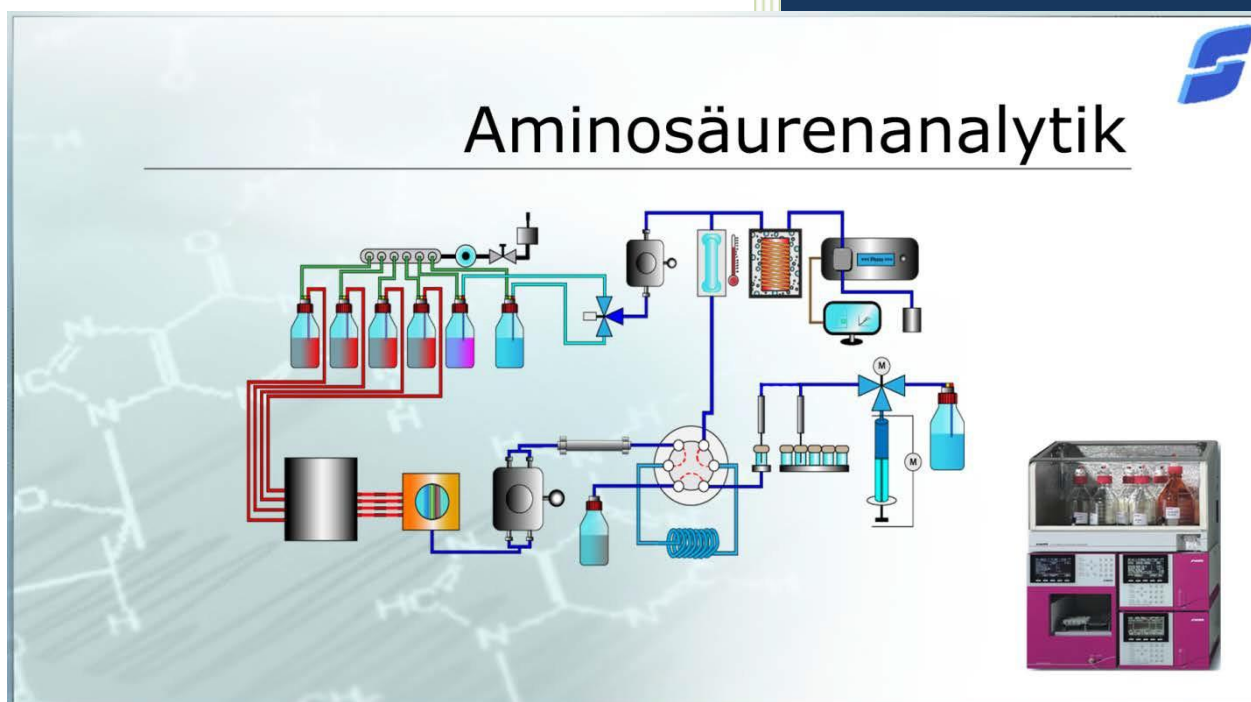


**시료 전처리 방법**



단백질의 가수분해법

[k.jansen@sykam.de](mailto:k.jansen@sykam.de)


Version 1.3 /21.8.2015

SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH

Carl-von-Linde-Straße 2

D-82256 Fürstenfeldbruck

번역 : 하성웅

<b>아미노산 시료 전처리 표준 방법(SOP)</b> <b>Standard Operation Procedure(SOP) for Amino Acid</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD 단백질 가수분해 법	Page:	2 of 29
		Version:	1.30

## 1 서문 :

이 문서에 소개된 가수분해법은 물의 처리와 가수분해 과정을 합친 문서입니다.

고전적인 방법들(VDLUFA Banding 4.11.1 Amino Acid / AOAC 공식 Method 994.11 FEED and Regulation (EC) No.152/2009)을 기반으로 세분화된 방법을 적용해 개량된 방법들 입니다.

이 문서에 소개된 가수분해는 현재 SYKAM의 실험실에서 사용되고 있으며 성분과 농도가 표준화된 시료를 이용한 품질 비교 및 검정이 꾸준히 이루어지고 있습니다. 하지만 이 문서에서 제시하는 가수분해 법을 그대로 사용하기 보다는 **사용자의 상황과 시료의 특성을 고려해 알맞게 수정되어야 하며 이 수정된 항목에 대해 반복적인 검정이 필요합니다.**

고전 방식(Classic method)과 동의어인 공식적인 방식(official method)은 공식적인 사료의 검사를 위한 사료 채취 과정과 분석 방법의 정의에 관한 독일내 법령(No. 152/2009)에서 인용되었습니다.

이 문서에서 제시된 가수분해 법은 SYKAM사의 아미노산 분석기를 기반으로 하며 분석에 사용되는 분석방법(method)은 고정으로 하여 각 가수분해 방법의 차이를 비교할 수 있습니다.

여기서 분석방법(분석 과정; method)이란 사료, 건조 음식, 식물 등의 시료에 포함된 아미노산을 결정하는 방법으로써 컬럼, 온도, pH, 구배분리 등을 조절하게 됩니다.


생리물질 분석과 비슷한 형태인 **단백질 결합 아미노산(protein-bounded amino acid)**의 경우 아미노산에 엔도텔린-1 혹은 유리 아미노산이 결합된 형태가 있는데, 특히 단백질 결합 아미노산만 분석할 경우 결합된 유리 아미노산을 제거하는 작업이 필수적으로 이행돼야 합니다.

다음과 같은 아미노산을 분석할 수 있습니다:

	아미노산	Amino acid	축약표기	단일표기
1	아스파라진산	aspartic acid	ASP	D
2	트레오닌	threonine	THR	T
3	세린	serine	SER	S
4	글루탐산	glutamic acid	GLU	E
5	프롤린	proline	PRO	P
6	글라이신	glycine	GLY	G
7	알라닌	alanine	ALA	A
8	시스틴	cystine	CYS	C
9	발린	valine	VAL	V
10	메티오닌	methionine	MET	M
11	Iso-루신	isoleucine	ILE	I
12	루신	leucine	LEU	L
13	티로신	tyrosine	TYR	Y
14	페닐알라닌	phenylalanine	PHE	F
15	히스티딘	histidine	HIS	H
16	라이신	lysine	LYS	
17	아르기닌	arginine	ARG	

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

※트립토판 혹은 메티오닌 같은 하이드록시기를 가진 아미노산은 해당 방법을 사용할 수 없습니다.

<b>아미노산 시료 전처리 표준 방법(SOP)</b> <b>Standard Operation Procedure(SOP) for Amino Acid</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD 단백질 가수분해 법	Page:	4 of 29
		Version:	1.30

## 2 방법 개요

아미노산의 결정은 시료 전처리 방법의 종류에 따라 결정됩니다. 크게 3가지로 분류가 되는데, 다음과 같습니다.

### 유리 아미노산(Free Amino Acid)

유리 아미노산은 희석된 염산에 의해 추출됩니다. 같이 추출된 질소 함유 고분자는 술포살리실산으로 침전 후 여과를 통해 제거합니다. 여과 후 pH를 2.2 까지 낮춰 준비를 끝냅니다. 이것이 공식적인 방법입니다.

또는 각각의 아미노산에 맞는(Li or Na) 시료 준비 완충액(Sample Preparation Buffer; PVP)를 사용하여 시료를 직접 추출하여 초여과(ultrafiltration) 혹은 단백질 침전 후 바로 분석 기계에 주입할 수도 있습니다.(자세한 내용은 SOP PVP -ASA\_15-1-SSA 참조).

아미노산은 이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리되며, 570nm의 광도 검출로 검출됩니다. 추출된 아미노산의 검출을 위해 확장된 가수분해 프로그램(+ Tau, Trp, Orn) 혹은 짧은 생리 프로그램(Physiological program)을 권장합니다.

### 전체 아미노산(Total Amino Acid)

선택한 전처리 방법은 어떤 아미노산을 분석할 것이냐에 달려있습니다.

시스틴 및 시스테인 혹은 메티오닌의 경우 가수분해 전에 각각 시스테인산(Cysteic acid)과 메티오닌 술폰(Methionine Sulfone)으로 산화시켜야 합니다.

티로신(Tyrosine)은 반드시 비산화물(non-oxidized)의 가수분해 방법으로 측정되어야 합니다.

이 외에 표1에 언급된 아미노산의 경우는 산화의 여부와 관계 없이 가수분해 후 검출할 수 있습니다.

산화 과정은 과의산(performic acid)-페놀(Phenol) 혼합물로 섭씨 0도씨에서 진행되어야 합니다.


잔여 산화 반응액은 메타중아황산나트륨(sodium disulfite)로 제거할 수 있습니다.

이후 산화된 시료 혹은 산화되지 않은 시료는 염산(3.20)에서 23시간 동안 가수분해 됩니다.

가수분해물은 이후 pH 2.2 까지 적정됩니다.(공식방법)

혹은 가수분해 후, 염산을 증발시키거나 분사 후 잔여물을 PVP에 녹이는 방법도 있습니다.

아미노산은 이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리되며, 닐하이드린(Ninhydrin)으로 발색 후 570nm(프롤린의 경우 440nm) 파장으로 광도 측정으로 검출됩니다.

<b>아미노산 시료 전처리 표준 방법(SOP)</b> <b>Standard Operation Procedure(SOP) for Amino Acid</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD 단백질 가수분해 법	Page:	5 of 29
		Version:	1.30


## 단백질 결합 아미노산(Protein-Bounded Amino Acid)

만약 시료가 정제된 단백질 시료가 아니라면, 즉 유리 아미노산 등이 추가적으로 결합된 형태의 단백질 시료라면 반드시 이러한 유리 아미노산 들을 제거하는 과정이 필요합니다.

이를 위해서 시료 물질을 2.1에서 언급한 바와 같이 염산을 통해 추출 합니다.

이후 가수분해 전에 원심분리와 술포살리실산을 이용해 질소 고분자 물질을 침전 후 제거합니다.

아미노산은 동일하게 이온 교환 크로마토그래피에 의해 분리되며, 닌하이드린으로 발색 후 570nm(프롤린의 경우 440nm)파장으로 광도 측정으로 검출됩니다.

<b>아미노산 시료 전처리 표준 방법(SOP)</b> <b>Standard Operation Procedure(SOP) for Amino Acid</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD 단백질 가수분해 법	Page:	6 of 29
		Version:	1.30

### 3. 화학물질:

아래에 나열된 화학물질은 제조사(판매자), Catalog No, 패키지 무게와 함께 기입돼 있습니다. 하지만 SOP에 있어서 제조사 제한은 없으며 품질의 비교 후 적합한 곳의 화학물질을 구매하면 됩니다.

#### 3.1. 술포살리실산

5-Sulfosalicylic acid dihydrate,

제조사: SIGMA-ALDRICH

Catalog No.: 257006

M 254,21

#### 3.2. DL – 노르류신 (IS)

DL – Norleucine

제조사: SIGMA-ALDRICH

Catalog No.: N 1398 Sigma

M 131,17

#### 3.3. 0.1 N 염산

염산 0,1 mol/l (0,1 N), ready to use


제조사: Merck Millipore

Formel: HCl

MW: 36,46 g/mol

밀도: 1,004 g/cm<sup>3</sup> (25 °C)

Catalog No.: 1.09060.1000

<b>아미노산 시료 전처리 표준 방법(SOP)</b> <b>Standard Operation Procedure(SOP) for Amino Acid</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD 단백질 가수분해 법	Page:	7 of 29
		Version:	1.30

### 3.4 염산

염산 37% EMSURE® ACS, ISO,  
 Reag. Ph. Eur. zur Analyse  
 Article No.: 1.00317.2510  
 VE: 1 \* 2,5 l  
 제조사: Merck Millipore  
 Formel: HCl  
 MW: 36,46 g/mol  
 Siedepunkt: 110 °C (1013 hPa)  
 Melting Pt: - 30 °C  
 Dichte: 1,18 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)

### 3.5 과산화수소내

과산화 수소 50% GPR RECTAPUR®  
 제조사: VWR Chemicals  
 Formel: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 MW: 34,01 g/mol  
 끓는점: 126 °C (1013 hPa)  
 녹는점: - 40 °C  
 밀도: 1,19 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)  
 Catalog No.: 23620.292

### 3.6 티오다이글라이콜(Thiodiglycol)

Article No.: SAFA166782-500G  
 VE: 1 \* 500 g  
 제조사: Sigma- Aldrich  
 Formel: S(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>  
 MW: 122,19 g/mol  
 Siedepunkt: 282 °C (1013 hPa)  
 Melting Pt: - 10 °C  
 Dichte: 1,18 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)  
 Flash-Pt: 113 °C (geschlossener Becher)

번역 : (주)아주과학	해당 문서는 내부적인 목적으로만 사용 가능하며 무단 복제 및 유포시 처벌을 받을 수 있습니다
--------------	---

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	9 of 29
		Version:	1.30

### 3.7 포름산

포름산 98 -100% EMSURE® ACS, Reag. Ph.

Eur. zur Analyse

Article No.: 1.00264.1011

제조사: Merck Millipore

### 3.8 메타중아황산나트륨

Natriummetabisulfit EMSURE® ACS,

Reag. Ph. Eur. zur Analyse

Formel:  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

MW: 190,11 g/mol

Melting Pt: 150 °C

Dichte: 1,48 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)

Article No.: 1.06528.0100

VE: 1 \* 100 g

제조사: Merck Millipore

### 3.9 수산화 나트륨

Natriumhydroxid, Plätzchen

EMSURE® zur Analyse

Article No.: 1.06498.1000

VE: 1 \* 1 kg

제조사: Merck Millipore

Formel: NaOH

MW: 40 g/mol

Siedepunkt: 1390 °C (1013 hPa)

Melting Pt: 323 °C

Dichte: 2,13 g/cm<sup>3</sup> (20 °C)



<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	10 of 29
		Version:	1.30

### 3.10 염화나트륨

Natriumchlorid EMSURE® ACS, ISO,

Reag. Ph. Eur. zur Analyse

Article No.: 1.06404.1000

VE: 1 \* 1 kg

제조사: Merck Millipore

Formel: NaCl

MW: 58,44 g/mol

Siedepunkt: 1413 °C (1013 hPa)

Melting Pt: 801 °C

Dichte: 2,16 g/cm³ (20 °C)

### 3.11 벤진(Petrolether)

Petroleumbenzin 40 -60°C

EMSURE® ACS, ISO zur Analyse

Article No.: 1.01775.6010

VE: 1 \* 10 l

제조사: Merck Millipore

Siedepunkt: 40 bis 60 °C (1013 hPa)

Dichte: 0,65 g/cm³ (20 °C)

Flash-Pt: -40 °C

### 3.12 페놀(Phenol)

Phenol, einzelne Kristalle

AnalaR NORMAPUR® ACS,

Reag. Ph. Eur. zur Analyse

Article No.: 20599.231

VE: 1 \* 250 g


제조사: VWR Chemicals

Formel: C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH

Siedepunkt: 181,8 °C (1013 hPa)

Melting Pt: 40,8 °C

Dichte: 1,06 g/cm³ (20 °C)

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	11 of 29
		Version:	1.30

### 3.13 Amino Acid Calibration Solution H

가수분해물 측정을 위한 17 종 아미노산 및 암모니아.

1,25 µMol/ml and 2,5 µMol/ml in 5 ml 0,1 N HCl/0,1 % Phenol

제조사: SYKAM Chr.Vertr. GmbH

Catalog No.: 60 06 001

### 3.14 Amino Acid Calibration Solution H-Ox

산화 후 가수분해물 측정을 위한 19종 아미노산 및 암모니아.

1,00 µMol/ml in 5 ml 0,1 N HCl/0,1 % Phenol

제조사: SYKAM Chr.Vertr. GmbH

Catalog No.: 60 06 007

### 3.15 질소가스 (< 10 ppm 산소).

### 3.16 Sample dilution Buffer(Li)

시료 희석 용액(Li), 12N, pH 2,2

제조사: SYKAM Chr.Vertr. GmbH


Catalog No.: 60 02 009

### 3.17 Sample dilution Buffer(Na)

시료 희석 용액(Na), 12N, pH 2,2

제조사: SYKAM Chr.Vertr. GmbH

Catalog No.: 60 02 009

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	12 of 29
		Version:	1.30

### 3.18 Elution Buffer A -1 (Na)

Na-Citrat- puffer/Na , 0,12 N, pH 3.45

제조사: SYKAM Chr.Vertr. GmbH

Catalog No.: 60 01 005

### 3.19 Elution Buffer B-1 (Na)

Na-Citrat- puffer/Na, 0, 2 N, pH 10.85

제조사: SYKAM Chr.Vertr. GmbH

Catalog No.: 60 01 006

### 3.20 Regeneration Solution (Na)

NaOH-Lsg /Na, 0,45 N,

제조사: SYKAM Chr.Vertr. GmbH

Catalog No.: 60 03 001

### 3.21 Ninhydrin


2-Komponenten Fertigninhydrin- Reagenz ,

제조사: SYKAM Chr.Vertr. GmbH

Catalog No.: 60 03 001

### 3.22 초순수(Deionized Water)

멸균 처리, Conductivity > 0,1  $\mu$ S (> 18 M $\Omega$ )

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	13 of 29
		Version:	1.30

## 4 장비

반드시 해당 회사(Eppendorf 등)의 실험기구를 사용해야하는 것이 아닙니다.  
해당 항목의 조건에 부합하는 실험 장비 및 기구를 사용하십시오.

### 4.1 원심분리기

### 4.2 Eppendorf Reaction tube 2 ml

### 4.3 Reaction Vessels Duran 20 ml with screw Cap

### 4.4 항온 반응 용기

### 4.5 냉장고 (7°C)

### 4.6 냉 동 고 (-15°C)

### 4.7 건조대

### 4.8 진공데시케이터


### 4.9 피펫

### 4.10 메스 플라스크

### 4.11 분석저울 (0,1 mg)

### 4.12 Vortex Shaker

### 4.13 1.5ml 병과 스크류 캡

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	14 of 29
		Version:	1.30

## 5 구비 시약

### 5.1 20 mMol/l 노를루신 보관 용액(Norleucine Stock Solution)

100ml 비커에 0.1N HCl(3.3) 50ml와 262.3mg의 노를루신을 넣은 후 교반기를 이용해 섞어줍니다.  
100ml 눈금에 정확히 맞춰 0.1N HCl을 추가합니다.

이 용액은 20mmol (2.62g/L)의 DL- norleucine 용액이 됩니다.

보관은 갈색 시약병(amber glass), 7도씨에서 1년 동안 사용 가능합니다.

### 5.2 침전 시약 A 30 % SSA

80ml의 DIO(초순수)에 술포살리실산(3.1) 30g을 교반기를 이용해 완전히 녹입니다.  
100ml의 부피플라스크를 이용해 눈금에 맞게 초순수를 부어줍니다.

보관은 플라스틱 용기, 7도씨에서 1년 동안 사용 가능합니다.

### 5.3 침전 시약 B 10 % SSA

80ml의 DIO(초순수)에 술포살리실산(3.1) 10g을 교반기를 이용해 완전히 녹입니다.  
100ml의 부피플라스크를 이용해 눈금에 맞게 초순수를 부어줍니다.

보관은 플라스틱 용기, 7도씨에서 1년 동안 사용 가능합니다.


### 5.4 수산화 나트륨 용액, c = 7,5 mol/l

300 g NaOH (3.9) 를 초순수에 녹인 후 1L까지 정량합니다.

### 5.5 수산화 나트륨 용액, c = 1 mol/l

40 g NaOH (3.9) 를 초순수에 녹인 후 1L까지 정량합니다.

last save by (initials): khj	filename: Technik \ QM \ SOP \ Probenvorbereitung \ PVP-ASA-15-2-HYD1_3.docx
------------------------------	--

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	15 of 29
		Version:	1.30

## 5.6 페놀 포름산 용액(Phenolic formic acid solution)

889g의 개미산(formic acid)(3.7)을 111g의 물에 녹인 후 4.73g의 페놀을(3.12) 첨가합니다.

## 5.7 추출용액, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$ ,

900ml의 초순수에 8.2 ml HCl(3.4)을 첨가한 후 잘 섞어줍니다.

그 뒤 20ml 티오다이글라이콜(Thiodiglycol)(3.6)을 첨가합니다.

1L가 될 때까지 초순수를 넣어줍니다.

※ HCl과 티오다이글라이콜을 동시에 첨가하면 안 됩니다. 충분히 HCl을 녹이고 섞은 후 티오다이글라이콜을 첨가합니다.


## 5.8 산화 용액(Oxidation mixture) (과인산 – 페놀)

5.6에서 제조한 **페놀 포름산 용액 4.5ml** 에 **과산화 수소(3.5) 0.5ml**를 혼합합니다.

과인산 형성을 위해 섭씨20~30도의 상온에서 1시간 가량 방치합니다.

시료에 첨가하기 전에 15분 정도 아이스 배스에서 냉각 후 첨가합니다.

**※ 피부 접촉을 피하기 위해 보호구 및 보호의를 착용하세요.**

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	16 of 29
		Version:	1.30

## 5.9 IS-침전 시약 A 30% SSA (1.8 µMol/ml NorLeu)

100ml 메스 플라스크에 침전 시약 A(5.2)를 넣은 뒤

5.1에서 제조한 노를루신 용액(5.1) 9ml를 넣고 섞은 후 침전 시약A로 100ml 정량합니다.

이 용액은 1.8 mmol DL - 노를루신 용액에 해당합니다.

보관은 갈색 유리병(amber glass), 7도씨에서 1년 동안 사용 가능합니다.

## 5.10 IS-침전 시약 B 10 % SSA (0.5 µMol/ml NorLeu)

100ml 메스 플라스크에 침전 시약 B(5.3)를 넣은 뒤

5.1에서 제조한 노를루신 용액(5.1) 2.5ml를 넣고 섞은 후 침전 시약B로 100ml 정량합니다.

이 용액은 0.5 mmol DL - 노를루신 용액에 해당합니다.

보관은 갈색 유리병(amber glass), 7도씨에서 1년 동안 사용 가능합니다.

## 5.11 IS-AS 교정 용액

10ml 메스 플라스크에 표준 용액 H(3.19) 0.4 ml를 넣습니다.


5.1 에서 제조한 노를루신 용액(5.1) 500µl를 첨가합니다.

시료 희석 용액/Na(3.17)로 10ml 까지 정량합니다.

이 용액은 50 ~ 100nmol / ml (urea 1µmol/ml)의 아미노산을 함유하고 있습니다.

또한 내부 표준 농도로 100 nmol / ml 의 노를루신이 있습니다.

이 용액은 즉시 분석 / 교정 용으로 사용하는 것이 좋으며 냉장보관으로 8주까지 보관 가능합니다.

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	17 of 29
		Version:	1.30

## 5.12 침전 시약 A가 있는 조립식 소형 반응 용기

5.9에서 제조한 IS-침전 시약 A 30% SSA (1.8 µMol/ml NorLeu) 100 µl을  
1.5 ml 폴리프로필렌 소형 반응 용기(micro reaction vessel, PP)에 넣은 후 밀봉합니다.

반응 용기는 영하 15도씨에서 수직으로 3개월 동안 보관 가능합니다.

## 5.13 침전 시약 B가 있는 조립식 소형 반응 용기

5.10 에서 제조한 IS-침전 시약 B 30% SSA (0.5 µMol/ml NorLeu) 500 µl을  
1.5ml 폴리프로필렌 소형 반응 용기(micro reaction vessel, PP)에 넣은 후 밀봉합니다.

반응 용기는 영하 15도씨에서 수직으로 3개월 동안 보관 가능합니다.

## 5.14 가수분해용액 1 C=6mol HCl

초순수 250ml 에 1g의 페놀을 첨가한 뒤 500ml의 37%wt HCl 을 첨가합니다.  
이후 초순수로 1L까지 눈금을 맞춥니다.


## 5.15 가수분해 용액 2 (IS 노를루신 함유), C = 6mol HCl

초순수 400ml에 1g의 페놀을 첨가한 뒤 105 mg의 노를루신(0.8mmol/L)를 넣어줍니다.  
이후 500ml 의 37wt% HCl을 넣은 후 초순수로 1L까지 눈금을 맞춥니다.

## 5.16 가수분해 용액 3 (IS 노를루신 함유), C = 6mol HCl

초순수 400ml에 1g의 페놀을 첨가한 뒤 131 mg의 노를루신(1.0mmol/L)를 넣어줍니다.  
이후 500ml 의 37wt% HCl을 넣은 후 초순수로 1L까지 눈금을 맞춥니다.



<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	18 of 29
		Version:	1.30

## 6 시료 준비

시료는 완전히 균질한 상태로 건조된 상태로 0.5mm 채를 통과할 수 있을 정도로 곱게 분쇄해야 합니다. 만약 시료에 습기가 있을 경우 균질화 전에 50도씨에서 24시간 동안 건조 혹은 동결 건조를 통해 수분을 없애야 합니다.

만약 시료 내 지방이 있다면, 분쇄 전에 벤진으로 추출 후 사용합니다.

공식 방법(Official method)은 식약처 등의 국가공인검정기관 혹은 법(독일) 등이 제시하는 공식적인 방법이며

사내 방법(In-House method)은 SYKAM에서 사용중인 방법을 뜻합니다.


사용할 모든 시료 전처리 방법은 공식 방법이든 사내 방법이든 적절한 절차를 통해 항상 재검증 및 검정으로 방법의 신뢰성을 유지해야 합니다.

### 6.1 유리 아미노산 함량 결정 방법(공식 방법; official method)

1. 1~5g 의 시료를 정량합니다.
2. 250ml 비커에 100ml의 추출 용액(5.7)과 함께 정량한 시료를 녹입니다.
3. 교반기를 이용해 중간 속도로 60분간 섞습니다.
4. 교반이 끝나고 약 20분 정도 뒤에 형성된 상등액 10ml를 100ml 비커에 붓습니다.
5. 침전 시약B(5.2)를 5ml 더한 뒤 5분간 교반기를 이용해 섞습니다.
6. 이후 용액을 여과 후 10ml를 100ml 비커로 옮깁니다.
7. 수산화 나트륨 용액을 이용해 pH를 2.2로 맞춥니다.
8. 용액을 50ml 매스 플라크스로 옮긴 후 구연산 완충 용액(Citrate buffer)으로 50ml를 맞춥니다.

참고 : IS(내부 표준물질)을 사용할 경우 50ml로 맞추기 전에 IS 0.5ml를 첨가합니다.

**완성된 추출물은 5도 이하에서 3일간 보관 가능합니다.**

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	0 of 29
		Version:	1.30

## 6.2 유리 아미노산 함량 결정 방법(사내 방법; In-House Method)

1. 1~5g 의 시료를 정량합니다.
2. 250ml 비커에 100ml의 추출 용액(5.7)과 함께 정량한 시료를 녹입니다.
3. 교반기를 이용해 중간 속도로 60분간 섞습니다.
4. 교반이 끝나고 약 20분 정도 뒤에 형성된 상등액 0.9ml를 1.5ml 소형 반응 용기(5.12)에 넣습니다.
5. vortex lab shaker로 섞은 후, 30분간 7도씨의 냉장고에서 냉장 보관합니다.
6. 10,000~12,000rpm 원심분리를 10분간 한 뒤, 500 $\mu$ l를 1.5ml 시약병에 옮긴 후 수산화나트륨(1N) 100 $\mu$ l, Sample preparation buffer 400 $\mu$ l을 가합니다.

참고: 완성된 샘플 용액에는 특정 아미노산과 90nmol/ml의 노를루신이 존재합니다.  
특정 아미노산의 농도는 정량한 시료내 아미노산의 0.45% 입니다. (하단 설명 참조)  
완성된 추출물은 5°C 이하에서 3일간 보관할 수 있습니다.

## 6.3 단백질 산화 방법(공식 방법)


1. 시료 0.1~1 g(10mg 의 질소)을 정량합니다.
2. 캡마개가 있는 100ml 병에 정량된 시료를 넣고 0도씨까지 냉각합니다. 그 후, 5ml의 산화용액을 첨가합니다.
3. 작은 끓임쪽 3개를 넣고 잘 흔들어 준 뒤 파라 필름(lab film)으로 밀봉 후 0도씨에서 16시간 보관합니다.
4. 0.84g의 메타중아황산나트륨(3.1)을 첨가해 잔여 산화용액을 제거합니다.

참고 : 시료는 위 과정을 거친 후 6.7 방법으로 가수분해 됩니다.

## 6.4 단백질 산화 방법(사내 방법)

1. 시료 0.02~0.2g (질소 2mg)를 정량합니다.
2. 20ml 듀란 시험관에 시료를 넣고 0도씨까지 냉각 후 1ml의 산화용액을 첨가합니다.
3. 작은 끓임쪽 3개를 넣어 잘 흔들어 준 뒤 실험실용 호일(laboratory foil)로 밀봉한 뒤 7도의 아이스배스에서 16시간 냉각합니다.
4. 냉각 후 0.16g의 메타중아황산나트륨(3.1)을 첨가해 잔여 산화용액을 제거합니다.

참고: 시료는 위 과정을 거친 후 6.8 방법으로 가수분해 됩니다.

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	1 of 29
		Version:	1.30


## 6.5 산화되지 않은 단백질의 가수분해(공식 방법)

1. 시료 0.1~1 g 을 정량합니다.
2. 100ml의 뚜껑이 있는병에 정량한 시료를 넣고 25ml의 가수분해 용액 1(5.14)을 넣어줍니다.  
-이후 질소가스(N<sub>2</sub>)를 용액층 위에 충분히 흘려줘 산소를 제거합니다.
3. 작은 끓임쪽 3알 정도를 넣고 잘 흔들어 주고 뚜껑을 닫은 뒤 110도씨로 23시간 동안 가열 및 건조 합니다. 해당 과정에서 사용되는 병은 내열 및 내압 기능이 있어야 합니다.
4. 가수분해 후 폼후드 내에서 식게 놔둡니다.
5. 그 뒤 조심스럽게 수산화 용액 17ml을 넣어 상온에서 pH 2.2 로 맞춥니다.
6. pH가 맞춰진 가수분해물 용액은 200ml의 매스 플라스크에 옮긴 후 2ml의 I.S. 용액(5.1)을 첨가한 뒤 구연산 완충용액을 눈금까지 부어줍니다.
7. 용액 1.5ml를 소형 반응 용기에 넣은 후 10,000rpm으로 10분간 원심분리 해줍니다.
8. 상층액 1ml를 샘플병에 옮깁니다. (200nmol 의 노를루신 ISTD가 만들어집니다.)

참고: 완성된 샘플 용액에는 특정 아미노산과 200nmol/ml의 노를루신이 존재합니다.  
특정 아미노산의 농도는 정량한 시료 내 아미노산의 0.5% 입니다. (하단 설명 참조)  
완성된 추출물은 5°C 이하에서 3일간 보관할 수 있습니다.

## 6.6 산화되지 않은 단백질의 가수분해(사내 방법)

1. 시료 0.02 ~ 0.2 g 를 정량합니다.(보통 0.1g을 정량합니다.)
2. 20ml 시험관에 정량한 시료를 넣고 가수분해 용액 2(6.15)를 5ml 넣습니다.  
-이후 질소가스(N<sub>2</sub>)를 용액층 위에 충분히 흘려줘 산소를 제거합니다.
3. 작은 끓임쪽 3개를 넣고 잘 흔들어 준 뒤 시험관의 뚜껑을 닫고 110도씨에서 23시간 동안 가열건조 합니다. 해당 과정에서 사용되는 병은 내열 및 내압 기능이 있어야 합니다.
4. 가수분해가 끝난 후, 폼후드 안에서 시험관이 식도록 놔둡니다.
- 5 1.5ml 소형 반응 용기에 125 µl 을 옮긴 후 90도씨에서 진공건조 합니다.
6. 시료 희석 용액(PVP) 1ml를 소형반응용기에 가한 뒤 잘 흔들어 준 뒤 샘플병에 옮겨담습니다.

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	2 of 29
		Version:	1.30

참고: 완성된 샘플 용액에는 특정 아미노산과 100nmol/ml의 노를루신이 존재합니다.  
특정 아미노산의 농도는 정량한 시료내 아미노산의 2.5% 입니다. (하단 설명 참조)  
완성된 추출물은 5°C 이하에서 3일간 보관할 수 있습니다.

## 6.7 산화된 단백질의 가수분해(공식 방법)


1. 메타중아황산나트륨(3.1)을 이용해 잔여 산화 용액을 제거한 뒤 가수분해 용액 1(5.14) 25ml 를 첨가하고 잘 흔들어 섞어줍니다.
2. 이후 23시간 동안 110도씨에서 가열 건조 합니다.  
해당 과정에서 사용되는 병은 내열 및 내압 기능이 있어야 합니다.
3. 가수분해가 끝난 후 폼후드 내에서 식혀줍니다.
4. 그 뒤 조심스럽게 수산화 용액 17ml를 가하여 상온에서 pH를 2.2로 맞춥니다.
5. pH가 맞춰진 가수분해물 용액을 200ml 매스 플라스크에 옮긴 후 2ml 의 노를루신 용액(5.1)을 첨가하고 눈금까지 구연산 완충 용액으로 채웁니다.
6. 5번 1.5ml를 소형 반응 용기에 옮겨 10,000rpm으로 10분간 원심분리 합니다.
7. 상층액 1ml를 샘플병에 옮깁니다.

참고: 완성된 샘플 용액에는 특정 아미노산과 200nmol/ml 의 노를루신이 존재합니다.  
특정 아미노산의 농도는 정량한 시료내 특정 아미노산 총량의 0.5% 입니다. (하단 설명 참조)  
완성된 추출물은 5°C 이하에서 3일간 보관할 수 있습니다.


## 6.8 산화된 단백질의 가수분해(사내 방법)

1. 메타중아황산나트륨(3.1)을 이용해 잔여 산화 용액을 제거한 뒤 가수분해 용액 3(5.16) 4ml 를 첨가하고 잘 흔들어 섞어줍니다.
2. 밀봉 후 섭씨 110도에서 23시간 동안 건조시킵니다.  
안전상의 이유로 사용되는 용기는 내열 및 내압 용기를 사용해야 합니다.
3. 가수분해 후 폼후드 내에서 식혀줍니다.
4. 소형 반응 용기에 125 µl 옮겨 담은 후 90도에서 진공 건조 해줍니다.
5. 시료 완충 용액(PVP; Sample Dilution Buffer) 1ml을 첨가한 후 잘 섞어준 비 1.5ml 샘플병에 옮깁니다.

참고: 완성된 샘플 용액에는 특정 아미노산과 100nmol/ml 의 노를루신이 존재합니다.

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	3 of 29
		Version:	1.30

특정 아미노산의 농도는 정량한 시료내 특정 아미노산 총량의 2.5% 입니다. (하단 설명 참조)  
 완성된 추출물은 5°C 이하에서 3일간 보관할 수 있습니다.

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	4 of 29
		Version:	1.30

## 6.9 비산화물(non-oxidized)의 기본적인 가수분해 방법(사내 방법)

1. 시료를 0.02 g ~ 0.2 g (약 2mg의 질소와 함께, 보통 0.1g) 정량합니다.
2. 스크류캡이 있는 폴리프로필렌 제질의 10ml 시험관에 정량한 시료를 넣고 수산화 바륨 8수화물(barium hydroxide octahydrate) 1.6g과 2ml의 물을 넣어줍니다.
3. 작은 끓임쪽 3개를 넣고 여러번 잘 흔들어 준 뒤 시험관 가장자리에 붙은 것들을 1ml의 물로 씻어 내린 후 밀봉하여 110도씨에서 23시간 동안 건조 해줍니다.      안전상의 이유로 사용될 시험관은 내열 내압 용기를 사용해야 합니다.
4. 가수분해 후, 식을 수 있게 놔둡니다. 충분히 식은 후 따뜻한 물 5ml에 녹여줍니다.
5. 이후 중성화를 위해 2ml의 황산을 첨가하고 뚜껑을 닫은 뒤 강하게 흔들어 줍니다.
6. 상층액 1ml을 소형 반응 용기에 옮긴 후 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 해줍니다. 이후 상층액 0.5ml를 다시 1.5ml 샘플병에 옮긴 후 PVP 0.5ml를 첨가합니다.

참고: 완성된 샘플 용액에는 특정 아미노산과 200nmol/ml의 노를루신이 존재합니다.

특정 아미노산의 농도는 정량한 시료내 특정 아미노산 총량의 2.5% 입니다. (하단 설명 참조)

완성된 추출물은 5°C 이하에서 3일간 보관할 수 있습니다.

### 참고,

6.7, 6.8, 6.9 등에서 나온 참고사항에서 특정 아미노산의 농도는 다음과 같은 의미를 가집니다.

정량한 시료 M g에 특정 아미노산 A가 X mol 만큼 들어있다면 이 시료 내의 아미노산 A의 농도는  $X/M$  mol/g 이 됩니다.

하지만 시료 내에 존재하는 모든 아미노산을 추출해 낼 수 없으며 각각의 전처리 과정에서 일부 아미노산만이 최종적으로 샘플병에 담겨 주입되게 됩니다.

예를 들어 특정 아미노산의 농도는 정량한 시료 내 특정 아미노산 총량의 2.5% 인데

분석한 결과에서 특정 아미노산의 농도가 300 nmol / ml 라면 시료 내 아미노산의 총량은  $(300 * 100 / 2.5)$  mol이 된다는 것을 의미합니다.

## 사진을 통한 시료 전처리 예시(6.4 + 6.8)



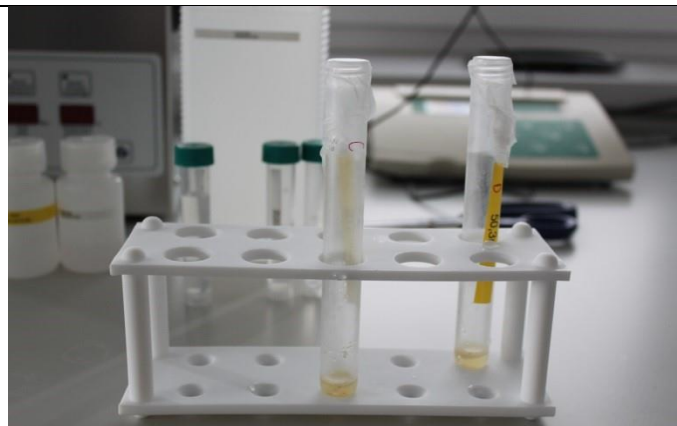
# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung

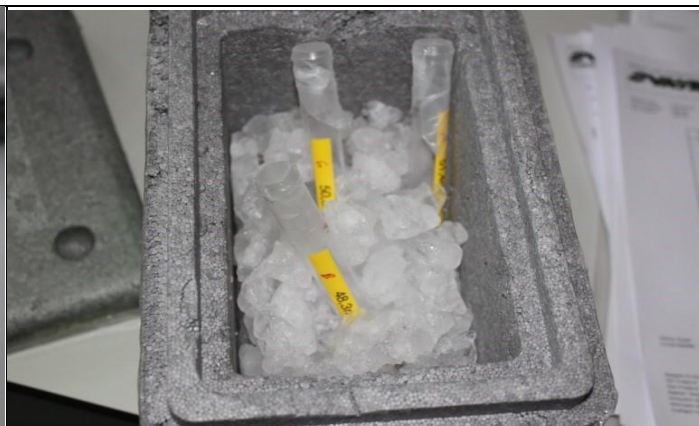


Freigabe vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

Page: 5 of 29  
Version: 1.30



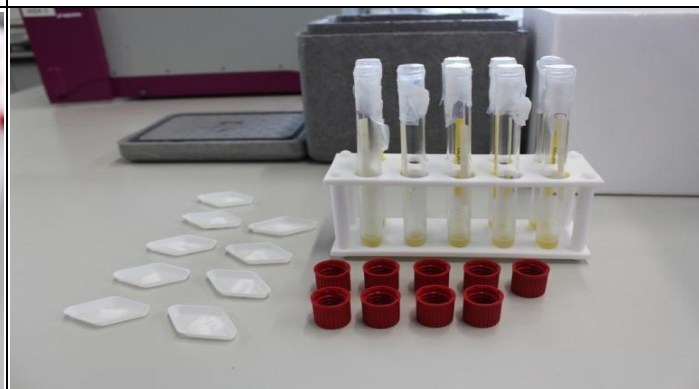
7.1 시약 50 mg 을 계량하여 넣고 차가운 상태에서 산화제 용액(5.8) 1 ml 를 혼합한 뒤 호일로 밀봉한다.



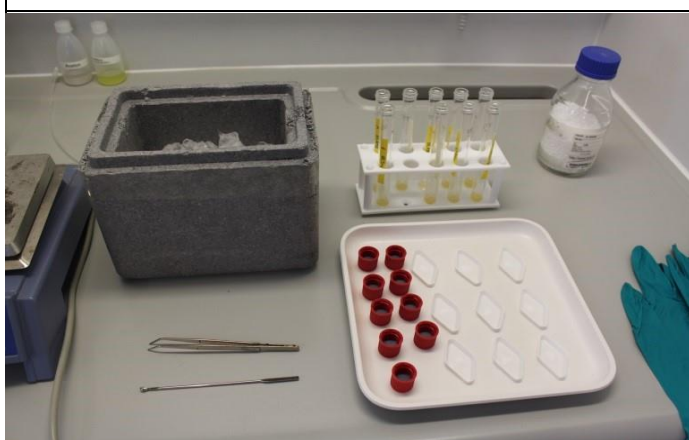
7.2 약 15~20 시간 얼음에 보관한다.  
얼음의 양은 스티로폼 용기에 가득 채우는 정도면 충분하다.



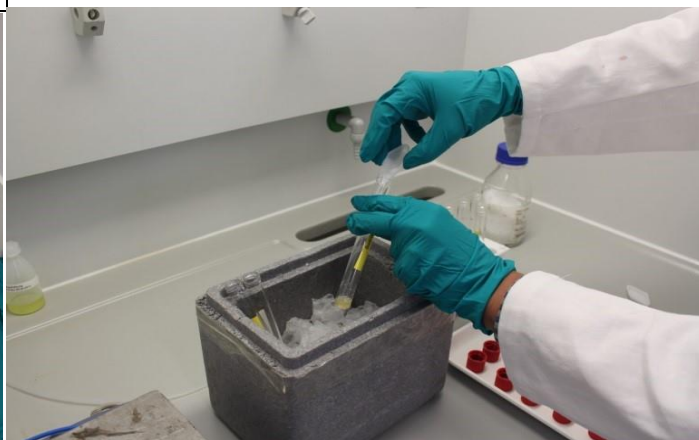
7.3 시약을 짧게 흔들어주고 상온에 둔다.



7.4 메타중아황산나트륨 160 mg 를 준비한다.



7.5 조심스럽게 반응 용기(Reaction vessels)를 연다.



7.6 메타중아황산나트륨을 이용하여 잔여 산화 용액을 제거한다.

last save by (initials): khj

filename: Technik \ QM \ SOP \ Probenvorbereitung \ PVP-ASA-15-2-HYD1\_3.docx

SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH

[Info@sykam.de](mailto:Info@sykam.de)

++49 (0)8141 150 420



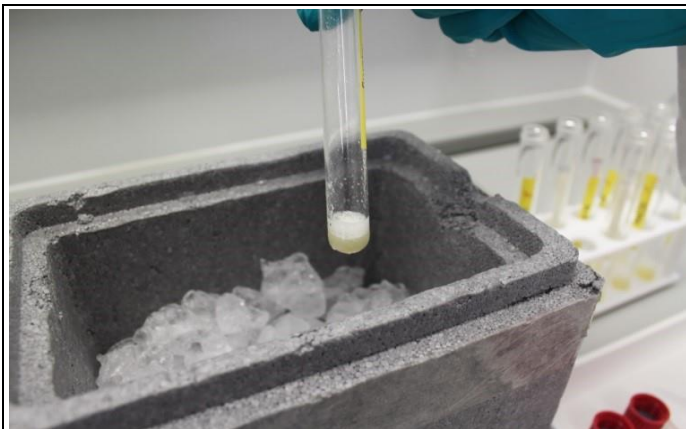
# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung



Freigabe vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

Page: 6 of 29  
Version: 1.30



7.7 가볍게 흔들어  
잔여 산화 용액( $H_2O_2$ )가 제거되도록 한다.



7.8 가수분해 용액 3(5.16) 4 ml 를 준비한다.



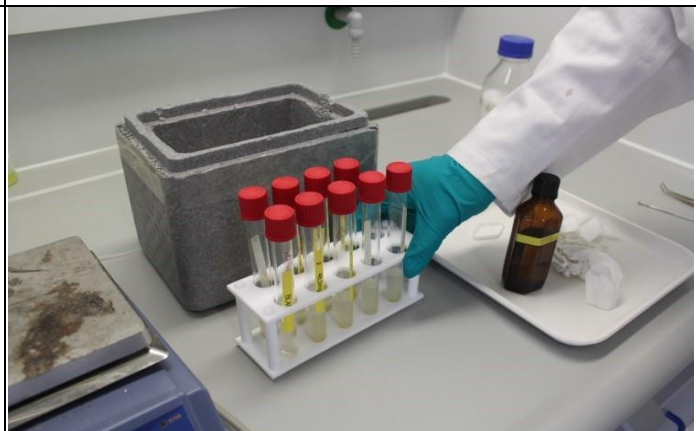
7.9 가수분해 용액이 둥근 벽면을  
통해 흐르도록 한다.



7.10 반응용기(Reaction vessels)를  
가볍게 흔들어준다.



7.11 10 분 후 용기를 밀봉한다.



7.12 반응용기(Reaction vessels)를  
정상 온도가 될 때까지 랙에 보관한다.

last save by (initials): khj

filename: Technik \ QM \ SOP \ Probenvorbereitung \ PVP-ASA-15-2-HYD1\_3.docx

SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH

[Info@sykam.de](mailto:Info@sykam.de)

++49 (0)8141 150 420





# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung



Freigabe vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

Page: 7 of 29  
Version: 1.30



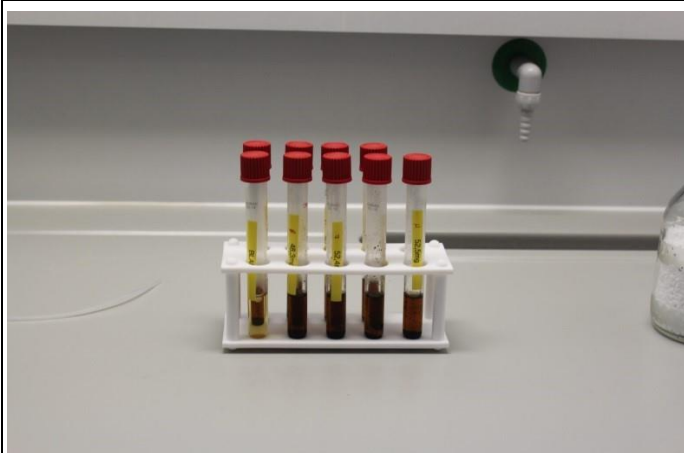
7.13 반응용기(Reaction vessels)를 건조기에 넣는다.



7.14 110 °C 에서 24 시간 보관한다.



7.15 24 시간뒤 조심스럽게 건조기에서 꺼낸다.



7.16 시료를 냉각시킨다(약 30 분 정도).



7.17 조심해서 용기를 연다.

last save by (initials): khj

filename: Technik \ QM \ SOP \ Probenvorbereitung \ PVP-ASA-15-2-HYD1\_3.d o cx

SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH

[Info@sykam.de](mailto:Info@sykam.de)

++49 (0)8141 150 420



# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung



Freigabe vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

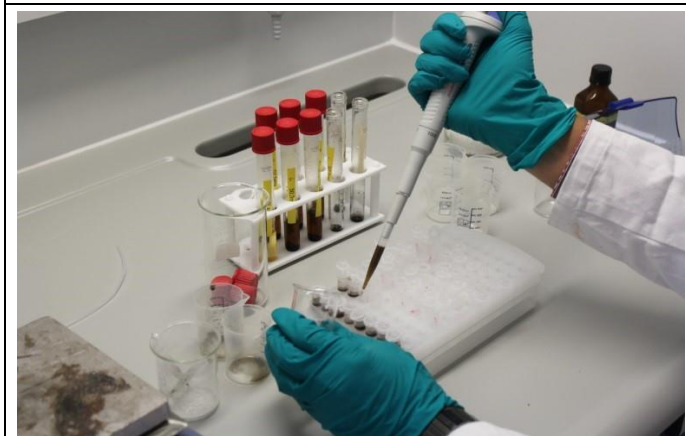
Page: 8 of 29  
Version: 1.30



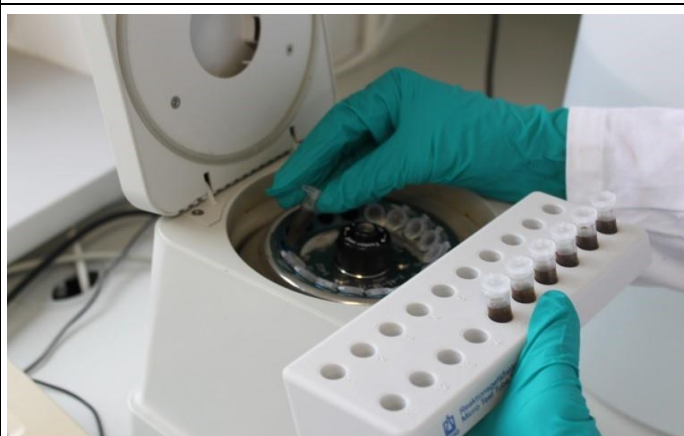
7.18 50ml 비커에 옮겨 담는다.



7.19 2ml Eppi-cap 2 개에 피펫으로 2ml 씩 넣는다.



7.20 첫번째 2 ml 를 예비 표본으로 이용한다.



7.21 두번째 Eppi-cap 을 원심분리기에 넣는다.



7.22 14000U/min, 30 분으로 설정한다.



7.23 캡을 열어 상층액 250μl 를 추출한다.

last save by (initials): khj

filename: Technik \ QM \ SOP \ Probenvorbereitung \ PVP-ASA-15-2-HYD1\_3.docx

SYKAM Chromatographie Vertrieb GmbH

[Info@sykam.de](mailto:Info@sykam.de)

++49 (0)8141 150 420





# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung

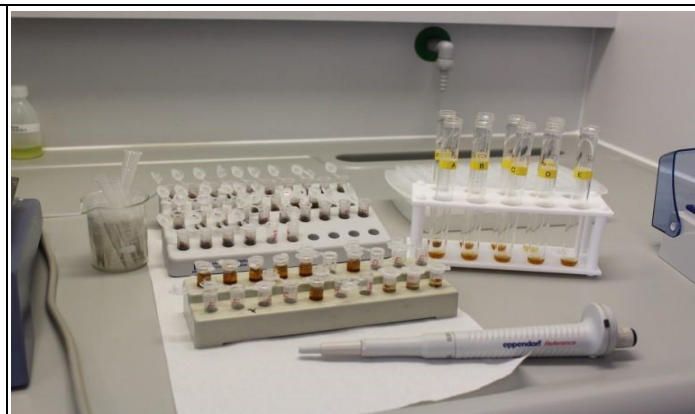


Freigabe vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

Page: 9 of 29  
Version: 1.30



7.24 조심스레 반응 용기에 옮겨 담는다.



7.25 반응용기에 흡입기를 연결한다.



7.26 유리용기들이 단단히 고정되게 주의한다.



7.27 약한 진공상태를 만든다.  
(0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 가스 세척병)



7.28 115°C 로 가열한다.

# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung



Freigabe vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

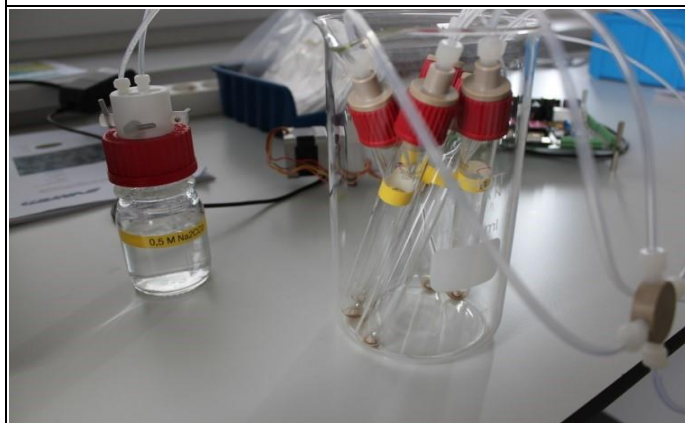
Page: 10 of 29  
Version: 1.30



7.29 조심스럽게 산을 증류시킨다.



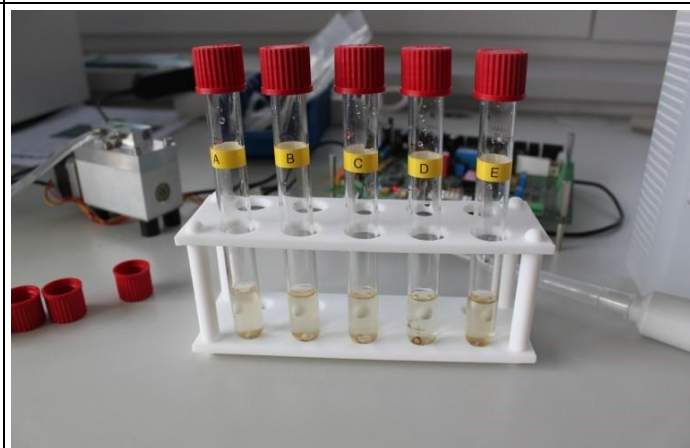
7.30 60 분 후 바닥에 침전물이 생긴다.



7.31 건조기에서 용기를 꺼낸 뒤  
15 분 동안 냉각시킨다.



7.32 시료 희석용액을 2ml 넣는다.



7.33 밀봉 시킨 뒤 세게 흔들어준다.



# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung

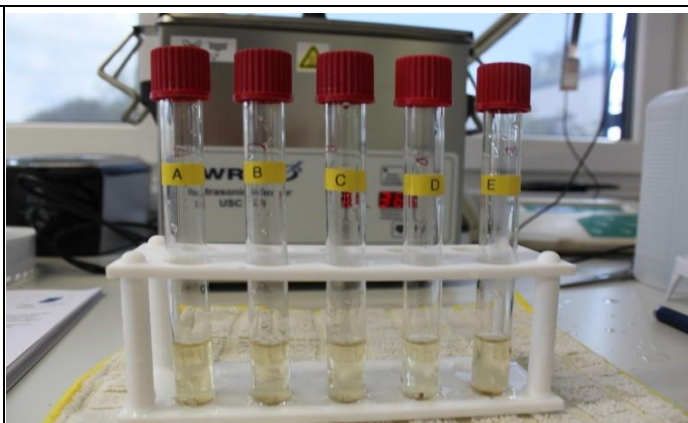


Freigabe vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

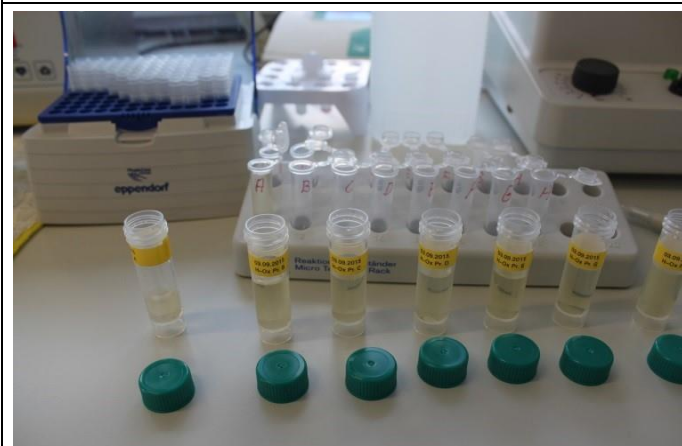
Page: 11 of 29  
Version: 1.30



7.34 2 x 10 분 동안 초음파 세척기에 넣고 강하게 흔들어준다.



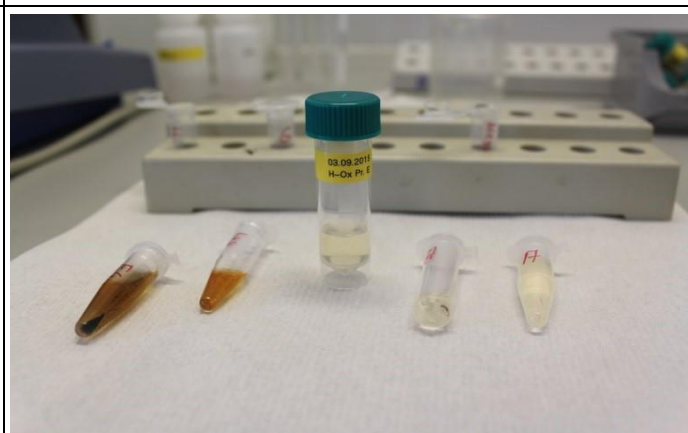
7.35 가능하면 벽면에 방울이 없도록 용기를 살짝 두드려준다.



7.36 Eppi-Caps 에 2ml 씩 옮겨 담는다.



7.37 30 분, 1400U/min 으로 원심 분리한다.



7.8 상층액 1ml 를 Injection vial 에 넣는다.

last save by (initials): khj


filename: Technik \ QM \ SOP \ Probenvorbereitung \ PVP-ASA-15-2-HYD1\_3.d o cx

SYKAM Chromatographie Vertriebs GmbH

[info@sykam.de](mailto:info@sykam.de)

++49 (0)8141 150 420



<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	12 of 29
		Version:	1.30

## 8. 분석조건:


분석은 기본적으로 SYKAM 사의 아미노산 분석기 시리즈인 S433 혹은 S633을 이용합니다.

가수분해물 분석, 생리물질 분석에는 각각 알맞은 컬럼 종류가 존재합니다.

가수분해물 분석에는 Na-type의 컬럼을, 생리물질 분석에는 Li-type의 컬럼을 사용해야 합니다.

**분석 종류와 다른 타입(Li-type)의 컬럼을 장착 한다면 컬럼에 비가역적인 피해를 줄 수 있습니다.**

보다 자세한 분석 조건 및 기계 운용법은 (주) 아주과학에서 배포한 아미노산 분석 장비 가이드를 참고하십시오.

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	13 of 29
		Version:	1.30

## 9. 참고문헌

- 

Sicherheitsdatenblätter SYKAM AS-Puffer und Reagenzien

VDLUFA-Verbandsmethode 4.11.1 Aminosäuren

AOAC Official Method 994.11 Amino Acids in FEED

Amtsblatt der Europäischen Union veröffentlichte Verordnung (EG) Nr.152/2009

ERNDIM : EU BIOMED 2-project, BMH4-98-3404 „RECOMMENDATIONS TO IMPROVE THE QUALITY OF DIAGNOSTIC QUANTITATIVE ANALYSIS OF AMINO ACIDS IN PLASMA AND URINE USING CATION-EXCHANGE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH POST COLUMN NINHYDRIN REACTION AND DETECTION“

Protein Purification. 1994. Robert K. Scopes. 3th edition. Springer-Verlag, New York

Methods in Enzymology. Vol. 182. Guide to protein purification. 1990. ed: Murray P. Deutscher. Academic Press San Diego

EUROPEAN PHARMACOPEIA 8.0, AMINO ACID ANALYSIS 01/2010:20256

# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung



Freigabe  
vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

Page: 14 of 29  
Version: 1.30

## 10. History

Revision	Datum	Änderung
00	04.12.2012	Neuerstellung SOP Vorlage
1.1	12.05.2014	Neuerstellung SOP Vorlage Aminosäurenanalytik Ph.Eur
1.2	19.11.2014	Neuerstellung SOP Vorlage Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung
1.3	10.08.2015	Neuerstellung SOP PVP-ASA-15/1-SSA



# Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT

## Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung



Freigabe  
vom: PVP-ASA-15/2-HYD  
Hydrolyse von Proteinen

Page: 15 of 29  
Version: 1.30

## 7 Genehmigungskprotokoll

7.1 Erstellt/ bearbeitet:

K.-H. Jansen/GF

Datum	Änderung/Weitergabe
13.08.2015	Neuerstellung
21.08.2015	Weitergabe zur formalen Überprüfung

7.2 Formale Überprüfung:

M.Jansen /IL

Datum	Änderung/Weitergabe
21.08.2015	Formale Überprüfung V. 1.3
27.08.2015	Weitergabe zur fachlichen - + QS - Überprüfung

7.3 Fachliche Überprüfung:

M.Hornung / TS

Datum	Änderung/Weitergabe
27.08.2015	Fachliche Überprüfung V. 1.3
	Weitergabe zur QS - Überprüfung

7.4 QS-Überprüfung + Freigabe:

Dr. M. Lappé/ LQS

Datum	Änderung/Weitergabe
27.08.2015	QS Überprüfung V. 1.3
	Weitergabe zur Prüfung auf Aktualität
	QS-Freigabe V.1.3
	Weitergabe V 1.3 zur Doku Freigabe

7.5 Doku-Freigabe:


M.Jansen /IL

Datum	Änderung/Weitergabe
	Löschung des Draft-Verfahrens, Doku Freigabe und Veröffentlichung Version 1.3

7.6 Prüfung auf Aktualität:

K.-H. Jansen/GF

Datum	Änderung/Weitergabe
	Prüfung auf Aktualität V. 1.3
	Weitergabe zur QS - Freigabe

<b>Standard Operating Procedure (SOP) DRAFT</b> <b>Aminosäurenanalytik Probenvorbereitung</b>			
Freigabe vom:	PVP-ASA-15/2-HYD Hydrolyse von Proteinen	Page:	16 of 29
		Version:	1.30

