

1. 서론

본 문서는 단백질 혹은 폴리 펩타이드 시료 내 존재하는 구성 아미노산 혹은 단백질 생성성 아미노산의 정량을 위한 시료 전처리 방법을 서술합니다. 단백질 산 가수분해, 산화 단백질 산 가수분해 및 염기 가수분해를 다루며 본 과정의 예시는 사진 및 영상을 참고할 수 있습니다.

2. 설명

자동 아미노산 분석기를 통한 시료 내 아미노산 정량 및 정성을 위해선 기본적으로 아미노산이 개별 형태인 유리 아미노산 형태로 존재해야 합니다. 이러한 아미노산 유리화 과정에는 기본적으로 염산을 이용한 가수분해를 사용하며 선택적으로 단백질 산화 혹은 염기 가수분해를 사용하기도 합니다. 황 함유 아미노산인 시스틴, 시스테인 및 메티오닌의 경우 가수분해 과정 중 유입된 미량의 산소와 반응해 각각 시스테인 산, 메티오닌 술폰을 형성해 정성 및 정량에 오차를 발생시킵니다. 이를 방지하기 위해 단백질 산화 과정을 거쳐 시료 내 시스틴, 시스테인 및 메티오닌을 산화시켜 반응합니다. 이러한 단백질 산화 과정에서는 티로신을 제외한 나머지 구성 아미노산의 조성이 안정적입니다. 티로신의 경우 할로젠화가 진행돼 함량이 불안정합니다. 티로신의 정확한 분석을 위해선 일반적인 산 가수분해를 따로 진행해야 합니다.

트립토판의 경우 일반적인 산 가수분해 과정에서 모두 분해됩니다. 이를 방지하기 위해선 수산화 나트륨을 이용한 염기성 가수분해를 진행합니다. 일부 문헌에서는 메탄술폰산을 이용한 가수분해를 권장하지만 해당 방법에 대한 논의는 본 문서에서 진행되지 않습니다.

시료 전처리 방법은 다음과 같은 국제적 공정서인 *VDLUFA 4.11.1 Amino Acids, AOAC Official Method 994.12 FEED and Regulation (EC) No.152/2009, European Pharmacopeia 5.0 2.2.56 AMINO ACID ANALYSIS* 등에서 제시하는 방법과 *식품의약품안전처 11-1471057-000554-01 건강기능식품공전 시험법 해설서 3. 단백질 및 아미노산류 등 다양한 단백질 시료* 등의 국내 공정서가 존재합니다.

본 문서는 일반적으로 통용되는 국제 혹은 국내 아미노산 분석을 위한 시료 전처리 방법을 참고해 Sykam 자동 아미노산 분석기에 주입 및 분석하기 적합한 아미노산 시료 전처리 방법을 제시합니다. 본 문서의 방법을 따를 사용자는 반드시 해당 방법을 사용 환경에 맞게 적용해야 하며 다양한 방법으로 전처리 방법이 적합하며 정확한지 검증해야 합니다.

3. 시약

본 문서에서 사용된 시약 및 용액은 다음과 같습니다. 하기 나열된 제품을 구할 수 없다면 동급의 GR, ACS Reagent 등급 혹은 이상의 시약 사용을 강력하게 권장합니다. 증류수 혹은 초순수는 실험실에서 신선하게 준비하여 사용하는 것을 권장합니다.

명칭	CAS No.	제조사	제품 번호
Deionized Water	7732-18-5	자체 제조	*18.2 MOhm 이상
Hydrochloric Acid 36 %	7647-01-0	Merck	1.00317
Phenol	108-95-2	Merck	1.00201
Hydrogen peroxide 30 %	7722-84-1	FUJIFILM	081-04215
Formic Acid	64-18-6	FUJIFILM	063-05895
Sodium pyrosulfite	7681-57-4	JUNSEI	60250S0401
Sodium Hydroxide	1310-73-2	FUJIFILM	192-07935
Sample Dilution Buffer/Na	N/A	(주)아주과학	60 01 007

사용되는 Sodium Hydroxide 용액은 50 % w/v 농도의 Carbonate Free 농축액을 사용하여도 무관합니다.

4. 용기 준비

액체상 가수분해(Liquid Phase Hydrolysis)는 고온, 고압 조건에서 진행되기 때문에 반드시 내열, 내압 기능이 존재하는 PTFE, FEP 혹은 테프론 재질의 플라스틱 가수분해 튜브 혹은 Pyrex Glass를 사용합니다. 만약 유리 재질을 사용할 경우, 유리 용기 내 불투명한 오염 유무를 반드시 확인해야 합니다. 용량은 기본적으로 25~50 mL를 사용하지만, 이 용량은 절대적인 것이 아니며 시료량에 따라 상이할 수 있습니다. 예를 들어 10 mg 이하의 시료를 가수분해하는 경우 1~2 ml의 내열 내압 앰플을 토치로 밀봉하여 사용합니다. 따라서 시료의 종류와 양에 따라 적절한 스케일의 가수분해 튜브를 준비합니다. 이때 시료의 양이 1mg 이하인 경우 피펫, 저울 등에 의해 큰 오차가 발생할 수 있습니다.

가수분해에 사용될 용기는 일회용 용기 사용을 권장합니다. 이는 발생할 수 있는 생물학적 오염을 방지하기 위한 가장 좋은 방법입니다. 만약 용기를 세척하여 재사용할 경우, 생물학적 오염 등을 제거하기 위해서 1~2 M 질산 용액에 3 시간 이상 담근 후 증류수로 세번 이상 세척하여 건조합니다. 만약 재사용할 튜브에 검붉은색 오염원이 제거되지 않는다면 해당 튜브는 폐기합니다.

모든 실험 과정은 반드시 라텍스 혹은 니트릴 보호 장갑, 보안경, 실험복을 착용하며 흡 후드 내에서 진행할 것을 권장합니다. 만약 흡 후드가 없다면 환기가 잘 되는 곳에서 최대한 빠르게 진행합니다. 여유가 된다면 화학적 장벽 크림 등을 발라 발생할 수 있는 사고를 대비합니다.

5. 용액 준비

가수분해 과정에 직접 사용될 용액(Working Solution)은 당일 제조 및 사용을 원칙으로 합니다. 보관 용액(Stock Solution)은 냉장 보관 하에 1년간 사용 가능합니다. 가수분해 과정에 사용할 Formic Acid, Hydrochloric Acid 등의 경우 반드시 제조사에서 제공한 성적서를 참고해 실제 농도를 확인합니다. **목표 농도에 알맞게 희석 및 첨가량을 조절합니다.**

1. 단백질 산화 보관 용액(Stock Solution)

페놀이 약 0.50 w/v %로 첨가된 23 M Formic Acid 용액

- 500 mL 볼륨 플라스크에 534 g의 Formic Acid(100 v/v%, 1.2 kg/L, MW 46.03 g/mol)를 채운 후 2.53 g의 페놀을 첨가합니다. 이후 천천히 증류수를 부어 플라스크 눈금에 맞춥니다.

2. 단백질 산화 용액(working Solution)

과산화수소(Performic Acid) 용액

- 단백질 산화 보관 용액과 30 % 과산화수소 용액을 9:1로 혼합합니다. 용기를 잘 흔들어 섞은 뒤 상온에서 1시간 방치하여 과산화수소(Performic Acid)를 형성합니다. 이 용액을 아이스 베스에서 15분 정도 냉각한 뒤 사용합니다. 이 용액은 불안정하여 제조 후 즉시 사용합니다. 이 용액은 시간이 지남에 따라 점차 노란색을 띄게 됩니다. 육안상 색이 확인되면 폐기합니다.

3. 산 가수분해 용액(Working & Stock Solution)

페놀이 0.1 w/v %로 첨가된 6 M Hydrochloric Acid 용액

- 500 mL 볼륨 플라스크에 100 mL의 증류수를 채웁니다. 이후 257.5 mL의 36 % Hydrochloric Acid를 천천히 벽면을 따라 첨가합니다. 조심스럽게 플라스크를 흔들어 충분히 섞이게 한 뒤 다시 증류수를 눈금까지 부어 용량을 맞춥니다. 이후 0.5 g의 페놀을 첨가해 마무리합니다.

※ 이 과정은 발열 과정입니다. 한 번에 많은 산을 부어 과한 열이 발생하지 않도록 합니다.

※ 제조사에서 제공한 성적서를 통해 실제 농도를 파악한 뒤 적합한 염산 용액 부피를 계산합니다.

4. 염기 중화 용액 1

6 M 농도의 Sodium Hydroxide(NaOH) 용액

- PP 혹은 HDPE 재질의 500 mL 플라스틱 볼륨 플라스크에 300 mL의 물을 채운 후 Sodium Hydroxide를 60 g 넣습니다. 용액의 온도가 상온으로 떨어지면 다시 60 g을 넣어 총 120 g의 NaOH를 녹입니다. 용액을 상온까지 식힌 후 증류수를 부어 눈금에 맞춥니다.

※ 이 과정은 발열 과정입니다. 한 번에 많은 산을 부어 과한 열이 발생하지 않도록 합니다.

5. 염기 중화 용액 2

1 M 농도의 Sodium Hydroxide(NaOH) 용액

- PP 혹은 HDPE 재질의 500 mL 플라스틱 볼륨 플라스크에 300 mL의 물을 채운 후 염기 중화 용액 1을 83 mL 넣습니다. 이후 플라스크를 천천히 흔들어 충분히 섞이게 한 뒤 상온까지 식힙니다. 이후 증류수를 눈금 아래로 2 cm 정도까지 붓습니다. 다시 용액을 식혀 상온까지 기다린 뒤 눈금까지 부어 용액을 제조합니다.

6. 염기 가수분해 용액(Working Solution)

4.2 M 농도의 Sodium Hydroxide(NaOH) 용액

- PP 혹은 HDPE 재질의 500 mL 플라스틱 볼륨 플라스크에 300 mL의 물을 채운 후 Sodium hydroxide 42 g을 넣습니다. 이후 플라스크를 천천히 흔들어 충분히 섞이게 한 뒤 상온까지 식힙니다. 다시 42 g을 넣어 총 84 g을 녹입니다. 용액을 상온까지 식힌 후 증류수를 부어 눈금에 맞춥니다.

※ 이 과정은 발열 과정입니다. 한 번에 많은 산을 부어 과한 열이 발생하지 않도록 합니다.

7. 산 중화 용액 1

6 M 농도의 Hydrochloric Acid 용액

- 500 mL 볼륨 플라스크에 100 mL의 증류수를 채웁니다. 이후 257.5 mL의 36 % Hydrochloric Acid를 천천히 벽면을 따라 첨가합니다. 조심스럽게 플라스크를 흔들어 충분히 섞이게 한 뒤 다시 증류수를 눈금까지 부어 용량을 맞춥니다.

※ 이 과정은 발열 과정입니다. 한 번에 많은 산을 부어 과한 열이 발생하지 않도록 합니다

8. 산 중화 용액 2

1 M 농도의 Hydrochloric Acid 용액

- 500 mL 볼륨 플라스크에 300 mL의 증류수를 채웁니다. 이후 43 mL의 36 % Hydrochloric Acid를 천천히 벽면을 따라 첨가합니다. 조심스럽게 플라스크를 흔들어 충분히 섞이게 한 뒤 다시 증류수를 눈금까지 부어 용량을 맞춥니다. 혹은 산 중화 용액 1을 6배 희석하여 준비합니다.

7. 시료 준비

시료의 크기가 불규칙하거나 0.5 mm 이상인 경우 효율적인 가수분해가 진행되지 않을 수 있습니다. 이 경우 시료를 동결건조 후 분쇄하는 것이 추천됩니다. 또한 시료가 액상 혹은 다량의 수분을 함유하는 경우 가수분해 용액이 중화돼 농도가 감소하여 가수분해 수율이 떨어질 수 있습니다. 이 경우 시료를 50 °C 이하 온도에서 건조하거나 동결 건조합니다.

만약 액상 시료의 가수분해 과정이 요구되는 경우, 액상 시료의 용액과 산 가수분해 용액의 비율 등을 고려해 산 가수분해 용액의 염산 농도를 역산해 조절합니다.

시료에 다량의 지방(fat)이 존재한다면 벤진 등을 이용한 액체상 추출(LLE) 혹은 속슬렛 농축 등을 이용해 지방을 제거합니다.

만약 킬달 질소(Kjeldahl-nitrogen) 함량을 측정해야 한다면 측정합니다. 측정이 불가능하다면 선행 시료를 임의로 분석한 뒤 역산합니다. 일반적으로 역산 계수(Conversion Factor)는 0.16 입니다 ($N \approx \text{protein} \times 0.16$). 이는 시료의 종류에 따라 달라집니다.

8. 시료 가수분해

시료에 적용할 가수분해 방법은 분석할 아미노산의 종류에 의해 결정합니다. 일반적인 구성 아미노산의 경우 산 가수분해 방법을 사용하며 시스틴, 시스테인 및 메티오닌 등의 황 함유 아미노산의 경우 산화 단백질 산 가수분해 방법을 사용합니다. 트립토판의 경우 단백질 염기 가수분해를 사용합니다. 시료 내 아스파라진 및 글루타민은 각각 아스파탐산 및 글루탐산으로 변합니다.

본 문서에서는 0.1~0.5 g의 시료를 정량하여 25 ml 튜브에서 가수분해를 진행합니다. 본문에서 이미 언급된바 시료의 정량 무게와 산 가수분해 용액 용량, 튜브 용량은 전적으로 사용자의 상황에 맞게 조절돼야 합니다. 또한 가수분해가 끝난 뒤 진행되는 산-염기 중화 반응 역시 사용자의 상황에 맞게 용량과 과정을 조절해야 합니다.

산 가수분해 용액은 반드시 충분한 양을 넣어야 합니다. 시료 무게의 100~200배 용량의 가수분해 용액이 사용돼야 합니다. 하지만 전체 용액의 부피는 용기 높이의 절반 이하여야 합니다. 용기 높이의 반 이상을 넣는 경우 용기 상단의 결로 및 침전이 발생해 가수분해 과정을 방해할 수 있습니다.

내부 표준 물질(ISTD; Internal Standard Solution)은 노르류신(NLE; Norleucine CAS No.: 616-06-8)을 사용합니다. 이를 통해 가수분해 과정 중 손실되는 시료의 회수율을 점검할 수 있습니다. 제조된 노르류신 내부 표준 용액은 8주간 냉장 보관 조건에서 안정적입니다.

8.1. 단백질 산 가수분해

단백질 산 가수분해는 대표적인 구성 아미노산 혹은 단백질 생성성 아미노산 분석을 위한 전처리 방법입니다. 강산 및 고온 조건에서 진행되기 때문에 산과 열에 안정적인 아미노산을 제외한 기타 아미노산은 대부분 분해됩니다. 따라서 약 18~20 종의 구성 아미노산만 높은 회수율을 보입니다. 제한적으로 하이드록시프롤린, 이소데스모신, 데스모신, GABA 등이 이 조건에서 안정적입니다.

과정

1. 시료를 0.1 – 0.5 g 정량해 가수분해 튜브에 담습니다.
2. 산 가수분해 용액을 약 15 ml 첨가합니다. 이때 필요시 내부 표준 물질을 첨가합니다.
 ※ 이때, 산 가수분해 용액이 용기의 절반 높이를 넘지 않도록 합니다. 넘는 경우 시료의 양과 용액을 줄입니다.
3. 용기 상층부에 고순도 질소 가스로 치환합니다. 이를 통해 존재할 수 있는 산소를 제거합니다.
4. 용기의 뚜껑으로 단단히 밀봉한 뒤 110 ± 2 °C 온도의 오븐에서 24 시간 동안 방치합니다.
5. 가수분해가 끝났다면 오븐을 열고 방치해 상온까지 식힙니다.
6. 50 ml 볼륨 플라스크에 용액을 옮겨 담습니다.
7. Sample Dilution Buffer(SDB) 혹은 증류수로 가수분해 튜브 벽면을 씻어내고 그 용액을 다시 볼륨 플라스크에 담아 시료의 손실을 방지합니다. 이를 두 번 정도 반복합니다.
8. 약 5 ml의 염기 중화 용액 1을 천천히 첨가하여 과한 발열을 방지합니다.
 ※ 이 반응은 매우 큰 발열을 동반합니다. 시료 용액의 온도는 40 °C를 넘지 않도록 합니다.
9. SDB 혹은 물을 이용해 눈금을 맞춥니다. 이를 1차 시료 희석액이라 합니다.
10. 10 ml의 1차 시료 희석액을 50 ml 볼륨 플라스크에 넣습니다. 이후 약 20 ml의 희석 용액을 첨가합니다.
11. pH 2.2를 포함하는 범위로 교정된 pH 미터를 준비한 뒤 SDB의 pH를 측정합니다. 허용 범위는 2.1 ~ 2.3 입니다. 만약 이 범위를 벗어났다면 새롭게 준비된 용액을 사용합니다.
 ※ SDB는 장기간 보관 혹은 개봉 후 시간이 지날수록 pH가 증가하는 경향을 가집니다.
12. 염기 중화 용액 2를 소량씩 첨가해가며 pH를 SDB와 동일하게 맞춥니다. pH를 맞췄다면 이제 SDB를 눈금까지 부어 50 mL로 정량합니다. 이를 최종 시료 희석액이라 합니다.
13. 최종 시료 희석액은 24 시간 내에 분석돼야 합니다. 만약 분석하지 않을 경우, 용기 상층부를 질소가스로 채운 후 밀봉하여 5 °C 이하에서 냉장 보관합니다. 6개월 이상 안정적입니다.
14. 시료를 바로 분석할 경우 0.2 um 공극 사이즈, PES 재질의 시린지 필터로 여과하여 바이알에 담습니다.
 ※ 이때, 처음 여과되는 1 ~ 2 ml 혹은 5 ml의 용액은 버린 후 바이알에 담습니다. 버리는 용액의 양은 필터 크기에 비례합니다.

8.2. 산화 단백질 산 가수분해

단백질 산 가수분해 과정은 시스틴, 시스테인 및 메티오닌 등의 황 함유 아미노산의 낮은 회수율을 보입니다. 이는 용기 및 용액 내 존재할 수 있는 산소에 의해 이들이 산화돼 다른 형태로 변할 수 있기 때문입니다. 산화 단백질 산 가수분해 과정은, 가수분해 전 시료를 강제로 산화반응을 진행해 모든 시스틴, 시스테인 및 메티오닌을 각각 산화형태인 시스테인산, 메티오닌 술폰으로 변환합니다. 이후 8.1. 단백질 산 가수분해 과정을 진행합니다.

과정

1. 시료를 0.1–0.2 g 정량해 가수분해 튜브에 담습니다.
2. 신선하게 준비된 단백질 산화 용액 3 ml를 첨가한 뒤 천천히 흔들어 줍니다.
 ※ 이 반응은 매우 격렬하게 일어납니다. 용액을 첨가한 뒤 뚜껑을 살짝 열어 둡니다. 산화 과정에서 발생할 수 있는 가스를 빼기 위함입니다.
3. 공식적인 방법으로는, 아이스 배스에서 약 16 시간 반응을 진행시킵니다. 2~3 시간마다 주기적으로 용기를 흔들어 잘 섞습니다.
 ※ 이 반응은 상온에서 1시간 진행하는 것으로 같음할 수 있지만, 회수율이 먼저 비교돼야 합니다.
4. 0.5 g의 Sodium pyrosulfite를 첨가해 산화 반응을 중단시킵니다.
 ※ !!! 이 반응은 매우 격렬하게 일어납니다. 또한 생성물로 이산화황 가스를 생성합니다. 반드시 흡후드에서 진행합니다.
5. 용기를 천천히 흔들어줍니다. 거품이 모두 사라지면 반응이 끝났음을 의미합니다.
6. 이후 “8.1. 단백질 산 가수분해 과정”과 동일한 가수분해 과정을 거칩니다.

한계

이 방법은 티로신의 회수율이 빈번하게 낮습니다. 이는 산 가수분해 용액 내의 불순물 등에 의해 형성된 염소 때문입니다. 형성된 염소는 티로신의 할로겐화 반응(Chlorination)을 유발합니다.

티로신의 정확한 정성 및 정량이 필요한 경우 동일한 시료를 “8.1. 단백질 산 가수분해 과정”을 따라 가수분해합니다.

8.3. 단백질 염기 가수분해

단백질 염기 가수분해 과정은 시료 내 존재하는 트립토판을 정성 및 정량하기 위한 전처리 방법입니다. 이 방법은 시료 내 트립토판 함량을 정확하게 분석할 수 있지만 다른 아미노산의 경우 회수율이 극단적으로 낮아 정량 정성이 불가능합니다.

염산을 통한 가수분해와는 다르게, 높은 농도의 염기 용액은 유리 용기의 표면을 녹여 결과적으로 하얀색 규산 관련 침전물을 발생시킬 수 있습니다.

이러한 증상을 피하기 위해선 PFA, PTFE 재질의 Digestion Vessel 등 내열, 내압 플라스틱 용기를 사용해야 합니다.

과정

1. 시료를 0.1–0.2 g 정량해 가수분해 튜브에 담습니다.
2. 신선하게 준비된 염기 가수분해 용액 10 ml를 첨가합니다. 이때 필요시 내부 표준 물질을 첨가합니다.
3. 용기를 천천히 흔들어 잘 섞이게 합니다. 이때 최대한 벽면에 붙은 시료가 없게 합니다.
4. 용기 내 공기를 고순도 질소로 채웁니다.
5. 용기의 뚜껑으로 단단히 밀봉한 뒤 $110 \pm 2^\circ\text{C}$ 온도의 오븐에서 24 시간 동안 방치합니다.
6. 가수분해가 끝났다면 오븐을 열고 방치해 상온으로 식힙니다.
7. 50 ml 볼륨 플라스크에 용액을 옮겨 담습니다.
8. 증류수를 15 ml 정도 첨가합니다.
9. 산 중화 용액 1을 500 μL 씩 총 5 ml를 천천히 플라스크 벽면을 타고 첨가합니다.
※ 이 반응은 다량의 발열이 발생합니다. 시료 용액의 온도는 40°C 를 넘지 않도록 합니다. 고온의 용액은 흰색 앙금이 형성될 수 있습니다. 앙금이 형성된 경우 시료를 폐기합니다.
10. SDB를 천천히 첨가해 눈금을 맞춥니다. 이 용액은 1차 시료 희석액입니다.
11. 1차 시료 희석액 10 ml를 50 ml 볼륨 플라스크에 옮겨 담은 후 20 ml의 SDB를 첨가합니다.
12. pH 2.2를 포함하는 범위로 교정된 pH 미터를 준비한 뒤 SDB의 pH를 측정합니다. 허용 범위는 2.1 ~ 2.3 입니다. 만약 이 범위를 벗어났다면 새롭게 준비된 용액을 사용합니다.
※ SDB는 장기간 보관 혹은 개봉 후 시간이 지날수록 pH가 증가하는 경향을 가집니다.
13. 산 중화 용액 2를 소량씩 첨가해가며 pH를 SDB와 동일하게 맞춥니다. pH를 맞췄다면 이제 SDB를 눈금까지 부어 50 mL로 정량합니다. 이를 최종 시료 희석액이라 합니다.
14. 최종 시료 희석액은 24 시간 내에 분석돼야 합니다. 만약 분석하지 않을 경우, 용기 상충부를 질소가스로 채운 후 밀봉하여 8°C 이하에서 냉장 보관 합니다. 최소 7일 이상 안정적입니다.
15. 시료를 바로 분석할 경우 0.2 μm 공극 사이즈, PES 재질의 시린지 필터로 여과하여 바이알에 담습니다.
※ 이때, 처음 여과되는 1 ~ 2 ml 혹은 5 ml의 용액은 버린 후 바이알에 담습니다. 버리는 용액의 양은 필터 크기에 비례합니다.

9. 어플리케이션

다음은 단백질 가수분해를 통해 분석 가능한 대표적인 아미노산 리스트입니다.

아미노산	특이사항	아미노산	특이사항
Aspartic Acid		Isoleucine	
Threonine		Leucine	
Serine		Tyrosine	빈번히 낮은 회수율
Glutamic Acid		Phenylalanine	
Proline		Histidine	
Glycine		Lysine	
Alanine		Arginine	
Cystine	낮은 회수율 혹은 CysOx로 산화	Hydroxyproline	유리 아미노산 분석 시스템 사용
Valine		GABA	LCA K13/Na 175 mm 컬럼 사용
Methionine	낮은 회수율 혹은 Met-SO ₂ 로 산화	(Iso)Desmosine	유리 아미노산 분석 시스템 사용

다음은 단백질 가수분해를 통한 분석 시 적합한 분석 프로그램입니다.

가수분해	프로그램	사용 컬럼
단백질 산 가수분해	Hydrolysate Program (Na_A-1/B-1/Reg.Sol.)	LCA K06/Na 4.6 x 150 mm
산화 단백질 산 가수분해	Extended Hydrolysate Program (Na_A-4/A-5/B-1/Reg.Sol.)	LCA K13/Na 4.6 x 175 mm
단백질 염기 가수분해	Hydrolysate Program (Na_A-1/B-1/Reg.Sol.)	LCA K06/Na 4.6 x 150 mm
HYP, IDE, DES ...	Physiological Fluid Program (Li_A-1/B-1/C-4/Reg.Sol.)	LCA K07/Li 4.6 x 150 mm

다음은 각 프로그램 별 추천되는 표준품입니다.

가수분해	프로그램	표준품
단백질 산 가수분해	Hydrolysate Program (Na_A-1/B-1/Reg.Sol.)	AA Standard Type H, H-G
산화 단백질 산 가수분해	Extended Hydrolysate Program (Na_A-4/A-5/B-1/Reg.Sol.)	AA Standard Type H-Ox
단백질 염기 가수분해	Hydrolysate Program (Na_A-1/B-1/Reg.Sol.)	단일 표준품 제제 분석
HYP, IDE, DES ...	Physiological Fluid Program (Li_A-1/B-1/C-4/Reg.Sol.)	AA Standard Type PH, PH-S

10. Trouble Shooting

단백질 가수분해 전처리 방법은 오차와 오류가 매우 빈번하게 발생하는 전처리 방법 중 하나입니다. 이는 실제 단백질 및 펩타이드 시료의 매트릭스 복잡성, 용액의 불순물 등 다양한 요소가 작용할 수 있기 때문입니다. 따라서 사용자는 분석할 샘플에 대해서 적절한 수정을 통해 전처리 방법의 안정성을 평가하고 설립해야 합니다. 이후 사용자는 설립한 절차를 정확하게 수행해야 합니다.

대표적인 오염원은 사람의 지문입니다. 따라서 시료 전처리 과정에서 사용될 초자류 및 기구를 다룰 땐 반드시 일회용 장갑을 사용합니다. 일회용 멸균 장갑이 추천됩니다. 또한 사용할 스폰, 핀셋 등은 일회용을 사용하거나 질산 용액에 담근 후 세척하여 준비합니다.

다음은 빈번하게 발생할 수 있는 문제와 해결 방법 제안입니다.

1. **Aspartic Acid, L-Threonine 등의 초기 피크들 머무름 시간 흔들림**
 - 주입된 시료의 pH가 SDB 용액의 pH와 차이가 존재함
2. **Peak Shape 혹은 Tailing이 극단적으로 왜곡됨**
 - 주입된 시료의 pH 확인, 지질 등의 양쪽성 물질(surfactant) 함량 점검
 - 표준품 분석을 통한 컬럼 점검(Serine의 분리도 확인)
3. **낮은 티로신 회수율**
 - 티로신의 Chlorination 반응 발생, HCl 및 페놀 순도 점검
 - 가능한 경우, 증기상 가수분해를 시도
4. **낮은 이소류신, 류신, 발린의 회수율**
 - 오븐 온도 정확도 및 유지 정도 확인
 - ILE-VAL-LEU 등의 펩타이드 결합은 매우 강력해 쉽게 떨어지지 않음 이 경우 마이크로웨이브를 이용한 초고온 가수분해 점검
5. **용액 내 앙금 생성**
 - 시료 내 Hydroxide와 앙금을 생성하는 전이금속 존재
 - 시료 내 가수분해가 덜 된 단백질 및 폴리 펩타이드의 침전 반응 발생

개정 내역

버전	개정 날짜	세부 사항
1.0	2025년 09월 22일	문서 편찬
1.1	2025년 11월 01일	문서 정식 출간, 오탈자 수정
1.2	2025년 12월 01일	순서 개정, 참고 문헌 수정
1.3	2026년 06월 25일	염기 가수분해 중 규산염 오염과 대응책 제시
1.4	2026년 09월 07일	용기 세척 방법 및 오탈자 수정
1.5	2026년 09월 14일	1. 1M 염기 중화 용액 용량 수정 2. 가수분해 희석 중 사용 용기 수정 3. 단백질 산화 후 중화를 위한 pyrosulfite 용량 수정 4. 시료를 분석하지 않을 경우 보관 조건 수정