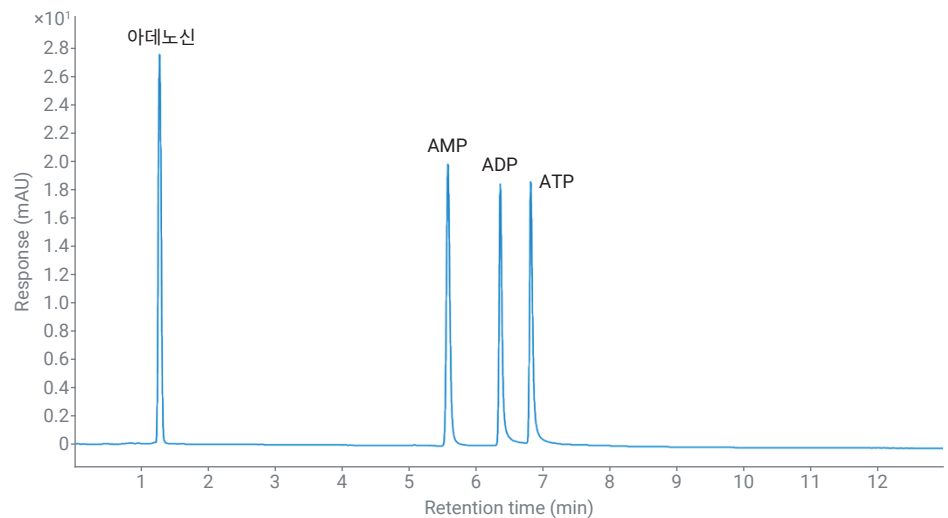


네 가지 LC 시스템에서의 뉴클레오타이드 분석 비교 연구

Bio vs 스테인리스 스틸 시스템



저자

Sonja Schneider
Agilent Technologies, Inc.

개요

인산화 화합물은 스테인리스 스틸 기반 액체 크로마토그래피(LC) 시스템으로 분석하기에 까다로운 분자입니다. 불량한 피크 모양과 시료 손실은 데이터 품질에 악영향을 줄 수 있으며, 생성된 데이터의 신뢰성을 떨어뜨립니다. 이 응용 자료에서는 아데노신 및 이에 상응하는 세 가지 뉴클레오타이드를 네 가지 애질런트 LC 시스템에서 분석하였습니다. 네 가지 중 두개는 저흡착 LC 시스템, 다른 두개는 스테인리스 스틸 기반 시스템입니다. 네 가지 시스템의 성능을 피크 모양 및 시료 손실 기준으로 비교 및 평가하였습니다. 저흡착 Bio LC 시스템 2개가 모두 스테인리스 스틸 LC 시스템에 비해 명백히 우수한 성능을 보였으며, 높은 재현성의 데이터를 생성했습니다.

서론

크로마토그래피 작업자들은 대칭적 Gaussian 피크 모양의 베이스라인 분리를 목표로 합니다. 피크 대칭성과 높은 회수율은 잘 작동되는 LC 시스템의 지표입니다. 잘 작동되는 LC 시스템은 시료와 크로마토그래피 표면 간에 원치 않거나 예측 불가능한 상호작용이 없는 것으로 여겨집니다. 흡착적 상호작용은 종종 비대칭적 피크 또는 피크 테일링 등의 피크 모양 변형으로 이어지며, 분석된 시료의 회수는 현저히 줄어든 수 있습니다.^{1,2}

인산화된 종은 특히 철이 포함된 스테인리스 스틸 성분과 인산기 사이의 상호작용으로 흐름 경로에서 피크 테일링 및 시료 손실이 발생할 수 있기 때문에 스테인리스 스틸 시스템에서 분석하기가 어렵습니다. 뉴클레오타이드는 특히 이러한 종류의 상호작용에 민감합니다³. 그러나 펩타이드, 당, 지질, 글리칸 등의 다른 인산화 화합물에서도 이러한 문제가 보고됩니다.⁴

인산화 시료와 스테인리스 스틸 성분 간의 상호작용을 방지할 수 있는 방법 중 하나로는 컨디션 절차를 수행하여 극성 표면을 비활성화하고 LC 시스템에서 금속 용출을 감소시키는 방법이 있습니다. 그러나 이 컨디션 절차는 보통 많은 시간을 필요로 하고, 강한 금속 킬레이트제 또는 산성 용액을 사용한 번거로운 플러싱 작업을 밤새 수행해야 합니다. 이런 작업은 LC 시스템을 손상시킬 수 있으며, 생산성을 떨어뜨리고 기기 수명을 단축시킬 수도 있습니다.^{2,5}

Agilent 1260 Infinity II Bio-inert LC, Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC, Agilent 1290 Infinity II Bio LC와 같은 저흡착 LC 시스템의 사용은 지루한 컨디션 절차 없이도 분석물질 회수율을 개선하고 원치 않는 상호작용을 제한합니다.² 이 응용 자료에서는 애질런트의 네 가지

LC 시스템에서 PEEK-lined HILIC 컬럼을 사용하여 아데노신 및 아데노신의 인산화 유도 물질을 분석해 그 결과를 시료 손실, 피크 모양, 재현성 면에서 비교합니다. 대상 시스템 중 2개는 저흡착 LC 시스템, 다른 2개는 스테인리스 스틸 기반 시스템입니다.

실험

장비

Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC를 구성하는 모듈:

- Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert 펌프(G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert Multisampler (G5668A), Agilent InfinityLab sample thermostat(G5668A#101) 장착
- Agilent 1260 Infinity II Multicolumn Thermostat(G7116A), bio-inert standard flow heat exchanger 장착
- Agilent 1260 Infinity II Diode Array Detector WR(G7115A), Bio-inert 표준 플로우 셀, 10mm(G4212-60007) 장착

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC 시스템을 구성하는 모듈:

- Agilent 1260 Infinity II Bio Flexible 펌프(G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II Bio Multisampler (G7137A) 및 시료 온도 조절 장치(#101 옵션)
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat(G7116B), 표준 유량의 생체 적합성 열교환기 장착(G7116-60071)
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114B), 생체 적합성 마이크로 플로우 셀(3mm, 2μL) 및 RFID 태그(G1314-60189) 장착

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템을 구성하는 모듈:

- Agilent 1290 Infinity II Flexible 펌프(G7104A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B), Sample Thermostat(옵션 #101) 포함
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat(G7116B), 표준 유량의 생체 적합성 열교환기 장착
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114B), 생체 적합성 마이크로 플로우 셀(3mm, 2μL) 장착(G1314-60187)

Agilent 1260 Infinity II LC 시스템을 구성하는 모듈:

- Agilent 1260 Infinity II Quaternary 펌프(G7111B)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167A), Sample Thermostat(옵션 #101) 포함
- Agilent 1260 Infinity II Multicolumn Thermostat(G7116A), 표준 유량의 생체 적합성 열교환기 장착
- Agilent 1290 Infinity II 가변 파장 검출기 (G7114B), 생체 적합성 마이크로 플로우 셀(3mm, 2μL) 장착(G1314-60187)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.5 이상

컬럼

InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 150, 2.7μm, PEEK-lined(제품 번호 673775-924)

화학물질

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용하였습니다. Acetonitrile(ACN)은 Merck(Darmstadt, 독일)에서 구입하였습니다. 초순수는 0.22 μ m 멤브레인 point-of-use 카트리지(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, 미국). Ammonium acetate, ammonium hydroxide, adenosine, adenosine 5'-monophosphate, adenosine 5'-diphosphate sodium salt, adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate는 Sigma-Aldrich(Steinheim, 독일)에서 구입했습니다.

시료

Adenosine, adenosine 5'-monophosphate, adenosine 5'-diphosphate sodium salt, adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate는 따뜻한 물에 용해시킨 후 80 μ M, 133 μ M, 200 μ M, 400 μ M에 혼합해 equimolar 농도를 생성했습니다.

주의: 아데노신은 차가운 물에서 용해도가 상대적으로 낮아지므로 따뜻한 물에 용해시키는 것이 가장 좋습니다.

완충액 준비

100mM의 아세트산 암모늄 용액을 조제해 pH를 9로 조절했습니다. 조제한 두 원액은 0.2 μ m 멤브레인 필터를 사용하여 여과시켰습니다. 1L의 용리액 A를 만들기 위해 100mL의 원액과 900mL의 물을 혼합했습니다. 용리액 B는 100mL의 원액과 900mL의 아세토니트릴을 혼합해 만들었습니다.

방법

표1. 크로마토그래피 조건.

파라미터	값
용매	A) 10mM 아세트산 암모늄, pH 9 B) ACN:100mM 아세트산 암모늄, pH 9 (9:1 (v:v))
그라디언트	0분: 90 %B 12분: 50 %B 13분: 50 %B 사후 시간 10분
유속	0.400mL/min
온도	35°C
검출	260nm 20Hz
주입	주입량: 1 μ L 시료 온도: 10°C 니들 세척: 물에서 3초

결과 및 토의

이 응용에서 분석 순서는 중요한 요소입니다. HPLC 장비에서 나온 금속 이온이 PEEK-lined 분리 컬럼의 성능에 영향을 줄 수 있기 때문입니다. 첫 번째로, 완전 PEEK 기반의 저흡착 시스템인 1260 Infinity II Bio-Inert LC에서 절차를 시작하였습니다. 두 번째로, 분석을 저흡착 MP35N(MP35N은 니켈-코발트 기반 합금) 기반 시스템인 1260 Infinity II Prime Bio LC로 이전하였습니다,

세 번째로, 분석을 첫 스테인리스 스틸 기반 시스템인 1290 Infinity II LC로 이전하였고, 마지막으로 네 번째 시스템인 1260 Infinity II LC로 이전하였습니다. 완전하게 동일한 용매, 시료를 사용하는 것은 중요한 사항이며, 무엇보다 중요한 것은 모든 실험에서 같은 컬럼을 사용하는 것이었습니다. 인산화된 시료의 분해를 막기 위해 모든 시료는 실험 직전에 바로 준비한 후, 10°C로 냉각하였습니다. 모든 분석은 며칠 내에 연속적으로 수행하였습니다.

Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC에서 수행한 첫 번째 분석 결과는 그림 1에 나와 있습니다. 모든 4개 피크가 베이스라인 분리를 보이고 있으며, 우수한 피크 모양 및 머무름 시간(RT) 및 면적에 대해 탁월한 상대 표준 편차(RSD)를 보여줍니다. HILIC은 역상 크로마토그래피에 비해 원치 않는 2차 상호작용이 더 흔하게 발생하기 때문에 피크 모양 면에서 어려운 부분이 있음을 유념해야 합니다.⁶ 이러한 HILIC 크로마토그래피의 까다로움을 고려했을 때 피크 모양은 테일링이 최소화된 우수한 형태로 나타났습니다.

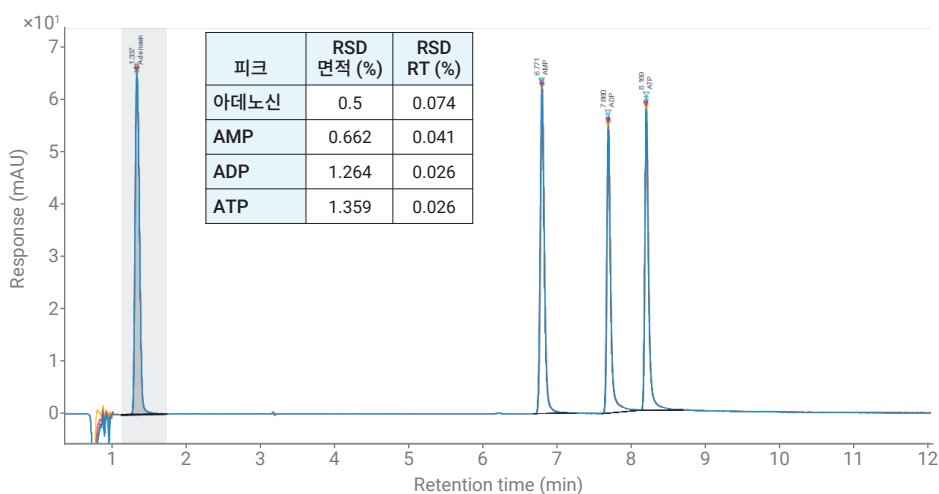


그림 1. Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC에서 뉴클레오타이드 분리, 7회 연속 실험.

Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC에서 수행한 두 번째 분석 결과는 그림 2에 나와 있습니다. 1260 Infinity II Bio-Inert LC에서 관찰한 바와 유사하게, 모든 4개 피크가 베이스라인 분리를 보이고 있으며, 우수한 피크 모양 및 머무름 시간(RT) 및 면적에 대해 탁월한 상대 표준 편차(RSD)를 보여줍니다. 아데노신 피크는 3개의 인산화된 뉴클레오타이드 피크에 비해 강도가 높게 나타나 있으며, 이는 저흡착 시스템이 아데노신 피크 모양을 보다 날카롭게 만들기 때문입니다. 그러나 4개의 뉴클레오타이드 피크 면적 퍼센트는 1260 Infinity II Bio-Inert LC 분석 결과의 면적 퍼센트와 비슷하며, 따라서 이 두가지 시스템은 뉴클레오타이드 분석 면에서 동급의 성능임을 보이고 있습니다.

1260 Infinity II Bio-Inert LC 시스템에 DAD를 사용함으로써 인해, VWD를 사용하는 타 시스템에 비해 피크 강도는 전체적으로 보다 높게 나타났습니다.

스테인리스 스틸 기반의 1290 Infinity II LC로 수행한 세 번째 분석은 전혀 다른 양상을 보였습니다(그림 3). 아데노신의 피크는 피크 높이/면적 및 모양 면에서 이전 2개의 시스템과 비슷하게 나타났으나, 3개의 인산화된 뉴클레오타이드 피크 모양은 상당히 다르게 나타났습니다. 철과 반응하는 인산기가 포함되어 있지 않은 아데노신은 이 실험에서 내부 표준물질로 여겨질 수 있으며, 모든 LC 시스템에서 완벽히 동일하게 나타날 것으로 기대됩니다. 이와 달리 AMP, 특히 ADP와 ATP에서는 상당한 테일링 현상이 나타났습니다. 또한 시료의 손실량은 분자에 결합된 인산기가 늘어날수록 커집니다(그림 5를 함께 참조). 스테인리스 스틸 캐필러리의 철과 기타 구성 요소의 상호 작용이 가시적으로 보입니다.

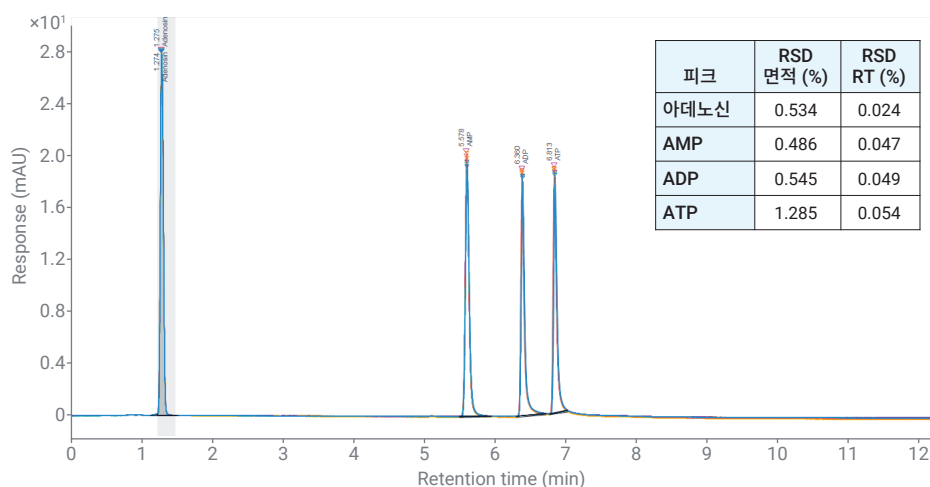


그림 2. Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC에서 뉴클레오타이드 분리, 7회 연속 실행.

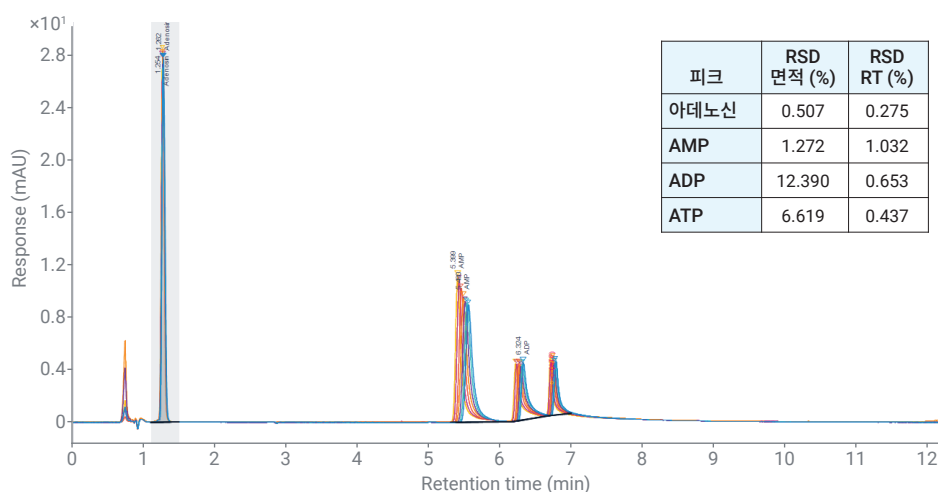


그림 3. Agilent 1290 Infinity II LC에서 뉴클레오타이드 분리, 7회 연속 실행.

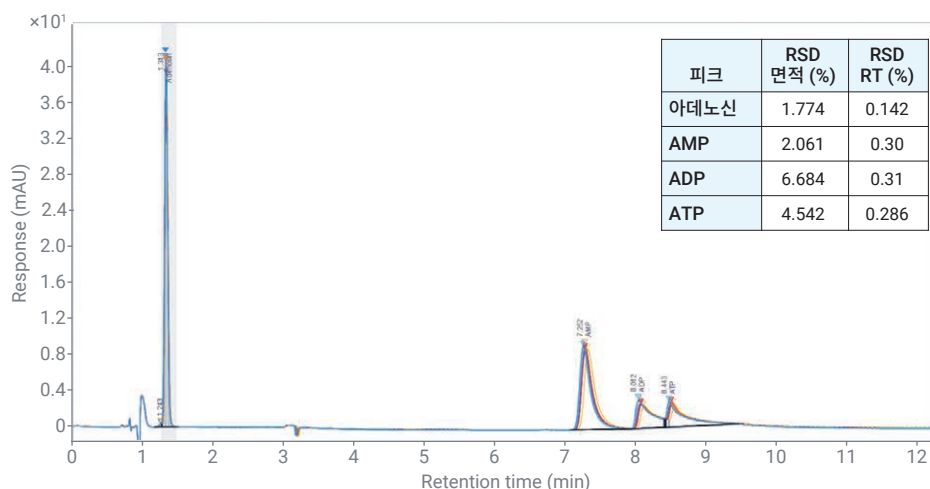


그림 4. Agilent 1260 Infinity II LC에서 뉴클레오타이드 분리, 7회 연속 실행.

1260 Infinity II LC의 분석은 1290 Infinity II LC에서의 분석과 비슷하게 인산화된 뉴클레오타이드의 높은 시료 손실 및 상당한 피크 테일링 현상을 보였습니다(그림 4와 그림 5 참조).

그림 5는 모든 네 가지 시스템 분석에서의 시료 손실량 결과를 요약해 보여줍니다. 면적 손실은 아데노신을 내부 표준물질로 사용해 계산하였습니다. 아데노신에는 인산기가 결합되어 있지 않으므로, LC의 철 포함 구성 요소와 상호작용할 것으로 예상되지 않습니다. 그러므로 면적 손실 계산에 수식을 사용했습니다(수식 1):

PEEK-cladded 캐필러리를 갖춘 1260 Infinity II Bio-inert 시스템과 기타 생물학적 비활성 재료가 가장 적합한 표준이라고 예상됩니다. 컬럼, 공급품 등의 다른 요소를 배제하기 위해 면적 손실값이 1260 Infinity II Bio-inert 시스템으로 정규화되었습니다.

첫 번째, 면적 손실은 결합된 인산기가 많을수록 늘어나기 때문에 인산염 양이 많을수록 철기반 재질과의 상호작용도 증가합니다.

두 번째, 면적 손실은 SST 시스템에서만 관찰되는 것이 분명하며, 2개의 Bio 시스템 간 면적 손실에는 차이가 보이지 않습니다. 따라서 MP35N 기반 시스템인 1260 Infinity II Prime Bio LC는 Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC와 동일하게 뉴클레오타이드 분석에 적합하다고 추론할 수 있습니다.

서로 다른 농도의 뉴클레오타이드를 분석하여 SST 기반 1290 Infinity II LC의 시료 손실에 농도가 어떤 영향을 미치는지 평가하였습니다. 그림 6은 서로 다른 농도에 따른 인산화된 뉴클레오타이드 시료 손실을

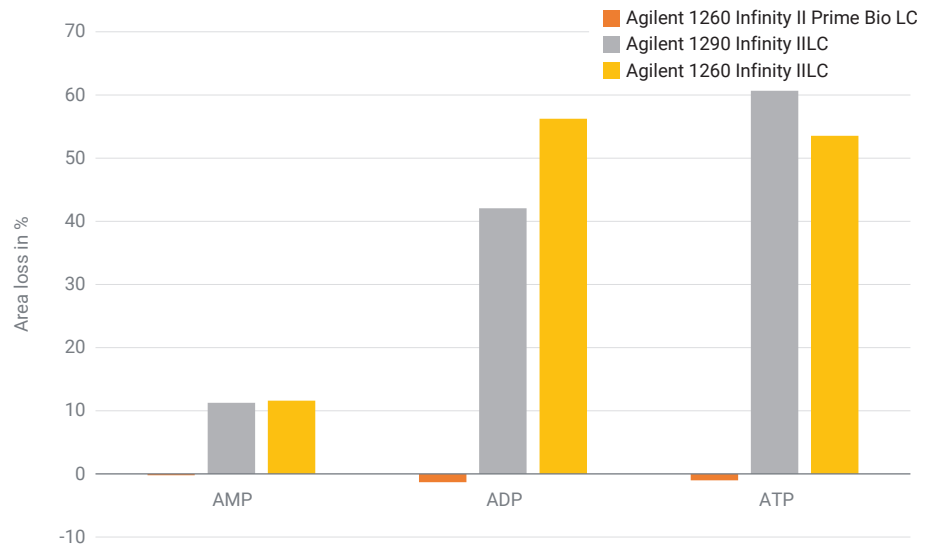
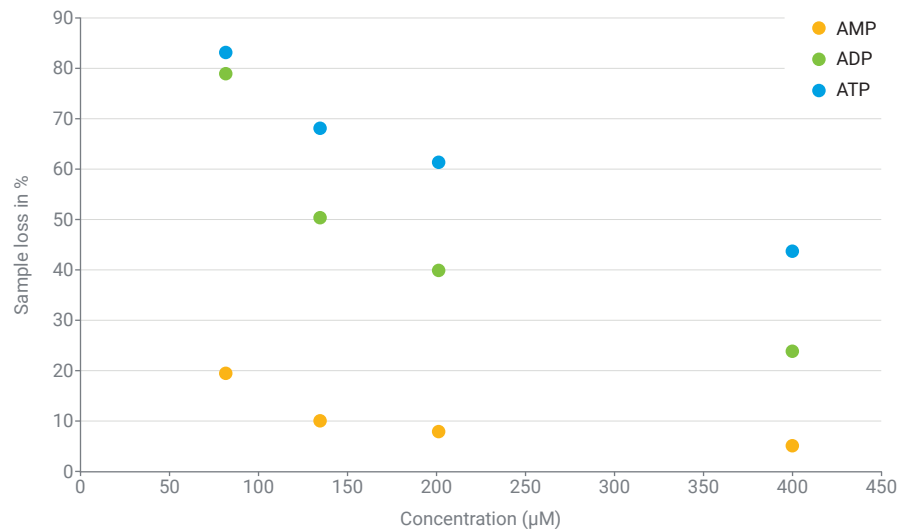


그림 5. 면적 손실 퍼센트, Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC와 비교.

공식 1.

$$\text{Area loss} = 100 - \left(\frac{A_{\text{AXP,SS}}}{A_{\text{Adenosine,SS}}} \times \frac{A_{\text{Adenosine,bio}}}{A_{\text{AXP,bio}}} \times 100 \right)$$



Sample Loss in %	80μM	133μM	200μM	400μM
아데노신	0	0	0	0
AMP	19.71	10.23	8.13	5.19
ADP	79.12	50.49	39.99	24.11
ATP	83.31	68.15	61.55	43.86

그림 6. SST 기반의 Agilent 1290 Infinity II LC에서 분석한 인산화된 뉴클레오타이드 시료 손실.

퍼센트 다이어그램으로 보여줍니다. 80, 133, 200, 400 μ M 등 네 가지 다른 농도를 분석하였습니다. 위에서 서술한대로, 시료 손실 효과는 ADP와 ATP에서 보다 뚜렷했습니다. 예를 들어 80 μ M의 낮은 농도에서 ATP의 상대적인 시료 손실은 80%를 초과했습니다. 이보다 5배 높은 400 μ M의 농도에서 ATP의 상대적인 시료 손실은 44%로 줄어들었습니다. 다시 말해 LC 시스템이 끼치는 영향은 높은 농도에서 덜했으며, 사용된 컬럼(PEEK-lines vs SST)의 효과가 보다 뚜렷했습니다³.

결론

저흡착 Bio LC 버전(완전한 생물학적 비활성의 Agilent 1260 Infinity II Bio-Inert LC 및 MP35N을 주재료로 사용하는 생물학적 호환 LC 시스템인 Agilent 1260 Infinity II Prime Bio LC)은 모두 철 성분에 민감한 인산화된 뉴클레오타이드에 대해 유사하게 뛰어난 성능을 보여주었으며, 많은 시간이 소모되는 passivation 절차는 불필요했습니다. 반대로 passivation 절차가 없었을 때 스테인리스 스틸 기반의 LC 시스템(Agilent 1290 Infinity II LC 및 Agilent 1260 Infinity II LC)은 인산화된 화합물에 대해 상당한 정도의 테일링 현상과 면적 손실을 나타냈으며, 이는 특히 ADP와 ATP에서 뚜렷했습니다. SST LC 시스템은 Bio LC 시스템에 비해 인산화된 화합물에서 둘 다 낮은 RT 정밀도와 면적 정밀도를 보였습니다. 시료 손실은 농도에 따라 크게 달라지는 것으로 관찰되었습니다. 농도가 낮을수록, 면적 손실도 뚜렷하게 드러났습니다. 따라서 이 두 가지 Bio LC 시스템을 사용하면 보다 확실하고 믿을 수 있는 데이터를 생성할 수 있을 뿐만 아니라 뉴클레오타이드 분석에서 시스템 구성 요소로 인한 시료 손실 위험을 최소화하면서 높은 재현성을 성취할 수 있습니다.

참고 문헌

1. Wakamatsu A.; Morimoto, K.; Kudoh, S. A Severe Peak Tailing of Phosphate Compounds Caused by Interaction with Stainless Steel Used for Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 1823-1830.
2. Fekete, S. Defining Material Used in Biopharmaceutical Analysis. *LCGC Europe* **2021**, 34, 245-248.
3. HPLC-DAD Analysis of Nucleotides Using a Fully Inert Flowpath. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0680EN, **2019**.
4. Tuytten, R. et al. Stainless Steel Electrospray Probe: a Dead End for Phosphorylated Organic Compounds? *J. Chromatogr. A* **2006**, 1104, 209-221.
5. Hsiao, J. J. et al. Improved LC/MS Methods for the Analysis of Metal-Sensitive Analytes Using Medronic Acid as a Mobile Phase Additive. *Anal. Chem.* **2018**, 90(15), 9457-9464.
6. Heaton, J. C.; McCalley, D. V. Some Factors that Can Lead to Poor Peak Shape in Hydrophilic Interaction Chromatography, and Possibilities for Their Remediation. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1427, 37-44.

www.agilent.com/chem

DE83266022

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 12월 2일, 한국에서 인쇄
5994-4392KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com