

UV-Vis 측정을 위한 고유한 멀티채널 Sipper 플로우 셀 펌프의 장점

Sipper와 수동 큐벳 측정을 비교할 때 시간 절약 및 향상된 측정 정밀도로 보는 차이



저자

Dr. Wesam Alwan
Agilent Technologies Inc.

서론

실험실에서 일상적인 측정을 수행하는 분석 시스템의 처리량을 증가시키면 시간과 비용을 절약할 수 있습니다. 그러나 분석 정확도 또는 정밀도를 저하시키면서 처리량을 증가시킬 수는 없습니다. UV-Vis 분광 광도계 사용 시 효율성을 고려할 때, 시료 취급은 일반적으로 큐벳을 수동으로 충전, 취급 및 세척할 때 주요 제한 사항입니다.

이 연구에서는 분광 광도계에 위치한 플로우 셀을 통해 액체 시료를 펌핑하도록 설계된 연동 펌프를 사용할 때와 수동 측정을 이용할 때를 비교했습니다. 액세서리인 Cary Sipper는 분광 광도계의 소프트웨어에서 제어할 수 있어 분석법의 필수적 부분으로 취급할 수 있습니다.

Cary Sipper는 3개의 채널로 설계되어 3개의 액체 시료를 UV-Vis 분광 광도계로 동시에 펌핑할 수 있다는 점에서 독특합니다. 그 덕분에 Cary 3500 UV-Vis 시스템의 동시 측정 능력이 보완되고 시료 자동화의 뚜렷한 장점을 더욱 부각시킵니다.

본 비교 연구는 시판되고 있는 발포정에서 비타민 C(L-ascorbic acid)를 정량하는 일반적인 분석 응용을 이용하여 분석을 수행했습니다.

실험

표준물질 전처리

50.0밀리그램의 순수 L-ascorbic acid를 23.5°C에서 100mL의 0.1M HCl에 용해시켜 pH 1.5의 500mg/L 원액을 생성하는 방법으로 L-ascorbic acid 원액을 제조했습니다. 그런 다음, 이 원액을 0.1M HCl로 희석시켜 표 1에 나타낸 바와 같이 0~70mg/L 농도의 8가지 표준물질을 제조했습니다. 이 표준은 약 0~4 흡광도 단위의 흡광도 범위를 포함하며, 이는 기존의 일상적인 스캔 UV-Vis 분광 광도계 범위에 해당합니다. 모든 측정(Cary Sipper 사용 및 사용하지 않음)에는 동일한 표준물질 용액이 사용되었습니다.

표 1. 제조된 표준물질의 농도와 측정된 평균 흡광도(n = 3).

표준물질 ID	농도(mg/L)	흡광도
표준물질 1	0	0.0014
표준물질 2	10	0.5893
표준물질 3	20	1.1584
표준물질 4	30	1.7088
표준물질 5	40	2.2768
표준물질 6	50	2.8228
표준물질 7	60	3.4147
표준물질 8	70	3.9120

시료 전처리

시판되고 있는 비타민 C 발포정을 지역 약국에서 구입했습니다. 표지에는 각 정제에 1000밀리그램의 비타민 C가 함유한 것으로 표시되었습니다. 각 20정씩 무게를 기록하고(표 2) 각 정제를 막자사발과 막자를 이용해 분말로 분쇄했습니다. 각 시료에 대해 얻어진 분말은 5.5~28.0mg 범위에서 다양하게 채취했습니다. 분말을 100mL의 Milli-Q 여과수에 용해시키고 23.5 °C에서 pH 1.5로 맞췄습니다. 이렇게 0~70mg/L의 검량 범위 내에 있는 20개의 시료를 제조했습니다. 모든 측정(Cary Sipper 사용 및 사용하지 않음)에는 동일한 시료 용액이 사용되었습니다.

제품 표지에 따라 각 정제에 1000mg의 비타민 C를 함유한다는 가정하에 각 시료 용액에서 비타민 C의 양을 계산했습니다. 이 계산은 각 정제의 무게 및 각 시료 용액을 제조하기 위해 사용된 분쇄된 정제 분말의 중량을 기준으로 했습니다. 각 시료 용액의 최종 농도도 계산했습니다. 계산된 값을 표 2에 나타냈습니다.

표 2. 20정 비타민 C 각각의 무게와 각 시료를 제조하는 데 사용된 분말 정제의 무게.

시료 번호	정제 무게 (mg)	채취한 양 (mg)	시료 용액 내 비타민 C 함량 계산값 (mg)	시료 용액 내 비타민 C 농도 계산값 (mg/L)
1.	4209	16.6	3.9	39.4
2.	4253	19.0	4.5	44.7
3.	4239	28.0	6.6	66.1
4.	4212	11.9	2.8	28.3
5.	4247	5.5	1.3	13.0
6.	4239	18.0	4.2	42.5
7.	4238	22.1	5.2	52.1
8.	4231	16.5	3.9	39.0
9.	4242	28.0	6.6	66.0
10.	4201	7.5	1.8	17.9
11.	4219	18.4	4.4	43.6
12.	4229	18.0	4.3	42.6
13.	4214	6.5	1.5	15.4
14.	4219	24.0	5.7	56.9
15.	4261	20.8	4.9	48.8
16.	4209	13.8	3.3	32.8
17.	4234	15.0	3.5	35.4
18.	4241	13.0	3.1	30.7
19.	4268	17.6	4.1	41.2
20.	4229	8.0	1.9	18.9

기기

본 연구에는 Agilent Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계가 사용되었습니다. Cary 3500 기기의 이러한 구성에서 최대 8개의 큐벳 위치를 동시에 측정할 수 있습니다(7개의 시료 및 하나의 레퍼런스물질). 절반의 측정은 기기 시료부 내부에 위치한 3개의 플로우 셀을 통해 3개의 시료 용액을 동시에 펌핑할 수 있는 Cary Sipper(그림 1 참조)를 기기에 장착했습니다. 남은 절반의 측정은 용액을 수동으로 큐벳으로 옮긴 다음 분광기로 옮겼습니다.



그림 1. Cary 3500 Multicell UV-Vis 분광 광도계에 연결된 Cary Sipper 액세서리.

Sipper 주입구 튜브를 분석할 용액이 들어 있는 15mL Falcon 튜브에 삽입하여 Sipper 측정을 수행했습니다. 그런 다음 용액을 단일 10mm 경로 길이의 390µL 석영 플로우 셀 내로 펌핑했습니다. 교차 오염을 방지하기 위해 스캔 사이에 Milli-Q 여과수로 플로우 셀을 헹궈줍니다. 각 표준물질과 시료의 측정을 3회 반복했습니다.

Cary Sipper 펌프는 80rpm의 고정 속도로 작동합니다. 측정 전에 플로우 셀을 통해 용액을 펌핑하는 데 필요한 시간을 ‘채움’ 시간이라고 합니다. 용액이 가라앉도록 펌핑하지 않는 이후 시간을 ‘유지’ 시간이라고 합니다. Sipper의 마지막 설정은 린스 용액이 셀을 통해 펌핑되는 시간이고, 이는 ‘린스’ 시간이라고 합니다. 세 가지 시간 모두 Cary UV Workstation 소프트웨어에서 설정하며 분석법의 일부로 저장할 수 있습니다.

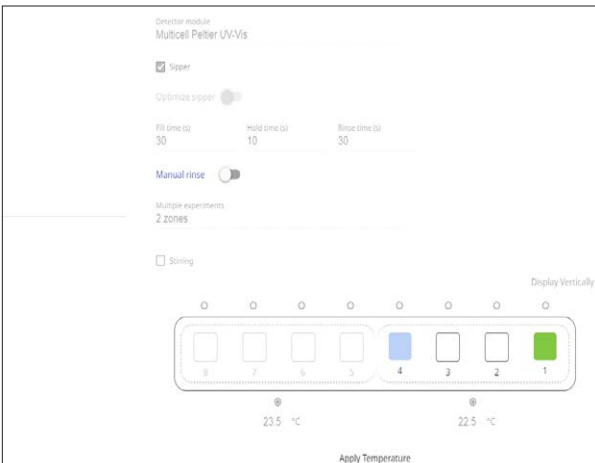


그림 2. Cary UV Workstation 소프트웨어에 있는 Cary Sipper 액세서리에 대한 제어.

남은 절반의 측정은 표준 10mm 경로 길이의 3.5mL 석영 큐벳을 사용했습니다. 여기에 수동으로 시료 용액을 채우고 각 측정 후에 Milli-Q 여과수로 헹궈줍니다. 각 표준물질과 시료의 측정을 3회 반복했습니다.

두 기기 설정 모두에 동일한 표준물질과 시료 용액을 사용하여 결과를 직접 비교할 수 있도록 했습니다.

Cary UV Workstation 소프트웨어에서 농도 애플리케이션을 사용하여 측정을 수행했습니다. 이 애플리케이션은 검량선을 생성하고 검량선을 기반으로 시료 농도를 확인하기 위한 분석법을 제공합니다.

각 표준물질과 시료의 파장 스캔(표 3에 나열한 파라미터 사용)을 350~200nm 범위에서 수행했습니다. 시료는 0.1µM HCl을 사용하여 베이스라인 보정을 수행했으며, 243nm에서의 피크는 정량에 이용했습니다. 그런 다음 각 표준물질에 대해 얻어진 흡광도 값을 이용하여 검량선을 생성했습니다. 시료는 동일한 기기 파라미터를 이용해 측정하고, 각 시료의 비타민 C 함량을 정량했습니다.

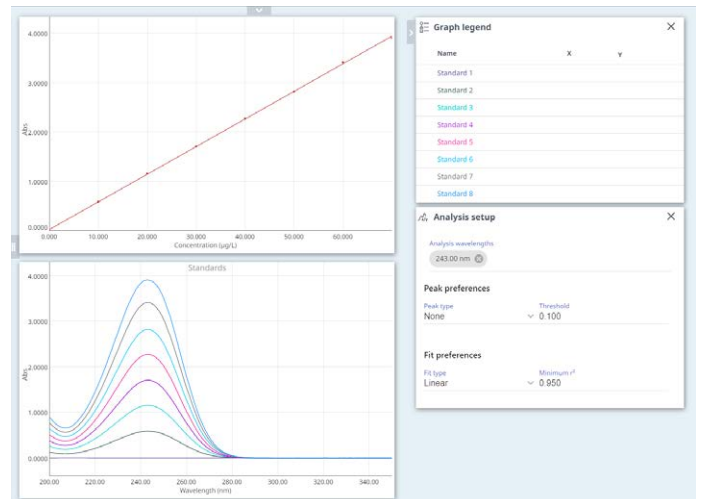


그림 3. 각 표준 용액의 파장 스캔. 243nm에서의 흡광도를 검량선 생성과 이후 시료 정량에 이용했습니다.

Cary Sipper를 사용하면 큐벳을 수동으로 채우는 것보다 빠를 가능성이 있으므로 절약되는 시간을 수확하기 위해 일련의 측정을 수행했습니다. 30개의 용액(표준물질 10개 및 시료 20개)을 4가지 방식으로 측정했습니다.

1. Sipper 없이 단일 3.5mL 큐벳 사용. 측정할 때마다 큐벳을 수동으로 채우고, 비우고, 헹구는 작업을 반복합니다.

- Sipper 없이 세 개의 표준 3.5mL 큐벳 사용. 측정할 때마다 큐벳을 수동으로 채우고, 비우고, 행구는 작업을 반복합니다. Cary 3500 멀티셀 기기의 동시 측정 기능을 사용하여 세 개의 큐벳을 동시에 측정했습니다.
 - Sipper를 이용해 단일 플로우 셀로 펌핑.
 - Sipper를 사용해 3개의 플로우 셀로 펌핑.
- 측정은 표 4에 나타난 기기 파라미터를 사용하여 수행했습니다.

표 3. 정량 측정에 사용된 기기 파라미터.

파라미터	설정
파장 범위(nm)	200~350
스펙트럼 대역폭(nm)	1
평균 시간(초)	0.1
데이터 간격(nm)	1
플로우 셀 부피(μL)	390
채움 시간(초)	30
유지 시간(초)	10
린스 시간(초)	30

표 4. 속도 비교 측정에 사용된 기기 파라미터.

파라미터	설정
파장 범위(nm)	200~350
스펙트럼 대역폭(nm)	1
평균 시간(초)	0.1
데이터 간격(nm)	1
플로우 셀 부피(μL)	390
채움 시간(초)	15
유지 시간(초)	5
린스 시간(초)	15

결과 및 토의

검량 직선성

Cary Sipper를 사용하여 8개의 표준물질에서 생성된 검량선의 R² 값은 0.9997이고, 큐벳 측정에서 생성된 곡선의 R² 값은 0.9998 이었습니다. Cary 3500은 3Abs 이상의 뛰어난 광도 직선성을 가지고 있어 고농도의 액체 시료로 정확한 광도 측정 결과를 얻을 수 있습니다.

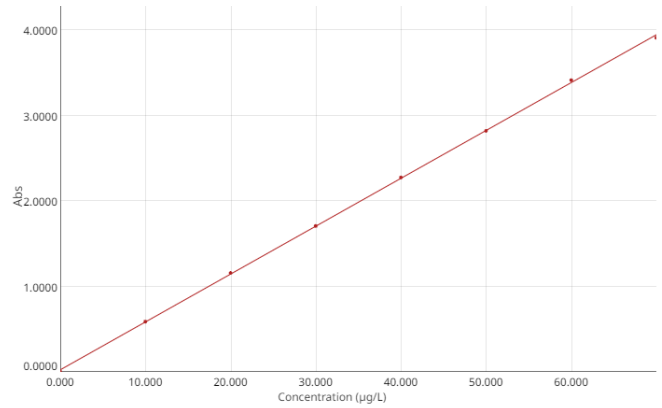


그림 4. 수동으로 채워진 석영 큐벳을 사용하여 생성된 검량선.

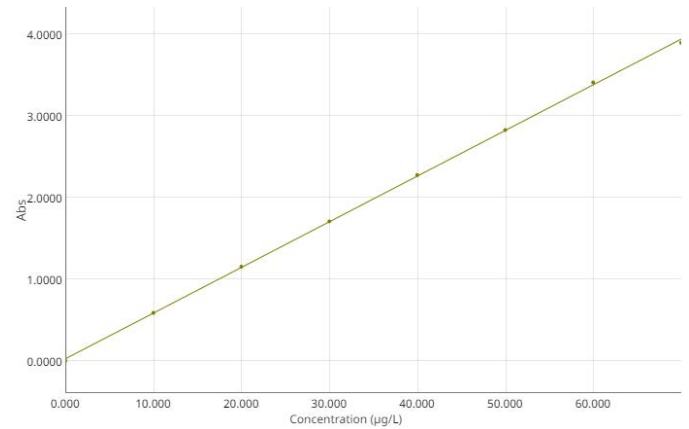


그림 5. Cary Sipper를 사용하여 생성된 검량선.

측정 정밀도

20개의 시료 용액 각각을 두 기기 구성에서 세 번 측정했습니다. Cary Sipper를 사용하는 경우, 시료 용액을 플로우 셀로 펌핑하고 측정 후, 린스 용액으로 교체한 후 플로우 셀을 다시 동일한 시료 용액으로 채웠습니다. 이 절차를 20개의 시료 각각에 대해 세 번 반복했습니다. 3.5mL 큐벳을 사용하는 경우, 큐벳을 시료로 채우고 측정 후, 행구고 동일한 시료의 또 다른 분취량을 다시 채웁니다. 이 절차를 20개의 시료 각각에 대해 세 번 반복했습니다.

표 5에 나타난 바와 같이, 두 결과 세트 모두 높은 수준의 정밀도를 보였으며, %RSD 값이 약전 분석법에서 일반적으로 지정하는 2%보다 훨씬 낮았습니다. 6개의 측정 모두에 대한 %RSD는 0.1869%인 것으로 나타났습니다.

표 5. 20개의 시료를 측정하여 얻은 흡광도 데이터로, 각 시료를 각 기기 설정으로 세 번씩 측정했습니다. 마지막 %RSD 열은 6번을 측정할 정밀도입니다.

시료	Sipper를 이용한 측정		수동 큐벳을 이용한 측정		%RSD n=6
	평균 n=3 (Abs)	%RSD	평균 n=3 (Abs)	%RSD	
1	2.2091	0.0775	2.2153	0.0197	0.1470
2	2.4895	0.3394	2.4763	0.0400	0.3313
3	3.8029	0.0462	3.7888	0.1150	0.1988
4	1.5972	0.1706	1.5912	0.0142	0.2119
5	0.7646	0.0991	0.7666	0.0190	0.1435
6	2.4438	0.0372	2.4353	0.0398	0.1766
7	3.0153	0.1773	3.0050	0.0315	0.1997
8	2.1405	0.2443	2.1333	0.0921	0.2277
9	3.6846	0.1805	3.6816	0.0161	0.1121
10	1.0538	0.1516	1.0581	0.0394	0.2241
11	2.4493	0.2714	2.4367	0.0441	0.3037
12	2.4525	0.2948	2.4351	0.0256	0.3941
13	0.8735	0.1588	0.8722	0.0330	0.1209
14	3.1695	0.2032	3.1676	0.0525	0.1248
15	2.7457	0.1754	2.7409	0.0389	0.1364
16	1.7695	0.2143	1.7631	0.0086	0.2186
17	2.0182	0.1966	2.0190	0.0207	0.1160
18	1.7909	0.1568	1.7863	0.1621	0.1818
19	2.3171	0.0425	2.3193	0.0129	0.0539
20	1.1099	0.0229	1.1098	0.1987	0.1157

시료 정량

각 시료의 3가지 흡광도 측정 평균값과 검량선을 이용해 Beer Lambert 법칙에 따라 각 시료 용액의 비타민 C 농도를 확인했습니다. 그런 다음 이 농도를 측정된 각 정제에서 비타민 C의 무게를 계산하는 데 사용했습니다. 결과는 표 6에 나타냈습니다. Sipper 설정을 사용하여 계산된 무게와 표지 무게의 평균 차이는 1.8%인 것으로 나타났으며, 그 범위는 0.5~5.3%였습니다. 큐벳을 사용하여 측정했을 때 동일한 20개 시료에 대한 평균 차이는 1.9%인 것으로 나타났으며, 그 범위는 0.6~5.6%였습니다. 결과는 USP(1)에 명시된 바와 같이 ascorbic acid 정제에 대한 ±10% 수용 기준 내에 있는 것으로 나타났으며, 정제가 표지 요구사항을 충족했음을 보여줍니다.

표 6. 두 가지 기기 설정을 사용하여 계산된 각 시료의 농도. 각 정제의 비타민 C 함량을 시료 농도로부터 계산했고 이를 각 정제에 명시된 표지값 1000mg과 비교했습니다(% 차이).

시료 번호	Sipper 설정			큐벳 설정		
	측정된 농도 (mg/L)	비타민 C 함량 계산값 (mg)	계산된 값과 라벨값 사이의 차이 (%)	측정된 농도 (mg/L)	비타민 C 함량 계산값 (mg)	계산된 값과 라벨값 사이의 차이 (%)
1	39.00	988.9	1.1	39.12	991.9	0.8
2	44.01	985.1	1.5	43.78	980.0	2.0
3	67.46	1021.3	2.1	67.22	1017.6	1.7
4	28.07	993.6	0.6	27.97	990.2	1.0
5	13.21	1019.7	1.9	13.25	1023.2	2.3
6	43.19	1017.2	1.7	43.05	1013.8	1.4
7	53.40	1023.9	2.3	53.22	1020.6	2.0
8	37.78	968.7	3.2	37.65	965.6	3.6
9	65.35	990.0	1.0	65.30	989.4	1.1
10	18.37	1028.9	2.8	18.46	1033.8	3.3
11	43.29	992.6	0.7	43.07	987.6	1.3
12	43.35	1018.4	1.8	43.05	1011.3	1.1
13	15.15	982.2	1.8	15.13	981.2	1.9
14	56.15	987.1	1.3	56.12	986.6	1.4
15	48.58	995.2	0.5	48.51	993.7	0.6
16	31.15	950.1	5.3	31.05	946.9	5.6
17	35.59	1004.6	0.5	35.62	1005.3	0.5
18	31.53	1028.7	2.8	31.46	1026.3	2.6
19	40.93	992.5	0.8	40.98	993.7	0.6
20	19.37	1024.1	2.4	19.38	1024.4	2.4

측정 시간

Cary Sipper는 수동으로 큐벳을 채우는 방법과 비교해 시간을 상당히 절약했습니다. 표 7과 같이 3개의 플로우 셀이 있는 Sipper를 사용하면, 표준 큐벳을 사용한 시료를 하나씩 측정할 때와 비교해 30개의 시료를 측정하는 시간이 65% 단축되었습니다. Sipper를 사용하지 않고 동시에 3개의 큐벳을 측정하면 단일 큐벳을 3번 채우고 비우고 다시 채우는 것과 비교해 24%의 시간을 절약할 수 있었습니다. 3개의 플로우 셀과 함께 Sipper를 사용하면 Cary 3500 멀티셀 기기에서 동시에 3개의 큐벳을 사용하는 수동 작업에 비해 54% 더 빨랐습니다.

표 7. 4가지 기기 설정을 사용하여 30개의 시료를 측정하는 데 걸린 시간.

작동 모드	측정 시간 n = 30	시간 단축(% (단일 큐벳 구성의 수동 처리와 비교))
수동 큐벳 처리		
1. 콤팩트 모듈 (시료 큐벳 1개)	21분 30초	
2. 멀티셀 모듈 (시료 큐벳 3개)	16분 26초	24%
Sipper 사용 채움 시간(15초), 유지 시간(5초), 린스 시간(15초)		
3. 플로우 셀 1개	19분 32초	9%
4. 플로우 셀 3개	7분 30초	65%

결론

이 연구에서는 Cary Sipper를 사용하여 UV-Vis 분광 광도계에서 측정하도록 용액을 펌핑하는 방법과 표준 큐벳을 수동으로 채우고 비우는 방법을 비교했습니다. Sipper가 수동 측정보다 정확하고 65% 더 빠른 것으로 밝혀졌습니다.

서로 다른 두 가지 설정을 사용하여 측정한 시료의 흡광도는 밀접하게 관련되어 있었습니다. 6가지 측정 모두에서 %RSD는 0.1869인 것으로 나타났고 높은 수준의 정밀도를 보였습니다.

Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계의 동시 측정 기능을 사용하여 세 가지 시료를 동시에 측정하면, 표준 큐벳을 사용하여 이러한 시료를 측정할 때보다 속도가 24% 더 빠른 것으로 나타났습니다.

Sipper 설정은 기기 소프트웨어에서 제어했으며 기기 분석법의 일부로 저장할 수 있습니다. 이를 통해 분석에서 일관된 설정을 사용할 수 있습니다.

결과적으로 Cary Sipper가 장착된 Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계는 여러 액체 시료의 일상적인 측정에 이상적인 기기인 것으로 입증되었습니다. 이 기기는 빠른 분석 속도를 제공하여 워크플로의 시간을 상당히 단축했습니다. Cary 3500은 넓은 흡광도 범위로 시료의 희석 필요성을 줄이고 큐벳을 사용한 수동 시료 측정보다 향상된 정밀도와 정확도를 제공합니다.

참고문헌

1. Dietary Supplements Compendium, 2019, United States Pharmacopeia, US Government Printing Office: Washington, DC, 2019

www.agilent.com/chem

DE.9264236111

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 5월 1일, 한국에서 인쇄
5994-1951KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
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

