

SYKAM 자동 아미노산 분석기를 이용한 찻잎 내 테아닌 분석법 Determination of Theanine in tea leaves with Sykam Amino Acid Analyzer

서문

L-테아닌(L-Theanine)은 글루타민의 유도체 아미노산 중 하나로써 녹차, 홍차 및 말차 등 주로 찻잎 내에서 발견되는 아미노산입니다. 테아닌은 긴장 완화 및 이완 효과로 스트레스를 줄이는 신경 안정 물질로 잘 알려져 있습니다.

이렇듯 신경 안정 효과로 잘 알려진 테아닌은 보통 찻잎 등에서 추출할 수 있습니다. 따라서 찻잎 내 테아닌 함량 분석은 매우 중요한 품질 관리 요소 중 하나로 부상하고 있는데, 테아닌은 글루타민의 유도체기 때문에 이에 맞는 적합한 시료 전처리와 함께 정밀한 유리 아미노산 분석이 요구됩니다.

유리 아미노산 분석에서 가장 어려운 항목은 글루타민과 글루탐산의 분리 및 정량입니다. 글루타민은 낮은 pH 조건에서 글루탐산으로 천천히 변성되며 일반적으로 일주일 내에 산성 용액 내 대부분의 글루타민이 글루탐산으로 변합니다. 또한 테아닌은 글루타민과 알파-아미노아디프산(α -amino adipic Acid) 사이에 분리되기 때문에 높은 분리도와 선택성이 요구됩니다.

유리 아미노산 분석 중 글루탐산은 온도에 매우 민감한 아미노산입니다. 단순히 컬럼 온도뿐만 아니라 실내 온도, 이동상 보관 온도까지 영향을 줄 수 있습니다.

Sykam 자동 아미노산 분석기의 S7130 이동상 보관 장치는 설정된 온도와 습도를 유지해 항상 일정한 이동상 온도를 제공합니다. 이를 통해 분석법적으로 매우 일정한 유리 아미노산 분석 조건을 제공하고, 이는 글루탐산의 일정한 머무름 시간을 가능케 합니다. 또한 유리 아미노산 분리 컬럼 LCA K07/Li는 매우 뛰어난 분리도에 기반해 50종 이상의 아미노산 분리를 제공합니다. 본 어플리케이션 노트에서는 35종 표준 유리 아미노산과 테아닌의 동시 분석 더 나아가 글루탐산, 글루타민 및 테아닌의 동시 분석 방법을 제시합니다.

분석 장비

본 어플리케이션 노트에서 사용된 자동 아미노산 분석 시스템은 Sykam S633의 유리 아미노산 분석 시스템을 사용합니다.

종류	이름
펌프 시스템	S 633P Dual Pump System
시료 주입 장치	S 633A Auto Sampler
반응 장치	S 633R Reactor
시약보관장치	S 7130 Reagent Organizer
분리 컬럼	LCA K07/Li Separation Column
암모니아 필터 컬럼	LCA K05/Li Ammonia Filter Column

시약 및 표준품

아미노산 분리 이동상 및 유도체화 시약은 (주)아주과학의 제품이 사용되었습니다. 침전제 5-SuLfosalicic Acid(CAS No.: 5965-83-3)은 Merck에서 구입했습니다. 사용된 이동상 종류와 제품 번호는 하기 표와 같습니다.

종류	제품 번호	제품명
이동상 1	60 01 012	Lithium Citrate Buffer A-1
이동상 2	60 01 013	Lithium Citrate Buffer B-1
이동상 3	60 01 014	Lithium Citrate Buffer C-4
이동상 4	60 01 011	Regeneration Solution/Li
희석액	60 01 015	Sample Dilution Buffer/Li
반응액	60 01 002	Ninhydrin Reagent
침전제	247006	5-SuLfosalicic Acid dihydrate

아미노산 표준품은 Sykam GmbH 제품이 사용되었으며 테아닌 및 글루타민 표준품은 Merck제품을 사용했습니다. 각 제품의 제품 번호는 다음과 같습니다.

종류	제품 번호	공급처
유리 아미노산 표준품 PH	S000031	Sykam GmbH
L-Theanine	SMB00395	Merck
L-Glutamine	G3126	Merck



표준 용액 및 시료 준비

먼저 테아닌은 저울로 17.4 mg을 정량해 SDB/Li (Cat. No.: 60 01 015) 희석액 100 mL에 희석했습니다.

글루타민은 14.6 mg을 3차 증류수 100 mL에 희석했습니다. 글루타민을 3차 증류수에 녹이는 것은 글루타민의 글루탐산으로의 탈아미드화 반응을 늦추기 위함입니다. 준비한 두 용액을 표준 원액이라고 하며 각 1 μ M 농도입니다.

Class A 등급의 10 mL 볼륨 플라스크에 SDB/Li 용액 5 mL를 넣은 후 테아닌, 글루타민 표준 원액을 각 1 mL 정확하게 취해 넣습니다. 이후 유리 아미노산 표준품 Type PH를 개봉해 1 mL를 넣습니다. 플라스크 눈금에 맞게 시료 희석용액을 넣은 뒤 잘 섞어줍니다. 이렇게 준비된 용액은 Urea를 제외한 각 아미노산이 100 nmol/mL 농도로 존재합니다.

준비한 100 nmol/mL 혼합 표준액을 통해 10, 20, 50 nmol/mL 농도의 표준액을 추가로 조제합니다. 모든 표준 용액은 SDB/Li를 통해 희석합니다.

시료의 전처리에는 일반적인 유리 아미노산 전처리 방법이 적용되었습니다. 먼저 시료 내 단백질 및 폴리펩타이드 침전을 위한 침전 시약을 제조합니다. 초순수 20 mL에 5-Sulfosalicylic Acid dihydrate 2.33 g 녹인 용액을 침전 시약으로 사용했습니다.

분석용 시료는 시판의 건조 찻잎 2 종류를 준비했습니다. 찻잎을 0.5 mm 이하의 크기로 잘게 자른 후 100 mg을 정량하여 50°C의 초순수 10 mL에 넣어 약 30분간 진탕합니다. 진탕한 용액은 냉장고에 약 30분간 식힙니다. 이후 용액 800 μ L를 원심분리 튜브에 담은 후 침전 시약 200 μ L를 첨가한 뒤 10분간 볼텍스 믹서로 잘 섞어 줍니다. 이 용액은 다시 냉장고에서 30분 간 식힌 후 13,500 RPM에 20분 간 원심 분리합니다.

원심 분리된 용액의 상층액 250 μ L를 취해 750 μ L의 SDB/Li에 녹였습니다. 이 용액을 잘 흔들어 섞은 뒤 다시 SDB/Li를 통해 4배 희석하였습니다.

준비된 시료는 분석 후 4°C 냉장고에서 4주 방치 후 다시 분석했습니다. 이는 시간에 따른 글루타민 및 아스파라긴의 함량 변화를 관찰하기 위함입니다.

아미노산 분석 시스템 준비 및 안정화

정확한 아미노산 분석 결과를 얻기 위해선 반드시 아미노산 분석기의 적합한 안정화 과정이 요구됩니다. 만약 기존 사용하고 남은 용액과 새로운 용액을 혼합하는 경우 혼합이 서서히 일어나 분석 시퀀스 동안 미세한 조건 변화가 발생해 분석 결과의 신뢰도를 떨어뜨립니다. 따라서 기존 용액은 비워낸 뒤 새로운 용액을 개봉해 준비합니다.

이때, 염기성 용액인 C-4/Li 용액과 Regeneration Solution의 경우 공기 중 이산화탄소화 반응해 탄산을 형성할 수 있으며 이는 각 용액의 분리력 저하를 유발할 수 있습니다. 따라서 개봉된 C-4/Li 및 Reg. Sol.은 3주 이상 사용하지 않는 것이 권장됩니다.

닌하이드린 반응액의 경우 반응액 1L를 넣은 뒤 제공된 1 mL 활성액을 첨가한 뒤 약 2분간 질소 가스 퍼징(혹은 Sparging)을 통해 잔존 산소를 제거합니다. 이후 각 용액은 최소 10 mL 이상 충분히 빼냅니다.

이후 장비 안정화는 사용자 매뉴얼인 아미노산 분석기 사용 가이드에 따라 적합한 절차로 준비합니다. 이때, 반드시 S7130 시약 보관 장치의 전원을 켜 이동상의 온도를 일정하게 유지시킵니다. 시약 보관 장치를 처음 켜면 이동상 온도가 변하는데 시간이 다소 소요될 수 있습니다. 설정된 온도 차가 5도 이내라면 약 1~2 회의 분석 동안 글루타민의 머무름 시간이 0.5분 정도 흔들릴 수 있습니다.



크로마토그래피 조건

본 분석에 사용된 분석법 조건은 다음과 같습니다.
컬럼 오븐 온도 반드시 세부적으로 조절되어야 합니다.

항목	조건
이동상	Citrate Buffer Li A-1/B-1/C-4/Reg. Sol.
컬럼 유속	0.450 ml/min
반응액 유속	0.250 ml/min
컬럼 온도	37 ¹ - 76 °C gradient
반응로 온도	130 °C
주입량	50 µL
샘플 보관 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
9.00	100.0	0.0	0.0	0.0
9.10	78.0	22.0	0.0	0.0
39.00	78.0	22.0	0.0	0.0
39.10	46.0	54.0	0.0	0.0
50.00	46.0	54.0	0.0	0.0
50.10	18.0	82.0	0.0	0.0
60.00	18.0	82.0	0.0	0.0
60.10	0.0	100.0	0.0	0.0
64.00	0.0	100.0	0.0	0.0
64.10	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
88.00	0.0	0.0	100.0	0.0
88.10	0.0	0.0	84.0	16.0
93.00	0.0	0.0	84.0	16.0
93.10	0.0	0.0	76.0	24.0
100.00	0.0	0.0	76.0	24.0
100.10	0.0	0.0	74.0	26.0
109.00	0.0	0.0	74.0	26.0
109.10	0.0	0.0	0.0	100.0
113.00	0.0	0.0	0.0	100.0
113.10	100.0	0.0	0.0	0.0
138.00	100.0	0.0	0.0	0.0

온도 조건은 다음과 같습니다.

시간	온도(°C)	시간	온도(°C)
Initial ²	39	84.0	46
30.0	39	85.0	76
31.0	42	115.0	76
50.0	42	116.0	39
51.0	46	135.0	39

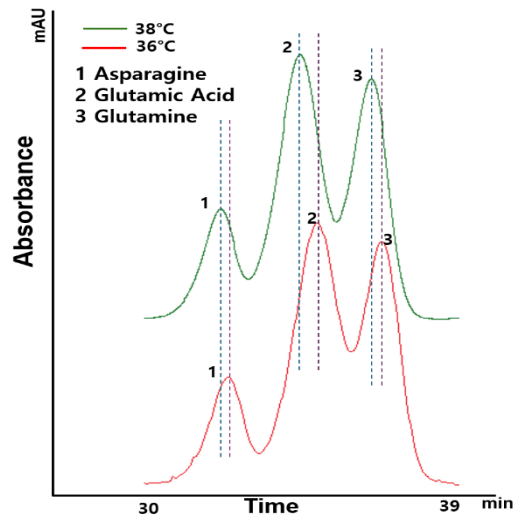
¹ 컬럼 오븐 시작 온도는 글루탐산/글루타민 분리에 맞게 조절되어야 합니다.

분석법 조정

유리 아미노산 분석에서 가장 어려운 분리는 아스파라긴 (ASN), 글루탐산(GLU), 글루타민(GLN) 사이의 적합한 분리도를 얻는 것입니다. 이들은 매우 분리하기 어렵습니다. 아스파라긴과 글루타민은 컬럼 오븐 온도의 변화에 따른 머무름 시간 변화가 크지 않지만 글루탐산의 경우 컬럼 오븐 온도가 1°C 변하는 것으로도 큰 머무름 시간 변화를 보이며 이를 통해 적합한 분리도를 얻을 수 있습니다. 컬럼 오븐 온도가 증가하면 글루탐산의 머무름 시간은 앞당겨지며 반대로 컬럼 오븐 온도가 감소하면 글루탐산의 머무름 시간은 증가합니다. 이를 이용해 글루탐산 피크의 위치를 조절할 수 있습니다. 물론, 이들의 완벽한 분리는 얻기 매우 힘듭니다. 이들의 완전한 분리를 위해선 보다 긴 컬럼과 이동상 조성의 변경이 필요합니다. 하지만 컬럼 및 분석법의 큰 변경 없이 단순한 컬럼 오븐 온도 조절을 통해 적절한 분리를 얻을 수 있으며 이를 통해 우수한 회수율 및 상대 표준 오차를 얻을 수 있었습니다.

아스파라긴, 글루탐산, 글루타민의 분리도 조절을 위해선 컬럼오븐의 온도를 조절해야 합니다. 온도 조절의 경우 항상 분석법 내 처음과 끝단(메소드 상에선 Initial, 30.0, 116.0, 135.0분 단계)을 동일하게 조절해야 일정한 결과를 얻을 수 있습니다.

컬럼 온도에 따른 ASN/GLU/GLN 분리 변화



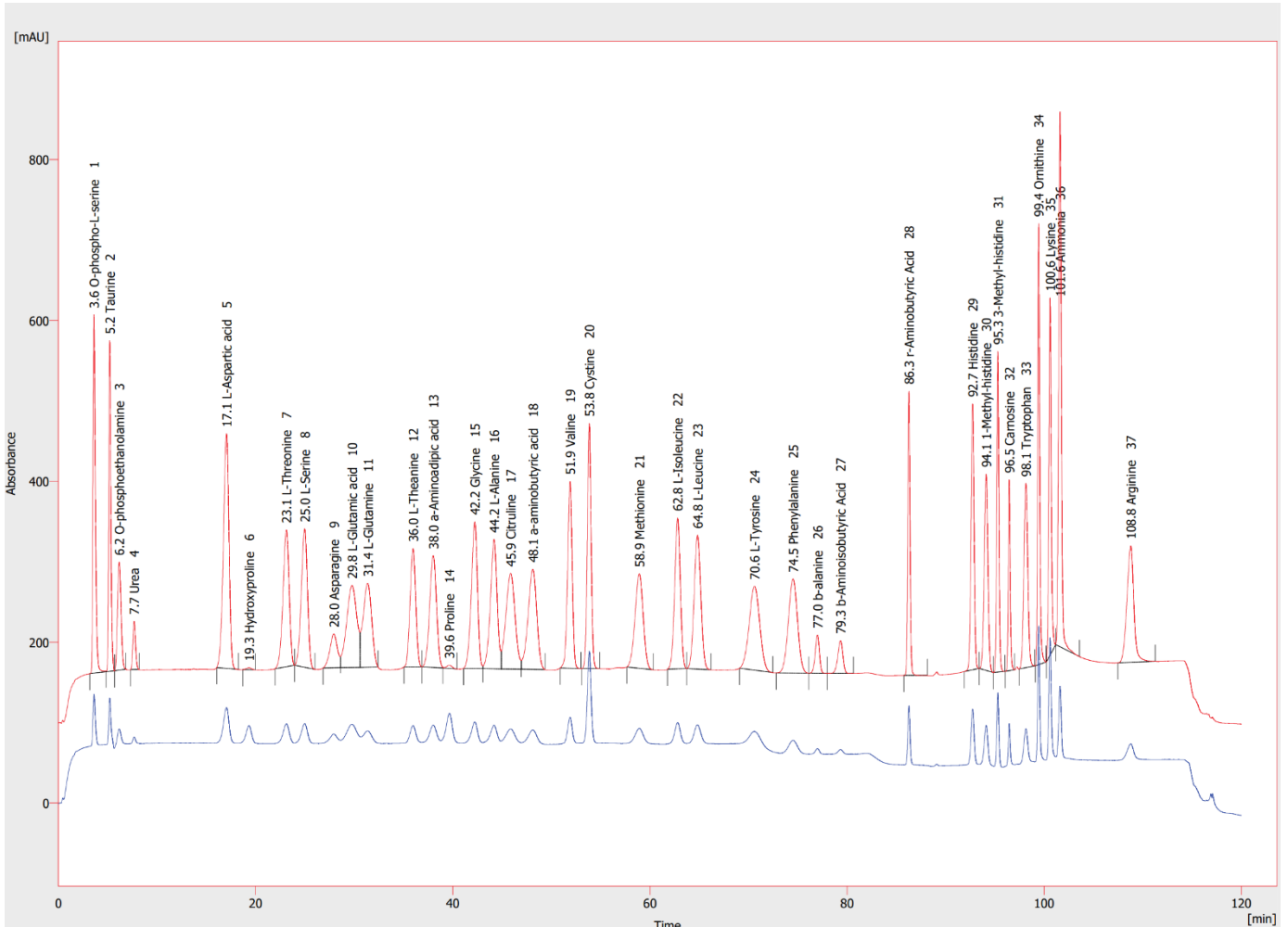
컬럼의 시작 온도가 증가하면 ASN, GLU, ASN의 머무름 시간은 단축되는데, 이 때 ASN과 GLN 대비 GLU의 변화 폭이 더 큰 것을 확인할 수 있습니다. 반대로 컬럼의 시작 온도가 감소하면 글루탐산의 머무름 시간은 더 크게 지연됩니다. 이러한 성질을 이용하여 글루탐산의 적합한 분리도를 얻을 수 있습니다. 본 분석에서는 39°C를 사용했습니다.

² 컬럼 오븐 온도는 글루탐산/글루타민 분리에 맞게 조절되어야 합니다.



결과 및 논의

시스템 안정화를 위해 약 2회의 Bypass 분석 후 10, 20, 50, 100 nmol/ml 농도의 표준액이 주입되었습니다. 이후 정밀성 평가를 위해 50 nmol/ml 농도의 표준액이 7회 반복 주입되었습니다. 다음은 100 nmol/ml 농도의 표준액 주입 크로마토그램입니다.

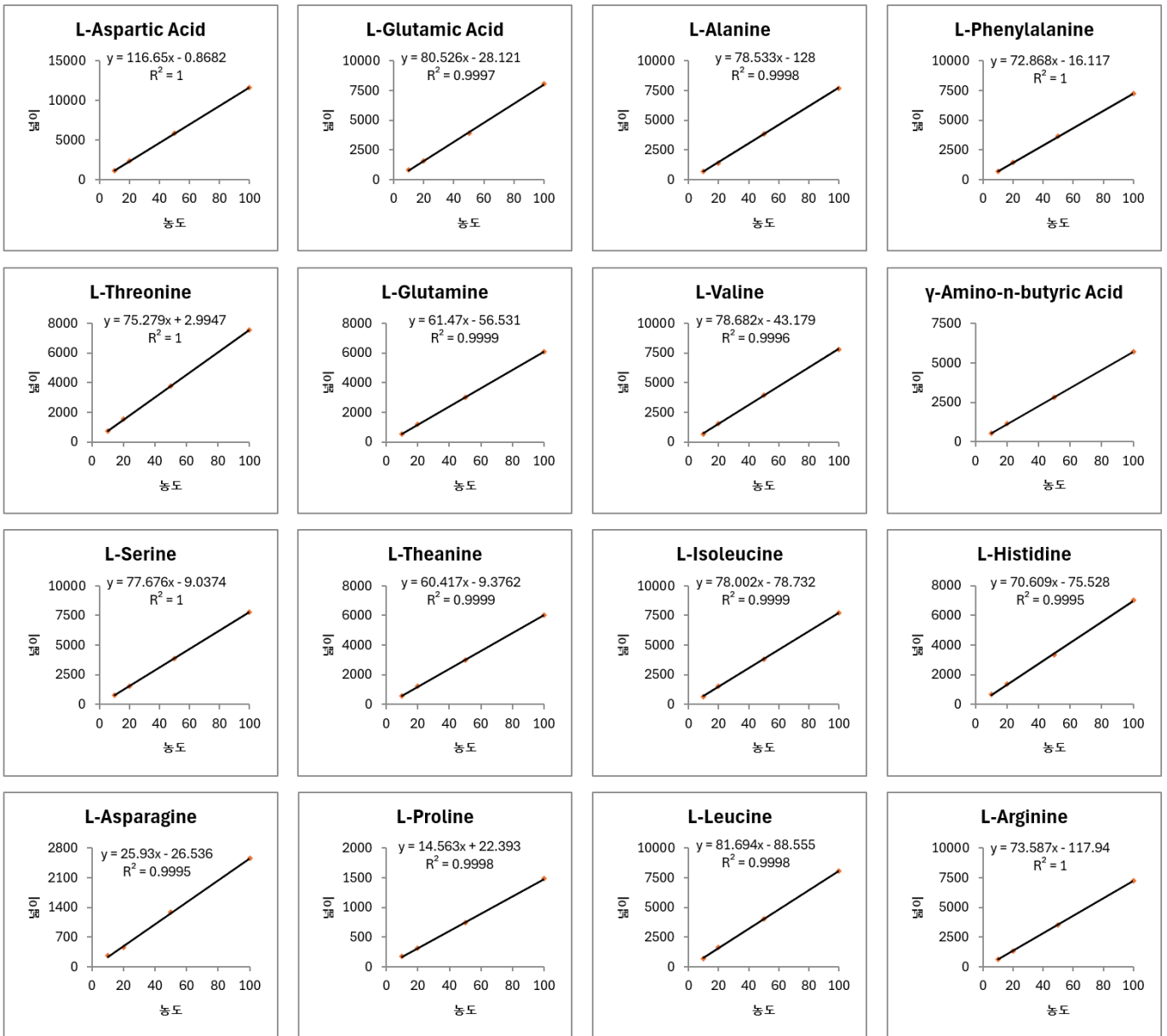


<100 nmol/ml 농도의 표준품 크로마토그램, 빨간색: 570 nm, 파란색: 440 nm>

컬럼 및 시스템의 성능 평가로 활용되는 L-Threonine/L-Serine의 분리도는 1.863을 얻었으며 Isoleucine/Leucine의 분리도는 1.793을 얻었습니다. 아미노산의 정성 정량에 있어 Hydroxyproline과 Proline은 440 nm 채널을 사용했으며 나머지 아미노산은 570 nm 채널을 사용했습니다. 암모니아는 표시만 됐으며 시료 내 암모니아 농도는 정량 평가하지 않았습니다.

L-Alanine과 Citrulline의 분리도가 1.354로 완전히 분리되지 않았는데, 이는 31.0 – 50.0 분 사이의 컬럼 오븐 온도가 높아 Citrulline이 빠르게 나오는 게 원인입니다. 다만, 분석된 차잎 시료 내 Citrulline이 검출되지 않아 분석법 조정은 이뤄지지 않았습니다.

직선성 평가를 위해 각 물질의 농도별 교정 곡선이 평가됐으며 전 농도 범위에서 모든 물질의 상관 계수(correlation coefficient)는 0.999 이상을 얻었습니다. 또한, *NELAC TNI Guidance on Instrument Calibration GUID-3-110-Rev0¹* 및 *Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration (IUPAC Recommendations 1998)*[2]에 따라 모든 교정 곡선의 피팅 타입은 1차 직선, 가중치 방법(Weighting Method)은 $1/Amount^2$ 가 선택되었습니다. 원점 및 오프셋의 유무는 평가에 큰 영향을 주지 않았으며 이에 원점을 무시하도록 설정했습니다. 다음은 몇몇 주요 아미노산들의 교정 곡선 평가 및 반복 분석을 통한 정밀성 평가입니다.



<녹차 차잎에서 검출된 대표적인 아미노산들의 교정 곡선>

암모니아를 제외한 모든 아미노산의 상관 계수는 원점 유무 및 가중치법에 관계없이 0.999₄ 이상을 얻었으며, 이렇게 얻은 교정 정보를 표준품 크로마토그램에 적용했을 때 상대 표준 오차(RSE; Relative Standard Error)의 계산은 다음과 같습니다.

물질명	Arginine				L-Theanine			
	교정 곡선이 원점을 지남		교정 곡선이 원점을 무시함		교정 곡선이 원점을 지남		교정 곡선이 원점을 무시함	
	이론값	측정값	이론값	측정값	이론값	측정값	이론값	측정값
	10	9.659	10	10.091	10	9.822	10	9.934
	20	19.414	20	19.574	20	20.332	20	20.349
	50	51.834	50	50.148	50	49.741	50	49.494
	100	105.672	100	100.921	100	100.632	100	99.929
RSE(%)	6.9		1.77		1.82		1.5	



NELAC TNI Guidance on Instrument Calibration GUID-3-110-Rev0 및 Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration (IUPAC Recommendations 1998) 가이드에서는 상대 표준 오차가 15-20 % 이하일 것을 권장합니다. 본 어플리케이션 노트에서 시연된 분석에서 개별 물질 별 원점의 유무에 따라 상대 표준 오차의 정도 차이는 있지만 최대 값은 원점을 지날 때, Urea의 RSE가 10.9% 였으며 여전히 조건 내 결과를 얻을 수 있었습니다. 대부분의 아미노산 교정 곡선은 원점을 지나지 않을 때 가장 낮은 RSE 값을 얻을 수 있었습니다. 다음 표는 개별 물질 별 RSE 값을 나타낸 표입니다.

Peak No.	물질명	RSE (%)	Peak No.	물질명	RSE (%)
1	O-phospho-L-serine	4.81%	19	L-Methionine	0.19%
2	Taurine	3.35%	20	L-Isoleucine	1.94%
3	O-phospho-ethanolamine	1.83%	21	L-Leucine	4.01%
4	Urea	7.05%	22	L-Tyrosine	3.56%
5	L-Aspartic acid	1.79%	23	L-Phenylalanine	1.75%
6	L-Threonine	1.26%	24	b-Alanine	5.71%
7	L-Serine	0.72%	25	b-Amino-iso-butyric Acid	3.57%
8	Asparagine	4.10%	26	r-Amino-n-butyric Acid	1.63%
9	L-Glutamic acid	2.08%	27	L-Histidine	3.39%
10	L-Glutamine	2.91%	28	1-Methyl-L-histidine	2.48%
11	L-Theanine	1.50%	29	3-Methyl-histidine	1.22%
12	a-Aminoadipic acid	1.25%	30	L-Carnosine	4.13%
13	Glycine	0.96%	31	L-Tryptophan	3.68%
14	L-Alanine	3.82%	32	L-Ornithine	0.47%
15	L-Citrulline	4.35%	33	L-Lysine	3.61%
16	a-Amino-n-butyric acid	3.41%	34	Ammonia	1.83%
17	L-Valine	3.85%	35	L-Arginine	1.77%
18	L-Cystine	2.59%			

대부분의 아미노산은 5 % 이하의 RSE 값을 얻었으며 b-Alanine의 경우 이동상 및 컬럼 오븐 온도 그래디언트의 영향이 동시에 작동해 베이스라인 하락이 부분적으로 포함돼 다소 높은 값을 얻었습니다. 하지만 이 역시 베이스라인을 고려한 적분을 다시 수행했을 때 3 % 이내의 값을 얻을 수 있었지만, 모든 피크에 일정한 적분 조건을 위해 적용되진 않았습니다. Urea의 RSE 값이 높은 이유는 희석액의 pH에 의한 주입 피크의 간섭에 영향이 있을 수 있습니다. 보다 낮은 Urea의 RSE 값을 위해선 희석 용액을 SDB/Li가 아닌 A-1/Li 완충 용액에 희석하는 것이 권장됩니다.

본 어플리케이션 노트에서 제시한 Sykam 자동 아미노산 분석기를 통한 37종 유리 아미노산 분석법은 위와 같이 여러 평가를 통해 뛰어난 분리와 신뢰도 높은 분석 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있었습니다.



다음은 50 nmol/ml 농도의 표준품을 7회 반복 주입한 뒤 마지막 6개의 크로마토그램에 대한 정밀성 평가입니다. 평가를 위해서 상대 표준 편차(RSD; Relative Standard Deviation)이 평가됐습니다. 암모니아를 제외한 모든 아미노산의 머무름 시간 RSD는 1% 이하였으며 피크 면적 RSD 역시 1% 이하였습니다. 가장 높은 머무름 시간 RSD를 보인 아미노산은 글루탐산, 가장 높은 면적 RSD를 보인 아미노산은 b-Alanine이지만 여전히 1% 이하의 우수한 정밀성을 얻었습니다. 다음 표는 아미노산들의 RSD 계산 결과입니다.

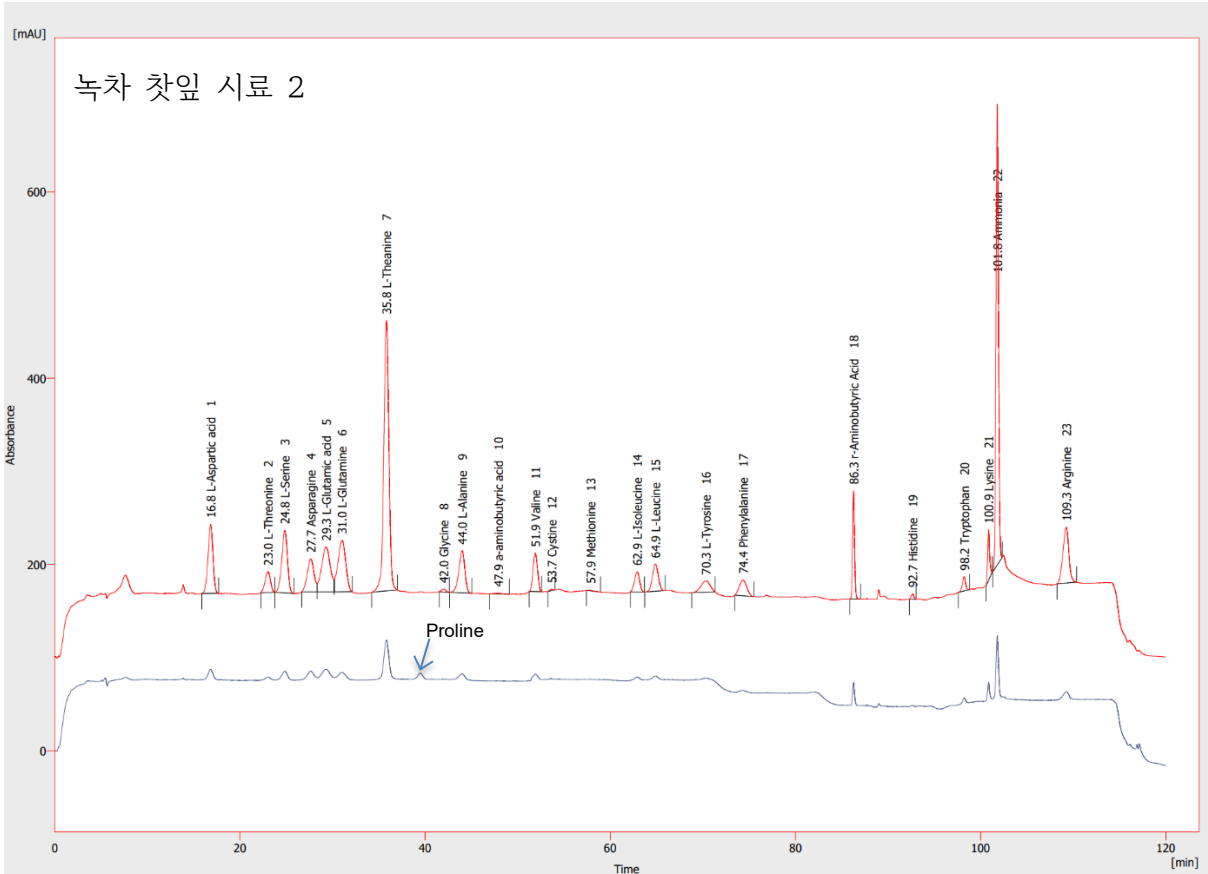
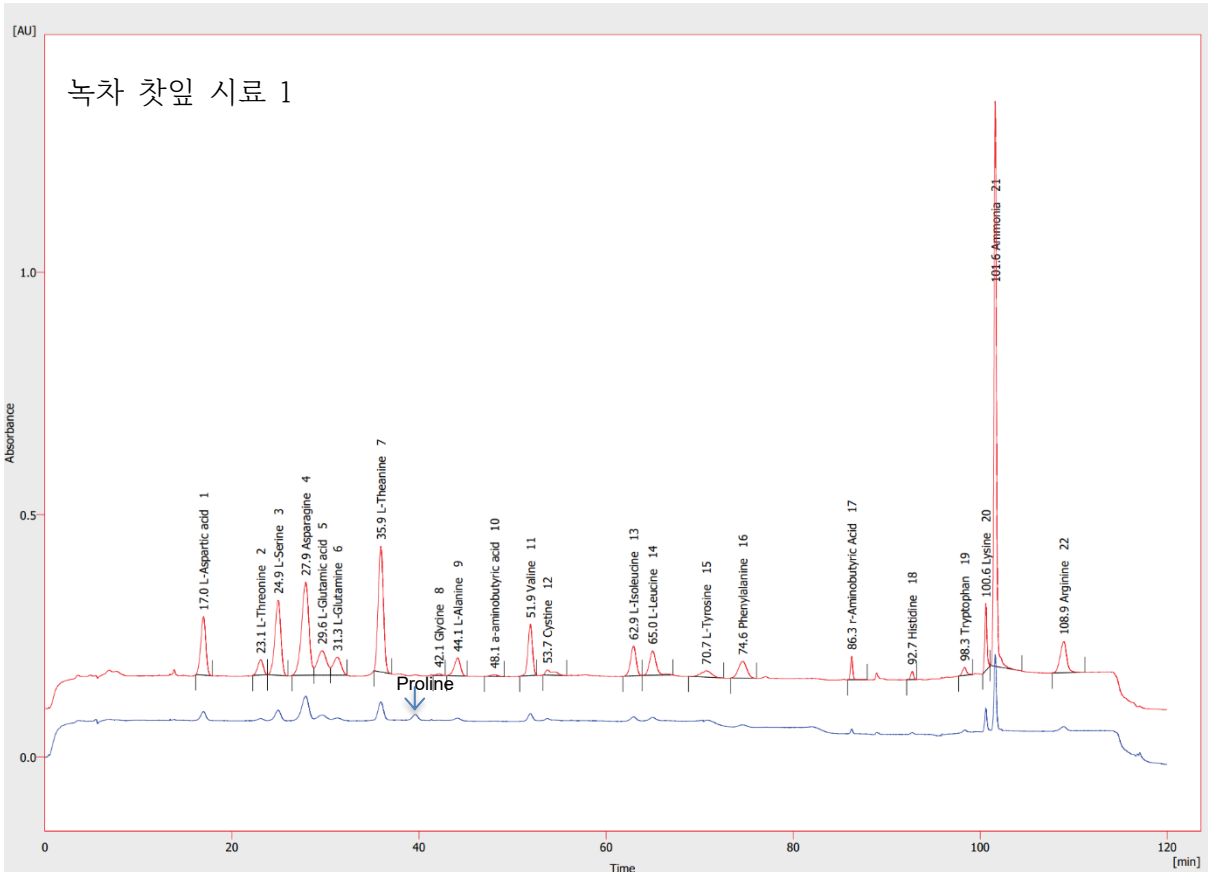
물질명	Reten. Time. RSD [%]	Area RSD [%]	물질명	Reten. Time. RSD [%]	Area RSD [%]
O-phospho-L-serine	0.11	0.11	L-Methionine	0.47	0.51
Taurine	0.12	0.21	L-Isoleucine	0.26	0.31
O-phospho-ethanolamine	0.08	0.47	L-Leucine	0.29	0.22
Urea	0.19	0.34	L-Tyrosine	0.35	0.14
L-Aspartic acid	0.13	0.33	L-Phenylalanine	0.47	0.36
L-Threonine	0.23	0.31	b-Alanine	0.71	0.71
L-Serine	0.29	0.41	b-Amino-iso-butyric Acid	0.47	0.32
Asparagine	0.27	0.49	r-Amino-n-butyric Acid	0.34	0.33
L-Glutamic acid	0.75	0.57	L-Histidine	0.26	0.47
L-Glutamine	0.39	0.34	1-Methyl-L-histidine	0.19	0.33
L-Theanine	0.55	0.24	3-Methyl-histidine	0.47	0.31
a-Amino adipic acid	0.36	0.31	L-Carnosine	0.44	0.33
Glycine	0.16	0.36	L-Tryptophan	0.51	0.44
L-Alanine	0.23	0.41	L-Ornithine	0.67	0.36
L-Citrulline	0.19	0.45	L-Lysine	0.64	0.69
a-Amino-n-butyric acid	0.18	0.47	Ammonia	0.39	0.47
L-Valine	0.57	0.34	L-Arginine	0.61	0.66
L-Cystine	0.26	0.31			

대부분의 아미노산은 5% 이하의 RSE 값을 얻었으며 b-Alanine의 경우 이동상 및 컬럼 오븐 온도 그래디언트의 영향이 동시에 작동해 베이스라인 하락이 부분적으로 포함돼 다소 높은 값을 얻었습니다. 하지만 이 역시 베이스라인을 고려한 적분을 다시 수행했을 때 3% 이내의 값을 얻을 수 있었지만, 모든 피크에 일정한 적분 조건을 위해 적용되진 않았습니다. Urea의 RSE 값이 높은 이유는 희석액의 pH에 의한 주입 피크의 간섭에 영향이 있을 수 있습니다. 보다 낮은 Urea의 RSE 값을 위해선 희석 용액을 SDB/Li가 아닌 A-1/Li 완충 용액에 희석하는 것이 권장됩니다.

본 어플리케이션 노트에서 제시한 Sykam 자동 아미노산 분석기를 통한 37종 유리 아미노산 분석법은 위와 같이 여러 평가를 통해 뛰어난 분리와 신뢰도 높은 분석 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있었습니다.



다음은 실제 녹차 차잎 시료의 분석 결과와 크로마토그램입니다.





아스파라긴, 글루탐산, 글루타민은 잘 분리됐으며, 테아닌은 매우 우수하게 분리됐습니다. 특히, 실제 시료에서 매우 높은 농도로 검출되는 암모니아는 대표적으로 라이신, 트립토판, 아르기닌의 정성 정량을 방해하는 요소로 작용하는데, 본 분석에서 라이신/암모니아의 분리도는 2.091로 라이신과 완전히 분리됐습니다. 또한 다량의 미지 아미노산 혹은 di-, tri- 펩타이드에 의한 매트릭스 간섭이 93.0~100.0 분 사이에서 관측됐지만 여전히 히스티딘과 트립토판의 정성 정량에는 문제없었습니다. 이는 Sykam 자동 아미노산 분석기와 LCA K07/Li 아미노산 분리 컬럼은 여러분에게 매우 뛰어난 아미노산 정성 정량을 제공할 수 있음을 나타냅니다.

다음 표는 주입된 시료 내 아미노산 농도와 이를 통해 실제 찻잎 내 아미노산의 함량을 계산한 표입니다.

	시료명: 찻잎 1	시료 무게: 101.3 mg	시료명: 찻잎 2	시료 무게: 100.9 mg
물질명 [Compound Name]	검출 함량 [nmol/ml]	시료 내 함량 [µg/mg]	검출 함량 [nmol/ml]	시료 내 함량 [µg/mg]
L-Aspartic acid	40.727	1.070	54.400	1.435
L-Threonine	19.327	0.454	30.445	0.719
L-Serine	91.802	1.905	86.889	1.810
Asparagine	425.886	11.108	161.367	4.225
L-Glutamic acid	46.814	1.360	94.985	2.770
L-Glutamine	34.585	0.998	109.889	0.000
L-Theanine	180.937	6.223	447.158	0.000
L-Glycine	3.663	0.054	6.837	0.218
L-Alanine	23.223	0.409	60.422	0.899
α-amino-n-butyric acid	4.884	0.099	6.158	0.109
Valine	47.936	1.108	42.952	0.878
Cystine	8.955	0.425	2.345	0.054
L-Isoleucine	35.257	0.913	10.367	0.494
L-Leucine	34.164	0.885	27.355	0.711
L-Tyrosine	12.487	0.447	40.179	1.045
L-Phenylalanine	33.490	1.092	20.554	0.738
γ-Amino-n-butyric Acid	14.272	0.291	38.357	1.256
L-Histidine	6.149	0.188	69.240	1.415
L-Tryptophan	9.369	0.378	5.834	0.179
L-Lysine	31.663	0.914	14.585	0.590
L-Arginine	47.837	1.645	28.645	0.830
L-Proline	36.615	0.832	89.623	3.095
전체 함량[µg/mg]		32.798		24.375

분석 결과, 녹차 및 홍차 등 찻잎 내 테아닌 함량 연구 결과^[3]와 비슷한 수치의 테아닌 함량을 얻을 수 있었습니다.



다음은 찻잎 시료 1을 4주간 방치한 뒤 재분석한 결과입니다. 이는 용액 내에서 조성이 불안정한 아스파라긴, 글루탐산, 트립토판의 함량 변화를 보기 위함입니다. 이 분석을 위해 동일한 농도의 표준품이 다시 조제됐으며 이동상은 기존의 이동상과 동일하며 닐하이드린 반응액은 동일한 생산 번호의 반응액으로 교체했습니다.

종류	1차 분석 함량 [nmol/ml]	2차 분석 함량 [nmol/ml]	변화량 [%]
GLN	34.585	3.369	- 91.2 %
GLU	46.814	59.169	+ 26.3 %
ASN	425.886	409.168	- 3.9 %
ASP	40.727	55.739	+ 36.8 %
TRP	9.369	8.787	- 6.2 %
AMM	100.396	143.862	+43.1 %

표에서 나온 것처럼, 대부분의 글루타민은 사라졌으며 아스파라긴, 트립토판 역시 일부 감소했습니다. 반대로 글루탐산 및 아스파르트산의 함량은 증가했는데, 글루타민 및 아스파라긴의 감소량에 비해 다소 적은 비율이 증가함을 알 수 있습니다. 또한 암모니아의 함량은 43.1 % 증가했는데, 이는 용액 내 조성이 불안정한 일부 아미노산들이 분해돼 그 부산물로 암모니아가 형성됨을 유추할 수 있었습니다.

다음은 시료 1 용액에 히스티딘, 트립토판 및 라이신을 첨가 (Fortifying) 했을 때의 회수율입니다. 이는 매트릭스 간섭 효과에 의해 히스티딘, 트립토판, 라이신의 정성 및 정량 정확도를 평가하기 위함입니다. SDB/Li에 히스티딘, 트립토판 라이신의 농도가 1000 nmol/ml이 되도록 희석하였습니다. 이후 시료 1 ml에 10 µL를 첨가하였습니다. 이를 통해 각 아미노산의 농도가 약 10 nmol/ml 증가하는 것을 기대할 수 있습니다.

종류	1차 분석 함량 [nmol/ml]	2차 분석 함량 [nmol/ml]	회수율 [%]
HIS	6.149	15.376	92.2 %
TRP	9.369	18.836	94.6 %
LYS	31.663	41.969	103.1 %

회수율은 92.2 ~ 103.1 %로 높은 회수율을 얻을 수 있었습니다. 이는 Sykam 자동 아미노산 분석기 및 LCA K07/Li 아미노산 분리 컬럼이 시료의 매트릭스 간섭에 매우 뛰어난 저항성을 가지며 여전히 신뢰도 높은 분석 결과를 제공함을 나타냅니다.

Sykam 자동 아미노산 분석기와 LCA K07/Li 아미노산 분리 컬럼으로 구성된 아미노산 분석기 S 633 시스템은 매우 우수한 유리 아미노산 분석 결과를 제공할 수 있습니다. Serine, Leucine 및 Ammonia 등 분리도 평가가 중요한 필요한 아미노산의 분리도는 우수했으며, 테아닌은 베이스라인에서 완전히 분리됐습니다. 또한 컬럼 오븐 온도 조절을 통해 아스파라긴/글루탐산/글루타민의 합리적인 분리를 얻을 수 있었습니다. 이를 통해 여러 농도의 표준품을 분석했을 때, 암모니아를 제외한 각 아미노산의 교정 곡선 역시 가중치 및 원점과 관계없이 모두 0.999 이상의 상관계수를 얻었습니다. 1/Amount² 가중치와 원점에 대한 조절이 적용되면 b-Alanine을 제외한 아미노산의 상대 표준 오차는 5 %이하로 우수한 결과를 얻었으며 b-Alanine 역시 베이스라인 제외된 적분을 적용했을 때 3 % 이하의 상대 표준 오차를 얻을 수 있었습니다.

실제 여러 간섭원이 존재할 수 있는 찻잎 시료 분석에도 여전히 뛰어난 분리도를 얻었습니다. 또한 시료의 매트릭스 간섭에 크게 영향받지 않았으며, 시료 내 일부 아미노산의 첨가 후 분석을 통한 회수율 평가에서 높은 회수율을 얻어 신뢰도 높은 결과를 얻을 수 있었습니다.

Sykam 자동 아미노산 분석기는 여러분에게 매우 우수한 분리도에 기반해 뛰어난 분리, 적은 매트릭스 간섭을 제공합니다. 또한 이 시스템은 모든 유료가 불활성 고분자인 PEEK, PTFE 등으로 이루어져 있어 매우 우수한 내화학성을 자랑합니다.

분석에 사용되는 이동상 및 반응액은 국내에서 생산 및 공급돼 매우 빠르며 경제적인 공급이 가능합니다. 이를 통해 여러분의 아미노산 분석 환경 및 워크 플로우를 일정하고 경제적으로 유지할 수 있게 합니다.



참조

- 1 *NELAC TNI Guidance on Instrument Calibration GUID-3-110-Rev0, 2018,*
<https://nelac-institute.org/docs/guidance/21666708.pdf>
- 2 Danzer, K., Currie, L. A., Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration (IUPAC Recommendations 1998). In Pure & Appl. Chem. Vol. 70, Issue 4, (1998), 993–1014.
- 3 Lee, Y. R., Kim, J. C., Shim, D., Chung, K. H., Lee, K. J., & An, J. H. (2021). Antioxidant and nitric oxide inhibition effect of domestic and foreign fermented black tea extracts. Korean Journal of Food Science and Technology, 53(4), 454-462.



© 2026 (주)아주과학 모든 권리 보유. 그 어떠한 허락되지 않은 수정 및 배포는 금지됩니다.

본 정보는 Sykam GmbH 및 (주)아주과학의 제품 성능을 보여주는 예시입니다. 사양, 조건 및 가격은 변경될 수 있습니다.

