

## 고성능 액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography)

2021

### 1.0 개요

고성능 액체크로마토그래피 (HPLC, high performance liquid chromatography)는 비휘발성 화학종 또는 열적으로 불안정한 물질을 분리할 수 있으며 유기물과 무기물의 대기오염물질에 대한 정성분석, 정량분석에 사용된다.

### 2.0 기기장치

고성능 액체크로마토그래프에서 흔히 사용하는  $2\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$  입자크기의 충전물을 사용하여 적당한 용리액의 흐름속도를 얻기 위해서는, 펌프압력을 수백 기압까지 가해 주어야 한다. 이렇게 높은 압력을 걸어주어야 하기 때문에 HPLC 장치는 다른 종류의 크로마토그래프에서 볼 수 있는 것보다 정교하다. 고성능 액체크로마토그래프 기기 장치의 기본 구성은 그림 1과 같다.

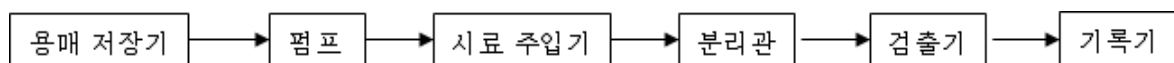


그림 1. 기기장치의 기본 구성

#### 2.1 용매 저장기와 용매처리장치

**2.1.1** 고성능 액체크로마토그래프 기기는 한 개 또는 그 이상의 유리 또는 스테인리스강으로 만든 용매 저장 용기를 가지고 있는데, 이 저장 용기 각각은 200 mL ~ 1 000 mL의 용매를 저장한다. 분리관과 검출기에서 기포를 형성하여 분석에 방해를 일으키는 기체 (보통은 산소와 질소)와 펌프장치나 시료주입계를 손상시키거나 분리관을 막히게 하는 먼지와 입자상 물질을 용매가 포함하고 있어서는 안 된다. 용매에서부터 용해된 기

체를 제거하기 위하여 사용되는 탈기채장치로는 진공펌프, 증류장치, 용매를 가열하거나 저어주는 장치, 또는 용해되어있는 기체를 쫓아내기 위하여 용해도가 낮은 비활성기체의 미세기포를 용액에 통과시키는 스파저 (sparger) 장치 등이 있고 먼지를 제거하기 위해서는 필터를 사용하여 용매를 거르면 된다.

**2.1.2** 일정한 조성의 단일 용매를 사용하는 분리법을 등용매 용리 (isocratic elution)라고 한다. 때로 분리 효율을 높이기 위하여 기울기 용리 (gradient elution)를 하는 경우가 많다. 이 경우에는 극성이 아주 다른 두세 가지 용매를 사용한다. 용리가 시작된 후에 용매들을 섞는 비율은 미리 프로그램된 비율에 따라, 어떤 경우는 연속적으로 또 어떤 경우에는 단계적으로 변화시키게 되어 있다. 고성능 액체 크로마토그래피 장치에는 둘 또는 그 이상의 각종 용매 저장 용기에서 혼합실로 들어가는 속도를 계속적으로 변화시킬 수 있는 장치가 붙어 있는 것이 편리하다.

## 2.2 펌프

**2.2.1** 고성능 액체크로마토그래프 펌프 (pump)장치가 갖추어야 할 필요조건들은 다음과 같다.

**2.2.1.1** 약 152 000 mmHg 까지의 압력 발생

**2.2.1.2** 맥동 충격이 없는 출력

**2.2.1.3** 0.1 mL/min ~ 10 mL/min의 흐름속도

**2.2.1.4** 흐름속도 조절 및 흐름속도 재현성의 상대오차가 0.5 % 또는 그 이하일 것

**2.2.1.5** 잘 부식되지 않는 스테인리스강으로 된 장치와 봉합재로써 테플론을 사용할 것 등이다.

**2.2.2** 펌프로는 세 가지 종류의 펌프, 즉 왕복식 펌프, 치환 (혹은 주사기형) 펌프 및 기압식 (혹은 일정압력) 펌프가 주로 사용된다.

**2.2.2.1** 왕복식 펌프

현재 가장 널리 사용되고 있는 왕복식 펌프 (reciprocating pump)는 보통 모터로 움직이는 피스톤의 왕복 운동으로 용매를 펌프질해서 밀어 넣는 작은 방이 달려있고, 교대로 열리고 닫히는 두 개의 구슬 제어콕이 용매를 실린더 내로 들어오고 나가게 조절한다. 다른 방법으로는 유연성이 있는 격막을 통해 압력을 용매에 전달하는 것으로 이때 왕복 피스톤으로 수압 펌프질을 하게 되어 있다. 왕복 펌프는 용매를 맥동으로 흐르게 하는 단점이 있는데 이로 인해 크로마토그램의 바탕선에 잡음이 나타나기 때문에 이를 감쇄시켜야 한다. 왕복 펌프의 이점은 내부 부피가 작고 ( $35\ \mu\text{L} \sim 400\ \mu\text{L}$ ), 출력압력이 높고 ( $532\ 000\ \text{mmHg}$ 까지), 기울기 용리에 쉽게 적용할 수 있고, 그리고 관에 역으로 작용하는 압력 및 용매 점도와는 거의 무관한 일정한 흐름속도를 갖게 한다는 것이다.

#### 2.2.2.2 치환 펌프

치환 펌프 (displacement pump)는 단계식 모터 (stepping motor)에 의해 기계적 나사식으로 움직이는 피스톤이 붙어 있는 주사기와 유사한 큰 원통으로 되어 있다. 치환 펌프도 역시 점도와 역압력에 무관하게 용매를 밀어 흐르게 한다. 그리고 출력흐름에는 맥동이 없다. 단점은 용매부피 ( $\sim 250\ \text{mL}$ )가 제한되어 있다는 것과 용매를 바꾸어야 하는 경우 상당히 많이 불편하다는 것이다.

#### 2.2.2.3 기압식 펌프

가장 간단한 기압식 펌프 (pneumatic pump)에서는, 압축 기체에 의해 압축되는 용기 속에 들어있는 압착 그릇에 이동상이 들어있다. 이러한 종류의 펌프는 값이 싸며 맥동도 없다. 그러나 부피와 압력출력이 제한되어 있을 뿐만 아니라 흐름속도가 용매의 점도와 분리관의 역압력에 의존하는 단점이 있다. 또 기울기 용리에는 이용할 수 없으며, 약  $98\ 800\ \text{mmHg}$  정도 이하의 압력에서만 사용할 수 있다.

### 2.3 시료 주입장치

**2.3.1 액체크로마토그래프 측정의 정밀도에 제한을 주는 인자 중 하나는 분리관 충전물에 시료를 주입할 때의 재현성에 있다.** 시료를 지나치게 많이 주입하게 되면 떠 넘힘 현상에 의해서 정밀도가 나빠지기 때문에 주입하는 시료의 부피는 가급적 작아야 하며,

십 분의 수  $\mu\text{L}$ 에서 약 500  $\mu\text{L}$ 까지 허용된다. 또한 기기 시스템의 압력을 낮추지 않고 시료를 주입할 수 있도록 하여야 한다.

**2.3.2** 가장 간단하게 시료를 주입하는 방법은 스스로 닫히는 탄성 격막 (septum)을 통한 주사기 주입법이다. 이 경우 76 000 mmHg의 압력에서도 견딜 수 있도록 만든 마이크로주사기를 사용한다. 흐름 정지식 주입법 (stop flow injection)인 경우에는, 용매의 흐름을 잠시 멈추고 분리관 입구에 있는 주입구를 열고 분리관 충전물의 머리 부분에 직접 시료를 주입한다. 주입구를 다시 닫은 후 다시 압력을 가하여 용매가 흐르도록 한다. 시료를 주입하는 또 다른 방법은 샘플링 루프 (sampling loop)를 이용하는 방법으로 시료 주입 과정의 재현성이 높은 장점이 있다.

## 2.4 분리관

### 2.4.1 분석관

대부분의 액체크로마토그래프 관 (column)의 길이는 10 cm ~ 30 cm이고 액체 관의 내부지름은 약 4 mm ~ 10 mm이다. 충전물의 입자크기는 보통 5  $\mu\text{m}$  또는 10  $\mu\text{m}$ 이다. 가장 흔히 사용되고 있는 관은 길이가 25 cm이고, 내부지름이 4.6 mm이며, 5  $\mu\text{m}$ 의 입자가 채워져 있다. 이러한 종류의 관은 40 000 plate/m 내지 60 000 plate/m (plate: 이론단수)를 갖는다. 마이크로관이 사용되기도 하는데, 이런 관은 내부지름이 1 mm ~ 4.6 mm이고, 3  $\mu\text{m}$  또는 5  $\mu\text{m}$ 의 입자가 채워져 있다. 길이는 3 cm ~ 7.5 cm 정도로 작다. 마이크로관은 100 000 plate/m (plate: 이론단수)를 가지고 있고, 속도가 빠르고, 용매의 소비가 적다는 것이 장점이다.

### 2.4.2 보호관

보통 짧은 보호관 (guard column)을 분석관 앞에 설치하여 용매에 있는 입자성 물질과 오염물질뿐만 아니라 정지상에 비가역적으로 결합되는 시료성분을 제거하여 줌으로써 분리관의 수명을 연장시키고 있다. 보호관 충전물의 조성은 분리관의 것과 거의 같아야 하지만 입자의 크기를 더 크게 하여 압력강하를 최소화 하고 있다. 보호관이 오염되었을 때는 다시 충전물을 채우든지 또는 똑같은 종류의 새로운 것으로 교체하여야 한다. 이처럼 보호관은 자신을 희생하여 더 비싼 분석관을 보호한다.

### 2.4.3 분리관의 항온장치

대개의 경우 분리관의 온도를 정밀하게 조절할 필요가 없으나 더 좋은 크로마토그램을 얻기 위하여 분리관의 온도를 10 분의 수 도(℃) 이내에 일정하게 유지할 필요가 있는 경우 실온에서부터 100 ℃ ~ 150 ℃까지의 온도영역까지 십 분의 수 도(℃)까지 관 온도를 조절할 수 있는 관 가열장치가 부착되어야 한다.

### 2.4.4 분리관 충전물의 종류

액체크로마토그래프에서 사용하고 있는 두 가지 종류의 기본적인 충전물에는 표피형 (pellicular) 입자와 다공성 (porous) 입자가 있다. 표피형 입자는 지름이 30 μm ~ 40 μm이고 다공성이 아닌 구형 유리 또는 중합체 구슬로 되어 있다. 실리카, 알루미나, 폴리스타이렌-다이바이닐벤젠 합성수지 즉 이온교환수지의 얇은 다공성 층을 이 유리 구슬의 표면에 입힌다. 액체크로마토그래프의 전형적 다공성 입자 충전물은 지름이 3 μm ~ 10 μm인 다공성 미세입자로 구성되어 있으며 입자는 실리카, 알루미나, 폴리스타이렌-다이바이닐벤젠 합성수지 즉 이온교환수지로 되어 있다. 지금까지 액체크로마토그래프에서 가장 흔히 사용되는 충전물은 실리카이다. 실리카 입자는 초미립의 실리카 입자를 응집시켜 대단히 균일한 지름의 큰 입자가 되도록 한 것이다. 이렇게 만든 입자의 표면에 얇은 유기물 막 (정지상)을 화학적 또는 물리적으로 결합시켜 입힌다.

### 2.4.5 분리관 정지상에 따른 액체크로마토그래피의 종류

액체크로마토그래피에서 화학종의 분리 방식은 크게 4 가지, 즉 분배, 흡착, 크기별 배제, 이온교환 방식으로 구별된다.

#### 2.4.5.1 분배 크로마토그래피

**2.4.5.1.1** 분배 크로마토그래피 (partition chromatography)는 네 가지 액체크로마토그래피 중에서 가장 널리 이용되고 있다. 이전에는 대부분 분자량이 크지 않고 (보통 < 3 000), 비이온성인 극성 화합물 분석에 응용되었다. 그러나 최근에는 방법이 개량되어 (유도체 만들기 및 이온쌍 만들기) 분배 분리를 이온성 화합물에도 응용하고 있다.

**2.4.5.1.2** 분배 크로마토그래피는 액체-액체 (liquid-liquid) 및 결합상 크로마토그래피

(bonded-phase chromatography)로 세분할 수 있다. 이 방법들의 차이점은 정지상이 충전물의 지지체 입자에 붙잡혀 있는 상태에 근거를 두고 있다. 액체-액체 크로마토그래피에서는 액체 정지상이 충전물의 표면에 물리적 흡착에 의해 붙잡혀 있고, 결합상 크로마토그래피에서는 정지상이 충전물 표면에 화학적 결합에 의하여 붙어 있다. 초기의 분배 크로마토그래피는 대부분 액체-액체 형태이었으나 지금은 액체-액체계의 몇 가지 단점 때문에 결합상 형태를 주로 사용하고 있다. 이러한 단점 중의 하나는 정지상이 이동상에 용해되어 유실이 일어나기 때문에 지지체 입자를 주기적으로 다시 흡착시켜야 한다는 것이다.

#### 2.4.5.1.3 결합상 크로마토그래피관

분배 크로마토그래피의 결합상 충전물은 대부분 단단한 실리카 또는 실리카를 기본 조성으로 하는 것으로 만든다. 이러한 고체는 균일하고 다공성이며, 기계적으로 단단한 입자로 되어 있으며, 대개 지름이 3  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  또는 10  $\mu\text{m}$  정도이다. 완전히 가수분해된 (0.1 M HCl로 하루 또는 이틀 동안 가열하여 가수분해된) 실리카 표면은 화학적으로 반응성이 있는 SiOH 작용기로 되어 있다. 가장 유용한 결합상 피막은 가수분해된 표면에 유기 클로로실란을 반응시켜 실록산으로 만든 것이다.

#### 2.4.5.1.4 역상 및 정상 충전물

분배 크로마토그래피는 이동상과 정지상의 상대적 극성에 따라 두 종류로 구분하고 있다. 정상 크로마토그래피 (normal-phase chromatography)는 정지상으로 실리카나 알루미나 입자에 도포시킨 정제수 또는 트라이에틸렌글리콜과 같은 극성이 매우 큰 것을 사용하며 이동상으로는 헥산 또는 아이소프로필에테르와 같이 비교적 비극성인 용매를 사용한다. 역상 크로마토그래피 (reversed-phase chromatography)에서는 정지상이 비극성인 것으로 종종 탄화수소를 사용하며 이동상은 비교적 극성인 것 (정제수, 메탄올, 아세트나이트릴 등)을 사용한다. 정상 크로마토그래피에서는 극성이 가장 작은 성분이 상대적으로 이동상에 가장 잘 용해되기 때문에 먼저 용리된다. 이동상의 극성을 증가시키면 용리시간이 짧아진다. 반대로 역상 크로마토그래피에서는 극성이 가장 큰 성분이 먼저 용리되고 이동상의 극성을 증가시키면 용리시간도 길어진다. 결합상 충전물은 결합된 피막이 비극성 성질을 가지고 있으면 역상으로, 피막이 극성 작용기를 가지면 정상으로 분류된다. 역상 충전물을 사용한 분리관은 대부분 C8 사슬 (n-octyl)이나 C18 사슬 (n-octadecyl)을 사용한다. 대부분의 역상 크로마토그래피의

응용에서는, 메탄올, 아세토나이트릴 또는 테트라하이드로퓨란과 같은 용매를 여러 가지 농도로 포함하고 있는 수용액과 같이 극성이 큰 이동상으로 용리를 한다. 이 경우 pH값이 7.5를 넘지 않도록 조심하여야 하는데, 그 이유는 pH가 높아지면 실록산이 가수분해되어 충전물이 분해 또는 파괴되기 때문이다. 정상 결합상 충전물로는 다이올 ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ), 사이아노 ( $-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$ ), 아미노 ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ ), 그리고 다이메틸아미노 ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{N}(\text{CH}_3)_2$ )기와 같은 극성 작용기를 가진 것을 사용한다. 이러한 충전물의 극성은 서로 상당히 다른데 사이아노 형태가 가장 극성이 작고 아미노 형태가 극성이 가장 크다. 다이올 형태는 중간 정도의 극성을 가진다. 정상 충전물을 이용할 경우, 에틸에테르, 클로로폼, 그리고 n-헥세인 같은 비교적 비극성인 용매로 용리를 한다.

#### 2.4.5.2 흡착 크로마토그래피

흡착 크로마토그래피 (adsorption chromatography)에 사용되는 정지상은 실리카와 알루미나 뿐인데, 실리카는 시료 부피가 크고 유용성이 다양하기 때문에 알루미나보다 더 널리 이용되고 있다. 몇 가지 예외는 있지만 두 물질의 흡착 특성은 서로 유사하다. 두 경우 모두 머무름시간 순서는, 올레핀 < 방향족 탄화수소 < 할로젠화합물, 황 화물 < 에테르 < 나이트로 화합물 < 에스테르, 알데하이드, 케톤 < 알코올, 아민 < 설펍 < 설펍사이드 < 카르복시산 순으로 나타난다. 일반적으로 흡착 크로마토그래피는 비극성 용매에 녹고, 역상 분배과정에 사용되는 것과 같이 수용액 용매에서 작은 용해도를 갖는 시료의 분석에 가장 적합하며 분배 크로마토그래피의 경우처럼 작용기의 종류와 수가 서로 다른 화합물을 분리할 수 있다. 흡착 크로마토그래피는 분자량 5000 이하인 비극성 화합물에 가장 적당하다. 또한 흡착 크로마토그래피의 큰 장점은 이성질체 혼합물 중의 성분들을 잘 분리해 낸다는 것이다.

#### 2.4.5.3 크기별 배제 크로마토그래피

젤 투과 (gel permeation) 크로마토그래피 또는 젤 여과 (gel filtration) 크로마토그래피라고도 부르는 크기별 배제 크로마토그래피 (size-exclusion chromatography)는 특히 고분자량 화학종에 매우 적합한 훌륭한 방법이다. 크기별 배제 크로마토그래피의 충전물은 작은 ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) 실리카 또는 중합체 입자로 되어 있는데, 이 입자들은 용질과 용매분자가 확산해 들어갈 수 있는 균일한 미세 구멍의 그물구조를 이루고 있다. 분자가 구멍에 들어가 있는 동안 효과적으로 지체되며 이동상의 흐름에서 벗어난다.

구멍에 머무르는 평균 시간은 분석물 분자의 유효 크기에 따라 달라진다. 충전물의 평균 구멍 크기보다 큰 분자는 배제되므로 사실상 머무르지 않고, 이러한 화학종은 우선적으로 용리된다. 구멍보다 상당히 작은 지름을 가진 분자는 구멍 미로를 통해 침투 또는 투과할 수 있으므로 오랜 시간 동안 붙잡혀 있게 되고 이들이 가장 늦게 용리된다. 이들 두 극단적인 것 사이에 있는 중간 크기의 분자가 충전물의 구멍 속으로 침투하는 평균 시간은 분자의 지름에 따라 달라진다. 이러한 분자들 사이에서도 분별이 일어나는데, 이것은 분자 크기와 어느 정도는 분자 모양에 직접 관련되어 있다.

#### 2.4.5.4 이온교환 크로마토그래피

이온크로마토그래피 (ion chromatography)라고 간략하게 부르기도 하는 이온교환 크로마토그래피 (IEC, ion-exchange chromatography)는 이온교환 수지를 이용하여 이온들을 분리하고 정량하는 방법이다. 이온크로마토그래피는 음이온 또는 양이온 혼합물이 음이온 또는 양이온 수지로 충전된 분리관에서 쉽게 분리된다는 원리를 이용한 것으로 검출법은 일반적으로 전도도 측정법을 사용한다.

### 2.5 검출기

#### 2.5.1 자외선흡수검출기

자외선흡수검출기 (UV absorbance detector)는 고성능 액체크로마토그래피의 분리관에서 화학종이 분리되고 용리되어 나올 때, 자외선을 쏘여 주고 이때 화학종이 자외선을 흡수하는 정도를 검출하는 것이다. 가장 일반적으로 쓰이는 것은 수은을 광원으로 하는 필터 광도계이며 수은에서 나오는 254 nm의 자외선을 필터로 분리하여 사용한다. 또한 간섭필터를 사용하여 중수소 또는 텅스텐 필라멘트 광원을 사용하기도 한다. 회절발 광학계를 이용하는 주사형 분광광도계 형태의 검출기도 사용되고 있다. 가장 유용한 자외선흡수검출기는 다이오드 배열 기기이다. 이 경우 대략 일초 내에 전 스펙트럼에 필요한 데이터를 모을 수 있고 각각의 크로마토그래피 봉우리의 스펙트럼 데이터를 용리액이 관 끝에서 나타날 때 모아서 저장할 수 있다.

#### 2.5.2 형광검출기

고성능 액체크로마토그래프에 사용되는 형광검출기 (fluorescence detector)는 자외선



이나 가시광선의 들뜸 빛살을 쪼여 주고 형광 물질에서 나오는 형광을 들뜸빛살에 대하여 90° 방향에 놓여있는 광전검출기로 측정한다. 가장 간단한 검출기는 수은 들뜸 광원을 사용하고 방출복사선의 띠를 분리하는 하나 또는 그 이상의 필터를 사용하는 방식이다. 또는 제논 광원을 사용하고 형광복사선을 분리하는데 회절발 단색화장치를 사용하기도 한다. 형광법의 고유한 이점은 감도가 높다는 것인데, 대부분의 흡광도 방법보다 10 배 이상 높다. 이러한 이점 때문에 액체크로마토그래피에서 형광을 발하는 시료의 성분을 분리하고 정량하는데 사용하고, 형광을 발하는 유도체를 만드는 시약으로 시료를 전처리하면 형광을 발하는 화학종의 수를 더 많게 할 수 있다. 예를 들면, dansyl chloride (5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonyl chloride)은 일차와 이차 아민, 아미노산 및 페놀과 반응하여 형광화합물을 만들기 때문에 단백질을 가수분해하여 생긴 아미노산을 검출하는데 사용된다.

### 2.5.3 굴절률 검출기

시차 굴절률 검출기 (refractive-index detector)는 순수한 용매가 검출기 셀의 한쪽 방을 통해 지나가고, 분리관을 통과한 용리액은 셀의 다른 쪽 방을 통해 지나가도록 고안되어 있다. 두 방은 유리판으로 분리되어 있는데, 만약 두 용액의 굴절률이 다르면 입사빛살이 이 유리판에서 굽힘이 일어날 수 있는 각도로 설치되어 있다. 빛살에 민감한 검출기의 표면에 도달하는 빛살이 이로 인해 이동하게 되어 출력신호의 변화를 가져오고 이것을 증폭하여 기록하면 크로마토그램이 된다. 굴절률 검출기는 거의 모든 용질에 감응을 보이는 장점이 있으며 흐름속도에 영향을 받지 않는다. 그러나 온도에 매우 민감하므로 천 분의 수 도(℃) 범위 내에서 일정한 온도를 유지해야 하고 대부분의 다른 형태의 검출기보다 감도가 좋지 않다.

### 2.5.4 증발 광산란 검출기

증발 광산란 검출기 (evaporative light scattering detector, ELSD)에서는 분리관에서 용리된 용출액이 분무기를 통과하면서 질소나 공기의 흐름에 의해 미세한 물방울로 변하게 된다. 미세방울은 온도가 조절되어 있는 이동관으로 흘러가서 이동상은 증발이 되고 분석물은 미세입자로 남아있게 된다. 그 다음 레이저 빛살이 이 자욱한 분석물 입자들을 통과하게 된다. 산란 된 복사선은 흐름에 직각인 위치에서 규소 광다이오드에 의해 검출된다. 이 형태의 검출기의 중요한 이점은 모든 비휘발성 용질에 대해서 대략 비슷한 감응을 나타낸다는 것이다. 더욱이, 검출한계가 0.2 ng/mL 정도로 굴절률

검출기보다 감도가 매우 좋다.

### 2.5.5 전기화학 검출기

여러 종류의 전기화학 검출기 (electrochemical detector)들이 사용되는데, 이러한 장치들은 전류법, 전압전류법, 전기량법 및 전도도법에 기초를 두고 있다. 전기분석방법은 여러 경우에 감도가 높고, 간단하며, 편리하여 널리 응용할 수 있는 이점을 가지고 있다.

### 2.5.6 질량분석 검출기

액체크로마토그래프를 질량분석 검출기 (mass spectrometric detector)와 연결함으로써 분리관에서 분리되어 나오는 각각의 화학종을 정성, 정량 분석할 수 있다. 질량분석 검출기를 액체크로마토그래프에 연결하는 방법은 다음과 같이 네 가지가 있다.

**2.5.6.1** 분리관에서 나오는 용리액을 분할하여 그 중 작은 일부만을 질량분석 검출기에 직접 주입하는 방법

**2.5.6.2** 직접 액체주입 장치를 흐름속도가 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  ~ 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ 인 새로운 미세관과 연결하여 사용하는 방법

**2.5.6.3** 용출액을 연속적으로 움직이는 벨트나 선에 부착시켜서 증발로 용매를 제거시키는 가열실로 분석물과 용매를 운반하고 용매가 증발된 다음 분석물 잔유물이 벨트나 선에 남아있게 되는데 이것들을 이온화 영역에서 탈착-이온화시키는 방법

**2.5.6.4** 열분무 (thermospray) 방법 등이 있다. 열분무 연결 장치는 2 mL/min의 흐름속도로 분리관에서 나오는 모든 용출액을 직접 받아들일 수 있게 되어 있다. 용출액은 가열된 스테인리스강 모세관을 통해 지나가면서 증발하여 용매와 분석물 분자의 에어로졸 젯트가 생긴다. 분무 과정에서 분석물은 용리액에 넣어준 아세트산암모늄과 같은 염과 전하교환 메카니즘을 통해 이온화한다. 따라서 열분무법은 연결 장치일 뿐 아니라 이온화장치이다.

## 2.6 기록계

기록계 (recorder)는 스트립 차아트 (strip chart)식 자동평형 기록계로 스펠 (span) 전압 1 mV, 펜 응답시간 (pen response time) 2 초 이내, 기록지 이동속도 (chart speed)는 10 mm/min을 포함한 다단변속이 가능한 것이어야 한다. 적분기 (integrator)를 사용하거나 컴퓨터를 이용하여 크로마토그램을 기록하고 저장할 때는 각 성분의 봉우리가 충분히 분리되어 봉우리 면적을 구하는데 어려움이 없어야 한다.

### 3.0 설치조건 및 조작방법

#### 3.1 설치조건

고성능 액체크로마토그래프를 설치할 장소는 다음의 조건을 만족해야 한다.

3.1.1 실험실 온도는 10 °C ~ 25 °C, 상대습도는 30 % ~ 85 %로 유지되며 온도와 습도의 급격한 변화가 없는 곳.

3.1.2 진동이 없고 햇빛이 직접 내려쬐지 않는 곳.

3.1.3 부식 기체나 먼지가 거의 없고 환기가 충분히 이루어지는 곳.

3.1.4 용량이 큰 변압기나 고주파 전열기로부터의 전자기 유도가 없는 곳.

3.1.5 고성능 액체크로마토그래프에 필요한 전압, 용량, 주파수에 맞는 전력의 공급이 가능할 것. 이때 전압의 변화는 10 % 이내이며 주파수의 변동이 없을 것.

#### 3.2 조작방법

##### 3.2.1 분석조건의 설정

각 표준 방법에 명시된 조건에 따라 다음 항목의 분석조건을 조절한다.

##### 3.2.1.1 용리액의 종류와 유속

### 3.2.1.2 컬럼의 종류

### 3.2.1.3 컬럼의 온도

### 3.2.1.4 검출기의 감도

### 3.2.1.5 기록지 이동속도 (feed speed)

## 3.2.2 기준선의 안정성 확인

위의 분석조건에서 10 분 동안에 측정했을 때 기준선 (base line)의 변동 (fluctuation)은 전체 기록범위의 1 %를 넘지 않아야 한다.

## 3.2.3 시료의 주입

시료는 마이크로 주사기를 이용하여 시료 주입부에서 신속히 주입한다.

## 3.2.4 크로마토그램의 기록

시료 도입 직후 크로마토그램에 시료 도입 시점을 표기한다. 감도계 (attenuator)를 조절하여 시료 성분의 봉우리가 기록지의 기록 범위 내에서 가능한 크게 나타나도록 한다.

## 3.2.5 크로마토그램에 기록할 사항

### 3.2.5.1 분석 날짜와 분석자 성명

### 3.2.5.2 제조사

### 3.2.5.3 시료의 이름과 주입량 ( $\mu\text{L}$ 혹은 $\text{mL}$ )

### 3.2.5.4 컬럼 충전물의 종류

3.2.5.5 컬럼 튜브의 재질, 내경 (mm)과 길이 (mm)

3.2.5.6 컬럼의 온도 (°C), 방 안의 온도, 컬럼 입구 압력 (Pa)

3.2.5.7 용리액의 종류와 유속 (mL/min)

3.2.5.8 기율기법의 분석조건

3.2.5.9 검출기의 종류와 작동 조건

3.2.5.10 기록지의 이동속도 (feed speed)

3.2.5.11 기타 사항

## 4.0 정성분석

정성분석은 동일 조건하에서 측정한 미지 성분의 머무름시간 (retention time)과 같은 머무름 값들 (retention values)과 예측되는 성분의 머무름 값을 비교하여야 한다. 그러나 어떤 조건에서 얻어지는 하나의 봉우리가 한 가지 성분에 반드시 대응한다고 단정할 수는 없으므로 고정상 또는 용리액의 종류를 바꾸어 측정하거나, 다른 정성분석이 가능한 방법을 병용하여 확인한다.

## 5.0 정량분석

### 5.1 분석방법

봉우리의 면적 또는 봉우리의 높이를 사용할 수 있는데 분석 방법으로는 절대검정곡선법 (external standard method), 상대검정곡선법 (internal standard method) 또는 표준물첨가법 (standard addition method)이 있다.

### 5.2 봉우리의 높이 측정

봉우리의 정점으로부터 기록지 횡축으로 수직선을 내려 바탕선 (baseline)과 교차하는 점과 정점과의 거리를 봉우리의 높이로 한다.

### 5.3 봉우리의 넓이 측정

봉우리의 넓이는 다음 방법에 의하여 측정한다.

#### 5.3.1 반높이 나비법 (peak width at half height method)

그림 2와 같이 봉우리 높이 ( $h$ )의 중앙으로부터 바탕선에 평행선을 그려 봉우리에 의하여 절단되는 선분을 반높이선 나비 ( $w$ )로 하며, 이것에 봉우리 높이 ( $h$ )를 곱한 것을 봉우리 면적 ( $A$ )으로 한다. 그러나 이 방법은 꼬리 끌림이 현저한 봉우리에는 적용할 수 없다.

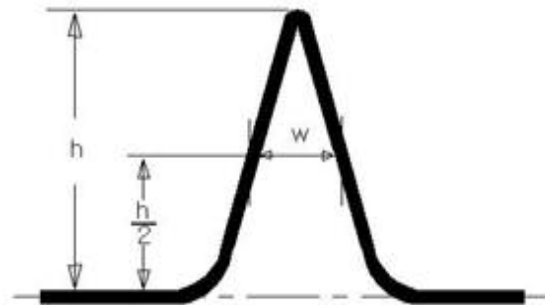


그림 2. 반높이 나비법에 의한 봉우리의  
넓이 측정

( $h$  : 봉우리 높이,  $w$  : 반높이선 나비)

### 5.4 절대검정곡선법

정량하려는 성분으로 된 순물질을 단계적으로 일정량을 취하여 크로마토그램을 기록하고 봉우리넓이 또는 봉우리 높이를 구한다. 측정한 성분의 양을 가로축에, 대응하는 봉우리넓이 또는 봉우리 높이를 세로축에 취하여 그림 3과 같이 검정곡선을 작성한다. 동일한 조건하에 시료를 주입하여 크로마토그램을 기록하고 봉우리넓이 (또는 봉우리 높이)를 측정하여 검정곡선으로부터 분석하려는 성분의 양을 구한다. 이 방법은 전체 측정조작을 일정한 조건하에서 엄격히 제어할 필요가 있다.

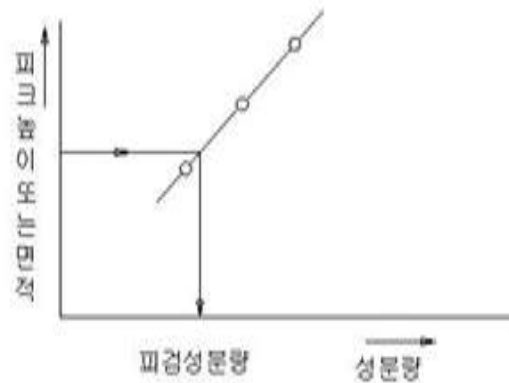


그림 3. 검정곡선법에 의한 검정선

### 5.5 상대검정곡선법

정량하려는 성분의 순물질 (X) 일정량에 내부표준물질 (S) 일정량을 가한 혼합시료의 크로마토그램을 기록하여 봉우리넓이를 측정한다. 가로축에 정량하려는 성분량 ( $M_x$ )과 내부표준물질량 ( $M_s$ )의 비 ( $M_x/M_s$ )를 취하고 세로축에 크로마토그램에서 측정한 정량할 성분의 봉우리넓이 ( $A_x$ )와 표준물질 봉우리넓이 ( $A_s$ )의 비 ( $A_x/A_s$ )를 취하여 그림 4와 같은 검정곡선을 작성한다.



그림 4. 내부표준법에 의한 검정곡선

분석할 시료 (질량  $m$ )에 표준물질 (질량  $n$ )을 가하여 균일하게 혼합한 내부표준물질의 봉우리가 검정곡선 작성과 동일 조건하에서 비슷한 크기가 되도록 주입량을 조절하여 크로마토그램을 기록한다. 크로마토그램으로부터 분석할 성분의 봉우리넓이 ( $A'_x$ )와 표준물질 봉우리넓이 ( $A'_s$ )의 비 ( $A'_x/A'_s$ )를 측정하고 검정곡선으로부터 분석할 성분량 ( $M'_x$ )과 표준물질량 ( $M'_s$ )의 비 ( $X = M'_x/M'_s$ )를 얻어서, 다음 식에 의해 시료 중 검출 성분의 함유율 ( $C$ )을 산출한다.

$$C(\%) = \frac{X \cdot n}{m} \times 100 \quad (\text{식 1})$$

여기서, C는 시료 중 검출한 성분의 조성 %, X는 내부표준물질에 대한 검출한 성분량의 비 ( $X = M'_x/M'_s$ ), m은 시료의 양, n은 내부표준물질의 양이다.

봉우리넓이 대신에 봉우리 높이를 사용할 수 있다. 내부표준물질로는 그 봉우리가 정량하려는 성분 봉우리의 위치에 가능한 한 가까우면서 시료 중의 다른 성분의 봉우리와는 서로 완전하게 분리되는 안정성이 있는 물질을 선택한다.

## 5.6 표준물첨가법

시료의 크로마토그램으로부터 분석 대상 성분 A와 임의의 다른 성분 B의 봉우리넓이  $a_1$ 과  $b_1$ 을 각각 구한다. 다음에 일정량의 시료 W에 순수한 물질의 A를  $\Delta W_A$  만큼 가하여 다시 크로마토그램을 기록하여 성분 A 및 B의 봉우리넓이인  $a_2$ 와  $b_2$ 를 각각 구하면 다음의 식이 성립한다.

$$\frac{W_A}{W_B} = K \frac{a_1}{b_1} \quad (\text{식 2})$$

$$\frac{W_A + \Delta W_A}{W_B} = K \frac{a_2}{b_2} \quad (\text{식 3})$$

여기에서  $W_A$  및  $W_B$ 는 시료 중에 존재하는 A 및 B 성분의 양, K는 비례상수이다. 이로부터 성분 A의 질량백분율 X (%)를 다음 식으로 구할 수 있다.

$$X(\%) = \frac{\Delta W_A}{\left( \frac{a_2}{b_2} \cdot \frac{b_1}{a_1} - 1 \right) W} \times 100 \quad (\text{식 4})$$

$\Delta W_A$ 의 양은  $a_2/b_2$ 의 값이 1.2 ~ 2.0의 사이에 있도록 조절하여 가하여야 한다. 적당한 내부표준물질을 구할 수 없는 경우에 이 방법을 적용할 수 있다. 또한 A를  $\Delta W_A$  만큼 가하더라도 A 성분 외에 다른 성분들의 농도변화가 무시할 수 있을 만큼 작을 때에는 위 식에서  $b_1 = b_2$ 로 놓고 A 성분의 농도를 정할 수 있다.

## 5.7 정량치의 표시



정량분석 결과의 농도표시는 질량분율 %, 부피분율 %, 몰 %, ppm,  $\mu\text{mol/mol}$ ,  $\text{nmol/mol}$  등으로 표시한다.