

# 마이크로 고속액체 크로마토그래프 (Micro - HPLC)

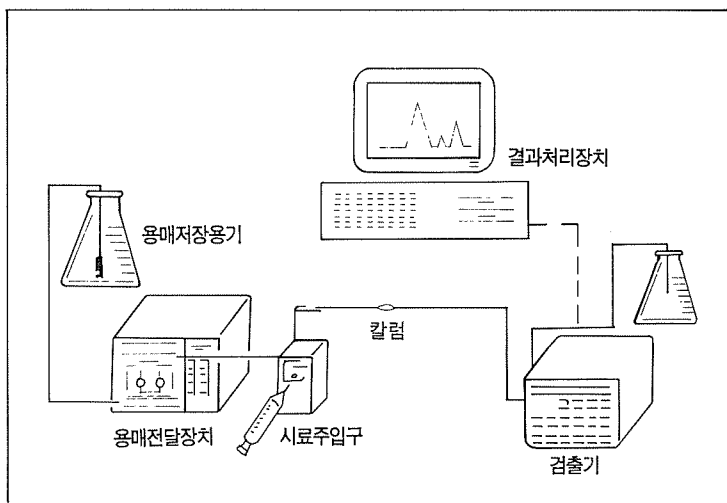
金宅濟

〈경기대교수·화학/분지 운영자문위원〉

마이크로 고속액체 크로마토그래프 (Micro-HPLC)는 작은 충전입자로 충전된 지름이 1mm 이하로 작은 마이크로보어 (microbore) 칼럼을 사용하여 고분리능과 뛰어난 감도로 극미량의 시료물질을 분석할 수 있는 액체 크로마토그래피의 최신기술이다.

마이크로 고속액체 크로마토그래프에 대한 이론적 가능성은 이미 오래전에 입증되었으나 지름이 1mm 이하의 작은 칼럼에 정확하고 정밀하게 미량의 용매를 흘려줄 수 있는 마이크로 펌프의 개발이 중요한 관건이었다. 1958년부터 모세관 칼럼을 기체 크로마토그래피에 사용하여 복잡한 혼합물 시료를 높은 분리능으로 신속하게 분리하면서 그 응용이 확대되었다.

초임계 유체 크로마토그래프 (Supercritical Fluid Chromatography) 및 장 흐름 분획법 (Field Flow Fraction)의 개척자이기도 한 프랭크 제이. 양 (Frank J. Yang) 박사는 지름이 1mm이하인 마이크로보어 칼럼과 모세관 칼럼을 고속액체 크로마토그래프에 응용하여 0.1 $\mu$ l의 용매를



◇ 마이크로 고속액체 크로마토그래프의 기기 구성

정확하게 흘려줄 수 있는 펌프와 0.25 $\mu$ l의 검출 셀을 갖는 검출기로 구성된 마이크로 고속액체 크로마토그래프를 92년 피츠버그학술회의에서 처음으로 소개했다. 마이크로 고속액체 크로마토그래프는 기존의 고속액체 크로마토그래프에 비해 99.9% 이상 용매 소모를 절감시키고 지름이 작고 긴 칼럼을 사용함으로써 고분리능을 제공할 뿐만 아니라 질량분석계 (Mass Spectrometer) 및 기체 크로마토그래피의 불꽃 반응을 이용한 검출기 (Flame Photometric Detector)

와 사용이 수월해져서 다양하게 응용할 수 있다. 마이크로 고속액체 크로마토그래프는 미국의 마이크로텍 사이언티픽 (Micro-Tech Scientific)사에서도 공급하고 있으며 가격은 2만~4만5천달러 정도이다.

## 원리와 기기 구성

마이크로 고속액체 크로마토그래프는 이동상에 용해된 혼합시료를 분리관의 정지상과 이동상에 대한 각 시료 성분의 흡착작용, 분배작용, 이온교환 작용 및 분자체 크기 배제작용 등의

차이에 의해 각 시료성분을 분리하는 방법으로 지름이 1mm 이하의 작은 칼럼을 사용하여 일반 고속액체 크로마토그래프로는 분석이 어려운 미량의 환경시료, 임상시료, 유기합성시료 등의 혼합물을 분리하는데 사용된다.

## 특징

### 1) 마이크로 펌프 (Prodigix-4P Pump)

마이크로텍사의 마이크로 펌프(특허)는 컴퓨터로 조절되는 마이크로 왕복 피스톤 방식으로 캠/벨트/기어 형태를 이용하는 펌프에서는 불가능했던 0.1  $\mu$ /min 단위까지 정확한 유속조절이 가능하다. 압력에 의해 용매가 수축되어 부피 변화가 일어나 정확한 용매 혼합과 전달이 어려웠던 저압 펌프와는 달리 고압 용매 혼합 방식(최대 10,000 psi)이므로 용매의 부피변화가 일어나지 않아 정확한 용매 전달과 기울기 용매 (gradient solvent) 분석의 재현성을 제공한다. 압력초기화 (Prepressurization) 기능은 모세관 칼럼 사용시 신속한 초기 칼럼 압력에 도달시켜 기존 방식보다 2시간 이상 평형시간을 단축시킨다.

또한, 마이크로펌프는 각각 독립적으로 조절할 수 있는 4개의 채널로 구성되어 한 펌프로 일정 용매분석에서 4중 기울기 용매분석이 가능하며 펌프 헤드를 교환

하여 마이크로-고속액체 크로마토그래프, 범용-고속액체 크로마토그래프 및 분취용-고속액체 크로마토그래프로 응용할 수 있다.

### 2) 칼럼


분리능은 지름이 작은 칼럼에 작은 입자 충전물을 사용할수록 증가하며 2  $\mu$ m 입자로 충전된 응용실리카 충전 칼럼에서 측정된 이론단수는 250,000 plate/meter이다. 이는 이론단수가 15,000~30,000인 범용 고속액체 크로마토그래프 칼럼에 비해 무려 7~16 배나 높다. 마이크로텍사에서 지름이 0.32mm 이하의 응용실리카 모세관 충전 칼럼(특허)을 공급한다. 응용실리카 칼럼은 광투과성이 뛰어나 칼럼 끝부분을 UV나 형광검출기의 검출

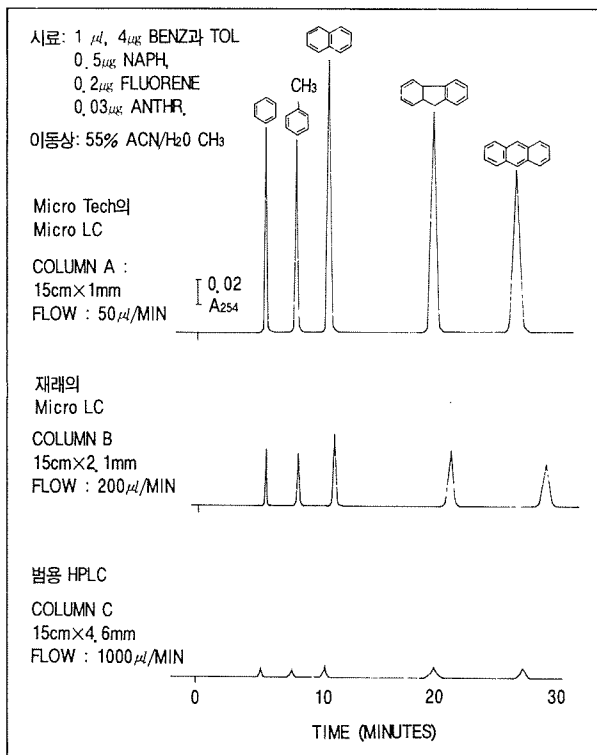
셀로 사용하여 칼럼내 (on-column) 검출이 가능하다.

### 3) 검출기

UV검출기 등과 같이 검출능이 농도에 의존하는 경우 칼럼의 지름을 줄임으로써 칼럼내 용매에 의한 시료성분의 희석을 줄일 수 있어 미량까지 검출할 수 있다. 마이크로 고속액체 크로마토그래프는 수  $\mu$  이하의 검출 셀을 사용하므로 감도가 증가하고 락스 현상이 감소되므로 매우 높은 민감도와 분리능이 요구되는 제약, 생물공학 연구와 시료량이 제한적인 임상, 생물학 실험에 유용하다.

## 응용

마이크로 고속액체 크로마토그래프는 기존의 고속액체 크로마토그래프로 분석할 수 있는 시료는 물론 미량시료의 고감도 분석 뿐만 아니라 이성질체나 유사한 구조의 시료를 고분리능으로 분리한다. 피스톤 형의 마이크로 펌프의 개발로 액체 크로마토그래피/질량분석계 (LC/MS)의 응용이 확대되면서 시료분할기 없이 칼럼을 전기분무 (Electrospray), 고속원자 충격 (Fast Atom Bombardment), 이온분무 (Ion spray)와 같은 질량분석계 장치에 연결함으로써 펩티드 서열확인 (Peptide sequencing) 등 생명과학 연구에 활용될 것으로 기대된다. 



◇Micro-HPLC에서의 검출감도 향상