

# Agilent 1260 Infinity II HPLC를 이용한 건강기능식품공전 비타민 B1 분석법 확인

## 저자

오채원, 유재영  
한국애질런트테크놀로지스 (주)

## 개요

건강기능식품공전의 3.6.2. 비타민 B1 제2법 액체크로마토그래피 분석법은 비타민 B1을 페리시안화 칼륨과 반응시켜 티오크롬으로 환원한 후 형광 검출기로 분석하도록 하고 있습니다.

본 응용 자료는 두 개의 HPLC 펌프와 적절한 액세서리를 사용한 시스템 구성으로 분석한 실제사례를 통해 비타민 B1 분석에 필요한 장비 구성과 결과 해석에 대한 이해를 돕기 위해 작성되었습니다.

## 실험

### 시약 및 표준물질

실험에 사용된 초산나트륨, 다카디아스타제, 삼염화초산, 제1인산나트륨, 페리시안화칼륨, 수산화나트륨 시약과 표준물질인 Thiamine hydrochloride은 Sigma-Aldrich에서 구매하였습니다.

### 시료 조제방법

- 1) Thiamine hydrochloride를 비타민 B1으로서 100µg/mL가 되도록 10% 삼염화초산용액에 녹여 표준원액으로 하였습니다.
- 2) 표준원액을 10% 삼염화초산용액으로 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0µg/mL로 희석하였습니다.
- 3) 농도별 표준액, 4M 초산나트륨용액, 2% 다카디아스타제 용액을 20 : 3 : 1의 비율로 혼합한 용액을 표준용액으로 하였습니다.

### 분석 조건 및 장비 구성

Agilent 1260 Infinity II HPLC 장비를 사용하였으며, 분석용 컬럼으로 Agilent Eclipse Plus C18, 4.6 x 250mm, 5µm를 사용하였습니다. 설정한 분석 조건 및 장비 구성은 각각 아래의 표 1, 2, 3과 그림 1과 같습니다.



그림 1. 비타민 B1 분석을 위한 Agilent Infinity II HPLC 시스템 도식도

그림 1의 장비 구성을 위해 필요한 장비 및 액세서리는 표 1과 같습니다.

표 1. Agilent HPLC 모듈 구성 및 추가 액세서리.

파라미터	값
펌프	1260 Infinity II Quaternary 펌프 × 2 (Active inlet valve 설치)
오토 샘플러	1260 Infinity II Vialsampler
컬럼	1260 Infinity II 멀티 컬럼 온도 조절 장치
검출기	1260 Infinity II 형광 검출기
캐필러리	Capillary stainless steel 0.17 x 400mm SI/SI ps/ps (p/n 5500-1245)
역류 방지 코일	Restriction capillary (ID 0.17mm× 3m, p/n G1362-87301)
Tee	Tee, Low dead volume (p/n 0100-1818)
반응 코일	Knitted delay coil (ID 0.5mm × 1m, p/n 5500-1341)
어댑터	Adapter, PEEK, 1/4-28 to 10-32 (p/n 0100-2298)

표 2. Agilent HPLC 분석 조건.

파라미터	값
분석 기기	Agilent 1260 Infinity II HPLC
주입량	10µL
컬럼	Eclipse Plus C18, 4.6 x 250mm, 5µm
컬럼 온도	40 °C
이동상	0.1M 제1인산나트륨 수용액
검출기 파장	여기 파장 : 375nm, 측정 파장 : 450nm
유량	0.7mL/분
반응액	0.01% 페리시안화칼륨·15%(w/v)수산화나트륨 용액 (유속 : 0.7mL/분)

HPLC 시스템은 두 개의 펌프를 사용합니다. 펌프 A는 이동상인 0.1M 제1인산나트륨 수용액을 흘려주고, 펌프 B는 반응액인 0.01% 페리시안화칼륨·15%(w/v) 수산화나트륨 용액을 흘려줍니다. 이 두 용액은 Tee에서 시료와 함께 섞이며, 반응 코일에서 Thiamine hydrochloride를 티오크롬으로 환원시킨 뒤 검출기로 이동됩니다.

## 결과

### 비타민 B1 피크 최적화

비타민 B1 피크 머무름 시간 확인을 위해 펌프 A와 펌프 B를 각각 0.7mL/분으로 설정하여 1ppm의 표준액을 측정했습니다. 표준액에서는 약 14-16분 범위에서 환원된 티오크롬 형태의 비타민 B1 피크가 관찰되었습니다.

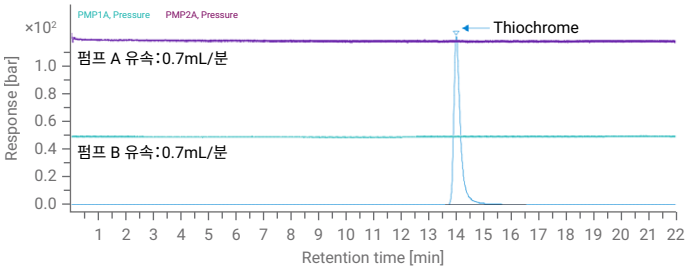


그림 2. 비타민 B1 1 ppm의 펌프 B 유속 조건 변경 전

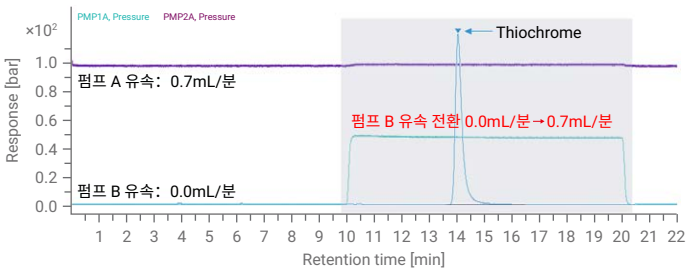


그림 3. 비타민 B1 1ppm의 펌프 B 유속 조건 변경 후

그림 2를 기반으로 고농도의 염을 함유한 반응액의 소모를 최소화하기 위해 표 3과 같이 0-10분과 20-22분 구간에서 펌프 B의 유속을 0mL/분으로 설정하고, 10-20분 구간에서는 펌프 B의 유속을 0mL/분에서 0.7mL/분으로 조절하였습니다. 해당 조건은 비타민 B1 피크 머무름 시간을 정확하게 확인하고 반응액의 소모를 최소화하는데 도움이 됩니다.

표 3. 펌프 이동상 조건.

파라미터	시간(분)	유속(mL/분)
펌프 A	0	0.7
	22	0.7
펌프 B	0	0
	10	0
	10.1	0.7
	20	0.7
	20.1	0
	22	0

### 직선성

비타민 B1 분석에 대한 직선성을 확인하기 위하여 표준액 0.01-1.0ppm를 분석한 결과, r<sup>2</sup>값이 0.9998로 높은 직선성을 나타냈습니다.

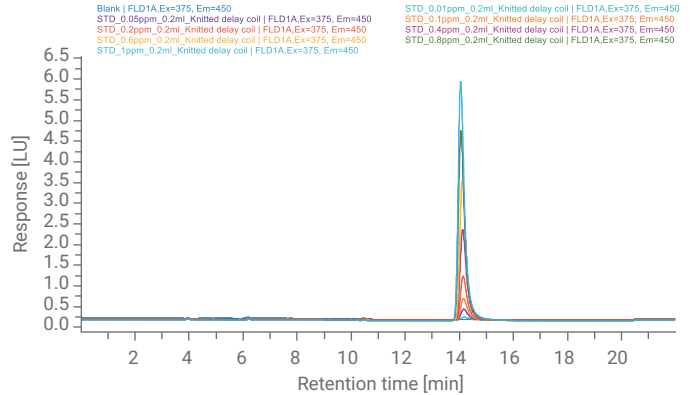


그림 4. 비타민 B1 표준액 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 1.0ppm의 크로마토그램 겹쳐보기

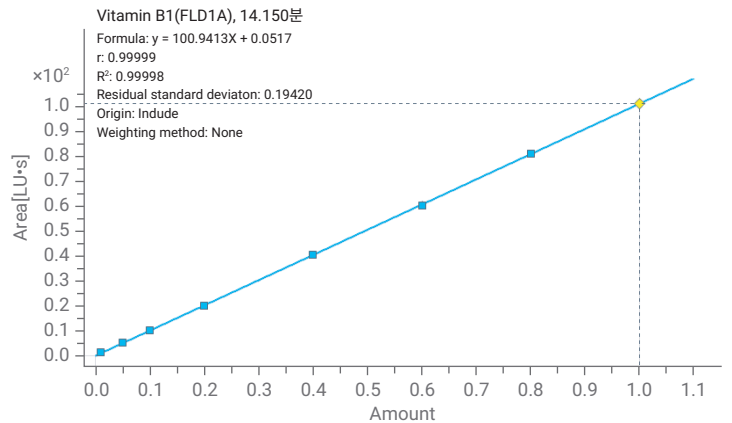


그림 5. 비타민 B1 표준액 0.01-1.0ppm의 검량선

## 반복성

비타민 B1 표준액 0.6ppm을 6회 반복 시험한 결과 피크면적의 상대 표준편차가 0.19%로 반복성이 확인되었습니다.

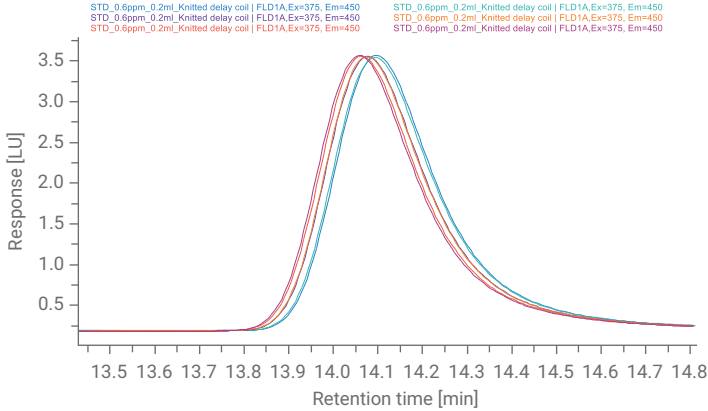


그림 6. 비타민 B1 표준액 0.6ppm의 반복성 크로마토그램

표 4. 비타민 B1 표준액 0.6ppm의 반복성 결과.

번호	피크 머무름 시간(분)	피크 면적(LU·s)
1	14.098	60.326
2	14.094	60.376
3	14.078	60.293
4	14.076	60.138
5	14.064	60.141
6	14.059	60.113
평균	14.078	60.231
상대 표준편차(%)	0.110	0.189

## 결론 및 고찰

두개의 펌프로 구성된 Agilent Infinity II HPLC의 시스템과 액세서리를 사용하여 건강기능식품공전의 비타민 B1 제2법 액체 크로마토그래피 분석법을 시험하였습니다. 펌프 A에서 공급된 이동상에 의해 컬럼에서 용리된 비타민 B1이 펌프 B에서 공급된 반응액과 Tee에서 혼합되어 반응 코일에서 티오크롬으로 환원됩니다. 이때 펌프 B의 유속을 비타민 B1 피크가 관측되는 구간에서는 0.7mL/분으로, 그 외 구간에서는 0mL/분으로 조절하여 반응액의 소모를 최소화하였습니다.

0.01-1.0ppm의 표준액에 대한 직선성은  $r^2$  이 0.9998을, 0.6ppm 표준액의 반복성은 상대 표준편차 0.19%를 나타내어 미량 분석임에도 불구하고 훌륭한 직선성과 반복성을 나타냈습니다.

결과적으로, Agilent Infinity II HPLC와 추가 액세서리를 이용하여 건강기능식품공전의 비타민 B1 제2법 분석을 재현할 수 있었으며, 펌프 B의 유속 조절로 반응액의 소모를 최소화하는데 도움이 될 수 있을 것으로 예상됩니다.

## 주문 정보

설명	부품 번호
Capillary stainless steel 0.17 x 400 mm SI/SI ps/ps	5500-1245
Restriction capillary (ID 0.17 mm× 3 m)	G1362-87301
Tee, Low dead volume	0100-1818
Knitted delay coil (ID 0.5 mm × 1 m)	5500-1341
Adapter, PEEK, 1/4-28 to 10-32	0100-2298

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

DE65589954

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2024  
2024년 6월 26일, 한국에서 발행  
5994-7526KO

한국애질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

