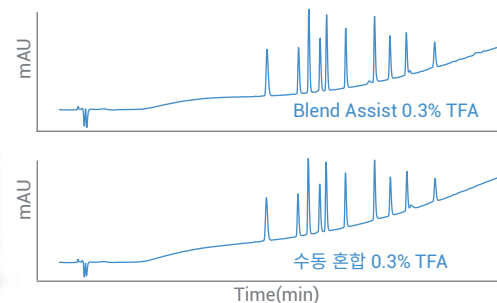


Blend Assist 장착 Agilent 1260 Infinity II Flexible Pump

BlendAssist를 이용해 용매 조성을 최대한 빨리 최적화하고 용매 변동성 최소화



저자

Melanie Metzloff &
 Clarissa Dickhut
 Agilent Technologies, Inc.

개요

Blend Assist 장착 Agilent 1260 Infinity II Flexible Pump는 3차 또는 4차 구배로 완충액 또는 조절제 농도를 변경해야 할 때 사용됩니다. 이 기술 개요는 Blend Assist를 사용하는 두 가지 예를 다루고 있습니다.

- 첫 번째로, Blend Assist 소프트웨어를 사용해 10가지 펩타이드 표준품 분리에서 서로 다른 TFA(trifluoroacetic acid) 농도의 영향을 테스트했습니다. 머무름 시간 정밀도 면에서 최적화된 분석법을 평가하였으며, 수동으로 이동상을 혼합했을 경우와 비교하였습니다
- 두 번째로, 다중 분석법 실험에 사용되었습니다. 한 시퀀스의 3가지 시료 혼합물을 여러 수준의 ammonium formate 농도에서 분석했습니다. 각 화합물에서 보이는 머무름 시간 정밀도는 Blend Assist 장착 1260 Infinity II Flexible Pump의 뛰어난 정밀도를 나타냅니다

소개

Blend Assist는 Agilent 1260 Infinity II Flexible Pump의 드라이버에 내장된 소프트웨어입니다. 이 소프트웨어는 1260 Infinity II Flexible Pump의 Quaternary 혼합 성능을 이용해 저장 용액(완충액 또는 조절제)을 온라인 희석합니다.

Blend Assist는 LC 분석법 개발 과정에서 완충액 또는 조절제 농도의 변경을 통해 화합물 분리를 최적화하기 위해 사용될 수 있습니다. 이 소프트웨어는 완충액 또는 조절제를 다양한 농도로 혼합하는 길고 어려운 과정을 간소화합니다. Quaternary LC 시스템을 사용할 때 1개 또는 2개 채널에 고농도 완충액/조절제(저장 용액)를 포함시킵니다. 사용자가 원하는 농도를 결정한 후 Blend Assist 소프트웨어로 용액을 희석합니다¹.

Blend Assist 소프트웨어를 다중 분석법 응용에 사용할 수도 있습니다. 이 응용은 한 시퀀스에서 3가지 시료 혼합물을 조절제 농도가 다른 3가지 분석법으로 분석하는 것입니다. Blend Assist를 활용하면 시스템 중단 없이 이동상을 변경하여 서로 다른 분석법을 실행할 수 있습니다.

실험

기기

각 실험에 사용된 모듈은 다음과 같습니다.

- V380 Jet Weaver Mixer(option #070) 장착 Agilent 1260 Infinity II Flexible Pump(G7104C)
- 통합형 시료 냉각기(option #100) 장착 Agilent 1260 Infinity II Vialsampler(G7129C)
- Agilent 1260 Infinity II MCT(G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II Diode Array Detector HS (G7117C), Max-Light 카트리지 셀 (10mm 셀 경로 길이, $\sigma V = 1.0\mu L$) 장착

소프트웨어

Agilent OpenLAB CDS(M8413A)

화학품

용매는 전부 LC 등급 용매를 사용했으며, 초순수는 0.22 μm 의 membrane point-

of-use cartridge(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다. 아세트니트릴은 머크(독일 담스타트)에서 구매했으며, TFA(Trifluoroacetic acid)와 ammonium formate는 씨그마알드리치(독일 스타인하임)에서 구입하였습니다.

분석법

표 1. 10가지 펩타이드 혼합물 분석 크로마토그래피 조건

파라미터	값
성분	Agilent 10 peptide standard(p/n 5190-0583)
컬럼	Agilent AdvanceBio Peptide Map, 2.1 × 100mm, 2.7 μm (p/n 655750-902)
용매	A) Water B) Acetonitrile C) Water + 1% TFA(solvent A additive) D) Acetonitrile + 1% TFA(solvent B additive)
Gradient	0min 5 %B 4min 65 %B
중지 시간	5min
Post time	3min
유속	1mL/min
주입	주입량: 2 μL with 3 seconds needle wash(60% acetonitrile in water) 시료 온도: 10°C
컬럼 온도	55°C
DAD	220/4nm, Ref. 360/80nm, 20Hz

표 2. 설파제, Testosterone 혼합물, 씨그마 펩타이드 표준품 분석을 위한 크로마토그래피 조건

파라미터	값		
컬럼	Agilent ZORBAX StableBond 80Å C18, 2.1 × 50mm, 1.8 μm , 1200bar(p/n 857700-902)		
용매	A) Water B) Acetonitrile C) 250mM Ammonium formate(solvent A additive)		
성분	설파제: Sulfanilamide, Sulfathiazole, Sulfachloropyridazine, Sulfamethazine (각각 100ng/ μL)	Testosterone 혼합물: Testosterone c-IIIN 50ng/ μL 와 Testosterone acetate 25ng/ μL	씨그마 펩타이드 표준품 (Sigma H2016)
Blend Assist 설정	200mM Ammonium formate (channel A + C as additive)	50mM Ammonium formate (channel A + C as additive)	25mM Ammonium formate (channel A + C as additive)
Gradient	0min 10 %B 0.5min 10 %B 4min 30 %B 4.2min 50 %B	0min 45 %B 3min 95 %B	0min 2 %B 0.5min 2 %B 6min 28 %B 7min 95 %B
중지 시간	5min	4min	7min
Post time	3min	3min	3min
유속	0.5mL/min	1mL/min	0.5mL/min
주입	주입량: 1 μL with 3 seconds needle wash(60% acetonitrile in water) 시료 온도: 10°C	주입량: 5 μL with 3 seconds needle wash(60% acetonitrile in water) 시료 온도: 10°C	주입량: 2 μL with 3 seconds needle wash(60% acetonitrile in water) 시료 온도: 10°C
컬럼 온도	60°C	30°C	35°C
DAD	254/8nm, Ref. 360/100nm, 20Hz	254/8nm, Ref. 360/100nm, 20Hz	220/8nm, Ref 360/100nm; 20Hz

결과 및 토의

TFA 농도에 변화를 주어 10가지 펩타이드 혼합물 분리 최적화

애질런트의 10가지 펩타이드 혼합물 분리 성능 향상을 위해 Blend Assist 장착 1260 Infinity II Flexible Pump로 이동상의 여러 TFA 농도를 테스트하였습니다.

TFA 농도를 0.05%에서 0.3%로 증가시킨 후 펩타이드 분리능은 향상되었습니다 (그림 1). 이동상의 0.05% TFA에서 피크 4(Neurotensin) 및 피크 5(Angiotensin I)가 함께 용출되었으며, 0.2% TFA에서는 두 피크가 모두 베이스라인 분리되었습니다. TFA 농도를 0.3%로 높이자, 이들 피크의 분리능은 1.77에서 2.25로 향상되었습니다. 표 3은 여러 조절제 농도에서 서로 다르게 나타나는 펩타이드 분리능을 상세하게 보여줍니다.

이동상에서 0.3% TFA를 사용함으로써 펩타이드 혼합물은 잘 분리되었으며 모든 화합물의 분리능은 2 이상이었습니다.

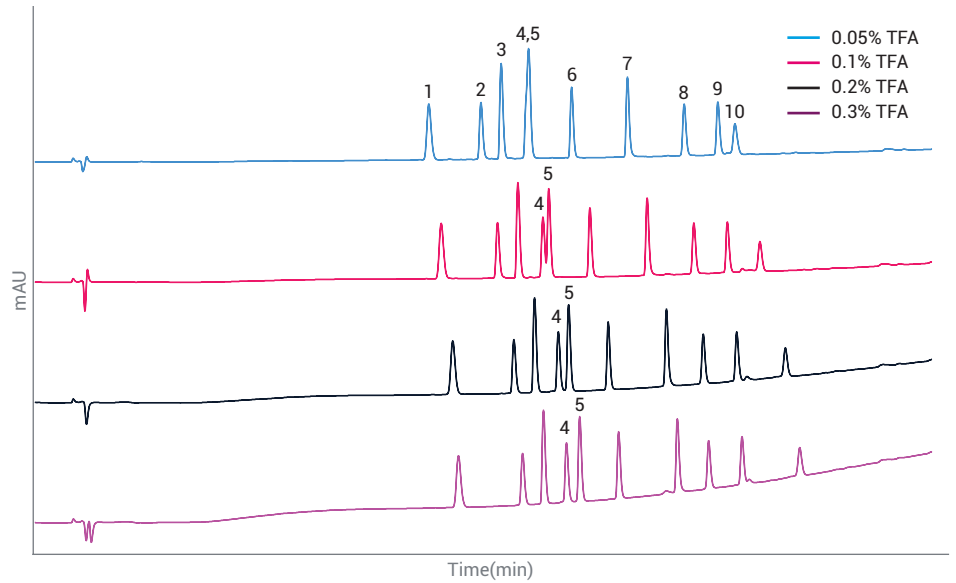


그림 1. 애질런트 10가지 펩타이드 표준품 분리에서 TFA 농도 상승의 효과 Blend Assist를 사용해 TFA 농도 변경

표 3. Blend Assist를 이용해 변경한 TFA 농도에서 분리능 결과

화합물	분리능			
	0.05% TFA	0.1% TFA	0.2% TFA	0.3% TFA
1. Bradykinin frag(1-7)	-	-	-	-
2. Bradykinin acetate	7.27	7.93	8.49	8.80
3. Angiotensin II	3.34	3.39	3.42	3.43
4. Neurotensin	3.37	4.21	4.05	3.92
5. Angiotensin I		0.99	1.77	2.25
6. Renin	6.02	7.07	6.87	6.74
7. [Ace-F-3,-2 H-1] Angiotensinogen(1-14)	9.88	10.11	10.15	10.24
8. Ser/Thr Protein Phosphatase(15-31)	9.68	8.01	6.26	5.33
9. [F14] Ser/Thr Protein Phosphatase(15-31)	5.51	5.59	5.60	5.57
10. Melittin	2.47	5.06	7.45	8.82

다음으로 조절제를 0.3% TFA의 농도로 이동상에 수동 혼합한 후 10가지 펩타이드 표준품 분석에 사용했습니다. 그림 2는 Blend Assist와 수동 혼합 이동상을 사용해 얻어진 크로마토그램을 직접 비교한 결과를 나타냅니다. 두 크로마토그램은 높은 유사성을 보입니다. 표 4는 머무름 시간 (RT), RT 정밀도(RT RSD), 분리능의 상세한 비교 결과를 보여줍니다. 두 실행 조건에서 얻은 결과는 RT와 분리능 면에서 우수한 성능을 보였습니다. RT 정밀도는 수동 혼합 용액에서 약간 더 우수하게 나타났으나, 두 조건에서 RT의 RSD는 0.15%(표준 사양) 이하의 수치를 보였습니다.

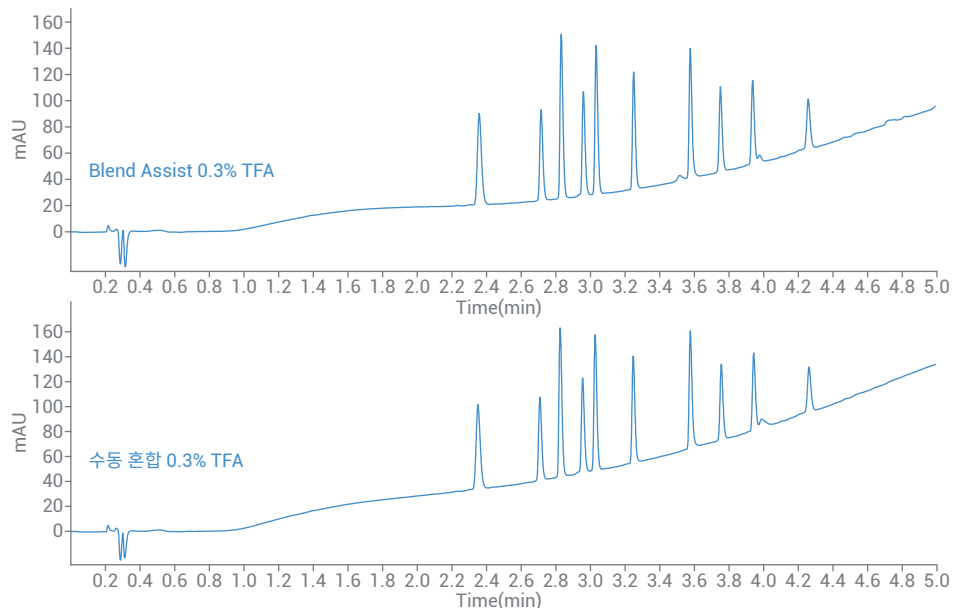


그림 2. Blend Assist 사용 및 비사용 시 10가지 펩타이드 표준품 분석 크로마토그램 비교

표 4. Blend Assist 분석법을 사용한 경우와 수동 혼합 0.3% TFA를 사용한 경우에서 머무름 시간 및 RT RSD를 비교한 결과입니다. 두 설정에서 모두 6회 연속 실행한 결과를 계산했습니다

펩타이드	Blend Assist 0.3% TFA			수동 혼합 0.3% TFA		
	RT(min)	RT RSD(%)	분리능	RT(min)	RT RSD(%)	분리능
1. Bradykinin frag(1-7)	2.366	0.017	-	2.359	0.008	-
2. Bradykinin acetate	2.725	0.020	8.80	2.717	0.007	8.73
3. Angiotensin II	2.841	0.019	3.43	2.834	0.007	3.42
4. Neurotensin	2.970	0.018	3.92	2.965	0.008	3.92
5. Angiotensin I	3.044	0.016	2.25	3.037	0.009	2.18
6. Renin	3.261	0.013	6.74	3.258	0.009	6.75
7. [Ace-F-3,-2 H-1] Angiotensinogen(1-14)	3.590	0.018	10.24	3.588	0.010	10.22
8. Ser/Thr Protein Phosphatase(15-31)	3.764	0.019	5.33	3.768	0.005	5.42
9. [F14] Ser/Thr Protein Phosphatase(15-31)	3.591	0.016	5.57	3.956	0.005	5.63
10. Melittin	4.272	0.011	8.82	4.275	0.015	8.82

다중 분석법 실행에서 완충액 농도에 변화를 줌으로써 3가지 시료 혼합물 분석

이 응용에서는 설파제, Testosterone, 씨그마 펩타이드 표준품을 포함하는 3가지 시료 혼합물을 분석했습니다. 3가지 분석물이 최적의 분리를 위해 필요한 수용성 이동상 내 ammonium formate 농도는 상이합니다. 이 3가지 분석물은 한 시퀀스에서 용매를 교체해가며 분석할 수 있으며, 이 기술 개요의 내용대로 단일 시퀀스 내에서 분석하는 것도 가능합니다. Blend Assist를 이용해 수용성 이동상 내 완충액 농도가 각 분석법마다 온라인으로 변경될 수 있으며, 따라서 단일 시퀀스 내에서 3개 분석법을 실행하는 것이 가능합니다.

그림 3은 sulfanilamide, sulfathiazole, sulfachloropyridazine, sulfamethazine을 포함하는 4가지 설파제의 분석 결과입니다. 설파제의 분리를 위해 200mL의 ammonium formate이 조절제로 사용되었습니다. 모든 피크에서 우수한 머무름 시간 정밀도를 얻었습니다.

그림 4는 testosterone CIII와 testosterone acetate를 연속 6번 분석해서 얻은 결과를 보여줍니다. Blend Assist를 이용하여 50mM ammonium formate를 수용성 이동상에 혼합할 수 있습니다. 두 피크 모두 우수한 머무름 시간 정밀도를 보였습니다.

그림 5는 씨그마 펩타이드 표준품 분석 결과를 보여줍니다. 이 분석은 25mM ammonium formate를 포함한 수용성 이동상에서 진행되었으며, 0.15%(표준 사양) 이하의 우수한 머무름 시간 정밀도를 보였습니다.

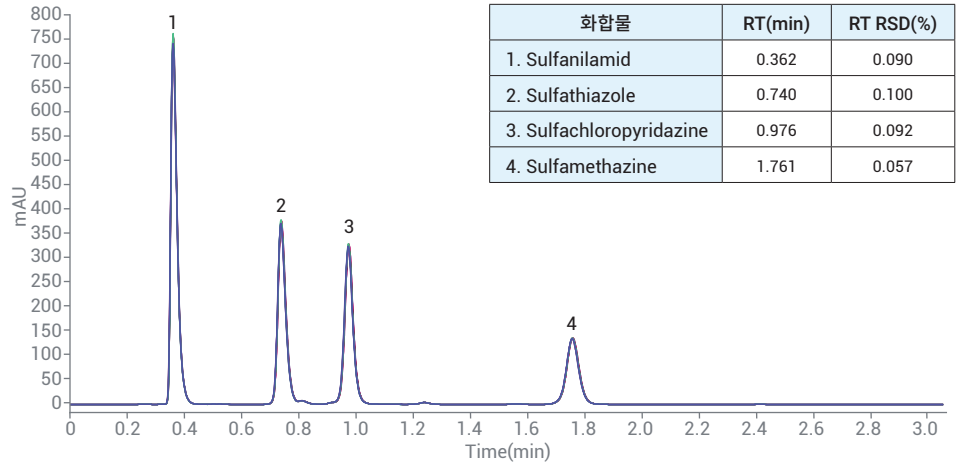


그림 3. 설파제 분리: 6회 연속 실행 오버레이

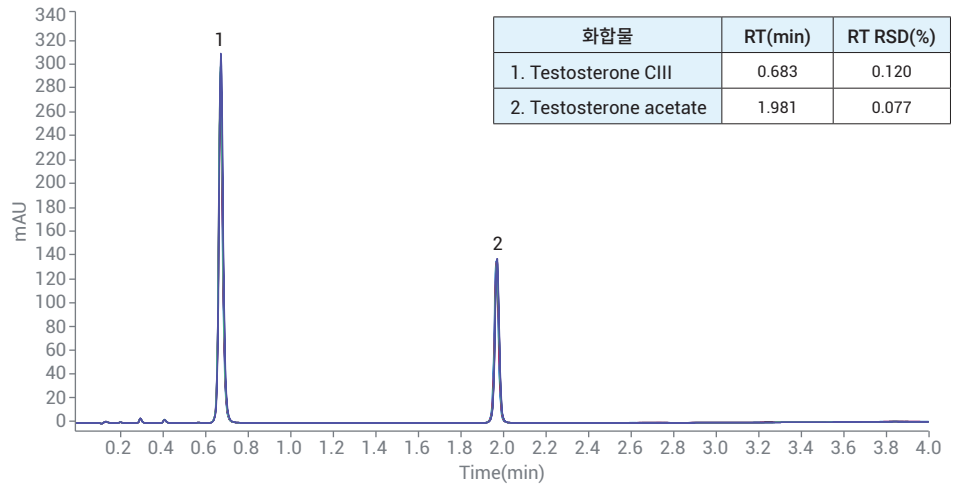


그림 4. Testosterone CIII와 Testosterone acetate의 분리: 6회 연속 실행 오버레이

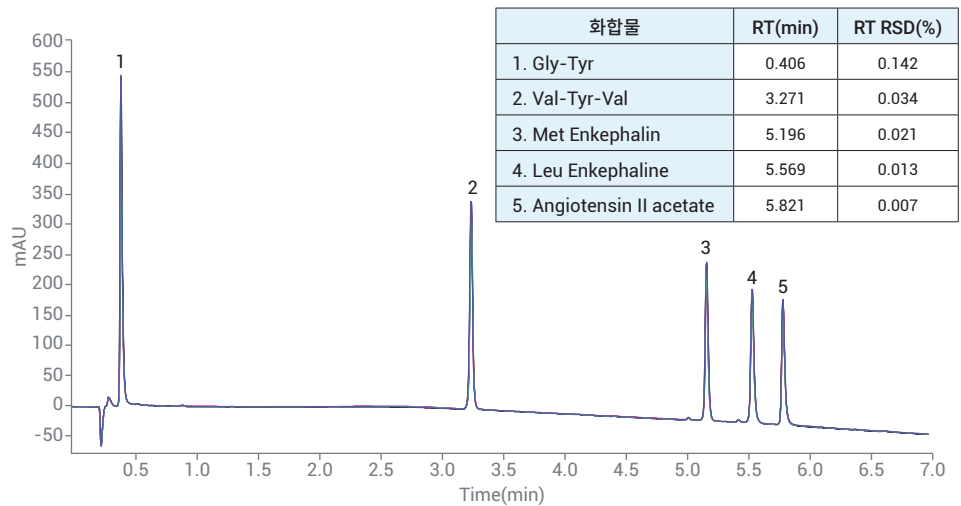


그림 5. 씨그마 펩타이드 표준품 분리: 6회 연속 실행 오버레이

결론

Blend Assist 장착 Agilent 1260 Infinity II Flexible Pump는 조절제/완충액 농도를 직접 변경함으로써, 여러 농도를 수동 혼합해야 하는 수고를 덜어줍니다. 이 기술 개요는 Blend Assist 사용의 두 가지 예를 보여줍니다. 첫 번째는 이동상 내 TFA 농도를 변화시켜 10가지 펩타이드 표준품 분리를 최적화하는 예입니다. Blend Assist 분석법을 이용한 경우와 수동 혼합 용매를 사용한 경우를 비교한 결과, 머무름 시간 및 분리능 면에서 뛰어난 일치성을 보였습니다.

두 번째는 한 스캔스에서 설파제, Testosterone 혼합물, 펩타이드 혼합물을 ammonium formate 조절제 농도가 다른 세 분석법으로 분석한 예입니다. 3개 응용 사례에서 모두 우수한 머무름 시간 정밀도가 나타났습니다.

참고문헌

1. Huesgen A.G. Fast and Flexible Optimization of Modifier Concentrations Using an Agilent 1290 Infinity LC System with Blend Assist, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-2169EN, **2013**

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 3월 1일 한국에서 인쇄
5991-9088KO

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