

# 액체크로마토그래피

대한산업보건협회 산업위생부  
오 도 석

## 원리·용도

분석원리는 가스크로마토그래피와 같다. 분석속도는 가스크로에 비하면 장시간이 걸리나 박층(薄層)크로마토그래피, paper-크로마토그래피와 같은 플레이트법이 쉽게 사용되어졌기 때문에 발달이 지연되었지만 이온교환수지 컬럼에 의한 아미노산 분석기로 시작해서 분석속도를 개선한 고속(고성능)액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)가 광범위하게 이용이 가능하게 되어 여러가지 용도의 기종이 시판되고 있다.

## 종 류

이동상의 용액의 종류 및 고정상의 종류에 의해 표 1과 같이 분류된다.

- Liquid(이동상)·Liquid(고정상) Chromatography, LLC(분배크로마토그래피)
- Liquid(이동상)·solid(고정상) Chromatography, LSC(흡착크로마토그래피)
- 완충액(이동상)과 이온교환수지(고정상, ion exchange)chromatography, IEC
- 저점성용액(低粘性溶液, 이동상)과 반경질(半硬質) 겔(gel) chromatography, GeC

전용분석기로는 아미노산 분석기, 핵산성분(nucleic acid)분석, 단백질의 아미노산 배열을 말단으로부터 해명하는 아미노산 sequence analyzer 등이 있다.

표 1. 액체크로마토그래피의 비교

종 류	LLC	LSC	IEC	GeC
원 리	서로 혼합안되는 2상간의 성분(용질)의 분배평형에 기인함	평형상태에 있는 2상간의 경계면에 용질이 머무르는 흡착현상에 기인함	이온성 성분을 가역적으로 머무르게 하는 현상에 기인함	용질이 충전제의 미세구멍에 머무르는 용매중으로 침투, 또는 분자체 효과에 기인함
이동상	물 유기용매 혼합용매	물 유기용매 혼합용매	완충액 이온강도와 pH를 변화시킨다	낮은 점성에서 시료를 잘 녹이는 용액(일정조성)
고 정상	극성액상 (에칠렌글리콜 등) 무극성액상 (스쿠알란 등)	전다공성흡착제 (실리카, 알루미늄 등) 표면다공성흡착제 (실리카, 알루미늄 등)	양이온 교환수지 음이온 교환수지	반경질겔 (포리스티렌겔, 폴리초산 비닐겔 등) 경질겔 (다공성 실리카, 다공성 유리 등)

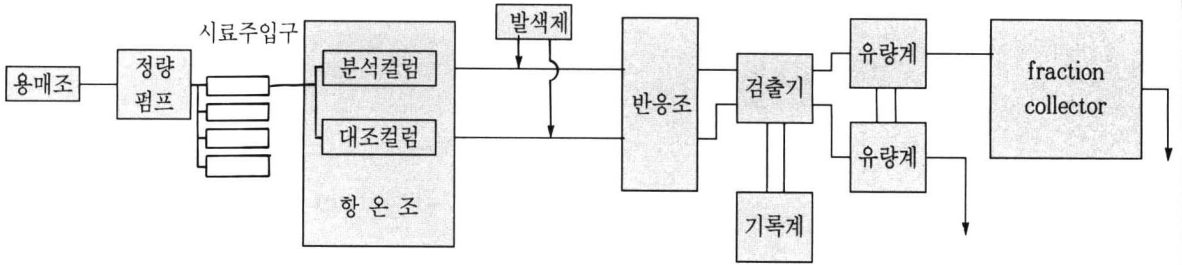


그림 1. 액체크로마토그래피 장치

## 구조

액체크로마토그래피의 중요한 구조는 정량(定量)펌프, 분석컬럼(경우에 따라서는 대조컬럼), 컬럼항온장치, 반응조, 검출기와 기록계, 유량계, 거기에 분리한 성분을 회수하고자 할 때에는 Fraction Collector 등이 된다(그림 1). 기타 부속품으로는 내약품·내압(耐藥品·耐壓)의 용매조, 반응약품조나 감압·탈기(減壓·脫氣)를 위한 감압펌프, 질소가스치환장치가 붙어 있다.

### 1. 정량펌프

액체크로마토그래피(그림 1)에는 액체를 보내기 위한 정량펌프가 대단히 중요하다. 컬럼입구에 필요한 최고압력은 일반적으로  $70\text{kg}/\text{cm}^2$ 가 필요하고 고속액체크로마토그래피의 미세한 충전제를 이용한 내경(內徑)이 작은 컬럼에는  $350\text{kg}/\text{cm}^2$ 이 된다. 펌프는 기계적 펌프와 공기압식 펌프가 있다. 기계적 펌프는 나사로 주사통을 작동시키지만, 피스톤의 왕복운동으로 액체를 보내는 방식이다. 이것은 유로계전체(특히 컬럼)을 통해 압력변화에는 관계없는 일정한 유량이 얻어진다. 유로계가 막힌 경우 컬럼 등의 파손을 막기 위한 안전뚜껑이 설치되어 있다. 공기압식 펌프는 이동상의 기압을 정상으로 유지하는 적당한 점을 수 있는 방식의 용기, 또는 피스톤이 공기압의 작용에 의해 액을 보낸다.

이런 펌프에서 토출(吐出)되는 최고 압력은 사용하는 가스압(일반적으로 고압펌프에서 약  $210\text{kg}/\text{cm}^2$ )에 의해 결정된다. 고압이 얻어지므로 액의 흐름이 맥류(脈流)가 없는 이점이 있다. 결점은 펌프내의 액체조의 양밖에 1회에 보내는 것을 할 수 없다.

### 2. 컬럼

컬럼입구에 시료를 주입하는 부분이 있다. 유로(流路)를 바꾸어 시료액을 이동상용매에서 컬럼으로 끌어들여 흐르게한다. 컬럼은 고압을 견디는 초경질유리제가 많지만 고속액체크로마토그래피에는 Tubore 유리나 정밀가공된 스테레스제가 사용된다. 모든 크로마토그래피 분리중 컬럼이 일정온도로 되도록 항온조의 물이 컬럼주위를 순환하고 있다. 분리효과를 올리기 위해 gradient mixer에 의해 용매에 밀도구배(密度勾配)를 사용하여 분리하는 방법도 있다.

### 3. 반응조

컬럼을 나온 용액은 일반적으로 발색시켜 비색측정되도록 하기위해 발색시약과 혼합되어 반응조에서 발색반응을 일으킨다. 아미노산분석에는 다투린 반응에 의해  $100^\circ\text{C}$ 에서 가열되어 발색된다. 이들의 분석에는 그림 2와 같다.

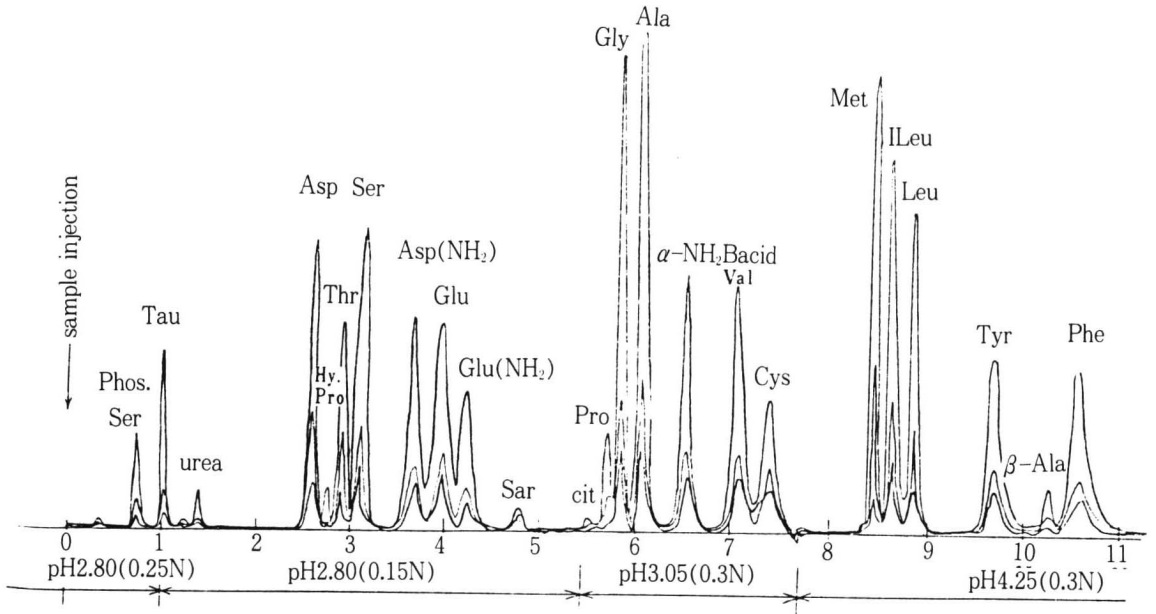


그림 2. 액체크로마토그래피에 의한 아미노산 자동분석(일례)

#### 4. 반응조

이동상중의 분석목적성분의 농도를 측정하는 데는 광전광도계에 의한 가시광선의 흡수나 자외선흡수가 일반적이다. 그외에 굴절율, 전기전도도, 유전율(誘電率)의 변화를 측정하는 방법이나 플라로그라피, 방사능검출기 등이 있다. 핵산, 아미노산, 아

민, 비타민, 스테로이드 등은 254 또는 280nm에서 직접 자외선 흡수에 의해 비색분석된다. 생체시료는 거의 발색조작에 의해 비색분석할 수가 있다. 컬럼으로부터 유출한 이동상을 광전광도계의 flowcell에 넣어 측정한다. 형광분석의 경우는 직각형 형광광도계를 사용한다. 검출기의 비교는 표 2와 같다.

표 2. 액체크로마토그래피 검출기 비교

검출기의 종류	단 위	최적시료감도	유속에 의한 변화	온도의 영향
광 전 광 도 계 (가 시 부)	AU	$10^{-6} \text{ g/m}$	무 관계	거의 없음
자 외 흡 수	AU	$10^{-9} \text{ g/m}$	무 관계	거의 없음
굴 절 계	RIU	$10^{-6} \text{ g/m}$	무 관계	$10^{-4}/^{\circ}\text{C}$
플 라 토 그 라 피	$\mu\text{A}$	$10^{-9} \text{ g/m}$	비 례	$1.5\%/^{\circ}\text{C}$
전 기 전 도 도	$\mu\text{mho}$	$10^{-8} \text{ g/m}$	무 관계	$2\%/^{\circ}\text{C}$
형 광 광 도 계	-	$10^{-9} \text{ g/m}$	무 관계	-

## 액체크로마토그래피의 정도관리

### 1. 유지·관리를 위한 사항

① 이동상 액체는 membrane filter(0.45 $\mu$ m)를 통과시켜 미세입자를 제거하여 펌프나 컬럼에 입자 상물질에 의한 오염 및 막힘에 유의한다.

② 이동상 액체는 불활성기체(He, Ar)에 의한 bubbling이나 초음파기를 사용하여 탈기(脫氣)시켜 유로(流路)중에 기포가 발생되지 않도록 한다.

③ 분석중 갑자기 압력이 상승하는 것을 막기 위해 일정한도의 압력을 설정하여 이상시 자동으로 전원이 차단되도록 하는 압력감지장치를 사용하여 사전에 trouble발생을 방지하면 편리하다.

④ 시료를 여과할 필요가 있을시는 1회용 septum filter를 사용하는 것이 편리하다. 단, 수용성인지 비수용성인지를 미리 파악하는 것이 중요하다. 특히, 비수용성유기용매인 경우 여과시 휘발에 유의해 적절한 용기를 선택한다.

⑤ 검출기의 감도를 높이고 주입량을 적게 하는 것이 일반적으로 좋다.

⑥ Syringe를 사용하여 주입시 Septum에 구멍이 생겨 액이 새지 않도록 유의한다. 또한 roof식 injector 사용시는 잘못 작동으로 인해 Syringe needle에 의한 굽힘이 일어나지 않도록 유의한다.

⑦ 이동상보다도 용출력이 강한 용매에 시료를 녹이면 피크폭이 넓어진다.

⑧ 이동상보다도 용해성이 큰 용매에 시료를 녹여 분석시 컬럼내에서 침전이 생성되어 trouble 원인이 될 수 있다.

⑨ 컬럼충진제는 batch간에도 특성차가 있을 수 있으므로 장기간 동일한 시료 분석시는 같은 batch의 컬럼을 미리 준비할 필요가 있다.

⑩ 분리되는 컬럼에 강하게 머무르는 공존물질은 분석컬럼을 오염시킬 수 있으므로 분석컬럼과 같은 충진제를 채운 짧은 보호컬럼을 주입구와 분리컬럼 사이에 설치하여 분석컬럼의 수명을 길게 할 수 있다.

⑪ 시료를 녹이는 용매는 이동상과 같은 것이

가장 좋다. 주입함으로 인하여 시료가 석출되지 않도록 유의한다.

⑫ 용출력이 같다면 점성이 낮은 이동상을 선택한다.

⑬ 분석후 컬럼은 충분히 세척한다. 특히 완충액을 사용하였을 경우는 더욱 세척에 세심한 주의를 한다.

⑭ 컬럼을 장기간 보관시에는 bellow를 부착하거나 cap을 하여 보관한다.

⑮ 펌프계, injector계 등에 이상이 있을시 우선 순서에 의해 분해후 메탄올 용매에서 깨끗이 세척하여 결합후 사용한다.

⑯ IC(ion chromatography), IPC(ion pair chromatography), IEC(ion exchange chromatography), GP(F)C(gel permeation(filtration) chromatography), 아미노산분석기 사용시는 특별히 원리 및 작동 manual을 참조하여 필요한 조치를 강구한다.

### 2. 액체크로마토그래피의 성능점검(4회/년)

① RPC(reversed phase chromatography)의 경우 column은  $\mu$ -bondapak C<sub>18</sub>(10 $\mu$ m, 25cm), 이동상은 acetonitrile/water(55/45, v/v), 검출기는 UV 254nm, flow rate 2.0ml/min, chart speed 1.0cm/min을 기준으로 작동시키면서 표준물질(resorcinol, naphthalene, anthracene)을 분석하여 이 물질들에 대한 R<sub>t</sub>(머무름시간), k(용량인자),  $\alpha$ (분리인자), R(분해능) 및 n(이론단수) 값을 기준값과 비교·평가한다(표 1).

② NPC(normal phase chromatography)에서는 column, 검출기, flow rate, chart speed는 같게 하고 이동상은 heptane, 표준물질은 carbon tetrachloride, benzene, naphthalene을 사용하여 분석 후 R<sub>t</sub>, k,  $\alpha$ , R, N에 대해 기준값과 비교·평가한다(표 1).

③ IC, IPC, IEC, GP(F)C, aminoacid analyzer 등도 적당한 분석조건 및 표준물질을 선정하여 분석후 비교·평가한다.

④ 표 3에 나타낸 기준은 참고치이며 실험실마다 여건에 따른 적합한 분석조건 및 표준물질을 선

정하여 동일한 조건하에서 3~10회 분석후 자체관리기준을 설정하여 운영하는 것이 바람직하다.

⑤ 기기가 다르거나 여러대 일 때에는 기기별로

관리기준을 설정하여야 한다.

⑥ 필요하다면, 검출한도(limit of detection)을 관리하는 것도 바람직하다.

표 3. 액체크로마토그래피의 성능점검표

평가인자	평가물질	관리기준	비고
RPC R, k, $\alpha$ , R and n	resorcinol naphthalene anthracene	R <sub>t</sub> : 1.8~3.4min k : 2~8 $\alpha$ : anthracene/naphthalene 1.9~3.0 R : 이웃 물질간 >1.5 n : anthracene >5,000	
NPC R, k, $\alpha$ , R and n	CCl <sub>4</sub> benzene naphthalene	R <sub>t</sub> : k : 2~8 $\alpha$ : 벤젠-나프탈린(임의결정) R : >1.5 n : >5,000	

산업  
보건

