Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 1.9µm 컬럼을 이용해 초고속 분리 달성

응용 자료

농산물, 식품 테스트, 저분자 의약품

저자

Anne Mack Agilent Technologies, Inc.

개요

10종의 화합물을 2.1 × 50mm, 1.9µm Agilent InfinityLab Poroshell 120 컬럼을 이용해 최소 2.2의 분리능으로 0.3분 내에 베이스라인 분리했습니다. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250mm, 5µm 컬럼에서 수행된 동일한 분석과 비교해 InfinityLab Poroshell 컬럼을 이용한 분석은 이동상을 98% 줄이면서 120배 더 빠른 속도로 완료되었습니다. 두 컬럼은 유사한 선택성을 가지므로 분석법 이전이 쉽습니다.

Agilent Technologies

서론

표면 다공성 입자의 LC 컬럼은 액체 크로마토그래피에서 인기 있는 도구입니다. 표면 다공성 입자 컬럼은 전체 다공성 입자 컬럼과 비교해 더 낮은 압력에서 높은 효율성을 창출합니다[1]. 이는 주로 질량 이동(mass transfer) 거리가 더 짧고 컬럼 내 입자 크기 분포가 더 조밀하기 때문입니다[2]. 표면 다공성 입자에 대한 현재 추세는 더 높은 효율성 개선을 위해 입자 크기를 줄이고 있습니다. 효율성이 더 높으면 분리능 및 감도가 개선되어 시간을 단축하거나 결과를 향상시킬 수 있습니다.

Agilent LC 컬럼 제품군 내에서 쉽게 분석법 전환 및 확장성을 보장하기 위해 많은 연구를 하였습니다. 고정상의 화학 특성은 완전 다공성 입자의 Agilent ZORBAX 및 표면 다공성 입자의 Agilent InfinityLab Poroshell 컬럼에서 매우 유사하므로, 추가적인 분석법 개발 없이도 분석법을 쉽게 업데이트할 수 있습니다[3].

이 작업은 기존 5µm 입자 컬럼을 이용한 분석에 비해 작은 Poroshell 입자 컬럼을 사용해 알킬페논(alkyphenone)의 분리를 개선하는 방법을 보여줍니다. InfinityLab Poroshell 컬럼을 사용하여 시간, 용매, 시료 및 비용이 크게 절약되는 것이 증명되었습니다.

실험

이 실험에는 Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 사용하였습니다. 이 시스템은 낮은 시스템 부피와 확산이 가능하도록 표준 구성을 수정하였습니다. 표 1은 구성 세부 정보와 이 실험에 사용된 두 개의 Agilent LC 컬럼을 나타냅니다.

표 2는 모든 분석에 대한 LC 분석법 파라미터를 나타냅니다. 빠른 1.9µm 분석을 제외하고, 모든 분석법은 컬럼 간 크로마토그래피 분리를 보장하기 위해 컬럼 부피에 따라 기하학적으로 크기를 조정했습니다.

이 작업에서 10종의 화합물을 분석하였습니다. 9종의 알킬페논(alkyphenone)은 애질런트에서 표준 용액으로 구매했습니다. Sigma-Aldrich에서 구매한 Thiourea를 표준물질에 추가하여 void volume 마커로 사용하였습니다. 아세토니트릴은 Honeywell(Burdick and Jackson)에서 구매했으며, 물은 Milli-Q 시스템(Millipore)(18MW)을 통해 0.2µm 필터링 막으로 필터링되었습니다.

표 1. UHPLC 시스템 구성

Agilent 1290 Infinity LC 시스템 구성	
Agilent 1290 Infinity Binary Pump (G4220A)	35 µL Solvent mixer: Jet Weaver, 35 µL/100 µL (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity High Performance Autosampler (G4226A)	Seat assembly, ultralow dispersion, for Agilent 1290 Infinity Autosampler (G4226-87030) Autosampler to heater: capillary, stainless steel, 0.075 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784) Vial, screw top, amber with write-on spot, certified, 2 mL, 100/pk (5182-0716) Cap, screw, blue, PTFE/red silicone septa, 100/pk (5182-0717) Vial insert, 250 µL, glass with polymer feet, 100/pk (5181-1270)
Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment (G1316C)	Heat exchanger, low dispersion, 1.6 µL, double (G1316-60005) Heater to column: InfinityLab Quick Connect assembly, 105 mm, 0.075 mm (5067-5961) Column to flow cell: capillary, stainless steel, 0.075 x 220 mm, SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)	Ultralow dispersion Max-Light cartridge flow cell, 10 mm (G4212-60038)
Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition Revision C.01.05 [35]	G4220A: B.06.53 [0013] G4226A: A.06.50 [003] G1316C: A.06.53 [002] G4212A: B.06.53 [0013]
Agilent LC columns	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm (959990-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm (699675-902)

표 2. HUPLC 분석법 파라미터

Column	Mobile phase	Flow rate (mL/min)	Gradient	Injection volume (µL)	Sample	Thermostated column compartment (°C)	Diode array detector
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm	A) water B) acetonitrile	1.0	35–95 %B in 36 minutes	20	p/n 5188-6529 (~1 mL) + 0.1 mL of 1 mg/mL thiourea	25	254 nm, 80 Hz
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm		0.5	35–95 %B in 3 minutes	1			254 nm, 80 Hz
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm(빠른 분리)		2.3	50–100 %B in 0.3 minutes	1		60	254 nm, 160 Hz

결과 및 토의

10종 화합물에 대한 원래 분리는 완전 다공성 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250mm, 5µm 컬럼을 이용하여 실행되었습니다. 이 분리는 최소 분리능 6.1로 36분 내에 완료되었으며, 그림 1에서는 표면 다공성 입자의 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 1.9µm 컬럼을 이용한 동일한 LC 분석 결과도 보여줍니다. ZORBAX Eclipse Plus C18 및 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼은 전체적으로 선택성이 비슷한 결합 케미스트리를 이용하므로, 분석법을 변경할 필요가 없습니다. 그러나 컬럼 사양이 다르므로, 더 작은 컬럼 부피에 맞도록, 그레디언트, 유속 및 주입량이 기하학적으로 조정되었습니다. InfinityLab Poroshell 1.9µm 컬럼의 경우 더 작은 입자에 맞는 최적의 유속에서 실행하도록 유속을 높였습니다. 결과적으로 크로마토그램은 12배 더 빠른 속도로 얻어졌으며 96% 더 적은 이동상과 95% 더 적은 시료만 사용할 뿐만 아니라, 5.5의 최소 분리능을 유지합니다.

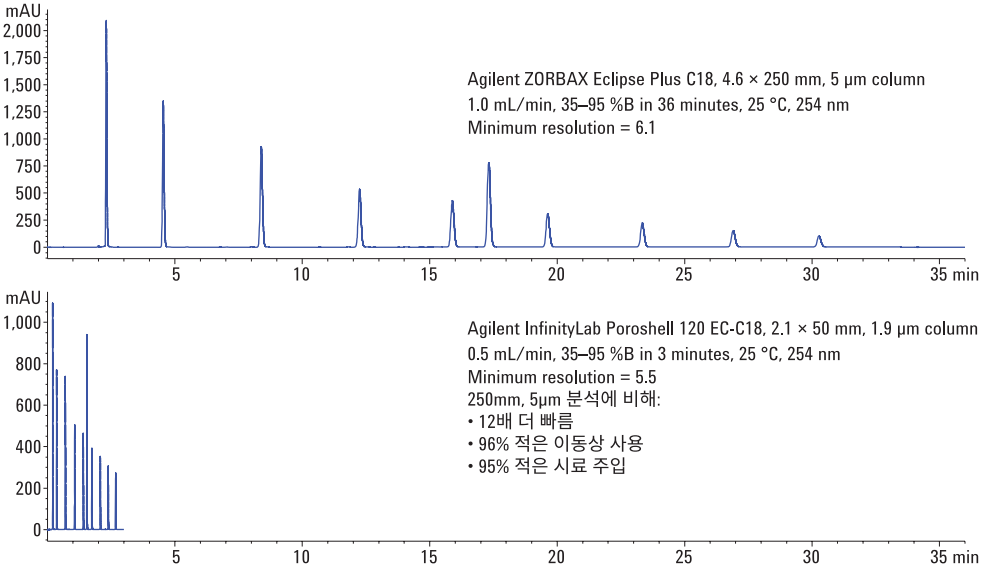

그림 1. Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250mm, 5µm 컬럼을 이용한 알킬페논(alkylphenone) 분석은 고성능 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 1.9µm 컬럼으로 이전함으로써 개선되며, 시간, 시료, 용매 및 비용이 크게 절감됩니다.

작은 표면 다공성 입자를 사용하면 매우 높은 효율성과 분리능을 얻을 수 있습니다. LC 시스템 압력 한계가 허용한다면 이러한 고성능을 활용해 초고속 분석을 실행할 수 있습니다. 그림 2에서 InfinityLab Poroshell 1.9µm 컬럼을 최대한 활용한 분리 결과를 보여줍니다. 높은 온도를 사용해 이동상 점도를 감소시킴으로써 유속을 2.3mL/분까지 올리고 1,150bar의 압력으로 실험하였습니다. 10종의 화합물 시료를 이 컬럼에서 가장 빠르게 분리할 수 있도록 원래 분석법의 그레디언트를 약간 조정했습니다. 결과적으로, 10종의 화합물이 모두 최소 분리능 2.2로 0.3분 내에 분리되었습니다. Eclipse Plus 250mm, 5µm 컬럼을 이용한 분석과 비교해 이 분석은 120배 더 빨랐으며, 최소 분리능을 유지하면서도 이동상을 98% 적게 사용했습니다.

표 3은 모든 크로마토그래피 결과의 요약 및 비교를 나타냅니다.

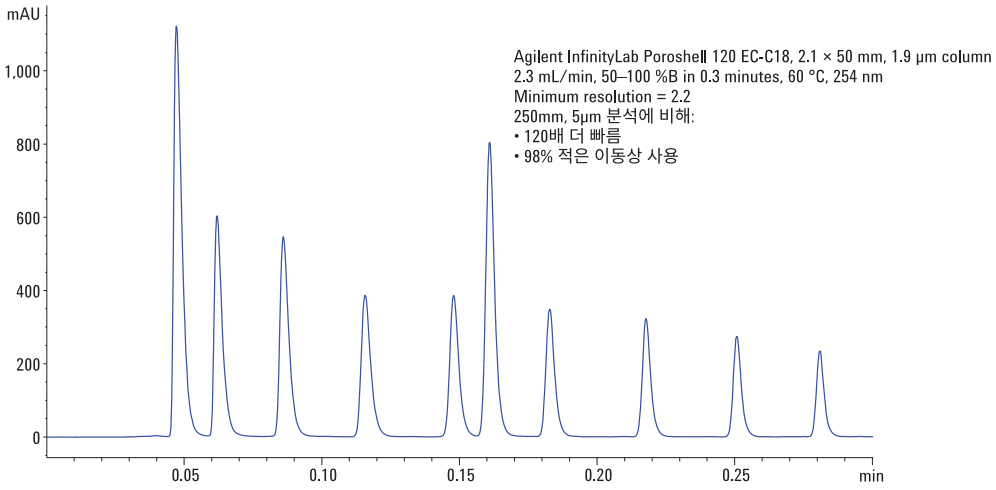

그림 2. 분석법 성능의 저하 없이 압력 한계에 가깝게 고성능 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 1.9µm 컬럼을 사용으로써 시간, 용매, 비용을 추가적으로 절약할 수 있습니다.

표 3. 다양한 LC 컬럼을 이용한 알킬페논(Alkyphenone) 분석의 비교

Column	Pressure (bar)	Minimum resolution	Conditional peak capacity (nC)	Run time (min)		Mobile phase consumption (mL)	
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250 mm, 5.0 µm	181	6.1	134	36	원래 5µm 분석	36	원래 5µm 분석
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm	420	5.5	91	3.0	원래 5µm 분석보다 12배 빠름	1.5	원래 5µm 분석보다 96% 더 적은 이동상 사용
Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm(초고속 분리)	1150	2.2	43	0.3	원래 5µm 분석보다 120배 더 빠름	0.69	원래 5µm 분석보다 98% 더 적은 이동상 사용

결론

높은 효율의 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 1.9µm 컬럼을 사용하여 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 5µm 컬럼과 같이 전통적인 컬럼을 이용하는 기존 분석법을 개선할 수 있습니다. InfinityLab Poroshell 및 ZORBAX 제품군은 유사한 결합상 케미스트리를 제공하므로, 분석법을 추가적인 개발 없이 쉽게 이전할 수 있습니다. LC 시스템 압력 한계가 허용한다면, InfinityLab Poroshell 1.9µm 컬럼으로 초고속 분리를 달성할 수 있고 기존 LC 컬럼과 비해 상당한 시간과 용매, 시료, 비용을 절약할 수 있습니다.

참고 문헌

1. A. Gratzfield-Hugsen, E. Naegele. Maximizing efficiency using Agilent Poroshell 120 Columns(Agilent Poroshell 120 컬럼을 이용한 효율성 극대화). Agilent Technologies 응용 자료, 발행물 번호 5990-5602KO, **2016**.
2. V. R. Meyer. Practical High Performance Liquid Chromatography. Fourth Edition, p. 34. Wiley (2004).
3. Transfer of Methods between Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns. Agilent Technologies 응용 자료, 발행물 번호 5990-6588EN, **2011**.

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트의 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹 사이트(www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016

2016년 11월 2일 한국에서 인쇄
5991-7540KO

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

Agilent Technologies