

## 제 10 장 크로마토그래피 (chromatography)

### 10-1. 개요

1906년에 러시아 식물학자인 Tswett는 컬럼 크로마토그래피에 의해 녹색과 노란색의 엽록체의 색소를 분리, 정제하였다. Tswett는 초기 실험에서 원하는 높이의 컬럼을 만들기 위해 유리 관속에 이눌린(inulin)을 채웠다. 앞에서 색소를 추출하고 그것을 석유에테르에 옮긴 후, 소량의 용액을 컬럼에 주입하였다. 용액이 스며들고 흡착제인 이눌린의 상층부에 좁은 시작띠가 형성되었을 때, 순수한 용매(예, 석유에테르)를 첨가하고 컬럼 상단부에 압력을 작용하였다. 용매가 컬럼을 따라 흐르면서 각각의 색소들은 다른 속도로 이동하고 결국에는 서로로부터 분리되었다. 이러한 컬럼 크로마토그래피 방법은 다양하게 변형되어 여러 종류의 크로마토그래피를 낳았다.

크로마토그래피는 크기, 전하, 흡착성 또는 생물학적 친화성(affinity)의 차이에 근거를 두고 미세한 입자를 충전시킨 컬럼을 통하여 유체를 균일하게 침투 통과시키는 과정에서 유체내 어떤 성분이 선택적으로 지연되어 결과적으로 물질이 분리되는 것을 말한다. 생물공정에서 많이 사용되는 것으로 크기의 차이에 근거를 두고 분리하는 겔(gel) 크로마토그래피, 이온교환수지의 흡착성을 기준으로 하는 이온교환(ion exchange) 크로마토그래피, 분자간의 친화성에 근거를 둔 친화성 크로마토그래피가 있다. 이외에도 용질분자와 지지체(matrix) 위의 작용기 사이의 소수성 상호작용에 기초한 소수성 상호반응(hydrophobic interaction) 크로마토그래피, 그리고 크로마토그래피의 일반 원리에 기초한 종이 크로마토그래피, 얇은 막 크로마토그래피, 기체 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피 등 여러 가지가 있다.

### 10-2. 크로마토그래피의 원리

유리와 철조각같이 성질이 아주 다른 물질이 섞여있을 땐 자석을 이용하여 쉽게 분리할 수 있다. 모래와 설탕이 섞여있을 땐 설탕은 물에서 녹기 때문에 쉽게 분리할 수 있다. 그러나 만약 섞여있는 물질들의 물리적, 화학적 성질이 유사하다면 분리 방법은 좀더 복잡해질 것이다. 크로마토그래피에서 물질들은 이동상(mobile phase)과 정지상(statoinary phase)으로 구성되어 있는 계에 놓인다. 그리고 물질들은 두 상에서 그들의 분포가 다르기 때문에 분리되어진다. 각 분자의 상대적 움직임은 이동상의 움직임과 정지상의 움직임 지연효과들 사이의 균형의 결과이다. 우리가 먼저 생각해야 되는 지연효과들은 분배(partition)와 흡착(adsorption)이다.

일반적으로 두 상이 동일한 용질을 포함한다면 용질은 두 상 사이에서 분포하게 될 것이다. 이것을 분배라 하며 이와 관련된 평형은 두 상에서 용질 농도의 비인 분배계수  $K$ 로 나타내어진다.

$$K = \frac{X_s}{X_m} \quad (10-1)$$

여기에서  $X_s$ 는 정지상에서 있는 용질의 농도이고  $X_m$ 은 이동상에서 있는 용질의 농도이다.

K 값이 크면 클수록 더 많은 분자들이 정지상에 있게 되고 이것은 용질이 컬럼을 통해 느리게 이동함을 보여준다. 즉 다른 K 값을 갖는 물질들은 컬럼을 통해 이동하는 속도가 다름으로 쉽게 분리가 이루어 진다.

분배이론은 정지상인 흡착제와 용매로 채워진 컬럼의 작동에 의해서 쉽게 설명된다. 용질을 포함한 용액은 흡착제 위에 놓여지고 흡착제 안으로 들어갈 수 있다. 그 다음 용매는 컬럼을 통해 연속으로 흘러간다. 비록 흡착제와 용매가 컬럼의 꼭대기부터 바닥까지 연속적일지라도 컬럼은 두 상을 포함한 많은 수의 각 층(이론적인 층)으로 구성되어 있다고 생각할 수 있다.

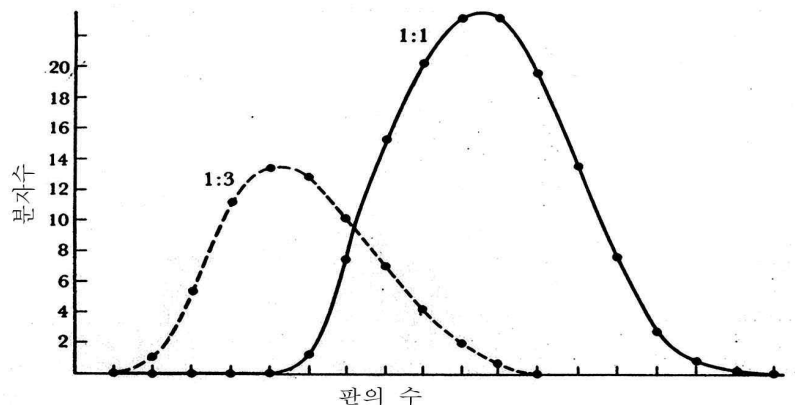
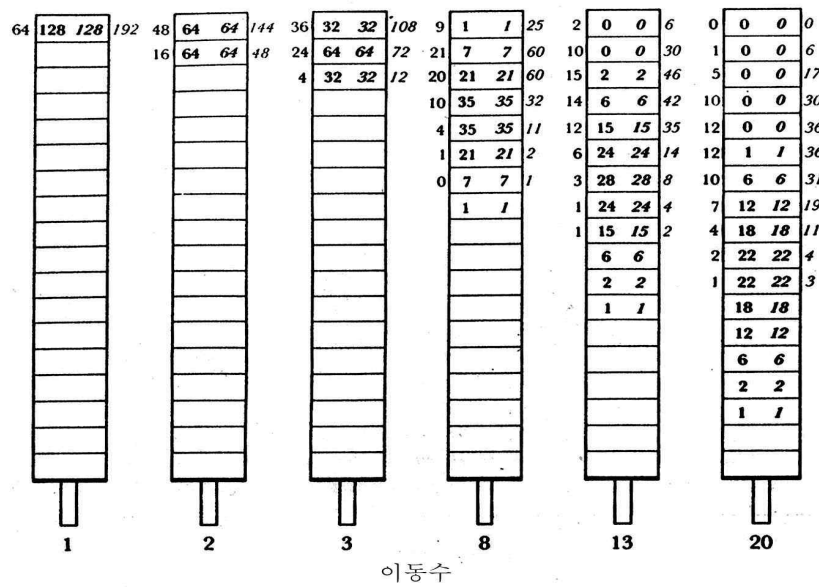


그림 10-1. 크로마토그래피의 분배원리

18 개의 이론적인 판을 갖는 컬럼의 정지상과 이동상에 고루게 분포하는 256 개의 분자를 생각해 보자 가장 위의 판에는 각 상에 128 개의 분자들이 각각 분포하게 될 것이다. 그 다음 두 번째 판으로 들어가게 되고 두 상에 64 개씩 고루게 분포하게 된다. 이동상이 이동함에 따라

계속적인 재분배가 일어나게 되고 16 번의 이동 후 그림 10-1과 같이 나타난다. 만약 정지상에 3 배 더 분포하는 다른 256 개의 분자를 가정하여 보자 (그림 10-1에서의 이탤릭체). 16 번의 이동 후 그림은 이탤릭체의 숫자와 같이 나타난다. 위 두 물질이 한 컬럼에 존재한다면 서로 다른 분포도에 따라 1 : 3의 경우 1 : 1의 경우보다 컬럼에서 더 천천히 이동하게 될 것이다. 그러므로 두 물질은 분리가 이루어지게 된다. 그림 10-1에서 보는 것처럼 컬럼의 길이가 증가할수록 분해능이 좋아짐을 알 수 있다. 이와 같은 원리가 분배이론이다.

여러 개의 비이커에 물과 아세트산을 다양한 농도로 섞어서 활성탄을 넣어주고 섞어 준다. 활성탄에 흡착된 아세트산의 농도는 수용액 상태에 존재하는 아세트산 농도의 감소량을 측정함으로써 알 수 있다. 흡착된 아세트산의 양을 용액상의 평형 (아세트산) 농도로 나타낼 때, 이 그림은 정해진 온도에서 수행된 실험 결과이므로 그림 10-2와 같이 등온선으로 표시된다.

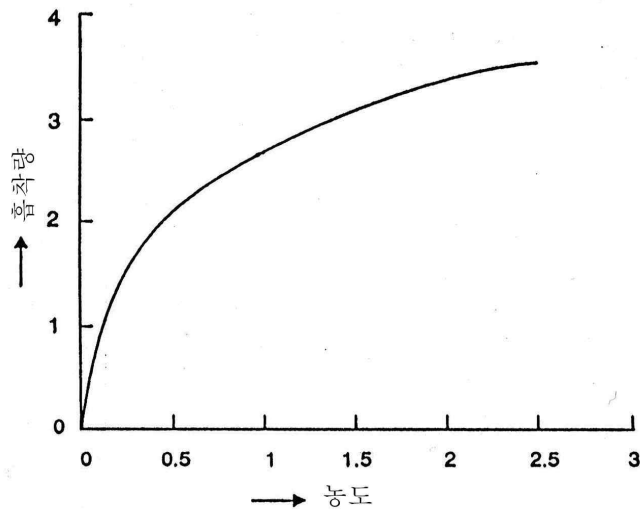


그림 10-2. 아세트산의 흡착

이 등온선은 다음과 같이 Freundlich식으로 표시된다.

$$q = K_F C^n \quad (10-2)$$

q : 흡착량 ( $\text{Kg/m}^3$ ,  $\text{mol/m}^3$ )

$K_F$  : Freundlich 평형상수

C : 농도 ( $\text{Kg/m}^3$ ,  $\text{mol/l}$ )

n : 지수

여기서  $K_F$ 와 n은 실험 변수인데 아세트산의 경우  $K_F$ 와 n이 각각 2.65와 0.35로 나타났다. Freundlich 흡착 등온선은 희석된 용액이나 간단한 분자의 경우에만 잘 적용이 된다. 단백질의 흡착과 같은 경우에는 Langmuir 식을 사용한다.

$$q = q_{\max} \frac{C}{C + K_L} \quad (10-3)$$

$K_L$  : Langmuir 평형상수

$q$  : 흡착된 용질의 몰 또는 그램 수 (흡착제의 단위 무게당)

$K_L$  값은 표면의 흡착력에 상관관계가 있으며 항상 0보다 크다. 단백질의 경우  $K_L$ 은 단백질의 등전점(isoelectric point), pH 그리고 용액의 이온세기 (ionic strength)에 좌우된다.

앞에서 설명한 바와 같이 흡착이 가역적이라면, 용질이 고체 표면에 흡착하는 정도는 용질의 농도에 달려 있다. 용질의 농도와 흡착량의 상관관계를 나타내는 흡착등온선(isotherm)은 Freundlich식에 의하면 그림 10-3과 같이 여러 가지 형태가 될 수 있다. 일반적인 흡착등온선은 A와 같은 곡선이지만 용질과 흡착제와의 특성에 따라 다르게 나타난다. 크로마토그래피에서 일정한 농도의 어떤 물질이 정지상 표면위로 침착되면 고정된 양은 정지상에 흡착하게 되고 나머지 양은 아래로 이동하게 된다. 물질의 이동속도는 정지상과 결합세기에 따라 차이가 있다. 즉, 강한 흡착력을 갖는 물질은 더 느리게 움직인다. 이처럼 서로 다른 흡착 등온선을 갖는 물질은 정지상에 대한 서로간의 지연정도가 다르기 때문에 분리가 될 수 있다. 이러한 원리가 흡착이론이다.

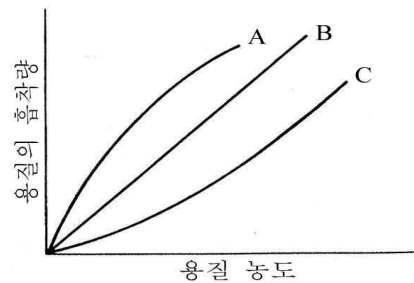


그림 10-3. 흡착 등온선

### 10-3. 크로마토그래피의 종류

#### 1. 겔 크로마토그래피 (gel chromatography)

겔 크로마토그래피는 겔 여과(gel filtration) 또는 겔 침투(gel permeation) 크로마토그래피라고 한다. 겔 여과 크로마토그래피(이동상은 물)라는 명칭은 생화학자들에 의해 사용되며, 겔 침투 크로마토그래피(이동상은 유기용매)라는 명칭은 고분자화학자가 사용한다. 겔 크로마토그래피는 정지상에 분자체(molecular sieve)를 사용하는데 이들은 세파덱스(Sephadex), 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) 또는 아가로오스(agarose) 겔로서 친수성이므로 물을 흡수할 수 있고 팽윤된다(그림 10-4).

시료 분자의 크기가 팽윤된 겔의 최대 구멍(pore)보다 클 때는, 그 분자는 겔 입자를 통과하지 못하므로 정지상 입자의 공간을 통해서 컬럼 밖으로 나온다. 보다 작은 분자는 겔 입자의 열린

구멍 속에 들어가나 그 크기와 모양에 따라서 통과하는 속도가 다르다. 그러므로 분자의 크기가 감소하는 순서로 용출된다.

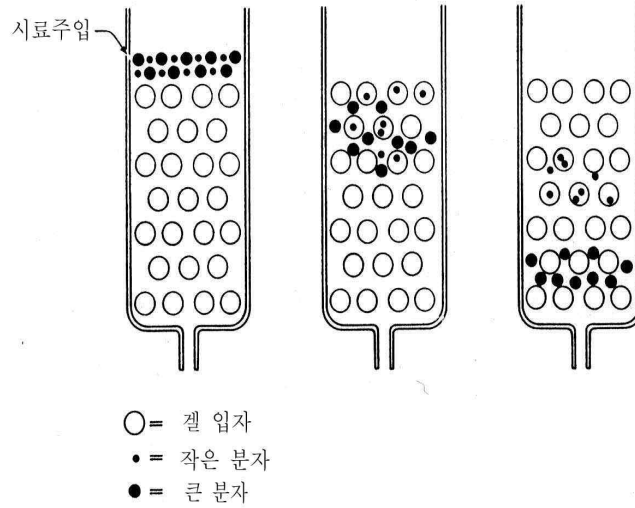


그림 10-4. 겔 크로마토그래피

겔 크로마토그래피에서 겔 베드(gel bed)의 총부피는 다음과 같은 식으로 표시된다(그림 10-5).

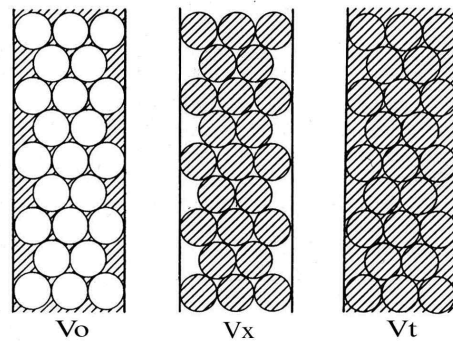


그림 10-5. 겔 크로마토그래피 부피개념

$$V_t = V_o + V_x \quad (10-4)$$

$V_t$  : 겔 베드(gel bed)의 총부피

$V_o$  : 보이드 부피(void volume)

$V_x$  : 겔 분자체의 부피

보이드 부피인  $V_0$ 는 겔 분자체 주위에 있는 용매가 차지하는 공간으로 일반적으로 겔 베드 총 부피( $V_t$ )의 약 35%가 된다. 대부분의 컬럼은 염료(dye)인 blue dextran (분자량  $2 \times 10^6$  dalton)으로  $V_0$ 를 보정(calibration)한다. 용리 부피(elution volume)인  $V_e$ 는 시료 분자가 컬럼을 지나서 밖으로 나올 때 까지 용리액의 양을 의미한다. 그리고 시료 분자의 지연 정도는 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$REV = V_e/V_0 \quad (10-5)$$

$$R = \frac{1}{REV} = \frac{V_0}{V_e} = V_0/V_e \quad (10-6)$$

$$K_{av} = (V_e - V_0)/V_x \quad (10-7)$$

여기서 REV는 상대적 용리부피(relative elution volume), R은 지연상수(retention constant),  $K_{av} = K_d$ 는 분배계수(partition or distribution constant)를 의미한다.  $K_{av}$ 를 잘 이용하면 그림 10-6에서처럼 이미 분자량을 알고 있는 물질들과 비교하여 시료의 분자량을 측정할 수 있다.

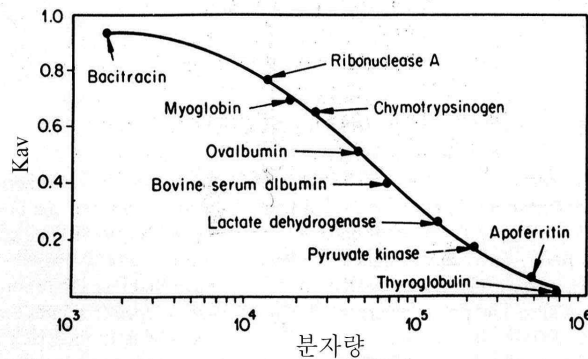


그림 10-6. 세파덱스 G-200의 분리곡선

앞에 설명한 바와 같이 시료의 분자량 분포에 대한 정보가 이 방법으로 얻어진다. 그리고 단백질, 펩티드, 핵산, 호르몬, 다당류들의 분리에 이용된다. 또한 겔 크로마토그래피는 고농도의 염으로 염색되어 분리된 단백질 분획으로부터 염을 제거하는 데 유용하다. 세파덱스 G-25와 같은 배제한계가 작은 겔을 사용하면, 단백질은 컬럼을 통과하는데 비하여 염은 겔에 유지되어 있다. 배제한계(exclusion limit)는 겔에 침투될 수 있는 분자의 최대 분자량을 나타낸다. 이 값은 겔에 따라 서로 다르며 1,000 - 수백만이다. 일반적으로 배제한계와 그보다 작은 어느 한계값 사이의 크기를 가진 분자가 분리된다. 겔은 사용하기 전에 수시간 내지 수일간 사용하는 용매 중에서 평형시켜야 된다. 고분자량 물질용의 겔은 중합도가 작으며 평형이 되기까지 긴 시간이 걸린다.

세파덱스(Sephadex)는 단백질 분리에 잘 사용되는 겔이다. 다당류이고 큰 고분자 사슬에 있는 수산기 때문에, 매우 극성이며 많은 물을 흡수한다. 겔은 그들이 물을 재흡수하여 팽윤하는 능

력에 따라서 특성을 나타낸다. 세파덱스 유형의 번호는 물의 재흡수값에 관계된 것이다. 이와 같이 세파덱스 G-10는 마른 겔 1 g당 1 ml의 물을 흡수하며, 세파덱스 G-200은 g당 약 20 ml의 물을 흡수한다. 세파덱스 겔의 종류와 분자량 분획범위를 표 10-1에 나타내었다. 이들 겔은 물에 녹지 않으며 약한 산화제, 환원제, 약한 염기에 대해서 안정하다.

표 10-1. 세파덱스 겔의 특성

구분	메쉬 (mesh)	입자직경 <sup>a</sup> (μ)	분획 범위 (MW)	물의 재흡수 (ml/g dry gel)	겔 부피 (ml/g dry gel)
Sephadex G-10		40 - 120	700	1.0 ± 0.1	2 - 3
Sephadex G-15		40 - 120	1,500	1.5 ± 0.2	2.5 - 3.5
Sephadex G-25	Coarse	100 - 300	1,000 - 5,000	2.5 ± 0.2	4 - 6
	Medium	50 - 150			
	Fine	20 - 80			
	Superfine	10 - 40			
Sephadex G-50	Coarse	100 - 300	1,500 - 30,000	5.0 ± 0.3	9 - 11
	Medium	50 - 150			
	Fine	20 - 80			
	Superfine	10 - 40			
Sephadex G-75		40 - 120	3,000 - 70,000	7.5 ± 0.5	12 - 15
	Superfine	10 - 40			
Sephadex G-100		40 - 120	4,000 - 150,000	10 ± 1.0	15 - 20
	Superfine	10 - 40			
Sephadex G-150		40 - 120	5,000 - 400,000	15 ± 1.5	20 - 30
	Superfine	10 - 40			
Sephadex G-200		40 - 120	5,000 - 800,000	20 ± 2.0	30 - 40
	Superfine	10 - 40			

a 건조입자직경

바이오-겔 P(Bio-Gel P)는 보다 화학적으로 불활성한 분자체 겔(molecular-sieve gel)이고 아크릴아미드 중합물이다. 물에 녹지 않으며, 보통의 유기 용매에도 녹지 않는다. pH 2 - 11의 범위에서 사용되며 흡착성은 세파덱스와 다르므로 극성물질의 분리 거동도 다르다. 표 10-2에 바이오-겔의 종류와 분자량 분획범위를 나타내었다.

또한 아가로오스겔로서 Phamacia에서 판매하는 세파로오스(Spharose)와 Bio-Rad사에서 판매하는 Bio-gel A가 있다(표 10-3). 아가로오스겔은 우레아(Urea), 구아니딘 염화수소(guanidine HCl)와 같은 수소결합을 파괴하는 화합물에 저항성을 갖고 있다. 분자량이 10,000 - 1.5 × 10<sup>8</sup>의 배제한계를 가진 겔이 제조되어 있다

겔 크로마토그래피 조업과 관련되어 몇 가지 고려사항은 시료의 크기, 점성도, 이온의 세기, 흐름 속도 등이다. 시료 크기는 시료의 특성과 원하는 분리 방법에 따라 달라진다. 그림 10-7에서 보듯이 목적에 맞는 적당량의 시료를 선택하여야 한다.

표 10-2. 바이오 겔의 특성

구분	매쉬 (mesh)	입자직경 <sup>a</sup> (μ)	분획범위 (MW)	물의 재흡수 (ml/g dry gel)	겔 부피 (ml/g dry gel)
Bio-Gel P-2	50 - 100	150 - 300	200 - 2,600	1.5	4
	100 - 200	75 - 150			
	200 - 400	40 - 75			
	400	40			
Bio-Gel P-4	50 - 100	150 - 300	500 - 4,000	2.4	6
	100 - 200	75 - 150			
	200 - 400	40 - 75			
	400	40			
Bio-Gel P-6	50 - 100	150 - 300	1,000 - 5,000	3.7	9
	100 - 200	75 - 150			
	200 - 400	40 - 75			
	400	40			
Bio-Gel P-10	50 - 100	150 - 300	5,000 - 17,000	4.5	12
	100 - 200	75 - 150			
	200 - 400	40 - 75			
	400	40			
Bio-Gel P-30	50 - 100	150 - 300	20,000 - 50,000	5.7	15
	100 - 200	75 - 150			
	400	40			
Bio-Gel P-60	50 - 100	150 - 300	30,000 - 70,000	7.2	20
	100 - 200	75 - 150			
	400	40			
Bio-Gel P-100	50 - 100	150 - 300	40,000 - 100,000	7.5	20
	100 - 200	75 - 150			
	400	40			
Bio-Gel P-150	50 - 100	150 - 300	50,000 - 150,000	9.2	25
	100 - 200	75 - 150			
	400	40			
Bio-Gel P-200	50 - 100	150 - 300	80,000 - 300,000	14.7	35
	100 - 200	75 - 150			
	400	40			

시료의 점성도는 증가함에 따라 용리액이 나오는 범위가 넓어지고 꾸불꾸불해진다. 그림에서 알 수 있듯이 시료의 점성도가 너무 커지면 완전한 분리는 더 이상 불가능하다. 이온의 세기도 중요하여 그 크기(0.008 이상)를 적절히 조절하기 위해 염화나트륨이나 염화칼륨을 0.2 - 1 M 정도의 농도로 사용한다. 그리고 겔 크로마토그래피에서는 여러 가지 분자의 혼합물이 겔 분자체 속으로 들어갈 기회가 주어져야 한다. 그러므로 흐름속도가 빨라질수록 겔 분자체 속에 들어갈 기회가 적어지므로 용출 범위가 넓어진다. 따라서 컬럼의 좋은 해상력을 기대할 수 없다.



표 10-3. 아가로오스 겔의 특성

구분	메쉬 (mesh)	입자직경 <sup>a</sup> ( $\mu$ )	분획 범위 (MW $\times 10^{-6}$ )	아가로오스 농도 (%)
Sepharose 4B		40 - 190	0.3 - 3	4
Sepharose 2B		60 - 250	2 - 25	2
Bio-Gel A-0.5m	50 - 100	150 - 300	< 0.010 - 0.5	10
	100 - 200	75 - 150		
	200 - 400	40 - 75		
Bio-Gel A-1.5m	50 - 100	150 - 300	< 0.010 - 1.5	8
	100 - 200	75 - 150		
	200 - 400	40 - 75		
Bio-Gel A-5m	50 - 100	150 - 300	0.010 - 0.5	6
	100 - 200	75 - 150		
	200 - 400	40 - 75		
Bio-Gel A-15m	50 - 100	150 - 300	0.04 - 40	4
	100 - 200	75 - 150		
	200 - 400	40 - 75		
Bio-Gel A-50m	50 - 100	150 - 300	0.10 - 50	2
	100 - 200	75 - 150		
Bio-Gel A-15m	50 - 100	150 - 300	1 - > 150	1
	100 - 200	75 - 150		

a 작은 입자 직경

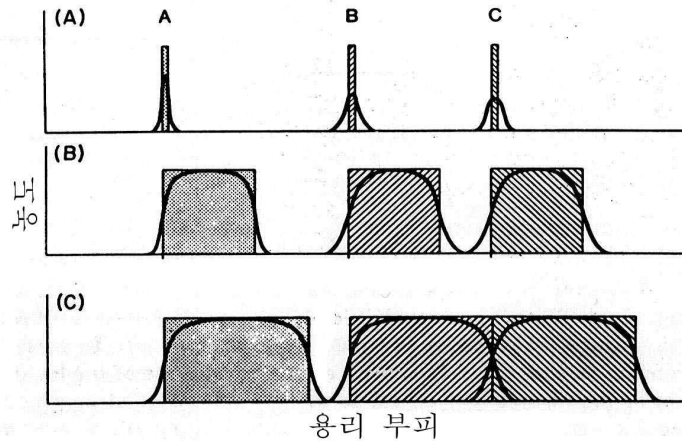


그림 10-7. 시료의 크기가 분리에 미치는 영향

- A : 성분 A, B, C를 분리하기에 필요한 양에 비해 시료의 양이 너무 적다.
- B : 각 성분의 분리에 적당한 시료의 양이다.
- C : 각 시료를 완전히 분리하기에는 시료의 양이 너무 많다.

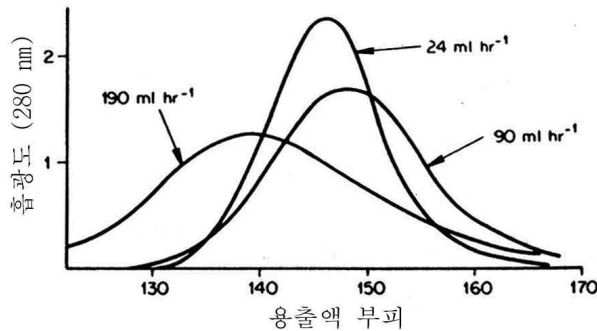


그림 10-8. 세파덱스 G-25를 이용한 우리딜릭 산의 겔 크로마토그래피시 흐름속도가 용출형태에 미치는 영향

## 2. 이온교환 크로마토그래피 (ion exchange chromatography)

이온교환 크로마토그래피는 음이온들이나 양이온들이 교환수지라고 하는 정지상에 공유결합되어 있는 이온교환수지를 이용한다. 이동상에 있는 반대 전하의 용질 이온들은 정전기적 인력으로 정지상에 이끌린다. 이 크로마토그래피는 이온 또는 전기적으로 전하를 띠는 화합물이 정전기적인 힘에 의해 이온교환수지에 흡착되어 평형을 이루는 것에 기초한다.

이온교환 크로마토그래피에서 정지상은 전하를 가진 이온교환수지(ion exchanger)로서 매우 다양한 종류가 있다. 이온교환수지의 용량(capacity)은 이온교환수지에 결합하는 이온의 최대값에 의해 결정된다.

음이온 교환수지에는 양으로 대전된 기가 지지체에 공유결합으로 붙어 있으며 용질 음이온들이 이 대전된 자리로 끌려간다. 양이온 교환수지는 용질 양이온과 결합하는 음으로 대전된 자리를 갖는다. 표 10-4에서 알 수 있듯이 카르복시메틸(CM)과 디에틸아미노에틸(DEAE) 등 다양한 종류의 기능이 각종 지지체에 부착하여 크로마토그래피에 적합한 이온교환수지가 된다. 지지체로 사용되는 물질로서는 폴리스티렌(Polystyrene), 폴리아크릴레이트(Polyacrylate), 셀룰로오스, 세파셀(Sephacel), 텍스트란, 아가로오스, 토요펠(Toyoperl) 등이 있다. 이동상에서 용리액은 주로 수용액 상태로 pH, 염의 농도와 성질, 용매의 점도 및 유전상수(dielectric constant) 등은 중요한 고려사항이 된다. 그리고 분리될 물질은 전하를 가지고 있거나 아니면 적어도 이온화 되어야 한다.

단백질 정제를 위한 이온교환 크로마토그래피의 과정은 다음과 같다(그림 10-9). 단백질 용액은 이온교환수지를 포함한 정지상 컬럼을 통과한다. 양이온 교환수지는 음전기를 띤 카르복시메틸기들을 셀룰로오스 지지체에 결합시켜 얻어지는 카르복시메틸-셀룰로오스이다. 양이온 단백질들은 컬럼에 유입되는 pH에서의 순수한 양전하에 의한 부착력인 정전기력에 의하여 교환수지에 결합한다. 이와같이 단백질이 결합된 후에, pH 또는 이온력을 증가시키는 완충액으로 세척한다. 용출액에서의 그러한 변화들은 결합을 약하게 하여 단백질들이 교환수지로부터 첫 번째로 분리되며, 그 다음에는 결합단계에서의 조건들이 많이 달라지게 됨에 따라 단단히 결합된 분자들이 분리한다. 결과적으로 이온교환수지층으로 처음 들어갈 때 단백질이 포함되지 않

왔던 용리액은 분리된 단백질의 어떤 특정 부분을 함유하게 된다. 컬럼을 세척하여 얻어진 용리액은 다른 조건들 아래에서 작은 부분들로 모아지게 된다. 전형적으로 디에틸아미노에틸 셀룰로오스를 사용하는 음이온 교환수지에도 유사한 방법이 사용된다.

표 10-4. 이온교환수지

이온교환수지	기능기명	약어
Strong cation exchangers		
-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sulfo-	S-
-CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sulfomethyl-	SM-
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Sulfoethyl-	SE-
-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	sulfopropyl-	SP-
-PO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	Phospho-	P-
Weak cation exchangers		
-COO <sup>-</sup>	Carboxy-	C-
-CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup>	Carboxymethyl-	CM-
Strong anion exchangers		
-CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Trimethylaminomethyl-	TAM-
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>	Triethylaminoethyl-	TEAE-
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	Diethyl-2-hydroxypropylaminoethyl	QAE-
Weak anion exchangers		
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> H <sub>3</sub>	Aminoethyl-	AE-
-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> H(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	Diethylaminoethyl-	DEAE-
-(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sup>+</sup> H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>3</sub>	Polyethyleneimine-	PEI-
-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -N <sup>+</sup> H <sub>3</sub>	Para-aminobenzyl-	PAB-

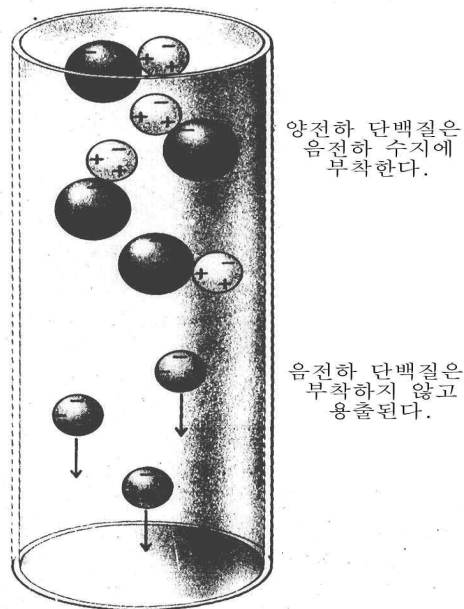


그림 10-9. 단백질의 이온교환 크로마토그래피

다음으로 세 개 아미노산(Gly, Asp, Lys)을 분리하는 과정을 생각해 보자.

양이온 교환수지를 이용하여 pH 3.5에서 분리하고자 했다면 Asp는 음전하를 띠어 Gly, Lys은 양전하를 띠게 되므로 교환수지에 결합하게 된다. 그러나 음이온 교환수지를 이용하면 pH 8.5에서 Gly은 컬럼을 빠져나오지만 Asp은 교환수지에 단단히 결합되어 있을 것이다. 이상과 같이 이온교환 크로마토그래피에서 교환수지에 원하는 물질이 결합되면 pH나 염 농도의 변화같은 적당한 처리를 하여 회수한다.

이온교환 크로마토그래피의 중요한 응용은 분석적인 분리에서 찾을 수 있다. 앞에서 설명한 단백질이나 아미노산의 분리는 분석적인 응용의 대표적인 예이다. 이 크로마토그래피는 양이온 및 음이온의 분리에도 효율적으로 이용된다. 할로겐화물 이온은 Dowex-2 컬럼으로 pH 10.4의 1 M NaNO<sub>3</sub> (NaOH로 조절)을 용리액으로 사용하면 F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>의 순으로 분리된다. 알칼리 금속이온은 Dowex-50이나 Amberlite IR 120 컬럼으로 0.7 M HCl에 의해서 Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>의 순으로 분리된다. 알칼리 토금속이온은 Dowex-50 컬럼에서 1.2 M 질산암모늄에 의해서 Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>의 순으로 용리시킬 수 있다.

### 3. 친화성 크로마토그래피 (affinity chromatography)

친화성 크로마토그래피는 용질분자와 지지체 위에 결합되어 있는 리간드(ligand) 사이의 특이한 화학적 상호작용에 기초한다(그림 10-10). 리간드와 용질사이의 친화성 결합은 분자의 크기와 모양에 특이할 수 있다.

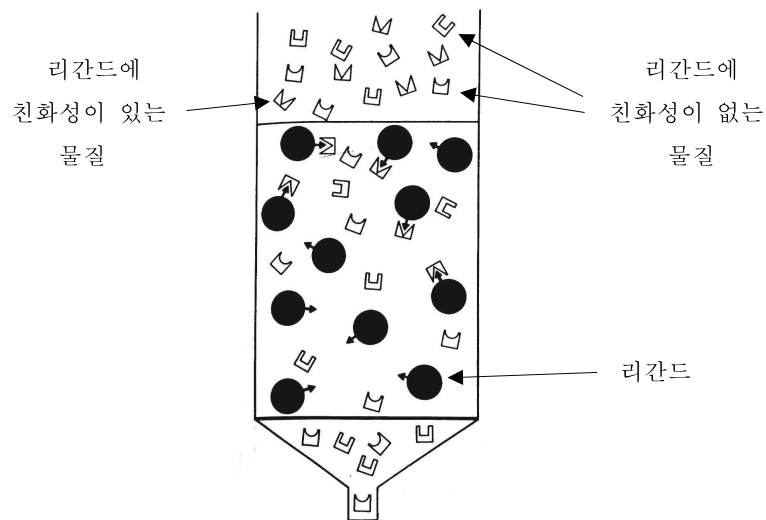


그림 10-10. 친화성 크로마토그래피

많은 생체 고분자(A)는 특이성이 우수한 다른 분자(B)와 복합물을 형성한다. 만일 B가 컬럼을 충전하는데 쓰이는 지지체에 붙는다면 A 성분에 대한 K 값은 매우 크며, 반면에 다른 용액 성분에 대한 K 값은 본질적으로 0이다. 상호작용을 갖는 구체적인 짝(pair)들의 예는 효소-억제

제, 항원-항체 등이다.

친화성크로마토그래피에서는 용질 중 한 성분이 정지상의 리간드와 특이한 상호작용으로 결합함으로써 다른 용질들과 분리된다. 따라서 컬럼 내 정지상에 단지 한 용질과만 고유하게 상호작용하는 리간드를 공유결합으로 붙인다. 시료를 이 컬럼에 통과시키면 단지 한 용질만 정지상에 붙게 된다. 그 다음 다른 성분들을 잘 씻어 버린 후, 달라붙은 성분은 용질과 정지상 간의 결합을 약화시킬 수 있는 조건으로 바꿔 줌으로써 용리된다. 예를 들면, 공유결합된 리간드가 특정한 단백질에 대해 항체인 경우이다. 여러 종류의 단백질을 포함한 혼합물이 컬럼을 통과할 때, 단지 항체와 반응하는 하나의 단백질만 컬럼에 결합된다. 다른 모든 단백질이 컬럼을 통해 씻겨 나간 후, pH를 변화시키거나 이온세기를 변화시킴으로써 결합되어 있는 특정한 단백질을 항체로부터 떨어지게하여 회수한다.

이러한 방법은 효소, 항원, 특이적 핵산, 비타민 결합 단백질, 약, 호르몬 수용체 같은 물질을 순수 분리할 때 자주 이용된다. 친화성 크로마토그래피가 생체고분자의 분리에 사용된 예는 표 10-5와 같다.

표 10-5. 친화성 크로마토그래피를 이용한 생체고분자의 분리

생체 고분자	사용한 리간드
Adenosine deaminase	Adenosine
Amino peptidase	Hexamethylenediamine
APO-aspartate aminotransferase	Pyridoxal-5'-phosphate
Avidin	Biocytin
Carbonic anhydrase	Sulfanilamide
Chroismate mutase	Tryptophan
$\alpha$ -Chymotrypsin	Tryptophan
Glycerol-3P dehydrogenase	Glycerol-3-phosphate
Isoleucyl-tRNA synthetase	Aminoacyl-tRNA
Thrombin	Benzamidine
Xanthine oxidase	Allopurinol
Coagulation factor	Heparin
Follicle-stimulating hormone	Concanavalin A
<i>Gal</i> repressor	<i>p</i> -aminophenyl- $\alpha$ -thiogalactoside
Interferon	Antibody
Thyroxine-binding protein	Thyroxine

크로마토그래피를 위한 지지체 선택시 고려사항은 낮은 비특이적 친화성, 높은 투과성 및 pH, 계면활성제에 대한 안정성, 활성 기능기(functional group)의 이용성, 높은 효율의 다공성 (porosity) 등이다. 이러한 사항을 충족시켜주는 지지체에는 아가로오스 담체(beads), 폴리아크릴아마이드 담체, 조절된 다공성(controlled porosity) 유리 담체 등이 있다. 아가로오스 담체는 가장 많이 쓰인다. 그러나 용리시킬 때 변성제(denaturant)가 응축되기 쉽다는 단점이 있다. 폴리아크릴아마이드 담체는 여러 조건을 충족시키기는 하지만 다공성이 부족하다.

조절된 다공성 유리 담체는 물리 화학적으로 안정해서 다양한 조건에서 전개 속도가 좋다. 그

렇지만 비특이적 단백질 흡착이 많으며 기능이 적다는 단점이 있다. 이 문제는 유리 표면에 텍스트란이나 다른 물질로 표면 처리 함으로써 극복할 수는 있다.

친화성 크로마토그래피에서 리간드를 붙일 때 고체 지지체(matrix)에서 되도록 긴 리간드를 붙이는 것이 좋다. 만약 리간드가 지지체에 바로 결합되어 있다면 거대 분자는 입체 장애(steric hindrance) 때문에 리간드에 접근할 수 없다. 그래서 종종 지지체와 리간드 사이에 팔(arm)을 붙인다.

친화성 크로마토그래피에서 리간드와 단백질 사이의 친화성이 너무 높거나 낮으면 좋지 않다. 기질이 리간드로 쓰일 경우에는 효소가 촉매 역할을 하지 않도록 촉매작용에 필요한 금속 이온을 제거하거나,  $k_m$ 과  $k_{cat}$  또는 pH가 다른 경우 온도를 낮추거나 pH를 변화시킨다.

리간드에 결합된 단백질을 분리하는 방법에는 두 가지가 있다. 첫 번째는 지지체에 리간드보다 친화성이 더 큰 물질을 포함하는 용리액으로 분리해 내는 방법이다. 다음으로 pH를 변화시키거나 온도, 이온세기 등을 변화시키는 방법이다.

#### 4. 소수성 상호반응 크로마토그래피 (hydrophobic interaction chromatography)

물속에 소수성 물질이 들어오면 서로 뭉치려는 현상을 볼 수 있다. 예를 들면 헥세인(hexane) 2 분자가 물에 들어오면 자발적으로 서로 모이는 것을 볼 수 있다. 이러한 현상은 열역학적으로 자발적으로 일어나는 소수성 상호반응이다. 소수성 상호반응 크로마토그래피는 소수성 기능을 갖는 지지체(matrix)와 어떤 분자간의 소수성 상호작용을 이용하여 분리하는 방법이다.

지지체는 친수성(hydrophilic)이고 불활성인 아가로오스를 변형시켜 소수성 기능(hydrophobic functionality)을 갖도록 한다. 즉 표 10-6에서 알 수 있듯이 알킬아민을 BrCN으로 활성화시킨 아가로오스와 반응시켜 변형된 아가로오스를 많이 이용한다.

표 10-6. 소수성 상호반응 크로마토그래피를 위한 변형된 아가로오스

구조	약어
(a) Agarose activated by BrCN	
-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> H	Seph - C <sub>n</sub>
-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NH <sub>2</sub>	Seph - C <sub>n</sub> - NH <sub>2</sub>
-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OH	Seph - C <sub>n</sub> - OH
-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> Ph	Seph - C <sub>n</sub>
-NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	Seph - C <sub>n</sub> - CPA
-NHCH(CHPh)CO <sub>2</sub> H	Phe - Seph
	A.A. - Seph
(b) Ether Linkages	
-NOCH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> O(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> H	Alkyl - ether - Seph
-OCH <sub>2</sub> Ph	Benzyl - ether - Seph

이 크로마토그래피는 단백질 순수 분리과정에 많이 이용되는데 단백질 표면에 있는 소수성 돌기(pitch)나 주머니(pocket)가 소수성 상호반응에서의 힘이 된다. 황산암모늄(ammonium sulphate)과 같은 염석이온(salting-out ion)은 용액 중에 물의 가용성을 감소시켜 소수성 상호

반응을 증가시키지만 sodium thiocyanate와 같은 염용이온(salting-out ion, chaotropic ion)은 소수성 상호반응을 감소시킨다. 각종 이온이 소수성 상호반응에 미치는 영향은 그림 10-11과 같다.

소수성 상호반응 크로마토그래피에서 단백질의 용리를 위해서는 이온세기를 감소시키거나 pH를 증가시킨다. 온도를 낮추면 이론적으로 용리를 향상시키는 것으로 생각되지만 그 효과는 미미하다. 그리고 극성(polarity)을 감소시키는 지방족 아민(aliphatic amine) 또는 알콜 또는 비이온성 세척제(detergent) (예, Tween-20, Triton X-100)를 사용하여 용리시키기도 한다.

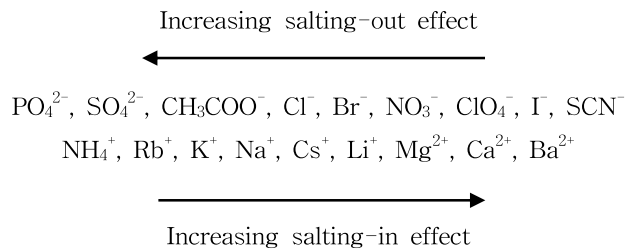


그림 10-11. 소수성 상호반응에 미치는 이온의 영향

### 5. 종이 크로마토그래피 (paper chromatography)

셀룰로오스 지지대를 얇은 종이 형태로 사용하는 것을 종이 크로마토그래피라한다. 셀룰로오스는 건조한 상태에서도 많은 양의 결합수(bound water)가 존재하는데 이 결합수가 정지상으로 전개 용매(developing solvent)가 이동상으로 작용한다.

크로마토그래피 방법은 다음과 같다. 분리할 시료 용액을 종이 하단부에 떨어뜨리고 종이를 말린다. 이 종이를 챔버에 넣고 적당한 용매에 담근다. 모세관 현상에 의해 종이를 따라 용매가 이동하여 시작점을 통과하면 시료를 녹이고 각각의 시료 성분들은 용매를 따라 움직인다. 용매가 이동한 거리와 시료 성분이 이동한 거리의 비  $R_f$ 를 비교한다.

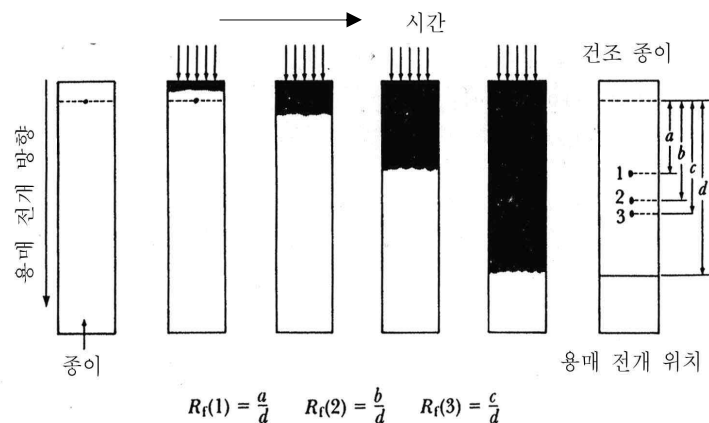


그림 10-12. 종이 크로마토그래피를 이용한 시료 분리

종이 크로마토그래피는 용매의 흐름 방향에 따라 상승법과 하강법의 두 가지가 있다.

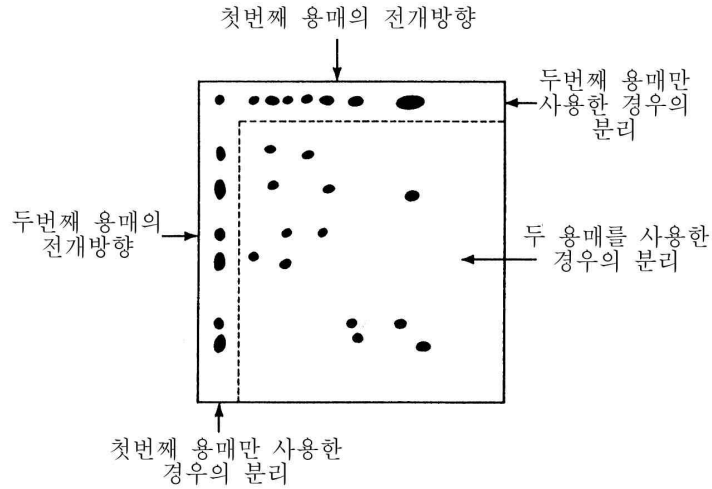


그림 10-13. 하강, 상승 크로마토그래피의 실험장치

크로마토그래피의 응용 예는 2 차원(two-dimensional) 종이 크로마토그래피이다. 이 방법은 크로마토그래피를 한 쪽 방향으로 진행시킨 후에 종이를 말리고 원래 진행 방향의 오른쪽 각도로 크로마토그래피를 진행시킨다. 각각의 용매로는 분리할 수 없는 시료를 두 용매를 함께 사용함으로써 쉽게 시료를 분리할 수 있다.

종이 크로마토그래피에 의해 분리된 시료는 색깔이나 형광, 화학반응, 방사성 등에 의해 검출될 수 있다. 성분의 동정(identification)은 보통  $R_f$  값을 알고 있는 표준 물질과의 비교에 의해 이루어진다. 또한 시료가 포함된 종이 부분을 오려내어 적당한 용매에 녹여 정성 분석적인 방법에 의해 해결하기도 한다.

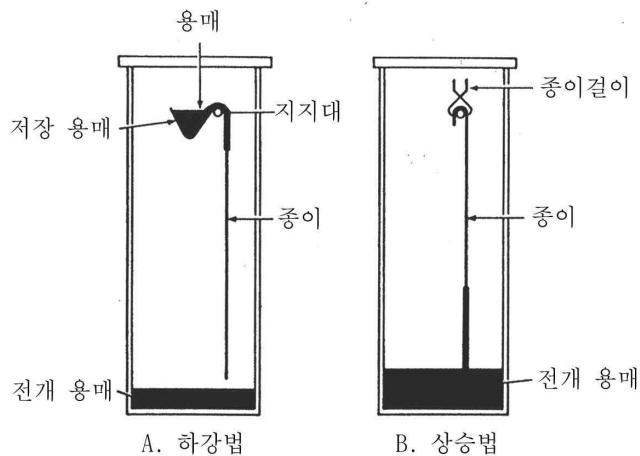


그림 10-14. 2 차원 종이 크로마토그래피



## 6. 얇은 막 크로마토그래피 (thin-layer chromatography)

얇은 막 크로마토그래피(thin-layer chromatography, TLC)는 지방을 분석하기 위해 개발되었다. 종이 크로마토그래피의 장점을 모두 가지며 다양한 물질들을 분리할 수 있다. 고체 지지대(support)로 사용하기 위한 무기 물질로서 실리카 겔, 산화 알루미늄, 규조토 등이 있으며, 유기 물질로는 셀룰로오스, 폴리아마이드, 폴리에틸렌 가루 등이 있다. 크로마토그래피 방법은 먼저 얇은 막 크로마토그래피 판을 만든 후 시료를 판에 떨어뜨린다. 그리고 나서 판을 챔버에 넣고 상승 크로마토그래피로 전개한 후 챔버에서 판을 꺼내 말리며 색깔이나 형광 또는 적당한 화학 반응을 통해 시료를 검출한다.

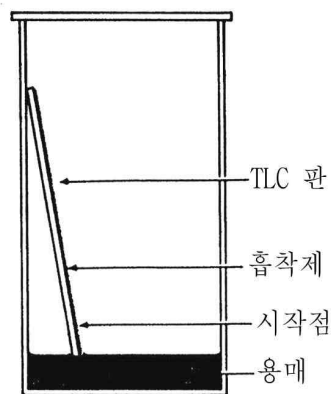


그림 10-15. 얇은 막 크로마토그래피판의 상승 전개를 위한 실험준비

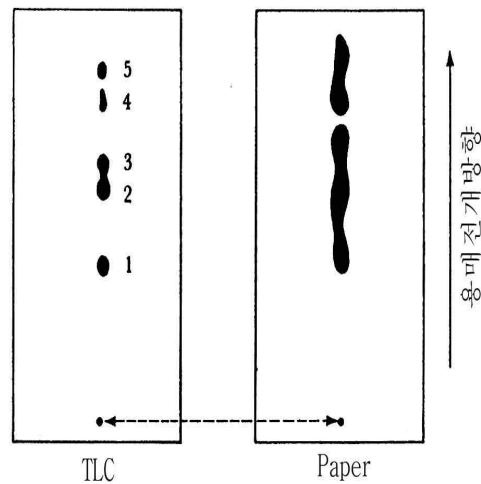


그림 10-16. 얇은 막 크로마토그래피와 종이 크로마토그래피에 의한 분리 비교

각각의 셀룰로오스에서의 전개는 모두 물을 사용하였다.

(1, 아데노신; 2, 하이포잔틴; 3, 이노신; 4, 우리딘)

얇은 막 크로마토그래피는 다음과 같은 장점을 가진다. 종이 크로마토그래피에 비해 시료 반점(spot)이 매우 작기 때문에 뛰어난 해상력을 보인다 (그림 10-16). 그리고 매우 빠른 속도로 분리되며 시료 성분의 분리 및 정제가 쉽다. 또한 비극성 물질을 분리할 수 있다.

## 7. 기타 크로마토그래피

### (1) 기체 크로마토그래피 (gas chromatography)

기체 크로마토그래피(gas chromatography, GC)는 특히 유기화학자들이 가장 널리 이용하고 있는 크로마토그래피 분석법이며 1952년에 개발된 이래 가장 중요한 기술의 하나가 되고 있다. 벤젠과 사이클로헥산의 분리는 일반적인 증류법으로는 어려우나, 기체 크로마토그래피로는 간단하게 할 수 있다.

기체 크로마토그래피에서 시료는 증기 상태로 전환되고 용리 이동상은 기체이다. 정지상은 보통 내화벽돌이나 규조토와 같은 불활성 고체분말에 비휘발성인 액체를 피복하여 사용한다.

기체 크로마토그래피의 구성도는 다음 그림과 같다. 시료는 고무격막을 통해서 주사기로 컬럼에 도입된다. 시료가 적어도 10 torr의 증기압이 되는 온도가 되도록 시료주입 부위, 컬럼, 검출기는 가열된다. 시료주입부와 검출기는 주입된 시료의 신속한 기화를 촉진하고 검출기에서 시료 응축을 막기 위해 컬럼보다 온도가 약간 더 높아야한다. 액체시료는 0.1에서 10  $\mu$ l를 주입하고 기체시료는 1에서 10 ml를 주입한다. 기체시료를 주입하는 경우 기체가 새지 않는 주사기를 쓰거나 일정 부피의 기체 도입 장치를 사용한다. 컬럼은 충전 컬럼의 경우 직경은 0.5 cm, 길이는 1 - 20 m 정도이며 세관(capillary) 컬럼의 경우 길이는 30 - 100 m 정도이다.

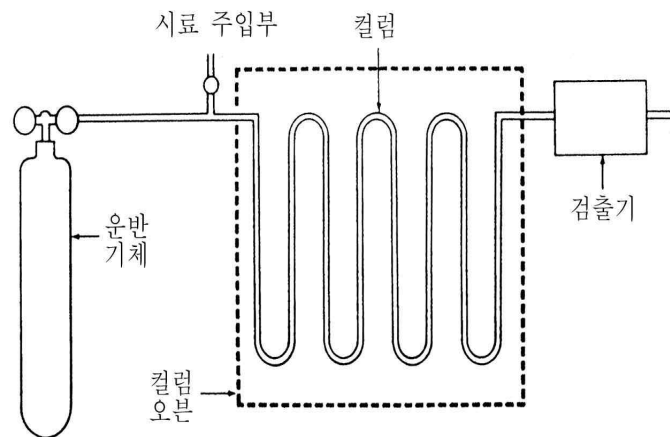


그림 10-17. 가스 크로마토그래피의 모식도

분리는 다른 크로마토그래피와 같이 시료성분이 운반기체와 정지상 액체 사이에서 분배되어 분리가 일어난다. 운반기체는 알곤, 헬륨, 질소, 이산화탄소와 같은 화학적으로 불활성이며 순도

가 높은 기체가 사용된다. 밀도가 높은 기체가 효과적이기는 하지만 밀도가 낮은 기체는 빠른 속도를 갖는 이점이 있다. 운반기체의 선택은 검출기의 종류에 따라서 가끔 제한되기도 한다.

시료성분은 증기의 성분에 대응되어 응답하는 여러 가지 검출기에 의해서 컬럼으로부터 일정한 유속으로 유출되어 자동적으로 검출된다. 일반적으로 검출기는 대조측과 시료측의 두 부분을 갖고 있다. 운반기체는 컬럼에 들어가기 전에 검출기의 대조측을 통해서 컬럼을 지난 다음에 시료측을 지난다. 대조측의 신호에 상대적인 시료측의 응답이 기록기에 입력되어 크로마토그래피 봉우리(peak)가 시간의 함수로서 기록된다. 머무른 시간을 분단위로 측정하여 순수한 물질에 대한 머무른 시간과 비교함으로써 봉우리를 확인할 수 있다. 봉우리의 넓이는 농도에 비례하므로 물질의 양이 정량적으로 결정된다.

가스 크로마토그래피에서 일반적으로 쓰이는 검출기에는 열전도도(thermal conductivity) 검출기, 아르곤 이온화(argon ionization) 검출기, 불꽃 이온화(flame ionization) 검출기 등 세 종류가 있다.

열전도도 검출기의 작용은 철사의 전기적 저항은 온도에 의존한다는 사실에 기초한다. 만약 기체가 일정한 속도로 뜨거운 철사를 지난다면, 철사는 기체의 열전도도나 흐름 속도에 의해 결정되는 온도로 냉각될 것이다. 그러므로 일정한 흐름과 온도에서 각각의 기체의 성질에 의해 저항이 변한다. 만약 기체 조성의 변화가 있을 때, 기체의 열전도도가 변하게 될 것이고 이것은 저항의 변화로 이어져 검출기에 의해 감지된다. 운반 기체로 아르곤을 사용하는 아르곤 이온화 검출기의 경우 양전하의 아르곤 이온이 Geiger-Muller tube에서 일정한 흐름으로 연속적으로 이온화 된다. 만약 시료 중에 아르곤 보다 이온화 되는 정도가 약한 것이 존재 할때, 이것은 아르곤 원자와 충돌하고 전자를 전달한다. 그 구성 물질은 그때 양전하를 띄게 된다. 그리고, 이것이 음극(cathode)에 접근 했을 때, 전자를 전달 받아 중성화 된다. 이러한 흐름은 시간대 별로 측정되어 그래프로 나타내어지며, 열 감지기에 의해 감지된다. 불꽃 이온화 검출기는 컬럼 용리액이 존재하는 상태에서 수소기체가 공기와 함께 연소된다. 이때 시료내에 존재하는 어떤 탄소도 연소되면 이산화탄소로 변한다. 이유는 명확하지 않지만 이 때 전자나 음이온이 생산되고 이것이 흐름으로써 감지된다. 이것은 다시 전압 차이로 변환되어 검출기에 의해 감지된다.

응용 분야에 관련되어 기체 크로마토그래피는 휘발성 물질의 분석에 이용한다. 불휘발성 물질은 산화, 아실화, 알킬화 등으로 휘발성 물질로 변화시킬 수 있다. 이러한 원리는 알콜, 에스테르, 지방산, 아민 등의 생물학적 시료의 분리에 사용된다. 그래서 기체 크로마토그래피는 물질 대사 중간 산물 연구에 유용하고 효소 반응 기구 연구에도 쓰일 수 있다. 또한 생물학적 물질에서 조미료나 포도주에서 농약을 분리할 수 있을 뿐만 아니라 유기물질 분석에도 사용할 수 있다.

복잡한 혼합물에서는 많은 성분을 정확히 확인하기가 쉽지 않을 수도 있다. 이 경우에는 컬럼 유출 기체를 드라이 아이스-아세톤 증탕에서 냉각하여 용기에 분획, 포집하면 질량 스펙트럼으로 성분을 확인하기 쉽게 된다. 이처럼 컬럼유출 기체를 자동적으로 질량분석기에 도입하여 질량에 따라 확실하게 성분을 확인할 수 있게 된다. 이 중요한 분석법을 기체 크로마토그래피-질량분석기라고 한다. 질량분석기는 매우 예민하고 선택적인 검출기이며 세관 컬럼을 사용했을 때는 복잡한 미량 물질의 혼합물을 확인하고 정량할 수 있다. 예컨대 하구 중의 수백종의 화합

물, 오줌이나 혈액 중의 미량인 약물들이 정량된다.

## (2) 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography)

기체 크로마토그래피는 속도와 감도가 우수하므로 앞서 언급한 바와 같이 액체 크로마토그래피보다 널리 이용된다. 그러나 알고 있는 화합물의 85 %는 기체 크로마토그래피로 분리하기에는 휘발성이나 안정성이 불충분하므로, 액체 크로마토그래피가 널리 이용되는 잠재적인 가능성이 있다. 액체 크로마토그래피는 처음에 비교적 큰 지름의 컬럼을 써서 중력 또는 저압 펌프를 이용하여 작은 유속에서 사용되었다. 분리시간은 흔히 수 시간이 걸리고 모아진 많은 부분을 개별로 분석하지 않으면 안 되었다. 그래서 이러한 단점을 보완하다보니 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 장치와 기술의 발전을 가져왔다. HPLC는 매우 작은 지름의 효율적인 입자로 채워진 컬럼을 사용하고 이동상은 높은 압력으로 흘러주는 장치를 사용한다. 그래서 HPLC를 사용하면 분리와 정량을 분 단위로 할 수 있다.

작고 균일한 입자로 채워진 컬럼은 크고 거친 입자로 채워진 컬럼보다 이동상의 흐름을 억제하는 정도가 심하다. 그러므로 적당한 흐름속도를 얻기 위해서는 컬럼을 통하여 액체에 높은 압력을 가해주어야 한다. 흐름속도가 약 0.5 - 5 ml/min가 되게 하려면 약 7 - 35 MPa (70 - 35 atm)의 압력이 필요하다. 그러므로 컬럼과 관련된 연결부들이 압력에 견딜수 있도록 강한 재료를 써야 하는데 보통 스테인레스강을 사용한다. 용매는 반드시 고순도이어야 하며 먼지와 기타 입자성 물질을 제거할 수 있는 여과기(filter)를 통해 용매를 걸러야 한다.

용매는 분리용 컬럼과 같은 충전물로 채운 전치 컬럼(precolumn)을 통과하도록 하는 것이 좋다. 비가역적으로 흡착된 용매의 불순물은 전치 컬럼에서 걸러지고, 따라서 분리용 컬럼의 수명을 길게 해 준다. 시료도 역시 주입하기 전에 걸러야 하는데, 그렇지 않으면 장치가 막힐 수가 있다.

한 가지 용매로 용리시키는 것을 등용매 용리(isocratic elution)라고 한다. 기체 크로마토그래피에서 온도 변화를 프로그램하는 것이 필요하듯이, 액체 크로마토그래피에서는 간혹 용리액 세기를 프로그램화하여 증가시키는 조작이 필요하다. 자동 기율기 프로그래머는 용리액 세기가 연속적으로 증가되도록 두 개 혹은 그 이상의 용매 저장기에서 용매들을 펌프로 올릴 수 있다. 이와 같은 방법에 의하여, 강하게 머무르는 용질들을 적당한 시간내에 컬럼으로부터 용리시킬 수 있다.

컬럼을 통해나온 용출액은 흡광도 모니터 속으로 흘러들어가고, 흡광도가 기록계에 나타난다. 또 다른 범용 검출기는 용출액의 굴절률을 추적한다. 어떤 시료들에 대해서는 폴라로그래피 검출기가 흡광도나 굴절률 모니터보다 더 예민하다. 용출액은 특별히 고안된 폴라로그래피 셀에 있는 수은 방울로 향하게 된다. 이 검출기는 나노그램(ng) 수준의 많은 유기 작용기와 금속 이온에 대해서 응답한다.

전반적으로 고해상도 GC에 비해 HPLC는 장치비가 적게 드는 편이다. GC에서 사용되는 운반 기체(carrier gas)의 높은 순도보다 HPLC에서 요구되는 여과장치와 고순도 용매가 적은 비용이 들기 때문이다. 하지만 고려해야 할 조건이 다양해서 GC에 비해 최적조건을 찾는 데 더 많은 시간이 요구되며 특정 성분의 분석에 있어 여전히 GC의 사용이 더 안정적일 수도 있다.

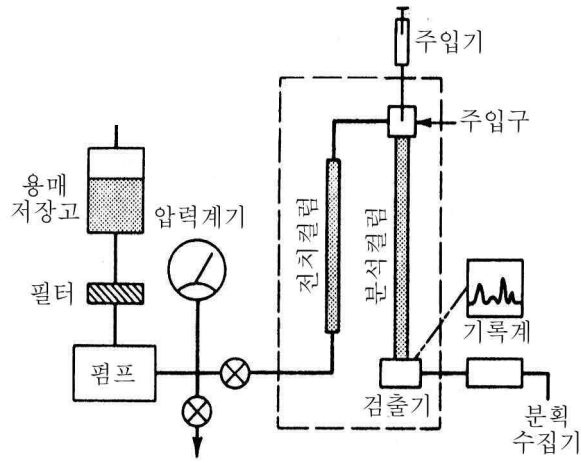


그림 10-18. 고성능 액체 크로마토그래피의 모식도

### (3) 초임계 유체 크로마토그래피 (supercritical fluid chromatography)

초임계 유체 크로마토그래피(supercritical fluid chromatography, SFC)는 가스와 액체 크로마토그래피의 중간단계 기술이라 볼 수 있다. 그래서 SFC가 GC나 HPLC의 상대적으로 우수한 특성들을 동시에 가질 수 있다. SFC에서 이동상은 초임계 유체이며 SFC는 GC나 HPLC에서 쓰이는 주요장치들을 가지고 있다. SFC에서 쓰이는 검출기는 GC나 HPLC에서 사용되는 것들을 변형시켜 사용하는데 광범위하게 사용되는 것이 UV 검출기와 불꽃 이온화 검출기이다. SFC는 비용면에 있어 HPLC에 비해 상당히 고가이다. 하지만 GC보다 용해도가 높고 HPLC보다 높은 해상력을 보인다. 또한 GC에서는 낮은 증기압 때문에 또 HPLC에서는 시료의 불용성 때문에 분석이 가능치 못한 고분자 물질의 분석도 가능하다. 하지만 이런 장점에도 SFC는 GC나 HPLC의 기술들을 중합시켜야 하기 때문에 운영상의 단순화는 가격문제와 더불어 SFC가 풀어야 할 난제이다.