

잎담배중 아미노산의 자동분석법

김 신 일 · 황 전 중 · 김 찬 호

한국인삼연초연구소 분석연구실

Automatic Determination of Total Amino Acid in Tobacco Leaf

Sin-Il Kim, Keon-Joong Hwang, Chan-Ho Kim

Lab. of Analysis

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute,

Seoul, Korea

(Received for Publication, August 31, 1982)

ABSTRACT

An automatic method for the determination of total amino acid in tobacco was studied.

This method makes use of the reaction of 2, 4, 6-Trinitrobenzene sulfonate with amino acid.

Results obtained with this simple and rapid method agreed with those obtained with the official method.

서 론

아미노산의 분석방법중 Van Slyke (7) 방법은 1급 아민과 아질산이 반응하여 질소가스를 생성하는 반응을 이용한 것으로, 이 방법은 장치가 복잡하고 분석시간이 오래걸리는 불편한 점이 있을 뿐만 아니라 암모니아, 질소화합물이 함유된 시료에서는 이들 물질이 함께 검출되는 문제점이 있다.

아미노산과 Ninhydrine 의 반응을 이용한 흡수분광도법이 있지만 실제 담배 시료에 적용할 때에는 담배중에 함유하고 있는 아미노산외의 다른 질소화합물이 아미노산 분석값에 영향을 미치고 있음을 Spies (6) 가 이미 보고하고 있다.

P. F. Colline 등 (2) 은 아미노산과 Ninhydrine 을 반응시켜 발생하는 탄산가스를 정량적으로 포집하여 흡수분광도법으로 분석하고자 하였으나 공

기중의 탄산가스를 완전히 차단해야하는 어려움이 있으며, 담배와 같이 시료가 천연물 일때에는 시료로부터 아미노산을 추출하는 것과 같은 전조작에 장기간이 소요되는 단점이 있다.

D. W. Palmer 등 (5) 은 혈장중에 함유된 아미노산을 2, 4, 6-Trinitro benzene sulfonate (TNBS)와 반응시켜서 전조작의 시간을 단축하고, 측정방법에 있어서도 분석적 재현성을 높이고자 하였다. 본 연구는 D. W. Palmer 등이 혈장에 적용한 방법을 천연물인 담배 시료에 적용할 수 있도록 조작을 개선하고 또 여러개의 시료를 연속적으로 자동분석 장치에 의해 분석할 수 있도록 새로운 Catridge 를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

시료: 일담배는 1982년에 한국인삼연구소 대구시험장에서 재배한 향초, 소향과 1982년도에 수입한 Basma, Izmir, 그리고 1981년도에 충주 및 예산지방에서 재배한 황색종과 Burley 종을 선별하여 지름 1mm 이하로 분쇄하고 80±2℃에서 3시간 건조시킨 다음 분석시료로 사용하였다.

장치

자동화 장치는 자동분석기 Technicon Type II에 그림 1과 같은 Cartridge를 사용하였으며 물중탕 진탕기는 Gyrotory Water Bath Shaker Model G76을 사용하였다.

시약

1) Carbonate/Bicarbonate 혼합용액 : Sodium carbonate (Na₂CO₃, WAKO, 일급) 5.3g과 Sodium bicarbonate (Na₂HCO₃, WAKO, 일급) 4.2g을 물 1ℓ에 용해시키고 Brij-35 용액 1ml로 첨가하여 사용.

2) Acetate buffer 용액 (PH 4.4) : 3.28g의 Sodium acetate (CH₃COONa·3H₂O, SHZMA-KYS, 일급)를 800ml의 물에 용해시킨 다음 4M Acetic acid를 14.2ml 첨가하여 잘 저은 다음 1ml Brij-35 (30% 용액, 계면활성제)를 첨가하여 사용한다.

3) Trinitro benzene sulfonic acid (TNBS) 0.04% 용액 : 80mg의 TNBS [(NO₂)₃C₆H₂SO₃H·3H₂O, Tokyo Kasei, 특급]를 200ml의 물에 용해시켜 사용한다.

4) 시료 추출용액 : Sodium acetate 3.28g을 800ml의 물에 용해시키고 여기에 14.2ml의 4M Acetic acid를 첨가한 후 전체 용량이 1ℓ가 되도록 물을 가한 후 사용한다.

5) 아미노산 표준용액 : 1.0439g의 L-Glutamine (WAKO, 특급)을 추출용액 100ml에 용해하고 (질소로 1mg/ml) 이 용액을 가지고 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1mg 질소/ml이 되도록 희석하여 아미노산 표준용액으로 사용하였다.

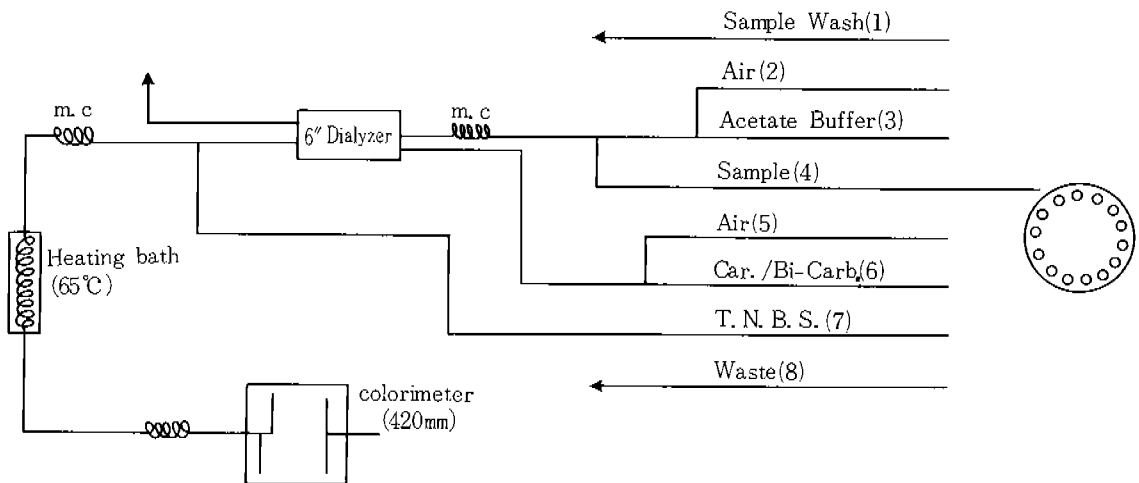


Fig. 1. Flow diagram for determination of total amino acid.

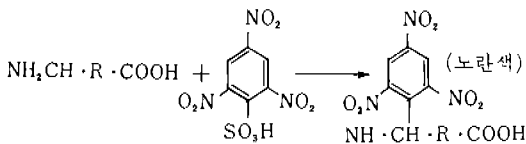
- 1) Pump tube (2.00ml/min)
 - 2) Pump tube (0.32 ml/min)
 - 3) Pump tube (1.40 ml/min)
 - 4) Pump tube (0.32 ml/min)
 - 5) Pump tube (0.32 ml/min)
 - 6) Pump tube (1.60 ml/min)
 - 7) Pump tube (0.23 ml/min)
 - 8) Pump tube (0.80 ml/min)
- m. c. : mixing coil

조작

1) 전처리 조작 : 시료 2g을 정확히 취하여 250ml 삼각플라스크에 넣고 환성탄분말(WAKO, 특급) 1g을 가한다음 시료 추출용액을 정확히 100ml 가하고 물중탕진탕기에 넣고 50°C 로 항온이 된 상태에서 1시간 30분간 진탕한 다음 거름 종이로 거른다. 거른액을 자동분석기의 시료용기에 옮긴다.

2) 자동분석기에 의한 조작 : 자동분석기의 시약과 시료용액 공급관을 Brij-35를 가한 물로 공급펌프를 작동시켜 30분 이상 씻은 다음 흡광도기와 기록기를 작동시킨다.

시료공급장치에는 아미노산 표준용액과 시료용액을 순서대로 놓고 그림 1에서와 같이 공급관과 시약을 준비한 다음 약 10분후에 표준용액과 시료용액을 차례로 관에 주입시킨다. 주입된 시료용액은 투석기를 통하여 투석되고, 투석된 용액은 Carbonate/bicarbonate 용액과 혼합되며, 알카리에서 TNBS와 반응하여 노란색을 나타낸다. 이때의 반응식은 다음과 같다.



약 20분 정도 경과하면 시료공급장치에 준비한 순서대로 기록기에 기록이 되는데 표준용액으로 구한 기록 내용으로 농도에 따른 검량선을 작성하고 이 검량선을 기준으로 각 시료중의 전 아미노산의 양을 다음 식으로 계산하여 구한다.

전 아미노산(%) =

$$\frac{\text{검량선에 구한 시료중의 아미노산 (mg/ml)}}{\text{시 료 (mg)}} \times 100 \times 100$$

결과 및 고찰

D. W. Palmer 등의 연구보고(5)에 의하면 아미노산과 2, 4, 6 - Trinitro benzene sulfonate와의 반응으로 생성되는 색의 흡수극대 파장은 420mm였다. 이 연구에서는 L- Glutamine의 농도

를 달리하여 표준물질을 조제하고 알카리성에서 TNBS와 반응시켜 발색시킨 다음 420mm에서 흡광도를 측정할 결과 그림 2와 같았으며 아미노산중의 질소 함량이 0.01mg/ml-0.1mg/ml까지는 Lambert-Beer의 법칙을 잘 따라주었다. 그러나 실제담배 시료에서는 아미노산을 추출할 때 황색색소 성분이 함께 추출되어 TNBS에 의하여 발색 반응을 완결시킬때까지 색소성분은 소멸하지 아니하며, 파장 420mm에서 아미노산과 함께 측정이 되어 아미노산의 흡수분광도 값에 오

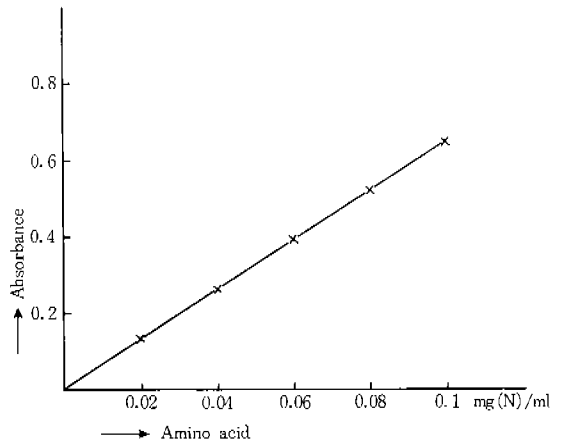


Fig. 2. Standard curve drawn from 420mm absorbance

Table 1. Recovery of 11 amino acids after activated carbon-treatment.

Amino acid	Amount of amino acid(mg) added	Amount of amino acid(mg) found	Recovery yield(%)
L-Leucine	45.86	43.11	92
L-Asparagine	47.20	47.20	100
L-Valine	41.80	40.97	98
L-Glutamine	52.20	52.20	100
L-Alanine	31.80	31.80	100
L-Methionine	53.30	51.70	97
L-Threonine	42.50	42.50	100
L-Histidine	55.40	49.86	90
L-Asparagic acid	47.20	47.20	100
L-Isoleucine	46.86	43.11	92
L-Serine	37.50	37.50	100

차 원인으로 간여하게 된다. 따라서 활성탄분말을 첨가하여 색소를 제거하는 전 조작이 불가피하나, 추출된 아미노산이 활성탄의 흡착현상에 의해 오차 원인으로 작용할 것인가 하는 문제가 우려된다.

이 문제를 검토하기 위하여 11개의 각종 아미노산 표준시약을 질소의 양으로 0.05mg/ml가 되도록 조제하고 활성탄분말 1g을 첨가하여 전처리조작후 분석하여 회수율을 검토한 결과 표 1과 같았다.

이 실험결과는 각 아미노산을 3회 되풀이하여 얻은 관측값이며 이중 L-Leucine을 포함하여 5종의 아미노산은 최대 10%의 흡착현상이 나타났으나 L-Glutamine을 포함하여 6종의 아미노산은 흡착현상이 전혀 보이지 않았는데 여러종류의 아미노산이 같은 비율로 혼합되었을때 흡착에 의한 오차가 3% 미만이 관측되어서 흡광도 분석에서 일반적으로 인정되고 있는 상대 오차 5% 범위내에 속하였다.

아미노산중에는 물에 대한 용해도 차이가 심하여 실제 시료중의 아미노산을 추출함에 있어서 P.F. Collin의 방법(2)과 같이 장시간을 요하는 불편함이 따른다. 시료 추출 시간을 단축하고자 4M 초산 완충액을 추출액으로 사용하고 추출시간과 추출온도를 달리하여 추출양과의 관계를 관찰하였다.

사용된 시료는 P.F. Collin의 방법(2)으로 5회 되풀이하여 아미노산의 함량을 구한 황색

중 일담배로서, 아미노산 0.124%에 해당된다.

추출온도가 상온인 20°C에서는 추출시간이 10시간후에 전량이 추출되었으나 추출온도를 상승시킴에 따라 추출시간은 단축되었는데 특히 추출온도를 50°C로 조작하였을 때는 추출시간이 1시간 30분으로 크게 단축되었다.

실제 일담배 중에는 아미노산과 분자구조가 비슷한 다른 질소 화합물이 존재하고 있으며 이들 질소화합물이 아미노산의 분석값에 영향을 미칠 것인가를 비교적 함량이 많은것으로 알려진 암모니아, 아미드, 아민, 알카로이드, 질산염, 아질산염, 피리딘에 대하여 검토하였다. 아미노산으로는 Glutamine 산(질소 0.1mg/ml)을 사용하였으며 아미노산과 함께 이들 화합물을 차례대로 혼합하여 아미노산을 분석해 본 결과 표 2와 같았다.

암모니아는 아미노산의 분석값에 +2%의 오차를 보였으며 아민은 +10%의 오차를 가져왔으나 실제 담배 질소화합물중 암모니아와 아민의 양은 10% 미만(3)이므로 우려할 정도의 영향은 아니었다. 그리고 니코틴 아미드를 포함하여 5개의 화합물은 아미노산 분석값에 아무런 영향을 주지 못하였다.

그리고 일담배의 내용성분은 질소화합물 이외에도 대단히 복잡한 양상을 보이고 있고 이들물질이 아미노산과 TNBS와의 반응에 간여하여 아미노산 분석값에 영향을 미칠 가능성은 충분히

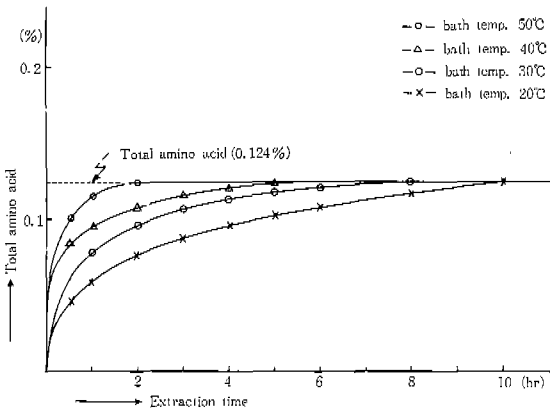


Fig. 3. Effect of extraction time and temperature

Table 2. Effect of nitrogen compound for analysis of Amino acids.

Nitrogen compound (mg)	Yield (%)	
	added	found
Amino acid 0.1 only	0.1	100
Amino acid 0.1+Ammonia 0.1	0.102	50
Amino acid 0.1+Amine 0.1	0.11	55
Amino acid 0.1+Nicotine 0.1	0.1	50
Amino acid 0.1+Pyridine 0.1	0.1	50
Amino acid 0.1+Sodium Nitrate 0.1	0.1	50
Amino acid 0.1+Sodium Nitrite 0.1	0.1	50
Amino acid 0.1+Nicotinamide 0.1	0.1	50

있는 것이다. 이를 밝히기 위하여 Burley 를 포함하여 6 종의 시료 담배에 대하여 시료 자체의 아미노산을 정량분석하고 다시 각 시료에 아미노산 표준물질을 0.50mg와 1.00mg를 첨가하여 분석값을 얻었다.

Burley 시료 자체에는 아미노산의 함량이 3.76 mg/g였으며 표준물질은 0.50mg을 첨가하여 얻은 분석값은 4.26mg였다. 따라서 첨가량 0.5mg은 시료중의 미지의 화합물의 영향을 받지 아

Table 3. Recovery of amino acid.

Sample	Amino acid (mg/g)			Recovery rate(%)
	leaf only	added	found	
Burley	3.76	0.50	4.28	100
Flue-cured	1.00	0.50	1.51	102
소향	0.27	1.00	1.26	99
향초	0.83	1.00	1.84	101
Basma	0.83	1.00	1.84	101
Izmir	0.80	1.00	2.78	98

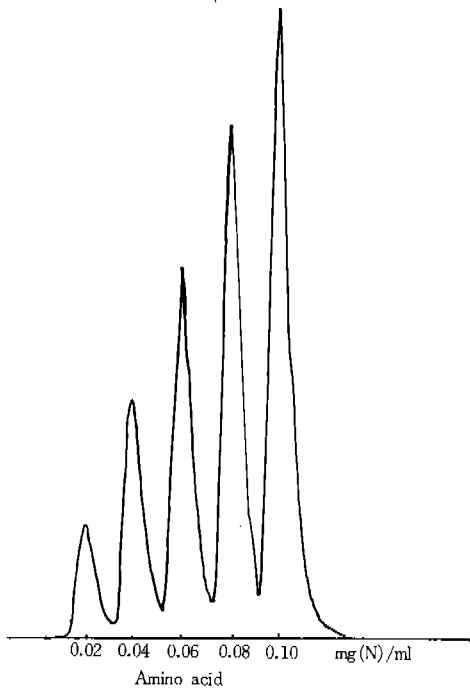


Fig. 4. Typical auto analyzer recording of amino acid standard

니하고 100%의 수율로 분석할수 있었다. 6개 시료에서 얻은 첨가량의 수율은 98-102%의 분석값을 얻어 ±2%의 오차를 보였는데 이 값은 시료중의 미지화합물이 여기서 논의되는 분석방법에 아무런 영향을 하지 않음을 시사하고 있다.

위에서 얻은 분석조건을 충족시키는 조작순에 따라 자동분석 Catridge를 배열한 결과 그림 1과 같았으며 표준물질을 사용하여 자동분석한 결과 그림 4와 같이 분석적 재현성을 가진 기록내용을 얻을수 있다.

따라서 담배시료 10개의 시료에 대하여 이 연구에서 설정한 자동분석 조작에 따라 구한 분석값과 한국연초연구소 발간 담배 성분분석 방법인 자동분석방법에서 구한 분석값을 비교한결과 표 4와 같았다.

Table 4. Comparison of amino acid values of official method with proposed method.

Sample	Amino acid (mg/g)		Relative Error
	Afficial Method	Proposed Method	
Burley 1	3.95	3.76	-4.8
Burley 2	2.73	2.72	-0.4
Burley 3	3.27	3.14	-3.7
Flue-cured 1	1.06	1.00	-5.6
Flue-cured 2	2.24	2.14	-4.5
Flue-cured 3	1.78	1.82	+2.2
향 초	1.74	1.75	+0.7
소 향	0.28	0.27	-3.7
Basma	0.88	0.83	-5.6
Izmir	0.80	0.80	0

표에서 보는 바와 같이 상대오차 범위는 +2.2% ~ -5.6%였으나 아미노산의 값이 적을 때 오차가 큰 값이었다. 오차가 가장 큰 Basma를 보면 0.88mg에 대하여 0.83mg의 분석값을 얻었는데 실제 절대량으로 보면 0.05mg의 오차로 본 연구에서 설정한 자동분석 방법이 상대오차 ±5% 범위내에서 분석적 재현성이 있음을 보이고 있다.

결 론

자동분석기를 이용하여 담배성분중의 전 아미노산을 자동분석할 수 있도록 설계하였다.

이 방법은 아미노산과 2, 4, 6-Trinitro benzene sulfonate와의 반응에 의하여 생성되는 황색을 이용한 것이다.

이 방법은 재래 방법에 비하여 신속하고 간편하며 상대오차 $\pm 5\%$ 이내에서 재현성이 있었다.

참 고 문 헌

1. Carugno, N., M. Neri, and G. Lionetti, *Beitrag zur Tabak.*, 7 (4), 222 (1974)
2. Collins, P. F., N.M. Sarji, and J.F. Williams, *Beitrag zur Tabak.*, 7 (4), 228 (1974)
3. Kim, S.I., and C.H. Kim, *J. of Kor. Soc. Tob. Sci.*, 1 (2), 120 (1979)
4. Nobumaro, K., and F. Harui, *Phytochem.* 6, 329 (1967)
5. Palmer, D.W. and T. Peters, *Clinical Chem.*, 15 (9), 891 (1969)
6. Spies, J.R., "Methods in enzymology" Vol. 4, Academic Press, (1957)
7. Van Slyke, D.D., et al, *J. Biol. Chem.*, 141, 627 (1941)