

초고성능액체크로마토그래프-질량스펙트럼분석법에 의한 현미와 발아현미에서 γ -아미노버터산의 정량

윤정호, 리혁철

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《제약공장과 의료기구공장들을 현대화하고 효능높은 의약품과 첨단의료설비, 기구, 의료용소모품들을 원만히 생산보장하도록 하여야 합니다.》

γ -아미노버터산(GABA)은 생물계에 분포되어있는 비단백성아미노산으로서 뇌동맥경화, 뇌진탕을 비롯한 뇌기능장애, 고혈압 등 각종 뇌질병치료에 리용되고있다.

세계적으로 발아현미에 대한 연구가 널리 진행되고있는데 그것의 약리적기능은 보통 현미에 비해 γ -아미노버터산(GABA)함량이 높은것과 관련된다.[3, 4] 현미를 싹틔우면 γ -아미노버터산이 많이 생기며 이 물질은 뇌의 피흐름을 좋게 하여 혈압을 낮추고 신경을 진정시키며 콩팥과 간의 기능을 개선하는 작용을 한다.

발아현미에서 γ -아미노버터산에 대한 분석방법을 확립하는것은 기능성식품으로서의 발아현미의 질을 평가하고 현미의 발아를 개선하는데서 관건적인 문제로 나선다.

o-프탈알데히드(OPA)유도체화법으로 γ -아미노버터산을 분석한 자료들[1, 2, 4]은 제기되었지만 초고성능액체크로마토그래프-질량분석법(UPLC-MS)으로 유도체화공정이 없이 직접 분석한 자료는 제기된것이 없다.

우리는 초고성능액체크로마토그래프-질량스펙트럼분석법으로 현미와 발아현미에서 γ -아미노버터산을 정량하기 위한 연구를 하였다.

실험 방법

기구로는 초고성능액체크로마토그래프-질량분석기(《ACQUITY UPLC-SQD2》), 전자천평(《AEG-120》), 초음파분산기(《KM-410L》), 10 및 25mL 눈금플라스크, 질량검출기(《SQ-2》)를, 시약으로는 아세토니트릴(HPLC급), GABA표준용액, 초순수, 개미산(분석순)을 리용하였다.

UPLC측정조건 략으로는 ACQUITY UPLC[®] ULTRA C18(1.7 μ m, 2.1mm \times 100mm)을, 이동상으로는 0.2% 개미산(A)과 아세토니트릴(B)을 리용하여 류속 0.2mL/min으로 구배용출(표1)을 진행하였으며 시료주입체적은 10 μ L, 측정시간은 10min이다.

표 1. 구배용출조건

시간/min	류속/(mL·min ⁻¹)	이동상 A함량/%	이동상 B함량/%
0	0.20	100	0
5	0.20	60	40
7.5	0.20	100	0
10	0.20	100	0

MS측정조건 모세관전압 3.5kV, 원추전압 0V, 원천온도 125℃, 탈용매기체류속 650L/h, 탈용매화온도 350℃에서 전기분무이온화(ESI)방식으로 주사구간 m/z 50~300에서 측정하였다. 이 조건에서 측정한 γ -아미노버터산표준용액의 질량스펙트럼은 그림 1과 같다.

그림 1에서 m/z 104는 γ -아미노버터산($M=103$)에 수소이온이 부가된 $[M+H]^+$ 이다.

시료준비 시료는 현미와 발아현미를 선행연구[1]에서와 같은 방법으로 처리하여 준비하였다.

측정방법 γ -아미노버터산표준용액을 UPLC-MS체계에 주입하고 초고성능액체크로마토그래프의 탑종류와 이동상조성을 변화시키면서 γ -아미노버터산의 분리효과를 검토하여 최적측정조건을 찾았다.

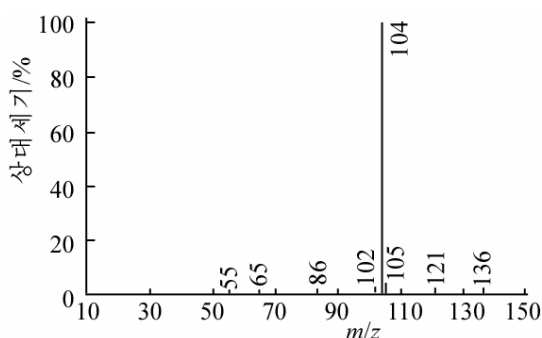


그림 1. γ -아미노버터산표준용액의 질량스펙트럼

실험결과 및 고찰

UPLC분리탑종류의 영향 UPLC분리탑 ACQUITY UPLC® ULTRA C18(1.7 μ m, 2.1mm×100mm)과 ACQUITY UPLC® HSS T3 C18(1.8 μ m, 2.1mm×150mm)이 γ -아미노버터산의 분리에 미치는 영향을 고찰하였다.(그림 2)

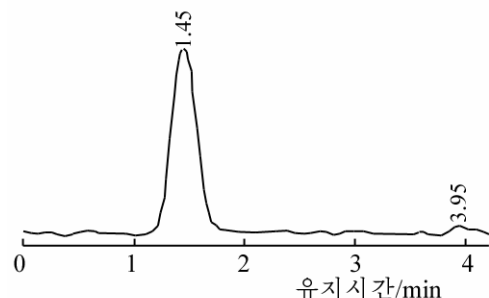


그림 2에서 보는바와 같이 ACQUITY UPLC® HSS T3 C18탑에서는 γ -아미노버터산이 탑에 유지되지 않고 넓게 분포되어 용출된다. 그러나 ACQUITY UPLC® ULTRA C18탑에서는 봉우리가 대칭적으로 나타나므로 우리는 이 탑을 분석에 리용하였다. 이때 γ -아미노버터산의 유지시간은 1.45min이다.

이동상용매조성의 영향 γ -아미노버터산의 분리에 미치는 이동상용매조성의 영향은 그림 3과 같다.

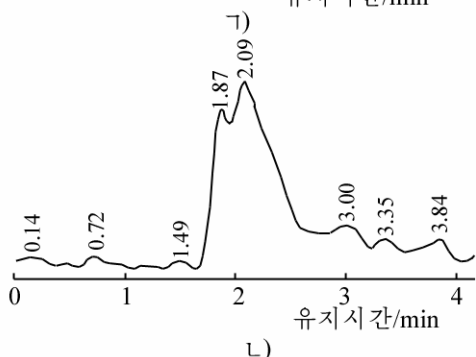
그림 3에서 보는바와 같이 이동상조성을 0.2% 개미산용액 : 아세토니트릴=90 : 10(체적비)으로 하였을 때 γ -아미노버터산이 잘 분리되었다. 실지 시료분석에서는 다른 성분들과의 분리를 위하여 구배용출조건을 리용하였다.

선형범위와 검출한계 γ -아미노버터산의 농도와 봉우리면적사이에는 10~150 μ g/mL에서 선형관계가 성립된다.(그림 4) 이때 검량선의 회귀방정식은 $y=17\,294x+17.4$ 이며 상관결수(r^2)는 0.999 8, 검출한계($S/N=3$)는 10 μ g/mL이다.

대상물분석 대상물분석은 표준첨가법으로 하였다.

저울질한 일정한 량의 시료를 선행연구[1]에서와 같이 추출하여 7 000r/min에서 원심분리하고 일정한 량의 상등액을 취해 UPLC-MS체계에 주입하여 우와 같은 조건에서 측정

그림 2. m/z 104의 질량크로마토그램
 ㄱ) ACQUITY UPLC® ULTRA C18탑,
 ㄴ) ACQUITY UPLC® HSS T3 C18탑



하였다.

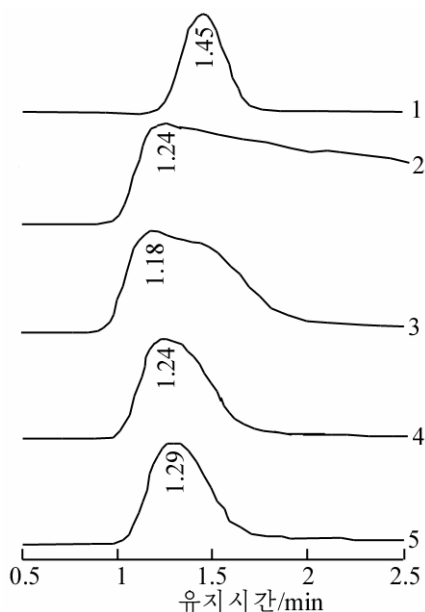


그림 3. γ -아미노버터산의 분리에 미치는 이동상용매조성의 영향
1—구배용출(표 1), 2—5는 A : B가 각각 25 : 75, 50 : 50, 75 : 25, 90 : 10인 경우

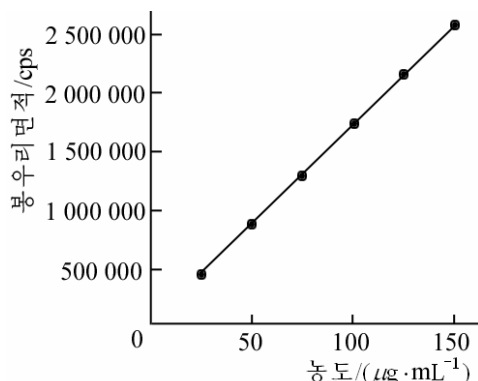


그림 4. γ -아미노버터산의 농도와 봉우리면적사이 관계

현미와 발아현미에서 γ -아미노버터산의 함량분석결과는 표 2와 같다.

표 2. 현미와 발아현미에서 γ -아미노버터산의 함량분석결과

No.	함량/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	변동계수/%	회수률/%
현미 1	258	3.85	98.4
현미 2	329	3.51	97.1
발아현미 1	1 688	3.01	98.2
발아현미 2	1 547	3.16	98.0

현미와 발아현미에서 γ -아미노버터산을 정량할 때 변동계수($n=5$)는 3.85%이하였으며 실지 시료에 첨가한 γ -아미노버터산의 회수률은 97.1%이상이었다.

맺 는 말

초고성능액체크로마토그래프—질량스펙트럼분석법으로 유도체화를 진행하지 않고 현미와 발아현미에서 직접 γ -아미노버터산을 정량하기 위한 분석방법을 확립하였다.

γ -아미노버터산의 검량선의 선형범위는 $10\sim 150\mu\text{g/mL}$, 검출한계($S/N=3$)는 $10\mu\text{g/mL}$ 이며 여러가지 현미와 발아현미에서 γ -아미노버터산을 정량할 때 변동계수는 3.85%이하, 회수률은 97.1%이상이었다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보 화학, 64, 1, 85, 주체107(2018).
- [2] Thitima Kaosa-ard et al.; J. Food Ag-Ind., 5, 4, 270, 2012.
- [3] Swati Bhauso Patil et al.; J. Food Sci. Technol., 48, 6, 661, 2011.
- [4] P. A. Vetha Varshini et al.; J. Biosci. Tech., 4, 1, 503, 2013.

Determination of γ -Aminobutyric Acid in Brown Rice and the Germinated Brown Rice by Ultra Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

Yun Jong Ho, Ri Hyok Chol

We established the analytical method to determine directly γ -aminobutyric acid from brown rice and the germinated brown rice by ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry.

The linear range of calibration of γ -aminobutyric acid is 10~150 μ g/mL and the detection limit($S/N=3$) is 10 μ g/mL. When we determine γ -aminobutyric acid in brown rice and the germinated brown rice, the variation coefficient is below 3.85% and the recovery is up 97.1%.

Keywords: γ -aminobutyric acid, germinated brown rice