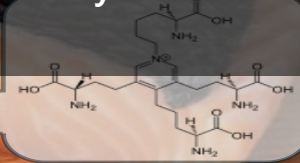


## SYKAM 자동 아미노산 분석기를 이용한 이소데스모신/데스모신 분석법 Determination of Isodesmosine/Desmosine by Sykam Amino Acid Analyzer



### 서문

이소데스모신(Isodesmosine)과 데스모신(Desmosine)은 엘라스틴에만 존재하는 아미노산으로서 엘라스틴 단백질의 지표로 활용되는 대표적인 아미노산입니다. 이들은 혈관 질환 및 피부 노화 예방과 탄력 개선 기능으로 주목받는 대표적인 미용 목적 아미노산입니다.

이소데스모신과 데스모신의 경우 엘라스틴 내에서 서로 얽혀 있는 가교 결합한 구조의 이성질체 관계이기 때문에 분리에 어려움이 있습니다. 고전적인 이소데스모신과 데스모신의 정성 및 정량 분석법 중 하나는 HPLC와 OPA 유도체화법을 활용한 아미노산 분석이 있습니다. 하지만 HPLC 시스템에 기반해 OPA를 이용한 컬럼 전 유도체화 방법은 일부 아미노산 분리도 확보의 어려움과 컬럼 전 유도체화 방법에 의한 재현성 문제가 존재합니다.

Sykam 자동 아미노산 분석기는 닐하이드린 반응액을 이용한 컬럼 후 유도체화법에 기반한 자동 아미노산 분석기입니다. 구성 아미노산, 유리 아미노산 및 생체 아민 분석 등의 다양한 어플리케이션을 지원합니다. 분리 컬럼으로 사용되는 아미노산 분리 컬럼 LCA 시리즈와 구연산 완충 용액은 고 분리도, 고 정밀성 그리고 뛰어난 내구도를 동시에 제공해 사용자에게 최상의 사용 경험을 제공합니다.

본 어플리케이션 노트는 Sykam 자동 아미노산 분석기의 보편적인 유리 아미노산 분석 시스템 구성을 통한 이소데스모신 및 데스모신과 35종 유리 아미노산과의 동시 분석을 시연합니다. 이는 사용자가 별다른 컬럼, 이동상 등의 변경 없이 간단한 분석법 조절을 통해 매우 우수한 분리도로 분석할 수 있음을 보이며 이는 Sykam 자동 아미노산 분석 시스템의 우수함을 나타내는 대표적인 예시입니다.

### 장비

본 어플리케이션 노트에서 사용된 자동 아미노산 분석 시스템은 Sykam S 433의 유리 아미노산 분석 시스템을 사용합니다.

| 종류         | 이름                               |
|------------|----------------------------------|
| 이동상 펌프     | S 2100 Solvent Delivery System   |
| 반응액 펌프     | S 4300 Amino Reaction Module     |
| 시료 주입 장치   | S 5200 Autosampler               |
| 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. 물론 사용자는 직접 이동상 및 닐하이드린 반응액을 제조해 사용할 수 있습니다. 이동상 제조와 관련된 내용은 SOP\_4110\_Sodium\_Buffers\_V1.0를 참고합니다.

| 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          |

| 종류          | 제품 번호   | 제품명                       |
|-------------|---------|---------------------------|
| 유리 아미노산 표준품 | S000031 | Sykam GmbH                |
| 이소데스모신      | I815051 | Toronto Research Chemical |
| 데스모신        | D296845 | Toronto Research Chemical |

## 이동상 및 표준 용액 준비

분석에 사용할 표준 용액 제조는 모두 시료 희석 용액(Cat. No.: 60 01 015) 으로 희석했습니다.

먼저 유리 아미노산 표준품은 Sykam GmbH의 35종 유리 아미노산 표준용액 Type PH를 사용했으며 개봉 후 즉시 희석 용액에 5배 희석했습니다. 이소데스모신 및 데스모신은 개봉 후 즉시 각각 1.00, 1.37 mg을 시료 희석 용액 50 ml에 희석했습니다. 이런 방법으로 준비한 세개의 용액을 표준 원액이라고 합니다.

이소데스모신, 데스모신 표준 원액을 1:1로 혼합한 뒤 시료 희석 용액에 다시 2배 희석한 것을 이소데스모신, 데스모신 혼합 표준 용액으로 사용했으며 유리 아미노산 표준 원액, 이소데스모신, 데스모신 세 표준 용액을 각 2:1:1 농도로 희석한 용액을 37종 아미노산 표준 용액으로 사용했습니다.

사용 후 남은 표준 원액은 용액 상층부를 질소 가스로 치환해 영하 35도 이하로 급속 냉동하여 시료의 변성을 방지합니다. 이렇게 보관된 표준 원액 중 유리 아미노산 표준 용액은 최소 3개월, 이소데스모신, 데스모신 표준 원액은 1년 이상 안정적입니다.

## 아미노산 분석 시스템 준비 및 안정화

아미노산 분석은 다양한 아미노산을 동시에 분리하기 위해 적합한 절차에 따라 충분한 안정화가 요구됩니다. 먼저 기존의 이동상은 모두 비워낸 뒤 새롭게 개봉한 이동상으로 채웁니다. 이후 공기와의 접촉을 최소화하기 위해 99.99% 순도의 질소 가스로 용액병 내부 공기를 치환합니다. 세척 용액으로는 물: 에탄올: 이소프로필알콜 = 50: 25: 25 혼합 용액을 사용하며 닐하이드린의 경우 1 ml의 활성 용액을 첨가한 뒤 충분한 용액 버블링(퍼징 혹은 Sparging) 후 질소 가스로 치환합니다. 보다 자세한 아미노산 분석을 위한 분석 시스템 준비 및 안정화는 사용자 매뉴얼인 **아미노산 분석기 사용 가이드**에 따라 적합한 절차로 준비합니다.

## 크로마토그래피 조건

표준 유리 아미노산과 이소데스모신 및 데스모신을 동시에 분석하기 위해선 일부 분석법이 조정되어야 합니다. 세부 분석 조건은 다음과 같습니다.

| 항목         | 조건                                     |
|------------|--|
| 암모니아 필터 컬럼 | LCA K05/Li, 100 * 4.6 mm               |
| 아미노산 분리 컬럼 | LCA K07/Li, 150 * 4.6 mm               |
| 이동상        | Citrate Buffer Li A-1/B-1/C-4/Reg.Sol. |
| 컬럼 유속      | 0.450 ml/min                           |
| 반응액 유속     | 0.300 ml/min                           |
| 컬럼 온도      | 35 - 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          |
| 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          |
| <b>83.10</b> | <b>0.0</b> | <b>0.0</b> | <b>93.0</b> | <b>7.0</b>   |
| <b>91.00</b> | <b>0.0</b> | <b>0.0</b> | <b>93.0</b> | <b>7.0</b>   |
| 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          |

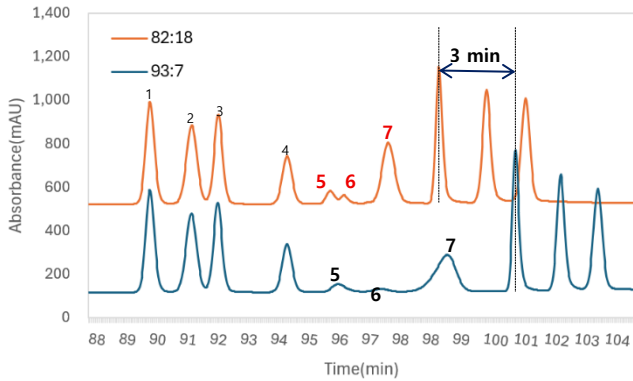
온도 조건은 다음과 같습니다.

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

사용자의 시스템 환경 및 컬럼에 따라 분석 결과는 조금씩 상이할 수 있습니다. 따라서 사용자는 본 어플리케이션 노트에서 제시하는 이동상 조성비를 기반으로 분석한 뒤 적절하게 조절해야 할 수 있습니다. 이소데스모신 및 데스모신은 카르노신과 트립토판 피크 사이에서 용리됩니다. 이들은 C-4&Reg.Sol. 용액이 각 93:7 비율로 혼합될 때 분리가 최적화됩니다. 이는 이동상 그래디언트 표의 파란색으로 강조된 부분입니다. 만약 이소데스모신 - 데스모신 분리도가 낮은 경우 93:7 비율의 그래디언트 단계를 연장한 뒤 다시 분석합니다. 일반적으로 표준 유리 아미노산 분석에서 93:7 그래디언트는 88분에 종료되는데, 이를 91 분 혹은 92분으로 연장하여 사용합니다.

다음은 이소데스모신과 데스모신이 C&D 혼합비가 각각 82:18, 93:7일 때의 분리도 비교입니다.

이동상 조성비에 따른 분리도 비교



| 번호 | 물질명           | 분리도(93:7)    | 분리도(82:18)   |
|----|---------------|--------------|--------------|
| 1  | Histidine     | > 2.500      | > 2.500      |
| 2  | 1-M-His       | 2.228        | 2.223        |
| 3  | 3-M-His       | 1.432        | 1.438        |
| 4  | Carnosine     | 3.947        | 3.918        |
| 5  | Iso-desmosine | 2.298        | 2.438        |
| 6  | Desmosine     | <b>1.685</b> | <b>0.868</b> |
| 7  | Tryptophan    | 2.021        | 2.291        |

이소데스모신 및 데스모신의 분리도를 최적화했을 때 개별 아미노산의 분리도를 1.5 이상 얻을 수 있었습니다.

## 결과 및 논의

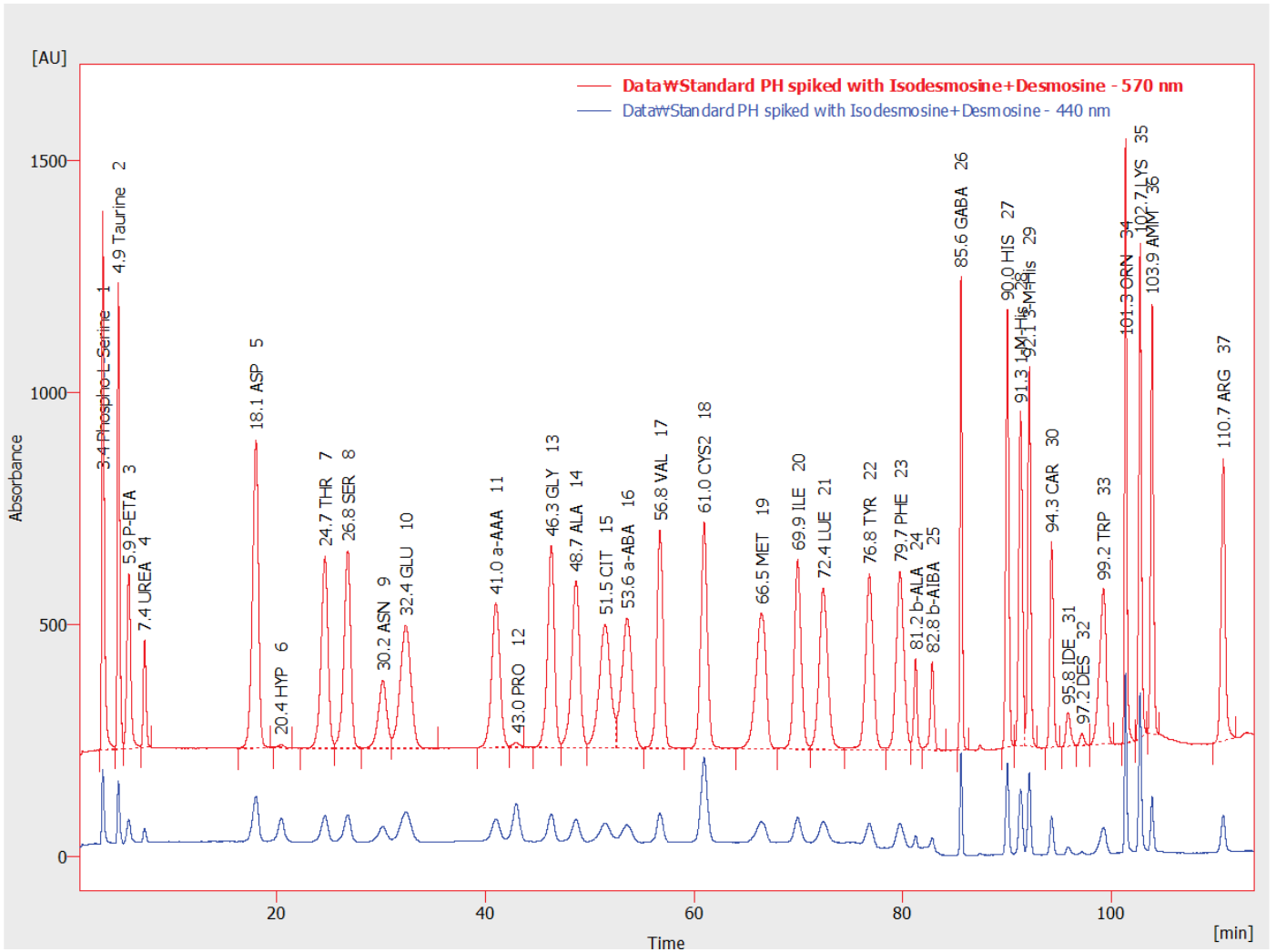
유리 아미노산 분석을 위해 사용되는 Sykam 아미노산 분석기와 아미노산 분리 컬럼 LCA K07/Li를 그대로 사용해 별다른 이동상이나 컬럼의 변경 없이 매우 간편한 방법으로 뛰어난 분리도를 얻을 수 있었습니다. 이소데스모신과 데스모신은 각각 1.5 이상의 분리도를 얻어 베이스라인 분리를 얻었습니다. 이는 서문에서 강조한 것처럼 Sykam 자동 아미노산 분석기와 아미노산 분리 컬럼 LCA 시리즈의 매우 뛰어난 선택성 및 분리도를 증명하는 또다른 사례입니다.

3-methyl-histidine(3-M-His)의 분리도는 93:7 그래디언트의 시작 시간에 강하게 영향을 받으며 그래디언트 시작 시간을 일부 조정하면 이 역시 매우 높은 분리도를 얻을 수 있습니다. 하지만 대부분의 엘라스틴 및 콜라겐 원료는 6 M 염산을 이용한 산 가수분해 과정을 이용하는 시료 전처리 방법이 필요합니다. 이는 물리, 화학적으로 가혹한 조건으로써 이 과정 중 대부분의 1,3-M-His 두 아미노산은 모두 분해됩니다.

대부분의 엘라스틴 및 콜라겐 시료는 매우 미량의 이소데스모신 및 데스모신 함량을 보입니다. 이에 따라 실제 분석 환경에서는 평소와는 다르게 매우 높은 농도의 시료가 주입되어야 합니다. 매우 높은 농도의 시료의 주입은 대표적으로 컬럼에 무리를 주는 원인 중 하나인데, Sykam 아미노산 분리 컬럼 LCA 시리즈는 7 um Poly(styrene-co-divinylbenzene)에 기반한 컬럼으로써 매우 우수한 컬럼 수명을 자랑합니다. 이를 통해 반복된 고 농도 시료 주입에도 뛰어난 저항성을 가집니다.

뛰어난 선택성, 높은 분리도 그리고 긴 수명을 동시에 제공하는 Sykam 자동 아미노산 분석기 시스템은 쉽고 일관된 아미노산 분석 환경을 제공합니다.

다음 사진은 37개 전체 피크를 나타내는 크로마토그램 예시입니다.



© 2025 ㈜아주과학 모든 권리 보유. 그 어떠한 허락되지 않은 수정 및 배포는 금지됩니다.  
 본 정보는 Sykam GmbH 및 ㈜아주과학의 제품 성능을 보여주는 예시입니다.  
 사양, 조건 및 가격은 변경될 수 있습니다.

