

머무름 시간 고정(RTL) 기능을 갖춘 Agilent 8890 GC에서 AOAC 2012.13에 따른 *cis-trans* FAME 분석의 시스템 적합성 보장

저자

Rachael Ciotti
Agilent Technologies, Inc.

개요

AOAC Method 2012.13에서는 불꽃 이온화 검출기를 장착한 캐필러리 가스 크로마토그래피를 사용해 유제품과 이유식 내 지방산 함량을 분석합니다. 이 분석법은 100m CP-Sil 88 컬럼을 장착한 Agilent 8890 GC 시스템에서 실행되었으며, 일반적인 37종의 지방산 메틸 에스테르 외에, 19개의 C18족 단일 및 다중불포화 *cis-trans* 이성질체를 사용해 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid의 분리 효율성을 향상시켰습니다. 가장 유사한 두 성분(critical pair)인 *cis* 및 *trans* FAME의 분리능은 정성 표준물질을 사용해 평가하였습니다. 마지막으로, 컬럼 유지보수 후 재정렬의 필요성을 피하기 위해 머무름 시간 고정(RTL) 역시 적용되었습니다.

서론

유제품 및 채소 지방에는 트리글리세리드 (Triglyceride)가 포함되어 있으며, 이 물질은 3개의 지방산 사슬과 결합된 글리세롤 에스테르입니다. 지방산은 탄화수소 사슬에 연결된 말단 카르복시기로 구성되어 있으며, 탄화수소 사슬은 길거나 짧을 수 있고, 선형적이거나 가지를 친 형태이거나, 포화, 단일 또는 다중 불포화 상태일 수 있습니다. 불포화 지방의 이중결합 구성 및 위치는 다양한 구조의 *cis-trans* 이성질체를 만들어낼 수 있습니다. 이성질체에 대한 정확한 식별은 정확한 영양 성분 표시를 위해 매우 중요합니다.

복잡한 매트릭스로부터 지방산 동족체와 이성질체를 분리 및 식별하는 것은 어려운 과제입니다. 에스테르화 이후, 해당 지방산 메틸 에스테르(FAME)는 불꽃 이온화 검출기를 장착한 가스 크로마토그래피로 재현성 높은 분석이 가능합니다. 이성질체 용리 순서 및 분리 효율성은 컬럼 고정상의 종류와 길이에 따라 크게 달라질 수 있습니다. 다양한 종류의 FAME *cis-trans* 이성질체를 완전히 분리할 수 있는 컬럼은 존재하지 않으나, CP-Sil 88 과 같은 높은 극성의 시아노프로필 고정상으로 코팅한 100m 캐필러리 컬럼을 사용하여 대부분의 *cis* 및 *trans* FAME 이성질체에 대해 정교하고 신뢰성 있는 분리를 할 수 있습니다. 기존의 왁스 컬럼과 달리, 높은 극성의 시아노프로필 고정상에서 *trans* 이성질체는 *cis* 이성질체 전에 용리됩니다.

실험

본 실험의 데이터는 분할/비분할 주입구 (SSL), 불꽃 이온화 검출기(FID), Agilent 7693A 자동 시료 주입기(ALS)를 장착한 Agilent 8890 가스 크로마토그래피에서 획득하였습니다.

화학물질

FAME 성능 평가를 위해 구입한 분석 표준물질:

- 100~600µg/mL 농도 범위의 C4~C24 FAME를 포함하고 있는 37가지 성분의 FAME 혼합물(47885-U)
- 4가지 성분을 포함한, 10mg/mL 총 *cis-trans* linoleic acid methyl ester 혼합물(CRM47791)

- 8가지 성분을 포함한 linolenic acid methyl ester 이성질체 혼합물(L6031), 각 성분의 중량 % 범위는 3~30%임
- 2.5mg/mL의 농도로 다양한 FAME를 포함한, *cis-trans* FAME 컬럼 성능 (Column Performance) 혼합물 (40495-U)

위의 모든 혼합물은 MilliporeSigma(St. Louis, MO)사 제품을 사용하였습니다. 8가지 성분을 포함한 *cis-trans* FAME 혼합물(35079)은 Restek(Bellefonte, PA)에서 구입하였습니다.

표 1. 기기 조건

Agilent 8890 GC 조건 – AOAC Official Method 2012.13	
주입	
시린지 크기	10µL, p/n G4513-80204
주입 부피	1µL
주입구	SSL, 분할 모드
온도	250°C
분할비	10:1
셉텀 퍼지 유속	3mL/분
컬럼	Agilent CP-Sil 88, p/n CP7489
규격	100m × 0.25mm, 0.20µm
운반 가스	He, 0.8mL/분, 일정 유속
오븐	
초기 온도	60°C
초기 머무름 시간	5분
상승	15°C/분으로 165°C까지(1분 유지) 2°C/분으로 225°C까지(20분 유지)
검출기	
종류	FID
온도	250°C
공기 유속	400mL/분
H ₂ 연료 유속	40mL/분
N ₂ 보충 가스 유속	25mL/분

결과 및 토의

전체 범위에 걸쳐 분리를 평가하기 위해 (그림 1), dichloromethane 용매에 혼합된 C4:0~C24:0의 37가지 성분 FAME 혼합물을 주입하였습니다. 초기 오븐 온도 설정값을 60°C로 설정하고 우수 품질의 중요한 지표인 C4:0을 용매 전선 (solvent front)으로부터 확실하게 분리해낼 때까지 이 온도를 유지합니다. 승온 오븐 프로그램을 통해 *cis-trans* 이성질체 및 긴 사슬 다중불포화 FAME가 효율적으로 분리되지만, 약 48분 인근에서 C23:0과 C20:4n6 피크 사이에 동시 용리 현상이 관찰되었습니다. 그러나 C23:0은 유제품에서 일반적으로 관찰되지 않기 때문에, 크게 문제가 되지는 않습니다.

cis-trans 이성질체에 대한 정교한 분리는 시판 중인 참조 표준물질 혼합물을 통해 이루어졌습니다. Restek에서 구입한 dichloromethane 내 8가지 성분 *cis-trans* FAME 혼합물은 dichloromethane으로 20배 희석한 후 GC로 주입하였습니다. 이 방법은 *cis-trans* C18:1 FAME 이성질체 분리에 매우 적합합니다(그림 2).

비록 *trans* 이성질체 중 미미한 수준의 동시 용리를 보이는 것들이 있으나, *trans* 그룹은 *cis*-C18 단일포화 이성질체로부터 잘 분리되었으며, 이는 *trans* 지방산이 AOAC Official Method 2012.13에서 그룹으로 보고되었으므로 필수적인 부분입니다.

C18:2 이성질체 분리의 특성 규명을 위해, dichloromethane 내 linoleic acid methyl ester FAME 혼합물(MilliporeSigma CRM47791)을 최종 농도 500mg/L로 희석하였습니다. 그림 3은 각 linoleic FAME 이성질체가 잘 분리되었음을 보여줍니다.

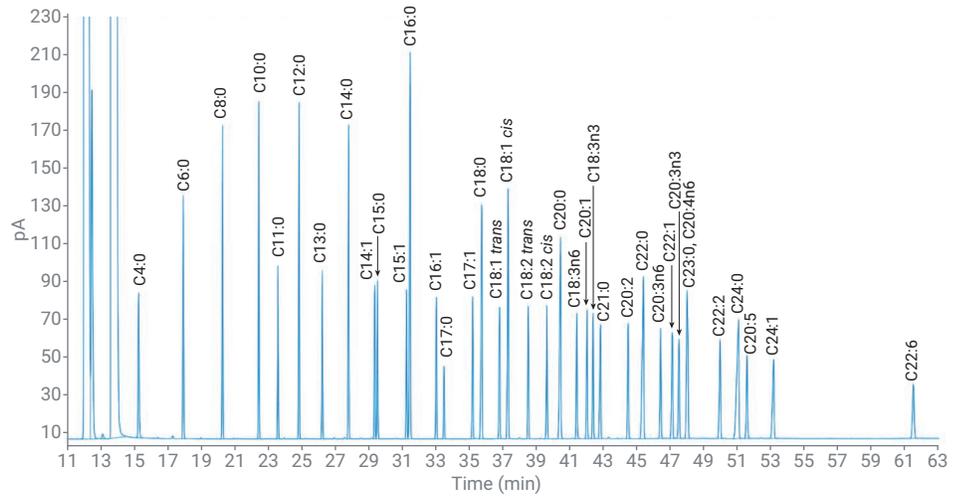


그림 1. 37가지 지방산 메틸 에스테르의 크로마토그램

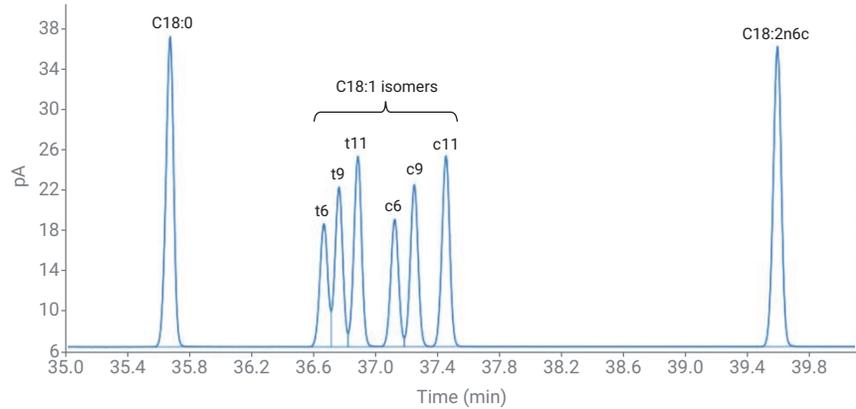


그림 2. AOAC 2012.13에서 규정한 C18:1 이성질체의 확대 크로마토그램

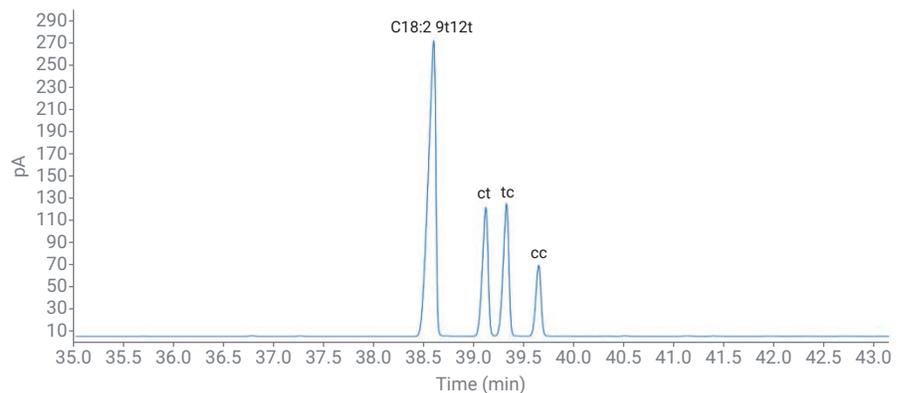


그림 3. AOAC Method 2012.13에서 규정한 C18:2 이성질체의 확대 크로마토그램

마지막으로, dichloromethane 내에서 2.5mg/mL의 농도로 희석된 linolenic acid methyl ester 혼합물(MilliporeSigma L6031) 주입을 통해 C18:3 이성질체에 대한 분석법 성능을 시험하였습니다(그림4). 어떤 컬럼도 linolenic acid 이성질체를 완전히 분리하지 못하였으나, 영양 성분 보고의 목적을 위한 *alpha*-linolenic acid methyl ester로부터의 trans 포함 이성질체 분리는 우수하게 진행되었습니다.

Method AOAC 2012.13은 검량 전에 성능 평가 확인을 요구합니다. 분리능은 *trans*-C18:1n13t/C18:1n14t와 *cis*-C18:1n9c/C18:1n10c 피크 사이에서 측정되었습니다(그림 5, 삽도). 공식 1로 계산된 R 값이 1.00 이상일 경우에 수용 가능한 분리능이 성취되었습니다. 정성 *cis-trans* FAME Column Performance 혼합물(MilliporeSigma 40495-U)을 5회 반복 주입하여 분리능과 면적/머무름 시간 재현성을 평가하였습니다.

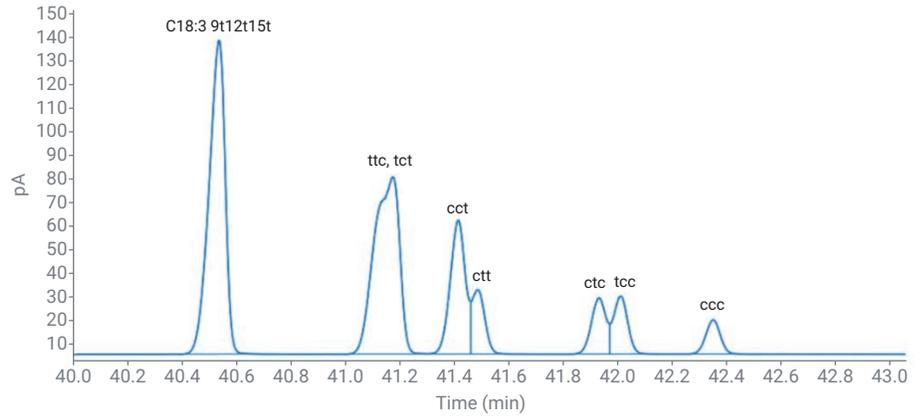


그림 4. AOAC Method 2012.13에서 규정한 C18:3 이성질체 분리능을 보여주는 확대 크로마토그램

$$R = 1.18 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.5h1} + W_{0.5h2}} \right)$$

공식 1. 절반 높이에서의 피크 분리능

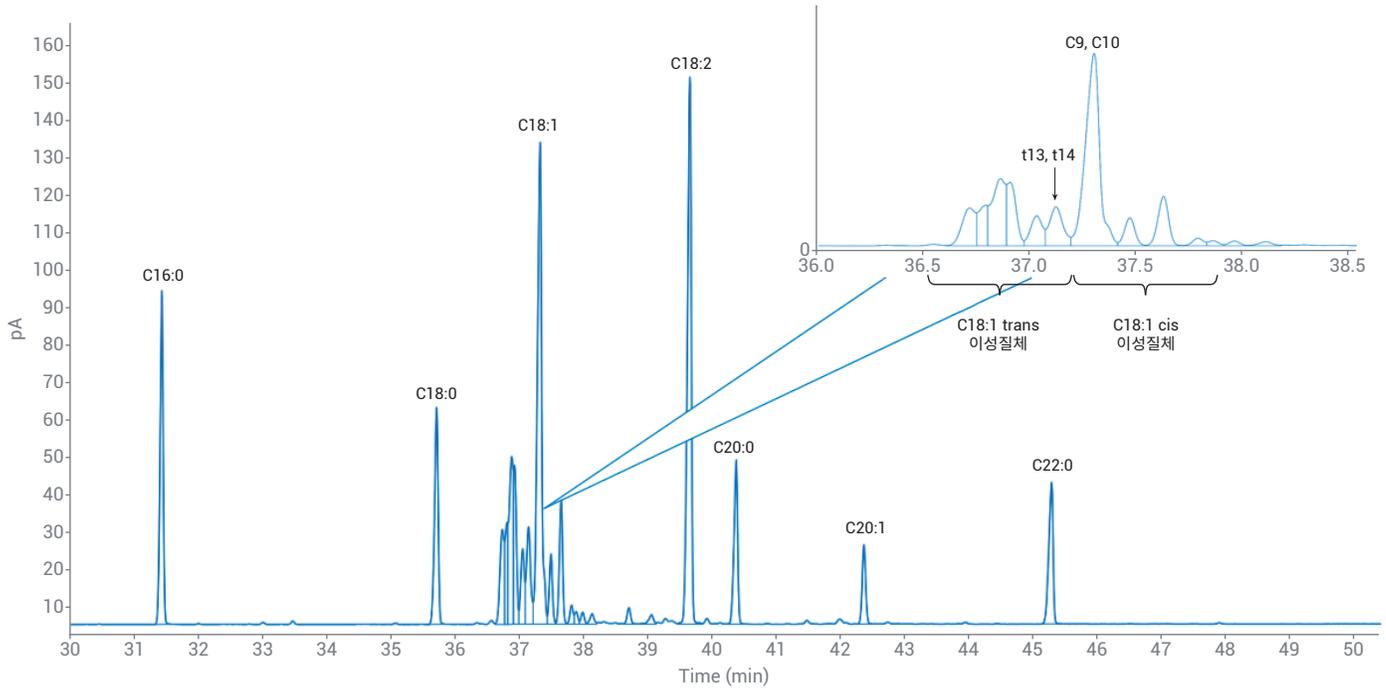


그림 5. 정성적 컬럼 성능 표준물질의 확대 크로마토그램

표 2는 분리능 확인에 사용된 가장 유사한 두 성분(critical pair)의 결과를 요약해 보여줍니다. 두 이성질체의 머무름 시간 재현성은 0.007% 상대 표준편차(RSD)로 우수합니다. 피크 면적 정밀도는 각 이성질체에 대해 2.5% RSD 미만입니다. 1.494의 절반 높이에서의 평균 피크 분리능은 분석법의 최저 분리능 요구를 능가합니다.

머무름 시간 고정(RTL)

AOAC 2012.13에 따라 분석한 다양한 FAME는 적절한 식별을 위해 온도와 유속 정밀도를 모두 필요로 하며, 결과적으로 이는 RTL에 매우 적합한 방법입니다. Agilent RTL은 주어진 장비에 대해 장기적인 재현성을 제공하며, 컬럼 유지보수 후 머무름 시간을 조절할 필요가 없습니다. 이 분석법을 다른 GC로 옮긴 후 동일한 머무름 시간을 유지할 수 있으므로, 분석법 이전을 쉽게 하고 실험실 간 비교를 간소화합니다. RTL은 여러 번의 참조 분석 동안 주입구 파라미터와 머무름 시간 간 관계 연구를 통해 특정 화합물에 대한 올바른 머무름 시간을 찾아내 고정하며, 결과를 활용해 시스템을 교정하고, 분석법 파일 내에 그 관계에 관한 정보를 저장합니다.

Agilent OpenLab CDS 2 Acquisition은 RTL 마법사를 통해 작업자에게 고정을 위한 수집 방법과 이전에 수집된 데이터 파일로부터 선택한 표적 화합물을 선택하는 절차를 안내합니다. 그 후 RTL 마법사는 지정된 수집 방법에 의해 규정된 파라미터를 기초로 일련의 압력 교정 실행을 설정합니다. 원래의 압력 설정값에서 1회 실행을 하고, 압력을 수집 방법 설정값에서 각각 15% 이상/이하로 변경하여 2회의

실행을 수행합니다. 압력 설정값의 편차는 유지보수(예를 들어 컬럼 트리밍과 같은) 실행 후 일반적으로 발생하는 컬럼 길이의 변화 효과를 모사합니다. 고정된 분석법은 컬럼 유지보수 또는 교체 후 머무름 시간 재정렬을 필요로 하지 않으며, 기존의 장비

머무름 시간은 간단한 재고정 표준물질을 통해 일치될 수 있습니다. 만약 재고정 표준물질도 컬럼 성능 평가 표준물질로 기능한다면, 사용자는 AOAC Method 2012.13에 규정된 성능 평가 요건을 한 단계만에 충족시킬 수 있습니다.

표 2. 정성적 컬럼 성능 FAME 표준물질 혼합물의 5회 반복 주입 결과

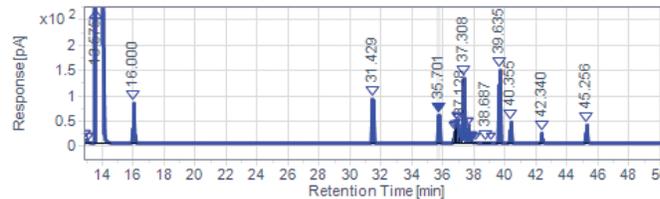
값	설명	1회	2회	3회	4회	5회	RSD
t _{R1}	머무름 시간(분), t13/t14 피크	37.124	37.125	37.128	37.128	37.13	0.007%
t _{R2}	머무름 시간 2(분), c9/c10 피크	37.304	37.305	37.308	37.308	37.31	0.007%
	면적 t13/t14 피크	115.605	113.463	117.747	115.944	120.812	2.356%
	면적 c9/c10 피크	599.259	588.91	610.828	602.276	628.644	2.458%
W _{0.5H1}	절반 높이에서의 너비, t13/t14 피크	0.073	0.072	0.073	0.073	0.074	0.969%
W _{0.5H2}	절반 높이에서의 너비, c9/c10 피크	0.069	0.069	0.069	0.069	0.07	0.646%
R	절반 높이에서 피크 분리능	1.496	1.506	1.496	1.496	1.475	0.77%

To complete the RTL calibration, the wizard will perform three runs. The first run is completed at a flow/pressure lower than the method setpoint, the second run is completed at the flow/pressure in the method, and the third run is completed at a higher flow/pressure than the method setpoint. Specify the pressure change for runs 1 and 3, and specify the sample vials for each of the runs. For liquid samples, this can be the same vial. For headspace samples, prepare three separate vials.

Run #	% Change in Pressure	Pressure	Vial Number
1	-15%	21.673 psi	107
2		25.498 psi	107
3	+15%	29.323 psi	107

Injection Source: GC Injector - Front

From the chromatogram or table below, please select the retention time of your locking compound. If you wish to set that retention time to a specific value, please enter that in the "Targeted Retention Time" box.



Targeted Retention Time: 35.701 min

Targeted Compound Name: C18:0

Peak Number	Compound Name	Retention Time	Area
7	C18:0	35.7009	229.6815
8	C18:1n6t	36.7209	113.8100
9	C18:1n9t	36.7966	77.3611
10	C18:1n11t	36.8657	202.8851
11		36.9096	129.4210

그림 6. 머무름 시간 고정 마법사 설정 화면

cis-trans FAMES Column Performance Mix 표준물질이 머무름 고정 분석법에 사용되었습니다. 이전에 수집된 성능 혼합물 표준물질 주입으로부터 수집 방법, 처리법, 처리 결과 파일이 선택되었습니다. RTL을 위한 표적 화합물로서 C18:0을 선택하였습니다. 그림 6에 보이는 바와 같이, RTL Wizard는 C18:0 피크와 35.701분의 표적 머무름 시간을 사용해 압력 고정 절차를 안내하였습니다. RTL 마법사의 일정대로 진행된 3회 연속 자동 실행에서 얻어진 압력 고정 곡선은 우수한 상관관계를 나타냈습니다(그림 7). 분석법은 그 후 25.498psi의 지시 압력에서 고정되었습니다. 그 후, CP-Sil 88 100m 컬럼의 헤드 부분을 약 0.5m 트리밍하여 컬럼 유지보수를 수행하였습니다.

컬럼 길이의 변화로 인한 머무름 손실 정도를 평가하기 위해, *cis-trans* FAMES Column Performance Mix 표준물질을 유지보수 후 재분석했으며, 표적 C18:0 피크의 머무름 시간이 약 0.232분 가량 당겨졌습니다. 시스템의 머무름 시간이 고정되지 않았다면,

작업자는 원하는 분석 대상 FAME를 포함하는 표준물질 분석을 수행하고, 데이터 처리법에서 수동으로 분석물질의 머무름 시간을 재입력해야 할 것입니다.

분석물질의 새로운 머무름 시간을 수동으로 재입력하는 대신, 분석법은 RTL Wizard를 통해 재고정되고, 새로운 압력 설정값 25.253psi가 적용되었습니다. 이 새로운 압력 설정값은 컬럼 길이의 변화를 수용해 예상되는 머무름 시간을 확정하고, 따라서 보다 빠른 시스템 준비를 가능하게 합니다. *cis-trans* FAMES Column Performance Mix 표준물질을 재주입해 새로운 압력

설정값이 예상한 머무름 시간의 결과를 제공하는지 확인하였습니다. 그림 8은 결과 요약과 크로마토그래피 오버레이를 보여줍니다. 고정된 컬럼 트리밍 이후의 머무름 시간은 기존의 머무름 시간, 트리밍 이전의 머무름 시간과 거의 일치했으며, 머무름 시간 변화 범위는 100m 컬럼에서 각 주요 분석물질당 0.000~0.009 분이었습니다. 실제 C18:0 머무름 시간인 35.700분과 초기 표적 머무름 시간인 35.701분의 상대적 차이는 0.0028%였습니다.



그림 7. 머무름 시간 고정 압력 고정 결과

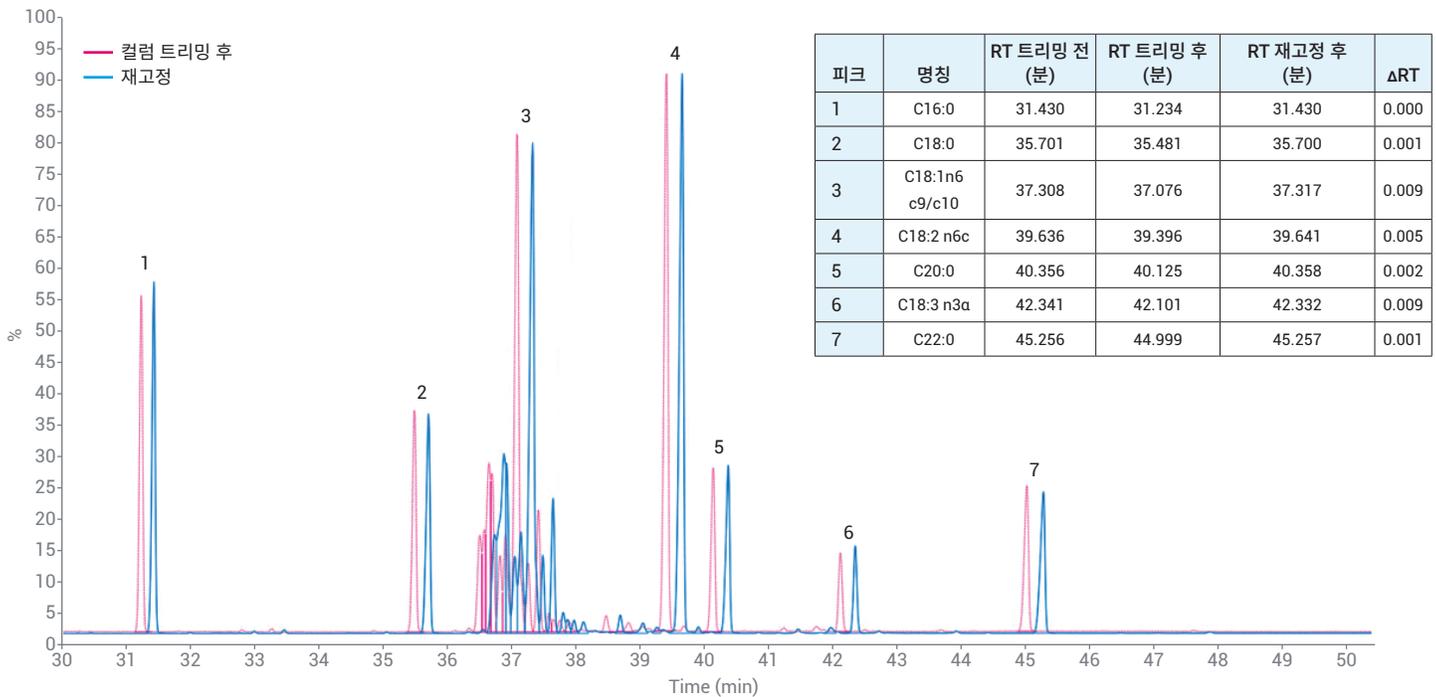


그림 8. 재고정 전과 후의 컬럼 성능 표준물질의 확대 크로마토그래피 오버레이 및 결과

결론

Agilent 8890 GC 시스템에서 Agilent CP-Sil 88 100m 컬럼을 사용해 수행한 FAME 이성질체의 분리는 AOAC Method 2012.13 에서 규정한 최소 분리 성능 요구를 능가하는 신뢰할 수 있는 분리능을 보여줍니다. 특화된 FAME Column Performance 표준물질에 대해 우수한 주입 재현성이 나타났으며, 머무름 시간 RSD는 2개의 주요 C18 이성질체에 대해 0.007%로 나타났습니다. 마지막으로, 애질런트 특유의 RTL 기능과 컬럼 성능 표준물질을 함께 사용함으로써 지속적으로 올바른 FAME 이성질체 식별이 가능했으며, 장비 유지보수 후 더 빠른 가동 시간, 더 쉬운 실험실 간 비교가 가능해졌습니다.

참고문헌

1. Official Methods of Analysis AOAC International, Method 2012.13, **2012**.
2. David, F.; Sandra, P.; Vickers, A. K. Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-3760EN, **2005**.
3. Zou, Y.; Wu, H. Improving the Analysis of 37 Fatty Acid Methyl Esters. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8706EN, **2018**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 11월 15일, 한국에서 인쇄,
5994-1184KO

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

