

## Application News

No. SSK-LCMS-2001

### LC-MS/MS

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

어류 중 아미노산 분석을 위한 비-유도체화 LC-MS/MS 분석법 개발

(Development and Validation of Non-derivatization LC-MS/MS  
Method for Fast Determination of Proteinogenic Amino Acids in Fish)



그림 1. LC-MS/MS system

아미노산 (Amino Acid, 이하 AA)은 건강과 활력을 유지하는 데 도움을 주는 신진 대사에서의 단백질과 중간체의 구성 요소로서 중심적인 역할을 하지만, 인체 내에서 합성을 할 수 없기 때문에 필수 아미노산이 풍부한 어류를 단백질 공급원으로 하고 있다. 이러한 아미노산의 일반적인 분석 방법은 고속액체크로마토그래프-형광검출기(이하HPLC-RF)를 이용하는 것으로, 컬럼 전 또는 후에 아미노산을 유도체화하기 위해 30 분에서 2 시간 정도의 긴 시간이 소요된다. 이로 인해 다양한 식품 중의 아미노산 분석에 있어서 유도체화 방법을 사용하지 않고, 간단하고 빠르게 분석할 수 있는 분석 방법이 요구되고 있다.

이에 본 뉴스레터에서는 가수분해된 어류에서 총 아미노산의 빠른 정량을 위해 Imtakt사의 'Intrada Amino Acid' 컬럼을 이용하여 MRM 기반의 비-유도체화 방법을 개발하고 검증하고자 하였으며, 분석법 검증을 위해 UHPLC-RF 분석법과 비교하였다.

■ LC-MS/MS 장비 구성 및 분석 조건

아미노산(AA) 21종 분석을 위한 액체크로마토그래프 텐덤질량분석기(LC-MS/MS)는 <그림 1>과 같으며, 분석 조건 및 MRM 조건은 <표 1>, <표 2>에 각각 나타내었다.

표 1. 장비 구성 및 분석 조건

HPLC system	Nexera X2
Column	Intrada Amino Acid column (100 x 3 mm I.D, 3 μm)
Mobile phase A	ACN/ THF/ 25 mM Ammonium formate/ Formic acid = 9/ 75/ 16/ 0.3 (v/v/v/v)
Mobile phase B	ACN/ 100 mM Ammonium formate = 20/ 80 (v/v)
Gradient program	0% B (0 - 3 min) → 17% B (6.5 min) → 100% B (10 - 12 min) → 0% B (12.01 min) → 0% B (15 min)
Flow rate	0.6 mL/min
Oven temp.	40 °C
Injection volume	2.0 μL
MS system	LCMS-8060
Nebulizing gas flow	2 L/min
Drying gas flow	10 L/min
Heating gas flow	10 L/min
DL temp.	250 °C
IF temp.	300 °C
Heat block temp.	400 °C
Ionization method	ESI (+, -)
Data acquisition	MRM mode

표 2. 아미노산(AA) 21성분의 MRM 조건

No	Name	MRM transition (m/z)	No	Name	MRM transition (m/z)
1	Trp	205.1 > 188.1	11	Thr	120.1 > 74.0
2	Phe	166.1 > 120.1	12	Ala	90.1 > 44.1
3	Tyr	182.1 > 136.0	13	Ser	106.1 > 60.2
4	Met	150.1 > 56.1	14	Gln	147.1 > 84.1
5	Leu	132.1 > 86.2	15	Asn	133.1 > 74.1
6	Ile	132.0 > 86.2	16	Cys	241.0 > 152.0
7	Val	118.1 > 72.1	17	His	156.1 > 110.0
8	Glu	148.1 > 84.1	18	Lys	147.0 > 84.1
9	Pro	116.1 > 70.1	19	Arg	175.1 > 70.1
10	Asp	134.2 > 74.1	20	Gly	76.2 (SIM)
			21	Tau	124.1 > 80.0 (-)

### ■ 시료 전처리

분석 시료로는 어류 중 도미, 농어, 고등어를 선정하였으며, 시료의 전처리는 분쇄한 시료 50 mg에 1 mL HCl/Propionic acid (1:1, v/v) 혼합 용액을 넣고, 160 °C에서 15 분, 30 분, 60 분, 120 분 동안 가수분해 시킨 각각의 시료를 질소로 건조하였다. 여기에 pH 5의 암모니아 용액을 넣어 재용해를 시킨 후, 헥산과 샘플을 2:1 비율로 넣고 잘 흔들어 지방질을 제거하였다. 각각의 시료를 15 분간 원심분리한 용액의 상등액을 400 배 희석한 후, 0.2 µm 나일론 필터를 이용하여 필터한 것을 시험용액으로 하였으며, 전처리 과정은 <그림 2>와 같다.

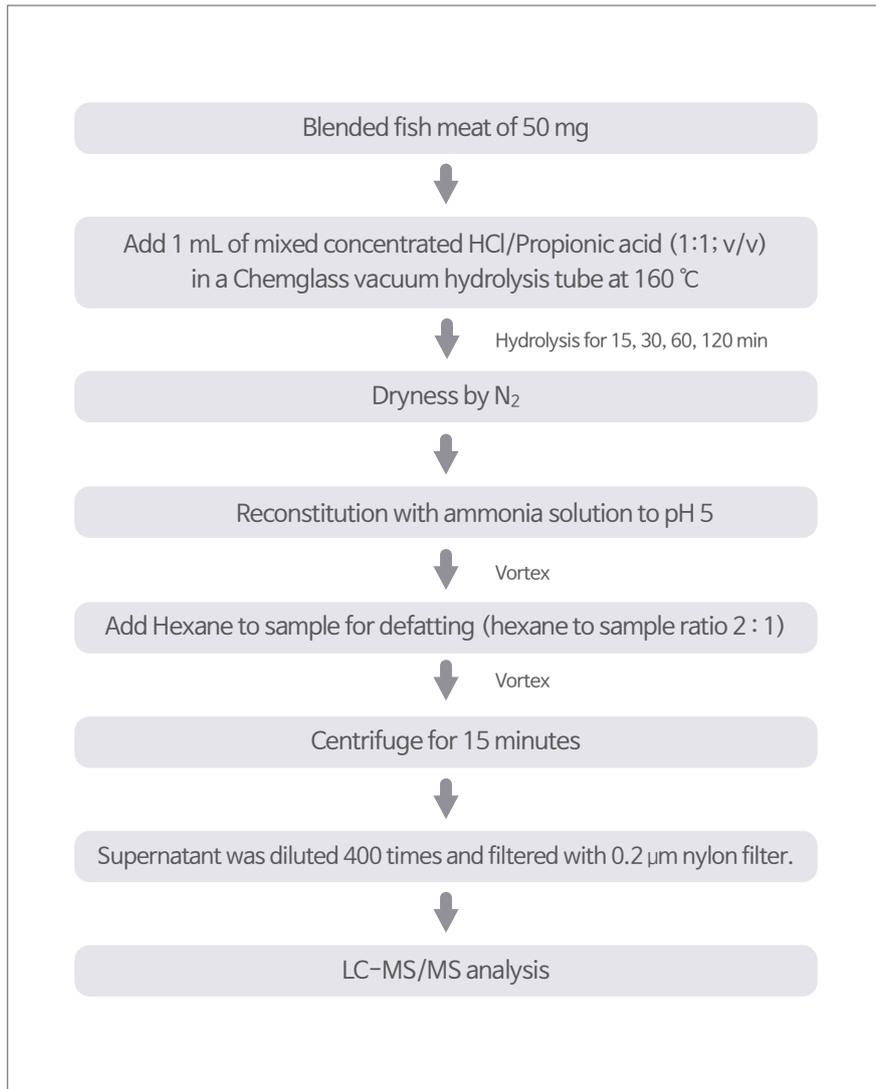


그림 2. 어류 중 아미노산 분석의 전처리 방법

■ 분석 결과

1. 검정곡선 및 재현성 결과

아미노산(AA) 21 성분의 정량 분석을 위해 <표 2>에 나타난 MRM 조건으로 분석을 수행하였으며, 글리신(Gly)의 경우에는 MRM 조건에서 감도가 낮아 SIM 조건으로 변경하여 분석하였다. <그림 3>은 농도 5 µM 아미노산 21 성분(Gly의 경우, 10 µM)에 대한 혼합표준물질 크로마토그램이다.

검정곡선은 글리신(Gly)을 제외한 20성분의 아미노산에 대해서는 (0.01 ~ 20) µM 농도 범위에서 작성하였으며, 글리신(Gly)의 경우에는 (5 ~ 20) µM 농도 범위에서 검정곡선을 작성하였다. 직선성은 아르기닌(Arg)이 R<sup>2</sup>=0.995, 나머지 20 개의 아미노산(AA)은 R<sup>2</sup>=0.997 이상으로 나타났으며, 일부 아미노산의 대표 검정곡선을 <그림 4>에 나타내었다.

아미노산의 정량한계(Limit of Quantitation, 이하 LOQ)는 글리신(Gly)이 5 µM로 나타났으며, 나머지 성분들은 (0.005 ~ 0.10) µM 농도 수준에서 분포하는 것으로 나타났다. 재현성은 0.5 µM 혼합 표준 용액(글리신의 경우, 5 µM)을 6 회 반복 측정하여 피크 면적의 %RSD로 산출하였으며, 결과는 글리신(Gly)이 11.9 %, 나머지 20 성분의 아미노산은 (0.8 ~ 7.8) % 수준에서 분포하는 것으로 나타났다. 각 성분에 대한 검정곡선과 정량한계, 재현성 결과는 <표 3>과 같다.

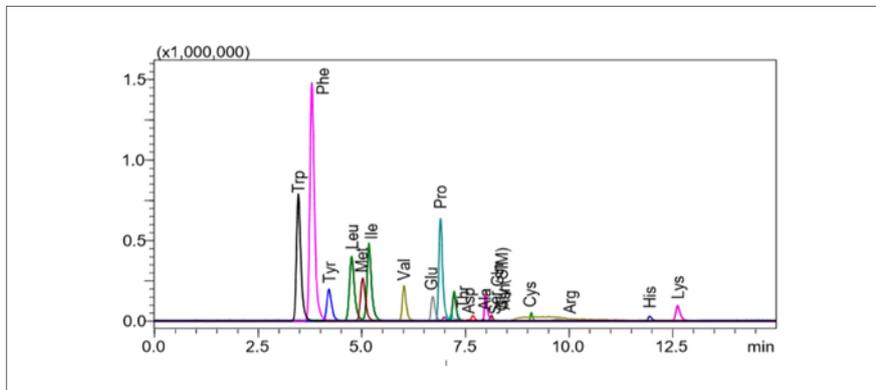


그림 3. 아미노산 21종의 크로마토그램 (농도: 5 µM, Gly: 10 µM)

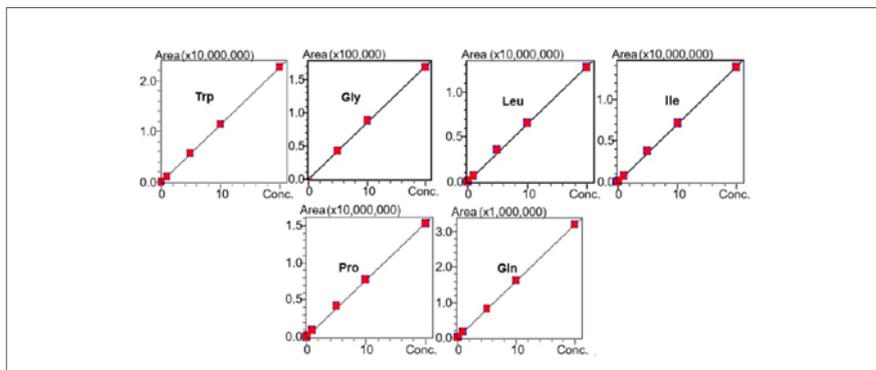


그림 4. 아미노산 검정곡선 (농도범위: (0.01 ~ 20) µM, Gly (5 ~ 20) µM)

표 3. 아미노산(AA) 21 성분에 대한 분석 결과

No	Compound	RT (min)	Calibration Curves and Quantitation Performance				
			Range (μM)	R <sup>2</sup>	LOQ (μM)	LOD (μM)	%RSD (n=6)
1	Trp	3.52	0.01-20	0.999	0.008	0.003	0.9
2	Phe	3.82	0.01-10	0.998	0.005	0.002	0.8
3	Tyr	4.22	0.05-20	0.999	0.050	0.020	1.8
4	Met	5.03	0.01-20	0.999	0.005	0.002	1.1
5	Leu	4.79	0.01-20	0.999	0.010	0.003	1.3
6	Ile	5.18	0.01-20	0.999	0.010	0.003	2.3
7	Val	5.99	0.05-20	0.999	0.020	0.006	2.5
8	Glu	6.68	0.01-20	0.998	0.010	0.003	1.7
9	Pro	6.91	0.01-20	0.999	0.010	0.003	3.0
10	Asp	7.24	0.10-20	0.997	0.100	0.030	7.8
11	Thr	7.12	0.05-20	0.999	0.050	0.015	3.9
12	Ala	7.61	0.05-20	0.998	0.014	0.004	2.4
13	Ser	7.89	0.10-20	0.999	0.100	0.030	3.9
14	Gln	7.96	0.05-20	0.998	0.050	0.015	4.4
15	Asn	8.11	0.05-20	0.997	0.050	0.015	4.6
16	Cys	9.07	0.05-20	0.998	0.050	0.015	3.6
17	His	11.98	0.05-20	0.999	0.050	0.015	4.4
18	Lys	12.60	0.05-20	0.998	0.050	0.015	3.9
19	Arg	9.66	0.01-20	0.995	0.010	0.003	6.3
20	Gly (SIM)	8.07	5.0-20	0.999	5.00	1.500	11.9
21	Tau (-)	6.99	0.10-20	0.998	0.010	0.003	1.8

## 2. 산 가수분해 절차 및 LC-MS/MS 분석법의 밸리데이션

어류 시료에서의 단백질의 산 가수분해는 일반적으로 110 °C에서 6N HCl로 24 시간 동안 진행되지만, 본 실험에서는 160 °C에서 고통도의 염산과 프로피온산을 이용하여 빠른 산 가수분해 방식을 채택하였다. 가수분해 시간은 15 분에서 2 시간 사이에서 최적화를 고려하였으며, 생성된 아미노산의 양(g/100 g)을 <그림 5>에 나타내었다. <그림 5>에서 보는 것과 같이 라이신(Lys)을 제외한 모든 아미노산 성분이 30 분에서 최고의 효율을 보이고 있기 때문에, 30 분의 산 가수분해 조건에서 3 종의 어류(도미, 농어, 고등어)에 대한 밸리데이션 실험을 수행하였다.

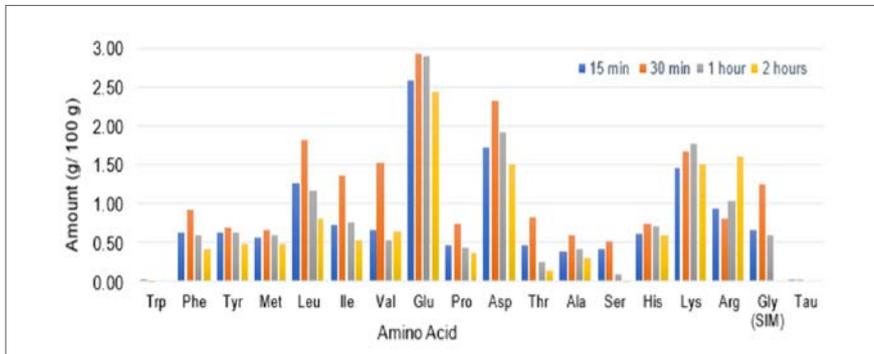


그림 5. 산 가수분해 시간에 따른 생성된 어류(고등어)의 아미노산의 양

세가지 유형의 어류에 대해 각 2개씩의(S1, S2) 시험용액을 준비하였으며, 확립된 LC-MS/MS 방법을 이용하여 일중(intra-day), 일간(inter-day)의 재현성 시험을 통해 밸리데이션 하였다. 또, 매트릭스 효과(matrix effect)의 검증을 위해 농어 시료를 산 가수분해 후에 5 µM 아미노산 혼합 표준용액을 첨가(post-spiking)하여 평가하였으며, 크로마토그램은 아래 <그림 6>과 같다.

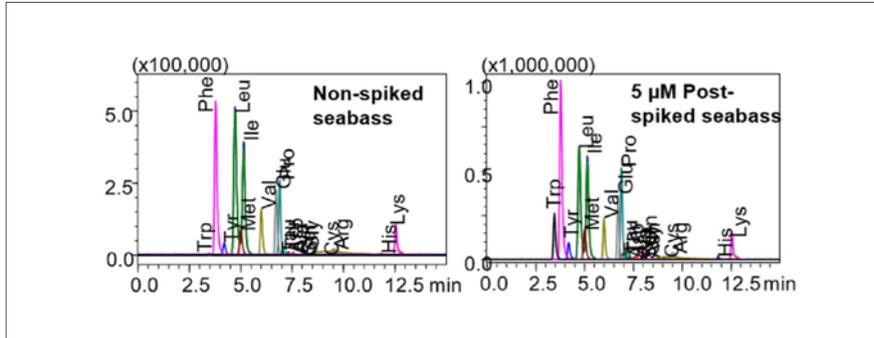


그림 6. 혼합 표준용액 첨가에 따른 MRM 크로마토그램  
(왼쪽: 혼합 표준용액을 첨가하지 않은 농어 샘플, 오른쪽: 5 µM의 혼합 표준용액을 첨가한 농어 샘플)

아미노산 21성분에 대한 매트릭스 효과의 결과는 <표 4>에 나타내었으며, 이는 아미노산의 정량적 결과를 보정하는데 사용되었다. 일중(intra-day) 및 일간(inter-day)의 재현성 결과는 적합한 수준이었으며, LC-MS/MS에 의해 얻은 정량적 결과는 농어과 어류인 틸라피아(Tilapia)의 UHPLC-형광분석법 결과와 유사한 것으로 나타났다. 필수 아미노산 중 주된 아미노산은 리신(Lys)과 류신(Leu)으로 나타났으며, 3종의 어류 시료에서 총 필수 아미노산(Total EAA)의 합계는 8.7 ~ 11.6 g/100g수준으로 나타났다. 글루타민(Gln) 및 아스파라긴(Asn)은 산 가수분해 과정에서 각각 글루탐산(Glu) 및 아스파르트산(Asp)으로 전환되기 때문에 검출되지 않았으며, 트립토판(Trp)은 산 가수분해 조건에서 분해되기 때문에 극히 낮은 수준으로 검출되었다.

표 4. 어류 중 아미노산(g/100g)의 LC-MS/MS 분석 결과 (매트릭스 효과, 재현성, UHPLC 비교 결과)

No	Amino Acid	Matrix effect (n=4) <sup>[4]</sup>	Intra-day (g/100g), n=2						Inter-day (g/100g), n=2						UHPLC results of Tilapia fish (g/100g)
			Red Snapper		Sea Bass		Spanish Mackerel		Red Snapper		Sea Bass		Spanish Mackerel		
			S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	
1 <sup>[3]</sup>	Trp	96.5	0.025	0.029	0.025	0.022	0.036	0.032	0.019	0.037	0.021	0.010	0.039	0.039	0.050
2	Phe	86.5	1.17	1.16	1.04	1.08	1.06	1.05	1.15	1.13	0.91	0.88	1.06	1.07	1.11
3	Tyr	94.6	1.05	1.25	1.06	1.05	1.07	1.16	1.26	1.21	0.64	0.60	1.19	1.15	0.77
4	Met	79.8	0.75	0.77	0.63	0.64	0.65	0.63	0.74	0.73	0.70	0.66	0.66	0.63	0.48
5	Leu	70.1	2.52	2.55	2.17	2.27	2.51	2.50	2.21	2.23	2.08	2.04	2.53	2.50	1.78
6	Ile	73.0	1.42	1.53	1.36	1.43	1.55	1.57	1.58	1.46	1.33	1.30	1.55	1.52	1.16
7	Val	73.9	1.30	1.49	1.23	1.23	1.40	1.40	1.39	1.38	1.19	1.14	1.37	1.38	1.12
8	Glu	103.7	2.02	2.47	2.18	2.15	2.03	2.09	2.13	2.46	2.64	2.36	2.11	2.10	4.44
9	Pro	90.7	0.76	0.92	0.75	0.72	0.88	0.87	0.81	0.85	0.69	0.66	0.95	0.93	2.93
10	Asp	81.3	2.62	2.85	2.66	2.53	2.46	2.52	2.27	2.25	2.27	1.99	2.47	2.22	3.95
11	Thr	99.5	0.79	0.81	0.63	0.57	0.73	0.67	0.85	0.86	0.66	0.57	0.67	0.69	0.94

No	Amino Acid	Matrix effect (n=4) <sup>[4]</sup>	Intra-day (g/100g), n=2						Inter-day (g/100g), n=2						UHPLC results of Tilapia fish (g/100g)
			Red Snapper		Sea Bass		Spanish Mackerel		Red Snapper		Sea Bass		Spanish Mackerel		
			S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	
12	Ala	90.0	0.61	0.71	0.54	0.55	0.69	0.65	0.62	0.63	3.12	2.83	0.61	0.67	1.65
13	Ser	107.8	0.35	0.31	0.32	0.36	0.34	0.33	0.38	0.39	0.40	0.33	0.46	0.40	0.85
14 <sup>[1]</sup>	Gln	106.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15 <sup>[1]</sup>	Asn	120.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	Cys	84.1	0.063	0.047	0.038	0.040	0.046	0.033	0.468	0.477	0.059	0.071	0.039	0.036	0.100
17	His	86.3	0.40	0.42	0.42	0.43	0.64	0.57	0.46	0.46	0.36	0.32	0.62	0.60	0.78
18	Lys	86.7	2.95	3.15	2.89	2.86	2.70	2.68	1.60	1.59	1.64	1.57	2.65	2.69	3.41
19	Arg	119.9	2.46	2.89	3.69	1.92	1.94	1.85	1.41	1.44	0.86	0.78	1.99	2.13	1.67
20	Gly(SIM)	86.4	1.81	2.26	2.43	2.14	2.39	2.25	2.14	2.14	1.06	1.00	2.44	2.65	1.12
21	Tau	107.5	0.12	0.12	0.12	0.12	0.02	0.02	0.25	0.21	0.24	0.21	0.02	0.02	N.A.
<b>Total EAA (9)<sup>[2]</sup></b>			<b>11.6</b>		<b>10.5</b>		<b>11.2</b>		<b>9.9</b>		<b>8.7</b>		<b>11.1</b>		<b>10.8</b>
Other AA			12.9		12.7		11.8		11.9		11.4		12.3		17.5

[1] 산 가수분해 조건에서 전환: Asn → Asp; Gln → Glu

[2] EAA = 필수 아미노산 (붉은색 표시)

[3] 값이 낮은 이유는 산 가수분해 조건에서 분해되기 때문으로, Trp을 위한 알칼리 가수분해가 필요.

[4] 매트릭스 효과; ME = [post-spiked - non-spiked]/Neat std.

## ■ 결론

본 뉴스레터는 160 °C에서 빠른 산 가수분해를 이용하여 비-유도체화 LC-MS/MS 방법을 개발하고자 하였으며, 시험 방법의 검증을 위해 어류 중 아미노산(AA) 21성분에 대해서 밸리데이션을 수행하였다. 이 분석 방법은 다른 종의 어류 시료를 UHPLC-RF로 분석한 총 필수 아미노산(EAA) 분석 결과와 서로 일치하는 것으로 나타났다. 따라서, 개발된 분석법이 고온에서 빠른 산 가수분해를 통해 유도체화 전처리 과정 없이 아미노산을 직접 분석할 수 있기 때문에 시료 전처리 및 LC-MS/MS 분석의 측면에서 보다 신속하다는 장점이 있다.

## ■ 참고 문헌

1. Application News No. AD-0185
2. European Pharmacopoeia 5.0, 2.2.56 Amino Acid Analysis. 01/2005:20256
3. Bimal Mohanty et al, "Amino Acid Compositions of 27 Food Fishes and their Importance in Clinical Nutrition" Journal of Amino Acids, Volume 2014, Article ID 269797
4. Imtakt Technical Report T1734E
5. Matsumoto K., Watanabe J., Yazawa I., ASMS 2014, TP 510