

크기 배제 크로마토그래프(SEC)의 원리 및 응용

김 풍 작

동일교역(주) 부설 연구소장

1. 서 론

크기 배제 크로마토그래피(SEC, Size Exclusion Chromatography)는 분석하려는 물질이 컬럼(column) 내에서 자신의 크기와 다른 것들을 배제함으로써, 크기별로 분리하는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, High Performance Liquid Chromatography)의 한 형태(mode 또는 기법)이다. HPLC의 다른 형태들과는 달리 용질(solute, 분석하려는 물질)이 이동상(mobile phase, eluent)이나 정지상(stationary phase) 사이에 상호 작용이 없는 형태의 크로마토그래피이다. 그래서, 이동상으로 사용하는 용매는 대개 분석하려는 물질을 용해할 수 있는 기능만 충족시키면 되고, 컬럼 충전제(packing material)도 여타 HPLC 형태에서 사용하는 것과 달리 정지상이 컬럼 지지체(support)에 물리적 또는 화학적 결합이 별도로 필요하지 않고, 지지체 자체(사전에 화학적 결합으로 만든 것 포함)가 충전물이 되나, 일부 충전제는 지지체에 별도 처리를 하여 사용한다.

SEC는 겔 투과 크로마토그래피(GPC, Gel Permeation Chromatography)와 겔 여과 크로마토그래피(GFC, Gel Filtration Chromatography)로 분류되는데, GPC는 컬럼 충전제 입자들의 표면에 있는 다공성(porous) 구멍(동공)의 다양한 크기, 형태, 깊이 등과 용질 분자들 사이의 유체 역학적 부피(크기나 모양)에 따라, 용질 분자들이 충전제의 동공에 머물거나 배제된다. 즉, 시료가 컬럼을 통해 지나갈 때, 용질 분자들 중 일정 크기 이하의 분자들은 이들 분자들보다 충전제의 동공이 크면 그 속에 머물게 되고, 그렇지 않으면 충전제 동공으로 들어가지 않고 배제된다. 이러한 머무름과 배제의 물리적 현상을 이용하여 용질 분자들이 분리되는 GPC는 고분자 물질 등에 널리 이용되고 있

으며, 이동상은 고분자 물질을 용해할 수 있는 유기용매가 주로 사용되고 있다.

이와는 달리 GFC의 기본 작동기구(mechanism)는 여과의 원리를 이용하여 분자량이 다른 것을 분리하는 기술로서 수용액 상태의 생화학 물질의 분리에 널리 이용된다. 즉, 비이온성인 고분자 물질($MW > 1,000$), 단백질, 아미노산, 바이러스, 탄수화물 등의 거대 분자 및 리그닌 셀룰산염(lignin sulfonate)과 같은 천연 중합체의 정제, 분자량 분포 및 평형의 연구 등에 SEC가 널리 이용되고 있으며, 때로는 분자량의 차이가 크고 조성이 간단한 무기염, 큰 이온(macro ions) 금속 치물 등의 시료를 분리하는 데에도 사용되는 신속한 분석방법이다.

SEC의 용리 거동에 의한 특이한 점은

- (1)띠(band)의 폭이 좁아 검출이 용이하다.
- (2)용질의 머무름 시간이 짧기 때문에 기울기(gradi-ent) 용리 없이도 분리 시간이 짧다.
- (3)검출 한계가 상대적으로 높아서 universal detector인 굴절률(refractive index) 검출기가 널리 사용된다.
- (4)SEC는 컬럼의 충전제에 따라 용질의 분자 크기의 한계와, 이에 따라 시료 전체의 분석 소요 시간을 예측할 수 있어, 다른 크로마토그래피법에 비해 분석 시간 예측 및 조건 설정, 시간의 절약 및 용출시간 예측에 의해 분자 크기를 알 수 있는 정보를 제공받을 수 있다.

이상의 장점 외에 몇 가지 단점이 있다.

- (1)띠의 수가 제한되어 있다.
- (2)시료에 포함된 유사한 크기는 분리하기 어렵다.
- (3)분리 원리가 다른 HPLC 방법과 같지 않다.

2. 이론

SEC의 종류는 GPC와 GFC로 분류되지만, GPC가 빈도가 많기 때문에 SEC를 대표하는 인식이 짙고, 실제로 이론도 주로 GPC의 원리에 기초함을 부인한다. SEC는 일반 HPLC와는 달리 정지상(컬럼 충전체)과 이동상(시료 용매)간에 용질(시료)의 분배에 따른 엔탈피 차이보다 엔트로피 차이에 기인되는 머무름 메카니즘이다. 시료와 정지상간에 원칙적으로 상호 인력이 없고, 정지상의 다공성 구조에 따라 확산(diffusion)현상으로 정류 이동상(stagnant mobile phase)으로 침투할 수 있는 시료 분자에 따라서 달라지는 과정에 의해 분리가 이루어진다. 따라서, 정지상 입자와 동공의 크기 및 분포가 성분의 머무름과 분리능을 주로 결정하며, 이동상은 분리능에 미치는 영향이 거의 없다.

2. 1. 머무름(Retention)

크로마토그래피의 일반적인 개념을 바탕으로 살펴보면, 컬럼의 불감 부피(dead 또는 void volume)에 해당되는 이동상의 부피가 컬럼을 통과하게 되면 SEC에서는 모든 머무름이 끝나게 되나, 다른 HPLC에서 머무름은 용리 부피와 불감 부피의 차이로서 측정되고, 불감 부피보다 항상 큰 값을 갖게 된다. 보통 HPLC에서 불감 부피라 함은 충전물질 입자간의 틈새 부피와 입자 내의 동공 부피를 합한 전체 부피를 의미하지만 SEC에서는 충전체 입자간의 틈새만으로 정의된다.

이와 같이 용리상에서의 근본적인 차이 때문에 SEC에서는 머무름과 분리능의 일반적인 개념이 수정되어야 하며, 특히 SEC에서 용출되는 모든 봉우리(peak)의 크기 인자(capacity factor, k')는 (-)값을 갖게 되며, 크기 인자와 분리 인자(separation factor, α)의 차된 의미가 되색된다.

SEC에서는 총 배드 부피 V_t 를 갖는 다공성 입자들이 충전된 컬럼에 대해서 다음과 같은 관계를 갖는다.

$$V_t = V_M + V_S + V_G \quad (1)$$

여기서, V_M 은 이동상의 불감 부피이며, V_S 는 다공성 입자 사이의 누적된 내부 부피이며, V_G 는 충전체의 매트릭스가 차지하는 부피이다.

만약, 시료 분자가 동공으로 확산하는 데 걸리는 시

간이 시료 분자가 동공 부근에서 소비하는 시간에 비해서 작다고 가정하면, 그 분리과정은 확산과정과 완전히 무관하다. 이러한 조건에서 용질의 용출 부피(또는 머무름 부피) V_R 은 시료 주입 후 컬럼으로부터 흐르는 유출액의 부피이다. 즉,

$$V_R = V_M + K_D V_S \quad (2)$$

여기서 K_D 는 분배계수(distribution coefficient)로서 정지상 입자 동공의 바깥 및 안의 이동상에서의 용질 농도의 비로서 나타내고, 정지상이란 입자 동공 내에 채워진 정류 이동상(stagnant mobile phase)이 된다. 용질의 크기가 클수록 정지상의 동공 내의 용질 농도가 상대적으로 작아지는데, 이는 큰 용질은 동공간에 접근, 접유할 수 있는 기회가 없다는 사실로서 설명이 된다. 식 (2)에서 K_D 의 상한 범위는 0과 1값을 갖게 되고, 이는 어느 용질에 대해 동공 부피 내에서의 완전한 배제성(exclusion)과 투과성(permeation)의 극한값을 의미한다.

식 (2)를 K_D 에 관해서 전개하면,

$$K_D = \frac{V_R - V_M}{V_S} \quad (3)$$

으로 되는데, 모든 동공에서 배제된 분자는 불감 부피로 용리되므로 이 경우에는 $V_R = V_M$ 이므로 $K_D = 0$ 이고, 충전물의 모든 동공으로 돌아갈 수 있는 작은 분자들에 대해서는 $V_R = V_M + V_S$ 이므로 $K_D = 1$ 이다.

SEC에서 이론단수(theoretical plate number)와 그 역수 관계인 HETP(height equivalent to a theoretical plate)의 개념은 HPLC에서와 같이 컬럼 효능(efficiency)과 컬럼 성능을 비교, 검토하는 데 사용되고, K_D 값이 1을 갖게 되는 작은 분자인 틀루엔, 아세톤이나 벤질알코올을 용질로 사용해서 이론단수나 HETP가 측정된다. 이론단수나 HETP의 관계식은 HPLC와 마찬가지로 표시된다.

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = \frac{L}{H} \quad (4)$$

여기서,

N : 이론 단수

- t_R : 용질의 머무름 시간
 W_h : 봉우리 높이의 반치폭
 W_b : 봉우리 밀변의 폭
 L : 컬럼 길이
 H : HETP

시판용 컬럼으로 HPLC 기법별 다른 단수가 Table 1에 주어졌다.

2. 2. 띠넓힘(Band Broadening)

일정한 화학구조를 가지고 있는 생체 고분자의 경우에는 HETP는 종래 개념과 일치해서 합리적으로 적용, 논의가 되지만 분자량이 다른 분포를 가진 합성고분자 물질의 컬럼 내에서의 용리거동 현상을 살펴보면 띠넓힘 현상의 결과로서 봉우리 분산(peak dispersion)은 일반적인 크로마토그래피 분산과 용질의 분자량 분포에 기인되는 분산과의 종합적인 결과이기 때문에 컬럼효율의 비교, 평가기준으로서 HETP는 적절치 않다.

일반적으로 띠넓힘 현상의 원인은 첫째로 두 상 간에 비평형에 기인되는 정지상과 이동상에서 용질전이에 대한 저해요인($C_s + C_M$)이고, 둘째로 컬럼 내에서 다양한 이동상의 유로에 기인되는 용질의 소용돌이 확산요인(Eddy diffusion, A)이며, 셋째로 용질의 종축분자 확산(longitudinal molecular diffusion, B)에 의한 현상으로 속도론 모델(rate theory model)에서 설명하고 있다.

위에서 설명한 3가지 요인, 이동상의 유속(U) 및 HETP와의 관계식은 아래와 같이 Van Deemter식으로 표시된다.

Table 1. EXPECTED EFFICIENCY OF COMMERCIALLY AVAILABLE PACKED COLUMNS

Type	Minimum Efficiency (plates / meter)
a) Adsorbent	
Pellicular (35~45 micrometers)	2000~5000
Porous (10 micrometers)	24,000
(5 micrometers)	40,000
b) Reversed-Phase	
Pellicular (35 micrometers)	1000
Porous (10 micrometers)	12,000~20,000
(5 micrometers)	35,000~45,000
(3 micrometers)	80,000~100,000
c) Ion-Exchange	
Pellicular (35 micrometers)	1000
Porous (10 micrometers)	10,000
Anion Cation	15,000
d) Size-Exclusion	
Porous Silica (10 micrometers)	15,000~20,000
Semirigid Organic Gels (10 micrometers)	9000~12,000

$$HETP = A + B / U + (C_s + C_M) U \quad (5)$$

위 식 중 A, B 및 $(C_s + C_M)$ 은 정해진 SEC 실험 조건과 용질을 선정하여 분석할 경우에는 상수가 되며, C_M 은 이동상, C_s 는 컬럼충전체(또는 지지체)에 관한 상수이다. SEC에서 정류 이동상에서의 확산과 입자간 이동상에서의 질량 전이(mass transfer)의 기여가 HETP에서 영향을 미치고 고분자 물질의 확산 계수가 저분자 물질의 경우에 비해 작기 때문에 분자 종축확산에 의한 HETP 기여도는 무시된다.

SEC에서 분리능에 영향을 미치는 몇 가지 실험적 인자의 관계를 요약하면 일반적으로

- (1) 컬럼 충전체가 갖고 있는 고유의 분해능은 입자의 크기, 동공 크기 분포와 동공 부피
- (2) 컬럼의 크기와 충전체의 충전 밀도
- (3) 컬럼 운영 조건 : 이동상의 속도, 온도, 점도, 용질의 확산 계수와 시료량이다.

분해능을 향상시키는 인자는

- (1) 입자 크기 분포의 폭이 좁고, 동공 크기 분포의 폭이 작으며, 동공 부피가 큰 충전체 입자
- (2) 낮은 이동상 속도
- (3) 상승된 컬럼 온도 등이며,

분해능을 저하시키는 인자는

- (1) 분해능을 향상시키는 인자의 반대 경우
- (2) 시료 분자량의 증가(확산계수의 감소로 인한)
- (3) 높은 점도를 갖는 이동상 등이다.

앞서 설명한 바와 같이 SEC에서 시료와 정지상 충전체와의 상호 인력이 없어야 한다. 즉, $0 < K_D < 1$ 범위에서 모든 용질이 용출되어야 한다. 그러나 GFC의 결합상 실리카 충전체에서 이동상의 pH와 이온 강도 등에 따라 다르지만 용질과 충전체간의 이온교환 성질이나 역상성질이 발생하여 $K_D > 1$ 인 결과가 가끔 생긴다. 이러한 상호작용에서 생기는 이온 반발이나 소수성(hydrophobic) 인력을 최소하기 위해 이동상의 pH와 이온 강도를 조절할 필요가 있다. 예를 들면 단백질 분석에서는 이온강도는 0.1~0.6M로 하는 것이 가장 좋다.

2. 3. 봉우리-봉우리 분리능

크로마토그램에서 두 봉우리간 분리능(R_s)은 각 봉우리 밀변의 폭(W_{b1} 과 W_{b2})의 평균값에 대해 두 봉우리 정점간 분리거리(Δt_R)의 비로 측정된다. 즉,

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0.5(W_{b1} + W_{b2})} = \frac{2\Delta t_R}{W_{b1} + W_{b2}} \quad (6)$$

여기에서 1과 2는 두 봉우리의 용리순서를 나타내고 t_R 는 각 봉우리의 머무른 시간을 나타낸다.

위 식에서 보여 주는 바와 같이 분리능이란 분자량이 다른 용질이 별개로 분리되는 일반적인 정의에서 보면 SEC에서는 잘 적용시키기가 어렵다. 그래서 봉우리 분리를 시료분자량에 관련된 새로운 술어인 specific resolution factor가 정의되며, 분자량 검량선(calibration curve)에서의 선형적인 영역내에서 다음과 같다.

$$R_{sp} = R_s \frac{1}{\log(M_1 / M_2)} \quad (7)$$

여기에서,

R_{sp} : specific resolution factor

R_s : 크로마토그래피의 분리능

M_1 / M_2 : 두 표준물의 분자량비

여기에서, $R_s = 1.00$ 이라고 가정하면(바람직한 분리능)

$$R_{sp} = 1 / \log R_m \quad (8)$$

이때, $R_m : R_s = 1.00$ 인 경우에 최소 분자량비(M_1 / M_2)이다.

최소 분자량비는 컬럼 성능을 비교할 경우에 유용한 파라미터이고 분리능을 기본적인 몇 가지 파라미터와 관련시키면 유용한 다음 식이 된다.

$$\log R_m = \frac{4mV_R}{Vs\sqrt{N}} \quad (9)$$

m : 분자량 검량선의 선형 범위 내에서의 기울기

V_R : 표준물 M_1 의 용출 부피

V_s : 동공 부피

N : 이론 단수

위 식을 통해서 분리능이 증가되려면 컬럼효율(N)과 컬럼 충전물의 내부 동공 부피(V_s)는 극대화되어야 하고 검량선의 기울기(m)는 극소화시켜야 한다는 사실을 보여 준다.

3. 기기 운영상 주요 부분

SEC는 HPLC의 한 종류로 HPLC 기기에서 컬럼과 용매만 바꿔 주면 SEC로 응용할 수 있다. 그래서 여기서는 분리용 컬럼과 사용되는 유기 용매에 대해서만 설명하고자 한다.

3. 1. 컬럼 충전제(Column packing material)

SEC에서 사용되고 있는 충전제의 종류를 대별하면, 반강체(semirigid)의 교차 결합(cross linked)된 고분자 미립자 유기겔(microparticle organic gel)과 단단하고 동공 크기가 조절된 유리 또는 실리카(organic modified glass or silica)가 있다. 시판, 사용되고 있는 일부 컬럼 충전제의 분자량의 분리 범위를 Table 2에 보여 주고 있다.

반강체 유기 겔은 polystyrene-polyvinylbenzene을 주성분으로 하며 GPC에서 오래 사용되어 왔으며, 이들의 동공의 크기가 커서 $10^2 \sim 5 \times 10^3$ 분자량 시료의 분석이 가능하다. 이들은 용매에 의해 약간 팽윤(swelling)하며, 이들이 bead의 압축률 때문에 압력에 제한을 받기 때문에 사용시 약간의 주의를 기울여야 한다. 용매와 팽윤 정도에 따라 최대 압력이 약 300psi로 한정된다. 이들은 대개 비수용액계에 사용되나, 부분적으로 살포화(sulfonate)된 polystyrene 알갱이(bead)들은 수용액계에도 사용된다. 대개 5μm 또는 10μm 직경 입자들의 사전 충전(prepacked) 컬럼이 있으며 600psi 까지 사용할 수 있다. Styrene계 외에도 2-hydroxymethyl methacrylate와 ethylene dimethacrylate계도 수용액계와 다양한 극성 유기 용매에서 사용할 수 있다.

다공성 유리(glasses)와 실리카는 다양한 직경의 구멍을 포함한다. 예를 들면 한 계열은 이를 구멍의 직경들을 가진다. 즉 분자량 단위로 조작 범위가 주어진다.

다공성 실리카의 장점으로는

- (1) 고압력, 즉 이동상의 흐름 속도가 높아도 베드 부피가 일정하게 유지된다.
- (2) 열적 안전성이 있으므로 고온에서도 사용이 가능하다.
- (3) 각종 수용액계와 비수용액계에서도 사용이 가능하다.

그러나 실리카 사용에 따르는 주요 단점으로서 그의 표면활성이 생화학적 분자나 극성 고분자 시료의 분리에서 흡착 등의 문제가 발생된다. 이를 방지하기 위해 silylation 반응 등에 의한 표면 비활성화를 시켜 흡착 현상이 제거되기도 하고 GFC에서 pH 및 이온세기를 조절한 이동상을 사용하기도 한다(Fig. 1).

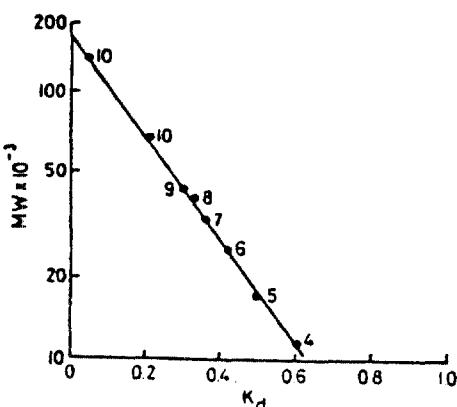


Fig. 1. Peak-position calibration for protein-sodium dodecyl sulfate complexes. Column, 175×0.9cm, controlled-pore glass GPC, 255Å; mobile phase, 6 M urea, 0.5% SDS, 0.5M phosphate buffer, pH 7; flow-rate, 0.66ml/min; sample, 200μl; solutes: (4) cytochrome C; (5) apomyoglobin; (6) α-chymotripsinogen A; (7) rabbit troposyosin; (8) aldolase; (9) ovalbumin; (10) bovine serum albumin (small amount of dimer also present).

GFC에서의 지지체에 의한 분자인력의 세기를 측정하는 컬럼 평가는 Table 3에 상세히 요약되어 있다.

3. 2. 이동상 용매

다른 HPLC법과 다르게 SEC에서의 이동상은 분리

Table 2. Microparticulate packings for size-exclusion chromatography

Commercial Name	Packing Material ^a	Average Pore Size (Å)	Molecular Weight Exclusion Limit or Range
μ Spheragel	SP-DVB	50	2×10^3
		100	(1 to 50) $\times 10^2$
		500	(5 to 10) $\times 10^3$
		1,000	(1 to 50) $\times 10^3$
		10,000	(1 to 50) $\times 10^4$
		100,000	(1 to 50) $\times 10^5$
		1,000,000	< 10^4
μ Spheragel	PS-DVB	100	< 7×10^2
		500	(5 to 100) $\times 10^2$
		1,000	(1 to 20) $\times 10^3$
		10,000	(1 to 20) $\times 10^4$
		100,000	(1 to 20) $\times 10^5$
		1,000,000	(1 to 20) $\times 10^4$
TSK Type H	PS-DVB	40	(0.5 to 10) $\times 10^2$
		250	(0.5 to 10) $\times 10^2$
		1,500	(1 to 60) $\times 10^3$
		10,000	(0.5 to 40) $\times 10^4$
		100,000	(0.2 to 400) $\times 10^4$
LiChrospher	Silica	100	(5 to 8) $\times 10^4$
		500	(3 to 6) $\times 10^3$
		1,000	(6 to 14) $\times 10^2$
TSK Type SW	Silica	4,000	(2 to 5.8) $\times 10^2$
		130	< 2×10^4
		240	< 4×10^4
		450	< 2×10^3
μ Bondagel E	Silica	125	(2 to 50) $\times 10^3$
		500	(0.5 to 50) $\times 10^4$
		1,000	(5 to 20) $\times 10^3$
CPG	Porous Glass	40	(1 to 8) $\times 10^3$
		100	(1 to 30) $\times 10^3$
		250	(2.5 to 125) $\times 10^3$
		550	(1.1 to 35) $\times 10^4$
		1,500	(1 to 10) $\times 10^4$
		2,500	(2 to 15) $\times 10^3$

^aAvailable in 5 or 10 micrometer particle sizes.

능에 영향을 미치지 않으므로 선택되는 용매는

- (1) 시료가 잘 녹고,
- (2) 이론단수를 증가시키기 위해 용매의 점도가 낮고 높은 온도에서 사용 가능하기 위해 끓는 점이

높은 용매이어야 하고,

- (3) 정지상과 이동상 사이의 극성차이에 의한 분배가 작아서 컬럼 충전체를 퇴화(degrade)시키지 말아야 하며,

Table 3. 수용성 biopolymer의 분리에 사용되는 컬럼의 특성을 결정하는 방법

거대분자 실험 대상물(Macromolecular Probes)

단백질은 monodisperse이므로 실험 대상물로 추천한다. 컬럼에 대하여 얻을 수 있는 정보는 다음과 같다.

1. 컬럼 불감 부피(Column void Volume).

송아지 thymus DNA는 동공 직경이 10,000nm 이하인 모든 충전제에서 배제된다.

2. 컬럼 검량(Calibration).

넓은 분자량 범위에 있는 단백질을 구할 수 있다.

3. 표면 흡착(Surface adsorption).

유도체화하지 않은(underivatized) 표면의 silanol group은 약간 음하전(negative charge)을 갖는다. 양하전(positive charge)을 갖는 단백질인 lysozyme으로 반응성이 있는 silanol group의 농도를 결정할 수 있다.

4. 생화학적 활동도의 머무름(Retention of biological activity).

효소의 경우, 컬럼에 투여한 모든 시료 물질을 회수할 수 있고, 용질과 충전제의 상호 작용으로 그들의 촉매 활동도(catalytic activity)를 얻어버릴 수 있다.

Trypsin은 실리카를 base로 한 충전제 위에서 이런 종류의 상호 작용에 민감하며 생화학적 활동도의 회수(recovery)를 위한 컬럼 성능(performance)을 평가할 수 있다.

소분자 실험 대상물(Small Molecule Probes)

소분자 실험 대상물로 비(non-)배제 크로마토그래피가 일어나는 조건을 확인할 수 있다. 컬럼과 관련(associate)되지 않은 모든 시험 대상물의 R_D 값은 1.0일 것이다.

이 값으로부터 벗어나면 충전제와 상호 작용이 있음을 말한다. 왜냐하면 높은 이온 강도(ionic strength)를 갖는 이동상이 소용매성(solvophobic) 상호 작용을 선호하는 동안 충전제와 이온성 상호 작용을 선호하는 이온 강도 때문이다. 컬럼 평가를 위하여 pH 7.05, 이온 강도 0.026의 phosphate buffer의 수용성 이동상이 적합하다.

1. 양이온 교환 상호 작용(Cationic-exchange interaction).

Arginine과 lysine이 적합한 실험 대상물이다.

2. 음이온 교환 상호 작용(Anionic-exchange interaction).

Glutamic acid, oxalic acid와 citric acid가 적합한 실험 대상물이다.

3. 소용매성 효능(Solvophobic effect).

Benzyl alcohol 또는 phenylethanol과 같은 중성의 수용성 분자가 적합한 시험 대상물이다.

(4) 정지상이 이동상 용매에 의해 젖음성(wettability)과 팽윤(또는 불음, swelling)이 양호해야 하고,

(5) 검출기에 감도(sensitivity) 측면에서 양립(compatible)할 수 있어야 한다.

SEC에서 사용되는 용매의 종류와 물질적 특성은 Table 4와 같고 특히 유기 겔로 된 μ -stiragel에 사용하는 데 적합하거나 부적합한 용매는 Table 5에서 보여 주는 바와 같다.

아울러 고분자 물질에 따른 용매 선정 기준을 Table 6에 나타냈다.

4. 분자량 측정

4. 1. 컬럼 선택

SEC 컬럼에 의한 분자량 분리 범위는 충전제의 동공의 크기와 분포에 의해 정해지므로 SEC에서는 컬럼 선택이 제일 중요하다. 충전제의 분자량 분리 범위는 검량선(calibration curve)에 의한 결과로 기술되는데, Fig. 2와 3에 상기한 두 종류의 충전제에 대한 검량선을 보여 준다.

제조 회사별 충전제의 동공 크기가 다름에 따라서 분석하고자 하는 분자량 범위가 따라서 다르나 일반적으로 $10^2 \sim 5 \times 10^8$ 정도 크기 범위로 되어 있다.

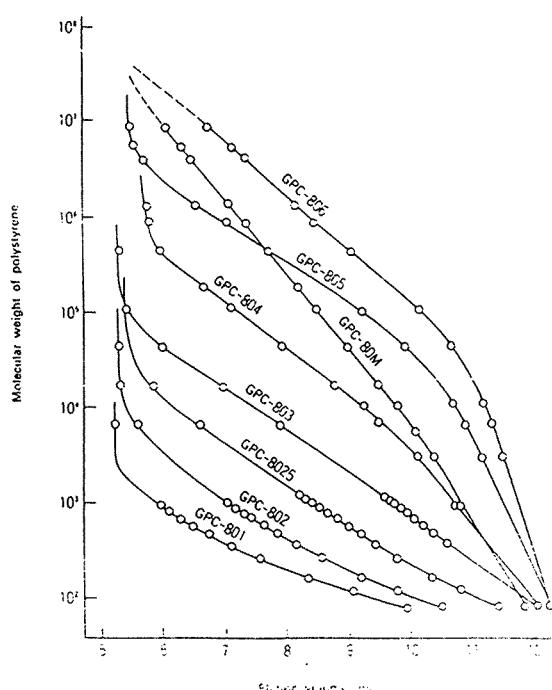


Fig. 2. Calibration curves for Shim-pack GPC-800 series columns.

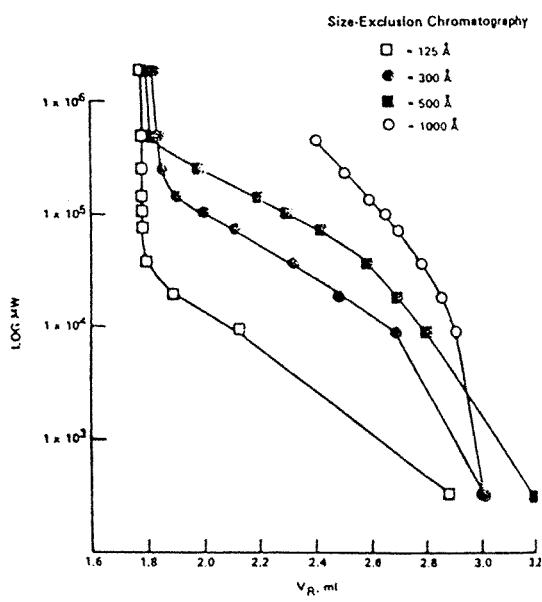


Fig. 3. Calibration curves for organic-modified silica packings. Columns. μ -Bondagel E : mobile phase, water : samples, dextrans.

위 그림(Fig. 2와 3) 중 대표적인 분자량의 표시를 가상적으로 생각해서 표시된 관계와 크로마토그램을 Fig. 4에서 보여 주고 있다.

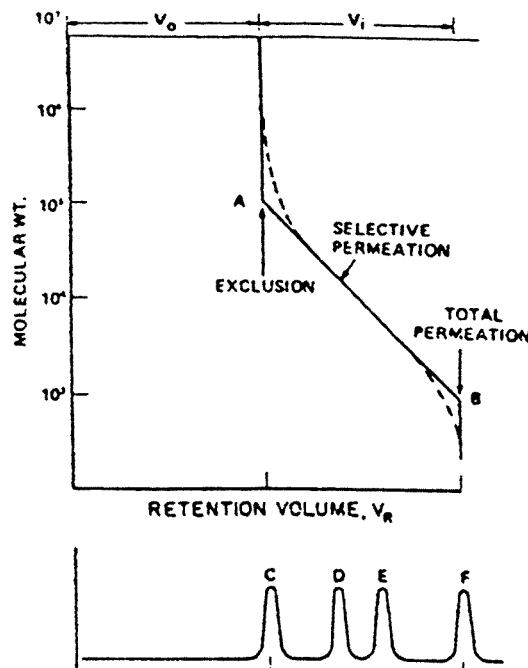


Fig. 4. Hypothetical calibration plot for a given size-exclusion packing column.

V_0 : interparticle volume

V_i : intraparticle volume

$A < V_R < B$: fractionation range

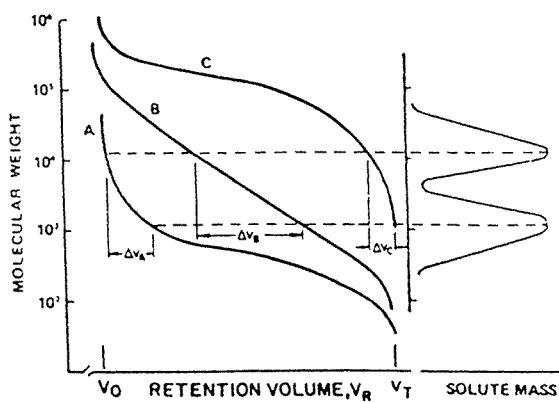


Fig. 5. Selection of the proper packing for maximum resolution of two adjacent bands.

Table 4. Properties of solvents commonly used in size-exclusion chromatography

Solvents	Melting point	Boiling Point	UV Density @20°C		Viscosity cutoff @20°C	Refractive index @20°C	Flash point @50°C	Oral LD. (rat Kg)	TLV ^R (rat ppm)	Irritant 'o skin & eye	Toxicity
	(°C)	(°C)	@20°C	(nm)	cp		(°C)	(rat)	(ppm)		
Tetrahydrofuran ^a	-65	66	0.8892	220	0.55	1.4072	14	3000	200	Mild	Slight
1,2,4-Trichlorobenzene (TCB)	17	213	1.4634	307	1.89(25°C)	1.5717	99	756	5	Moderate	Slight
o-Dichlorobenzene ^b	-19	180	1.3048	294	1.26	1.5515	66	500	50	Moderate	Moderate
Toluene	-95	110.5	0.8699	285	0.59	1.4969	4	5000	100	Moderate	Slight
N,N-Dimethylformamide(DMF) ^c	-61	153	0.9445	275	0.90	1.4294	58	3500	10	Moderate	Slight
Methylene chloride (dichloromethane)	-97	40.1	1.3266		0.44	1.4237	None	2136	200g	Severe	Slight
Ethylene dichloride (dichloroethane)	-36	84	1.235		0.84	1.4443	13	680	50	Slight	Slight
N-Methyl pyrrolidone ^c	-24	202	1.027	262	1.65	1.47	95.4	7000	Not set	Moderate	Very low
m-Cresol	12	202.8	1.034	302	20.8	1.544	94	242	5	Severe	Moderate
Benzene	5.5	80.1	0.8790	280	0.652	1.5011	27	3800	1°	Mild	Slight
Dimethylsulfoxide (DMSO)	18	189	1.014	260	2.24	1.4770	95.0	20,000	Not set	None	Very low
Perchloroethylene	-19	121	1.622	290		1.505	None	5000	100	Severe	Very low
o-Chlorophenol	7	175.6	1.241		4.11	1.5473	None	670	Not set	Severe	Slight
Carbon tetrachloride	-23	76.8	1.589	265	0.969	1.4630	None	1770	10	Moderate	Slight
Water	0	100.0	1.00		1.00	1.33	None	-	-	-	-
Trifluoroethanol		73.6	1.382	190	2.00°C	1.2910	40.6	240	Not set	Mild	Moderate
Chloroform ^d	-64	61.7	1.483	245	0.58	1.4457	None	2000	log	Moderate	Slight
Hexafluoroisopropanol	-3.4	58.2	1.59	190	1.02(25°C)	1.2752	None	1040	Not set	Very severe	Slight

검량선에서 중간 영역인 A와 B의 직선범위는 분별 범위(fractionation range)라고 하며, 용질의 선택성 투과(selective permeation)에 의해 충전제의 사용 가능한 문자량 분리 범위를 나타낸다. A점은 배제점(exclusion point)이라고 하고 A점 바깥 부분은 충전제의 동공 내로 용질이 침투되지 못하고 전적으로 배제되는 영역을 나타낸다. B점은 전투과점(total permeation point)이라고 하고 B점 바깥 부분은 동공내로 용질이 완전히 침투되는 영역을 나타낸다. 따라서 A와 B의 두 바깥 영역에서는 문자량별로 분리가 이루어지기가 어렵다.

문자량이 다른 두 성분을 분리하기 위해 컬럼 선택은, 첫째 두 성분의 용리부피가 분별범위의 중간에 오도록 해야 하고, 둘째 검량선에서 분별범위의 직선기울기(retention volume V_R/MW)가 제일 작은 값을

보여 주는 컬럼의 분리능이 우수하다(Fig. 5와 6).

동공 크기가 같은 컬럼에서 시료의 분별범위가 보다 넓은 경우에 동공 크기별 컬럼 선택은 동공 크기의 차이가 1 decade 되는 별개의 동공 크기(bimodal이라고 함)와 동공 부피가 비슷한 두 개 이상의 컬럼을 사용하면 된다. 이를 bimodal pore size configuration이라고 한다(Fig. 7과 8). 이 방법에 의해 분별범위가 중첩되지 않고 문자량 검량범위가 직선적으로 넓은 범위란 앞서 언급한 바와 같이 기울기가 같은 값(separation capacity, m^3/decade)을 의미한다.

시판용 2종 지지체(μ -styragele과 porous silica microsphere)에 의한 선형 분리범위는 Fig. 9에 보여 주는 바와 같다.

검량선의 선형 영역은 다음 식과 같이 주어진다.

Table 5. Solvent compatibility with μ -Styragel

Satisfactory	Marginal	Damaging
Benzene	Cyclopentane	Acetone
Carbon tetrachloride	Cyclopentane	Benzyl alcohol
Chloroform	Diethylamine	Butyl acetate
<i>p</i> -Dioxane	Methylene chloride	Carbon disulfide
Diethylbenzene	Diethyl ether	<i>m</i> -Cresol
Divinylbenzene	Ethyl acetate	<i>o</i> -Chlorophenol
Pyridine	Methylethyl ketone	Dimethylformamide
Toluene	Triethylamine	Dimethylacetamide
Tetrahydrofuran	90% Tetrahydrofuran / methanol	<i>n</i> -Dodecane
Trichlorobenzene		50% Tetrahydrofuran / methanol
Tetrachloroethane		Acetic acid
Tetrahydropyran		Acetic anhydride
Tetrahydrothiophene		Acetonitrile
<i>p</i> -Xylene		Cyclohexane
		Hexafluoroisopropanol
		Heptane
		Hexane
		Isooctane
		Trifluoroethanol
		Alcohols
		Water

$$V_R = C_1 - C_2 \log M \quad (10)$$

$$\text{또는 } \log M = C_1 / C_2 - V_R / C_2 \equiv A - BV_R \quad (11)$$

여기서,

V_R : 용출부피

C_1 : 분자량 검량곡선의 선형영역에서의 절편

C_2 : 선형 영역에서의 기울기 (ml/decade)

M : 용질의 분자량

위 식에서 크로마토그래피의 통념상 분자량 순서와는 다른 용리 순서임을 알 수가 있으며, 시료 성분 전체가 주어진 컬럼에서 분석 용리시간을 예측 가능하고 컬럼내에서 용출되지 않는 성분이 없기 때문에 컬럼 수명을 연장, 사용할 수 있는 잇점이 있다.

실례 :

Fig. 9에 소개한 μ -styragel을 사용해서 컬럼 선택과 컬럼 갯수에 관해 살펴보자. 분자량 범위가 $5 \times 10^2 - 1 \times 10^6$ 의 선형 범위에서 분리를 하기 위해 500\AA 컬럼 2개(식 10에서의 C_2 또는 separation capacity값이 $1.6 \times 2 = 3.2$)와 10^5\AA 컬럼 한 개(C_2 또는 separation capacity값이 약 3)를 연결, 사용하면 된다. 또한 porous silica microsphere(PSM) 경우에서는 충전제의 내부 동공 부피와 동공 크기별 종류가 거의 같기 때문에 컬럼 선택은 보다 간단하고 정확하게 이루어질 수가 있다. 60\AA 와 750\AA 동공크기의 PSM을 각각 2개씩 4개를 연결함으로써 Fig. 8에서 보여 주는 바와 같이 10^4 이상의 분자량 범위 내에서 선형 관계가 있음을 확인할 수 있다.

4. 2. 분자량과 분자량 분포

SEC 분석을 통해 얻을 수 있는 중요한 분석결과는 시료의 분자량과 분자량 분포이다. 실험에 의한 결과는 시료 분자의 크기와 모양을 바탕으로 분리가 일어

Table 6. Solvent Selection Guide for Polymeric Material

Polymeric Material / Solvent	THF	Toluene	N.N-Dimethyl-formamide	Methylene Chloride	Chloroform	2,2,2-Tri-fluoro-ethanol	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
ABS			◆				
Acrylics	◆		◆				
Alkyds	◆						◆
Amides / Imides			◆				
Asphalt	◆						
Butyl Rubber	◆	◆					
Cellulosics	◆		◆		◆		
Epoxy	◆						
Film-Forming							
Polyesters							◆
Glycellides	◆						
Natural Rubber		◆			◆		
Neoprene		◆					
Nonionic Surfactants	◆		◆			◆	
Nylon							◆
Phenolics	◆						
Polyacrylonitrile			◆				
Polybutadiene	◆	◆					
Polycarbonates	◆			◆	◆		
Polyesters / Unsaturated	◆			◆	◆		
Polyethylene*							
Polyethylene Oxide			◆				
Polyglycols	◆						
Polyisobutylene	◆	◆					
Polyisoprene	◆	◆					
Polyols	◆			◆	◆		
Polyphenylene Oxides	◆						
Polypropylene*							
Polystyrene	◆	◆	◆	◆	◆		
Polysulfones	◆				◆		
Polyurethane	◆		◆				
Polyvinyl acetate	◆						
PVC	◆						
Silicones		◆					
SBR	◆	◆					

* These polymers are soluble only at elevated temperatures.

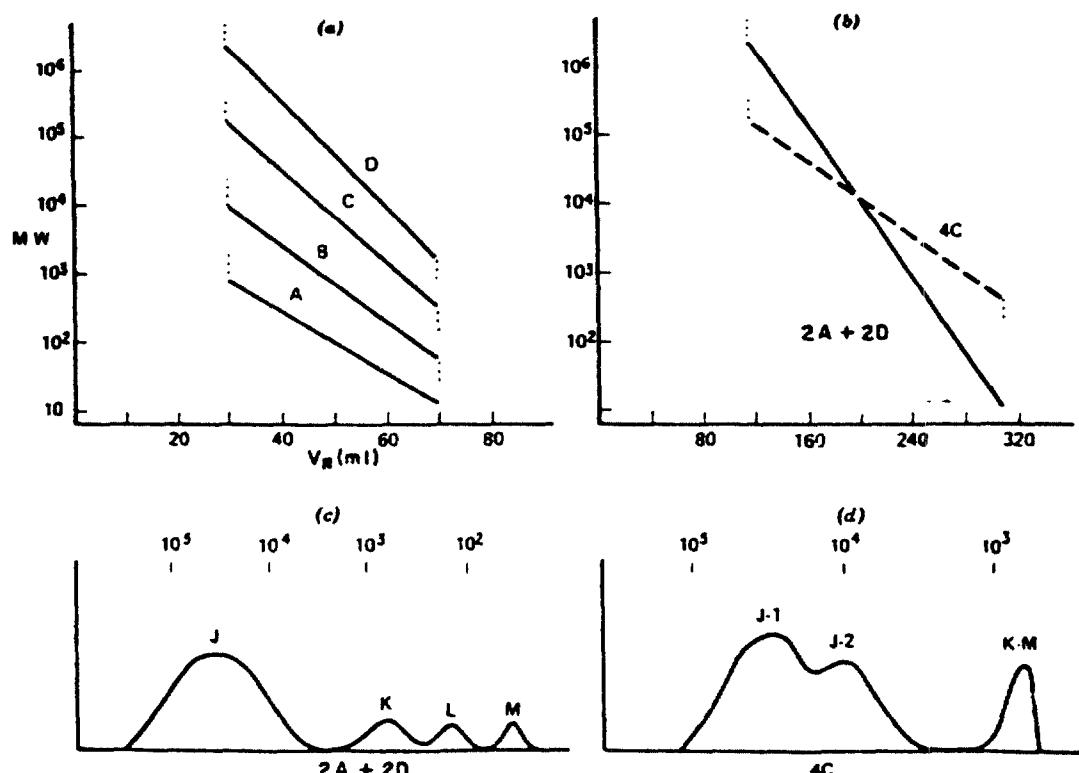


Fig. 6. Combining size-exclusion columns for separating broad-range mixtures of two compounds of similar size.

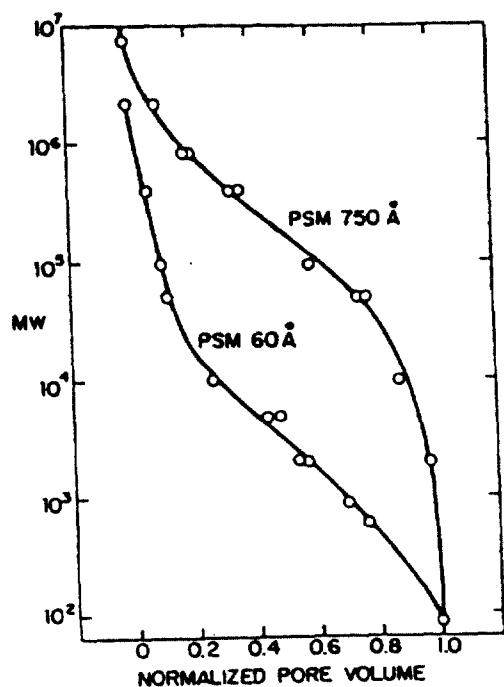


Fig. 7. Comparison of molecular-weight fractionation range for pore sizes differing by about 1 decade. Columns, 10×0.78cm each, porous-silica microspheres (10) : mobile phase, tetrahydrofuran ; temp., 22°C ; flowrate, 2.5ml/min ; UV detector, 254nm ; sample, 25 μ l solution of polystyrene standards.

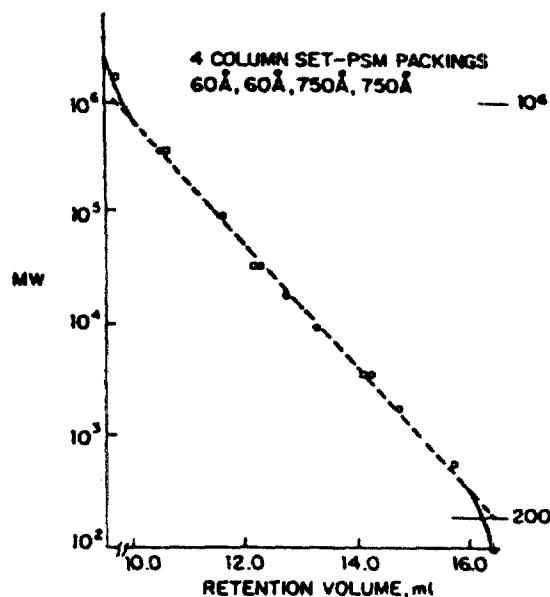


Fig. 8. Polystyrene molecular-weight calibration curve with bimodal column set. Conditions same as for Fig. 7.

난다. Monodispersive sample($M_w / M_n < 1.1$)나 생체 고분자 물질은 이동상의 용매 종류에 따라 시료 분자의 크기가 수화물이나 다른 화합물을 형성해서 실제와는 다르게 된다. 이러한 용질과 이동상 용매와의 인력 때문에 hydrodynamic size와 분리 특성이 변한다. Monodispersive sample을 분석할 경우에 분석 시료와 비슷한 화학구조를 가진 표준물로 검량함으로써 정확한 분자량 결과를 얻을 수 있다.

Polydisperse sample($M_w / M_n > 1.1$)인 경우는 분자량에 대해 염밀한 값이 없고 대부분의 고분자 물질에서는 분자량이 다른 화학종의 분포인 polydisperse system이기 때문에 통계적 함수(statistical function)에 의한 분자량, 즉, 수평균 분자량(number-average molecular weight, M_n)이나 중량 평균 분자량(weight-average molecular weight, M_w) 등으로 기술한다(Table. 7).

수평균은 보통 산술 평균이지만, 중량 평균화 평균은 잘 볼 수 없는 특수한 평균값으로 Fig. 10과 같은 모형을 써서 설명한다. 수평균, 중량 평균, Z평균은 각각 1, 2, 3차원적 평균값으로 생각하면 이해하기 쉽다.

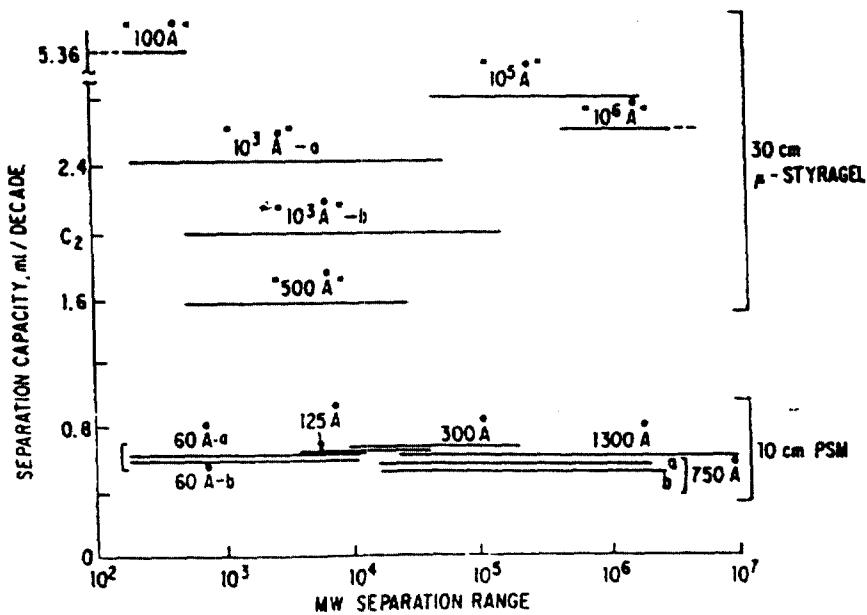


Fig. 9. Separation capacity versus calibration range for μ -Styragel and porous-silica microsphere columns. Data on PSM columns same as for Fig. 7 : μ -Styragel data obtained using : mobile phase, tetrahydrofuran : temp., 23°C ; flowrate, 1.0ml/min ; detector, RI : sample, 100 μ l of polystyrene standard solutions (a) and (b) represent data on different packing lots.

Table 7. Terms for determining the molecular weight of polydisperse samples.

Term Describing Molecular Weight	Symbol	Formula for Calculation	Formula for Calculation form The Chromatogram
Number-Average molecular weight	\overline{M}_n	$\frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{\sum W_i}{\sum (W_i / M_i)}$	$\frac{\sum h_i}{\sum (\frac{h_i}{M_i})}$
Weight-Average Molecular weight	\overline{M}_w	$\frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i}$	$\frac{\sum h_i M_i}{\sum h_i}$
Z-Average molecular weight	\overline{M}_z	$\frac{\sum N_i M_i^3}{\sum N_i M_i^2}$	$\frac{\sum h_i M_i^2}{\sum h_i M_i}$
Viscosity-Average molecular weight	\overline{M}_v	$\left(\frac{\sum N_i M_i^{1+a}}{\sum N_i M_i} \right)^{1/a}$	$\left(\frac{\sum h_i (M_i)^a}{\sum h_i} \right)^{1/a}$
극한 점도 $n = KM^a$ ($0.5 \leq a \leq 1$)일 때			
Polydispersity Index	I	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$	

Fig. 10을 실제적인 예로 보면, 지금 10개의 입방체가 있다고 보고 그 중 한 변의 길이가 1cm인 것이 3개, 2cm인 것이 4개, 3cm인 것이 3개 있다고 하자. 이때의 한 변의 길이의 평균이 몇 cm인가라는 문제를 생각해 본다. 여기에서 cm는 M_i 를, 개수는 N_i 를 뜻한다. 따라

서 수평균, 중량 평균 및 Z평균은 각각 다음과 같이 계산된다.

$$\text{수평균} = \frac{1 \times 3 + 2 \times 4 + 3 \times 3}{3+4+3} = 2.00\text{cm} \quad (\text{본 수로 높이를 나눈다})$$

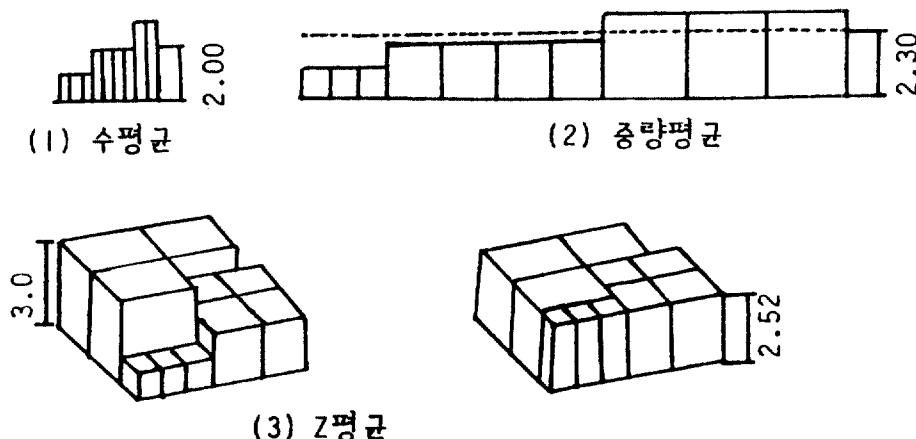


Fig. 10. 각종 평균값의 비교

$$\text{무게평균} = \frac{1^2 \times 3 + 2^2 \times 4 + 3^2 \times 3}{1^2 \times 3 + 2^2 \times 4 + 3^2 \times 3} = 2.30\text{cm}(밀면을 변하지 않고 높이를 평균화한다)$$

$$Z\text{평균} = \frac{1^3 \times 3 + 2^3 \times 4 + 3^3 \times 3}{1^2 \times 3 + 2^2 \times 4 + 3^2 \times 3} = 2.52\text{cm}(밀면적을 변하지 않고 높이를 평균화한다)$$

이와 같이 수평균에는 저분자량 성분이 민감하게 효

과를 나타내고 Z평균에는 고분자량 성분이 민감하게 효과를 나타내는 결과 $\bar{M}_n = \bar{M}_w = \bar{M}_z$ 가 된다(Fig. 11).

또한 M_w/M_n 값이 큰 고분자일수록 분자량 분포가 넓다는 말이 되므로, 분자량 분포는 폭의 넓이를 나타내는 척도로 쓰인다. 단순 분산인 고분자일 때는 $\bar{M}_n = \bar{M}_w = \bar{M}_z$ 가 된다.

SEC의 크로마토그램을 이용해서 수평균 분자량과

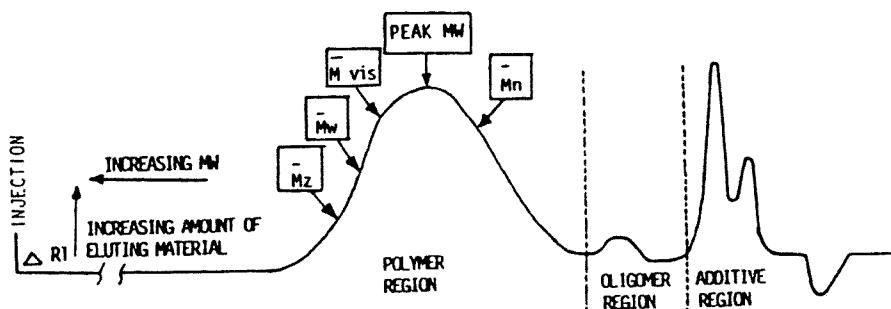


Fig. 11. APPROXIMATE LOCATIONS OF VARIOUS MOLECULAR WEIGHT AVERAGES

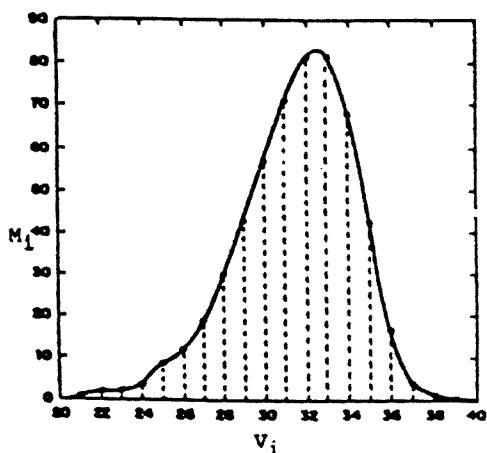


Fig. 12. Manual methods for determining the molecular weight of polydisperse samples.

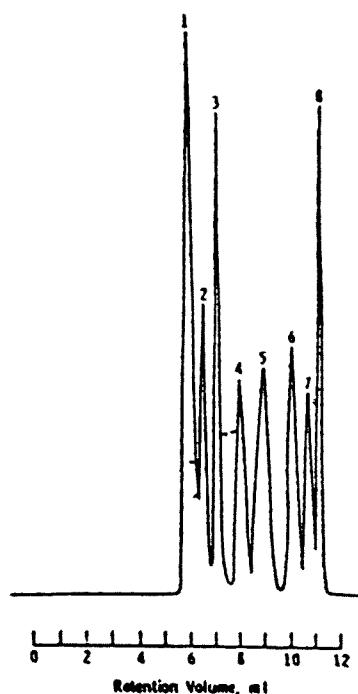


Fig. 13. Separation of narrow molecular weight polystyrene standards on a μ -Bondagel column combination, 125, 300, 500, and 1000 Å; mobile phase methylene chloride, flow rate 0.5ml/min. Polystyrene standards 1, 2, 145,000 : 2, 411,000 : 3, 170,000 : 4, 51,000 : 5, 20,000 : 5, 4000 : 7, 600 : and 8, benzene.

질량 평균 분자량 등을 계산(manual method)하는 방법은 Fig. 12와 같다.

1. \bar{M}_n 이나 \bar{M}_w 를 계산하기 위하여, 크로마토그램을 손으로 digitize한다. V_i 를 일정 부피로 끊어 보통 $8 < i < 20$ 으로 한다(Fig. 12의 점선)
2. 각 V_i 에 대한 h_i 를 자로 캤다.
3. 별도로 얻은 검량선(예 : Fig. 8)에서 각 V_i 에 대해 M_i 를 구한다.
4. Table 3의 식에 의해 \bar{M}_n 과 \bar{M}_w 를 구한다.

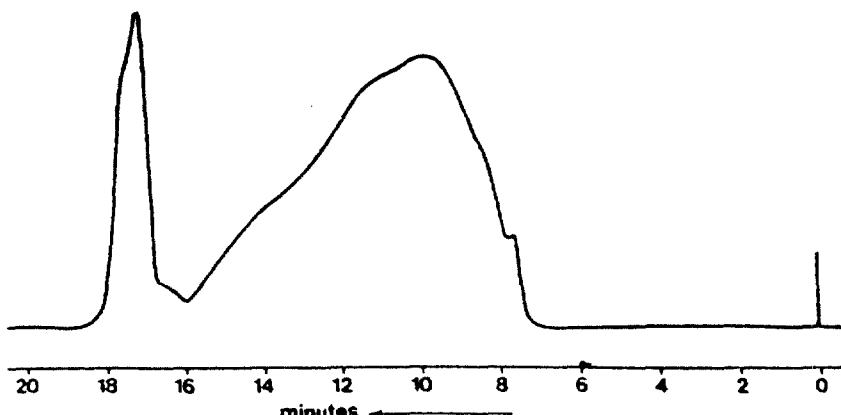


Fig. 14. Molecular-weight distribution of a carboxymethylcellulose(CMC) sample. Columns, 30×0.46cm, 1-LiChrospher SI-100, and 1-LiChrospher SI-500 : mobile phase, 0.5 M aqueous sodium acetate, pH 6 : flowrate, 0.5m l/min : sample, 100 μ l of 0.5% solution : detector, RI.

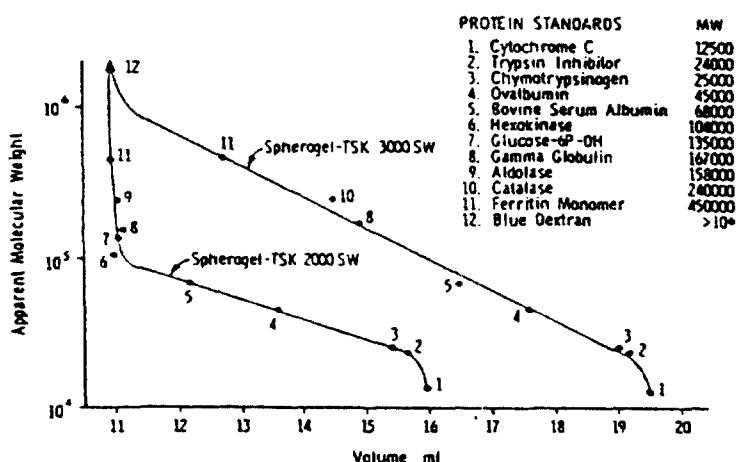


Fig. 15. Protein calibration curves for SpheroGel TSK -SW 2000 and SW 3000 columns. Mobile phase phosphate buffer 0.2M, pH 6.8, flow rate 1.0ml/min.

바와 같다.

봉우리 위치 검량법은 적절한 표준물의 이용에 제한을 받고 표준물과 시료의 용액 형태(solution conformation)가 비슷하고 분자량과 분자 크기와의 상관조건이 설정되어야 만족하고 정확한 검정법이 될 수 있다.

가장 믿을만한 universal calibration method는 hydrodynamic volume을 calibration parameter로 선정해서 머무름 부피와의 관계를 표시하는 방법이다.

고분자 물질의 hydrodynamic volume(V_h)은 Einstein에 의해 다음 식과 같이 표시된다.

$$V_h = [\eta] M / \alpha N_A \quad (12)$$

여기에서

$[\eta]$: 고유 점성도

M : 용질의 분자량

α : Simha parameter로서 분자 모양에 따르는 상수로 공 모양일 경우는 2.5이며, 공 모양이 아닌 입자의 경우는 2.5보다 크다.

N_A : Avogadro수

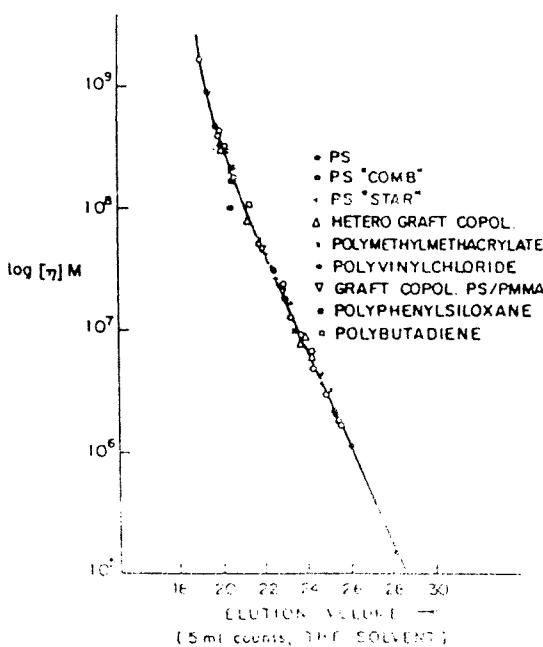


Fig. 16. Universal SEC calibration curve.

SEC에서 $[\eta]M$ 의 개념을 도입하여 용출부피(V_R)와의 관계식 (12)를 다시 정리하면 다음과 같다.

$$\log [\eta] M = C + C' V_R \quad (13)$$

이미 언급한 바와 같이 위 식의 결과는 모든 고분자 물질에서 $\log [\eta]M$ 와 V_R 와는 직선적인 검량선임을 보여 준다(Fig. 16). C와 C'는 Table 8에서 나타낸 바와 같이 고분자 물질별로 정해진 K와 a의 Mark Houwink 상수와 관련되는 상수로서 다음과 같이 표시된다.

$$C = -(a+1)B \quad (14)$$

$$C' = \log K + (a+A) \quad (15)$$

여기서 A와 B는 식 (11)에 나타난 상수이며, K와 a는 다음과 같은 관계를 갖는다.

$$[\eta] = KM^a \quad (16)$$

표준 polystyrene의 peak position calibration method에 의한 검량선을 이용하여 미지고분자 물질의 분자량은 다음 식에 의해 계산할 수 있다.

$$M_1 = \left[\frac{K_2}{K_1} (M_2)^{\alpha_2} \right]^{1/\alpha_1} \quad (17)$$

M_1 : 미지 시료의 분자량

M_2 : 표준 검정곡선 그림에서 얻은 분자량

K_1 와 α_1 : 미지 시료의 각 계수

K_2 와 α_2 : 표준 물자량 물질의 각 계수

여기에서 K와 α 값은 위에서 기술한 MarkHouwink의 K와 a에 의해 다음과 같이 계산될 수 있다.

$$K = 6.19 \times 10^9 (K)^{1/3} \quad (18)$$

$$\alpha = \left[\frac{1+a}{3} \right] \quad (19)$$

Hydrodynamic volume을 바탕으로 한 universal calibration method는 모든 고분자에 적용할 수 있는 가능성을 보였지만 그 결과의 정확성이나 정밀성은 아직까지 충분히 평가되지 않았다.

Table 8. Mark-Houwink constants for molecular-weight determination by the universal calibration method

Polymer	Solvent	Temperature (°C)	Mark-Houwink constants		Molecular-weight range applicable $\times 10^{-3}$
			$K \times 10^4$	a	
Polystyrene	THF	25	1.60	0.706	> 3
Polystyrene	THF	23	68.0	0.766	50~1000
Polystyrene(comb)	THF	23	2.2	0.56	150~11,200
Polystyrene(star)	THF	23	0.35	0.74	150~600
Polyvinylchloride	THF	23	1.63	0.766	20~170
	—	—	1.50	0.77	20~105
	—	—	1.60	0.77	10~1000
	—	—	7.2	0.61	27~100
Polymethylmethacrylate	THF	23	0.93	0.72	170~1300
	—	—	1.28	0.69	150~1200
	—	—	21.1	0.406	< 31
	—	—	1.04	0.697	> 31
Polycarbonate	THF	25	3.99	0.77	—
Polycarbonate	THF	25	4.9	0.67	7.77
Polydioxalane	THF	25	0.937	0.874	—
Polyvinyl acetate	THF	25	3.5	0.63	10~1000
Polyvinyl bromide	THF	20	1.59	0.64	—
Polyvinyl ferrocene	THF	30	0.72	0.72	—
Polyisoprene	THF	25	1.77	0.735	40~500
Natural rubber (poly-cis-isoprene)	THF	25	1.09	0.79	10~1000
Butyl rubber (isobutene coisoprene)	THF	25	0.85	0.75	4~4000
Poly-1, 2-butadiene	THF	20	Mn(PB) = 0.167	Mn(PS)	9~25

4. 3. 표준 물질(Standard materials)

SEC에서 미지 시료의 분자량 검정용으로 몇 가지 생화학 물질이나 합성 고분자 물질이 널리 사용되고 있다. 특히 고분자용 표준물질은 물질량(molar mass)의 분포가 좁으며, 그 평균값은 다른 방법으로 정확히 측정한 것을 사용한다. GFC와 GPC용 시판되고 있는 표준품, 공급 회사명 및 물질량 범위 등이 Table 9에 소

개되어 있다.

5. 응용

SEC의 응용 분야를 Table 10에 요약하였다(실제 응용의 예는 별첨 brochure 참조).

Table 9. Some important polymer reference materials

A Proteins and viruses	$M_M \times 10^3 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$
1. Insulin B-chain (bovine)	3.4
2. Glucagon	3.5
3. Insulin	5.7
4. Kallikrein	6.5
5. Cytochrome C	12.3
6. Ribonuclease A (from bovine pancreas)	13.7
7. Methemoglobin	17.0
8. Apomyoglobin	17.2
9. Myoglobin (equine)	17.8
10. Trypsin inhibitor (from soybean)	22.0
11. α -Chymotrypsin (from bovine pancreas)	25.0
12. Chymotrypsinogen A (from bovine pancreas)	25.0
13. Tropomyosin (from rabbit muscle)	33.5
14. Pepsin	35.5
15. β -Lactoglobulin B	38.0
16. Ovalbumin	45.0
17. Bovine serum albumin (monomer) (dimer) (trimer...etc.)	66.0 132.0
18. Hemocyanin (cross-linked, monomer) (dimer) (trimer...etc)	70.0 140.0
19. Transferrin (human)	80.0
20. Aldolase (rabbit muscle)	158.0
21. Alcohol dehydrogenase	150.0
22. γ -Globulin (bovine)	170.0
23. Catalase (from bovine liver)	232.0
24. Fibrinogen (human)	340.0
25. Ferritin (from horse spleen)	560.0
26. Turnip yellow mosaic virus	3.6×10^3
27. Tobacco mosaic virus	39×10^3

The above reference materials are available from the following companies : Boehringer. Mannheim. FRG : BDH Chemicals Ltd., Poole, UK : Calbiochem. Lucerne. Switzerland : Fluka AG. Buchs. Switzerland : Inter-med-Export-Import, Berlin GDR : Koch-Light. Laboratories. Colnbrook. UK : E. Merck. Darmstadt. FRG : Pharmacia Fine Chemicals. AB. Uppsala, Sweden : Reanal Fine Chemicals. Budapest. Hungary : Serva Fein-biochemica. Heidelberg. FRG : Sigma London Chemical Company. Ltd., Poole, UK.

Table 10. SEC 응용의 주요 분야

A. Gel Permeation Chromatography

유기 용매에 용해하는 고분자 물질 등 분리에 보통 사용되며, 다음과 같은 정보를 얻을 수 있다.

- (1) 평균 분자량
- (2) 분자량 분포
- (3) 고분자 물질(polymer)에 존재하는 oligomer 및 첨가제(additives)
- (4) 분획(collection of fractions) 후 다른 분석 방법 또는 기기를 이용하여 구조 결정

B. Gel Filtration Chromatography

수용성인 거대분자(생화학 물질: 단백질, 아미노산, 바이러스, 탄수화물 등)와 무기염, 큰 이온(macromolecules), 금속 치화합물 등의 분리에 보통 사용되며, 다음과 같은 정보를 얻을 수 있다.

- (1) 분자량 추정
- (2) Molecular association constants
 - a. 소분자와 거대분자의 complex
 - b. 거대분자의 융집(aggregation)
- (3) Molecular fraction으로 특성 분석 또는 기타 용도