ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
(*Journal of the Korean Society of Analytical Sciences*)
Vol. 6, No. 1, 1993
Printed in the Republic of Korea

아미노산 분석에 음이온 질량분석법의 응용

표 동 진
강원도 춘천시 효자 2동 강원대학교 자연과학대학 화학과
(1993년 2. 8 접수)

Application of Negative Ion Mass Spectrometry in Amino Acid Analysis

Dongjin Pyo
Department of Chemistry, Kangweon National University Chuncheon 200-701, Korea
(Received Feb. 8, 1993)

요약 : 음이온 화학적 이온화 질량분석법은 아미노산 분석에 있어서 sensitivity를 향상시킬 수 있는 좋은 방법이 될 수 있다. 강한 전자 포획성 분자들에 대해서 이 방법은 femtomole에서 attomole(10^{-18})까지 측정한계가 내려가는 것이 보고되고 있다. 이 논문에서는 아미노산을 전자 포획성 물질인 dinitro-phenyl(DNP) 유도체를 만들어 음이온 화학적 이온화 질량 분석법으로 스펙트럼을 얻어 이를 전자 이온화법으로 얻은 질량 스펙트럼과 비교하였다. 그 결과 음이온 질량분석법의 경우 이온화 과정의 선택성 때문에 background noise가 훨씬 줄어들어 깨끗한 스펙트럼이 얻어졌다.

ABSTRACT : Negative chemical ionization mass spectrometry(NCI-MS) can provide the enhancement in sensitivity in the analysis of amino acids. For molecules which are strongly electron-capturing, NCI-MS has been reported to have detection limits in the femtomole to attomole(10^{-18}) range. Because of the selectivity of the ionization process, background noise is diminished, further enhancing signal to noise ratio. In this paper, we explored a dinitro-phenyl derivatives of amino acids by NCI-MS and compared it with eletron ionization method. The results demonstrated NCI-MS produces very clean spectra with a very little noise.

Key Words : Negative Ion Chemical Ionization, Amino Acid Analysis

1. 서 론

1950년대 이래로 단백질의 1차구조 분석 분야는 매우 중요한 분야로 여겨져 왔다. 단백질을 구성하는 아미노산에 대한 정보는 biomolecules들이 어떻게 서로 상호 작용하여 어떤 기능을 갖는지에 대한 귀중한 자료를 줄 수 있기 때문이다. 그러나 단백질을 구성하는 아미노산 분석에 대한 기본 화학은 거의 30년 동안 변한 것이 없었다. 즉, Edman Siquential Degradation이 바로 그것이다. 변화가 있었다면 Edman과 Begg[1]에 의해 spinning cup automated sequenator가 개발되어 종래의 solid phase[2] 나 gas-liquid phase[3] sequencer를

대신하게 되었다는 점이다. 이 방법의 장점은 peptide 세척의 번거로운 절차를 줄여 주었으며 cycles의 수를 조절하여 원하는 만큼의 sequencing만 할 수 있으며 따라서 sequencing에 필요한 peptide의 양을 줄일 수 있게 됐다. 그럼에도 불구하고 단백질을 분리, 정제하는 데 많은 노력과 비용이 들기 때문에 적은 양의 단백질을 사용하는 microsequencing 방법의 개발은 이 분야에서 중요한 필요성을 가지게 된다.

수동 혹은 자동 Edman degradation은 일반적으로 1~100 nmole의 아미노산을 필요로 하며[4], microsequencing이라는 용어는 1 nmol 이하의 양을 다룰 때 사용되어진다. Edman degradation에서는 각 단계마다 발생되는 phenylthiohydantions(PTH) 아미노산의 검출이 전체 단백질 sequencing의 검출한계를 결정하게 된다. 그러므로 아미노산에 어떤 유도체를 만들어 아주 적은 양의 아미노산을 검출하는 일은 이 분야에서 매우 중요한 일이다. 가장 많이 쓰이는 방법으로는 PTH 아미노산을 만들어서 HPLC로 UV 흡광도를 측정하는 것[5,6]을 들 수 있다. 이 방법으로 5~10 pmol의 검출 한계가 보고되어 있다.[3] 이것 뿐만 아니라 다른 검출 방법들이 많이 시도되어졌다. 즉 parent amino acid로 back hydrolysis[7], gas chromatography[8], 그리고 전자이온화를 이용한 질량분석법[9], chemical ionization[10], field desorption[11], SIMS[12] 등의 방법이 시도되었다. 이러한 방법들을 살펴보면 어떤 형태로든 mass spectrometry를 사용하는 방법이 크로마토그래피를 사용하는 방법보다 검출한계를 훨씬 낮출 수 있으며 또한 비정상적인 아미노산이나 아미노산의 변형들도 질량분석기를 이용하면 구조를 결정할 수 있다.

아미노산의 검출한계를 낮추어서 더 적은 아미노산을 검출하려는 시도는 여러 사람들에 의해 다양하게 이루어졌다. 그 중 modified phenyl-isothio cyanate (PITC) 유도체를 이용하는 방법들 중의 하나로 방사선을 내는 원소를 포함하는 PITC 아미노산이 많은 주목을 받았다.[13] 이 방법은 높은 sensitivity를 보여 주었지만 가격이 바싸고 상품화된 물질의 낮은 순도 때문에 사용에 많은 제한을 받는다. Chang은 아미노산 분석에 있어서 sensitivity를 높이기 위해 dimethylamino azobenzene isothiocyanate(DABITC) 유도체를 사용했다.[14] DABITC로 처리된 아미노산은 PTH 아미노산보다 약 2배만큼 더 큰 몰흡광계수를 나타냈으며 automated seguencer와 함께 사용되었을 때 5 pmol의 검출한계를 보였다.[14] Fluorescence spectroscopy를 이용한 PTH 아미노산의 검출도 여러 사람들에 의해서 보고되었다.[15,16] Fluorescence spectroscopy를 이용하는 경우 UV spectroscopy를 이용하는 검출법보다 상당히 검출한계를 낮출 수 있었다.[15,16]

이 연구는 음이온 화학 이온화 질량분석법(Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry, NCI-MS)를 이용하여 sensitivity가 높은 새로운 아미노산 분석 방법을 개발하고자 시도되었다.

음이온은 주로 resonance capture[17]로 알려진 일련의 과정에 의해 생성되는데, 이것은 thermalized electron이 analyte에 의해 붙잡히게 되어서 음전하를 띠게 된다. Hunt와 Crow는 NCI-MS 방법으로 아민류의 perfluoroacyl 유도체를 attomole(10^{-18} mole) level까지 검출할 수 있다고 보고했다.[18] NCI-MS는 pesticides (약 5pg까지 검출 가능)의 분석에서도 가장 sensitive한 도구로 되어 있으며[19], 대기 오염물질의 분석에서도 multiple ion detection을 이용해서 100 femtogram 이하를 측정했으며[20], chlorinated phenols의 경우 1pg 이하가 측정되었다.[21]

아미노산 NCI-MS를 적용하기 위해 사용된 유도체로는 p-nitro PITC[22], DABITC[14] 등이 있다. 특히 Chang 등에 의해 개발된 DABITC 유도체는 수동[14] 혹은 자동[23] 단백질 sequencing에 성공적으로 사용되었다. 이 연구에서는 아미노산에 전자에 사용된 유도체보다 비교적 간단하면서 강한 전자 포획성 물질인 2, 4-dinitrophenyl(DNP) group을 붙여서 NCI-MS를 시도하였다. 2, 4-dinitrophenyl group(DNP)은 Sanger[24]에 의해 처음 시도된 후 peptide의 유도체로 여러 번 사용되어졌다. 아미노산의 이러한 유도체는 gas chromatography[25], high performance liquid chromatography[26]에 사용되어졌으며 유도체가 노란색을 띠므로 420nm에서 UV 흡광도로 검출할 수 있다.[26]

2. 실 험

실험에 사용한 질량분석기는 Hewlett-Packard 5985B GC/MS이다. Direct insertion probe(DIP)를 이용했으며 electron energy는 70eV였다. 음이온 화학 이온화를 위해서 메탄(CH_4) 가스를 사용했으며 cali-

bration 물질로서는 perfluorotributylamine(PFTBA)와 nitrobenzene을 사용하였다. Calibration을 위해 사용된 이온들은 m/z 123(nitrobenzene), m/z 557 (PFTBA) 이온들이었다.

DNP 아미노산은 다음과 같은 방법으로 만들었다. 아미노산(1~2mg)을 4.2% $NaHCO_3$ 용액 0.2ml 속에 녹인 후 pH를 9로 맞춘다. 1-Fluoro-(2, 4)-dinitrobenzene(FDNB)을 ethanol에 녹여서 5% 용액으로 만든다. 이 용액 0.4ml를 취해 녹아 있는 $NaHCO_3$ 용액에 첨가한 후 1시간 동안 30℃로 유지한다. 반응이 일어나는 동안 pH가 8에서 9 사이를 유지하도록 주기적으로 검사한다. 1시간 후 질소 가스 흐름하에서 ethanol을 제거한다. 반응 후 초과분의 FDNB와 반응의 부산물들을 제거하기 위해 ether로 3번 이상 추출하였다. 물층에 녹아 있는 DNP 아미노산은 6M HCl 용액으로 pH를 1로 바꿔 준다. 그런 다음 ether에 10% ethyl acetate가 녹아 있는 용액으로 4번 더 추출한다. 그런 다음 질소 가스 흐름과 진공하에서(1시간 가량) 용액을 날려 버린다. DNP 아미노산의 에스테르화는 methanol에 기체 HCl을 bubbling시킨 용액을 첨가함으로써 반응이 일어난다. 이때 methanol과 HCl에는 수분이 전혀 없도록 해야 한다. 이렇게 methyl ester를 만드는 이유는 질량분석기를 사용하기 위해서 아미노산의 기화성을 높이기 위함이다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 DNP-valine-methyl ester의 EI spectrum을 보여 주는데, m/z 297이 분자량 peak로써 다른 유도체에 비해 높은 intensity의 M^+를 보여 준다. Methyl ester를 만들지 않고 DNP-free amino acid를 가지고 NCI-MS를 시도했을 때는 분자량 peak를 얻을 수가 없었다. 가장 intensity가 큰 m/z 238 peak는 $(M\text{-}COOCH_3)^+$로 생각되며 이것은 DNP-amino acids-methylester의 질량 스펙트럼에 나타나는 공통되는 특성 peak로서 우리가 원하는 물질이 올바로 생성되었는지를 점검할 수 있는 peak이다. m/z 254 peak는 $(M\text{-}R)^+$로 생각되며 여기서 R은 valine을 결정짓는 isopropyl기 이다. 뿐만 아니라 m/z 210 이하의 여러 많은 이온들이 분자량 이온으로부터 fragmentation되어서 나타나는 것을 볼 수 있다.

같은 물질을 음이온 화학적 이온화 질량 분석법으로 분석하였을 때 놀랍게도 깨끗한 스펙트럼을 얻을 수 있었다(*Fig.* 2). m/z 297 peak는 음전하를 띤 분자량 peak라고 볼 수 있다. 즉 전자를 하나 포획해서 M^-가 되었다고 할 수 있다. 이것은 sample 분자의 electron

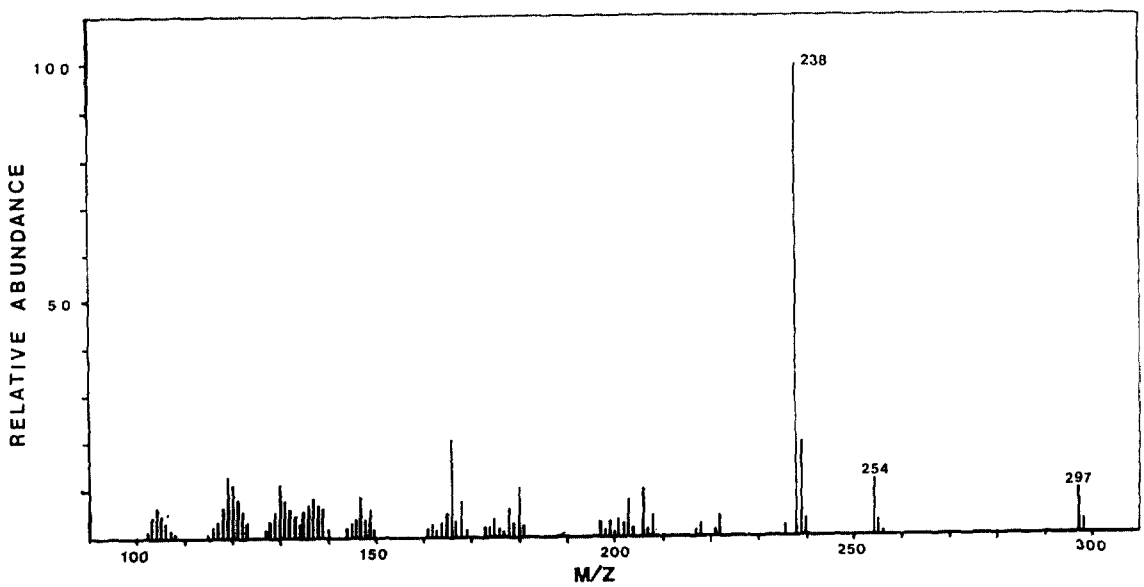

Fig. 1. EI mass spectrum of the DNP derivative of val methyl ester.

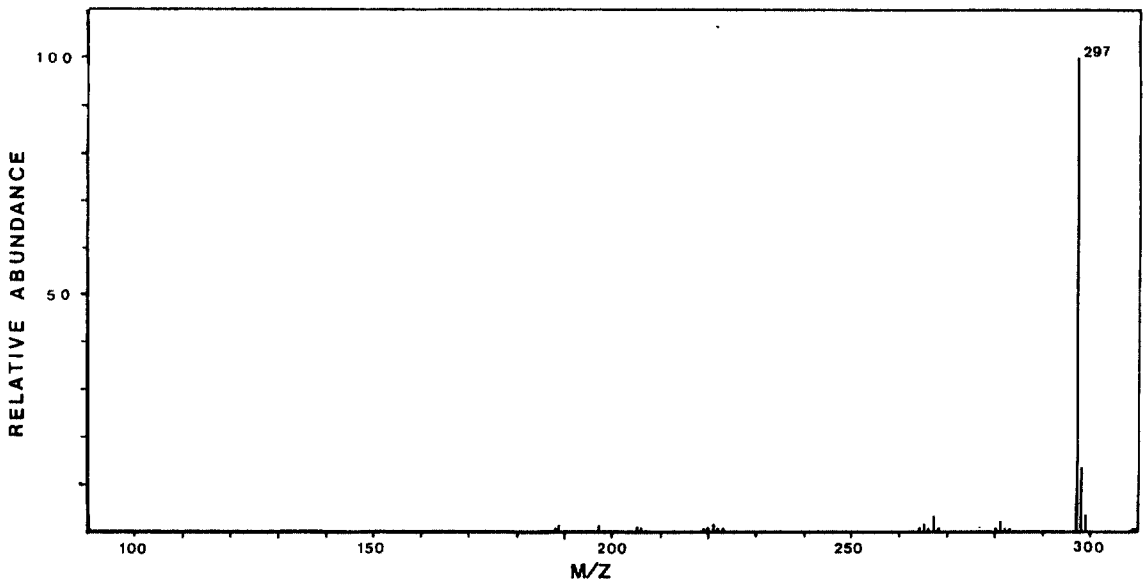

Fig. 2. NCI mass spectrum of the DNP derivative of val methyl ester.

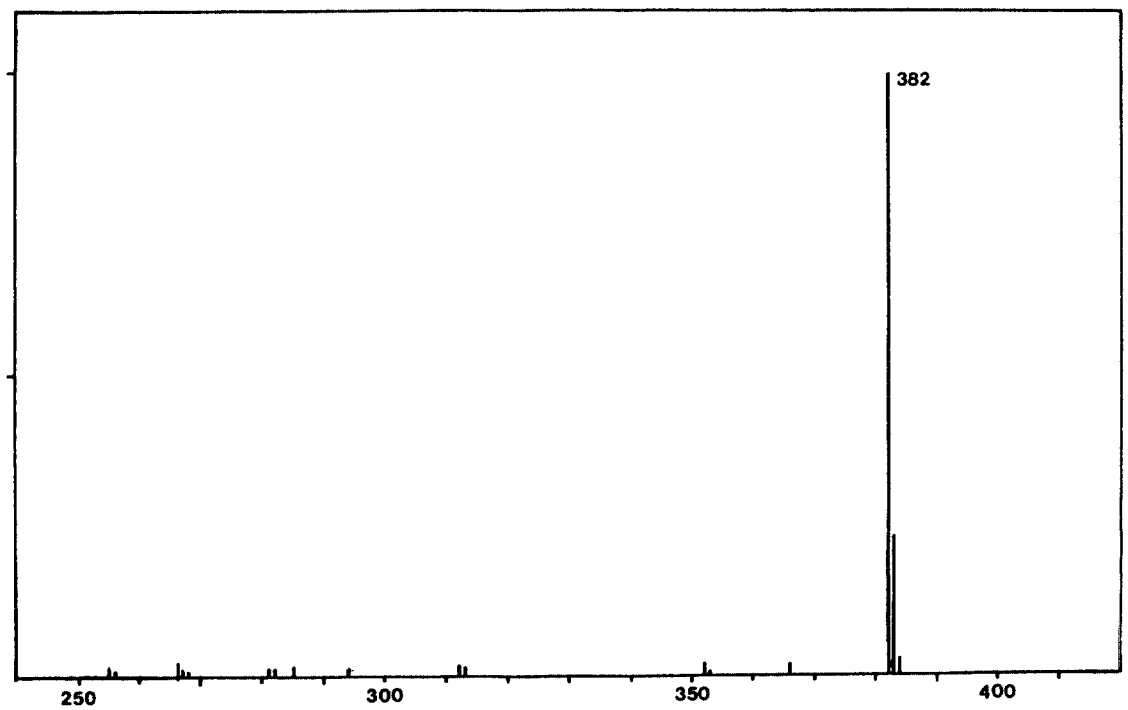

Fig. 3. NCI mass spectrum of the DNP derivative of pro-ser methyl ester.

affinity(EA)가 양인 경우에만 가능하다. 이럴 경우 전자는 에너지 준위가 낮으며 비어 있는 궤도에 들어가게 되며 이런 process를 resonance capture라 부른다.[27] 양이온 화학적 이온화 질량 분석법(PCI)를 이용하면 $(M+1)^+$ peak, $(M+29)^+$ peak, $(M+41)^+$ peak 등이 나타나는데 비해 음이온을 이용하면 M^- peak하나만 나타나므로 아미노산의 mixture를 분석하는 경우에는 음이온을 이용하는 경우가 훨씬 효과적임을 볼 수 있다. 뿐만 아니라 fragmentation이 적고 거의 분자이온 peak만 나타나는 특징은 이 방법이 EI나 PCI에 비해 훨씬 sensitive한 방법이 될 수 있음을 보여 주는 것이다.

Fig. 2를 보면 intensity가 작지만 $(M-NO)^-$ $(M-O)^-$의 fragmentation 이온들이 나타나는 것을 볼 수 있는데, 이는 dissociative resonance capture라는 mechanism을 따라 분자가 쪼개져서 나타나는 peak들이다.[27] 즉 $AB^- \rightarrow A^- + B^{\cdot}$이 되는데, 전자를 포획한 분자 음이온이 repulsive 상태에 있게 되기 때문이다. 음전하를 띤 토막이온이 생기기 위해서는 fragments의 dissociation threshold가 AB의 dessociation threshold 보다 낮아야 한다.

Fig. 3은 di-peptide인 proline-serine의 DNP 유도체를 만든 후 카르복실기를 메틸에스테르화하여 음이온 화학적 이온화 법으로 질량스펙트럼을 얻은 것이다. *Fig.* 2와 같이 분자이온 peak만이 높은 intersity로 나타나며 molecular ion의 fragmentation은 거의 없는 것을 볼 수 있다. 이렇게 음이온을 이용하면 양이온을 이용할 때와는 달리 스펙트럼이 단순화되기 때문에 여러 아미노산이 섞여 있는 혼합물을 크로마토그래피 없이 질량 스펙트럼만으로 확인할 수 있게 된다. 뿐만 아니라 total ion current의 90% 이상의 분자량 peak에 집중되기 때문에 적은 양의 시료도 검출할수 있게 된다. *Fig.* 4는 100 pmol의 여러 가지 다른 아미노산들(Leu, Val, Met)의 혼합물의 음이온 화학 이온화 질량 스펙트럼을 보여 주고 있다. 각 성분들을 질량 스펙트럼만으로도 잘 확인할 수 있음을 보여 준다.

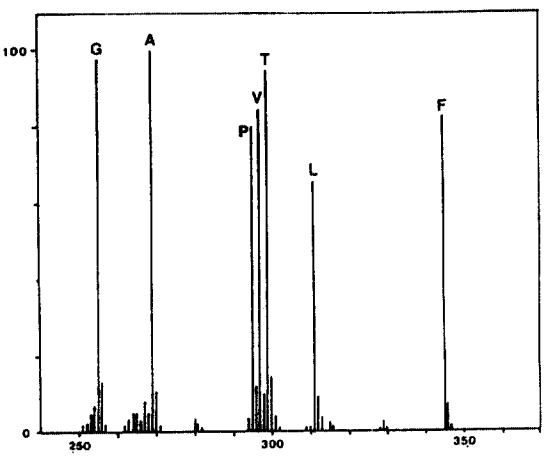

Fig. 4. NCI mass spectrum of the mixtures of DNP derivative of leu, val, methyl ester.

4. 후 기

연구비를 지원해 주신 학술진흥재단에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. P. Edman and G. Begg, *Eur. J. Biochem.* **1**, 80 (1967).
2. R. A. Laursen, *Eur. J. Biochem.* **20**, 89(1971).
3. R. M. Hewick, M. W. Hunkapiller, L. E. Hood, and W. J. Dreyer, *J. Biol. Chem.* **256**, 7990(1981).
4. B. Wittman-Lieboild, "Methods in Protein Sequence Analysis", M. Elzinga, (ed.), Humana Press, Clifton, N. J. (1982) pp. 27-63.
5. N. D. Johnson, M. W. Hunkapiller, and L. E. Hood, *Anal. Biochem.* **100**, 335(1979).
6. D. Hawke, P. M. Yuan, and J. E. Shively, *Anal. Biochem.* **120**, 302(1982).
7. E. Mendez and C. Y. Lai, *Anal. Biochem.* **68**, 47 (1975).
8. D. Tripier, "Methods in Protein Sequence Analysis", M. Elzinga (ed.), Humana Press, Clifton, N. J. (1982) pp. 519-527.
9. T. Fairwell, W. T. Barnes, F. F. Richards, and R. E. Lovins, *Biochem.* **9**, 2260(1970).
10. T. Fairwell, *Meth. Enzymol.* **91**, 502(1983).
11. H. R. Schulten and B. Wittmann-Liebold, *Anal. Biochem.* **76**, 300(1976).
12. A. Benninghoven and V. Anders, *Org. Mass Spectrom.* **19**, 345(1984).
13. J. Silver and L. Hood, *Anal. Biochem.* **67**, 392 (1975).

14. J. Y. Chang, E. H. Creaser, and K. W. Bentley, *Biochem. J.* **153**, 607(1976).
15. J. J. L'Italien and S. B. H. Kent, *J. Chromatogr.* **283**, 149(1984).
16. S. W. Jin, G. X. Chen, Z. Palacz, and B. Wittmann-Liebold, FEBS Lett. **198**, 150(1986).
17. H. Budzikiewicz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20**, 624(1981).
18. D. F. Hunt and F. W. Crow, *Anal. Chem.* **50**, 1781(1978).
19. S. J. Stout and W. A. Steller, *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 207(1984).
20. M. Oechme, *Trends in Anal. Chem.* **1**, 321(1982).
21. S. Shang-Zhi and A. M. Duffield, *J. Chromatogr.* **284**, 157(1984).
22. G. E. Tarr, "Methods in Protein Microcharacterization", J. E. Shively, (ed.), Humana Press, Clifton, N. J. (1986) pp. 154-194.
23. J. Salnikow, A. Lehmann and B. Wittmann-Liebold, *Anal. Biochem.*, **117**, 433(1981).
24. F. Sanger, *J. Biochem.* **39**, 507(1945).
25. N. Ikekawa, O. Hoshino, R. Watanuki, H. Orimo, T. Fujita, and M. Yoshikawa, *Anal. Biochem.* **17**, 16(1966).
26. J. Rosmus, and Z. Deyl, *J. Chromatogr.* **70**, 221 (1972).
27. H. Budzikiewicz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **20**, 624(1981).