

# SYKAM 자동 아미노산 분석기를 이용한 이소데스모신/데스모신 분석법 Determination of Isodesmosine/Desmosine by Sykam Amion Acid Analyzer

By Ajoo Scientifics

Application Note AN-04



## 서문

이소데스모신(Isodesmosine)과 데스모신(desmosine)은 엘라스틴에만 존재하는 아미노산으로써 엘라스틴 단백질의 지표로 활용되는 대표적인 아미노산입니다.

최근 들어 혈관 질환 및 피부 노화 예방 및 탄력 개선에 도움이 된다는 것이 밝혀져 주목받고 있는 대표적인 미용 목적 아미노산입니다.

이소데스모신과 데스모신의 경우 엘라스틴 내에서 서로 얽혀있는 Cross-Link 구조며 이성질체 관계이기 때문에 분리와 검출에 어려움이 있습니다.

이소데스모신과 데스모신의 정성 및 정량 분석법 중 하나는 자동 아미노산 분석기를 활용한 아미노산 분석이 있습니다. 하지만 오르니틴과 카르노신과 비슷한 시간대에 용리 돼 분석에 매우 큰 어려움이 있습니다. 이러한 분석법적 어려움은 Sykam 자동 아미노산 분석기와 동시에 세밀한 분석법 조정을 통해 뛰어난 분리를 제공하며 이에 따라 이소데스모신/데스모신 분석은 사용자에게 높은 분석 재현성, 낮은 검출 한계 그리고 뛰어난 분리도를 통해 높은 분석 신뢰도를 제공합니다.

본 문서는 Sykam 자동 아미노산 분석기 S433 시스템과 Sykam LCA K07/Li (150 \* 4.6 mm) 컬럼을 이용해 이소데스모신 데스모신 분석 그리고 더 나아가 35종 유리 아미노산과 이소데스모신 및 데스모신의 동시 분석법에 대한 가이드라인을 제시합니다.

## 장비

본 어플리케이션 노트는 Sykam S433 장비 사용을 기반으로 두고 있지만 Sykam S436, S437 혹은 S633 등의 동격의 장비로 대체될 수 있습니다. 이때 아미노산의 함량 보존을 위해 시료 냉각 기능 사용이 권장됩니다.

| 종류       | 이름                               |
|----------|----------------------------------|
| 이동상 펌프   | S2100 Solvent Delivery System    |
| 시료 주입 장치 | S5200 AutoSampler                |
| 반응 모듈    | S4300 Amino Reaction Module      |
| 시약 보관 장치 | S7130 Reagent Organizer          |
| 컬럼 1     | LCA K05/Li Ammonia Filter Column |
| 컬럼 2     | LCA K07/Li Separation Column     |

## 시약 및 표준품

아미노산 분석기에 사용되는 이동상 및 반응액 그리고 표준품은 모두 구매 후 사용하시는 것을 강력하게 권장합니다. 이는 제조 과정 중 발생할 수 있는 오차 그리고 표준품의 바탕액 차이에 따른 오차를 최소화하고 품질을 보증하기 위함입니다.

| 종류    | 제품 번호     | 제품명                       |
|-------|-----------|---------------------------|
| 이동상 1 | 60 01 012 | Citrate Buffer A-1/Li     |
| 이동상 2 | 60 01 013 | Citrate Buffer B-1/Li     |
| 이동상 3 | 60 01 014 | Citrate Buffer C-4/Li     |
| 이동상 4 | 60 01 011 | Regeneration Solution/Li  |
| 희석액   | 60 01 015 | Sample Dilution Buffer/Li |
| 반응액   | 60 01 002 | Ninhydrin Reagent         |

모든 이동상은 개봉 후 즉시 사용됐으며 닌하이드린 반응 용액의 경우 사용 직전에 동봉된 환원제(Reducing Agent)를 첨가해 활성화했습니다.

분석에 사용된 표준품은 총 세가지며 다음과 같습니다.

| 종류     | 제품 번호    | 제품명                                       |
|--------|----------|---|
| 표준품 1  | S000031  | AA Std Solution Type PH                   |
| 이소데스모신 | I815051  | IsoDesmosine Chloride x 2H <sub>2</sub> O |
| 데스모신   | 991-01-5 | Desmosine Chloride                        |

이소데스모신/데스모신은 Toronto-Research-Chemicals에서 공급받았습니다.

모든 표준품의 희석은 시료 희석 용액인 Sample Dilution Buffer에 희석했습니다. 이는 시료의 변성을 예방하며 시료 바탕액의 pH를 일정하게 유지해 pH 변동으로 인한 피크 왜곡과 머무름 시간이 흔들리는 것을 방지합니다.

35종 유리 아미노산 표준품(S000031)은 200 nmol/ml 농도로 희석됐으며 이소데스모신 데스모신은 각 1mg/50 mL, 1.37 mg/50 mL로 희석됐으며 총 세가지 표준품은 각 2:1:1로 최종 혼합했습니다.

사용 후 남은 용액은 모두 영하 -40 도씨 냉동고에서 냉동 보관했습니다.

자동 아미노산 분석기 S433와 그에 맞는 컬럼은 적합한 절차에 맞게 안정화해야 합니다. 이에 대한 자세한 방법은 “아미노산 분석기 사용 설명서”를 참고합니다.

## 크로마토그래피 조건

분석 조건은 기존 표준 유리 아미노산 분석법에서 후반부 그라디언트와 온도가 일부 수정됐으며 세부 항목은 다음과 같습니다.

| 항목         | 조건                                     |
|------------|--|
| 암모니아 필터 컬럼 | LCA K05/Li                             |
| 아미노산 분리 컬럼 | LCA K07/Li                             |
| 이동상        | Citrate Buffer Li A-1/B-1/C-4/Reg.Sol. |
| 유속         | 0.450 ml/min                           |
| 반응액        | Ninhydrin Reagent                      |
| 유속         | 0.300 ml/min                           |
| 반응로 온도     | 130 °C                                 |
| 주입량        | 50 µL                                  |
| 샘플 온도      | 10 °C                                  |
| 검출         | 570/440 nm 흡광도 검출                      |

이동상 및 컬럼 온도 조건은 다음과 같습니다.

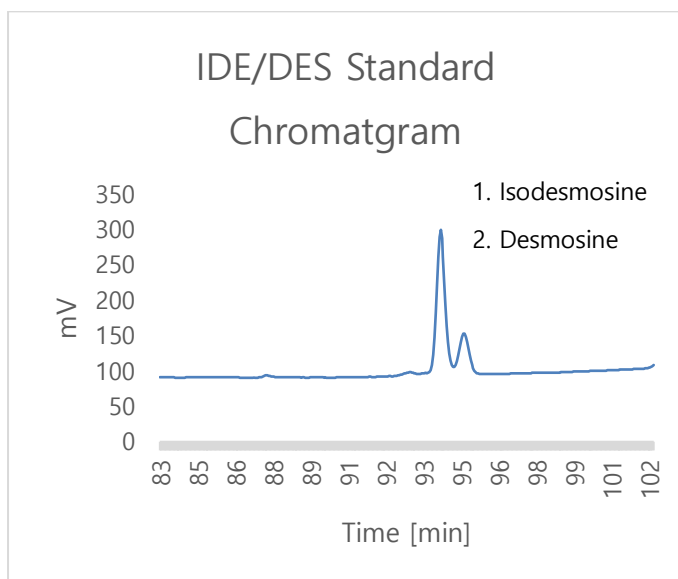
| 시간      | A-1   | B-1   | C-4   | Reg. Sol. |
|---------|-------|-------|-------|-----------|
| Initial | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 0.0       |
| 8.00    | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 0.0       |
| 8.10    | 76.0  | 24.0  | 0.0   | 0.0       |
| 36.00   | 76.0  | 24.0  | 0.0   | 0.0       |
| 36.10   | 55.0  | 45.0  | 0.0   | 0.0       |
| 53.00   | 55.0  | 45.0  | 0.0   | 0.0       |
| 53.10   | 30.0  | 70.0  | 0.0   | 0.0       |
| 64.00   | 30.0  | 70.0  | 0.0   | 0.0       |
| 64.10   | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 0.0       |
| 68.00   | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 0.0       |
| 68.10   | 0.0   | 76.0  | 24.0  | 0.0       |
| 75.00   | 0.0   | 76.0  | 24.0  | 0.0       |
| 75.10   | 0.0   | 0.0   | 100.0 | 0.0       |
| 83.00   | 0.0   | 0.0   | 100.0 | 0.0       |
| 83.10   | 0.0   | 0.0   | 93.0  | 7.0       |
| 88.00   | 0.0   | 0.0   | 93.0  | 7.0       |
| 88.10   | 0.0   | 0.0   | 82.0  | 18.0      |
| 99.00   | 0.0   | 0.0   | 82.0  | 18.0      |
| 99.10   | 0.0   | 0.0   | 75.0  | 25.0      |
| 110.00  | 0.0   | 0.0   | 75.0  | 25.0      |
| 110.10  | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 100.0     |
| 114.00  | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 100.0     |
| 114.10  | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 0.0       |
| 139.00  | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 0.0       |

온도 조건은 다음과 같습니다.

| 시간      | 온도(°C) |
|---------|--------|
| Initial | 39     |
| 30.0    | 39     |
| 31.0    | 35     |
| 50.0    | 35     |
| 51.0    | 46     |
| 84.0    | 46     |
| 85.0    | 76     |
| 115.0   | 76     |
| 116.0   | 39     |
| 135.0   | 39     |

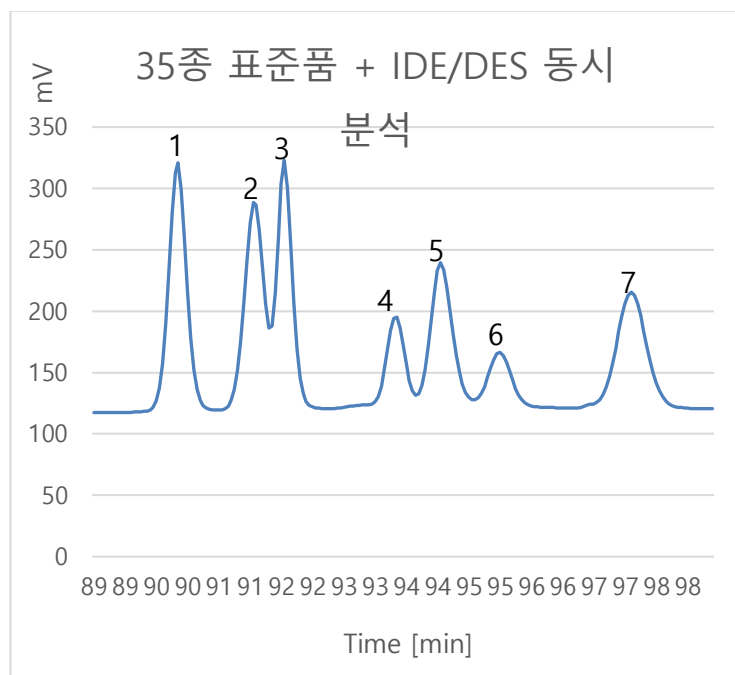
## 크로마토그램

이소데스모신과 데스모신 표준품 크로마토그램은 다음과 같습니다.



이소데스모신, 데스모신 모두 91~96분 사이에서 분리되었습니다. 하지만 서문에서 언급된 바 이소데스모신과 데스모신은 오르니틴 및 카르노진과 머무름 시간이 비슷해 분석에 어려움이 있으며 이에 따라 세밀한 온도와 그래디언트 테이블 조정이 필요합니다.

다음은 35종 표준품과 이소데스모신 데스모신의 동시 분석 결과입니다.



| 번호 | 물질명           | 분리도     |
|----|---------------|---------|
| 1  | Histidine     | > 2.500 |
| 2  | 1-M-His       | 2.216   |
| 3  | 3-M-His       | 1.103   |
| 4  | Carnosine     | 3.611   |
| 5  | Iso-Desmosine | 1.236   |
| 6  | Desmosine     | 1.426   |
| 7  | Ornithine     | 2.702   |

1,3 Methyl Histidine의 경우 그래디언트 타이밍을 조절해 분리도를 향상할 수 있습니다.

보다 향상된 Isodesmosine/Desmosine 분리도를 위해선 다음과 같은 방법을 사용할 수 있습니다.

1. LCA K14/Li (200 \* 4.6 mm) 컬럼 사용
2. C-4/Reg.Sol. 그래디언트 타이밍 조절
3. 컬럼 오븐 온도 조절

하지만 위와 같은 방법은 분석 시간이 길어지게 되며 분리 조절이 예민해진다는 단점을 가지고 있습니다.

다음은 실제 분석 크로마토그램입니다.

