

크로마토그래피의 理論과 應用

- 1. 序論과 物質分離의 理論 -

강릉대학교 치과대학 구강생화학교실

한 송

목 차

1. 크로마토그래피의 歷史
 2. 物質의 分離
 3. 크로마토그래피에 의한 物質分離의 原則
 4. 크로마토그래피 系에서 溶質의 移動
 5. 薄膜 크로마토그래피 (TLC)에 있어서 展開過程
 6. 溶質 滯留의 기전과 板 理論 (The Plate Theory)
- 參考文獻
英文抄錄

1. 크로마토그래피의 歷史

1890년대 후반 러시아 식물학자인 Mikhail Tswett은 탄산 칼슘을 사용한 원시적인 액체-고체 크로마토그래피 방법을 써서 여러 식물 색소를 분리하였는데 吸着床에 생성된 여러 색깔의 띠를 관찰한데 유래하여 크로마토그래피라는 명칭이 생기게 되었고 사실상 현대 크로마토그래피와 색깔은 아무 관계도 없지만, 이러한 역사적인 이유로 “크로마토그래피, Chromatography”라는 슬어가 쓰이게 되었다. 크로마토그래피는 사실상 Tswett에 의하여 발견되었지만, 1910년이 되어서야 그는 식물색소인 크로로필을 분리하는 방법을 출판하였다¹⁻³⁾. 이 당시 D. T. Day도⁴⁻⁶⁾ 크로마토그래피를 사용하여 석유의 각종 성분을 분리하였지만 실제로 크로마토그래피 과정을 해석한 사람은 Tswett이었다. 1931년 Kuhn 등⁷⁾은 Tswett이 권장한 방법을 써서 lutein과 xanthine을 분리하였다. 또한 Kuhn과 그의 동료들은^{8, 9)} α -carotene과 β -carotene을 분리하는데 똑같은 방법을 사용하였다.

Martin과 Synge는 1930년과 1940년대 초반 액체-액체 크로마토그래피 방법을 써서 아세틸 아미노산을 분리하였고, 1941년 그들의 연구를 출판하였으며 그 논문에서 액체 이동 상 (Mobile phase)을 적당한 기체로 대체 할 것을 권장하였다. 그 논문에서 그들은 용리 크로마토그래피 (Elution chromatography)의 일반적인 이론 즉 “板理論, Plate Theory”를 거론하였다. LC는 1963년 이후 거듭 발전하여 현재의 HPLC의 근간이 되었다.

GC의 역사는 영국의 London의 National Institute for Medical Research에 근무했던 A. T. James와 A. J. P. Martin에 의한 실험의 결과로부터 시작된다. 1941년 Martin과 Synge에 의한 업적¹⁰⁾은 그들로 하여금 노벨 상을 타게 하였을 뿐 아니라 LC의 혁명과 GC의 발전을 가져왔다. 1952년 James와 Martin¹¹⁾은 GC에 대한 첫 번째 논문을 발표하였는데, 흡착제에 부착된 지방산의 혼합물을, ethyl acetate을 이동 상으로 써서, 각 지방산을 분리하였다. 동년 Lapidus와 Amundson¹²⁾은 Rate Theory를 개발하였고 1956년 Deemter, Zuiderweg와 Klinkenberg¹³⁾가 Rate theory를 더욱 발전 시켰으며 1950년대 말부터 1960년대 중반에 이르기까지 Giddings^{14, 15)}는 일반 비평형이론 (Non-equilibrium theory)를 개발하여서 크로마토그래피의 속도론적인 면의 이해를 도왔다. GC는 1952년부터 1960년대 후반까지 매우 복잡한 분석 테크닉으로 발전하였다. 1956년에는 “Vapor phase chromatography”라는 가스 크로마토그래피에 관한 심포지움이 영국의 런던에서 열렸고 여기에서 여러 검출기가 토론이 되었다. Golay는 1957년에 GC에서 모세 컬럼 (capillary column)을 사용할 것을 주장하

였는데 모세 컬럼은 충전 컬럼보다 더 침투성이 있어 효율성이 좋고 더 해상도를 높힐 수가 있지만 컬럼물질의 내구성이 없고 고정 상을 일정하게 필름으로 코팅하는데 어려움이 있어 모세 컬럼은 잘 이용되지 않았었다. 이러한 문제들은 1980년 Dandeneau와 Zenenner에 의하여 fused-silica open tubular column (FSOT)이 발명됨으로 인하여 해결되었다. 이러한 Column은 원래 fiber-optic기술 공정에 의하여 제조되었던 바, 매우 flexible하고 화학적으로 안정성이 있다. 1958년 제2차 GC에 관한 국제 심포지움이 열렸는데 Littlewood¹⁶⁾에 의하여 GC 이론이 심화되었고 Golay¹⁷⁾에 의해 모세 컬럼이 소개되었다. Mc-Williams와 Dewer가 flame ionization detector를 기술하였다. 1960년에 다시 GC에 관한 국제 심포지움이 영국의 에딘버러에서 개최되었는데 GC에 관한 여러 가지 기술적인 문제가 토의되었다.

초기의 LC의 발전에 큰 걸림돌은 예민한 검출기의 부재였다. 그 당시는 용리 곡선은 컬럼으로부터 많은 분획물을 모아서 각 분획물을 비색법이나 적정법에 의하여 분석이 된 후 작성이 되어 엄청난 시간과 노력이 필요로 하여 비휘발성 물질의 분리 필요성에도 불구하고 1960년대 중반까지 LC의 진보는 답보상태였다. 1942년 Tiselius와 Claesson¹⁸⁾이 1951년 첫 번째 굴절률 검출기를 발명하였고, Vanderheuel 과 Sipos¹⁹⁾에 의해 개선이 되었다. LC에서 주요 검출기로 현재 많이 사용되고 있는 자외선 검출기는 처음 Merritt²⁰⁾에 의하여 GC에 사용되었는데 Kirkland²¹⁾에 의해 효율적인 LC검출기로 개발되었다. 또한 Kirkland²²⁾와 Major^{23, 24)}는 각각 지름이 몇 μm 인 아주 작은 충전 물질을 컬럼에 충전하는 방법을 개발하였으며 따라서 LC의 컬럼의 효율성 (Column efficiency)는 몇 백 이론 판에서 몇 천 이론 판으로

급등하게 되었다. 컬럼에 아주 작은 충전 물질을 충전 해서 물질을 분리하는 방법을 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)라고 불리우게 되었고 1970년대 후반에서부터는 HPLC가 주요 분석기술로 인정받게 된 것이다.

TLC의 역사는 GC나 LC와 달라 특정한 시기에 발전한 것은 아니고 점진적으로 발전해 왔다. 1938년 Izmailov와 Schraiber²⁵⁾에 의하여 기초가 닦여졌고 나중에 Stahl^{26, 27)}에 의하여 발전되었다. 비교적 간단한 기술이며 분리 방법으로는 저평가 되어 왔음에도 불구하고 화학의 모든 분야에서 빠르게, 효과적으로, 값싸게 분리를 할 수 있는 방법이다. 주로 미지의 시료를 LC를 통하여 분석하기 전에 예비검사를 하기 위하여 사용되어 왔다.

2. 物質의 分離

물질의 분리는 기계적, 물리적, 화학적인 방법에 의하여 이루어지고 (表 1, 2), 분리된 물질의 정량은, 물리적 화학적, 생물학적인 방법에 의하여 이루어 질 수 있다. 대부분의 물질의 분리는 최소 2개 이상의 상 (相, phase)의 형성을 포함하며 이러한 상속에서 물질이 분리가 되고 그 구성성분들이 계측이 된다. 조심스럽게 실험 조건 (온도, 압력 등)을 변화시킴으로서 고체를 액체로 변화시킬 수 있으며 (용해, melting) 또는 고체를 기체 (승화, sublimation)로 변화시킬 수 있으며, 액체를 고체로 또는 기체로 바꿀 수도 있다. 상전이 (phase transition)가 끝났을 경우 하나의 상에 원하는 물질이 있고 다른 상태에는 원하지 않는 물질이 있다. 여러 상들은 기계적이나 물리적으로 분리 될 수 있고 원하는 물질이 있는 상을 우리는 얻을 수 있다. 우리가 원하는 물질은 물질의 3가지 상태(고체,

表 1. 物質의 分離

고체			액체			기체		
고체	액체	기체	고체	액체	기체	고체	액체	기체
체로 치기 (Sieving), 磁場으로 분리하는 방법	용액	승화	LSC, 침전, 결정화, Electro-deposition	LLC, 증류, 추출	기화	GSC, 흡착	GLC, 응축, 흡착	열 확산

LSC: Liquid-solid chromatography
GSC: Gas-solid chromatography

LLC: Liquid-liquid chromatography
GLC: Gas-liquid chromatography

表 2. 物質分離의 方法

化學的	機械的	物理的
침전 (Precipitation)	여과 (Filtration)	GLC, GSC, LLC, LSC
Electrodeposition	Centrifugation (원심침전)	Liquid-liquid extraction
Masking	Exclusion chromatography	Distillation
이온 교환 (Ion Exchange)	Dialysis (투석)	Sublimation
		Zone electrophoresis
		Zone refining

表 3. 移動 相에 따른 크로마토그래피의 分類

移動 相 (Mobile Phase)	固定 相 (Stationary Phase)	種 類
기체	액체	GLC
	고체	GSC
액체	액체	LLC, PC
	고체	LSC, TLC, 이온 교환

액체, 기체)중에서 하나에 있을 수가 있고, 이것을 다시 3가지 상의 어떤 것으로도 변화 될수 있으므로 여러 가지 방법이 물질 분리에 이용된다.

물질의 분리는 表 1에서와 같이 아홉 가지 방법을 생각할 수가 있는데 크로마토그래피은 위의 표에서 4

가지 경우에 쓰인다. 물질분류의 과정과 방법으로는 表 2에서 보듯이 물리적, 기계적 화학적인 방법이 쓰이고, 크로마토그래피의 종류는 表 3과 4에서 나타내었다. 분리된 물질은 물리적, 화학적 방법에 의하여 측정된다.

여기에서 크로마토그래피를 특별한 범주안에 넣게 되는 것은 즉 다른 물질 분리방법과 다른 것은 하나의 상이 움직이며(移動 相, mobile phase), 다른 상은 움직이지 않는다는(固定 相, Stationary phase)것이다. 따라서 크로마토그래피에서의 물질 분류는 이동 상 (mobile phase)과 고정 상 (stationary phase)을 사용하여 이루어진다. 이러한 전제조건 때문에 크로마토그래피의 일차적인 분류는 이동 상의 물리화학적 성질에 의하여 행해진다. 따라서 이동 상으로 가스를 쓰는 경우에는 가스 크로마토그래피 (Gas Chromatography, GC)라고 불리운다. 반면에 이동 상으로 액체를 쓰는 경우에는 액체 크로마토그래피 (Liquid

表 4. 分離 기전에 의한 LC의 分類

LC의 種類	작용 기전 (Mechanism of Interaction)	應用
Affinity	생물학적 친화력	단백질, 효소
Chromatofocusing	등전점	단백질, 펩타이드
Hydrophobic Interaction	분산작용, 소수성 결합	단백질, 폴리사카라이드
Ion Exchange	정전기적 상호작용	단백질, 펩티드, 아미노산 핵산, 효소 등
Metal Chelate Interaction	특수 금속결합	단백질, 아미노산
Reverse Phase	분산작용	아미노산, 단백질, 핵산, 효소 등
Size Exclusion	분자량에 의하여 분리, 분자간 상호작용 없음	단백질, 펩타이드

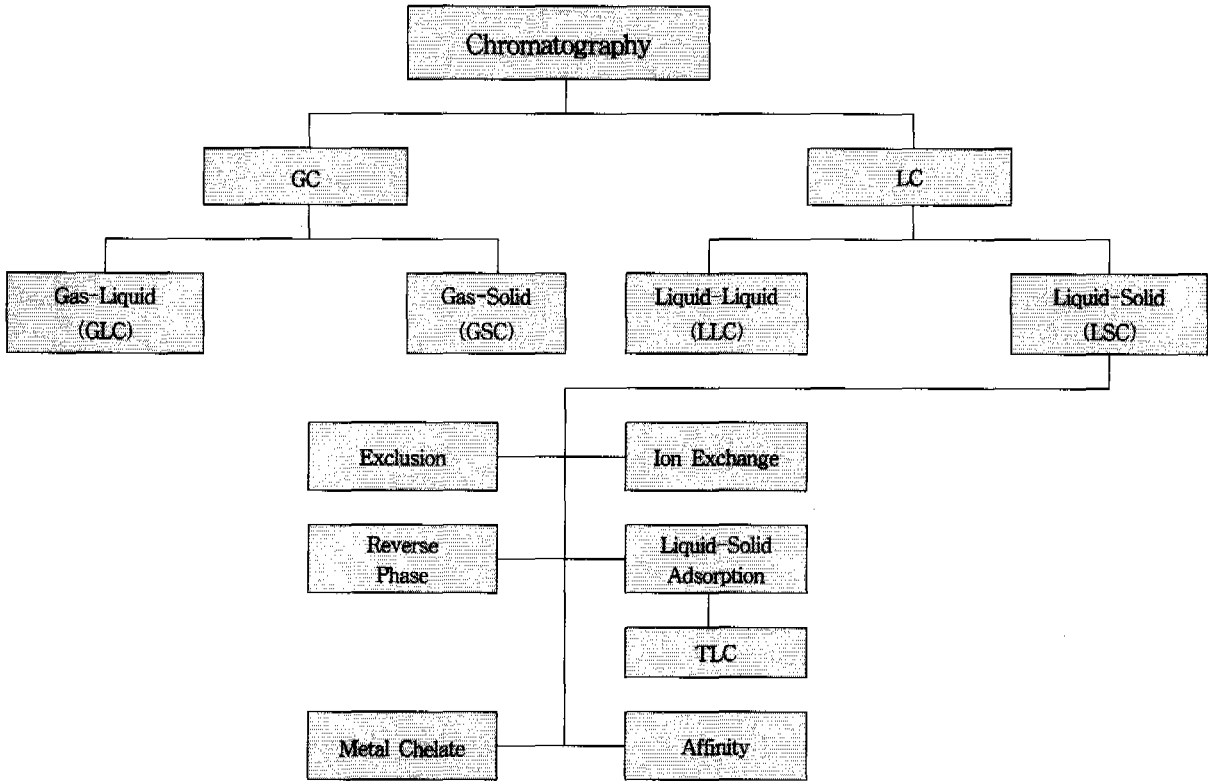


그림 1. 크로마토그래피의 一般의 分類

Chromatography, LC)라고 불리운다. 크로마토그래피의 다른 식으로 분류하면, 물질 분류가 일어나는 곳의 물리적 모양에 의하여 분리하게 되는데, 물질 분리가 관에서 이루어지면 컬럼 크로마토그래피 (Column Chromatography)라고 하며, 물질분리가 얇은 판이나 종이 장에서 이루어지면 판 크로마토그래피 (Lamina Chromatography)라 한다.

이 논문에서는 물질 분리의 이론과 크로마토그래피에 관한 일반적인 사항이 소개 될 것이며, 최근 크로마토그래피의 이론과 응용에 관한 많은 문헌들이 출판되었으므로 관심이 있는 독자들은 참고 문헌 28-38을 참조하여 주길 바란다.

3. 크로마토그래피에 의한 物質分離의 原則

성공적인 크로마토그래피의 분리는 해상도 (Resolution), 시료의 양 (Sample capacity)와 분석시간 (Analysis Time) 또는 속도(Speed)의 세 가지 인자사이에서 적당히 협상하여 행해진다. 크로마토그래피 도중, 실험조건을 변경하여 이 세 가지 중 두 가지

를 희생하여 한 가지를 향상시킬 수가 있는데 크로마토그래피 이론이 물질분리를 최적화하는데 도움이 될 것이다. 크로마토그래피 결과를 향상시키기 위한 여러 가지 최적화 방법이 있으나 중요한 것은 한 번에 하나의 실험 조건을 변해야 만 한다는 것이다³²⁾.

(1) 해상도 (Resolution)

크로마토그래피의 목적은 시료 중 여러 가지 구성 성분을 컬럼을 통하여 개별 밴드 또는 피크로 분리하는 것을 의미하고, 해상도, R은 다음 식과 같이 주어지고 그림 2에서 나타내졌다.

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_2 + w_1}{2}} = \frac{2\Delta t}{w_2 + w_1} \quad (1)$$

여기서 t_{R1} , t_{R2} 는 피크 첨단에서 측정된 체류물질의 체류시간이고 Δt 는 t_{R1} 과 t_{R2} 의 차이이다. w_1 과 w_2 는 피크의 기저부에서의 피크 넓이 (peak width)를 시간

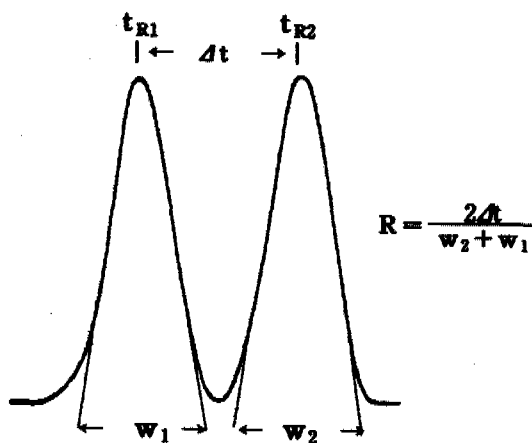


그림 2. 해상도 (Resolution)

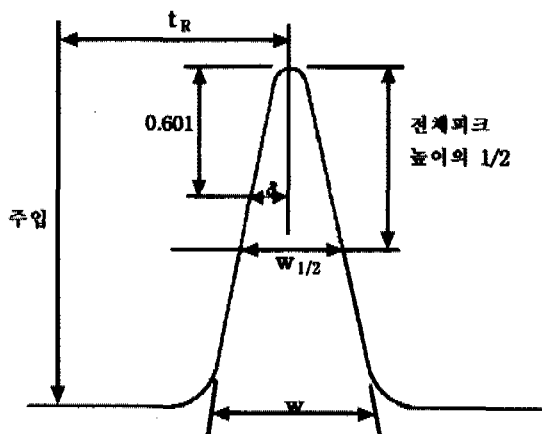


그림 3. 理論板 (Theoretical Plate)의 計算

으로 나타낸 것인데,

실무에서는 기사 (技師)는 단순히 피크의 모양을 보고 R 값을 추정할 수 있으므로 해상력의 크기를 계산하는 것은 거의 필요가 없다³⁹⁾. R 값이 0.4 보다 작을 경우는 시료 중 2개 이상의 구성성분이 존재한다고 해도 알 수가 없으나, 해상력이 0.5 이상이면 시료가 몇 개의 성분으로 구성되었는지 알 수 있다. 일반적으로 정량분석을 할 경우 R 값이 1.0 이상이 되어야 한다. 해상력을 높이는 방법 중 제일 좋은 것은 band width를 줄임으로서 컬럼 효율성 (column efficiency)를 높이는 것이 좋다. 컬럼의 효율성은 용매의 유속, 충전물질의 알갱이 크기, 충전 방법, 용매의 점도 등에 의하여 결정되며 이 컬럼 효율성이 개선됨에 따라 고속 LC의 발전도 이루어 졌다고 볼 수 있겠다. R 값을 개선하는 방법 중의 하나는 컬럼의 선택도 (Selectivity)를 바꾸는 방법이 있다. 선택도는 용질과 용매의 상호작용의 열역학에 의하여 결정된다. 고정상의 양을 상대적으로 많이 증가시키면 용리 시간이 길어지는 단점이 있다 하더라도 R 값은 증가된다.

(2) 컬럼의 효율성 (Column Efficiency)

해상력을 높여야만 하는 문제에 부딪친 크로마토그래피 기사는 첫 번째로 컬럼의 효율성을 검사해야만 하고 효율성이 낮다면 효율성을 높이므로써 해상력을 높힐 수가 있다. 컬럼의 효율은 다음 식에서 보듯이 정량적으로 측정될 수 있다 (그림 3 참조).

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 = 5.5 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2 \quad (2)$$

위의 식에서 w는 기저선에서 피크의 넓이이고 w_{1/2}은 피크 높이의 1/2 되는 점에서 피크의 넓이이다. 위의 식은 컬럼 내에서 시료의 구성성분이 체류한 시간과 피크의 넓이를 변수로 갖고 있다. 따라서 효율적인 컬럼은 피크의 퍼짐을 (band spreading) 방지하고 매우 좁은 피크를 유지하게 한다. 숫자 N은 이론 판수 (Theoretical Plate Number)⁴⁰⁾라고 불리며 크로마토그래피 컬럼의 길이와 비례하는데 긴 컬럼일 수록 판수가 증가한다. 상업적으로 생산되는 컬럼의 길이는 여러 가지 일 수가 있으므로 컬럼의 길이와 무관하게 컬럼의 효율성을 잘 필요가 있다. 이론판수에 상응하는 크기, H 또는 HEPT (height equivalent to theoretical plate)는 컬럼의 효율성을 재는 방법 중 선호되는 방법인데 서로 길이가 다른 컬럼의 효율성을 비교할 수가 있기 때문이고 이 값은 이론판수와 관계가 있는데

$$H = \text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (3)$$

으로 주어진다.

위에서 L은 컬럼 길이 (보통 mm) 이고 N은 이론 판수이다. HPLC 컬럼은 주로 판 높이 (Plate height)가 0.01 내지 1.0 mm 이다. 물론 좋은 컬럼일 수록 H 값이 작다.

(3) 컬럼의 선택도 (Column Selectivity)

LC를 사용하여 물질 분리할 경우 해상도를 높이는 다른 방법 중의 하나는 이동 상이나 고정 상을 바꿈으로서 컬럼의 선택도 (Selectivity)를 높이는 방법이다. 컬럼의 선택도는 용질과 용매사이의 상호작용의 열역학적인 기능이고 컬럼의 효율성은 그 상호작용의 동력학 (속도론, kinetics)의 기능이다.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_2}{K_1} \quad (4)$$

위의 식에서 t_{R1} 과 t_{R2} 는 각각 성분1과 성분2의 체류 시간이고 t_m 은 체류되지 않은 성분 (용매전단)의 체류시간이며, t'_{R1} 과 t'_{R2} 는 각각 성분 1과 성분 2의 교정된 체류시간 (corrected retention time), K_1 과 K_2 는 성분1과 성분2의 분배계수이다 (그림 4).

크로마토그래피 系에서 무용부피 (dead volume), V_m 에 해당되는 체적이 대개 컬럼 부피의 반 정도가 되는데 컬럼에 의하여 체류되지 않는 물질을 컬럼 내로 주입 후 그 물질이 컬럼에서 나오는 체적을 재서 결정한다. Deuterium Oxide 같은 물질은 reverse-phase LC의 경우 컬럼에 의하여 체류되는 것이 아니기 때문에, V_m 을 측정하기 위한 시험물질로 쓰일 수가 있다.

(4) 컬럼의 용량인자 (Capacity Factor), k'

용량인자는 다음과 같이 정의된다.

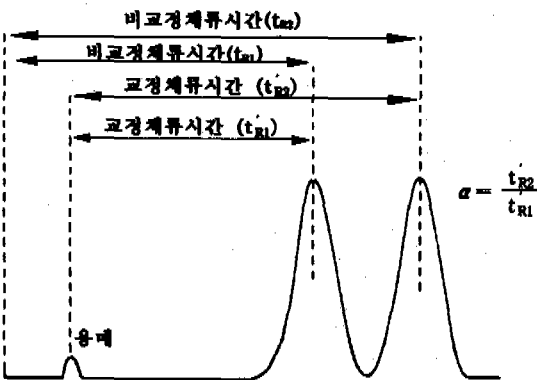


그림 4. 컬럼의 선택도 (Column Selectivity)

$$k' = \frac{KV_s}{V_m} = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (5)$$

k' 값이 작을수록 컬럼에서 체류되지 않고 비체류물질의 피크 (unretained peak)에 가깝게 용리되어 시료의 분리가 잘 안 된다. 반면에 k' 값이 커지면 시료 분리는 잘되나 분석시간이 길어지고 피크를 검출하기 힘들다. LC에서 피크나 밴드의 용리체적 V_R 은 ($V_R = t_R \cdot \text{flow rate}$)

$$V_R = V_m + KV_s \text{ 로 주어지는데} \quad (6)$$

위에서

V_m = 이동상의 틈새체적 (void volume)과 기계의 dead volume = $t_m \cdot \text{flow rate}$

V_s 는 고정 상에서 체적, 세공 체적 (Exclusion 크로마토그래피의 경우) 또는 표면적 (흡착 크로마토그래피의 경우) 이다.

분배계수 (Distribution coefficient), K 는 partition coefficient 또는 permeation coefficient 등으로 불리며 고정상의 용질농도를 이동상의 용질농도로 나눈 것이다. 식 (6) 은 용질의 체류체적은 체류되지 않는 물질의 체류체적, V_m 에 그 물질을 용리하기 위하여 필요한 이동상의 체적, KV_s 를 더한 것이 된다. K 값이 크다는 것은 고정 상에 대한 친화력이 크다는 것을 의미하고 긴 체류시간을 갖게된다. 따라서 컬럼의 선택도 분배계수나 고정 상 체적, V_s 을 바꿈으로써 개선 될 수 가 있고 flow rate (용매의 이동속도)나 컬럼의 압력은 선택도에 아무런 영향을 미치지 못한다. 분배계수 K 를 바꾸는 것은 온도를 바꾸거나, 이동상을 바꾸거나 (pH, ionic strength, 극성), 고정 상을 바꾸어서 (세공의 크기, 흡착제의 표면을 변화시키는 것 등) 이루어진다.

(5) 컬럼 길이 (Column Length)

컬럼의 길이를 두 배로 늘려도 Zone spreading 또한 증가하여 다음 식에서 보듯이 해상도 R 은 컬럼 길이의 제곱근에 비례한다.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = \frac{L}{H} \quad (7)$$

여기서 t 와 Δt 가 L 에 비례하고 t/w 도 \sqrt{L} 에 비

해하므로 w 도 \sqrt{L} 에 비례한다. 따라서

$$R = \frac{\Delta t}{w} \propto \frac{L}{\sqrt{L}} \propto \sqrt{L} \quad (8)$$

HPLC 컬럼의 길이는 10 cm 정도의 짧은 것부터 100 cm 정도로 긴 것까지 다양한데 술자는 원하는 해상도, 시료의 양을 생각하여 컬럼의 크기를 결정해야 한다. 용량이 적은 컬럼이, 검출기의 최소검출한도가 작은 이유로, 종종 과부하 (overload)가 될 수 있다는 것을 명심해야 할 것이다.

(6) 해상도. R을 높이는 방법

식 (1), 식 (2), 식 (6)을 결합하여, 컬럼의 효율성, 선택도, 용량인자에 관계된 해상도에 관계된 식을 다음과 같이 만들 수 있다.

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{k' + 1} \right) \quad (9)$$

위의 식에서 N이 있는 항은 컬럼 효율성 (Column Efficiency) 따지는 것이고 두 번째 항은 컬럼의 선택성 (Selectivity)을 따지는 부분이고 마지막 항은 용량 (Capacity)을 나타내는 항이다. 따라서 물질 분리는 이 세 항 중 어느 하나를 조절함으로써 개선될 수가 있다. 위의 식은 재 정렬하여 원하는 물질분리를 위해서 요구되는 해상도 R을 얻기 위한 板 수를 계산할 수 있다.

$$N_{req} = 16 R^2 \left(\frac{k' + 1}{k'} \right)^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \quad (10)$$

N_{req} 값과 HETP 추정 값으로부터 원하는 물질 분리를 위한 컬럼의 길이를 계산할 수가 있다.

$$L = (HETP) (N_{req}) \quad (11)$$

이상 해상도를 높이기 위한 여러 방법들을 고찰해 보았다. 좋은 실험 결과를 얻기 위해서는 다음과 같은 질문을 스스로에게 하여야만 할 것이다.

1. 컬럼 크로마토그래피 하는 주요 목적이 무엇인가? 물질의 순수 분리인가? 어떤 물질의 검출인가? 또는 특정물질의 정량분석인가?

2. 시료의 모든 구성성분을 분리하는 것이 중요한가?
3. 정량분석이 필요하다면 어느 정도의 정확도가 요구되는가?
4. 시료의 구성성분 검출 등을 위하여 몇 가지 방법을 사용할 것인가?
5. 한 번에 몇 가지 시료가 분석되어야 하는가?
6. 어떠한 기구들을 사용해야만하고 어떤 정도의 기술 수준이 요구되는가?

4. 크로마토그래피 系에서 溶質의 移動

크로마토그래피는 분리될 물질들을 이동 상과 고정 상에 분배하는 분리과정이라고 말할 수 있으며 이동 상에 주로 분배되는 물질은 고정 상에 주로 분배되는 물질보다 빠르게 크로마토그래피 시스템을 통과한다. 결과적으로 고정 상에 관한 분배상수와 반비례하여 물질들은 칼럼에서 용리 (Elution)된다.

용질을 이동 상에 있을 때만 칼럼을 통하여 크로마토그래피 시스템을 통과한다. 이러한 과정 즉 물질이 크로마토그래피 시스템을 통과하는 과정을 크로마토그래피 전개 (development)라 한다. 세 가지 크로마토그래피 전개를 소개하면 용리전개 (elution development), 치환전개 (displacement development)와 전단분석 (frontal analysis)이다. 現在로는 가끔 제조용 LC에서 치환전개가 사용되는 것을 제외하고는 GC, LC 공히, 용리전개가 유일한 전개 수법이다. 박막 크로마토그래피 (TLC)에서는 여러 가지 성분을 갖는 용매가 전단분석에 의하여 움직이는 반면 시료인 용질은 용리전개에 의하여 움직인다.

이 부분에 관한 더 자세한 내용은 참고문헌 35와 36에 기술되어 있다.

(1) 용리전개 (Elution Development)

용리전개란, 시료가 크로마토그래피 시스템에 주입될 때부터 칼럼에서 나올 때까지 계속적으로 흡착-추출과정을 거치는 것을 말한다. 크로마토그래피 컬럼을 통하여 용질이 이동하는 것을 생각할 때 그림 5에서 보면 GC와 LC 컬럼을 통하여 용리되는 용질이 그려져 있고 이동 상과 고정 상에 있는 용질농도가 Gauss 함수형태로 나타내져 있다. 板 이론에 관한 한 Gauss 함수 형태는 유효하다. 두 개의 系에 있어서 용질의 분포는 서로 다른 평형에 기인한다. GC의 경우 기체와 고정 상간의 평형은, 용질 분자가 표면과

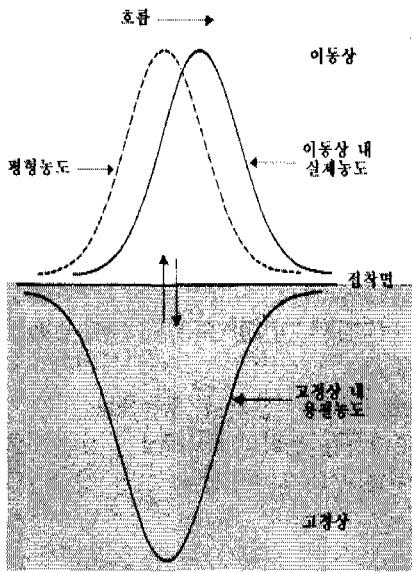


그림 5. Mass Transfer 효과

접촉하여 고정 상으로 들어갈 확률과 용질 분자가 고정 상을 떠날 정도로 충분한 운동 에너지를 획득하여 기체상태로 들어갈 확률이 같을 때, 형성된다. LC에 있어서는 이동 상에 있어서도 물질간의 상호 작용이 있을 수 있으므로 용질의 평형상태는 용질 분자와 두 개의 상 (고정 상과 이동 상) 간의 힘의 크기와 상호 작용의 확률에 달려있다고 볼 수 있다. 두 분배 시스템은 열역학적으로 평형 쪽으로 가게된다. 그러나 이동 상이 움직임에 따라서 이동 상의 흐름은 이동 상의 용질의 농도를 계속 비교적 앞쪽으로 (고정상의 용질과 비교할 때) 치환시키게 되는데 아래 그림에 나타내었다 (그림 5).

이러한 치환에 따라 GC와 LC 모두에 있어 피크 앞쪽에 있는 이동 상의 용질의 농도는 고정 상의 평형시의 용질농도를 넘게 된다. 이동 상에 있어서의 peak의 앞쪽 부분의 용질은 평형을 다시 이루기 위하여 고정 상으로 계속적으로 들어가게 되고, 피크의 뒤쪽 부분에 있어서는 반대현상이 일어나게 된다. 즉, 농도측면 (concentration profile)이 앞으로 움직임에 따라, 고정 상에 있어서의 피크 뒷부분에서는 고정상의 용질농도는 평형농도를 지나치게 된다. 따라서 용질은 고정 상을 떠나게 되고 평형을 다시 이루기 위하여 이동 상으로 이동하게 된다. 이러한 방식으로 즉 용질이 뒷 부분에서 이동 상으로 이동하고 피크 앞부분에서 고정 상으로 귀환한 방식으로 용질은 크로마

토그래피 시스템을 이동하게 되는 것이다. 용질의 띠 (band)는 열역학적인 평형에 도달하기 위하여 컬럼을 통해서 진전되는데 이것은 피크의 뒤쪽에 고정 상으로부터 이동 상으로 순운반 (net transfer)에 의하여 이루어지게 되고 피크 위 앞쪽에서는 이동 상으로부터 고정 상으로 순운반 (net transfer)에 의한 것임은 물론이다

(2) 치환 전개 (Displacement Development)

치환전개는 흡착제의 활성부위에 대하여 용질간의 경쟁에 달려있고 용질이 표면에 흡착되는 liquid-solid계에서만 유효하다. 치환전개 시스템에서는 시료의 모든 성분이 고정 상에 강력히 부착되어 있어 이동 상에 의하여 용리 될 수가 없던지 아주 천천히 용리된다. 시료는 그러나, 용질의 구성성분의 어느 것 보다도 고정 상에 더 강력히 부착 될 수 있는 물질에 의하여 치환된다 (치환제; displacer라 불린다). 초기에 시료혼합물이 컬럼에 넣어지면 각 용질은 흡착이 가능한 근처의 부위를 점령하기 위한 경쟁이 일어날 것이고 가장 가까운 근처의 고정 상은 가장 강력히 부착된 성분에 의하여 포화 상태가 될 것이고, 시료가 컬럼을 따라서 움직임에 따라서, 다음 흡착 가능 부위는 다음으로 강력한 성분에 의하여 포화상태에 이를 것이다. 이런 식으로 시료의 모든 성분이 흡착정도에 따라 컬럼 안에서 줄을 서게 될 것이고 실제제로도 흡착강도가 제일 낮은 시료 성분이 컬럼의 입구로부터 제일 먼 곳에 위치하게 될 것이다. 물질간의

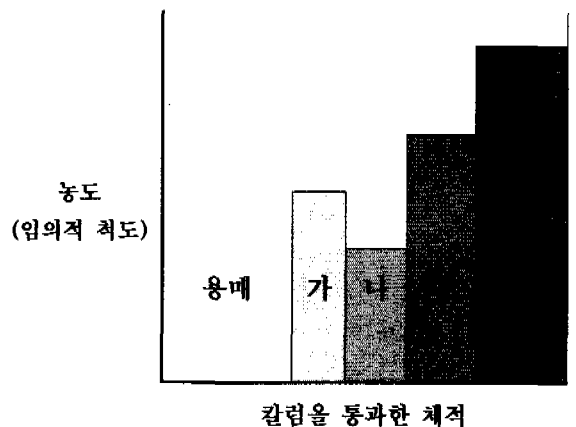


그림 6. 치환 전개

분리를 유도하기 위하여 이동 상에 치환제가 주입되어야 하는데 가장 흡착력이 강한 용질은, 치환제가 주입되면, 이동 상으로 움직여 컬럼의 밑 부분 (주입구로부터 먼 부분) 방향으로 움직여서 고정 상에 덜 강하게 흡착된 용질을 치환한다. 따라서 치환제는 흡착된 성분들은 강제적으로, 컬럼을 따라서, 컬럼에 붙어 있는 용질을 점차적으로 밀어내게 되는데 위에 있는 흡착된 용질이 아래에 있는 용질 (입구에서 먼)을 밀어내는 식이 된다.

검출기에 기록된 여러 성분의 농도 측면은 그림 6에 나타나 있는데 용리 크로마토그래피와 마찬가지로 용질은 용리가 되는 순서에 따라 특징지워 질 것이고, 각 띠의 높이가 아닌 길이는 혼합물 중에 존재하는 용질의 양에 비례할 것이다. 이런 종류의 전개에 가장 큰 단점은 용질을 서로 실제로 분리가 안된다는 점이다. 모든 용질은 차례로 컬럼에서 나오지만 서로 접촉하게 되고 실제로는 옆에 있는 다른 종류의 용질과 섞이게 된다. 치환전개는 분석용 크로마토그래피에는 전혀 사용되지 않고 있으며 제조용 LC에서 가끔 쓰인다. 과부하된 컬럼에 용리전개의 방법을 쓸 경우, 약간의 치환전개효과가 나타나는데 이 경우 시료의 대량분리에 도움이 된다^{35, 40, 41}.

(3) 전단분석 (Frontal Analysis)

전단분석이 용리전개와 다른 것은 두 가지 점이다. 첫째, 전단분석에 있어서는 시료는 순수한 상태로나

또는 이동 상에서의 용액 상태로 칼럼에 계속적으로 반입이 되는데 용리 크로마토그래피에서는 일정량의 시료가 칼럼에 반입된 후 분리가 그 후에 전개된다. 둘째로 용리전개에 있어서는 혼합물의 모든 성분이 각각 서로 분리가 될 수 있다. 전단분석에 있어서는 첫 번째 성분의 일부분이 비교적 순수한 상태로 용리되며, 그 후의 각 성분은 전에 용리된 것과 서로 섞인다. 가, 나, 다의 3가지 성분을 갖는 혼합물이 이동 상에 희석된 용액으로 계속 반입이 되면 결과적으로 농도/용리-체적 곡선은 다음 그림에서와 같다.

용질과 고정 상간의 분자간의 힘 때문에 각 용질은 칼럼에 서로 다른 정도의 친화력으로 부착하게 된다. 포화 농도는 분배계수 K의 크기에 따라 달려있는데

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{으로 정의되며} \quad (12)$$

여기서 C_m 은 칼럼에 반입된 이동 상 내의 용질의 농도이고, C_s 는 이동 상내의 C_m 과 평형상태에 있는 고정 상의 농도이다. 따라서 포화농도는 다음과 같다.

$$C_s(\text{포화농도}) = KC_m(\text{반입농도}) \quad (13)$$

첫 번째로 용리 될 성분 <가>는 이동 상 내에서 가장 약하게 부착된 용질이다. (가장 작은 K을 갖은 용질), 그 후 두 번째로 용리될 성분 <나>는 용리가 되나 첫 번째 용질과 섞이게 된다.

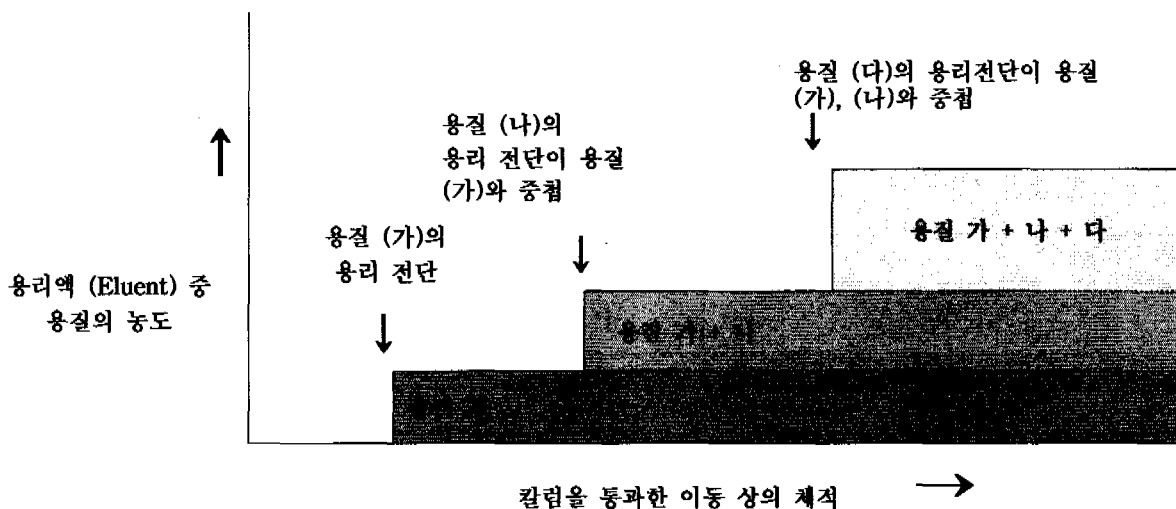


그림 7. 전단분석

마지막으로 세 번째 용질<다> (가장 K가 큰 용질)가 용리되는데, 이때 <가>, <나>, <다>의 혼합체가 용리될 것이다. 그림 7에서 보듯이 오직 <가>만이 순수한 형태로 용리가 되며 따라서 전단 분석은 조제 크로마토그래피에 부적당하다. 원래 전단분석은 분석용으로 쓰였으나 용리전개 방법으로 대체되었다.

5. 薄層 크로마토그래피 (TLC)에 있어서 展開過程

TLC에 있어서 전개과정은 매우 복잡하다. TLC에서 용질을 용리시킬 때 사용한 이동 상은 적어도 3개 이상의 용매를 포함하기 때문이다. 板이 용매로 前處置되지 않은 경우 판 평면에서 변형이 일어난다. 물질 분리는 이동 상 자체의 전단분석에 의하여 점증용리 (Gradient Elution)의 형태로 일어나게 되는 것이다. 고정 상과 가장 강하게 상호작용을 하는 용매는 혼합 용매에서 추출되어 그림 8에서 <A>부분에 흡착된다. 나머지 두 용매의 혼합물은 板을 따라서 계속 움직여서 고정 상과 다음으로 강하게 작용하는 용매 <나>는 판의 부분에 흡착된다. 고정 상과 가장 약하게 작용하는 용매 <다>는 계속 이동하여 판의 <C> 부분에 흡착된다. 이 경우 분배 시스템은 매우 복잡한데 혼합용매의 세 구성성분의 전단분석에 기인한다. 물질 분리도중 어떤 부분이 용질과 작용하나 보자. <A> 부분에서 용질은 용매 <가>, <나>, <다>와 용매 <가> 가 덮은 표면에 분포 될 것이다. 다음 부분 에서는 용질은 <나>와 <다>의 혼합용매와 용매 <나>에 의하여 덮어진 표면에 분포 된 것이다. 마지막으로, <C> 부분에서 순수용매 <다>와 <다>로

덮혀진 표면사이에 분배가 일어날 것이다. 이런 식의 논리도 사실상 너무 단순화 한 것이다. 각 부분의 이동 상 농도는 일정하지 않고 板의 위쪽으로 갈수록 농도가 적어질 것이기 때문이다. 더구나 용질의 분리가 계속되면서 <A>, , <C>의 부분의 길이가 길어지기 때문이다. 전체적인 효과는 용질 분리가 TLC板의 서로 다른 세 부분에서 연속적으로 일어나는 것처럼 보이고, 각 부분은 서로 다른 고정 상과 이동 상을 갖고, 각 부분에서 용질 분리는 용리 전개에 의하여 달성이 되나 전체적인 효과는 일종의 점증용리 (Gradient Elution)의 일종이라고 보아야 할 것이다. 이러한 시스템은 매우 복잡하지만 용질분리가 시작하기 전 이동 상의 용질의 증기 (vapor)로 板을 前處置함으로써 단순화 할 수 있다.

6. 溶質 滯留의 기전과 板 理論 (The Plate Theory)

시료혼합체를 성공적으로 분리하기 위해서는 용질을 움직여서 각 구성성분을 분리해야 함과 동시에 각 피크의 확산을 막아서 원하는 구성성분이 별개로 분리 될 수 있도록 해야 한다. 크로마토그래피 전개 시, 구성성분의 분리와 band spreading은 계속 일어나며 서로 독립적인데, 체류의 기전은 분자간 상호작용 때문이고 band spreading은 분자운동속도 (molecular kinetics)에 기인한다. 두 가지 물질의 분리정도는 크로마토그래피 系에서 두 물질의 상대적 체류에 달려 있다. 따라서 용질의 체류체적에 관한 식은 어떻게 체류가 조절되고 어떻게 분리가 달성이 될 수 있는가를

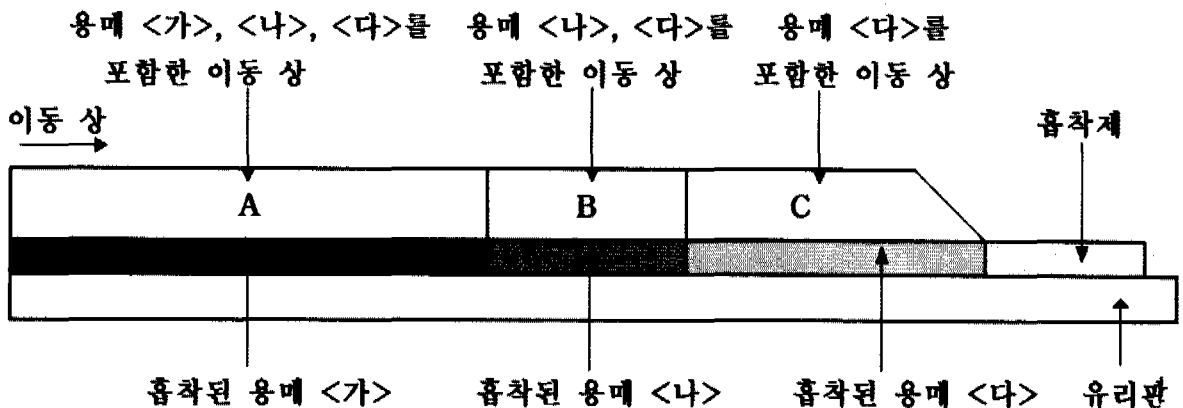


그림 8. TLC에서의 전개과정

	板 (P-1)	板 (P)	板 (P+1)	흐름의 방향 →
移動相	V_m $C_{m(p-1)}$	V_m $C_{m(p)}$	V_m $C_{m(p+1)}$	

참조: 참고문헌 (35)으로부터 다시 그린 것

그림 9. LC 컬럼에서 세 개의 連續 理論 板

보여줄 수 밖에 없다. 체류체적에 관한 식을 유도하기 위하여 용질의 용리곡선에 대한 식을 얻을 필요가 있다. 즉 컬럼을 지난 이동 상의 체적과 용리체 (eluent) 내의 용질농도의 관계식을 말한다. 이러한 방정식은 크로마토그래피란 곡선을 기술하는 방정식이다. 용리곡선 식이 유도되면, 미분하여 식을 영으로 놓으면 피크의 최대치가 결정될 수 있고, V_r 에 관한 식이 얻어질 수 있다. V_r 의 식이 용질 체류정도를 결정하는 인자를 나타낼 것이고 즉 크로마토그래피 분리에 관계하는 인자들을 나타내게 될 것이다. Martin과 Syngé¹⁰⁾에 의하여 개발된 板 이론이 용질의 용리곡선에 관한 필요한 방정식을 줄 수 있는데 원래 유도된 식은 지수함수를 포함하는 解이었는데, 정확한 해가 아니라 近似解이었다. 그 후 Said²⁾는 다른 수학적 방법을 동원하여 더 정확한 해답을 얻는데 여기서는 Said가 유도한 방식을 따른다. 板 理論은 GC, LC를 포함하여 모든 크로마토그래피 系에 적용될 수 있으나, Lamina 크로마토그래피의 대표적인 박막 크로마토그래피 (TLC)에는 적용될 수가 없다. 이 板 이론은 모든 용질이 두 상에서 항상 평형관계 있다고 가정한다. 용질이 컬럼을 따라 내려갈 때 이동 상과 고정 상에서의 용질이 계속적인 교환이 있기 때문에 사실상 평형상태가 도달하는 것은 불가능하다. 결과적으로 물의 증류 시 증류 컬럼이론과 비슷한 이론으로 시도되었는데, 컬럼은 많은 板(plate)나 방(cell)으로 나뉜다고 생각되어 지고 실제로 "plate"란 술어는 증류이론에 관한 Martin의 연구에서부터 비롯된다. 각 방은 일정한 길이가 할당되어서, 용질은 각 방에서 일정한 시간을 보내는 것으로 가정되었다. 방의 크기는 각 용질에 충분한 "dwell time; 체제시간"을 보장할 수 있어, 이론적으로 용질은 두 상 사이에서 평형을 이룰 수가 있다. 따라서 plate 크기가 작을수록 두 상간에

용질교환이 효율적으로 일어나고 板수가 컬럼 안에 많아진다. 이러한 이유로 이론적인 板의 수가 "컬럼 효율(column efficiency)"라고 불리는 것과 같고 이는 컬럼의 분리 능력의 척도이다.

분리상수, K는

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad (14)$$

로 주어지고 C_m 은 이동 상 안의 용질의 농도이며, C_s 는 고정 상 내의 용질의 농도이다.

식 (14)은 크로마토그래피 분리에서 아주 작은 농도 아래서는 일반적인 분리의 법칙이 적용된다는 것을 보여준다 (즉 흡착 등온선은 직선이다).

식 (14)을 미분하면

$$dC_s = KdC_m \quad \text{이 되는데} \quad (15)$$

컬럼내 총 n 개의 판에서 3개의 연속적인 판 (p-1), (p)와 (p+1)을 생각해보면, (그림 9)

각 板에 있어서 이동 상과 고정 상의 체적을 각각 V_m 과 V_s 라고 하고 각 판에 있어서의 이동 상과 고정 상에 있어서의 용질의 농도는 각각 $C_{m(p-1)}$, $C_{s(p-1)}$, $C_{m(p)}$, $C_{s(p)}$, $C_{m(p+1)}$, 및 $C_{s(p+1)}$ 이 될 것이다. 이동 상의 체적 (dV)가 板 (p-1)에서 板 (p)로 움직임과 동시에 板 (p)로부터 같은 체적의 이동 상을 치환시켜 板 (p+1)로 이동시키자. 板 (p)에서 용질의 질량변화를 보면 板 (p-1)에서 板 (p)로 들어오는 용질의 질량과 板 (p)에서 板 (p+1)로 이동하는 용질의 질량 차이가 板 (p)에 있게된다.

질량은 체적을 농도에 곱한 것이니까 板 (p)에서 용질질량의 변화 (dm)은 다음과 같다.

$$dm = (C_{m(p-1)} - C_{m(p)})dV \quad (16)$$

만약 평형이 板 (p)에서 유지가 된다고 가정하면 질량 (dm)은 두 상에 분배가 되는데 첫 번째로 이동 상의 용질 농도변화 $dC_{m(p)}$ 와 두 번째로 고정 상의 용질 농도변화 $dC_{s(p)}$ 을 야기 시킬 것이다.

$$\text{따라서 } dm = V_s dC_{s(p)} + V_m dC_{m(p)} \quad (17)$$

식 (15)에서 $dC_{s(p)}$ 를 대입하면

$$dm = (v_m + K_v) dC_{m(p)} \quad (18)$$

식 (16)과 (18)을 같이하고 재배열하면

$$dC_{m(p)}/dV = (C_{m(p-1)} - C_{m(p)})/(v_m + K_v) \quad (19)$$

여기서 수식을 간단하게 하기 위하여 변수를 바꾸자. 이동 상에 있어서 흐름의 체적을 밀리리터 대신 $v_m + K_v$ 로 측정하자.

따라서 새로운 변수 (v)는 다음과 같이 정의 될 수 있다.

$$v = V / (v_m + K_v) \quad (20)$$

수식 ($v_m + K_v$)는 '판 체적(plate volume)'이라고 명명되며, 칼럼을 지나는 이동 상의 흐름은 밀리리터 대신 '판 체적(plate volume)'으로 측정된다. "판 체적"이라는 것은 이동 상 내의 용질의 평형농도에서 板에 있는 모든 용질을 함유하는 이동 상의 체적을 말한다.

식 (20)을 미분하면 $dv = dV/(v_m + K_v)$ (21)

식 (19)에서 식 (21)로부터 dV를 대입하면

$$dC_{m(p)}/dv = C_{m(p-1)} - C_{m(p)} \quad (22)$$

이것이 板(p)에서 이동 상 내의 용질의 농도변화를 기술하는 기본적인 미분 방정식이고 식 (22)을 적분하면 용리곡선에 관한 식을 얻을 수 있다. 실제 적분 과정은 여기서 소개하지 않지만 관심 있는 독자는 R. P. W. Scott의 저서 (참고문헌 35, 43)와 Said의 저서 (참고문헌 42)를 참고하기 바란다. 용리곡선에 대한 식은 식 (22)의 적분해서 얻는데 다음 식과 같다.

$$C_{m(p)} = C_0 \exp(-v)^p / p! \quad (23)$$

여기서 $C_{m(p)}$ 는 (p)번째 판에서 떠나는 이동 상의 용질농도이며 (C_0)는 칼럼의 첫 번째 판에 있는 용질의 초기 농도이다. 따라서 칼럼의 최종 판 (n)에 대한 식 (칼럼을 지난 이동 상의 체적을 갖고 검출기에 진입하는 이동 상의 용질농도 와 관계되는 식)은 다음과 같이 주어진다.

$$C_{m(p)} = C_0 \cdot \exp(-v) \cdot v^n / n! \quad (24)$$

식 (24)은 검출 기록된 용질의 농도와 이동 상의 체적의 흐름과의 관계를 나타낸다.

크로마토그래피 상을 나타내는 사실상의 관계

$$\frac{dC_{m(n)}}{dv} = C_0 \cdot \frac{-\exp(-v) \cdot v^n + \exp(-v)n \cdot v^{(n-1)}}{n!} \quad (25)$$

또는

$$\frac{dC_{m(n)}}{dv} = C_0 \cdot \frac{-\exp(-v) \cdot v^{(n-1)}(n-v)}{n!} \quad (26)$$

는 그림 10에 나타내었다.

식 (24)은 사실상 Poisson 함수이다. (n)이 클 경우 식 (24)은 간단한 error 함수나 Gauss 함수로 된다. 이러한 이유로 GC나 LC로부터 용리된 피크는 Gaussian 형태를 하고 있다. 식 (24)을 미분하고 영으로 놓으면 주입점과 피크점 사이의 컬럼을 지난 이동 상의 체적 (V_r)에 관한 식을 얻을 수 있다.

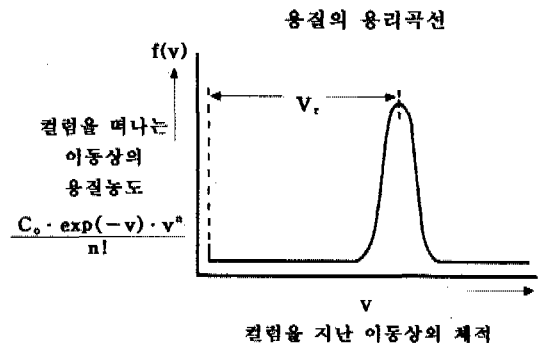


그림 10. 용질의 용리곡선

영으로 놓으면 $n-v = 0$ 또는 $v = n$

이것은 peak 정점에서 칼럼을 통해 n 개의 板 체적을 가진 이동 상이 이동했다는 것을 의미한다. 체적 이동은 ml 이 아닌 板 체적 (plate volume)으로 측정되므로 칼럼을 지난 부피를 ml 로 표시하면 판 체적 ($v_m + Kv_s$)을 곱하면 된다.

따라서 체류체적(retention volume, V_r)은

$$V_r = n(v_m + Kv_s) = nv_m + nKv_s \quad (27)$$

로 표시된다.

nv_m 은 칼럼내의 이동 상의 총 체적 즉 V_m 이며, nv_s 는 칼럼내의 고정 상의 총 체적, 즉 V_s 가 되므로

$$V_r = V_m + KV_s$$

또는 $V'_r = KV_s$ (28)

따라서 수정된 체류체적은 두 개의 매개변수에 의해 조절된다. 첫 번째는 두 개의 상 사이의 용질의 분배상수며 두 번째는 용질이 흡착할 수 있는 고정 상의 양이다. 결과적으로 V'_r 을 바꾸기 위해서는 K 나 V_s 또는 양쪽 모두를 바꿔야 한다. 용질(가)와 (나)의 분리가 어떻게 달성이 될 것인지는 식 (28)에서 명백하다. 용질 A와 B를 분리하기 위해 $K_{(A)}$ 을 $K_{(B)}$ 보다 크거나 작게 하든지 $V_{s(A)}$ 을 $V_{s(B)}$ 보다 크거나 작게 하든지 하여 $V'_{r(A)}$ 을 $V'_{r(B)}$ 보다 크거나 작게 만들어야 한다. 혼합물을 분리하기 위하여 모든 구성 성분의 K 값 또는 각 성분에 접근 가능한 고정 상의 양 V_s 이 달라져야 하거나 두 개의 값이 모두 달라져야 한다. 지금까지 비평형 이론을 도입하여 용질체류에 관한 板理論을 검토해 보았다. 板理論 (Plate theory)에 관한 더 자세한 내용은 참고문헌 35, 42, 43에 기술되어 있다. 지금부터 크로마토그래피 분리에 있어 용질의 체류를 설명하는데 열역학이 어떻게 사용되는지를 보겠다.

滯留의 熱力學

고전 열역학에 의하면 R 을 가스 상수, T 를 절대온도, ΔG_0 을 표준 자유 에너지라고 할 때

$$RT \ln K = -\Delta G_0 \quad (29)$$

이고 크로마토그래피 할 경우 체류의 경우를 생각하

면, 분배상수가 위의 식의 평형 계수가 된다.

또한 ΔH_0 가 표준 엔탈피 변화이고, ΔS 가 표준 엔트로피 변화일 때

$$-\Delta G_0 = \Delta H - T\Delta S \quad \text{이므로} \quad (30)$$

$$\ln K = \Delta H/RT - \Delta S/R \quad \text{또는} \quad (31)$$

$$K = \exp\{-\Delta H/RT - \Delta S/R\} \quad \text{이다.} \quad (32)$$

두 상 (고정 상과 이동 상)에 있어서 특정한 용질의 분배에 관한 표준 엔트로피 변화와 표준 엔탈피 변화가 계산될 수 있으면 분배상수 K 와 체류체적도 예견될 수 있다. 그러나 이러한 분배 시스템에서의 이러한 열역학적인 성질은 용질과 두 상 (고정 상과 이동 상) 간에 일어나는 서로 다른 상호작용의 모든 것을 합친 총체적인 성질이므로 전체의 분배계수의 크기를 가늠하기 위하여 각각의 상호작용에 의한 기여도를 분리하여 계산하는 것은 거의 불가능하다. 그러나 어느 특정한 분배 시스템을 최적화하기 위하여 경험에 의한 방정식을 개발해 낼 수 있다. 식 (32)는 여러 온도에서 체류체적을 측정함으로써 특정한 분리에서 일어나는 체류기전을 알아내는데 사용할 수 있다.

식 (32)를 다시 재조합 하면

$$\log K = -\frac{\Delta H_0}{RT} + \frac{\Delta S_0}{R} \quad (33)$$

$$V' = KV_s \quad \text{이므로} \quad (34)$$

$$\log V' = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} - \log V_s \quad \text{이다.} \quad (35)$$

$1/T$ 과 $\log V'$ 의 상관을 나타내는 곡선은 일직선이 되어야 하고 그 기울기는 용질의 이동에 따른 엔탈피의 변화와 비례한다. 똑같이 하여 절편은 엔트로피 변화와 관계가 있고 분배 시스템에 있어서의 주된 효과는 이러한 곡선에서 확인될 수 있다. 이러한 곡선은 Vant Hoff 곡선이라고 불리우며 두 개의 서로 다른 분배 시스템에 있어 $\log V'$ 와 $1/T$ 의 상관관계를 나타내는 두 개의 Van Hoff 곡선은 다음 그림 11과 같다.

系 A에 있어서는 큰 엔탈피 값 $[\Delta H/RT]_A$ 를 갖고 있고, 적은 엔트로피 $[-\Delta S_0/R - V_s]_A$ 를 갖는다.

$[\Delta H/RT]_A$ 의 값이 커진다는 것은 분배가 주로 분자

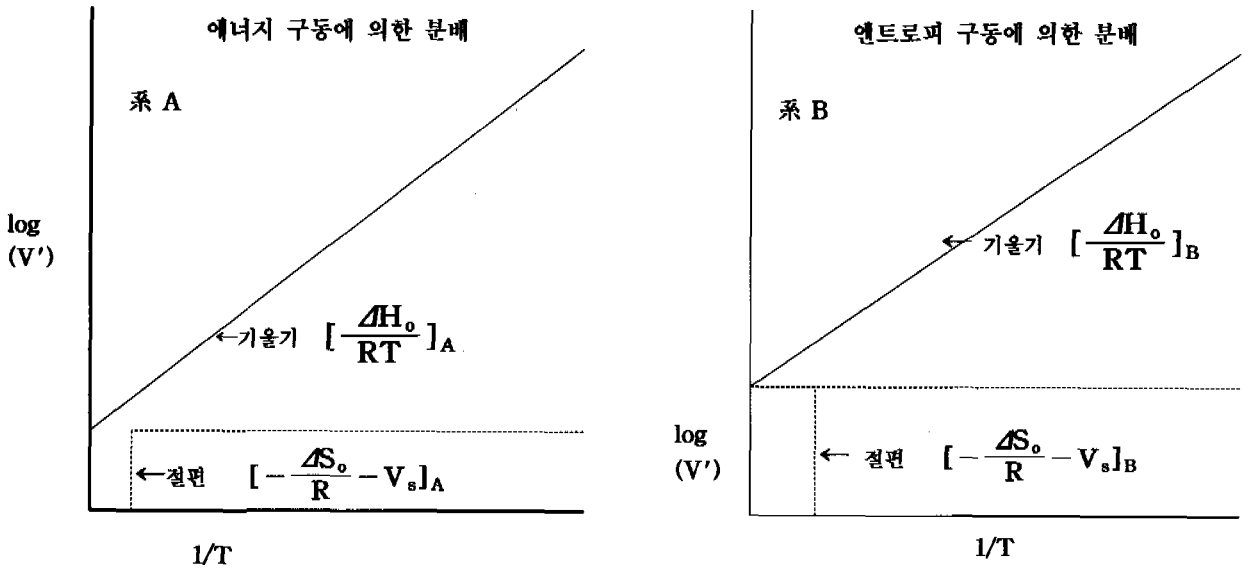


그림 11. 두 개의 서로 다른 分配 系에 있어서 Van Hoff 곡선

력에 의하여 조종된다는 것을 말한다. 용질 분자와 고정 상의 분자간의 상호작용력이 용질분자와 이동 상의 분자간의 상호작용력보다 크기 때문에 용질은 주로 고정 상에 분배가 된다. 이 경우 자유에너지에 주로 기여하는 것이 엔탈피 변화이기 때문에 분배 열역학적으로 말하면 "에너지 구동형 energetically driven"이다. 대조적으로 분배시스템 B에 있어서는 엔탈피의 변화가 적고 이 경우 엔트로피의 공헌 $[-\Delta S_0/R - V_s]_B$ 가 크다. 이것은 분배가 분자력 (molecular forces)에 의하여 조정되는 것이 아니라 는 것을 의미하고 엔트로피의 변화는 용질이 어떤 특별한 상태에 있을 때 경험하는 무질서의 정도이다. 용질의 무질서 정도 또는 자유도가 커질수록 용질은 그쪽으로 이동하게 되고 엔트로피는 커진다. 큰 엔트로피 변화는 용질분자가 系 (B)의 고정 상에 더욱 제한되어 있거나 무질서 하지 않게 있음을 나타낸다. 이러한 이유 때문에 용질은 고정 상에 더 분배가 되고 용질이 체류가 커지는 것이기 때문이다. 系 (B)에 있어서 자유에너지에 주로 기여하는 것이 엔트로피이므로 분배는 "엔트로피 구동형, entropically driven"이라고 말해진다. 손대칭 분리(Chiral separal)이나 크기 배제 때문에 일어나는 분리는 엔트로피에 의해서 조정된다. 크로마토그래피 분리는 배타적으로 "energetically driven"이나 "entropically driven"일 필요는 없다. 대부분의 경우에 있어서 고정 상에서 체류에는 엔탈피와 엔트로피가 모두 관계한다. 열역학

은 기본적으로 두 종류의 분배가 있다는 것을 보여주나 분배가 어떻게 조절되는지는 설명을 안 해준다. 체류가 어떻게 조절되는지를 확인하기 위해서는 K와 V_s 의 크기에 영향을 주는 인자를 알아내야 하는데 일반적으로 K의 크기는 용질과 두 상간의 분자 간격의 종류와 크기에 달려있다. 고정 상의 접근가능성 (V_s 의 크기)은 고정 상의 기하학적 모양에 달려있다.

參 考 文 獻

1. Tswett, M. : Travl. Soc. Naturaliste Varisovic 14, 1903.
2. Tswett, M. : Ber. Deut. Botan. Geo. 24:385, 1906.
3. Tswett, M. : Khromfilli v Rastitel'nom I Zhivotnom Mire, Izd. Karbasnikov, Warsaw, 380, 1910.
4. Day, D. T. : Prog. Am. Phil. Soc. 36:112, 1897.
5. Day, D. T. : Congr. Intern. Petrol Paris 1:53, 1900.
6. Day, D. T. : Science 17:1007, 1903.
7. Kuhn, R., Winterstein, A. and Lederer, E. : Z. Physiol. Chem. 197:141, 1931.
8. Kuhn, R. and Lederer, E. : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 200, 246
9. Kuhn, R. and Brockman, H : Berichte. 64:1349, 1931.
10. Martin, A. J. P. and Singe, R. L. M. : Biochemical Journal 35:1358, 1941.
11. James, A. T. and Martin, A. J. P. : Biochemical J. 50:679, 1952.
12. Lapidus, L. and Amundson, N. R. : J. Phys. Chem.

- 59:416, 1955.
13. van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J. and Klinkenberg, A. : Chem. Eng. Sci. 5:271, 1956.
 14. Giddings, J. C. : J. Chem. Phys. 31:1462, 1956.
 15. Giddings, J. C. : Dynamics of Chromatography, Part I, Principles and Theory, Dekker, New York, 13-26, 1965.
 16. Littlewood, A. B. : Gas Chromatography 1958 (ed. D.H. Desty) Butterworth, London 23:1965.
 17. Golay M. J. E. : Gas Chromatography 1958 (ed. D. H. Desty) Butterworth, London 23:1958.
 18. Tiselius, A. and Claesson, D. : Arkiv, Kemi Mineral. Geol., 18:15, 1942.
 19. Vanderhevel, F. S. and Sipos, J. C. : 33:21, 1962.
 20. Merritt, C., Comendant, F., Abrams, B. T. and Smith, V.N. : Anal. Chem. 40:391, 1963.
 21. Kirkland, J. : J. Anal. Chem. 40:391, 1968.
 22. Kirkland, J. J. : J. Chrom. Sci. 9:206, 1971.
 23. Majors, R. E. : Anal. Chem. 44:1722, 1972.
 24. Majors, R. E. : Amer. Lab 7:13, 1975.
 25. Izmailov, N. A. and Shraiber, M. S. : Farmatsiya 3, 1938.
 26. Stahl, E. : Pharmazie 11:633, 1956.
 27. Stahl, E. : Chemiker Ztg 82:323, 1958.
 28. Heftmann, E. : Chromatography. Rheinhold 1961.
 29. Schon, D. J. and Stahl, E. : Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Academic Press, New York 1965.
 30. Snyder, L. R. : Principles of Adsorption Chromatography. Marcel Dekker, New York 1968.
 31. Ettre, L. S. : The development of chromatography. Anal. Chem. 43:20-31, 1971.
 32. Johnson, E. L. and Stevenson R. : Basic Liquid Chromatography. Varian Assoc. 1978.
 33. Ettre, L. S. and Zlatkiss, A. : 75 years of chromatography. Int J. Chromatography Library Vol. 17. Elsevier, Amsterdam. 1979.
 34. Baugh, P. J. : Gas Chromatography-A Practical Approach IRL 1993.
 35. Scott, R. P. W. : Techniques and Practice of Chromatography. Chromatographic science series vol.70, Jack Cazes Marcel Dekker, Inc, NY, 1995.
 36. Grob, R. L. : Modern Practice of Gas Chromatography. Wiley, 1995.
 37. Katz, E. D. : High Performance Liquid Chromatography, Principles and Methods in Biotechnology. Wiley 1996.
 38. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. and Glajch, J. L. : Practical HPLC Method Development, 2nd ed. Wiley 1997.
 39. Snyder, L. R. J. : Chrom. Sci. 10:202, 1972.
 40. Guiochon, A. and Katti, A. : Chromatographia 24:165, 1987.
 41. Golshan-Shirazi, S., Jaulmes, A. and Guiochon, G. : Anal. Chem. 60:1856, 1988.
 42. Said, A. S. : Theory and Mathematics of Chromatography, Dr. Alfred Huthig Verlag Gmbdh Heidelberg 126, 1981.
 43. Scott, R. P. W. : Liquid Chromatography Column Theory. John Wiley and Sons, Chichester and New York, 1992.

- ABSTRACT -

THEORY AND APPLICATION OF CHROMATOGRAPHY

-1. An Introduction and theory of separation of matters -

Song Han, D.D.S., Ph. D.

Department of Oral Biochemistry College of Dentistry, Kangnung National University

The purpose of this article, the first part of series, is to describe the general theory applicable to various chromatographic procedures. History of chromatography, separation of matters, classification of chromatography, underlying principles of separation in chromatography, covering resolution, column efficiency, column selectivity, and capacity factor, movement of solute in chromatographic phase, including elution development, displacement development, and frontal analysis, were discussed. Mathematical description of plate theory and thermodynamic viewpoint of retention were emphasized.

Key words : chromatography, resolution, column

附錄：用語解説

Adsorbent :

흡착제 ; 가스 크로마토그래피에서는 흡착력에 의해 샘플을 유지하기 위하여 작은 고체 알갱이로 packed column이나 벽의 고정제로 사용한다.

Adsorption Chromatography :

흡착 크로마토그래피 ; GC에서 이 용어는 Gas-Solid Chromatography와 동의어.
TLC도 이 것의 일종.

Absolute temperature, K : 온도를 켈빈이라는 용어로 정한 것

최도 : $K = ^\circ C + 273.15$ $0^\circ C = 273.15K$

Area normalization (raw area normalization) :

각 피크에서 피크면적을 합한다. 각 피크면적은 전체의 퍼센트로 표현한다.

Attenuator :

저항을 직렬로 연결함으로써 일정한 비율로 기록계의 입력 전압을 감소시킨다.

Band : 칼럼을 통하여 분리가 일어 날 동안 시료가 차지하는 체적, zone과 동의어.

Band area : peak area과 동의어이며, 크로마토그램 상에서 피크의 면적이다.

Bed volume : packed column이 부피와 유사함

Bonded Phase : 지지물질이나 칼럼 관의 안쪽 벽에 코팅되어 공유 결합으로 부착된 고정 상

Carrier gas : 운반 가스 (GC에서는 이동 상과 같다)

Chromatogram : 검출기의 반응을 시간이나 유출체적에 대비하여 그린 도면

Chromatograph :

크로마토그래피에 의하여 물질을 분리하다 (동사로서 사용)

크로마토그래피를 할 수 있는 장비 (명사로서 사용)

Chromatography : 이동 상과 고정 상 사이에 분배되어 있는 시료의 구성성분을 분리하는 방법

Column : 시료의 구성 성분과 이동 상이 지나가는 금속이나 플라스틱 또는 유리관으로 칼럼 물질로 충전되거나 내부적으로 코팅이 된 상태이며 이곳에서 이동 상이 흐르며 물질의 분리가 일어나는 곳

Column efficiency : 칼럼 효율. 理論板 數(Theoretical plate number)와 같음.

Column material : 칼럼 물질

Column volume, V_c : 고정 상 존재하는 칼럼의 총 부피

Component : 시료 혼합물에 있는 구성성분

Concentration Distribution ratio, D_c :

고정 상에 있는 성분의 분석농도와 이동 상에 있는 그 성분의 분석농도의 비

$$D_c = \frac{\text{試料成分量} / \text{ml 固定相}}{\text{試料成分量} / \text{ml 移動相}} = \frac{C_s}{C_M}$$

Detector : 검출기 ; 크로마토그래피 칼럼에서 용리된 성분의 존재를 알리는 기기

Detector minimum detectable level, MDL : 신호-잡음비(S/N ratio)가 2일 때 시료의 양

Detector selectivity : 선택적 검출기는 특정한 물질에만 반응한다(FID, N-FID, ECD, PID등)

Detector sensitivity : 검출기 반응의 기울기

Displacement Chromatography : 치환 크로마토그래피

Distribution Coefficient, D_g , D_s , D_v : 분배계수

흡착제의 표면적이 알려지지 않았을 경우 다음과 같이 표현된다.

$$D_g = \frac{\text{試料 成分量} / \text{g 乾燥 固定相}}{\text{試料 成分量} / \text{ml 移動相}}$$

흡착제의 표면적이 알려졌을 경우 다음과 같이 표현된다.

$$D_s = \frac{\text{試料 成分量/m}^2 \text{ 表面積}}{\text{試料 成分量/ml 移動 相}}$$

고정상의 무게를 측정하는 것이 적당하지 않을 경우 다음과 같이 표현된다

$$D_v = \frac{\text{固定 相 內 試料 成分量/ml 床 體積}}{\text{試料 成分量/ml 移動 相}}$$

Distribution Constant, K :

이동 상 내의 특정 용질 구성성분의 농도와 고정 상 내의 그것의 농도의 비율

Efficiency of column : 주로 컬럼 이론 판 수로 측정된다.

Effective theoretical plate number, $N_{eff}(N)$: 해상도(R_s)를 생각할 때의 컬럼의 성능

$$N_{eff} = \frac{16R_s^2}{(1-a)^2} = 16\left(\frac{t'_R}{w}\right)^2 = N \frac{k}{(k+1)^2}$$

Eluant: 용리제 ; 용리(Elution)에 의하여 분리할 수 있게끔 하는 물질, GC에서는 가스(mobile phase)

Elution: 용리, 용출 ; 이동 상(mobile phase)을 사용하여 시료성분을 컬럼 속에서 운반 시키는 것

Elution Chromatography :

시료가 주사된후 컬럼을 통하여 용리제가 지나가게 함으로서 물질을 분리하는 크로마토그래피 기술

Flow rate : 이동 상의 유속. ml/min으로 나타냄. $F_c = \frac{\pi r^2 L}{t_M}$

Frontal Chromatography : 크로마토그래피의 일종으로 시료가 컬럼에 계속적으로 집어 넣어진다.

Gas Chromatography : 이동 상(mobile phase)이 가스인 크로마토그래프

Gas-liquid Chromatography, GLC :

고정 상은 비활성 물질 위에 있는 분배된 액체이거나 컬럼 벽위에 얇게

코팅된 액체이고 이동 상은 가스일 경우의 크로마토그래피

Gas-solid chromatography, GSC :

고정 상이 활성흡착제이고 이동 상은 기체일 경우의 크로마토그래피

Height equivalent to an effective plate, H_{eff} : 컬럼 길이를 유효판수로 나눈 것. $H_{eff} = \frac{L}{N_{eff}}$

Height equivalent to a theoretical plate, H : 컬럼 길이를 이론판수로 나눈 것.

$$H = \frac{L}{N} = HETP = \frac{H}{d}$$

Integral detector : 검출기를 지나는 시료의 총량에 신호가 달린 검출기.

Internal standard : 이미 알고있는 순수한 물질의 일정량을 주입하여 시료의 정량을 하기 위한.

Interstitial volume : packed column에서 이동 상에 의해 점유된 체적.

Mobile phase: 이동 상 ; GC에서는 운반가스와 동일.

Moving phase : Mobile phase와 동일.

Net retention time, V_N :

Pressure gradient correction factor를 곱하여 조정된 체류시간, $V_N = j V'_R$

Packed column : 고체 흡착제로 다져진 컬럼 또는 액체 상으로 코팅된 고체로 다져진 컬럼.

Partition coefficient : Distribution constant (분배상수)와 동일.

Peak :

첨두, 피크. 컬럼에서 물질이 분리되어서 나올 경우, 검출기의 반응을 기록하는 크로마토그램의 일부. 물질 분리가 불완전할 경우, 둘 이상의 성분이 한 개의 피크로 나타날 수 있다.

Peak area : Band area와 동일하며 peak와 peak base로 둘러싸인 면적.

Peak base : peak의 기저부 사이의 기저선.

Peak height, h :

피크 최대치와 피크 기저부 사이의 거리, 시간 축에서 수직으로 검출기 반응 축에 평행으로 측정된다.

Peak maximum : 시료가 컬럼에서 나올 때 검출기가 최대로 반응하는 점.

Peak resolution, R_s : 두 첨두(peak)의 분리정도를 평균 peak width로 나타냄.

$$R_s = \frac{2\Delta t_R}{w_a + w_b} = \frac{2\Delta t'_R}{w_a + w_b}$$

Peak width, w_b :

피크 양쪽의 어느 한쪽의 변곡점에서 직각 방향으로 시간이나 체적의 축으로 투영 시 나타나는 peak base의 bar segment

Peak width at half-height, w_h :

peak height를 양단하고 피크의 두 가지를 교차하는 점에서 끝나고, peak base에 평행한 (시간축 또는 체적축으로 투영된) 선의 길이.

Polarity : 극성.

Potentiometric recorder : 크로마토그래피 검출기에서 출력되는 볼트에 비례하여 신호를 기록하는 장치.

Pyrometer 전류의 변화에 의한 온도를 재는 기구.

Retention time (absolute), t_R :

체류시간; 시료가 수신된 후부터 구성성분의 첨두의 최상부분의 기록 시 까지

Retention volume (absolute), V_R : 체류체적 운반가스의 유속 \times 체류시간

Resolution, 해상력 : Peak resolution과 같은 말. 두 첨두 (peak)사이의 분리 정도를 나타 냄.

Separation efficiency, N/L :

컬럼이 얼마나 좋은 가를 측정하는 수단. 단위 컬럼 길이당 이론 판수를 나타냄.

Separation fraction, $\alpha_{a/b}$: 동일 조건하에서 측정 시 물질 A, B의 분배비율의 비.

$$\alpha_{a/b} = \frac{KD_a}{KD_b} = \frac{D_a}{D_b} = \frac{K_a}{K_b}$$

Solute : 시료 안에 있는 여러 물질

Solvent : 액체 상 (mobile phase)과 같은 술어

Specific retention volume V_g :

$$\text{고정 상 1g당 net retention volume (0°C에서), } V_g = \frac{273V_N}{TW_L} = \frac{iV'R}{TW_L}$$

Stationary phase : 이동 상 ; GLC에서는 고체에 분해된 액체상 GSC에서 고체 흡착제를 말함.

Stationary phase fraction, ϵ_s : 충전된 컬럼의 단위 면적 당 고정상의 체적

Stationary phase volume, V_s : 지지물질 상에 있는 고정상의 총 체적

Surface area : 고정 상 흡착제의 표면적

Theoretical plate number : 이 숫자는 컬럼의 효율성이나 첨두의 첨예도(sharpness)을 의미한다.

$$N = 16 \left(\frac{\text{peak retention time}}{\text{peak width}} \right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

Trenzahl number, T_z :

Separation number와 비슷하며, 두 개의 연속적인 탄화수소 사이의 해상력으로부터 계산된다.

$$T_z = \left[\frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_h)_1 + (w_h)_2} \right] - 1$$

van Deemter equation :

시료의 구성성분이 컬럼을 지날 때 band spreading의 정도를 나타낸다.

$$HEPT(H) = A + \frac{B}{u} + Cu$$

HEPT = height equivalent to a theoretical plate

u : 이동상의 gas 운반 속도 (GC에서)

A : 컬럼에서 "Eddy" 확산을 설명하는 상수

B : 컬럼 축의 방향으로의 기체의 분자확산을 설명하는 상수

C : 용질이 컬럼 충전 물질을 지나갈 때의 저항에 비례하는 상수

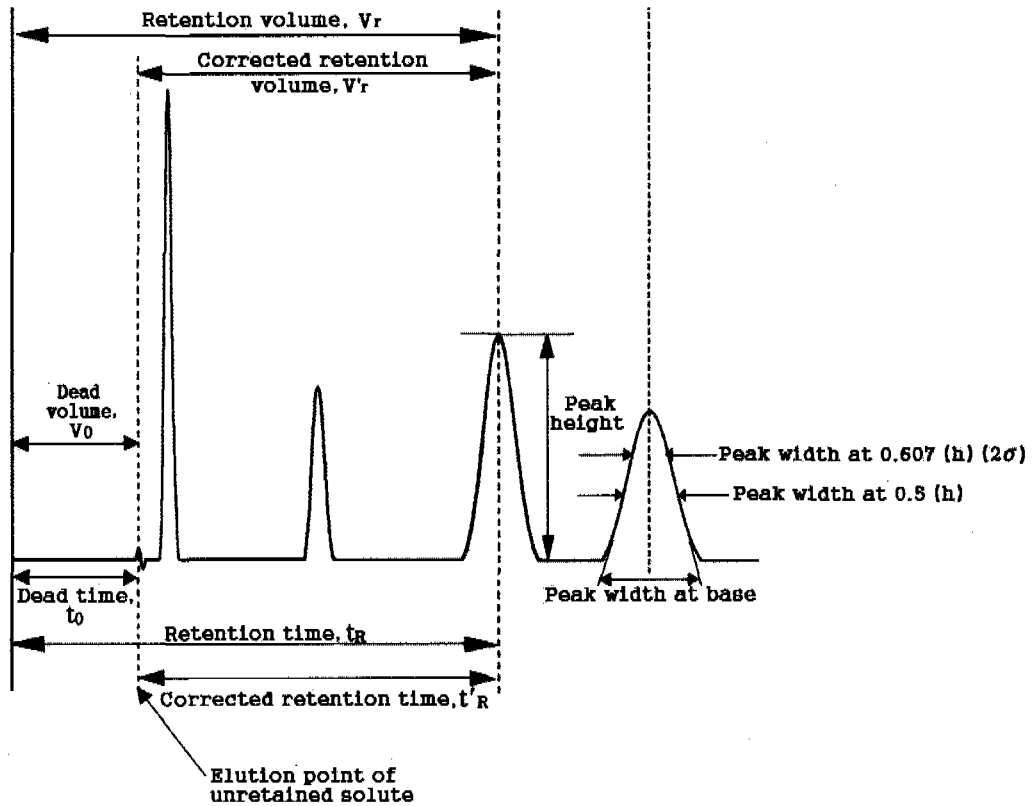


그림 12. 크로마토그램의 모식도

附記 : 크로마토그래피 국제표준 명명법에 관하여서는 참고문헌 44에 자세히 기술되어 있음.