

“양호한” 시료 전처리는 정말 양호합니까?

지질 및 불충분한 매트릭스 제거의 숨겨진 위험

소개

실험실은 수년간 워크플로 관리 능력과 효율성을 극대화하기 위해 노력해왔습니다. 생물학적 시료 전처리에 단백질 침전법(PPT)을, 식품 시료 전처리에 QuEChERS를 보편적으로 사용한다는 것은 복잡한 시료 전처리 절차를 간소화하는 방법을 보여주는 좋은 예입니다. 만약 귀하께 실험실에서 현재 사용 중인 워크플로가 어떠한지 여쭙본다면, 아마도 업무를 수행하기에 충분하다고 답할 것입니다. 하지만 귀하가 생각하는 충분히 양호한 시료 전처리 방법이 정말 괜찮은 것일까요?

귀하의 실험실 워크플로는 많은 어려움에 직면해 있으며, 지속적으로 효율성이나 처리량 지표를 개선해달라는 요청을 받고 있습니다. 일반적인 워크플로는 시료 수집, 시료 전처리, 기기 도입, 분석, 데이터 검토, 마지막 데이터 보고 단계로 구성되며, 시료 전처리는 워크플로 개선을 방해하고 속도를 제한하는 요소로 여겨져 왔습니다. 현재 첨단 기기는 복잡한 시료 분석에 필요한 감도, 선택성, 신뢰성, 타당성을 고려하여 다양한 시료를 분석할 수 있는 능력이 크게 증가되었습니다. 따라서 시간, 비용, 복잡성을 줄이고 범용 적용성을 개선하기 위해 시료 전처리 단계는 최대한, 그리고 양호한 수준으로 간소화되었습니다.

가장 중요한 워크플로는 귀하의 몫입니다. 시료 전처리가 충분히 최적화되지 않으면 시간 낭비, 기기 유지보수 및 고장 문제, 부정확한 데이터 등의 잠재적 위험이 있어 이러한 위험 발생 시 전반적인 성공에 영향을 미칠 수 있습니다. 적절한 시료 전처리 워크플로를 적용하면 이러한 잠재적 위험을 제거하거나 최저 수준으로 낮출 수 있습니다. 이 개선은 연구자 재교육이나 큰 비용 지출, 또는 표준 작업 절차서(SOP)의 재작성 없이도 실현할 수 있습니다.

이 백서는 일상적으로 어려움을 겪는 잘 알려진 시료 간섭의 일부를 서술하고, 시료 전처리 워크플로에서 매트릭스 제거를 최적화하지 않았을 경우 마주칠 수 있는 덜 알려진 잠재적 저해요소를 밝힙니다. 또한 잘 알려졌거나 알려지지 않은 결과에 대해 알아보며, 생산성과 기술자의 업무 효율성을 향상시키고 분석 기기의 오염 위험을 최소화시키는 최신 솔루션을 소개해 드립니다. SOP에 큰 변화를 주거나, 처리량을 희생하거나, 워크플로에 복잡성을 더하지 않고도 회수율 및 재현성을 개선할 수 있습니다. 이제, 이것이 양호한 시료 전처리의 정의가 될 것입니다!

시료 정제를 수행해야 하는 이유는 무엇입니까?

시료 전처리를 해야 하는 두 가지 주요 이유는 다음과 같습니다.

- 원하지 않는 매트릭스 제거
- 표적 분석물질 농축

이 백서는 매트릭스 제거 효율을 극대화하지 않았을 경우 맞닥뜨릴 수 있는 명백하거나 잠재적인 위험을 살펴봅니다.

원치 않는 매트릭스 성분이 처리되지 않은 채로 남아 있거나 충분히 제거되지 못한다면, 흐름 경로를 오염시킬 수 있습니다. GC, GC/MS, GC/MS/MS 분석에서, 표적 분석물질과 함께 추출되는 비활성 간섭 매트릭스는 주입구, 골드 실(gold seal), 컬럼과 같은 GC 흐름 구성요소에 해로운 영향을 미칠 수 있습니다(그림 1). LC,



그림 1. “양호한” 시료 전처리 후 GC 시스템 구성요소의 오염

LC/MS, LC/MS/MS 분석에서 매트릭스 미립자와 염은 밸브, 온라인 필터, LC 컬럼을 손상시킬 수 있습니다. 표적 분석물질과 함께 추출되는 간섭 매트릭스는 MS 소스에서 상당한 이온 억제를 초래할 수 있으며 (그림 2), 그 결과 분석법 신뢰성에 부정적인 영향을 미칠 수 있습니다. 대부분 분석자들은 위에서 언급한 알려진 위험을 피하고자 시료를 시스템에 주입하기 전에 입자 매트릭스 효과를 최소화할 수 있게 필터링을 거칩니다. 그러나 원치 않는 매트릭스가 용매에 용해되었다면 어떻게 할까요? 필터링만 했다면 어떤 결과를 초래할까요?

그림 2는 용해된 원치 않는 매트릭스 동시 추출물을 나타냅니다. 이는 용해된 염, 색소, 단백질, 지질 등이 있을 수 있으며 분석 하드웨어에 해로운 영향을 미칠 수 있습니다.

질량 분석은 높은 감도와 선택성으로 인해 광범위한 응용 분야에서 선호되는 분석법입니다. 그러나 매트릭스 성분에 의해 야기되는 이온 억제나 이온 증강은 정확도, 정밀도, 견고성에 부정적인 영향을 미칩니다 (높은 상대 표준 편차(RSD)에서 확인 가능). 컬럼 후(post-column) 주입은 매트릭스에 의해 야기된 이온 억제나 이온 증강을 식별하는 기술이며, 그림 3은 그러한 실험을 위한 일반적인 설정을 나타냅니다(응용 자료 5991-8007KO³ 참조).

이 비교 연구를 통해 귀하가 사용 중인 “양호한” 시료 전처리가 효율 요건에 미치지 못함을 확인할 수 있습니다. 애질런트 시료 전처리 솔루션이 귀하의 “양호한” 시료 전처리에 효율성과 신뢰성을 더할 것입니다.

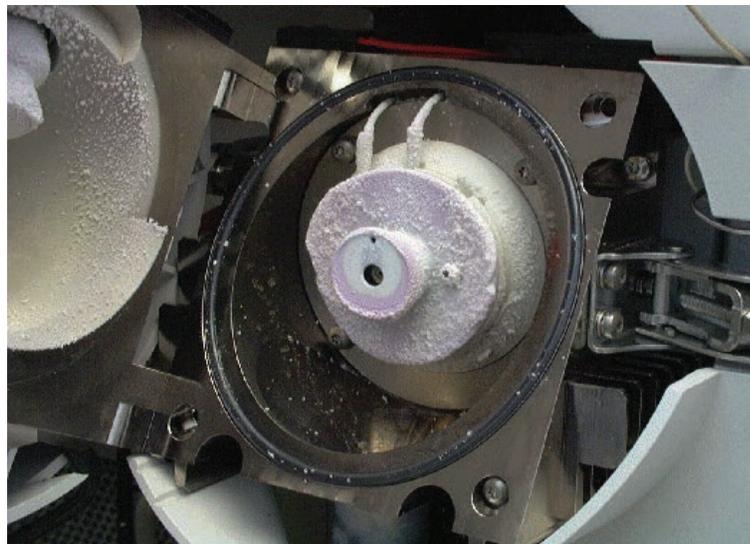


그림 2. “양호한” 시료 전처리 과정에서 제거되지 않은 염이 LC/MS 이온화원에 축적됨

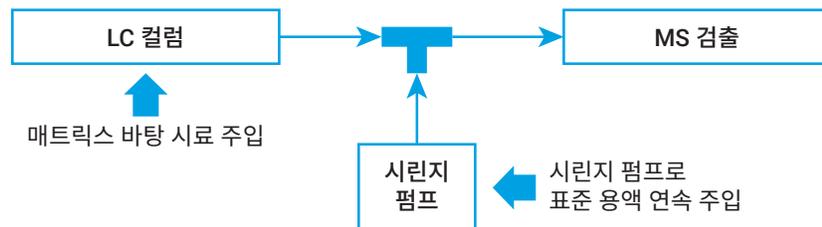


그림 3. 매트릭스 이온 억제 평가 및 비교 연구를 위한 표준 컬럼 후(post-column) 주입 설정 다이어그램

지질의 영향은 얼마나 심각합니까?

지질은 효율적인 제거가 어렵고 축적 시 육안으로 확인하기 어렵기 때문에 모든 시료 매트릭스 동시 추출물 중에서 가장 어렵지만 자주 간과되는 성분입니다. 컬럼 후(post-column) 주입 실험(그림 3 참조)에서 매트릭스 바탕 시료를 연속 주입하여 혈청, 혈장 등이 MS 신호에 대한 매트릭스 효과를 평가할 수 있습니다. 신호 강도의 변화는 매트릭스에 이온 억제나 증강을 야기하는 물질이 존재함을 나타냅니다.

예시는(그림 4의 zone 2 및 zone 3) 지질이 데이터의 품질에 얼마나 큰 영향을 미치는지 나타냅니다.

단백질 침전법은 생물학적 시료 내 다량의 단백질을 제거하는 데 효율적이지만, 상당한 이온 억제를 야기할 수 있는 인지질을 제거하지 못합니다 (응용 자료 5991-8007KO³ 참조).

데이터 품질이 떨어지면 전체적인 실험실 생산성을 현저히 저하시킵니다.

다음은 LC/MS/MS나 GC/MS/MS 분석에서 비효율적인 매트릭스 제거가 실험실 생산성에 미치는 영향을 일부 나열하였습니다.

분석법 신뢰성 및 데이터 품질

- 분석법 감도 및 선택성이 허용 불가능한 수준으로 하락됨
- 검량 직선성이 허용 불가능한 수준으로 하락됨
- 분석법 정확도 및 정밀도 저하
- 피크 식별 및 적분이 어려움

분석법 적용성

- 분석법 개발 및 최적화 시간이 길어짐
- 분석법 트러블슈팅 빈도 증가
- 매트릭스에 따른 검출 결과 변화
- 시료 재분석 빈도 증가

질량 분석기 청결도

- MS 이온화원 세척 빈도 증가
- 캐필러리 세척 또는 교체 빈도 증가
- 진공도를 설정하거나 유지하기 위한 능력 손실
- 추가적인 트러블슈팅 필요

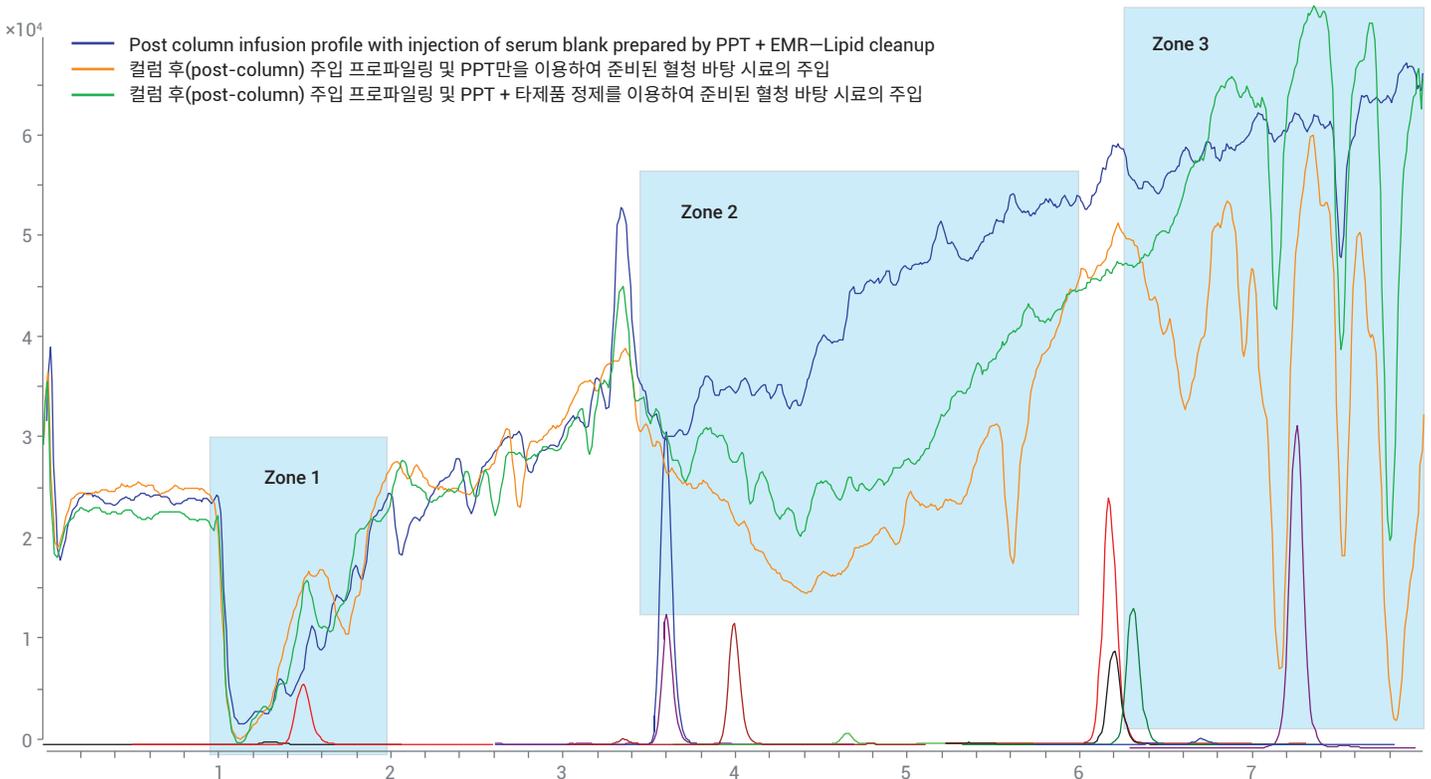


그림 4. 표준 컬럼 후(post-column) 주입 프로파일링 비교 및 표적 분석물질에 대한 매트릭스 이온 억제 효과 증명

컬럼 내 지질 축적

- LC 및 GC 컬럼의 사용수명 단축
- GC 주입구 유지보수 빈도 증가
- GC 컬럼 클리핑(clipping) 빈도 증가
- LC 컬럼 역압(backpressure)
- 시스템 세척 또는 평형화 빈도 증가
- 분석 시간 늘어남

지질 제거를 위한 워크플로가 존재하기는 하지만, 기존 시료 정제 분석법은 지질을 제거하는 동시에 일부 표적 분석물도 함께 제거하여 분석물 회수율을 감소시킵니다. 많은 분석자들은 유지보수 빈도, 소모품 교체 빈도를 증가하거나 더 종합적인 시료 전처리 기법을 적용하는 방식으로 이러한 상황에 대처하고 있습니다. 보다 종합적인 시료 전처리 기법을 적용하면 데이터 품질을 향상하는 데는 도움이 되지만, 훨씬 많은 비용, 시간, 전문성이 필요하여 생산성을 감소시킵니다.

왜 단순히 “양호한” 시료 전처리를 수행하는 것만으로 분석의 성공을 보장할 수 없다고 하는가?

더 나은 품질의 데이터를 얻고 생산성을 현저히 개선하려면, 지질과 일반적인 매트릭스 간섭을 제거할 수 있는 더 간편하고 나은 분석법이 필요합니다. 애질런트는 이 목표를 달성하기 위해, 단순화된 워크플로를 통해 효과적으로 시료를 정제하는 Captiva EMR—Lipid를 개발했습니다. Captiva EMR—Lipid는 간편하고 광범위하게 사용되는 접근법으로, 탁월한 분석물질 회수율을 통해 지질로 인한 매트릭스 효과를 감소할 수 있습니다.

식품이나 생물학적 시료와 같이 복잡하고 어려운 시료를 분석할 때, 표적 분석물질에 가장 적합한 시료 전처리 기법을 결정해야 합니다. 많은 시료 전처리 기법들은 조작이 어렵거나, 인력이 많이 필요하거나, 시간이 오래 걸릴 뿐만 아니라, 정제 후에도 여전히 화합물 회수율과 매트릭스 간섭 문제가 있을 수 있습니다. 시료 전처리의 일반 요구사항은 간편하고 간소화된 프로토콜을 제공하는 것입니다. 시료 정제는 효과적으로 매트릭스 간섭물을 제거해야 하며, 다양한 표적 분석물질의 회수율에 대한 영향을 최소화해야 합니다.

표 1. 기존 PPT(96-well plate) 기반 원심분리와 Agilent Captiva EMR—Lipid cleanup(96-well plate)을 이용한 필터링 기반 PPT 비교

기존 PPT(96-well plate) (원심분리)			PPT + Captiva EMR—Lipid cleanup(96-well plate) (필터링)		
단계	필요 시간(분)	필요한 소모품	단계		
플레이트 라벨링 및 시료 분주(aliquoting)	30	96 tips(small size) 1 Collection plate	플레이트 라벨링 및 시료 분주(aliquoting)	30	96 tips(small size) 1 Collection plate 1 EMR—Lipid plate
내부 표준물질 첨가	5	1 Repeater tip	내부 표준물질 첨가	5	1 Repeater tip
시료 혼합	2	Plate cover	시료 혼합	2	Plate cover
crash 용매 첨가	5	1 Repeater tip	crash 용매 첨가	5	1 Repeater tip
시료 혼합	5	Plate cover	시료 혼합	5	Plate cover needed only for active mixing
원심분리	10		필터링	10	
상등액 옮김, 수집 플레이트 라벨링	30	96 tips(medium size) 1 Collection plate		기타	1 Plate mat
시료 후처리	기타	1 Plate mat	시료 후처리		
필요한 총 시료 전처리 시간	후처리까지 87 분 필요		필요한 총 시료 전처리 시간	후처리까지 57 분 필요(약 30% 시간 절약)	
기기 가동 시간 및 용매 사용량	100%		기기 가동 시간 및 용매 사용량	<90%(최소 10% 시간 및 용매 사용량 절약)	
매트릭스 제거	단백질만		매트릭스 제거	단백질 및 지질	

엄청나게 많은 매트릭스 성분 중에서 표적 화합물을 식별하는 상황을 가정해 보십시오. 그림 5는 아보카도 추출물에 대해 아무런 후처리를 적용하지 않았을 경우(안좋은

결과), C18 정제를 적용했을 경우(불충분한 결과)와 EMR-Lipid cleanup을 적용했을 경우(최적화된 결과)에 얻은 GC 전체 스캔 크로마토그램을 보여줍니다.

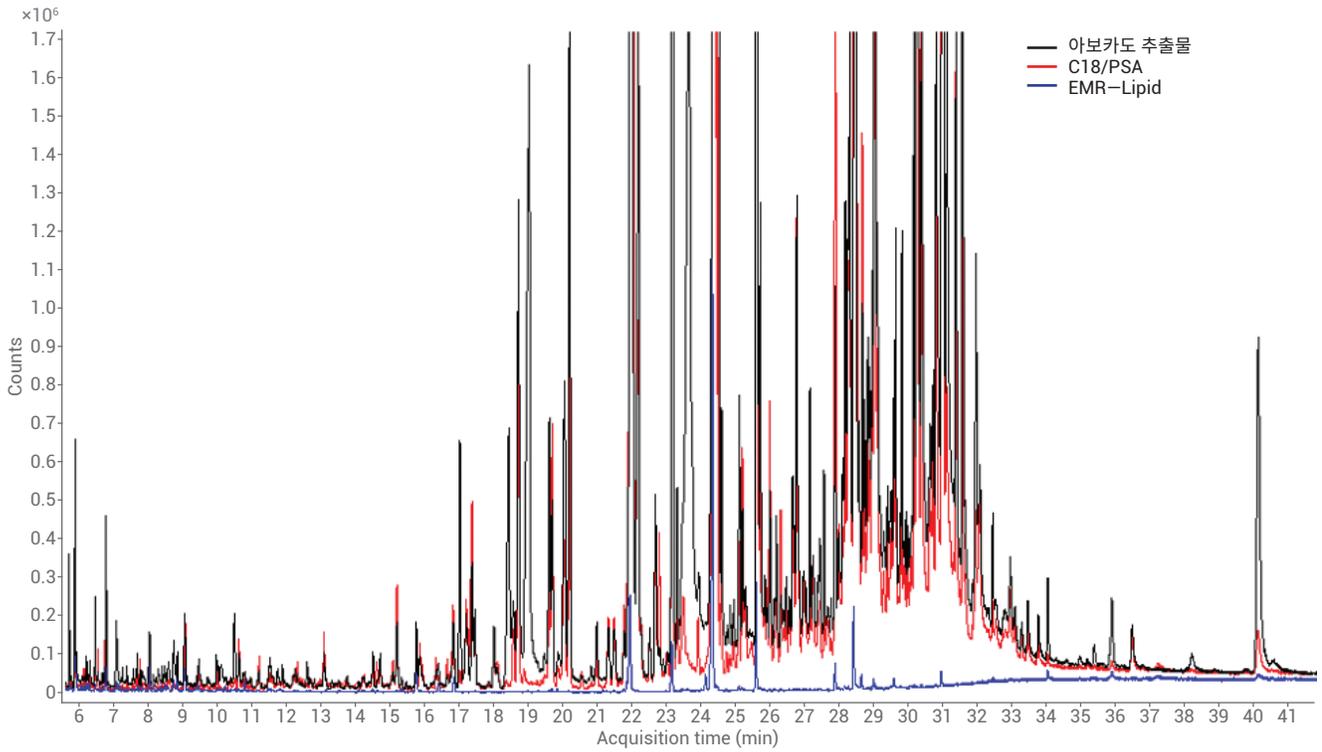


그림 5. 처리를 거치지 않은 QuEChERS 아보카도 추출물(바탕 시료)을 기존 C18/PSA cleanup의 처리를 거친 추출물(빨간색) 및 Agilent EMR-Lipid의 처리를 거친 추출물(파란색)과 비교한 GC/MS 전체 스캔 중첩 크로마토그램

지질은 현저한 매트릭스 이온 억제 효과를 일으켜 검출 감도를 낮추고 분석법 재현성을 떨어뜨립니다. 생물학적 시료 내 인지질은 막대한 매트릭스 효과를 야기하므로 고질적인 문제로 여겨집니다. 그림 6은 비타민 D 대사물질 분석에서 Captiva EMR—Lipid cleanup을 적용한 시료가 PPT로만 처리한 시료보다 현저히 높은 분석물질 반응과 향상된 RSD를 보인 것을 나타냅니다.

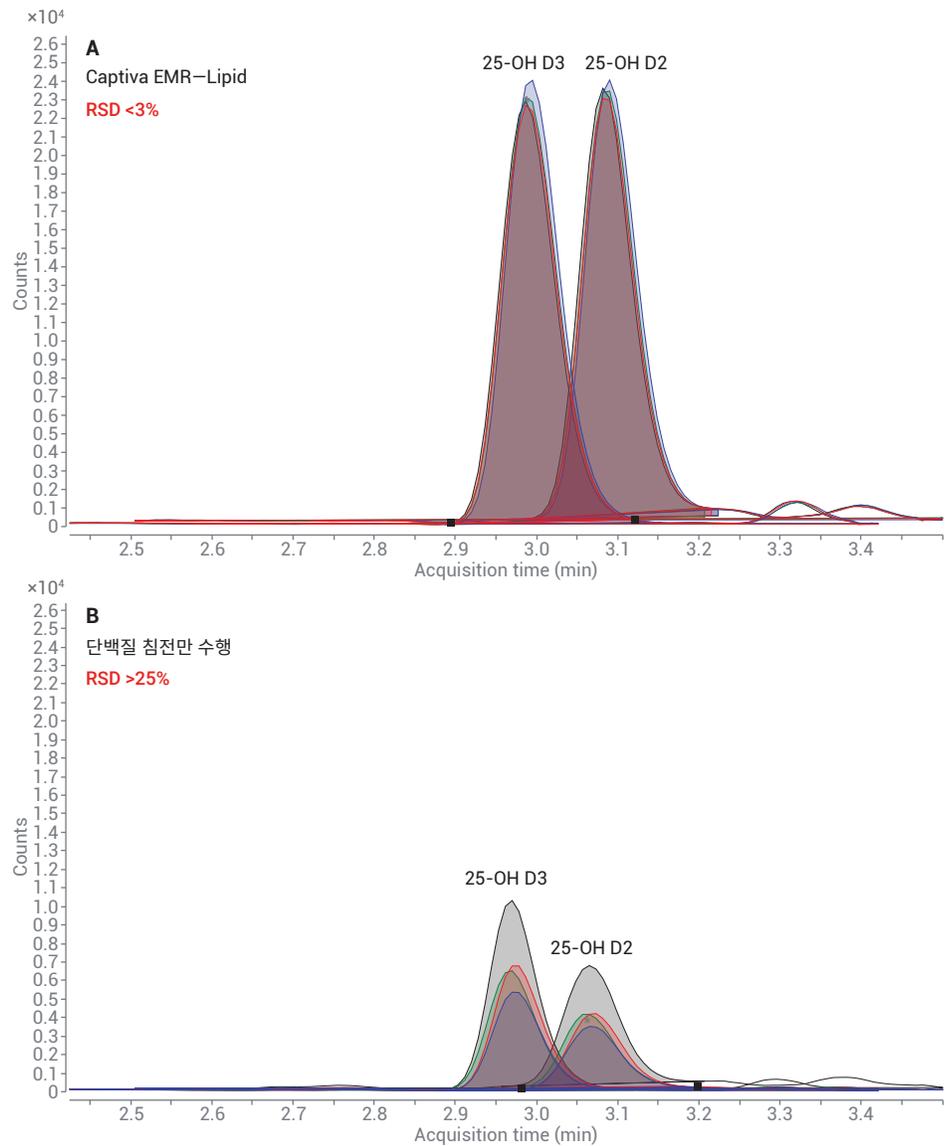


그림 6. PPT를 단독 수행할 때, PPT와 EMR—Lipid를 함께 적용할 때의 분석물질 반응 및 RSD 값 비교

이제 효과적으로 지질을 제거할 수 있게 되었습니다. 분석을 더 빠르게 할 수 있을까요?

Captiva EMR—Lipid를 사용하면, 분석법 신뢰성 및 데이터 품질을 개선할 뿐 아니라, 분석 시간을 단축하고 실험실

생산성을 개선할 수 있습니다. 그림 7의 그래프는 시료 주입 전에 인지질이 충분히 제거되었기 때문에, 소수성 화합물이 역상 크로마토그래피에서 용리될 때까지 기다릴 필요가 없어 소중한 분석 시간을 절약할 수 있음을 보여줍니다.

시료를 더욱 깨끗하게 정제함으로써 분석 시간과 시스템 세척 빈도를 감소시킵니다. 시료 청결도의 향상은 또한 예정된 예방

유지보수 시간 사이에 더 많은 시료를 분석할 수 있다는 것을 의미합니다. 또한 현재 실험실 장비로 더 높은 시료 처리량을 얻고 실험실에 향상된 경제적 이득을 가져올 수 있음을 의미하기도 합니다.

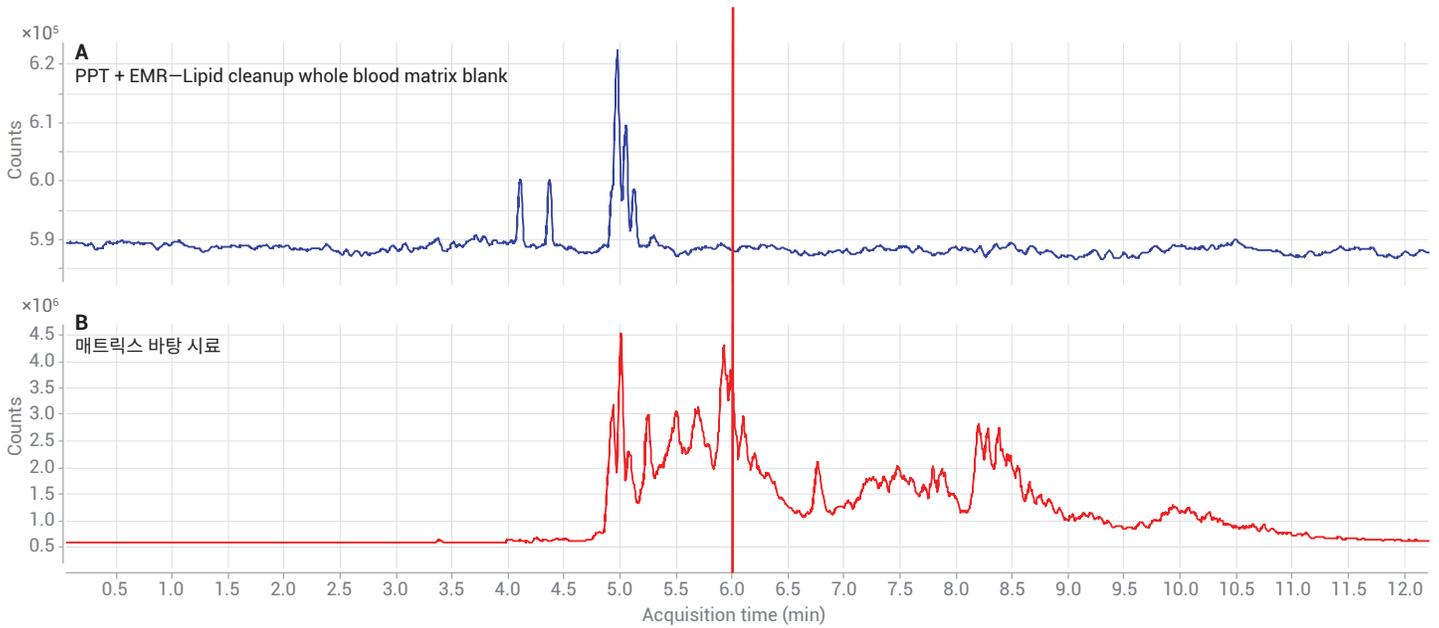


그림 7. 주기 시간이 단축되었음을 입증하기 위한 매트릭스 바탕 시료 인지질 프로파일링 비교

결론

시료 정제가 중요한 이유는 무엇일까요? 복잡한 시료는 지질, 단백질, 염, 색소 등 문제가 되는 매트릭스 성분을 다량 포함하고 있습니다. 지질은 몇 가지 이유로 가장 문제가 되는 매트릭스 성분 중 하나입니다.

귀하가 충분하다고 여기는 시료 전처리 워크플로에 개선된 시료 전처리 단계를 더하면 추가 기기 가동시간 확보, 실험실 분석자의 벤치 작업 시간 감소, 크로마토그래피 분석 시간의 잠재적인 감소 등 이점으로 일일 시료 처리량을 증대시킬 수 있습니다. 유지보수를 정기적으로 수행해야 하는 원인은 매트릭스 오염 때문입니다. 한 번의 유지보수를 통해 더 많은 매트릭스를 제거할 수 있다면, 유지보수 빈도를

줄일 수 있습니다. 이는 SOP를 변경하거나 워크플로에 추가적인 시간을 들이지 않아도 달성할 수 있습니다. 시료 전처리가 없다면, 표적 분석물질의 피크를 명확하게 확인할 수 없으며 정확하게 정량할 수 없을 것입니다. 심지어는 표적 분석물질의 피크를 아예 보지 못할 수도 있습니다. 이러한 모든 효과는 데이터 처리 시간을 연장시키고, 낮은 데이터 품질로 인해 시료와 배치를 재분석하는 빈도를 증가시킵니다.

Agilent Captiva EMR—Lipid에 대해 더 자세히 알아보세요

www.agilent.com/chem/Captiva-EMR-Lipid



Agilent Captiva EMR—Lipid cleanup

애질런트 시료 전처리 솔루션으로 생산성 향상을 달성하는 방법을 알아보세요

www.agilent.com/chem/did-you-know

권장 응용 자료

1. Quantitative Determination of Drugs of Abuse in Human Whole Blood by LC/MS/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-9251EN.
2. Protein Precipitation for Biological Fluid Samples Using Captiva EMR—Lipid 96-Well Plates, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-9222EN.
3. Agilent Captiva EMR—Lipid Cleanup 을 통한 인간 혈청 내 의약품의 LC/MS/MS 정량분석(Quantitative LC/MS/MS Analysis of Drugs in Human Serum with Captiva EMR—Lipid Cleanup), *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행물 번호 5991-8007KO.
4. Agilent Captiva EMR—Lipid를 이용한 생체시료 내 Vitamin D 대사산물 분석 (Vitamin D Metabolite Analysis in Biological Samples Using Agilent Captiva EMR—Lipid), *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행물 번호 5991-7956KO.
5. Multiclass Multiresidue Veterinary Drug Analysis in Beef, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8598EN.

동물용 의약품 분석에 관심이 있으신가요? **Journal of Chromatography A**에서도 저널 논문을 참조하실 수 있습니다.

Multiclass multiresidue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1549, 14-24.

www.agilent.com/chem/sampleprep

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 8월 6일, 한국에서 인쇄
5994-0110KO

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