

아미노산 전용 분석기를 통한 구성 아미노산 분석

Determination of Combined Amino Acids
by Sykam Amino Acid Analyzer

소개

아미노산은 단백질의 단위체인 펩타이드를 구성하는 가장 기본적인 물질입니다. 사람의 신체 역시 단백질로 단백질은 펩타이드로 펩타이드는 아미노산으로 구성됩니다. 수만가지 종류의 아미노산 중 사람에게 반드시 필요한 아미노산을 필수 아미노산이라고 합니다. 혹은 구성 아미노산이라고도 하는데 구성 아미노산은 단백질을 구성하고 있는 아미노산들을 의미하며 대략 16~20 종 정도가 있습니다.

최근 들어 소비자들의 아미노산에 대한 관심은 날이 갈수록 높아 지고 있습니다. 소비자들의 필수 아미노산에 대한 요구는 날로 높아가고 있으며 아미노산은 식품, 식품첨가제, 영양제, 제약 등에 널리 사용되고 있습니다. 이러한 트렌드에 발맞춰 식품, 제약 산업에서 아미노산의 분석에 대한 필요성이 대두됩니다.

하지만 아미노산은 그 구조가 비슷한 물질들을 칭하는 단어라는 사실에서 알 수 있듯이 아미노산은 분리가 매우 힘든 물질입니다. 분리 후 역시 문제인데, 대부분의 아미노산과 단백질은 UV/Vis에 대한 반응성이 없습니다. 펩타이드 결합은 190 nm에서 강한 흡광 반응을 하지만 텅스텐 중수소 램프를 사용하는 HPLC 장비의 특성상 200 nm 이하의 빛은 사용하기 힘듭니다.

이렇듯 아미노산은 직접적인 분리, 검출이 매우 힘든 물질입니다. 하지만 아미노산은 공통적으로 아미노기와 카복시기를 가진다는 구조적 특성을 이용해 유도체화 반응(Derivatization)을 이용한 분석법이 개발됩니다.

초창기 아미노산 분석은 HPLC에서 진행했습니다. 유도체화 반응은 분석자가 직접 유도체화 반응을 시행하거나 오토샘플러 인젝션 니들에서 진행했습니다. 하지만 이 방법은 시약 소비량이 적다는 장점이 있지만 그 분석 과정이 매우 복잡하며 분석 가능한 아미노산의 종류가 상대적으로 적다는 단점이 있습니다. 이러한 단점 때문에 아미노산 분석기가 개발됩니다.

아미노산 분석기는 별도의 반응로(Reactor)가 존재하며 이 반응로에서 유도체화 반응이 진행됩니다.

따라서 모든 과정이 자동화로 진행되며 전용 컬럼을 사용해 다양한 아미노산을 분석할 수 있게 됩니다. 아미노산 분석법은 유럽 약전(EP) 2.2.56. 및 미국 약전(USP) <1052> 에서 분석법을 제시하고 있습니다. 본 문서의 분석법과 Sykam GmbH 아미노산 분석기는 위 분석법의 조건과 기준을 충족합니다.

분석 장비

이 문서는 Sykam GmbH에서 제조 및 (주)아주과학에서 공급하는 Sykam 아미노산 분석기를 사용하였습니다.

해당 장비는 아래와 같습니다.

- Pump: S633P Gradient Pump
- Autosampler: S633A Auto Sampler
- Detector: S633R Reaction module

※ 위 장비는 Sykam GmbH에서 제조하는 Sykam Amino Acid Analyzer S433로 대체될 수 있습니다.

분석 조건

Sykam Amino Acid Analyzer의 구성 아미노산 분석법은 두가지가 있으며 두 방법 모두 570 nm & 440 nm Photometric Detection을 사용합니다.

A-1/B-1/Reg. Sol 을 사용하는 Hydrolysate Program
A-4/A-5/B-1/Reg.Sol을 사용하는 Extended Hydrolysate program 으로 나뉘며 분석법은 아래와 같습니다.

Hydrolysate Program					
Eleunt:	Sodium Citrate Buffer A-1, B-1, Reg. Sol				
Reagent:	Ninhydrin Reagent with Reducing Solution				
Standard:	Amino Acid Standard Solution Type-H				
Column:	Sykam LCA K06/Na Cation Separation column Sykam LCA K04/Na Ammonia Filter column				
Flow Rate:	Buffer: 0.45 ml/min Ninhydrin: 0.35 ml/min				
Run Cylce:	60 min				
Inj. Vol	100 ul				
Eluent Gradient	Time	A-1	B-1	Reg. Sol.	Flow
	Initial	100	0	0	0.45
	10	100	0	0	0.45
	10.1	80	20	0	0.45
	23	80	20	0	0.45
	23.1	32	68	0	0.45
	29	32	68	0	0.45
	29.1	12	88	0	0.45
	35	12	88	0	0.45
	35.1	0	100	0	0.45
	42	0	100	0	0.45
	42.1	0	0	100	0.45
	45	0	0	100	0.45
	45.1	100	0	0	0.45
60	100	0	0	0.45	
Temperature Gradient	Time	Temperature[°C]			
	0	57			
	31	57			
	32	74			
	51	74			
	60	57			

Hydrolysate Program은 일반적으로 빠른 분리를 위해 사용되는 분석법 이며

Extended Hydrolysate Program은 세밀한 분리과 특수 아미노산 분석을 위해 제작된 분석법 입니다.

유럽 약전의 아미노산 분석법 시스템 적합도 평가 항목인 이소류신(ILUE)/류신(LUE) 분리능 > 1.5를 위해선 **Extended Hydrolysate Program**을 사용해야 합니다.

Extended Hydrolysate Program					
Eleunt:	Sodium Citrate Buffer A-4, A-5, B-1, Reg. Sol				
Reagent:	Ninhydrin Reagent with Reducing Solution				
Standard:	Amino Acid Standard Solution Type-H				
Column:	Sykam LCA K13/Na Cation Separation column Sykam LCA K04/Na Ammonia Filter column				
Flow Rate:	Buffer: 0.45 ml/min Ninhydrin: 0.35 ml/min				
Run Cylce:	60 min				
Inj. Vol	100 ul				
Eluent Gradient	Time	A-4	A-5	B-1	Reg. Sol.
	Initial	100	0	0	0
	6	100	0	0	0
	6.1	16	84	0	0
	22.5	16	84	0	0
	22.6	0	88	12	0
	29	0	88	12	0
	29.1	0	73	27	0
	38	0	73	27	0
	38.1	0	56	44	0
	44	0	56	44	0
	44.1	0	0	100	0
	60	0	0	100	0
	60.1	0	0	0	100
63	0	0	0	100	
63.1	100	0	0	0	
81	100	0	0	0	
Temperature Gradient	Time	Temperature[°C]			
	0	68			
	13	68			
	14	56			
	36	56			
	81	68			

분석 준비

구성 아미노산 분석은 일반적으로 18종 표준품을 이용하여 시료 내 황 함유 아미노산인 Methionine과 Cysteine(Cystine)의 정량을 위한 20종 표준품 역시 있습니다.

추가적으로 내부표준물질을 위한 Norleucine과 대표적인 특수 아미노산 GABA를 분석할 수 있습니다.

일반적으로 표준품의 안정성, 신뢰도, 정확성을 위해 미리 제조된 표준품을 구매해서 쓰는 것이 권장됩니다.

만약 표준품을 직접 제조한다면 분석법 혹은 공전에서 지시하는 절차를 따라야 합니다.

본 문서에서 사용된 표준품은 일반적으로 사용되는 Amino Acid Standard Solution Type H를 사용했습니다.

일반적인 시료의 전처리는 여러가지 방법이 존재하며 본 문서에서 사용하는 전처리 방법은 아래와 같습니다.

1. 시료를 100 mg ~ 500 mg 정확히 정량한다.
2. 6 N HCl 을 15 ml 넣은 후 질소가스로 채운다.
3. 섭씨 110도에서 22시간 가열한다.
4. 천천히 식힌 후 감압증발기로 산을 날려보낸다.
5. 초순수 10ml 정도를 벽면에 타고 흘린다.
6. 4-5 과정을 3회 반복한다.
7. Sample Dilution Buffer로 20 ml까지 정용한다.
8. 0.22 um 시린지 필터로 여과 후 샘플 바이알에 담는다.

전처리가 끝난 샘플은 4도씨 이하 냉장보관 하에 최대 6주까지 보관 가능하다.

위 방법은 일반적인 가수분해 방법이며 황 함유 아미노산과 트립토판의 파괴가 동반됩니다. 트레오닌, 메티오닌 등의 황 함유 아미노산 분석 혹은 트립토판 분석의 경우 개별적인 전처리 방법이 적용돼야 합니다.

검량선 작성을 위해서 최소 5 가지의 농도를 준비해야 하지만 아미노산 분석기의 경우 One Point Calibration 역시 가능합니다. 아미노산의 오염이 비교적 적다는 점, 유도체화 반응을 이용한 간접 분석이라 특성에 기인합니다. 따라서 어떤 교정을 선택할지는 분석자의 상황에 맞게 고려해 선택합니다. 본 문서는 5가지 농도의 Calibration을 이용했습니다.

장비 세팅

Sykam GmbH의 아미노산 분석기는 양이온 교환 컬럼과 구연산 완충액(Citrate Buffer)을 이용해 pH, Molarity Gradient로 아미노산을 분리합니다. 따라서 분석 전 컬럼의 pH와 Buffer의 평형이 매우 중요합니다.

사용할 프로그램의 종류에 맞게 Buffer와 Reagent를 채워 넣은 후 충분한 Purging을 통해 라인 내의 기포를 제거해줍니다.

만약 새로운 컬럼을 사용한다면 Column Conditioning을 시행하는 것이 권장됩니다. 컨디셔닝은 아래와 같습니다.

	Time	A-1(A-4)	Reg. Sol.	Flow
Eluent Gradient	Initial	0	100	0.1
	10	0	100	0.1
	10.1	0	100	0.2
	20	0	100	0.2
	20.1	0	100	0.3
	30	0	100	0.3
	30.1	0	100	0.4
	35	0	100	0.4
	35.1	0	100	0.45
	45	0	100	0.45
	45.1	100	0	0.45
	80	100	0	0.45

마지막 분석이 끝난 지 얼마 안 됐다면 Blank run 1~2회 후 바로 분석해도 무방합니다.

가장 중요한 것은 Column 과 A-1 사이의 평형입니다.

Reg. Sol. 과 A-1(A-4) Buffer가 흐른 시간의 길이와 비율에 따라서 Column이 A-1과 평형을 이루는 정도가 달라지게 됩니다. 이는 분석 결과가 달라질 수 있다는 것을 의미하며 이를 방지하며 분석 결과의 재현성(Reproducibility)를 얻기 위해 Sequence Idle Time은 3분으로 설정하며 첫 분석은 Blank 혹은 Bypass Run으로 설정합니다.

이제 오토샘플러에서 injection port wash를 2회 실행 후 drain port에서 물방울이 일정하게 떨어지는 것을 확인합니다.

준비가 완료됐다면 분석을 시작합니다.

분석 결과

크로마토그램 상의 빨간 선은 570nm 채널을 뜻하며 Proline을 제외한 모든 아미노산 정량 및 정성에 사용됩니다. 파란색 선은 440nm 채널을 뜻하며 Proline의 정량 및 정성을 위해 사용됩니다.

두가지의 분석법으로 분석된 표준품 분석 크로마토그램은 아래와 같습니다.

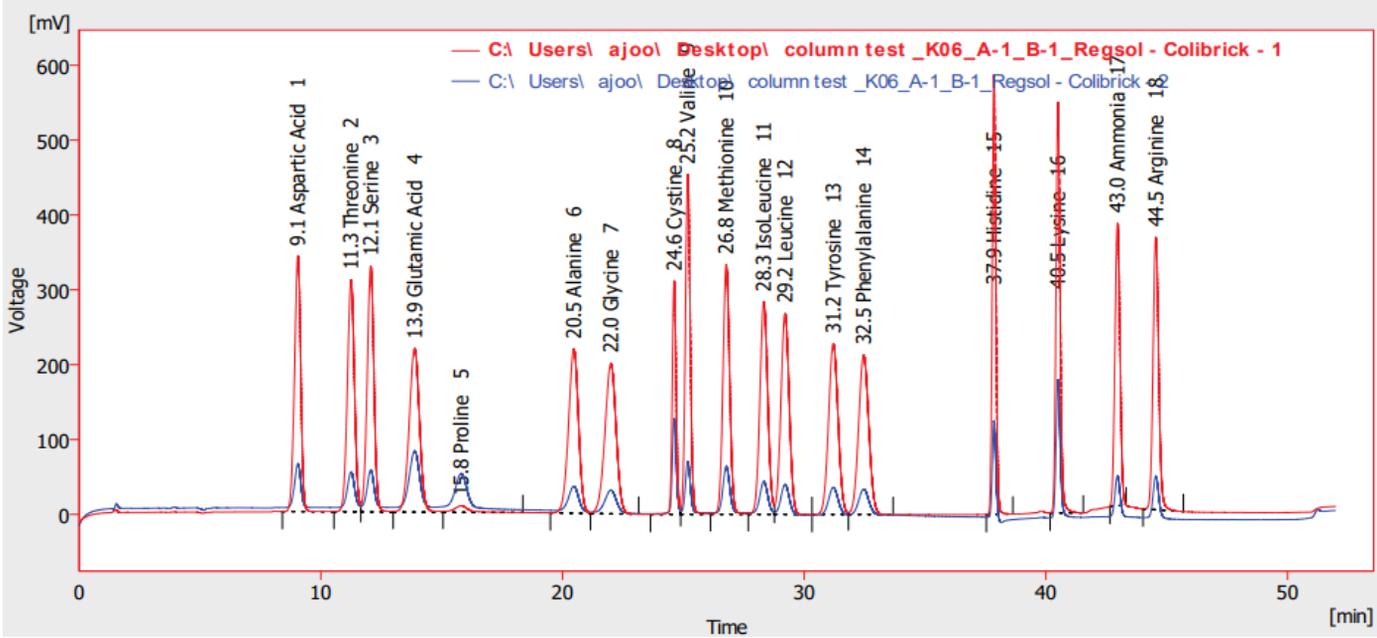


Figure 3. Hydrolysate Program을 통한 18종 아미노산 분석 결과

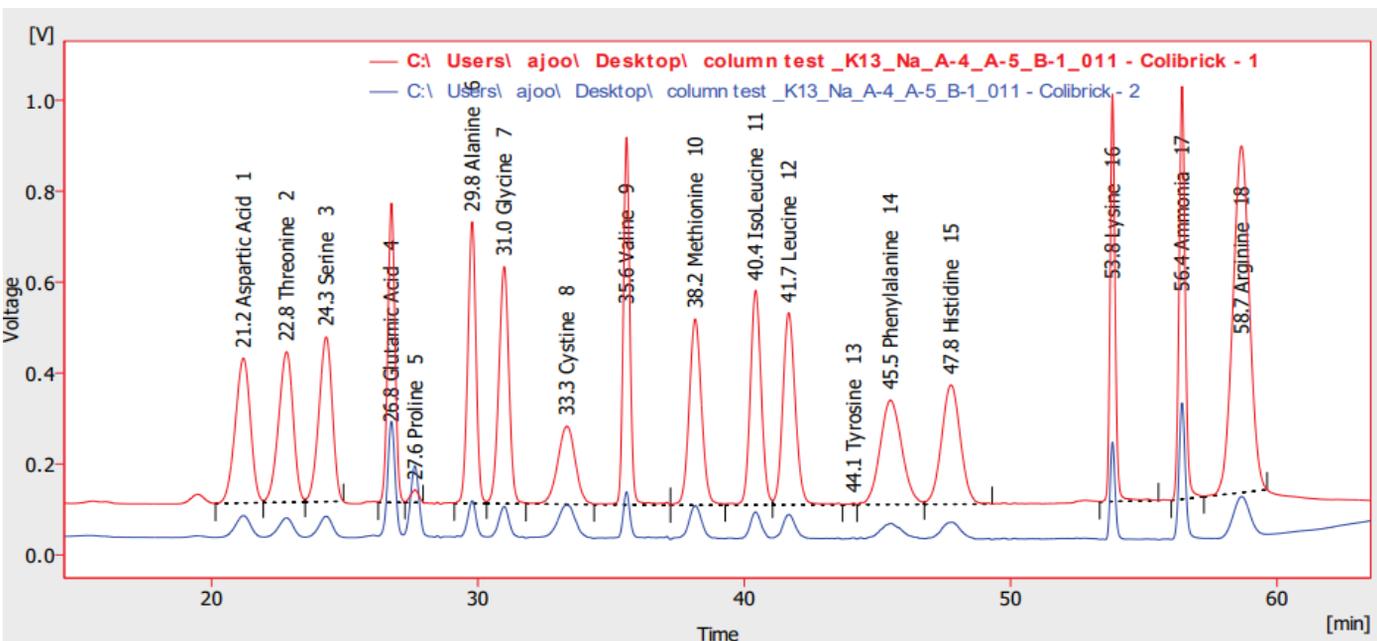


Figure 4. Extended Hydrolysate Program을 통한 18종 아미노산 분석 결과

결과 해석

먼저 Sykam GmbH에서 공급하는 아미노산 분석 전용 컬럼은 다음과 같은 성능 조건을 요구합니다.

Limit of Column Performance for LCA K06	
Resolution	THR/SER > 1.3
Asymmetry	N/A
Efficiency	N/A
Limit of Column Performance for LCA K13	
Resolution	THR/SER > 1.3
Asymmetry	0.8 ~ 1.5
Efficiency	> 40000

또한 아미노산 분석의 적합성 평가를 위해선 아래와 같은 항목 역시 평가됩니다.

RSD of Area, Retention time < 1.5 % [Precision]
 Correlation Factor of Peaks > 0.999 [Linearity]
 Resolution between ILUE/LUE > 1.5 [Resolution]
-only valid for extended hydrolysate program

정밀성 및 직선성 조건 역시 모두 만족했으며 각 항목별 최저치와 분리도 값은 아래와 같습니다.
 각 농도별로 6회 반복 분석 됐으며 표기는 평균입니다.

Summary of results			
Compound Name	Proline	Correlation Factor	0.9992
Compound Name	Ammonia	RSD of Area	1.10%
Compound Name	Histidine	RSD of Retention Time	0.65%

Resolution of ILEU/LEU for EP SST			
Concentration [nmol/ml]	300	Resolution	1.553
Concentration [nmol/ml]	200	Resolution	1.574
Concentration [nmol/ml]	100	Resolution	1.594
Concentration [nmol/ml]	50	Resolution	1.602
Concentration [nmol/ml]	25	Resolution	1.601
Concentration [nmol/ml]	12.5	Resolution	1.559
Concentration [nmol/ml]	6.25	Resolution	1.583

결론

Sykam GmbH에서 공급하는 아미노산 분석기를 이용한 구성 아미노산 분석은 성공적으로 완료됐습니다.

본 문서에서 사용된 아미노산 분리 컬럼인 Cation separation column SykamLCA K06 및 LCA K13/Na 두 컬럼 모두 적합한 성능을 보여준다는 것을 확인했습니다.

분리도, 직선성, 정밀성 및 정확성이 모두 평가됐으며 제시된 조건을 만족함을 확인했습니다.

Sykam Amino Acid Analyzer S433, S633 모두 본 문서에서 시행된 분석을 진행할 수 있습니다. 단, S633과 S433의 경우 일부 기계적 특성이 달라 분석법이 수정돼야 할 수 있습니다.

본 문서에서 사용된 분석법은 S633에 최적화된 분석법이며 S433 역시 사용 가능합니다. 단, 이 경우 초반 그라디언트 조건이 조금 수정이 요구될 수 있으며 이와 관련된 문의는 언제든지 저희 (주)아주과학으로 연락주시면 해결해드리겠습니다.