기술 개요

Agilent
Trusted Answers

블리드는 GC/MS 데이터에 어떤 영향을 미치며 어떻게 제어할 수 있습니까?

소개

컬럼 블리드 이해하기

컬럼 블리드는 질량 분석기(MS) 데이터에서 가장 일반적으로 관찰되지만 잘못 이해되는 측면 중 하나입니다. 블리드는 크로마토그래피 베이스라인을 높이고 스펙트럼 간섭을 일으켜 데이터의 품질과 신뢰도를 떨어트립니다. 블리드를 이해하려면 먼저 블리드가 어디서 발생하는지 생각해 보아야 합니다. 컬럼에는 다양한 상 유형이 있지만, 1, 5, 624와 같이 오늘날 가장 일반적으로 사용되는 컬럼은 WCOT(Wall-Coated Open Tubular) 컬럼으로 분류됩니다. 이러한 컬럼은 그림 1과 같이 용융 실리카 튜브(mm 단위의 다양한 내부 직경)로 구성되어 있으며, 내부에는 고정상의 얇은 막(µm 단위의 다양한 두께)이 코팅되어 있습니다. 이 코팅된 고정상은 분석물질과 상호 작용하여 크로마토그래피의 선택성과 머무름 특성을 만들어냅니다. 그러나 바로 이러한 특성이 컬럼 블리드의 원인이기도 합니다.

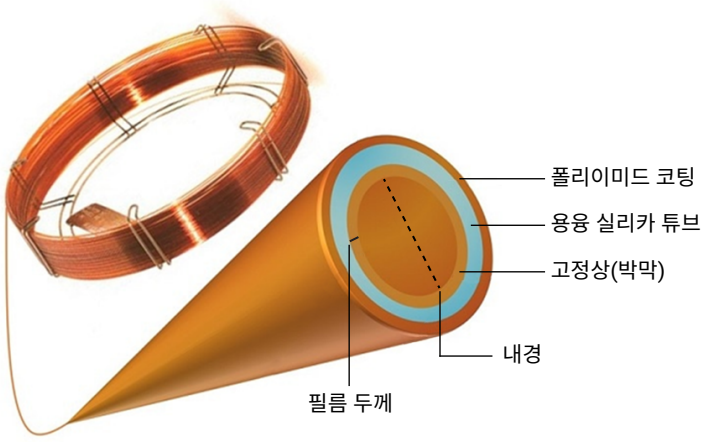


그림 1. WCOT 용융 실리카 GC 컬럼과 일반적인 컬럼 특성을 보여주는 다이어그램.

컬럼 상은 폴리실록산 골격을 갖춘 다양한 극성의 액체 폴리머로 만들어질 수 있습니다. 열이 가해지면 고정상 폴리머의 말단이 뒤로 구부러지기 시작하여 스스로를 공격하는데, 이를 "백바이팅(backbiting)"이라고 합니다. 열역학적으로 안정적인 링 구조는 그림 2와 같이 풀어헤쳐져 노이즈를 증가시키고 베이스라인을 높입니다. 그런 다음 프로세스가 반복됩니다. 주어진 온도가 높을수록 반응이 더 빠르게 진행되는데, 이것이 300°C 이상의 온도에서 베이스라인이 증가하는 이유입니다.

베이스라인 상승이 증가하면 신호대 잡음비가 낮은 분석물질의 경우 문제가 될 수 있습니다. 피크 적분이 데이터 품질에 부정적인 영향을 미칠 수 있기 때문입니다. 안정적이고 평평한 베이스라인은 피크 적분의 정확성과 재현성을 최적화합니다. MS와 같은 민감한 검출기로 작업할 때 검출기의 감도가 증가하면 백그라운드 노이즈와 블리드 감지도 증가하여 과도한 컬럼 블리드가 미량 수준 화합물의 감도에 해를 끼치게 됩니다.

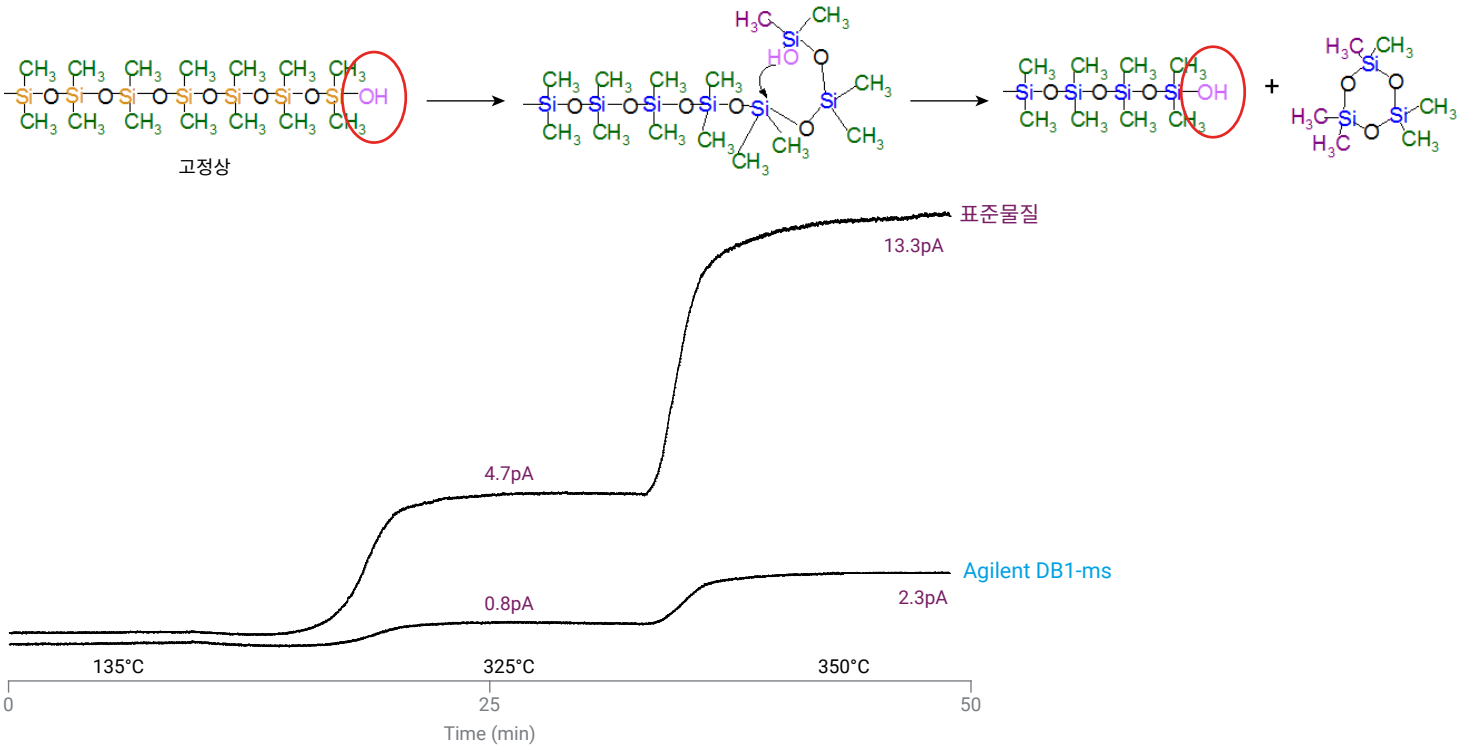


그림 2. Agilent J&W DB-1ms 컬럼과 "표준" 컬럼의 블리드 프로필을 비교한 컬럼 블리드 메커니즘.

자유로워진 고리 구조가 백바이팅으로 인해 MS로 유입되면 해당 질량도 이온화 소스에서 조각화되고 질량 스펙트럼에서 간섭 이온을 생성할 수 있습니다. *m/z* 207 및 281의 이온은 그림 3과 같이 극성이 다른 컬럼 상에서도 스펙트럼에 나타날 가능성이 가장 높습니다. 이러한 추가 블리드 이온은 분석물질의 스펙트럼 무결성을 떨어트릴 수 있습니다. 따라서 GC/MS 분석, 특히 민감한 GC/TQ 및 GC/Q-TOF 기기에는 저블리드 컬럼의 사용이 권장됩니다.

컬럼의 열 한계 내에서 작업

온도는 컬럼 블리드 양에 큰 영향을 미치므로 GC 컬럼의 열 프로그래밍을 관찰하는 것이 중요합니다. 모든 GC 컬럼에는 최대 허용 작동 온도(MAOT)가 있으며 이는 컬럼 상 유형에 따라 달라집니다. 이는 컬럼을 노출시킬 수 있는 최고 온도로, 이를 넘어가면 조기 열화가 발생합니다. 최대 온도는 일반적으로 325/350°C와 같이 두 개의 숫자로 표시됩니다. 첫 번째 낮은 숫자는 등온 분석을 위한 MAOT입니다. 두 번째 더 높은 숫자는 열 구배 또는 오븐 프로그램을 사용할 때의 MAOT입니다. 컬럼 수명을 최적화하고 블리드의 영향을 제한하려면 작동 한계 내에서 오븐 프로그램을 실행하세요.

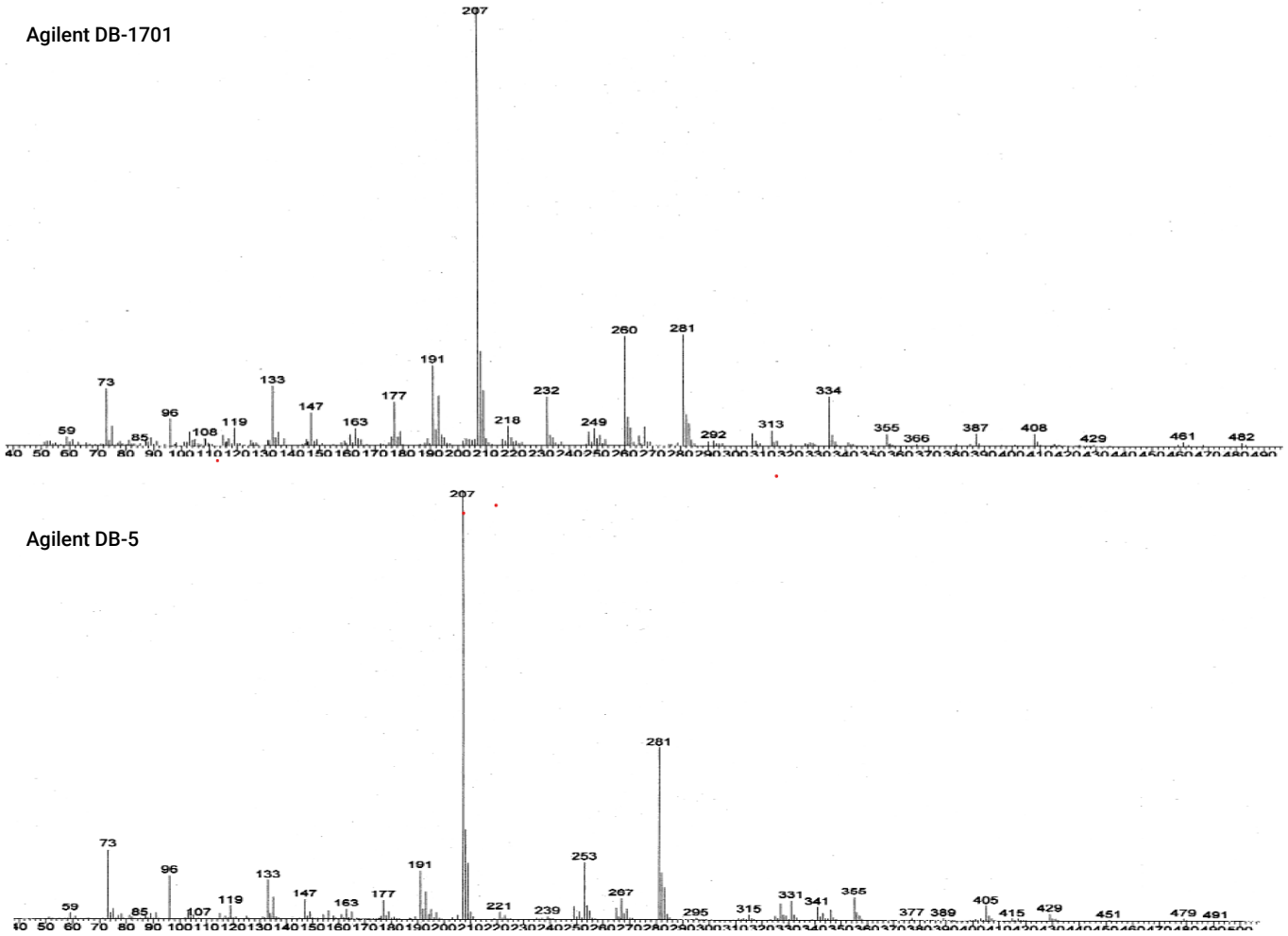


그림 3. 극성이 다른 두 GC 컬럼 상의 블리드 스펙트럼 예.[1]

가스 크로마토그래피/질량 분석법용으로 설계된 컬럼 선택

1991년에 애질런트는 저블리드 MS 응용 분야용으로 설계된 최초의 컬럼인 Agilent J&W DB-5ms를 출시했습니다. 이 컬럼은 빠르게 GC/MS 응용 분야의 업계 표준이 되었습니다. 오늘날 GC/MS 감도는 크게 향상되었으며 더 높은 감도와 accurate-mass 기능을 통해 계속해서 발전하고 있습니다. Agilent J&W DB-5Q 및 HP-5Q GC 컬럼은 초저 블리드 폴리머를 사용하여 현대식, 탠덤 및 TOF(Time-of-flight) 질량 분석기의 감도와 스펙트럼 요건을 충족합니다. 기존 GC/MS 컬럼과 비교할 때 J&W HP-5Q 컬럼은 블리드 프로파일이 현저히 낮아 특히 낮은 신호대 잡음비에서 정확한 적분을 위한 보다 안정적인 베이스라인을 제공합니다. HP-5Q 컬럼은 또한 간섭을 일으키는 블리드 이온을 크게 줄여 분석물질의 스펙트럼 충실도를 유지합니다.

실험

불꽃 이온화 검출기(FID)와 결합된 Agilent 8890 GC 및 Agilent 5977 시리즈 B GC/MSD를 사용하여 데이터를 얻었습니다. 데이터 수집에는 Agilent OpenLab ChemStation 및 MassHunter 수집 소프트웨어를 사용했습니다. 또한 FID와 함께 Agilent Intuvo 9000 GC를 사용하여 데이터를 수집했습니다. J&W DB-5Q 및 J&W HP-5Q GC 컬럼을 기존의 다양한 상용 5ms GC 컬럼과 비교했습니다.

표 1-8에는 각 분석법에 대한 파라미터가 요약되어 있습니다.

표 1. 분석법 A에 대한 Agilent 8890 GC 파라미터.

Agilent 8890 GC	
주입구	300°C, 분할 모드, 분할 20:1
주입량	0.5mL
주입구 라이너	애질런트 inlet liner, Ultra Inert, split, low pressure drop (품번 5190-2295)
가스 절약 기능	켜짐, 3분 후 20mL/분
셉타 퍼지 유속	3mL/분
오븐	90°C(0.5분), 20°C/분 속도로 330°C까지 승온(10분), 10°C/분 속도로 340°C까지 승온(10분), 10°C/분 속도로 350°C까지 승온(30분)
컬럼	
운반 가스	헬륨, 2.0mL/분, 일정 유속
컬럼	– Agilent J&W DB-5Q, 30m × 0.25mm, 0.25µm (품번 122-5532Q) – Agilent J&W HP-5Q, 30m × 0.25mm, 0.25µm (품번 19091S-433Q) – 기존 5ms 컬럼 X, 30m × 0.25mm, 0.25µm – 기존 5ms 컬럼 Y, 30m × 0.25mm, 0.25µm
주입구 연결	분할/비분할 주입구
배출구 연결	FID

표 2. 분석법 A의 FID 파라미터

설정	조건
온도	325°C
H_2 유속	30mL/분
공기 유속	400mL/분
보충 가스	N_2
보충 가스 유속	25mL/분, 컬럼 + 보충 가스 = 일정

표 3. 분석법 B에 대한 Agilent 8890 GC 파라미터

Agilent 8890 GC	
주입구	300°C, 분할 모드
주입량	0.5mL
주입구 라이너	애질런트 inlet liner, Ultra Inert, split, low pressure drop (품번 5190-2295)
주입 압력	12.37psi
분할 배출구 퍼지 유속	1.0분에서 100mL/분
셉타 퍼지 유속	3mL/분
오븐	70°C(1.0분), 20°C/분 속도로 200°C까지 승온, 10°C/분 속도로 330°C까지 승온(10분), 10°C/분 속도로 340°C까지 승온(10분)
컬럼	
운반 가스	헬륨, 1.3mL/분, 일정 유속
컬럼	– Agilent J&W DB-5Q, 30m × 0.25mm, 0.25µm (품번 122-5532Q) – 기존 5ms 컬럼 X, 30m × 0.25mm, 0.25µm – 기존 5ms 컬럼 Y, 30m × 0.25mm, 0.25µm
주입구 연결	분할/비분할 주입구
배출구 연결	MSD

표 4. 분석법 B의 MSD 파라미터

파라미터	값
모델	Agilent 5977B GC/MSD
소스	XTR
모드	스캔(40-500amu)
용매 지연	4.0분
이온 소스 온도	300°C
사중극자 온도	175°C
게인	1.0

표 5. 분석법 C에 대한 Agilent 8890 GC 파라미터

Agilent 8890 GC	
주입구	250°C, 분할 모드, 분할 100:1
주입량	1.0mL
주입구 라이너	애질런트 inlet liner, Ultra Inert, split, low pressure drop (품번 5190-2295)
가스 절약 기능	켜짐, 3분 후 20mL/분
셉타 퍼지 유속	3mL/분
오븐	50°C, 30°C/분 속도로 350°C까지 승온(150분), 30°C/분 속도로 50°C까지 승온(10분)
컬럼	
운반 가스	헬륨, 2.0mL/분, 일정 유속
컬럼	– Agilent J&W HP-5Q, 30m × 0.25mm, 0.25µm (품번 122-5532Q) – 기존 5ms 컬럼 X, 30m × 0.25mm, 0.25µm – 기존 5ms 컬럼 Y, 30m × 0.25mm, 0.25µm – 기존 5ms 컬럼 Z, 30m × 0.25mm, 0.25µm
주입구 연결	분할/비분할 주입구
배출구 연결	FID

표 6. 분석법 C의 FID 파라미터

설정	조건
온도	325°C
H_2 유속	30mL/분
공기 유속	400mL/분
보충 가스	N_2
보충 가스 유속	25mL/분, 컬럼 + 보충 가스 = 일정

표 7. 분석법 D에 대한 Agilent Intuvo 9000 GC 파라미터

Agilent 9000 GC	
주입구	300°C, 분할 모드, 분할 236:1
주입량	0.5mL
주입구 라이너	애질런트 inlet liner, Ultra Inert, split, low pressure drop (품번 5190-2295)
가스 절약 기능	켜짐, 3분 후 20mL/분
셉타 퍼지 유속	3mL/분
Guard Chip은	300°C 등온
버스 온도	300°C
오븐	65°C(11분), 20°C/분 속도로 350°C까지 승온(30분)
컬럼	
운반 가스	헬륨, 3.27mL/분, 일정 유속
컬럼	– Agilent J&W DB-5Q, 30m × 0.25mm, 0.25µm (품번 122-5532Q-INT) – Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert Intuvo 컬럼, 30m × 0.25mm, 0.25µm (품번 122-5532UI-INT)
주입구 연결	분할/비분할 주입구
배출구 연결	FID

표 8. 분석법 D의 FID 파라미터

설정	조건
온도	325°C
H_2 유속	30mL/분
공기 유속	400mL/분
보충 가스	N_2
보충 가스 유속	25mL/분, 컬럼 + 보충 가스 = 일정
검출기 1 테일 D1	320°C

결과 및 토의

온도 한계에서의 블리드 프로파일 비교

HP-5Q 컬럼의 열 안정성을 기존 5ms 컬럼과 비교하기 위해 이중 분할/비분할 주입구와 이중 FID가 장착된 8890 GC에 컬럼을 설치하고 동시에 실험을 수행했습니다. 컬럼 연결이 적절하게 이루어지고 누출이 없는지 확인하고 컨디션을 완료한 후, 오븐 온도를 330°C와 340°C로 올리고 각각 10분 동안 유지했습니다. 그런 다음, 오븐 온도를 최종 온도 350°C(컬럼 상의 프로그래밍된 MAOT)까지 올리고 30분 동안 유지했습니다. 그림 4에서 볼 수 있듯이 DB-5Q와 HP-5Q는 모두 온도 한계에서 초저 FID 반응을 유지했으며 둘 다 340°C에서 컬럼 블리드 수준을 1.0pA 미만으로 유지했습니다. 또한 10시간 동안 350°C(프로그램된 최대 온도)에서 컬럼을 작동할 때 DB-5Q와 HP-5Q 모두 2.0pA 미만의 블리드 수준을 유지한 반면 기존 5ms 컬럼 X와 Y는 각각 10pA와 4pA에서 블리드 수준을 유지하여 DB-5Q 및 HP-5Q GC 컬럼의 열 안정성이 더 높음을 보여주었습니다.

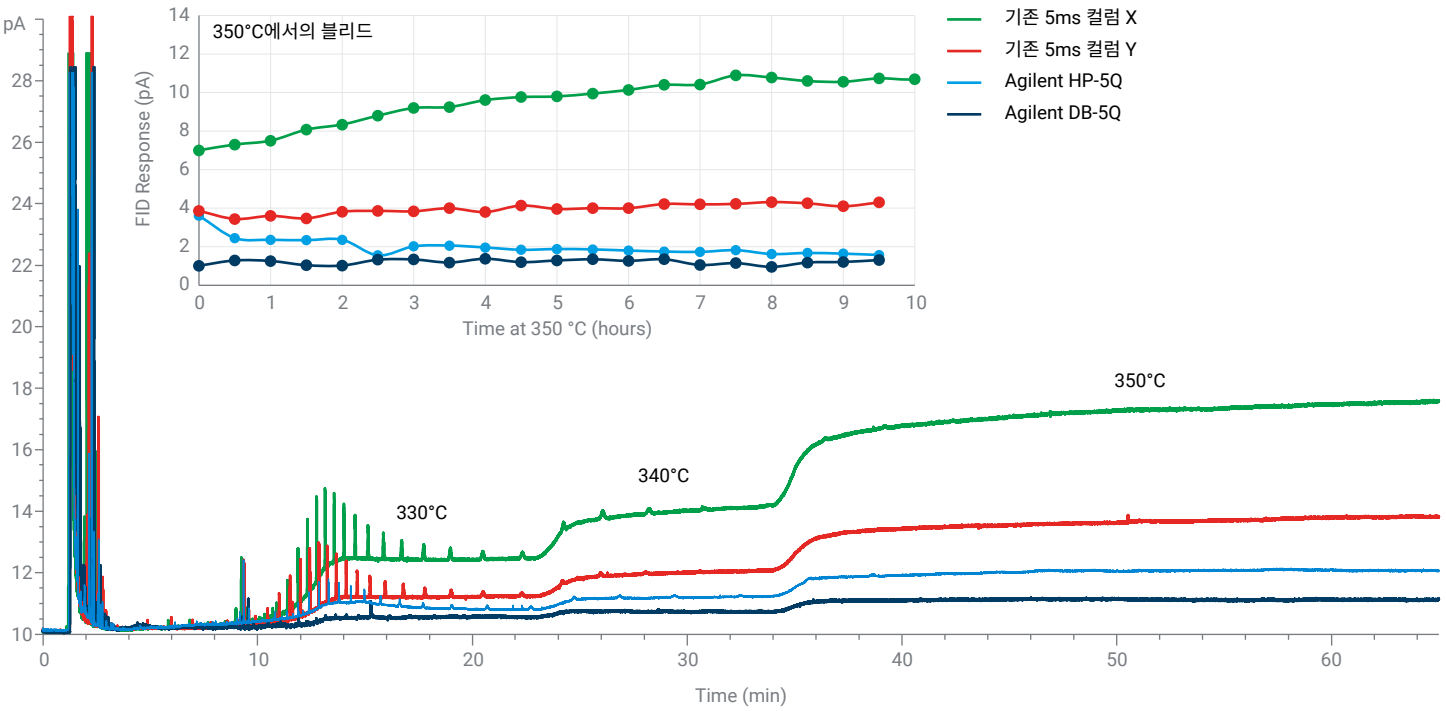


그림 4. GC 분석법 A를 사용하여 FID에서 수집 시 Agilent J&W HP-5Q 및 DB-5Q GC 컬럼과 두 개의 기존 5ms 컬럼에 대한 블리드 프로파일 비교.

열 안정성이 향상되어 스펙트럼 간섭이 줄어듭니다

SQ 질량 분석기를 사용할 때 피크가 없는 크로마토그램 영역에서 스펙트럼의 포착하여 컬럼 블리드로 인한 스펙트럼 간섭을 확인할 수 있습니다. 기존 5ms 컬럼 2개와 DB-5Q 컬럼 1개를 5977 시리즈 GC/MSD에 설치하고 8890 GC와 분석법 B를 사용하여 비교했습니다. 스펙트럼 스냅샷은 베이스라인만 증가하고 피크는 없는 330°C에서 얻었으며, 질량 스펙트럼을 스케일링 없이 비교했습니다. 그림 5에서 볼 수 있듯이 DB-5Q에 비해 기존 5ms 컬럼 Y 및 X에서 이온 *m/z* 207 및 281이 더 풍부했습니다. 스펙트럼 간섭의 감소는 온도 한계에서 민감한 GC/MS 미량 분석 응용 분야에 일반적으로 사용되는 DB-5Q 컬럼 상의 열 안정성이 증가했다는 증거입니다.

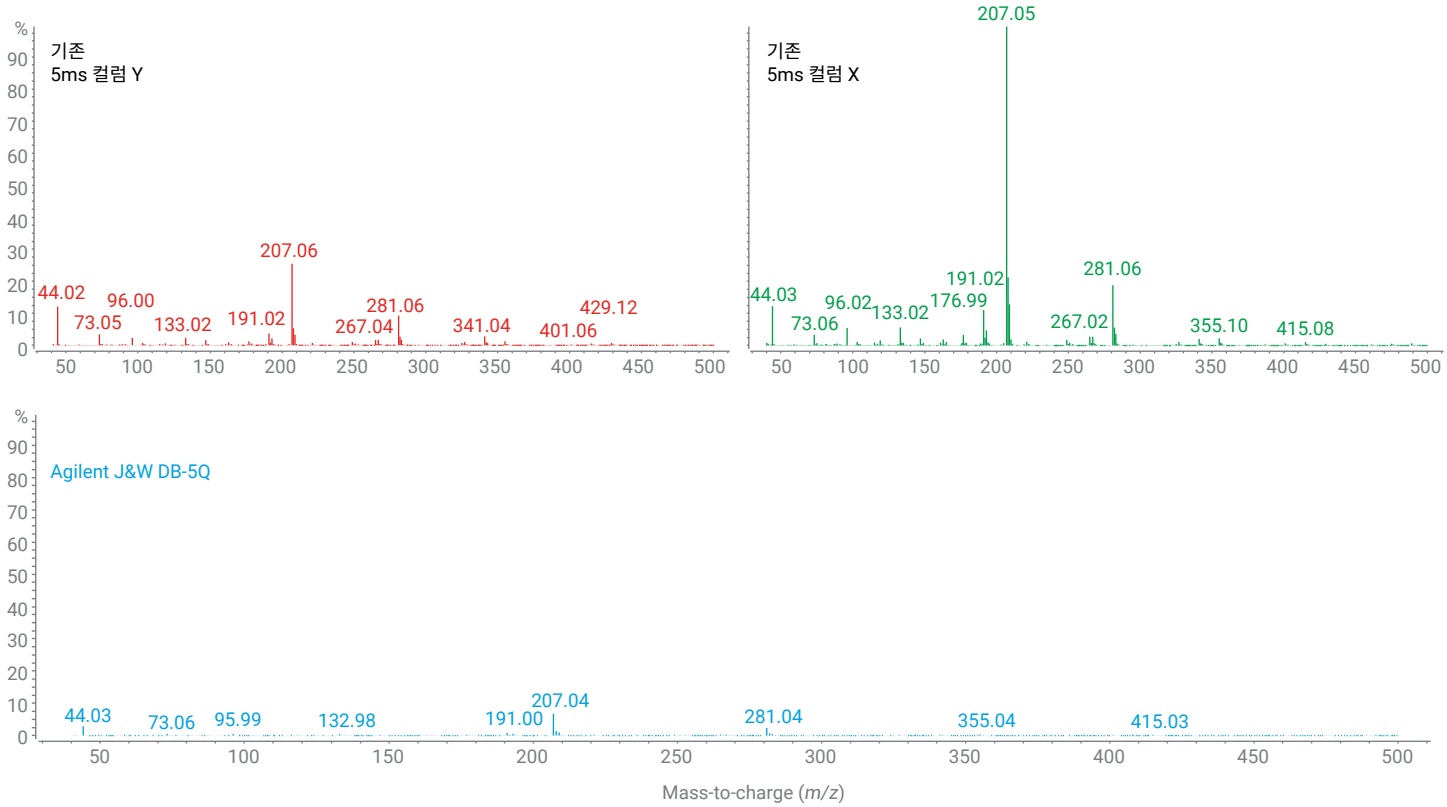


그림 5. 분석법 B에 따라 Agilent 5977 시리즈 B GC/MSD와 8890 GC를 사용하여 330°C에서 기존 5ms 컬럼 X 및 Y와 Agilent J&W DB-5Q GC 컬럼에서 수집한 블리드 스펙트럼입니다.

GC 컬럼의 적절한 컨디션

컬럼을 GC 주입구 및 검출기에 처음 설치할 때 컬럼을 컨디션하는 것이 중요합니다. 컨디션은 과도한 베이스라인 노이즈를 방지하고 컬럼 수명을 연장하며 정확한 실행 간 결과를 제공합니다. 컬럼이 트리밍되고 설치되면 운반 가스 흐름을 켜고 오븐을 낮은 40°C 온도로 설정합니다. 온도를 높이기 전에 컬럼에서 수분과 산소를 제거하면 상 열화가 최소화됩니다. 퍼징 후 누출이 없으면 컬럼 흐름을 켜고 특정 컬럼 상 및 구성에 대한 MAOT를 초과하지 않으면서 컬럼을 최대 작동 온도로 올립니다. 처음에는 베이스라인이 증가합니다. 그러나 컬럼이 분석을 수행하는 데 필요한 최대 온도로 유지되면 베이스라인이 떨어지고 안정적인 평탄화 상태가 됩니다. 베이스라인이 평탄화되는 지점에서 컬럼이 컨디션된 것으로 간주합니다. 컬럼 상마다 필요한 시간은 다를 수 있지만 일반적으로 컬럼 상이 열적으로 더 안정적일수록 컬럼을 컨디션하는 데 걸리는 시간이 줄어듭니다.

5% 페닐 상과 같은 비극성 컬럼의 경우 컨디션하는 데 2시간이 걸리는 경우가 드물지 않습니다. 그림 6에 나타낸 것처럼 HP-5Q는 350°C에서 컨디션할 때 1시간 이내에 평탄화된 베이스라인에 도달하는 반면, 기존 5ms 컬럼 Z는 컨디션된 것으로 간주하는 데 2시간이 필요합니다. HP-5Q GC 컬럼을 적절하게 컨디션하는 데 필요한 시간이 줄어들어 정상 작동으로 더 빠르게 복귀하고 기기 생산성을 높이는 데 도움이 됩니다.

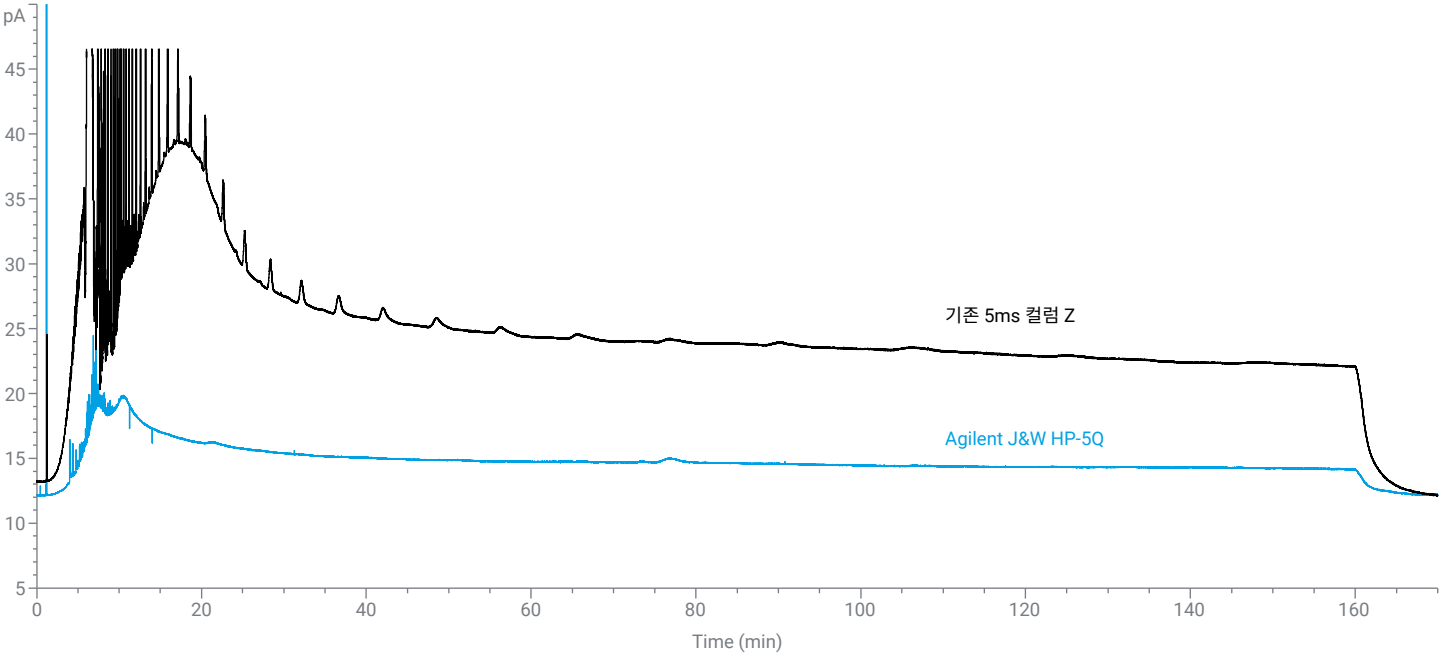


그림 6. 분석법 C를 사용하여 FID로 기존 5ms 컬럼 Z와 Agilent J&W HP-5Q에서 수집한 350°C의 컨디션 프로파일입니다.

컬럼 블리드가 베이스라인 안정화에 미치는 영향

대부분의 크로마토그램에서 컬럼 블리드가 GC 오븐 프로그램의 온도 한계에 어떤 영향을 미칠 수 있는지 쉽게 알 수 있지만 열 안정성은 베이스라인 안정화를 통해 실행 시작에 영향을 미칠 수도 있습니다. GC 수집 프로그램은 기기가 다음 주입을 시작할 준비가 되었는지 판단하기 위해 여러 가지 지표를 사용합니다. 예를 들어, *오븐 온도 설정점 준비 완료 및 평형 도달* 또는 *주입구 온도 준비 완료* 등을 판단합니다. 이러한 설정이 설정값에 도달하면 주입 주기가 시작됩니다. 그러나 이는 베이스라인이 예상 베이스라인으로 복귀한 것으로 결정된 경우는 고려하지 않습니다. 8890 GC와 같은 기존의 공기조 오븐은 고온에 도달한 후 더 낮은 오븐 설정점에 도달하고 평형을 이루는 데 더 오랜 시간이 걸릴 수 있기 때문에 주기 간 시간이 더 길 수 있습니다. 이것이 바로 이 현상이 공기조 오븐에서만큼 자주 나타나지 않는 이유입니다. 그러나 Intuvo 9000 GC의 빠른 가열 및 냉각 주기로 인해 잠재적인 주기 간 시간이 감소하여 컬럼 베이스라인이 예상 설정점으로 돌아오기 전에 GC가 "준비" 상태가 될 수 있습니다. 이를 그림 7에 나타내었습니다.

그림 7A에서는 Agilent J&W DB-5ms UI에서 UBER 믹스로 알려진 일상적인 테스트 믹스를 사용하여 초기 주입을 수행했습니다. 모든 화합물이 용출된 후 오븐의 온도를 30분 동안 350°C까지 높였습니다. 이 분석이 완료된 후 시퀀스는 다음 라인으로 이동하고 GC에서 준비가 되었다고 표시하면 다음 주입을 수행하고 데이터를 수집했습니다. 그림 7B에서 볼 수 있듯이, 실행 시작 초기에도 베이스라인이 여전히 감소했는데, 이는 컬럼 베이스라인이 고온에서 유지된 후에도 아직 정상으로 돌아오지 않았음을 나타냅니다. 이렇게 변경된 베이스라인으로 인해 초기 용출 화합물에 대한 피크 모양이 좋지 않게 되어 화합물의 적분이 왜곡되고 정량이 부정확해집니다.

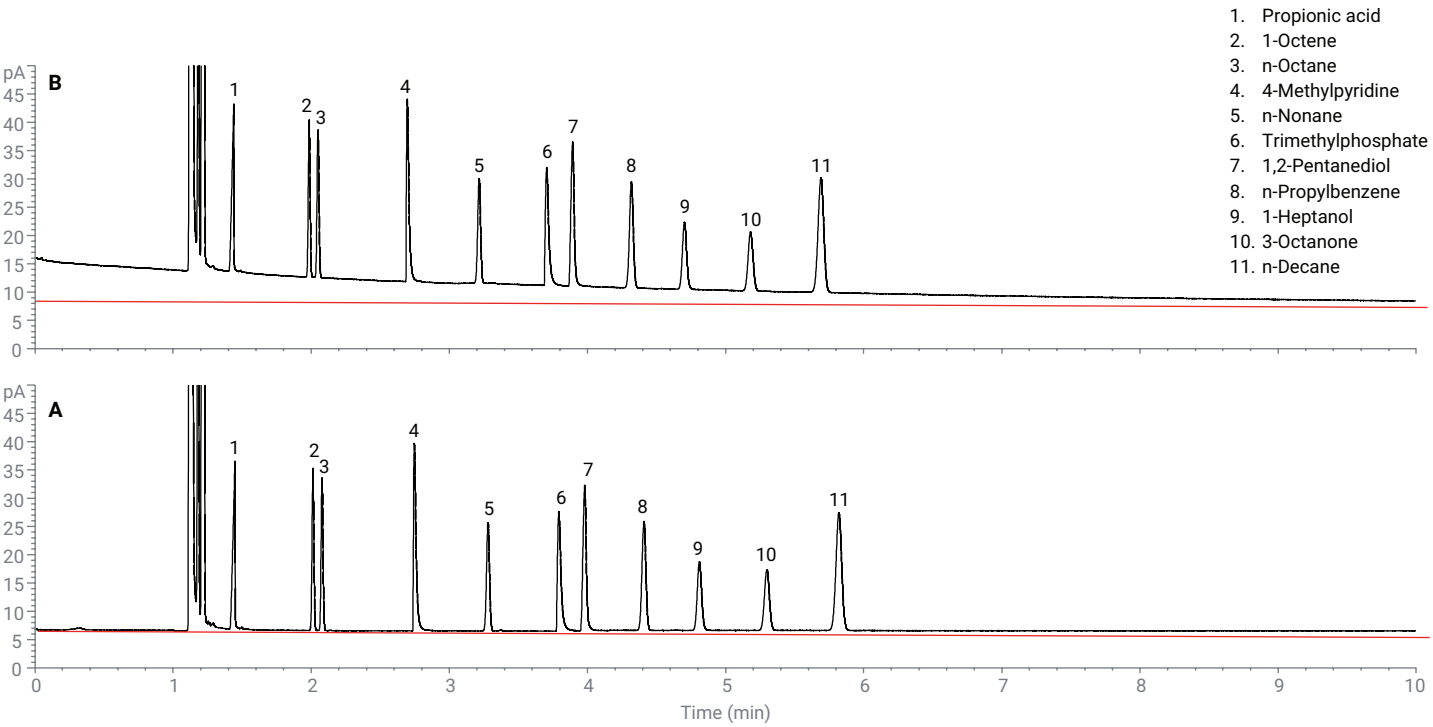


그림 7. (A) Agilent J&W DB-5ms Intuvo GC 컬럼에서 분석한 UBER 테스트 믹스의 초기 주입. (B) 오븐을 350°C로 순환시킨 후 분석한 UBER 테스트 믹스의 후속 주입.

그림 8은 DB-5Q Intuvo GC 컬럼을 사용하여 동일한 테스트를 수행한 결과입니다. 향상된 열 안정성과 매우 낮은 컬럼 블리드로 인해 후속 테스트 혼합물 주입을 시작했을 때 베이스라인이 증가하지 않았습니다. 이는 DB-5Q Intuvo 컬럼의 향상된 열 안정성이 전체적으로 컬럼 블리드를 낮게 유지할 뿐만 아니라 Intuvo 9000 GC의 빠른 냉각 옵션을 사용하는 경우에도 최적의 저블리드를 제공할 수 있음을 나타냅니다.

결론

컬럼 블리드는 정상적인 현상이지만 사용 중인 검출기의 분석 및 감도에 미치는 영향을 줄이는 여러 가지 방법이 있습니다. Agilent J&W DB-5Q 및 HP-5Q GC 컬럼의 도입으로 컬럼 기술이 향상되면서 열 안정성이 높아져 컬럼 블리드를 획기적으로 줄일 수 있게 되었습니다. 고온에서 컬럼 블리드가 감소하면 컬럼 상의 백바이팅으로 인한 이온의 스펙트럼 간섭이 감소하므로 질량 분석기의 감도가 증가합니다. 이는 DB-5Q 및 HP-5Q GC 컬럼이 GC/MS, TQ GC/MS 및 GC/Q-TOF와 같은 민감한 검출기와 함께 사용하기에 최적이라는 사실을 보여줍니다.

참고 문헌

1. Reese, A.; Vickers, A.; George, C. GC Column Bleed: A Mass PerSPECtive, *Agilent Technologies*, 발행 번호 B-0442, **2001**.

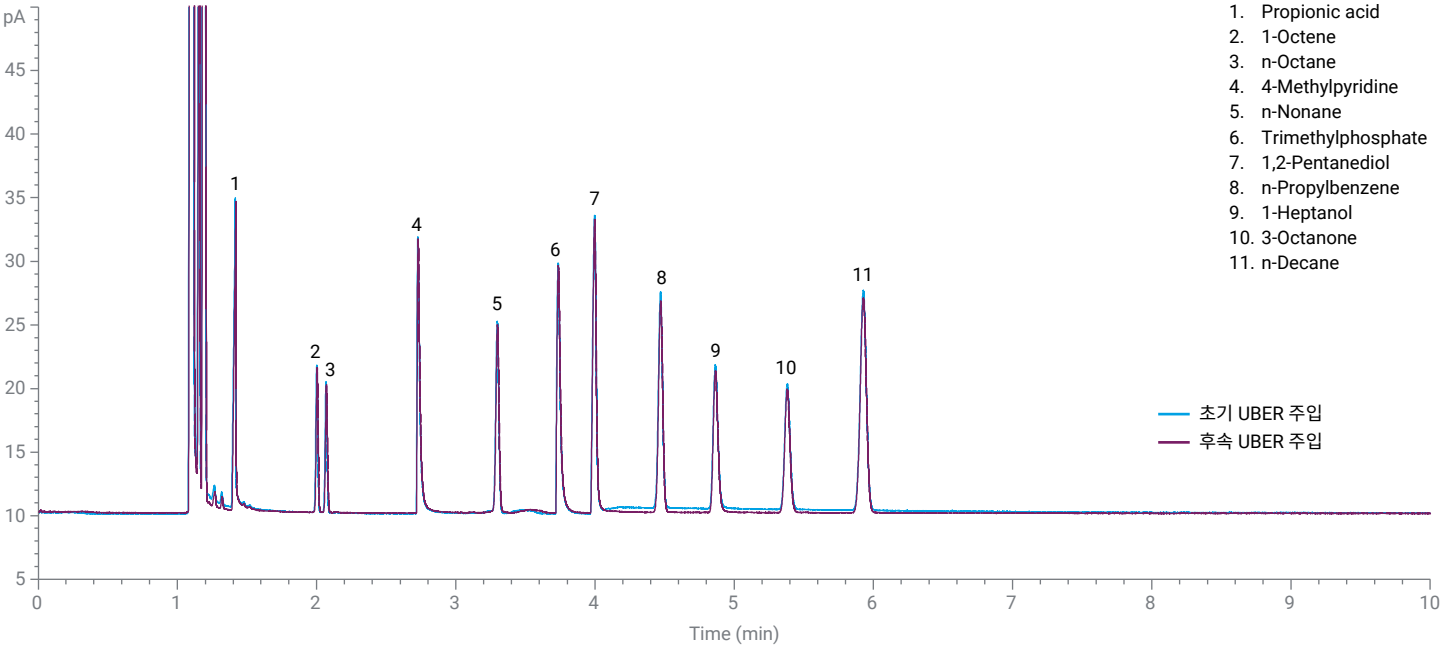


그림 8. Agilent J&W DB-5Q Intuvo GC 컬럼에서 처음에, 그리고 최대 온도 350°C에서 30분 동안 유지한 후 UBER 테스트 믹스를 분석한 결과.

www.agilent.com

DE63295737

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024

2024년 6월 25일 한국에서 발행
5994-7586KO

한국애질런트테크놀로지스㈜
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

Agilent
Trusted Answers