

## 디니트로플루오로벤졸유도체화법에 의한 $\gamma$ -아미노버터산분석

리혁철, 윤정호, 리덕환

최근 세계적으로 영양가치와 약리적기능이 높은 발아현미를 대대적으로 생산리용하고 있는데 발아현미에는 보통 현미에 비하여  $\gamma$ -아미노버터산(GABA)이 많이 들어있다.[3, 4]

GABA는 단백질조성에 포함되지 않는 생체성분아미노산으로서 억제성신경전달물질로 작용하고 뇌수조직의 활성을 높이며 포도당리용과 혈액공급을 개선하고 뇌수에서 독성대사산물을 빨리 배출시킨다.[3]

지금까지 *o*-프탈산알데히드(OPA)유도체화법으로  $\gamma$ -아미노버터산을 분석한 연구결과들 [2, 4]은 많이 발표되었지만 디니트로플루오로벤졸을 리용한 연구결과와는 발표된것이 없다.

우리는 디니트로플루오로벤졸유도체화법으로  $\gamma$ -아미노버터산을 유도체화하고 초고성능액체크로마토그래프로 분리하였다.

### 실험 방법

기구로는 초고성능액체크로마토그래프(《ACQUITY UPLC》), 항온수욕조(《DC-8006》)를, 시약으로는  $\gamma$ -아미노버터산표준(99%), N,N-디메틸포름아미드(N,N-DMF)(GC순), 디니트로플루오로벤졸(DNFB), 아세트니트릴(GC순), 초순수를 리용하였으며 기타 모든 시약들의 순도는 분석순이다. 이밖에 완충액으로서 유도화완충액(탄산염완충액 pH 9.2)과 평형화완충액(린산완충액 pH 7.0)을 리용하였다.

DNFB를 리용하여 GABA를 유도체화하고 GABA유도체를 UPLC로 분리하였다. 아미노산표준을 포함한 모든 시료들의 DNFB유도체화는 선행연구[1]에서와 같은 방법으로 진행하였다. 초고성능액체크로마토그래프의 탑종류와 이동상구배를 변화시키면서  $\gamma$ -아미노버터산의 분리효과를 검토하여  $\gamma$ -아미노버터산분석방법의 최적조건을 찾았다.

발아현미가루에 증류수를 첨가하고 30℃의 항온수욕조에서 각이한 시간동안 추출[2]한 다음  $\gamma$ -아미노버터산함량자료에 기초하여 최적추출시간을 결정하였다.

UPLC측정조건은 다음과 같다.

분리탑: HSS T3(1.8 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150mm), ACCQ-TAG ULTRA C18(1.7 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 100mm), 분리탑온도: 30℃, 류속: 0.4mL/min, 시료주입량: 10 $\mu$ L, 검출파장: 360nm, 측정시간: 13min.

### 실험결과 및 해석

DNFB-GABA유도체의 분리조건 DNFB유도체들의 크로마토그램은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 GABA유도체의 크로마토그램에서는 봉우리가 4개 나타났는데 첫번째와 네번째 봉우리는 유도체시약의 봉우리이고 가운데봉우리가 GABA의 봉우

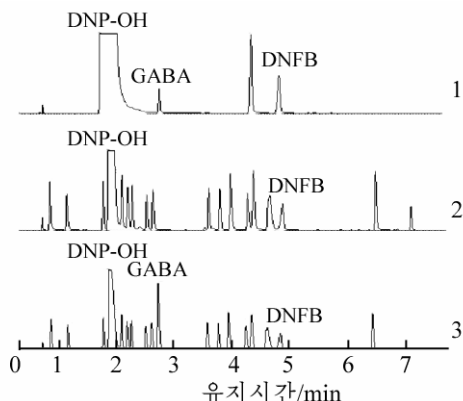


그림 1. DNFB유도체들의 크로마토그램  
1-DNFB-GABA유도체, 2-DNFB-중합아미노산(H형)표준유도체, 3-DNFB-중합아미노산(H형)+GABA표준유도체

리이다. 또한 중합아미노산표준유도체의 크로마토그램과 GABA를 첨가한 중합아미노산표준유도체의 크로마토그램을 비교한 결과 GABA의 봉우리가 GABA표준의 봉우리와 같은 위치(2.69min)에서 나타났다.

탐종류의 영향 탐종류에 따르는 유도체들의 크로마토그램은 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 HSS T3탐을 리용하는 경우 모든 유도체들의 봉우리가 뒤로 끌리는 현상이 나타났는데 이것은 탐과 아미노산유도체들 사이의 호상작용에 의한 결과이다. 그러나 ACCQ-TAG ULTRA C18탐을 리용하는 경우에는 모든 유도체들이 정확히 분리되며 분석시간도 1/3로 줄일

수 있다. 따라서 ACCQ-TAG ULTRA C18탐을 선택하였다.

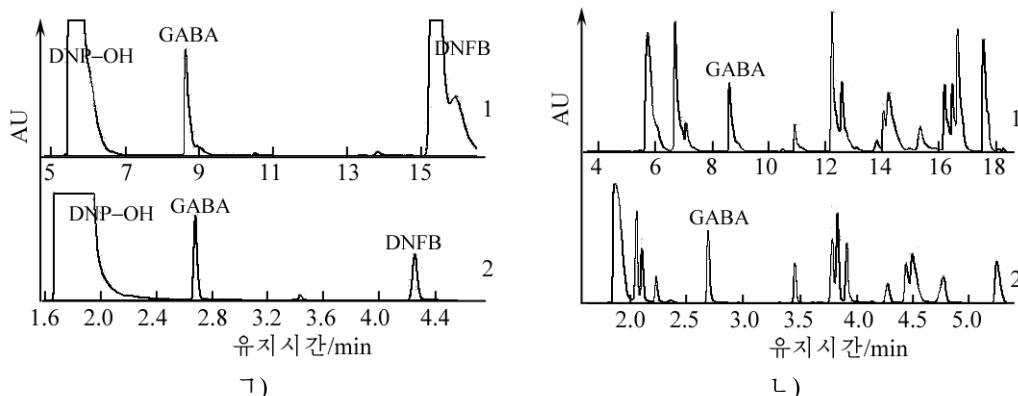


그림 2. 탐종류에 따르는 DNFB-GABA유도체(ㄱ)와 DNFB-중합아미노산유도체(ㄴ)의 크로마토그램  
1-HSS T3탐, 2-ACCQ-TAG ULTRA C18탐

이동상2원구배의 영향 선행연구결과[1]에 기초하여 이동상 A와 B를 제조하고 2원구배를 조성하면서 GABA와 아미노산들을 분리하여 2원구배표를 작성하였다.(표 1)

표 1과 같은 이동상구배를 조성한 결과 GABA가 다른 아미노산들과 완전히 분리되었다. 우와 같은 분리조건에 따라 GABA표준으로 작성한 검량선은 그림 3과 같다.

표 1. 이동상2원구배표

시간/min	이동상 A/%	이동상 B/%
0	86	14
0.2	86	14
3.0	69	31
5.0	64	36
9.0	20	80
11.0	86	14
13.0	86	14

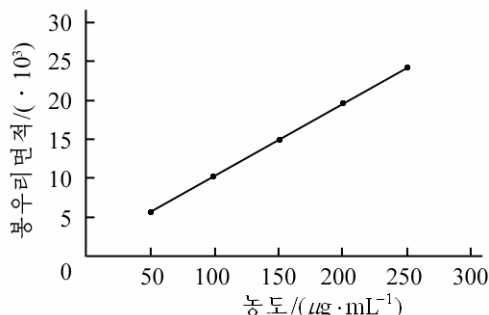


그림 3. 검량선

물추출시간의 영향 발아현미가루에 증류수를 일정한 량 첨가하고 30℃ 항온수욕조에서 추출할 때 추출시간에 따르는 GABA함량변화는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 추출시간이 길어짐에 따라 GABA함량은 높아지다가 12h후에는 변하지 않는다. 따라서 추출시간을 12h로 정하였다.

대상시료분석결과 《서해 7》호와 《평양 49》호를 발아시켜 만든 발아현미에서 GABA함량을 분석한 결과는 표 2와 같다.

표 2에서 보는바와 같이 《서해 7》호와 《평양 49》호의 GABA함량은 각각 1.076, 0.622mg/g이다.

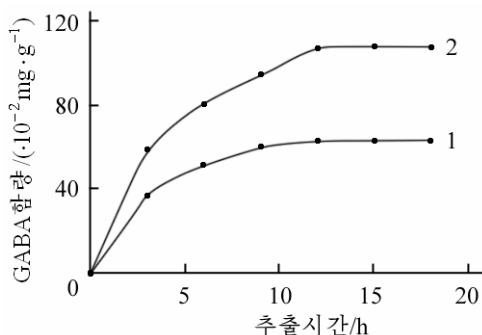


그림 4. 추출시간에 따르는 GABA함량변화  
1-《평양 49》호, 2-《서해 7》호

표 2. 발아현미에서 GABA함량(·10<sup>-2</sup>mg/g)

측정회수	1	2	3	4	평균	표준편차	변동계수/%
《서해 7》호	107.7	106.5	108.2	107.8	107.6	0.73	0.68
《평양 49》호	62.8	62.0	62.5	61.7	62.2	0.49	0.79

## 맺 는 말

$\gamma$ -아미노버티산을 DNFB로 유도체화하고 UPLC로 분리하였다.

DNFB-GABA유도체의 유지시간은 2.69min이며 분리탑으로 ACCQ-TAG ULTRA C18을 리용하면 GABA를 정확히 분리할수 있다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 62, 5, 90, 주체105(2016).
- [2] Thitima Kaosaard et al.; J. Food Agr. Ind., 5, 4, 270, 2012.
- [3] Swati Bhauso Patil et al.; J. Food Sci. Technol, 48, 6, 661, 2011.
- [4] Vetha Varshini Pa et al.; J. Biosci. Technol, 4, 1, 503, 2013.

주체106(2017)년 10월 5일 원고접수

## Determination of $\gamma$ -Aminobutyric Acid by Derivatization with 2,4-Dinitro Fluorobenzene

Ri Hyok Chol, Yun Jong Ho and Ri Tok Hwan

The retention time of DNFB-GABA derivative is 2.69min and using the ACCQ-TAG ULTRA C18 column, GABA can be separated exactly.

Key words:  $\gamma$ -aminobutyric acid, DNFB, UPLC