

Application News

No.L560K

High Performance Liquid Chromatography

염기성 화합물 분석시 피크 형상의 개선 및 멀티린스 기능에 의한 오염문제 감소

Improvement of peak shape in analysis of basic compounds and reduction of carryover by multi-rinse function.

잡은 손 소독은 계절성 인플루엔자 확산에 효과적인 방법입니다. 많은 손 소독제의 주성분은 에탄올이며, 그 중 일부는 살균제 성분도 포함하고 있습니다. 시중에서 구할 수 있는 소독제의 유효 성분으로는 클로르헥시딘과 벤제토늄이 있는데, 이 두 성분 모두 강력한 염기성 화합물입니다.

일반적인 C18컬럼으로 염기성 화합물을 분석할 경우 충전재 표면에 남아있는 Silanol과 비특이 상호작용하여 피크 모양의 테일링(Tailing) 또는 기타 열화 현상이 발생할 수 있습니다. Shim-pack Arata™ 18은 특히 Silanol과의 상호작용을 억제하도록 설계되어 있어 이동상의 간단한 구성으로도 염기성 화합물을 분석할 때 좋은 피크 형상을 기대 할 수 있습니다.

클로르헥시딘(Chlorhexidine)은 오토샘플러의 젖은 부위에 매우 쉽게 흡수되는 화합물로 알려져 있으며, 이러한 이유로 후속 분석 결과에 클로르헥시딘의 캐리오버 현상, 특히 고농도 시료를 분석한 경우 영향을 받을 수 있습니다. Nexera™ X3시스템은 캐리오버 발생 빈도가 높은 주입포트를 자동으로 세척하여 캐리오버 현상을 줄이는 멀티린스 기능이 표준사양으로 탑재되어 있습니다.

본 자료는 위에서 언급한 2가지 염기성 화합물을 Nexera X3와 Shim-pack Arata C18을 이용한 분석과 더불어 멀티린스 기능을 이용한 캐리오버 감소에 대하여 설명합니다.

Y.Zhou

Table 1 Analytical Conditions

System	: Nexera X3
Column	: Shim-pack Arata C18 (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm) Typical C18 column (100 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile phase	: A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Flow rate	: 0.7 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 1 μL
Detection	: UV 258 nm

Table 2 Time Program

Time (min)	A. Conc	B. Conc
0	95	5
3	50	50
6	50	50
6.01	95	5
10	95	5

클로르헥시딘(Chlorhexidine)과 벤제토늄(Benzethonium) 분석

Fig.1은 클로르헥시딘 디아세탄산(50mg/L)과 염화 벤제토늄(200mg/L)의 혼합표준용액 1uL를 주입했을 때의 크로마토그램이며, Table 1과 2는 일반적인 C18컬럼과 Shim-pack Arata C18컬럼을 사용했을 때의 분석 조건입니다. Table3은 이러한 컬럼을 이용하여 혼합 표준 용액을 분석했을 때의 대칭 계수(Symmetry factors)를 보여줍니다. Shim-pack Arata 18을 이용한 대칭계수는 클로르헥시딘 1.14, 벤제토늄 0.98인 반면, 일반 C18컬럼으로 얻은 계수는 클로르헥시딘.1.85, 벤제토늄 2.17이었습니다. 따라서 일반 C18컬럼과 비교하여, Shim-pack Arata 18을 사용하여 분석했을 때, 더 나은 피크 대칭성을 얻었습니다.

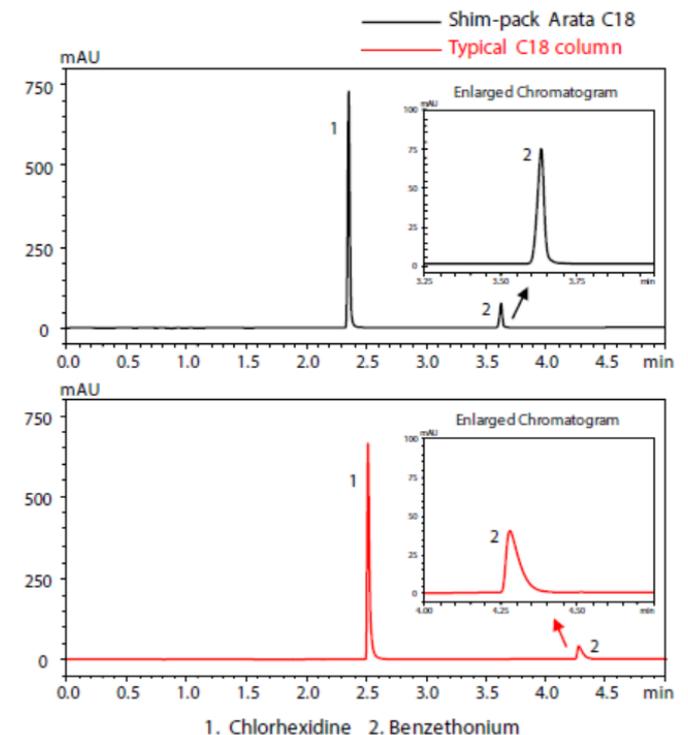


Fig. 1 Chromatograms of Mixed Standard Solution of Chlorhexidine Diacetate (50 mg/L) and Benzethonium Chloride (200 mg/L)

Table 3 Comparison of Symmetry Factors

Compound	Shim-pack Arata C18	Typical C18 column
Chlorhexidine	1.14	1.85
Benzethonium	0.98	2.17

■ 멀티린스(Multi-Rinse) 기능에 의한 캐리오버 감소

멀티린스 기능으로 최대 2개의 린스 용액으로 needle 외부 표면과 최대 3개의 린스 용액으로 needle 내부 표면을 세척하는 것이 가능하며 린스 순서는 원하는 대로 설정 할 수 있습니다. 캐리오버는 주로 주입 포트에서 발생하지만, 멀티린스 기능을 통하여 해당 부품의 자동 린스도 가능합니다.

본 자료에서는 캐리오버와 관련하여 2개를 비교하였습니다. 하나는 기존의 세척(needle의 외부 헴금만 사용)을 사용하였고, 다른 하나는 멀티린스 기능에 포함된 분사 포트 헴금을 통해서였습니다. 표준용액을 주입한 후 즉시 블랭크(blank)로 물을 주입하였고, 각각의 피크 부위에서 캐리오버를 계산하였습니다. 여기에 사용된 세척 용액은 물과 아세트나이트릴이 혼합된 용액과 0.1%포름산을 함유한 아세트나이트릴 용액이었습니다.

Table 4와 Table 5는 분석 조건을 나타냅니다. Fig2는 멀티린스 기능을 사용할 때 LabSolutions™의 설정 화면을 캡처한 것입니다. Fig3은 needle의 외부 헴금만을 사용하는 경우, 클로르헥시딘 디아세테이트(10,000mg/L) 표준용액에 따라 5uL의 블랭크를 주입했을 때의 크로마토그램입니다. Fig4는 멀티린스 기능을 수행한 크로마토그램입니다. Table6은 두 경우 모두에 대한 캐리오버 결과를 보여줍니다. Fig2에 보여주는 설정으로 needle 외부 세척 외에 needle 내부 표면과 주입 포트도 분석이 완료된 후 세척 용액 R2, R1의 순서로 세척합니다. 이러한 세척 작업 후 sample loop의 용매를 R0로 교체한 후 다음 분석을 위한 등교정을 1분간 실시합니다.

Table 4 Analytical Conditions

System	: Nexera X3
Column	: Shim-pack Arata C18 (100 mm x 3.0 mm I.D., 2.2 μm)
Mobile phase	: A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
Flow rate	: 0.7 mL/min
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 5 μL
Detection	: UV 258 nm
Rinse solution R0	: Water/acetonitrile=50/50 (v/v)
Rinse solution R1	: Water/acetonitrile=50/50 (v/v)
Rinse solution R2	: 0.1% Formic acid in acetonitrile

Table 5 Time Program

Time (min)	A. Conc	B. Conc
0	80	20
2	80	20
2.01	60	40
3	60	40
3.01	80	20
6	80	20

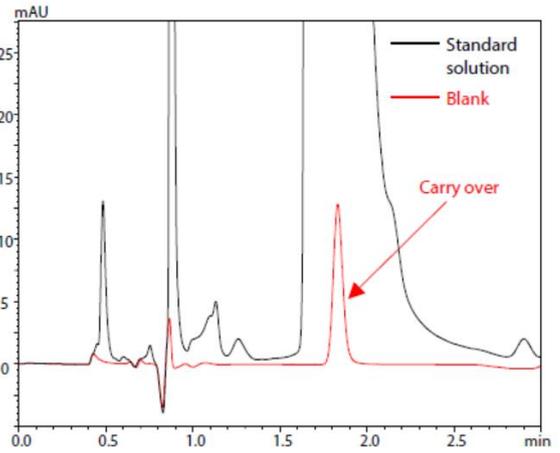
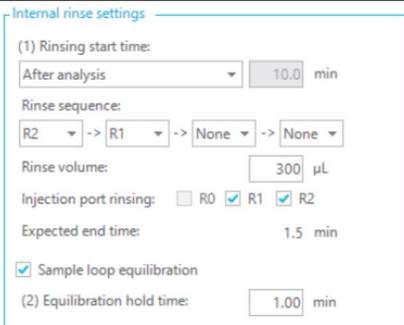


Fig. 3 Chromatograms When Only Using Needle External Rinse

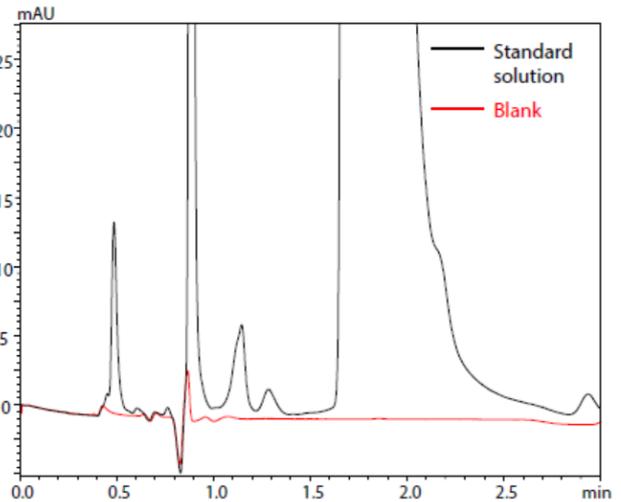


Fig. 4 Chromatograms When Using Multi-Rinse Function

클로르헥시딘 디아세테산 10,000mg/L의 표준용액을 주입한 후에 needle 외부 세척을 사용할 때의 캐리오버는 2.31mg/L로 표준용액의 0.0231%에 해당한다. 반면 needle 내부/외부 세척 및 주입구 세척을 사용할 때의 캐리오버는 검출한도를 밑돌았지만 기준 농도는 0.01mg/L로 표준용액의 0.0001%에 해당합니다. 따라서 멀티린싱 기능으로 캐리오버를 약 1/230로 줄일 수 있습니다.

Table 6 Comparison of Carryovers

Rinse method	Concentration of carryover (mg/L)	Carryover (%)
Needle external rinse	2.31	0.0231
Needle internal/external rinse and injection port rinse	0.01	0.0001

■ 결론

0.1%포름산 수용액 등 이동상의 간단한 구성으로 염기성 화합물을 분석 할 때 일반 C18컬럼에 비해 Shim-pack Arata C18 컬럼을 사용하면 개선된 피크형상을 얻을 수 있었습니다. 또한, Nexera 멀티린싱 기능으로 캐리오버를 크게 향상 시킬 수 있었습니다. 본 자료에서 설명 했듯이, 이 기능은 고농도 샘플을 주입했을 때 캐리오버를 줄이는데 특히 유용합니다.