

아미노산 분석기 사용 가이드

Manual For Amino Acid Analyzer

서문

이 책은 (주)아주과학에서 공급하는 Sykam GmbH의 아미노산 분석기 사용자의 쉬운 이해와 사용을 위해 작성된 책입니다.

아미노산 분석기는 그 뿌리가 HPLC에 두고 있어 HPLC와 별반 다를 것 없는 사용법이 적용될 것 같아 보이지만 그 내부 구조가 HPLC에 비해 매우 복잡하며 분석의 특성상 잔고장이 생길 확률이 높습니다. 한번의 잘못된 분석으로 그 즉시 아미노산 분석기의 주요 핵심 부품이 망가져 분석 진행이 불가능 할 수도 있습니다. 그렇기에 항상 사용자의 세심한 사용과 주의가 필요합니다.

주기적인 워크샵을 통한 대면 교육만으로는 분명히 부족한 부분이 있을 수밖에 없습니다. 워크샵은 보편적인 내용과 간략한 진행으로 상세하고 개인간의 개별적 교육이 힘들다는 단점이 있습니다. 또한 그 모든 내용을 사용자가 기억하고 적용하는 것 또한 불가능에 가깝습니다.

오랜만에 장비를 사용하기 위해 전원을 켜지만 앞이 막막할 때, 분석 도중 궁금하거나 문제가 발생했을 때 사용자가 느끼는 막연한 두려움은 분석장비를 사용해본 사람들이라면 누구나 이해하고 있을 감정이라고 생각합니다. 특히 장비가 비싸면 비쌀수록 그 감정의 크기는 커집니다.

이 책은 이러한 상황에서 두고두고 볼 수 있으며 단순히 형식적인 내용이 아닌 실제로 사용해오면서 느낀 유용한 팁이나 반드시 알아 두어야 할 항목들 등 여러분이 아미노산 분석기를 사용하는데 있어서 필요할 만한 것들을 최대한 모아 놓은 책입니다.

(주)아주과학

이 책에서는 반복적으로 나오는 표시가 있습니다.
3개의 표시가 있으며 각 표시는 다음과 같은 의미를 지닙니다.

이 항목은 절대적인 규칙입니다.
지켜지지 않을 경우 사용자와 분석장비에 비가역적인 피해를 줄 수 있습니다.



이 항목은 경고 및 강력한 권고 사항입니다.
지켜지지 않을 경우 분석의 신뢰도 하락 및 잠정적인 피해를 줄 수 있습니다.



이 항목은 추천 및 참고 사항입니다.
분석의 최적화와 장비의 수명 및 성능을 위해 추천 및 참고해야될 항목입니다.



이 책은 크

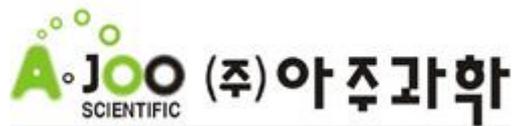
게 여덟가지 항목으로 나뉠 수 있습니다.

1. *Quick Start Guide*
2. *아미노산 분석의 이해*
3. *아미노산 분석기의 이해*
4. *아미노산 분석기 사용 방법*
5. *데이터 처리*
6. *주의사항*
7. *트러블 슈팅*
8. *부록*

위와 같이 총 여덟가지의 항목으로 분류해 아미노산 분석과 아미노산 분석기에 대한 이해를 돕고자 합니다.

1. QUICK START GUIDE

간략한 아미노산 분석기 사용 방법



본 항목은 간략한 아미노산 분석기 사용법입니다.

확실하게 기억이 나지 않으시거나 세부사항 확인을 위해선 반드시

'4. 아미노산 분석기의 이해' 항목을 참고해 문제 없으시길 바랍니다.

아미노산 분석기 사용방법은 아래와 같습니다.

아미노산 분석기 가동 절차	
순서	항목
1	가스 압력 및 용액병 밸브 확인
2	전원 인가 후 연결 확인
3	용액 퍼징 및 니들 세척
4	압력 및 온도 안정화 작업
5	시퀀스 작성 후 분석 시작
6	분석 데이터 처리

1. 가스 압력 및 용액병 밸브 확인

- 가스 압력 공급기와 S7130 Oraginzer의 압력이 모두 0.5~ 1.0 bar 이내인지 확인
용액병의 밸브가 알맞게 열려있는지 확인

2. 전원 인가 후 연결 확인

- 장비의 전원스위치를 누른 뒤 Clarity 소프트웨어를 켜올 때 오류 없이 모든 기기와 연결 확인

3. 용액 퍼징 및 니들 세척

- flow 설정시 적정 압력이 걸리는지 확인, 안 걸리면 퍼징 작업 실시
- Clarity Device Monitor에서 Autosampelr need wash(to injectino port, 50%) 3회 실시 후 확인

4. 압력 및 온도 안정화 작업

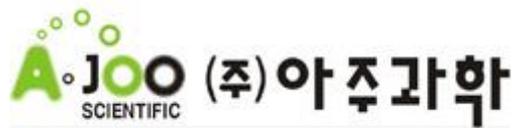
- buffer: 0.45 ml/min 일때 압력이 35~80 bar 이내로 걸리는지
- Reag/H₂O: 0.35 ml/min 일때 압력이 11 ~ 20 bar 이내로 걸리는지 확인
- 설정된 온도에 도달하기 까지 대기

5. 시퀀스 작성 후 분석 시작

- 반드시 Idle Time : 3분 설정
- 첫 injection은 2회 Bypass run

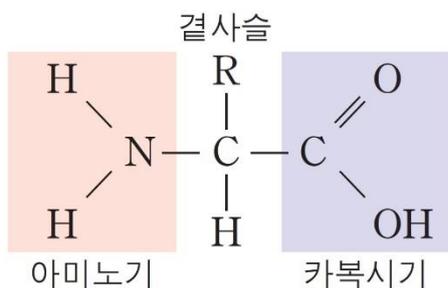
2. 아미노산 분석의 이해

아미노산의 구조와 성질에 대한 이해와 그에따른 분석 방법



2. 아미노산 분석의 이해

2.1. 아미노산의 이해



<아미노산의 구조>

아미노산의 기본적인 구조는 아미노기, 카복시기가 단일 결합으로 탄소와 결합한 구조이기 때문에 특수한 아미노산 몇 개를 제외하면 일반적으로 아미노산은 UV/Vis 광선에 대한 흡광, 형광 반응성이 없습니다. 펩타이드 체인의 경우 190nm에 꽤 감도 좋은 흡광 반응을 보여주지만 현실적으로 200nm 이하의 파장으로는 분석하기가 힘듭니다.

따라서 아미노산 분자와 특정 물질을 반응시켜 발색체를 만들어 이를 검출하는데 이때 발색체를 만드는 과정을 유도체화 반응(derivatization)라고 합니다.

아미노산의 분석은 일반적으로 아미노산을 직접 검출하는 것이 아닌 아미노산들을 일괄적으로 유도체화 반응을 통해 발색체(유도체)를 형성하고 이 유도체를 검출하는 방식입니다. 즉, 간접적인 검출 방법을 사용하며 이에 따라서 내부표준물질(ISTD) 사용시 큰 장점을 가집니다.

아미노산의 분석 방법은 유도체화 과정의 순서에 따라 크게 두 가지로 나뉩니다.

Pre-column derivatization 컬럼 전 유도체화	Post-Column derivatization 컬럼 후 유도체화
적은 시약 소비 높은 분리도	분석 가능한 종류 다양 베이스라인이 안정적
베이스라인 노이즈 분석 가능한 종류의 한계	시약 소비량이 많음

<분석 방법에 따른 장단점 비교>

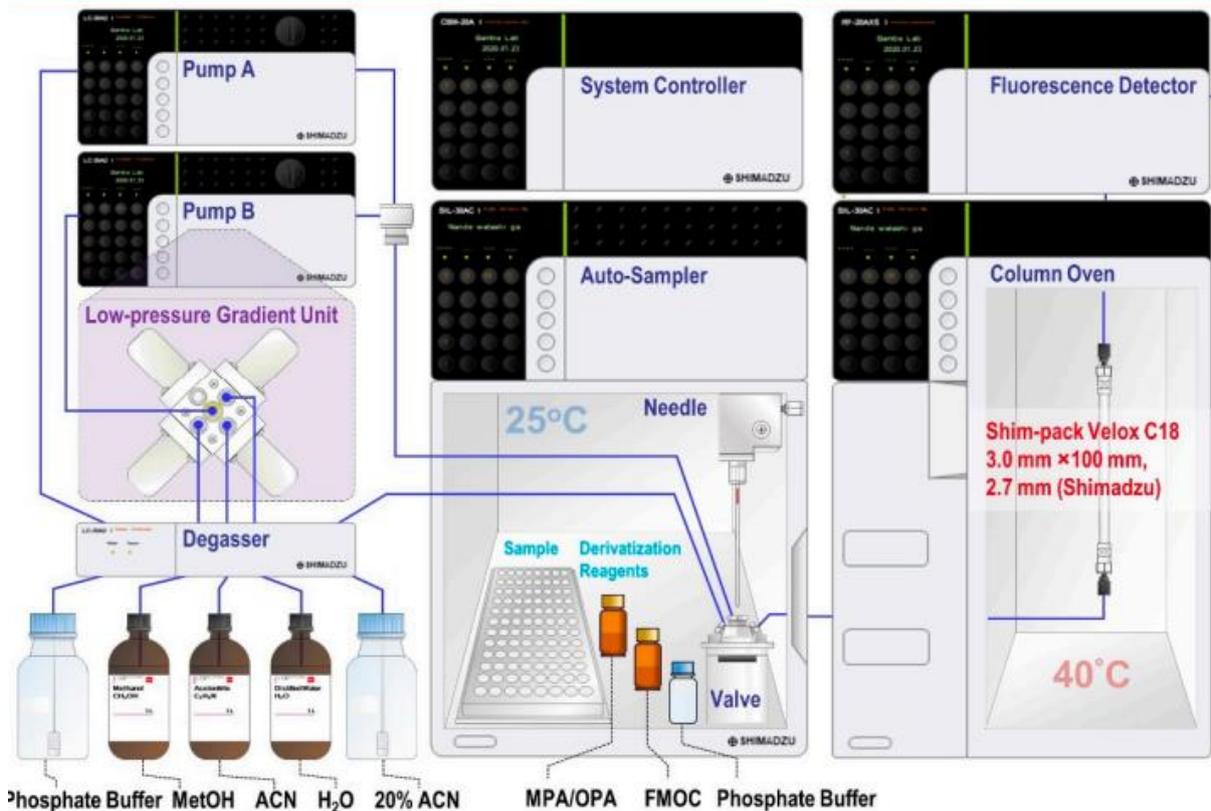
컬럼 전 유도체화 방식(Pre-column derivatization)은 시료(Sample) 내 아미노산의 유도체화 반응을 진행한 뒤 분석을 시작합니다. 이때 사용자가 직접 유도체화 반응을 진행하거나 HPLC시스템의 Autosampler에서 진행되는 방법이 있습니다. 이를 Off-Line Derivatization이라고도 합니다.

정량성과 재현성이 상대적으로 떨어지며 사용자의 숙련도에 따라 분석결과의 편차가 큼니다. 분석을 원하는 대상에 따라 다양한 방법의 유도체화 방법과 다양한 종류의 시약이 사용되기에 분석 자유도는 높지만 그만큼 실험자의 높은 숙련도가 요구됩니다.

컬럼 후 유도체화 방식(Post-column derivatization)에 비해 초고감도 분석이 가능하며 상대적으로 적은 양의 시약 소비 그리고 간단한 장비 구성 등의 장점이 있습니다.

일반적으로 아미노산 분석기가 아닌 HPLC 등에 추가적인 장치를 통해 아미노산 분석을 시행할 때 주로 사용되는 유도체화 방법입니다.

iPDAQ: in-needle Pre-column Derivatization for Amino acids Quantification



Pre-Column Derivatization example, "Metabolites 2022, 12, 807"

위와 같이 Autosampler 내의 Injection Needle에서 유도체화 반응이 진행됩니다. 일반적으로 MPA/OPA 시약이 주로 사용됩니다.

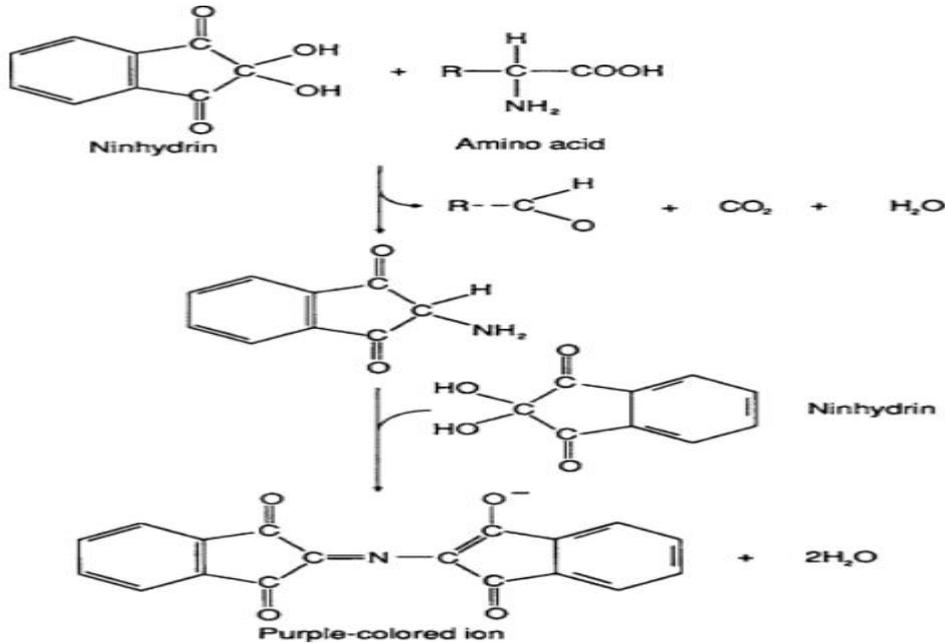
컬럼 후 유도체화 방식(Post-column derivatization)은 분석물의 유도체화 반응이 컬럼을 통과한 후에 진행됩니다. 컬럼 전 유도체화 방식에 비해 획일화, 자동화된 분석 방법입니다.

유도체화 반응은 반응로(Reactor) 라는 장치에서 진행되며 고온에서 반응이 진행됩니다.

Reactor의 유형에는 Column을 사용하는 Reactor Column, Coil을 사용하는 Reactor Coil 형태가 존재하며 Sykam Amino Acid Analyzer는 모두 Reactor Coil 방식을 채택했습니다.

유도체화 반응이 분석 도중 기기 내에서 이뤄지기 때문에 **정확성, 재현성**이 뛰어납니다.

여러가지 유도체화 방법이 있으며 대표적으로 ninhydrin을 이용한 유도체화 발색반응이 있습니다.



아미노산의 발색반응

Ninhydrin의 발색 반응은 위와 같은 과정을 거칩니다.

Ninhydrin은 강력한 산화제로써 암모니아 혹은 아민기(-NH₂)와 반응하여 유리시키게 됩니다.

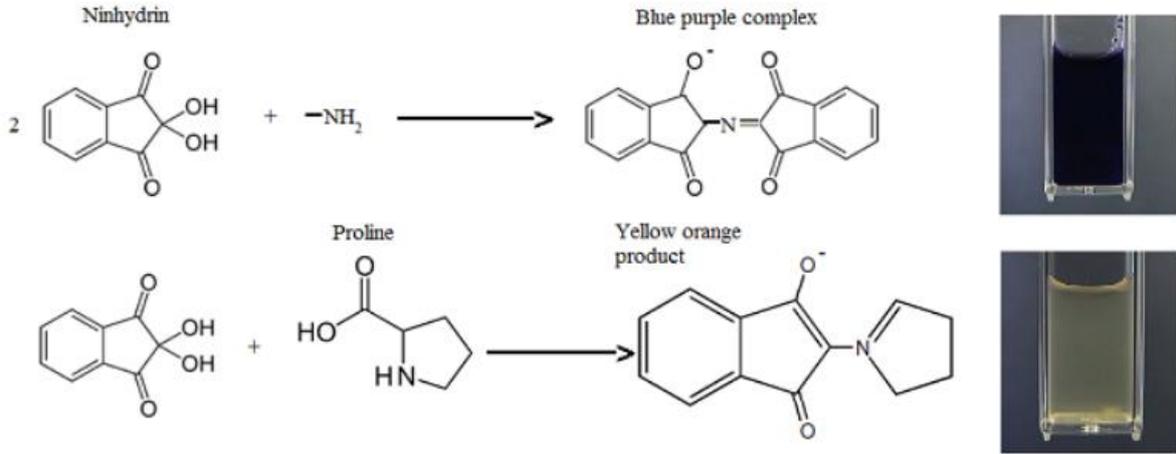
이때 Ninhydrin은 Hydrindantin으로 바뀌며 Hydrindantin과 Ninhydrin이 반응해 최종적으로 발색체를 형성하는데 이를 **ruhemann's purple**이라고도 합니다.

즉, 아미노산의 Ninhydrin과의 정수배의 반응을 통해 생성된 유도체를 검출해내는 방식입니다.

이때 당연히 정수배로 반응하기에 정량 역시 가능합니다.

다만 프롤린과 하이드록시프롤린의 경우 아민기(-NH₂)가 아닌 이미노기(-NH)가 존재하는 이미노산¹ 이기에 발색되는 색이 **주황색**이 됩니다.

¹ Proline, Hydroxyproline 계열의 물질들, 정확한 명칭은 아님



아미노산과 프롤린의 발색반응과 발색

일반적인 아미노산은 청자색 유도체가 생성되기 때문에 570nm 구간의 빛을 잘 흡수하지만 Proline은 주황색 유도체가 생성되기 때문에 570nm 구간의 빛을 잘 흡수하지 못합니다.

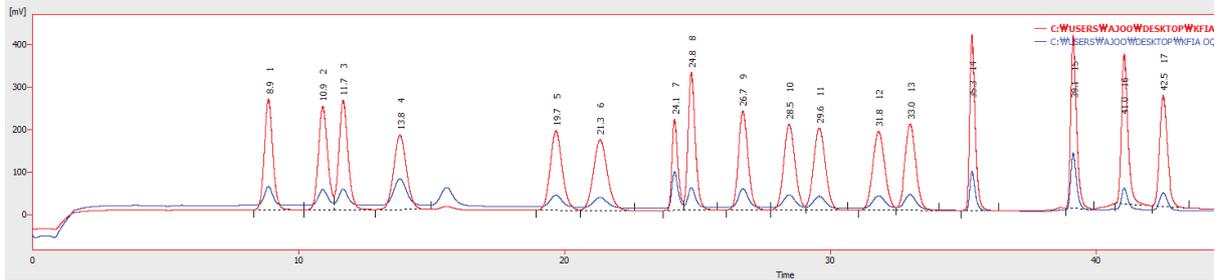
따라서 이러한 이미노산 분석을 위해 추가적으로 440nm 구간의 빛을 사용하여 검출하게 됩니다.

2.2. 크로마토그래피법

아미노산 분석기는 HPLC에 기반을 둔 분석 장비입니다.

따라서 분석 방법 역시 **크로마토그래피법**을 사용합니다.

분석이 끝나면 시스템은 해당 분석 데이터를 **크로마토그램** 형식으로 저장하게 됩니다.



<표준 분석 물질의 크로마토그램>

위 사진과 같이 검출된 신호와 데이터들은 크로마토그램 형식으로 저장됩니다.

크로마토그램에서 검출된 데이터, 각 곡선을 **Peak**라고 칭합니다.

위 크로마토그램에선 빨간선을 기준으로 총17개의 Peak가 존재합니다.

X축은 시간(Time), Y축은 Detector Response입니다.

Response는 Detector가 **반응하는 정도(흡광도)**를 나타냅니다. 이동상이 지나갈 때의 Response가 Baseline이 되며 분석물이 지나갈 때 변하는 Response값이 기록되고 이를 수치화 하여 컴퓨터로 전송하게 됩니다. 아미노산 분석기는 흡광도 분석을 하기에 AU 혹은 mV 단위를

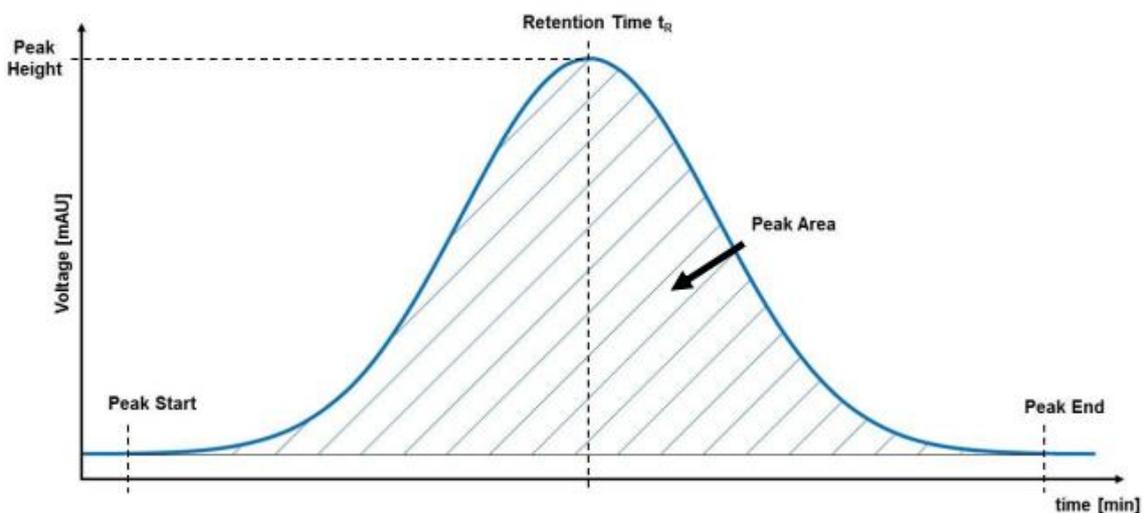
Response의 단위로 사용하게 됩니다. 이때 이동상이 지나갈 때 Response는 Baseline이 되며 분석물이 지나갈 때 Response값이 증가하게 되며 이 형태는 가우스 곡선(혹은 Error Function)의 양상을 띄게 됩니다.

Peak의 최대 높이를 **Height**, Peak와 적분 기준선이 이루는 영역은 **Area**입니다.

일반적으로 검출된 물질의 **양(Amount)**은 Response에 의해 결정되는데 이때 Area 혹은 Height 중 하나가 기준이 돼 결정됩니다. 일반적으로는 면적(Area) 값을 물질의 양으로 둡니다.

Peak의 극댓값에서의 시간을 **머무름 시간(Retention Time)**이라고 합니다.

해당 Peak가 어떤 물질이냐는 그 물질의 머무름 시간(Retention Time; RT)에 의해 결정됩니다.

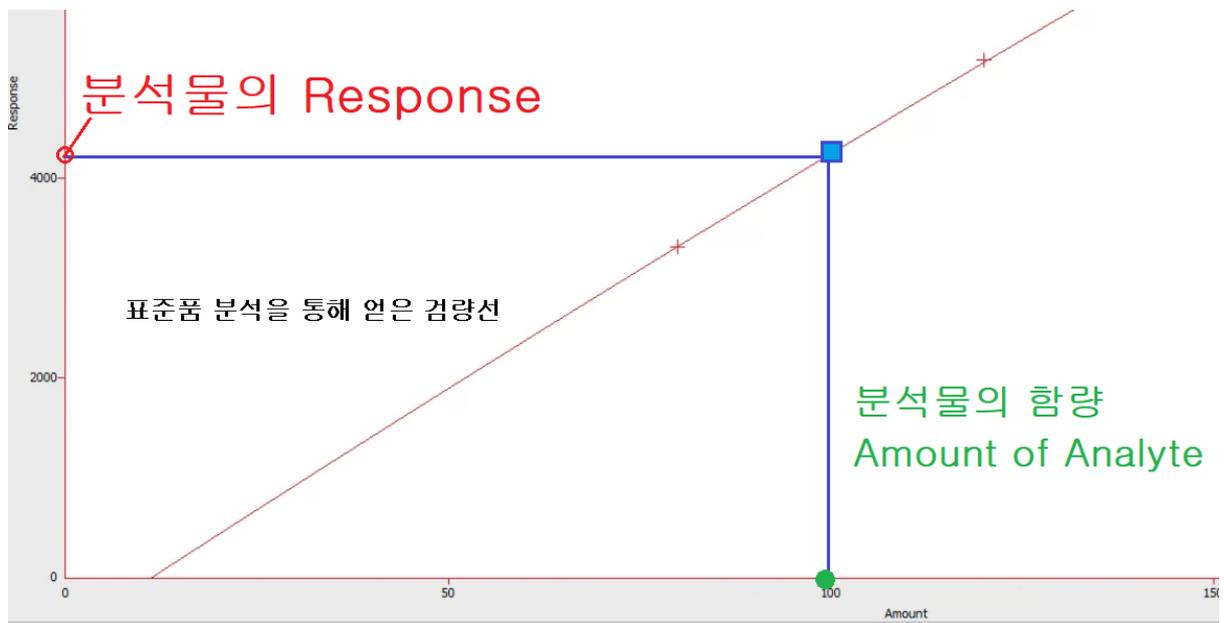


분석이 끝났다면 이제 얻어진 크로마토그램에서 알맞은 형태로 가공하는 **적분**이 필요합니다. 우리가 수학에서 다루던 **적분(Integration)**이라는 것은 그래프와 축이 이루는 넓이를 구할 때 사용합니다. 이와 마찬가지로 크로마토그래피법에서 적분이란 Peak의 넓이값을 구하는 과정입니다. 이 과정에서 Peak의 시작점, 끝점 그리고 Baseline을 정해주는 것이 수학에서 적분과 동일하기에 적분이라고 불립니다.

Peak 의 적분 값을 Peak Area라고 합니다.

일반적인 분석은 모두 Peak Area를 통해 정량하게 됩니다.

적분이 끝난 크로마토그램과 피크들의 정량은 전형적인 크로마토그래피법의 정량 방법인 **교정곡선** 혹은 **검량선(calibration curve)**를 통한 정량을 하게 됩니다. 먼저 다양한 농도로 분석된 표준 분석 물질(Standard Solution)을 분석합니다. 이후 이들을 가공하여 검량선(calibration Curve)를 얻습니다. 검량선은 일반적으로 직선 형태, $Y = AX + B$ 형태로 얻어지게 됩니다.



검량선과 분석물의 Response의 관계

Y축은 Response, X 축은 함량(Amount)의 관계로 얻어지며 이때 미지의 시료를 검출했을때의 Response를 $Y = AX + B$ 식에 대입하여 시료의 Response에 해당하는 Amount를 얻게 됩니다. Analyte Peak의 Response, 즉 Peak의 넓이에 해당하는 Y값을 방정식에 대입해 X값을 얻어내는 것이 정량입니다.

Sykam 아미노산 분석기는 One Point Calibration을 지원합니다.

따라서 일반적으로 단일 농도의 표준품만 분석해 검량선 작성이 가능합니다.



2.3. 표준 분석 물질

여느 크로마토그래피법과 마찬가지로 아미노산 분석은 정성분석²이 불가능합니다.

따라서 **표준품 분석을 통한 정성 및 정량**이 이뤄져야 합니다.

같은 시료를 분석한다고 해서 항상 같은 값과 결과가 검출되는 것이 매우 이상적이겠지만 현실적으로 기계의 안정화 정도, 시약의 미세한 pH 차이, 이온 농도 차이, 온도 차이 등 다양한 변수에 의해 같은 시료를 분석해도 상황별로 상대적으로 다른 값이 나올 수 있습니다. 그래서 그 상대적인 검출값을 비교할만한 절대적인 비교선이 있어야 합니다.

이러한 비교선에 **표준 분석 물질(표준품; Standard solution)**을 사용합니다.

표준 분석 물질은 정성 및 정량 된 아미노산들이 들어있는 **시료(sample)**입니다.

분석에 있어 비교될 **절대적 기준점**이 되는 것이 **표준 분석 물질, Standard**입니다.

어떤 시료를 분석할 것인지, 어떤 아미노산을 분석하고 싶은 지 즉 내가 어떤 방식의 분석방법 (Hydrolysate, Physiological)을 사용할 것인지에 따라 다른 표준 분석 물질이 사용됩니다.

표준 분석 물질(standard)에는 크게 두가지 종류로 나눌 수 있습니다.

첫번째는 Sykam 등 특정 회사에서 판매하는 Standard Solution입니다. 이들은 Standard Solution의 함량, 성분에 대한 보증이 전적으로 판매 회사에 있기에 사용하기 간편하다는 장점이 있습니다. 단점으로는 정해진 아미노산들만 분석할 수 있으며 비교적 가격이 비싸다는 점이 있습니다

두번째는 자체적으로 제작하는 Standard Solution이 있습니다.

분석을 원하는 아미노산이 특수아미노산 등 표준품에 포함돼 있지 않거나

SST(System Suitability Test)를 위해 특정 아미노산만 포함하고 있는 표준품이 필요할 때 직접 제작할 수 있습니다. 이 경우 제조 즉시 사용 가능해 비교적 아미노산 보존이 잘 된다는 점, 분석 단가가 싸다는 장점이 있지만 이 경우 Validation of Compendial Procedure³ 혹은 시험방법 밸리데이션⁴에서 추가적인 Validation이 요구될 수도 있다는 단점이 존재합니다.

² 물질의 종류와 형태를 알 수 있는 분석

³ USP<1225> 일련의 분석과정에 대한 검정에 대한 내용을 제시하는 미 약전

⁴ 식약처에서 제시하는 일련의 분석과정에 대한 검정에 대한 내용을 제시하는 식품의약품안전처 문서

2.4. 아미노산 분석의 종류

아미노산의 분류에는 다양한 방법이 있겠지만 아미노산을 분석하는 입장에서 아미노산을 분류하자면 크게 세가지 형태로 나눌 수 있습니다.

구성 아미노산	유리 아미노산	단백질결합 아미노산
<ul style="list-style-type: none">• Combined amino acid• Total Amino Acid• 아미노산이 펩타이드 결합으로 사슬형태로 이어진 형태	<ul style="list-style-type: none">• Free Amino Acid• 아미노산이 개별로 존재	<ul style="list-style-type: none">• Protein bounded Amino Acid• 아미노산이 단백질에 결합된 형태

전처리 방법에 따른 아미노산 분류

위와 같이 아미노산은 전처리 방법에 따른 분류로 크게 세가지로 나눌 수 있는데 구성 아미노산, 유리 아미노산, 단백질결합 아미노산으로 나눌 수 있습니다.

이때 전처리 방법이란 시료를 분석에 적합한 형태로 가공하는 일련의 과정을 의미합니다.

구성 아미노산(Combined Amino Acid)은 단백질 혹은 폴리 펩타이드라고도 하는데, 아미노산들이 탈수축합 반응을 통해 결합하는 펩타이드 결합을 통해 사슬 형태로 이어진 형태입니다.

유리 아미노산(Free Amino Acid)는 아미노산이 구성 아미노산과는 다르게 개별적으로 존재합니다. 일반적으로 혈장, 혈청, 뇌수, 양수 등에 다수 존재합니다.

단백질결합 아미노산(Protein combined Amino Acid)는 아미노산이 단백질에 겹가지처럼 결합된 형태를 의미합니다. 대표적으로 모발이 이러한 형태를 띄고 있으며 가지처럼 붙어있는 유리아미노산을 분석할지, 겹가지를 제거하고 단백질을 분석할지에 따라 다른 전처리 방법이 필요합니다.

Sykam Amino Acid Analyzer는 컬럼 전, 후 유도체화 방법 모두 적용 가능한 장비입니다.

다만 최근 추세로는 대부분의 아미노산 분석이 컬럼 후 유도체화 방법, 특히 ninhydrin 유도체화법을 주로 사용합니다. 따라서 이 책에서는 Ninhydrin 법을 이용한 분석만 다룹니다.

아미노산 분석법은 크게 두가지로 나눌 수 있습니다.

하나는 **가수분해물 분석(Hydrolysate Program)**이며

나머지 하나는 **생리물질 분석(physiological Program)** 입니다.

명명법의 차이는 각 분석법이 대표적으로 분석하는 물질들에 따라 나뉩니다.

가수분해물 분석의 경우 단백질, 폴리펩타이드 등을 유리 아미노산 형태로 분해하기 위해 산가수 분해 과정을 거치게 되며 이 과정에서 제거되지 않는 18~20 종의 아미노산만을 분석합니다.

이때 사용하는 시약은 Sodium(Na) Buffer를 사용하기 때문에 **Sodium System**이라고도 합니다.

생리물질 분석은 유리 아미노산을 분석하는 분석법입니다. 35, 54 종의 아미노산을 대표적으로 분석하며 비교적 간단한 전처리 과정을 거치기에 분석할 수 있는 아미노산이 다양합니다.

대표적으로 혈장, 혈청, 척수액, 뇌수, 양수 등 체내에 있는 물질들이 분석되기에 생리물질 분석이라고 하며 사용하는 시약은 Lithium(Li) Buffer를 사용하기 때문에 **lithium system**이라고도 합니다.

리튬은 소듐보다 크기가 작아 더 세밀한 분리가 가능합니다. 다만 컬럼의 압력이 높아지고 베이스라인이 소듐에 비해 상대적으로 불안정합니다. 소듐의 경우 적은 아미노산을 분석하지만 빠른 분리와 낮은 압력 그리고 안정적인 베이스라인을 보여줍니다.

가수분해물 분석은 분석 시간이 짧고 적은 종류의 시약이 필요하지만 전처리 과정에서 파괴되는 아미노산들이 많아 분석 가능 아미노산이 18~20종으로 제한적입니다.

또한 전처리 과정에 따라 분석 결과가 크게 바뀌게 됩니다. 따라서 사용자의 실력이 가장 크게 작용하는 분석법이기도 합니다.

생리물질 분석은 분석 시간이 길며 가수분해물 분석에 비해 필요한 시약의 종류가 더 많습니다.

리튬의 크기가 소듐의 크기보다 작기 때문에 보다 세밀한 분리가 가능합니다.

분석가능한 아미노산의 종류가 다양하며 전처리 과정이 상대적으로 쉽다는 장점이 있습니다.

가수분해물 분석 Hydrolysate Program	생리물질 분석 Physiological Program
Baseline이 안정적이고 빠른 분석이 가능 소듐(Na) 종류의 시약을 사용	다양한 종류의 아미노산 분석이 가능하다. 전처리 과정이 상대적으로 간단하다. 리튬(Li) 종류의 시약을 사용
분석가능한 아미노산의 종류가 적다. 전처리 과정이 다양하며 복잡하다.	분석 시간이 길다. Baseline이 Na System에 비해 높다. 사용되는 시약이 많으며 소모량이 많다.
사용되는 시약: Ninhydrin, Na-Buffer A, B, D	사용되는 시약: Ninhydrin, Li-Buffer A, B, C, D

*Buffer D = Regeneration Solution = 재생 용액

2.5. Gradient Separation

아미노산은 그 구조가 비슷한 물질들을 통칭하는 단어입니다. 이는 필연적으로 아미노산의 분리가 상당히 어려울 것이라는 것을 알 수 있습니다.

크로마토그래피법에서 물리, 화학적 성질이 비슷한 물질의 경우 분리가 어렵습니다.

하지만 다행히도 아미노산들의 경우 pH, 온도에 따라서 분리가 가능한 특징이 있습니다. 이렇듯 아미노산별로 각기 다른 pH, 온도 민감성을 이용해 아미노산의 분리가 가능합니다. 이러한 성질을 이용해 아미노산 분리는 매우 복잡한 Gradient Separation이 적용됩니다.

일반적으로 HPLC에서의 Gradient Separation의 경우 유기용매와 물의 비율을 조정해 이동상의 극성을 조절하는 경우가 대부분이지만 아미노산 분석의 경우 다양한 Citrate Buffer끼리의 pH와 Molarity를 조절하며 Column의 온도까지 Gradient에 이용합니다.

따라서 임의로 Gradient를 변경하는 것은 매우 조심해야 합니다.

일반적인 분석의 경우 정해진 종류의 buffer와 정해진 Gradient Table을 제공합니다.

Hydrolysate Program의 경우 A-1/B-1/Reg. Sol 혹은 A-4/A-5/B-1/Reg. Sol이 사용되며 Physiological Program의 경우 A-1/B-1/C-4/Reg. Sol 등이 이용됩니다.

대부분의 사용자들은 Na Buffer를 사용하는 Na system을 많이 사용합니다.

최근 아미노산 분석의 흐름이 유럽 약전(european pharmacopoeia)의 아미노산 분석법 항목에서 제시하는 시스템적합평가(SST)의 조건인 ILUE-LEU Resolution > 1.5 조건을 만족하기 위해선 A-4/A-5/B-1/Reg.sol 을 사용해야 합니다.

만약 특수 아미노산의 분리 등이 필요한 경우 사용하는 Buffer의 변경과 Gradient Table 변경이 요구될 수도 있습니다.

이러한 경우가 아니라면 Gradient Table 등 Separation에 영향을 주는 무언가를 사용자가 임의로 변경하는 것은 권고되지 않습니다. 만약 변경이 이뤄진다면 이는 분석법유효증명 등이 추가로 요구될 수 있습니다.

2.6.1. 가수분해물 분석(Hydrolysate Program)

대부분의 아미노산 분석은 가수분해물 분석을 통해 진행됩니다.

곡물, 고기, 사료 등은 대개 시료 안에 아미노산이 **유리 아미노산(free Amino Acid)** 형태가 아닌 단백질, 펩타이드 사슬 형태인 **단백질 구성 아미노산 (combined Amino Acid)** 형태로 존재하게 됩니다. 이렇기에 바로 시료혹은 검체를 채취해 분석하면 원하는 결과를 얻을 수 없습니다.

단백질의 합성은 아미노산 등의 펩타이드 단위체가 탈수축합반응을 통해 형성됩니다.

따라서 이의 역반응인 가수분해 반응을 통해 결합 사슬을 끊어 유리 아미노산 형태로 만들어주는 **산 가수분해 전처리 과정**이 필수로 요구됩니다.



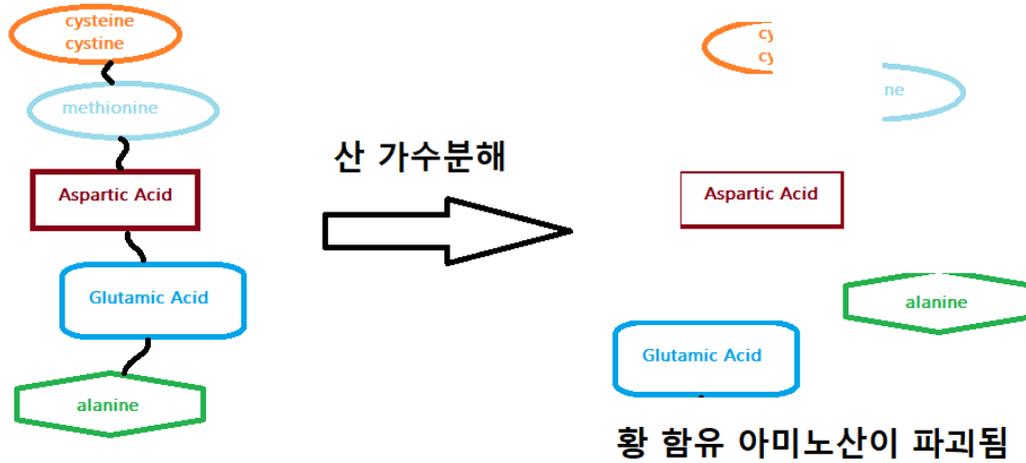
일반적으로 6M HCl의 산과 섭씨 110도의 열을 가하기 때문에 대부분의 아미노산들이 파괴되거나 변성됩니다. 따라서 산과 열에 안정적인 18~20 종의 아미노산만 남게 됩니다.

인간은 아미노산을 대부분 섭취를 통해 얻습니다. 이때 위산이라는 강산을 이겨내고 흡수되기 때문에 산과 열에 안정한 아미노산들의 대부분은 인간에게 필수적인 **필수 아미노산**이라고 합니다.

즉, 인간에게 필요한 아미노산들이 대부분 산과 열에 안정적이기 때문에 주로 사용되는 분석법인 것입니다.

가수분해된 시료의 경우 분석가능한 종류가 많지 않기 때문에 비교적 분리가 빠르고 베이스라인이 안정적인 Sodium System을 사용합니다.

모든 필수 아미노산이 산과 열에 안정적이면 좋겠지만 개중 **황함유아미노산**인 시스틴(Cystine), 시스테인(Cysteine), 메티오닌(methionine) 그리고 트립토판은 가수분해 과정 중에 대부분이 파괴돼 분석 결과의 정확성 및 재현성에 문제가 생깁니다. 따라서 이들을 산에 안정적인 산화 형태로 바꾸기 위해 단백질 산화 전처리를 거친 후 가수분해 과정을 거치게 됩니다.



위와같이 일반적인 산가수분해 방법들은 황함유 아미노산의 파괴가 동반됩니다. 따라서 특정 아미노산, 특히 황함유 아미노산의 정확한 분석을 위해선 특별한 가수분해 방법을 채택해야 합니다. 다양한 가수분해 방법이 존재하는데, 그중 대표적으로 황함유 아미노산 가수분해에는 포름산 가수분해가 이용됩니다.



과의산(performic acid)를 통해 황함유 아미노산의 산화 반응을 거치면 Cysteine 및 Cystine은 Cystic Acid로, Methionine은 Methionine sulfone으로 산화됩니다. 산화된 두 물질은 비교적 산에 안정적입니다. 이후 일반적인 가수분해 과정을 거친 뒤 분석하게 됩니다. 트립토판 보존, Iso-아미노산 보존 등 다양한 목적의 가수분해 방법이 존재하므로 목적에 맞게 선택하여 사용합니다.

일반적으로 sodium system에서 분석하는 18종 아미노산은 다음과 같습니다.

	Amino acid	축약표기	단일표기
1	aspartic acid	ASP	D
2	<i>threonine</i>	<i>THR</i>	<i>T</i>
3	serine	SER	S
4	glutamic acid	GLU	E
5	proline	PRO	P
6	glycine	GLY	G
7	alanine	ALA	A
8	cystine	CYS	C
9	<i>valine</i>	<i>VAL</i>	<i>V</i>
10	<i>methionine</i>	<i>MET</i>	<i>M</i>
11	<i>isoleucine</i>	<i>ILE</i>	<i>I</i>
12	<i>leucine</i>	<i>LEU</i>	<i>L</i>
13	tyrosine	TYR	Y
14	<i>phenylalanine</i>	<i>PHE</i>	<i>F</i>
15	<i>histidine</i>	<i>HIS</i>	H
16	<i>lysine</i>	<i>LYS</i>	
17	<i>arginine</i>	<i>ARG</i>	

표 1: 가수분해물 프로그램에서 검출 가능한 아미노산 목록(필수 아미노산은 노란색, 반필수 아미노산은 파란색)

가수분해물 분석에는 최대 4가지 Sodium Buffer와 ninhydrin Reagent가 사용됩니다.

Buffer A-1

Buffer A는 아스파라긴산(asparaginic acid; aspartic acid) 부터 시스틴(cystine)까지를 분리합니다. 시스틴(cystine)은 pH에 상당히 민감하기에 Buffer A의 정확한 pH 값이 요구됩니다.

모든 아미노산 중에서 시스틴(cystine)이 pH 변화에 가장 민감하게 반응하는 아미노산입니다.

시스틴(cystine)은 pH가 증가하면 너무 빠르게 용리(elute)⁵되며 반대로 pH가 감소하게 되면 너무 느리게 용리(elute) 됩니다.

컬럼의 온도에 가장 민감하게 반응하는 아미노산은 글루탐산(glutamic acid)입니다.

시작 온도의 증가는 글루탐산의 이른 용리를, 감소는 글루탐산의 늦은 용리를 유발하기 때문에 컬럼 오븐의 온도역시 매우 중요합니다.

Buffer A-1 + Buffer B-1

Buffer A, B의 혼합 용액은 발린(valine) 부터 페닐알라닌(phenylalanine)까지 분리합니다.

Buffer B-1

Buffer B는 히스티딘(histidine) 부터 아르기닌(arginine)까지 분리합니다.

이 대역은 이전 대역들에 비해 상대적으로 덜 민감합니다.

그래서 pH의 변화가 머무름시간(retention time)⁶에 영향을 줄 순 있지만 아미노산 분리에 있어 독특한 훼손등을 주진 않습니다.

Regeneration solution(D)

재생 용액(regeneration solution)은 분석이 시작된 후 컬럼(column)의 재생을 위해 사용됩니다.

분석이 끝난 후 가장 중요한 과정입니다.

재생 용액을 이용해 컬럼을 청소해준 후 Buffer A와 평형 상태로 맞춰야 합니다.

⁵ 아미노산이 검출되는 속도

⁶ 아미노산이 컬럼에 머무르는 시간

2.6.2 생리물질 분석(Physiological Program)

생리물질 분석(physiological program)은

유리 아미노산(free amino acids)을 분석하는데 사용됩니다.

유리 아미노산은 특정 아미노산, 혹은 단백질과 결합한 형태가 아닌 단독으로 존재하는 상태로 산 가수분해 과정이 아닌 다른 전처리 과정이 이용됩니다. 음료수, 차 추출물 등 단백질 함량이 거의 없다고 예상되는 시료들은 단순한 필터링 후 주입도 가능하며 일반적으로 5-술포살리실산(5-sulfosalicylic acid)과 낮은 농도의 염산으로 침전 및 여과 후 분석하게 됩니다.

이때문에 산, 열처리로 파괴되어 가수분해물 아미노산 분석에선 분석할 수 없던 물질들을 분석할 수 있습니다.

혹은 단백질 사슬에 결합된 형태(protein combined Amino Acid)의 경우 낮은 농도의 염산을 통해 결합을 끊어내고 유리아미노산 분석을 할 수 있습니다.

생리물질(physiological) 분석에는 3 가지 완충용액A, B, C(Buffer A, B, C) 와 재생 용액 D(regeneration solution D) 가 사용됩니다.

Buffer A-1

타우린(Taurine)부터 글루타민(Glutamine)까지 분리합니다.

글루탐산(glutamic acid)의 피크 위치가 컬럼 오븐의 온도에 가장 민감하게 반응합니다.

컬럼 오븐의 초기 온도가 높으면 글루탐산(glutamic acid)의 용리가 아스파라진(asparagines)까지 이른 시간에 용리되며 반대로 온도가 낮다면 글루타민(glutamine)까지의 용리가 늦춰지게 됩니다.

BufferA-1 + B-1

α -아미노아디핀산(alpha-Aminoadipic Acid)부터 페닐알라닌(Phenylalanine)까지 분리합니다.

Buffer A 와 B 의 다른 조합비를 통해 알파 아미노아디핀산부터 페닐알라닌까지의 분리가 다양한 범위로 가능합니다.

Buffer B-1

호모시스틴(Homocystine)을 분리합니다.

Buffer C-4

암모니아(Ammonia)부터 아르기닌(Arginine)을 분리합니다.

컬럼 오븐의 온도는 트립토판(tryptophane) 피크의 위치를 정합니다.

높은 컬럼 오븐은 트립토판의 이른 검출을, 반대로 낮은 온도는 트립토판의 늦은 검출을 유도합니다.

Regeneration solution (D)

재생 용액(regeneration solution)은 분석 시작 후 컬럼 재생에 사용됩니다.

프로그램된 재생 시간이 지난 후, 컬럼은 buffer A 와 다시 평형상태가 되어야합니다.

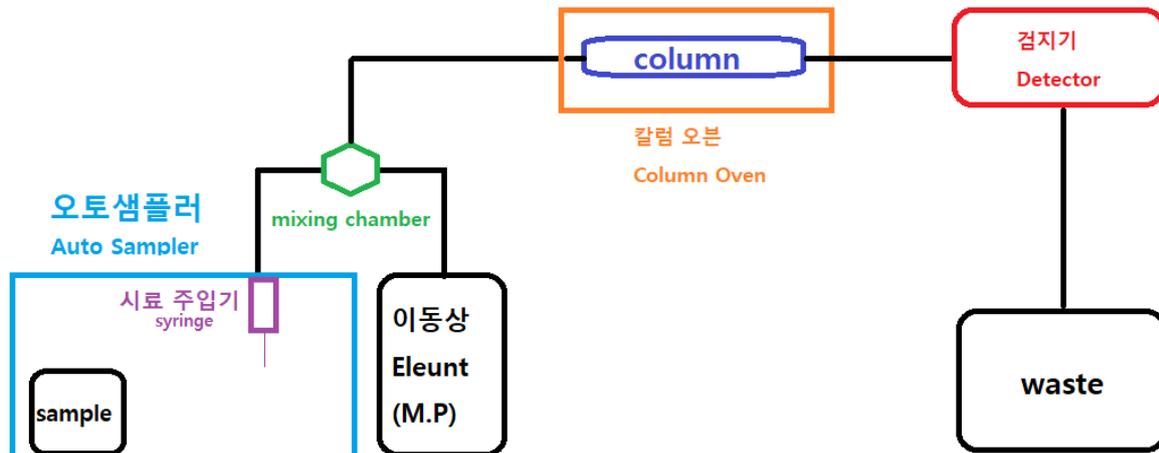
3. 아미노산 분석기의 이해

아미노산 분석기와 HPLC의 차이와 아미노산 분석기의 구조 이해



3. 아미노산 분석기의 이해

아미노산 분석기는 그 뿌리를 HPLC에 두고 있다고 언급했습니다. 기본적인 분리와 구조는 액체 크로마토그래피 법과 비슷합니다. 다만 아미노산을 검출하기 위한 유도체화 과정이 필요하며 이 유도체화 과정이 일어나는 곳을 Reactor 라고 합니다. 먼저 HPLC의 간략한 구조는 아래와 같습니다.

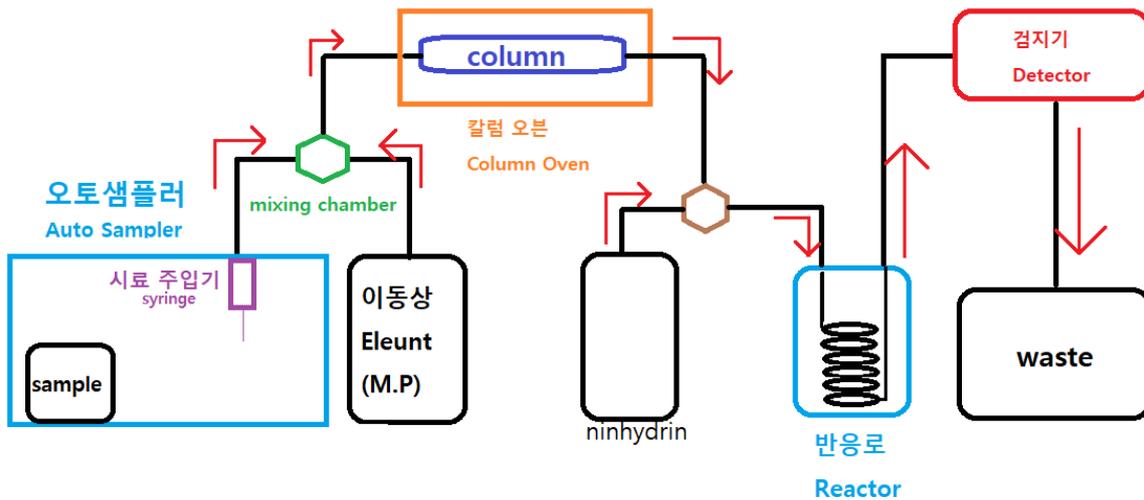


분석물이 들어있는 시료(sample)를 이동상에 녹여 칼럼에 흘려보낸 뒤, 칼럼에서 분리된 분석물들을 디텍터에서 검출하는 것이 기본적인 HPLC의 구조입니다.

초창기의 아미노산 분석은 유도체화 과정을 사용자가 하거나 HPLC의 Autosampler에서 진행되는 경우가 많았습니다. 유도체화 반응은 고온에서 진행돼야 반응 효율과 수율이 좋으며 외부에 노출되고 Autosampler의 구조가 매우 복잡해지는 단점이 있습니다. Auto Sampler Needle 내에서 반응이 일어나는데 니들의 길이가 짧기 때문에 높은 반응 수율을 기대하기 어렵다는 단점 역시 존재했습니다.

따라서 아미노산 분석에 대한 문제점을 해결하고자 아미노산 전용 분석기가 등장하게 됩니다.

아미노산 분석기의 구조는 대략적으로 다음과 같습니다.



< 아미노산 분석기 모식도 >

기존의 HPLC와 가장 큰 차이점은 바로 반응로(Reactor)와 반응액(Reagent)의 추가입니다. 반응액의 경우 보통 닐하이드린 용액(Ninhydrin Reagent)을 사용합니다.

컬럼 후 유도체화 방법을 사용하기에 컬럼에서 분리된 아미노산이 바로 Detector로 가는 것이 아니라 Reactor에서 유도체화 반응을 거친 후 Detector로 가게 됩니다.

Reactor에는 크게 두가지 종류가 있습니다.

하나는 **Reactor Column** 방식과 나머지는 **Reactor Coil** 방식이 있습니다.

Reactor Column 방식의 경우 유도체화 반응이 Reactor Column에서 일어납니다. 이때 Reactor Column은 보통 인공 다이아몬드로 패킹 돼있으며 길이가 짧아 Peak의 Symmetry에 이점이 있습니다. 다만 재료 등의 문제로 자체 가격이 높다는 단점이 있습니다.

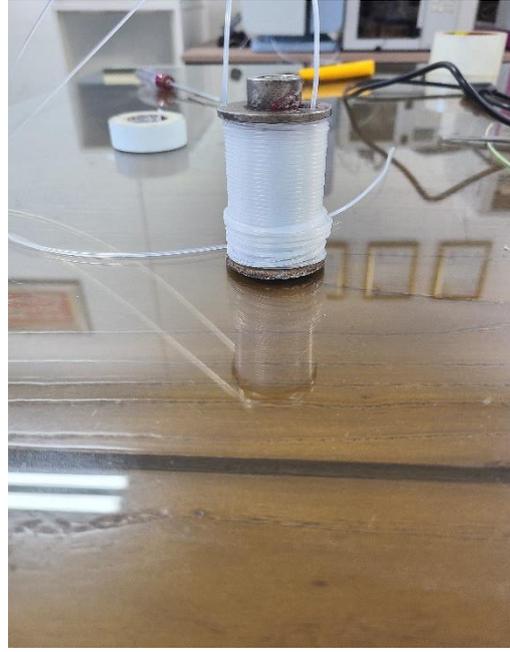
Reactor Coil 방식은 유도체화 반응이 Coil에서 일어납니다. 보통 20m 길이의 PTFE 관 혹은 8m의 스테인리스 관에서 반응이 일어납니다. Column 방식과 비교해 길이가 길기 때문에 diffusion이 발생하며 이에 따라서 Peak tailing이 발생합니다. 하지만 유지보수가 용이하다는 장점이 있습니다. 다만 PTFE의 경우 사용자의 실수로 관이 막히는 상황이 자주 발생하며 이러한 단점을 보완하기 위해 스테인리스 재료의 Coil을 사용하기도 합니다. PTFE 관의 경우 70bar 이상의 압력이 걸리면 찢어진다는 단점이 있어 관이 막히면 자르거나 교체를 해야 하는데 스테인리스 관의 경우 300 bar 이상의 압력을 걸어줘도 문제없으며 열 전도가 높다는 장점이 있습니다.

현재 Sykam의 아미노산 분석기는 모두 16m의 PTFE 관을 Reactor Coil로 사용하고 있습니다.

-추후 스테인리스 코일역시 출시예정입니다.

Reactor는 Reactor Oven이라는 곳에 들어있는데 Reactor Oven은 Reactor의 온도를 일정 온도 이상

유지시켜줘 반응의 수율을 높이는 역할을 합니다.



Reactor Oven 과 Reactor Coil

아미노산 분석기에서 가장 잦은 고장을 일으키는 것이 바로 Reactor Coil입니다.

기계가 꺼져 온도가 내려가고 Flow가 멈추게 되면 아미노산과 니하이드린이 반응해 생성된 유도체가 굳어버리면서 관을 막아버립니다.

일반적으로 Flow Cell의 Inlet, Outlet 근처와 Reactor Coil의 끝 쪽이 주로 막히는데, 막힌 곳을 볼 경우 검 보라색으로 관을 막고 있는 것이 눈에 보입니다. 이때 막힌 부분을 날카로운 커터 칼이나 가위 등으로 자른 뒤 다시 나사를 체결하면 사용할 수 있습니다. (부록 참조)

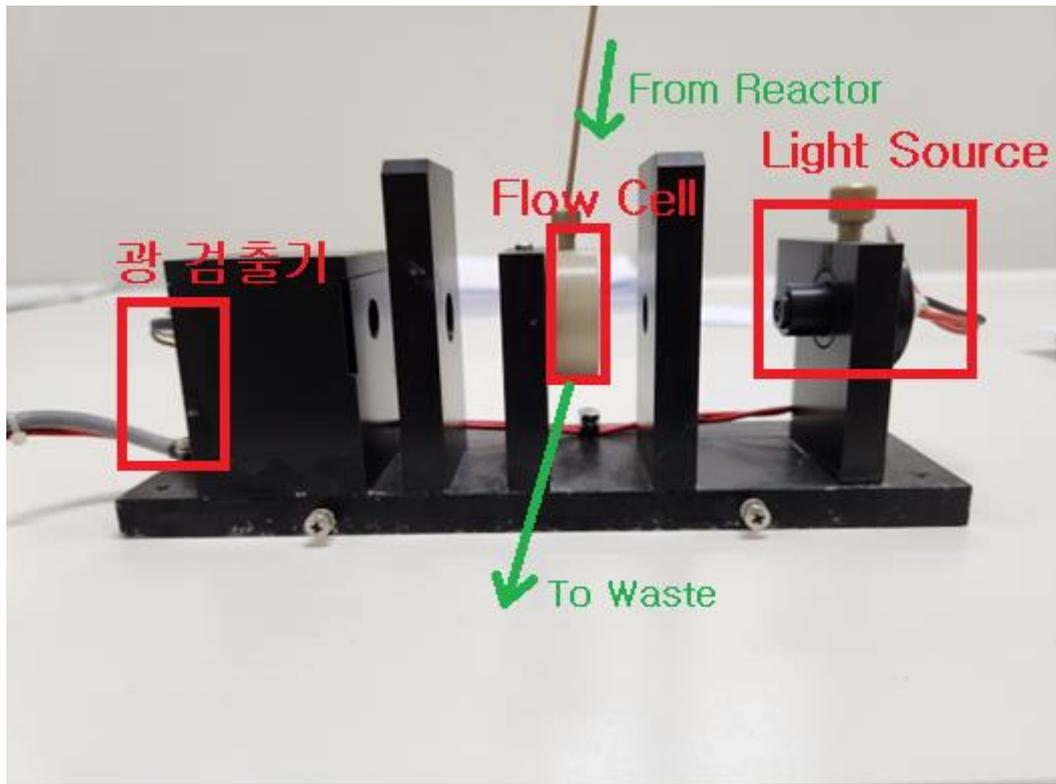
아미노산 분석기의 검출 방식은 흡광도 검출(Absorbance Detection)입니다.
570nm, 440nm 총 두가지 파장의 흡광도 검출을 하게 됩니다.

아미노산 분석기의 Detector Module은 그 모델에 따라서 조금씩 다릅니다.

S433의 경우 아날로그 방식의 Detector를 사용하며

S633의 경우 LED 디지털 방식의 Detector를 사용합니다.

반도체를 이용한 검출을 하기 때문에 크기가 매우 작고 노이즈가 적다는 장점이 있습니다.



Detection Module for S433

S433 에서 사용되는 Detection Module 은 위와 같습니다.

Flow Cell 에는 Reactor Coil 로부터 나온 이동상이 흐르고 Flow Cell 에서 분석물을 포함한 이동상이 570nm 혹은 440nm 의 빛을 흡수하게 됩니다. 이때 빛의 흡수로 인해 디텍터에 도달하는 빛의 세기가 바뀌게 되며 이를 기록하게 됩니다. 이때 광 검출기는 아날로그 데이터(Analog Data)를 생성하게 되며 이 아날로그 데이터를 디지털 데이터(Digital Data)로 변경해주는 것이 Colibrick A/D Convertor 입니다.

4. 아미노산 분석기 사용법

아미노산 분석기 사용법



4. 아미노산 분석기 사용법

이제부터 이론적인 얘기는 멈추고 실제로 아미노산 분석기를 가동하는 방법을 설명하겠습니다.

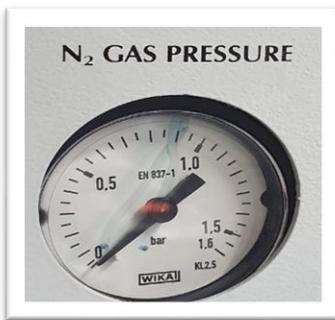
아미노산 분석 전에 아미노산 분석기를 알맞은 상태로 맞춰 놓는 것이 가장 중요합니다.

이러한 일련의 과정들은 안정화 과정이라고 합니다.

안정화 과정을 거치지 않으면 기계와 분석의 **재현성, 신뢰성**이 급감하게 됩니다.

4.1. 질소 가스 압력 확인

아미노산 분석기에 공급되는 질소 가스는 시약이 공기와 접촉해 산화되는 것을 방지하며 펌프가 일정한 유속으로 시약을 공급하는데 가장 중요한 역할을 합니다.



Reagent Organizer의 오른쪽(S433) 혹은 정면(S633)에 질소 가스 압력 계기판이 있습니다. 항상 압력을 **0.4 Bar ~ 0.6 Bar** 사이로 유지해야 합니다. 질소가스의 공급 방법은 크게 두가지가 있는데 하나는 가스통을 통한 공급이며 나머지 하나는 실험실 자체적인 가스라인을 통한 공급입니다. 만약 전자의 경우, 즉 가스통을 옆에 두고 그 가스통에서 가스를 공급하는 형식이라면 **절대적으로 가스 레귤레이터 작동방식에 대한 이해가 필요합니다.**

가스 레귤레이터에 대한 이해와 정확한 사용법이 요구 됩니다.

일순간 높은 압력이 걸리면 유리병이 깨지거나 기계에 비가역적 손상을 줍니다



가스 레귤레이터에는 보통 두 개의 밸브가 있는데, 가스 탱크의 1차 밸브는 **정방향 밸브**지만 레귤레이터의 2차 밸브는 **역방향 밸브**입니다.



그러므로 밸브를 사용할 때 항상 1차 밸브와 2차 밸브를 구분해서 사용해야 합니다.

가스 레귤레이터의 사용법은 비단 이 문서뿐 아니라 개별적으로 사용법을 숙지한 채 사용해야 사고를 예방 할 수 있습니다.

1차 밸브는 시계방향으로, 2차 밸브는 반시계 방향으로 돌려 양 밸브를 모두 차단합니다.

1차 밸브를 열어 가스 탱크의 압력을 확인 후

2차 밸브를 천천히 시계방향(오른쪽)으로 돌려 가스를 천천히 공급합니다.

장비를 가동하고 있지 않아도 항상 일정한 압력의 질소가스 공급은 시약 및 버퍼 용액의 변질을 최대한 늦춰줍니다.



4.2. 시약병 벨브 확인

아미노산 분석기의 용액 라인은 총 6개가 있습니다.

4개의 Buffer Line과 Washing, Ninhydrin Line 총 6개의 line이 존재합니다.

이때 4개의 Buffer Line은 Analytical Pump(a 마크)에 의해 공급되며

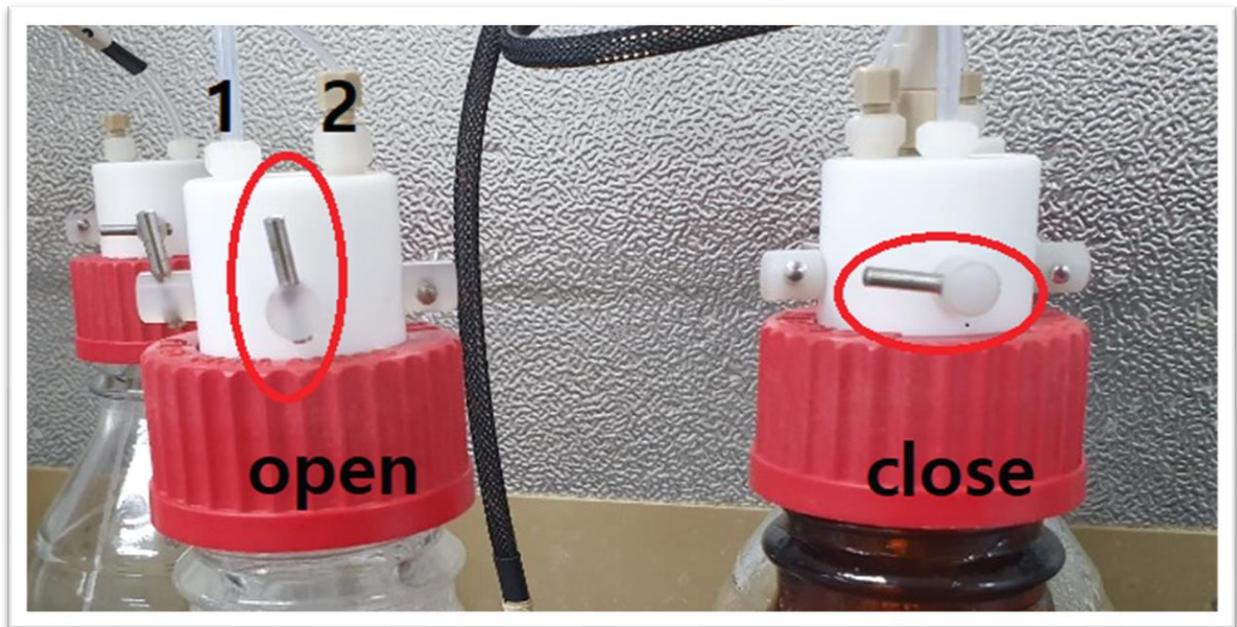
나머지 두개의 경우 Micro pump(m 마크)에 의해 공급됩니다.

S433의 경우 S2100 Solvent Delivery System에서 4개의 Buffer line을 통해 용액을 공급하며

S4300 Reactor Module에서 Washing, Ninhydrin Reagent line을 통해 용액을 공급합니다.

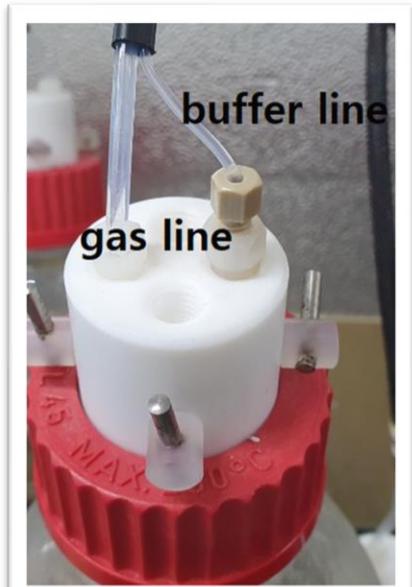
S633의 경우 단일 S633 Pump에서 모든 용액 공급을 담당합니다.

먼저 각 시약병의 뚜껑에는 4 개의 스위치 벨브가 있습니다.



벨브를 위로 올리면(수직) 열린 상태, 벨브를 아래로(수평) 내리면 닫힌 상태입니다.

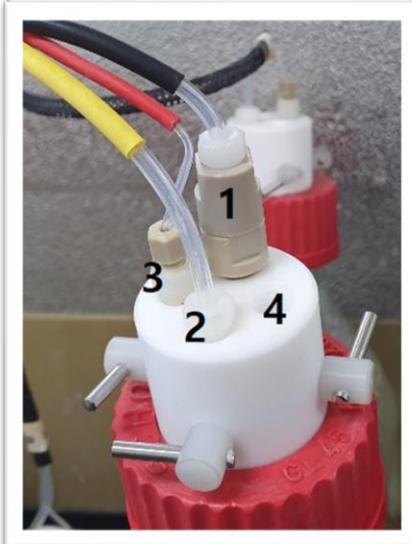
닌하이드린 시약병(갈색병)을 제외한 나머지 5개의 병은 모두 투명 유리에 2개의 관이 있습니다.



분석시 항상 gas line, buffer line 두 벨브를 open, 나머지 두 벨브를 closed 상태로 놔야합니다.

gas라인을 통해 질소 가스가 공급되는데, 일정한 압력이 유지돼야 공급되는 buffer의 양도 일정하게 유지가 되기 때문에 불안정한 질소 가스의 공급은 머무름시간(Retention Time; RT)에 영향을 줄 수 있습니다.

시약을 교체했다면 항상 분석 전에 Buffer Line, Gas line 은 open 나머지 두 valve는 closed 상태로 유지해야 합니다.



Ninhydrin의 경우 완충용액 시약병과는 조금 다른 구조인데

Ninhydrin의 경우 빛, 용존 산소와 반응해 침전물을 형성하기 때문에 추가적으로 관리를 해야합니다.

- | |
|--|
| <p>1번 벨브는 질소 가스를 용액 안으로 공급</p> <p>2번 벨브는 질소 가스로 병 내 압력을 형성</p> <p>3번 벨브는 ninhydrin reagent를 기계로 공급</p> <p>4번 벨브는 가스를 방출하는 데 사용</p> |
|--|

기계를 오랫동안 사용하지 않았거나 Ninhydrin을 상온에서 오랫동안 놔둔 상태로 기계를 가동시키면 높은 확률로 문제가 발생합니다.

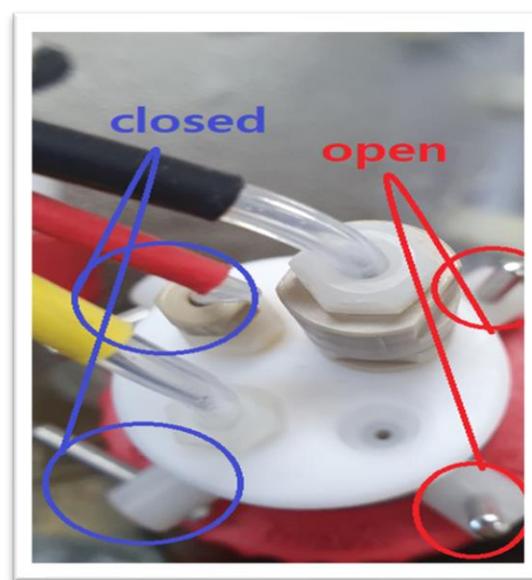
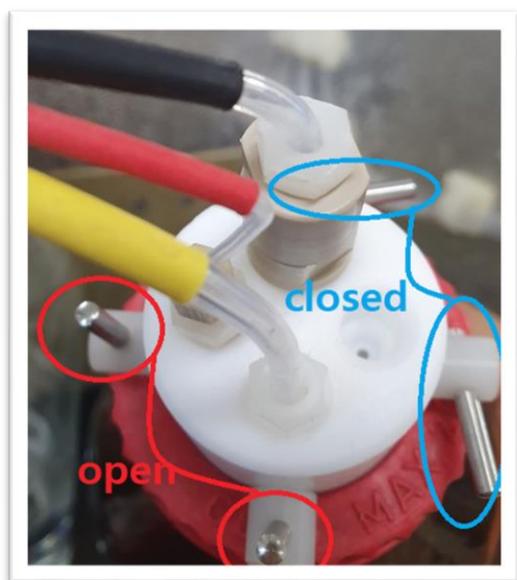
따라서 기계를 오랫동안 사용하지 않았거나 Ninhydrin을 오랫동안 상온에 방치했을 경우 새로운 용액으로 교체해야 합니다. 이때 Ninhydrin 용액을 새로 교체했을 경우 반드시 **Purge** 과정을 거쳐야 하는데 이 과정은 1번 벨브와 4번 벨브를 약 1분가량 열어주는 것으로 진행됩니다.

1번 벨브를 통해 용액 내로 질소가스가 공급되어 산소가스를 4번 벨브 출구로 밀어내 시약병 밖으로 방출합니다. 이때 용액 내의 용존 산소가 제거됩니다.

Purge가 끝났으면 1번, 2번 벨브를 닫고 2번, 3번 벨브를 열어 분석을 준비합니다.

	Buffer bottle	Ninhydrin bottle
--	---------------	------------------

Purge	Gas, buffer Line: Open Others: Closed	Line 2, Line 3: Closed Line 1, Line 4: Open
분석	Gas, buffer Line: Open Others: Closed	Line 2, Line 3: Open Line 1, Line 4: Closed



<ninhydrin: using>

<ninhydrin: purging>

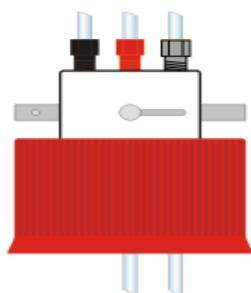


Figure 21: Screw Cap (Closed)

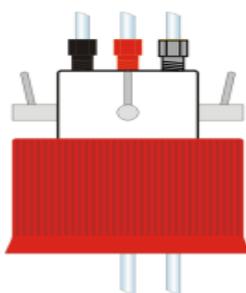


Figure 22: Screw Cap (Open)

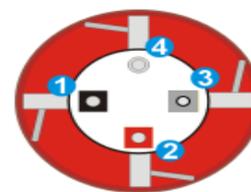
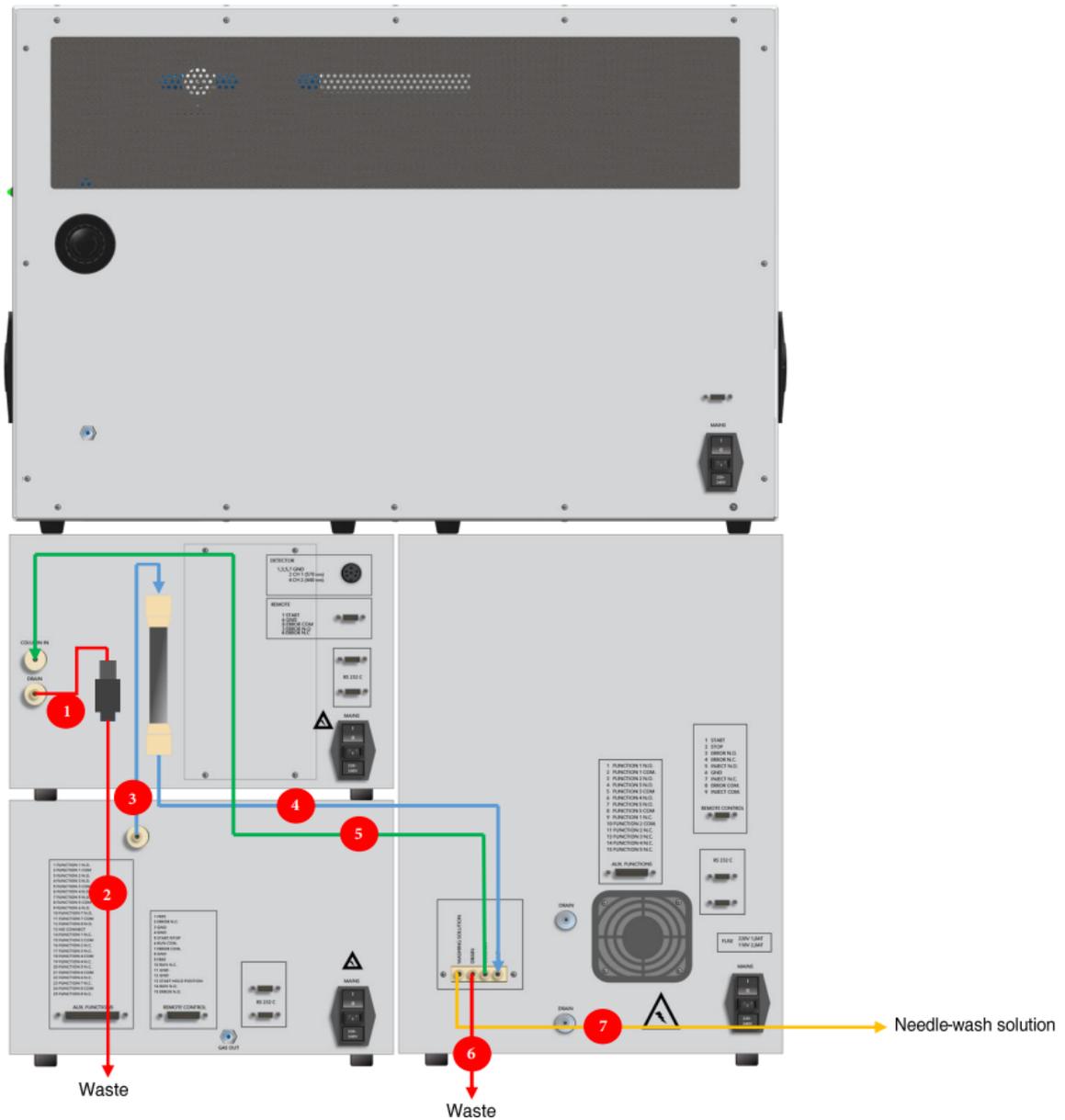


Figure 23: Screw Cap Top

#	Description
1	He/N ₂ Pressure (Black)
2	Liquid Delivery (Red)
3	He/N ₂ Flushing (Gray)
4	Gas Drain (Open)

6개의 용액 라인을 모두 확인했다면 이제 오토샘플러의 워싱 용액을 확인해야 합니다.
 오토샘플러의 워싱 용액은 S433의 경우 기계 뒷면에, S633의 경우 버퍼 시약병과 같이 있습니다.



위 그림은 S433의 뒷면이며, 오토샘플러 워싱 용액은 노란색으로 표시된 Needle-wash solution과 연결돼 있습니다.

이때 오토샘플러 워싱 용액은 1g/L의 NaN_3 (Sodium Azide) 용액을 사용합니다.

반드시 오토샘플러 워싱 용매가 병의 반 이상 차있는지 확인해야 합니다.
 오토샘플러 워싱 용매가 충분히 있다면 다음 과정으로 넘어갑니다.

**만약 오토샘플러 워싱 용매로 초순수를 사용하면
 미생물이 번식할 수 있습니다. 이 경우 라인이 초록색 빛을 띄게 됩니다.**

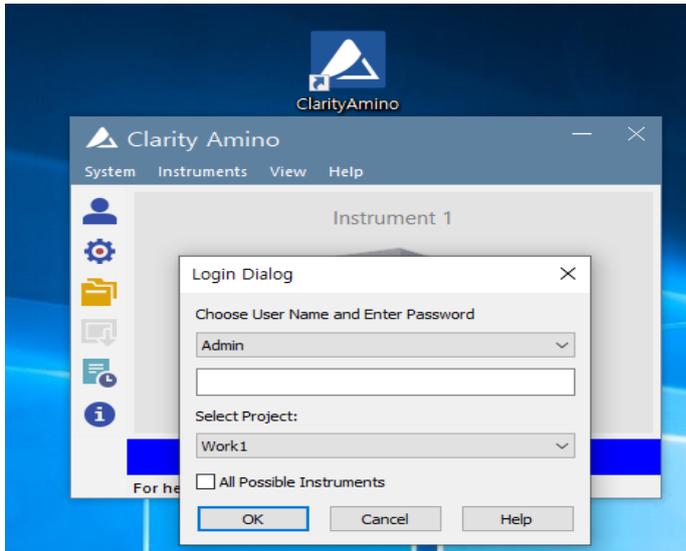
4.3. 데이터 시스템(Clarity) 연결



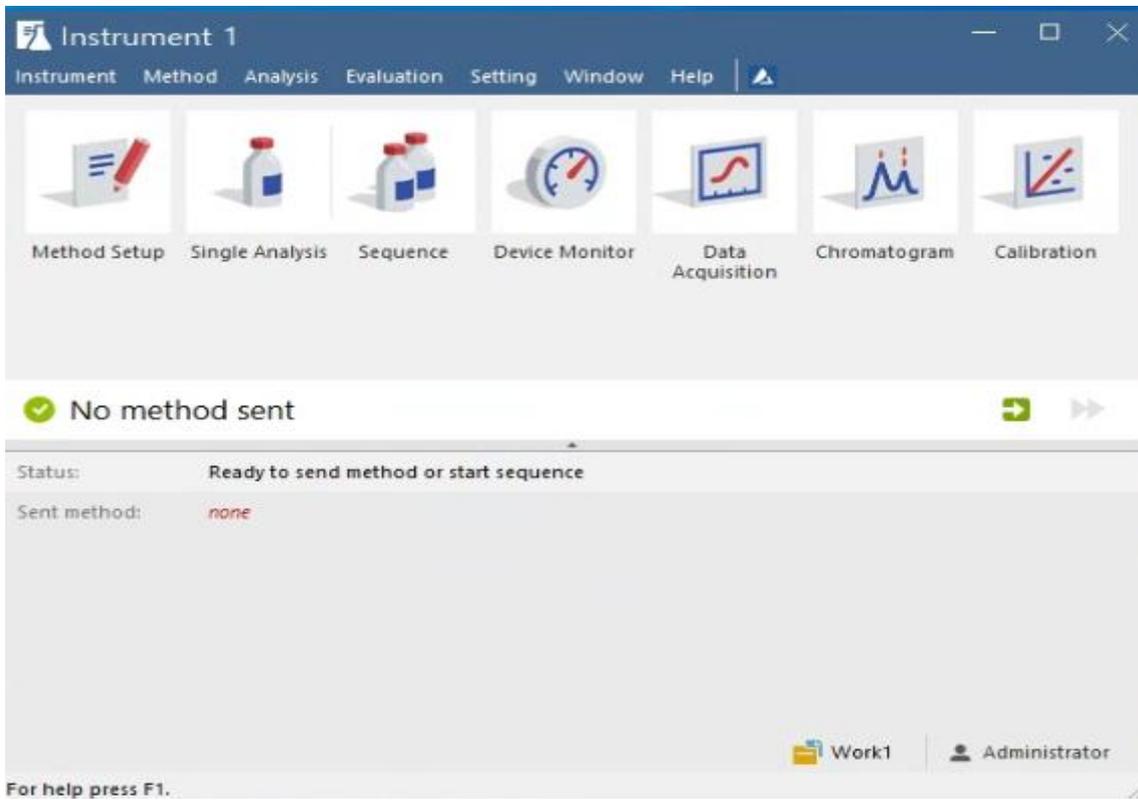
가스 압력에 대한 확인이 끝났다면 기계 뒷면의 스위치를 눌러 전원을 켜줍니다.

아미노산 분석기와 컴퓨터를 연결해야 하는데, 이때 S433의 경우 각 모듈(S2100, S4300, S5200)들이 모두 Serial Mode로 변경돼 있는지 확인합니다. 이후 모델의 경우 자동으로 Serial Mode로 변경돼있습니다. (부록 참조)

아미노산 분석기는 데이터시스템으로 Clarity라는 CDS(Chromatography Data System)을 사용합니다. **Clarity**라는 소프트웨어를 이용해 모든 분석과 기계 제어를 할 수 있습니다.



먼저 Clarity(Amino)를 실행하고 메인 화면을 클릭해 아이디와 비밀번호를 입력하고 로그인 합니다.



<Instrument Window>

비밀번호를 입력하고 로그인을 하면 위와같이 Instrument Window가 나타나게 됩니다.

각 항목은 다음과 같습니다.

이름	기능
Method Setup	분석에 사용될 Method를 설정 및 수정하는 기능
Sequence	분석 시퀀스(순서)를 설정하는 기능
Device Monitor	장비의 상태와 제어를 위한 기능
Data Acquisition	현재 장비가 컴퓨터로 보내는 데이터를 실시간으로 확인하는 기능
Chromatogram	분석이 끝난 후 크로마토그램 데이터를 확인 및 수정하는 기능
Calibration	교정 곡선(검량선)을 만들고 평가하는 기능

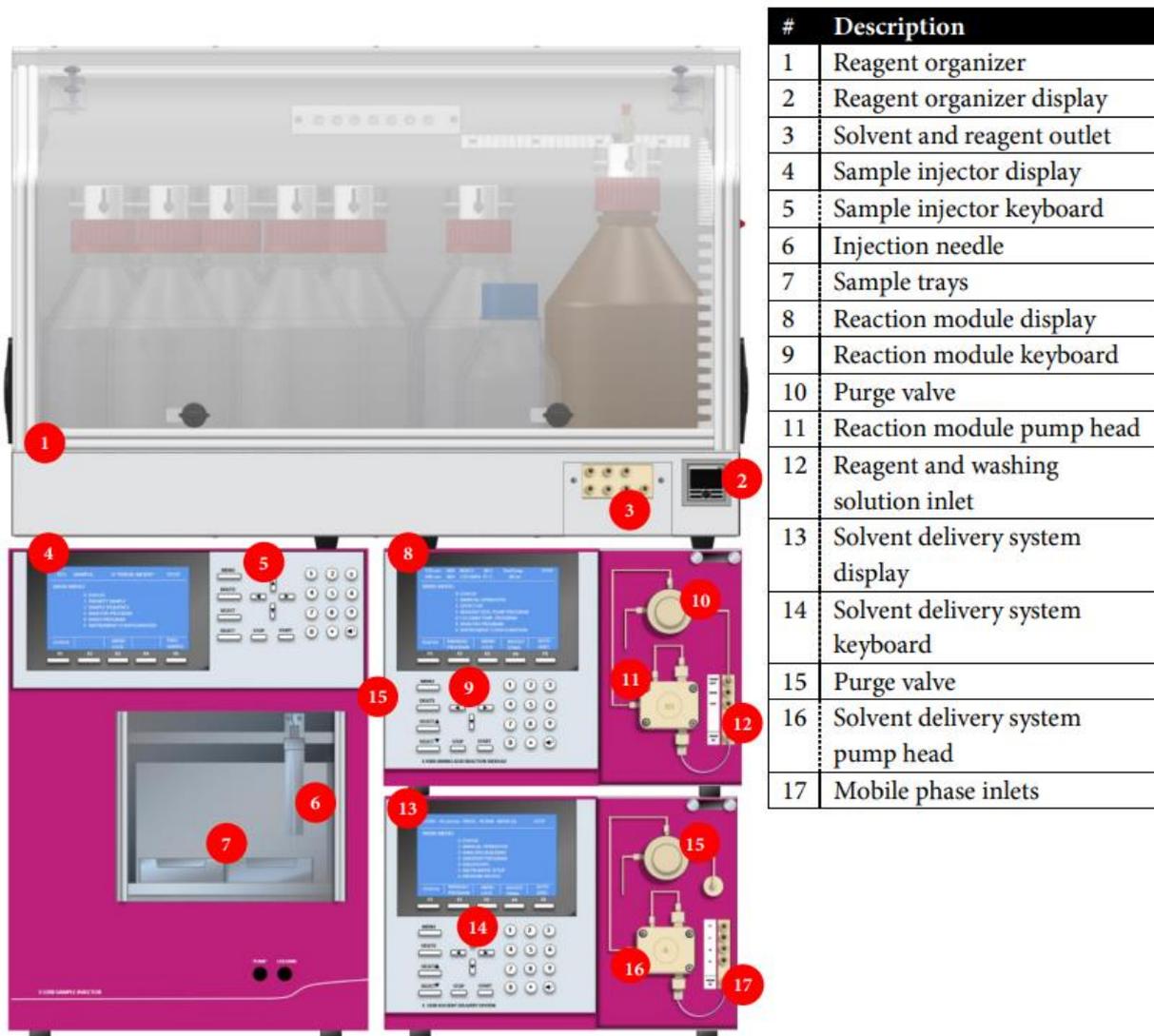
먼저 분석을 시작하기 전에 기포제거(Purging) 과정이 필요합니다.

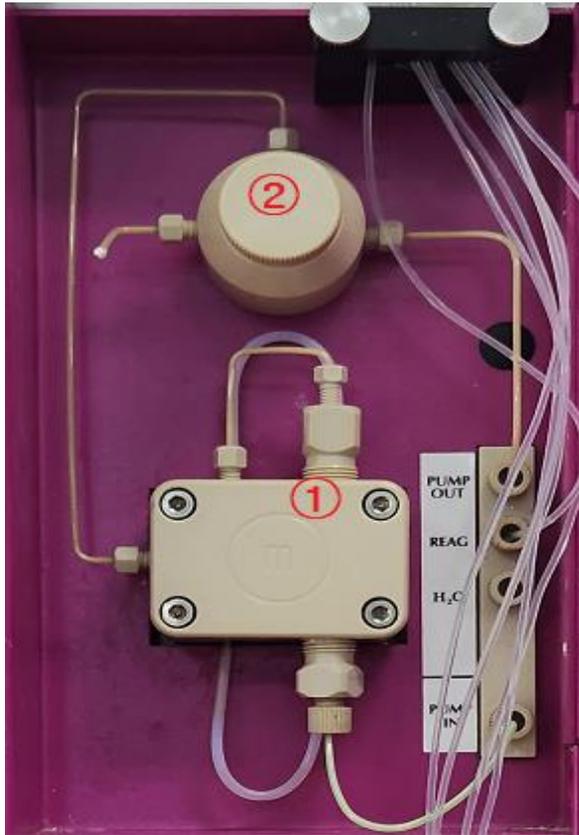
특히, 기계를 오랫동안 사용하지 않았거나 용매를 교체했을 경우 반드시 기포제거 과정이 필요합니다.

4.4. 기포 제거(Purging)와 Needle Washing

만약 시약을 교체하거나 오랫동안 사용하지 않았을 경우 높은 확률로 관 내에 기포(Air bubble)가 발생하게 됩니다. 펌프의 구조상 관 내에 기포가 존재할 경우 시약 공급이 원활하지 않아 BaseLine Noise 혹은 턱짐 현상이 발생합니다. 따라서 시약을 교체 혹은 추가하거나 장시간 사용하지 않았을 때 반드시 기포를 제거하는 과정이 필요합니다. 이러한 과정을 **Purging** 혹은 **Degassing**이라 칭합니다.

기계를 정면에서 바라봤을 때 아래와 같으며 각 부분의 명칭은 아래와 같습니다.





먼저 S433의 S2100, S4300에 각각 한 개씩 펌프가 존재하며 구분은 다음과 같습니다.

① Pump head

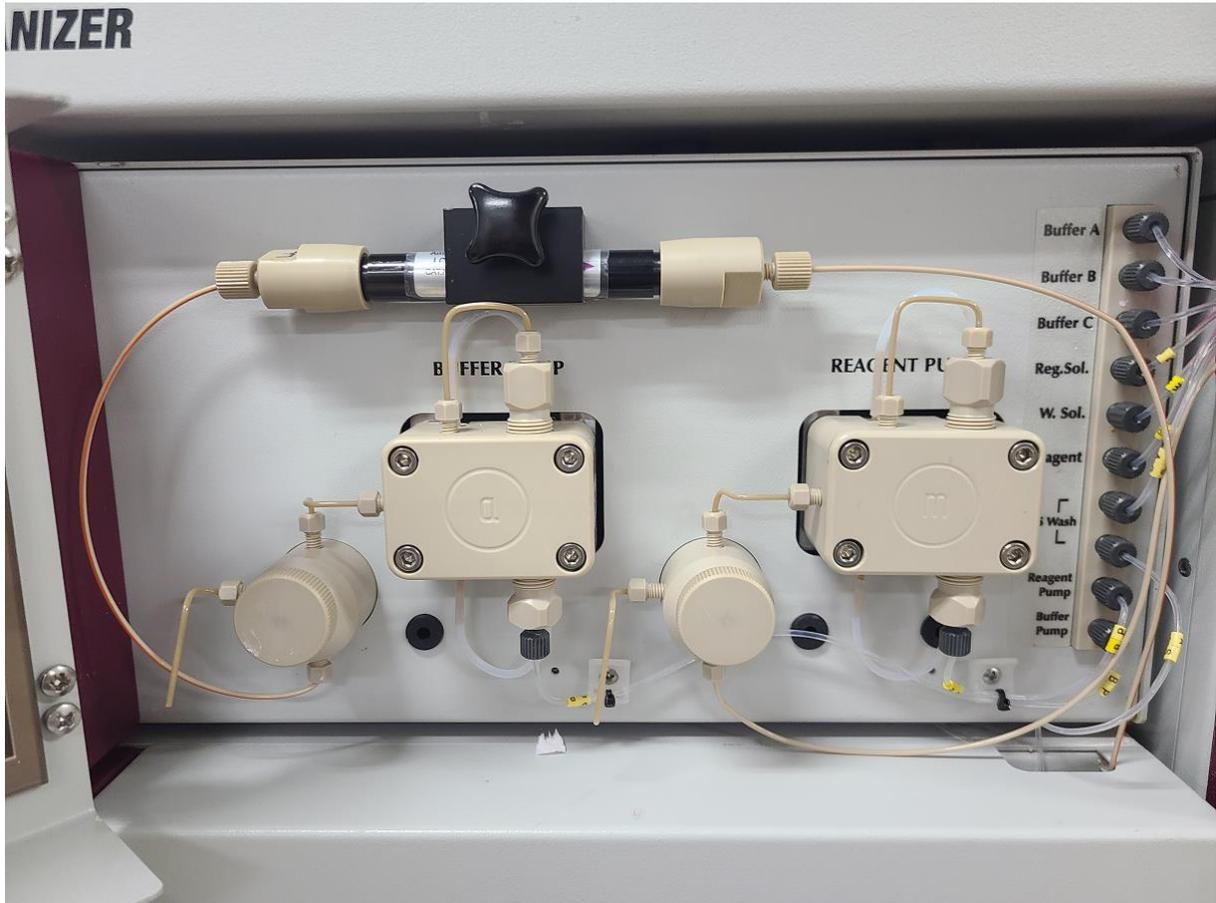
- m: Micro(Reagent)
- a: alytical(Buffer)

② Relief Valve(Drain Valve)

- 반시계 방향으로 돌릴 때 열림

펌프 헤드에 적혀있는 a, m은 각각 펌프 헤드의 종류를 의미합니다. a는 Analytical Pump이며 Buffer Pump이고 m은 Micro Pump이며 Reagent Pump입니다.

S2100 Solvent Delivery System와 S4300 Amino Reactor module에 각각 한 개의 펌프가 존재합니다. 이 두 펌프들의 Relief valve를 반시계 방향으로 돌려서 열어줍니다. Relief Valve가 열린 상태로 이동상이 흐르면 왼쪽의 라인으로 빠져나오게 됩니다.

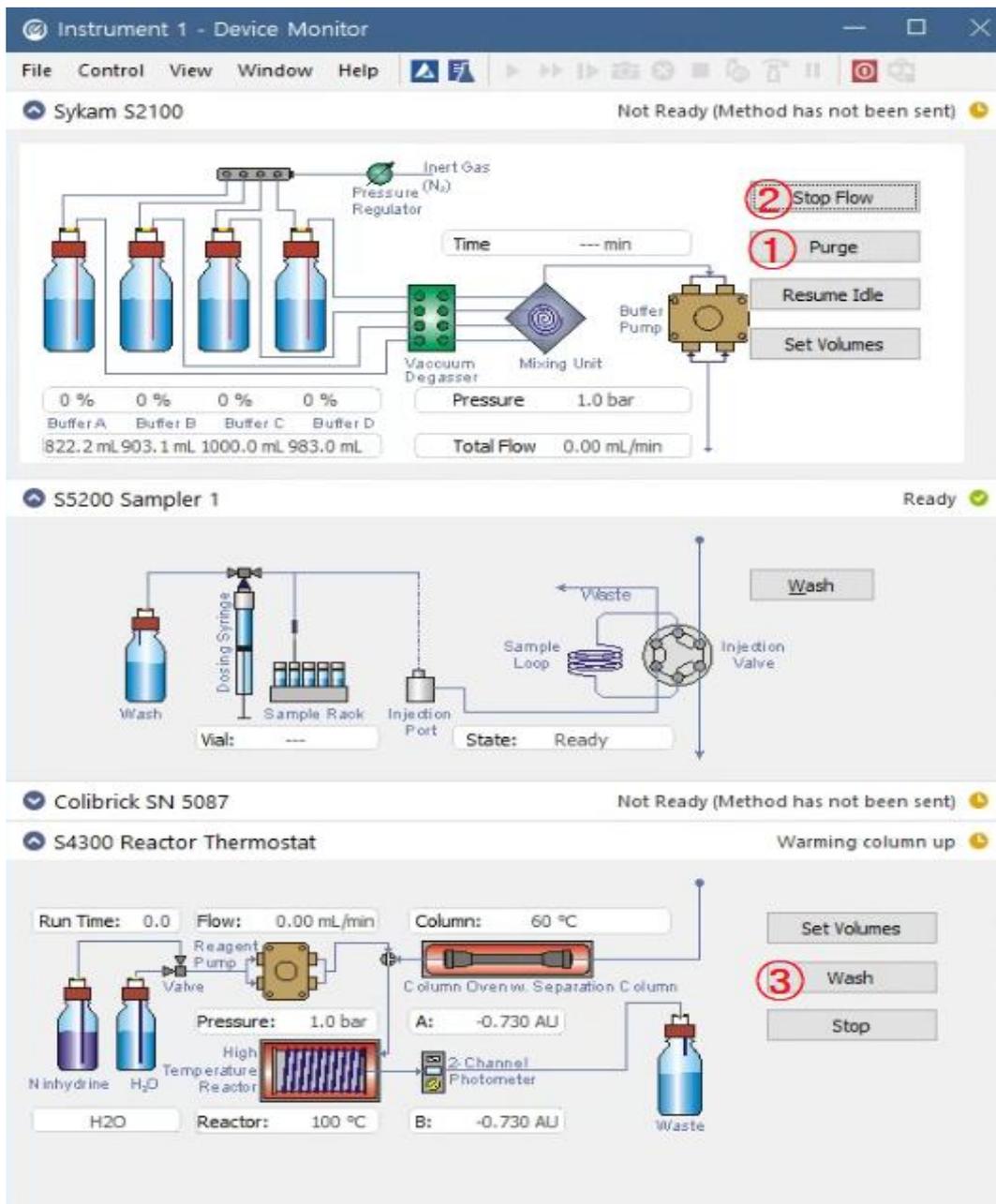


S433을 제외한 다른 모델의 경우 두 펌프가 하나의 장비에 모여있습니다.

S433과 동일하게 두 펌프의 Relief Valve(Drain Valve)를 반시계 방향으로 돌려서 열어줍니다.

만약 정상적으로 가스 압력이 걸리며 시약 병의 밸브가 올바르게 열려있다면 가스의 압력에 의해 조금씩 이동상이 흘러나오게 됩니다.

이제 Instrument Window의 Device Monitor를 열어줍니다.



<Device Monitor>

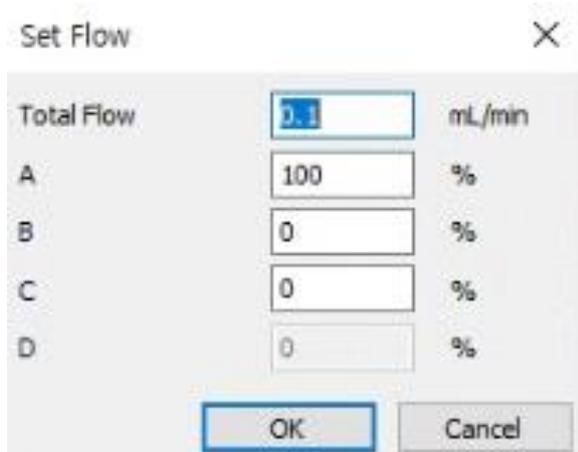
Device Monitor를 열면 위와 같은 창이 나타납니다.

이름	기능
Purge Set Flow	Buffer pump의 Flow 설정
Stop Flow	Buffer pump의 Flow 중단
Wash	Reagent Pump의 Flow 및 온도 설정

이제 기포제거를 위해 Flow를 설정해야 합니다. 우선 필요한 기능은 다음과 같습니다.

먼저 Buffer Pump의 Flow를 설정하기 위해 Purge(혹은 Set Flow)를 클릭합니다.

이때 반드시 Relief Valve가 열려있어야 합니다.



Total Flow를 2 ml/min 이상으로 둡니다.
 최대 10까지 설정 가능합니다.
 기본적으로 A 100%가 설정돼 있습니다.

OK 버튼을 누르면 계에서 펌프 작동 소리가
 나면서 펌핑이 시작되며 왼쪽라인으로 이동
 상이 나옵니다.

이때 라인에 기포가 있으면 거품이 나오게 됩니다. Flow 5 ml/min 기준으로 3분 정도 흘
 려줍니다. 이후 Purge(Set Flow)를 다시 클릭해 이번엔 B 100%로 똑같이 3분 흘려줍니다.
 이와 같은 방법으로 사용하는 모든 Buffer Line을 Purging 합니다.

모든 Buffer Line을 충분히 Purging 했고 눈으로 봤을 때 거품이 나오지 않는다면
Flow를 멈추고 Relief Valve를 시계방향으로 돌려 잠귀줍니다.

Micro Pump(Reagent Pump) 역시 같은 방법으로 해줍니다. 단, 이때 Purging Flow를
 2ml/min 이하로 설정하며 최소 5분 이상 흘려줘야 기포가 제거됩니다.

Water/Ninhydrin 모두 Purging 했다면 Flow를 멈추고 Relief Valve를 잠귀줍니다.

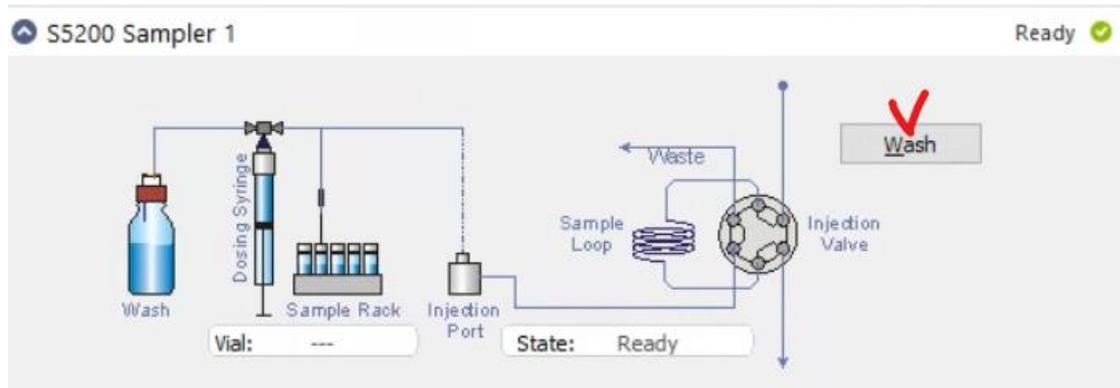
절대로 Drain valve가 닫혀있는 상태로 Flow를 높이지 마십시오.

이는 그 즉시 컬럼과 Reactor에 비가역적인 데미지를 줍니다.

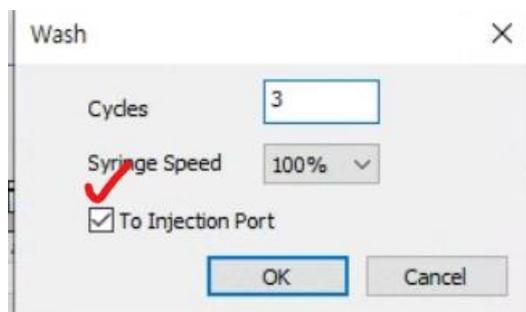


퍼징과 동시에 오토샘플러 워싱 역시 진행해줍니다.

Clarity Device Monitor에서 AutoSampler의 Wash 버튼을 클릭합니다.



Wash 창이 뜨면 Cycles를 3회 입력하며 To Injection Port를 체크한 뒤 Ok를 누릅니다.



이제 오토샘플러의 인젝션 니들이 움직이면서 워싱을 시작합니다.

동시에 오토샘플러 뒤의 Drain 병(Reactor에서 나오는 Waste line과는 다른)을 확인합니다.

정상적으로 Needle Washing이 진행된다면 Drain 라인으로부터 물방울이 연속적으로 떨어지는 것을 볼 수 있습니다. 첫 워싱에는 내부에 기포가 있을 수 있어 불규칙적으로 떨어질 수 있지만 이후부터는 규칙적으로 다량의 물이 떨어져야 합니다.

만약 물방울이 일정하게 떨어지지 않거나 나오지 않는다면 이는 Sample Injection에 문제가 있음을 의미합니다. AutoSampler Washing Bottle에 워싱 용매가 절반 이상 있는지 확인해야 합니다.

**Needle Washing 중에 반드시 Drain에서 물방울이 규칙적으로 떨어져야 합니다.
그렇지 않다면 시스템에 문제가 있다는 것을 의미합니다.**

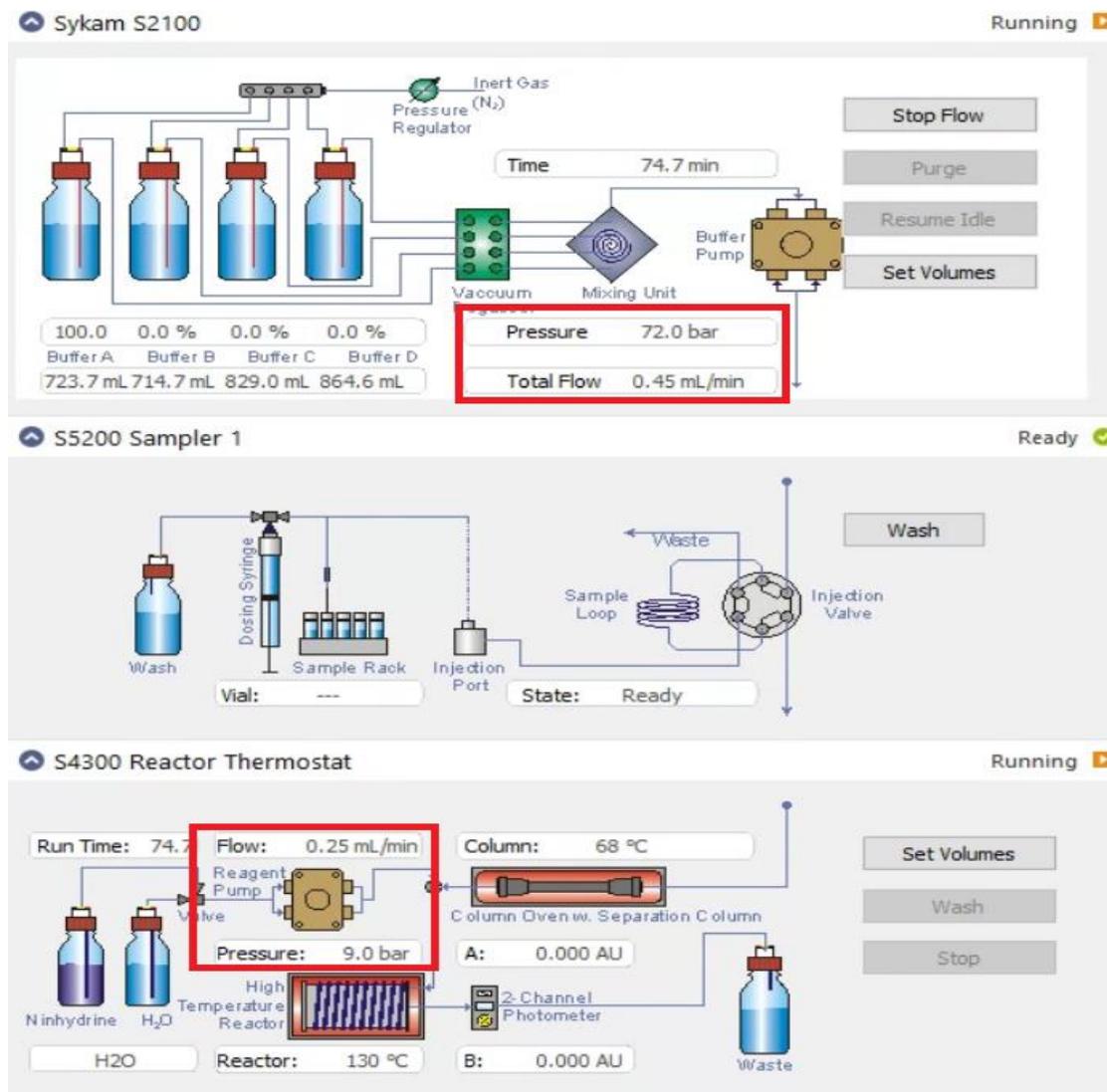
인젝션 니들 워싱과 퍼징이 모두 끝났다면 이제 압력이 제대로 걸리는지 확인해야 합니다.

먼저 Purge 할때와 같은 방법으로 Buffer A Flow를 0.45ml/min으로 설정합니다.

그리고 Reagent Pump에서도 물 혹은 Ninhydrin Reagent를 0.25ml/min 혹은 메소드에서 설정된 값



으로 설정합니다.



그러면 위와 같이 각각 압력이 걸려야 합니다.

먼저 Column에는 최소 35 bar의 압력이 일정하게 걸려야 합니다.

Reactor Thermostat 혹은 Reagent Pump에도 최소 8~13 bar의 압력이 일정하게 걸려야 합니다.

만약 압력이 불안정하게 흔들리는 경우 Purge가 덜 됐다는 것을 의미합니다.
만약 충분한 Purge 이후에도 압력이 불안정하다면
pump head 내의 check valve를 교체해야 합니다.

4.5.

Method

용액 퍼징과 니들 워싱이 끝났다면 이제 분석에 사용할 Method를 기계로 전송해야 합니다.

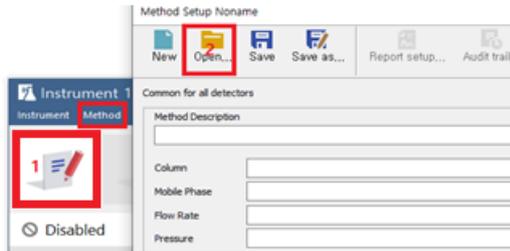
Method란 기계가 수행할 분석에 있어 모든 조건이 설정된 일종의 셋업입니다.



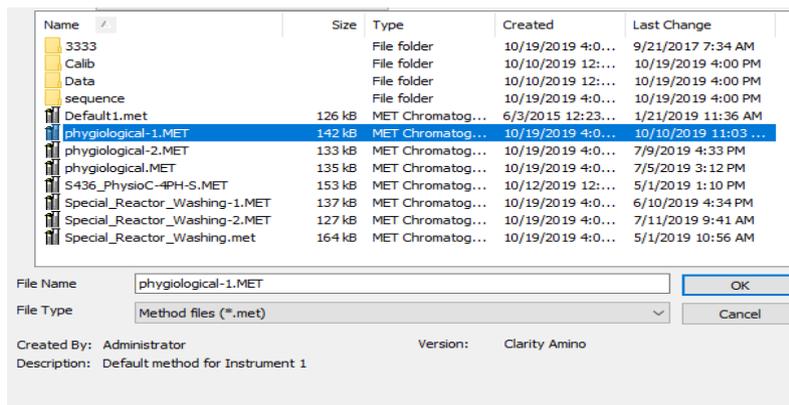
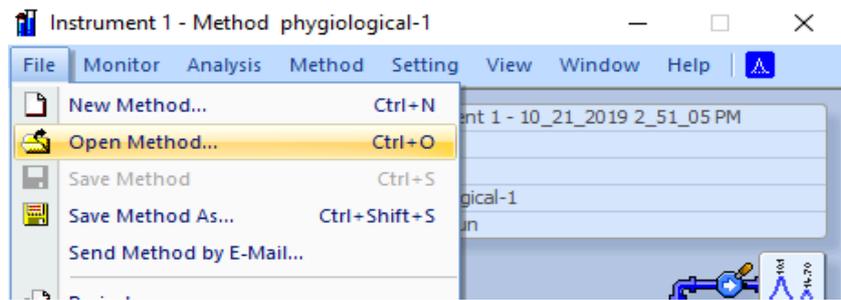
Flow, Gradient, 온도, 분석 시간, 검출 범위 등 분석시 기계의 다양한 조건이 저장된 파일입니다.

먼저 Instrument Window로 이동해 첫번째 항목인 Method Setup을 클릭합니다.

먼저 분석에 필요한 METHOD 파일을 불러와야 합니다.



신버전은 첫번째 아이콘을 눌러 좌상단 Open 아이콘을 눌러 METHOD 파일을 불러옵니다.



구버전은file->Open Method를 이용해 METHOD 파일을 불러옵니다

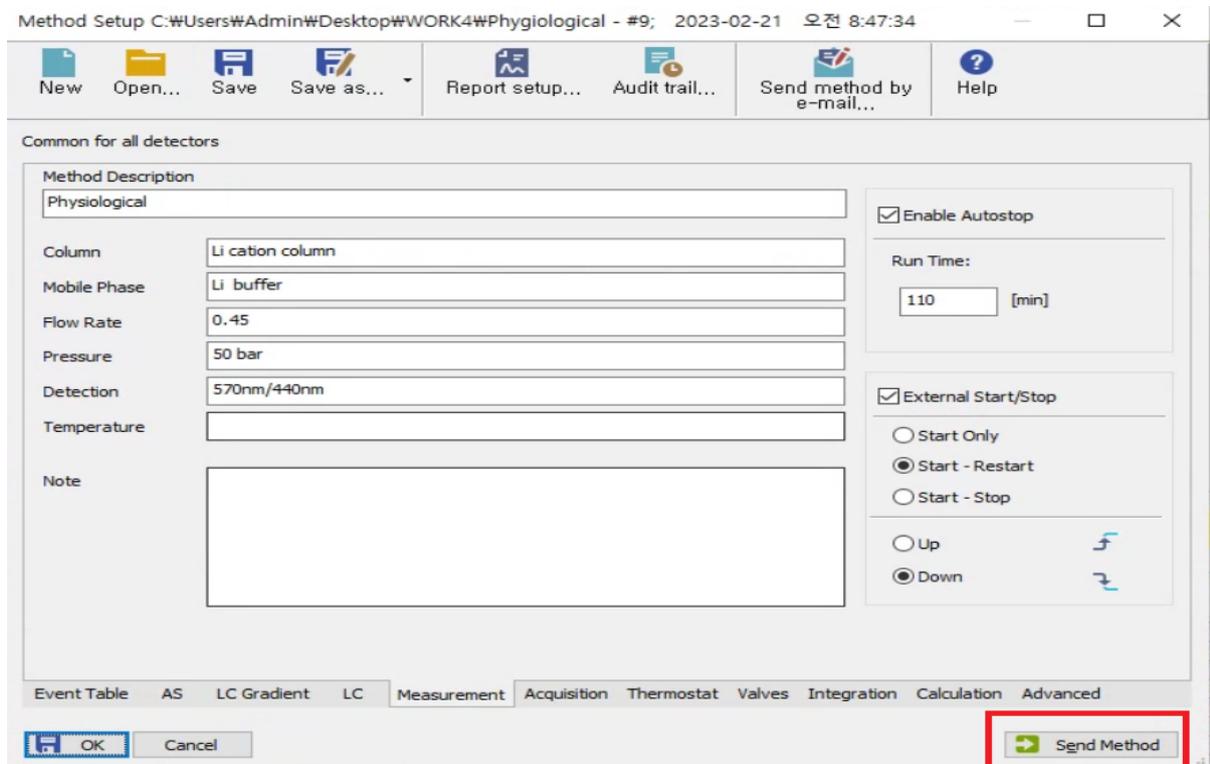
Method의 변경은 예상치 못한 분석 결과 변화를 야기할 수도 있습니다.

반드시 전문가와 상담 후 변경 하시길 권장합니다.

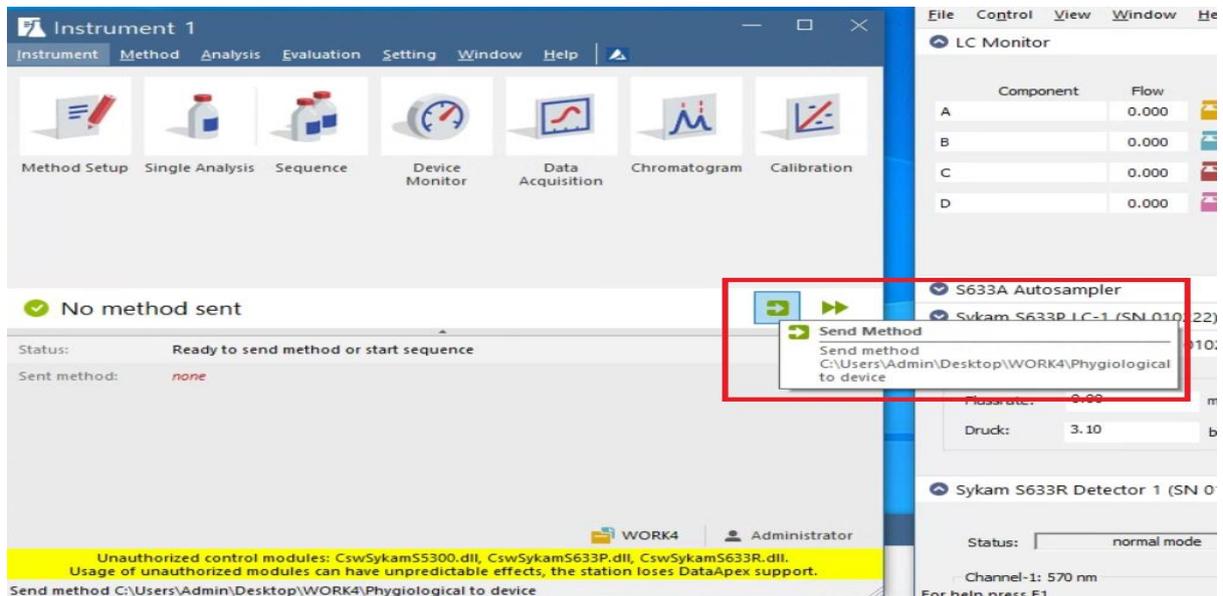


이제 Method를 불러왔다면 기계로 Method를 전송해야 합니다.

먼저 Method Setup에서 원하는 Method를 불러온 뒤 우측 하단의 Send Method를 클릭합니다.



혹은 Instrument Window에서 아래 아이콘을 클릭하면 이전에 보냈던 Method를 보낼 수 있습니다. Instrument Window에서 메소드를 보낼 경우 이전에 보냈던 method가 다시 보내집니다.



Method를 기계에 전송했다면 이제 분석에 필요한 조건에 맞게 세팅이 됩니다.

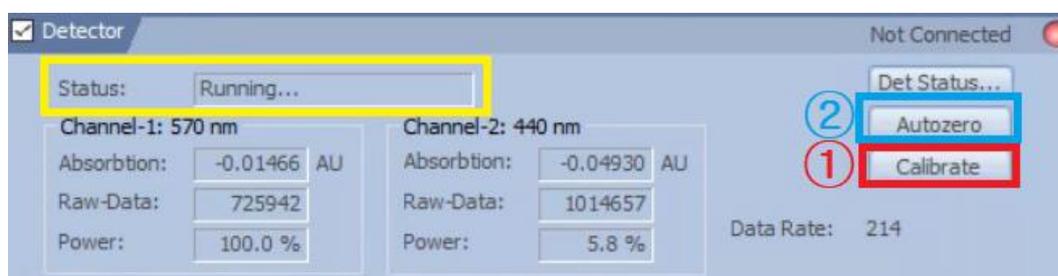
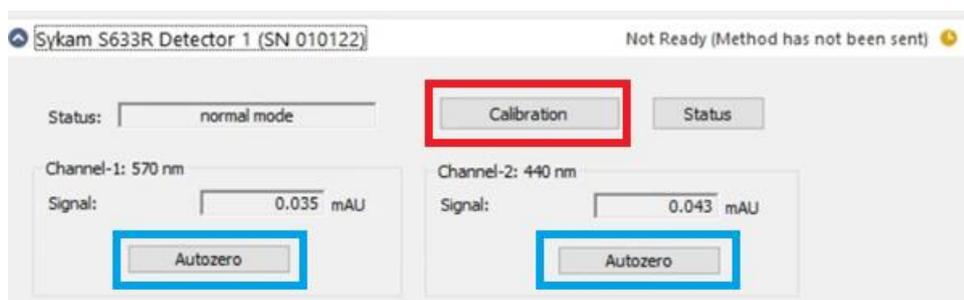
Flow, 컬럼 온도, 리액터 온도 등 분석에 필요한 인자들이 적절한 값으로 세팅이 되며 안정화가 될때까지 대략 20~30분정도 기다려줍니다.

이제 디텍터와의 연결 확인과 베이스라인 확인을 위해 AutoZero를 해야합니다.

먼저 Sykam S433의 경우 S4300 Amino Reactor Module의 키보드에 AutoZero 버튼이 있습니다.



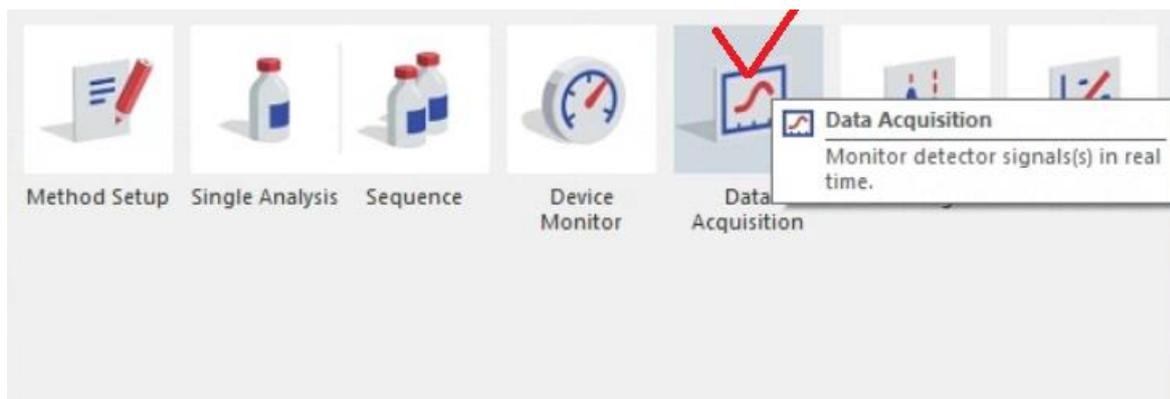
S436, S437, S633 등의 S433 이후 모델의 경우 Clarity Device Monitor에서 가능합니다.



이때, 먼저 **Calibrate**를 눌러줍니다. 하단의 노란색 창 처럼 Status 항목에서 "Calibrating..." 이라고 나오며 3분 정도 기다려줍니다. 그런다음 **Autozero** 버튼을 눌러줍니다.

4.6. Data Acquisition

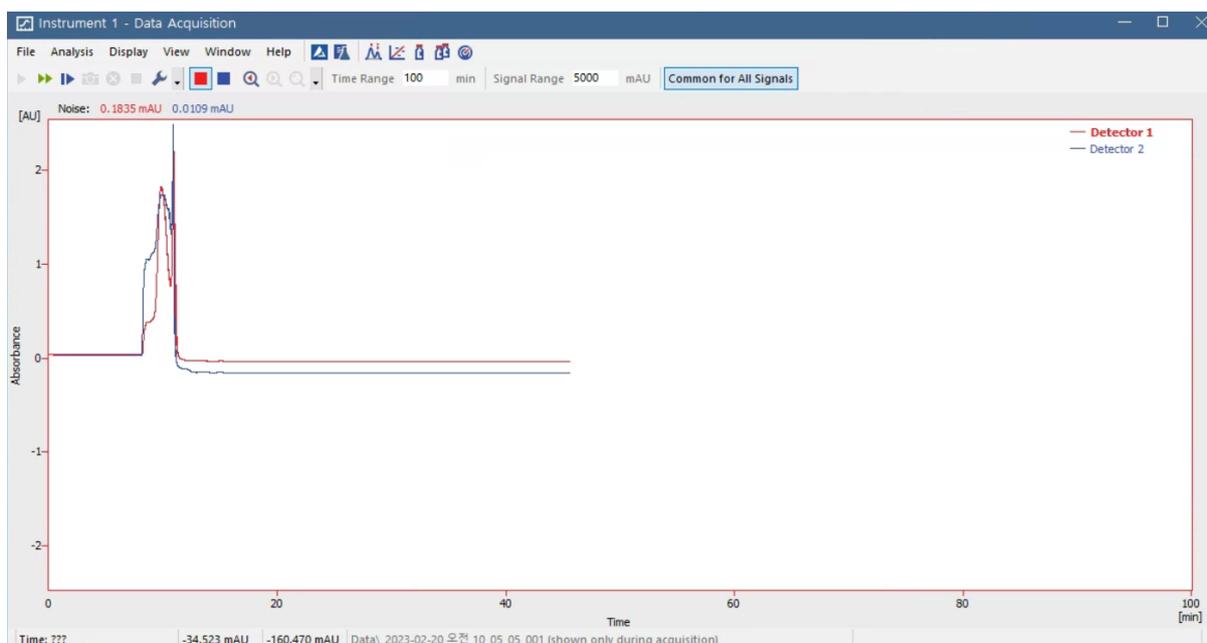
이제 Instrument Window에서 Data Acquisition을 클릭합니다.



Data Acquisition은 디텍터가 컴퓨터로 보내는 데이터를 실시간으로 볼 수 있는 기능입니다.

먼저 위에서 설명한 Autozero를 눌러보면 시그널 값이 위아래로 출렁이는 것을 볼 수 있습니다. 만약 AutoZero를 했는데도 아래와 같이 위아래로 값이 흔들리지 않고 변화가 없다면 그것은 디텍터와의 연결이 잘못됐다는 것을 의미합니다.

Autozero를 한 뒤 아래와 같이 비교적 평평한 베이스라인을 얻을때까지 기다려줍니다.



이제 Baseline이 20분 정도 안정적으로 유지되면 분석을 시작할 준비가 됐습니다.

4.7 Sequence

기계적인 안정화가 됐다면 이제 분석의 순서, 주입량 등을 결정하는 시퀀스를 작성할 차례입니다.
먼저 Instrument Window의 Sequence를 클릭합니다.

Status	Run	SV	EV	I/V	Sample ID	Sample	Sample Amount	ISTD1 Amount	Sample Dilution	Inj. Vol. [μL]	File Name	Sample Type	Lvl	Method Name	Report Style	Open	Open Calib.	Print
<input checked="" type="checkbox"/>	1	1	1	1	bk		0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n	Bypass		Hydrolisat		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	2	2	3	3	std 100 nmol		0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n%i	Unknown		Hydrolisat		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	3	3	1	1	sample 1	hydrolysis	0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n	Unknown		Hydrolisat		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	4	4	1	1	sample 2	oxidized	0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n	Unknown		Hydrolisat		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	5	5	5	1	end	oxidized	0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n	Bypass		Special_Reactor_Washing		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	6															<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

이제 시퀀스를 작성할 때 반드시 알아야할 몇가지 항목이 있습니다.

Name	기능
SV(EV)	몇번 바이얼을 분석할지 결정
I/V	몇번 반복 분석할지 결정
Inj.Vol	1회 주입량, 일반적으로 100 uL 고정
File Name	해당 분석의 크로마토그램 파일 형식
Sample Type	해당 분석 바이얼의 종류 결정
Method Name	해당 분석에 사용할 Method

Sample Type의 경우 해당 바이얼이 어떤 종류의 바이얼인지 결정합니다.

Bypass의 경우 Injection 없이 분석이 진행되며 Blank, Standard의 경우 Calib 폴더에 크로마토그램이 저장됩니다. Unknown의 경우 Data 폴더에 저장됩니다.

Status	Run	SV	EV	I/V	Sample ID	Sample	Sample Amount	ISTD1 Amount	Sample Dilution	Inj. Vol. [μL]	File Name	Sample Type	Lvl	Method Name
<input checked="" type="checkbox"/>	1	1	1	1	bk		0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n	Bypass		Hydrolisat
<input checked="" type="checkbox"/>	2	2	3	3	std 100 nmol		0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n%i	Unknown		Hydrolisat
<input checked="" type="checkbox"/>	3	3	1	1	sample 1	hydrolysis	0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n	Unknown		Hydrolisat
<input checked="" type="checkbox"/>	4	4	1	1	sample 2	oxidized	0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n	Unknown		Hydrolisat
<input checked="" type="checkbox"/>	5	5	5	1	end	oxidized	0.000	0.000	1.000	100.000	%q_%R_%3n	Bypass		Special_Reactor_Washing

먼저 Sample ID 와 Sample을 작성한 뒤, Injection Volume은 100 uL로 설정합니다.

이후 File Name을 설정한 뒤 분석에 사용할 Method를 위 사진의 빨간 상자를 클릭해 불러옵니다.

이때, 마지막 워싱을 위한 "end" 의 경우 추가적으로 지정된 워싱 메소드로 설정해줍니다.

일반적으로 분석 전에 블랭크 런(Bypass run)을 돌리는 것이 바람직합니다.

이는 동일한 시간의 Reg.Sol -> Buffer A-1(A-4) 비율을 적용하기에 컬럼의 상태를 동일한 조건으로 맞춰주며 이는 Peak Retention Time에 가장 중요한 역할을 합니다.

알아두면 좋은 상식, File Name

기본으로 설정된 File Name 을 사용한다면 모든 데이터가 하나의 Data Folder에 저장되기 때문에

불편할 수 있습니다. 따라서 이들을 시간별로, 날짜별로 혹은 특정 그룹 별로 개별적으로 저장하도록 지정할 수 있습니다.

먼저 "File Name,의 원리는 다음과 같습니다.

먼저 %다음 알파벳 혹은 숫자는 축약어를 의미합니다.

%q는 Sample ID를 %Q는 Sample을의미합니다. 축약어 리스트의 경우 File Name의 더보기 항목을 클릭해 볼 수 있습니다.

즉, 방금 전 예시로 나온 File Name인 %q_%R_%3n은 "Sample ID"_"현재시간"_"분석번호" 입니다.

또한 윈도우에서 폴더 경로의 구분은 "w,, 로 구분합니다.(엔터키 위 키)

만약 해당 날짜의 폴더에 크로마토그램을 저장하고 싶다면(해당 폴더가 존재하지 않으면

" %m%oW%q_%R_%3n ,, 이렇게 지정하면 됩니다.

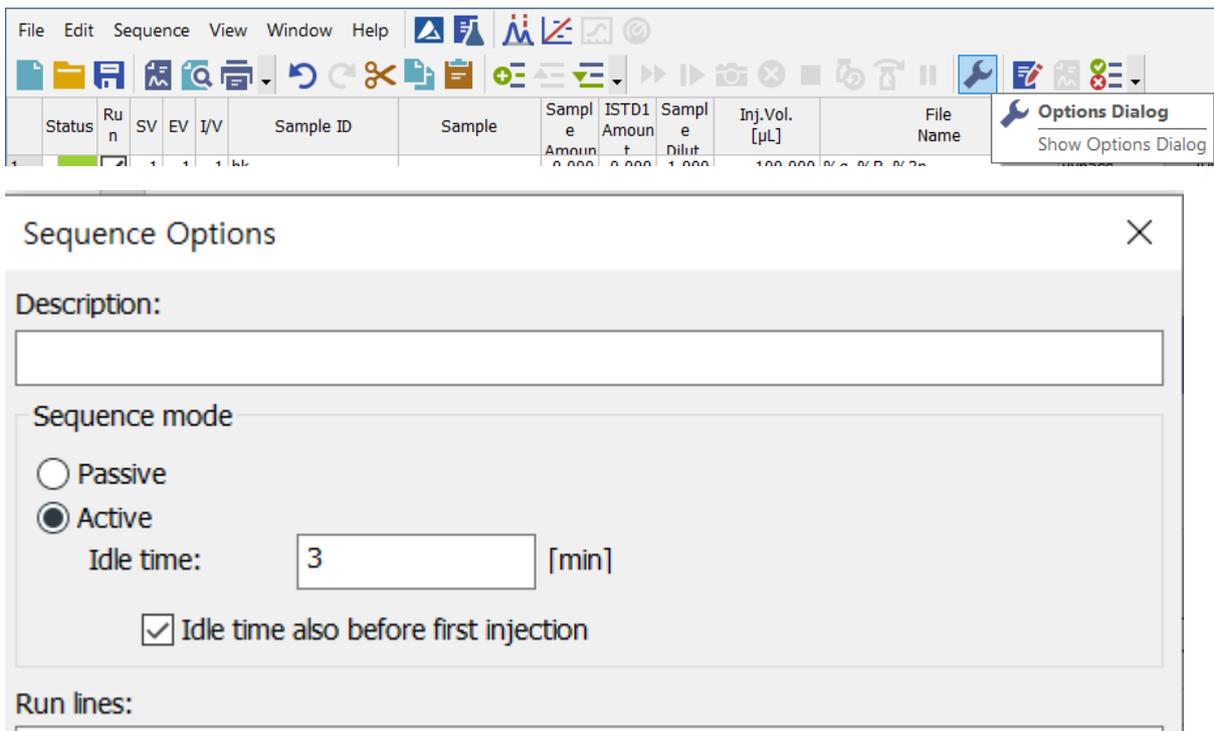
혹은 %를 이용한 축약어가 아닌 원하는 내용을 기입할 수도 있습니다.

만약 test 폴더에 저장하고 싶다면 testW%q_%Q_%T 이런 식으로도 가능합니다.

아래는 다양한 File Name의 예시입니다.

Status	Run	SV	EV	I/V	Sample ID	Sample	Sample Amount	ISTD1 Amount	Sample Dilut	Inj.Vol. [μL]	File Name	Sample Type	Lvl	Method Name
1	<input checked="" type="checkbox"/>	1	1	1	Std		100 nmol	0.000	0.000	1.000	100.000	ColumnTestW%q_%Q_%T	Unknown	Hydrolysat
DATA#ColumnTest#Std_100 nmol_12_59.prm														
2	<input type="checkbox"/>													
DATA#0221#Sample_AKF-B102_12_59.prm														

시퀀스 작성이 끝났다면 이제 상단의 스페너 아이콘, "Options Dialog"를 클릭합니다.

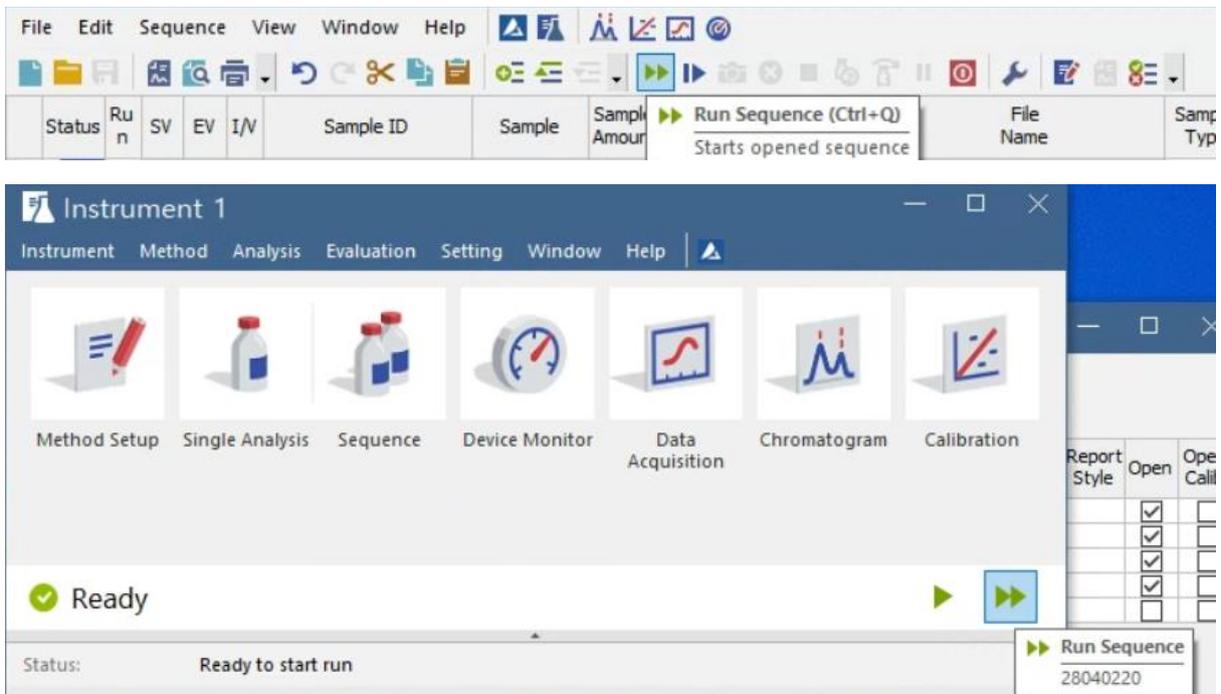


Idle Time을 3분으로 설정합니다.(Idle Time은 분석이 끝난 후 몇분 뒤에 다음 분석을 할지 결정)

이제 시퀀스 작성이 끝났다면 시퀀스를 저장한 뒤 분석을 시작합니다.

분석의 시작은 두가지 방법으로 가능합니다.

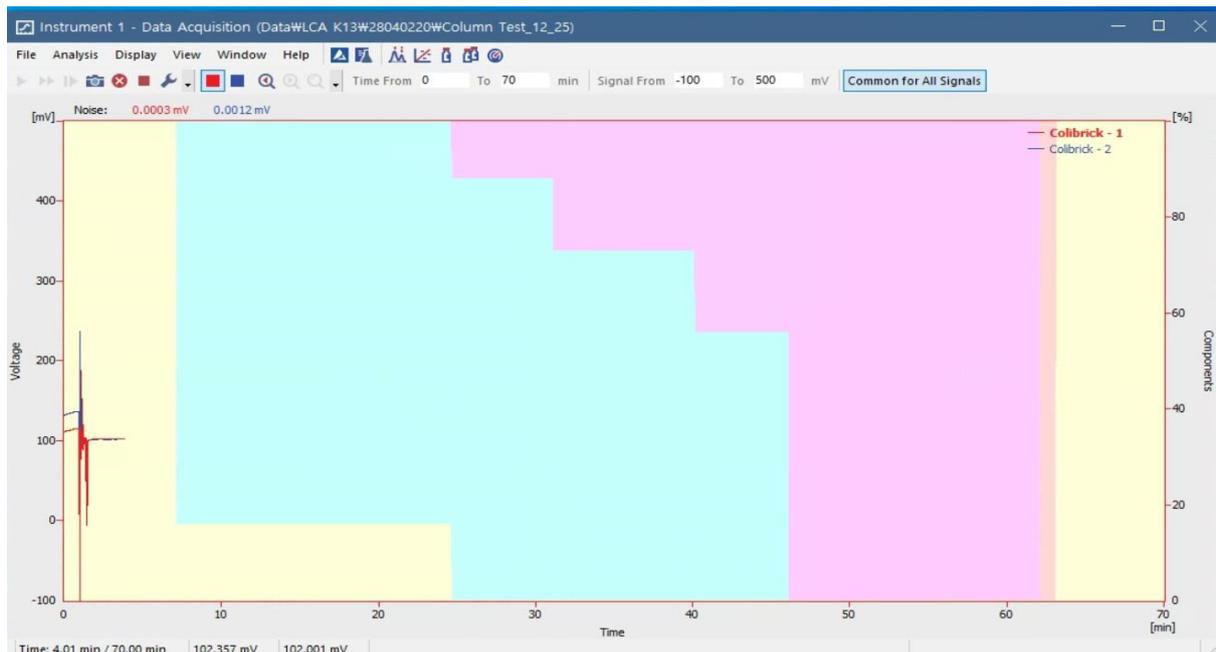
먼저 아래와 같이 Sequence의 상단 메뉴바의 초록 화살표를 누르거나 Instrument Window에서 초록 화살표를 눌러 분석을 시작할 수 있습니다.



분석 시작 명령을 내리면 곧 장비의 오토샘플러에서 샘플을 인젝션 합니다.

샘플의 인젝션이 완료되면 "Data Acquisition"의 배경화면이 하얀색에서 노란색 혹은 설정된

Gradient Table로 변경됩니다.



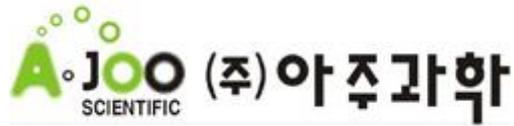
이제 분석이 끝날때까지 기다려 줍니다.

아미노산 분석기의 사용은 다음과 같이 요약할 수 있습니다.

순서	과정	상세 내용
1	Waste 확인	Waste Bottle에 여유 용량 있는지 확인
2	퍼징	Buffer, Ninhydrin(H ₂ O) Reagent Purge
3	압력확인	Buffer, Ninhydrin(H ₂ O) pump 압력 확인
4	니들 워싱	오토샘플러 니들 워싱
5	AutoZero	디텍터 연결 확인
6	안정화	20~30 분정도 안정화 작업
7	시퀀스 작성	원하는 내용으로 시퀀스 작성
8	분석 시작	분석 시작
9	데이터 가공	데이터 적분, 교정

5. 데이터 처리

아미노산 분석 크로마토그램 데이터 사용 방법



5.1. 적분(INTEGRATION)

분석 결과에서 정해진 개수의 피크가 나오지 않거나
 피크의 모양이 이상한 경우 8.부록 분석법 수정을 참고해주세요.

분석이 끝났다면 자동으로 분석 데이터는 크로마토그램 형태로 저장됩니다.

이제 이 분석 데이터를 원하는 형태로 가공해야 합니다.

이러한 일련의 과정을 **적분(Integration)**이라고 합니다.

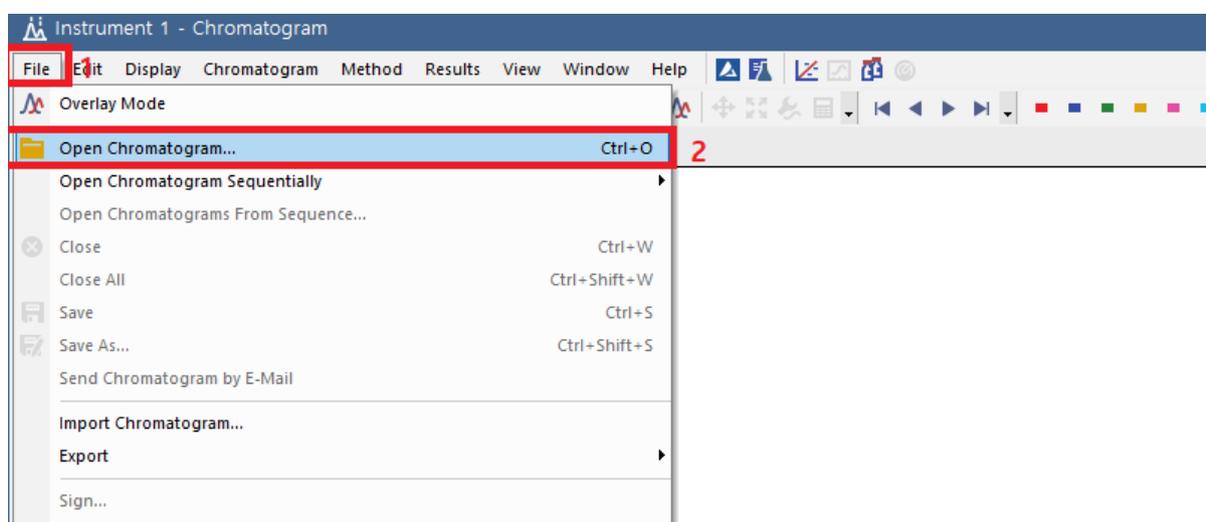
처음 적분하는 것은 표준 분석 물질(Std)의 크로마토그램입니다.

이는 시료 분석 데이터에 적용할 **교정 데이터(Calibration Data)**가 필요하기 때문입니다.

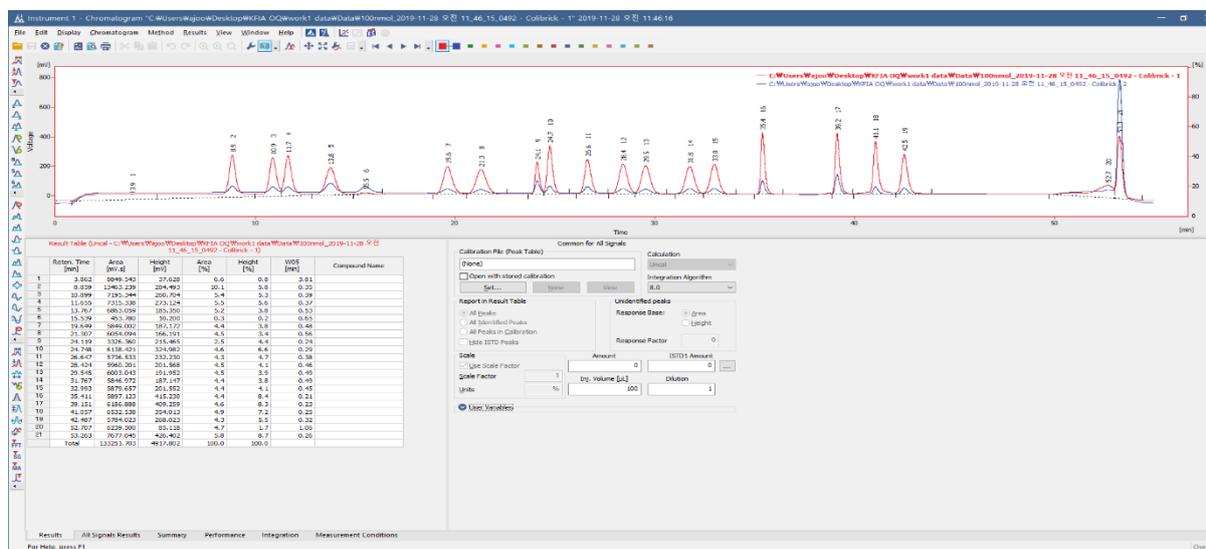
따라서 분석이 끝난 후 표준 분석 물질 크로마토그램을 먼저 적분하여 교정 데이터를 만듭니다.



4번 크로마토그램(Chromatogram)을 눌러 새로운 크로마토그램 윈도우를 불러옵니다.



Open Chromatogram 을 이용해 먼저 분석했던 표준 분석 물질(Standard) 데이터를 불러옵니다.



<표준 분석 물질 분석 데이터>

Chromatogram window 내에서 진행되는 적분은 다음과 같은 과정으로 진행됩니다.

1. 크로마토그램을 불러온다.
2. 필요 없는 부분을 지운다.
3. 각 Peak에 맞는 적분선을 설정한다.

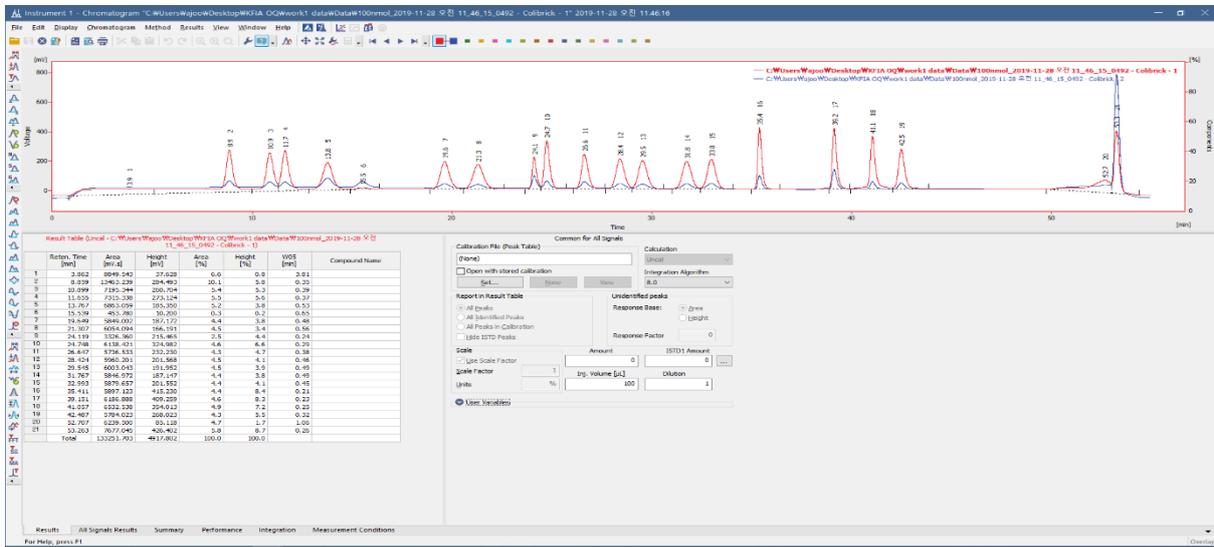
위와 같은 과정을 통해 크로마토그램을 가공하게 됩니다.

이런 적분 과정에서 필요한 기능이 여러가지 있는데, 그 중에서 가장 중점적으로 필요한 기능은 아래와 같습니다.

	Add: 새로운 Peak를 추가하는 기능
	lock: Peak 를 제거(등록 해제)하는 기능
	Start: Peak 의 시작점을 설정하는 기능
	End: Peak 의 끝점을 설정하는 기능

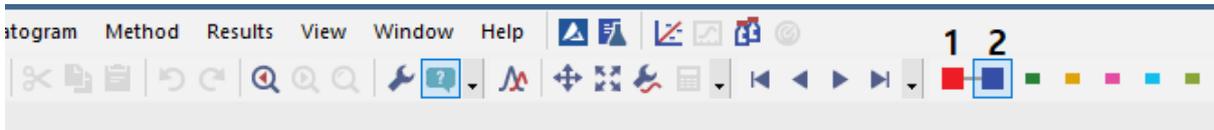
일반적인 아미노산 분석 크로마토그램을 다룰 땐 위 네가지 기능을 이용해 적분을 하게 됩니다. 이제 이 기능 들을 이용해 교정 데이터를 만들 차례입니다.

우선 일반 시료 분석 크로마토그램을 적분하기 앞서 교정 데이터 작성을 위해 표준 분석 물질의 크로마토그램을 먼저 적분합니다.



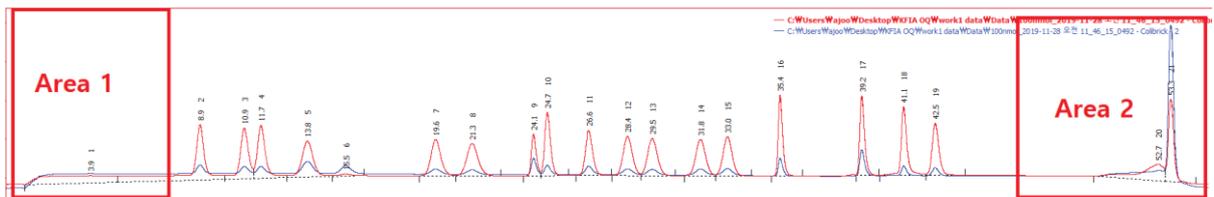
표준 분석 물질(Standard)의 크로마토그램을 불러옵니다.

빨간선은 570nm, 파란선은 440nm를 나타냅니다.



먼저 상단 메뉴에서 빨간색 박스를 클릭하여 570nm를 수정합니다.

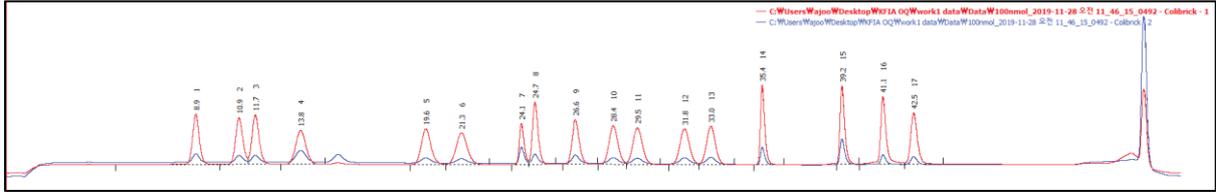
우선 분석의 시작과 끝에 나오는 Noise 등의 필요 없는 데이터와 Peak를 지워주는 작업이 필요합니다. 아래와 같은 Area1, Area2부분은 필요 없는 데이터입니다.



<Hydrolysate Std 100nmol Chromatogram>



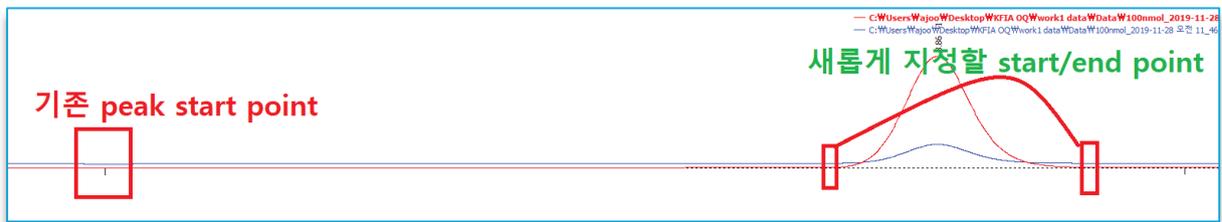
를 고른 후 각 영역을 선택하여 Area 1과 Area 2의 peak를 지워줍니다. 면 그림상 나와있는 1번, 20번, 21번 peak는 목록에서 사라지게 됩니다.



<Area 1, Area 2를 지워준 후>

이제 필요없는 데이터를 지웠다면 이제 첫 번째 peak(aspartic Acid)의 시작점을 수정해줘야 합니다.

마우스로 1번 peak 근처를 드래그하여 확대합니다.



Clarity에서 자동으로 Peak를 끊는 과정에서 위와같이 Peak의 시작점(Start Point)이 잘못 설정된 경우가 있습니다.

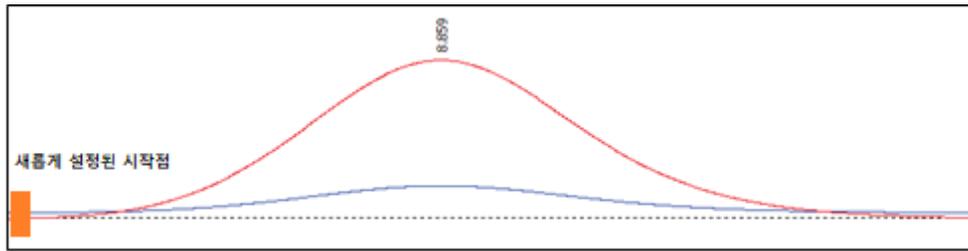
Peak의 시작점과 끝점은 최대한 Peak의 극점(높이가 가장 높은 점)을 기준으로 좌우 대칭이 되도록 하는 것이 중요합니다.

Peak에 해당하는 물질은 대개 Peak의 Area의 비율로 정해지기 때문에 잘못된 시작, 끝점은 결국 잘못된 함유량(Amount)을 받게 됩니다.

start/end를 이용해 Peak의 양 끝을 최대한 대칭성 있게 수정합니다.



Start를 이용해 시작점을 새롭게 설정합니다.

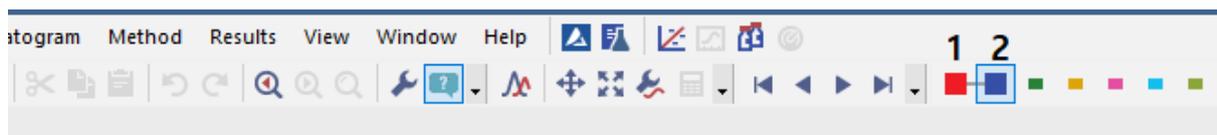


<start/end point 를 수정 후>

양 옆의 필요 없는 데이터를 제거하고 1번 peak의 시작점을 수정했다면 이제 570nm 데이터의 가공은 끝났습니다.

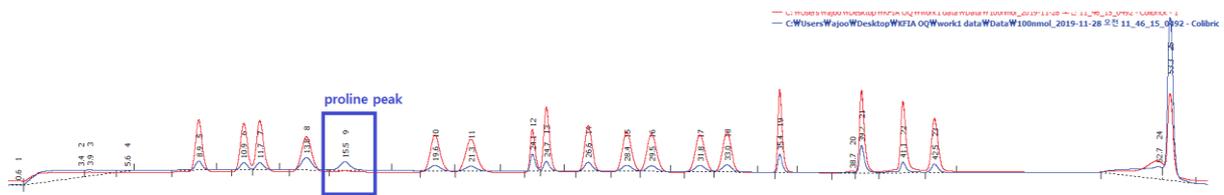
이제 440nm 데이터역시 같은 방법으로 적분하는데

440nm 채널의 경우 Proline과 Hydroxy Proline만 이용합니다. 따라서 나머지 Peak들을 지워야 합니다.

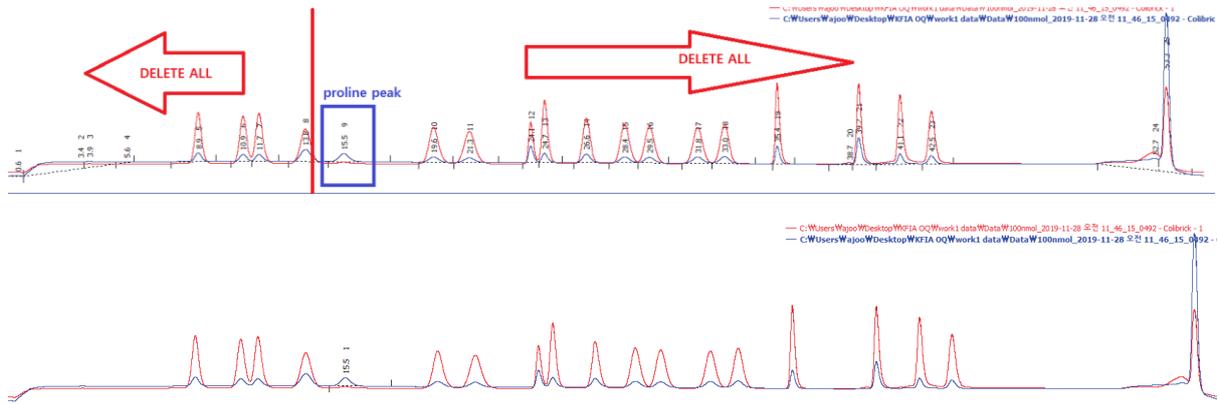


상단 메뉴에서 2번 파란색을 누릅니다.

만약 Overlay Mode를 이용해 여러 개의 크로마토그램을 불러왔다면 색만 다를 뿐 순서는 같습니다. (왼쪽: 570nm, 오른쪽: 440nm)



570nm의 데이터 가공처럼 나머지 peak를 지우는데, 이 때 Proline peak인 9번 Peak를 제외한 나머지 모두를 지워주면 됩니다.



<프롤린을 제외한 peak 를 지웠을 때>

이제 적분과정이 끝났습니다.

시작점, 끝점을 수정하여 각 peak 별로 올바른 적분선을 설정하였습니다.

하지만 이러한 작업을 모든 크로마토그램에 반복할 수는 없습니다.

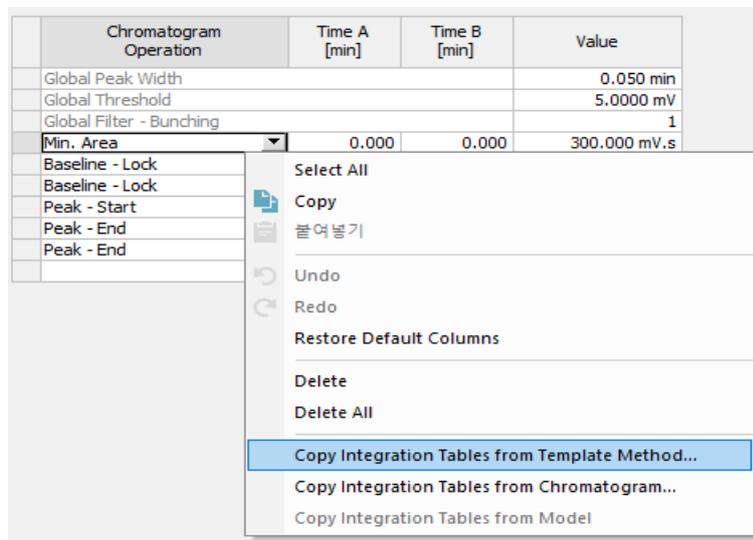
따라서 나머지 크로마토그램 혹은 이후 분석할 크로마토그램에 동일한 적분을 적용하게 하는 방법 역시 필요합니다. 이러한 기능을 위해 Integration Table 을 사용합니다.

크로마토그램에 적용된 적분 내용을 담은 것을 Integration Table 이라고 합니다.

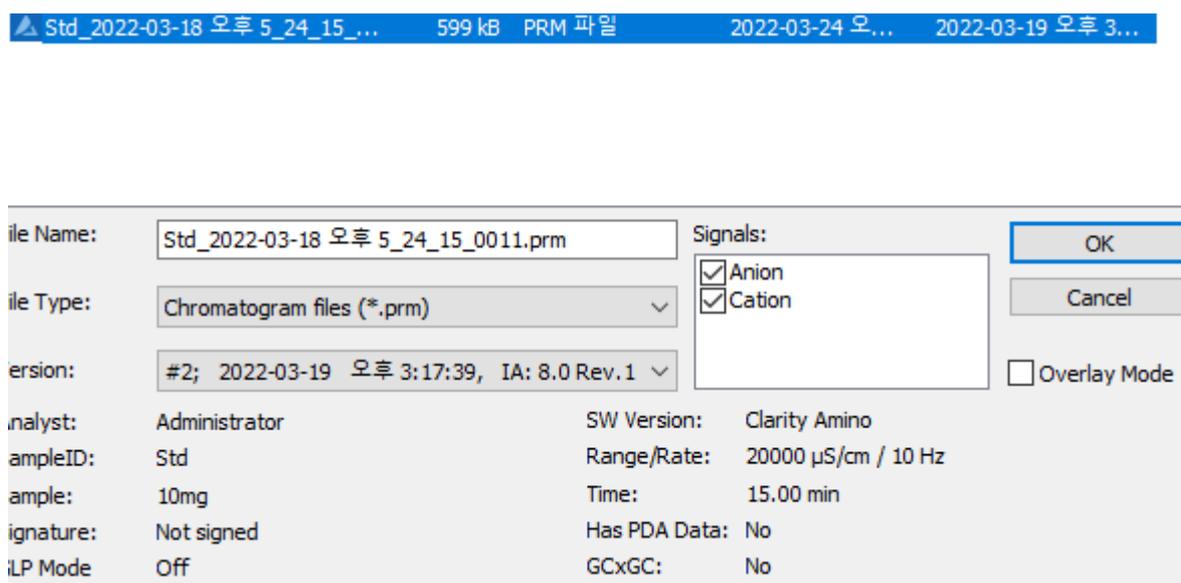
Integration Table			
Chromatogram Operation	Time A [min]	Time B [min]	Value
Global Peak Width			0.050 min
Global Threshold			5.0000 mV
Global Filter - Bunching			1
Min. Area	0.000	0.000	300,000 mV.s
Baseline - Lock	0.000	6.940	
Baseline - Lock	49.000	55.000	
Peak - Start	9.014	-0.505	
Peak - End	9.014	0.658	
Peak - End	30.728	0.668	

크로마토그램 창의 하단 Integration 탭에서 확인할 수 있습니다.

이제 다른 크로마토그램을 연 뒤 Integration 탭에 간 뒤 우클릭을 하여
Copy Integration Table From Chromatogram ... 을 클릭합니다.



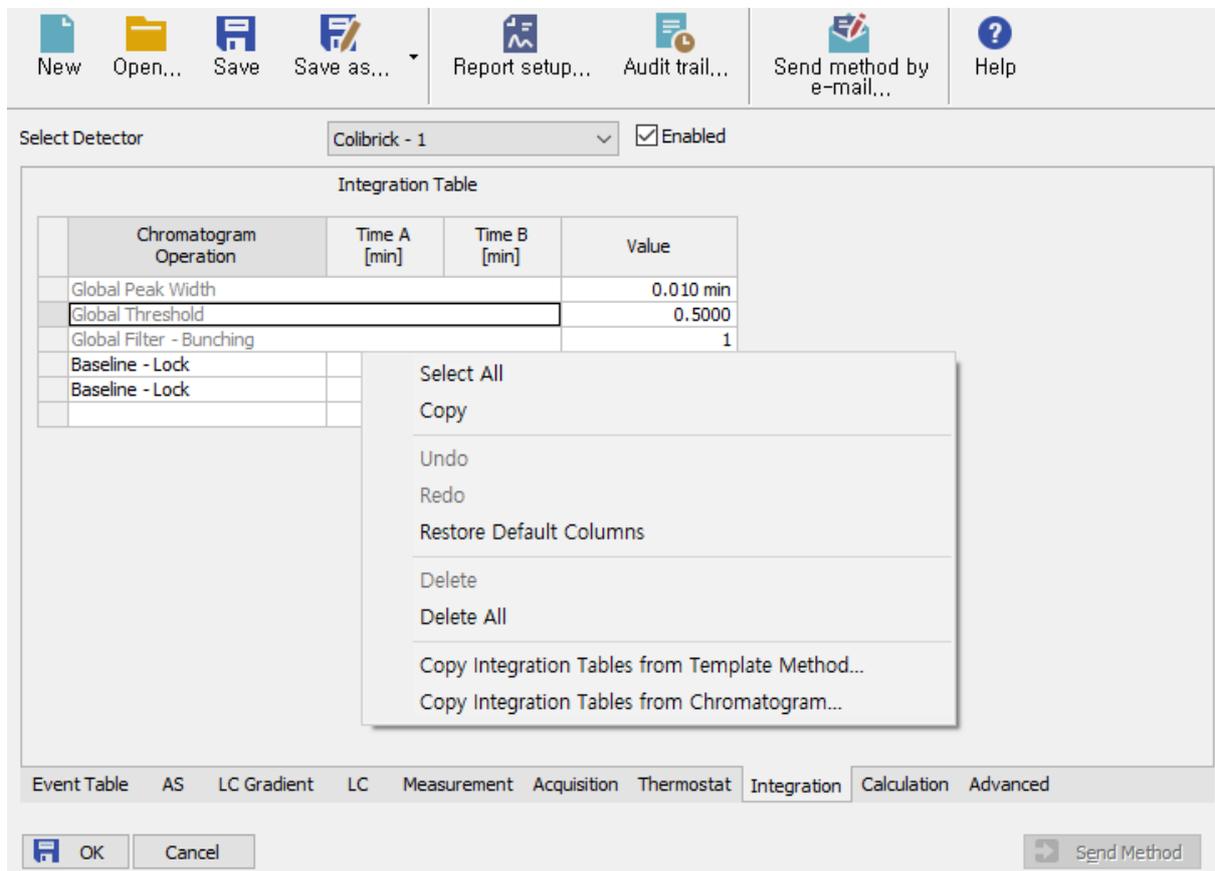
그 뒤 앞서 적분을 끝낸 크로마토그램을 선택해 불러와주면 적분 테이블이 불러와집니다.



또한 앞으로 분석될 크로마토그램에도 동일한 적분 테이블을 적용하고 싶다면

Method 에 적분 테이블을 옮겨주면 됩니다.

사용하는 Method 의 Integration 탭으로 이동합니다.



이전 상황과 동일하게 크로마토그램을 불러와주면 해당 크로마토그램에 저장된 Integration Table 이 적용되게 됩니다.

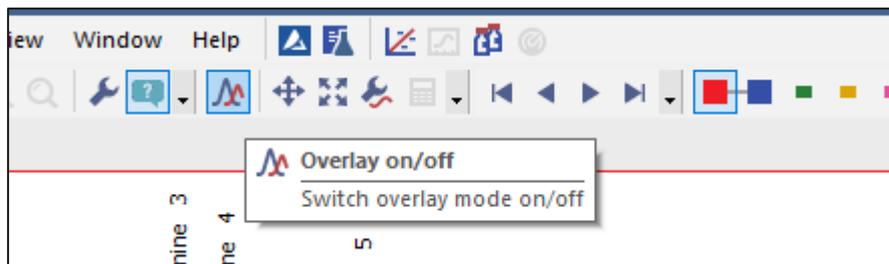
이후 입력된 Integration Table 이 분석될 모든 크로마토그램에 적용되게 됩니다.

알아두면 좋은 상식, Overlay Mode

Chromatogram window 에는 또다른 기능인 overlay Mode, 겹쳐보기 모드가 있습니다.

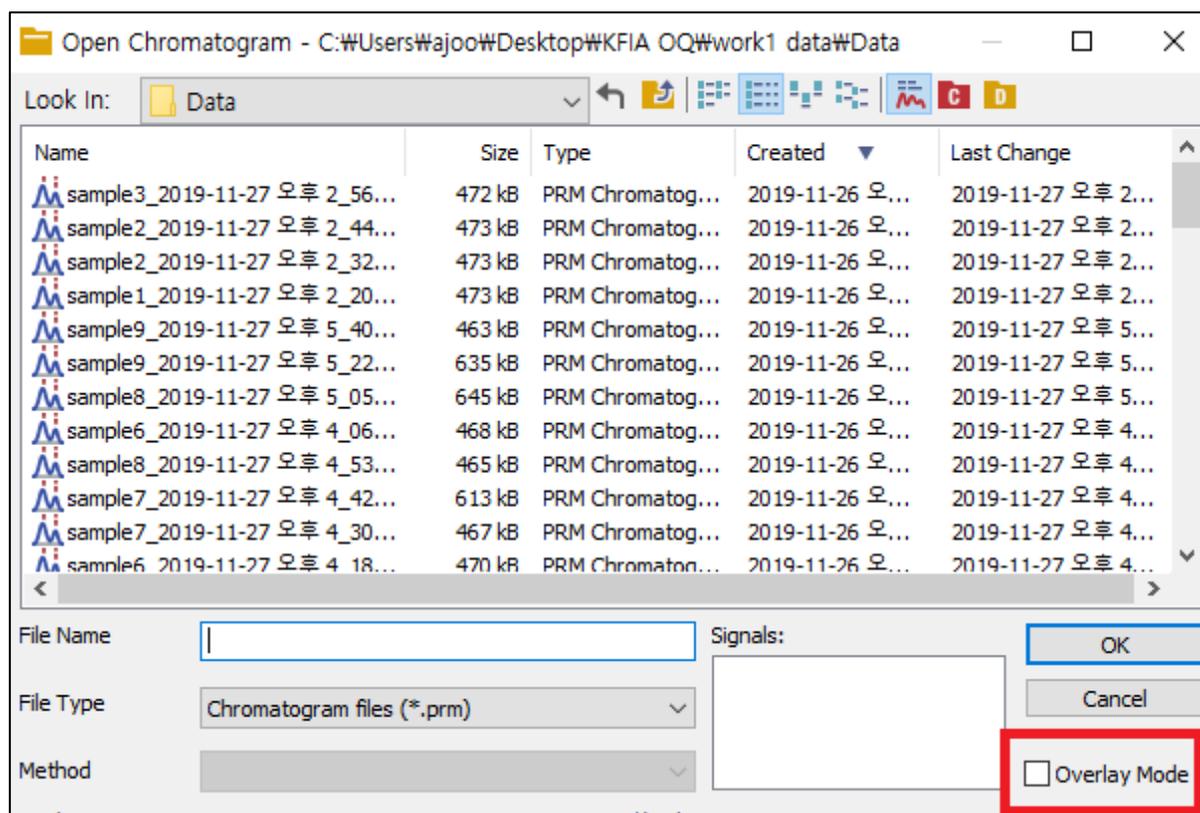
이는 여러 크로마토그램 데이터를 한 화면에 겹쳐놓는 방식인데, 같은 분석 상황에서 같은 물질의 머무름 시간(Retention Time)이 흔들리는 등 여러가지 분석과 기계의 상태를 확인하기 위해서 사용합니다.

같은 조건하에 같은 물질이 어떤 크로마토그램에선 9.1 분에, 어떤 크로마토그램에선 9.4 분에 검출 된다면 이는 기계적이나 프로그램 상 분석에 문제가 있다는 걸 뜻합니다.



Overlay mode는 중앙 상단의  아이콘을 누르거나

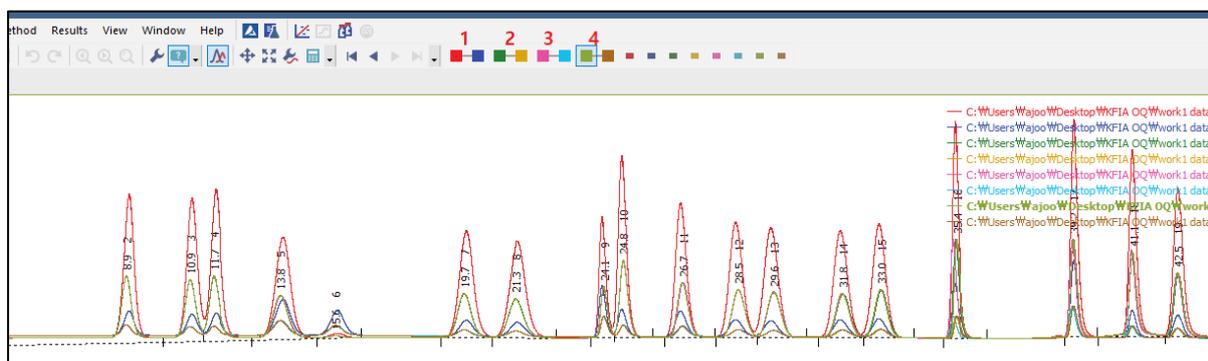
좌측 상단의 File -> Overlay Mode



혹은 File -> OpenChromatogram -> Overlay mode를 체크하면 overlay mode를 사용할 수 있습니다.

이는 사용하시는 Clarity 버전에 따라 조금씩 위치가 바뀔 수 있습니다.

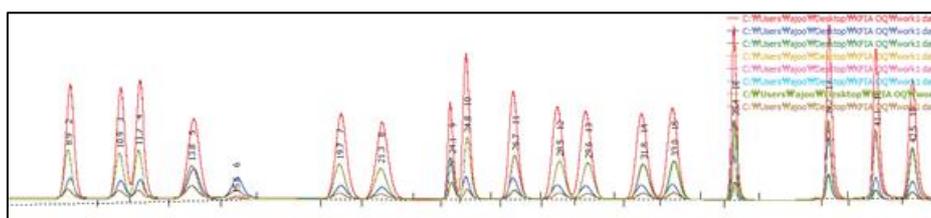
이제 같은 조건(시퀀스)에서 분석된 크로마토그램을 여러 개 불러옵니다.



농도가 다른 4개의 std chromatogram을 불러왔습니다.



메뉴의 중앙에 위치한 단색 사각형들을 클릭하면 순서대로 원하는 크로마토그램을 맨 위로 두고 수정, 가공할 수 있습니다.



농도별로 peak의 크기가 다르지만 각 peak의 RT는 동일한 것을 볼 수 있습니다.

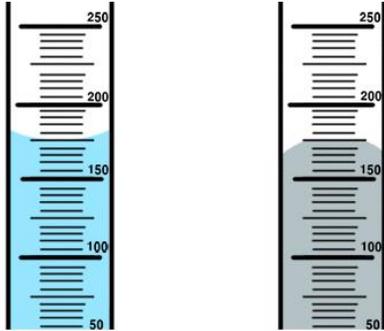
사용하는 시약의 미세한 pH 차이에 등에 따라 RT 값이 달라질 수 있지만 같은 시약 조건 하에 시행된 분석, 특히 시퀀스에서 작성된 반복 분석 시행된 표준 분석 물질의 크로마토그램은 위와 같이 모든 peak의 머무름 시간이 같아야 합니다.

만약 Retention time이 흔들려 오차 범위 이상의 차이가 날 경우 교정 데이터를 사용할 수 없게 됩니다. 일반적으로 Retention Time의 RSD(%)가 1% 이내여야 합니다.

5.2. 교정(CALIBRATION)

교정 데이터는 비커의 눈금과도 같은 역할을 합니다.

모든 분석은 상대적이기 때문에, 그 상대적인 분석값의 기준점이 되는 역할이 교정 데이터(Calibration Data)입니다.



우리가 플라스크의 담긴 용액의 부피를 알고 싶으면 용액의 높이에 맞는 눈금을 읽으면 됩니다.

플라스크의 눈금과 같이 기준점이 되는 것이 교정 데이터입니다.

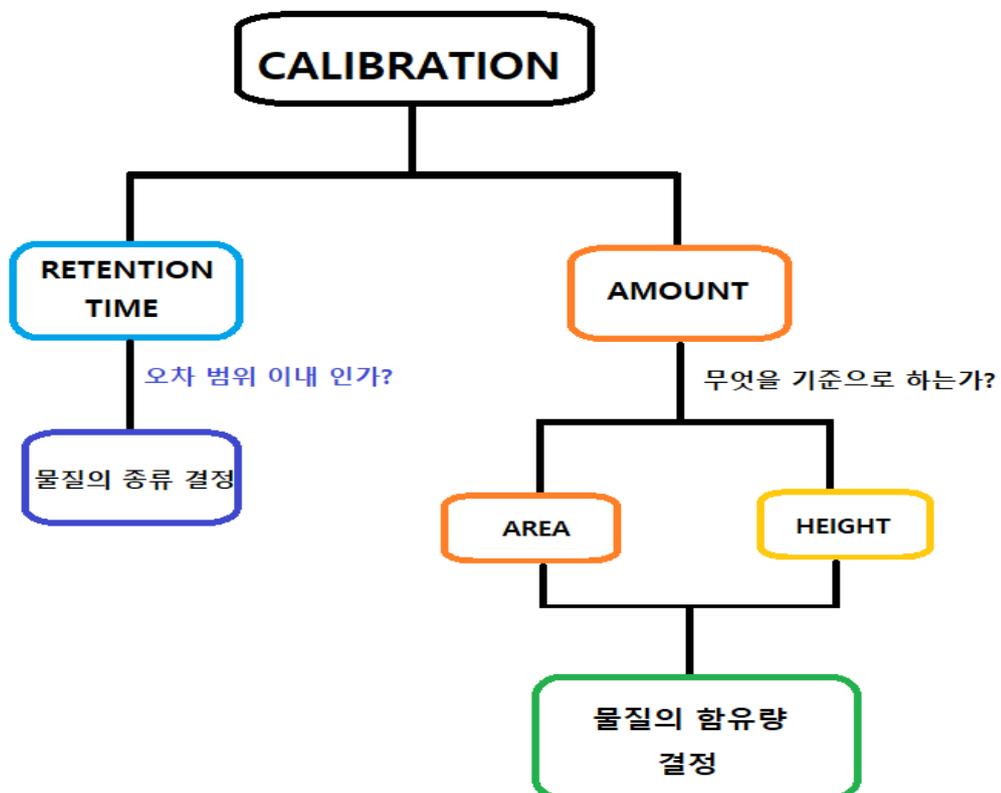
교정 데이터에는 크게 두 가지 요소가 있습니다.

첫번째는 머무름 시간(RT)와 양(Amount)입니다.

머무름 시간(Retention Time; RT)는 어떤 물질이냐를 정하며

양(Amount)은 얼마나 들어있냐를 정합니다.

양(Amount)은 크로마토그램에선 Response라고 표현됩니다.



One Point Calibration과 Multi Point Calibration

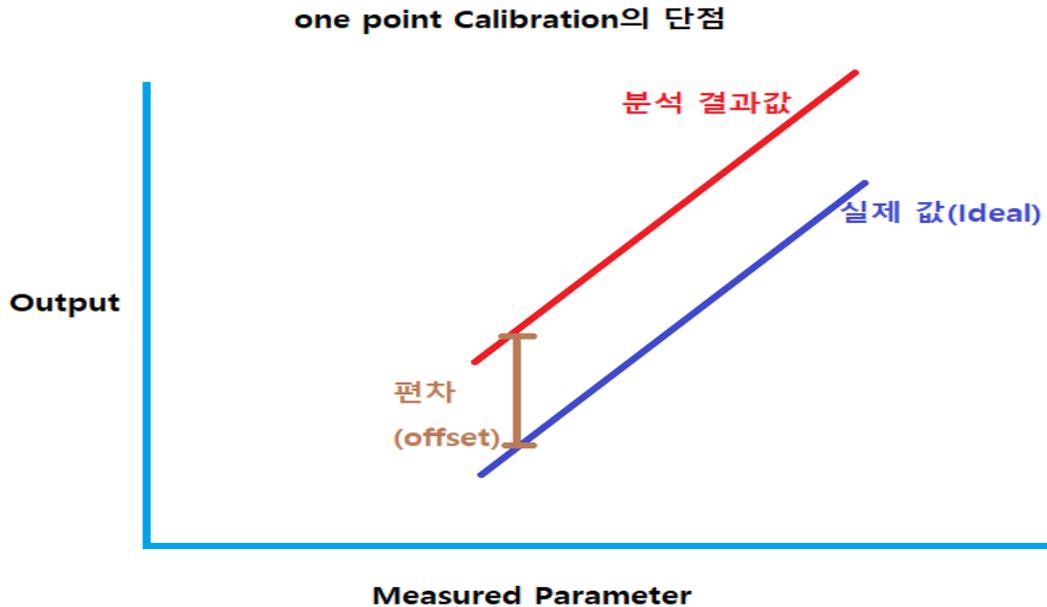
교정에는 크게 두 가지 종류가 있습니다.

단일 점 교정(One Point Calibration)과 다중 점 교정(Multi Point Calibration) 입니다.

교정은 물질과 디텍터의 감도 사이의 직선 관계식을 도출하는 과정입니다.

하지만 한 값으로만 교정을 하게된다면 하나의 점을 지나는 직선은 무수히 많기 때문에 이론상 단일 점 교정의 경우 편차(Offset)에 의한 오류가 발생할 수 있습니다.

만약 Blank의 함량이 0임을 보일 수 있다면 $Y=aX$ 형태로 높은 정확도의 교정이 가능합니다.



아미노산 분석은 일반적으로 발색법을 통한 간접 분석이기 때문에 비교적 Matrix 내의 불순물에서 자유롭습니다. 따라서 OQ(Operation Qualification) 검정이 끝난 아미노산 분석 기라면 One Point Calibration 역시 비교적 높은 직선성을 보증합니다.

만약 매우 정밀한 분석과 결과값, 그리고 교정 데이터의 높은 신뢰도가 필요하다면 **다중 점 교정(Multi Point Calibration)**을 사용해야 합니다.

다중 점 교정은 여러 농도의 표준 분석 물질(std)의 크로마토그램을 이용합니다.

예를 들어 25, 50, 100, 200, 400nmol, 총 다섯 가지 농도의 표준 분석 물질의 크로마토 그램을 이용할 경우 이론상 다섯 점 모두 지나는 직선을 그릴 수 있습니다.

하지만 현실적으로 기계적 한계, 물성 등의 이유로 조금씩 직선에서 벗어나게 되는데 이러한 편차가 얼마나 적냐가 다중 점 교정의 신뢰도, 직선성을 결정합니다.

이러한 신뢰도를 나타내는 척도가 있는데, 이를 상관계수(Correlation Factor)라고 합니다.

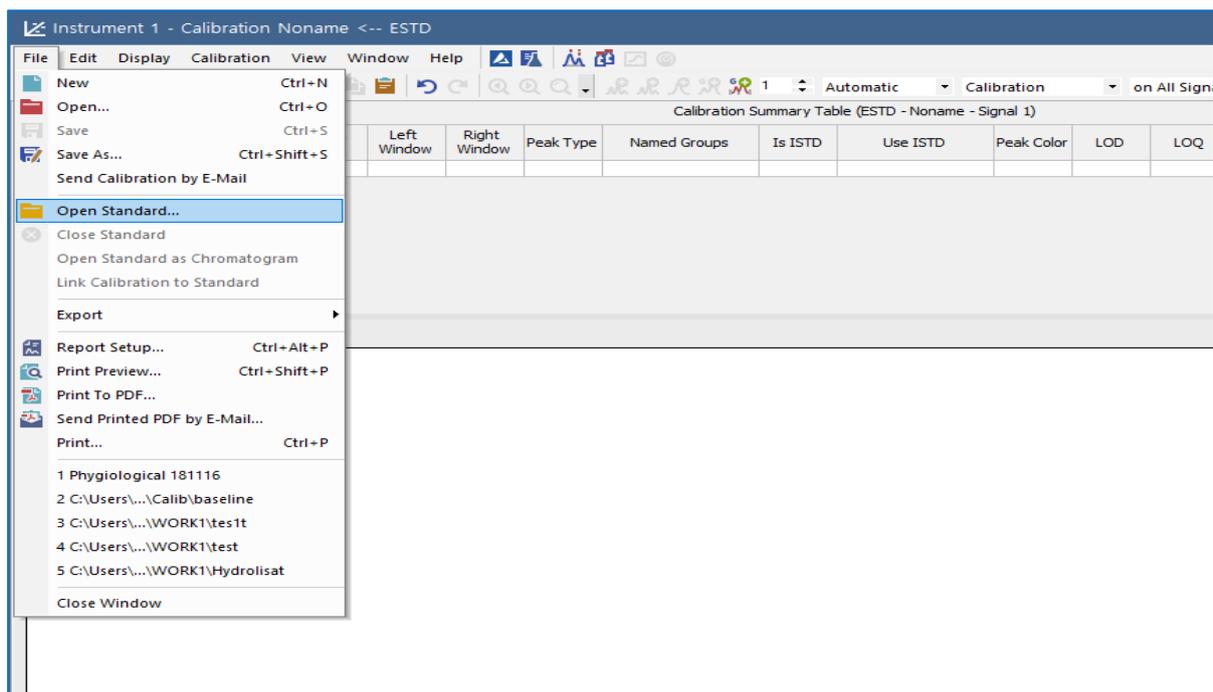
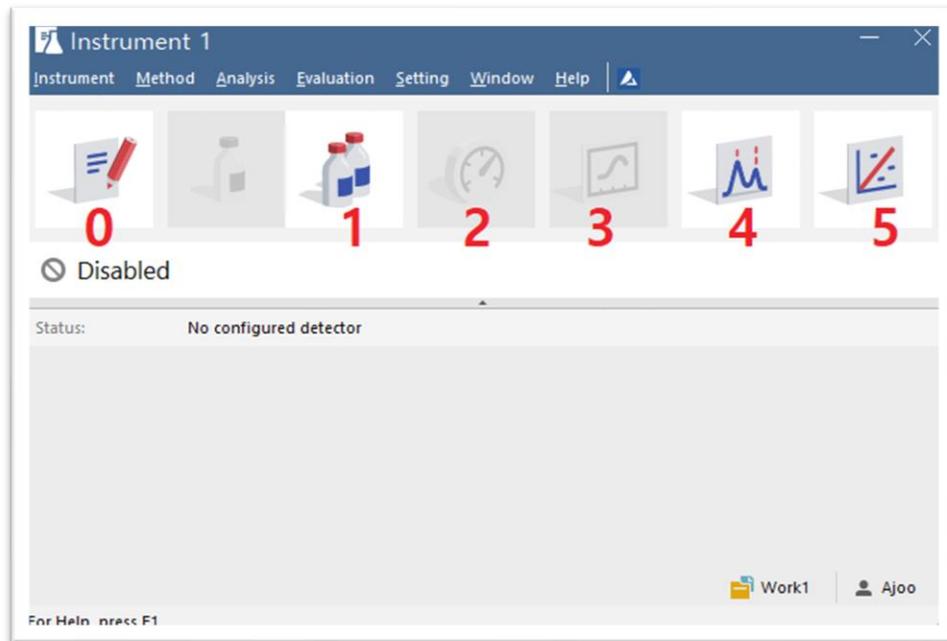


AOAC의 권장 사항 및 식품의약품안전처 등 국가 기관 혹은 공신력 있는 집단에서 제시하는 LC의 직선성 조건은 상관계수가 물질별로 0.999 이상을 요구합니다.

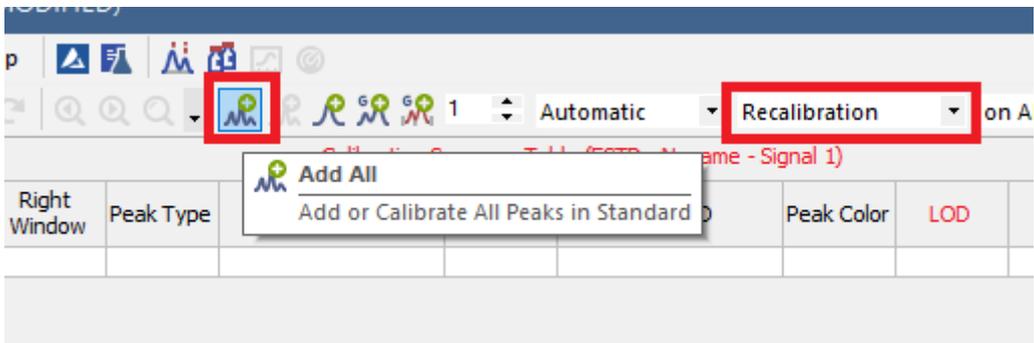
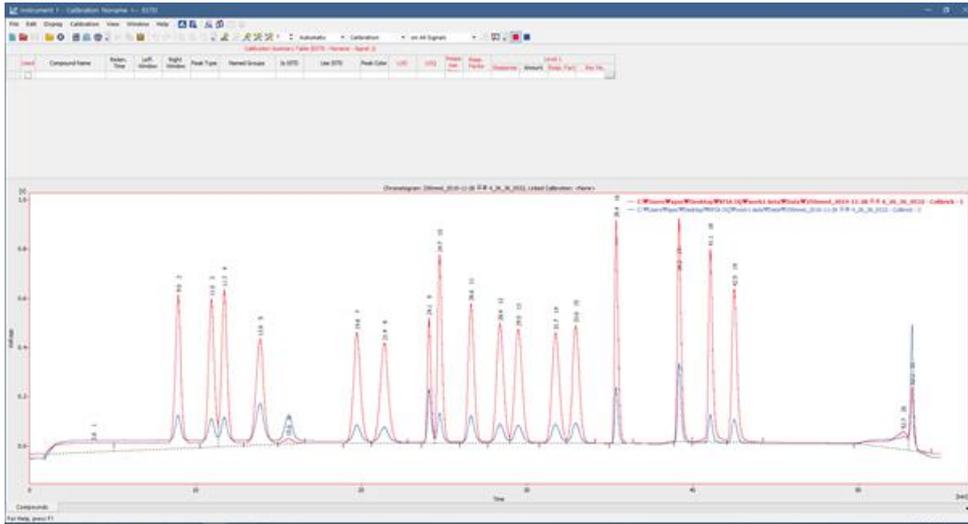
이제 교정 데이터를 작성해볼 차례입니다.

Calibration Data 를 작성하기 위해

Instrument Window 에서 5 번 **Calibration** 을 열어줍니다.



원하는 Calibration 의 종류에 맞춰 크로마토그램을 불러옵니다.



중앙 상단 메뉴에서 Recalibration 으로 설정한 뒤 **Add All**을 클릭하여 모든 Peak 를 추가합니다.

Used	Compound Name	Reten. Time	Left Window	Right Window	Peak Type	Named Groups	Is ISTD	Use ISTD	Peak Color	LOD	LOQ	Response	Resp. Factor	Response	Amount	Level 1	Resp. Fact	Rec No.
1	Peak 8.859	8.859	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	0.0000	5916.091	0.000	0.0000	1	...	
2	Peak 10.899	10.899	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	5845.544	0.000	0.0000	1	...
3	Peak 11.655	11.655	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	6118.008	0.000	0.0000	1	...
4	Peak 13.767	13.767	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	5855.946	0.000	0.0000	1	...
5	Peak 19.649	19.649	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	5849.002	0.000	0.0000	1	...
6	Peak 21.307	21.307	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	6054.094	0.000	0.0000	1	...
7	Peak 24.119	24.119	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	3326.359	0.000	0.0000	1	...
8	Peak 24.748	24.748	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	6138.421	0.000	0.0000	1	...
9	Peak 26.647	26.647	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	5736.532	0.000	0.0000	1	...
10	Peak 28.424	28.424	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	5960.200	0.000	0.0000	1	...
11	Peak 29.545	29.545	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	6003.043	0.000	0.0000	1	...
12	Peak 31.767	31.767	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	5846.972	0.000	0.0000	1	...
13	Peak 32.993	32.993	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	5879.657	0.000	0.0000	1	...
14	Peak 35.411	35.411	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	5897.122	0.000	0.0000	1	...

다음과 같이 크로마토그램의 모든 Peak가 추가됩니다.

Used	Compound Name	Reten. Time	Left Window	Right Window	Peak Type	Named Groups	Is ISTD	Use ISTD	Peak Color	LOD	LOQ	Response	Resp. Factor	Response	Amount	Level 2	Resp. Fact	Rec No.
1	Peak 8.859	8.859	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
2	Peak 10.899	10.899	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
3	Peak 11.655	11.655	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
4	Peak 13.767	13.767	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
5	Peak 15.538	15.538	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	1415.672	0.000	0.0000	1	...
6	Peak 19.649	19.649	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
7	Peak 21.307	21.307	0.200 min	0.200 min	Ordnr		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...

이제 우측 상단의 파란색 상자를 클릭하여 440nm 신호로 바꾼 뒤 프롤린 Peak 도 추가합니다.

Peak의 추가가 끝났다면 이제 각 Peak의 성분명과 함량을 기입해야 합니다.

함유된 물질의 농도는 표준 분석 물질과 함께 동봉된 문서에 자세하게 설명이 되어있습니다.

Used	Compound Name	Reten. Time	Left Window	Right Window	Peak Type	Named Groups	Is ISTD	Use ISTD	Peak Color	LOQ	LOQ	Respo. Fact	Resp. Factor	Response	Amount	Resp. Fact	Rec No.
1	Aspartic Acid	8.859	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5918.09	100.000	0.0169	1
2	Threonine	10.899	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5845.54	100.000	0.0171	1
3	Serine	11.655	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	6118.008	100.000	0.0163	1
4	Glutamic Acid	13.767	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5855.94	100.000	0.0171	1
5	Proline	15.538	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5846.972	100.000	0.0000	0
6	Glycine	19.449	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5849.00	100.000	0.0171	1
7	Alanine	21.307	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	6054.094	100.000	0.0165	1
8	Cysteine	24.119	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	3326.39	50.000	0.0130	1
9	Valine	24.748	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	6138.42	100.000	0.0163	1
10	Methionine	26.447	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5736.53	100.000	0.0174	1
11	Isoleucine	28.424	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5960.200	100.000	0.0168	1
12	Leucine	29.545	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	6003.043	100.000	0.0167	1
13	Tyrosine	31.767	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5846.972	100.000	0.0171	1
14	Phenylalanine	32.993	0.300 min	0.300 min	Ordv	None	None			0.000	0.000	A	0.0000	5879.65	100.000	0.0170	1

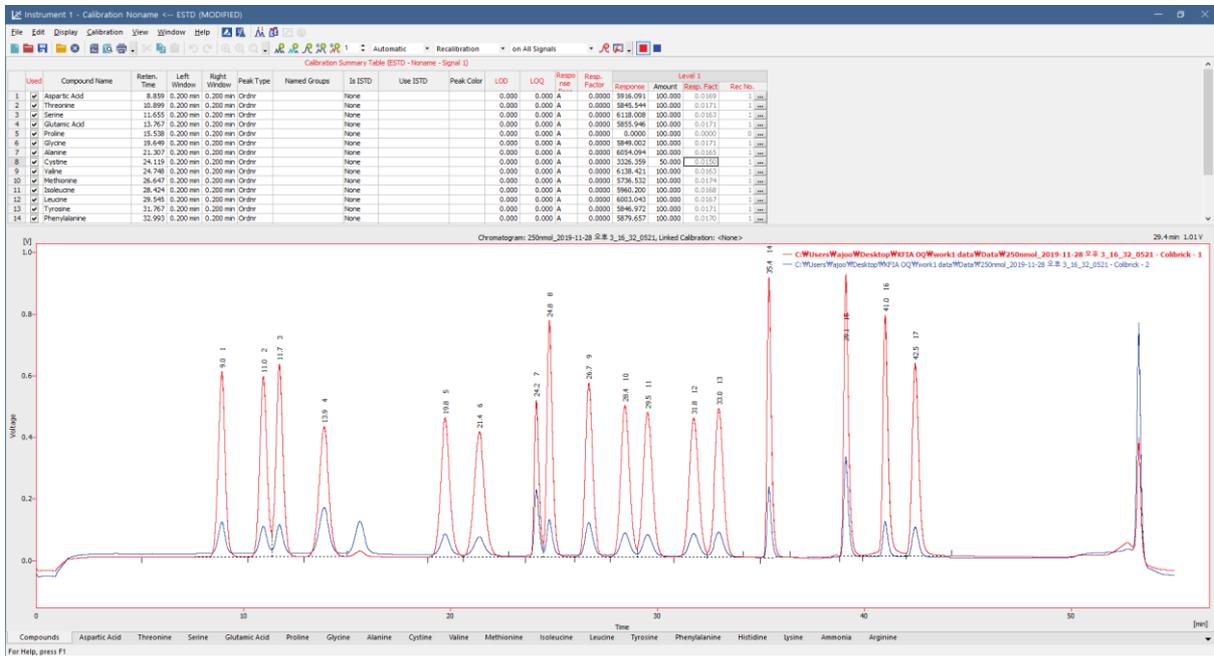
파란색 박스처럼 각 Peak의 Amount를 기입합니다.

그 후 Left, Right Window를 1.0min을 기입합니다.

Left, Right Window와 Amount의 입력이 끝났다면 이제 단일 점 교정(One Point Calibration) 작성이 끝납니다.

이제 다중 점 교정 데이터(Multi Point Calibration Data)를 작성해볼 차례입니다.

먼저 100nmol 농도 등으로 한 번 작성된 교정 데이터를 불러옵니다.



그 후 Open Standard 를 이용해 다른 농도의 Std Chromatogram 을 불러옵니다.

Type	Named Groups	Is ISTD	Use ISTD	Peak Color	LOD	LOQ	Response	Resp. Factor	Level 2				
									Response	Amount	Resp. Fact	Rec No.	
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	0.000	0.0000	0	...

Current Level 을 2 로 올려주고 Recalibration 을 선택해줍니다.

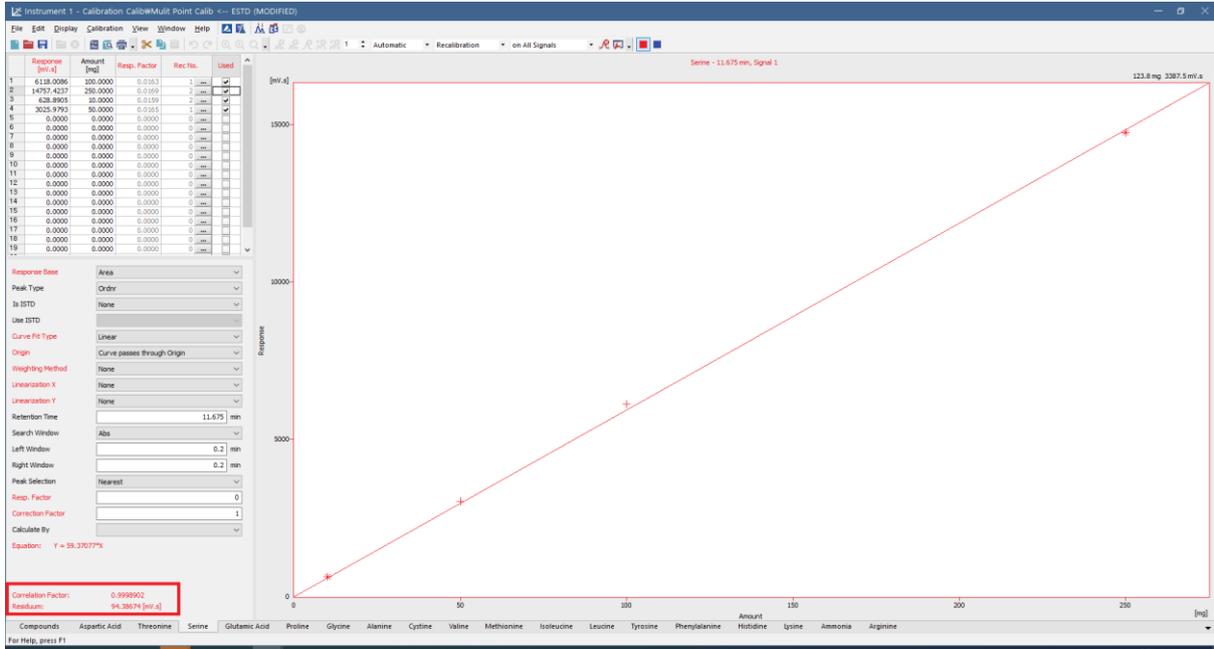
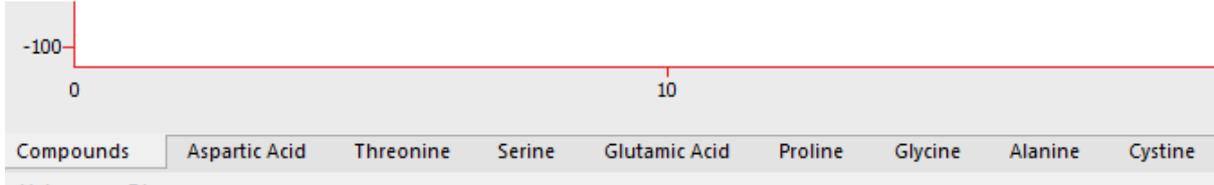
Type	Named Groups	Is ISTD	Use ISTD	Peak Color	LOD	LOQ	Response	Resp. Factor	Level 2				
									Response	Amount	Resp. Fact	Rec No.	
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14069.5103	250.000	0.0178	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14166.1334	250.000	0.0176	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14757.4237	250.000	0.0169	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14277.3928	250.000	0.0175	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	0.0000	250.000	0.0000	0	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14321.3820	250.000	0.0175	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14869.4449	250.000	0.0168	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	7793.3641	125.000	0.0160	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14622.8071	250.000	0.0171	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14225.1000	250.000	0.0176	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14653.3006	250.000	0.0171	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14825.9244	250.000	0.0169	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14341.6658	250.000	0.0174	2	...
		None			0.000	0.000	A	0.0000	14340.0427	250.000	0.0174	2	...

이제 새로 불러온 크로마토그램 Peak 들의 각 물질별 농도(Amount)를 입력해줍니다.

이처럼 Current Level 을 올린 뒤 다른 농도의 표준품 분석 크로마토그램을 불러와 양을 기입하면 다중 점 교정 데이터 작성이 완료됩니다.

이제 작성이 완료됐다면 상관계수(Correlation Factor)를 확인할 차례입니다.

Calibration Window 의 하단에 있는 각 물질의 이름을 클릭합니다.



클릭하면 위와 같이 각 물질별 교정곡선과 상관계수를 확인할 수 있습니다.

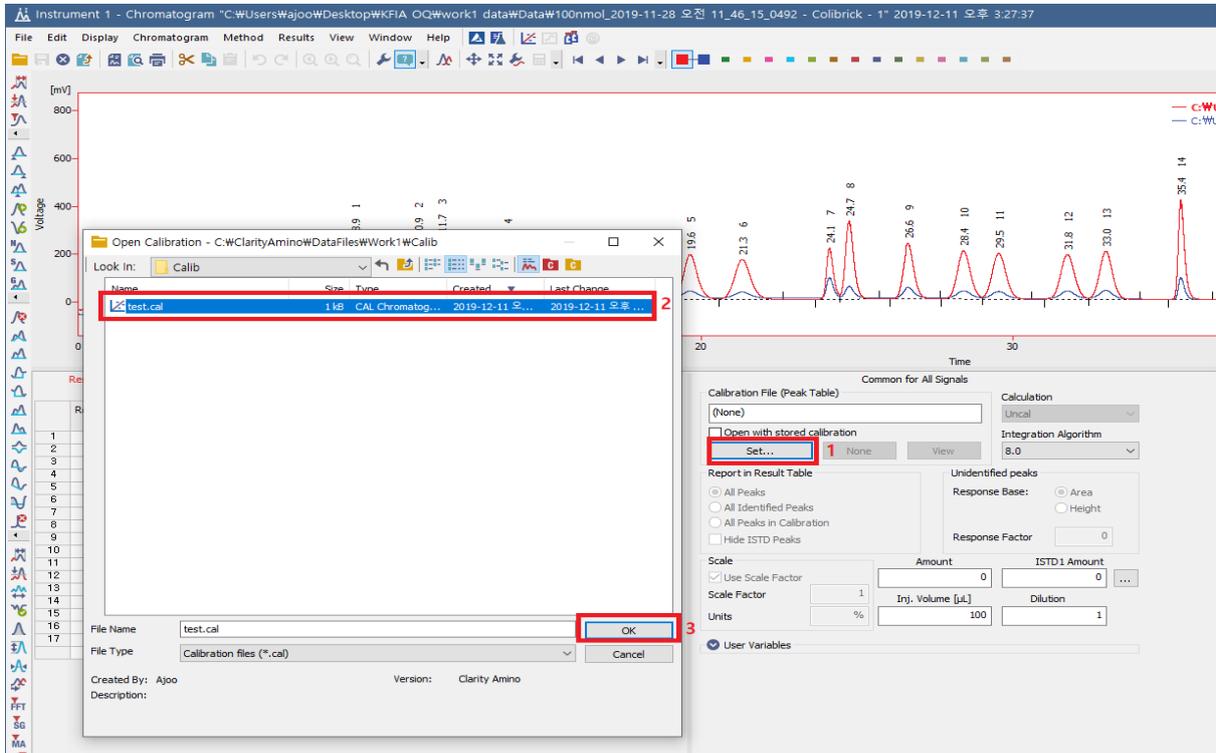
교정 데이터의 직선성을 보장하기 위해선 각 물질별 Correlation Factor 의 값이 0.999 이상이어야 합니다.

5.3. 교정 데이터 적용

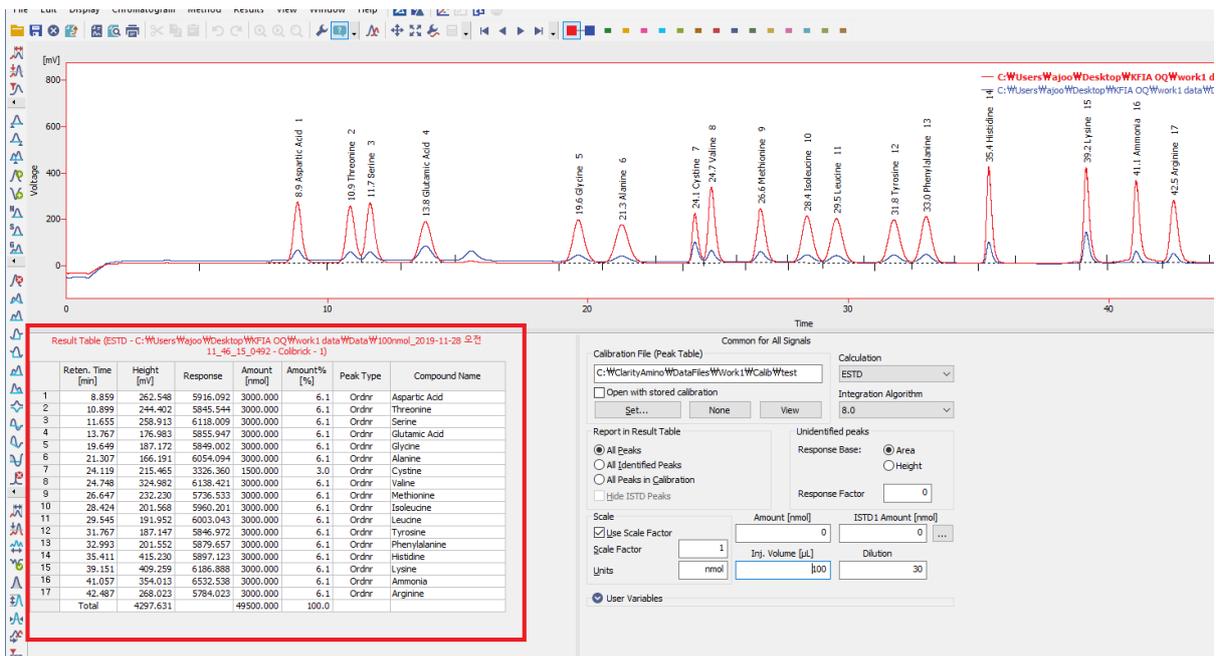
이제 교정 데이터(Calibration Data) 작성을 끝냈다면 이 교정 데이터를 적용할 차례입니다.

분석이 끝난 시료(sample)의 크로마토그램을 불러옵니다.

시료의 크로마토그램을 Chromatogram window로 불러옵니다.



Set을 누른 후 저장한 Calibration file을 불러옵니다.



정상적으로 피크의 물질명과 함량이 표시됩니다.

The screenshot displays a software interface for chromatography data analysis. On the left, a 'Result Table' shows data for two peaks: Na+ and NH4+. The table includes columns for Compound Name, Retention Time, Height, Area, Amount, Resolution, and Symmetry/Tailing. On the right, a 'Common for All Signals' configuration panel is visible. The 'Scale' section is highlighted with a red box, showing 'Use Scale Factor' checked, 'Scale Factor' set to 1, and 'Units' set to 'nmol/ml'. Other settings include 'Amount [uL]' (0), 'Inj. Volume [uL]' (25), and 'Dilution' (1).

Compound Name	Reten. Time [min]	Height [μS/cm]	Area[s]	Amount [uL]	Resolution [-]	Symmetry/Tailing [-]
1 Na+	20.327	107.218	5574.252	10193.317		1.098
2 NH4+	27.023	0.003	0.101	17.234	6.522	1.444
Total		107.222	5574.354	10210.551		

이제 단위를 맞추기 위해 Result Table 오른쪽의 Scale Units 를 nmol/ml 로 변경합니다.

또한 샘플을 희석했을 경우 Dilution 에 희석배수를 기입하면 희석 전 샘플에 포함된 성분의 원량을 알 수 있습니다.

5.4. 분석 결과 출력(PRINT)

이제 모든 분석과정이 끝났습니다. 필요에 따라 분석 결과를 출력해야 합니다.

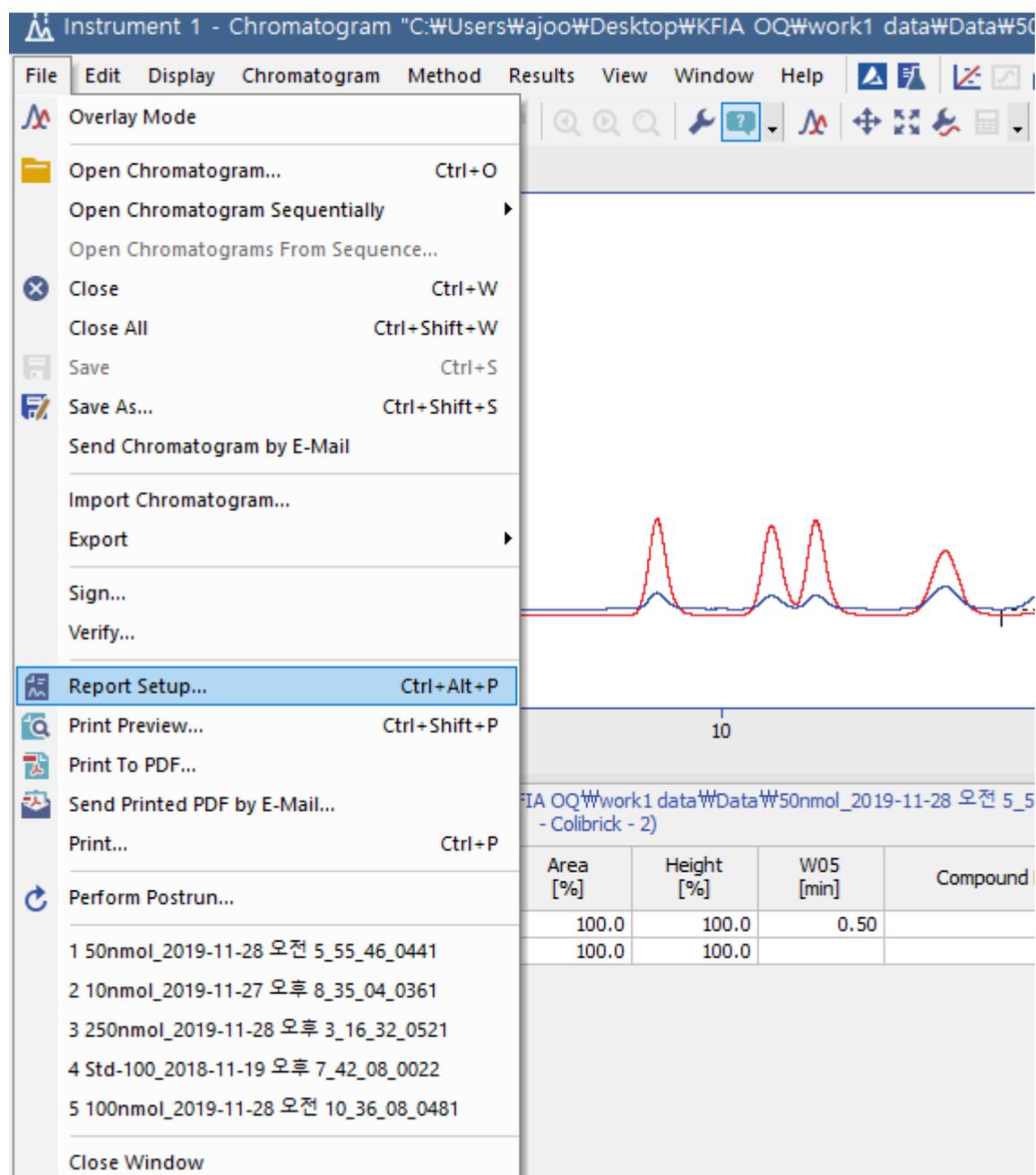
분석한 데이터를 출력하기 위해선 우선 출력 형식을 정해야 합니다.

분석 데이터의 모든 결과를 출력해 버리면 난잡해지기 때문에

원하는 결과값과 출력물의 형식을 정해줘야 합니다.

출력 형식을 변경하기 위해서 Chromatogram Window 에서

File -> Report Setup을 이용합니다.



The screenshot shows the 'File' menu of the Chromatogram software. The 'Report Setup...' option is highlighted, with the keyboard shortcut 'Ctrl+Alt+P' displayed next to it. Other menu items include 'Open Chromatogram...', 'Close', 'Save', 'Print Preview...', and 'Print...'. The background shows a chromatogram with several peaks and a data table below it.

Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound
100.0	100.0	0.50	
100.0	100.0		

The screenshot shows the software interface for instrument calibration and data analysis. At the top, a calibration table is visible:

Response [mV.g]	Amount [mg]	Resp. Factor	Rec.No.	Used
1	5118.0096	100.0000	0.0163	1
2	14757.4237	280.0000	0.0169	2
3	428.8943	50.0000	0.0139	2
4	3025.9793	50.0000	0.0165	1
5	0.0000	0.0000	0.0000	1
6	0.0000	0.0000	0.0000	1

The main window displays a chromatogram plot with a peak at 11.675 min. A 'Report Setup Chromatogram' dialog box is open, showing options for page setup, orientation, and printing. The 'Print Preview' window is also open, showing two chromatograms and a data table:

Reten. Time [min]	Area [mV.g]
1	14,433
Total	728,302

The print preview window also displays a table with columns: Reten. Time, Area, and Signal Name.

원하는 형식으로 정한 후 Preview를 통해 확인합니다.

6. 주의사항

분석 전후의 주의사항



6.1 분석 전 주의사항

분석을 시작하기 전에 참고해야 할 주의사항은 다음과 같습니다.

1. 가스공급 확인

-공급되는 질소가스의 압력은 일정해야 합니다. 또한 가스 공급이 안 되는 경우 용액 공급이 원활하지 않아 분석 결과에 큰 영향을 줄 수 있습니다.

2. 표준품 유통기한

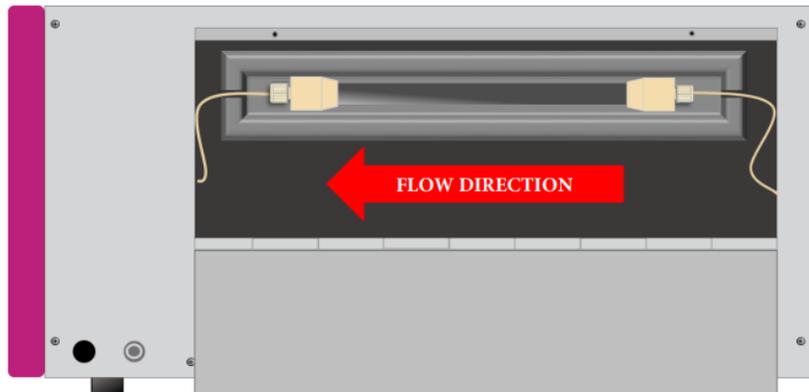
-표준품(standard Solution)의 유통기한은 종류별로 다릅니다. H, H-Ox 타입의 경우 냉장 보관시 **최대 6개월까지** 보관이 가능합니다.

PH, PH-S, PH-Sigma의 경우 개봉 후부터 점진적으로 표준품 내 변성이 발생합니다. 따라서 최적의 결과를 얻기 위해선 **개봉 후 3주내로** 사용해야 합니다.

3. 컬럼 교체

-컬럼 교체 후 압력이 너무 낮게 걸리는 경우 Ferrule(나사)가 제대로 잠기지 않았을 수 있습니다. 항상 컬럼을 교체할 때 Ferrule을 어느정도 힘을 줘 조여줘야 합니다.

단, 이때 너무 강하게 조이는 경우 부러질 수 있습니다.



컬럼을 교체한 후 새는 곳이 있는지 확인하기 위해 컬럼 오븐에 넣지 않고 0.3ml/min 정도로 3분정도 흘려줘 새는 곳이 있는지 확인한 다음 오븐에 넣습니다.

5.2. 분석 후 주의사항

컬럼, 반응 코일 청소

분석이 끝난 후 특별한 과정을 거치지 않는 이상 컬럼과 반응로(Reactor Coil)등에 잔여물이 남아 있을 수 있습니다. 이를 위해 End Method 혹은 Special Reactor Washing Method를 시퀀스 말단에 넣어줘야 합니다.

혹은 수동으로 직접 워싱을 할 수 있는데, Flow 설정을 다음과 같이 합니다.

Column	Regeneration Buffer 5 ~ 10 min -> Buffer A -1(A-4) 30min
Reactor Coil	H ₂ O or Washing Sol (MeOH 30% IPA 30% D.W 40%) 20 min

6.2. 폐유기물량 확인

반응 후 배출되는 폐기물은 Waste Line을 따라 밖으로 내보내집니다.

대부분 폐유기물 통에 보관되며 항상 이 통이 넘치지 않게 관리해줘야 합니다.

7. TROUBLE SHOOTING

문제 해결



7. Trouble Shooting

아미노산 분석기는 복잡한 구조와 추가적인 Reactor Coil이 사용되기에 철저한 관리가 필요합니다. 그럼에도 불구하고 간혹 문제가 발생할 수 있는데, 일반적으로 발생하는 문제는 다음과 같습니다.

1. 압력 문제(Low Pressure)

- buffer Flow가 0.45ml/min, Reagent Flow가 0.25ml/min 일때 컬럼에는 최소 35bar, Reagent Pump 에는 최소 6bar의 압력이 걸려야 합니다. 이보다 낮은 압력이 걸리거나 압력이 큰 폭으로 흔들리는 경우 다음과 같은 처치가 가능합니다.

1.1. Low Column Pressure

증상: 컬럼의 압력(Buffer Pump Pressure)이 안 걸리거나 너무 낮게 걸리는 경우

처치1: Buffer Line Purging

처치2: Column을 포함해 Buffer Line 전체적으로 새는 곳 있는지 확인

증상: 컬럼 압력이 큰폭으로 흔들리는 경우

처치1: 암모니아 필터 컬럼의 Outlet을 푼 뒤 물기를 털어주듯 털고 재결착

처치2: Inlet, Outlet Check valve의 페럴이 너무 세게 조여져있는지 확인

처치3: Pump Head의 Check valve 초음파 세척 및 교체 (부록 참고)

1.2 High Column Pressure

증상: 컬럼에 압력이 너무 높게 걸리는 경우(70~90bar 이상)

처치1: 컬럼 온도를 74도로 올린 뒤 Reg.Sol 0.3ml/min으로 40분간 흘려줌

확인: 다시 Flow를 0.45ml/min으로 했을 때 압력이 내려갔는지 확인

처치2: Column을 역방향으로 연결한 뒤 3~7초 정도 잠깐 Flow를 0.45ml/min으로 흘림

처치3: 처치2 이후 즉시 flow를 멈추고 컬럼을 털어준 뒤 정방향으로 연결

위 처치를 다 한 뒤 Std 분석 후 성능 확인, 성능 미달의 경우 컬럼 교체

1.3 Low Reagent Pump Pressure

증상: Flow를 올려도 Reagent Pump의 압력이 안 오르는 경우

처치1: Reagent(H₂O) Purge

확인: H₂O 1 ml/min으로 흘렸을 때 Waste에서 물방울이 나오는지 확인

처치2: Pump Head의 Check valve 초음파 세척 및 교체 (부록 참고)

1.4 High Reagent Pump Pressure

증상: Reagent Pump Pressure가 0.25 ml/min 기준 30bar 이상인 경우

확인: H₂O 0.3 ml/min으로 흘렸을 때 Waste에서 물방울이 나오는지 확인

처치1: Detector cell에 연결된 라인 양쪽 끝을 날카로운 가위로 자른 뒤 Flow 흘리기

-양끝이 막히는 경우가 제일 많으며 뚫었다면 검붉은 액체가 흘러나옴.

2. 피크가 안 나오는 경우(No peaks)

- 대표적으로 발생하는 문제이며 다음과 같은 확인과 처치가 가능합니다.

2.1. 반응액 공급 문제

Reagent Pump Pressure check

H₂O를 2ml/min으로 했을 때 압력이 15bar 이상으로 올라가는지 확인

처치1: Reagent Pump의 drain valve를 열고 H₂O, Ninhydrin Reagent Purge

처치2: Pump Head의 Check valve 초음파 세척 및 교체 (부록 참고)

2.2. 오토샘플러 니들 확인

Device Monitor에서 AutoSampler Washing 3회 실행

확인1: 오토샘플러 내 Needle이 휘어지진 않았는지 확인

- 오토샘플러 니들이 휘어져 있는 경우: 서비스콜

확인2: AutoSampler drain에서 물방울이 일정하게 나오는지 확인

확인3: AutoSampler Washing Solution에 충분한 양의 액체가 있는지 확인

2.3. Ninhydrin 수명 확인

확인1: Ninhydrin 반응액이 개봉된지 며칠 지났는지 확인

확인2: Ninhydrin 용액에서 시큼한 냄새가 많이 나는지 확인

확인3: Ninhydrin 용액의 색이 짙은 노란색 혹은 와인색인지 확인

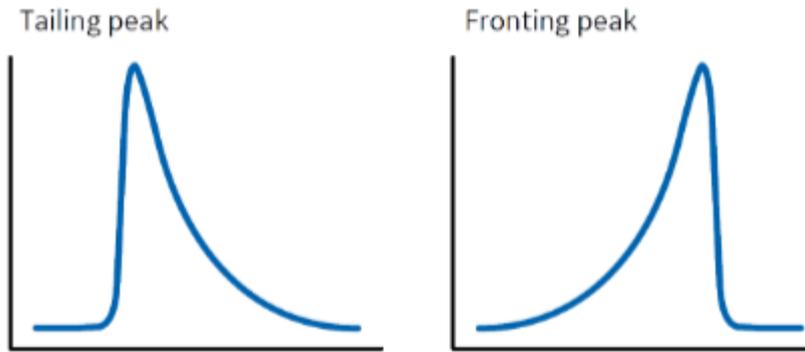
처치: ninhydrin 병 세척 후 용액 교체

Ninhydrin 반응액은 개봉하는 순간부터 산화가 진행됩니다.
따라서 더 이상 사용하지 않는다면 밀봉 후 냉장보관 합니다.
냉장보관 역시 한달 이상 지났을 경우 와인색으로 변질될 수 있기에
교체를 권장해드립니다.



3. 피크의 모양이 이상한 경우(Distorted Peaks)

3.1. peak tailing/fronting



위와 같이 peak 들이 전체적으로 Tailing 혹은 Fronting이 되는 경우가 있습니다.

이는 peak 들의 Asymmetry 값이 비정상적(0.8 ~ 1.4 이내가 아닌 경우) 경우를 뜻합니다.

확인: L-serine의 Resolution이 1.3 이하 혹은 L-Threonine의 Asymmetry가 0.8-1.5 범위 밖인지 확인

처치: Column 교체

일반적으로 column에 높은 압력이 걸리는 경우 발생하며 이때 Column의 레진 배열에 비가역적인 손상이 간 것입니다.

대부분의 Peak Tailing, Fronting 문제는 컬럼에 비 가역적인 데미지가 가해진 것으로

Column 교체가 요구됩니다.

3.2 피크 뭉침 현상(Peak Coelution)

Chromatogram의 특정 영역이 뭉쳐서 나오는 경우

확인: 블랭크런(Bk)을 돌린 후 다시 분석

확인: 사용중인 std가 PH 타입이면 개봉 후 지난 시간 확인

처치: 개봉 후 한달 이상이 지났으면 폐기

확인: L-Serine의 Resolution 확인

처치: Resolution이 1.3 이하(Physiological의 경우 1.5)일 경우 column 교체

확인: Buffer A-1(A-4)의 pH 측정

처치: 3.45(2.80)의 오차범위 밖일 경우 HCl 혹은NaOH(LiOH)로 pH 적정

8. 부록

Appendix



부록은 다양하지만 조금 복잡한 내용을 다룹니다. 어느정도 아미노산 분석과 아미노산 분석기에 익숙해지신 분들이 읽어볼만한 내용들을 모아놨습니다.

처음에는 두가지의 Na Buffer 시스템을 소개하며 더 나아가 여러분에게 쉽게 발생할 수 있는 분석 결과 뒤틀림 등을 수정하는 방법을 소개할 예정입니다.

아미노산 분석의 경우 일반적인 HPLC 나 IC 등 LC 류에 비해 분석 완건성이 떨어지며 이는 분석 조건에 매우 민감하게 반응함을 의미합니다. 따라서 여러분이 분석법 수정에 대한 이해를 쌓아두신다면 발생할 수 있는 오차나 오류 등에 쉽게 대응할 수 있습니다.

1. Hydrolysate program vs Extended hydrolysate program

대부분의 아미노산 분석기 사용자 분들은 Na A-1/B-1/Reg. Sol. 을 사용하는 Na System을 사용합니다. 핵심 아미노산들을 빠르게 분리하며 베이스라인이 안정적이기 때문입니다.

그런데 동일한 가수분해물 분석(Na System)도 크게 두가지 종류로 나뉠 수 있습니다. 일반적인 사용자 입장에선 Hydrolysate Program과 Extended Hydrolysate Program 두 종류로 나눌 수 있습니다. 이 둘의 가장 큰 차이점은 사용하는 버퍼의 종류에 있습니다.

Hydrolysate Program은 Na A-1/B-1/Reg.Sol 을 사용하고

Extended Hydrolysate Program은 Na A-4/A-5/B-1/Reg.Sol을 사용합니다.

Extended hydrolysate Program(확장 가수분해물 분석)의 경우 단어의 뜻 그대로 분석의 범위가 확장된 분석입니다. 분석 시간이 55분에서 70분으로 길어지며 이에 따라서 각 물질 별로 좀 더 최적화된 크로마토그램을 얻을 수 있습니다.

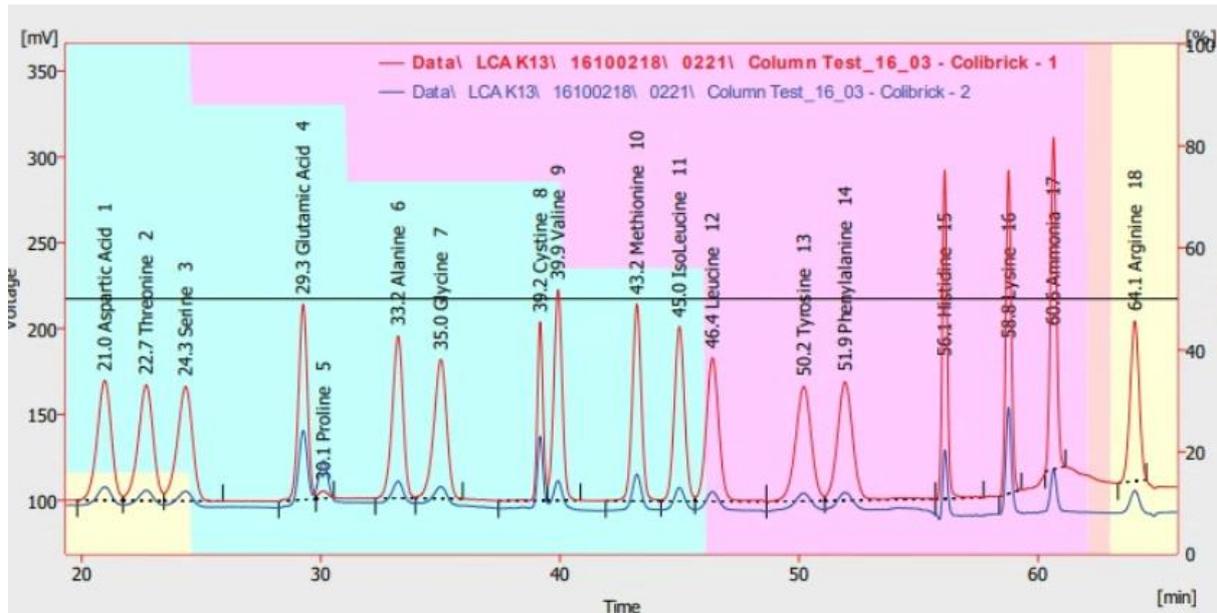
현재 많은 사용자들이 유럽 약전(European Pharmacopeia)의 아미노산 분석 시스템 적합 평가(SST)를 통과하길 원합니다.

유럽 약전에선 SST 조건을 ILEU-LEU의 분리능 1.5 이상임을 제시하고 있습니다.

ILEU/LEU 분리능의 경우 버퍼와 온도에 영향을 받기 때문에 기존의 A-1/B-1/Reg.Sol을 사용하는 프로그램으로는 만족하기가 어렵습니다. 설령 만족한다고 하더라도 그 분석법에 대한 완건성에 문제가 생길 수 있습니다.

따라서 ILEU-LEU 분리능 1.5 이상을 원한다면

Na Buffer A-5/B-1/Reg.Sol을 사용하는 Extended Hydrolysate program을 사용해야 합니다.



Sodium Citrate Buffer A-4/A-5/B-1/Reg.Sol을 이용한 Standard Type H 분석 결과

2. Buffer pH

Buffer의 pH 변화는 분석에 큰 영향을 줄 수 있습니다. 대표적으로 Cystine(CYS)2이 아주 강하게 Buffer A-1의 pH에 영향을 받습니다. 또한 ASP, THR, SER의 머무름 시간에도 영향을 줍니다.

A-1, B-1 Buffer를 사용하는 경우 Glycine과 Cystine이 붙어서 나오거나 Cystine이 너무 늦게 나와 Peak Shape이 왜곡되는 경우가 발생할 수 있습니다.

Buffer A-1의 경우 보관 온도에 따라 그 용해도가 달라져 pH가 바뀔 수 있습니다.

이러한 문제를 해결하는 근본적인 방법은 다음 항목인 Gradient Table을 조절하는 것이지만 제약회사 등 분석법을 고정해서 사용해야 하는 경우 이러한 방법이 제한될 수 있습니다. 따라서 이러한 경우에는 Buffer A-1, B-1의 pH를 조절해서 임의로 Cystine Peak의 Retention Time을 조절해야 합니다.

하지만 pH를 측정하는 pH meter의 태생적인 한계로 0.02라는 오차를 가지고 있습니다.

pH 0.02의 차이는 pH를 통해 용리하는 아미노산 분석에 있어 꽤나 큰 변화를 야기할 수도 있습니다.

Buffer A-1의 pH가 낮다면 전체적으로 아미노산들이 늦게 용리되며

Buffer A-1의 pH가 높다면 전체적으로 아미노산들이 빠르게 용리됩니다.

모든 아미노산이 같은 시간만큼 움직이지 않습니다. 아미노산 개별적인 특성에 따라 pH에 민감한 정도가 다릅니다. 따라서 특정 구역의 아미노산들의 RT값을 동일한 비율로 이동시키고 싶다면 Gradient Table 수정이 필요합니다.

3. Lamping gradient vs step gradient Gradient

위 2번 항목을 확장해서 이제 Gradient Table의 원리와 수정에 대해서 다뤄보겠습니다.

Gradient Separation 이란 분석 시간 동안 이동상의 조성이 바뀌는 분리방법 입니다.

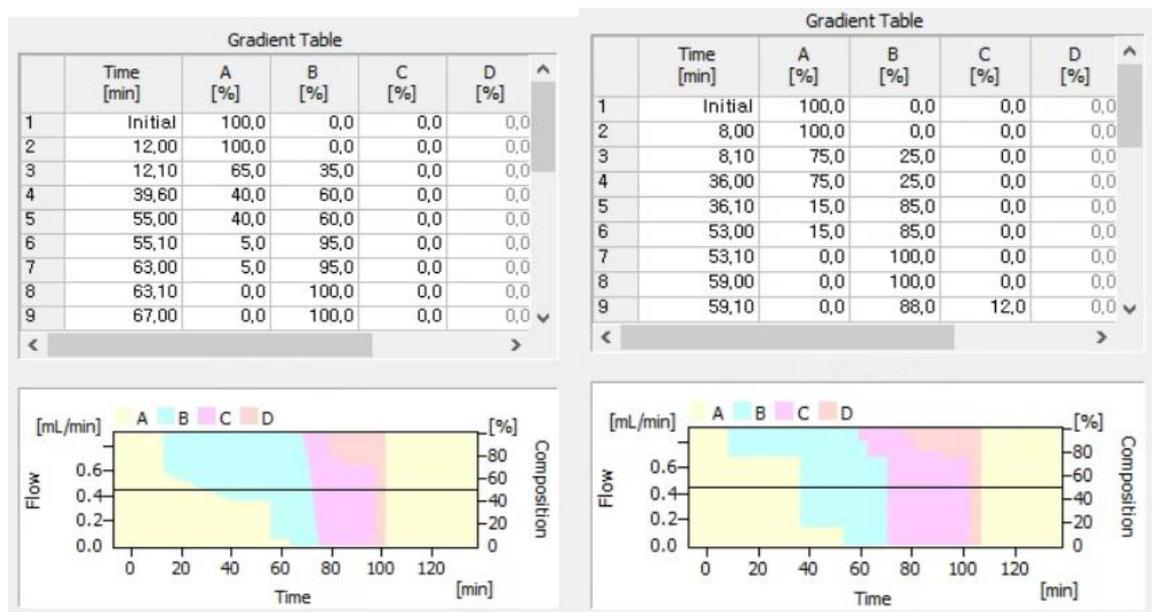
분석 시간 동안 흐르는 이동상의 종류가 일정한 등용매분리(Isocratic separation)과 대척점에 있습니다.

Gradient Separation은 크게 두가지로 나뉠 수 있습니다.

이들은 Lamping(linear) gradient, Step gradient로 분류될 수 있습니다.

Lamping Gradient, 기울기 구배분리는 이동상의 조성비 등이 일정한 비율을 가지고 시간에 따라서 천천히 바뀌는 것을 의미합니다.

Step Gradient, 계단식 구배분리는 이동상의 조성비가 정해진 시간에 그 즉시 바뀌는 것을 의미합니다.



< 좌: Lamping gradient, 우: Step Gradient >

과거에는 대부분 왼쪽과 같이 Lamping Gradient를 사용했습니다.

시간이 지나면서 LC Pump의 성능, 특히 Mixing Valve의 성능이 비약적으로 발전하면서 오른쪽과 같은 Step Gradient 방식을 사용할 수 있게 되었습니다.

이론적으로 LC에서는 두가지 방식 모두 각기 장단점을 가지고 있습니다. 분석 장비의 종류, 상황에 따라 매우 많은 점이 바뀌지만 일반적으로 아래와 같은 장단점이 있습니다.

	Lamping Gradient	Step Gradient
장점	Peak Sharpness	간편한 Gradient 수정
단점	Gradient 수정이 어려움	pH 변화에 민감하게 반응

Lamping Gradient의 경우 상대적으로 Peak의 폭(Peak width)이 좁아지게 되며 이에 따라 좀더 이상적으로 Sharp한 Peak를 얻을 수 있습니다.

또한 이동상의 조성비 변화가 천천히 연속적으로 일어나기 때문에 Buffer pH에 영향을 상대적으로 덜받는다는 장점이 있습니다. 하지만 영향이 없는 것은 아니기에 buffer pH 변화에 의한 분석 결과 변화에 대응하기 어렵습니다.

하지만 추가적인 Gradient 수정이 매우어려워지기 때문에 상대적으로 제약이 존재합니다.

Step Gradient의 경우 Lamping Gradient에 비해 그래디언트 수정이 매우 간편하다는 장점이 있습니다. 또한 아미노산 분석의 경우 Lamping Gradient를 사용함으로써 얻는 장점이 미미합니다. Buffer pH의 경우는 사용자가 직접 조절이 가능합니다.

분석법 고정을 위해 Lamping Gradient를 사용하는 경우도 많지만, 지정된 컬럼과 레진을 보유하고 계시다면 Step Gradient를 사용하시는 걸 권장해드립니다.

4. 분석법 수정

이제부터 분석법 수정을 통해 peak의 RT 값을 바꾸는 방법을 알아보겠습니다.

대표적으로 Peak의 Retention Time이 문제가 되는 경우는 GLY, ALA, (CYS)2 구간에서 발생합니다.

또한 LCA K06/Na 150*4.6 mm 컬럼과 Hydrolysate program을 사용했을 때 일반적으로 ASP의 RT는 8.5 ~ 9.2 분 정도가 최적의 값입니다

LCAK13/Na 175*4.6 mm 컬럼의 경우 9.0~ 9.6분 정도로 150 mm 컬럼보다 용리시간이 조금씩 늦춰집니다.

Buffer A-1 의 COA에서는 일반적으로 ASP의 용리시간을 8.3 ~ 10.0 분으로 제한합니다.

이 범위 밖이라면 이는 분석법의 조정 혹은 Buffer A-1의 pH가 조정돼야 함을 의미합니다.

잘못된 분석결과를 교정하기 위해 분석법을 수정하기 전에 먼저 다음과 같은 것들이 확인 돼야 합니다.

1. **이동상 유속의 정확성(Flow Accuracy of Eluent pump)**
-Buffer A Flow를 흘렸을 때 정확한 유속으로 흐르는지
2. **그라디언트 유속의 정확성(Flow Accuracy of Gradient flow)**
-Gradient Flow를 흘렸을 때 정확한 유속으로 흐르는지

위 세가지가 고정된 상태에서 분석법 수정이 이뤄져야 유의미하고 완전성있는 분석결과를 얻을 수 있습니다. 실제 유속이 설정된 유속보다 낮은 경우 Buffer A의 pH가 낮은 것과 비슷한 현상이 발생합니다. 따라서 분석법을 수정하기 전에 먼저 위 두가지를 통해 Flow가 얼마나 정확하게 흐르고있는지 확인하는 것이 권장됩니다.

만약 주기적인 Operation Qualification을 받으시다면 건너뛰셔도 괜찮습니다.

펌프의 유속을 측정하는 방법은 아래와 같습니다.

1. 이동상 병에 걸리는 압력을 밸브를 열어 제거한다.
2. Purge Valve를 열고 Flow를 0.45 ml/min 으로 설정한 뒤 2분 정도 안정화한다.
-Gradient 유속의 경우 A : B = 80 : 20 으로 설정 아니라면 A 100%
3. 무게를 알고있는 소형 비커와 스톱워치를 준비하고 동시에 측정을 시작한다.
4. 15분이 흘렀을 때 용액의 무게가 6,750 mg, 오차 100mg 내외여야 한다.

3번 이상 측정했을 때 그 오차가 허용범위 이상이라면 이는 펌프 세팅의 조정 혹은 수리가 필요함을 의미합니다. 이 경우 반드시 서비스 엔지니어의 도움이 필요합니다.

유속에 이상이 없다면 이제 분석법 수정을 통해 올바른 크로마토그램을 얻을 수 있습니다. 다음은 대표적으로 아미노산 분석에서 발생하는 peak issue 입니다.

먼저 A-1/B-1/Reg. Sol. 을 사용하는 경우

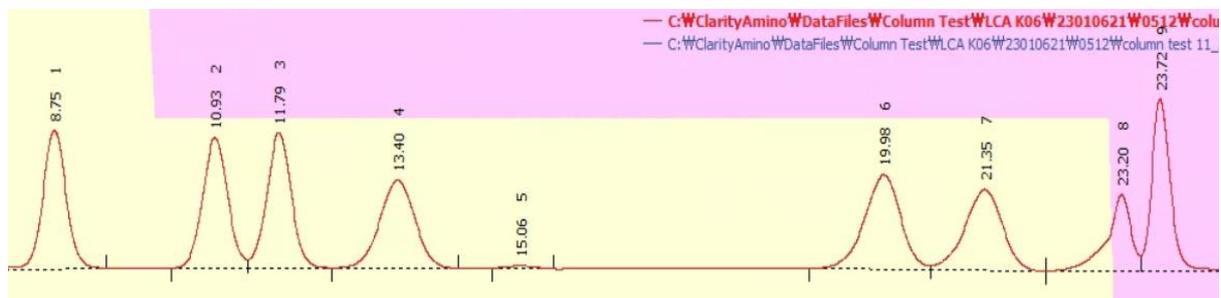
Buffer A-1 100% 는 ASP ~ ALA 까지,

첫번째 A/B gradient 는 (CYS)2 ~ LUE 까지

두번째 A/B Gradient는 PHE ~ TYR 까지 분리합니다.

Leucine(LUE)까지가 버퍼에 민감하게 반응하며 이 이후로는 크게 버퍼에 영향받지 않습니다.

먼저 아래와 같은 문제가 대표적으로 발생합니다.



위 사진에서 1번 피크인 Aspartic Acid(ASP)의 RT값이 8.75로 정상입니다. 또한 ALA/GLY의 분리에 문제가 없습니다.

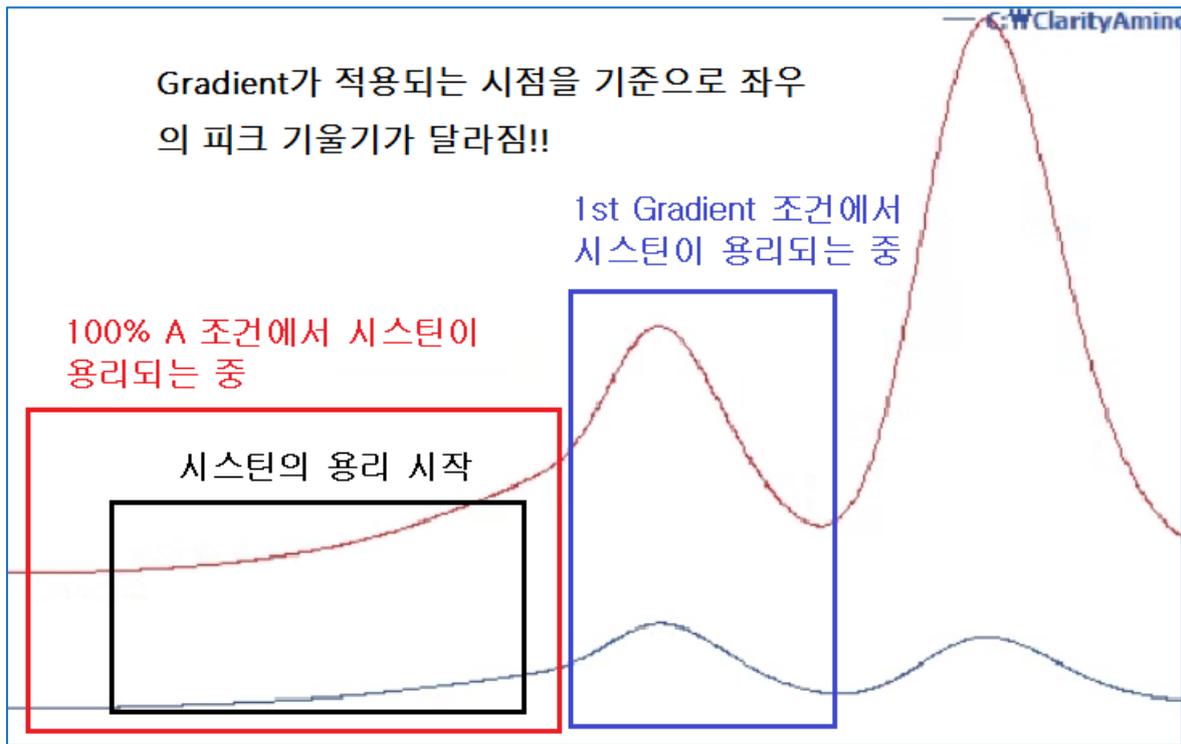
하지만 8번 피크인 Cystine(CYS2)의 Peak가 9번 피크인 Valine(VAL)과 분리가 제대로 되지 않았으며 시스틴의 피크 모양이 이상한 것을 볼 수 있습니다.

첫번째 그래디언트는 A : B = 80 : 20 이며 적용 시간은 9.1 분 입니다

이와 같은 문제는 시스틴이 A/B 그래디언트 조건에서 용리되는 것이 아닌 100% A 에서 용리되기 시작하기 때문에 발생합니다. 즉, A/B 그래디언트가 늦다는 것을 의미합니다.

이는 파란색 선인 440 nm 채널을 이용하면 더욱 더 쉽게 알 수 있습니다.

440nm 채널은 아미노산 유도체에 대한 감도가 떨어지지만 반대로 버퍼의 조성비 등 베이스라인과 이동상에는 훨씬 더 민감합니다. 위 사진에서 CYS2/VAL 사이의 피크를 확대해보면 다음과 같은 결과를 볼 수 있습니다.



<시스틴이 첫번째 그래디언트보다 일찍 용리되어 broad한 피크가 나오는 중>

위 사진에서 볼 수 있듯이 시스틴은 첫번째 그래디언트 조건에서 용리돼야 좋은 피크를 얻을 수 있습니다. 하지만 첫번째 그래디언트가 다소 늦게 적용돼 100% A 조건에서 용리되는 것입니다. 100% A보다 A/B 혼합 용액이 pH가 더 높기 때문에 더 빠른 용리가 이루어지며 이에 따라 피크의 기울기가 달라진다고 생각하면 이해가 쉽습니다.

이때 주의해야하는 점은 첫번째 그래디언트는 보통 8~10분대에 적용되는데 실제 그래디언트가 적용되고 시스틴이 용리되는 시간은 20분 이후라는 점입니다.

이는 Gradient에 즉각적으로 반응하는 HPLC 와 C18 컬럼과는 다른 컬럼의 특성입니다. 이온 교환 수지를 사용하는 컬럼이기에 그래디언트가 시작되더라도 그 그래디언트 용액과 평형상태(equilibrium)에 도달하는데 시간이 걸리기 때문입니다.

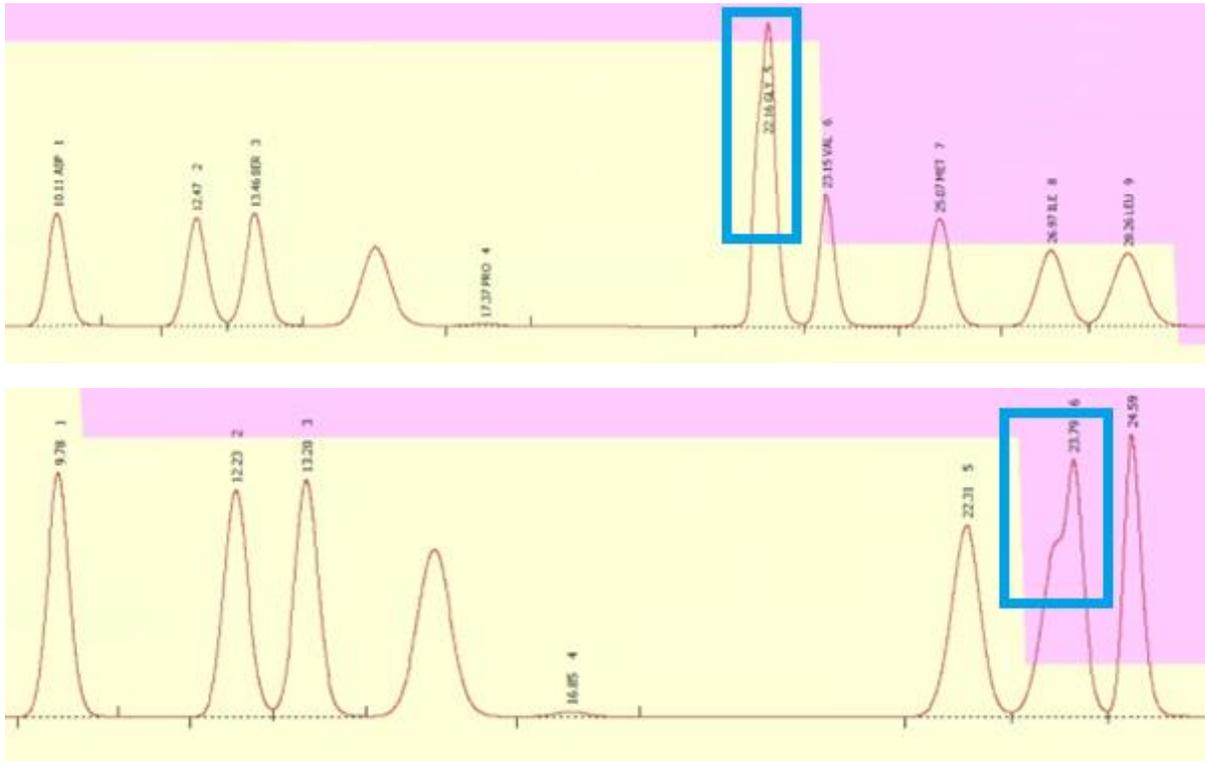
따라서 수정해야 할 Gradient는 첫번째 그래디언트의 시간(9.1)입니다.

위의 경우 Gradient가 늦게 적용되기 때문에 첫번째 그래디언트의 시작 시간을 9.1 분이 아닌 8.1 분으로 수정하면 됩니다. 이때 9.0 분까지 100% A가 흐르는 시간 역시 8.0 분으로 동일하게 줄여야 합니다.

수정전			수정후		
시간	A	B	시간	A	B
initial	100	0	initial	100	0
9	100	0	8	100	0
9.1	80	20	8.1	80	20
23	80	20	23	80	20

이때 첫번째 그래디언트의 시간을 너무 많이 앞당겨 알라닌(ALA) 피크의 영역을 침범하지 않는지에 대한 여부도 확인돼야 합니다.

다음은 보다 복합적인 문제가 발생하는 경우를 살펴보겠습니다.
 분석 조건은 LCA K06/Na 150mm column과 A-1/B-1/Reg.Sol. 입니다.



위 두 경우 공통적으로 GLY/ALA/CYS2/VAL 네가지 피크가 분리되지 못한 것을 알 수 있습니다.

첫번째 크로마토그램에서는 GLY Peak에 왼쪽 sholdering이 있는 것을 보아 GLY/ALA가 제대로 분리되지 않고 있음을 의미하며 시스틴 피크가 보이지 않는 것을 확인할 수 있습니다. 이는 GLY/ALA/CYS2가 동시에 용리되고 있다는 것을 의미합니다.
 또한 ASP의 RT값이 10.11로 너무 늦습니다.

두번째 크로마토그램 역시 ASP의 용리가 다소 늦으며 GLY ~ VAL의 용리가 제대로 되지 않는 것을 볼 수 있습니다.

이렇게 ASP부터 전체적인 피크들의 용리시간이 늦는 경우 일반적으로 Buffer A-1의 pH가 너무 낮거나 buffer flow가 낮음을 알 수 있습니다.

가장먼저 Buffer A-1의 pH를 측정합니다. 이때 calibration range는 1.68 - 4.01 2 point로 두며 실내 온도가 25도 근처여야 합니다. 이 조건 하에 Buffer A-1의 pH는 3.45 에 오차 범위 0.03 입니다. 이 범위를 벗어난 경우, 특히 pH가 너무 낮은 경우 NaOH (Li buffer의 경우 LiOH)를 통해 pH를 조정해야 합니다.

A-1의 pH가 낮으면 낮을수록 피크는 늦게 나오며 반대로 높은 경우 피크가 이르게 나옵니다. 따라서 A-1 버퍼의 pH를 3.45로 먼저 맞춰야 합니다.

이때 pH를 측정하는 동안 일정한 속도로 교반기를 돌려줘야 빠르고 정확한 측정이 가능합니다. 이러한 pH 차이가 발생하는 이유는, 제조 후 오랜 시간이 지나거나 온도, 습도가 달라짐에 따라 용액 내의 Citrate의 몰농도가 달라짐 등이 원인이 될 수 있습니다.

A-1의 pH를 맞췄다면 Blank(Bypass) 분석을 한번 한 뒤 다시 표준품 분석을 합니다. ASP 의 용리 시간이 정상 범위내로 돌아왔다면 이제 이전 항목에서 언급된 바 같이 용리 시간을 조절해주면 됩니다.

Step Gradient의 강점은 이러한 점에서 드러납니다. 분석 결과에 문제가 있다면 이에 대한 접근이 매우 용이하기 때문입니다.

아래 표는 각 분석 종류 별로 용리 구간을 나타낸 표입니다.

Sample Type: H			
Compound Name	A-1/B-1	Compound Name	A-4/A-5/B-1
ASP	A-1 IsoCratic	ASP	A-4 IsoCratic
THR		THR	
SER		SER	
GLU		GLU	1st A-4/A-5 Grad (16/84/0)
PRO		PRO	
GLY		GLY	
ALA		ALA	
(CYS)2		1st A-1/B-1 Grad (80/20)	(CYS)2
VAL	VAL		
MET	MET		
ILE	ILE		
LEU	LEU		
TYR	2nd A-1/B-1 Grad (32/68)	TYR	3rd A-5/B-1 Grad (0/73/27)
PHE		PHE	
HIS	3rd A-1/B-1 Grad (8/92)	HIS	4th A-5/B-1 Grad (0/56/44)
LYS	B-1 IsoCratic	LYS	B-1 IsoCratic
AMM		AMM	
ARG		ARG	

유리 아미노산 분석의 경우 더 복잡한 그래디언트를 가지고 있습니다. 단순히 글을 본다고 해서 이해하는 것은 쉽지 않습니다. 분석이 보다 자유로운 식품 회사라면 도전해볼만 하지만 GxP 레벨 하에 통제를 받는 제약회사 등은 이러한 도전이 마냥 쉽지않은 않을 수 있습니다!

따라서 문제가 발생하거나 궁금하신 점이 있다면, 언제든지 저희 (주)아주과학에 연락주시면 친절히 답변드리겠습니다.