



## 제목 : 가축사료중 총 아미노산 분석

### 1. 개요

본 자료에서는 가축사료중 함유된 아미노산 분석에 대해 소개합니다.

#### 1) 분석 대상 아미노산

Alanine, Arginine, Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Isoleucine, Lysine  
Phenylalanine, Proline, Serine, Threonine, Tyrosine, Valine

#### 2) 제외 성분

Cysteine, Methionine, Tryptophane

### 2. 기본 원리

6N HCl을 사용하여 가수분해 한 후 ion-exchange HPLC 방법으로 아미노산을 분리하고 ninhydrin 을 이용한 post column 유도체화법으로 정량한다.

가축사료의 가수분해 과정은 아미노산의 peptide 결합을 깨기 위한 과정으로 아미노산의 산화를 방지하기 위해 Phenol을 HCl에 첨가한다. 가수분해 과정은 110 °C에서 24시간동안 진행한다.

Cysteine과 Methionine은 분석 크로마토그램상에 분리 검출되나 가수분해 과정중 부분적으로 산화 되기 때문에 본 방법으로는 정확한 정량을 할 수 없다.

가수분해 후 filtering 과정을 거치고, HCl을 제거하기 위해 증발건조 시킨다. 고온에서의 증발건조는 아미노산의 분해가 발생할 수 있으므로 주의하여야 하고 pH 2.0 이하의 산성에서는 Aspartic acid, Threonine, Serine 등에 분해능 문제가 발생할 수 있으므로 잔존 HCl을 제거하여야 한다.

증발건조한 가수분해 산물은 pH 2.2의 citrate buffer용액에 용해 후 micro membrane filter 로 filter하고 -10 °C이하에서 보관한다.

Ion exchange column을 사용한 HPLC gradient 조건에서 각각의 아미노산은 분리되며, 이 때의 gradient 조건은 sodium buffer용액의 pH와 양이온 농도를 점차적으로 증가시킨다.

용리 순서는 산성 아미노산이 가장 먼저 용리되고, 그 다음에 중성, 알칼리성 순서로 나온다.

분리된 아미노산은 ninhydrin 용액과 반응하여 유도체화 되는데 1차 아미노산은 570 nm에서, 2차 아미노산은 440 nm에서 최대 흡광을 갖는 유도체화 산물이 생성된다.

전체 분석과정에서 주의할 사항은 인체 피부가 함유하고 있는 아미노산 그룹이 쉽게 반응할 수 있으므로 전처리 과정중 직접 손으로 접촉하는 것을 피하여야 한다.

### 3. 사용 Reagent

- Glass Distilled Water
- 6 N Hydrochloric acid(0.1% phenol 함유)
- Sodium diluent(pH 2.2)
- Sodium diluent(pH 3.15)
- Sodium diluent(pH 7.40)
- Sodium Regenerate
- Ninhydrin reagent





## APPLICATION NOTE

### 4. 실험 절차

#### 1) 가수 분해

- 시료를 가루 형태로 잘 간 후 0.5g을 칭량하여 250mL 둥근 flask에 옮긴다.
- 0.1% phenol을 함유하는 6N HCl 100 mL를 가한다.
- Flask를 용축기에 연결하고 미리 가열된 sandbath에 위치시킨 후 110-120 °C에서 24시간 동안 유지한다.
- Flask를 분리한 후 50mL 비이커를 뒤집어 덮고 HCl 증기가 더 이상 발생하지 않을 때까지 냉각한다.
- Norleucine Internal Standard 1.0mL를 flask에 가한다.
- 가수분해 산물은 Whatman #1 filter paper를 통과시켜 250mL vol flask로 옮긴다.
- Flask와 filter는 distilled water로 세척하여 합친다.
- Vol flask의 눈금선까지 H<sub>2</sub>O로 맞춘다.
- 위 용액 10 mL를 취하여 100 mL 둥근 flask에 옮긴다.
- Rotary vacuum evaporator를 사용하여 증발 건조시키며, 이때 온도는 60 °C를 유지한다.
- Flask 내벽을 distilled water로 세척하고 다시 증발 건조시킨다.
- Na diluent pH 2.2를 5.0 mL 취하여 flask에 가한다. 가수분해 잔존물을 잘 녹여낸 후 덮개를 덮어 5분간 정지한다.
- Syringe micropore filter를 사용하여 filter한다.
- Sample vial을 밀봉 및 label 후 보관한다.

#### 2) 기기 분석

위 절차에 따라 준비한 최종 시료를 아래 분석조건에 따라 분석한다.

- Flow Rate : 0.4 mL/min
- Column temperature : 55 °C
- Reactor temperature : 130 °C
- Wavelength : 500 nm
- Injection volume : 20 uL
- Gradient program

| Time (minutes) | % Na citrate Buffer<br>pH 3.15 | % Na acetate Buffer<br>pH 7.50 | % NaOH regenerate |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| 0.0            | 100                            | 0                              | 0                 |
| 10.0           | 100                            | 0                              | 0                 |
| 34.0           | 0                              | 100                            | 0                 |
| 53.0           | 0                              | 100                            | 0                 |
| 53.1           | 0                              | 0                              | 100               |
| 55.0           | 0                              | 0                              | 100               |
| 55.1           | 100                            | 0                              | 0                 |
| 75.0           | 100                            | 0                              | 0                 |

