

■ 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 뉴클레오타이드의 정확하고 재현성 높은 분석을 위해 금속이 없는 유로를 이용한 Nexera XS inert 고성능 액체 크로마토그래프와 금속이 없는 컬럼을 사용한 분석을 소개한다.

■ 분석조건

분석 성분은 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 미기반 시스템(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)	Nexera XS	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)
Flow rate	: 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 °C
Vial	: TORAST™ -H Bio Vial (Shimadzu GLC) ^{*3}
Injection volume	: 2 μL
Detection	: 254 nm (SPD-M40, UHPLC inert cell)

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

■ 피크 모양과 재현성 비교

AMP, ADP, ATP 혼합표준용액(50 μg/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 알 수 있다. "금속 미기반 시스템"에서는 약 1의 대칭 인자로 피크 모양이 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.

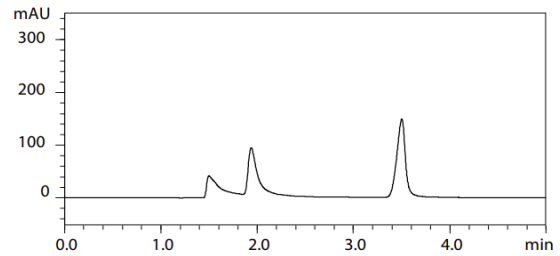


그림 1. "금속 기반 시스템"에서 분석한 AMP, ADP, ATP 혼합표준용액(50 μg/mL)의 크로마토그램

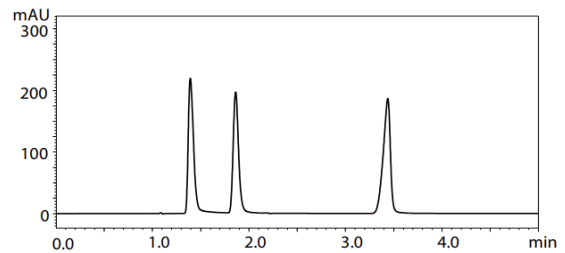


그림 2. "금속 미기반 시스템"에서 분석한 AMP, ADP, ATP 혼합표준용액(50 μg/mL)의 크로마토그램

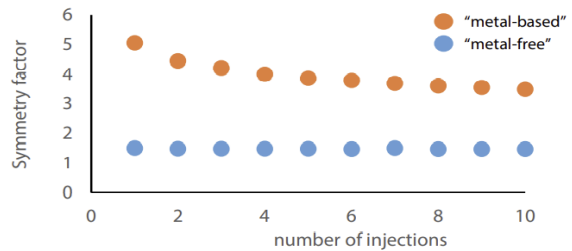


그림 3. 주입 수에 따른 대칭 인자의 추이

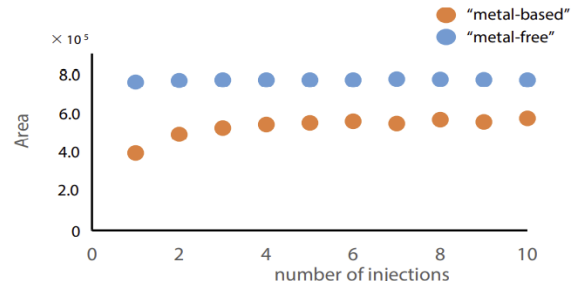


그림 4. 주입 수에 따른 ATP 피크 면적의 추이

■ 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 ($r^2=0.9918$, 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 나타난 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 ($r^2=0.9999$, 그림 6). 표 5는 각 검정곡선 농도의 정확도와 정밀도를 보여준다.

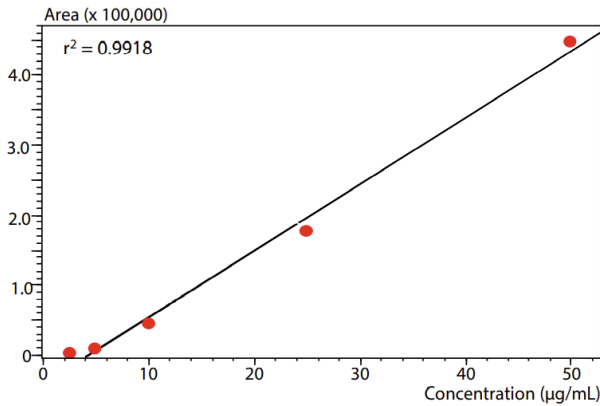


그림 5. ATP의 검정곡선 ("금속 기반 시스템")

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 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.

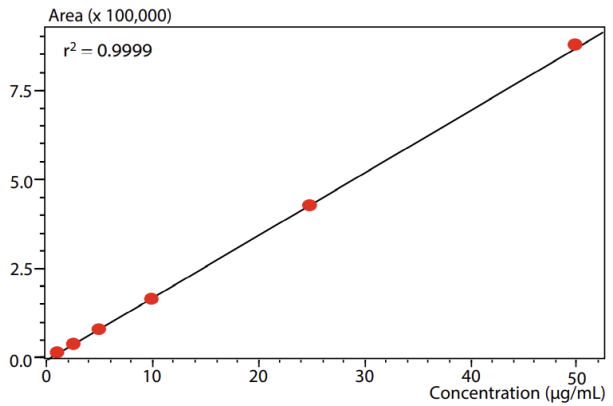


그림 6. ATP의 검정곡선 ("금속 미기반 시스템")

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

Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n = 6)		
	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 5. 검정곡선 표준 시료의 정량 값, 정확도, 정밀도 ("금속 미기반 시스템")

Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n = 6)		
	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 4. QC 대조군의 정량 값, 정확도, 정밀도 ("금속 기반 시스템")

Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n = 6)		
	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 6. QC 대조군의 정량 값, 정확도, 정밀도 ("금속 미기반 시스템")

Conc. (µg/mL)	Intra-Assay (n = 6)		
	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

