

Application News

No. 01-00807-K

High Performance Liquid Chromatograph Nexera™ XR

오토샘플러 자동 희석 기능을 사용한 검정곡선 작성법 (part 2)

Simple Labor-Saving Calibration Curve Creation Using Autosampler Automatic Dilution Function (Part 2)

Natsuki Iwata, Ryota Kanamaru, and Erika Baba

사용자 활용 포인트

- ◆ 오토샘플러의 자동 희석 기능은 수동으로 희석하여 시료를 준비하는 것에 비해 유기 용매 소비를 줄여준다.
- ◆ 배치 테이블에서 원하는 희석 비율을 지정하고, 동일한 메소드 파일을 사용하여 자동으로 용액을 희석하고 검정곡선을 작성한다.
- ◆ 희석 비율에 관계없이 단일 메소드 파일을 사용하므로 HPLC 조건을 변경할 때 설정 및 관리가 쉽다.

■ 서론

HPLC 분석을 위한 표준 용액 및 샘플 용액의 희석은 일반적으로 피펫을 사용하여 수동으로 수행된다. 그러나 이러한 작업은 노동 집약적이고 시간이 많이 걸린다. 최근 몇 년 동안 작업 효율성과 생산성을 개선하기 위해 노동 절약을 목적으로 하는 자동화가 요구되고 있다. 유기 용매가 희석제인 경우, 메스 플라스크에서 검정곡선을 위한 표준 용액을 조제하기 위해 많은 양의 용매가 소모되지만 HPLC 분석에 필요한 샘플 용액의 양은 수십 μL 이하에 불과하다.

Nexera 오토샘플러에 장착된 자동 희석 기능을 사용하면 사용자가 정의한 배수로 희석한 샘플을 준비하여 분석 컬럼에 직접 도입할 수 있다. Application News 01-00717은 초순수를 희석제로 사용하여 검정곡선을 만드는 간단한 방법을 설명한다. 이 뉴스레터에서는 유기 용매를 희석제로 사용한 분석을 소개한다.

■ 전처리 프로그램 및 운영 개요

분석 메소드 파일에는 LC 매개변수, 분석 매개변수 및 전처리 프로그램과 같은 정보가 들어 있다. 전처리 프로그램은 100 배 희석과 같은 다양한 희석 비율을 설정할 수 있다. 또한 배치 추가 기능(다음 페이지의 그림 2)과 함께 프로그램을 사용하는 경우 희석 비율에 관계없이 단일 방법 파일을 사용할 수 있으므로 설정 실수와 같은 인적 오류를 방지할 수 있다.

희석 배수와 혼합 프로세스와 관련된 조건은 LabSolutions 워크스테이션을 사용하여 구성된다. 오토샘플러 전처리를 위한 설정 창은 그림 1에, 전처리 프로그램 명령은 표 1에 나타내었다. 이 뉴스레터에서는 린스 용액을 희석제로 사용하였다.

희석 비율에 해당하는 용량을 원액 용액의 바이알에서 흡인하여 희석제와 함께 오토샘플러에 미리 세팅 해 둔 빈 바이알(혼합 바이알)에 분배한다(이 예에서 최종 용량은 100 μL 이다). 바이알의 용액은 흡인/분주 기능(피펫팅)을 사용하여 혼합한다. 마지막으로 특정 양의 용액을 흡인하여 컬럼에 주입한다.

표 1. 전처리 프로그램

Line	Command
1	a3=100/a2
2	n.drain
3	disp 600.0,rs
4	d.rinse
5	vial.n a0,a1
6	n.strk ns
7	aspir a3,ss
8	air.a 0.1,ss
9	d.rinse
10	vial.n rn,sn
11	n.strk ns
12	disp 100.1,rs
13	mix 1,5,40,ss,35
14	n.drain
15	disp 100.0,rs
16	d.rinse
17	inj.p
18	v.inj
19	wait 2.0
20	goto f0
21	end

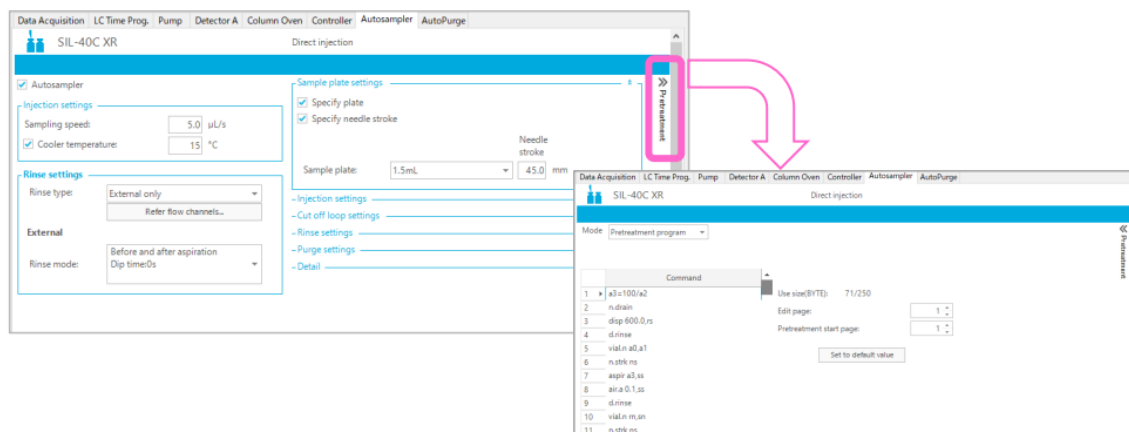


그림 1. 오토샘플러 전처리 프로그램을 위한 설정 창

■ 배치 테이블 설정

‘SIL pretreatment variable’라고 하는 배치 추가 기능*1은 LabSolutions에 미리 적용되어 원액 용액의 바이알의 위치와 희석 비율을 배치 테이블에 입력한다. 그림 2는 배치 테이블에 대한 SIL pretreatment variable 설정 창을 나타내었다. SIL pretreatment variable의 열 A0-A2에 원액 용액 바이알의 플레이트 번호(A0), 바이알 번호(A1) 및 희석 비율(A2)을 설정한다. 배치 테이블의 트레이와 바이알 번호로 지정된 위치에 자동 희석(혼합)을 위한 빈 바이알을 놓는다. 샘플 유형(standard)과 레벨 번호가 그림 2와 같이 설정된 경우 분석 후 검정곡선이 자동으로 생성된다. 별도의 분석 매개변수 설정은 필요하다.

*1 배치 추가 기능 적용에 대한 정보는 Shimadzu에 문의하세요.

■ 혼합 표준 용액에 대한 자동 희석 분석

쿠마린(coumarin)과 신남알데하이드(cinnamaldehyde)의 혼합 표준 용액 100 mg/L을 사용하여 자동 희석 분석을 수행하였다(아세트니트릴로 조제). 표 2에 분석 조건을 정리하였으며, 전처리 프로그램은 표 1과 같다. 혼합을 위해 1.0 mL 폴리프로필렌 바이알을 사용하였고, 섀텀 바이알은 원액 용액(표준용액 및 샘플)에 사용하였다. 아세트니트릴은 희석제로 린스 용액*2을 사용하였다. 그림 3은 아세트니트릴로 100 배 희석한 혼합 표준 용액(자동 희석 후 농도: 각각 1.0 mg/L)의 크로마토그램을 나타내었다.

*2 다중 린스 기능이 장착된 HPLC의 경우, 오토샘플러의 매개변수 설정에 지정된 린스 용액을 사용하세요.

표 2. 분석 조건

System:	Nexera XR
Column:	Shim-pack GIST-HP C18*3 (150 mm × 3.0 mm I.D., 3 µm)
Flow rate:	0.8 mL/min
Mobile Phase:	A) Water B) Acetonitrile
Time Program:	50 % B (0-2.0 min) → 60 % B (4.0 min) → 100 % B (4.1 - 5.0 min) → 50 % B (5.1 - 5.5 min)
Column Temp.:	40 °C
Sample:	100 mg/L Coumarin and Cinnamaldehyde in Acetonitrile
Injection Volume:	5 µL
Needle Stroke:	45 mm
Vial for Mixing:	Shimadzu Vial, LC, 1 mL, Polypropylene*4
Vial for Stock Solution and Sample:	SHIMADZU LabTotal for LC 1.5 mL, Glass*5
Diluent:	Rinse solution (Acetonitrile)
Detection:	Ch1 (Coumarin): 276 nm, Ch2 (Cinnamaldehyde): 288 nm (SPD-M40)

*3 P/N: 227-30040-05, *4 P/N: 228-31600-91, *5 P/N: 227-34001-01

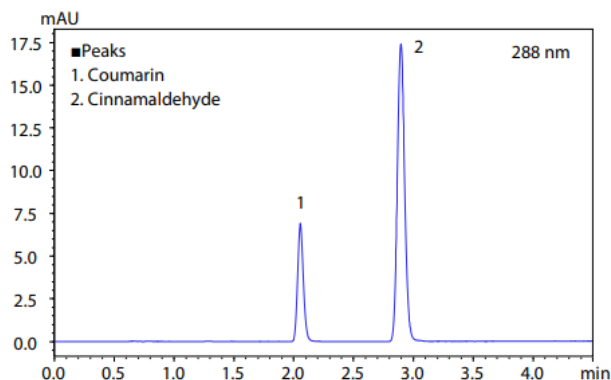
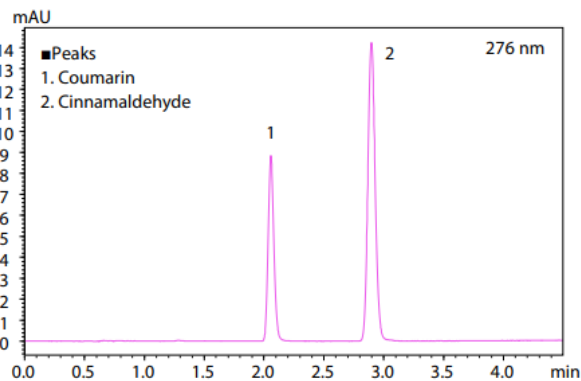


그림 3. 쿠마린과 신남알데하이드의 혼합 표준 용액에 대한 크로마토그램 (희석 비율: 100, 자동 희석 후 농도: 각각 1.0 mg/L)

■ 반복성 테스트

혼합 표준 용액 (희석 비율: 500, 자동 희석 후 농도는 각각 0.2 mg/L)을 오토샘플러 자동 희석 기능을 이용하여 연속 6회 분석하였다. 머무름 시간 및 피크 면적의 반복성(%RSD)은 표 3에 나타내었다.

표 3. 6회 반복 분석의 반복성 결과 (%RSD)

Compound	Retention time	Peak area
Coumarin	0.09	1.46
Cinnamaldehyde	0.06	1.82

Analysis	Tray Name	Vial#	Sample Name	Sample ID	SIL Pretreatment Variables	Sample Type	Level#	Inj. Volume	Method File
1	2	3	2mix_100	x1000	A0=2,A1=51,A2=1000	1:Standard	1	5	45_5.5m.lcm
2	2	4	2mix_100	x500	A0=2,A1=51,A2=500	1:Standard	2	5	45_5.5m.lcm
3	2	5	2mix_100	x200	A0=2,A1=51,A2=200	1:Standard	3	5	45_5.5m.lcm
4	2	6	2mix_100	x100	A0=2,A1=51,A2=100	1:Standard	4	5	45_5.5m.lcm
5	2	7	2mix_100	x50	A0=2,A1=51,A2=50	1:Standard	5	5	45_5.5m.lcm
6	2	8	2mix_100	x20	A0=2,A1=51,A2=20	1:Standard	6	5	45_5.5m.lcm
7	2	9	2mix_100	x10	A0=2,A1=51,A2=10	1:Standard	7	5	45_5.5m.lcm

Plate No. →
Vial No. →
Dilution ratio →

SIL Pretreatment Variables

A0: OK
A1: Cancel
A2:
A3:
A4:
A5:
A6:
A7:

그림 2. 배치 테이블의 SIL pretreatment variable에 대한 설정 창

■ 검정곡선

쿠마린과 신남알데하이드 (각 농도 범위 0.1-10 mg/L)에 대해 자동 희석 기능을 이용하여 3번 분석한 검정곡선을 작성할 수 있었다. 검정곡선의 결정 계수(r^2)는 0.999 이상으로 우수한 직선성을 얻었으며, 그림 4에 각 성분의 검정곡선을 나타내었다.

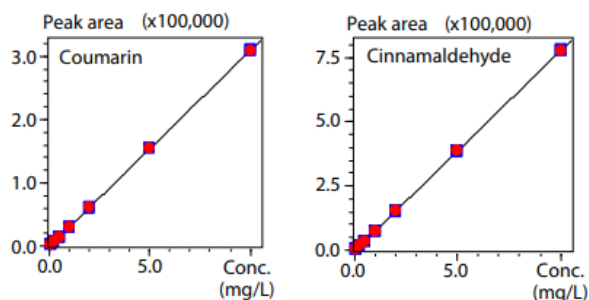


그림 4. 검정곡선 (n=3)

■ 시나몬 분석

상업용 *Cinnamomum cassia* 샘플을 사용했으며, 전처리 프로토콜은 Application News No. 01-00233의 그림 3에서 여과까지의 프로세스와 동일하다. No. 01-00233에서 전처리의 마지막 단계는 아세토니트릴로 수동으로 희석했지만, 이 뉴스레터에서는 오토샘플러로 샘플을 자동으로 희석하였다. 전처리 프로토콜은 그림 5에 나타내었다. 아세토니트릴을 추출 용매로 사용했으며, 지질은 분산형 고체상 추출 (dSPE) 카트리지(Merck Supel™ QuE Z-Sep+)를 사용하여 제거하였다. 카트리는 샘플을 로딩하기 전에 컨디셔닝을 수행할 필요가 없어 작업을 간소화하였다.

그림 6은 자동 희석 기능을 사용하여 *Cinnamomum cassia* 추출물을 아세토니트릴로 100 배 희석하여 얻은 크로마토그램을 나타내었다. 두 가지 대상 화합물은 오염 물질과 잘 분리되었다. 분석 결과(자동 희석 후 농도)는 표 4에 정리하였으며, 검정곡선에 대한 표준 용액을 수동으로 조제하고 전처리 된 시나몬 추출물을 수동으로 100 배 희석하였을 때 얻은 분석 결과를 비교하였다.

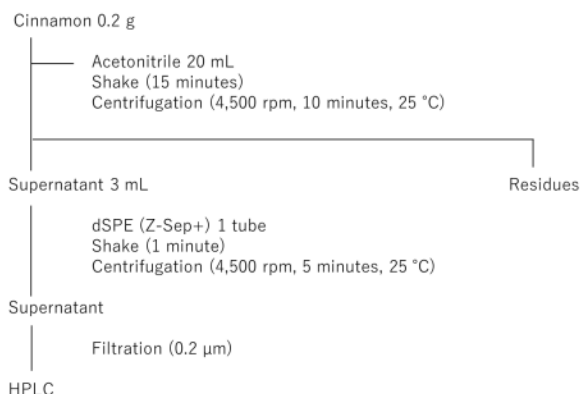


그림 5. 전처리 프로토콜

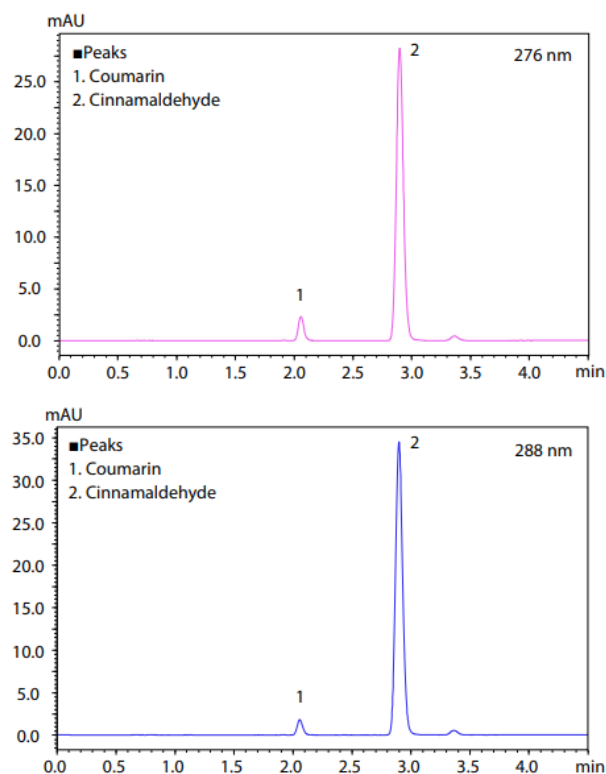


그림 6. 자동 희석 방법으로 얻은 *Cinnamomum Cassia*의 크로마토그램 (희석 비율: 100)

표 4. 분석 결과 (n=3)

Compound	Concentration (mg/L)*6	
	Automatic	Manual
Coumarin	0.28 (0.72)	0.27 (0.38)
Cinnamaldehyde	1.90 (1.08)	2.02 (0.59)

*6 괄호 안의 숫자는 %RSD를 나타내었다, n = 3.

■ 결론

모든 희석 비율에서 검정곡선에 대한 표준 용액을 자동으로 조제하고 직접 분석함으로써 검정곡선을 쉽고 정확하게 만들 수 있었다. 또한 실제 샘플을 분석할 때도 희석을 자동으로 수행 할 수 있었으며, 간단한 전처리만으로 분석이 가능함을 확인하였다. 이 뉴스레터에서 설명하는 검정곡선 작성 방법은 분석자의 노동력 절감과 지속 가능성 관점에서 용매 절감으로 이어질 것으로 기대한다.

관련 응용자료

1. Simultaneous Quantitative Analysis of Coumarin and Cinnamaldehyde in Cinnamon Produced in Different Regions
Application News No. 01-00233
2. Simple Labor-Saving Calibration Curve Creation Using Autosampler Automatic Dilution Function
Application News No. 01-00717