

# 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 × 100mm 포맷이며 2.7µm 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 창출합니다<sup>1</sup>. 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 성과와 이 기술로 8개 수용성 비타민의 베이스라인 분리를 소개합니다. 그림 1에 이들 화합물이 나타나 있습니다.

## 실험

이 작업을 위해 Agilent 1290 Infinity LC 는 저분산으로 설정되었습니다. 표 1 에 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.

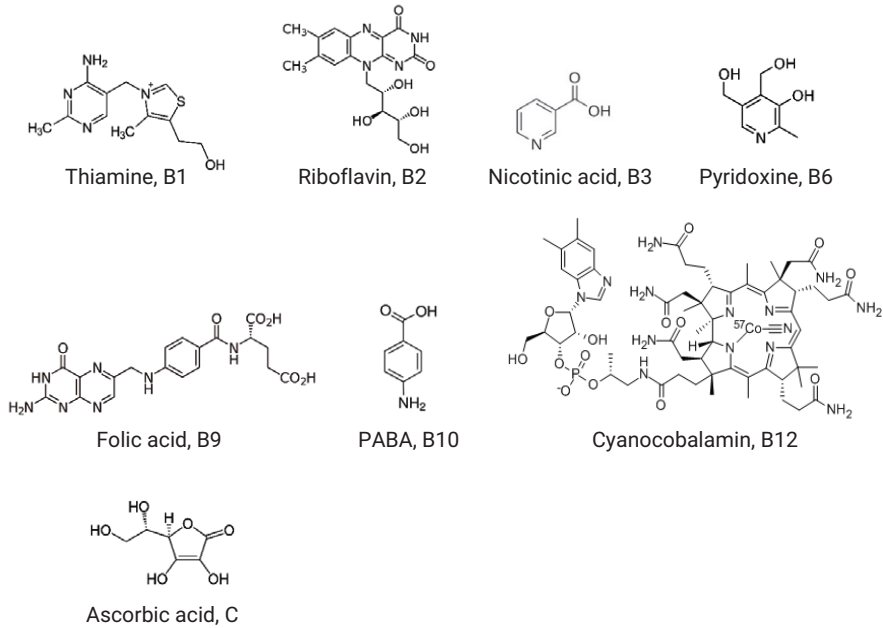


그림 1. 수용성 비타민

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"> <li>• Seat assembly, ultra low dispersion, for Agilent 1290 Infinity autosampler G4226A (G4226-87030)</li> <li>• Autosampler → Heater: Capillary, stainless steel, 0.075 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784)</li> <li>• Vial, screw top, amber with write-on spot, certified, 2 mL, 100/pk (5182-0716)</li> <li>• Cap, screw, blue, PTFE/red silicone septa, 100/pk (5182-0717)</li> <li>• Vial insert, 250 µL, glass with polymer feet, 100/pk (5181-1270)</li> </ul>
Agilent 1290 Infinity Thermostatted Column Compartment G1316C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heat exchanger, low dispersion, 1.6 µL, double (G1316-60005)</li> <li>• Heater → Column: Agilent InfinityLab Quick Connect assembly, 105 mm, 0.075 mm (5067-5961)</li> <li>• Column → Flow cell: Capillary, stainless steel, 0.075 × 220 mm, SV/SLV (5067-4784)</li> </ul>
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"> <li>• G4220A: B.06.53 [0013]</li> <li>• G4226A: A.06.50 [003]</li> <li>• G1316C: A.06.53 [002]</li> <li>• G4212A: B.06.53 [0013]</li> </ul>
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 0.2µm 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, 2.7µm 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 B3을 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 <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)
Riboflavin (B2)	0.1	CH <sub>3</sub> CN/DMSO (9:1)
Niacin/nicotinic acid (B3)	0.4	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)
Pyridoxine/pyridoxol(B6)	0.4	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)
Folate/folic acid (B9)	0.4	CH <sub>3</sub> CN/DMSO (9:1)
4-Aminobenzoic acid/PABA (B10)	0.2	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (95:5)
Cyanocobalamin (B12)	0.4	H <sub>2</sub> O
Ascorbic acid (C)	0.2	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)

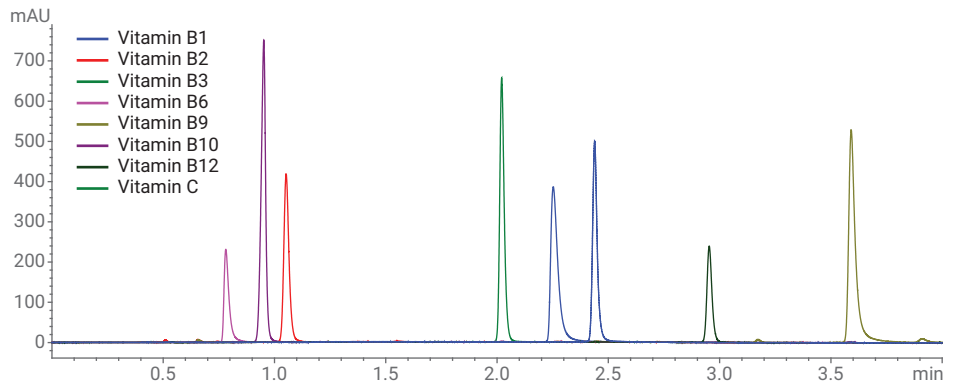


그림 2. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5 컬럼을 이용한 수용성 비타민 분리

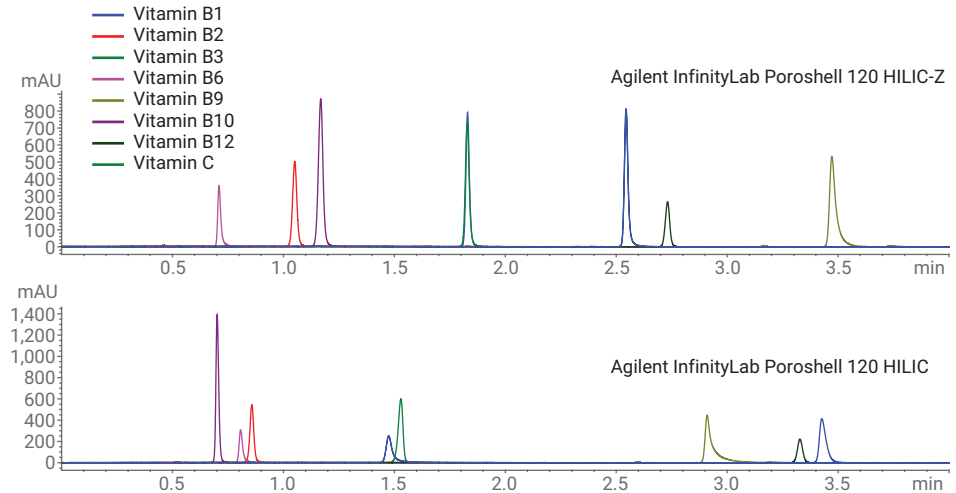


그림 3. 대안적인 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC 상을 이용한 수용성 비타민 분리

## 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-Huguen, A.; Naegele, E. Maximizing efficiency using Agilent InfinityLab Poroshell 120 Columns, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-5602EN, 2016.

[www.agilent.com/chem](http://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](http://www.agilent.co.kr)