

애질런트 응용 솔루션

젯병에서 침출되는 bisphenol A 분석

응용 자료

소비재

저자

Syed Salman Lateef
Agilent Technologies, Inc.
Bangalore, India

개요

Bisphenol A는 플라스틱 식품 용기의 표면에서 침출될 수 있으며 플라즈마, 소변 및 지하수와 같은 다양한 매트릭스에서 검출됩니다. Bisphenol A는 환경 호르몬으로 에스트로겐 등의 인체 호르몬과 유사하며 인체에 부정적인 영향을 미칠 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 젯병에서 추출한 bisphenol A와 구조적으로 유사한 bisphenol F의 정량 방법을 설명합니다. 이 방법은 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 컬럼과 Agilent 1260 Infinity LC 시스템을 기반으로 개발하였습니다. 면적과 머무름 시간의 직선성, 견고성 및 정밀성을 입증하기 위한 부분 분석법 밸리데이션을 수행하였습니다. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench로 희석액을 자동 생성하여 분석 시간을 절약하였습니다. Bisphenol A의 정량 한계(LOQ)는 1.06ng/mL로 확인되었습니다. 시료 회수율 연구 동안 bisphenol A의 회수율은 80%였습니다. Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 사용하여 분석법을 초고성능 액체 크로마토그래피 분석법(UHPLC)으로 이전하였습니다. UHPLC 분석법에서는 동일한 실험 조건을 사용하지만, 피크가 더 좁고 높으며, 분리능과 신호 대 잡음 감응이 향상됩니다. 두 가지 분석법 모두 젯병과 같은 식품 용기의 품질 관리 중 bisphenol A 정량에 적용할 수 있습니다.



Agilent Technologies

서론

Bisphenol A (BPA)는 폴리카보네이트 플라스틱과 에폭시 수지를 만들 때 사용하는 모노머입니다. 가열 또는 pH 변화와 같은 다양한 환경 조건에서 극미량의 BPA가 폴리카보네이트 플라스틱 표면에서 침출될 수 있고 결국에는 체내로 흡수됩니다. BPA는 소변, 지하수 및 혈장과 같은 다양한 매질에서 검출됩니다. 독성 효과가 관찰되는 임계값이 존재한다는 가정을 기반으로 미 환경 보호국(US EPA)에서는 BPA에 대한 기준 선량(RfD)을 '50µg/kg(체중)/일'로 정했습니다¹. 폴리카보네이트 플라스틱 재료의 젖병은 영유아에게 잠재적으로 위험이 될 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 분리 효율성을 확인하기 위해 BPA와, 구조가 이와 유사한 시판 bisphenol F (BPF)(그림 1)를 사용하였습니다.

Ballesteros-Gomez *et. al.*는 BPA의 분리, 식별 및 정량을 다루는 여러 분석법을 검토하였습니다². 또한 ASTM 표준 시험법 D 7574-09에서는 수중 bisphenol A를 추출하기 위한 SPE 기반 오프라인 분석법을 설명합니다³. BPA는 형광 화합물로 젖병의 BPA 농도 검출 시 형광 검출기 (FLD)는 감도가 높은 방법입니다. 이 응용 자료에서는 (U)HPLC/FLD 검출을 이용한 SPE 기반 오프라인 추출 절차에 따라 BPA와 BPF를 동시 정량하는 분석법을 설명합니다.

실험

기기와 소프트웨어

Agilent 1260 Infinity Binary LC 시스템을 사용하였으며 구성 모듈은 다음과 같습니다.

- Agilent 1260 Infinity Binary 펌프 (G1312B)
 - Agilent 1260 Infinity 자동 시료 주입기 및 온도 조절 장치(G1367E, G1330B)
 - Agilent 1260 Infinity 향온 컬럼 장치(TCC) (G1316A)
 - Agilent 1260 Infinity 형광 검출기 (G1321B), 8µL 플로우 셀 장착
- UHPLC 분석은 Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 사용하여 개발 및 수행하였으며 구성 모듈은 다음과 같습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프 (G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 자동 시료 주입기 및 온도 조절 장치(G4226A, G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 향온 컬럼 장치(G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 형광 검출기 (G1321B), 8µL 플로우 셀 장착

소프트웨어:

- Agilent ChemStation B.04.02
- 시료 전처리:
- Agilent 7696A Sample Prep WorkBench

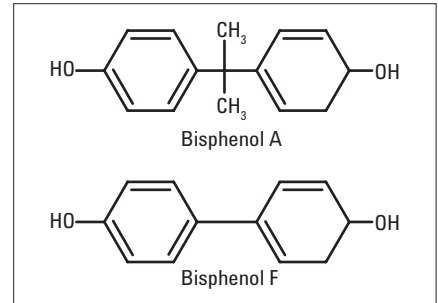


그림 1
bisphenol A 및 bisphenol F의 분자 구조

시약 및 재료

모든 화학품과 용매는 HPLC 등급이었습니다. 정제수는 Milli-Q 정수 시스템(Millipore Q-POD Element, USA)으로 얻었습니다. Acetonitrile 및 methanol super gradient는 Lab-Scan (Bangkok, Thailand)에서, potassium phosphate monobasic은 Fluka (Germany)에서 구입하였습니다. Bisphenol A 및 bisphenol F 표준물질은 Sigma-Aldrich (India)에서 구입하였습니다. 미국산 BPA 프리 젯병과 현지에서 생산한 3가지 다른 브랜드의 폴리카보네이트 젯병을 구입하였습니다.

크로마토그래피 파라미터

Agilent 1260 및 Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 사용하는 역상 액체 크로마토그래피에 대한 크로마토그래피 파라미터는 표 1과 같습니다.

파라미터	Agilent 1260 Infinity LC 시스템	Agilent 1290 Infinity LC 시스템
컬럼:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6×100mm 5µm(p/n 959996 902)	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6×100mm 1.8µm(p/n 959964 902)
TCC 온도:	40°C	
FLD:	Ex. 230. Em: 316	
FLD 수집 속도, 계인:	9.26Hz, 15	
시료 항온 장치:	4°C	
이동상 A:	10 mM monobasic potassium phosphate in water	
이동상 B:	100% Acetonitrile	
그라디언트:	시간(분) %B	
	0 5	
	2 5	
	2.1 35	
	12.5 35	
	12.6 70	
	17 70	
	18.1 5	
	23 5	
유속:	0.9mL/분	
주입량:	20µL 5초간 Flush port에서 5초 니들 세척, 이동상 A 사용	

표 1
Agilent 1260 Infinity LC 및 Agilent 1290 Infinity LC 시스템에서 사용되는 크로마토그래피 파라미터

표준물질 전처리

BPA 및 BPF의 무게를 정확하게 재어 100% methanol에 별도로 용해시켜 각각 약 300µg/mL의 원액을 제조한 다음 사용하지 않을 때는 4°C에서 보관하였습니다. 5% acetonitrile 희석 완충액과 95% 10mM monobasic potassium phosphate로 원액을 희석하여 400ng/mL BPA 및 BPF 용액을 제조하였습니다. 표 2에 표시된 직선성 레벨은 400ng/mL 용액을 추가로 희석한 농도입니다. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench에서 연속 희석으로 직선성 레벨 용액을 만들었습니다. 첫 번째 시퀀스에서 희석액 400µL를 모든 바이알에 추가하였습니다. 두 번째 시퀀스에서 400ng/mL 용액 300µL를 첫 번째 시퀀스의 레벨 7 바이알에 추가한 후 15초 동안 볼텍싱 처리하였습니다. 전 레벨 바이알에서 용액 300µL를 가져와 다음 레벨 바이알에 추가하는 방식으로 순차적으로 희석하였습니다. 시퀀스를 두 번 실행하는 대신에 모든 단계를 한 가지 분석법에 프로그래밍하여 시퀀스를 한 번만 실행할 수도 있습니다. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench 설정에 사용된 시린지 파라미터는 표 3과 같습니다. 애질런트 응용 자료⁵에서는 7696A Sample Prep WorkBench⁴ 설정을 자세하게 설명합니다.

직선성 레벨	Bisphenol A (ng/mL)	Bisphenol F (ng/mL)
LOD	0.195105	0.195105
1	1.06224	1.06224
2	2.478559	2.478559
3	5.783305	5.783305
4	13.49438	13.49438
5	31.48688	31.48688
6	73.46939	73.46939
7	171.4286	171.4286

표 2
bisphenol A 및 bisphenol F의 희석표

시료 전처리

폴리카보네이트 컵의 BPA는 그림 2 순서도에 따라 추출하였습니다. SPE 어댑터(p/n 12131001) 및 3mm OD 튜빙(p/n 5062-2483)을 사용하여 시료를 Agilent Bond Elut Plexa SPE 컬럼, 200mg, 6mL(p/n 12109206)에 로드하였습니다. Agilent 20 port vacuum 추출 매니폴드(p/n 12234104)를 SPE 설정에 사용하였습니다. ASTM 분석법³에 기재된 시료 처리 주의사항을 준수하였습니다. 그림 2의 마지막 단계에서 재조성된 용액을 시료 분석에 바로 사용하였습니다.

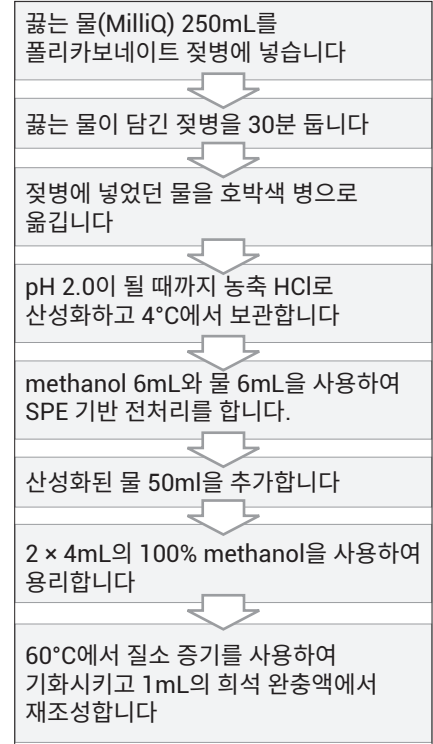


그림 2
컵에서 BPA 추출 및 SPE를 사용하여 시료 전처리

	용매 사전 세척 1	분주 세척	분주 펌프	분주 설정
펌프 개수 또는 세척 횟수	1	1	3	
세척 볼륨(µL)	50	50	20	
분취 속도(µL/분)	1250	1250	1250	1250
분주 속도(µL/분)	2500	2500	2500	2500
Needle dept off set(mm)	-2.0	-2.0	-2.0	-2.0
점도 지연(s)	0	0	0	0
터렛 용매	A			
공극(% syr. vol.)	0			0

표 3
Agilent 7696A Sample Prep WorkBench에 사용되는 500µL 시린지 파라미터

절차

젓병의 재조성 추출물을 주입하여 직선성 범위를 정하기 전에 BPA의 대략적인 농도를 측정하였습니다. 20µL의 이동상 A 용액을 바탕으로 주입한 후 각 직선성 레벨을 확인하기 위하여 표준 시료를 6회 반복 주입하였습니다. 각 레벨의 면적 및 머무름 시간(RT) 정보를 이용하여 상대 표준 편차(RSD) 값을 계산하였습니다. 직선성 범위에서 각 직선성 레벨의 평균 면적을 농도와 비교하여 플롯하는 방법으로 검량선을 작성하였습니다. BPA 및 BPF에 대한 검출 한계(LOD) 및 정량 한계(LOQ)는 더 낮은 직선성 레벨 주입을 통해 정하였습니다.

분석법의 견고성을 확인하기 위해 6가지 중요한 분석법 파라미터를 평가하였습니다.

- 유속 $\pm 2\%$
- 컬럼 온도 $\pm 2.5\%$
- 주입기 용량 $\pm 5\%$
- 들뜸 및 방출 파장 $\pm 3\%$
- 단계적 그레디언트 $\pm 10\%$
- 완충용액 농도 $\pm 10\%$

각 견고성 파라미터에서 표준 농도가 30ng/mL인 BPA 및 BPF 용액을 7회 반복 주입하였습니다.

회수율 연구를 위해 그림 2의 방법으로 BPA가 없는 젓병에서 시료를 추출하였습니다. 이 시료 50mL에 소량 혹은 대량의 BPA 및 BPF를 스파이킹 하였습니다. 스파이킹한 두 가지 시료 모두 SPE 방법을 적용하였습니다. 검량선에서 시료의 최종 농도를 확인하였습니다. 이론 농도값을 실험값과 비교하여 회수율 값을 얻었습니다.

마지막으로 표준 HPLC 분석법을 사용하여 3가지 다른 브랜드의 젓병을 분석하여 2가지 bisphenol의 침출 농도를 확인하였습니다.

그 다음 이 분석법을 Agilent 1290 Infinity LC 시스템으로 이전하였고 같은 실험 조건을 사용하여 1.8µm 컬럼에서 분석해 분석법의 분리능과 감도를 시험하였습니다. 이 분석법에서 각 표준물질의 검출 한계, 정량 한계, 직선성과 면적 및 RT RSD로 이 분석법의 정밀도를 평가하였습니다.

결과 및 토의

분리 및 검출

분석법 개발 과정에서 산성 및 염기 이동상을 사용하여 C18 컬럼에서 BPA 및 BPF 분리를 시험하였습니다. 분석법을 확정하기 전에 젓병에서 추출한 물 시료도 시험하였습니다.

추가 실험에는 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 컬럼을 사용하였습니다. 거의 동시에 용리되는 불순물에서 BPA를 분리할 때는 TCC가 저온(35°C)일 때 최적이었지만, 매트릭스 시료를 분석할 때는 40°C가 나은 결과를 보였습니다. 선형 그레디언트가 2가지 bisphenol을 분리하였지만 초기 분석법 견고성 연구에서는 그레디언트가 수정되면 변화의 폭이 큰 것으로 나타났습니다. 그에 따라 단계별 그레디언트 분석법을 변경하였고 견고성 결과를 비교할 수 있었습니다. ASTM 분석법에서는 bisphenol 저온 보관을 권장하므로 분석하는 동안 자동 시료 주입기를 4°C에서 보관하였습니다. 그림 3은 마지막 분석법을 사용하여 2가지 bisphenol을 분리하는 크로마토그램을 보여줍니다.

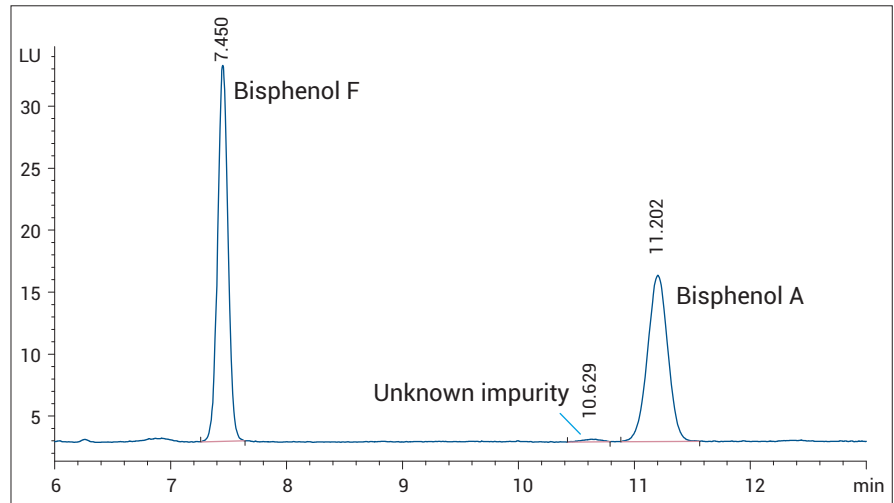


그림 3
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 컬럼을 사용하여 30ng/mL bisphenol F 및 bisphenol A 분리. 크로마토그램은 들뜸 230nm, 방출 316nm의 FLD 설정에서 수집하였습니다.

검출 한계(LOD)와 정량 한계(LOQ)

신호 대 잡음비(S/N) > 3일 때의 분석물질 농도를 LOD로 간주하고 S/N > 10일 때의 분석물질 농도를 LOQ로 간주합니다. 피크 대 피크 분석법을 사용하여 노이즈를 계산하였습니다. 그림 4는 바탕(이동상) 주입과 오버레이된 정량 한계 수준에서 BPA의 크로마토그램을 보여줍니다. BPA의 경우 검출 한계는 S/N이 4.3일 때 0.19ng/mL이고 정량 한계는 S/N이 15.1일 때 1.06ng/mL였습니다.

직선성

직선성 범위를 포함하는 검량선(표 2 참조)은 Agilent 7696A Sample Prep WorkBench를 사용하여 전처리하였습니다. WorkBench는 시료 처리를 자동화하여 일관된 결과를 제공합니다. 간단하게 프로그램을 실행하여 다양한 세트의 직선성 범위를 준비할 수 있습니다. BPA 정량 한계 수준을 시작으로 직선성 레벨을 정하였습니다. 검출 한계 및 정량 한계 값과 함께 직선성 결과는 표 4에서 확인할 수 있습니다. 주입량을 늘려 검출 한계 및 정량 한계를 추가로 낮출 수 있지만 이 응용 분석에서는 필요하지 않았습니다. 젓병을 분석하여 확인한 값이 직선성 범위 안에 포함되었기 때문입니다.

머무름 시간(RT)과 면적 정밀도

면적 정밀도는 직선성 레벨 전반에서 RSD(%)로 측정하였습니다. BPA 및 BPF 각각의 최대 RSD 값은 레벨 1(L1)에서 5.6% 및 7.2%로 확인되었습니다. 비슷하게 RF 정밀도 계산에 따르면 BPA 및 BPF의 최대 RSD 값은 각각 0.14% 및 0.11%였습니다. 그림 5에서는 면적 RSD 값을 그래프로 제공합니다.

Sl no.	이름	LOD ng/mL	S/N	LOQ ng/mL	S/N	직선성 범위	R ² 값	레벨
1	Bisphenol F	0.19	5.1	0.46	12.4	1.06~171.43	0.99999	7
2	Bisphenol A	0.19	4.3	1.06	15.1	1.06~171.43	0.99998	7

표 4

BPA 및 BPF의 검출 한계, 정량 한계 및 직선성 Agilent 7696A Sample Prep WorkBench를 사용하여 시료를 전처리하였습니다. 폴리카보네이트 젓병에서 확인된 BPA 수준은 직선성 범위 안에 포함되었습니다.

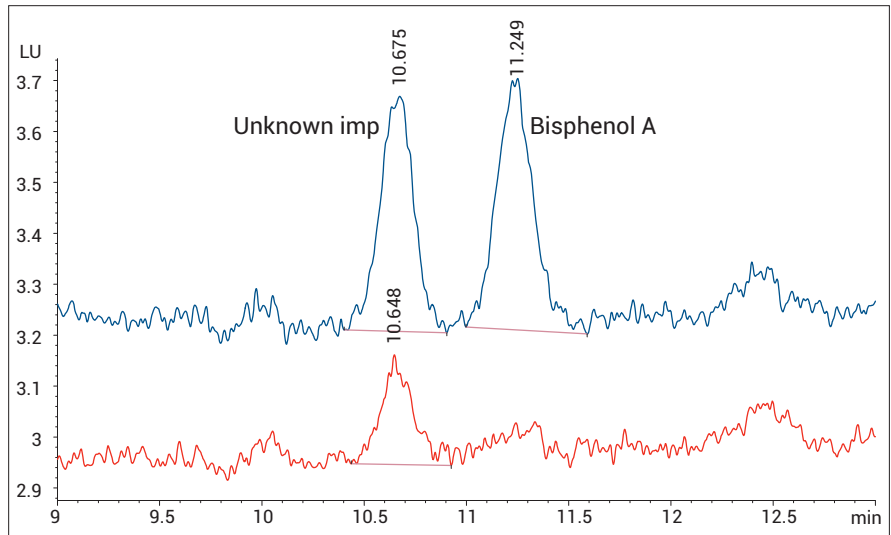


그림 4

바탕 주입과 중첩된 bisphenol A의 20µL 정량 한계 수준, 1.06ng/mL(21pg on column)의 용액 주입. 이 농도에서 확인한 신호대 잡음비는 15였습니다.

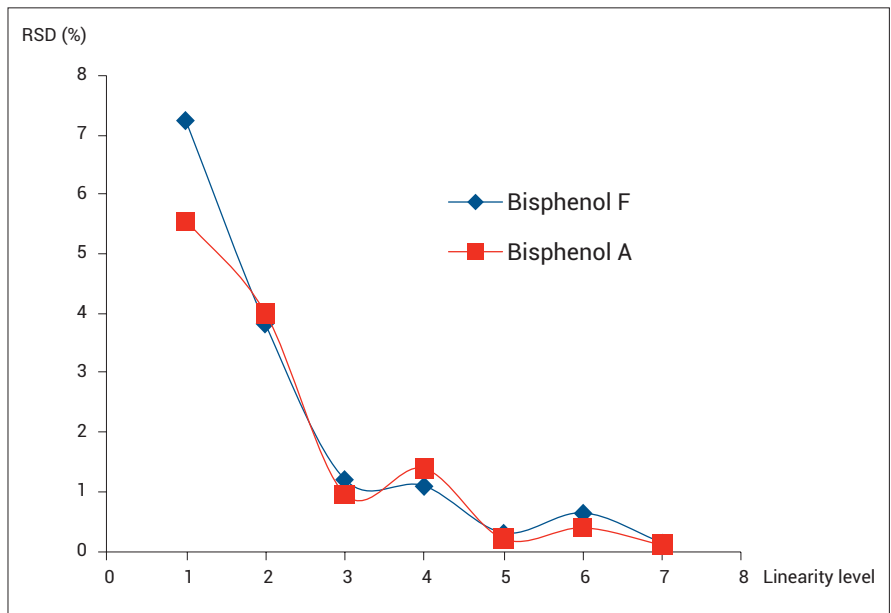


그림 5

BPA 및 BPF에 대한 각각의 농도 수준에서 6회 반복하여 RSD(%)로 측정된 면적 정밀도

견고성

분석법의 견고성을 시험하기 위해 BPA 및 BPF가 함유된 표준 용액 30ng/mL을 사용하였습니다. 6가지 중요한 분석법 파라미터(유속, 컬럼 온도, 주입기 용량, 들뜸 및 방출 파장, 단계별 그레디언트 및 완충용액 농도)를 개별적으로 변경하였고 7회 반복 주입을 통해 데이터 수집하였습니다. 분석에서 마지막 6회 반복 주입에 따른 화합물 피크 면적을 비교하였습니다. 면적 및 머무름 시간에 대해 허용된 편차는 각각 $\pm 5\%$ 및 $\pm 3\%$ 로 설정하였습니다.

견고성 테스트 결과는 표 5에서 요약해 제공합니다. 빨간색 숫자는 허용된 편차를 초과하는 결과를 나타냅니다. 유속을 +2% 변경하면 2가지 bisphenol 면적이 감소하였습니다. 구체적으로 bisphenol A의 경우 컬럼 온도를 2.5% 변경하면 피크 면적이 음수 편차를 나타내는 것으로 확인되었습니다. 불순물과 비교한 BPA 분리능(RT 10.6, 그림 3 참조)에 따르면 온도 증가에 따라 결과가 악화되고 온도가 35°C로 감소하면 결과가 개선됩니다. 시료 분석을 위해서는 온도가 40°C일 때가 나은 것으로 확인되었습니다. 견고성 결과는 분석 동안 컬럼 온도를 유지하는 것이 중요함을 보여줍니다. FLD 들뜸을 230nm로, 방출을 316nm로 설정하면 최대 피크 면적을 나타내므로 가장 이상적인 것으로 확인되었습니다. 3nm를 변경해도 허용된 한계를 기준으로 면적 백분율의 편차가 나타나지 않기 때문에 방출을 316nm로 설정하는 것이 좋습니다. 하지만 들뜸 파장은 제어해야 합니다. 완충용액 농도 또한 매우 중요합니다. BPA 및 BPF 모두에서 10%의 편차로 피크 면적이 감소했기 때문입니다. 견고성 결과는 이 분석법을 일반

용도로 사용하는 경우 신뢰할 수 있고 대부분은 의도적으로 분석법 파라미터를 변경해도 성능에 영향을 주지 않는다는 사실을 보여줍니다. 일부 파라미터는 매우 중요하기 때문에 신중하게 제어해야 합니다.

시료 매트릭스의 회수율

BPA 프리 젯병을 바탕 매트릭스로 사용하였습니다. 스파이킹 실험을 반복하여 BPA 및 BPF의 회수율을 시험하였습니다. BPA 프리 젯병 물 추출물 50mL에 각각 BPA (30ng) 및 BPF (30ng)를 함유한 저농도 표준물질을 첨가하였습니다. 그리고 BPA 프리 젯병 물 추출물 50mL에 각각 BPA (50ng) 및 BPF (50ng)를 함유한 고농도 표준물질을 첨가하였습니다. 아래에서 설명하는 것처럼 물 시료에서 분석물질을

추출하였습니다. 수용성 선형 곡선 ("직선성" 섹션 참조)을 사용하여 면적을 농도값으로 전환하였습니다. 저농도 및 고농도 값을 이론값과 비교하였습니다. 회수율 실험 결과는 표 6에서 확인할 수 있습니다. BPA의 경우 고농도 값에서 회수율 값은 80%였습니다. 80%는 단일 평균 실험실 결과에서 회수율이 70%로 확인된 ASTM 분석법에서 보고된 값보다 높습니다.

화합물명	회수율 농도 낮음(%)	회수율 농도 높음(%)
Bisphenol F	70.2	75.9
	70.1	74.1
Bisphenol A	76.9	79.6
	75.1	81.1

표 6
반복 수행한 스파이킹 실험의 회수율 결과

파라미터	변경	BPF		BPA 분리능 알 수 없음		BPA	
		% 면적	% RT	% 면적	% RT		
유속: 0.9mL/분 $\pm 2\%$	높음: 0.92mL/분	-4.6	-1.2	1.9	-5.1	-1.2	
	낮음: 0.88mL/분	0.1	1.9	1.9	-1.9	2.2	
TCC: 40°C $\pm 2.5\%$	높음: 41°C	-4.2	-0.4	1.7	-5.0	-0.6	
	낮음: 39°C	-3.1	0.9	2.1	-10.0	1.3	
주입기: 20µL $\pm 5\%$	높음: 21µL	2.6	0.2	1.9	0.0	0.2	
	낮음: 19µL	-7.6	0.1	1.9	-9.8	0.1	
파장: 230-316 $\pm 3\text{nm}$	233~316	-2.2	0.0	1.9	-5.7	0.0	
	227~316	-7.0	0.2	1.9	-4.6	0.2	
	230~319	-3.2	0.1	1.9	-4.5	0.1	
	230~313	-3.5	0.1	1.9	-3.0	0.1	
단계별 그레디언트 시작 지점: 2분 $\pm 10\%$	높음: 2.2분	-3.8	2.9	1.9	-4.1	2.0	
	낮음: 1.8분	-3.3	-2.4	1.9	-3.8	-1.5	
완충용액 농도: 10mM $\pm 10\%$	높음: 11mM	-4.2	0.2	1.9	-6.0	0.2	
	낮음: 9mM	-5.9	0.1	1.8	-9.8	0.1	

표 5
30ng/mL의 농도에서 표준 분석법과 비교한 견고성 테스트 분석법 결과. 표에서 빨간색 값은 면적의 경우 5%, 머무름 시간의 경우 3%인 허용 한계를 초과하는 편차를 나타냅니다.

시료 분석

젖병의 BPA 및 BPF 함량은 추출 절차 및 개발한 크로마토그래피 분석법을 사용하여 확인하였습니다. 브랜드 1, 브랜드 2, 브랜드 3으로 라벨링한 젖병을 반복해 분석하였습니다. 분석 결과를 시료 분석 전에 작성한 검량선과 비교하였습니다. SPE에 적용된 바탕 물 시료에서는 BPA가 나타나지 않았는데, 이는 실험에서 사용한 플라스틱에서 BPA가 침출되지 않았음을 의미합니다³. 3가지 브랜드의 젖병에서는 다양한 양의 BPA가 검출되었습니다(그림 6A). 표준물질의 BPA 방출 스펙트럼은 시료의 스펙트럼과 중첩됩니다. BPA의 존재를 확인시켜주는 뛰어난 오버레이가 관찰되었습니다(그림 6B 참조). 다양한 브랜드 분석에서 고농도 값은 4ng/mL이고 저농도 값은 0.5ng/mL이었습니다(표 7 참조). 이러한 값은 앞서 0.6ng/mL으로 확인한 Sun *et al.*의 관찰 결과와도

일치합니다⁵. 10kg 유아가 브랜드 2 젖병을 사용해 250mL의 우유를 마시는 경우 해당 유아가 섭취하게 되는 BPA는 0.1µg/kg/일입니다. 이 값은 미 환경 보호국에서 정한 기준 선량 50µg/kg/일보다는 낮지만, 다른 연구에 따르면 우려가 되는 수준입니다⁶. 결과에 따르면 BPF가 검출된 젖병은 없습니다.

화합물명	BPF (ng/mL)	BPA (ng/mL)
브랜드 1	0	0.76
	0	0.52
브랜드 2	0	4.26
	0	4.46
브랜드 3	0	2.08
	0	2.58

표 7
다양한 브랜드의 젖병에서 추출한 250mL 물의 BPA 및 BPF 농도

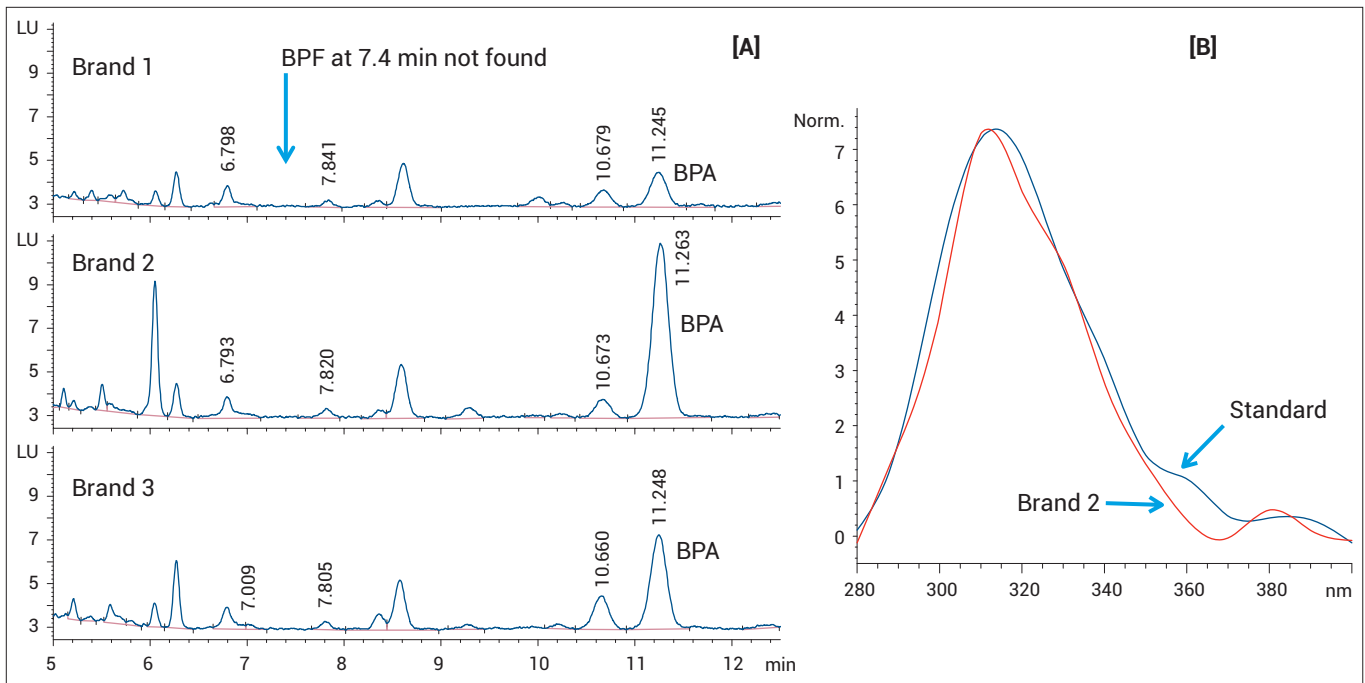


그림 6

[A] BPA 및 BPF를 분석한 3가지 젖병의 크로마토그램 오버레이. [B] 브랜드 2 시료에서 확보한 표준물질의 BPA 방출 스펙트럼 오버레이

UHPLC 분석법

HPLC 분석법은 그림 7과 같이 동일한 분석 시간을 유지하는 Agilent 1290 Infinity LC 시스템에서 UHPLC 분석법으로 이전되었습니다. 이전은 분리능 및 감도에 대한 영향을 연구하기 위해 수행하였습니다. UHPLC 분석법에서는 같은 이동상, 그레디언트 및 검출기 설정을 사용하였습니다. UHPLC 분석법에서 컬럼 규격은 동일하게 유지하였지만 입자 크기는 5 μ m에서 1.8 μ m로 감소하였습니다. UHPLC 분석법에서 피크는 약 1.2분 빨리 용리되었는데 Agilent 1290 Infinity LC 시스템의 지연량(volume)이 더 낮기 때문입니다. UHPLC 분석법은 HPLC 분석법에 비해 피크가 더 좁고 분리능이 더 나은 것으로 나타났습니다. 가장 낮은 직선성 레벨 L1과 가장 높은 직선성 레벨 L7에서의 피크 면적, 피크 높이, 피크 폭, 분리능 및 S/N을 표 8에서 비교하였습니다. HPLC 분석법에서 1.9였던 BPA의 분리능이 UHPLC 분석법에서 2.5로 증가하였습니다. 신호대 잡음비가 거의 두 배가 되었기 때문에 감도가 향상하였고 정량 한계 및 검출 한계 수준을 다시 정의할 수 있는 가능성이 생겼습니다.

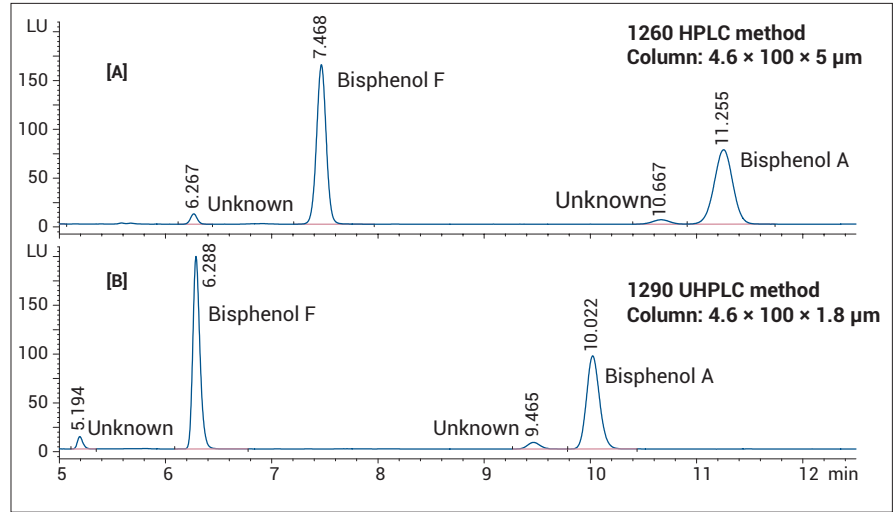


그림 7

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6x100 컬럼에서 BPA 및 BPF에 대한 레벨 7 표준물질을 분리하는 HPLC 분석법 [A] 및 UHPLC 분석법 [B]의 크로마토그램 오버레이. HPLC 분석법에는 5 μ m의 입자 크기를 사용했지만, UHPLC 분석법에서는 1.8 μ m를 사용하였습니다.

화합물명 (레벨)	HPLC 분석법				UHPLC 분석법			
	피크 면적	반높이에서 피크 폭	피크 높이	분리능 S/N	피크 면적	반높이에서 피크 폭	피크 높이	분리능 S/N
BPF(L7)	1037.0	0.10	163.7	- 3683.0	930.5	0.07	199.6	- 6784.8
BPA(L7)	934.1	0.19	76.3	1.9 1715.7	825.8	0.13	96.4	2.5 3276.7
BPF(L1)	7.5	0.10	1.1	- 27.4	7.2	0.07	1.4	- 42.6
BPA(L1)	8.1	0.20	0.6	1.8 15.1	9.4	0.14	1.0	2.5 31.6

표 8

첫 번째 직선성 레벨에서 마지막 레벨까지 HPLC 분석법과 UHPLC 분석법 간의 피크 면적, 반높이에서 피크 폭, 피크 높이, 분리능 및 신호대 잡음비 비교. UHPLC 분석법은 HPLC 분석법에 비해 감도 및 분리능이 더 뛰어납니다.

BPA 및 BPF에 대한 검량은 같은 검량 수준(표 2 참조)을 사용했을 때 선형인 것으로 확인되었습니다(BPF의 경우 R²: 0.99991, BPA의 경우 R²: 0.99993). 모든 농도 수준에서 면적에 대한 RSD(%) 편차와 RT를 계산하였습니다. 결과에 따르면 면적 편차에 대한 RSD(%)가 UHPLC 분석법에서 비교했을 때 더 낮았습니다. 그림 8에서 확인할 수 있는 것처럼 BPA 레벨 1에 대한 값은 3.0%로 확인되었습니다. BAP 및 BPF 모두에서 RT의 최대 RSD는 0.1% 미만이었습니다.

결론

Agilent 1260 Infinity LC 시스템 및 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 컬럼을 사용하여 bisphenol A 및 bisphenol F를 분리하고 정량하였습니다. Agilent 7696A Sample Prep WorkBench를 사용하여 검량 표준물질을 전처리하였습니다. 분석법을 개발하고 부분적으로 검증하였습니다. 이 분석법으로 다양한 젯병의 bisphenol A와 bisphenol F를 정량하였고 회수율 값은 80%였습니다. 이 분석법을 젯병의 품질 관리를 위한 BPA 및 BPF 농도 확인에 적용하였습니다. Agilent 1290 Infinity LC 시스템으로의 분석법 이전은 같은 검출기 및 분석법 조건을 유지하여 효과적으로 수행하였습니다. HPLC 및 UHPLC 분석법 모두 선형이며 정확한 결과를 제공합니다. HPLC 분석법과 비교했을 때 UHPLC 분석법에서 분리능 및 신호대 잡음비가 개선된 것으로 나타났으며 피크 폭은 더 좁아지고 피크 높이는 증가하였습니다.

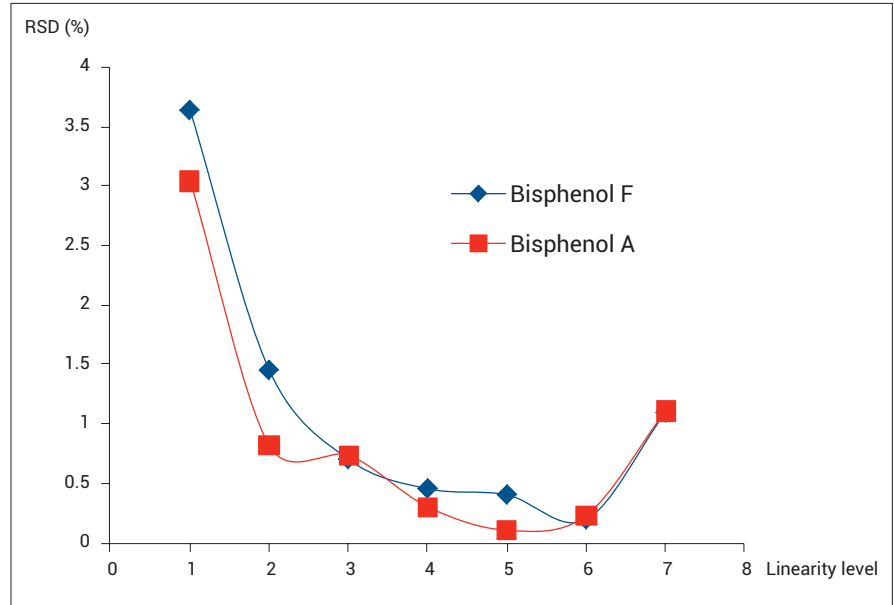


그림 8
UHPLC를 사용하여 BPF 및 BPA에 대해 RSD(%)로 측정된 면적 정밀도. 각 농도 수준에서 6회 반복해 측정하였습니다.

참고 문헌

1. U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), Bisphenol A. (CASRN 80-05-7), <http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>
2. A.Ballesteros-Gomez; S. Rubio; D.Perez-Bendito, "Analytical methods for the determination of bisphenol A in food," *J. Chrom A*, 1216: 449-469, **2009**.
3. ASTM method,"Standard Test Method for Determination of Bisphenol A in Environmental Waters by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry," D7574-09.
4. W.D. Snyder," Agilent 7696A Sample Prep WorkBench: How to automate Preparation of a Sample Set by Serial Dilution for Measurement of Flame Ionization Detector Performance," Agilent Application note, Publication Number, 5990-6850EN, **2010**.
5. Y. Sun, M. Wada, O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, H. Nakazawa, K. Nakashima, "High-Performance Liquid Chromatography with Peroxyoxalate Chemluminescence Detection of Bisphenol A Migrated from Polycarbonate baby bottles using 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl)benzoyl chloride as a label," *J.Chrom B*, 749: 49-56, **2000**.
6. S.K. Ritter, "Debating BPA's Toxicity. The Precautionary Principle Serves as a Dividing Line in Arguments Over the Safety of Bisphenol A," *Chemical & Engineering News*, 89: 14-19, **2011**.

www.agilent.com/chem/lc

© Agilent Technologies, Inc., 2017
2017년 7월 1일, 한국에서 발행
발행물 번호 5990-9398KO

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



Agilent Technologies