

## 4.7 크로마토그래피 1

크로마토그래피(chromatography)란 다공성 흡착제 입자를 일정한 길이만큼 충전시킨 관(column)에 용질이 들어 있는 혼합물을 통과시켜 흡착제 입자에 대한 용질의 흡착 특성 차이에 근거하여 분리하는 방법이다. 즉, 시간이 지나면서 흡착제에 잘 흡착되지 않는 용질은 관의 멀리까지 이동하고 쉽게 흡착되는 용질은 이동하는 속도가 느리다.

크로마토그래피 공정은 이동상(mobile phase)과 고정상(stationary phase)으로 이루어진다. 고정상은 흡착제, 이온교환수지, 다공성 물질, 또는 겔 등이며, 이들은 원통형관(cylindrical column)에 충전되어 있다. 이동상에는 분리하려는 용질이 포함된 용액과 용액을 고정상으로 운반하는 용매가 있다. 시료성분은 고정상과 이동상으로 분배(partition)를 반복하면서 고정상 내를 이동하는데 각 성분마다 그 분배의 비율이 다르고, 고정상 내의 이동속도에 차이가 생겨 각 성분은 분리된다. 이동상의 종류에 따라 가스 크로마토그래피(gas chromatography)와 액체 크로마토그래피로 분류된다. 가스 크로마토그래피는 고감도이고, 빠르고, 간편하며, 열적으로(thermally) 안정된 휘발성 물질에 대한 분리능이 높지만 비휘발성 물질의 분석에는 직접 적용할 수 없기 때문에 알코올이나 저분자 유기산 이외의 생물공정에서 얻어지는 생성물을 분리정제 하는 데는 유용하지 않다. 그러나 액체 크로마토그래피는 적당한 용매에 용해되는 비휘발성 물질의 분석에 적합하다. 크로마토그래피는 다성분 혼합시료의 분리와 분석에 특히 유용하다.

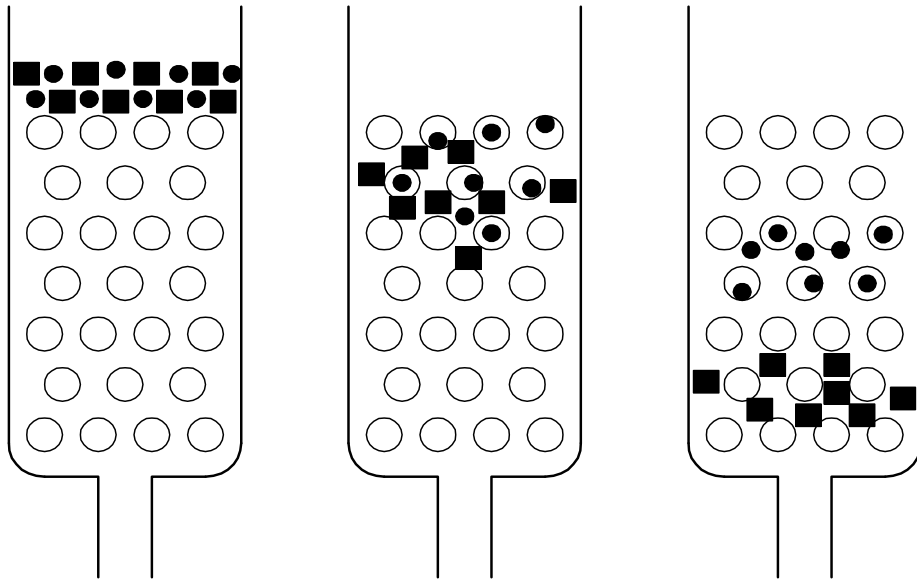
액체크로마토그래피의 몇 가지 형태

- 1) 고압액체 크로마토그래피(high-pressure liquid chromatography, HPLC)는 일반적인 크로마토그래피와 같은 원리에 기초하는 데, 충전관에 가해지는 높은 액체압력만 다르다. 고압의 액체와 조밀한 관

충전 때문에 HPLC는 용질분자에 분리능이 높고 분리가 빠르다.

- 2) 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)는 이온 또는 전기적으로 전하를 띠는 화합물이 정전기적인 힘에 의해 이온교환수지에 흡착되어 평형을 이루는 것에 기초한다.
- 3) 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)는 용질분자와 지지체 위에 결합되어 있는 리간드(ligand) 사이의 특이한 화학적 상호작용에 기초한다. 리간드와 용질 사이의 친화성 결합은 특이적(specific)이다.
- 4) 겔 여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography)는 용질분자의 크기와 모양에 따른 체류시간의 차이를 이용한다. 즉, 충전입자(packing particles) 내의 미세한 구멍으로 용질분자가 침투하여 긴 시간 동안 고체와 접촉하는 작은 입자와 구멍에 들어가지 못하여 고체와 짧은 시간만 접촉하는 큰 분자를 분리한다.

이온교환과 친화성 크로마토그래피는 단백질을 다른 생물분자로부터 분리하는 데 가장 널리 사용되는 크로마토그래피법이다. 이외에도 흡착 크로마토그래피(adsorption chromatography), 액-액 분배 크로마토그래피(liquid-liquid partition chromatography), 소수성 상호반응 크로마토그래피(hydrophobic interaction chromatography), 종이 크로마토그래피(paper chromatography), 얇은 막 크로마토그래피(thin layer chromatography) 등이 있다.



기호설명 : ○ = 겔 입자 , ■ = 큰 분자 (겔 입자내를 통과할 수 없음),  
● = 작은 분자 (겔 입자내를 통과할 수 있음)

그림 10 겔 크로마토그래피의 개념도

### 겔 크로마토그래피

겔 크로마토그래피(gel chromatography)는 겔 여과(gel filtration) 또는 겔 침투(gel permeation) 크로마토그래피라고도 한다. 겔 크로마토그래피는 정지상에 분자체(molecular sieve)를 사용하는데 이들은 세파덱스(Sephadex), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 또는 아가로오스(agarose) 겔로서 친수성(hydrophillic)이므로 물을 흡수할 수 있고 팽윤된다(그림 10).

시료분자의 크기가 팽윤된 겔의 최대 구멍(pore)보다 크면 그 분자는 겔 입자를 통과하지 못하므로 정지상 입자 사이의 공간을 통하여 비교적 빨리 관 밖으로 나온다. 구멍보다 작은 분자는 그 크기와 모양에 따라 겔 입자내의 미세한 구멍 속을 각기 다른 속도로 통과한다. 그러므로 가장 큰 분자가 먼저 관 밖으로 나오고 가장 작은 분자가 마지막에 나타난다.

겔 크로마토그래피에서 겔 베드(gel bed)의 총부피는 다음과 같은 식으로 표시된다.

$$V_t = V_0 + V_x \quad (43)$$

여기서,  $V_t$ ,  $V_0$ ,  $V_x$ 는 각각 겔 베드의 총부피, 보이드 부피(void volume)와 겔 분자 자체의 부피이다. 보이드 부피  $V_0$ 는 관에서 겔 분자 자체가 차지한 공간을 제외한 나머지 공간으로 일반적으로 겔 베드 총부피  $V_t$ 의 약 35%를 차지한다. 이 부피  $V_0$ 는 대개 분자량  $2 \times 10^6$  달톤의 blue dextran으로 측정한다.

여기서 시료 분자가 관을 통과하여 밖으로 나올 때까지 사용된 용리액(eluent)의 양을 말하는 용리부피(elution volume,  $V_e$ )를 도입하면 시료 분자가 관내에서 체류하는 정도는 다음 식으로 표현된다.

$$REV = \frac{V_e}{V_0} \quad (44)$$

$$R = \frac{1}{REV} = \frac{V_0}{V_e} \quad (45)$$

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_x} \quad (46)$$

여기서,  $REV$ 는 상대적인 용리부피(relative elution volume),  $R$ 은 체류상수(retention constant),  $K_{av} = K_d$ 는 분배계수(partition constant)를 의미한다. 이미 분자량을 알고 있는 여러 물질에 대하여  $K_{av}$ 와 분자량의 관계를 도시해 놓은 그래프를 이용하여 미지의 물질에 대해  $K_{av}$ 를 측정하며 분자량을 알아낼 수 있다.

겔 크로마토그래피는 단백질, 펩티드, 핵산, 호르몬, 다당류들의 분리에 이용된다. 또한 겔 크로마토그래피는 고농도의 염으로 염석되어 분리된 단백질 분획으로부터 염을 제거하는 데 유용하다. 세파텍스 G-25와 같은 배제한계(exclusion limit)가 작은 겔을 사용하면, 단백질은 크로마토그래피 관을 통과하는 데 비하여 염은 겔에 들어 있다. 배제한계란 겔에 침투될 수 있는 용질의 최대 분자량이다. 이 값은 겔마다 다르며 1,000~수백

만 달톤 사이이다. 겔은 사용 전에 수 시간 내지 수일 간 사용하고자 하는 용매 중에서 평형상태에 도달시켜야 한다.