

SYKAM 자동 아미노산 분석기를 이용한 이소데스모신/데스모신 분석법 Determination of Isodesmosine/Desmosine by Sykam Amino 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.

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 얽혀 있는 가교 결합된 구조이며 이성질체 관계이기 때문에 분리와 검출에 어려움이 있습니다.

고전적인 이소데스모신과 데스모신의 정성 및 정량 분석법 중 하나는 HPLC와 OPA 유도체화법을 활용한 아미노산 분석이 있습니다. 하지만 HPLC와 OPA를 이용한 컬럼 전 유도체화 방법은 아미노산의 다양한 분리와 분석 자체의 재현성에 문제가 발생할 수 있습니다.

반면 Sykam 자동 아미노산 분석기는 세밀한 분석법 조정을 통해 뛰어난 분리와 뛰어난 재현성을 제공합니다. 자동 아미노산 분석기와 함께 사용된 LCA K07/Li 컬럼은 뛰어난 분리능을 통해 45개 이상의 아미노산을 동시 분리할 수 있습니다.

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 있으며 Sykam S436, S437 혹은 S633 등의 동등한 장비로 대체될 수 있습니다.

이때 아미노산의 함량 보존을 위해 시료 항온 기능 사용이 추천됩니다.

종류	이름
이동상 펌프	S2100 Solvent Delivery System
반응액 펌프	S4300 Amino Reaction Module
시료 주입 장치	S5200 Autosampler
시약 보관 장치	S7130 Reagent Organizer
암모니아 컬럼	LCA K05/Li Ammonia Filter Column
분리 컬럼	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 위한 목적입니다.

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

크로마토그래피 조건

모든 이동상은 개봉 후 즉시 사용됐으며 난하이드린 반응 용액의 경우 사용 직전에 동봉된 환원제를 첨가해 활성화했습니다.

분석에 사용된 표준품은 세 가지며 다음과 같습니다.

종류	제품 번호	제품명
표준품 1	S000031	AA Std Solution Type PH
이소데스모신	I815051	IsoDesmosine Chlroide X 2H2O
데스모신	991-01-5	Desmosine Chloride

모든 표준품의 희석은 시료 희석 용액인 Sample Dilution Buffer/Li에 희석됐습니다. 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 혼합됐습니다.

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

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

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

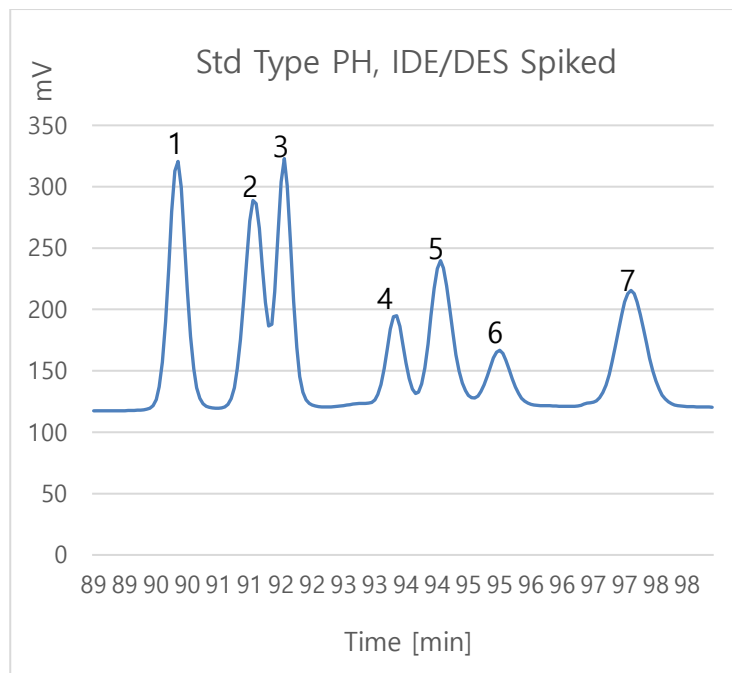
항목	조건
암모니아 필터 컬럼	LCA K05/Li
아미노산 분리 컬럼	LCA K07/Li
이동상	Citrate Buffer Li A-1/B-1/C-4/Reg.Sol.
유속	0.450 ml/min
반응액	Ninhydrin Reagent
유속	0.300 ml/min
반응로 온도	130 °C
주입량	50 µL
샘플 온도	10 °C
검출	570/440 nm 흡광도 검출

이동상 및 컬럼 온도 조건은 다음과 같습니다.

시간	A-1/Li	B-1/Li	C-4/Li	Reg. Sol./Li
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
91.00	0.0	0.0	93.0	7.0
91.10	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

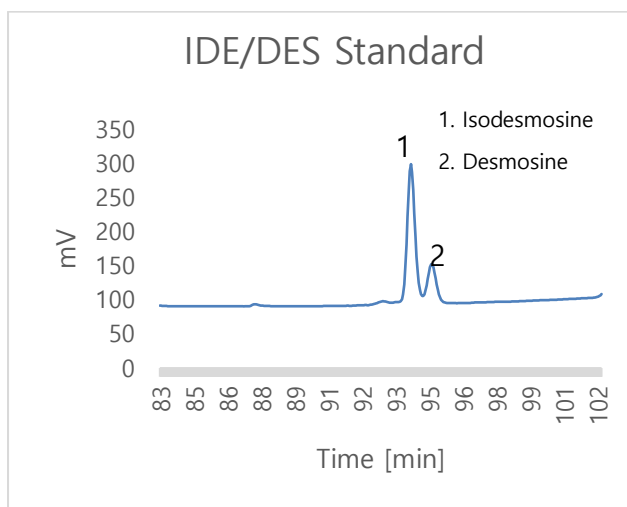
온도 조건은 다음과 같습니다.

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.



번호	물질명	분리도
1	Histidine	> 2.500
2	1-M-His	2.211
3	3-M-His	1.427
4	Carnosine	> 2.500
5	Iso-Desmosine	2.254
6	Desmosine	1.575
7	Tryptophan	1.923

이소데스모신과 데스모신은 C&D 그래디언트 조건에 의해 분리되며 일반적으로 첫번째 93:7 비율의 그래디언트 조건에서 분리되는 것이 최적화된 분리 건입니다.

기존 유리 아미노산 분리 그래디언트에서 100% C는 Histidine과 1-M-Histidine을 분리하며 첫번째 C&D 93:7 비율의 그래디언트는 3-M-Histidine과 Carnosine을 분리하며 이후 두번째 C&D 그래디언트가 적용됩니다.

이소데스모신과 데스모신 분리를 위해 첫번째 C&D 그래디언트 시간을 연장하여 이소데스모신과 데스모신의 분리 시간 여유를 줍니다. 또한 컬럼 오븐 온도의 증가를 통해 카르노진과 이소데스모신 사이의 거리를 확보할 수 있습니다.

다음은 실제 분석으로 얻어진 크로마토그램입니다.

