

컬럼 및 용매 선택 자동화를 통한 단일 LC 시스템 내의 다중 식품 응용 분석

Agilent 1260 Infinity II 다중 분석법 솔루션

응용 자료

식품 검사 및 농업

저자

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

개요

Agilent 1260 Infinity II 다중 분석법 솔루션은 1대의 LC 시스템에서 수동으로 시스템을 변경하지 않고도 다양한 LC 응용 분석을 쉽게 실행할 수 있도록 해줍니다. 일반적으로 최대 15개의 서로 다른 이동상을 사용하는 자동 용매 선택과 최대 4개 컬럼 간의 자동 전환을 통해, 100개 이상의 서로 다른 분리 조건을 사용할 수 있습니다. 컬럼과 용매가 분석법 파라미터로 지정되기 때문에, 서로 다른 컬럼과 용매를 사용하는 여러 분석법을 시퀀스의 일부로 포함시킬 수 있습니다. 본 응용 자료는 식품 관리 실험실에서의 응용 사례로서, 1260 Infinity II 다중 분석법 솔루션을 이용한 향산화제, 감미료 및 보존료 분석에 대해 설명합니다.



Agilent Technologies

서론

많은 실험실에서, 서로 다른 컬럼과 이동상 및 기타 크로마토그래피 파라미터를 필요로 하는 다양한 응용 분석을 동일한 LC 시스템에서 수행하고 있습니다. 이러한 경우 보통 원하는 응용에 기기를 맞추기 위해 수동으로 컬럼과 이동상을 교체해야 합니다. Agilent 1260 Infinity II 다중 분석법 솔루션은 최대 15개의 서로 다른 이동상을 자동으로 선택하고 최대 4개의 (길이 300mm 이하) 컬럼을 자동으로 전환할 수 있습니다. 이러한 구성을 통해 수동 시스템 변경 없이 100가지가 넘는 서로 다른 분리 조건을 활용할 수 있습니다. 이보다 더 많은 규모의 컬럼과 이동상 전환이 필요한 경우에는, 이전 응용 자료¹에서 소개한 바와 같이 Agilent 1290 Infinity II 다중 분석법 솔루션이 이상적입니다.

식품 첨가물은 식품에 첨가되거나 생산, 가공, 포장 또는 보관에 관여하는 물질로서, 식품의 영양적 또는 관능 가치를 높이거나 유통기한을 연장시키는 역할을 합니다². 식품 첨가물에는 비타민, 방향 물질, 감미료, 색소, 보존료 및 향산화제 등이 있습니다. 대부분의 국가에서 식품 첨가물의 사용을 규제하고 있습니다. 유럽 연합에서는 식품 첨가물로 사용하는 물질에 E-number를 부여하여 표기합니다.

BHA(E 320) 및 BHT(E 321)와 같은 향산화제는 지방의 산화를 지연시켜, 지질 분해산물로 인해 발생하는 불쾌한 냄새에 의한 식품 품질 저하를 방지하기 위해 사용됩니다². Acesulfame K (E 950) 및 saccharin(E 954)과 같은 감미료는 단맛을 생성하지만, 무시해도 될 수준의 영양가를 가진 화합물입니다². 물리적 방법으로 미생물총을 제거할 수 없는 경우, 유통기한을 연장하기 위해 보존료 또는 항균제가 필요합니다.

Sorbic acid(E 200) 및 benzoic acid (E 210)와 같은 약산은 주로 산성 식품에 사용됩니다². Salicylic acid는 화장품에서 향균제로 사용하며, 이외에도 여드름 치료용 각질 용해제로 사용하기도 합니다³.

본 응용 자료는 식품 관리 실험실에서의 응용 사례로서, 1260 Infinity II 다중 분석법 솔루션을 이용한 향산화제, 감미료 및 보존료 분석에 대해 설명합니다.

실험

장비

Agilent 1260 Infinity II 다중 분석법 솔루션은 다음과 같은 모듈로 구성하였습니다.

- Agilent 1260 Infinity II Quaternary 펌프(G7111B)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A), 용매 선택 밸브(G4235A)
- Agilent 1260 Infinity II Multisampler(G7167A), 시료 냉각 장치(옵션 100)
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A), 컬럼 ID 키트 및 밸브 드라이브(옵션 057), 4-컬럼 선택 밸브(G4237A) 및 캐필러리 키트(옵션 006)
- Agilent 1260 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 HS(G7117C), 10mm Max-Light 카트리리지 셀(G4212-60008)

소프트웨어

Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, revision C.01.07 SR 2 [255]

컬럼

- Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 4.6 × 100mm, 2.7µm(p/n 685975-902T)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100mm, 2.7µm(p/n 695975-902T)
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 100mm, 2.7µm(p/n 695975-906T)

화학물질

모든 용매는 LC 등급 용매를 사용하였습니다. Acetonitrile은 Merck (Darmstadt, 독일)에서 구입하였습니다. 신선한 초순수는 0.22µm 멤브레인 point-of-use 카트리리지(Millipak)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다(Millipak, EMD Millipore, 미국). Potassium dihydrogen phosphate는 Merck(Darmstadt, 독일)에서 구입하였습니다. Acetic acid, trifluoroacetic acid, propyl gallate, tert-butylhydroquinone, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, acesulfame K, sodium saccharin 및 benzoic acid는 Sigma-Aldrich(Steinheim, 독일)에서 구입하였습니다. Aspartame 및 sorbic acid은 Supelco(Bellefonte, 미국)에서 구입하였습니다. Salicylic acid 및 2',4',5'-trihydroxybutyrophenone은 Fluka(Buchs, 스위스) 및 Synquest Laboratories(Alachua, 미국)에서 각각 구입하였습니다.

시료 및 분석법

항산화제 분석

표준물질: Butylated hydroxyanisole (BHA, E 320), butylated hydroxytoluene(BHT, E 321), propyl gallate(PG, E 310), tert-butylhydroquinone(TBHQ, E 319), 2',4',5'-trihydroxybutyrophenone(THBP)의 혼합물을 water:acetonitrile(80:20, v:v)으로 제조하였습니다(PG 및 THBP의 농도는 10µg/mL, BHA 및 TBHQ의 농도는 50µg/mL, BHT의 농도는 100µg/mL).

시료 및 시료 전처리: 츄잉껌은 현지 슈퍼마켓(독일)에서 구매하였습니다. 츄잉껌을 작은 조각으로 자른 후, 초음파 용기에서 20mL의 acetonitrile을 이용해 추출하였습니다. 분석 전, 1mL 플라스틱 시린지에 Captiva Premium 시린지 필터(나일론, 15mm, 0.45µm, p/n 5190-5091)를 연결하여 추출물을 여과하였습니다.

감미료 분석

표준물질: Acesulfame K(E 950), aspartame(E 951) 및 sodium saccharin(E 954)의 혼합물을 water:acetonitrile(90:10, v:v)으로 제조하였습니다(각 성분의 농도는 10µg/mL).

시료 및 시료 전처리: 무설탕 에너지 드링크는 현지 슈퍼마켓(독일)에서 구매하였습니다. 초음파로 시료를 탈기하고 1mL 플라스틱 시린지에 Captiva Premium 시린지 필터(재생 셀룰로오스, 15mm, 0.45µm, p/n 5190-5109)를 연결하여 여과하였습니다. 분석을 위해 시료를 물에 1:10 비율로 희석하여 사용하였습니다.

보존제 분석

표준물질: Benzoic acid(E 210), salicylic acid 및 sorbic acid(E 200)의 혼합물을 water:acetonitrile(90:10, v:v)으로 제조하였습니다(각 성분의 농도 10µg/mL).

시료 및 시료 전처리: 페이셜 토닉은 현지 슈퍼마켓(독일)에서 구매하였습니다. 시료는 1mL 플라스틱 시린지에 Captiva Premium 시린지 필터(재생 셀룰로오스, 15mm, 0.45µm, p/n 5190-5109)를

표 1. 항산화제 분석용 크로마토그래피 조건

파라미터	값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 4.6 × 100mm, 2.7µm
용매	A) Water + 0.5% acetic acid B) Acetonitrile
그레디언트	0분에 10% B 10분에 95% B
정지 시간	15분
사후 시간	10분
유속	1.000mL/분
온도	40°C
검출	280nm/4nm, Ref. 390nm/20nm, 20Hz, 스펙트럼 수집
주입량	10.0µL
시료 온도	10°C

표 2. 감미료 분석용 크로마토그래피 조건

파라미터	값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100mm, 2.7µm
용매	A) 20 mM KH ₂ PO ₄ in water, pH 3 B) Acetonitrile
그레디언트	0분에 15% B 10분에 80% B
정지 시간	10분
사후 시간	5분
유속	1.000mL/분
온도	30°C
검출	214nm/4nm, Ref. 360nm/100nm, 20Hz, 스펙트럼 수집
주입량	10.0µL
시료 온도	10°C

표 3. 보존제 분석용 크로마토그래피 조건

파라미터	값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 4.6 × 100mm, 2.7µm
용매	A) Water + 0.05% trifluoroacetic acid B) Acetonitrile:isopropanol (50:50) + 0.05% trifluoroacetic acid
그레디언트	0분에 15% B 10분에 40% B
정지 시간	10분
사후 시간	5분
유속	1.000mL/분
온도	40°C
검출	235nm/4nm, Ref. 380nm/40nm, 20Hz, 스펙트럼 수집
주입량	10.0µL
시료 온도	10°C

연결하여 여과하였습니다. 분석을 위해 물에 1: 1,000으로 희석한 시료를 사용하였습니다.

기기 설정

1260 Infinity II 다중 분석법 솔루션은 컬럼과 용매를 분석법 파라미터로 지정할 수 있는 기능을 제공합니다. 이를 통해 사용자의 상호 작용 없이도 단일 기기에서 서로 다른 컬럼과 용매를 사용하는 다양한 분석법을 수행할 수 있으며, 또한 이러한 분석법을 시퀀스의 일부가 되도록 합니다.

기기 구성 설정 시, 용매 선택 밸브와 Agilent 1260 Infinity II Quaternary 펌프를 묶어 펌프-밸브 클러스터를 구성합니다. 용매 선택 밸브와 펌프의 클러스팅은 해당 내용을 소개한 이전 응용 자료를 참고하십시오⁴. 본 응용 자료에서, 용매 선택 밸브는 1260 Infinity II Quaternary 펌프의 A 채널에 연결하여, 사용할 수용성 용매를 선택할 수 있도록 하였습니다. Pump Valve Cluster Configuration 메뉴에서는, 용매 선택 밸브의 위치 및 1260 Infinity II Quaternary 펌프의 B, C, D 채널을 연결하는 용매로 명명합니다. 그렇게 하면 펌프-밸브 클러스터의 Method 화면에서 드롭다운 메뉴를 사용해 용매명을 선택할 수 있으며, 용매 선택 밸브가 해당 위치로 자동 전환됩니다.

Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치와 컬럼 ID 태그 판독기 (컬럼 ID 키트의 일부)를 이용하면 컬럼 이력을 추적할 수 있습니다. 컬럼 ID 태그가 있는 컬럼을 설치할 때, 종류와 기하학적 데이터 뿐만 아니라 pH, 압력, 온도 한계값과 같은 컬럼 속성이 ChemStation 컬럼 표에 자동으로 입력됩니다(그림 1). 주입 횟수, 최대 측정 온도 그리고 최초 및 최근 주입 날짜 등을 포함한 컬럼 이력을 컬럼 ID 태그로 추적할 수 있습니다.

#	Installed	Location	Tag	Description	Col. Serial#	Batch#	Product#	# Injections	Max. P [bar]	Max. T [°C]	Max. pH	Min. pH	Length	Diameter	Size	Void Unit	Comment
1	YES	Left 1	Sealed	Poroshell 120 SB-C18	USCEW03045	B16095	695975-902T	29	600	90.0	8.0	1.0	100.0	4.6	2.7	1,000 ml	
2	YES	Left 2	Sealed	Poroshell 120 EC-C18	USCF507202	B16107	695975-902T	29	600	60.0	8.0	2.0	100.0	4.6	2.7	1,000 ml	
3	YES	Left 3	Sealed	Poroshell 120 EC-C8	USDFK01718	B16046	695975-906T	142	600	60.0	8.0	2.0	100.0	4.6	2.7	1,000 ml	

그림 1. ChemStation 컬럼 표

Column Assignment 대화 상자 (그림 2)에서 4-컬럼 선택 밸브의 유로 연결을 정의하고, 설치된 컬럼을 해당 위치로 지정합니다. Column Assignment 대화 상자는 ChemStation 컬럼 표와 직접 연결됩니다. 설치된 컬럼 중 컬럼 ID 태그가 있는 컬럼은 자동으로 정확한 위치에 배치됩니다.

4-컬럼 선택 밸브에는 4 개의 위치가 있어, 컬럼과 연결하거나 바이패스 또는 폐용매 위치로 사용할 수 있습니다. 본 응용 자료에서는 3 개의 컬럼을 설치하고, 나머지 하나의 위치는 바이패스로 사용하였습니다.

컬럼 수명을 극대화하기 위해, 사용할 컬럼으로 유로를 전환하기 전, 바이패스를 통해 새로운 이동상으로 펌프에서 검출기까지 시스템을 씻어 내는 것이 좋습니다. 이렇게 하면, 이 컬럼에 권장하지 않는 pH 값을 가진 용매로부터 컬럼을 보호할 수 있습니다. 또한 사용 후에는 컬럼 수명을 극대화하는 데 가장 적절한 용매로 컬럼을 씻어낼 것을 권장합니다. 이러한 과정을 간편하게 진행할 수 있는 한 가지 방법은 각 응용별로 플라싱과 컬럼 평형 및 컬럼 보관을 진행하는 마스터 시퀀스를 설정하는 것입니다.

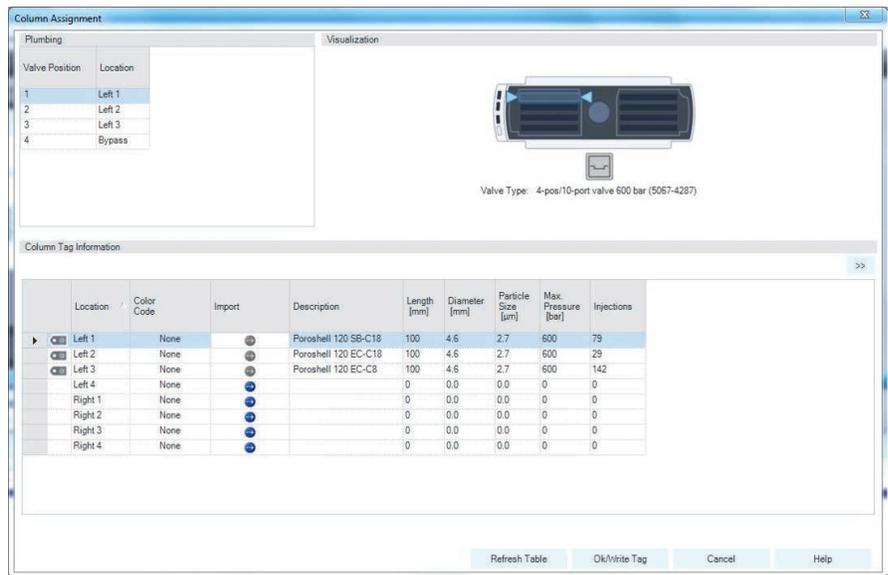


그림 2. Column Assignment 대화 상자

컬럼 지정 후에는 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치의 Method 대화 상자 내 드롭다운 메뉴에서 특정 분석법에 사용되는 컬럼을 선택할 수 있습니다(그림 3). 분석법을 로딩하면, 4-컬럼 선택 밸브는 선택되어 있는 컬럼에 해당하는 위치로 자동 전환합니다.

결과 및 토의

본 응용 자료에서는 1260 Infinity II 다중 분석법 솔루션을 사용하여 식품 관리 실험실의 응용 사례로서 항산화제, 감미료 및 보존료에 대한 분석을 수행하였습니다. 이들 분석은 분석법 파라미터로 사용된 컬럼과 용매의 선택을 통해 하나의 시퀀스 내에서 수행할 수 있습니다.

항산화제 분석

그림 4는 항산화제인 PG, THBP, TBHQ, BHA, BHT의 분석과 10회 연속 분석을 통해 측정된 머무름 시간 및 면적 정밀도를 나타냅니다. 모든 피크에서 우수한 머무름 시간 정밀도를 얻었습니다. PG, THBP, TBHQ 및 BHT의 경우, 표준 혼합물 내에서의 이들 화합물의 분해로 인해 면적 정밀도가 저하되었습니다.

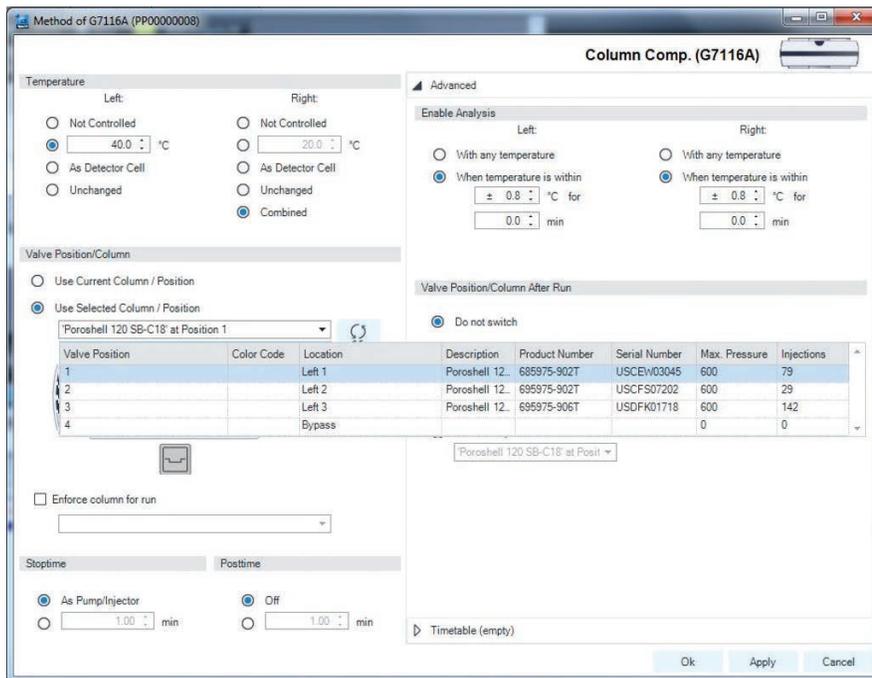


그림 3. Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치 Method 대화 상자에서의 컬럼 선택

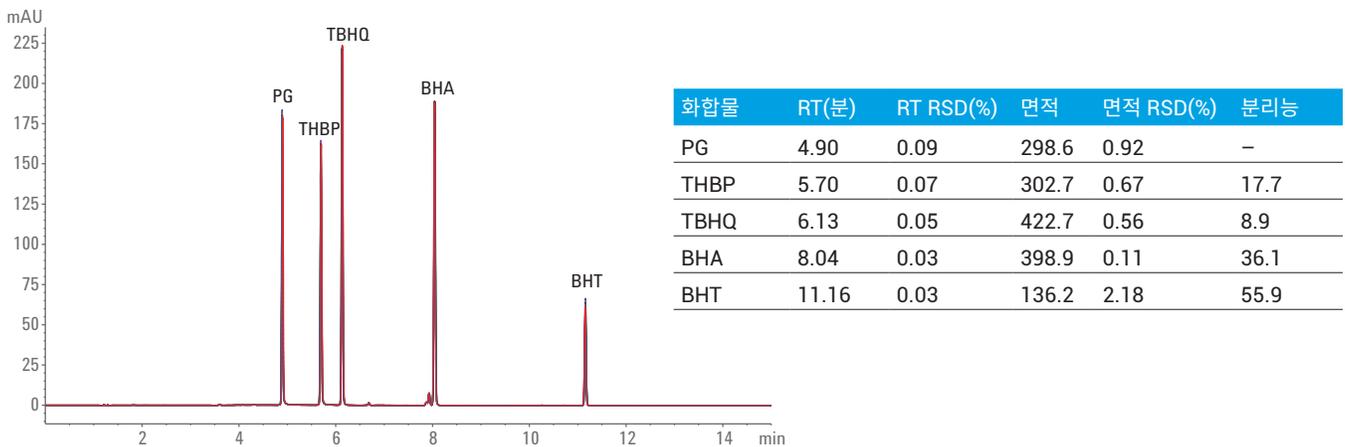


그림 4. 항산화제 분석: 표준 혼합물의 10회 연속 분석 오버레이와 머무름 시간 및 면적 정밀도 측정

실제 시료 분석의 사례로 추잉껌을 분석하였습니다. 머무름 시간과 UV 스펙트럼에 기반하여 추잉껌 시료에서 BHA를 식별할 수 있었습니다(그림 5).

감미료 분석

그림 6은 감미료 acesulfame, aspartame 및 saccharin의 분석과 10회 연속 분석을 통해 측정된 머무름 시간 및 면적 정밀도를 나타냅니다. 모든 피크에서 우수한 머무름 시간 및 면적 정밀도를 얻었습니다.

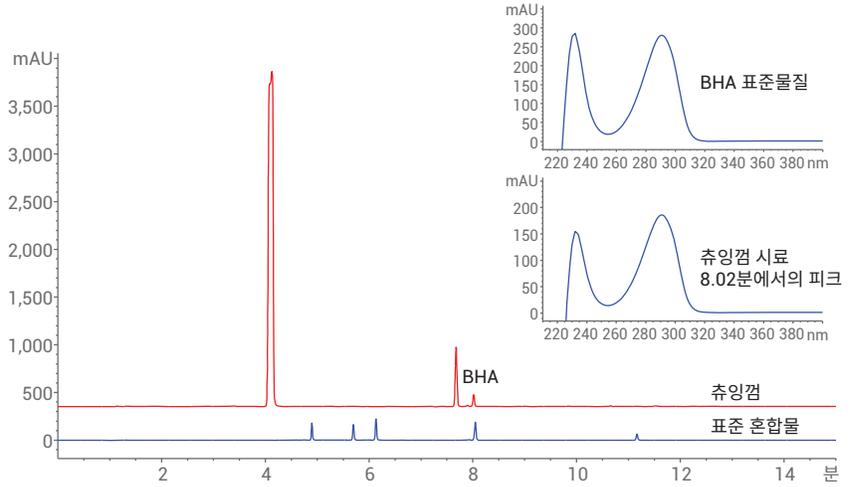
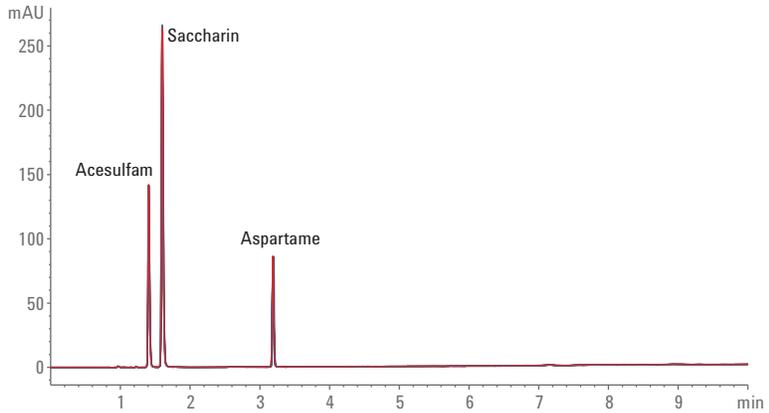


그림 5. 항산화제 분석: 추잉껌에서의 BHA 식별



화합물	RT(분)	RT RSD(%)	면적	면적 RSD(%)	분리능
Acesulfame	1.41	0.10	222.4	0.08	-
Saccharin	1.60	0.14	471.0	0.09	4.5
Aspartame	3.19	0.12	130.1	0.08	37.2

그림 6. 감미료 분석: 표준 혼합물의 10회 연속 분석 오버레이와 머무름 시간 및 면적 정밀도 계산

무설탕 에너지 드링크는 실제 시료 분석의 사례로 분석되었습니다. 머무름 시간과 UV 스펙트럼에 기반하여 에너지 드링크 시료에서의 acesulfame과 aspartame을 식별할 수 있었습니다 (그림 7).

보존제 분석

그림 8은 보존제 sorbic acid, benzoic acid 및 salicylic acid의 분석과 10회 연속 분석을 통해 측정된 머무름 시간 및 면적 정밀도를 나타냅니다. 모든 피크에서 우수한 머무름 시간 및 면적 정밀도를 얻었습니다.

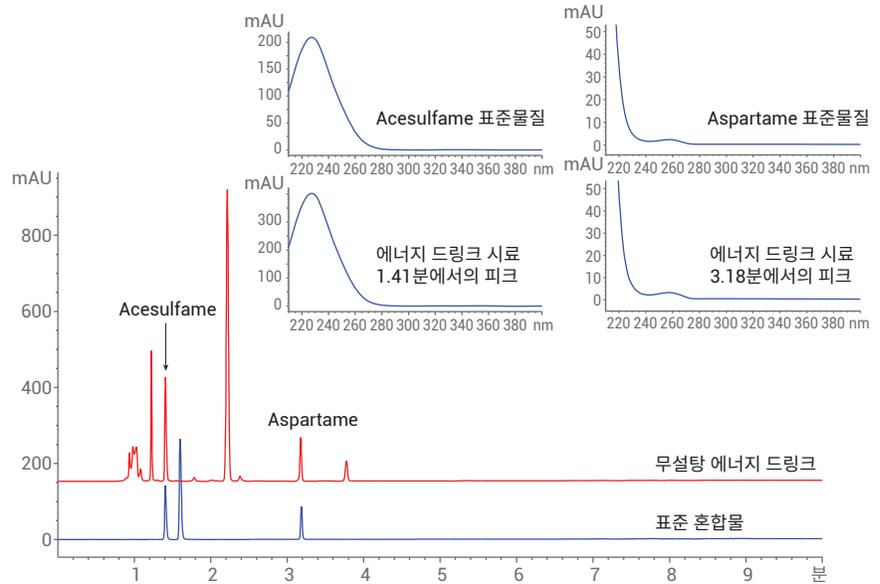
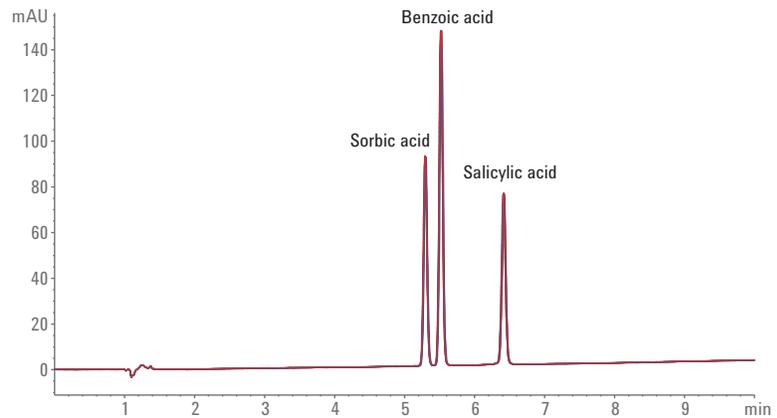


그림 7. 감미료의 분석: 무설탕 에너지 드링크 내의 acesulfame 및 aspartame 식별



화합물	RT(분)	RT RSD(%)	면적	면적 RSD(%)	분리능
Sorbic acid	5.30	0.08	319.2	0.03	-
Benzoic acid	5.52	0.08	515.6	0.04	2.4
Salicylic acid	6.42	0.07	293.8	0.18	9.2

그림 8. 보존료 분석: 표준 혼합물의 10회 연속 분석 오버레이와 머무름 시간 및 면적 정밀도 계산

페이셜 토닉은 실제 시료 분석의 사례로 분석되었습니다. 머무름 시간과 UV 스펙트럼에 기반하여 페이셜 토닉 시료에서의 salicylic acid를 식별할 수 있었습니다(그림 9).

결론

Agilent 1260 Infinity II Multimethod 솔루션은 수동으로 시스템을 변경하지 않고도 단일 LC 시스템에서 서로 다른 컬럼과 이동상을 이용하여 다양한 LC 응용을 수행할 수 있도록 해줍니다. 본 응용 자료는 식품 관리 실험실에서의 응용 사례로 항산화제, 감미료 및 보존료의 분석을 입증합니다. 모든 응용 사례에서 우수한 머무름 시간 정밀도를 얻었습니다. 머무름 시간과 UV 스펙트럼에 기반하여, 식품과 화장품 시료 내의 항산화제, 감미료 및 보존료를 식별할 수 있었습니다.

참고문헌

1. Naegele, E. The Agilent 1290 Infinity II Multimethod Solution, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-5679EN, 2015.
2. Belitz; *et al.*, Food Chemistry, 4th revised and extended edition, Springer 2009.
3. Judefeind; *et al.* Stable isotope dilution analysis of salicylic acid and hydroquinone in human skin samples by gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography B* 2007, 852, 300-307.
4. Gratzfeld-Huesgen, A.; Naegele, E. The Agilent 1290 Infinity Multimethod Solution, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-5600EN, 2010.

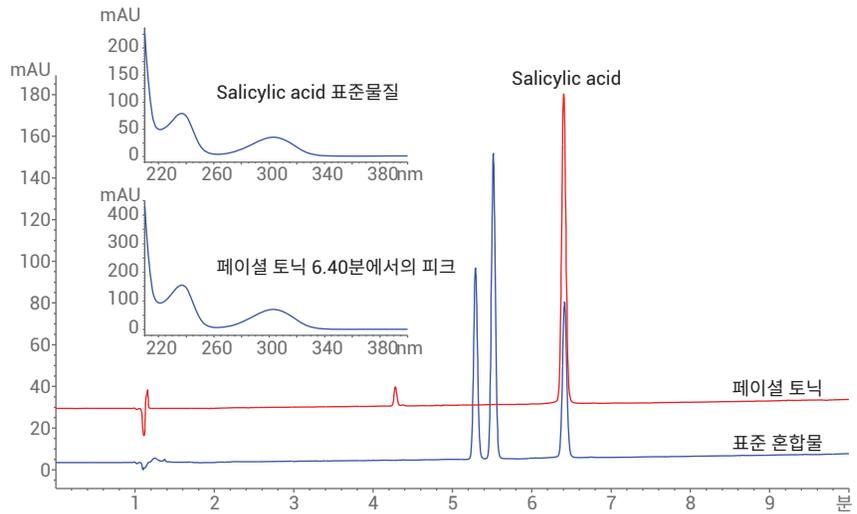


그림 9. 보존료 분석: 페이셜 토닉 내의 salicylic acid 식별

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 12월 1일, 한국에서 인쇄
5991-7622KO

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



Agilent Technologies