

UFLC-MS/MS를 이용한 아미노산 분석방법 최적화

김지영 · 박재선 · 남용재 · 유은진 · 이원석 · 최성현 · 한진석 · 최종우[†]

국립환경과학원 환경기반연구부 환경측정분석센터

Optimization of Analytical Method for Amino Acids by Using UFLC-MS/MS

Ji-young Kim, Jaeseon Park, YongJae Nam, Eunjin Yoo, Won-seok Lee, Sunghun Choe, Jinseok Han and Jong-Woo Choi[†]

Environmental Measurement & Analysis Center, Environmental Infrastructure Research Department, National Institute of Environmental Research Environmental Research Complex, Incheon 404-708, Korea

Received June 18, 2012/Accepted June 29, 2012

Analytical conditions of amino acids in ground-water by using UFLC-MS/MS(ESI) were optimized for prompt and accurate analysis. Under the Edmen's method, derivatization of amino acids with PITC (phenylisothiocyanate) was performed and chromatographic separation was achieved on ODS (octadodesylsulfonate)- column with 3,400 psi. Within 10 minutes (6 min for MS collection), 21 types of amino acids were simultaneously analyzed by UFLC-MS/MS (ESI) after the selection of qualitative and quantitative ions. This method was precise with percent relative standard deviation of 2.6~13.8 % on 7 replicate analysis and accurate with percent recovery of 81.6~115.3 %. Confidence interval (CI, 3.53~4.25 mg/L). coefficient of determination (r^2 , 0.970562 (TRP)~0.999329 (VAL)), limits of detection (0.29(PRO)~1.88(ASN) mg/L (mean, 0.91 mg/L)), and limits of quantification (0.99(PRO)~6.28(ASN) mg/L (mean, 3.03 mg/L)) were obtained and proven to be a reliable method. Derivatives was relatively stable when it occurred for more than three hours under 45°C based on optimum tests. Also, it was notable that m/z 164.15 ion, reagent of derivatization under MS/MS, was identified with phenylalanine in the same time frame, indicating excessive quantity. However, when the quantitative ion was changed from m/z 164.15 to m/z 221.10, relevant result was achieved.

Key words: amino acids, UFLC-MS/MS, limit of detection, precision and accuracy

1. 서 론

생물체에는 단백질을 구성하는 약 21종의 주요 아미노산이 존재하며, nonpolar 그룹(8개), uncharged polar 그룹(9개), polar 그룹(4개)으로 구분된다. 주요 아미노산의 분자량은 89(alanine)에서 204(tryptophan)까지 이며, 등전점은 2.85(aspartic acid)에서 10.76(arginine)으로 비교적 다양하다. 아미노산의 해리상수는 $pK_1(\alpha\text{-COOH})$ 가 1.80~2.46, $pK_2(\alpha\text{-NH}_3)$ 가 8.72~10.70으로 매우 다양한 물리화학적 특성을 나타낸다.¹⁾ 아미노산의 pK_1 과 pK_2 값이 지하수 및 토양 등 환경

중의 pH 5~8 보다 작거나 크기 때문에 Henderson-Hasselbalch Equation ($\text{pH}-\text{p}K_1 = \log\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$)을 고려해 보면, 지하수 수맥 또는 용탈에 의해 이온 형태의 아미노산 이동이 가능하다. 일부에서는 이러한 아미노산의 농도와 개별 아미노산의 peak pattern을 이용하여 가축사체 매몰지 침출수 유래 오염지표로 활용하자는 제안이 있었고, 이를 위해서는 지하수 중 아미노산 분석방법의 최적화가 필요한 것으로 판단하였다. 오염된 지하수 중의 아미노산 분석에는 다양한 간섭물질의 영향이 나타날 수 있기 때문에 전처리 및 분석기기의 종류에 따라 분석의 정밀도 및 정확도의 편차가

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cjw111@korea.kr

크게 나타나므로 LC 및 GC를 이용한 분석방법이 다양하게 개발되어왔다. 특히 HPLC를 이용한 아미노산 분석은 지난 50년 전부터 개발되어져 왔으며, Moore와 Spackmann(1958)이 ninhydrine 자색 발색 반응을 적용한 아미노산 자동분석 시스템을 개발하였다. 대부분의 아미노산은 친수성으로 유기용매에는 잘 녹지 않는 성질을 가져 역상 컬럼을 사용한다. 유도체화 시약으로는 *o*-phthalaldehyde (OPA), 4-fluoro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole, 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC-Cl), 5-(dimethylamino)-naphthalene-1-sulfonylchloride (Dansyl-Cl), 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F), 6-amino-quinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC), phenylisothiocyanate (PITC) 등이 있으며, 이들은 ODS 컬럼 등을 사용한다. 다른 유도체화 시약들로 phenylhydantoin (PTH)의 경우 비공성 C14 정상 컬럼을 사용하며, 4,7-phenantroline-5,6-dione의 경우 phenyl-hexyl 컬럼을 사용하였다. ODS컬럼과 phenyl치환 컬럼의 경우 아미노산 분석시 분리능 및 민감도 측면에서 ODS가 더 유리한 것으로 보고하였다.²⁾ 최근 개발된 UFLC-MS(ultra fast liquid chromatography mass spectrometer)의 경우 GC-MS(gas chromatography mass spectrometer)보다 민감도가 약 3 배 더 높으며, 초고압 펌프를 적용함으로써 분석시간은 기존 HPLC-MS(high performance liquid chromatog-

raphy mass spectrometer) 보다 2배~10배 정도 더 빨랐다. 또한 분석시간, 피크용량, 민감도, 재현성의 결과로 볼 때 분석 효율을 획기적으로 높이는 결과를 보였다.³⁾ 대부분의 연구결과, HPLC를 이용한 아미노산의 분석시간은 약 15분에서 60분까지 다양하였으며, 최근에는 유도체화 하지 않고 아미노산을 직접 분석하는 기법이 연구 중이나, 유도체화 방법보다 측정의 민감도가 떨어지는 것으로 나타났다.⁴⁾

따라서, 본 연구에서는 짧은 시간에 다량시료 분석 및 오염원 추적을 위하여 아미노산 분석시간의 단축, 정성, 정량의 정확도 및 정밀도 등을 충분히 확보하기 위하여 PITC로 유도체화 된 아미노산을 ESI-MS/MS가 장착된 UFLC에 적용하여 다량 시료의 신속한 분석 및 21여종 아미노산의 동시분석을 위한 분석방법의 최적화 조건을 정립하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

21종의 아미노산은 Sigma-aldrich사(St Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였다. 전처리에 사용된 시약인 pyridine, triethylamine은 Fluka의 분석급 시약을 사용하였다. Acetonitrile, methanol, water (J.T. Baker, USA)는 HPLC급 용매를 사용하였다. 검정곡선

Table 1. Operating conditions of UFLC-MS/MS(ESI) for amino acids analysis

Parameter	Conditions																		
Instrument	Shimadzu UFLC-MS/MS(8030)																		
Column	Simpack XR ODS-II column (2.0 × 150 mm, 1.7 μm)																		
Mobile phase	Elute A: 5 mM Ammonium formate Elute B: Acetonitrile																		
Gradient	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A %</th> <th>B %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.5</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>5.5</td> <td>65</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>6.5</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>8.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>95</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	A %	B %	0.5	95	5	5.5	65	35	6.5	5	95	8.0	5	95	10.0	95	5
	Time (min)	A %	B %																
	0.5	95	5																
	5.5	65	35																
	6.5	5	95																
	8.0	5	95																
10.0	95	5																	
Column flow rate	1.0 mL/min																		
Injection volume	10 μL																		
Column temperature	40°C																		
Ionization mode	negative																		
DL temperature	250°C																		
Heat block temperature	400°C																		
Drying Gas flow	15 L/min																		
Nebulizer gas	3 L/min																		

작성을 위해 아미노산 표준물질을 각 200 mg/L의 농도로 하여 1N HCl에 녹여 냉장보관 하였으며, 필요시 보관용 표준용액을 단계별로 희석하여 사용하였다. 유도체화 시약인 PITC는 Thermo사의 아미노산 분석용 시약을 사용하였다.

2.2. UFLC-MS/MS(ESI) 분석조건

분석기기는 autosampler (SIL-30AC)가 장착된 Shimadzu 사의 UFLC-MS/MS (LCMS-8030)을 사용하였다. 분석 컬럼은 Shim-pack XR-ODSII 컬럼(2.0 ×150 mm, 1.7 μm)을 사용하였으며, 컬럼온도는 40°C로 등온 모드로 유지하였다.⁵⁾ 분석용매는 5 mM ammonium formate와 acetonitrile을 Table 1과 같이 농도구배를 주어 사용하였다. 이동상의 유량은 1 mL/min, 시료 주입량은 10 μL, 분석물질은 음이온 모드로 검출하였으며, MRM (multiple reaction monitoring) 방식을 사용하였다.

2.3. 전처리방법

PTC-Amino acid (phenylthiocarbonyl-amino acid derivatives) 유도체화는 PITC (MW 135.19)를 pH 9에서 아미노산을 반응시켰다.⁶⁾ 분석 대상 시료의 아미노산 농도가 낮을 경우 1 mL의 시료를 질소 농축하여 수분을 완전히 제거 후 coupling solution (acetonitrile : pyridine : triethylamine : water = 10:5:2:3) 100 μL를 넣고 섞는다. 다시 질소로 농축하고, coupling solution 100 μL와 phenylisothiocyanate(PITC) 5 μL를 함께 넣고 5분간 반응 후 질소 가스로 농축하였다. 마지막으로 5 mM ammonium formate 100 μL에 녹이고 0.2 μm hydrophilic PTFE 필터로 걸러 분석에 사용하였다. 유도체화가 완료된 시료는 3시간 이내에 분석을 시작하였다.

2.4. 검정곡선 작성

검정곡선은 21종 아미노산을 각 200 mg/L의 고농도의 표준원액을 조제하여 분석에 이용하였다. 매 분석시 표준원액을 희석하여 4, 8, 12, 16, 20 mg/L의 검정곡선을 작성하고, 경우에 따라 이하 또는 이상의 농도를 만들어 사용하였으며, 분석 바탕시료와 전처리 바탕시료를 처리하였다.

2.5. QA/QC

아미노산 21종의 예상 검출한계인 아미노산 각 4

mg/L의 용액을 7번 조제하여 측정된 결과로부터 표준편차를 구하고 %RSD를 구하였다. 검출한계는(LOD) 3s/slope, 정량한계(LOQ)는 10s/slope로 정하였고⁷⁾, 분석의 신뢰구간(CI)은 95% 신뢰수준에서 얻어졌다.

3. 결과 및 고찰

3.1. UFLC 및 MSMS 분석조건

아미노산 표준용액을 PITC (MW:135.19)로 유도체화 후, ESI 음이온 모드로 검출하였다. collision energy는 10~25 V까지 주었으며, MS에서 스캔모드로 분석하여 PTC-아미노산을 기준이온으로 잡아 precursor ion으로 선택하고, product ion을 스캔하여 각기 특징적으로 나타난 이온을 정성이온으로 선택하였다. 각 이온의 MS 수집 전환시간(pause time)은 3 msec, 데이터 수집시간(dwel time)은 10 msec를 주었다. 그 결과 MS의 분석시간은 5.2분 이내로 수집이 끝나고, 컬럼과 MS의 세척을 위해 LC 동작시간을 더하여 한개 시료당 총 10분 이내로 분석을 수행할 수 있었다. 라이신을 제외한 모든 아미노산은 PITC 1분자만 결합하였으나, 라이신의 경우 2개의 아민기에 2분자의 PITC가 결합하여 precursor ion이 m/z 415에 검출되었으며, 머무름 시간을 확인해도 가장 나중에 용출되는 것으로 나타났다. 21종의 아미노산은 Table 2와 같은 순서로 용리되었다. 처음으로 아스파르트산(ASP)이 0.72분에 라이신(LYS)이 가장 마지막으로 5.066분에 검출되었다. 초기 HPLC를 이용한 아미노산의 분석은 UV detector를 이용한 연구가 대부분이었다. Dube 등(2006)⁸⁾은 silk sericine 단백질 내의 아미노산을 PITC로 유도체화 하여 13종 아미노산을 10분 이내로 분석하였다. 그러나 UV detection의 정량한계가 높고, baseline이 불안정하여, MS 또는 MS/MS를 이용한 분석방법이 점차 개발되었다. Dietzen 등(2008)⁹⁾은 32종의 아미노산을 HPLC-MS/MS를 이용하여 20분 이내로 분석하였으며, Shimbo 등(2009)¹⁰⁾은 22종의 아미노산을 HPLC-MS/MS(ESI)를 이용하여 6.5분(총 12분) 이내로 단축하였다. 본 연구에서는 PITC로 유도체화 된 21종 아미노산을 5.2분(10분) 이내로 비교적 신속히 분석결과를 얻을 수 있었다.

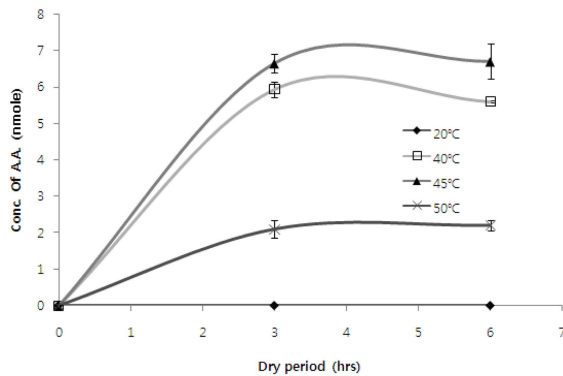
3.2. 유도체화 반응조건

PTC-아미노산 유도체화 시, 반응 온도에 따른 영향을 보기 위해 4단계의 온도 단계(20, 40, 45, 50°C)와 2, 3, 6시간으로 구분하고, 21종의 아미노산별로 0.196

Table 2. Parameters of UFLC-MS/MS in MRM mode for amino acids analysis

Event	Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Retention Time (min)	Q1 Pre Bias (V)	Collision Energy (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	ASP (Aspartic acid)	267	132	0.720	18	15	25
2	GLU (Glutamic acid)	281	146	0.818	19	15	14
3	ASN (Asparagine)	266	131	1.833	19	15	25
4	SER (Serine)	239	104	1.886	16	15	20
5	GLY (Glycine)	209	175	2.000	15	10	11
6	HIS (Histidine)	289	154	2.174	20	15	15
7	THR (Threonine)	253	118	2.444	17	15	23
8	ARG (Arginine)	308	173	2.485	22	15	17
9	ALA (Alanine)	223	189	2.525	15	10	20
10	PRO (Proline)	249	114	2.651	17	15	23
11	TYR (Tyrosine)	315	180	3.400	22	15	11
12	H-PRO (Hydroxy-Proline)	265	130	3.535	19	15	27
13	VAL (Valine)	251	217	3.627	18	10	25
14	MET (Methionine)	283	249	3.800	19	10	17
15	GLN (Glutamine)	282	146	4.103	19	15	14
16	CYS (Cysteine)	281	146	4.105	19	10	15
17	ILE (Isoleucine)	265	231	4.268	19	10	26
18	LEU (Leucine)	265	231	4.332	19	10	26
19	PHE (Phenylalanine)	299	221	4.668	21	20	23
20	TRP (Tryptophan)	338	203	4.791	24	15	21
21	LYS (Lysine)	415	280	5.066	30	10	19

(TRP)~0.533(GLY) nmole (총 6.475 nmole)에 PITC 16.69 μ mole을 처리하여 유도체화 효율을 시험하였다. 20°C에서는 10시간이 지나도 유도체화 시약이 완전히 건고되지 않아 반응을 종료하였으며, 40°C 이상의 온도에서는 시료 수에 상관없이 3시간 이내로 완전히 건고되었고 4시간과 6시간 건고시간을 연장하여도 유도체화 효율은 비슷한 수준이었다. 45°C를 기준으로 40, 50°C조건으로 3시간 이상 유도체화 시켰을 경우 효율

**Fig. 1.** Efficiencies of derivatization of amino acid with PITC by different temperature.

은 각각 89.3, 31.7%로 나타났다. 따라서 40 \pm 2°C일 때 비교적 안정적이고 높은 효율을 얻을 수 있었다.

3.3. 바탕시료 검정

방법 바탕시료에서 아미노산을 넣지 않고 증류수로 확인한 결과, 페닐알라닌의 머무름 시간에서 선택이온인 m/z 164 피크가 확인되어, 결과적으로 페닐알라닌이 과다 산정되는 결과를 초래하였다. 이의 원인은 PITC 전처리 과정 중 생기는 물질 혹은 잔여물질이 동일한 머무름 시간에 나타나는 것으로 확인되어 m/z 164 대신에 m/z 221.1이온을 선택하여 정량한 결과, 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다.

3.4. 이미노산별 분리능

PITC로 유도체화 된 21종의 아미노산은 대부분 양호한 분리능을 나타내었으나, 이중 이성질체인 이소류신(MW:131.18)과 류신(MW:131.18)은 구조이성질체로 분자량이 같고, 기타 물성이 유사하며, MS 분석시 product ion의 m/z차이가 거의 나지 않아 피크의 겹침 현상이 나타났다. 이소류신과 류신을 분리하기 위해서는 HILIC (hydrophilic interaction chromatography)

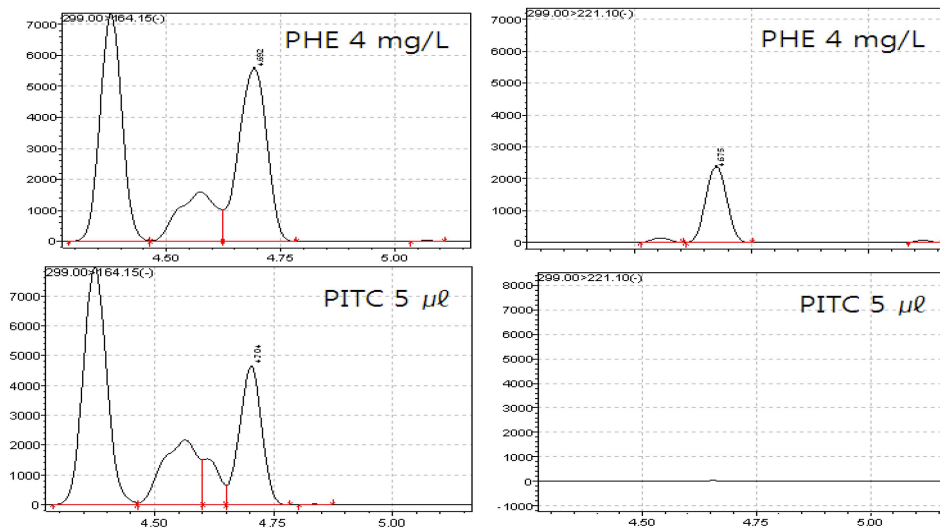


Fig. 2. Chromatograms of Phenylalanine and Phenylisothiocyanate (left : 164.15(-), right : 221.10(-)).

을 이용하거나, 용리액의 조성을 변화시켜 분석시간을 길게 주어 분리하는 방법이 적용되었으나¹¹⁾, 이는 역상 컬럼을 사용하였을 때보다 재현성이 낮았고, 컬럼의 평형 도달 시간이 길어지는 현상을 보였다.¹²⁾

본 연구에서는 PTC-아미노산 유도체화한 후 역상컬럼(ODS-II)을 이용하여 분리한 결과, 이소류신은 4.268 분과 류신 4.332분에 분리되었고, 피크 폭이 각 0.095, 0.099로 피크 분리요소인 R(USP resolution factor)값

이 0.656으로 나타나 완전한 분리(R값 = 1.5)에 미치지 못하는 것으로 나타났다. 다만, Standard Method (2005)¹³⁾에 따르면 유기물질 분석시 구조이성질체의 경우, 이성질체 물질 피크 높이 합의 25%에 해당하는 값이 피크 사이의 계곡 높이보다 낮을 경우 그 분리도를 인정(AR; acceptable resolution)하고 있다. 본 실험에서 얻은 ILE과 LEU의 AR값은 25.4%로 AR 값 기준 25%과 유사한 수준으로 계산되어 양 피크가 바탕

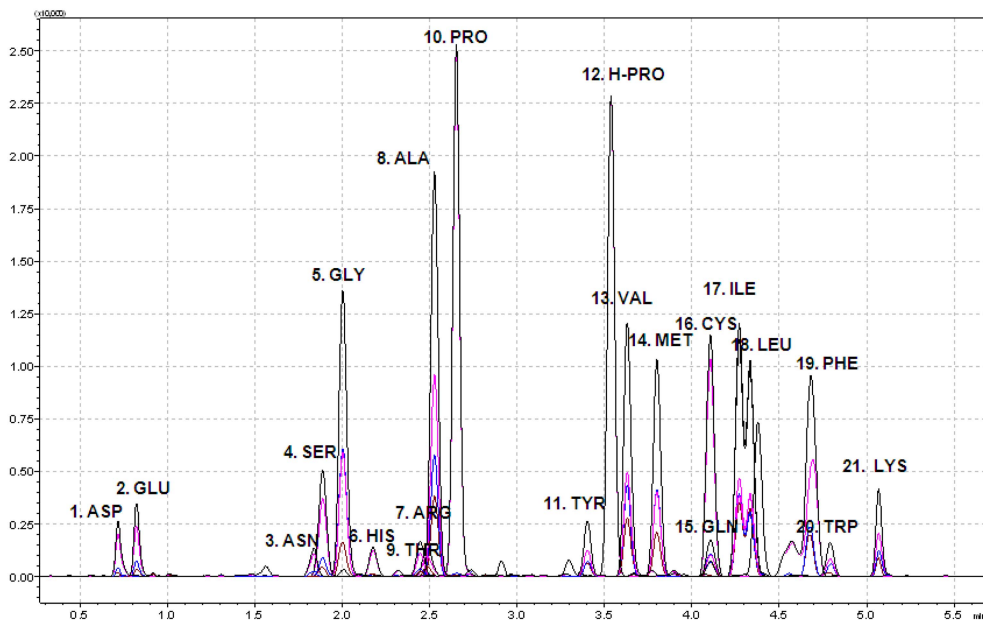


Fig. 3. Chromatogram of UFLC-MS/MS separation for 21 PTC-amino acids.

선으로 부터 분리된 것으로 간주할 수 있었다.

3.5. 분석민감도

21종 아미노산을 동시에 분석할 때 각 아미노산의 용리 순서와 민감도는 각기 큰 차이를 보였다. 가장 낮은 시그널을 보인 글루타민은 가장 큰 시그널 값을 보인 프롤린과 비교하여 최대 100배 이상 차이를 나타내었다. 아미노산마다 분자량, PITC와 결합한 구조, 방향족 아미노산(페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘, 프롤린, 타이로신)과 같은 구조적인 차이, 그리고 각기 아미노산의 극성/비극성 및 산성/염기성 특성에 따라 머무를 순서 및 감도에 영향을 미친 것으로 평가 할 수 있다.

3.6. 검정곡선 및 정밀/정확도

검정곡선은 4, 8, 12, 16, 20 mg/L으로 나누어 작성하였으며, 결정계수(R²)는 TRP에서 최소 0.97056, 아스파라긴(ASN)에서 최대 값인 0.99926으로 양호하게 나타났으나, 물질에 따라 선형성은 조금씩 다르게 나타났다. 검정곡선의 기울기는 LOD (limit of detection), LOQ (limit of Quantitation)를 구할 때 사용하였다.

정확도/정밀도 확인에 사용된 시료 반복수(n)는 7시료에 대하여 전처리 후 분석하였으며 농도는 각 아미노산 4.0 mg/L로 하였다. 분석결과에 대한 정량은 Lab solution (Shmiadzu, Japan)프로그램을 이용하였다. 회수율은 81.6 (ARG)~115.3 (MET)%로 양호하게 나타났으며, 상대표준편차도 유사한 결과를 나타내었다. 분석결과의 신뢰구간은 95% 신뢰도일 때 평균 3.53~4.25 mg/L로 양호한 결과를 나타냈다. 본 결과는 전처리 방법을 포함한 검출한계 및 정량한계이며, 기기의 정밀도를 별도 분석한 결과 상대표준편차가 0.5% 미만으로 나타나 동일한 시료의 반복 분석에 따른 오류는 매우 작은 것으로 나타났다. 정량 및 정성 한계는 프롤린이 가장 민감한 검출한계(0.297 mg/L)와 정량한계(0.991 mg/L)를 나타냈으며, 아스파라긴이 가장 둔감한 검출한계(1.885 mg/L)과 정량한계(6.283 mg/L) 값을 보였다.

4. 결 론

지하수 및 토양에 누출 가능성이 있는 가축 사체 매

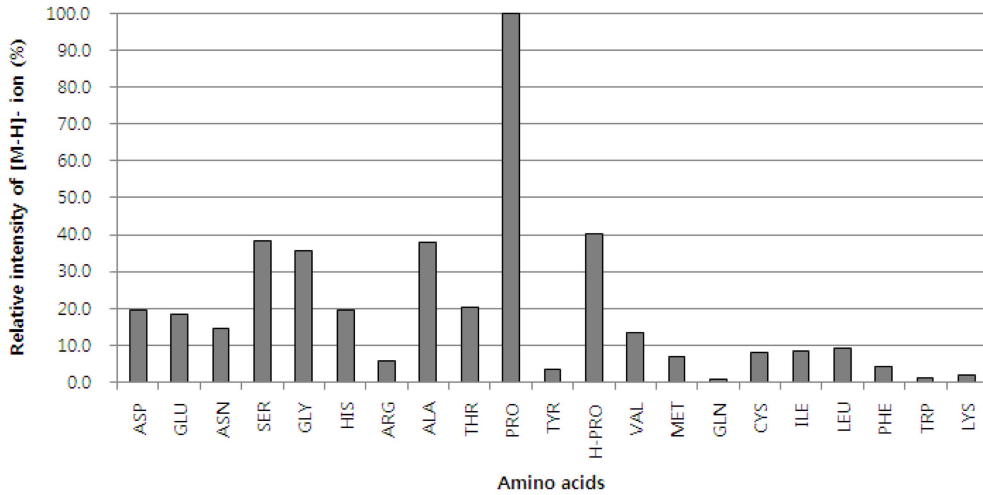


Fig. 4. Comparison of MS response by different amino acids.

Table 3. Coefficients of determination and slopes of calibration curves for quantitative analysis of amino acids

A. A.	ASP	GLU	ASN	SER	GLY	HIS	ARG	ALA	THR	PRO	
R ²	0.99832	0.99282	0.99926	0.99819	0.99281	0.99396	0.98231	0.99609	0.99431	0.99715	
Slope	7408.65	6885.86	5465.71	14483.8	13477.6	7385.92	2201.18	14426	7658.4	37939.2	
A. A.	TYR	H-PRO	VAL	MET	GLN	CYS	ILE	LEU	PHE	TRP	LYS
R ²	0.99504	0.99820	0.99933	0.99919	0.97374	0.99866	0.98375	0.99801	0.98660	0.97056	0.99805
Slope	1328.58	15230.2	5064.75	2620.98	316.269	2962.82	3180.62	3468.96	1509.73	369.732	640.071

Table 4. The accuracy and precision for 21 amino acid analysis by using UFLC-(ESI)MS/MS

AMINO ACID	Ave. (mg/L)	STDEV. (mg/L)	%RSD	Recovery (%)	Confidence Interval (mg/L)		LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
					+	-		
ASP	3.816	0.259	6.8	104.8	3.508	4.124	0.778	2.593
GLU	3.713	0.251	6.7	107.7	3.415	4.011	0.752	2.506
ASN	4.661	0.628	13.5	85.8	3.914	5.407	1.885	6.283
SER	3.624	0.200	5.5	110.4	3.386	3.861	0.600	2.000
GLY	3.713	0.279	7.5	107.7	3.382	4.045	0.837	2.791
HIS	3.535	0.313	8.9	113.2	3.163	3.907	0.939	3.131
ARG	4.902	0.372	7.6	81.6	4.460	5.343	1.115	3.716
ALA	4.017	0.191	4.7	99.6	3.790	4.243	0.572	1.907
THR	3.731	0.224	6.0	107.2	3.465	3.997	0.672	2.241
PRO	3.885	0.099	2.6	103.0	3.767	4.003	0.297	0.991
TYR	3.824	0.232	6.1	104.6	3.549	4.100	0.696	2.319
H-PRO	4.159	0.100	2.4	96.2	4.040	4.278	0.300	0.998
VAL	4.446	0.264	5.9	90.0	4.133	4.759	0.791	2.636
MET	3.469	0.440	12.7	115.3	2.947	3.991	1.319	4.396
GLN	3.722	0.236	6.4	107.5	3.441	4.003	0.709	2.364
CYS	3.629	0.131	3.6	110.2	3.474	3.784	0.392	1.307
ILE	3.590	0.326	9.1	111.4	3.203	3.977	0.977	3.256
LEU	3.607	0.541	15.0	110.9	2.964	4.249	1.622	5.407
PHE	3.909	0.493	12.6	102.3	3.324	4.495	1.479	4.929
TRP	3.903	0.240	6.2	102.5	3.618	4.189	0.721	2.403
LYS	3.919	0.543	13.8	102.1	3.275	4.564	1.628	5.426
Mean.					3.53	4.25	0.91	3.03

*%RSD = (STDEV/mean value) × 100

*Recovery(%) = (measured value/calculated value)*100

*Confidence Interval = mean + t value(n-1, 95%) × SD/root n

*LOD(Limit of detection = 3 × STDEV/slope)

*LOQ(Limit of quantitation = 10 × STDEV/slope)

립지 침출수의 오염원 추적에 활용하기 위하여, UFLC(ESI)-MS/MS를 이용한 신속하고 정확한 아미노산 분석방법을 최적화하였다.

현장시료 분석 시 매트릭스의 영향을 줄이고자 유도체화를 이용하여 아미노산의 선택적인 분석이 가능하게 하였으며, 21종 아미노산의 동시분석을 위해 각 물질별로 최적의 정량이온을 선택하였다. 확립된 분석 방법으로 분석한 결과, 21종 아미노산의 순수 분석시간은 총 6분 이내였고, 각 아미노산의 검정곡선은 r^2 가 0.97056(TRP)~0.99832(ASP)로 매우 양호한 직선성을 보였으며, 정확도는 회수율로서 81.6(ARG)~115.3(MET)%, 정밀도는 상대표준편차로서 2.6(PRO)~15.0(LEU)% 수준이었다. 검출한계 및 정량한계는 7번 반복 측정의 3s와 10s로 제시하였으며 검출한계는 0.2~1.8 mg/L 수준이었다. 이 결과를 지하수 또는 침출수에 직접 적용할 경우 검출한계가 낮기 때문에 지하수 시료의 경우

농축이 필요할 것으로 보이고, 이에 대해서는 질소기체를 이용한 농축을 통하여 1/100 수준으로 검출한계를 낮출 수 있을 것이며, 예비실험을 통하여 확인한 바 있으나 다음 논문에서 자세히 다루고자 한다. 따라서, 본 연구에서 확립한 21종 아미노산의 연속분석 방법은 지하수 중 아미노산별 존재비 특성(peak pattern)을 이용한 질산성 질소 오염원 추적 연구에 매우 유용하게 활용될 수 있다고 본다.

5. 참고문헌

1. Merck Index, 1989, 11th ed. Merck & Co., Inc. Rahway, N.J. USA.
2. T. Cserhati, Chromatography of amino acid and short peptides. New advances, *Biomed. Chromatogr.* 2008, 21, 780-796.

3. X. Wang, H. Sun, A. Zhang, P. Wang and Y. Han, Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry as a sensitive and powerful technology for metabolomic studies, *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 3451-3459.
4. M. Piraud C. Vianey-Saban, K. Petritis, C. Elfakir, J. P. Steghens, A. Morla and D. Bouchu, ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative ionisation mode, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2003, 17, 1297-1311.
5. R. Checa-Moreno, E. Manzano, G. Miron and L. F. Captan-Vallvey, Revisitation of the phenylisothiocyanate-derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV, *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 3817-3828
6. R. L. Heinrikson and S. C. Meredith, Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography : Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate, *Anal. Biochem.* 1984, 136, 65-74.
7. G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney, Vogel's Textbook of quantitative chemical analysis, 1989, 5th Ed. Ch. 4, 127-149.
8. S. Dube, M. T. Khumalo, N. Torto and Jacob A. Nyati, Characterization of amino acids in silk sericin protein from *Gonometa rufobrunnae* by MEKC with phenylisothiocyanate derivatization, *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 1245-1250.
9. D. J. Dietzen, A. L. Weinedel, M. O Carayannopoulos, M. Landt, E. T. Normansell, T. E. Reimschisel and C. H. Smith, Rapid comprehensive amino acid analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: comparison to cation exchange with post-column ninhydrin detection, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, 22, 3481-3488.
10. K. Shimbo, T. Oonuki, A. Yahashi, K. Hirayama and H. Miyano, Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, 23, 1438-1492.
11. Z. Liu, P. E. Minkler, D. Lin and L. M. Sayre, Derivatization of amino acids with *N,N*-dimethyl-2,4-dinitro-5-fluorobenzylamine for liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 1059-1065.
12. S. Inagaki, Y. Tano, Y. Yamakata, T. Higashih, J. Z. Min and T. Toyooka, Highly sensitive and positively charged precolumn derivatization reagent for amines and amino acids in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, 24, 1358-1364.
13. Standard Method for water and wastewater, 2005. 21th Ed. Ch.6. 6-78.