

# NanoLC(Nanodapter)-TQ를 이용한 극미량 물질 정량분석

## 저자

정중목  
한국애질런트테크놀로지스(주)

## 개요

Nano-liquid chromatograph(nanoLC)는 수백 nL/min의 유량을 사용하는 액체 크로마토그래프로 질량분석기와 함께 사용할 때 특징적인 낮은 유량으로 인해 이온소스에서 이온화 효율이 개선되어 감도가 높아지는 장점이 있습니다. 일반적으로 nanoLC는 미세한 유량을 생성하기 위해 특화된 전용장비를 사용해야 하지만 기존의 UHPLC(Ultra High Performance Liquid Chromatograph)에 피동 분할(Passive split) 방식의 장치를 추가 장착하여 사용할 수도 있습니다. 본 분석에서는 애질런트의 피동 분할 방식의 nanoLC인 Nanodapter를 사용하여 저분자 약물과 펩타이드의 정량분석법을 셋업하고 UHPLC-TQ(Triple Quadrupole, 사중극자)와 nanoLC-TQ 각각의 정량결과를 비교하였습니다. nanoLC-TQ의 정량 결과는 피크면적 재현성이 물질에 따라 5~8% 상대표준편차, 머무름 시간 재현성 0.2% 내외의 상대표준편차로 UHPLC-TQ의 결과와 큰 차이가 없었으며 감도 면에서는 성분에 따라 5~20배의 향상을 보였습니다.

## 서론

1988년 Karlsson과 Novotny가 최초로 시도한 이후로 nanoLC는 지속적으로 발전되어 왔습니다.<sup>1</sup> nanoLC에 대한 표준적인 정의는 확립되어 있지 않지만 사용하는 컬럼의 내경이 100µm 이하, 사용되는 유량이 25~800nL/min 정도인 LC로 받아들여지고 있습니다.<sup>2</sup> 자외선 흡광 검출기와 함께 nanoLC 단독으로 사용하기도<sup>3</sup> 하지만 TQ나 Q-TOF(Quadrupole-Time of Flight) 등의 질량분석기에 연결하여 사용할 때 성능 향상이 월등하여 주로 nanoLC-MS(Mass Spectrometer)의 조합으로 사용하고 있습니다. nanoLC-MS는 다양한 응용분야에 사용되는 데 단백질학 분야에서 일반 LC-MS에서는 검출하기 어려운 극미량 펩타이드의 검출이나<sup>4</sup> 질병 진단을 위한 미량 Biomarker(생체 표지)의 검출에 사용되며<sup>5</sup> 법의학 분야에서 미량 성분의 검출을 위해 활용되기도 합니다.<sup>6</sup> 본 분석에서는 일반 UHPLC로도 사용 가능한 피동 분할 방식의 nanoLC를 TQ에 연결하여 저분자 약물과 펩타이드를 고감도로 정량하는 분석법을 제안합니다.

## 실험

### 시료 정보

분석에 사용한 저분자 약물은 Reserpine(Agilent, G1946-85004) 이고 펩타이드는 Human Serum Albumin Standard Mix(Agilent, G2455-85001)입니다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약 및 용매는 LC-MS급으로 사용하였습니다.

### 시료 조제방법

정량분석을 위하여 표준품을 Agilent LC/MS급 water(P/N 5191-4498)와 Agilent LC/MS급 acetonitrile(P/N 5191-4496)를 사용하여 Reserpine은 30% acetonitrile(70% water)로 HSA는 10% acetonitrile(90% water)로 희석하여 분석하였습니다.

### 분석 기기 및 조건

Agilent 1290 Infinity II UHPLC 및 Nanodapter와 Agilent 6495C TQ가 본 분석을 위해 사용되었습니다. UHPLC 분석 조건은 표1, Nanodapter분석 조건은 표2, MS 분석 조건은 표3에서 확인할 수 있습니다.

표 1. UHPLC 분석법 파라미터.

파라미터	설정값		
장비	1290 Infinity II 고속 펌프(G7120A) 1290 Infinity II Multisampler(G7167B) 1290 Infinity II Integ. Column Comp.(G7116B)		
자동 시료 주입기 온도	4°C		
주입 부피	1µL		
컬럼	Agilent EP C18, 2.1x50mm, 1.8µm		
컬럼 온도	30°C		
이동상 A	0.1% Formic acid in water (LC-MS급)		
이동상 B	0.1% Formic acid in ACN (LC-MS급)		
유속	0.3mL/min		
<b>Reserpine 조건</b>			
이동상 그레디언트	시간(분)	A(%)	B(%)
	0.0	90	10
	0.1	90	10
	3.0	75	25
	4.0	5	95
	4.1	5	95
7.0	90	10	
<b>펩타이드 조건</b>			
이동상 그레디언트	시간(분)	A(%)	B(%)
	0.0	95	5
	0.1	95	5
	5.5	60	40
	5.6	5	95
	7.0	5	95
	7.1	95	5
10.0	95	5	

표 2. Nanodapter(nanoLC) 분석법 파라미터.

파라미터		설정값			
장비	1290 Infinity II 고속 펌프(G7120A) 1290 Infinity II Multisampler(G7167B) 1290 Infinity II Integ. Column Comp.(G7116B) Nanodapter(G1988-64003)				
자동 시료 주입기 온도	4°C				
주입 부피	1µL				
컬럼	트랩 컬럼: C18, 0.075mmx20mm, 3µm 분석 컬럼: C18, 0.05mmx150mm, 2µm				
컬럼 온도	실온				
이동상 A	0.1% Formic acid in water (LC-MS급)				
이동상 B	0.1% Formic acid in ACN (LC-MS급)				
이동상 그레디언트 조건(Reserpine)					
시간(분)	유속(nL/분)	A(%)	B(%)	밸브 위치	
0.0	~5000	98	2	Through trap to waste	
1.6	~5000	98	2	To waste to analytical	
2.5	~300	98	2	Through trap to analytical	
4.0	~300	40	60	Through trap to analytical	
6.0	~300	10	90	Through trap to analytical	
21.0	~300	10	90	Through trap to analytical	
23.0	~300	98	2	Through trap to analytical	
32.0	~300	98	2	Through trap to analytical	
이동상 그레디언트 조건(펩타이드)					
시간(분)	유속(nL/분)	A(%)	B(%)	밸브 위치	
0.0	~5000	98	2	Through trap to waste	
1.6	~5000	98	2	To waste to analytical	
2.5	~300	98	2	Through trap to analytical	
6.0	~300	60	40	Through trap to analytical	
10.0	~300	40	60	Through trap to analytical	
14.0	~300	10	90	Through trap to analytical	
25.0	~300	10	90	Through trap to analytical	
27.0	~300	98	2	Through trap to analytical	
36.0	~300	98	2	Through trap to analytical	

표 3. Agilent 6495C TQ 분석법 파라미터.

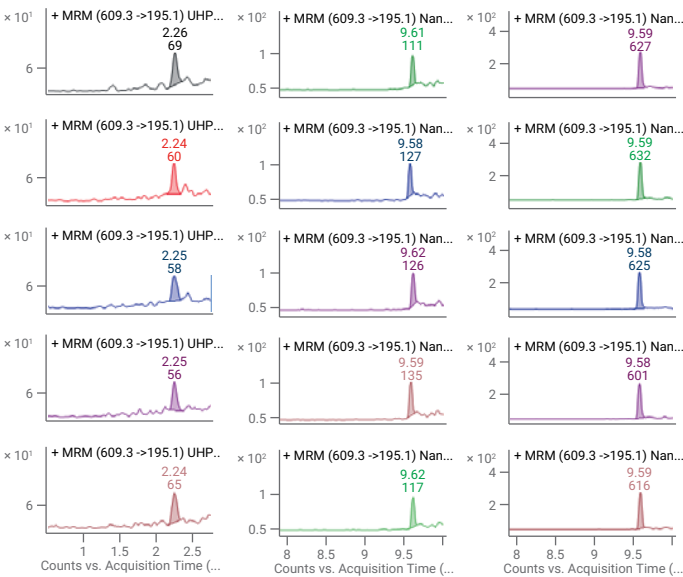
파라미터		설정값			
장비	Agilent 6495C LC-Triple Quadrupole(TQ)				
이온 소스	Electrospray Ionization(AJS ESI for UHPLC, Nano ESI for nanoLC)				
스캔 모드	MRM				
극성	Positive				
Reserpine 조건					
건조 기체 온도	200°C for AJS ESI, 225°C for Nano ESI				
건조 기체 유속	11L/min				
네블라이저 압력	40psi for AJS ESI				
Sheath gas 온도	350°C for AJS ESI				
Sheath gas 유속	12L/min for AJS ESI				
캐필러리 전압	3500V for AJS ESI, 1700V for Nano ESI				
노즐 전압	500V for AJS ESI				
iF HP/LP RF 전압	200V / 110V				
Delta EMV	200V				
MRM 조건	Comp.	Pre. Ion (m/z)	Pro. Ion (m/z)	Dwell time (ms)	CE (V)
	Reserpine	609.3	195.1	300	42
펩타이드 조건					
건조 기체 온도	200°C for AJS ESI, 225°C for Nano ESI				
건조 기체 유속	11L/min				
네블라이저 압력	40psi for AJS ESI				
Sheath gas 온도	350°C for AJS ESI				
Sheath gas 유속	12L/min for AJS ESI				
캐필러리 전압	3500V for AJS ESI, 1700V for Nano ESI				
노즐 전압	1000V for AJS ESI				
iF HP/LP RF 전압	140V / 80V				
Delta EMV	200V				
MRM 조건	Compound	Pre. Ion (m/z)	Pro. Ion (m/z)	Dwell time (ms)	CE (V)
	YL	464.3	651.4	100	13
	서열	YLVEIAR			
	LV	575.3	213.1	100	16
	서열	LVNEVTEFAK			
	AA	686.3	120.1	100	62
	서열	AAFTE[CAM][CAM]QAADK			

\* [CAM] : Carbamidomethylated Cystein.

## 결과

본 응용자료에서는 저분자 약물인 Reserpine과 생물학적 화합물인 펩타이드를 각각 UHPLC-TQ와 nanoLC-TQ로 분석한 결과를 수록하였습니다.

그림 1은 20ppt Reserpine을 UHPLC-TQ로 5회 반복 분석한 결과와 0.8ppt 및 4.0ppt Reserpine을 nanoLC-TQ로 5회 반복 분석한 결과입니다. nanoLC-TQ분석에서 0.8ppt 수준까지 면적값 기준 6.8%, 머무름시간(RT) 기준 0.17%의 상대표준편차(RSD)로 재현성 있게 분석이 가능함을 확인하였습니다.



UHPLC (20ppt) n=5			NanoLC (0.8ppt) n=5			NanoLC (4.0ppt) n=5		
	RT	Area		RT	Area		RT	Area
%RSD	0.33%	7.72%	%RSD	0.17%	6.78%	%RSD	0.06%	1.76%

그림 1. UHPLC-TQ 및 nanoLC-TQ의 Reserpine 반복 분석 결과.

또한 그림 1에서 확인할 수 있는 것처럼, nanoLC-TQ의 Reserpine 분석 결과는 0.8ppt 이하의 검출한계(LOD)를 보였으며 UHPLC-TQ의 분석 결과는 20ppt 정도의 검출한계를 보였습니다. 이는 UHPLC-TQ에 비해 nanoLC-TQ에서 Reserpine 분석 시 20배 이상의 높은 감도를 얻을 수 있다는 것을 의미합니다.

그림 2는 nanoLC-TQ를 이용하여 0.8ppt, 4.0ppt, 20ppt, 100ppt Reserpine 표준품을 분석하여 검량선과 정확도를 계산한 결과입니다. 1/x의 가중치를 주었을 때 검량선의 R<sup>2</sup>는 0.9997이며 표준품 시료 각각의 정확도는 96~106% 사이에 분포하는 결과로 해당 농도 범위에서 정량하기에 적합함을 확인하였습니다.

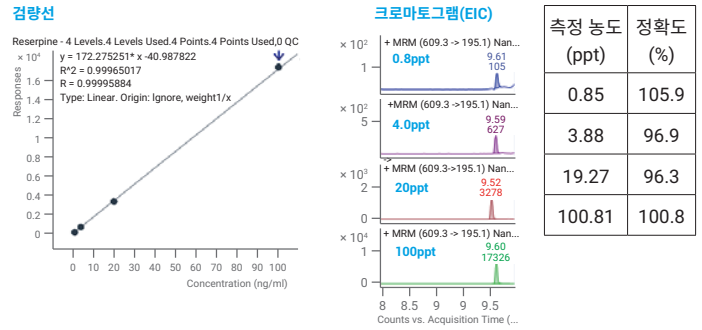


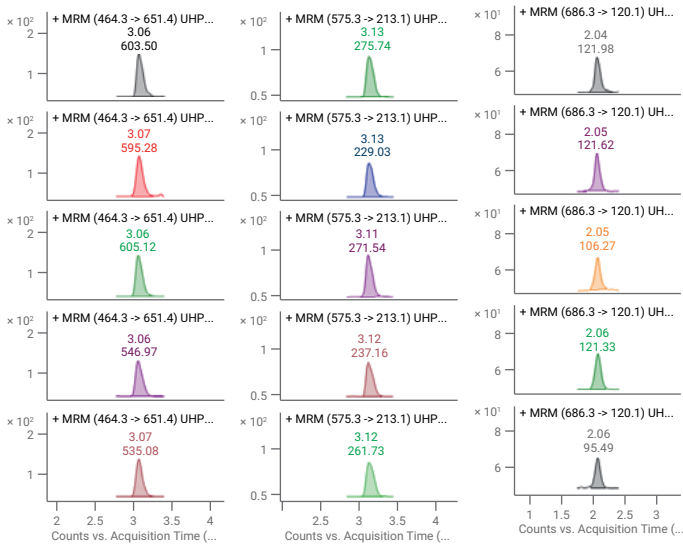
그림 2. nanoLC-TQ의 Reserpine 표준품 분석 검량선/정확도 및 크로마토그램 결과.

그림 3은 400amole(attomole, 10<sup>-18</sup>mole) 펩타이드를 UHPLC-TQ와 nanoLC-TQ로 5회 반복 분석한 결과입니다. 일반적으로 재현성 있는 결과를 얻기 어려운 펩타이드 분석이지만 nanoLC-TQ분석에서도 면적값 기준 5~8%, 머무름시간(RT) 기준 0.2% 내외의 상대표준편차로 재현성 있는 결과를 얻었습니다.

한편 그림 4에서 확인할 수 있는 것처럼, UHPLC-TQ 분석에서 YL은 16amole, LV는 16amole, AA는 80amole 수준에서 검출한계가 형성되었고 NanoLC-TQ에서 YL은 0.64amole, LV는 0.64amole, AA는 16amole 미만의 검출한계를 보였습니다. 펩타이드는 아미노산 서열에 따라 검출 감도의 편차가 상당히 크기 때문에 감도가 일률적이지 않아서 펩타이드의 개별 서열에 따라 각각의 검출한계를 구해야 합니다. 동일 펩타이드에 대하여 UHPLC-TQ와 nanoLC-TQ의 분석 결과를 비교하였을 때 nanoLC-TQ에서 5~20배 이상의 감도 향상을 얻을 수 있었습니다.

그림 5는 nanoLC-TQ를 이용하여 YL, LV, AA 펩타이드 표준품 시료를 분석한 결과입니다. YL 및 LV는 0.64 amole, 3.2 amole, 16 amole, 80 amole, AA는 16 amole, 80 amole, 400 amole, 2000 amole 농도의 표준품 시료를 분석하여 검량선과 정확도를 계산하였습니다. 1/x의 가중치를 주었을 때 YL 펩타이드 분석 결과를 보면 검량선의 R<sup>2</sup>는 0.9990이며 표준품 시료 각각의 측정 농도 정확도는 85~115% 사이에 분포하며, LV 펩타이드 분석 결과를 보면 검량선의 R<sup>2</sup>는 0.9998이며 표준품 시료 각각의 측정 농도 정확도는 97~102% 사이에 분포하며, AA 펩타이드 분석

결과를 보면 검량선의 R<sup>2</sup>는 0.9941이며 표준품 시료 각각의 측정 농도 정확도는 85~126% 사이에 분포하는 것을 확인하였습니다. 펩타이드의 특성상 서열별로 결과값의 감도나 정확도에 편차가 큰 것을 고려하였을 때 각 펩타이드를 해당 농도 범위에서 정량하기에 적합하다고 할 수 있습니다.



**UHPLC (400amole YL) n=5**

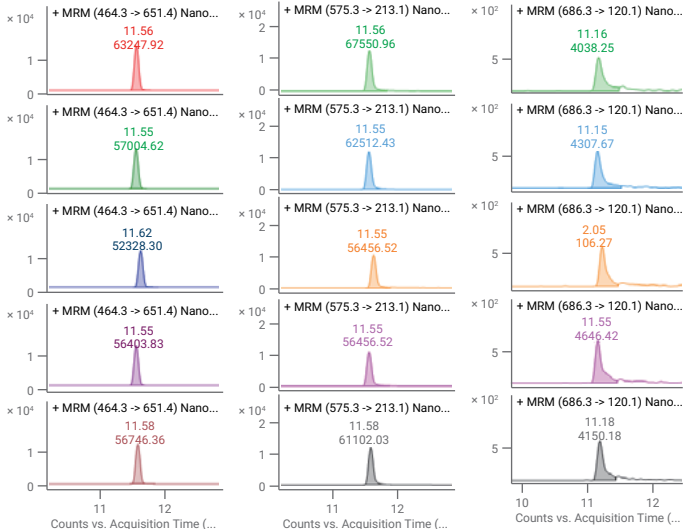
	RT	Area
%RSD	0.16%	5.20%

**UHPLC (400amole LV) n=5**

	RT	Area
%RSD	0.24%	7.39%

**UHPLC (400amole AA) n=5**

	RT	Area
%RSD	0.36%	9.67%



**NanoLC (400amole YL) n=5**

	RT	Area
%RSD	0.23%	6.12%

**NanoLC (400amole LV) n=5**

	RT	Area
%RSD	0.23%	8.22%

**NanoLC (400amole AA) n=5**

	RT	Area
%RSD	0.20%	5.54%

그림 3. UHPLC-TQ 및 NanoLC-TQ의 펩타이드 반복 분석 결과.

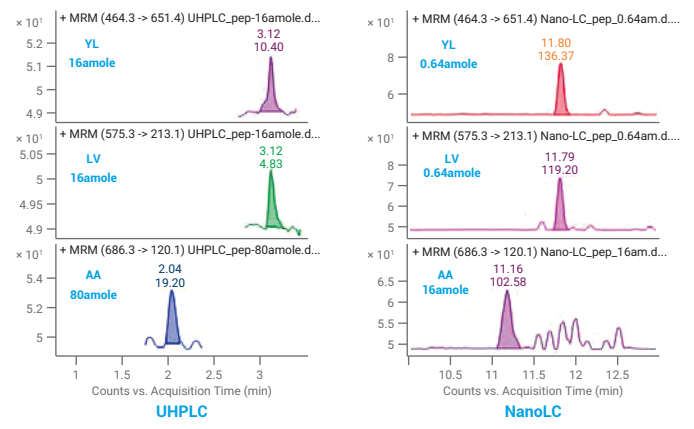
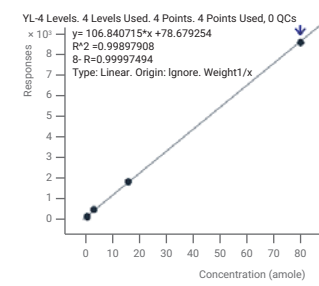
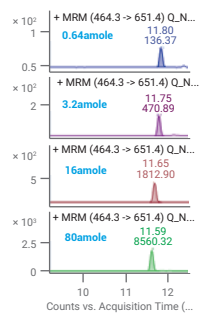


그림 4. UHPLC-TQ 및 NanoLC-TQ를 이용한 검출한계 수준의 펩타이드 분석 결과.

**Peptide: YL 검량선**

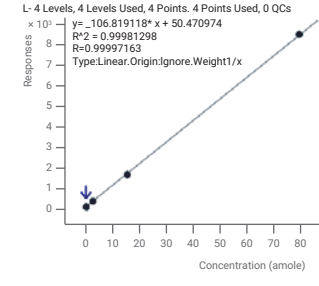


**크로마토그램(EIC)**

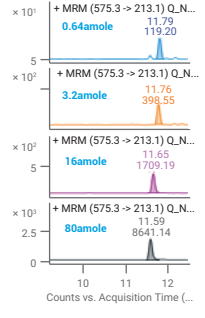


측정 농도 (ppt)	정확도 (%)
0.54	84.5
3.67	114.8
16.23	101.4
79.4	99.2

**Peptide: LV 검량선**

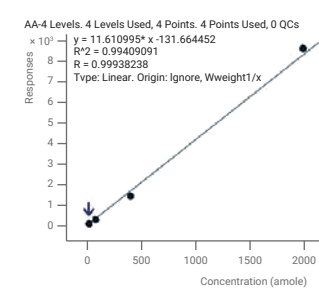


**크로마토그램(EIC)**

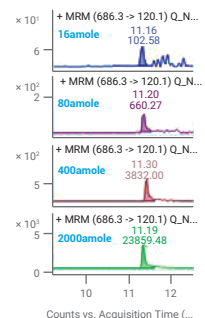


측정 농도 (ppt)	정확도 (%)
0.64	100.6
3.26	101.8
15.53	97.0
80.41	100.5

**Peptide: AA 검량선**



**크로마토그램(EIC)**



측정 농도 (ppt)	정확도 (%)
20.2	126.1
68.2	85.3
341.4	85.3
2066.3	103.3

그림 5. NanoLC-TQ의 펩타이드 표준품 분석 검량선/정확도 및 크로마토그램 결과.

## 결론 및 고찰

Agilent의 피동 분할 방식의 nanoLC인 Nanodapter와 Triple Quadrupole(TQ) 질량분석기를 결합하여 저분자 약물인 Reserpine과 3종의 펩타이드를 분석하여 정량한계, 정밀도, 정확도, 검량선 등의 지표로 정량분석 가능 여부를 검토하였습니다. Nanodapter-TQ를 사용하였을 때 Reserpine의 경우 검출한계 수준이 0.8ppt 이하이며 0.8ppt를 5회 반복 분석 시 6.8%의 상대표준편차를 보였고 0.8ppt~100ppt 범위에서 검량선을 계산하였을 때  $R^2$ 가 0.9997, 그리고 각 표준시료의 측정 농도의 정확도 범위가 96~106%로 정량 분석을 위해 적합한 수치임을 확인하였습니다. 또한 UHPLC-TQ의 분석 결과와 비교했을 때 Nanodapter-TQ의 분석 결과에서 20배 이상의 감도 향상을 얻었기 때문에 저분자 화합물의 극미량 정량분석을 위해 탁월한 솔루션이 될 수 있을 것으로 보입니다.

펩타이드 분석의 경우 3종의 펩타이드를 분석하였는데 2종은 0.64amole 이하, 1종은 16amole 이하의 검출한계를 가지며, 5회 반복 시 5.5~8.2%의 상대표준편차를 나타내었습니다. 펩타이드 별로 검출한계가 다르기 때문에 검량선의 농도 범위를 YL 및 LV는 0.64~80amole, AA는 16~2000amole로 설정하여 분석하였으며  $R^2$ 가 0.9941~0.9998, 각 표준시료의 측정 농도의 정확도 범위는 84~126%를 나타내었습니다. 각 펩타이드 서열의 구성에 따라 감도 및 정밀도/정확도에 편차가 크기 때문에 전반적으로 보았을 때 정량분석에 적합한 수준이라고 판단됩니다. 그리고 UHPLC-TQ와 비교하였을 때 Nanodapter-TQ의 펩타이드 분석 결과에서 5~20배 이상의 감도향상이 있음을 확인하였습니다. 펩타이드 분석에서도 극미량 분석을 위해 Nanodapter-TQ가 강력한 솔루션으로 자리매김할 것으로 기대합니다.

## 참고 문헌

1. Karl-Erik Karlsson, Milos Novotny. Separation efficiency of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with very small inner diameters. *Analytical Chemistry*. 1988, 60(17), 1662-1665.
2. Chiara Fanali, et al. Handbook of advanced chromatography/mass spectrometry techniques. Chapter 9 - Nano-Liquid Chromatographic Separations. AOCs. 2017, 311.
3. Lucie Zampachova, et al. A Rapid Nano-Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Cannabinoids in Cannabis sativa L. Extracts. *Molecules*. 2021, 26, 1825.
4. Teresa Mendes Maia, et al. Simple Peptide Quantification Approach for MS-Based Proteomics Quality Control. *ACS Omega*. 2020, 5, 6754-6762.
5. Hideaki Sueoka, et al. Nano-LC-MS/MS for Quantification of Lyso-Gb3 and Its Analogues Reveals a Useful Biomarker for Fabry Disease. *PLoS One*. 2015 May 12;10(5).
6. Gustavo Merola, et al. Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 71, 2012, 45-53.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

DE29477015

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2023  
2023년 7월 11일, 한국에서 발행  
5994-6345KO

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](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

