

포괄적 2차원 가스 크로마토그래피 (GC × GC)와 고분해능 질량 분석기를 이용한 에센셜 오일 분석



저자

Nick Harden, Sofia Nieto,
Scott Hoy, Kai Chen 및
Matthew Curtis
Agilent Technologies, Inc.

개요

에센셜 오일과 같은 복잡한 시료의 분석은 포괄적 2차원 가스 크로마토그래피(GC × GC)를 활용하는 경우 상당한 이점을 얻을 수 있습니다. 두 번째 차원이 추가된 만큼 높은 수준의 크로마토그래피 분리가 제공됩니다. GC × GC를 고분해능 accurate mass 측정과 결합하면 식별 가능한 성분 수가 늘어나고 결과에 대한 신뢰도가 높아집니다.

본 연구에서는 Reverse Flow Modulator(RFM)와 고분해능 Quadrupole Time-of-Flight (GC/Q-TOF) 질량 분석기를 결합한 GC × GC를 사용하여 에센셜 오일을 분석하는 워크플로를 수립합니다.

소개

에센셜 오일은 일반적으로 풍미, 향기 및 품질에 영향을 미치는 화학적 성분을 파악하기 위해 분석합니다. 또한, 이러한 분석은 진위 여부를 평가하고 혼입 물질을 식별하는데 도움을 줍니다. 에센셜 오일은 식물에서 종류나 저온 압착을 통해 얻은 휘발성 및 준휘발성 성분의 복잡한 혼합물입니다.¹ 여기에는 종종 매우 유사한 질량 스펙트럼과 근접한 머무름 지수(RI)를 갖는 이성질체가 자주 포함됩니다. 따라서 단일 컬럼에서 에센셜 오일을 분리하는 것만으로는 개별 성분을 식별하기에 충분하지 않을 수 있습니다. 에센셜 오일의 조성이 복잡하기 때문에 높은 선택성의 첨단 크로마토그래피 기술에 대한 수요가 끊임없이 생겨나고 있습니다. 따라서 이 시료 매트릭스에 대한 적절한 크로마토그래피 분리를 위해서는 GC × GC 접근법이 적합합니다.

GC × GC에서는 1차 컬럼의 용출액을 모아서 선택성이 다른 2차 컬럼에 재주입하여 보완적인 분리를 수행합니다. 이를 위해 두 컬럼 사이에 위치한 modulator가 사용됩니다. GC × GC 분리에 사용되는 modulator는 일반적으로 열 혹은 유량 기반입니다. 이론적으로는, 첫 번째 차원의 각 크로마토그래피 피크를 3회 이상 샘플링하여 두 번째 차원에서 빠르게 분리해야 합니다.² 따라서 고품질 스펙트럼을 유지하면서도 빠른 데이터 수집 속도를 제공하는 TOF 분석기는 GC × GC 분리 기술과 결합할 때 가장 적합한 질량분석기입니다. 반면, 스캐닝 방식의 질량 분석기가 일반적으로 20Hz 근처인 최고 속도로 데이터를 수집하는 경우 스펙트럼 왜곡으로 인해 라이브러리 매칭이 제대로 이루어지지 않을 수 있습니다.

유량 조절은 극저온 냉매를 사용하지 않고 GC × GC 분리를 가능하게 하는 비용 효율적인 기술입니다. RFM은 일반적으로 불꽃 이온화 검출기(FID)와 결합되며, 탄화수소와 폴리머 분석은 물론 향미료와 향수 응용 분야 등에서도 자주 사용됩니다.³ RFM을 MS 검출기와 결합하면 더욱 간소하고 확실한 화합물 식별이 가능합니다. 그러나 이 기술은 일반적으로 1-2mL/분 범위인 MS의 최적 운반 가스 유량 제약으로 인해 상당한 어려움을 제기시킵니다.

본 연구의 주요 목표는 RFM과 고분해능 accurate mass GC/Q-TOF 시스템을 결합한 GC × GC 분석법을 사용하여 에센셜 오일을 분석하는 워크플로를 개발하는 것입니다. 처음에 이 GC × GC 분석법의 개발과 최적화에는 복잡하지만 잘 연구된 시료인 디젤이 사용되었습니다. 복잡한 GC × GC 에센셜 오일 데이터를 비교하기 위한 통계 분석 및 접근 방식도 조사되었습니다.

실험

데이터 수집

RFM이 장착된 GC × GC 구성을 사용하여 Agilent 8890 GC에서 시료를 분리하고 고분해능 accurate mass Agilent 7250 GC/Q-TOF MS와 FID를 사용하여 분석했습니다. 비극성 1차 컬럼과 극성 2차 컬럼을 결합한 “일반” 컬럼 세트가 사용되었습니다. 이 세트는 20m × 0.1mm, 0.1µm Agilent DB-1ms 컬럼(100% dimethylpolysiloxane)과 5m × 0.25mm, 0.15µm Agilent DB-17ms 컬럼((50%-phenyl)-methylpolysiloxane과 동일)으로 구성되었습니다.

MS로의 유량을 줄이고 구성에 FID를 두 번째 검출기로 추가하려면 2차 컬럼 끝부분에서 분할기에 연결하여 컬럼 유량을 분할해야 합니다. 퍼지형과 비퍼지형의 두 가지 분할기 유형을 살펴보고 각 구성의 이점과 한계를 살펴보았습니다. 퍼지형 분할기의 경우, 두 개의 검출기 사이에서 분할되기 전에 컬럼 유량이 보조 유량과 혼합됩니다. 이와 대조적으로, 비퍼지형 분할기는 두 개의 검출기에 연결된 두 제한기 사이에서 컬럼 유출물을 분할할 때 보조 유량을 사용하지 않습니다. 분석법 최적화 및 문제해결을 위해 두 번째 FID(모니터 또는 벤트) 채널이 추가되었습니다.

수집 소프트웨어에서 설정이 더 간단하여 선호되는 퍼지형 분할기 구성을 사용할 때의 최적화된 기기 파라미터를 표 1에 나타내었습니다.

표 1. 데이터 수집 파라미터.

파라미터	값
MS	Agilent 7250 GC/Q-TOF 시스템
GC	Agilent 8890 GC 시스템
주입구/라이너	MMI, 애질런트 5190-2294: 990µL (분할, 직선형, 유리송, Ultra Inert)
주입 모드	분할: 250:1
주입량	0.5µL
주입구 온도	300°C
컬럼 1 치수 및 유량	Agilent DB-1ms, 20m × 0.1mm, 0.1µm(127-0122); 0.2mL/분
컬럼 2 치수 및 유량	Agilent DB-17ms, 5m × 0.25mm, 0.15µm(122-4711); 10mL/분
제한기-Modulator(벤트) FID	애질런트 비활성화 용융 실리카; 0.4m × 0.05mm(160-2655-1)
Q-TOF 및 유량에 퍼지형 분할기 제한기 연결	애질런트 비활성화 용융 실리카; 0.6m × 0.12mm(CP801206); 1.3mL/분
검출기 FID에 퍼지형 분할기 제한기 연결	애질런트 비활성화 용융 실리카; 1.05m × 0.25mm(CP802505)
변조 지연	0.51분
변조 주기	5.1초
주입 시간	0.125초
운반 가스	헬륨
오븐 온도 프로그램	1분 동안 45°C; 3°C/분의 속도로 285°C까지 승온, 3분 유지
이송 라인 온도	305°C
이온화원 온도	300°C
사중극자 온도	150°C
충돌 셀 가스 유량	N ₂ , 1mL/분 + He, 4mL/분
전자 에너지	70eV
방출 전류	5µA
스펙트럼 수집 속도	50Hz
질량 범위	m/z 45 - 650
FID 온도	300°C
FID H ₂ 유량	30mL/분
FID 공기 유량	400mL/분
FID 보조 유량(N ₂)	검출기 FID: 15mL/분 모니터(벤트) FID: 25mL/분

데이터 처리

고분해능 7250 GC/Q-TOF 시스템을 사용하여 50Hz의 데이터 속도로 데이터를 수집했습니다. 화합물 식별을 위해 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 버전 12.1의 Unknowns Analysis 와 GC Image 소프트웨어 버전 2024 R1을 NIST23 EI 라이브러리와 함께 사용했습니다. 화합물 식별에 대한 신뢰도를 높이기 위해 선형 머무름 지수(LRI)를 사용했습니다. 통계 분석은 Agilent Mass Profiler Professional(MPP) 소프트웨어 버전 15.1에서 수행했습니다.

결과 및 토의

GC × GC 구성의 선택 및 최적화

GC × GC를 수행할 때 변조가 충분한 비율로 이루어지려면 두 번째 컬럼에서의 분리가 빨라야 합니다. 이를 위해 일반적으로 비교적 짧은 두 번째 컬럼을 사용하는데, GC × GC RFM 구성의 관점에서 이는 MS와 호환되지 않는 상당한 유량을 발생시킵니다. 따라서 MS와 FID 채널 사이의 2차 컬럼에서 나오는 유량을 분할하려면 퍼지형 분할기나 비퍼지형 분할기를 사용할 수 있습니다.

이러한 점 때문에 GC × GC RFM 분석법은 처음에 디젤 시료를 사용하여 개발 및 최적화되었습니다. MS로의 최적 운반 가스 유량을 보장하는 동시에 성분을 크로마토그래피적으로 충분히 분리하기 위해 다양한 컬럼 길이와 내부 직경을 갖는 여러 구성을 조사했습니다. 그림 1-4에 가장 실용적인 두 가지 구성이 설명되어 있습니다. 두 가지 접근 방식 모두 MS 외에 두 개의 FID 채널(벤트/모니터 및 검출기)을 사용합니다. RFM을 사용하여 GC × GC를 실행할 때는 모니터 FID 채널을 포함할 필요가 없지만 초기 분석법 설정, 최적화 및 문제해결에는 매우 중요합니다. 구체적으로, 설정에서 모니터 FID 채널을 구성하면 modulator 시료 루프의 과총전으로 인한 돌파를 감지할 수 있고, 이를 통해 컬럼/제한기 파라미터, 변조 및 주입 시간을 그에 적절하게 추가로 조정할 수 있습니다. RFM을 사용하여 GC × GC를 구성할 때 고려해야 할 또 다른 중요한 점은 MS 제한기의 일부는 오븐에 의해 가열되고, 다른 세그먼트는 이송 라인에 의해 가열된다는 것입니다. 각 세그먼트는 열원에 따라 구성해야 합니다. 이송 라인 온도와 MS로의 유량에 맞게 MS에 대한 제한기 치수를 선택해야 합니다. MS와 두 번째 검출기 사이의 유량을 분할할 때 MS로의 일정 유량을 유지해야 합니다. 올바르게 설정하면, MS와 두 번째 검출기 사이의 유량 분할비는 일정하고 오븐 온도 프로파일과 무관합니다. 비퍼지형 분할기를 사용한 구성은 그림 1에 나와 있습니다. 적절한 설정을 위해 MS 및 FID 검출기 제한기에서 생성된 것과 같은 역압을 갖는 대표적 복합 컬럼 2 배출구 세그먼트를 수집 소프트웨어에서 구성해야 합니다. 따라서 MS와 검출기 FID 제한기는 개별적으로 구성되지 않습니다.

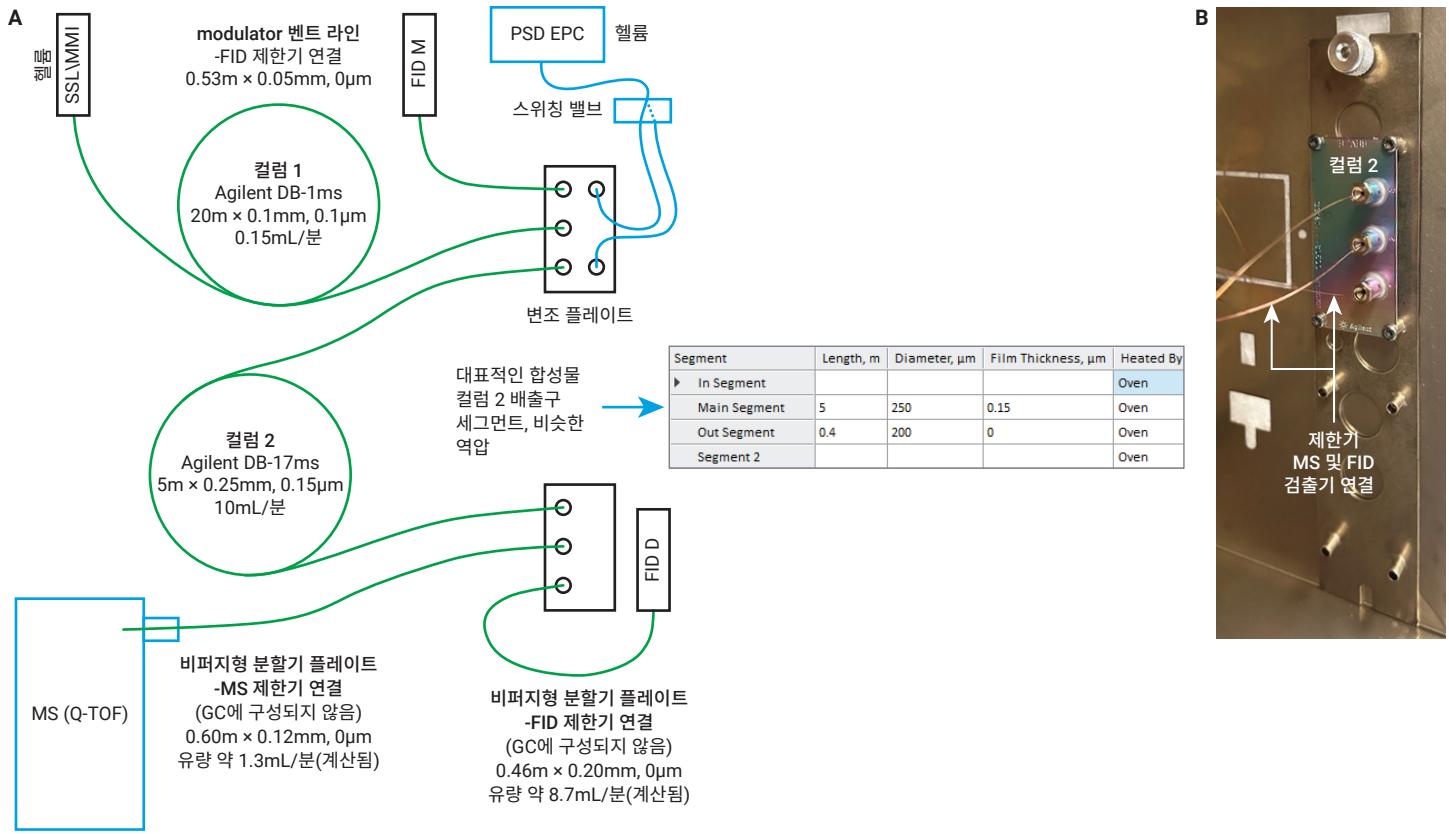


그림 1. 비퍼지형(2방향) 분할기를 사용한 GC × GC RFM 설정. (A) 비퍼지형 분할기 구성의 개략도. (B) 비퍼지형 분할기 플레이트의 사진. RFM은 GC 오븐의 반대쪽에 설치됩니다.

이 구성을 사용하여 얻은 디젤의 GC × GC 크로마토그램은 그림 2에 나와 있습니다. 이 분석법을 사용하면 일반적으로 디젤 지방족 물질의 분리가 우수하게 이루어집니다. 그러나 2.5°C/분의 느린 오븐 승온 속도로 인해 변조 주기가 6.3초이더라도 트리-방향족 화합물이 용리되지 않고 머물러 있었습니다.(다음 변조 주기까지 2차 컬럼에서 용출되지 않음).

퍼지형 분할기를 사용한 구성은 그림 3에 나와 있습니다. MS, 벤트 및 검출기 FID를 포함하여 이 설정에 사용된 세 가지 제한기를 모두 수집 method에서 구성해야 합니다.

퍼지형 분할기 구성은 그림 4에 나와 있습니다. 이 3방향 분할기 구성에서는 모노-, 디-, 트리-방향족 화합물을 물론 파라핀과 나프텐을 포함한 디젤 탄화수소의 분리도 탁월하게 이루어졌습니다. 4.5°C/분의 빠른 오븐 승온 속도를 사용했을 때는 트리-방향족 화합물에서 상당한 wraparound가 관찰되지 않았습니다.

모니터 FID 채널은 퍼지형 분할기와 비퍼지형 분할기 방식 모두에서 피크를 나타내지 않아 modulator 구성이 적절함을 보여주었습니다. 3방향 분할기 구성에 대해 깨끗한 FID 채널을 보여주는 예가 나와 있습니다(그림 5).

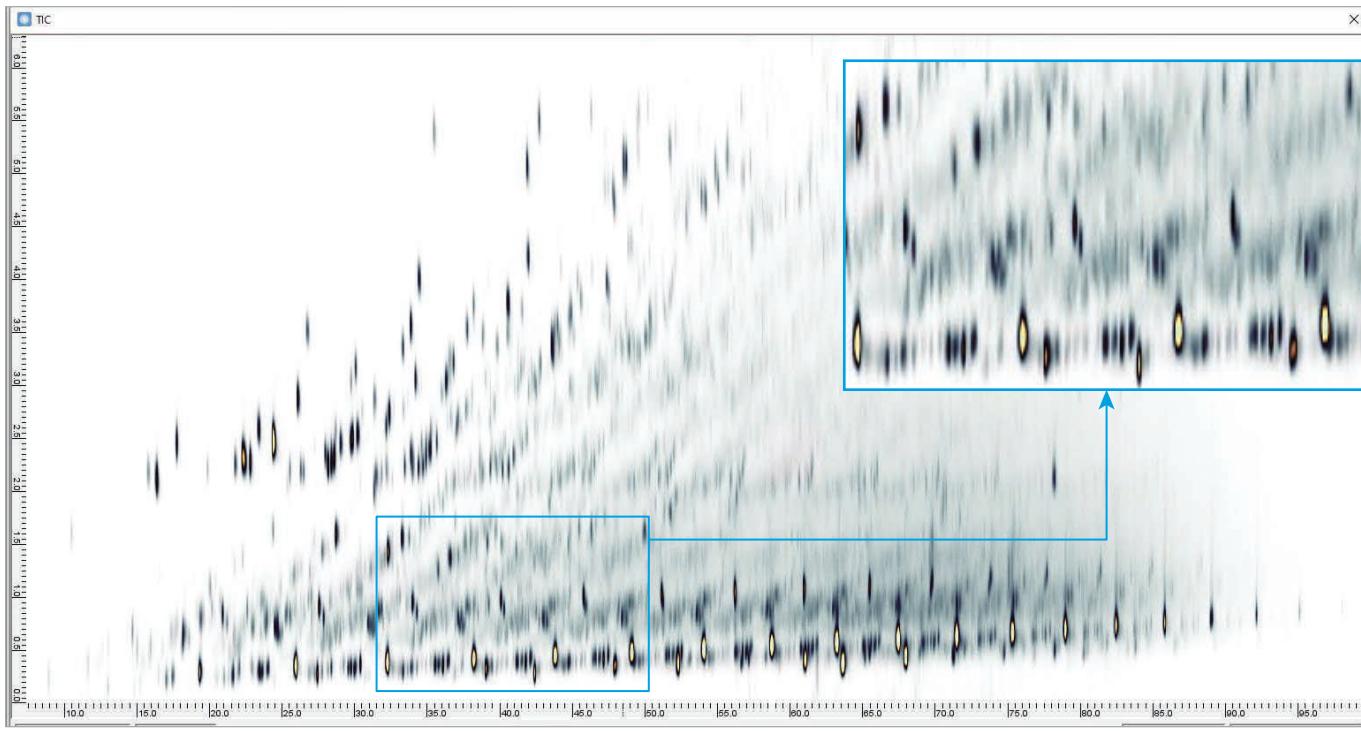


그림 2. 비퍼지형 분할기 설정을 사용한 디젤 분리. 변조 주기는 6.3초이고, 오븐 온도는 6분 동안 40°C, 승온 속도는 2.5°C/분이었습니다.

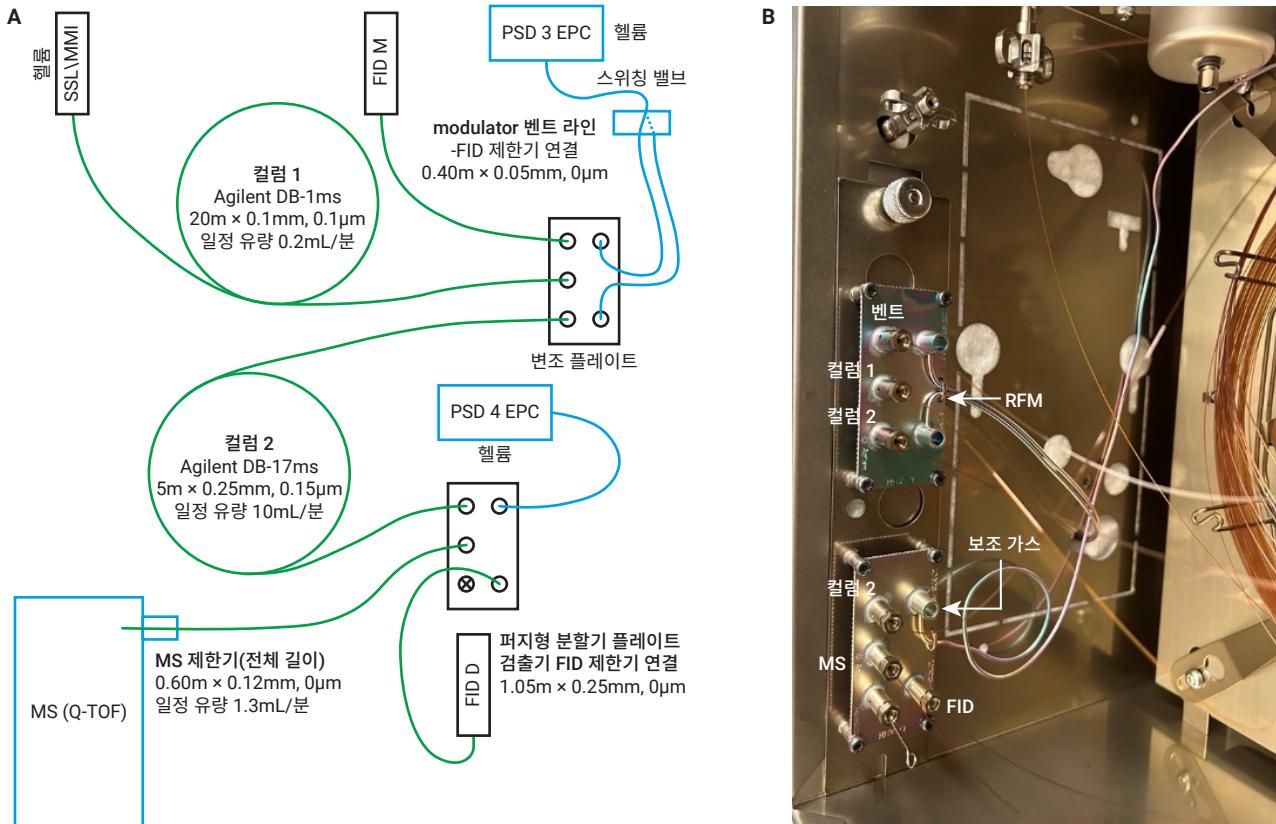


그림 3. 퍼지형 분할기를 사용한 GC × GC RFM 설정. (A) 퍼지형(3방향) 분할기 구성을 사용할 때의 GC × GC 개략도. (B) 퍼지형 분할기와 reverse flow modulator 플레이트가 장착된 GC 오븐을 보여주는 사진.

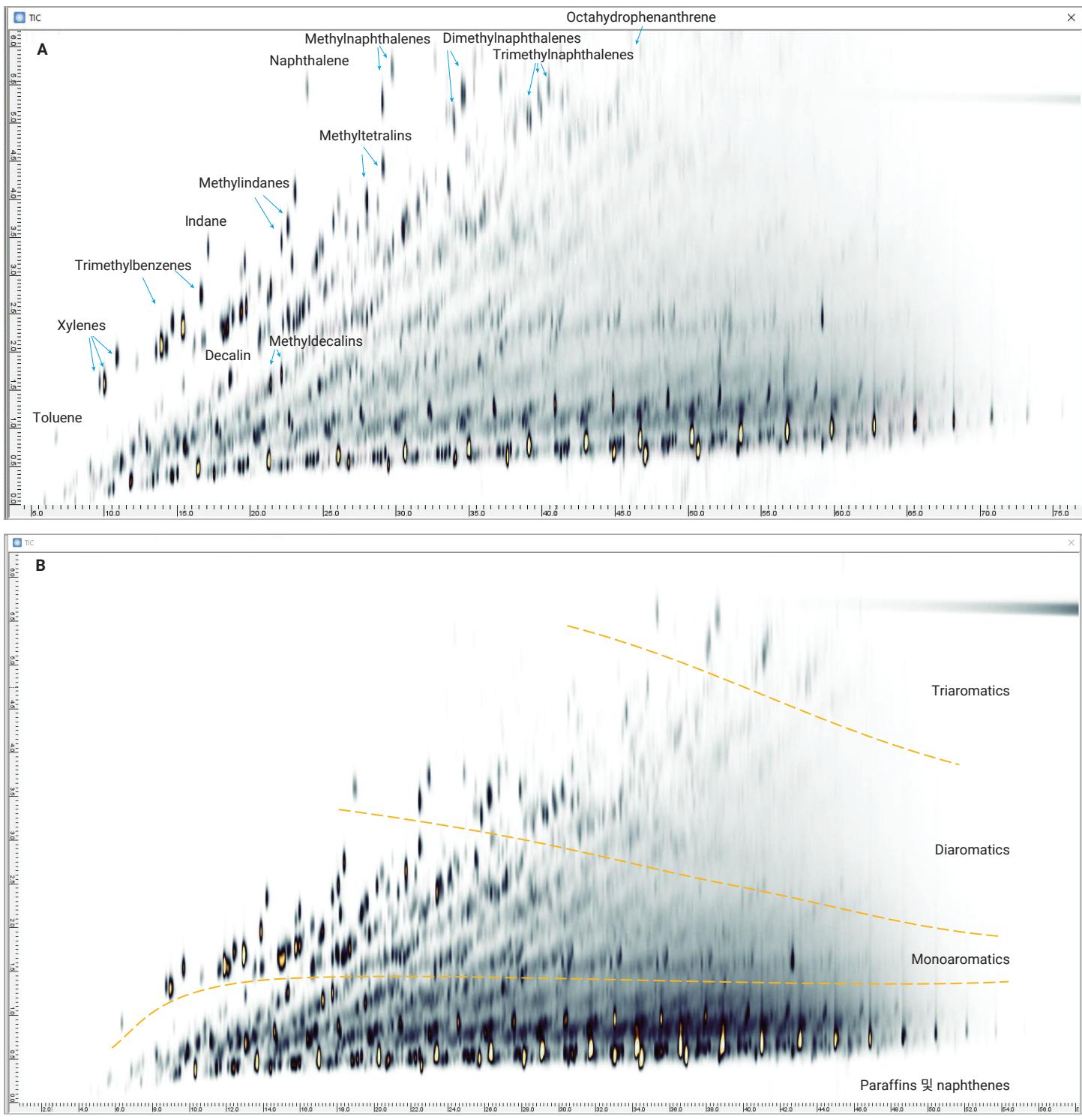


그림 4. 퍼지형 분할기 설정을 사용한 디젤 분리. 변조 주기는 6.3초이고 오븐 승온 속도는 (A) 3°C/분, (B) 4.5°C/분이었습니다.

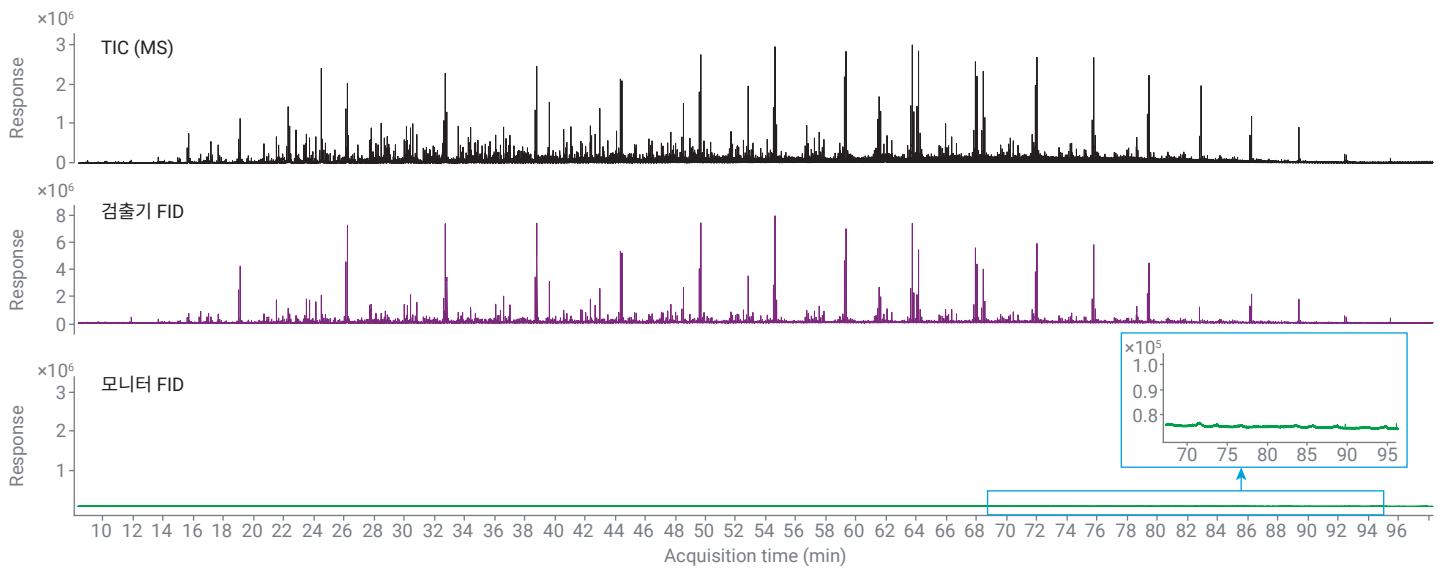


그림 5. GC/Q-TOF MS 채널의 디젤 총 이온 크로마토그램(TIC)과 최종 검출기 및 모니터 FID 채널의 FID 신호를 보여주는 예입니다.

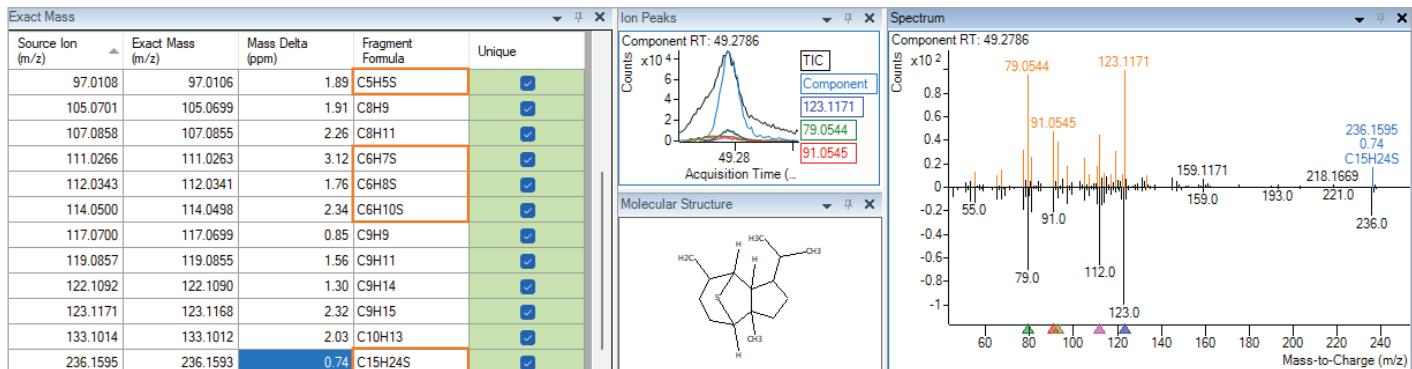
에센셜 오일의 성분을 결정하고 비교하기 위한 워크플로

생강과 주니퍼베리 에센셜 오일(Sigma-Aldrich에서 구입)을 비파지형 분할기와 퍼지형 분할기를 갖춘 GC × GC RFM 구성으로 사용하여 GC/Q-TOF 시스템에서 분석했습니다. 두 방식 모두 GC × GC 분리 결과가 비슷했습니다. 에센셜 오일의 화학적 조성을 결정하기 위해 LRI 매칭을 갖춘 NIST23 라이브러리를 사용하여 Unknowns Analysis 소프트웨어로 화합물을 식별했습니다.

화합물 식별의 신뢰도를 더욱 높이기 위해 Unknowns Analysis의 ExactMass를 사용했습니다. ExactMass는 가능한 경우 라이브러리 검색 결과를 기반으로 화학식을 사용하여 deconvoluted 스펙트럼에서 accurate mass 조각을 작은 질량 오차 범위 내에서 할당했습니다. 이러한 접근 방식은 해당 결과 확인하거나, 위양성이 발생한 경우 화합물 ID를 배제하는 데 도움이 됩니다(그림 6).

A α-Mint sulfide

Library match score: 90.4, RI Δ 13, m/z match ✓



B n-Propylcyclohexane
Library match score: 78.2, RI Δ 5, m/z mismatch

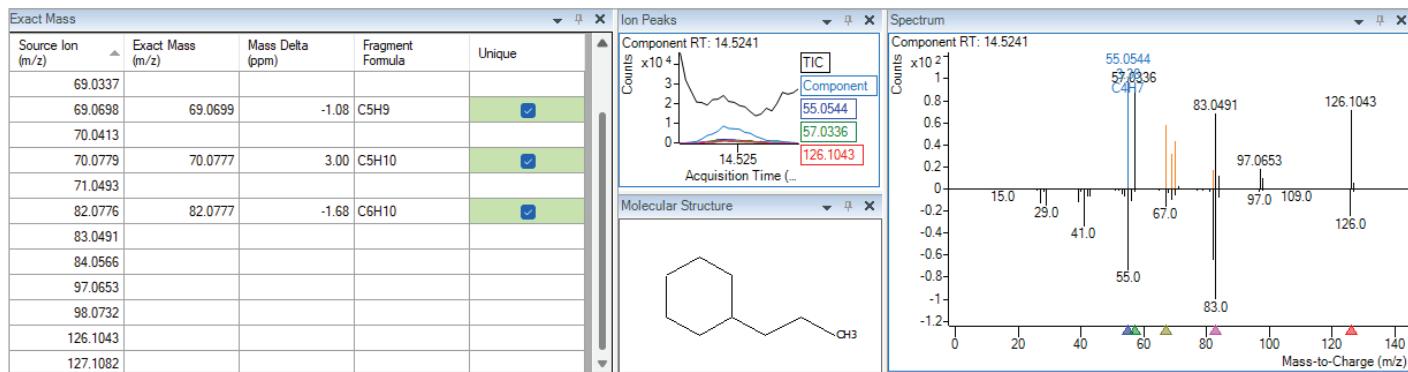


그림 6. Accurate mass 정보를 사용하여 Unknowns Analysis 소프트웨어에서 화합물 ID를 확인합니다. Unknowns Analysis 소프트웨어에서 사용할 수 있는 ExactMass는 (A) 라이브러리 검색 결과를 확인하거나 (B) 배제합니다. 이러한 결정은 라이브러리 검색 결과의 원소 조성을 고려하여 스펙트럼에서 가장 특이적인 accurate mass 조각 이온에 화학식을 할당할 수 있는지 여부에 따라 이루어집니다. 패널 A의 주황색 사각형은 헤테로원자 황을 포함하는 조각 화학식 주석을 나타냅니다.

몇몇 조각 화학식 주석(그림 6A에 표시된 라이브러리 검색 결과에 대해 주황색 사각형으로 강조 표시됨)에는 헤테로원자, 이 경우 황이 포함되어 있습니다. 할당된 조각 화학식에 헤테로원자가 존재한다는 것은 화합물의 식별된 원소 조성이 정확할 가능성이 높다는 또 다른 중요한 지표입니다.

2D 플롯에 화합물의 화학적 분류를 맵핑함으로써 에센셜 오일의 화합물 식별이 더욱 용이해졌습니다. GC Image 소프트웨어를 사용하여 GC × GC 데이터를 시각적으로 나타내었습니다(그림 7). 그림 7A에서 보인 것처럼, 화합물 부류는 2D 플롯에서 명확히 구분되어 있으며, 1차원과 2차원의 특정 좌표(머무름 시간)는 화합물 구조에 대한 추가적 단서를 제공하는 데 도움이 됩니다.

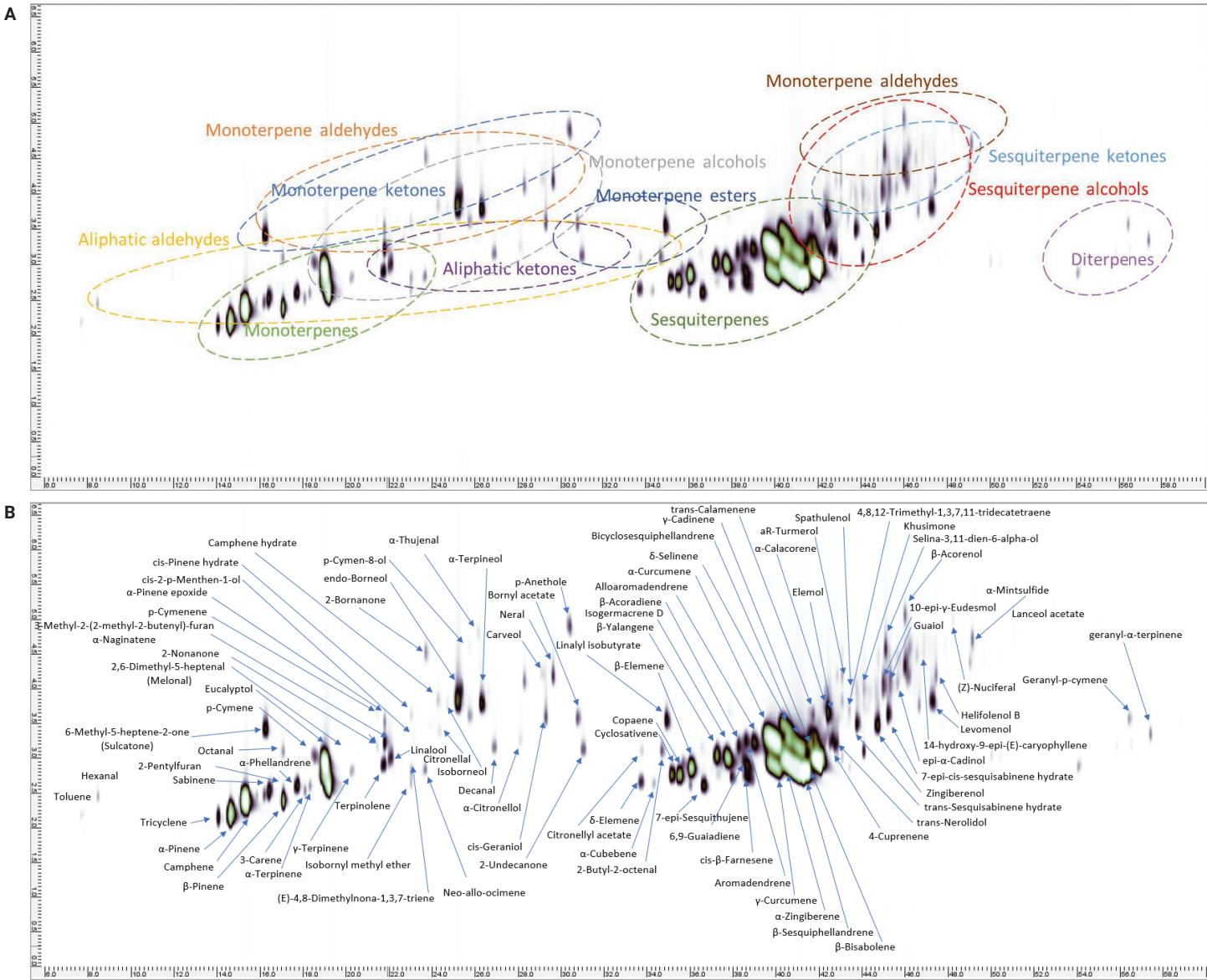


그림 7. (A) 화합물 부류 및 (B) 생강 오일 시료의 2D 크로마토그램에 매핑된 개별 성분. 변조 주기는 6.7초이고 오븐 승온 속도는 2.5°C/분이었습니다.

2D 크로마토그램에서는 동일한 수직선에 정렬된 화합물이 1차원에서 공동 용출됩니다. 따라서 2차원에서 추가적인 크로마토그래피 분리를 수행하지 않거나 다른 극성 컬럼을 사용하지 않으면 이러한 화합물을 정확하게 식별하는 것이 어려울 것입니다.

이러한 경우의 예가 그림 8에 설명되어 있는데, 이는 세 가지 테르페노이드(동일한 변조 주기)를 2차원에서 분리한 것과 deconvoluted 스펙트럼을 보여주며, 이를 통해 신뢰할 수 있는 라이브러리 매칭 결과를 얻을 수 있습니다.

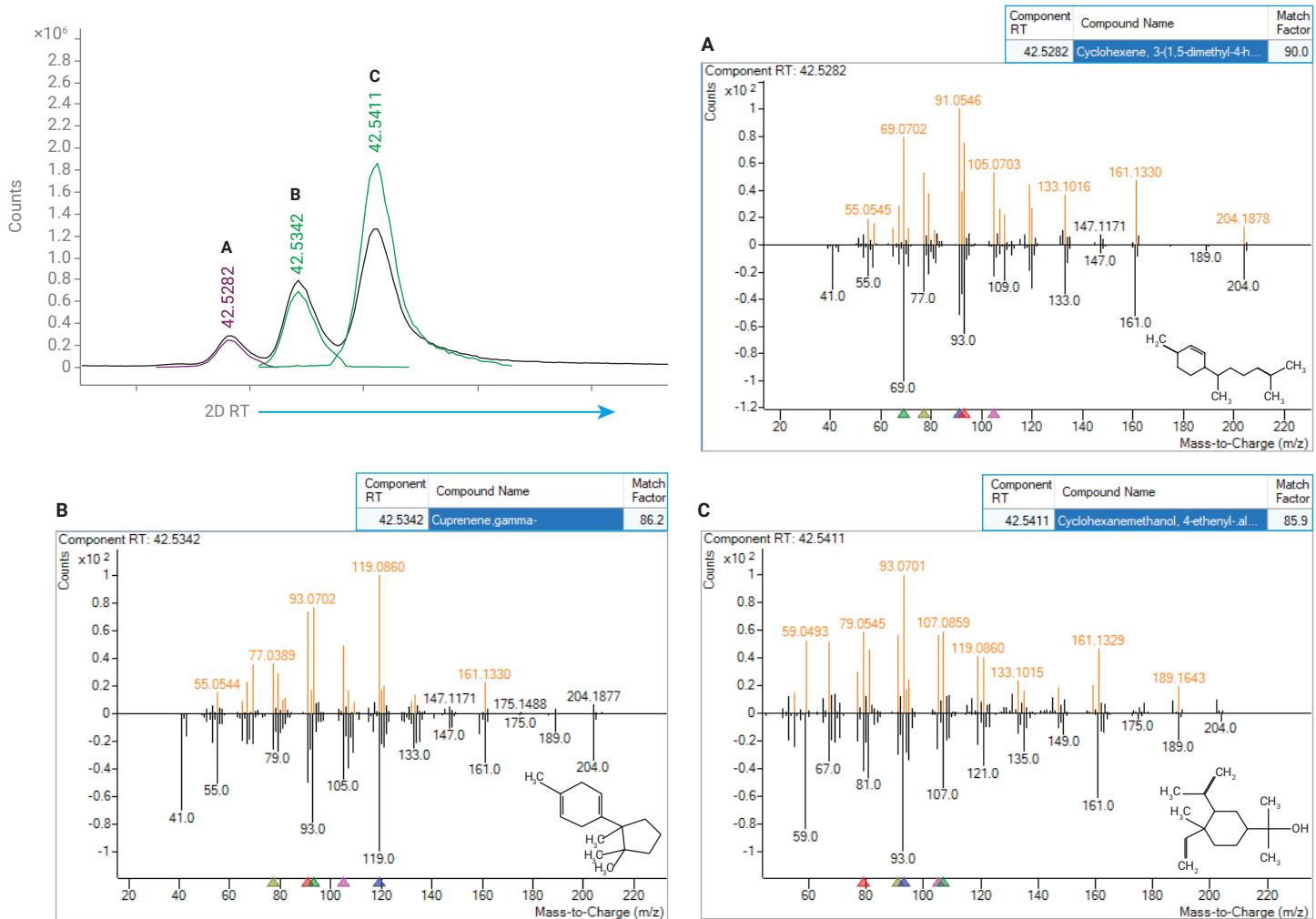


그림 8. 2차원에서 동일한 변조를 통해 생강 오일 테르페노이드(A, B 및 C)를 분리했습니다.

에센셜 오일 시료에서 확인된 화합물 부류에는 지방족 알데하이드와 케톤, 모노테르펜과 모노테르펜 알데하이드, 케톤, 알코올과 에스테르, 세스퀴테르펜 및 세스퀴테르펜 알코올과 케톤, 그리고 디테르펜이 포함되었습니다.

현재의 접근 방식은 한 번의 실험에서 주요 에센셜 오일 성분 (예: alpha-zingiberene)뿐만 아니라 소수의 미량 성분 (예: alpha-mintsulfide)도 정확하게 식별할 수 있게 해줍니다.

GC × GC 기술의 분리 능력은 통계적 분석을 개선하는 데 도움이 될 수 있지만, 두 번째 차원이 존재하기 때문에 데이터 처리의 복잡성이 한층 높아집니다. 통계 분석을 수행하기 위해 화합물

주석을 Unknowns Analysis 소프트웨어에서 화합물 교환 형식 (CEF) 파일로 내보내어 MPP 소프트웨어로 가져왔습니다.

동일한 성분 피크에 걸쳐 여러 번의 변조로 생성된 중복된 성분 ID는 MPP의 정렬 과정에서 자동으로 병합됩니다.

생강과 주니퍼베리 오일의 성분을 비교하기 위해 주성분 분석 (PCA) 플롯을 사용하여 시료 그룹을 평가했습니다(그림 9). 생강과 주니퍼베리 오일 시료는 뚜렷한 클러스터링을 보여줍니다.

그림 10의 volcano 플롯은 약 150개의 식별된 화합물이 생강과 주니퍼베리 오일 사이에서 상당히 다른 수준으로 발견되었음을 보여줍니다.

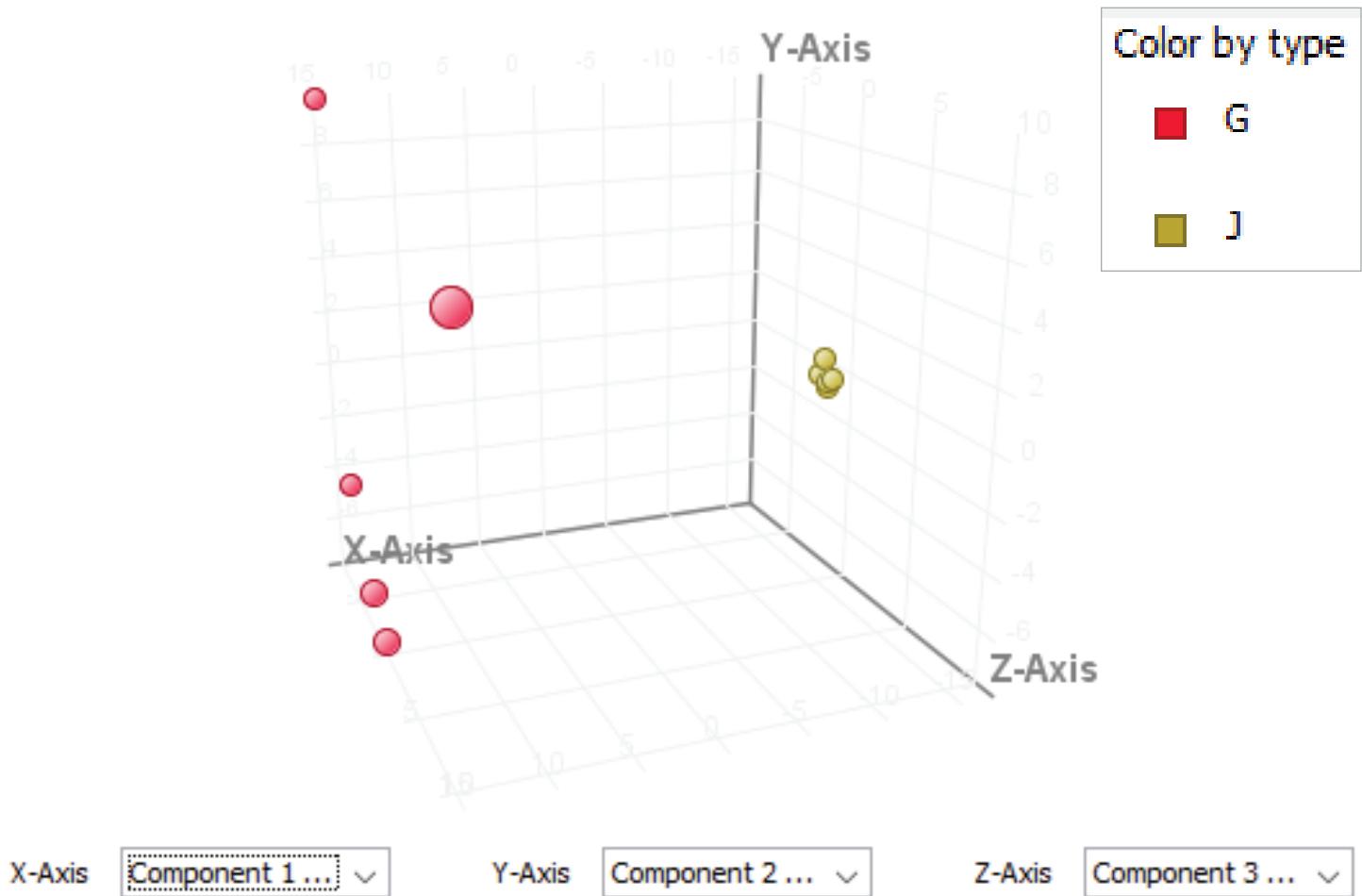


그림 9. 생강(G)과 주니퍼베리(J) 오일 시료의 명확한 클러스터링을 보여주는 PCA 플롯.

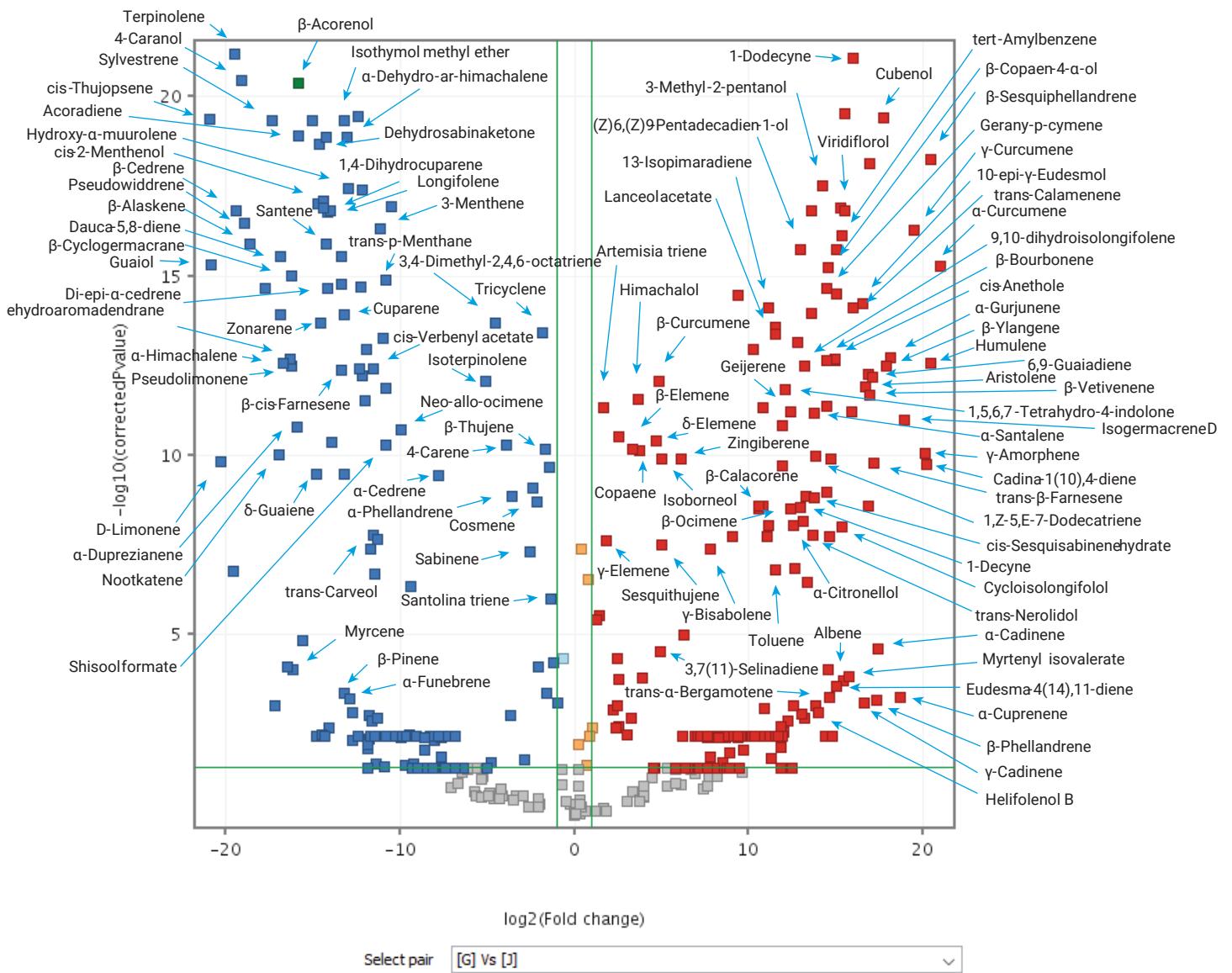


그림 10. 생강과 주니퍼베리 오일의 성분을 비교하는 volcano 플롯으로, 폴드 변화 임계값 2와 p-value 임계값 0.05가 사용되었습니다.

결론

이 응용 자료에서는 역류 변조기(RFM)와 고분해능 Agilent 7250 GC/Q-TOF 시스템을 갖춘 몇몇 포괄적 GC × GC 구성을 사용하여 에센셜 오일을 분석하는 방법을 개발했습니다. 디젤 시료를 사용하여 분석법 최적화를 수행했습니다. GC × GC로 분리된 에센셜 오일 성분은 Unknowns Analysis 소프트웨어를 사용하여 높은 신뢰도로 식별되었습니다. Agilent Mass Profiler Professional(MPP) 소프트웨어를 사용하여 에센셜 오일 간의 화학적 조성 차이를 성공적으로 확인했습니다.

참고 자료

1. International Organization for Standardization. ISO 9235:2013, Aromatic Natural Raw Materials - Vocabulary; ISO: Geneva, Switzerland, 2013. <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:9235:ed-3:v1:en>.
2. Murphy, R. E.; Schure, M. R.; Foley, J. P. Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1998**, 70(8). DOI: 10.1021/ac971184b.
3. Agilent Reversed Flow Modulator. Capillary Flow Technology; Agilent Technologies technical overview, publication number **5994-0157EN**, 2018.

감사의 글

이 응용 자료 제작에 사용된 GC Image GCxGC Edition 소프트웨어를 제공해 준 GC Image, LLC에 감사의 말을 전합니다.

www.agilent.com

DE-003420

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025
2025년 1월 30일 한국에서 발행
5994-8029KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
DFT타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

