제 5 항 액체크로마토그래피(HPLC)

1. 원리 및 적용범위

이 시험방법은 기체크로마토그래피에 적용하기 곤란한 비휘발성 물질들을 고정상과 액체 이동상 사이의 물리화학적인 반응성의 차이를 이용해 분리하여 분석하는 방법으로, 공기 중 알데하이드의 정성 및 정량분석에 적용한다.

2. 개요

2.1 액체크로마토그래피의 분류

고성능액체크로마토그래피는 목적성분이 컬럼 내에 주입되었을 때, 고정상과 이동상 사이의 반응성의 차이에 따라 분리가 일어난다.
공기 중에 존재하는 알데하이드의 분석에 이용되는 HPLC법은 비극성의 고정상이 지지체에 화학적으로 결합되어 있는 컬럼을 이용하며, 이동상과 고정상의 두 상에 대한 반응성 및 용해도에 따라 이동 평형이 달라지면서 분리되는 분배 메카니즘을 이용하여 분석하는 방법이다. 일반적으로 비극성의 고정상을 포함한 컬럼을 이용하고, 상대적으로 극성의 성질을 가진 시료전개 용매를 사용하여 혼합물질 중에 목적성분을 분리하는 방법을 역상액체크로마토그래피라 칭한다.

TAESUNG

2.2 HPLC 분석방법의 선택

고성능액체크로마토그래피의 선택은 분자량, 수용성 및 지용성, 이온성 및 비이온성 등 시료의 성질, 요구하고 있는 분리인자의 형태, 시료채취, 실험조건의 결정, 컬럼의 안정성, 컬럼의 유효성, 컬럼 충전, 실험의 용이성 등을 고려하여야 한다.

3. 장치 및 구성

이 장치의 기본구성은 그림 1과 같다.

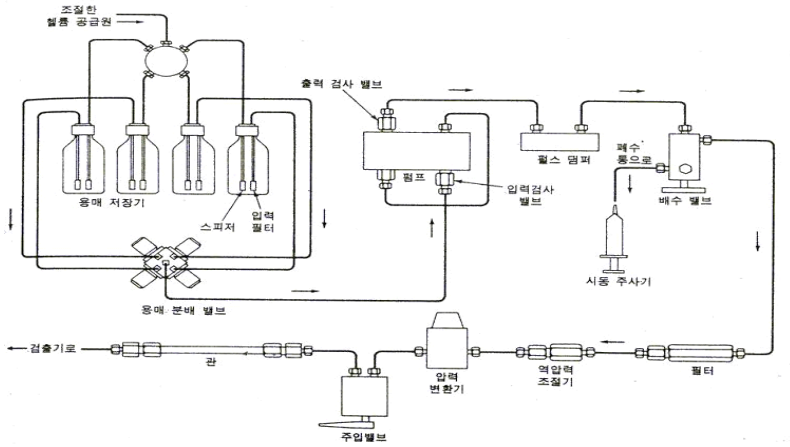

그림 1. HPLC장치의 구성

3.1 HPLC 연결관

HPLC 장치의 연결관으로는 스테인리스강, PTFE, PEEK, 유리 등의 재질이 사용되며, 일반적으로 스테인리스강이 가장 많이 이용되고 있다. 이러한 스테인리스강은 산화제에 강하고, 부식의 진행을 방해한다. 하지만, 산에 의해 손상될 우려가 있으며, 연결관 내부를 오염시킬 수 있다. 따라서 이러한 물질들은 되도록 사용하지 않는 것이 좋으며, 사용해야 할 경우에는 사용 후 반드시 증류수로 세척하여야 한다.

3.2 HPLC 용매 및 용매저장용기

용매를 저장하는 용기는 유리 또는 폴리에틸렌 재질로 만들어져 있는 것을 사용하며, 시료분석에 영향을 주지 않아야 한다.
HPLC 용매는 시료 분석 목적에 방해를 주지 않는 고순도 HPLC용 용매만을 사용하며, 물을 사용할 경우에는 비저항 값이 18㏁ 이상인 것을 사용한다. 또한 두 용매를 혼합하여 사용하고자 할 때 혼화성 지수의 차가 15미만이어야 한다. 두 용매를 섞을 때는 부피비(v/v)로 섞어주고 기포는 제거한다. 분리하고자 하는 시료는 반드시 이동상에 녹아야 하지만 이동상은 고정상을 녹여서는 안된다.
HPLC에서 사용되는 이동상(용매)이 갖추어야 할 조건은 다음과 같다.

3.2.1 시료를 녹일 수 있어야 한다.

3.2.2 시료의 용량인자 k'값이 1~10 범위의 강도를 가져야 한다.

3.2.3 용매는 고순도이어야 한다.

3.2.4 용매의 점도는 낮아야 한다.

3.2.5 용질과의 화학반응 또는 충전제의 존재로 중합반응을 피할 수 있는 낮은 반응성을 가져야 한다.

3.3 탈기장치(Degassor)

이동상으로 사용하는 용매를 준비하는 과정에서 생성되는 기포는 HPLC 분석에 방해요인으로 작용하므로, 이를 제거하기 위해 탈기 장치를 이용한다. 용매 중에 포함되어 있는 기포는 그림 1과 같이 He 등의 불활성 기체를 이용하여 제거하며, 그 밖에 진공펌프를 이용하여 용매를 담고 있는 저장용기를 감압하여 탈기해주는 방법이나, 초음파 세척기를 이용하여 용액 내의 분자운동을 증가시켜 탈기를 해주는 방법도 가능하다.

3.4 펌프

일정한 유속과 압력으로 용매를 밀어주는 장치로서 왕복식 펌프, 주사기형 또는 치환형 펌프, 가압식 펌프가 있으며 HPLC의 펌프로서 일반적으로 쓰이는 것은 왕복식 펌프이다. 펌프가 필요로 하는 기본 조건은 다음과 같다.

3.4.1 펌프 내부는 용매와의 화학적인 상호 반응이 없어야 한다.

3.4.1 최소한 500 psi의 고압이 가능해야 한다.

3.4.3 0.1 ~ 10 mL/분 정도의 유속 조절이 가능해야 한다.

3.4.4 펌프에서 나오는 용매의 공급은 펄스가 없어야 한다.

3.4.5 유속조절 및 유속 재현성이 상대적으로 0.5 % 또는 그 이상으로 유지되어야 한다.

3.4.6 기울기 용리가 가능해야 한다.

3.5 시료주입기

분석하고자 하는 시료를 HPLC 장치에 주입해주는 역할을 하는 장치로서, 시료주입용 밸브를 이용하는 방법이 가장 일반적으로 쓰인다. 이 방법은 시료루프(Sample Loop)를 사용함으로써 HPLC 장치에 정확한 양의 시료를 주입할 수 있다. 이러한, 시료주입기에 사용되는 루프의 용량은 목적성분의 농도에 따라 2.0 μL~5.0 mL 까지 다양하게 사용할 수 있으며, 일반적으로 20 μL 용량의 시료루프가 가장 많이 사용되어 진다.

3.6 컬럼 및 충전제

HPLC용 컬럼은 5,000 psi정도의 높은 압력에 견딜 수 있어야 하고 용리액과 반응성이 없어야 하며 연결이 수월해야 한다. 스테인리스강은 이러한 문제를 쉽게 해결할 수 있기 때문에 가장 많이 이용되고 있다. 일반적으로 많이 쓰이는 컬럼은 길이 10~30 cm 이며, 내경 4.6 mm, 충전제의 크기 5 ㎛, 이론단수 40,000~60,000 plate/m이며, 분석용 컬럼(Analytical Column)과 분석용 컬럼을 보호하기 위한 보조컬럼(Guard Column)이 사용된다. 보조컬럼은 길이가 5~10 cm 정도로 분석 컬럼의 수명을 연장시키고, 입자성 물질과 용매로부터 들어오는 오염물질을 제거하게 된다. 보통 분석용 컬럼과 같은 종류의 충전제를 사용하며, 분석용 컬럼 앞에 설치한다.
액체크로마토그래피에서 시료의 분리와 가장 관련성이 큰 것은 고정상으로 사용되는 충전제이며, 분리 메카니즘에 따라 실리카, 이온교환수지, 폴리머 등 다양한 종류가 사용되고 있다. 일반적으로 HPLC 분석에 가장 많이 사용되는 컬럼은 비극성 물질이 지지체에 결합되어 있는 것을 가장 많이 사용한다.

3.7 검출기

HPLC는 최근 검출기의 종류가 다양해지고 감도가 크게 증가하면서 미량 성분의 분석이 가능하게 되었고, 그 응용 범위도 계속 확대되고 있다.

3.7.1자외선-가시광선검출기(Ultraviolet-Visibledetector)

HPLC 검출기 중 가장 많이 사용되는 검출기로서, 목적성분이 자외선-가시광선 영역의 특정 파장에서 흡수하는 에너지의 양을 측정하는 검출기이다. 이러한 자외선-가시광선 검출기는 광원에서 특정 파장의 빛이 광로를 거쳐 검출기 셀 내의 시료에 투사되면, 특정파장의 빛이 시료에 의해 흡수된다. 검출기에서는 이러한 빛의 흡수량을 전기적인 신호로 나타내어, 신호의 크기로서 시료의 정량분석이 이루어진다.

TAESUNG

표 3. 자외선가시광선 검출기의 특성

구 분	자외선-가시광선검출기
종 류	- 수은 방전관 검출기 - 중수소 방전관의 자외선검출기
특 성	- 감도가 10^{-6}~10^{-10} g으로 크다. - 시료에 따라 선택성이 있다. - 기울기 용리에 적용이 가능하다.
비 고	시료에 포함된 각 성분이 검출기에서 방사되는 파장의 빛을 흡수해야만 가능하다.

4. 조작법

4.1 설치조건

제3항 기체크로마토그래피"의 설치조건에 준 한다

4.2 조작

4.2.1 분석조건의 설정

각 분석방법에 규정된 방법에 의하여 다음 항목을 소정의 값으로 조절한다.

4.2.1 퍼지가스의 유량

4.2.2 이동상의 종류 및 유속

4.2.3 컬럼의 종류

4.2.4 감도

4.2.2 바탕선의 안정도 확인

검출기 및 기록계를 소정의 작동상태로 하여, 바탕선의 안정상태를 확인한다.

4.2.3 검량선의 작성

전체 시스템을 작동시켜 유속을 1~2 mL/분으로 고정시킨 다음 이동상 용매를 흘려보내면서 펌프의 압력 및 검출기의 신호가 일정하게 유지될 때까지 기다린다. 펌프의 압력이 일정하게 유지되고 기록계의 바탕선이 안정화되면 분석하고자 하는 물질을 각각 주입하여 크로마토그램을 작성하고 해당물질의 머무름 시간을 확인한다. 다음에 표준물질을 적어도 세 종류의 각기 다른 농도로 준비한다. 표준물질을 주입하여 크로마토그램을 작성하고 크로마토그램상의 피크면적으로부터 각물질의 농도에 대한 검량선을 작성한다.

4.2.4 시료의 도입

분석하고자 하는 시료를 주입량에 따라 주사기법이나 밸브법을 이용하여 각각의 방법에 적정하게 주입한다.

4.2.5 데이터의 정리

데이터는 다음 사항을 정리 기재한다.

4.2.5.1 날짜

4.2.5.2 장치명

4.2.5.3 시료명 시료주입량(μL 또는 mL)

4.2.5.4 이동상의 종류 및 혼합비

4.2.5.5 컬럼의 종류

4.2.5.6 검출기의 종류 및 조작조건

4.2.5.7 조작자 명

4.2.5.8 기타 필요한 사항

TAESUNG
TAESUNG