

Agilent Captiva EMR—Lipid를 이용한 생체시료 내 Vitamin D 대사산물 분석

응용 자료

임상 연구

저자

Derick Lucas & Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

개요

생체시료 내 지질은 25-hydroxyvitamin D2, D3 대사산물 분석에 방해가 됩니다. 단백질 침전과 같은 전통적인 시료 전처리 기법으로는 지질 간섭을 막을 수 없으며, 고체상 추출의 경우에는 여러 단계의 처리 및 분석법 개발이 필요합니다. Agilent Captiva EMR—Lipid를 이용하면 96-well plate 기반 *in situ* 단백질 침전 및 pass-through lipid cleanup에서 보다 믿음직하고 확신이 가는 시료 전처리를 할 수 있습니다. 최신 흡착제는 타겟하는 분석물은 그대로 두고 지질만 제거합니다. 모든 QC 농도에서 일내(Intraday) 및 일간(interday) 정확성은 90 ~ 110%, 정밀성은 RSD 10% 미만으로 나타났습니다. 기존 단백질 침전에 비해 현저하게 향상된 분석 감도 및 완전성으로 높은 지질 제거율을 자랑하며, 이는 postcolumn infusion(컬럼 전 주입), matrix effect(매트릭스 효과), phospholipid(인지질) 분석 등 실험을 통해 증명됩니다.



Agilent Technologies

소개

Vitamin D의 일반적인 분석은 혈청, 혈청과 같은 생체시료 내 25-hydroxyvitamin D2, D3(25-OH D2 & D3) 대사산물 모니터링을 통해 진행됩니다. LC/MS/MS는 Vitamin D 대사산물의 정확한 정량과 분리를 위한 방법으로 널리 사용되어왔습니다. 질량분석기는 타겟 분석물질에 대해 높은 감도와 선택성을 보이는 한편, 생체시료와 같이 인지질 등의 방해성분을 포함하는 경우 이를 제거하지 않으면 분석 성능을 저해하기도 합니다. 이런 현상은 단백질 침전(PPT)과 같은 표준적인 시료 전처리 프로토콜에서 흔하게 발생합니다. 고체상 추출(SPE)은 매트릭스 간섭을 효과적으로 줄일 수 있으나, 여러 단계의 작업과 분석법 개발을 필요로 합니다.

Agilent Captiva EMR—Lipid는 혈청, 혈청, 혈액과 같은 복잡한 생체시료를 위한 PPT와 지질 cleanup 과정을 한층 개선합니다. 이 제품은 96-well plate 와 1mL 카트리지 타입이 있으며, *in-situ* PPT를 가능하게 하는 용매 머무름 frit이 함께 들어 있습니다. 침전된 단백질은 필터링을 거치고, 용리액은 cleanup을 위해 EMR—Lipid 흡착제를 통과합니다. 상업적으로 시판되는 여타 지질 제거 제품과 달리 Captiva EMR—Lipid는 막힘 현상이 잘 일어나지 않으며, 선택성이 뛰어난 최신 흡착제를 사용하고 있습니다¹. 크기 배제 및 소수성 상호작용 메커니즘의 조합을 통해 지질이 제거되어, 정제된 용리액을 분석에 사용할 수 있습니다.

이 응용 자료는 혈청 내 25-OH D2 및 D3에 대한 LC/MS/MS 분석을 검증하는 내용을 담고 있습니다². 분석법의 안정적인 성능을 증명하기 위해 일내 (intraday) 및 일간(interday) 정확성 및 정밀성이 측정되었습니다. Captiva EMR—Lipid의 효과적인 *in situ* 단백질 침전 및 정제 추출 기능은 matrix effect, postcolumn infusion, phospholipid 분석 등 실험을 통해 증명되며 신뢰성, 완전성이 한층 향상된 분석법을 제공합니다.

LC 구성 및 파라미터

구성	
Agilent 1290 Infinity II high speed pump (G7120A)	
Agilent 1290 Infinity II multisampler (G7167B)	
Agilent 1290 Infinity II multicolumn thermostat (G7116B)	
Analytical column	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 μm, LC column (699775-902)
	Agilent InfinityLab Poroshell 120, EC-C18, 2.1 × 5 mm, 2.7 μm, guard column (821725-911)
컬럼 온도	30 °C
주입량	20 μL
이동상 A	물 + 0.1% 포름산
이동상 B	메탄올 + 0.1% 포름산
유속	0.5 mL/min
이동상 변화도:	Hold 0.5 minutes at 75 % B, ramp to 98 % B at 4 minutes, hold at 98 % B to 5 minutes
Post time	2 min

MS/MS 구성 및 파라미터

구성	
Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS with Agilent Jet Stream	
MS/MS 모드	Dynamic MRM
이온 모드	Positive
건조 가스 온도	250 °C
건조 가스 유속	5 L/min
Nebulizer 압력	45 psi
Sheath 가스 온도	325 °C
Sheath 가스 유속	11 L/min
캐필러리 전압	5,000 V
EMV	200 V
노즐 전압	1,500 V

화합물	Precursor ion	Quantifier ion	Qualifier ion	Collision energy(V)	Frag (V)
25-OH D2	413.3	395.3	355.3	4	115
25-OH D2-d ₃	416.3	398.3	—	4	115
25-OH D3	401.3	365.3	383.3	4	115
25-OH D3-d ₃	404.3	386.3	—	4	115

실험

시료 전처리

- Agilent Captiva EMR—Lipid 96-well plate (5190-1000); (5190-1001 [5/pk])
- Captiva 96-deep well collection plate, 1 mL (A696001000)
- Agilent CaptiVac vacuum collar (A796) 및 gasket kit (A796G)
- Agilent Captiva 96-well plate cover, 10/pk (A8961007)
- DuoSeal 96-well plate seal, 10/pk (A8961008)

정확성 및 정밀성 검증 실험

화학물질 및 시약

인간 혈장, Vitamin D가 제거된 혈장, 인간 혈청은 Golden West Biological Inc.에서 제공되었습니다. 인간 혈청은 정량화 연구에, 혈장은 매트릭스 제거 평가에 사용되었습니다. 표준품 및 내부 표준물질은 Sigma-Aldrich에서 100µg/mL 용액 형태로 구입하였습니다. 시료 전처리 시약 및 LC 용매는 Honeywell에서 구입하였습니다.

검증 연구

Vitamin D 대사산물을 위한 Captiva EMR—Lipid 프로토콜은 3일에 걸쳐 별개의 시료군에서 실험되었습니다. 시료군은 각각의 농도에 따른 2개의 double blank, 8개의 blank, 7개의 calibrator, 6개의 quality control(QC)로 구성되었습니다(표 1). QC는 2개 검량선 세트 사이에 일괄 처리되었으며, 25-OH D3은 10, 20, 50, 100, 250, 500, 750ng/mL 농도로, 25-OH D2는 20, 30, 50, 100, 250, 500, 750ng/mL 농도로 준비되었습니다. 동위원소 라벨이 부착된 내부 표준물질 25-OH D3-d₃, 25-OH D2-d₃은 250ng/mL 농도로 스파이킹 되었습니다.

시료 전처리

calibrator 및 QC 시료의 전처리

calibrator 및 QC 시료는 적절한 농도로 미리 스파이킹 한 후 완전히 혼합하였습니다. 그 다음 단계로 100µL의 혈청 시료를 96-well 시료 플레이트로 옮긴 후, 10µL 내부 표준물질을 스파이킹합니다. 시료 플레이트는 매트릭스로 덮어 볼텍스 처리되었습니다. 다시 옮기고 흡입 혼합하기 위해 96-well plate 피펫을 사용했습니다.

Agilent Captiva EMR—Lipid 절차

1. Captiva EMR—Lipid plate well에 1% 포름산이 들어 있는 아세트니트릴 400 µL를 첨가합니다.
2. 시료 플레이트의 혈청 100µL를 PPT용 EMR—Lipid plate well로 옮깁니다.
3. 용매/혈청을 5회 흡입 후 배출의 방법으로 혼합합니다.
4. 침전이 완료될 때까지 1분간 기다립니다.
5. CaptiVac vacuum collar를 EMR—Lipid plate와 collection plate 사이에 넣고 1-2” Hg 진공으로 흘리기 시작합니다. 96-well collection plate에서 여과액을 수집합니다.
6. 1방울/5s의 속도를 유지하면서 필요한 경우 진공을 확장합니다.
7. 10” Hg 진공을 1분간 적용해 용리를 완료합니다.
8. 플레이트 매트릭스로 collection plate를 덮으면 분석을 위한 시료 준비가 끝납니다.

표 1. 시료 ID 및 QC 농도

Sample ID	정의	25-OH D2	25-OH D3
		농도(ng/mL)	농도(ng/mL)
LLOQ	최소 정량 한계	10	20
LQ	Low QC	20	30
MQ	Mid QC	250	250
HQ	High QC	500	500
ULOQ	최고 정량한계	750	750

결과 및 토의

직선성

데이터는 MassHunter 정량분석 소프트웨어로 처리하였습니다. 직선회귀분석과 $1/x^2$ 중량계산을 통해 얻은 25-OH D2, D3(농도 범위 10–750ng/mL)의 검량선 R^2 값 범위는 0.992 ~ 0.997입니다(그림 S1). 모든 calibrator의 정확성은 기대값의 $\pm 10\%$ 이하입니다.

정확성 및 정밀성 결과

이 연구의 탁월한 결과는 표 2의 일내 결과 요약 및 표 3의 일간 결과 요약에 잘 나타나 있습니다. 모든 QC의 정확성 범위는 90 ~ 110%, RSD는 10% 미만이었습니다. Captiva EMR—Lipid가 25-OH vitamin D를 보존하지 않는다는 것을 시연하기 위해 postspiked 검량선과 내부 표준물질 보정 없는 prespiked 혈청 시료를 이용해 QC의 절대 회수율을 측정했습니다. 절대 회수율 범위는 모든 농도에서 89 ~ 106%, RSD는 15% 미만이었습니다(표 S1). 그 어떤 blank 나 double blank 시료에서도 교차오염이 검출되지 않았습니다.

매트릭스 제거

혈장과 같은 생체시료에는 단백질, 인지질 등 분석에 악영향을 미치는 간섭물질이 존재합니다. 단백질은 위에 기술된대로 *in situ* 기반 PPT에서 1:4 비율의 시료/1% 포름산이 들어 있는 아세트니트릴을 이용해 효과적으로 제거되었습니다. 여러 기법을 활용하여 인지질 제거율과 이온 억제 효과를 평가하였습니다.

표 2. 인간 혈청 내 25-OH D2 및 D3 검출법의 일내 정확성 및 정밀성(각 QC 농도에서 n = 6)

	25-OH D2		25-OH D3	
	정확도(%)	%RSD	정확도(%)	%RSD
Day 1				
LLOQ	97.2	4.7	106.8	9.9
LQ	97.8	5.8	104.1	5.9
MQ	96.0	5.3	93.4	2.8
HQ	107.3	4.9	105.1	2.7
ULOQ	101.9	2.7	101.5	3.1
Day 2				
LLOQ	108.4	5.8	108.3	6.6
LQ	101.2	4.8	99.3	7.4
MQ	108.7	5.6	108.1	4.7
HQ	105.4	3.6	108.7	2.7
ULOQ	104.3	2.9	109.1	1.5
Day 3				
LLOQ	99.1	5.6	109.4	8.1
LQ	92.9	4.8	99.2	5.4
MQ	105.0	4.6	104.0	4.0
HQ	106.0	3.1	105.8	3.0
ULOQ	105.6	2.7	109.1	3.7

표 3. 일간 QC 시료의 정확성 및 정밀성 결과(n = 18)

	25-OH D2		25-OH D3	
	정확도(%)	%RSD	정확도(%)	%RSD
LLOQ	101.6	5.4	108.2	8.2
LQ	97.3	5.1	100.9	6.2
MQ	103.2	5.2	101.9	3.8
HQ	106.2	3.9	106.5	2.8
ULOQ	103.9	2.8	106.6	2.8

LC/MS/MS의 인지질 제거 모니터링

MS/MS precursor ion scan($m/z = 184$)을 이용한 인지질 제거 분석 결과를 그림1에 표시하였습니다. 존재비가 높은 파란색 곡선은 PPT만 적용했을 때 제거되지 못한 혈장 인지질을 나타냅니다. 존재비가 낮은 적색, 녹색, 검정색 검출물은 Captiva EMR—Lipid cleanup 후 3회 실행된 3개 혈장 시료 분석 결과입니다. Captiva EMR—Lipid 에서 제거된 매트릭스를 공식 1로 계산한 결과 99.53%로 나타났습니다.

$$PLR \% = \frac{(\text{Peak Area}_{\text{Blank no cleanup}} - \text{Peak Area}_{\text{Blank Captiva cleanup}})}{(\text{Peak Area}_{\text{Blank no cleanup}} - \text{Peak Area}_{\text{Reagent blank}})} \times 100$$

공식 1. 총 피크면적을 이용한 인지질 제거율(% PLR) 계산

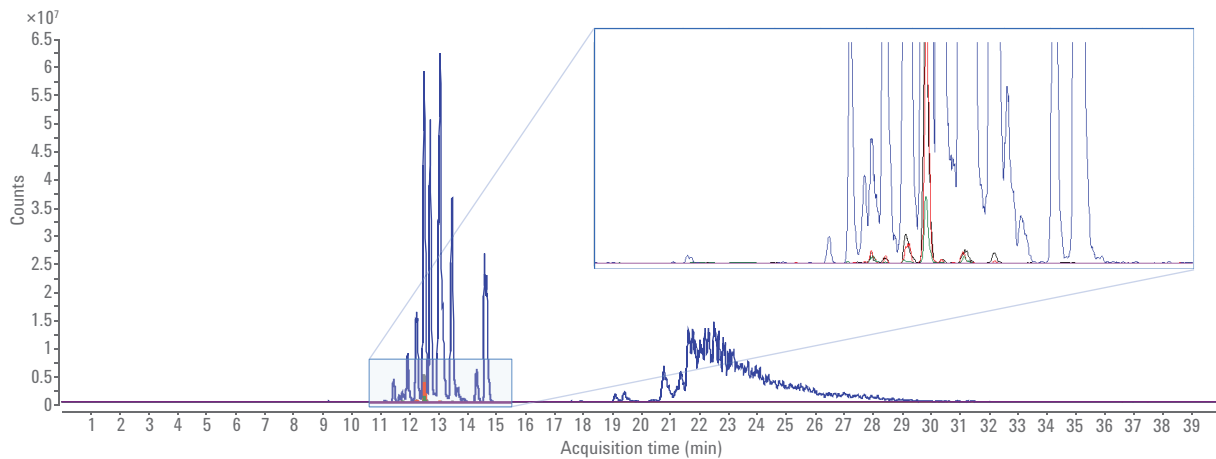


그림 1. $m/z = 184$ 의 인지질 분석 product ion scan 중첩 크로마토그램. 파란색 곡선=PPT; 적색, 적색, 검은색 곡선=Agilent Captiva EMR—Lipid (n = 3)

매트릭스 효과

50ng/mL 농도에서 25-OH D2, D3으로 혈장 시료를 postspike한 후 Captiva EMR—Lipid 워크플로(A) 및 PPT(B)를 통해 감응 재현성과 상대 피크면적을 비교합니다. 그림 2에서, Captiva EMR—Lipid cleanup은 매우 일관된 피크면적을 보여주며 RSD는 3% 미만이었습니다. PPT 시료는 Captiva EMR—Lipid 처리 시료보다 80% 낮은 분석물 감응 및 RSD 25%를 초과하는 분산된 피크면적을 나타냈습니다.

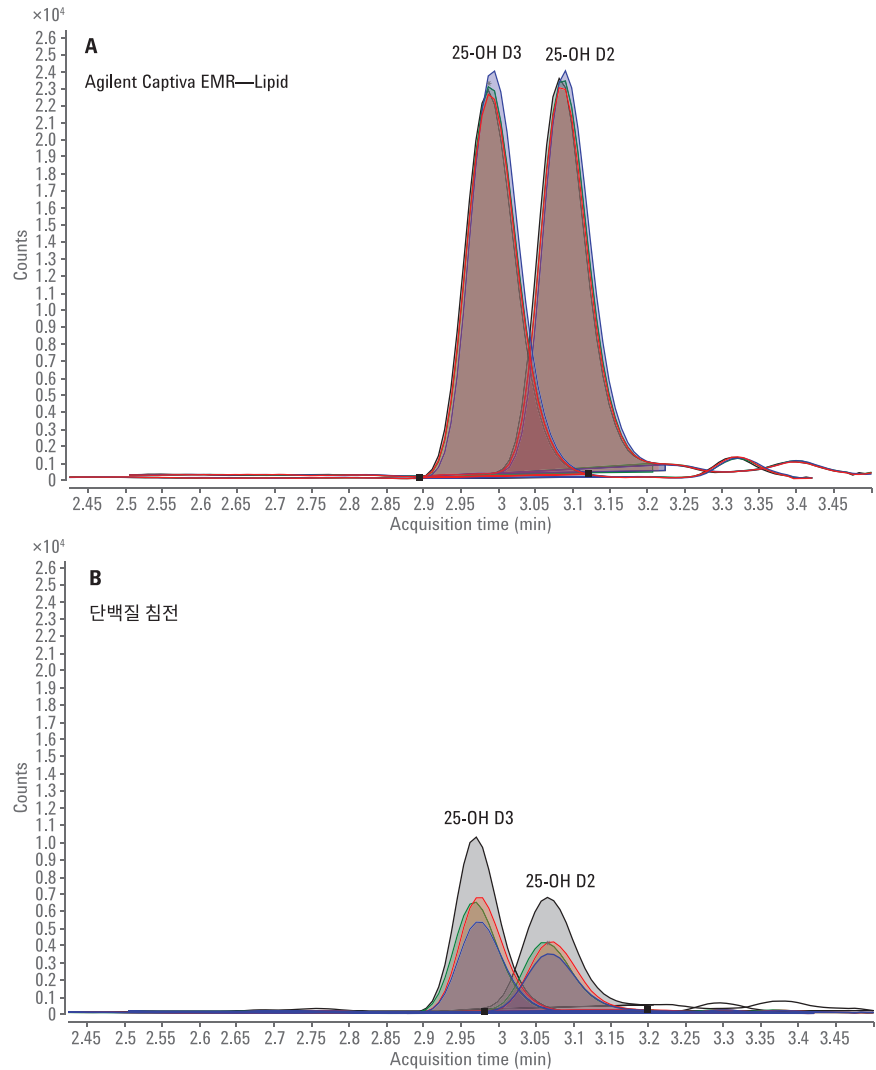


그림 2. Agilent Captiva EMR—Lipid cleanup(A)과 PPT(B)를 통해 얻은 50ng/mL 인간 혈장 내 1) 25-OH D2 (m/z 313.3 >295.3)와 2) 25-OH D3 (m/z 303.3 >265.3)의 MRM 중첩 크로마토그램

표준 postcolumn infusion

표준 postcolumn infusion은 분석 대상인 25-OH vitamin D 화합물의 매트릭스 효과를 평가하는 정성 방법으로 사용되었습니다. 시린지 펌프를 이용해 25-OH D2 및 D3 용액 50ng/ml를 90 μ L/h의 유속으로 LC 컬럼 이후의 T-in으로 펌핑합니다(LC 분석법도 함께 작동). 그 다음 혈장 blank 시료를 주입하여 매트릭스/지질이 용출되는 억제 영역(suppression zone)을 생성했습니다. 그림 3은 그림 3B의 중첩 크로마토그램에서 억제 영역과 함께 용출된 25-OH D2와 D3을 보여줍니다. 그림 3A의 중첩 크로마토그램은 Captiva EMR—Lipid로 인해 제거된 시그널 억제와 그로 인해 현저하게 향상된 분석물 감응을 보여줍니다.

Agilent Captiva EMR—Lipid를 이용한 시료 전처리

EMR—Lipid plate는 사용이 쉽고 효율적인 cleanup 성능과 높은 분석물 회수율을 제공하며 정밀한 vitamin D 대사산물 분석 성능을 보유하고 있습니다. 혈장 QC 및 calibrator 시료는 철저한 혼합, 균일한 이전, 완전한 PPT를 위해 별도의 시료 플레이트 내에서 전처리되었습니다. 용매 머무름 frit은 crash 용매를 머무르게 하고 PPT 후 진공으로 인한 원활한 용매 흐름을 가능케 하였습니다. 단백질은 막힘 현상 없이 효율적으로 필터링되었으며, 바로 시료주입할 수 있는 상태의 맑은 용리액으로 나옵니다. 분석법 개발은 용리 증발 및 재용해로 향상된 분석 감도를 보여주었으나, 빠른 직접 주입 워크플로에서 선호되는 농도 및 조건과 맞지 않는 적정 감도로 인해 바람직하지 않은 면모를 보였습니다. 주의깊게 유속을 제어하여 1" Hg에서 3" Hg로 진공도를 점차 높여서 1방울/5s의 유속을 유지하도록 합니다. 다양한 시료 내의 주요 지질류 제거율은 일관되게 높았으며, 일부는 이 실험의 측정 범위조차 능가하는 성능을 보여주었습니다^{1,3}.

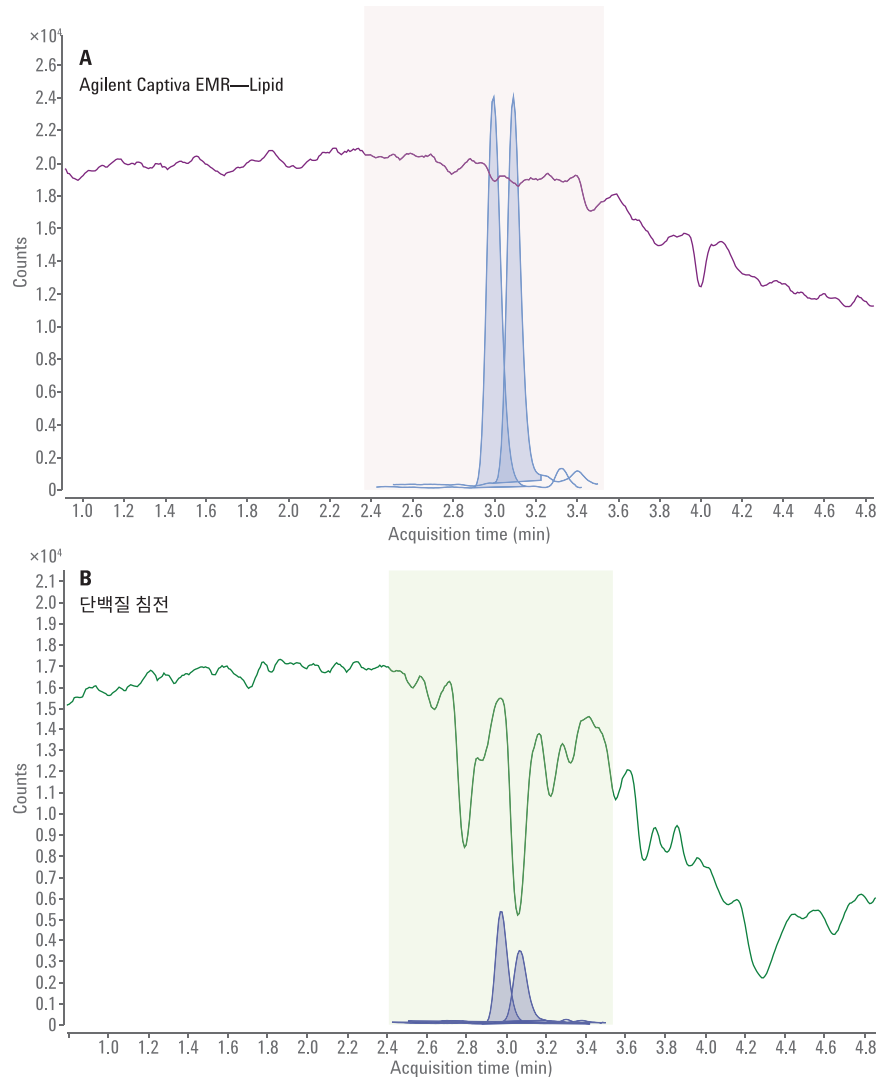


그림 3. Agilent Captiva EMR—Lipid (A)와 PPT만 (B) 통해 얻은 50ng/mL postcolumn infusion 검출물의 중첩 크로마토그램

결론

여러 날에 걸쳐 진행된 Agilent Captiva EMR—Lipid 96-well plate를 이용한 vitamin D 대사산물 검출 실험에서 탁월한 정확성(90 ~ 110%), 정밀성 (<10 %RSD), cleanup 결과(99% 이상 인지질 제거율)를 확인할 수 있었습니다. 단백질은 *in situ* 단백질 침전을 통해 막힘 현상 없이 혈장 및 혈청 시료로부터 효과적으로 필터링되었으며, 지질은 새로 개발된 EMR—Lipid 흡착제에 의해 잘 흡착되었습니다. 이 방법은 신속하고 실행이 간단하며 매트릭스 간섭을 효과적으로 제거할 수 있어 극대화된 분석 감도, 최소화된 교차오염, 높은 재현성 등을 나타냈습니다. 지질 흡착제의 우수한 감도는 다양한 등급의 약품 분석을 가능하게 하며³, 향후 다양한 등급의 다양한 잔류 성분 분석이 절실히 필요한 복잡한 식품 시료에도 응용될 수 있을 것으로 보입니다.

참조

1. L. Zhao, D. Lucas, *Agilent Technologies*, 발행물 번호 5991-8006EN
2. U.S. Department of Health and Human Services (HHS), Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*, 2001

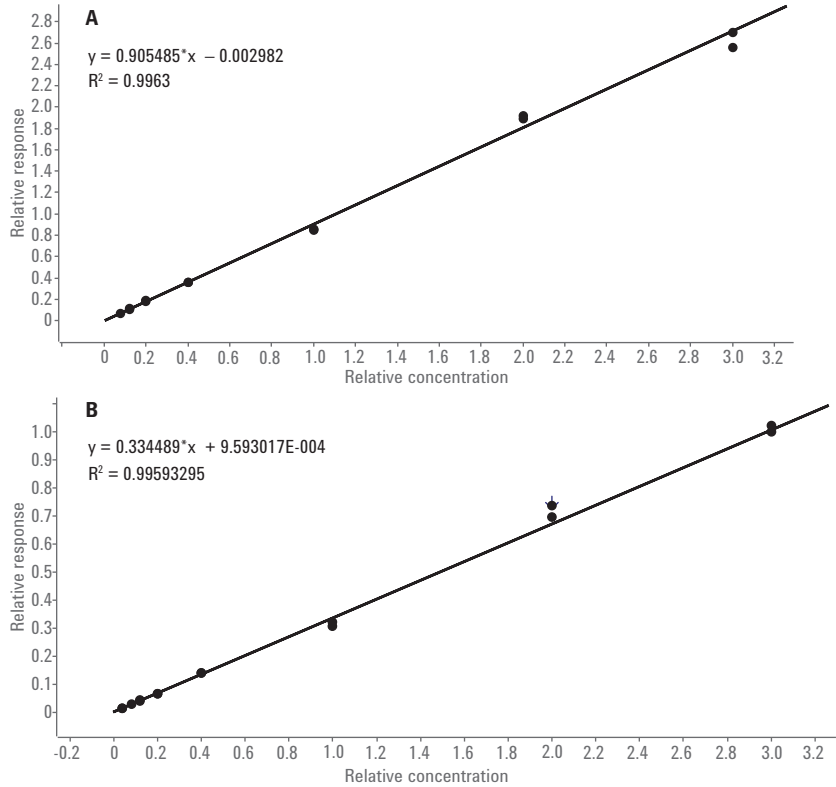


그림 S1. 25-OH D2 (A)의 20–750 ng/mL에서 선택된 검량선과 25-OH D3 (B)의 10–750 ng/mL에서 선택된 검량선

3. L. Zhao, D. Lucas, *Agilent Technologies*, 발행물 번호 5991-8007EN

표 S1. 25-OH D2와 D3의 절대 회수율 및 %RSD 수치(n=6)

	25-OH D2		25-OH D3	
	절대 회수율(%)	%RSD	절대 회수율(%)	%RSD
10 ng/mL	106.4	4.8	106.3	10.2
20 ng/mL	88.8	9.5	94.2	9.2
30 ng/mL	90.8	5.0	94.7	6.3
250 ng/mL	96.9	14.6	96.6	4.2
500 ng/mL	97.1	11.5	100.1	9.5
750 ng/mL	96.9	6.4	100.3	5.0

www.agilent.com/chem

연구 용도에만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
 2017년 7월 11일 한국에서 발행
 5991-7956KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
 한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
 고객센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr