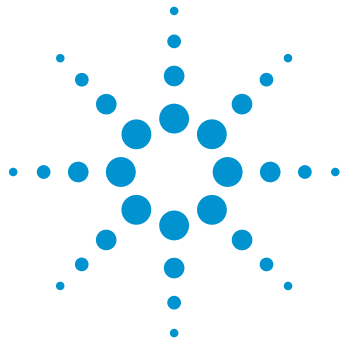




방향족 산성물질 분석 개선: 1.9 μ m Agilent InfinityLab Poroshell 120 컬럼을 이용한 시간, 용매, 시료 및 비용 절약

응용 자료

농산물, 식품 테스트, 저분자 의약품

저자

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.
미국 델라웨어주 월밍턴

개요

포름산과 아세트니트릴 그레디언트를 사용해 6개 방향족 산성물질을 분석하였습니다. 이러한 분리에 대해 4개 컬럼의 성능을 평가하였습니다. 원래 분석은 4.6 $\times$ 250mm, 5 μ m 전체 다공성 입자의 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 컬럼에서 실시하였으며, 2.1 $\times$ 50mm, 1.9, 2.7 및 4 μ m 표면 다공성 입자의 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼에서도 실시하고 비교했습니다. 모든 컬럼의 선택성이 유사하므로 컬럼 간 분석법 개발이 필요하지 않았습니다. 모든 컬럼이 최소 분리능 1.8로 방향족 산성물질을 성공적으로 분리했습니다. 긴 5 μ m 컬럼과 비교해 짧은 1.9 μ m InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼은 96% 더 적은 양의 이동상과 75% 더 적은 양의 시료를 사용해 보다 우수한 최소 분리능(2.9 대 2.4)을 12배 더 빠른 속도로 달성했습니다. 추후 분석법 수정으로, 1.9 μ m InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼을 이용해 분석 시간을 단축할 수 있고 원래 분석보다 103배 더 빠른 속도로 최소 분리능 2.3을 달성하는 동시에 6개의 방향족 산성물질을 0.35분 안에 완전히 분리할 수 있음이 증명되었습니다.



Agilent Technologies

서론

표면 다공성 입자의 LC 컬럼은 액체 크로마토그래피에서 널리 사용됩니다. 표면 다공성 입자 컬럼은 전체 다공성 입자 컬럼과 비교해 더 낮은 압력에서 높은 효율성을 창출합니다¹. 이것은 주로 질량 이동(mass transfer) 거리가 더 짧고 컬럼 내 입자 크기 분포가 더 조밀하기 때문입니다². 표면 다공성 입자에 대해 더 높은 효율성을 위해 입자 크기를 축소하는 것이 최근의 트렌드입니다. 효율성이 더 높으면 분리능 및 감도가 개선되어 분석 속도를 높이거나 결과를 향상시킬 수 있습니다.

Agilent LC 컬럼 제품군 내에서 쉽게 분석법 전환 및 확장성을 보장하기 위해 많은 연구를 하였습니다. 고정상 케미스트리는 전체 다공성 입자 Agilent ZORBAX와 표면 다공성 입자 Agilent InfinityLab Poroshell 컬럼 간에 유사하므로, 분석법을 추가적인 개발 없이 쉽게 업데이트할 수 있습니다³.

이 작업은 기존 5µm 입자의 컬럼을 이용한 분석에 비해 작은 Poroshell 입자의 컬럼을 사용해 방향족 산성물질의 분리를 개선하는 방법을 보여줍니다. Poroshell 컬럼을 사용하여 시간, 용매, 시료 및 비용이 크게 절약되는 것이 증명되었습니다.

실험

이 실험에는 Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 사용하였습니다. 이 시스템은 표준 구성에서 시스템 부피 및 확산이 낮아지도록 수정하였습니다. 표 1은 구성 세부 정보와 본 실험에 사용된 4 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.

표 1. UHPLC 시스템 구성

Agilent 1290 Infinity LC 시스템 구성	
Agilent 1290 Infinity Binary Pump (G4220A)	35 µL Solvent mixer: Agilent 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 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)	Agilent 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) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm (699775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 4 µm (699770-902)

표 2. UHPLC 분석법 파라미터

Column	Mobile phase	Flow rate (mL/min)	Gradient	Injection volume (µL)	Sample	Thermostatted Column Compartment (°C)	Diode Array Detector
Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 × 250 mm, 5 µm	A) 0.2 % formic acid in water B) acetonitrile	1.0	8–35 %B in 36 minutes	20	0.01 mg/mL each of protocatechuic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 4-aminobenzoic acid (PABA), vanillic acid, syringic acid, salicylic acid in water	25	280 nm, 80 Hz
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm		0.5	8–35 %B in 3 minutes	5	화합물은 용리된 순서로 나열됨. 구조는 그림 1 참조	60	280 nm, 160 Hz
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm							
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 4 µm							
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm(빠른 분리)		2.2	8–26 %B in 0.3 minutes				

이 실험에서 6개의 방향족 산성물질을 분석하였으며, 이들의 구조는 그림 1에 나와 있습니다. 이러한 방향족 산성물질과 포름산 이동상 변형제(modifier)는 Sigma-Aldrich에서 구매하였습니다. 아세토니트릴은 Honeywell(Burdick and Jackson)에서 구매하였습니다. 물은 Milli-Q 시스템(Millipore)(18MW)을 통해 0.2µm 필터링 막으로 필터링되었습니다.

결과 및 토의

6개 방향족 산성물질의 원래 분리를 4.6 × 250mm, 5µm 전체 다공성 입자 ZORBAX Eclipse Plus C18 컬럼에서 실시하였습니다. 이 분리는 2.4의 최소 분리능으로 36분 안에 이루어졌으며, 그림 2에서 볼 수 있습니다. 그림 2는 또한 2.1 × 50mm, 1.9µm 표면 다공성 입자 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 컬럼에서 동일한 LC 분석 조건을 이용한 분석을 보여줍니다. ZORBAX Eclipse Plus C18 및 Poroshell 120 EC-C18은 선택성이 비슷한 결합 케미스트리를 이용하므로, 분석법을 변경할 필요가 없습니다. 그러나 컬럼 사양이 다르므로, 더 작은 컬럼 부피를 위해, 그레디언트, 유속 및 주입량이 기하학적으로 조정됩니다. 또한 1.9µm Poroshell 컬럼의 경우 더 작은 입자에 맞는 최적의 유속에서 실행하도록 높은 유속을 사용했습니다. 결과적으로 크로마토그램은 12배 더 빠른 속도로 얻어졌으며 96% 더 적은 이동상과 75% 더 적은 시료만 사용할 뿐만 아니라, 2.9의 최소 분리능도 계속 유지합니다.

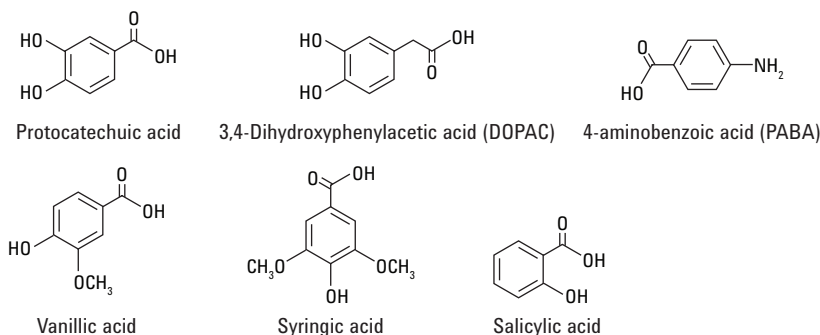


그림 1. 관심 화합물

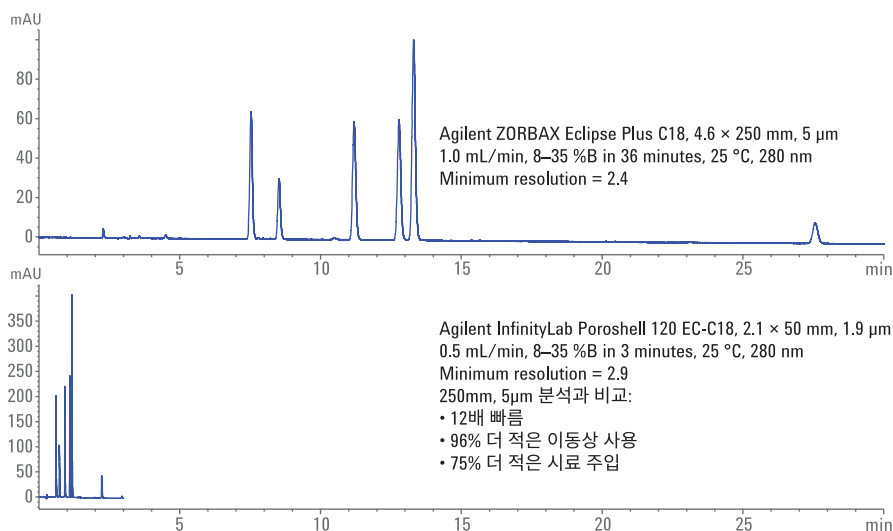


그림 2. 고성능 50mm, 1.9µm Agilent InfinityLab Poroshell 컬럼으로 이전함으로써 250mm, 5µm Agilent ZORBAX 컬럼을 이용한 방향족 산성물질의 분석이 개선됨. 최소 분리능이 향상된 동시에 상당한 시간, 시료, 용매 및 비용이 절약되었음.

1.9 μ m Poroshell 컬럼을 이용한 분석은 472bar의 압력을 생성합니다. 이것은 기기 압력 사양에 따라 분석에 제한이 있을 수 있습니다. Agilent Poroshell 120 제품군에는 1.9, 2.7, 4 μ m의 세 가지 입자 크기 옵션이 있습니다. 이러한 다른 입자 크기는 간편한 분석법 호환을 위해 동일한 결합상을 사용합니다. 그림 3은 세 입자 크기를 사용한 방향족 산성물질 분리의 동일한 선택성을 보여주며, 모든 분석법 파라미터가 동일합니다. 입자 크기가 증가하면 압력이 감소합니다. 그러나 입자 크기가 더 크면 분리능과 피크 용량이 감소합니다. 이러한 상황에서, 분석자는 기존 장비의 작동 압력에 따른 제한을 받는지 최상의 분리능이 필요한지 등, 자신의 요구에 가장 적합한 컬럼을 선택해야 합니다.

작은 표면 다공성 입자를 사용하면 높은 효율성과 분리능을 얻을 수 있습니다. LC 시스템 압력 한계가 허용한다면 이러한 고성능을 활용해 초고속 분석을 실행할 수 있습니다. 그림 4에서는 1.9 μ m Poroshell 컬럼을 그 한계까지 밀어붙였습니다. 높은 온도를 사용해 이동상 점도를 감소시킴으로써 유속을 2.2mL/분까지 올리고 1,150bar의 압력으로 실험하였습니다. 또한 방향족 산성물질을 이 컬럼에서 가장 빠르게 분리할 수 있도록 이전 분석법의 그레디언트를 약간 조정했습니다. 결과적으로, 모든 6개 화합물이 최소 분리능 2.3으로 0.35분 안에 분리되었습니다. 250mm, 5 μ m Eclipse Plus 컬럼을 이용한 분석법과 비교해 이 분석법은 103배 더 빠르며, 98% 더 적은 이동상을 사용하는 동시에 최소 분리능을 유지할 수 있습니다.

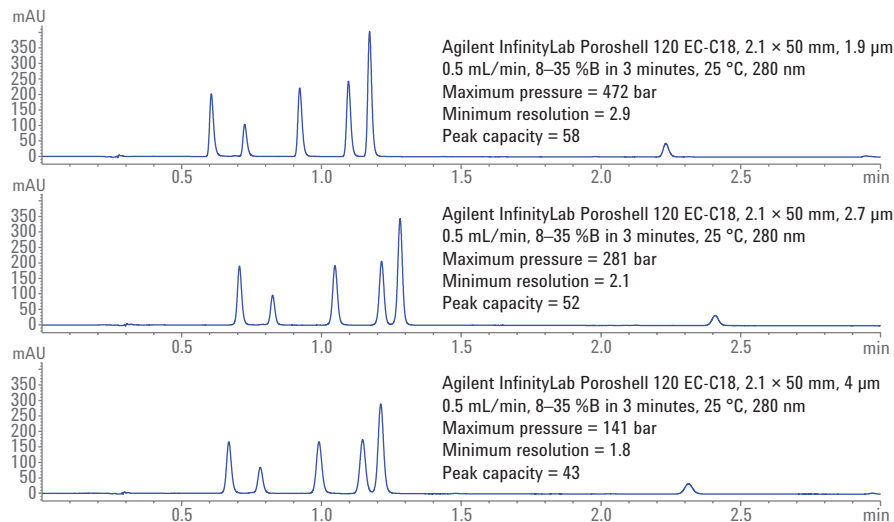


그림 3. Agilent InfinityLab Poroshell 입자 크기 간 선택성이 유사하여 분석자가 추가적으로 분석법을 개발할 필요 없이 기기 압력 한계 또는 분석법 성능 요건에 맞는 컬럼 구성을 선택할 수 있음.

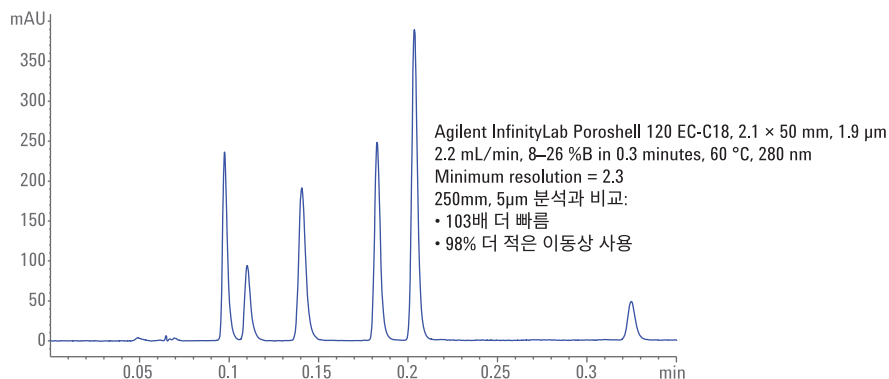


그림 4. 분석법 성능의 저하 없이 압력 한계에 가깝게 고성능 50mm, 1.9 μ m Agilent InfinityLab Poroshell 컬럼을 작동함으로써 시간, 용매, 비용을 추가적으로 절약할 수 있음.

표 3은 모든 크로마토그래피 결과의 요약 및 비교를 나타냅니다.

표 3. 다양한 LC 컬럼을 이용한 방향족 산성물질 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 µm	193	2.4	88	36	원래 5µm 분석	36	원래 5µm 분석
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm	472	2.9	58	3.0	원래 5µm 분석보다 12배 빠름	1.5	원래 5µm 분석보다 96% 더 적은 이동상 사용
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 2.7 µm	281	2.1	52				
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 4 µm	141	1.8	43				
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50 mm, 1.9 µm(초고속 분리)	1150	2.3	37	0.35	원래 5µm 분석보다 103배 빠름	0.77	원래 5µm 분석보다 98% 더 적은 이동상 사용

결론

효율성이 높은 1.9µm Agilent InfinityLab Poroshell 120 컬럼을 사용해 5µm Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 컬럼과 같은 일반적인 컬럼을 사용한 기존 분석법을 개선할 수 있습니다. Poroshell 및 ZORBAX 제품군은 유사한 결합상 케미스트리를 제공하므로, 분석법을 추가적인 개발 없이 쉽게 이전할 수 있습니다. 1.9µm 입자로 생성된 압력이 LC 시스템 한계보다 너무 높은 경우, 동일한 선택성을 제공하는 Agilent Poroshell 120, 2.7µm 및 4µm 입자를 사용할 수 있습니다. 그러나 LC 시스템 압력 한계가 허용한다면, 1.9µm Poroshell 컬럼으로 초고속 분리를 달성할 수 있고 기존 LC 컬럼과 비해 상당한 시간과 용매, 시료, 비용을 절약할 수 있습니다.

참고 문헌

1. Gratzfield-Huguen, A.;
Naegele, E. Maximizing efficiency
using Agilent Poroshell 120
Columns(Agilent Poroshell 120 컬럼을
이용한 효율성 극대화), Agilent
Technologies 응용 자료, 발행물 번호
5990-5602K0, **2016**.
2. Meyer, V. R. In *Practical High
Performance Liquid Chromatography*.
제4판, Wiley; 2004; p. 34.
3. Transfer of Methods between
Poroshell 120 EC-C18 and ZORBAX
Eclipse Plus C18 Columns, Agilent
Technologies 응용 자료, 발행물 번호
5990-6588EN, **2011**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 11월 1일 한국에서 발행
5991-7518K0

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



Agilent Technologies