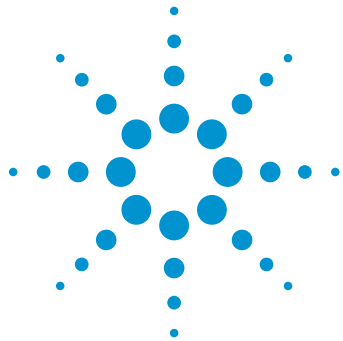




가장 높은 정밀도 및 유연한 주입 부피를 갖춘 초임계 유체 크로마토그래피

Agilent 1260 Infinity II SFC 시스템의 Agilent 1260
Infinity II SFC Multisampler에 대한 성능 평가

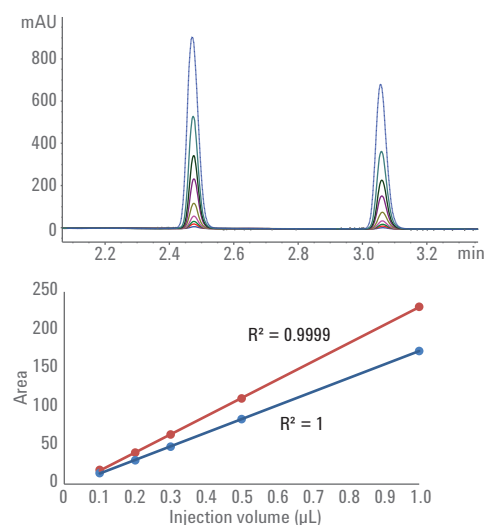
기술 개요

저자

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.
Waldbronn, Germany

개요

이 기술 개요는 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler에 사용되는 주입 원리에 대해 소개합니다. Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler에서, 시료량은 대기압 조건하에 통과하고, 시스템 압력으로 가압한 후 초고속 시린지 채취 및 주입(syringing) 과정을 통해 주입됩니다. 데이터는 1260 Infinity II SFC Multisampler가 넓은 시료량 범위에 걸쳐 가장 높은 정밀도 및 뛰어난 직선성을 갖춘 유연한 시료량 주입을 가능하게 하는 것을 보여줍니다.



Agilent Technologies

서론

샘플링 경로를 채운 이동상이 해를 끼치지 않도록 대기압을 통과하는 기존 HPLC 기기의 가변 시료 주입과 달리, SFC 기기는 고밀도 CO₂의 기화를 방지하기 위해 대기압 조건에서 샘플링 경로에 이동상을 사용하는 것을 피해야 합니다. 샘플링 경로에서의 CO₂ 기화는 시료의 완전한 손실 또는 불완전한 주입을 초래할 수 있습니다. 따라서 전에 채워진 루프가 가압된 CO₂ 스트림으로 전환하는 고정 루프 접근법이 SFC가 선택된 분석법으로 사용해 왔습니다. 이 접근법은 전체 루프 주입에서 우수한 피크 면적 정밀도를 제공할 수 있지만, 루프 과충전을 필요하기 때문에 시료 낭비를 일으킵니다. 부분 루프 채우기 모드를 사용할 때, 이는 복잡한 사용 과정이 필요하며 정밀도를 저하시킬 수 있습니다.

이 기술 개요는 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler에 사용되는 주입 원리에 대해 소개합니다. 루프 과충전으로 시료를 낭비하거나 부분 루프 주입에서 낮은 주입 정밀도를 제공하는 널리 사용되는 고정 루프 접근법과 달리, 1260 Infinity II SFC Multisampler는 가장 높은 정밀도로 유연한 시료량 주입을 가능하게 합니다. Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler에서 시료량은 대기압 조건하에 통과하고, 시스템 압력으로 가압한 후 초고속 시린지 채취 및 주입 (syringing) 과정을 통해 분석 유동 경로에 주입됩니다.

실험

기기

Agilent 1260 Infinity II SFC 시스템의 구성:

- Agilent 1260 Infinity II SFC 제어 모듈(G4301A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Binary 펌프(G4782A)
- Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler(G4767A)
- 고압 SFC 플로우 셀을 탑재한 Agilent 1260 Infinity II DAD(G7115A)
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A)

기기 설정

1260 Infinity II SFC Multisampler는 SFC 펌프 및 컬럼의 다운스트림과 직접 연결됩니다. 모든 필요한 플러싱 및 세척 단계는 공장에서 설치된 배관을 통해 수행합니다. 세척 및 피드 과정용 용매와 니들 세척용 용매, 총 2가지 용매만 연결하면 됩니다.

컬럼

Agilent ZORBAX Rx-Sil,
4.6 × 150mm, 5µm

소프트웨어

LC 및 LC/MS 시스템용 Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition, 개정판 C.01.07 SR3

시료

Caffeine 및 theobromine 용액
(각 250mg/L in methanol),
caffeine(0.5g/100mL in methanol),
theobromine(250mg/L in methanol).

화학물질

모든 용매는 Merck(독일)에서 구입하였습니다. 화학물질은 Sigma-Aldrich(독일)에서 구입하였습니다.

결과 및 토의

고정 루프 접근법은 최첨단 시료 주입 기술로 SFC 기기에서의 시료 주입에 사용됩니다. 이 접근법은 고정된 시료량을 높은 정밀도로 주입할 수 있지만, 부분 루프 채우기 모드로 주입한 시료량은 정밀도의 영향을 받을 수 있습니다. 액체 CO₂는 대기압에 노출될 수 없기에, HPLC 기기에서 시료 주입의 가변 루프 개념을 널리 사용할 수 없습니다. 이는 기화로 인한 부분적인 또는 완전한 시료 손실을 초래할 수 있습니다. 이러한 단점을 극복하기 위해, 1260 Infinity II SFC Multisampler는 Agilent 1260 Infinity II SFC 시스템에서 유연한 주입 원리를 도입하였습니다.

애질런트 피드-주입 기술은 시린지 채취 및 주입(syringing) 과정을 통해 컬럼 전의 CO₂ 스트림으로 주입된 가압 시료를 제공합니다. 시료를 추출하기 전에, 피드 용매로 퍼징하여 연결된 루프, 니들 및 시트를 세척하는 동시에 SFC 펌프를 컬럼에 연결합니다. 유연한 시료량을 취한 후, 루프 내에서 시스템 압력 수준까지 가압합니다. 시료를 포함한 가압된 루프는 분석 SFC 펌프의 CO₂ 스트림에 연결되고 컬럼으로 통합됩니다. 이 위치에서 시료는 가변 주입 속도(피드 속도)로 시린지 채취 및 주입(syringing) 과정을 통해 주입될 수 있습니다. 전체 시료를 루프에서 플러시하기 위해 과충전된 시료량(과충전 부피)을 정의할 수 있습니다.

SFC 분석

파라미터	값
용매 A	CO ₂
용매 B	Methanol
SFC 유속	2.5mL/분
등용매 용출	12%B
정지 시간	6분
그라디언트 용출	4분 후 5~35%B
정지 시간	6분
사후 시간	2분
대용량 주입의 그라디언트	0~1분 – 1%B 1.1분 – 5%B 4분 – 35%B
정지 시간	6분
사후 시간	2분
역압 조절기(BPR) 온도	60°C
BPR 압력	130bar
컬럼 온도	40°C
주입 부피	0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0μL
대용량 주입	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80μL
피드 용매	Methanol
과충전 부피	4μL
피드 속도	400μL/분(최대 10μL 주입) 및 대용량 주입의 경우(>10μL) 100μL/분
니들 세척	Methanol에서 3초
검출	272nm/대역폭 4nm; 표준 360nm/대역폭 100nm; 표준 고압 SFC 플로우 셀; 데이터 속도 10Hz

주입을 제어하는 두 기기 파라미터는 피드 속도와 과충전 부피입니다. 표준 주입(0.1~10 μ L)에서 피드 속도는 피크 넓어짐 현상을 방지하기 위해 일반적으로 100 μ L/분(기본값은 400 μ L/분, 최대 1,000 μ L/분)보다 높아야 합니다. 보다 낮은 피드 속도는 주입을 초기 등용매 단계에 트래핑할 때 사용될 수 있습니다. 시료 손실 가능성을 제거하기 위해, 과충전 부피는 2 μ L 이상이어야 합니다(기본값은 4 μ L). 보다 높은 값은 점성 화합물 또는 Heavy-matrix 로딩 시료를 플러시하는 데에 사용될 수 있습니다. 애질런트 기술 개요에서 이러한 파라미터가 크로마토그래피 성능에 미치는 영향을 더 자세히 소개하였습니다¹.

1260 Infinity II SFC Multisampler의 성능을 확정하기 위해, 0.1 μ L~10.0 μ L의 주입 부피 범위에서 등용매 및 그레디언트 용출 조건하에 주입 직선성과 피크 면적 정밀도를 측정하였습니다(그림 1, 2, 3). 두 실험 세트는 모두 과충전 부피 및 피드 속도의 기본 조건을 적용하였습니다(분석법 참고). 이는 시료가 CO₂ 스트림으로 빠르게 피드되도록 하며, 샘플링 루프에서 완전히 플러시되는 것을 보장할 수 있습니다. 등용매 조건에서 두 화합물은 모두 잘 분리되었으며, 피크 모양은 0.1~10.0 μ L의 모든 주입 부피에서 탁월하게 나타났습니다

(그림 1A). 0.1~10.0 μ L, 0.1~1.0 μ L 및 1.0~10.0 μ L인 서로 다른 주입 부피 범위에서 주입 직선성을 계산하였습니다. 모든 경우에, 주입 직선성은 두 화합물에 대해 $R^2 > 0.9995$ (그림 1B~1D)로 우수하게 나타났습니다. 그레디언트 분리에 대한 결과도 0.1~10.0 μ L의 모든 시험한 주입 부피에서 우수한 피크 모양을 나타냈습니다(그림 2A). 두 화합물의 주입 직선성은 0.1~10.0 μ L, 0.1~1.0 μ L 및 1.0~10.0 μ L의 모든 시험 주입 부피 범위에서 $R^2 > 0.9999$ 의 우수한 값을 나타냈습니다(그림 2B~2D).

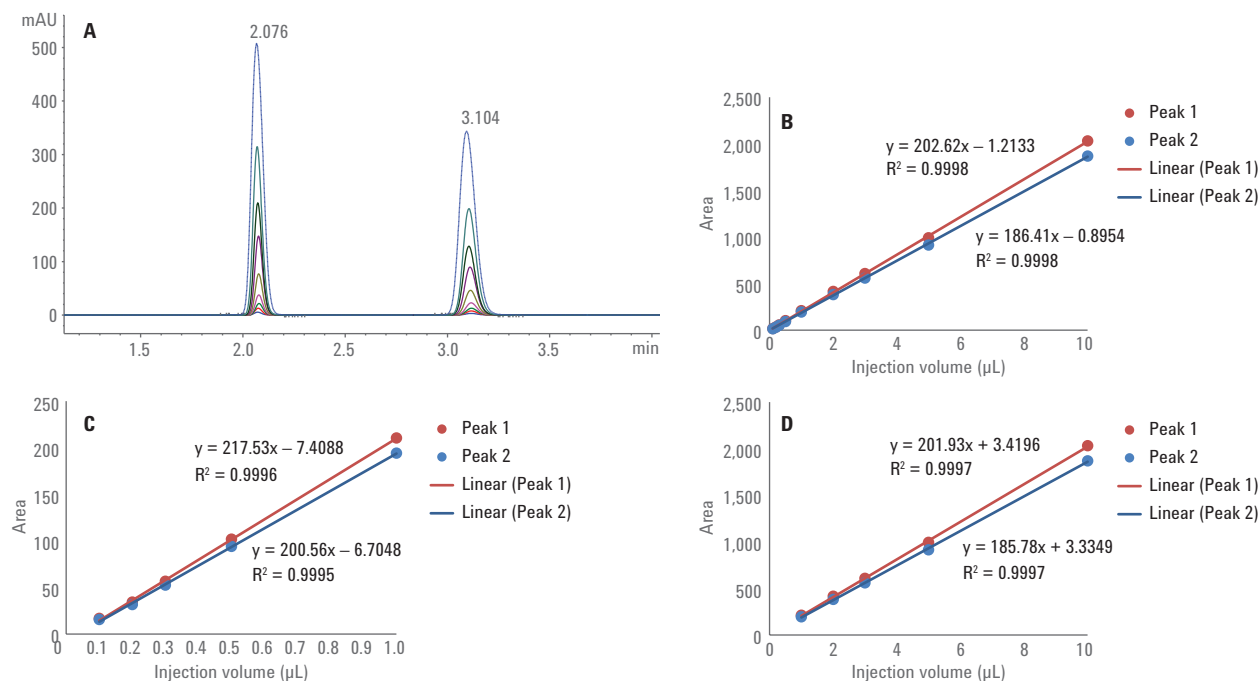


그림 1. 등용매 용출 조건 하의 피크 1 및 피크 2의 주입 직선성. A) 등용매 분리의 크로마토그램. 피크 1: caffeine, 2.076분 피크 2: Theobromine, 3.104분 주입 부피: 0.1~10.0 μ L. B) 0.1~10 μ L 주입 부피 직선성. C) 0.1~1.0 μ L 주입 부피 직선성. D) 1.0~10 μ L 주입 부피 직선성. 일반적으로 $R^2 > 0.9995$

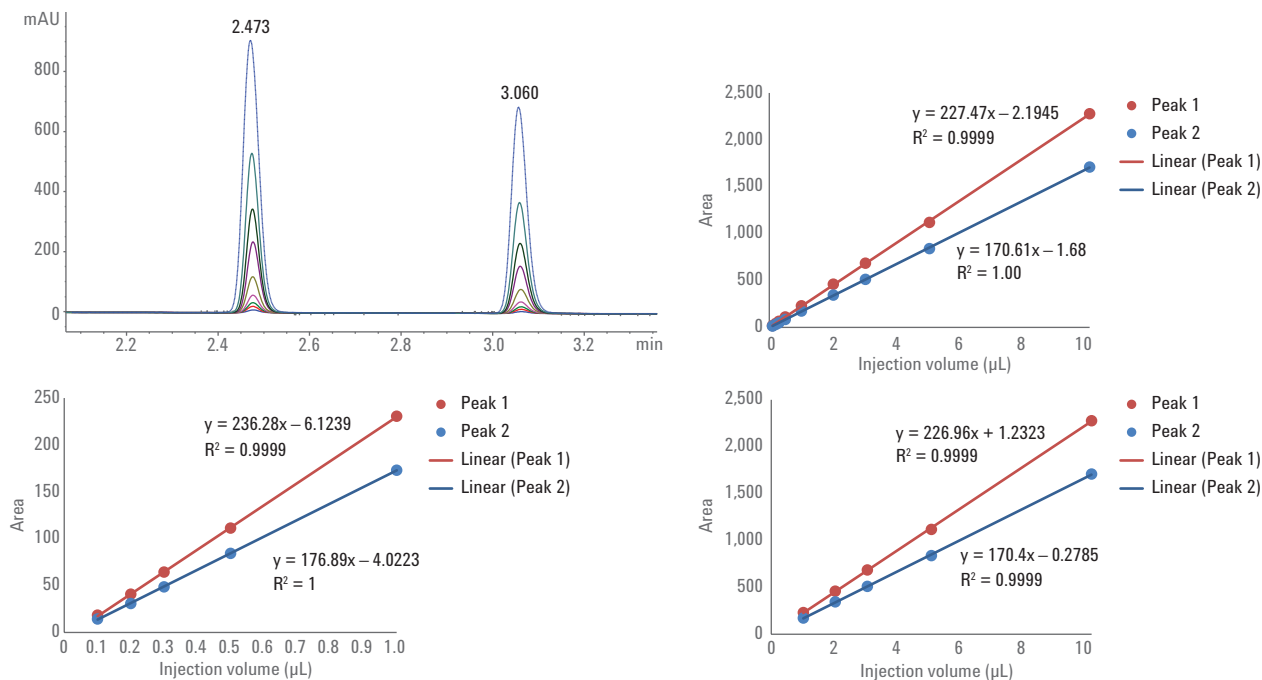


그림 2. 그레디언트 용출 조건 하의 피크 1 및 피크 2의 주입 직선성. A) 그레디언트 분리의 크로마토그램. 피크 1: Caffeine, 2.473분 피크 2: Theobromine, 3.060분 주입 부피 0.1~10.0µL. B) 0.1~10µL 주입 부피 직선성. C) 0.1~1.0µL 주입 부피 직선성. D) 1.0~10µL 주입 부피 직선성. 일반적으로 $R^2 > 0.9999$

모든 주입 부피의 면적 RSD 값은 등용매 및 그레디언트 실험에서 10회 반복 분석을 통해 계산되었습니다 (그림 3). 두 화합물의 면적 RSD는 등용매 분리에서 3.0~3.5%(그림 3A), 그레디언트 분리에서 2.0~2.5%(그림 3B)의 가장 낮은 부피(0.1µL)로부터 주입 시작합니다. 두 가지 경우의 RSD 값은 0.5µL이상의 주입 부피를 증가하기 위해 0.3% 이하로 감소됩니다. 최대 10.0µL의 높은 주입 부피에 대한 RSD 값은 0.3%이하에 유지하였습니다.

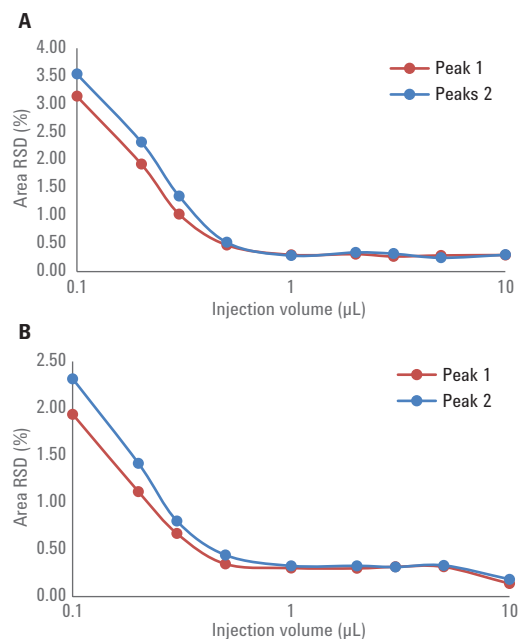


그림 3. A) 등용매 B) 그레디언트 분리 조건에서의 주입 부피 0.1~10µL인 피크 1 및 피크 2의 면적 RSD

10 μ L이상의 주입 범위에 대해, SFC Multisampler는 보다 큰 부피를 주입 가능합니다. 이러한 목적을 성취하기 위해, 이 기기에는 100 μ L의 시료 루프가 설치되어 있습니다. 100 μ L 루프 부피에서 사용한 과충전부피를 빼면 주입 가능한 시료량을 계산할 수 있습니다. 이 기능을 입증하기 위해, 10~80 μ L의 theobromine 용액을 주입하였습니다(250mg/L in methanol). 강한 용리 용출 용매인

메탄올 용액의 대량 시료를 CO₂ 스트림으로 천천히 주입하였습니다 (100 μ L/분). 피드 과정 후, 용매 농도는 1%에서 5%로 빠르게 증가하였으며, 용출 그래디언트를 시작하였습니다. Theobromine 피크의 높이와 폭은 주입 부피에 따라 증가되었습니다(그림 4). 더 높은 주입 부피에 대한 피크 높이는 크게 증가되지 않지만, 피크 면적은 피크 폭의 증가함에 따라 선형적으로 증가하였습니다(그림 4의 표 참고).

주입 부피와 피크 면적의 상관 관계는 0.9999의 상관계수로 우수한 직선성을 나타냈습니다(그림 4B). 반높이의 피크 폭은 0.04분의 10 μ L 주입 부피에서 80 μ L 주입 부피에서의 0.1분까지 합격 수준으로 향상되었습니다. 이는 모든 주입 부피에서의 대칭적인 피크가 나타났습니다(그림 4의 표 참고). 모든 주입 부피의 피크 면적에서 상대 표준편차를 계산했으며, 일반적으로 0.3% 면적 RSD이하의 우수한 값으로 나타났습니다(그림 4C).

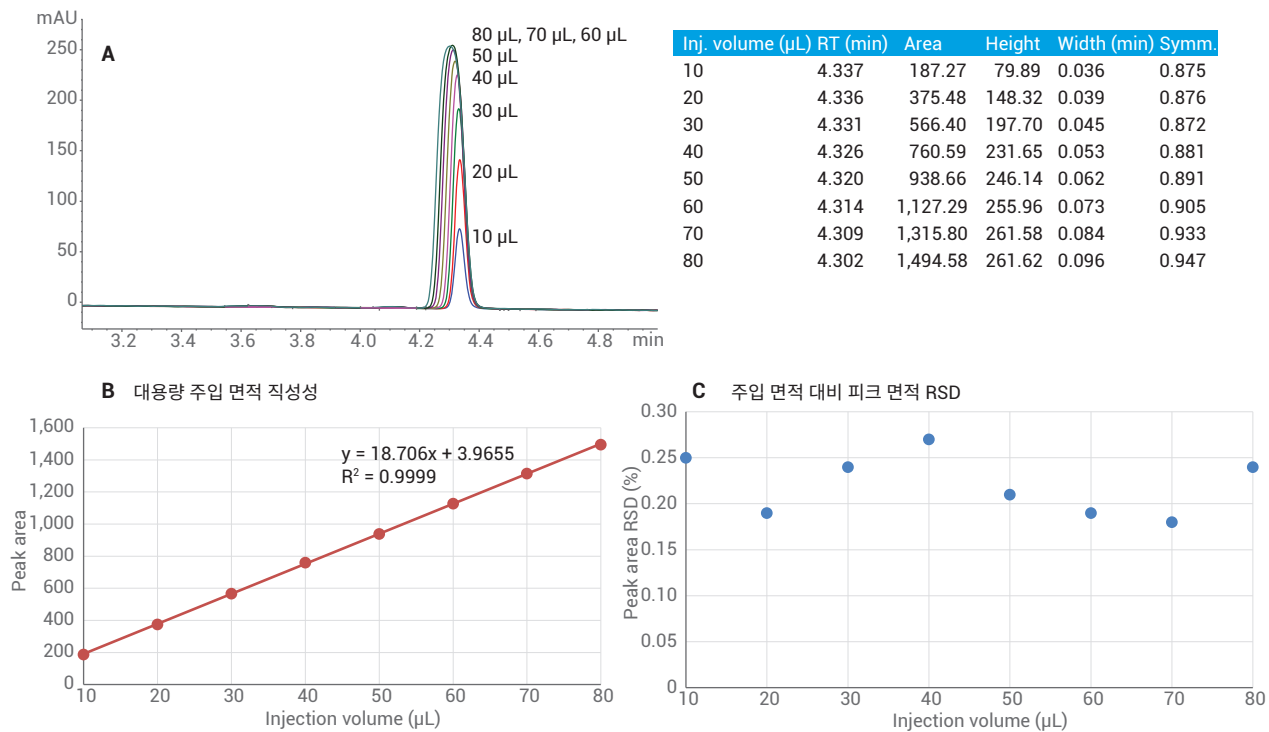


그림 4. 대용량 주입의 결과

- A) 10~80 μ L의 시료 주입 부피에 대한 크로마토그램 오버레이
- B) R^2 0.9999의 대용량 주입 면적 직선성
- C) 각 대용량 주입의 10회 반복 주입에서 계산된 피크 면적 RSD(%)
- 표) 대용량 주입에서 측정된 모든 파라미터 요약

마지막으로, 고농도 caffeine 시료 (5g/L in MeOH, 주입 부피 5 μ L) 주입을 통해 1260 Infinity II SFC Multisampler의 교차 오염 현상을 시험하였습니다. 고농도 caffeine 주입 후, 첫 번째 바탕 주입에서의 교차 오염을 측정하였습니다. 고농도 caffeine 피크와 비교한 면적 백분율로 계산된 교차 오염은 0.0014%(14ppm) 이었습니다. 고농도 caffeine 주입 후, 두 번째 바탕 주입에서 교차 오염이 나타나지 않았습니다(그림 5).

결론

이 기술 개요에서는 가변 주입 부피를 가장 높은 정밀도로 처리하는 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler의 성능 결과에 대해 다룹니다. 0.5~10 μ L 주입 부피에서의 면적 RSD는 일반적으로 0.3%이하입니다. 0.1 μ L까지 낮은 주입 부피에서의 면적 RSD는 일반적으로 2.5%이하입니다. 입증된 주입 직선성은 일반적으로 0.9995보다 우수합니다. 최대 80 μ L에 이르는 주입 부피에서도 0.3%이하의 탁월한 면적 RSD 값이 나타났습니다. 대용량 주입에 대한 피크 면적 직선성은 역시 매우 뛰어났습니다. 유연한 시료 주입의 교차 오염은 오직 14ppm뿐이며 무시해도 될 수준입니다. 이는 일반적으로 고정 루프 자동 시료 주입기의 전체 루프 모드 사용 시의 성능과 비교할 만하나, 또한 가변 루프 자동 시료 주입기의 높은 유연성을 갖추고 있습니다.

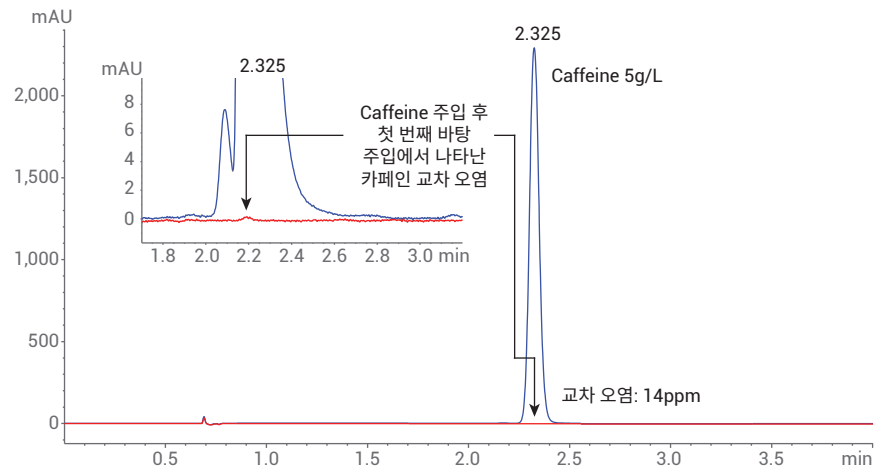


그림 5. 고농도 caffeine 시료(5g/L in MeOH, 주입 부피 5 μ L) 주입을 통해 Agilent 1260 Infinity II SFC Multisampler의 교차 오염을 측정하였습니다. 고농도 caffeine 주입 후, 첫 번째 바탕 주입에서의 교차 오염을 측정하였습니다. 고농도 caffeine 주입 후, 두 번째 바탕 주입에서 교차 오염이 나타나지 않았습니다. 주입된 caffeine 양이 검출기의 비선형 범위에 도달했기 때문에, 5 μ L 주입의 올바른 면적은 보다 낮은 주입 부피의 측정값을 통해 계산되었습니다.

참고 문헌

1. Naegele, E. Feed Speed and Over-Feed Volume – New Parameters for SFC Injection, *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-7626EN, 2017.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
2017년 10월 15일, 한국에서 발행
5991-7623KO

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



Agilent Technologies