에 의해 실행되었다. 이 system은 간장과 발효된 콩, 그리고 콩 같은 식품 중에 있는 D-아미노산의 정량에 적용된다. 이 achiral/chiral coupled-column system하에서는 시료 전처리과정이 중요함을 알게 되었다. Phenylalanine은 시판용 간장 속에 242ppm, 재래식 간장 속에는 102ppm, 발효된 콩에는 1g당 8.34mg, 콩에는 1g당 2.87mg이 함유된 것으로 밝혀졌다. D-phenylalanine은 시판용 간장 속에는 0.67%, 재래식 간장에는 0.34%, 발효된 콩에는 1.81% 미만, 콩에는 2.82% 미만이 검출되었다.

Abstract : Detectable levels of several free D-amino acids were found in some food. This was accomplished by using a column switching method. The determination of total amount of D- and L-amino acids was based on an achiral separation with a C₁₈ column. The level of D-amino acids to L-amino acids was determined by the column switching system including the postcolumn reaction detection of the amino acids derivatized with O-phthalaldehyde. The chiral separation of the postcolumn detection system was carried out with chiral crown ether column. This system was applied for the micro-determination of D-amino acids in food such as soy sauce, fermented soy bean and beans. It turned out that the sampling process is critical for the trace analysis of D-amino acids under this achiral/chiral coupled-column system. It was found that commercial soy sauce contained 242ppm, conventional soy sauce 102ppm, fermented soy bean 8.34mg per 1g and bean 2.87mg per 1g sample for phenylalanine. D-phenylalanine was found 0.67% in commercial soy sauce, 0.34% in conventional soy sauce, less than 1.81% in fermented soy bean, and less than 2.82% in bean.

Key words : D- and L-amino acids, chiral separation, postcolumn detection system

1. 서론

단백질은 동물, 식물, 미생물 등 모든 생물의 원형질을 구성하는 중요한 물질로서, 생명체 내에서 세포의 구조 유지, 촉매(효소), 운반, 방어, 운동 등의 기능을 한다. 단백질을 구성하고 있는 것은 아미노산¹이며 D형과 L형의 거울상 이성질체로 존재한다. 편광 회전성을 제외한 모든 물리·화학적 성질이 동일한 거울상 이성질체의 분리는 합성화학이나 속도론의 촉매작용, 의약품과 지질학의 연대 측정 뿐 아니라 입체화학의 이해나 이용에 매우 중요하며 환경화학이나 식품산업에도 주목을 끌기 시작했다.^{2,3} 특히 생화학(Biomedical)과 약제학(Pharmaceutical)에서는 처방약품 중에 70% 이상이 적어도 한 개의 키랄 중심을 가지며 거의 30%가 라세미 혼합물인데, 불순물의 이성질체를 함유한 약품의 문제는 이성질체가 부작용을 야기할 수 있고⁴ 활성화학종의 작용을 변화시킬 수도 있고, 활성화학종과 경쟁반응을 할 수도 있으며 약을 복용한 사람에게 복잡한 반응을 일으킬 수도 있다.

1939년에 Kogi와 Erxleben⁵이 종기의 단백질에서 나온 가수분해물 속에 D-아미노산이 존재한다고 주장한 이래로 D-아미노산은 동물이나 인간의 체내에서 조금씩 검출되어 왔다. 그러나 많은 학자들은 D-아미노산이 산의 가수분해 과정에서 라세미화(racemization)에 의해 생긴다고 믿어 왔으며 이것에 대한 논란이 수십년 동안 계속되어 왔다.⁶⁻¹⁴

최근에는 Armstrong¹⁵ 등이 사람의 체액(혈장, 소변, 척수액, 양수액)에 미량의 D-아미노산의 존재와 정량방법을 발표하였다. 그러나 아직도 동물이나 인간의 체내에 존재하는 D-아미노산의 근원과 생성 메카니즘은 알려져 있지 않다. 동물이나 인간의 체내에 들어 있는 D-아미노산의 출처를 밝히기 위해서는 먼저 식품을 조사할 필요가 있다. 따라서 개인의 음식물과 생체액 내의 D-아미노산을 측정하여 그 상관관계를 알아보고, 생체액에 존재하는 D-아미노산의 출처를 발견하여 사람의 건강이나 질병상태를 진단하는 데 도움이 되고자 하는 것이 본 실험의 궁극적인 목적이다.

식품 속에 들어 있는 D-아미노산에 관한 연구로는 Gerardo Palla와 그의 공동 연구자들이 L-phenyl-alanine-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-glu-

tamic acid 2~3%가 검출되어졌다고 발표하였다.¹⁶

본 실험에서는 여러 식품 속에 들어 있는 아미노산을 시료 전처리 과정을 통하여 추출해 낸 다음 역상 LC로 분리하여 OPA로 검출¹⁷⁻²⁴하는 postcolumn detection system으로 식품에 존재하는 D-아미노산의 정량 가능성을 확인하였다. OPA 유도체화물은 2분 정도의 짧은 시간에 반응이 완결되지만 안정성은 5분 정도로 상당히 떨어지므로 precolumn detection system 보다는 postcolumn detection system으로 많이 이용된다. 특히 높은 형광성을 띠기 때문에 감도가 좋은 형광검출기를 이용할 수 있어 낮은 검출한계를 가지므로 미량정량에 적합하다. Proline과 hydroxyproline 같은 아미노산을 제외한 대부분의 아미노산 유도체의 분리가 가능하며 높은 감도와 반응성으로 용액 중 존재하는 아미노산이나 matrix가 많은 시료 중의 아미노산을 column으로 먼저 분리한 후 유도체화할 수 있어 응용할 수 있는 시료의 범위가 넓다. 또한 여러 가지 matrix의 효과를 줄일 수 있는 column-switching system¹⁵을 이용하여 각 아미노산을 1차 비키랄 분리(achiral separation)한 다음 분리된 각 아미노산 봉우리를 연속해서 키랄 분리(chiral separation)를 위한 컬럼으로 주입시켜 분리 정량하고자 한다. 먼저 1차 비키랄 분리 단계에서는 유리 아미노산을 C₁₈ 컬럼으로 비키랄 분리를 해서 표준물 첨가법(standard addition method)으로 정량하고자 한다. 그리고 2차 키랄 분리 단계에서는 column-switching system을 이용해서 crown ether 컬럼으로 키랄 분리가 가능한 아미노산을 선택하여 미량의 D-아미노산을 정량하고, 그 정량 분석법의 타당성을 조사하고자 한다.

2. 실험

2. 1. 기기장치

본 실험에서 사용한 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에서 펌프는 Shimadzu 10 LC Model의 펌프와 Varian LC 5000 Model의 펌프, OPA용 Eldex Lab. Inc. PCR 펌프를 사용했고 Varian LC 5000 Model의 검출기(210nm)와 형광 검출기인 Varian Fluorichrom(λ_{ex} : 340nm, λ_{em} : 455nm)를 사용했다. 적분기로는 Spectra-Physics Chromjet 적분기, 영인 적분기를 사용했다. 시료 주입은 Rheodyne 7125 injector를, 그리고 switching valve는 Rheodyne 7000을 사용했

다. 본 연구에 사용한 컬럼은 Varian Micro Pack SP C₁₈(150mm×2mm i. d., 5 μ m), Chiral Crown Ether CR(+) 컬럼을 이용했다. 이동상의 pH는 DMS digital pH/ion meter Model DP-215를 사용하여 조절하였다.

2. 2. 시약

시료로 사용한 식품은 시판되는 간장과 집에서 담근 재래식 간장, 메주, 콩 등이며 재래식 간장을 제외하고 모두 시중에서 구입하여 사용하였다. 표준물질로 이용한 각 아미노산 및 아미노산 유도체화시약(OPA)은 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용했으며 2-mercaptoethanol은 Junsei Chemical Co. Ltd에서 구입하여 사용하였다. 용매로 사용한 methanol은 Merck로부터 구입한 LC grade를 사용했으며, 추출에 사용한 acetonitrile은 1급 시약을 정제해서 사용했고, diethyl ether는 1급 시약을 그대로 사용했다. OPA 검출용액을 만들기 위해 사용된 H₃BO₃는 Merck로부터 구입하였으며, KOH는 Junsei Chemical Co. Ltd로부터 구입하여 사용하였다. 물은 1차 증류수를 ELGA Co.(U.K.)의 water purification system으로 탈이온화시켜 사용하였다.

2. 3. 아미노산 추출을 위한 식품 전처리

시중에서 구입한 간장과 콩의 아미노산을 분리하기 위해서는 각 시료의 전처리 과정이 필요하다. 간장에서 아미노산의 전처리는 간장을 10배까지 물로 묽힌 후 0.5 μ m의 membrane filter로 거르는 방법을 사용하였다.

메주와 콩에서 아미노산 전처리는 메주와 콩을 각각 분쇄한 후, 메주 6.7370g과 콩 10.1092g을 각각 물 500ml에 48시간 담가 둔 후에 유리 아미노산을 추출하기 위해 0.5 μ m의 membrane filter로 거르고 500ml의 acetonitrile을 이용하여 단백질을 제거했다. 단백질을 제거 후 다시 filter로 거르고 증발시킨 후 ethylether를 이용하여 지방을 제거하였다. 증발시켜 물에 녹이고 filter로 걸러 10ml로 용량을 조절한 후 기기적 분리를 수행했다.

2. 4. 검출을 위한 아미노산의 유도체화반응

2. 4. 1. OPA 유도체화반응

검출을 위해서는 2.5M의 H₃BO₃ 수용액에 KOH를 첨가하여 pH를 10.4로 맞추어 완충용액을 만들고, 5ml의 MeOH에 0.4g의 OPA를 녹인 후 0.3ml의 2-mercaptoethanol을 첨가한 후 준비한 완충용액에 더하여(500ml) OPA 용액을 만드는데, 이 용액은 빛에 의해 산화되므로 갈색병에 넣어 사용하였다(Fig. 1). 또한 이 유도체화반응은 2분 정도의 짧은 시간에 반응이 완결되지만 생성된 유도체화물의 안정성이 5분 정도로 상당히 떨어지므로 postcolumn detection system을 이용했다. 또한 OPA 용액은 불안정하므로 사용하기 직전에 만들었다.

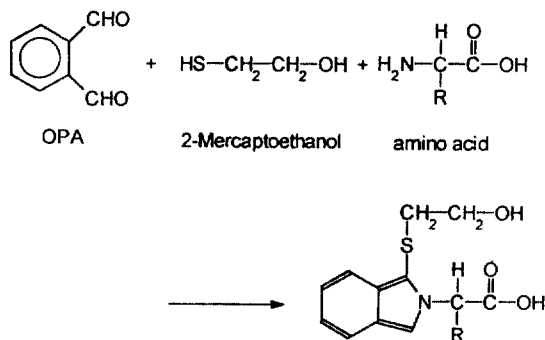


Fig. 1. OPA derivatization of amino acids

2. 4. 2. Postcolumn detection system

Postcolumn detection을 위해서 이동상(0.03M perchloric acid)을 0.6ml/min으로 일정하게 흐르게 하고 OPA 반응시약을 유속 0.5ml/min으로 일정하게 흐르게 한다. 컬럼을 통과한 용리액은 'tee'에서 OPA 반응시약과 섞여 600cm의 긴 반응 코일(0.5mm id)을 거치면서 효과적으로 유도체화된다.

2. 5. 아미노산의 정성확인 및 정량방법

아미노산을 유도체화시키지 않고 C₁₈ 컬럼으로 분리하기 때문에 대부분의 아미노산은 빨리 용출된다. C₁₈ 컬럼과 crown ether 컬럼을 연속적으로 사용하기 때문에 이동상의 조성은 유기 용매의 조성이 10%를 넘지 않게 메탄올 수용액을 사용했으며, 이동상의 유속은 1.0ml/min으로 하였다. 실제 시료에서 아미노산의 정성 확인은 시료에 표준 아미노산을 첨가했을 때 첨가된 물질의 피크가 실제로 커지는 것을 보고 확인하였

으며, 정량은 표준물 첨가법(standard addition method)으로 하였다.

2. 6. Column-switching system을 이용한 D-아미노산의 정량방법

Fig. 2는 아미노산의 거울상 이성질체를 분리하기 위한 column-switching system을 도식적으로 보여 준다.¹³ 컬럼 (I)은 C₁₈ 컬럼, 컬럼 (II)는 chiral crown ether 컬럼을 사용했는데, 컬럼 (I)에서의 이동상의 조성과 유속은 위의 2. 5절과 같으며, 컬럼 (I)에서는 여러 가지 시료 matrix로부터 유리 아미노산이 분리되어 나온다. 그리고 컬럼 (II)에서는 분리된 유리 아미노산의 거울상 이성질체가 다시 분리된다. Load 위치에서 이동상 (I)은 액체펌프 (I)에 의해 컬럼 (I)을 통과하여 검출기 (I)로 흐르게 된다. 시료를 주입하면 컬럼 (I)에서 여러 가지 시료 matrix로부터 아미노산이 분리되어 검출기 (I)에서 아미노산 봉우리가 감지되며 표준물 첨가법으로 아미노산이 정량된다.

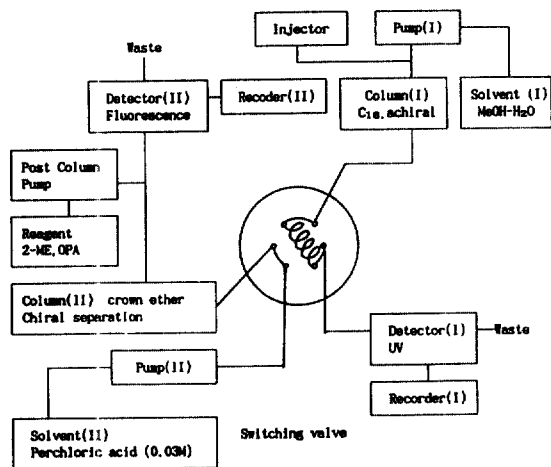


Fig. 2. Schematic diagram of column-switching system of post detection system

검출기 (I)에서 각 아미노산의 피크가 최대로 되었을 때 switching valve를 injection 위치로 switching 함으로써 컬럼 (I)에서 분리된 아미노산은 이동상 (II)에 의해 switching valve의 100 μ l 루프를 지나 컬럼 (II)로 흐르게 된다. 컬럼 (II)에서는 컬럼 (I)에서 분리된 아미노산이 각각 거울상 이성질체로 분리된다. 기록기 (II)에서 크로마토그램의 D-아미노산과 L-아

미노산의 피크 면적을 보고 % D-AA를 구하여 D-아미노산을 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 아미노산의 확인 및 정량

3. 1. 1. 아미노산의 확인

Fig. 3은 6가지 표준 유리 아미노산을 등용매 용리 (isocratic elution) 조건하에서 분리한 크로마토그램이다. 많은 아미노산을 한꺼번에 분리할 때는 주로 기울기 용리 (gradient elution)를 많이 이용하는데, 기울기 용리는 재현성이 좋지 않아서 본 실험에서는 등용매 용리로 분리하였다. 아미노산은 바탕선분리가 가능하였다. Fig. 4, 5는 실제 시료에서 추출한 아미노산을 표준 유리 아미노산과 같은 용매조건하에서 분리한 크로마토그램이다. 실제 시료에서 아미노산의 확인은 시료에 표준아미노산을 첨가했을 때 첨가된 물질의 피크가 커지는 것으로 확인하였다. 실제 시료 속에서 대부분의 아미노산이 빠른 시간에 용리되어 피크가 겹쳐 나오는 것과 phenylalanine이 분리되어 나옴을 확인할 수 있어 tryptophan은 존재하지 않음을 확인했다.

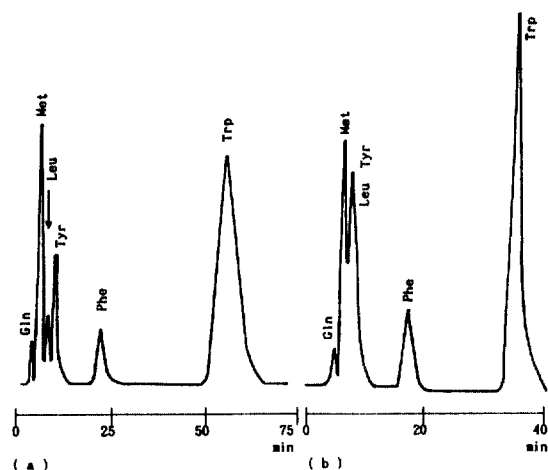


Fig. 3. Chromatograms of the standard free amino acids

Mobile phases : (a) 3% MeOH and 97% aqueous solution

(b) 10% MeOH and 90% aqueous solution

Flow rates : (a) 0.5ml/min (b) 1.0ml/min

Column : C₁₈ column

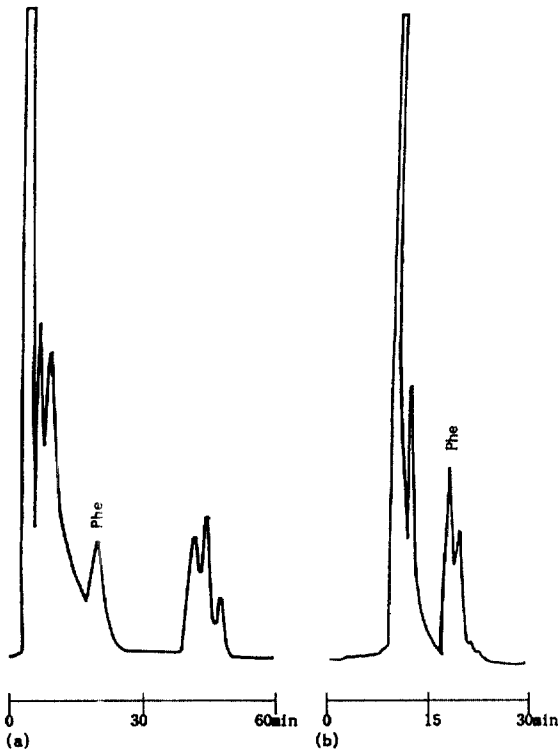


Fig. 4. Chromatograms of the phenylalanine in Food
Mobile phases : 5% MeOH and 95% aqueous solution

Samples : (a) Bean (b) Soy sauce 1

Flow rate : 1.0ml / min

Column : C₁₈ column

3. 1. 2. 머무름 시간과 피크면적의 재현성

Table 1은 표준 아미노산을 반복 주입하여 머무름 시간과 피크면적의 재현성을 살펴본 결과이다. 표준 아미노산은 각 아미노산을 1×10^{-3} M로 주입해서 결과를 얻었다. 아미노산의 머무름 시간은 편차계수(C.V)가 0.01%에서 3.22%의 범위를 가지며 평균 1.53%를 나타내었고 표준 아미노산의 피크면적은 편차계수가 0.01%에서 6.15%의 범위를 가지며 평균 2.76%를 나타냈다. 비교적 높은 수치이지만 재현성 있는 결과로 정량적 가치가 있는 것으로 생각된다.

3. 1. 3. 아미노산의 정량

Table 2는 식품에 존재하는 아미노산 중 분리 가능한 phenylalanine을 여러 가지 matrix의 효과를 고려하여 표준물 첨가법으로 정량한 값이다. 각 식품에 존재하

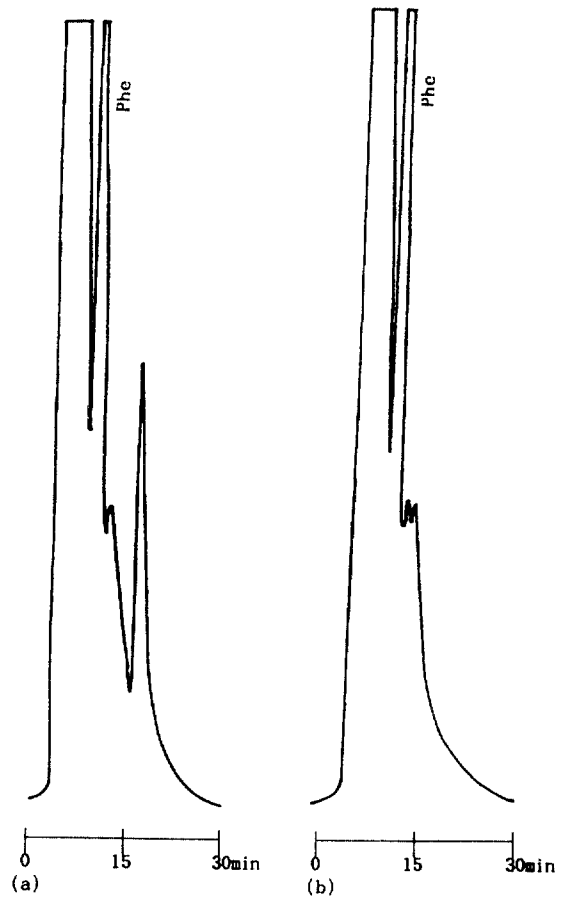


Fig. 5. Chromatograms of the phenylalanine in food
Mobile phases : 10% MeOH and 90% aqueous solution

Samples : (a) Fermented soy bean (b) Soy sauce 2

Flow rate : 1.0ml / min

Column : C₁₈ column

는 phenylalanine의 양은 시판용 간장에서 435.04ppm으로 가장 많이 검출되었으며 콩에서는 1g당 2.87mg으로 가장 적게 검출되었다. 조사한 식품 모두 콩을 주원료로 한 것이지만 제조 과정 중의 원료처리에 따라 각각 다른 값이 나왔다.

3. 1. 4. 아미노산의 회수율과 직선 감응범위

시료 전처리 과정 동안 아미노산의 손실 정도를 알아보기 위해 표준 아미노산(phenylalanine)을 0.66 mg / 100ml에서 49.56mg / 100ml 범위를 제조하여 회수율을 조사하였다. 결과를 보면 87.8%에서 102.7%의

Table 1. Reproducibility of Retention Times and Peak Area of Free Amino Acids

Amino Acids	Retention Times(N* = 3)			Peak Areas		
				Standard(N* = 3)		
	Mean (min)	S.D. (min)	C.V. (%)	Mean ($\times 10^6$)	S.D. (%)	C.V. (%)
Alanine	3.72	0.03	0.81	0.34	0.02	5.88
Threonine	3.97	0.05	0.01	0.16	0.04	6.25
Asparagine	4.09	0.12	2.93	2.06	0.01	0.49
Serine	4.16	0.09	2.17	0.60	0.02	3.33
Glutamine	4.19	0.10	2.39	0.65	0.04	6.15
Valine	4.66	0.15	3.22	0.24	0.03	4.17
Isoleucine	6.11	0.14	2.29	0.34	0.02	5.88
Methionine	6.46	0.07	1.08	0.44	0.01	0.83
Leucine	6.72	0.08	1.64	1.21	0.01	2.27
Tyrosine	7.08	0.09	1.27	10.37	0.04	0.39
Phenylalanine	12.68	0.08	0.63	29.58	0.02	0.07
Histidine	27.63	0.19	0.69	0.32	0.03	0.11
Tryptophane	32.31	0.23	0.71	364.98	0.03	0.01

* Number of data

Table 2. Reproducibility of Retention Time and Peak Area of Phenylalanine in Foods

Sample	Retention Time(N=4)			Peak Area(N=4)			Concentration
	Mean (min)	S.D. (min)	C.V. (%)	Mean ($\times 10^6$)	S.D. (%)	C.V. (%)	
St. Phe	9.82	0.07	0.00	26.63	0.15	0.00	165.20ppm
soy Sauce 1	9.47	0.24	2.51	70.13	0.52	0.00	435.04ppm
Soy Sauce 2	9.51	0.16	0.02	11.78	0.43	0.04	73.12ppm
Fermented							
Soy Bean	9.50	0.18	0.02	8.23	0.18	0.02	8.34mg / 1g
Bean	9.50	0.20	0.02	4.40	0.16	0.03	2.87mg / 1g

Fermented soy bean : 6.7370g

Bean : 10.1092g

평균 94%의 좋은 회수율을 나타냈다.'또 직선감응범위를 알아보기 위해 표준 아미노산을 0.66mg/100ml에서 132.16mg/100ml까지 만들어 조사해 보았다. 검정곡선의 결과 상관계수가 0.999의 값을 가지며 좋은 직선감응을 나타냈다. 이 실험결과로부터 이 실험방법이 실제 시료 속에 존재하는 아미노산의 정량분석에 적합하다고 생각한다. 그리고 유리 아미노산의 검출한계는 신호 대 잡음비가 2일 때로 결정하였으며,

0.0066g/100ml의 값을 나타냈다.

3. 2. Column-switching system을 이용한 D-아미노산의 정량방법

표준 유리 아미노산을 Fig. 5에 있는 용리 조건을 이용하여 비키랄 분리를 행하고 각 아미노산 봉우리의 최고점에서 column-switching하여 0.03M perchloric acid를 이동상으로 하여 crown ether 컬럼으로 키랄분

Table 3. Chromatographic Parameters of Free Amino Acids.

Amino	Acids	k'	α	Rs	Amino	Acids	k'	α	Rs
Gln	D	0.44	4.68	1.41	Tyr	D	3.76	1.52	6.47
	L	2.06				L	5.70		
Met	D	1.00	3.73	1.56	Phe	D	4.66	1.58	6.35
	L	3.73				L	7.38		
Leu	D	2.83	2.21	3.70	Trp	D	23.28	1.16	5.89
	L	6.25				L	27.06		

Mobile phases : 0.03M perchloric acid aqueous solution

Column : crown ether column(150×2.0mm i. d.)

Flow rate : 0.6ml/min

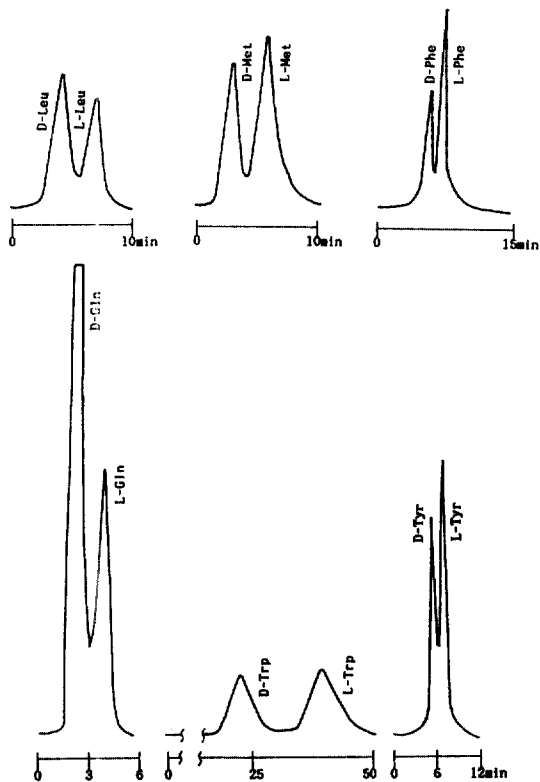


Fig. 6. Chromatogram of free amino acids by a coupled-column switching method

Mobile phase : 0.03M perchloric acid

Columns : C₁₈(150×2.0mm i. d.), crown ether column

Flow rate : 0.6ml/min.

리하였다.

그 결과가 Fig. 6과 Table 3에 나타나 있다. 모두 6개 아미노산의 분리가 가능하였는데, 그 중에서 glutamine을 제외한 다른 아미노산은 모두 Rs값이 1.5 이상인 바탕선 분리가 가능하였으므로, 실제 식품에 존재하는 미량의 D-아미노산을 상대적으로 과량인 L-아미노산으로부터 분리, 정량이 가능할 것으로 생각된다.

3. 3. 식품 속에서 D-아미노산의 분리 정량

실제 시료에 존재하는 아미노산을 표준 시료와 같은 방법으로 키랄 분리를 수행하였다. Fig. 7, 8은 실제 시료에서 얻은 크로마토그램이다. Postcolumn detection system을 통해 재래식 간장과 시판용 간장, 메주, 콩 등에서 D-phenylalanine이 들어 있는 것으로 확인되었다.

크로마토그램에 나타난 D-아미노산과 L-아미노산의 피크면적을 보고 % D-AA를 결정하여 D-아미노산을 정량하였다. 그 결과가 Table 4에 나타나 있다. 결과를 보면 시판용 간장에는 D-phenylalanine이 0.67%, 재래식 간장에는 D-phenylalanine이 0.34%가 들어 있는 것으로 나타났다. 메주와 콩에서는 각각 1.81%, 2.82% 미만이 들어 있는 것으로 나타났다. 검출이 안 된 D-아미노산이 검출기의 검출 한계보다 더 적은 양인가를 조사하기 위해 표준 아미노산을 검출이 안 된 시료에 미량 주입하여 검출 한계 %를 구했다. 시판용 간장과 재래식 간장에는 원래 들어 있는 아미

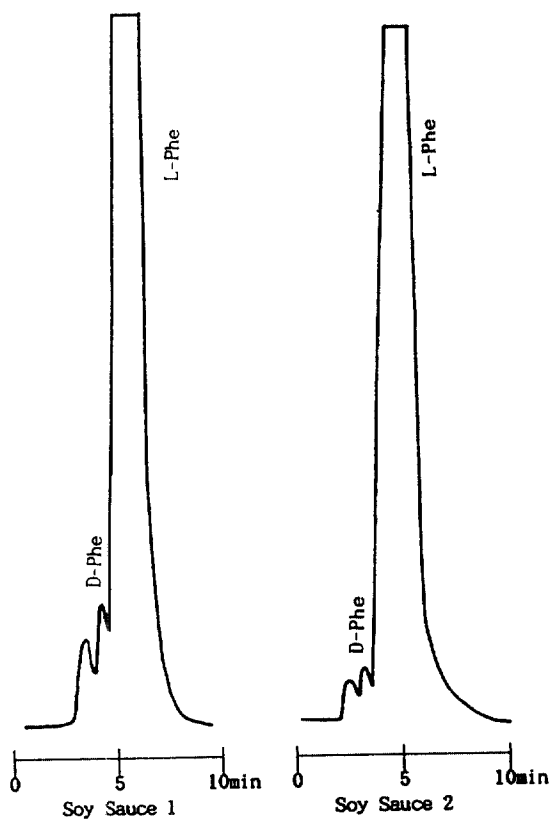


Fig. 7. Chromatogram of amino acid in soy sauce 1, 2 by a coupled-column switching method

Mobile phase : 0.03M perchloric acid

Column : crown ether column

Flow rate : 0.6ml/min

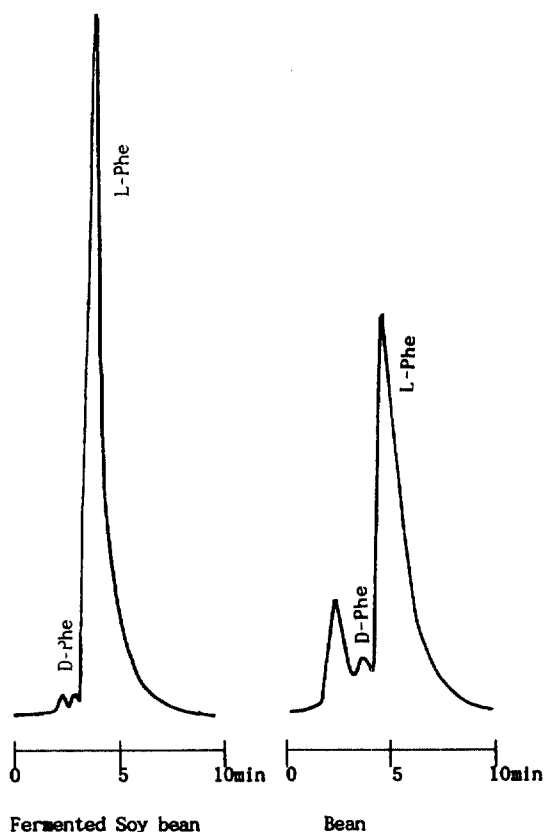


Fig. 8. Chromatogram of amino acid in fermented soy bean and bean by a coupled-column switching method

Mobile phase : 0.03M perchloric acid

Column : crown ether column

Flow rate : 0.6ml/min

노산의 양이 많기 때문에 0.2% 이상의 D-아미노산이 들어 있으면 D-아미노산의 검출이 가능하였다. 그런데 메주와 콩에는 원래 들어 있는 아미노산의 양이 비교적 작아서 이 아미노산의 농도하에서는 메주에서는 1.81% 미만에서, 콩에서는 2.82% 미만의 D-아미노산은 검출이 불가능하였다. Table 4에는 다른 연구자들이 실험한 결과도 나타나 있다. 결과를 비교해 보면 2종류의 결과가 서로 다를 뿐 아니라 콩을 주원료로 하는 식품이지만 검출되는 아미노산의 양이 차이가 많이 남을 알 수 있다. 이러한 차이가 나는 가장 큰 이유는 분석한 시료가 서로 다를 뿐 아니라 콩을 원료로 만든 식품의 제조 과정을 통한 아미노산의 추출량이 분쇄의 정도나 발효, 숙성, 열처리, 첨가한 물의 양 등에 따라 상당히 다른 결과를 가져오리라 추측된다. 또 다른 이유

로는 시료의 전처리 방법이나 유도체화 방법의 차이도 있을 수 있다고 생각한다.

4. 결론

실제 식품에 들어 있는 아미노산을 묽힘 및 탈단백질과 지방추출을 이용한 간단한 아미노산 추출방법을 이용해서 추출해 낸 다음 유리 아미노산 상태에서 C_{18} 컬럼으로 1차 비키랄 분리를 해서 표준물 첨가법으로 정량하였다. 2차 키랄 분리 단계로 column-switching system을 이용해서 chiral crown ether 컬럼을 이용한 키랄 고정상법을 통해 OPA로 유도체화하는 post-

Table 4. Content of D-amino Acid in Foods.

Food	Amino Acid	D / L Amino Acid	*% D-Amino acid	
			Sample(N ^b =4)	Data Ref.
Soy Sauce 1	Phe Trp	435.04ppm nd	0.67±0.12	*5.1% (11mg/100g)
Soy Sauce 2	Phe Trp	73.12ppm nd	0.34±0.06	
Fermented Soy Bean	Phe Trp	8.34mg/1g nd	<1.81 nd	d _
Bean	Phe Trp	2.87mg/1g nd	<2.82 nd	d _

$$*\%D-AA = D-AA / (D-AA + L-AA) \times 100$$

^b Number of data

^cData ref. was taken from ref 25.

^dData ref. was taken from ref 26.

nd : Not Detected

column detection system으로 하였다. 이동상으로 0.03M perchloric acid를 사용하여 키랄 분리하여 D-아미노산을 정량하였다.

1차 비키랄 분리 단계에서는 phenylalanine을 정량 분석할 수 있었으며 각 식품에 들어 있는 phenylalanine의 양을 살펴보면 시판용 간장에서는 242ppm, 재래식 간장에서는 102ppm, 메주에서는 1g당 8.34mg, 콩에서는 1g당 2.87mg이 들어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 메주와 콩의 전처리 방법은 각각 평균 94%의 회수율을 나타냈으며, 분석결과 나타난 각 식품에서의 L-phenylalanine 함량의 % 농도로 D-아미노산의 분석이 가능하였다. 각 값의 차이는 각 시료의 차이, 시료에 따른 제조 과정의 차이, 전처리 및 유도체화에서의 차이가 그 원인인 것으로 유추된다. 이상의 시료 외에도 식초나 녹차일 등도 시도해 보았으나 식초에서는 phenylalanine 등의 머무름 시간이 긴 아미노산이 검출되지 않았으며 녹차에서는 사용한 파장에서 흡수 matrix가 많아 검출에 어려움이 있었다. 그러나 여러 시료에서의 재현성 있는 결과로 미루어 수행된 실험법이 머무름 시간이 긴 유리 아미노산의 양을 미량 분석하기에 적합한 것으로 생각한다. 따라서 더 많은 시료에서의 적용이 가능할 것으로 생각한다. 본 실험의 결과 및 앞으로 더 많은 식품에서의 D-아미노산 연구가

활발히 이루어져 질병과의 상관관계가 임상실험 및 역학관계 조사로 밝혀져 인류의 건강증진에 도움이 되고자 하는 바램을 가져본다.

감사의 글

본 연구는 1992년 한국과학재단(KOSEF 921-0300-013-2)의 연구비 지원에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. P. D. Hoeprich, *J. Biochem.*, **240**, 1654(1965).
2. E. Timothy and B. Leakey, *J. Chromatogr.*, **507**, 199(1990).
3. P. Gerado, M. Rosangela, D. Arnaldo and C. Giuseppe., *J. Chromatogr.*, **475**, 45(1989).
4. A. Ariens, W. Soudijn and P. Timmermans, *Streochemistry and Biological Activity of Drugs*, Blackwell, Oxford, 1983.
5. F. Kogl and H. Erxleben, *J. Physiol. Chem.*, **258**, 57(1939).
6. F. Kogl, *Experientia*, **5**, 173(1949).
7. J. A. Miller, *Cancer. Res.*, **10**, 65(1950).

8. P. M. Helfman and J. L. Bada, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **72**, 2891(1975).
9. P. M. Masters and J. L. Bada, J. S. Zigler, *Nature*, **268**, 71(1977).
10. E. H. Man, M. Sandhouse, J. Burg and G. H. Fisher, *Science*, **220**, 1407(1983).
11. Y. Nagata, T. Akino, K. Ohno, Y. Kataoka, T. Ueda, T. Sakure, k. Shiroshita and T. Yasuda, *Clin. Sci.*, **73**, 105(1987).
12. Y. Nagata, R. Konno, Y. Yasmure and T. Akino, *J. Biochem.*, **257**, 291(1989).
13. R. Konno, Y. Nagata, A. Niwa and Y. Yasmura, *J. Biochem.*, **261**, 85(1989).
14. R. Konno, K. Isobe, A. Niwa and Y. Yasmura, *Metabolism*, **37**, 1139(1988).
15. D. W. Armstrong, M. Gasper, S. H. Lee, J. Zukowski and N. Ercal, *Chirality*, **5**, 375(1993).
16. G. Palla, R. Marchelli, A. Dossena and G. Casnati, *J. Chromatogr.*, **475**, 45(1989).
17. H. Y. Lee, S. H. Lee and T. S. oh, *Bull. Korean chem. Soc.*, **13**, 3(1992).
18. B. N. Jones, J. P. Gilligan, *J. Chromatogr.*, **266**, 471(1983).
19. S. K. Maifra, T. T. Yoshokawa, J. L. Hansen, E. I. Nilssen, W. J. Palin, M. C. Schota and L. B. Guze, *Clin. chem.*, (Wiston-Salen. NC), 1977.
20. R. Schuster, *Anal. Chem.*, **52**, 617(1980).
21. A. K. Rappe and W. A. Goddard III, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5115(1980).
22. R. L. Cunico and T. Schlabach, *J. Chromatogr.*, **266**, 461(1983).
23. M. K. Radjai and R. T. Hatch, *J. Chromatogr.*, **196**, 319(1980).
24. M. Roth, *Anal. Chem.*, **277**, 222(1971).
25. H. Brucker and M. Hausch, *Chromatographia*, **28**, 9-10(1989).
26. H. Brucker and M. Haucher, *Milchwissenschaft*, **45**, 357(1990).