

# 이온 크로마토그래피를 이용한 미량 암모니아 분석법

## Determination of Ammonia in High concentration of Sodium Ion

### By Sykam Ion Chromatography S150 Plus

By S.W. Ha in Ajoo Scientifics

암모니아(Ammonia)는 대표적인 이온 크로마토그래피에서 분석되는 양이온 분석물입니다.

일반적으로 암모니아는 소듐이온과 비슷한 시간대에 용리되기 때문에 소듐을 통해 간접적으로 농도를 측정하는 탄산수소나트륨, 탄산나트륨 등의 분석에 영향을 줄 수 있습니다.

또한 암모니아는 그 자체로도 인체에 유해한 물질로 분류되어 식품 및 제약 산업 전반적으로 규제와 제한이 존재하는 물질입니다.

대표적으로 암모니아에 대한 규제와 분석에 대한 적격성 평가는 미연방 약전(USP)에서 제시하는 분석조건이 있습니다.

하지만 해당 방법은 실험의 방법과 유지에 대한 어려움이 있기에 본 문서에서는 보다 간편한 방법인 이온크로마토그래피법을 통해 암모니아 측정을 하고자 합니다.

암모니아와 탄산수소나트륨의 질량비가 1:50,000 일 때 암모니아의 검출 여부와 분석법의 신뢰도를 평가합니다.

이때 정밀성, 특이성, 회수율 등의 평가는 USP <1225>

Validation of analytical Compendial를 참고해 평가됩니다.

음이온 분석과는 다르게 양이온 분석의 경우 이동상 내 용리제 이온의 농도를 낮추는 기술인 서프레션의 필요성에 대해 분쟁이 있습니다.

서프레션을 적용할 경우 낮은 베이스 라인 전도도를 가지게 됩니다. 대략 1uS 이하의 전도도를 가지며 이에 따라 미량 분석에 용이합니다. 하지만 일반적으로 양이온 분리 용리액으로 사용되는 메탄술폰산과 결합해 염을 형성하는 아민, 암모니아 염을 형성하는 물질들의 회수율 및 직선성이 훼손될 수 있습니다. 하지만 낮은 베이스라인 전도도와 작은 노이즈를 보입니다.

반대로 서프레션 기술을 적용하지 않을 경우 암모니아 및 1, 2차 아민 물질들에 대한 회수율 및 직선성이 비교적 뛰어납니다. 하지만 높은 베이스라인 전도도와 낮은 컬럼 Capacity 때문에 미량 분석에 불리합니다.

본 문서의 주 목적은 고농도의 소듐 이온과 저 농도의 암모니아 이온의 분리와 분석을 평가함에 있습니다. 따라서 본 문서에서 진행될 분석은 서프레션 기술이 적용된 Sykam S150 Plus 장비와 그에 적합한 컬럼으로 진행됩니다.

Sykam에서 제공하는 양이온 분석에 사용되는 컬럼은 대표적으로 C07과 C06 컬럼이 있습니다.

이중 서프레서를 사용하는 S150 Plus 이온 크로마토그래피의 경우 Sykam C06 컬럼이 추천됩니다.

일반적으로 양이온 분리 컬럼에서 높은 Capacity를 확보하기 위해선 비교적 size가 크거나 품질이 낮은 레진을 길게 채워 넣어 Capacity를 확보하는 경우가 많습니다.

이는 필연적으로 column에 높은 압력이 걸리며 높은 압력은 짧은 수명을 야기합니다.

이와 다르게 Sykam C06의 경우 짧은 컬럼에 품질이 우수한 레진을 사용해 짧은 컬럼길이로 인한 Tailing 감소와 그에 따른 빠른 분리 및 높은 분리 한계를 자랑합니다.

만약 Sykam C06 Column보다 더 높은 Capacity와 Resolution을 원하신다면 Sykam C07 Column을 추천 드립니다.

## 사용 장비

본 분석에서 사용될 장비는 아래와 같습니다.

Sykam S 150 plus	
Detector:	Sykam S3121
Pump:	Sykam S1130
AutoSampler:	Sykam S5300
CDS:	Clarity™

## 분석 조건

본 분석은 일반적인 양이온 분석이 아닌 시스템 적합도 평가를 위한 특수한 분석입니다. 따라서 일반적인 분석 조건인 5 mM MSA with 1 ml/min flow 가 아닌 특수한 조건을 이용하며 그 분석조건은 아래와 같습니다.

Chromatographic Conditions	
Column:	Sykam C06 Cation Separation Column
Eluent:	2 mM Methanesulfonic Acid
Flow Rate:	0.45 ml/min
Run Time:	25 min
* Idle Time: 3 min	
Temperature:	30 °C (RT)
sample Loop Vol	20 uL
Injection Volume	20 uL ( Full Loop Injection)
* Full Loop injection: 샘플 루프 볼륨의 1.5~2배 주입	
Detection	Suppressed Conductivity Detection Self-regenerating Cation Suppressor
Supp. Current	10 mA
BackPressure	31 bar
Baseline Cond.	<1 uS/cm
* < 500 nS/cm 추천됨	
ASTM Noise	< 5 nS/cm

## 사용 준비

본격적인 분석에 앞서 장비를 분석에 적합한 상태로 맞춰주는 안정화 작업이 필요합니다.

특히 본 분석처럼 미량 분석의 경우 세심하고 완전한 안정화 작업 없이는 결코 좋은 결과를 얻을 수 없습니다.

먼저 저항이 18.2 m Ω 이상인 증류수를 사용하여 실험 및 분석에 사용될 모든 기구를 세척합니다. 이후 진공 혹은 불활성 기체 조건 하에 건조합니다.

이후 샘플 제조 및 이동상 제조에 사용될 모든 증류수는 증류수를 받은 그 즉시 사용해야 합니다.

이동상을 제조했다면 유속을 0.45 ml/min 으로 흘려줍니다. 이때 압력은 가드 컬럼이 없는 기준으로 12~18 bar 이내여야 합니다.

만약 압력이 너무 낮거나 흔들린다면 용액이 흐르는 라인 내에 기포가 있다는 것을 의미합니다. 이때는 펌프 헤드 옆의 동그란 밸브를 반시계방향으로 열어 충분한 퍼징을 해주고 다시 닫아 압력이 제대로 일정하게 걸리는지 확인합니다.

압력이 제대로 일정하게 걸린다면 컬럼과 이동상 그리고 서프레스 간의 안정화가 필요합니다.

서프레스를 통한 안정화는 크게 두가지 방법이 있습니다.

1. 0.2 ml/min 유속 20 mA 전류로 12시간 이상 흘림
2. 1.0 ml/min 유속 100 mA 전류로 2시간 이상 흘림

위 두가지 방법 중 하나를 택해 충분한 안정화 과정을 거쳐야 합니다. 성공적으로 안정화 과정을 거쳤다면 베이스라인 전도도(Baseline Conductivity)는 1 uS 이하로 유지됩니다. 본 분석에서는 충분한 안정화 과정을 거쳐 600 nS 이하의 베이스라인 전도도를 얻은 후 분석이 진행되었습니다.

이제 분석에 사용될 샘플 용액을 제조할 차례입니다.

용액 명과 농도는 다음 표와 같습니다.

용액명	SB 함량 [ppm]	NH4+ 함량 [ppb]	Spiking Vol. [uL]
Stock solution	2000	0	0
Solution #1	1000	20	50
Solution #2	1000	100	50
Solution #3	1000	500	50
*SB: Sodium Bicarbonate			
용액명	SB 함량 [ppm]	NH4+ 함량 [ppb]	Spiking Vol. [uL]
Solution #4	0	20	50
Solution #5	0	100	50
Solution #6	0	500	50

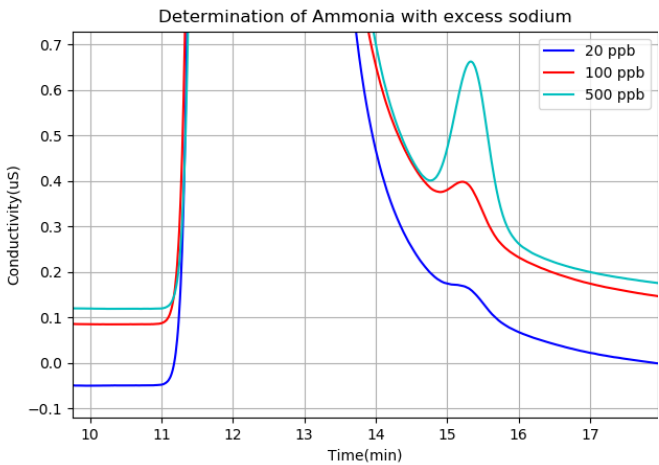
시스템의 안정화가 끝나고 위 표 대로 용액을 제조했다면 이제 분석을 할 차례입니다.

분석 시퀀스는 아래와 같습니다.

순서	Sample	반복 횟수	순서	Sample	반복 횟수
1	Bypass	6	6	Solution #3	3
2	Blank	5	7	Solution #4	3
3	Solution #1	3	8	Solution #5	3
4	Solution #2	3	9	Solution #6	3

분석 결과

분석 결과 대표 크로마토그램은 아래와 같습니다.



각 분석에 대한 결과 데이터는 아래와 같습니다.

농도 [ppb]	Ret. Time [min]	Response [us/cm.min]	농도 [ppb]	Ret. Time [min]	Response [us/cm.min]
20	15.005	0.395	100	15.215	1.796
20	15.022	0.38	500	15.337	10.488
20	15.022	0.384	500	15.28	10.612
100	15.265	1.736	500	15.273	10.679
100	15.292	1.784			

정확성[Accuracy]

정확도는 공정서의 종류에 따라 그 정확한 의미가 서로 다릅니다. 본 문서에서는 USP-NF의 암모니아 분석법을 위한 문서이므로 Validation of Analytical Compendial, USP <1225>와 ICH에서 제시 및 정의되는 정확도를 평가합니다.

정확도는 나머지 평가항목을 평가하여 간접적으로 갈음될 수도 있지만 직접적으로는 해당 물질의 회수율 계산을 통해 보일 수 있습니다. 세가지 농도의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 를 총 3회씩 반복 분석하여 교정곡선이 작성됐습니다. 이때의 교정 곡선은 "Linear Type"으로 작성됐습니다.

농도 [ppb]	회수율 [%]
20	105.37
100	94.48
500	100.54

- 20 ppb의 회수율이 100%가 넘는 이유는 아래와 같습니다.
- 1. 제조 중에 사용되는 초순수 내의 잔여 암모니아
  - 2. Quadratic, Linear Curve의 차이

이중 1번 항목은 사용되는 초순수의 품질을 관리할 경우 더 회수율이 참값에 근접하는 결과를 얻을 수 있으며 2번 항목의 경우 하단의 직선성 항목에서 설명될 항목입니다.

정밀성[Precision]

정밀성은 분석으로 얻어진 크로마토그램 데이터의 암모니아 피크의 상대표준편차로 평가될 수 있습니다. 머무름 시간(RT; Retention Time) 및 피크 면적(Response)의 상대표준편차(RSD; Relative Standard Deviation)가 평가됩니다. 평가 결과는 아래와 같습니다.

농도 [ppb]	Mean RT. [min]	Mean Area [us/cm.min]	RT. RSD [%]	Area RSD [%]
20	15.016	0.386	0.065	2.011
100	15.257	1.772	0.256	1.792
500	15.297	10.593	0.229	0.915

머무름 시간의 경우 농도와 상관없이 모두 낮은 RSD 값을 보여 일정한 머무름 시간을 얻었습니다. 피크 면적 상대 표준편차의 경우 **0.915 % ~ 2.011 %**를 얻었습니다. 이 경우 수동 적분을 사용할 경우 피크 면적 상대 표준편차의 값을 줄일 수 있습니다. 본 문서의 경우 각 농도별로 모두 동일한 적분 테이블을 적용해 더 신뢰도 높은 데이터를 얻었습니다.

## 직선성[Linearity]

20, 100, 500 ppb의  $\text{NH}_4^+$ 를 각 3회 반복분석 하였을 때 관계식은 아래와 같습니다.

Calibration Type	Equation	Correlation Factor
Linear	$Y = 0.02098 \cdot X$	0.9994
Quadratic	$Y = 4.98\text{E-}06 \cdot X^2 + 0.01857 \cdot X$	0.9998

## 검출 및 정량 한계 [LOD, LOQ]

검출한계 및 정량 한계를 구하는 방법은 여러가지가 있습니다.

USP 에서는  $2H/h$  값을 S/N 비로 정의합니다.

Bypass와 Blank 분석을 통해 10~ 20분 사이의 Noise를 측정했을 때 아래와 같습니다.

sample type	Noise [uS/cm]
Bypass	0.001500
Bypass	0.001800
Bypass	0.003200
Bypass	0.002100
Bypass	0.003500
추정 LOD [S/N = 2:1]	1.3 ppb
추정 LOQ [S/N = 10:1]	6.5 ppb

이 외에도 검량선과 충분히 낮은 농도의 샘플 반복 분석을 통한 통계적 수치도 구할 수 있으며 이 경우 아래와 같습니다.

$\text{LOD} = 3.3 \cdot \text{표준편차} / \text{검량선 기울기} = 1.221 \text{ ppb}$

$\text{LOQ} = 10 \cdot \text{표준편차} / \text{검량선 기울기} = 3.700 \text{ ppb}$

## 결론[Conclusion]

본 어플리케이션 노트에서는 Sykam 사의 이온크로마토그래피 장비를 이용한 암모니아 분석법, 특히 고농도의 Sodium이 존재하는 Matrix 내에서 미량의 암모니아 분석법과 그 타당성에 대해 알아봤습니다.

선형 검량선을 이용하여도 높은 상관계수(Correlation Factor)를 얻었으며 다른 컬럼 대비 비교적 빠른 분리와 별다른 안정화 및 컬럼 클리닝 시간 또한 없거나 매우 짧다는 장점이 있음을 알 수 있습니다.

추가적으로 더 나은 분리와 더 좋은 검출 한계를 원하신다면 Sykam C07 Column은 C06에 비해 더 작고 긴 컬럼 충진물을 사용했기에 더 좋은 선택지가 될 수 있습니다.