



Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 1.9 μ m 컬럼을 이용한 유리 아미노산의 LC/MS 분석

응용 자료

농산물, 식품 테스트, 저분자 의약품

저자

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.
미국 델라웨어주 윌밍턴

개요

포름산염암모늄 및 아세트니트릴 그레디언트, Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 2.1 \times 150mm, 1.9 μ m 컬럼을 이용한 LC/MS에서 12개의 유리 아미노산이 분석되었습니다. 550bar에서 동중원소 루신 및 이소루신의 베이스라인 분리능($R_s = 1.9$)으로 분석이 11분 내에 완료되었습니다.



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.

이 응용 자료는 UHPLC에서 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 1.9µm 컬럼의 성능과 LC/MS에서 이 컬럼을 이용해 동중원소 쌍의 베이스라인 분리능으로 12개의 유리 아미노산을 분리할 수 있음을 보여줍니다.

실험

이 실험에는 Agilent 1290 Infinity LC 시스템과 Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS가 사용되었습니다. 이 시스템은 낮은 시스템 부피와 확산이 가능하도록 표준 구성을 수정하였습니다. 표 1은 구성 세부 정보와 이 실험에 사용된 Agilent LC 컬럼을 나타냅니다. 표 2는 LC 분석법 파라미터를 보여주고, 표 3은 MS 파라미터를 보여주며 표 4는 MS SIM 파라미터를 보여줍니다.

이 응용 자료에서 분석된 12개의 아미노산은 Agilent(5061-3330)에서 혼합 용액으로 구매했으며, 시료는 주입 전에 아세트니트릴에 1:10으로 희석되었습니다. 포름산염암모늄 및 포름산은 Sigma-Aldrich로부터 구매했습니다. 아세트니트릴은 Honeywell(Burdick and Jackson)에서 구매했습니다. 물은 Milli-Q 시스템(Millipore)(18MW)에서 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, 1.0 µL, long, down (G1316-80012) InfinityLab Quick Turn fitting (5067-5966) Column to MS source: capillary, stainless steel, 0.075 × 340 mm, SV/SLV (5067-4783)
Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)	Ultralow dispersion Max-Light cartridge flow cell, 10 mm (G4212-60038)
Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS (G6460A)	Agilent Jet Stream technology
Agilent MassHunter Workstation Software LC/MS Data Acquisition for 6400 Series Triple Quadrupole Version B.07.01 Build 7.1.7112.0	G4220A: B.06.72 [0002] G4226A: A.06.54 [006] G1316C: A.06.53 [002] G4212A: B.06.72 [0002]
Agilent LC Column	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC, 2.1 × 150 mm, 1.9 µm (693675-901)

표 2. 유리 아미노산 분석을 위한 UHPLC 분석법 파라미터

Parameter	Value
Mobile phase A	10 mM ammonium formate pH 3 in water
Mobile phase B	10 mM ammonium formate pH 3 in acetonitrile:water (9:1)
Flow rate	0.4 mL/min
Gradient	100–95 %B in 5 minutes, then 95–60 %B in 6 minutes
Post run	4 minutes
Injection	5 µL
Autosampler temperature	4 °C
Column temperature	4 °C
Diode array detector	Off
Column	Agilent Poroshell 120 HILIC, 2.1 × 150 mm, 1.9 µm (693675-901)
Sample	Agilent AA standard, 1 nmol/µL (5061-3330), diluted 1:10 in acetonitrile

결과 및 토의

그림 1은 InfinityLab Poroshell 120 HILIC, 2.1 × 150mm, 1.9µm 컬럼을 이용한 12개의 유리 아미노산 분리 결과를 보여줍니다. LC/MS 검출을 이용하면 검출기가 특정 mass fragment에 따라 분석물질을 분리하기 때문에 모든 화합물에 베이스라인 크로마토그래피 분리능이 필요하지 않습니다. 그러나, 동중원소 화합물이 존재할 경우 베이스라인 크로마토그래피 분리능이 필요합니다. 루신과 이소루신에 대한 크로마토그래피 분리능은 그림 2에 나오는 바와 같이 1.9이며, 이 두 동중원소는 잘 적분 및 정량화되었습니다.

표 3. MS 분석법 파라미터

MS 소스 파라미터		MS 수집 파라미터	
Gas temperature	300 °C	Scan type	MS2 SIM
Gas flow	5 L/min	Mass	표 4 참조
Nebulizer	45 psi	Fragmentor	표 4 참조
Sheath gas temperature	400 °C	Cell accelerator	7 V
Sheath gas flow	11 L/min	Polarity	Positive
Capillary	3,500 V	Time segment 1	3.6 min
		Time segment 2	3.6 min

표 4. MS SIM 분석법 파라미터

Amino acids (in elution order)	MW	M+H	Fragmentor voltage	Dwell time (ms)	Time segment
L-Phenylalanine	165.19	166	25	5	1
L-Tyrosine	181.19	182	25	5	1
L-Iso/leucine	131.17	132	25	1	1
L-Methionine	149.21	150	75	5	1
L-Valine	117.15	118	25	5	2
L-Threonine	119.12	120	25	5	2
L-Alanine	89.09	90	25	5	2
L-Serine	105.09	106	25	5	2
L-Proline	115.13	116	50	5	2
Glycine	75.07	76	25	5	2
L-Glutamic acid	147.13	148	75	5	2

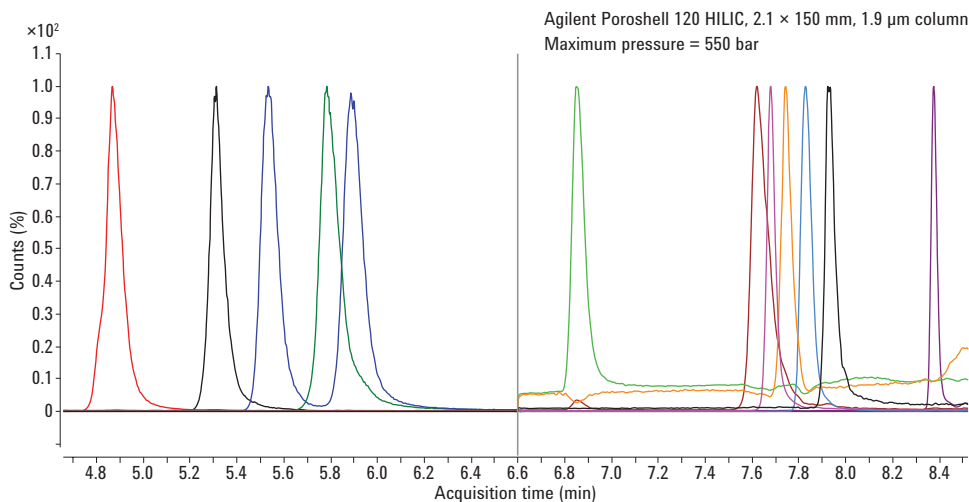


그림 1. Agilent Poroshell 120 HILIC 1.9µm 컬럼을 이용한 12개의 유리 아미노산 분리 결과

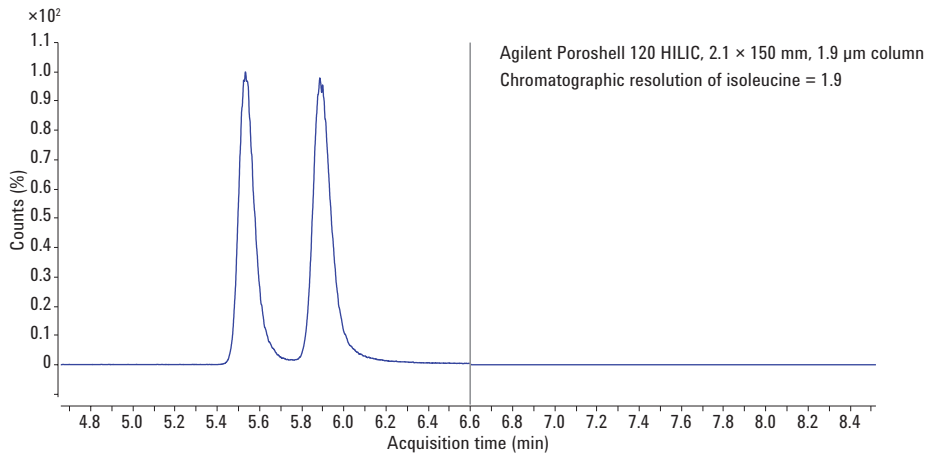


그림 2. Agilent Poroshell 120 HILIC 1.9 μ m 컬럼을 이용한 동중원소 루신과 이소루신의 분리 결과

결론

LC/MS를 이용해 유리 아미노산을 분리하기 위해 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 1.9 μ m 컬럼이 사용되었습니다. 이 작은 표면 다공성 입자 컬럼의 높은 효율은 동중원소 쌍의 베이스라인 분리에 충분한 분리능을 제공할 수 있습니다.

참조 문헌

1. A. Gratzfield-Huguen, E. Naegel. 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).

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 10월 19일 한국에서 인쇄
5991-7541KO

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



Agilent Technologies