

Application News

No. 01-00278-K

High Performance Liquid Chromatograph Nexera™ XS inert

뉴클레오타이드 분석의 감도 및 성능 향상 방법

Achieving Improved Sensitivity and Reliable Analytical Performances in Nucleotides Analysis

■ 서론

스테인리스 스틸은 내압성 및 내식성으로 인해 HPLC에 일반적으로 사용된다. 그러나 인산기를 포함하는 화합물은 금속 친화력에 의해 상호 작용할 수 있다. 이는 피크의 모양과 감도에 부정적인 영향을 미치는 요인이다. 금속 흡착을 억제하기 위해 인산으로 유로를 세척하고, 이동상에 킬레이트제를 첨가하거나 표적 화합물을 반복 주입하는 방법을 사용하기도 하지만, 재현성 있는 결과를 얻기는 쉽지 않다. 이 뉴스레터에서는 뉴클레오티드의 정확하고 재현성 높은 분석을 위해 금속이 없는 유로를 이용한 Nexera XS inert 고성능 액체 크로마토그래프와 금속이 없는 컬럼을 사용한 분석을 소개한다.

■ 분석조건

분석성분은 인산기를 포함하는 화합물인 아데노신 모노포스페이트 (AMP), 아데노신 디포스페이트 (ADP), 아데노신 트리포스페이트 (ATP)를 사용하였으며, 모든 화합물을 물에 용해 및 희석하여 조제하였다. 금속 흡착 효과를 평가하기 위해 크로마토그래프와 컬럼의 두 가지 조합을 비교하였다. 하나는 "금속 기반 시스템(metal-based)"이고 다른 하나는 "금속 미기반시스템(metal-free)" 이다 (표 1). 두 시스템의 분석 조건은 동일하며 표 2와 같다.

표 1. HPLC 구성

"이름"	시스템	컬럼
"금속 기반 시스템" (metal-based)		Shim-pack [™] Scepter C18-120
"금속이 미기반 시스템" (metal-free)	Nexera XS inert	Shim-pack Scepter C18-120 [metal-free]

표 2. 분석 조건

System : Nexera XS inert or Nexera XS

Column : Shim-pack Scepter C18-120 [metal-free]*1

(100 mm × 2.1 mm I.D., 3 µm) : Shim-pack Scepter C18-120*2 (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 µm)

Mobile Phase : Acetonitrile/10 mmol/L ammonium formate

solution = 0.5 : 99.5

Flow Rate : 0.2 mL/min Column Temp : 40 $^{\circ}$ C

Vial : TORAST[™] -H Bio Vial (Shimadzu GLC)^{*3}

Injection volume $\,:\, 2\,\mu L$

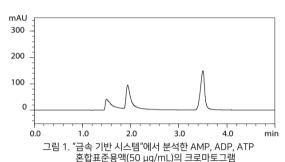
Flow rate

Detection : 254 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

■ 피크 모양과 재현성 비교

AMP, ADP, ATP 혼합표준용액(50 μ g/mL)의 크로마토그램은 그림 1, 그림 2와 같으며, 혼합표준용액 10회 분석시 대칭 인자 및 ATP 피크의 면적 값의 추이를 그림 3과 그림 4에 나타내었다.

"금속 기반 시스템"에서 금속 흡착으로 인해 피크 테일링이 있으며, 대칭 인자가 더 크다. 또한, 샘플이 "금속 기반 시스템"에 주입될 때마다 ATP의 피크 면적 값이 증가하여 샘플이 금속 상호작용으로 인해 내부 표면을 점진적으로 "코팅"하고 있음을 알수 있다. "금속 미기반 시스템"에서는 약 1의 대칭 인자로 피크모양이 개선되었으며, 면적 값은 첫 번째 주입부터 열 번째 주입까지 일관되게 안정적이었다. 이러한 결과는 "금속 미기반 시스템"을 사용한 분석이 금속 흡착을 억제하고 재현성을 향상시킨다는 것을 의미한다.



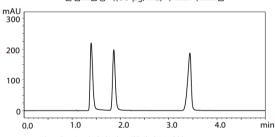
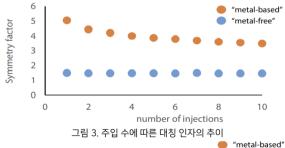
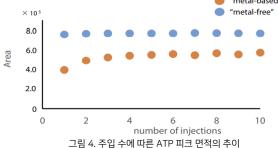


그림 2. "금속 미기반 시스템"에서 분석한 AMP, ADP, ATP 혼합표준용액(50 µg/mL)의 크로마토그램





^{*1} P/N 227-31073-02, *2 P/N 227-31014-05, *3 P/N 370-04350-00

■ 뉴클레오티드 표준시료의 정량적 정확도 평가

ATP 표준용액 (1, 2.5, 5, 10, 25, 50 µg/mL)을 표 1의 조건으로 6 회 반복 측정하여 검정곡선을 얻었다.

"금속 기반 시스템" 검정곡선에서는 금속 흡착으로 인해 선형성이 감소했다 (r²=0.9918, 그림 5). 표 3은 각 검정곡선 농도의 정확도와 정밀도를 보여준다. "금속 기반 시스템" 에서는 1 µg/mL 농도에서 검출되지 않았고, 2.5 μg/mL 농도에서는 검출이 가능했지만, 피크의 감도가 정량하기에 충분하지 않았다. ATP 표준용액을 2, 20 및 45 µg/mL 의 농도로 조제하여 QC 대조군으로 준비하였다. 이 대조군은 그림 5에 나타낸 검량선을 사용하여 정량 하였으며 QC 결과를 표 4에 정리하였다. "금속 기반 시스템"을 사용할 때, 금속 흡착으로 인한 검정곡선의 낮은 선형성으로 인해 예상한 것과 같이 QC 대조군의 정량 값의 편차가 크게 나타났다.

반면, "금속 미기반 시스템"으로 얻은 검정곡선은 우수한 선형성을 보였다 (r²=0.9999, 그림 6). 표 5는 각 검정곡선 농도의 정확도와 정밀도를 보여준다.

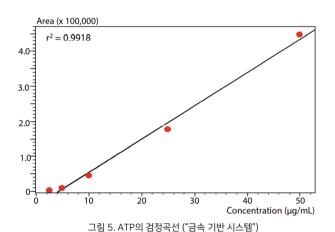


표 3. 검정곡선 표준 시료의 정량 값, 정확도, 정밀도 ("금속 기반 시스템")

	Intra-Assay (n = 6)			
Conc. (µg/mL)	Measured Conc. (µg/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)	
1	N.D.			
2.5	2.28	91.0	110	
5	5.29	106	4.9	
10	8.65	86.5	7.1	
25	22.7	91.0	6.3	
50	51.3	103	3.6	

표 4. QC 대조군의 정량 값, 정확도, 정밀도 ("금속 기반 시스템")

	Intra-Assay (n = 6)			
Conc. (µg/mL)	Measured Conc. (µg/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)	
2	4.53	226	1.6	
20	18.4	91.9	5.7	
45	46.4	103	3.3	

표 6은 QC 대조군의 정량적 결과를 보여준다. 낮은 수준의 검정곡선 농도와 QC 대조군에서도 우수한 재현성을 얻었다. 이러한 결과는 Nexera XS inert와 metal-free 컬럼의 조합이 금속 흡착을 억제하는 데 효과적이며, 뉴클레오티드와 같은 인산기를 포함하는 화합물 분석에 효율적으로 사용할 수 있음을 보여준다.

■ 결론

이 뉴스레터에서는 뉴클레오티드 분석에서 금속 흡착의 영향을 평가하였다. 금속 기반 크로마토그래프 및 컬럼과 비교하여 금속 미기반 유로는 인산기를 포함하는 화합물을 정확하고 재현성 있게 분석하였다. 과거에는 금속 흡착을 억제하기 위해 여러 가지 처리가 필요했지만, Nexera XS inert 및 Shim-pack Scepter C18 metal-free 컬럼의 조합은 감도 향상과 함께 정확하고 견고한 분석 결과를 제공 하였다.

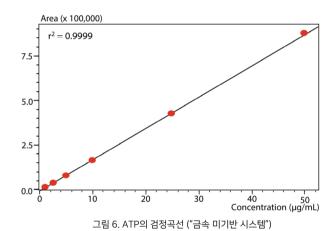


표 5. 검정곡선 표준 시료의 정량 값, 정확도, 정밀도 ("금속 미기반 시스템")

	Intra-Assay (n = 6)			
Conc. (µg/mL)	Measured Conc. (µg/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)	
1	1.07	101	0.61	
2.5	2.43	97.0	0.50	
5	4.82	96.4	0.28	
10	9.74	97.4	0.24	
25	24.9	99.4	0.81	
50	50.6	101	0.095	

표 6. QC 대조군의 정량 값, 정확도, 정밀도 ("금속 미기반 시스템")

	Intra-Assay (n = 6)			
Conc. (µg/mL)	Measured Conc. (µg/mL)	Accuracy (%)	Precision (%)	
2	2.00	100	0.59	
20	19.6	98.2	0.081	
45	44.9	99.7	0.11	

01-00278-K



Shimadzu Corporation www.shimadzu.com/an/ Shimadzu Scientific Korea www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only, Not for use in diagnostic procedures, Not available in the USA, Canada, and China.
This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".

Third-party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".

Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and