

쉽고 빠른 시료 전처리 자동화

Agilent 1260 Infinity III Multisampler 및 Vialsampler를 사용한 주입기 워크플로에 의한 시료 전처리 자동화



저자

Adem Cakar
Agilent Technologies, Inc.

개요

실험실의 시료 수가 계속 늘어나면서 자동화된 워크플로에 대한 수요가 증가하고 있지만, 실험실 환경에 자동화를 구현하는 일은 어렵고, 시간이 많이 걸리며, 비용도 많이 듭니다. 이 기술 개요에서는 시료 전처리를 위한 자동화 분석법을 빠르고 쉽게 구현하기 위한 대안적 방법을 설명합니다. 여기에는 아미노산 시료의 유도체화, 시료 희석, 그리고 Agilent 1260 Infinity III Multisampler 또는 Agilent 1260 Infinity III Vialsampler를 주입기 워크플로와 함께 사용한 검량 표준물질의 준비가 포함됩니다. 정밀도, 반복성 및 감도 측면에서 매우 우수한 결과를 얻었으며, 작업자의 기술 수준과 무관했습니다.

소개

유도체화 및 검량 표준물질 제조와 같은 수동 시료 전처리 워크플로에는 많은 인력과 시간이 소요되며, 작업자의 기술 수준에 따라 결과가 크게 좌우됩니다. 자동화된 시스템을 사용하면 수작업에 의존한 액체 처리 단계가 생략되어 시간과 비용이 절약됩니다. 또한 자동화 시스템의 결과는 작업자의 기술 수준과 무관합니다. 불행히도, 실험실 환경에서 액체를 처리하기 위한 자동화 시스템을 구축하는 일은 어렵고 비용이 많이 드는 과정입니다.

1260 Infinity III Vialsampler 및 1260 Infinity III Multisampler와 같은 Agilent InfinityLab 자동 시료 주입기는 주입기 프로그램을 사용하여 검량 표준물질 준비, 시료 희석 또는 시료 유도체화와 같은 일련의 작업을 정의하고 순차적으로 수행할 수 있는 기회를 줍니다. 즉, 시료 전처리를 위한 자동화된 워크플로를 구성하는 데 추가 장비가 필요하지 않습니다. 지금까지 주입기 프로그램을 제작하려면 어느 정도의 전문 지식과 경험이 필요했지만, 주입기 워크플로를 통해 모든 수준의 LC 사용자가 훨씬 더 쉽고 빠르게 작업할 수 있게 되었습니다.

이 기술 개요에서는 기존 주입기 프로그램과 비교한 주입기 워크플로의 장점을 개괄적으로 알아봅니다. 프리컬럼 아미노산 유도체화 및 검량 표준물질 준비와 같은 액체 처리 워크플로는 1260 Infinity III Vialsampler 또는 1260 Infinity III Multisampler를 포함한 Agilent 1260 Infinity III LC 시스템과 함께 주입기 워크플로를 사용하여 수행했습니다.

실험

장비

다음 모듈로 구성된 1260 Infinity III LC

- Agilent 1260 Infinity III Binary 펌프 (G7112B)
- 다음 중 하나: 통합 컬럼 격실(G7130A), 100μL 분석 헤드 및 100μL 시료 루프 (기본 구성)를 갖춘 Agilent 1260 Infinity III Vialsampler(G7129A)
- 또는: 100μL 분석 헤드와 100μL 시료 루프(기본 구성) 및 추가 멀티컬럼 온도 조절 장치(G7116A)를 갖춘 Agilent 1260 Infinity III Multisampler(G7167A)
- 10mm 표준 플로우 셀(14μL, 옵션 #018)이 장착된 Agilent 1260 Infinity III 가변 파장 검출기(VWD)(G7114A)
- 8μL FLD 셀(G1321-60005)이 장착된 Agilent 1260 Infinity III 형광 검출기 스펙트럼(FLD)(G7121B)

소프트웨어

Agilent OpenLab CDS 버전 2.8 이상

컬럼

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 2.7μm(품목 번호 699975-902)
- Agilent AdvanceBio AAA LC 컬럼, 3.0 × 100mm, 2.7μm(품목 번호 695975-322); Agilent AdvanceBio AAA 가드 컬럼, 3.0 × 5mm, 2.7μm(품목 번호 823750-946) 장착

화학물질

LC용 Agilent InfinityLab 그레디언트 등급 아세트ونی트릴(품목 번호 5191-5100*) 및 LC용 Agilent InfinityLab 그레디언트 등급 메탄올(품목 번호 5191-5110*)을 모든 실험에 사용했습니다. 초순수는 0.22μm 멤브레인 Point-of-Use 카트리지(Millipak,

Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다. Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) 및 disodium tetraborate decahydrate($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)은 Sigma-Aldrich(Steinheim, Germany)에서 구입했습니다. Hydrochloric acid(HCl) (37%)와 ortho-phosphoric acid(85%)는 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입했습니다.

다음에 포함한 표준물질과 유도체화 시약은 애질런트에서 얻었습니다.

- 다음에 포함한 아미노산 보충 키트 (품목 번호 5062-2478): L-asparagine, L-glutamine, L-tryptophan, L-4-hydroxyproline, L-norvaline 및 sarcosine(각 1g)
- 아미노산 표준물질, 100pmol/μL(품목 번호 5061-3332)
- Borate 완충액, 0.4N 수용액, pH 10.2, 100mL(품목 번호 5061-3339)
- FMOC 시약, 2.5mg/mL 9-fluorenylmethylchloroformate acetonitrile 용액, 10 × 1mL(품목 번호 5061-3337)
- OPA 시약, 각각 10mg/mL o-phthalaldehyde 및 3-mercaptopropionic acid의 0.4M borate 완충액, 6×1mL(품목 번호 5061-3335)
- Caffeine 표준물질 키트, 125μg/mL (품목 번호 8500-6762)

아미노산 분석을 위한 용매

이동상 A: 1.9L 물에 2.8g의 Na_2HPO_4 및 7.6g의 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 를 녹이고 1.5mL의 HCl(37%)을 첨가합니다. 균일해질 때까지 섞은 후, HCl로 pH를 8.2에 맞추고 물로 최대 2L까지 채웁니다. 조류 증식을 방지하기 위해 2L 용량의 갈색 용매병(품목 번호 9301-6341) 사용을 권장합니다.

* 일부 국가에서만 사용 가능

이동상 B: Acetonitrile:methanol:물
45:45:10(v:v:v)

주입 희석액: 이동상 A 10mL +
orthophosphoric acid 200μL(85%)

OPA 또는 FMOC 앰플을 연 후, 인서트
(품목 번호 5181-1270)와 스크류 캡(품목
번호 5190-7024)이 달린 갈색 바이알(품목
번호 5182-0716)에 시약을 나누어 담고
일주일 내에 사용했습니다. Borate 완충액과
주입 희석액을 인서트가 없는 바이알에
옮겼습니다. 모든 시약은 4-8°C에서
보관해야 하며, 자동 시료 주입기의 시약은
매일 교체해야 합니다.

아미노산 표준 용액

Asparagine, glutamine 및 tryptophan이
1.8nmol/μL 포함된 확장 아미노산
(EAA) 원액을 제조하기 위해 asparagine
59.45mg, glutamine 65.77mg, tryptophan
91.95mg을 25mL 용량 플라스크에 넣고
0.1M HCl을 채웁니다. 0.1M HCl을 이용해
용액을 1:10으로 희석합니다.

Norvaline과 sarcosine 1nmol/μL를 포함한
내부 표준물질(ISTD) 원액을 제조하기 위해
norvaline 58.58mg과 sarcosine 44.54mg을
50mL 용량 플라스크에 넣고 0.1M HCl을
채웁니다. 0.1M HCl을 이용해 용액을
1:10으로 희석합니다.

반복적인 동결-해동을 피하기 위해
-20°C에서 동결하기 전에 원액을 분배하는
것이 좋습니다.

검량 표준물질을 준비하기 위해 EAA 원액을
900, 450, 225, 90, 45, 22.5 및 9pmol/μL로
희석하고 1:1 ISTD 원액과 혼합했습니다.
나중에 이를 해당하는 아미노산 표준 농도와
1:10의 비율로 혼합하여 각 아미노산의 최종
농도가 90, 45, 22.5, 9, 4.5, 2.25, 0.9 및
0.45pmol/μL이고 ISTD는 50pmol/μL가
되도록 했습니다.

주입기 워크플로를 이용해 아미노산을 유도체화하기 위한 시료 전처리 분석법

주입기 워크플로에서 아미노산 유도체화를
설정하기 위해 워크플로 템플릿
“OPA/FMOC-protocol for AAA”(그림 1)가
사용자 인터페이스에 열립니다(그림 2).
이 사용자 인터페이스에서 샘플러 위치와
시료, 완충액, 시약의 양을 선택합니다. 혼합
파라미터를 최적화하는 옵션도 있습니다.
추가적인 최적화가 필요한 경우, 고급
보기에서 필요한 모든 파라미터를 변경할 수
있습니다(그림 3). 주입기 워크플로의 고급
보기는 기존의 주입기 프로그램과 동일한
인터페이스를 가지고 있습니다.

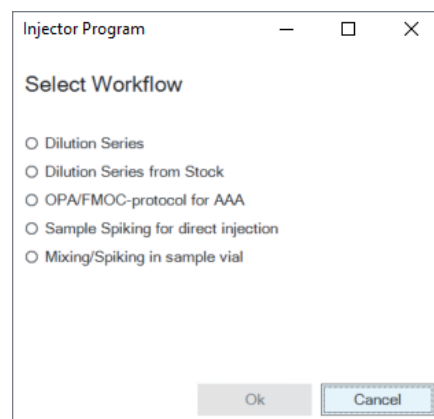


그림 1. 다양한 워크플로 템플릿이 있는 선택 인터페이스.

Workflow			
OPA/FMOC-protocol for AAA		Select Workflow	
Parameters			
Sample Volume:	1.00 μL	Mix 1 Volume:	7.00 μL
Borate Buffer Volume:	5.00 μL	Repetitions:	10
From Location:	D1F-A1		
OPA Reagent Volume:	1.00 μL	Mix 2 Volume:	7.40 μL
From Location:	D1F-A2	Repetitions:	10
FMOC Reagent Volume:	0.40 μL		
From Location:	D1F-A3		
Injection Diluent Volume:	32.00 μL	Mix 3 Volume:	20.00 μL
From Location:	D1F-A4	Repetitions:	5

그림 2. 아미노산의 프리컬럼 OPA/FMOC 유도체화를 위한 워크플로 템플릿.

카페인 원액 및 대조 시료

카페인 용액(125µg/mL)을 원액으로 사용하여 주입기 워크플로를 통해 25-0.04µg/mL의 검량 표준물질을 준비했습니다. 또한, 수동으로 준비한 12.5µg/mL의 카페인 대조 시료를 사용하여 검량을 평가했습니다.

주입기 워크플로를 사용한 카페인 검량 표준물질 준비

연속 희석을 통해 카페인 검량 표준물질을 준비하기 위해 주입기 프로그램의 “dilution series”(연속 희석) 옵션(그림 1)을 사용했습니다. 희석액을 적절히 혼합하려면 평평한 유리 바이알 인서트(품목 번호 5181-3377)를 사용하는 것이 중요합니다. 이 워크플로 템플릿(그림 4)에서는 시료와 희석액의 위치를 지정해야 합니다. 희석률과 희석 횟수를 선택할 수 있습니다. 여기에서도 추가적인 최적화가 필요한 경우, 고급 보기에서 필요한 모든 파라미터를 변경하고 최적화할 수 있습니다(그림 5).

Function	Parameter
▶ Comm...	▼ Comment: Workflow derived from template: OPA/FMOC-protocol for AAA
Draw	▼ Draw 5.00 µL from location "D1F-A1" with default speed using default offset
Wash	▼ Wash needle as defined in method
Draw	▼ Draw 1.00 µL from sample with default speed using default offset
Wash	▼ Wash needle as defined in method
Draw	▼ Draw 1.00 µL from location "D1F-A2" with default speed using default offset
Wash	▼ Wash needle as defined in method
Mix	▼ Mix 7.00 µL from air with default speed for 10 times
Draw	▼ Draw 0.40 µL from location "D1F-A3" with default speed using default offset
Wash	▼ Wash needle as defined in method
Mix	▼ Mix 7.40 µL from air with default speed for 10 times
Draw	▼ Draw 32.00 µL from location "D1F-A4" with maximum speed using default offset
Wash	▼ Wash needle as defined in method
Mix	▼ Mix 20.00 µL from air with maximum speed for 5 times
Inject	▼ Inject

그림 3. 아미노산의 프리컬럼 OPA/FMOC 유도체화를 위한 주입기 워크플로와 개별 명령을 보여주는 고급 보기.

Workflow															
Dilution Series		Select Workflow													
Parameters															
Draw Sample	From Location: Location ▼	D1F-A2	Sample Volume: 18.00 : µL												
Draw Dilution Solvent	From Location: D1F-A1		Dilution Factor 1: 5 : Diluent Volume: 72.00 µL												
Dilute	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Target Location</th> <th>Sample Volume in Target [µL]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>▶ D1F-B1</td><td>18.00</td></tr> <tr><td>D1F-B2</td><td>3.60</td></tr> <tr><td>D1F-B3</td><td>0.72</td></tr> <tr><td>D1F-B4</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>D1F-B5</td><td>0.03</td></tr> </tbody> </table>	Target Location	Sample Volume in Target [µL]	▶ D1F-B1	18.00	D1F-B2	3.60	D1F-B3	0.72	D1F-B4	0.14	D1F-B5	0.03	Mix Mode: Air bubble ▼	
Target Location	Sample Volume in Target [µL]														
▶ D1F-B1	18.00														
D1F-B2	3.60														
D1F-B3	0.72														
D1F-B4	0.14														
D1F-B5	0.03														
		Repetitions: 10 :													
		Speed: ☐ Default ☒ Maximum													
		☐ 20.0 : µL/min													
		Add	Remove												

그림 4. 연속 희석에 대한 워크플로 템플릿.

Function	Parameter
▶ Comment	▼ Comment: Workflow derived from template: Dilution Series
Draw	▼ Draw 72.00 µL from location "D1F-A1" with default speed using default offset
Wash	▼ Wash needle as defined in method
Eject	▼ Eject maximum volume to location "D1F-B1" with default speed using default offset
Wash	▼ Wash needle as defined in method
Draw	▼ Draw 18.00 µL from location "D1F-A2" with default speed using default offset
Wash	▼ Wash needle as defined in method
Eject	▼ Eject maximum volume to location "D1F-B1" with default speed using default offset
Repeat	▼ Repeat 10 time(s)
Draw	▼ Draw maximum volume from air with default speed
Eject	▼ Eject maximum volume to location "D1F-B1" with default speed using default offset
End Repeat	▼ End Repeat

그림 5. 연속 희석에 대한 주입기 워크플로와 개별 명령을 보여주는 고급 보기.

분석법

테이블 1. 유도체화된 아미노산 분석을 위한 크로마토그래피 조건.

파라미터	값
컬럼	Agilent AdvanceBio AAA LC 컬럼, 3.0 × 100mm, 2.7µm; Agilent AdvanceBio AAA 가드 컬럼, 3.0 × 5mm, 2.7µm 포함
용매	A) 10mM Na ₂ HPO ₄ 및 10mM Na ₂ B ₄ O ₇ , pH: 8.2 B) Acetonitrile/Methanol/물(45:45:10; v:v:v)
그라디언트	시간(분) %A %B 0 98 2 0.40 98 2 13.60 43 57 14 0 100 정지 시간: 17분 사후 시간: 3분
유속	0.600mL/min
온도	40°C
검출	FLD: 여기: 345nm; 방출: 455nm 13:00분 후: 여기 변경: 265nm; 방출 변경: 315nm PMT 게인: 10 피크 폭: > 0.025분(18.52Hz)
주입	100µL 분석 헤드와 100µL 루프를 갖춘 Agilent 1260 Infinity III Vialsampler - 주입 부피: 1µL - 니들 세척: Acetonitrile을 이용해 3초: 0.1M HCl(50:50; v:v) - 샘플링 속도: 채취 속도: 200µL/min; 배출 속도: 400µL/min - 니들 높이 위치: 오프셋 0.0mm - 시료 온도: 8°C 100µL 분석 헤드와 100µL 루프를 갖춘 Agilent 1260 Infinity III Multisampler - 주입 부피: 1µL - 니들 세척: Acetonitrile을 이용해 3초: 0.1M HCl(50:50; v:v) - 샘플링 속도: 채취 속도: 200µL/min; 배출 속도: 400µL/min - 니들 높이 위치: 바이알 바닥 감지 사용, 오프셋 0.0mm - 시료 온도: 8°C

표 2. 카페인 분석을 위한 크로마토그래피 조건.

파라미터	값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 50mm, 2.7µm
용매	A) 물 B) Acetonitrile
그라디언트	시간(분) %A %B 0 95 5 3.00 50 50 3.1 10 90 정지 시간: 4분 사후 시간: 3분
유속	0.500mL/min
온도	40°C
검출	VWD: 273nm, 20Hz
주입	100µL 분석 헤드와 100µL 루프를 갖춘 Agilent 1260 Infinity III Vialsampler - 주입 부피: 5µL - 니들 세척: Acetonitrile:물(50:50; v:v)로 3초 - 샘플링 속도: 채취 속도: 200µL/min; 배출 속도: 400µL/min - 니들 높이 위치: 오프셋 0.0mm - 시료 온도: 8°C 100µL 분석 헤드와 100µL 루프를 갖춘 Agilent 1260 Infinity III Multisampler - 주입 부피: 5µL - 니들 세척: Acetonitrile:물(50:50; v:v)로 3초 - 샘플링 속도: 채취 속도: 100µL/min; 배출 속도: 400µL/min - 니들 높이 위치: 오프셋 -3.0mm - 시료 온도: 8°C

결과 및 토의

주입기 워크플로의 자동화 가능성을 보여주기 위해, 검량 표준물질을 포함한 전체 아미노산 유도체화 워크플로와 카페인 용액의 연속 희석을 포함한 검량 표준물질 희석 워크플로를 생성했습니다. 카페인을 이용한 아미노산 유도체화 및 희석 워크플로의 결과는 주입기 워크플로가 기존 주입기 프로그램과 유사한 결과를 제공한다는 사실을 보여주었습니다. 기존 주입기 프로그램의 결과와 성능은 이미 공개되어 있습니다.^{1,2}

아미노산 분석

그림 6은 1260 Infinity III Multisampler와 주입기 워크플로를 사용하여 유도체화한 22.5pmol/µL의 아미노산과 50pmol/µL의 ISTD를 함유한 아미노산 검량 표준물질을 분석하여 얻은 크로마토그램을 보여줍니다. 이 크로마토그램은 17분 내에 20개의 아미노산과 2개의 ISTD가 성공적으로 분리되었음을 보여줍니다.

감도를 확인하기 위해 90-0.45pmol/µL에서 검량을 수행했습니다. 반복성을 보여주기 위해, 아미노산 22.5pmol/µL와 ISTD 50pmol/µL를 함유한 검량 표준물질을 10회 연속 주입하여 측정했습니다. 표 3과 표 4에 분석 중 반복성, 감도 및 검량에 대한 결과가 나와 있습니다.

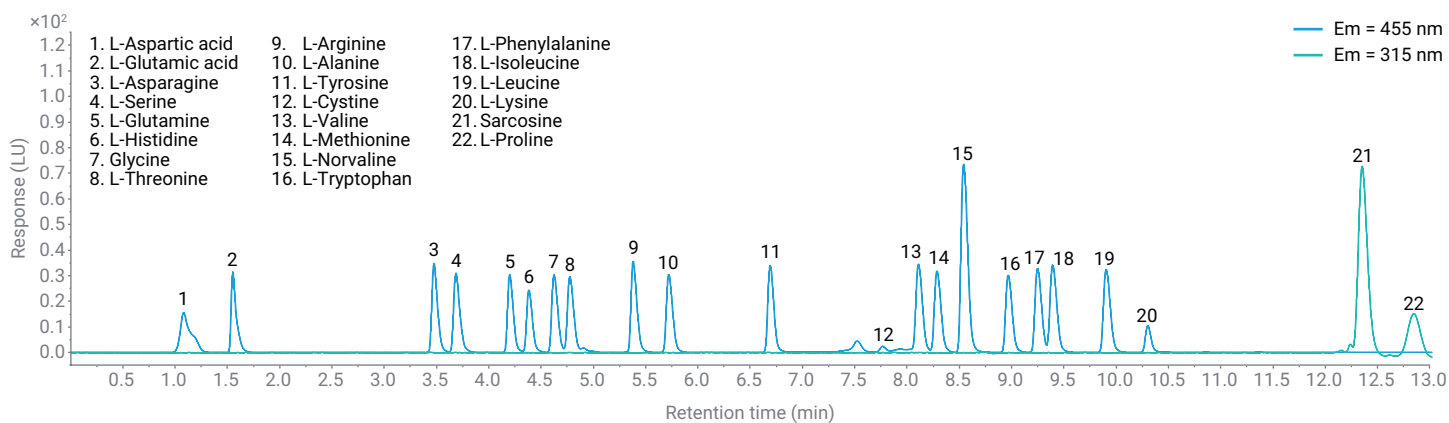


그림 6. 22.5pmol/μL 아미노산 혼합물과 50pmol/μL ISTD를 분석하여 얻은 크로마토그램.

표 3. Agilent 1260 Infinity III Multisampler에서 주입기 워크플로를 사용하여 아미노산을 분석했을 때의 검량 선형성, 감도 및 반복성. 각 아미노산에 대해 최종 농도가 22.5pmol/μL인 아미노산 혼합물을 10회 연속 주입하고 ISTD를 50pmol/μL로 설정하여 상대 표준편차(RSD)를 계산했습니다. 검출 한계(LOD)는 신호대 잡음비(S/N) 값의 3배 임계값을 사용하여 결정했습니다.

피크 번호	화합물	RT (분)	RT RSD (%)	면적 RSD (%)	LOD (pmol/μL)	검량 범위 (pmol/μL)	검량 유형	R ²
1	L-Aspartic acid	1.07	0.61	0.34	0.227	0.45 - 90	선형	0.99999
2	L-Glutamic acid	1.56	0.60	0.36	0.117	0.45 - 90	선형	0.99997
3	L-Asparagine	3.47	0.07	0.25	0.112	0.45 - 90	선형	0.99990
4	L-Serine	3.68	0.06	0.29	0.068	0.45 - 90	선형	0.99992
5	L-Glutamine	4.20	0.04	0.23	0.121	0.45 - 90	선형	0.99986
6	L-Histidine	4.38	0.03	0.98	0.143	0.45 - 90	2차	0.99999
7	Glycine	4.62	0.03	0.32	0.090	0.45 - 90	선형	0.99997
8	L-Threonine	4.77	0.03	0.20	0.122	0.45 - 90	선형	0.99997
9	L-Arginine	5.38	0.02	0.21	0.107	0.45 - 90	선형	0.99998
10	L-Alanine	5.72	0.02	0.21	0.110	0.45 - 90	선형	0.99998
11	L-Tyrosine	6.69	0.02	0.30	0.110	0.45 - 90	선형	0.99998
12	L-Cysteine	7.76	0.04	1.71	1.399	2.25 - 90	2차	0.99994
13	L-Valine	8.11	0.03	0.23	0.109	0.45 - 90	선형	0.99997
14	L-Methionine	8.28	0.03	0.91	0.142	0.45 - 90	선형	0.99998
15	L-Norvaline*	8.54	0.03	0.36	NA	NA	NA	NA
16	L-Tryptophan	8.96	0.03	0.49	0.133	0.45 - 90	선형	0.99996
17	L-Phenylalanine	9.24	0.02	0.21	0.126	0.45 - 90	선형	0.99998
18	L-Isoleucine	9.39	0.02	0.33	0.116	0.45 - 90	선형	0.99999
19	L-Leucine	9.90	0.02	0.34	0.121	0.45 - 90	선형	0.99999
20	L-Lysine	10.30	0.02	2.32	0.39	0.45 - 90	2차	0.99993
21	Sarcosine*	12.35	0.02	3.29	NA	NA	NA	NA
22	L-Proline	12.84	0.02	3.18	1.606	2.25 - 90	2차	0.99943

* ISTD

표 4. Agilent 1260 Infinity III Vialsampler에서 주입기 워크플로를 사용하여 아미노산을 분석했을 때의 검량 선형성, 감도 및 반복성. 각 아미노산에 대해 최종 농도가 22.5pmol/μL인 아미노산 혼합물을 10회 연속 주입하고 ISTD를 50pmol/μL로 설정하여 RSD를 계산했습니다. LOD는 S/N 값의 3배 임계값을 사용하여 결정했습니다.

피크 번호	화합물	RT (분)	RT RSD (%)	면적 RSD (%)	LOD (pmol/μL)	검량 범위 (pmol/μL)	검량 유형	R²
1	L-Aspartic acid	1.194	0.338	0.469	0.167	0.45 - 90	선형	0.99994
2	L-Glutamic acid	1.808	0.456	0.632	0.267	0.45 - 90	선형	0.99995
3	L-Asparagine	3.657	0.139	0.512	0.137	0.45 - 90	선형	0.99980
4	L-Serine	3.875	0.110	0.563	0.137	0.45 - 90	선형	0.99997
5	L-Glutamine	4.389	0.081	0.623	0.141	0.45 - 90	선형	0.99967
6	L-Histidine	4.573	0.079	1.313	0.254	0.45 - 90	2차	0.99972
7	Glycine	4.829	0.079	0.559	0.166	0.45 - 90	선형	0.99996
8	L-Threonine	4.966	0.075	0.541	0.213	0.45 - 90	선형	0.99984
9	L-Arginine	5.569	0.070	0.588	0.184	0.45 - 90	선형	0.99998
10	L-Alanine	5.933	0.050	0.639	0.186	0.45 - 90	선형	0.99997
11	L-Tyrosine	6.912	0.078	0.643	0.163	0.45 - 90	선형	0.99998
12	L-Cysteine	7.991	0.048	1.181	0.886	0.90 - 90	2차	0.99973
13	L-Valine	8.326	0.044	0.676	0.149	0.45 - 90	선형	0.99998
14	L-Methionine	8.517	0.037	2.892	0.563	0.90 - 90	선형	0.99962
15	L-Norvaline*	8.764	0.034	0.573	NA	NA	NA	NA
16	L-Tryptophan	9.209	0.026	0.653	0.156	0.45 - 90	선형	0.99981
17	L-Phenylalanine	9.479	0.025	0.675	0.187	0.45 - 90	선형	0.99999
18	L-Isoleucine	9.615	0.025	0.525	0.169	0.45 - 90	선형	0.99997
19	L-Leucine	10.137	0.017	0.581	0.189	0.45 - 90	선형	0.99997
20	L-Lysine	10.535	0.012	1.287	0.564	0.45 - 90	2차	0.99999
21	Sarcosine*	12.578	0.016	3.521	NA	NA	NA	NA
22	L-Proline	13.067	0.013	2.961	0.477	0.90 - 90	2차	0.99965

* ISTD

대부분의 화합물에 대해 우수한 머무름 시간 (RT) 및 피크 면적 정밀도(n = 10)가 얻어졌으며, RT RSD의 경우 0.1% 미만, 피크 면적 RSD의 경우 1% 미만의 값을 나타냈습니다. 또한, L-cysteine과 L-proline을 제외한 모든 아미노산에 대해 LOD가 대부분 0.4pmol/μL 이하인 뛰어난 감도를 얻었습니다. L-cysteine의 감도가 낮은 이유는 OPA와 함께 형성된 시스테인 부가물이 다른 아미노산의 부가물보다 형광이 낮기 때문이라고 설명할 수 있습니다.³

카페인 검량

그림 7은 주입기 워크플로의 연속 희석 템플릿을 사용하여 1260 Infinity III Multisampler로 준비한 카페인 표준물질을 분석하여 얻은 검량선을 보여줍니다. 이 워크플로에는 카페인 원액을 25-0.04µg/mL 범위에서 연속 희석한 후 측정하는 과정이 포함됩니다.

검량 기능(표 5)을 평가했으며, 이를 통해 1260 Infinity III Multisampler와 1260 Infinity III Vialsampler가 우수한 희석 정밀도를 제공할 수 있음을 알 수 있습니다. 검량을 평가하기 위해 농도 12.5µg/mL의 편차 대조 시료를 수동으로 준비했습니다. 표 4는 1260 Infinity III Multisampler와 Vialsampler를 이용한 검량이 대조 시료에 대해 뛰어난 결과를 제공한다는 것을 보여줍니다.

결론

Agilent 1260 Infinity III Multisampler 또는 Agilent 1260 Infinity III Vialsampler와 함께 주입기 워크플로를 사용하면 아미노산 유도체화, 시료 희석, 검량 표준물질 제조와 같은 특정 시료 전처리 분석법을 뛰어난 정밀도, 반복성 및 감도로 자동화할 수 있습니다. 주입기 워크플로는 오류 없이 더 빠르고 쉽게 분석법을 설정할 수 있어 시간과 비용을 절감할 수 있다는 점에서 기존 주입기 프로그램과 다릅니다.

Calibration Curve

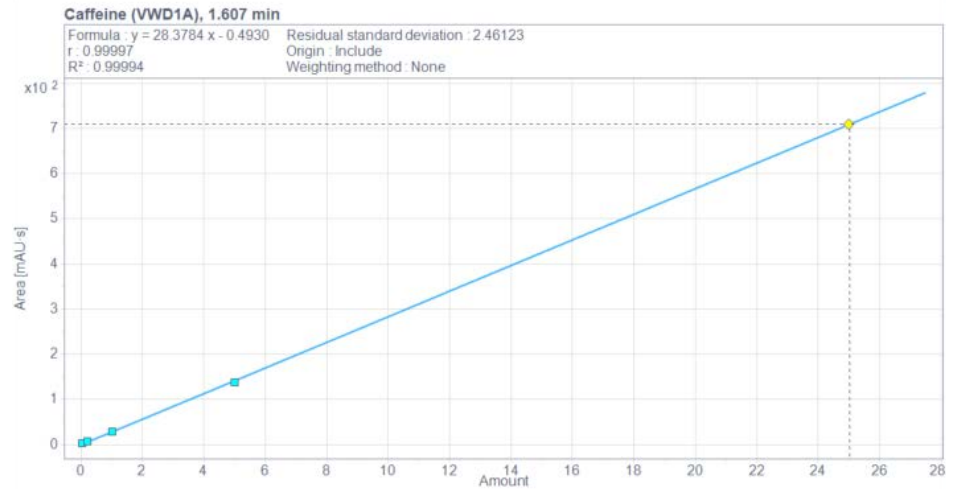


그림 7. Agilent 1260 Infinity III Multisampler를 사용하여 얻은 검량 곡선.

표 5. Agilent 1260 Infinity III Multisampler와 Agilent 1260 Infinity III Vialsampler로 준비한 검량액을 사용한 카페인 검량.

자동 시료 주입기	검량 기능	상관 계수 R²	편차 관리 시료(%)
Agilent 1260 Infinity II Multisampler	$y = 28.3784x - 0.4930$	R²=0.99994	3.58%
Agilent 1260 Infinity II Vialsampler	$y = 28.5657x - 0.7107$	R²=0.99999	0.79%

참고 자료

1. Schipperges, S. Comparison of Plant-Based Meat Alternatives and Meat. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-5950EN, **2023**.
2. Schipperges, S. Let Your Autosampler Do Your Pipetting. *Agilent Technologies 기술 개요*, 발행 번호 5994-1704EN, **2020**.
3. Lee, K. S.; Drescher, D.G. Derivatization of Cysteine and Cystine for Fluorescence Amino Acid Analysis with the o-Phthaldialdehyde/2-Mercaptoethanol Reagent. *JBC* **1979**, 254(14), 6248–6251.

www.agilent.com

DE-001917

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 10월 21일, 한국에서 인쇄
5994-7703KO

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