

## 응용 자료

식품/음료 테스트, 발효  
모니터링, 농약, 바이오연료,  
대체 에너지



# Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼을 이용한 당류 분석

## 저자

Anne Mack & Ta-Chen Wei  
Agilent Technologies, Inc.

## 개요

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼을 이용해 11개 당류 화합물을 그레이언트 및 등용매 용리법 두 가지 방식 모두로 분리하였습니다. 이 실험에서는 포도당 아노마 분리에 pH와 온도가 끼치는 영향을 탐구하였습니다. 결과적으로, 높은 pH와 낮은 온도의 조합이 피크 모양과 컬럼 수명 모두를 위한 최상의 조건인 것으로 드러났습니다. 최종 분리는 35°C에서 수산화 암모늄 이동상을 이용해 진행되었습니다.

## 소개

표면 다공성 입자의 LC 컬럼은 액체 크로마토그래피에서 인기 있는 도구입니다. 이러한 컬럼은 전체 다공성 입자 컬럼과 비교해 더 낮은 압력에서 높은 효율성을 창출합니다. 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 분리에서 적용되었습니다. 표면 다공성 입자 기술의 발전과 함께, chemistry 및 크로마토그래피 기술에서의 응용 분야가 넓어져 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)의 응용도 가능해지게 되었습니다. HILIC는 역상 모드 분리에서 머무름 및 분리가 어려운 극성 분석물질에 적합합니다. 이 응용 자료는 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z (2.7 $\mu$ m 컬럼)를 이용한 UHPLC 성능과, 이 기법을 통해 그레디언트 및 등용매 용리 두 모드로 11개 당류 화합물을 분리하는 기능을 소개합니다.

InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z는 견고한 하이브리드 입자에 결합된 새로운 양쪽성 이온 고정상을 사용합니다. 이 고정상은 최대 80°C 및 pH 12까지 안정적입니다. 또한 이 고정상으로 매우 넓은 극성 범위의 분석물질을 분리할 수 있습니다. 이들 HILIC-Z 고정상은 높은 pH의 분리에 적합하여 견고한 솔루션을 제공합니다.

## 실험

이 실험에는 Agilent 1260 binary LC 시스템과 Agilent G4218A ELSD가 사용되었습니다. 모든 연결 캐뉼러리는 0.12mm의 짧은 내부 직경을 가지고 있으며 시스템 입자 분산도를

최소화할 수 있습니다. 시스템 제어와 데이터 처리에는 애질런트 OpenLAB 소프트웨어를 사용했습니다. 표 1은 사용된 크로마토그래피 분석법을 보여주고 있습니다. 모든 화합물은 개별 표준물질로 주입되었습니다. 표 2에는 농도와 시료 용매가 기재되어 있습니다.

11개의 당류 화합물은 Sigma-Aldrich에서 구입하였습니다. 포름산 암모늄, 포름산, 아세트산 암모늄, 수산화 암모늄 역시 Sigma-Aldrich에서 구입하였습니다. 아세토니트릴은 Honeywell(Burdick and Jackson)에서 구입했으며, 물은 Milli-Q 시스템(Millipore)(18MW)에서 0.2 $\mu$ m 필터링 막으로 필터링되었습니다.

표 2. 시료 분리 및 주입 부피

당류	다음 용매로 포화용액 준비:	주입 부피( $\mu$ L)
Xylose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	0.1
Arabinose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	0.1
Fructose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	0.1
Mannose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	0.2
Glucose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	0.4
Galactose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	0.4
Sucrose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	0.5
Maltose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	1.0
Lactose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	1.5
Maltotriose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	3.0
Raffinose	CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O (9:1)	7.0

표 1. 분석법 파라미터

분석법	이동상 A	이동상 B	이동상 조성	유속(mL/분)	컬럼	컬럼 온도(°C)	ELSD 설정
그림 1	Water	Acetonitrile	95–80 %B in 12 minutes, 3 minutes re-equilibration	0.4	경쟁사 HILIC column, 2.1 × 100 mm, 2.7 $\mu$ m	35, 40, or 80	60 °C, 3.5 psi, 30 Hz
	100 mM Ammonium formate in water pH 4.5						
	100 mM Ammonium acetate in water pH 7.0						
	0.6 % Ammonium hydroxide in water						
그림 2	0.3 % Ammonium hydroxide in water	Acetonitrile	90 % B Isocratic	0.4	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 $\mu$ m (p/n 685775-924)	35	60 °C, 3.5 psi, 30 Hz
	100 mM Ammonium acetate in water pH 7.0					80	
그림 3	0.3 % Ammonium hydroxide in water	0.3 % Ammonium hydroxide in acetonitrile	85–60 %B in 6 minutes, 3 minutes re-equilibration	0.4	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 $\mu$ m (p/n 685775-924)	35	60 °C, 3.5 psi, 30 Hz
그림 4	0.3 % Ammonium hydroxide in water	0.3 % Ammonium hydroxide in acetonitrile	80 %B Isocratic	0.4		35	60 °C, 3.5 psi, 30 Hz

## 결과 및 토의

당류는 많은 화합물이 아노мер 분리 현상이 발생하여 HPLC 분리가 매우 어렵습니다. 그림 1은 포도당 아노머 분리가 높은 pH, 높은 온도 또는 pH와 온도의 적절한 조합에 의해 제어될 수 있음을 보여줍니다. 실리카 기반의 LC 컬럼에서는 이와 같은 조건이 컬럼에 가혹한 환경을 조성해 컬럼 수명을 줄일 수 있습니다.

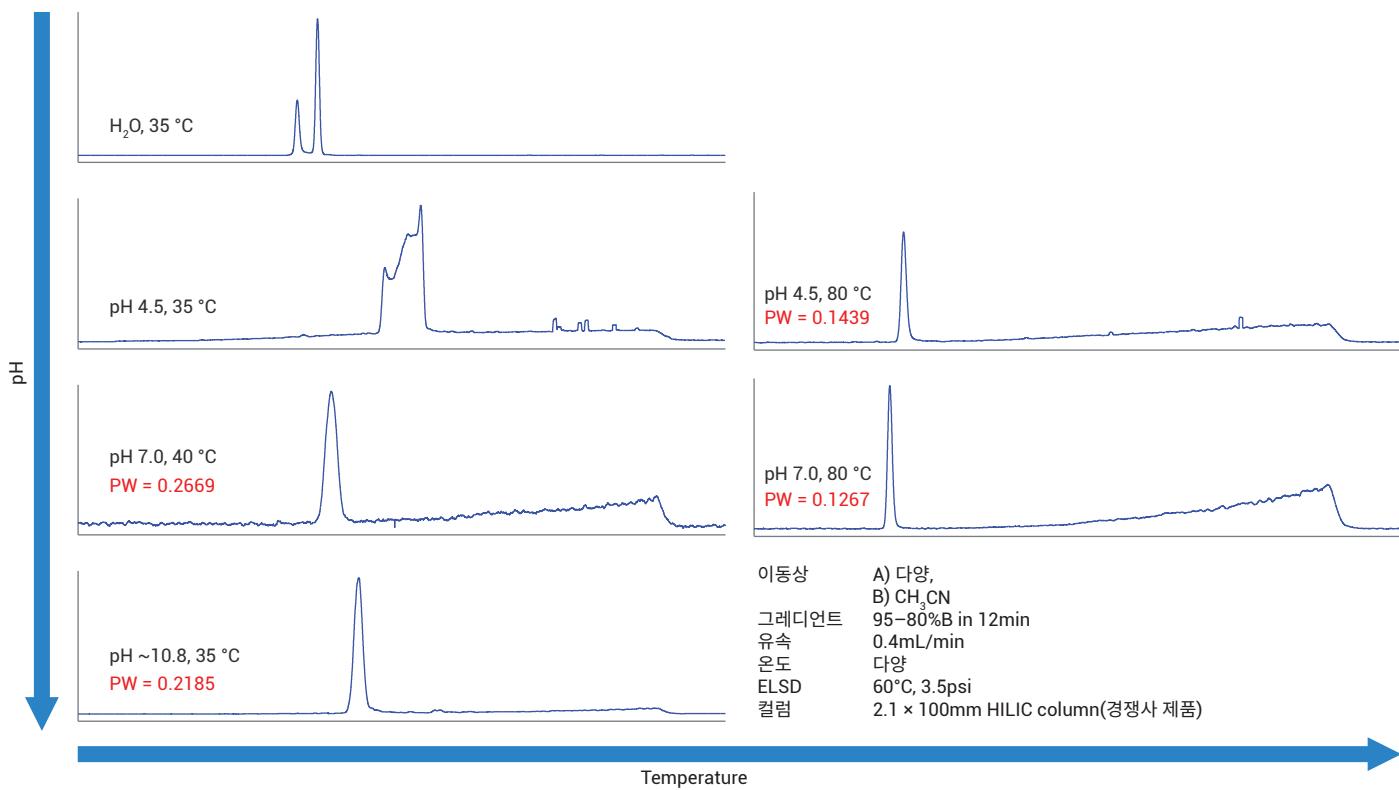


그림 1. 포도당 아노머 분리에 pH와 온도가 끼치는 영향

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 입자는 특허를 받은 하이브리드 입자에 양쪽성 이온 결합을 생성함으로써 높은 pH의 이동상에서도 입자를 안정적으로 만듭니다. 그림 2는 당류에 적합한 분석법 조건으로 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼 수명을 측정한 결과입니다. 결과에 따라 높은 pH와 낮은 온도의 조합은 14,000개 컬럼에서 성능 저하를 야기하지 않았습니다. 높은 온도와 중간 pH의 조합은 보다 좁은 피크 너비와 낮은 역압(backpressure)을 나타냈으나, 이와 같은 조건은 컬럼 손상을 가속화했습니다. InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼의 경우 높은 pH와 낮은 온도의 조합이 가장 견고한 당류 분석법으로 나타났습니다.

그림 3은 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼에서 그레이드언트와 높은 pH 이동상을 이용한 11개 당류 분석 결과를 보여줍니다. 모든 화합물에서 우수한 피크 모양이 나타났으며, 아노마 분리는 수산화 암모늄(pH ~10.8) 및 35°C의 컬럼 온도를 통해 제어할 수 있었습니다. 2개의 중요 쌍인 xylose/arabinose 및 glucose/galactose는 베이스라인 분리되지 않았습니다. 이러한 중요 쌍 분리는 더 긴 컬럼과 더 긴 분석 시간으로 개선될 수 있습니다.

그림 4는 당류의 등용매 분리 역시 가능하다는 것을 나타냅니다. 그림 3은 그레이드언트 분석 때와 거의 비슷한 시간 동안 등용매 분리가 수행되었음을 나타냈습니다. 그러나 초기 용리된 화합물에 대해서는 분리능과 감도가 후기 용리된 화합물에서보다 그만큼 나타나지 않았습니다. 이러한 작은 문제에도 불구하고, 등용매 분리는 당류 분석에서 그레이드언트 용리가 해결할 수 없는 부분에 적합합니다. RI 검출기 흐름 셀은 높은 pH의 이동상과 호환되지 않음을 유념해주세요. 만약 RI 검출기를 사용하고자 한다면, 중간 pH와 높은 온도의 조합을 선택해야 합니다. 모든 다른 분석법 파라미터는 동일하게 유지되어야 하며, 감도는 비슷할 것으로 예상됩니다.

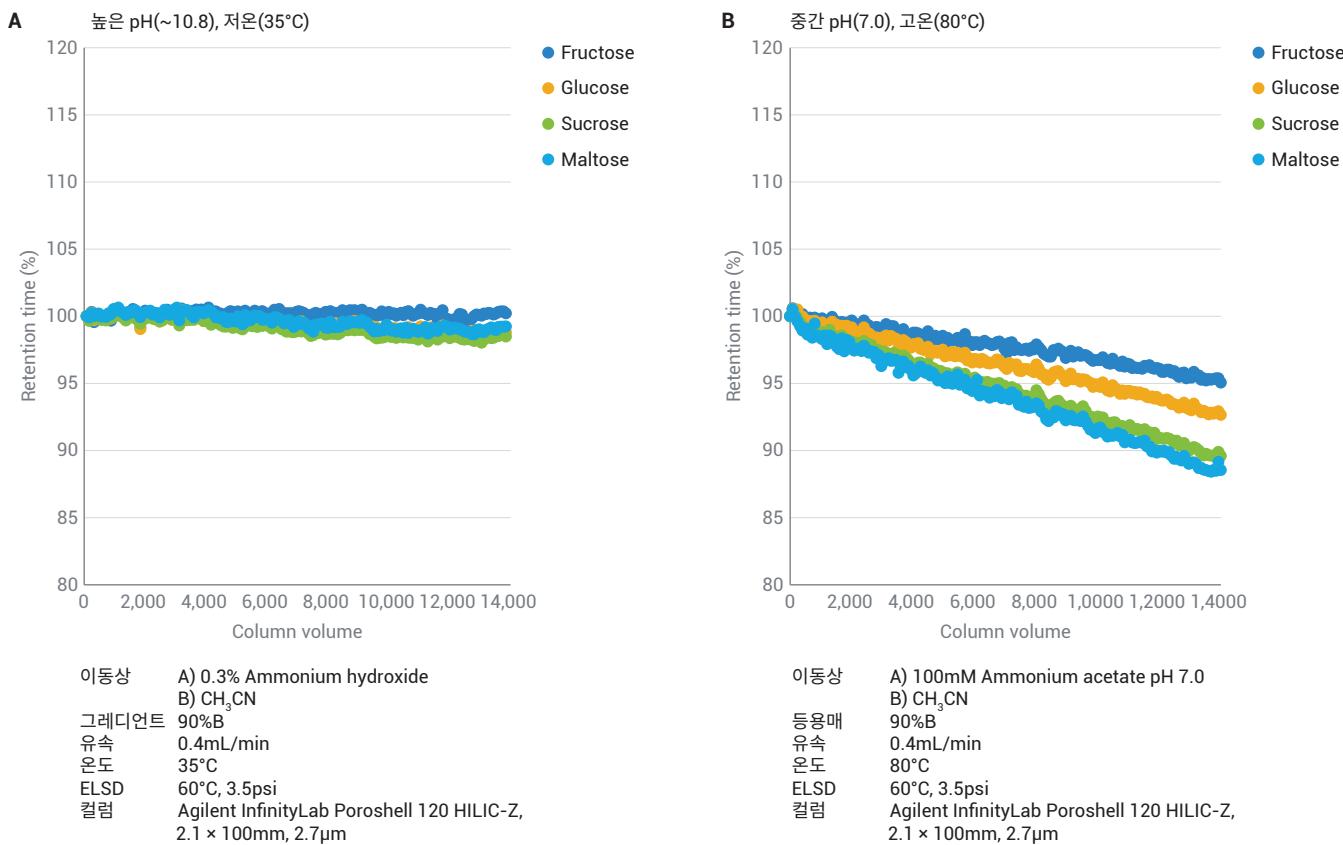


그림 2. 2.7μm Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z LC 컬럼에서 높은 pH와 높은 온도로 당류 분석 시 컬럼 수명 비교

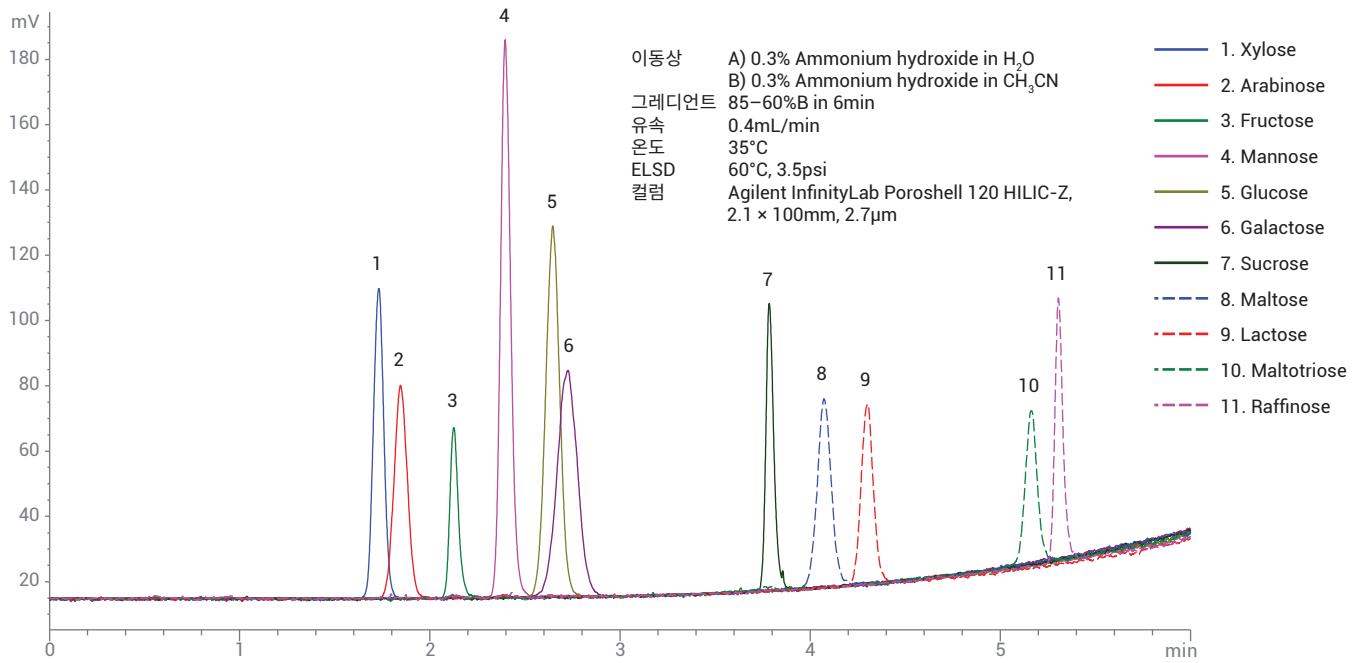


그림 3. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z LC 컬럼을 이용한 11개 당류 화합물 그레이디언트 분리

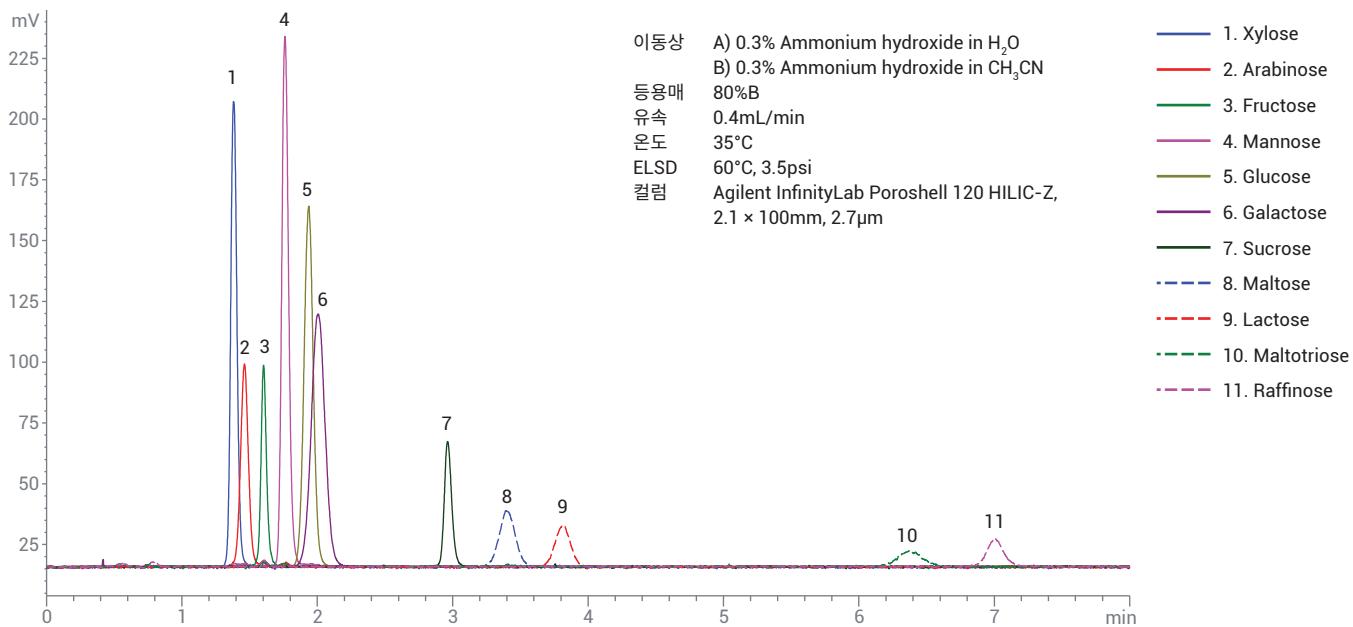


그림 4. Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z LC 컬럼을 이용한 11개 당류 화합물 등용매 분리

## 결론

Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z

컬럼은 당류 분리에 매우 적합합니다.

이 컬럼으로 모든 화합물에 대해 우수한

분리능, 피크 모양을 획득했으며, 높은 pH

조건에서도 훌륭한 수명을 자랑합니다.

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

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018

2018년 1월 30일 한국에서 인쇄

5991-8984KO

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)

