

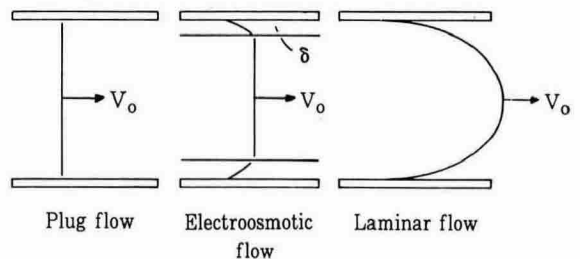
## 모세관 전기영동(Capillary Electrophoresis)의 실제와 응용

이 부 용  
농산물이용연구부

### 1. CE(Capillary Electrophoresis) 란 무엇인가?

기존의 전기영동은 임상학, 생물학, 제약, 생물공학 실험에서 매우 유용한 분석기법의 하나로 많이 사용되어 오고 있다. 전기영동의 분리 원리는 용액내에서 전하를 띤 입자가 외부에서 걸어준 전기장내에서 전극의 한쪽으로 이동하는 속도의 차이에 의해서 분리가 일어나는 것이다. 전하를 띤 입자는 그 입자의 총 전하(net charge), 크기, 모양, 외부인자인 사용 buffer의 pH, 적용하는 전압 등에 의해 결정되는 속도와 방향으로 이동하게 된다. 전기영동상에서 분자들의 분리는 대개 종이나 반고체 젤과 같이 활성이 없는 매질에서 일어나는데, 이 매질로 인해 분리시 열의 발생으로 분리효율이 저하되며, 정확한 정량분석이 이루어지지 않는 문제 등이 있다. 따라서 기존의 전기영동은 비교적 분자량이 적은 아미노산, 펩타이드, 뉴클레오타이드와 같은 물질과 비교적 분자량이 큰 단백질, DNA, RNA를 포함한 폴리 뉴클레오타이드의 분리에 많이 이용되어 왔다. CE는 기존의 전기영동보다도 훨씬 넓은 범위의 분자들을 분리할 수 있는 새로운 방법으로서 분리속도가 매우 빠르며 분리능이 뛰어난 뿐 아니라 아주 적은 양의 시료로도 분석이 가능하다. 실제 1-10nl정도의 적은 양으로도 시료 주입이 가능하기 때문에  $\mu$ l 정도의 시료만 있

으면 분석이 가능하다 CE는 open된 모세관내에서 electrophoretic migration과 electroosmotic flow에 의해서 분리가 일어나는데 폭이 매우 좁은 모세관(25-200 $\mu$ m)을 사용하기 때문에 열을 효과적으로 발산시켜 열에 의한 zone broadening을 많이 감소시킨다. CE에서 일어나는 electroosmotic flow는 plug-type flow로서 laminar flow에서 나타나는 longitudinal flow를 감소시키며, 이 두가지 요소가 결합되기 때문에 분자들의 용리가 빠르게 나타날 뿐 아니라 매우 sharp한 피크를 얻을 수 있다.



CE는 기존의 전기영동 장치나 크로마토그래피에 비해서 다음과 같은 장점을 갖는다.

1) 내경이 10-20 $\mu$ m 정도의 아주 작은 모세관을 사용하여 모세관 내부 표면적대 부피비를( $10^4 \sim 10^5 m^{-1}$ ) 최대화 시킨다.

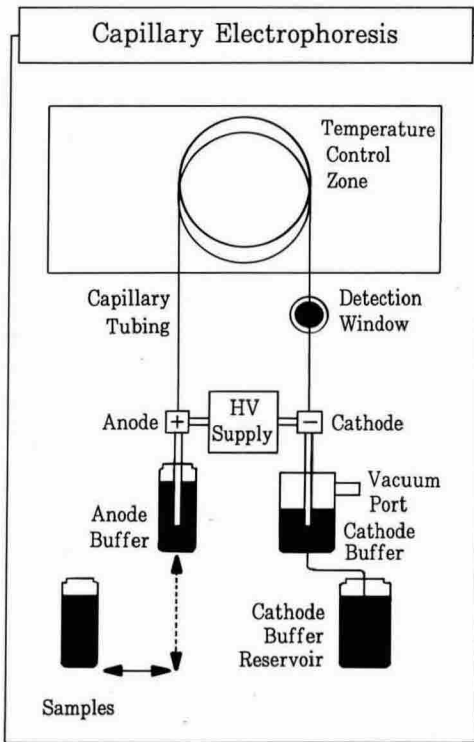
2) 모세관내에서 발생하는 열을 효과적으로 발

산시킬 수 있으므로 빠르고 효율적인 분리가 가능하다. 보통 이론단수는  $N = 10^6$ 이다. 대개의 LC는  $10^3$ 정도이다.

- 3) 쉽게 정량적인 결과를 얻을 수 있다.
- 4) 시료 주입량이 보통 5ul 정도만 있으면 가능하며 실제 주입량은 1nl~5nl 정도이다.
- 5) 운용 시스템을 자동화 시키기가 쉽다.

## 2. CE의 기기 구성

CE는 대개 다음과 같은 4가지의 주요한 부분으로 구성되어 있다.



### 1) Autosampler

시료를 선택하고 sampling 및 injection을 할 수 있다. 대개 수십개의 시료 vial을 담을 수 있는 카트리지가 형태로 되어 있다. 시료 주입 방법에는 2

가지가 있다.

① Pressure injection : 모세관의 inlet 부분에 약간의 압력을 걸어주거나 outlet 부분에 진공을 걸어준다.

$$Q = (r^4 c \Delta p t) / 8 \eta L$$

- Q : 시료 주입량
- r : 모세관 직경
- c : 시료농도
- $\Delta p$  : 압력차
- t : 시료주입시간
- $\eta$  : buffer의 전해질 농도
- L : 모세관 길이

② Electrokinetic injection : 짧은 시간동안에 전압을 걸어주어 electroosmotic flow에 의해 시료를 주입한다.

$$Q = (r^2 c t v (\mu_{eo} + \mu_{ep})) / L$$

- v : 전압 (voltage)
- $\mu_{eo}$  : mobility of electroosmotic flow
- $\mu_{ep}$  : electrophoretic mobility

### 2) 모세관

실제 분자들의 분리가 일어나는 부분이다. polyimide로 코팅된 용융 silica를 이용하며 내경은 일반적으로 10~200 $\mu$ m, 길이는 20~150cm, 모세관의 벽 두께는 약 150 $\mu$ m, 사용하는 전압은 1~30kV, 작동전류는 1~100 $\mu$ A 정도이다.

### 3) High-voltage power supply

positive와 negative의 두가지 전압을 걸어줄 수 있으며 모세관의 끝에 걸어준다.

### 4) Detector

보통 UV/Vis 검출기를 사용하며, 흡광, 형광, 간접 형광, raman 분광법, mass 분광법, thermal lens, 굴절률 검출기 등이 사용될 수 있다. 그외에 전기화학적 방법으로는 전도도, 전류법, 간접 전류법, 전위차법에 의한 검출기 등이 사용된다.

### 3. CE의 분리 원리 및 분리 방식

CE의 개략적인 분리 원리는 앞에서 간단하게 언급하였다. 일반적인 분리는 일정한 전위차내에서 용질들이 용매의 electroosmotic flow를 따라 음극으로 이동함에 따라 일어나며, 이때 이동 속도는 각 용질 분자들이 갖는 전하량에 따라 결정된다. 보다 자세한 사항은 분리 방식을 설명할때 기술하도록 하겠다.

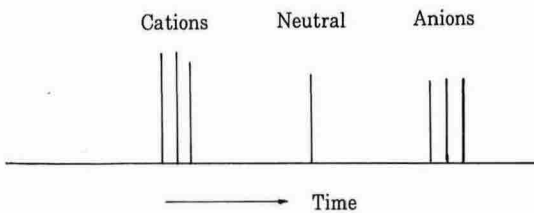
#### 1) Capillary Zone Electrophoresis(CZE)

CZE는 모세관 전기영동 기법과 기존의 zone 전기영동 기법을 결합한 방식으로서 여러가지의 buffer 용액을 사용할 수 있으므로 Free Solution Capillary Electrophoresis(FSCE)라고도 부른다.

CZE는 전기영동 분리를 자동적으로 행할 수 있는 가장 좋은 방법으로서 여러가지 용질 분자들이 섞여 있는 혼합물의 electrophoretic mobility와 electroosmotic flow의 차이에 의해 분자들이 분리된다.

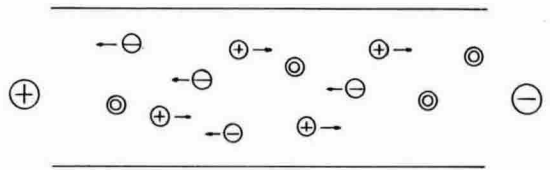
pH=7의 phosphate buffer를 사용하는 경우 electropherogram의 분리 순서는 아래 그림과 같다.

Schematic Zone Electropherogram



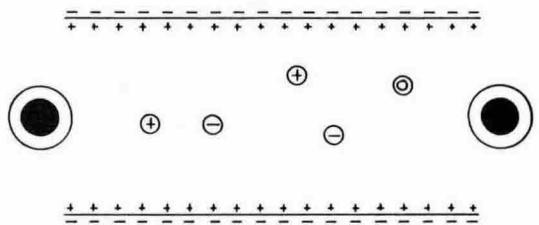
위와 같은 분리에서 electrophoresis의 관점으로 보면 양쪽 끝에 전극이 걸려 있으므로 양이온 분자들은 음극으로 이동하고, 음이온 분자들은 양극쪽으로 끌려 가며, 중성 분자들은 어느쪽으로도 이동하지 않는다. 그러나 모세관 전기 영동에서는 electroosmotic flow가 electrophoretic mobility보다 훨씬 큰 힘을 발휘하기 때문에 결국 모든 분자들은 검출기쪽으로 끌려가게 된다.

Electrophoresis in a Capillary



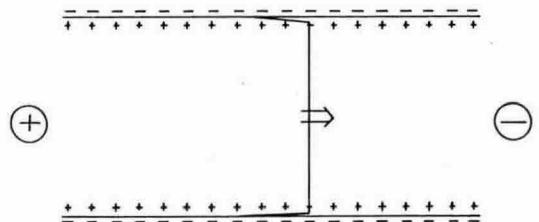
Electroosmosis는 고체-액체의 접촉면에서 전기적 이중층(electric double layer)이 생기게 하는 힘이다. 즉 유리 재질로 된 모세관 내벽에는 silanol group이 H<sup>+</sup>가 떨어진 상태로 ⊖전하를 띠고 붙어있다.

Environment Inside a Silica Capillary



따라서 양이온이나 부분적으로 양이온성을 띠는 물질들이 모세관 내벽에 정전기적인 힘으로 붙어서 전기적 이중층을 형성하게 되고 모세관 양쪽끝에 전압이 걸리므로 해서 아래와 같은 electroosmotic flow가 일어나게 된다. 결국 모든 분자들은 electroosmosis에 의해 ⊖극 쪽으로 이동하게 되는 것이다.

Electroosmosis is Caused by the Charged Capillary Walls



Electrophoresis는 전기장에서 하전된 입자가 움직이는 이동을 의미하며 이동속도,  $V_{ep}$ 는 다음과 같다.

$$V_{ep} = \mu_{ep} \frac{V}{L} \quad (1)$$

- $\mu_{ep}$  : electrophoretic mobility
- $V$  : applied potential
- $L$  : capillary length

Electroosmotic flow에서 이동속도,  $V_{eo}$ 는 다음과 같다.

$$V_{eo} = \mu_{eo} \frac{V}{L} \quad (2)$$

$\mu_{eo}$  : mobility of electroosmotic flow

시간  $t$ 에서 용질 분자들이 모세관을 통해서 완전히 이동한다면 (3)식과 같으며,

$$t = \frac{L}{V_{ep} + V_{eo}} = \frac{L^2}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V} \quad (3)$$

분자들의 이동중에도 확산은 계속 일어나기 때문에 초기의 얇은 지역에서  $t$ 시간 동안 확산이 일어난다면 공간 편차  $O^2L$ 은 (4)식과 같이 표현된다.

$$O^2L = 2Dt = \frac{2DL^2}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})N} \quad (4)$$

$D$  : Didiffusion coefficient of the solute

한편, 전기 영동에서 분리 효율인 이론단수  $N$ 은 (5)식과 같이 표현되며

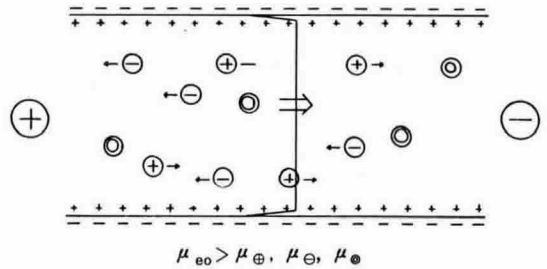
$$N = \frac{L^2}{O^2L} \quad (5)$$

(4)식을 (5)식에 대입하면 (6)식으로 표현 된다.

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2D} \quad (6)$$

(6)식을 보면 전압이 높을수록 분리 효율이 증가하며 모세관의 길이( $L$ )는 영향을 미치지 않는다.

### Electroosmotic Flow is Greater than Electrophoretic Mobility



결국 electroosmotic flow는 용질 분자들이 어떤 전하를 띠느냐에 상관없이 모든 분자들을  $\ominus$ 극 쪽으로 이동시키게 되는 것이다.

CZE에서 두 zone 사이의 분리능  $R$ 은 (7)식과 같이 표현된다.

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\Delta v}{\bar{v}} \right) \quad (7)$$

$\Delta v/\bar{v}$  : 두 zone에서의 상대적인 속도차

Electroosmotic mobility가 있을 때  $\Delta V/V$ 는 (8)식과 같이 표현된다.

$$\frac{\Delta v}{\bar{v}} = \frac{\mu_{ep,1} - \mu_{ep,2}}{\mu_{ep} + \mu_{eo}} \quad (8)$$

- $\mu_{ep,1}$  : 용질 1의 electrophoretic mobility
- $\mu_{ep,2}$  : 용질 2의 electrophoretic mobility
- $\mu_{ep}$  : 평균 electrophoretic mobility

(6)식과 (8)식을 (7)식에 대입하면 다음식을 얻는다.

$$R = \frac{1}{4} \left[ \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2D} \right]^{1/2} \left[ \frac{\mu_{ep,1} - \mu_{ep,2}}{\mu_{ep} + \mu_{eo}} \right]$$

다시 배열하면

$$R = 0.18(\mu_{ep,1} - \mu_{ep,2}) \left[ \frac{v}{D(\mu_{ep} + \mu_{eo})} \right]^{1/2}$$

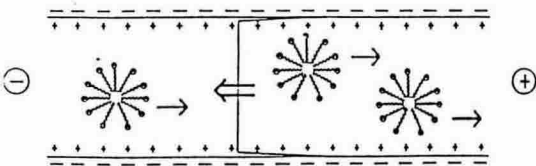
로 된다. 위의 식을 보면 CZE에서 분리능은 모세관의 길이에 상관없이  $\mu_{eo} = \mu_{ep}$ 일 때 가장 좋다는 것을 알 수 있다.

## 2) Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MECC)

MECC는 분자량이 큰 소수성 물질의 분리에 많이 이용하는 방식이다.

소수성이 큰 분자들은 전하를 많이 띠지 않으므로 SDS와 같은 계면활성제를 넣어주어  $\ominus$  전하를 띠게 하여 분석한다. 즉 micellar의 용해도와 electrokinetic 이동을 바탕으로 비 이온성 분자뿐 아니라 이온성 분자들 까지도 분리할 수 있다.

### Micellar Capillary Electrophoresis



위의 그림에서 볼때 MECC에서 electroosmotic flow,  $\mu_{eo}$ 는 다음과 같다.

$$\mu_{eo} = \frac{-\epsilon Z}{\eta}$$

$\epsilon$  : permeability of solution

$Z$  : zeta potential field strenath of the double layer of charged groups

$\eta$  : viscosity of solution

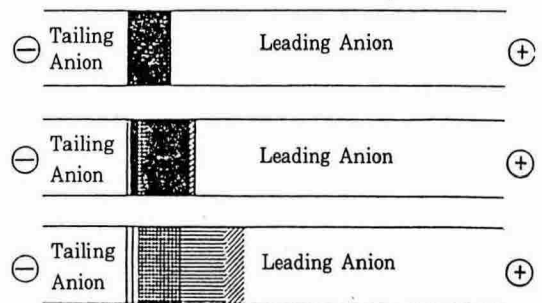
이때 걸어주는 전압이 일정하다면  $\mu_{eo}$ 는 첨가하는 계면 활성제(SDS)의 농도에 상관 없으며, 계면 활성제의 농도가 증가하는데 따라 생기는 점도의 증가는 전류 증가에 따른 온도를 조절하여서 보정할 수 있다. 즉 계면 활성제의 농도는 모세관 표면의 zeta potential에 별다른 영향을 미치지 않는다. MECC는 현재 아미노산 분석에 매우 효율적이고 O-phthalaldehyde 유도체를 만들면  $10^{-12}$  mole정도의 아미노산도 분석이 가능하며, 형광 검출기를 사용하면  $10^{-15}$  mole 까지도 분석이 가능하다. 많이 사용되는 계면 활성제로는 SDS(Sodium

Dodecyl Sulfate) 이외도 STS(Sodium Decyl Sulfate)와 같은 음이온계면활성제, CTAC(Cetyl Trimethyl Ammonium Chloride), DTAC(Dodecyl Trimethyl Ammonium Chloride)와 같은 양이온 계면 활성제 등이 있다.

## 3) Capillary Isotachopheresis (CITP)

CZE와 일반적인 chromatography는 한가지 단일 조성의 buffer만을 사용하는데 비해서 CITP에서는 불연속적인 buffer system (gradient buffer system)을 사용하여 물질들의 분리 효율을 높이게 된다. 시료속의 분자들은 leading 전해질과 terminating(tailing) 전해질 사이에서 머무르게 되며 전류를 일정하게 걸어 주었을 때 이동도에 따라 분리가 일어난다. 즉 leading 전해질의 이온들이 시료분자들 보다 앞서서 이동하고 지나가면서 전기 전도도를 낮게 해주면 시료 분자들이 그 영역을 통과하면서 가속되어 분자들은 leading 이온 주위에 높은 농도로 모이게 된다. 이분자들 뒤로 terminating 전해질의 이온들이 따라가면서 시료분자들이 좁은 zone 내에 존재하도록 몰아주게 되면 sharp한 분자들의 zone이 형성되는 것이다. 음이온성 물질을 분리하는 경우, 양극과 모세관을 leading 전해질로 채우며 leading 전해질로 쓰이는 음이온은 시료속에 들어있는 어떤 다른 음이온성 물질보다도 이동도가 커야 한다. 음극 부분은 terminating 전해질로 채우며, terminating 전해질로 쓰이는 음이온은 시료속의 다른 음이온성 물질 보다도 이동도가 적어야 한다.

### Separation by Isotachopheresis



연속적인 zone 내에서 voltage gradient를 추가적으로 실시하는 경우 isotachophoretic system은 두가지 중요한 특징을 나타낸다.

① Zone 경계를 스스로 보정할 수 있다는 것이다. Zone 경계는 일단 안정한 상태가 되면 더 이상 넓어지지 않는다. 이에 비해서 CZE에서는 분자들의 흡착과 분산 때문에 분리되는 peak가 sharp하지 못하고 넓게 퍼져서 나타난다.

② 앞서서 나가는 zone 내에서는 온도가 감소하며 이 감소 현상은 열적 검출기로 감지되어 보정된다.

CITP를 쓰는 경우 CZE에 비해 다음과 같은 장점이 있다.

① 시료의 크기가 CZE보다 CITP에서는 100배 정도 크다.

② 아주 적은 양의 분자 농도라도 그 분자에 해당되는 peak가 약해지지 않는다.

③ 모든 분자들이 차지하는 zone이 자체 보정 효과에 의해서 효율이 아주 높다.

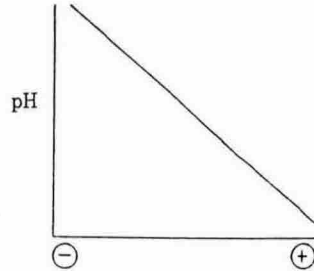
④ CZE에 비해 분석시간이 짧게 걸리며 electrophoretic mobility 차이가 작은 물질들도 쉽게 분리할 수가 있다.

결론적으로 CITP는 넓은 범위의 시료들 분석하는 좋은 방법이며 아주 적은 양으로도 분석이 가능하며 무기 음이온이나 유기산, EDTA 복합물질, 알칼리 이온금속, 탄탄족 양이온, quaternary phosphonium salt나 뉴클레오타이드 등의 분리에 이용된다.

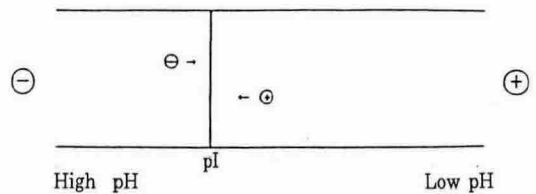
#### 4) Capillary Isoelectric Focusing(CIEF)

Isoelectric focusing(IEF)은 펩타이드나 단백질과 같은 양쪽성 물질들을 분리 분석하는 좋은 방법이다. CIEF에서는 zone 내의 고정상으로 pH gradient buffer를 사용하며 시료속의 분자들은 그 분자가 갖는 pI(isoelectric point)에 따라서 분리된다. pI의 pH에 해당되는 분자들은 zwitter-ion 형태로 존재하며 이때 이분자는 전기장을 걸어주어도 이동하지 않는다.

#### In Isoelectric Focusing a pH Gradient is Set-up in the Capillary



A Protein Above its pI is Negatively Charged and Repelled by the Cathode (and Vice Versa)



pH가 pI보다 높아지면 분자들은 H<sup>+</sup>를 잃고 음이온으로 하전되어 전기장내에서 양극쪽으로 이동되며, pH가 낮아지면 총 전하가 양이온성을 띠며 음극쪽으로 이동한다. 따라서 pH가 모세관의 한쪽 끝에서 다른 쪽 끝으로 갈수록 증가할 때 양극에서 pH가 제일 낮고 음극에서 pH가 가장 높다. IEF를 이용하면 시료 분자들은 좁은 zone 내로 농축되는데 pI 차이가 0.01 이상의 차이만 난다면 분리가 잘 일어난다. 이상적인 IEF를 실시하려면 몇 가지 주의사항이 필요하다.

① 모세관내의 용액은 안정 상태에서 전기 전도도의 차이가 없어야 한다.

② 이동상으로 사용되는 양쪽성 물질은 저 파장(210~260nm)에서 UV 흡광을 거의 나타내지 않아야 한다.

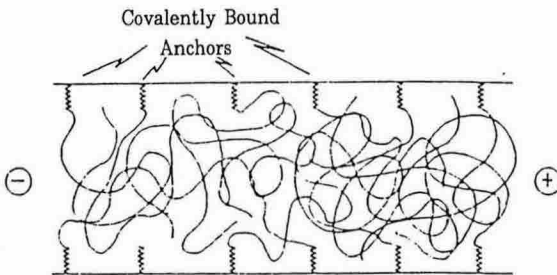
③ Carrier로 사용하는 양쪽성 물질들이 분석하고자 하는 시료 분자에 결합되는 것을 막아야 한다. 이 경우 좀 더 높은 농도의 salt를 첨가해서 양쪽성 단백질 물질을 해리시킨다.

④ 등전점에서 단백질들의 침전을 막아야 한다. 침전시 ethylene glycol이나 계면 활성제 등을 첨가하여 제거시킨다.

#### ⑤ Capillary Gel Electrophoresis (CGE)

CZE에서는 단순히 fused silica로 코팅된 모세관을 사용하지만 CGE에서는 agarose나 polyacrylamide gel을 사용하여 모세관내에 matrix를 형성시켜 분자들의 분리시 열 대류 현상에 의한 분자간 섞임 현상을 방지하고 분자들을 체(sieve)역할을 하는 matrix에 의해 크기별로 분리가 일어난다. 재래식의 gel 전기 영동법은 시간이 매우 오래 걸리며 정량이 어려운 단점이 있으나 CGE는 기존의 전기 영동이 갖는 단점들을 크게 보완 시켰다.

### Capillary Gel Electrophoresis



한편 분석하고자 하는 시료 분자들의 크기에 따라 gel을 형성하는 monomer대 cross-linking 물질의 비율을 조절하여 matrix의 다공성 정도를 조절하면 넓은 범위의 분자들을 효율적으로 분리할 수가 있다.

## 4. 맺음말

지금까지 CE에 관한 여러가지 사항들을 살펴 보았다. CE는 기존의 GC나 HPLC에 비해 많은 장점을 갖고 있으나 GC나 HPLC에 비해 시료 주입시 주입되는 시료량의 재현성이 다소 정확지 못한 점이 큰 단점이다. 주입되는 시료의 양도 매우 소량이므로 상당히 중요한 문제라고 생각된다. 이와 같은 문제만 좀 더 보완 된다면 CE는 식품속의 여러 성분들을 분석하는데 훌륭한 분석기기가 될 것으로 생각된다.

### 참고 문헌

1. Rickword, D. and Hames, B.D., Gel electrophoresis of nucleic acid. IRL press, Washington DC, 1987
2. Melvin, M., Electrophoresis, JW & S press, New York, 1987
3. Zeece, M., Trends in Food Science & Technology, 3, 6, 1992.
4. Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M. and Verheggen, T.P.E., J. Chromatogra., 169, 1, 1979.
5. Gordon, M.J. Huang, X., Pentoney, S.L. and Zare, R.L., Science, 242, 224, 1988
6. Karger, B.L., Cohen, A.S. and Guttman, A., J. Chromatogra., 492, 585, 1989
7. Giddings, J.C., Sep. Sci., 4, 181, 1969
8. Neilsen, R.G. and Rickard, E.C., J. Chromatogra., 516, 99, 1990
9. Swedberg, S., Anal. Biochem., 185, 51, 1990