

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 컬럼을 이용한 수용성 비타민 분석

저자

Anne Mack
Agilent Technologies, Inc.

개요

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 컬럼을 이용해 8개 수용성 비타민이 4분만에 베이스라인 분리되었습니다. 컬럼은 $2.1 \times 100\text{mm}$ 포맷이며 $2.7\mu\text{m}$ 표면 다공성 입자입니다. Agilent 1290 Infinity LC에서의 분리를 위해 아세트산 암모늄과 아세토니트릴의 농도 구배가 사용되었습니다.

소개

표면 다공성 입자의 LC 컬럼은 액체 크로마토그래피에서 인기 있는 도구입니다. 이러한 컬럼은 전체 다공성 입자 컬럼과 비교해 더 낮은 압력에서 높은 효율성을 창출합니다¹. 이는 주로 질량 이동(mass transfer) 거리가 더 짧고 컬럼 내 입자 크기 분포가 더 조밀하기 때문입니다. 효율성이 더 높으면 분리능 및 감도가 개선되어 시간을 단축하거나 결과를 향상시킬 수 있습니다.

지금껏 표면 다공성 입자는 주로 역상 분리에 사용해왔습니다. 표면 다공성 입자 기술의 발전과 함께, chemistry 및 크로마토그래피 기술에서의 응용 분야가 넓어져 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)에서의 응용도 가능해지게 되었습니다. HILIC는 종종 역상 모드에서 머무름 및 분리가 어려운 극성 분석물질의 분석에 적합합니다. 이 응용 자료는 2.7µm 컬럼을 이용한 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5의 UHPLC 성능과 이 기술로 8개 수용성 비타민의 베이스라인 분리를 소개합니다. 그림 1에 이들 화합물이 나타나 있습니다.

실험

이 작업을 위해 Agilent 1290 Infinity LC는 저분산으로 설정되었습니다. 표 1에 상세한 내용이 나와 있습니다. 표 2는 사용된 크로마토그래피 분석법을 보여주고 있습니다. 모든 화합물이 개별 표준물질로 주입되었으며, 농도와 시료 용매에 대한 정보는 표 3에 기재되어 있습니다.

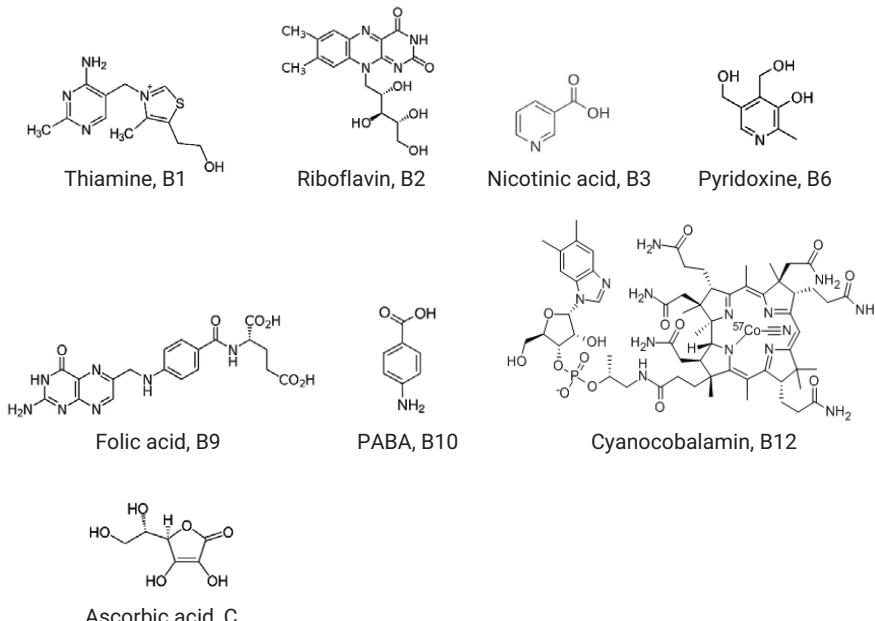


그림 1. 수용성 비타민

표 1. Agilent 1290 Infinity LC 시스템 구성

파라미터	값
Agilent 1290 Infinity Binary Pump (G4220A)	35 µL Solventmixer: Agilent Jet weaver, 35 µL/100 µL (G4220-60006)
Agilent 1290 Infinity autosampler G4226A	<ul style="list-style-type: none">Seat assembly, ultra low dispersion, for Agilent 1290 Infinity autosampler G4226A (G4226-87030)Autosampler → 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	<ul style="list-style-type: none">Heat exchanger, low dispersion, 1.6 µL, double (G1316-60005)Heater → Column: Agilent InfinityLab Quick Connect assembly, 105 mm, 0.075 mm (5067-5961)Column → Flow cell: Capillary, stainless steel, 0.075 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784)
Agilent 1290 Infinity Diode Array Detector (G4212A)	Agilent Ultra-Low Dispersion Max-Light Cartridge flow cell, 10 mm (G4212-60038)
Agilent OpenLAB CDS ChemStationEdition RevisionC.01.05 [35]	<ul style="list-style-type: none">G4220A: B.06.53 [0013]G4226A: A.06.50 [003]G1316C: A.06.53 [002]G4212A: B.06.53 [0013]
Agilent LC column	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm (685775-601)

표 2. LC 분석법 파라미터

컬럼	이동상	유량 (mL/min)	이동상 조성	주입량 (µL)	항온 컬럼 장치 (°C)	다이오드 어레이 검출기
Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm	A) 100 mM ammonium acetate + 0.5 % acetic acid B) Acetonitrile	0.5	87 %B for 0.5 minutes, 87–50 %B in 3.5 minutes, 3 minutes re-equilibration	1.0 시료 정보는 표 2를 참고하십시오	40	260 nm, 80 Hz

이 실험에서 분석된 8개 비타민은 Sigma-Aldrich에서 개별 분말 형태로 구입하였습니다. 아세트산 암모늄과 아세트산도 Sigma-Aldrich에서 구입하였습니다. 아세토니트릴은 Honeywell(Burdick and Jackson)에서 구매했으며, 물은 Milli-Q 시스템(Millipore) (18MW)에서 0.2 μ m 필터링 막으로 필터링되었습니다.

결과 및 토의

그림 2의 크로마토그램에서 보이듯, 8개의 비타민 화합물이 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5를 사용해 베이스라인으로 분리되었습니다. 이 분리는 4분만에 진행되었으며, 최소 분리능은 비타민 B2와 B10의 주요 쌍 사이에서 2.7로 나타났습니다.

HILIC-Z와 HILIC를 포함해, 2.7 μ m Agilent InfinityLab Poroshell 120 입자를 적용할 수 있는 다른 HILIC 상도 애질런트에서 구입 가능합니다. 이들 상 역시 비타민 화합물 분리에서 사용이 고려되었습니다. 그러나 그림 3에서 보이듯 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5의 성능이 가장 우수했습니다. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼으로 모든 8개 화합물의 탁월한 피크 모양을 얻을 수 있으나, 이러한 실험 조건에서 비타민 B1과 B3를 분리하지 못했습니다. Poroshell 120 HILIC 컬럼은 매우 강한 또다른 선택성을 보유하고 있으나, 비타민 B9과 C의 피크 모양이 그렇게 좋지 않습니다.

표 3. 시료 전처리

수용성 비타민 (B,C)	농도 (mg/mL)	시료 용매
Thiamine (B1)	0.4	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)
Riboflavin (B2)	0.1	CH ₃ CN/DMSO (9:1)
Niacin/nicotinic acid (B3)	0.4	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)
Pyridoxine/pyridoxol(B6)	0.4	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)
Folate/folic acid (B9)	0.4	CH ₃ CN/DMSO (9:1)
4-Aminobenzoic acid/PABA (B10)	0.2	CH ₃ CN/H ₂ O (95:5)
Cyanocobalamin (B12)	0.4	H ₂ O
Ascorbic acid (C)	0.2	CH ₃ CN/H ₂ O (9:1)

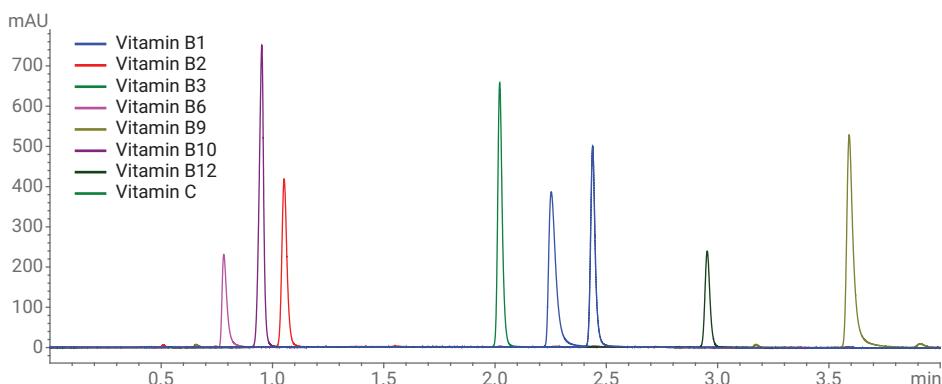


그림 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 컬럼을 이용한 수용성 비타민 분리

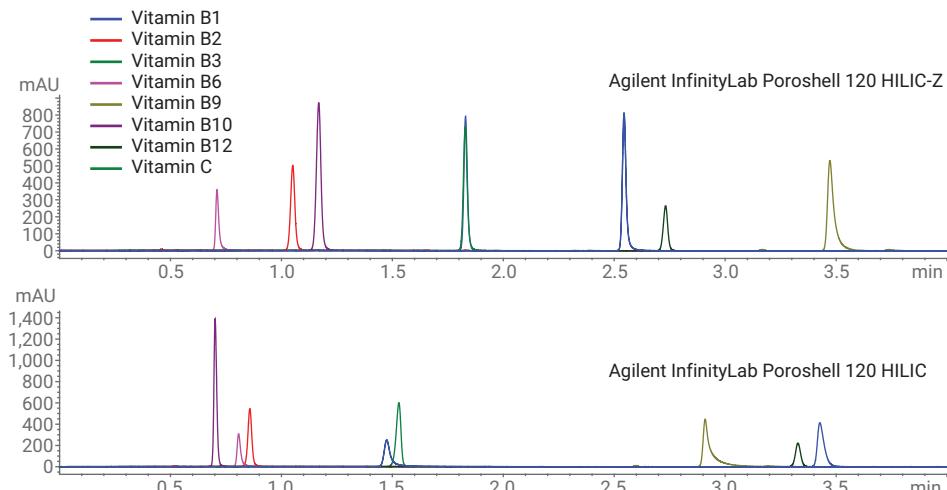


그림 3. 대안적인 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 상을 이용한 수용성 비타민 분리

결론

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 컬럼은 수용성 비타민 분리에 매우 적합합니다. 이 컬럼은 모든 화합물에 대해 우수한 피크 모양 및 분리 성능을 제공합니다. 다른 HILIC chemistry도 이 분리를 위해 사용이 고려되었습니다. 그러나 다른 상의 분리능은 적합하지 않았으며, 적절한 분리를 위한 최적의 조건에 대해 추후 더 심도 있는 분석법 개발 연구가 필요할 것으로 보입니다.

참고문헌

1. Gratzfield-Hugsen, A.; Naegle, E. Maximizing efficiency using Agilent InfinityLab Poroshell 120 Columns, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-5602EN, 2016.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2017
2017년 11월 29일, 한국에서 인쇄
5991-8780KO

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

