

GPC/SEC eBook 시리즈

GPC/SEC 응용 자료

폴리머, 바이오폴리머, 단백질 분석
시 알아야 할 사항



Agilent
InfinityLab

 **Agilent**
Trusted Answers

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의
정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한
단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

내용

eBook 시리즈 소개	3
GPC/SEC 응용 자료 소개	4
1.1. 제품 등록과 REACH	5
1.2. 정량화, 그리고 몰 질량 평균 이상의 정보 확보	11
1.3. 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석	16
1.4. 다양한 표준물질을 이용한 검량	23
1.5. 몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술	29
1.6. 분지 분석	33
1.7. 멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC	39
용어	43

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC *팁과 요령*에 관한 글은 지난 10년 동안 LC/GC 디지털 매거진인 *The Column*에 60여 차례 게재되었습니다. 이 *팁과 요령*은 GPC/SEC 사용자의 일상적 작업을 지원하도록 고안되었으며 이 강력한 기술의 다양한 측면에 대한 포괄적인 개요를 다루고 있습니다.

게재된 주제를 모두 한 눈에 볼 수 있도록 본 eBook 시리즈를 만들었습니다.

이 eBook에서는 다루는 주제는 다음과 같습니다.

- GPC/SEC 이론과 배경
- GPC/SEC 컬럼
- GPC/SEC 검출
- GPC/SEC 문제 해결
- GPC/SEC 응용

각 eBook에는 최신 정보, 신규 사례, 그림으로 꾸며진 *팁과 요령* 발행물이 5~8가지 포함되어 있습니다.

GPC/SEC 신규 사용자들이 지속적으로 읽을 수 있도록 내용을 편집했으므로 원본 발행물의 내용과 약간의 차이가 있습니다.

하지만 본래의 핵심 내용은 그대로 유지했습니다. 따라서 이 발행물들은 사용자가 관심 있는 주제만 읽을 수 있는 독립적인 참조 자료로 활용됩니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의
정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한
단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

GPC/SEC 응용 소개

GPC/SEC는 전형적인 폴리머 재료, 건축 자재, 전자 화학, 의약품 부형제, 영양 (하이드로)콜로이드, 바이오 치료제 등을 다루는 모든 현대적 실험실에서 확립된 분리 기술입니다.

GPC/SEC의 성공 스토리에는 여러 가지 이유가 있습니다.

- GPC/SEC를 이용하면 크로마토그래피 실험실에서 제품 특성 정보와 사용 시 거동을 바로 예측할 수 있습니다.
- R&D, 제품 개발, 품질 보증 및 (온라인, 오프라인) 생산 제어에 응용할 수 있는 활용도 높은 기술입니다.
- 잘 알려진 성숙한 분리 기술입니다.
- 간단한 시스템/응용부터 거대분자 크로마토그래피 데이터 시스템(MCDS) 환경에서 풍부한 정보를 제공하는 검출기가 결합된 하이픈 기술 시스템까지 계속 구성과 소프트웨어를 확장할 수 있습니다.
- 견실한 파트너가 최적화된 하드웨어, 소프트웨어, 품질 지원 및 전문 서비스 엔지니어를 제공하여 포괄적인 적격성 평가 서비스를 포함한 전체 시스템 수명 주기를 책임지므로 제약, 식품, 화장품 및 관련 산업의 규제 실험실에 적합합니다.

본 GPC/SEC 시리즈 eBook의 각 섹션에서는 다양하고 흥미로운 GPC/SEC 응용 분야에 대해 자세히 설명합니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

1.1. 제품 등록 및 REACH

폴리머/거대분자의 가장 큰 장점은 독성 모노머에서 생성된 경우에도 무독성으로 간주될 수 있다는 것입니다.¹ 폴리머와 거대 분자는 크기가 크고 반응성 작용기가 중합 중에 반응한다는 사실 때문에 일반적으로 (생)화학적 불활성으로 간주됩니다.

그러나 우려되는 것은 최종 제품의 가공성, 안정성 및 품질을 향상시키기 위해 첨가되는 미반응 단량체, 올리고머, 보조제, 첨가제입니다. 이 성분들이 침출되면 심각한 문제를 유발할 수 있습니다.

따라서 등록 기관은 상세한 몰 질량 정보, 그리고 일부 제품의 경우 추출물 및 침출물 연구와 함께 포괄적인 특성 분석을 요구합니다.

폴리머 제품의 몰 질량은 전통적으로 GPC/SEC를 사용하여 측정되며 몰 질량이 신제품에 적용되는 등록 범주에 영향을 미칠 수 있으므로 측정 결과가 매우 중요합니다.

예를 들어, 몰 질량에 따라 신제품이 “PLC(Polymer of Low Concern)” 범주에 속할지 여부, 또는 제품이 등록 대상인지 여부(예: EU REACH)가 결정됩니다.

따라서 규제 지침을 만족하는 상세하고 적절한 몰 질량 데이터의 획득은 성공적인 등록을 위한 핵심 요소입니다.

REACH

REACH(registration, evaluation, authorization, and restriction of chemicals)는 2007년 6월 1일에 발효된 EU 규정입니다. 그 규정은 화학물질의 생산과 이것이 인간의 건강과 환경에 미치는 영향이 그 대상입니다. 유럽의 경우 폴리머는 모두 REACH에 따른 등록 및 평가에서 면제됩니다.

폴리머는 세 가지 기준을 사용하여 정의됩니다.

- 분자는 일정 분자량 범위에 걸쳐 분포되어야 합니다.
- 세 개 이상 단량체 단위를 포함하는 분자의 중량 백분율은 50%를 넘어야 합니다(3M + 1 규칙).
- 분자량이 같은 분자의 중량 백분율은 50%를 넘지 않아야 합니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

전 세계적으로 REACH와 유사한 여러 규정에서 이 정의를 채택했습니다. 다만 결과에 대한 규제 요건은 다를 수도 있습니다. 예를 들어, 폴리머는 China-REACH에서 면제되지 않습니다.

물질이 폴리머의 정의에 속하는지 판단할 때 많이 사용하는 방법은 경제협력개발기구(OECD) TG 118을 기초로 작성된 GPC/SEC입니다.²

제품의 몰 질량이 충분히 낮은 경우 GPC/SEC 분리는 그림 1의 크로마토그램에 표시된 것처럼 올리고머 프로파일을 나타내는 경우가 많습니다. 단일 피크의 식별은 데이터를 하나 이상의 알려진 표준물질로 오버레이하면 가능합니다. 그런 다음, 단일 피크의 몰 질량과 중량 백분율을 평가할 수 있습니다. 이 예는 몰 질량 분포가 있는(기준 1 총족) 폴리올과 1~8+ 반복 단위가 있는 체인에 대해 자동으로 식별된 8개의 피크를 보여줍니다. 몰 질량(더 긴 체인, 8+ 반복 단위)이 더 높으면 GPC/SEC의 분리능만으로는 단일 피크로 분리하기에 충분치 않았습니다. 몰 질량이 높을수록 더 넓은 피크가 관찰되는 현상은 GPC/SEC에서 매우 일반적입니다.

표 1은 식별된 8종에 대한 수치 결과와 REACH 폴리머 정의 기준과 비교한 내용을 정리한 것입니다.

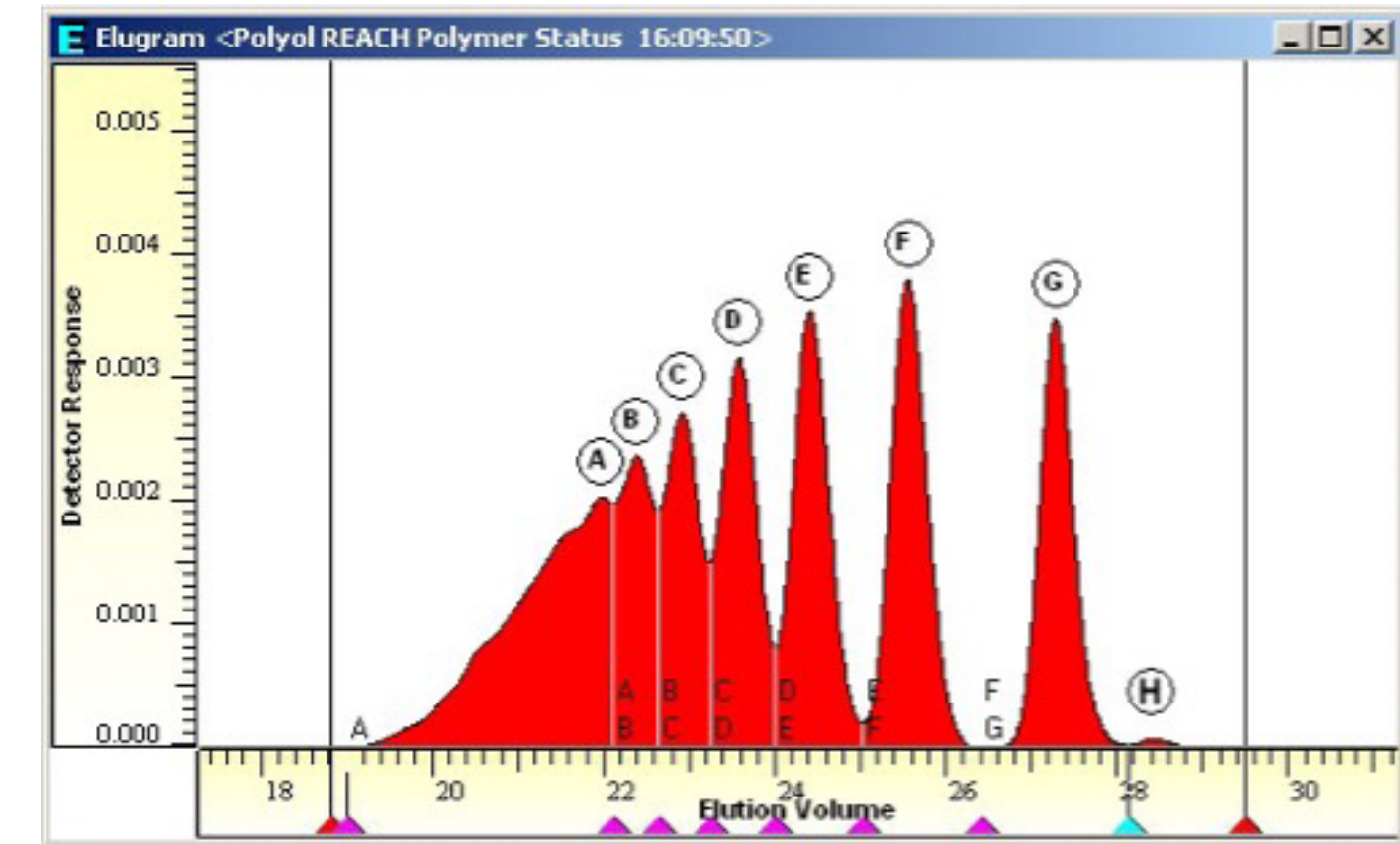


그림 1. 1~8+ 반복 단위가 있고 8개 이상 단일 체인이 자동으로 확인된 폴리올의 크로마토그램.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

폴리올 예시	함량[%]	몰 질량 M_p [Da]*	코멘트	폴리머?
피크 H	0.20	200	R-M,	예, 50% 미만 (3M + 1) 미만
피크 G	13.4	490	R-M-M	
피크 F	15.7	790	R-M-M-M	
피크 E	14.8	1,090		예, > 50% 개별 체인 없음
피크 D	13.3	1,400		
피크 C	11.0	1,810		예, 몰 질량 분포
피크 B	9.30	2,190		
피크 A	22.3	2,550		

표 1. 그림 1의 피크에 대한 몰 질량 및 중량 백분율 결과는 이 제품이 REACH 기준에 따른 폴리머임을 보여줍니다.

* 폴리스티렌 등가물

REACH 기준을 GPC/SEC 결과와 비교했을 때 세 가지 REACH 기준이 모두 충족되었음이 확인되었습니다. 결과적으로, 이 물질은 REACH의 정의에 따른 폴리머입니다.

위험성이 낮은 폴리머(PLC)

제품 등록을 위해서는 M_w (중량 평균 분자량)과 500, 1,000Da와 같이 지정 몰 질량에 미달하는 질량 분율이 필요합니다.

이 조건은 제품을 위험성이 낮은 폴리머(PLC)로 분류하는 데 필요합니다. 국가마다 PLC에 대한 정의와 필요한 조치가 다를 수도 있지만, 그럼에도 GPC/SEC는 필요한 정보를 제공할 수 있습니다.

GPC/SEC 결과에는 잘 분리된 각 피크의 면적 백분율 값 외에도 몰 질량 분포가 포함되어 있어 M_w 를 결정하고 특정 분율을 추론할 수 있습니다. 몰 질량 분포는 검량선이 있을

경우(더 정확하게는 각 용리 부피에 대한 몰 질량 정보가 있는 경우) 크로마토그램에서 얻습니다.³ GPC/SEC 분석에 특수 변환이 필요하기 때문에 용리 부피만 몰 질량으로 대체되는 크로마토그램이 아니라 실제 몰 질량 분포에서 등록에 필요한 결과를 얻는 것이 중요합니다.⁴

그림 2는 그래픽 몰 질량 분포 및 몰 질량 평균뿐만 아니라 500Da 미만 및 1,000Da 초과 분율을 포함하는, 몰 질량 분포(단일 피크로 분리되지 않음)가 넓은 시료의 예를 나타낸 것입니다. 정의에 따르면, 이 시료는 예컨대 미국과 중국에서는 M_w 가 10,000Da 이상이고, 2% 미만이 500Da 이하이고, 5% 미만이 1,000Da 이하이므로 위험성이 낮은 폴리머입니다. 1,000Da에서 10,000Da 사이 M_w 폴리머의 경우, 500Da 이하의 분율은 10% 미만, 1,000Da 이하의 분율은 25% 미만이어야 합니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

통상적으로 면제되지 않는 폴리머에 대해서도 몇 가지 제외되는 사항이 있습니다. 양이온성 또는 잠재적 양이온성 폴리머, 고분자량 수분 흡수 폴리머 및 분리, 열화 또는 해중합되는 폴리머는 면제 대상이 아닙니다. 반응성 그룹도 문제가 될 수 있습니다. 질량 결과값이 위험성이 낮은 폴리머임을 나타내는데도 폴리머가 규제에서 면제되지 않을 때 그렇습니다.

또한, 제품 등록을 위해 모든 몰 질량 슬라이스(슬라이스 목록이라고도 함)에 대한 질량 분포가 필요할 수도 있습니다. 몰 질량 분포가 확보되면 슬라이스 목록을 쉽게 만들 수 있습니다. 이 슬라이스 목록으로부터 위에서 설명한 필수 파라미터를 직접 결정할 수 있습니다.

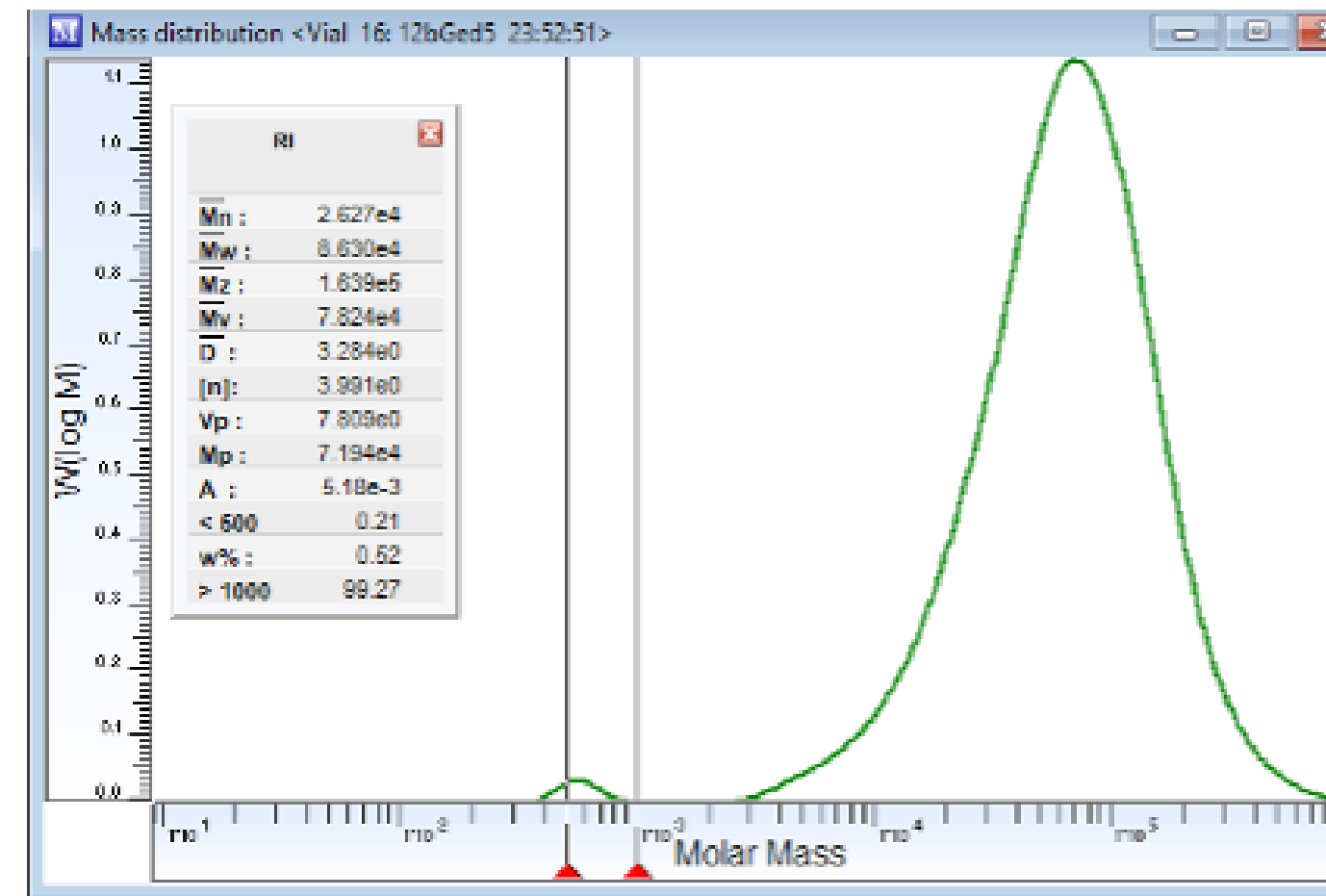


그림 2. 제품이 우려 수준이 낮은 폴리머인지 확인하기 위한 설정과 함께 몰 질량 분포를 보여줍니다.

분석 파라미터의 측정 불확실성 및 영향

제품 등록을 위한 데이터를 생성하는 분석 과학자는 GPC/SEC 분석에서 최소한 두 가지 중요한 부분을 살펴야 합니다.

첫째, 분석자는 올바른 검량을 선택해야 합니다. 상대적 분석법인 GPC/SEC는 항상 참조물질 또는 몰 질량을 직접 측정할 수 있는 추가 검출기를 사용하여 검량해야 합니다.⁵ 낮은 몰 질량 부분이 가장 우려되는 등록의 경우, 질량 분석법(예: ESI-MS 또는 MALDI)은 화학적으로 일치하는 참조물질을 사용할 수 없는 제품에 귀중한 가치를 발휘할 수 있습니다.⁶ 화학적으로 일치하는 참조물질을 사용할 수 있는 경우, 더 일반적인 물질이 있더라도 이 참조물질을 사용하는 것이 좋습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

검량과 부분적으로 관련하여 검토할 사항은 측정 불확실성입니다. 원시 데이터의 품질, 분석 조건 및 검량 품질은 결과에 영향을 미치며 측정 불확실성은 무작위 오류의 원인을 식별하여 데이터 품질을 개선하는 데 도움이 될 수 있습니다.

그림 3은 1,000Da 미만의 분율이 5%보다 약간 높은 몰 질량 분포의 예입니다. 여기서 결과는 PLC 분류의 경계에 가깝기 때문에 데이터 검토가 특히 중요합니다. 더 상세한 분석 결과, 검량 품질(여기서는 낮은 몰 질량 영역의 데이터 포인트가 충분하지 않음)과 원시 데이터의 품질(여기서는 검출기 노이즈)이 모두 불확실성의 주요 원인이며 데이터에 대한 신뢰도를 높이기 위해 개선이 필요함을 보여주었습니다. 특히 이처럼 중대한 사례에서는 회사가 올바른 의사 결정을 내리고 신뢰할 수 있고 정확하며 정밀한 데이터를 생성할 수 있도록 잘 개발되고 문서화된 견실한 분석법과 추가 분석법 및 데이터의 뒷받침이 중요합니다.

요약

- 제품의 몰 질량에 따라 적용할 등록 범주가 결정됩니다. 따라서 GPC/SEC 데이터는 제품 등록에 매우 중요합니다.
- 몰 질량 평균으로는 충분하지 않은 경우가 많습니다. 특히 낮은 몰 질량 영역에서 상세한 분석이 필요합니다.

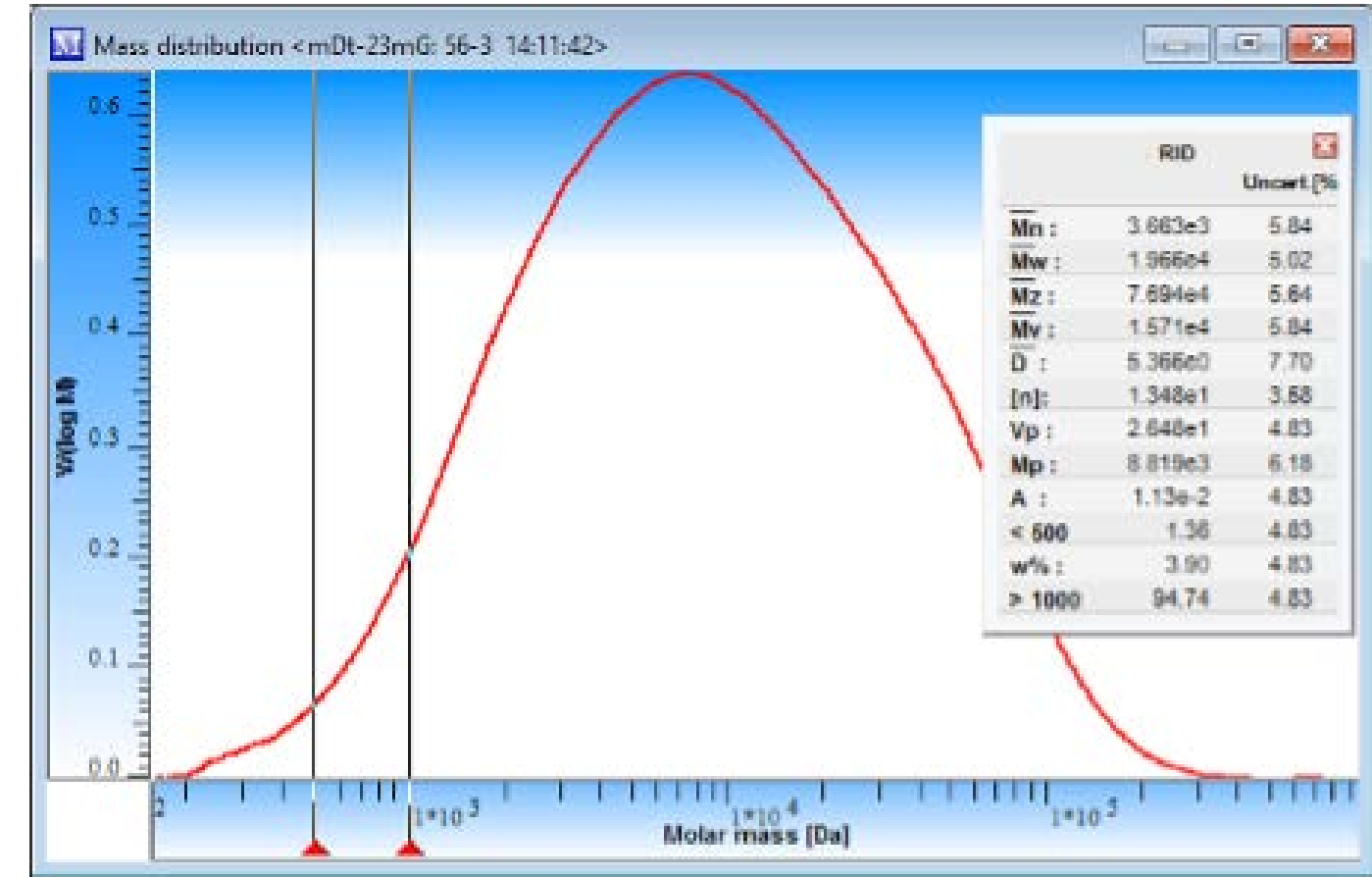


그림 3. 위험성이 낮은 폴리머에 대한 몰 질량 요구 사항을 충족하지 않는 폴리머 제품에 대해 결정된 몰 질량 분포(분율 < 1,000Da가 5% 이상).

- 등록 데이터는 y축 w(log M)가 올바르게 변환된 실제 몰 질량 분포에서만 얻을 수 있습니다. 그렇지 않으면 분율 결과가 잘못될 수 있습니다.
- 결과 불확실성의 결정은 제출된 결과의 분석 품질이 우수함을 보장하는 데 중요할 수도 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의
정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한
단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

참고문헌

1. https://echa.europa.eu/documents/10162/2324906/polymers_en.pdf/9a74545f-05be-4e10-8555-4d7cf051bbbed
2. Test No.118: Determination of the Number-Average Molecular Weight and the Molecular Weight Distribution of Polymers Using Gel Permeation Chromatography. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 1, Physical-Chemical Properties, **1996**.
3. Kilz, P.; Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC From a Chromatogram to the Molar Mass Distribution. *The Column* **2014**, 10 (22).
4. Kilz, P.; Held, D. Qualification of GPC/GFC/SEC Data and Results, in: *Quantification in LC and GC*. Wiley, **2009**.
5. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**.
6. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC: Absolute or True Molar Masses for Macromolecules - Mass Spectrometry as a New Solution. *The Column* **2011**, 7 (6).
7. Kilz, P.; Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Result Uncertainty - How Reliable Are Results? *The Column* **2012**, 8 (10), 14-20

팁과 요령: GPC/SEC 제품 등록 및 REACH는 저자 Daniela Held가 2017년 6월 *The Column*에 처음 게재했습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

1.2. 정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

GPC/SEC는 용액 내 크기에 따라 분자를 분리하는 액체 크로마토그래피(LC) 분류 기술입니다. 분취는 분리 컬럼에 채워진 입자의 공극에서 일어납니다. 크기가 큰 분자는 공극에 들어갈 수 없으므로 먼저 용리되고 크기가 작은 분자는 공극을 드나들기 때문에 나중에 용리됩니다.

전형적인 GPC/SEC 검량선(그림 1 비교)이 이 거동을 잘 보여주고 있으며 이것은 세 영역을 구별할 때 유용합니다. 그림에는 용리 부피에 대한 몰 질량의 로그가 표시되어 있습니다.

주입 한계와 배제 한계 사이의 영역 I에서는 아무 것도 용리될 수 없습니다. 분자(크기와 관계없이)가 너무 커서 어떤 공극에도 들어갈 수 없기 때문에 동일한 부피로 용리되는 배제 한계 이후에는 효율적인 크기 분리가 가능합니다. 즉, 영역 II가 시작되는 것입니다. 분자는 이제 작은 공극에서 배제되는 동안 일부 더 큰 공극으로 들어갈 수 있습니다. 여기에서 몰 질량 분포를 정확하게 결정할 수 있습니다. 영역 II는 총 침투 한계에서 끝납니다. 이 한계에서 용액의 분자는 충분히 작아서 모든 공극을 통과할 수 있습니다. 여기가 낮은 몰 질량 분율 또는 첨가제에 대해 더 자세히 알 수 있는 영역 III이 여기서 시작됩니다.

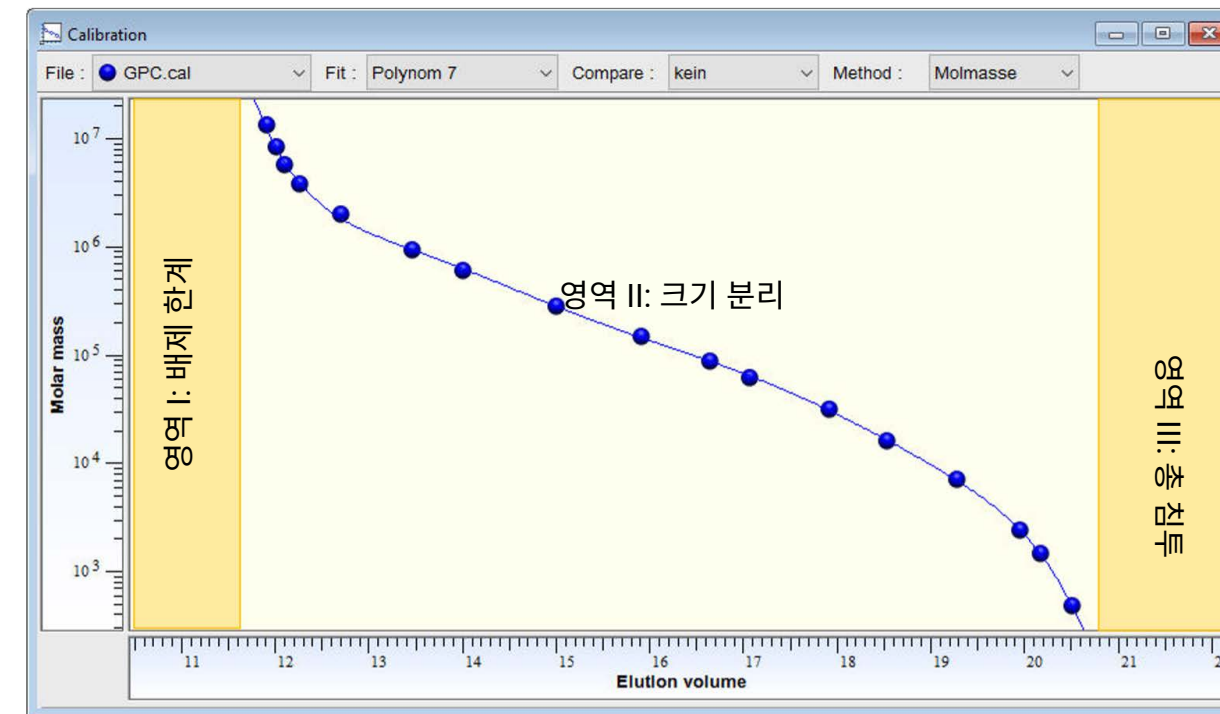


그림 1. 3개의 개별 영역이 있는 GPC/SEC 검량선.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

이론적으로, 분리의 유일한 원동력이 상호작용 없는 크기 배제인 경우 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT) 또는 아세톤에서 톨루엔과 같은 분자를 분리하는 것이 불가능해야 합니다. 그러나 분리가 관찰되는 경우가 꽤 빈번합니다.

그림 2는 중간 몰 질량 분리 범위의 컬럼을 사용하여 얻은 BHT, 톨루엔 및 아세톤의 크로마토그램 오버레이를 나타낸 것입니다. 분자의 크기 차이만으로는 설명할 수 없는 (베이스라인) 분리가 존재합니다. 따라서 분리는 분석물과 고정상 사이의 엔탈피 상호작용으로 인해 발생해야 하며 이는 혼합 모드 메커니즘이 작동함을 나타냅니다. 이것은 분자 크기와 고정상과 분자의 상호작용이 모두 용리 거동에 기여한다는 것을 의미합니다.

GPC/SEC로 폴리머의 몰 질량을 결정할 때 상호작용을 꼭 피해야 하지만, 이 혼합 분리는 낮은 몰 물질의 식별과 정량화를 가능하게 하므로 유익할 수도 있습니다.

식별

그림 3은 넓은 폴리머 피크와 낮은 몰 질량 범위(높은 용리 부피)에서 총 침투 한계에 가까운 다양한 피크가 용리되는 QC 시료의 크로마토그램을 나타낸 것입니다. 첫 번째 단계는 시료 피크와 일반적인 시스템 피크를 구별하는 것입니다. 이것은 바탕 시료 측정을 통해 달성할 수 있습니다. 바탕 용액은 시료와 동일한 방식으로 처리된 순수한 이동상(이동상 병에서 채취하는 것이 이상적)입니다.

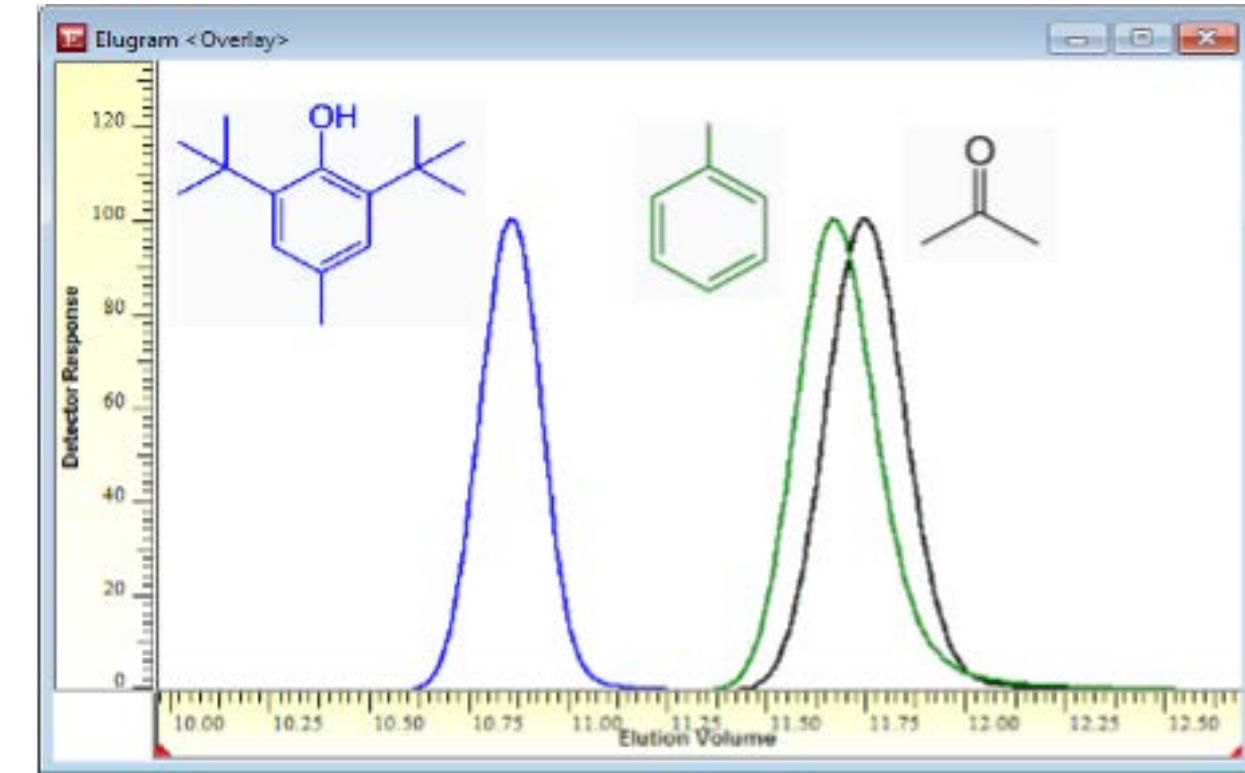


그림 2. BHT(파란색), 톨루엔(녹색) 및 아세톤(검정색) 오버레이. 분자가 모든 공극에 들어맞지만 분리(상호작용에 의한 잔류)가 관찰됩니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

바탕 용액과 시료 주입의 오버레이는 어떤 피크가 시스템 피크인지 직접적으로 보여줍니다. 그림 3의 예에서 두 개의 피크 F와 G는 시스템 피크로 식별될 수 있습니다.¹ 피크 E도 시료에 속하지 않으며, 이 피크는 추가된 내부 플로우 마커 BHT로 인한 것입니다.² 시료 자체에는 긴 꼬리가 있는 폴리머 부분(피크 A)이 포함되어 있습니다. 테일링 영역에서 세 피크(B, C 및 D)를 추가로 특성화해야 합니다.

피크는 어떻게 식별할 수 있을까요?

여기서 여러 가지 전략을 적용할 수 있습니다.

이미 의심되는 물질이 있고(예: 생산 공정에서 나온 생성물, 잔류 모노머, 용매, 개시제 또는 첨가제가 알려진 경우) 순수한 물질이 있는 경우, 별도의 시료로 준비하여 주입할 수 있습니다. 피크 할당은 크로마토그램을 오버레이하거나 용리 부피를 비교하여 실시할 수 있습니다. 원래 시료에 의심되는 물질을 스파이킹한 다음 각 피크 영역의 증가를 모니터링하는 것도 가능합니다.

그러나 피크 위치에 의존하는 것만으로는 충분하지 않을 수도 있습니다. 고급 검출 기술 또는 분획 분취 후 오프라인 특성화를 통해 검증을 해도 됩니다. 이는 잠재적인 첨가제나 오염물질에 대한 정보가 없을 때도 권장됩니다.

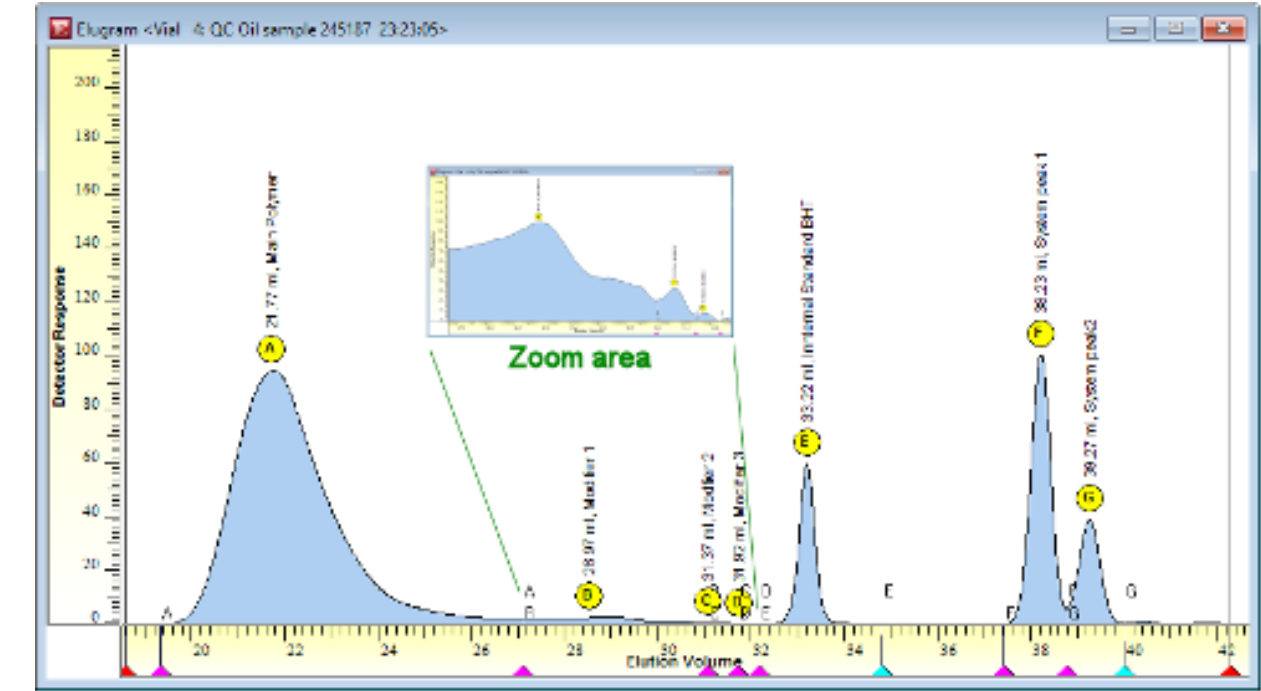


그림 3. 오일 시료의 크로마토그램. 피크 F 및 G는 시스템 피크입니다. 피크 E는 내부 플로우 마커 BHT입니다. 삽입된 그림은 피크 B, C 및 D를 식별하고 정량화해야 하는 낮은 몰 질량 분율을 확대하여 나타낸 것입니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

쉽고 비용 대비 효율이 높은 방식은 추가 UV 검출을 사용하는 것입니다. 종종 GPC/SEC 시스템에는 두 가지 농도 검출기, 즉 더 보편적인 굴절률(RI) 검출기와 특정 UV 검출기(DAD/PDA)가 있습니다. UV 활성 물질의 경우 해당 물질을 특정하여 검출하기 위해 UV 파장을 선택할 수 있습니다. DAD/PDA를 사용할 수 있다면 스펙트럼을 식별에 사용해도 됩니다.

더 복잡한 작업에는 온라인 질량 분석법, NMR 또는 (제한된 수의 용매에 대해) FTIR 검출과 GPC/SEC 기술을 결합해야 합니다.³

실용적인 접근 방식은 분취 및 오프라인 분석입니다.

GPC/SEC는 비파괴적인 기술이므로 분획을 분취한 다음 분광 또는 분광 측정 기술을 오프라인으로 적용하여 분획을 특성화할 수 있습니다. 분취된 분획의 양이 충분하지 않다면 반복 분획을 실시해도 됩니다. 분석용 GPC/SEC 시스템은 분석용 컬럼을 분취용 컬럼으로 교체하여 반분취용 시스템으로 쉽게 업그레이드할 수 있으므로 더 많은 양을 주입할 수 있습니다. 분획 분취기를 추가하여 자동화가 쉽게 가능합니다.

FTIR 연결로 GPC/SEC를 결합시키는 자연스러운 방법은 온라인 분취 모듈을 사용하는 것입니다. 이 FTIR 인터페이스는 시스템의 마지막 장치로 연결됩니다. 가열된 노즐을 통해 컬럼을 빠져나가는 유출물에서 용매가 증발되고 비휘발성 성분이 회전하는 게르마늄 디스크에 증착되어 서로 다른 성분이 특수하게 분리됩니다. 실행이 완료된 후, FTIR 분광계를 사용하여 게르마늄 디스크의 트레이스를 지점별로 분석합니다. MALDI 기기에 대해서도 유사한 접근 방식이 가능합니다.

FTIR 또는 MALDI 결합 구성을 이용한 분획 분취의 두 접근 방식 모두에서 문제가 되는 것은 비휘발성 첨가제입니다. 예를 들어, 적절한 GPC/SEC 분리를 보장하기 위해 때로 염이 필요합니다. 휘발성 염으로 대체해야 합니다.⁴

정량화

그림 4는 높은 몰 질량 피크와 낮은 몰 질량 세 피크에 대한 상세한 예시 결과를 보여줍니다. 여기에서 폴리머 피크의 절대 몰 질량 분포는 광산란 검출과 함께 GPC/SEC를 통해 측정됩니다. 동시에, RI 검출기 신호만을 사용하여 상대적인 피크 면적(조성 결과)을 측정합니다. 따라서 단 한 번 실행으로 시료가 완전히 특성화됩니다.

이 설정에서는 정량화도 가능합니다. HPLC 분석과 마찬가지로 각 피크의 면적 백분율을 쉽게 측정할 수 있습니다. 절대 농도도 결정할 수 있습니다. 피크가 확인되면 순수한 물질을 알려진 농도로 주입하여 각 피크에 대한 RI 검출기 반응 계수를 측정할 수 있습니다.

반응 계수가 알려지면 각 피크의 농도를 측정하는 데 사용할 수 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

이 검출기 검량은 일반적인 GPC/SEC 검량과는 다르다는 점에 유의해야 합니다. 검출기 검량에는 농도를 알고 있는 순수 물질을 주입해야 하는 반면, GPC/SEC 검량에서는 그림 1에 표시된 것과 같은 검량선을 작성하기 위해 몰 질량을 알고 있는 여러 가지 표준물질을 주입해야 합니다.⁵

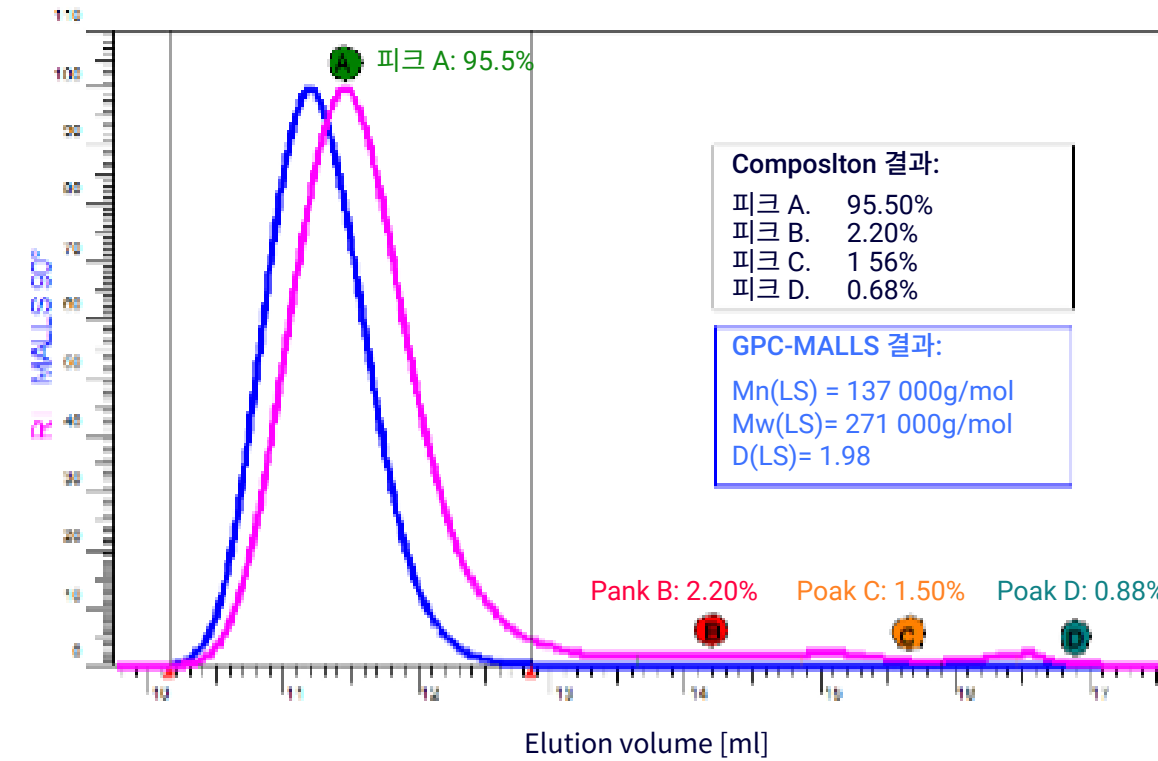


그림 4. 피크 A의 절대 몰 질량(광산란 검출 기능이 있는 GPC/SEC)과 식별된 네 피크의 상대적 양

- GPC/SEC는 비파괴 분취 기술입니다.
- 두 가지 정보, 즉 피크 면적(예: 백분율)과 몰 질량 분포를 동시에 얻을 수 있습니다.
- 오버레이는 생산/처리에서 힌트가 있는 경우 피크를 식별할 때 유용할 수도 있습니다. 특수 검출(예: UV (스펙트럼), FTIR 또는 MS)을 온라인 또는 오프라인으로 적용하여 분취 후 피크를 식별할 수 있습니다.
- 검출기 반응 계수는 일반적인 HPLC 분석과 유사하게 측정할 수 있습니다. 이 계수를 통해 측정된 피크 면적으로 농도를 측정할 수 있습니다.

참고문헌

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Peak Identification in GPC/SEC. *The Column* **2010**, 6 (22).
2. Held, D.; Radke, W. Tips & Tricks: GPC/SEC Flow Marker — An Easy Concept to Increase Reproducibility. *The Column* **2016**, 12 (6), 24–27.
3. Pasch, H.; Kilz, P. Coupled Liquid Chromatographic Techniques in Molecular Characterization, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, **2006**.
4. Held, D. Tips & Tricks: Evaporative Light Scattering Detection in GPC/SEC. *The Column* **2013**, 9, (18).
5. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

1.3. 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

단백질은 합성 거대분자와 여러 바이오폴리머와 달리 대부분 몰 질량 분포를 나타내지 않지만¹ 몰 질량은 균일합니다. 그럼에도 분취 기술은 응집 유무를 식별하거나 모니터링할 수 있다는 점에서 단백질 시료에도 유용합니다.

전통적으로, 크기 배제 크로마토그래피는 단량체 또는 조각에서 안정적인 응집체를 분리하는 데 이용할 수 있으며 광산란 또는 질량 분석법과 같은 고급 검출을 통해 몰 질량과 크기도 측정할 수 있습니다.

몰 질량 분포가 있는 단백질 혼합물(예: 젤라틴)의 경우, GPC/SEC를 통해 완전한 몰 질량 분포를 결정할 수 있으며 각종 품질 및 안전 관련 결과도 볼 수 있습니다.

GPC/SEC 단백질 분석에서 시급한 과제는 분리 컬럼에 사용되는 고정상과 바람직하지 않은 상호작용을 일으키지 않는 강력한 분석법을 개발하는 것입니다.

단백질 분석에서 GPC/SEC의 장점과 한계는 무엇일까요?

GPC/SEC의 큰 장점 하나는 비파괴 분리 기술이라는 것입니다. 시료에 존재하는 거대분자의 크기에 따라 시료를 분취합니다. GPC/SEC는 질량 분석, 광산란 또는 점도 측정과 같은 고급 검출 기술을 적용하기 전에 시료의 복잡성을 줄이는 데 이상적입니다. 복잡성을 줄이면 분취되지 않은 이종 시료를 직접 분석할 때와 비교해 데이터 평가와 해석이 쉬워집니다. 검출기를 둘 이상 이용하는 고급 검출은 종종 온라인 분석법에 자주 사용됩니다. 이 방식이 불가능하다면 GPC/SEC 기술로 오프라인 특성화에 이용할 시료 분획을 분취해도 됩니다.

GPC/SEC에서 단백질은 변성 없이 용액의 기본 조건에서 분석할 수 있으며, 이는 구조 및 단백질-단백질 상호 작용이 그대로 유지된다는 점에서 바람직합니다. 따라서 많은 GPC/SEC 분리에서 거대분자의 생물학적 활동이 보존됩니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

그러나 용액 내 단백질의 크기만을 기반으로 하는 진정한 GPC/SEC 분리 조건은 실현하기 어려울 수도 있습니다. 시료와 고정상 간의 상호작용이 발생하여 예상치 못한 피크 모양, 불안정한 잔류 시간 및/또는 불량한 회수율이 나오기도 합니다. 단백질마다 서로 다른 모양(예: 구형, 막대형 또는 유연한 사슬)을 나타내기 때문에 용액에서의 크기가 몰 질량과 직접적인 상관 관계가 없는 경우가 많아 정확한 몰 질량 측정을 위해서는 고급 검출 분석법이 필요합니다.

따라서 단백질 분석을 위한 완벽한 분석법 개발을 위해서는 다음이 필요합니다.

- 상호작용하지 않는 고정상, 입자 크기 및 다공성이 특징인 올바른 컬럼(또는 컬럼 조합) 선택
- 이동상의 pH 및 이온 강도 조정
- 일련의 시료에 대한 최상의 검출 옵션 선택

또한 시료에 존재하는 모든 성분과 응집체의 크로마토그래피 회수율을 평가하는 것도 필수 요구 사항입니다.

분석법 개발의 함정

단백질은 수용액에서 분석해야 하므로 수용성 GPC/SEC의 하위 범주입니다. 수용성 GPC/SEC 분석에 사용되는 일반적인 분석법 개발 방법은 모두 단백질 분석법 개발에도 적용할 수 있습니다. 따라서 이 섹션에서는 단백질에 특정한 요구 사항만 설명합니다.

합성 폴리머 또는 큰 생체분자와 비교할 때 단백질이 갖는 장점은 일반적으로 단백질의 크기가 작고 시료 내 크기 분포가 상대적으로 좁다는 것입니다. 이러한 이유로 고효율의 작은 입자로 채워진 GPC/SEC 컬럼을 사용할 수 있습니다. 또한 분포가 좁기 때문에 검량선이 매우 얇은 컬럼(좁은 몰 질량 범위에서 높은 분리능)을 사용할 수 있습니다. 이를 위해 대부분의 단백질 응용 분석에 실리카 기반 GPC/SEC 컬럼이 권장됩니다.

크로마토그래피 관점에서 단백질을 분석할 때의 단점은 단백질에 작용기/하전기가 많고 큰 소수성 세그먼트 또는 서열을 가질 수 있다는 것입니다. 이 두 가지 특성으로 인해 컬럼 고정상과 단백질 사이에 정전기 및 소수성 상호작용이 없는(또는 적어도 최소화된) 진정한 GPC/SEC 분석법을 개발하기가 어렵습니다. 상호작용 때문에 어느 정도의 흡착이 발생할 수 있으며, 이로 인해 회수율 감소(또는 피크가 검출되지 않는 완전한 흡착), 용리 시간 이동 또는 피크 모양 왜곡(예: 테일링)이 발생할 수도 있습니다.

상호작용을 피하거나 최소화하려면 pH 값, 이온 강도/염 함량 및 잠재적인 유기 변형제의 양을 조정해야 합니다. 그러나, 추가되는 염 또는 변형제의 농도는 시료의 용해도에도 영향을 미치므로 제한됩니다. 안정적인 GPC/SEC 분석법 개발이 불가능할 경우, 고정상의 변화(실리카 컬럼에서 폴리머 기반 컬럼으로)를 조사해야 합니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

분석법 개발의 출발점은 등전점 pI에서 단백질을 실행하는 것입니다. 단백질의 pI는 단백질을 구성하는 여러 아미노산으로 인한 양전하와 음전하가 균형을 이루는 pH 값입니다. 양전하를 띤 암모늄이나 음전하를 띤 카르복실기는 지배적이지 않습니다. 각각의 단백질에 이상적인 GPC/SEC 분석법은 pH가 pI와 일치하는 수용액으로 실행하는 것입니다.

단백질마다 분석법을 마련해야 하는 번거로움을 피하기 위해 pI에 가까운 이동상 pH를 선택해야 합니다. 그러면 추가 폴리머 전해질, 염화나트륨 또는 염화칼륨과 같은 1가 염이 추가됩니다. 전해질은 잔여 전하를 차단하는 역할을 하여 단백질과 고정상 사이의 바람직하지 않은 상호작용을 더욱 감소시킵니다.

고려해야 할 또 다른 파라미터는 단백질의 소수성입니다. 가장 중요한 것은 단백질 내 여러 R 그룹의 극성입니다. R 그룹을 기준으로 아미노산은 하전성, 친수성 또는 소수성으로 분류할 수

있습니다. 류신, 알라닌, 발린과 같은 많은 아미노산을 포함하는 단백질은 소수성이고 세린, 아르기닌 또는 히스티딘과 같은 아미노산을 포함하는 친수성 또는 하전성 단백질과 동일한 조건에서 분석할 수 없습니다.

그림 1은 서로 다른 소수성을 가진 단백질의 크로마토그램에서 이온 강도의 영향을 비교한 것입니다. 키모트립시노겐 A와 같은 친수성 단백질은 높은 이온 강도에서 측정해야 합니다. 소수성도 친수성도 아닌 단백질인 BSA(Bovin serum albumin)는 높은 이온 강도와 낮은 이온 강도에서 측정할 수 있습니다. 그리고 알라닌 또는 치환 알라닌과 같은 소수성 아미노산은 낮은 이온 강도에서 분석해야 합니다. 단백질의 극성에 따라 이온 강도를 조절하지 않으면 분리가 되지 않습니다.

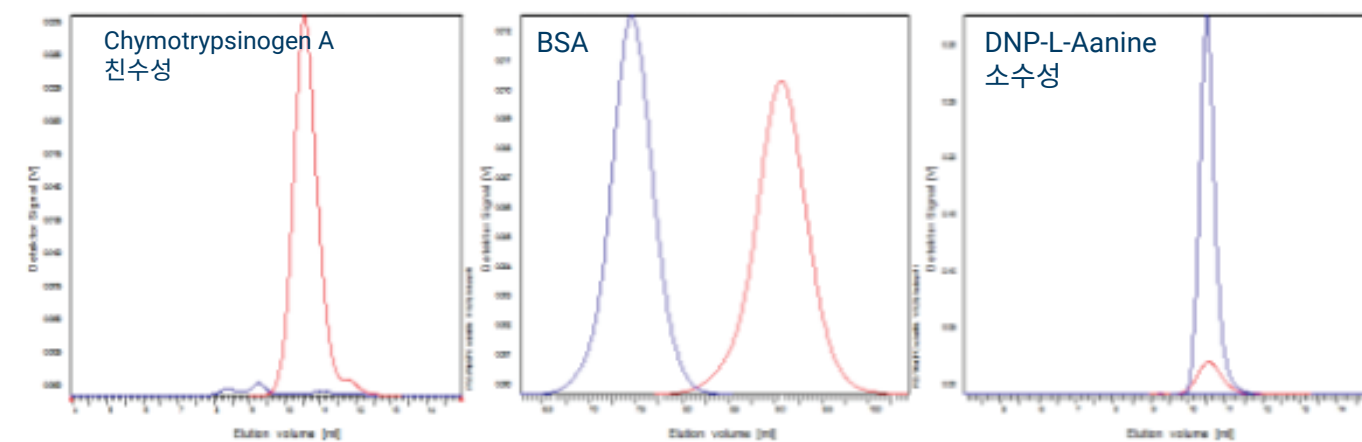


그림 1. 소수성이 서로 다른 여러 단백질/아미노산의 크로마토그램(파란색: 낮은 이온 강도, 빨간색: 높은 이온 강도).

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

예상치 못한 피크 모양(예: 테일링)이 발생할 수도 있으며 이는 스테인리스 강으로 만들어진 습식 구성 요소가 있는 표준 LC 장비와 검출기 셀을 사용한 결과입니다. 금속-단백질 부가물 또는 원하지 않는 단백질 상호작용을 최소화하기 위해 생체 불활성 또는 생체 적합성 크로마토그래피 시스템 및 컬럼 하드웨어의 사용을 고려해야 합니다. 이러한 시스템은 극단적인 pH 값 또는 높은 염 함량과 같은 공격적인 이동상 조건이 필요할 때도 유용합니다. 살균제 또는 정균제를 사용하면 세균 오염을 막을 수 있습니다. 그렇지 않으면 몇 시간 내에 수용성 이동상에서 조류 증식이 발생할 수 있으며 심각한 문제로 이어질 수도 있습니다.

검출 옵션

UV 검출기를 사용하여 단백질을 검출할 수 있습니다. UV 검출기는 사용하기 쉽고, 넓은 범위에 걸쳐 선형적 반응을 보이며, 민감하고 베이스라인이 안정적이기 때문에 매우 편리합니다. 각 UV 파장 범위에는 저마다 장점이 있습니다. 280nm는 표준 파장으로 자주 선택됩니다. 근자외선 또는 더 긴 파장(380~315nm)은 트립토판과 같은 방향족 아미노산을 검출합니다. 아미드 펩타이드 결합이 강한 흡광도를 갖는 220nm와 같은 원적외선 범위(280~200nm) 파장을 선택하면 더 높은 감도를 얻을 수 있습니다.

단백질 농도를 측정하기 위해 서로 다른 두 파장이 동시에 기록되는 구성도 많이 있습니다. 이 듀얼 파장 검출 방식의 조합은 순도 조사 목적으로 제안됩니다. 이 경우, 낮은 파장은 존재비가 낮은 종에 대한 감도가 좋고 높은 파장은 주요 종(예: 단량체)에 대한 선형 범위가 더 높습니다.²

크기 기반 GPC/SEC 분리의 한계를 극복하기 위해 질량 분석법(MS) 또는 광산란(LS) 검출을 사용하여 몰 질량을 직접 측정할 수 있습니다. 두 분석법 모두 완전히 다른 응용 분야에서 사용되는 솔루션이므로 보완적인 기술로 인식해야 합니다. MS는 낮거나 중간 정도의 몰 질량 범위에서 제한된 수의 개별 종에 대한 매우 특이적인 정보를 알아내야 하는 요구 사항이 있을 때 적용할 수 있습니다. MS를 적용할 수 있다면 이것이 몰 질량을 결정하는 가장 정확하고 정밀한 분석법입니다. 그러나 시료 복잡성과 몰 질량이 증가하면 결과적인 질량 스펙트럼의 복잡성으로 인해 데이터를 해석하고 결과를 판정하는 것이 사실상 불가능합니다. 다행스럽게도 이러한 경우 LS를 사용할 수 있습니다. 이 기술은 다분산, 높은 몰 질량 시료를 분석하는 데 적합하기 때문입니다. LS의 또 다른 장점은 낮은 농도에서도 높은 몰 질량에 매우 민감하다는 것입니다. 따라서 LS는 다른 검출기보다 더 높은 감도로 높은 응집체를 검출할 수 있는 경우가 많습니다.

GPC/SEC와 MS 기술을 결합할 때 관건은 필요한 이동상의 조성입니다. GPC/SEC의 이동상에는 종종 고농도의 비휘발성, MS 비호환 염이 포함되어 있어 질량 분석기 오염과 이온 억제의 문제가 발생합니다. 따라서 분석법을 결합하는 접근 방식은 LS를 이용하면 달성하기가 훨씬 더 쉽습니다. 검출은 용액에서 하므로 이동상을 증발시킬 필요가 없고, 단백질이 이온화되고 기화될 때 MS 검출에서 비가역적으로 손실되는 정보를 생성합니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

산란 강도를 동시에 획득할 때 이용하는 각도의 수가 서로 다른 다양한 LS 검출기가 시판되고 있습니다.³

대부분의 구상 단백질은 크기가 워낙 작아 대개 90° 광산란이면 몰 질량을 측정하기에 충분합니다. 아쉽게도 단일 각도로는 크기(회전 반경)를 측정할 수 없습니다. 이 값을 얻으려면 유체역학적 반경(Rh)을 측정하기 위해 다각도 광산란 검출(MALS) 또는 동적 광산란(DLS, QUELS라고도 함)과 같은 기술을 사용해야 합니다.

굴절률 검출기(RI)는 합성 폴리머용으로 GPC/SEC에서 가장 일반적인 검출기로서 단백질 분석에도 사용됩니다. 다만 LS 검출기와 함께 굴절률 증분 dn/dc를 온라인으로 결정하는데 주로 사용됩니다. 이 시료 관련 파라미터는 광산란 결과의 정확도에 큰 영향을 미칩니다. 또한 LS 검출기 파장, 용매 등을

포함한 많은 실험 설정의 영향도 받습니다. 일반적인 스크리닝 목적으로 0.185mL/g의 평균 dn/dc를 많은 단백질에 적용할 수 있지만 dn/dc는 단백질 유형에 따라 크게 달라질 수 있으므로 주의해야 합니다.⁴

다른 GPC/SEC 검출 옵션을 사용해도 됩니다. 예를 들어, 일부 단백질은 향상된 감도 및/또는 선택성을 제공할 수 있는 형광 검출기로 분석할 수 있습니다.

변성과 응집을 구별할 목적으로 온라인 점도계의 사용이 점차 보편화되고 있습니다. 점도계는 밀도 차이를 검출하고 구조 변화를 식별할 때 유용합니다. 따라서 합성 폴리머의 GPC/SEC 분석에서 이미 일반적으로 사용되는 다중 검출 방식이 단백질 분석에서도 점차 보편화되고 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

결과는 어떻게 나타날까요?

그림 2는 단백질 응집을 조사하는 데 사용된 UV-LS 설정의 원시 데이터와 결과를 나타낸 것입니다. UV 트레이스와 광산란 트레이스를 사용한 결합 분석은 컬럼 검량 없이 이합체 및 모노머의 몰 질량에 대한 정보를 직접적으로 제공할 수 있습니다. 작은 피크의 획득된 몰 질량이 큰 피크의 몰 질량의 약 두 배이므로 이는 이합체화를 의미합니다. UV 트레이스의 피크 영역을 분석하면 이 예에서 이합체 함량이 약 10%인 것으로 결론지을 수 있습니다.

그림 3은 전체 길이 단일 클론 항체(mAb)에서 얻은 크로마토그램과 동일한 컬럼 세트에서 분석한 항체 조각의 오버레이를 나타낸 것입니다. 빨간색 곡선은 전체 길이 항체와 그 이합체의 UV 신호를 나타내고 파란색 곡선은 항체 조각과 높은 수준의 응집체의 UV 신호를 나타냅니다.

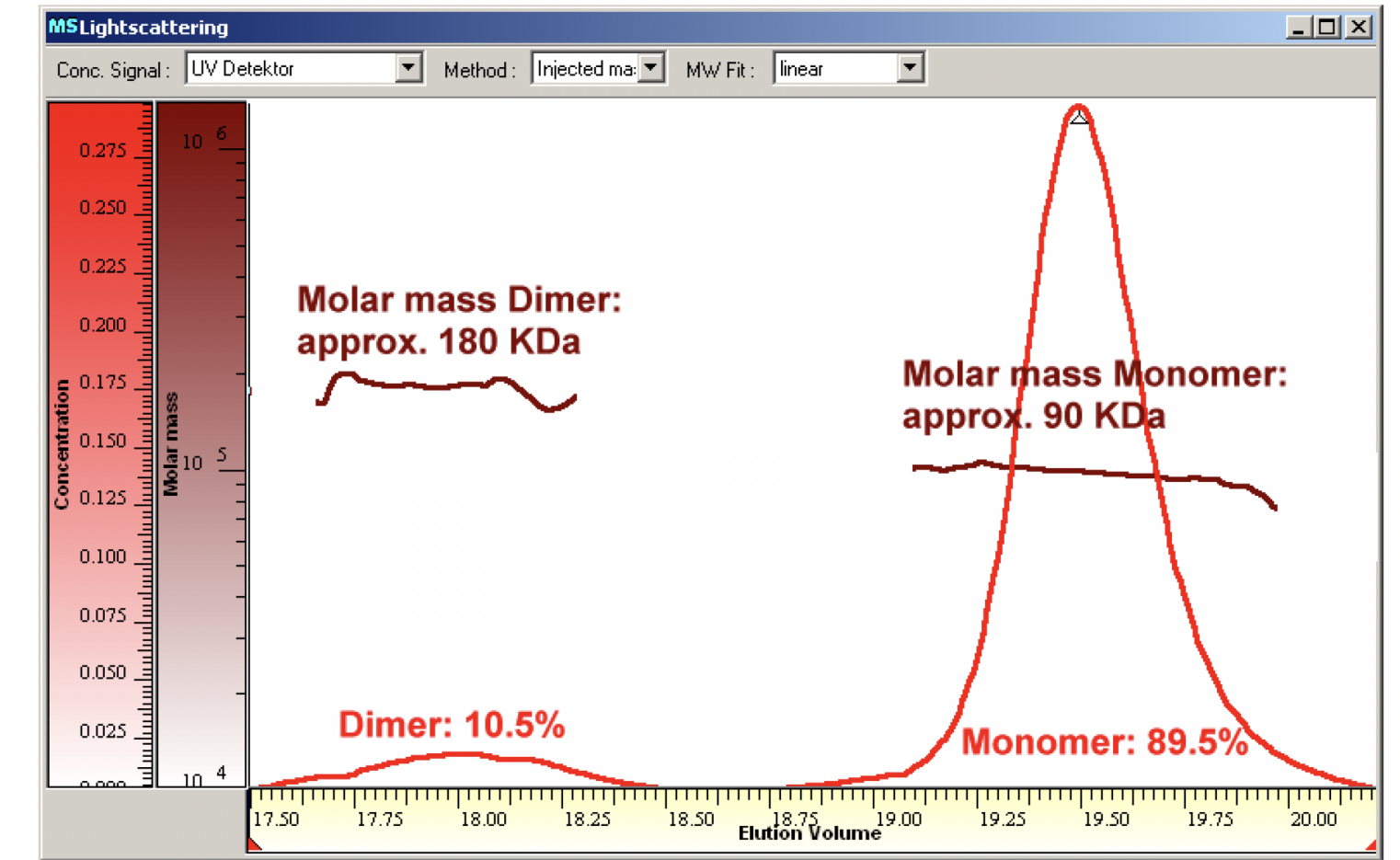


그림 2. 단백질 응집을 조사하는 데 사용된 UV-LS 구성에서 얻은 원시 데이터와 결과. 빨간색 곡선은 모노머와 이합체의 농도를 나타내고 진한 빨간색 선은 모든 용리 부피에서 온라인으로 측정된 몰 질량을 나타냅니다.

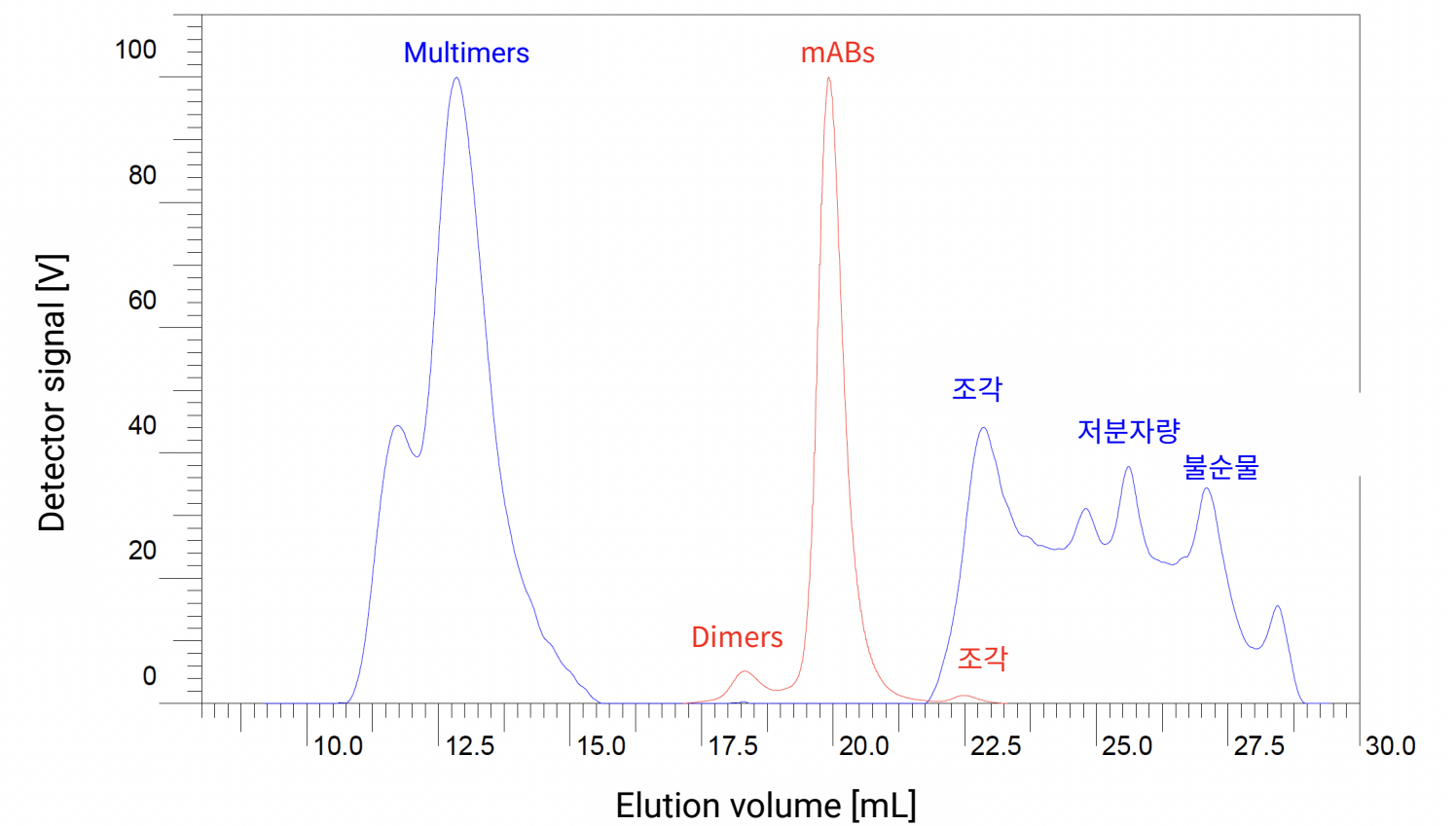


그림 3. 동일한 컬럼 세트에서 측정된 단일 클론 항체(mAb)(빨간색, UV 트레이스) 및 조각(파란색, UV 트레이스)의 크로마토그램 오버레이.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

그림 4는 몰 질량 분포를 나타내는 단백질에 대한 결과입니다. 오버레이에서 세 가지 다른 젤라틴을 명확하게 구분할 수 있으며 몰 질량 평균과 몰 질량 분포를 쉽게 결정할 수 있습니다.

요약

- GPC/SEC는 단백질 응집을 조사하는 강력한 기술입니다. 이를 통해 용액 내 단백질 크기에 따라 비변성 조건에서 단백질을 분리할 수 있습니다.
- 크기에 따른 분리 조건에는 일반적으로 이온 강도가 조정된 이동상이 필요합니다. 분석법 개발에는 회수율 조사도 포함되어야 합니다.
- 고급 검출 옵션(보완 기술로서 MS 또는 LS)은 GPC/SEC 한계를 극복하고 몰 질량을 직접 측정하는 데 도움이 될 수 있습니다.
- RI 또는 점도계와 같은 다른 일반적인 GPC/SEC 검출기는 dn/dc(LS 평가에 필요) 또는 구조 정보를 알려줍니다.

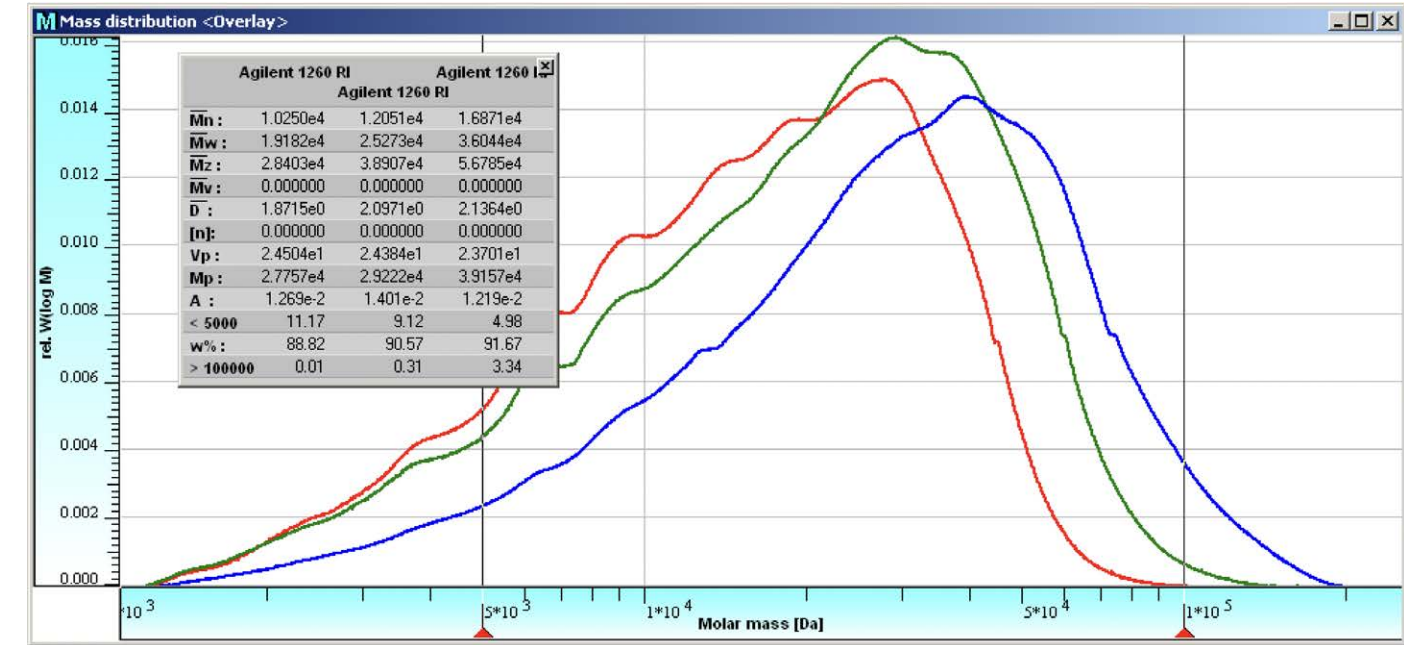


그림 4. 세 가지 젤라틴의 몰 질량 분포 오버레이: 은 140 블룸(빨간색), 금 180 블룸(녹색) 및 백금 240 블룸(파란색).

참고문헌

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC The Importance of Molar Mass Distributions. *The Column* **2007**.
2. Bond, M. et al. Evaluation of a Dual-Wavelength Size Exclusion HPLC Method with Improved Sensitivity to Detect Protein Aggregates and Its Use to Better Characterize Degradation Pathways of an IgG1 Monoclonal Antibody. *J Pharm Sci.* **2010**, 99 (6), 2582–97.
3. Held, D.; Kilz, P. Tips & Tricks: GPC/SEC How to Choose a Static Light-Scattering Technique for Molar Mass Determination. *The Column* **2009**.
4. Zhao, H.; Brown, P.; Schuck, P. On the Distribution of Protein Refractive Index Increments. *Biophys J.* **2011**, 100 (9), 2309–17.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

1.4. 다양한 표준물질을 이용한 검량

동일한 화학 유형의 좁은 분포 몰 질량 표준을 사용할 수 없는 폴리머 재료의 경우, 농도 검출기만으로는 신뢰할 수 있는 실제 몰 질량을 측정할 수 없습니다. 그러나 몰 질량 분포가 넓고 폴리머 유형이 같으며 잘 특성화된 시료를 이용하면 신뢰할 수 있는 실제 몰 질량을 얻을 수 있습니다. 이 접근 방식은 추가 계측이 필요하지 않으므로 온라인 광산란 또는 온라인 점도계 검출기와 같은 몰 질량에 민감한 검출기를 비용 효율적으로 대체할 수 있습니다.

서론

겔 투과 크로마토그래피/크기 배제 크로마토그래피 (GPC/SEC)는 거대분자의 몰 질량과 몰 질량 분포(MMD)를 측정하는 간편하고 강력한 분석법입니다. 용액 내 거대분자의 크기에 따라 분리가 일어납니다. 거대분자가 클수록 컬럼에서 더 빨리 용리됩니다.

GPC/SEC에서 얻어지는 기본 정보는 검출기 신호를 용리 부피의 함수로 보여주는 크로마토그램입니다. 몰 질량 분포를 도출하려면 용리 부피와 용리 폴리머의 몰 질량을 연관짓는 검량선을 이용하여 크로마토그램을 변환해야 합니다. 이 같은 검량선은 대개 분포가 좁은 폴리머 표준물질로 도출합니다. 그러나 몰 질량이 같아도 화학적으로 다른 폴리머는 용액 내에서 크기가 매우 다른 경우가 종종 있습니다. 따라서 검량액의 화학

구조가 시료의 구조와 일치하는 경우에만 정확한 몰 질량을 얻을 수 있습니다.

아쉽게도, 폴리아미드, 폴리에스테르 또는 폴리올레핀과 같은 주요 폴리머 중에는 좁은 표준물질을 상업적으로 이용할 수 없는 것이 많습니다. 실제 몰 질량을 얻으려면 다른 분석법이 필요합니다. 몰 질량에 민감한 검출기를 사용하는 것이 한 대안입니다. 그러나 이 경우 비싼 추가 장비와 더욱 정밀하고 정확한 시료 전처리, 더 많은 시간, 수준 높은 데이터 평가 지식이 필요합니다. 특히 품질 관리 실험실의 경우 이러한 제한 사항이 중요하게 작용합니다. 여기서 빠르고 강력하며 사용하기 쉬운 검량 방법이 필요합니다. 적절하고 비용 대비 효율이 더 높은 방법이 있다면 넓게 분포된 표준물질을 사용하는 것입니다.

폭 넓은 시료를 사용한 검량, 어떻게 작동할까요?

분포가 좁은 폴리머는 크로마토그램의 피크 최대값을 쉽게 식별하고 할당할 수 있습니다. 분포가 넓은 시료는 그렇지 않습니다. M_p 값을 알고 있더라도 피크 최대값은 분리 컬럼의 분리능에 따라 달라질 수 있으므로 정확하게 식별하기 어려울 수도 있습니다. 따라서 단순히 몰 질량 값과 최대 피크에서의 용리 부피를 플롯하여 검량선을 작성하는 것은 권장되지 않습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC에서 일반적으로 수용되는 보편적인 검량의 개념¹을 따르면 좁은 분포의 검량액으로 얻은 검량선과 분석물 사이에 다음과 같은 관계를 가집니다.

$$\log M_{\text{analyte}} = A + B \times \log M_{\text{calibrant}}$$

여기서 검량액과 분석물 모두 고정상과 상호작용하지 않고 용리된다고 가정합니다.

파라미터 A는 좁은 분포의 검량액으로 생성된 검량선에 상대적으로 검량선을 수직으로 이동시키는 반면, B의 변화는 검량선의 기울기를 변화시킵니다(그림 1 비교). 파라미터 A와 B는 동일한 용매에 있는 분석물과 검량액의 Mark-Houwink 파라미터와 관련이 있습니다.²⁻⁵ 파라미터 A와 B가 검량선에 미치는 영향으로 인해 MMD, 결과적으로 주어진 크로마토그램에 대해 계산된 몰 질량 평균이 파라미터의 함수로 변화합니다.

표 1에 그 내용이 나와 있으며, 폴리스티렌 검량선(기본 검량선)과 서로 다른 A 및 B 파라미터를 사용하여 넓은 분포의 폴리락트산(PLA) 시료에서 얻은 두 크로마토그램을

평가했습니다. 폴리스티렌 검량선을 적용하면 실제 몰 질량 값 (M_w 및 M_n)이 3배 정도 과대 평가됩니다. 파라미터를 변경하면 몰 질량 값이 실제 값에 더 가까워집니다. 그러나 서로 다른 시료에 대해 신뢰할 수 있는 결과를 얻으려면 두 파라미터를 모두 변경해야 합니다. 마지막 줄에 나와 있는 A와 B에 최적화된 파라미터 세트의 경우 광산란의 기준 값과 잘 일치하는 모습입니다.

표 1에는 또 분포가 넓은 표준물질의 알려진 몰 질량 값과 크로마토그램으로부터 파라미터 A와 B를 결정할 수 있는 방법이 정리되어 있습니다. A와 B를 얻기 위해 알려진 몰 질량과 기본 검량을 사용하여 각 크로마토그램에서 계산된 몰 질량이 최대한 잘 일치할 때까지 이를 체계적으로 변화시킵니다.

다행스럽게도 이 변이는 대부분의 최신 GPC/SEC 소프트웨어 패키지에서 자동으로 일어납니다. 파라미터 A와 B의 계산된 값을 사용하여 기본 검량에서 분석물과 동일한 구조의 미지 시료에 적합한 검량선을 쉽게 도출할 수 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

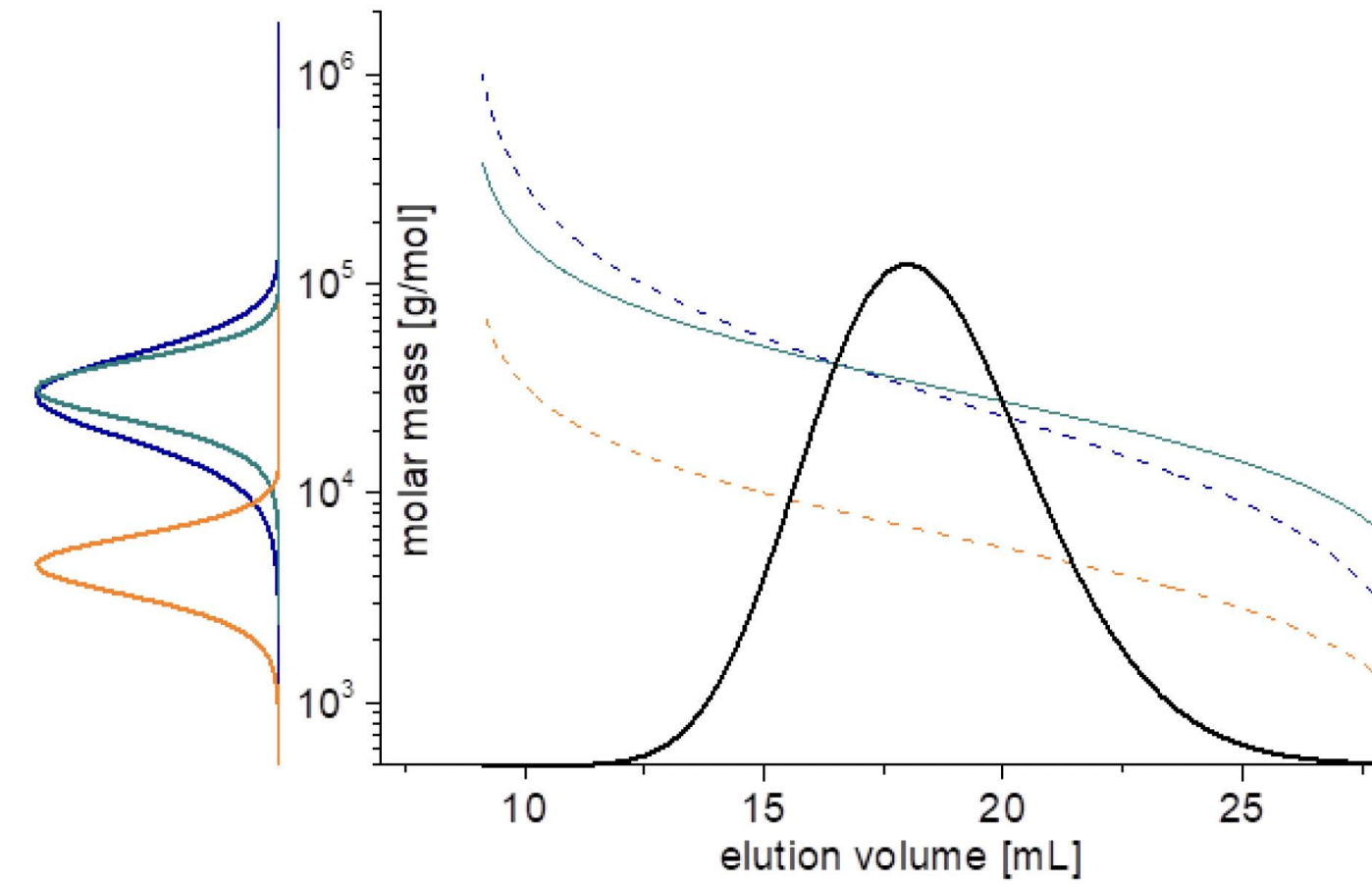


그림 1. 파라미터 A와 B가 검량선에 미치는 영향과 그에 따른 분석물의 MMD.
 - 청록색: 원래(기준) 검량선과 거기서 도출된 MMD(왼쪽)
 - 파란색: 파라미터 B를 변화시켜(기울기) 청록색 곡선에서 유도된 검량선과 MMD
 - 주황색: 파라미터 A를 변화시켜(수직 이동) 파란색 곡선에서 유도된 검량선과 MMD.

	PLA-시료 1 M _w [g/mol]	PLA-시료 2 M _w [g/mol]
광산란의 참조 값	37,000	500,000
폴리스티렌 검량 (A = B = 1)	82,300	1,247,000
A = 0.5; B = 1	35,400	580,000
A = 0.5; B = 8	3,790	355,000
소프트웨어로 최적화된 값 A = 0.717; B = 0.957	36,950	500,700

표 1. 파라미터 A 및 B의 변이가 폴리스티렌 검량선과 넓은 분포 PLA 시료의 크로마토그램에서 도출된 몰 질량에 미치는 효과

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

앞에서 설명한 방식은 넓은 표준 검량에 대한 다른 방식과 달리 기본 검량이 컬럼 패키지의 공극 크기 분포를 드러내므로 검량선의 실제 모양(대부분의 경우 형태가 S자형 또는 비선형), 배제 부피 및 기본 검량선의 분리 한계를 드러낸다는 사실에서 그 장점을 찾을 수 있습니다. 시료를 둘 이상 이용하여 검량선을 만들 수 있다는 점 또한 장점입니다. 이를 통해 정확도가 향상되고 외삽 없이 더 넓은 몰 질량 범위를 포괄할 수 있습니다.

넓은 폭의 표준물질을 사용하여 검량선을 작성하는 프로세스

앞서 언급한 절차에 대해 검량선을 작성하려면 다음이 필요합니다.

1. 많은 유기 용매의 경우 폴리스티렌 또는 수용성 응용 분야의 경우 pullulan 또는 PEO/PEG와 같이 임의의 화학 구조를 가진 좁은 분포의 표준물질을 사용하여 수립된 기존 검량선(기본 검량선)
2. M_w 및 M_n 이 알려져 있고 특성화할 분석물과 구조가 같은 넓은 분포 시료 하나 이상. 넓은 분포 시료가 둘 이상 사용되는 경우, 시료별로 M_w 이나 M_n 과 같은 몰 질량 평균 하나면 충분합니다.

다음부터는 절차가 간단합니다.

- 해당 GPC/SEC 시스템에서 좁고 넓은 분포의 표준물질을 실행합니다.
- 몰 질량(M_p)과 좁은 분포 검량액의 피크 최대값을 사용하여 기본 검량을 수립합니다.⁶
- 소프트웨어 도구(예: Agilent WinGPC 또는 Agilent OpenLab CDS GPC/SEC)를 사용하여 검량선을 이동하고 기울기를 조정하여 검량이 넓은 분포 시료에 대해 올바른 결과를 얻도록 합니다. 이는 소프트웨어가 넓은 표준물질의 크로마토그램을 사용하고 알려진 몰 질량 평균을 적용하여 최적화된 파라미터 A와 B를 내부적으로 결정한다는 의미입니다.
- 몰 질량을 모르는 시료의 완전 질량 분포와 실제 몰 질량 평균을 구하는 데 이용할 수 있도록 이 새 검량선을 저장합니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

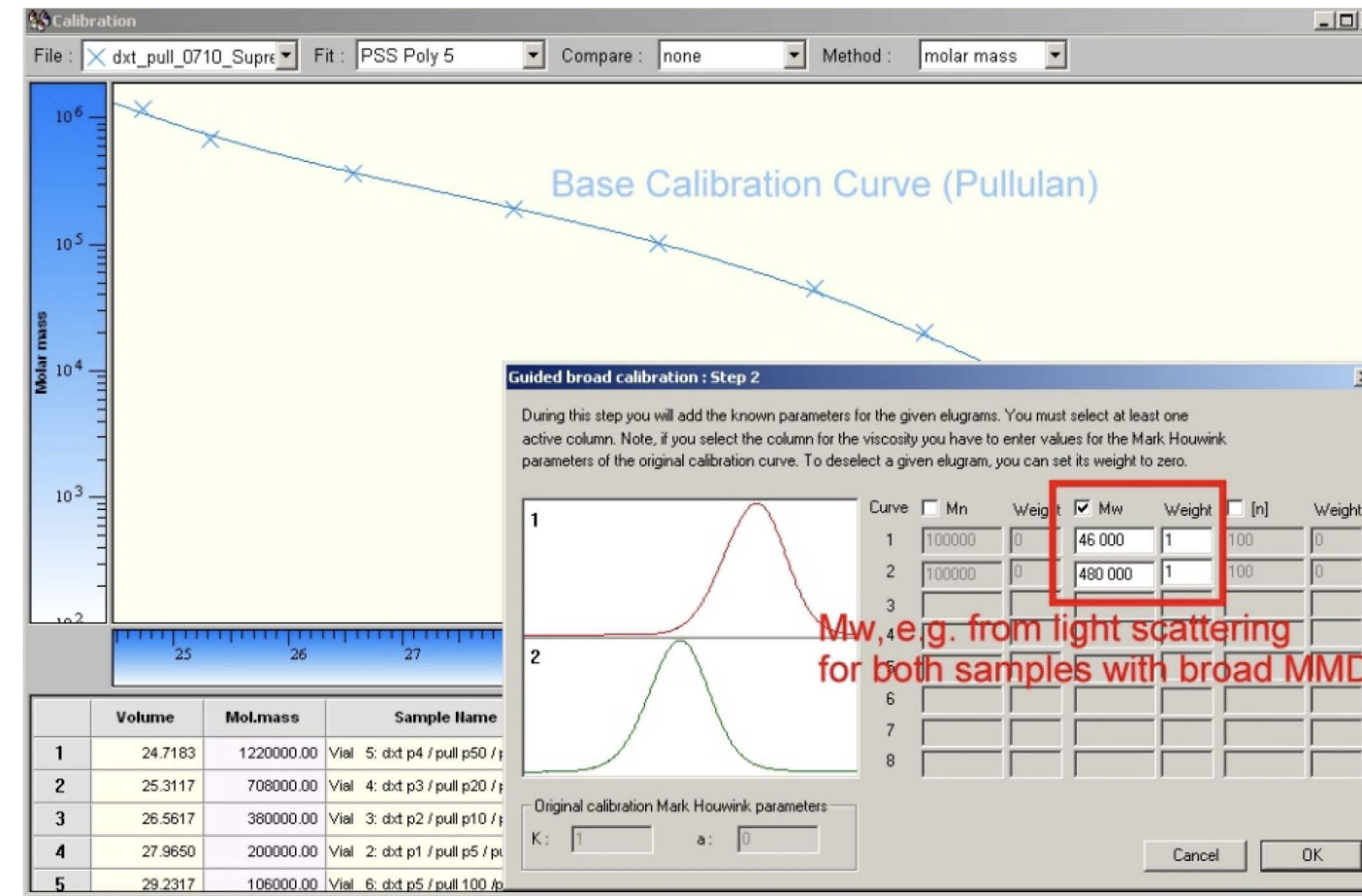


그림 2. M_w 가 알려진 두 넓은 분포 시료에 대한 기본 검량과 크로마토그램. 정확도와 몰 질량 범위를 높이기 위해 시료를 여덟 개까지 사용할 수 있습니다.

그림 2는 넓은 분포 표준물질의 크로마토그램과 넓은 표준물질 검량의 개념을 사용할 때 필요한 요소를 나타낸 것입니다. 검량 정확도를 높이려면 하나 이상의 넓은 분포 표준물질을 사용해야 합니다. 넓은 몰 질량 범위를 다루어야 한다면 여러 시료를 이용하는 것이 좋습니다.

그림 3은 기존/기본 검량(파란색)과 A 및 B 결정 후 결과적인 검량선(빨간색)을 비교한 것입니다. 이후 이 검량선은 미지 시료 평가에 사용되며 이 유형의 모든 시료에 대해 실제 몰 질량을 제공합니다.

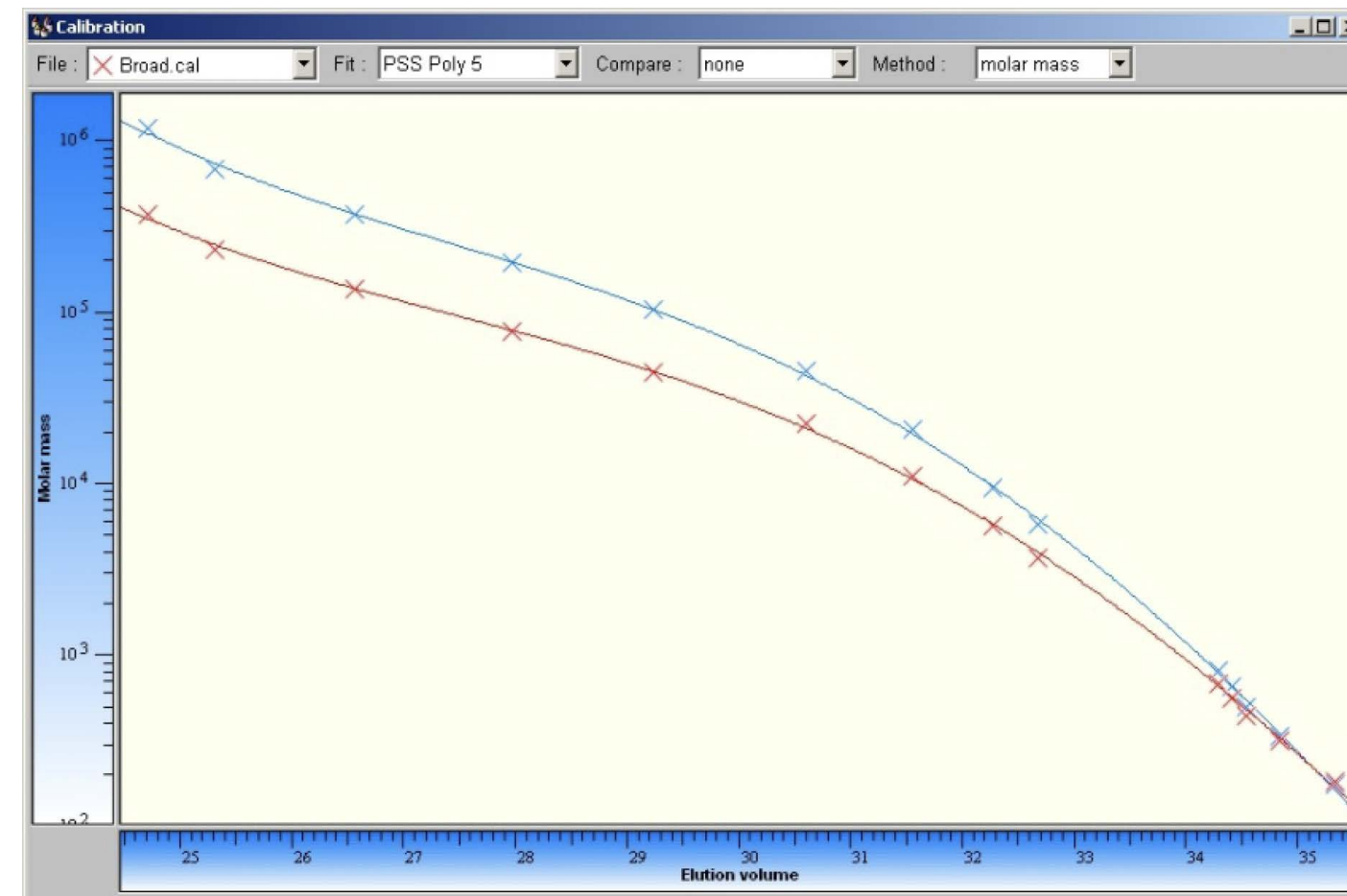


그림 3. 몰 질량 분포(빨간색)가 넓은 시료에서 얻은 최적 A 및 B 값을 이용하여 검량선과 Pullulan 기본 검량선(파란색)을 비교한 결과.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

넓은 표준물질을 얻는 방법

소수지만, 화학 구조가 다양한 넓은 표준물질을 여러 업체가 공급하고 있습니다. 상업적으로 이용 가능한 넓은 표준물질이 없는 경우, 시료 테스트 실험실은 M_w 또는 NMR에 대해 광산란, 또는 M_n 에 대해 삼투압 측정과 같은 절대 기술에서 얻은 배치 측정을 사용하여 실제 몰 질량 값을 측정할 수 있습니다. 다중 검출 GPC/SEC를 이용하는 온라인 결정으로도 이 문제를 해결할 수 있습니다.

참고문헌

1. Grubisic, Z.; Rempp, P.; Benoît, H. A Universal Calibration for Gel Permeation Chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1967**, 5 (9), 753–759.
2. Mori, S. Calibration of Size Exclusion Chromatography Columns for Determination of Polymer Molecular Weight Distribution. *Anal Chem* **1981**, 53, 1813–1818.
3. Mahabadi, H.; O’Driscoll, K. A Gel Permeation Chromatography Calibration Method for a Broad Molecular Weight Distribution Polymer. *J Appl Polym Sci* **1977**, 21, 1283–1287.
4. Weiss, A.; Cohn-Ginsberg, E. A Note on the Universal Calibration Curve for Gel Permeation Chromatography. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* **1969**, 7 (5), 379-381.
5. Radke, W. Chromatography of Polymers, in: *Macromolecular Engineering*, Vol. 3. Wiley-VCH, **2007**, 1881–1936.
6. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**.

요약

- 넓은 표준물질을 이용하는 검량은 빠르고 간단해 비싼 고급 검출이 필요하지 않은 품질 관리 실험실에 적합합니다.
- M_w 및 M_n 값이 알려져 있고 몰 질량 분포가 넓은 표준물질은 계약 분석 실험실에서 배치 분석법을 사용하여 쉽게 얻을 수 있습니다. 이를 통해 전 세계 과학자들은 정밀하고 정확한 몰 질량을 측정할 수 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

1.5. 몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

GPC/SEC는 몰 질량 기준 수백 달톤부터 수백만 달톤까지 여러 가지 시료에 적용할 수 있는 분석법입니다. 낮은 몰 질량 시료의 분석은 간단하지만 수백만 달톤 범위의 높은 몰 질량 시료를 분석하려면 더 많은 주의와 이해가 필요합니다.

시료 전처리

거대분자의 분석은 인내심을 가지고 수행해야 합니다. 몰 질량이 높은 시료의 경우에는 특히 그러합니다. 거대분자에 필요한 용해 시간은 상당하며 심하면 몇 주까지 걸리기도 합니다. 용해 시간은 시료, 용매, 몰 질량, 다분산도, 사슬 화학, 결정화도, 조성 및 입체화학과 같은 많은 파라미터에 따라 달라집니다. 경험에 비춰 보면 재료의 몰 질량이 높고 분포가 좁을수록 완전하고 재현 가능한 용해를 얻기까지 시간이 더 걸립니다.

폴리머 용해 속도를 높일 수 있는 방법은 많지 않습니다. 초음파 장치의 사용은 권장되지 않는데, 시료가 열화될 가능성이 높기 때문입니다. 몰 질량이 매우 높은 시료는 마그네틱 교반기 막대를 사용해도 체인 절단이 발생할 수도 있습니다. 따라서 시료가 단일 분리 사슬로 용해될 때까지 기다리는 것이 유일한

선택입니다. 용해 과정이 몇 주/일이 소요되는 경우 안정화된 용매를 사용해야 합니다. 용리 용기를 어두운 환경에 보관하는 것도 자주 권장됩니다. 용액이 잘 섞이도록 용해 용기를 가끔 부드럽게 휘젓기만 하면 됩니다.

일반적으로, 시료에 겔이나 입자가 포함된 경우 멤브레인 필터를 통해 시료 용액을 여과하는 것이 권장되지만 몰 질량이 높은 시료에 대해서는 주의를 기울여야 합니다. 시료가 변성되지 않도록 필터의 공극 크기를 조정해야 합니다. 가능하면 몰 질량이 높은 시료 용액의 여과는 피해야 합니다.

또한 낮은 몰 질량 시료와 비교하여 농도도 줄여야 합니다. 높은 몰 질량 분자는 다른 체인의 간섭 없이 진정한 유체역학적 부피로 팽창할 공간이 필요합니다. 예를 들어, 질량이 똑같은 몰 질량이 큰 물질을 여러 가지 주입량/농도 옵션으로 분석 컬럼 세트에 주입할 수 있습니다. 예를 들어 두 가지 옵션을 사용하여, 먼저 1.0% w/v, 10 μ L 부피 또는 0.1% w/v, 100 μ L 부피로 시료를 주입할 수 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

첫 번째 예에서는 용액이 점도가 매우 높고, 위에서 언급한 대로 큰 몰 질량 분자가 진정한 유체역학적 부피가 아니라는 사실로 인해 높은 몰 질량 물질에 대해 정확하고 재현 가능한 몰 질량 값을 얻을 가능성은 희박합니다. 실제로는 용리 시간이 점점 더 늦어지거나(그림 1 참조) 컬럼에서 용리되는 훨씬 더 넓은 피크로 시료 피크 용리가 관찰될 수 있습니다.

몰 질량 범위	농도
100-10,000	2mg/mL(0.2%)
10,000-1,000,000	1-2mg/mL(0.1-0.2%)
> 1,000,000	0.5mg/mL 미만(0.05%)

용리 부피에 미치는 시료 농도의 영향은 몰 질량에 따라 증가합니다. 표에는 몰 질량을 기준으로 권장되는 시료 농도가 요약되어 있습니다. 이 권장 사항은 몰 질량 분포가 좁은 시료에 대한 것입니다. 다분산도가 높은(넓은 몰 질량 분포) 시료는 더 높은 농도가 가능합니다.

그림 1은 몰 질량이 5,000Da인 경우와 비교하여 몰 질량이 500,000Da인 참조물질의 용리 부피와 피크 모양 변화를 나타낸 것입니다. 몰 질량이 작은 시료에는 영향이 적지만 몰 질량이 큰 용리 부피와 피크 모양은 크게 달라집니다.

용리 부피의 변화는 GPC/SEC 시스템이 좁은 분포의 몰 질량 표준물질로 검량될 때 특히 문제가 됩니다. 이 경우에는 시료의 피크 위치가 참조 표준물질의 위치와 비교됩니다. 피크 모양의 변화(불충분한 분리를 나타냄)는 온라인 점도계, 광산란 검출기 또는 삼중 검출 시스템까지 포함해 모든 종류의 검량에 영향을 미칩니다.

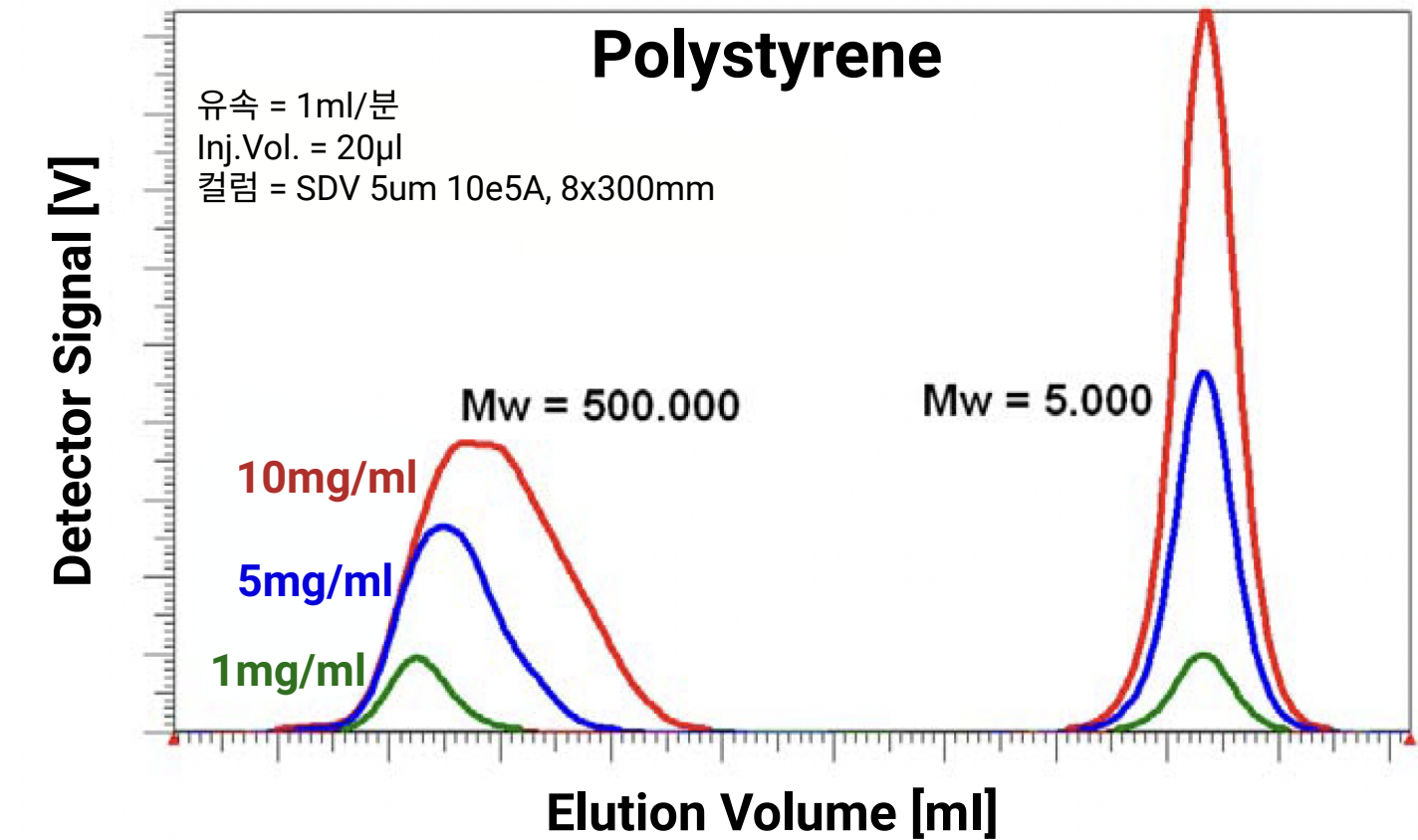


그림 1. 세 가지 농도에서 두 폴리스티렌의 크로마토그램 오버레이. 5,000Da 시료의 경우 미미한 영향만 있을 뿐이지만 500,000Da 시료의 용리 부피는 피크 모양까지 포함해 농도의 영향을 많이 받습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

크로마토그래피 조건

다음 규칙은 GPC/SEC로 분석하는 모든 시료에 적용됩니다.

- 높은 몰 질량을 분리하려면 더 큰 공극이 있는 분리 컬럼이 필요합니다.
- 큰 입자는 일반적으로 시료의 전단 열화를 피하기 위해 더 높은 분자량에 사용됩니다.

그러나 수백만 Dalton 몰 질량의 시료에 대해서는 실험 조건을 더 고려해야 합니다.

최적화해야 조건으로 가장 중요한 것은 시스템 유속입니다. 폴리머는 확산 계수가 낮아 너무 높은 유속에서 실행되면 상당한 피크 확장 또는 예기치 않은 피크 모양이 나타납니다. 유속을 0.25mL/분 이하로 줄이면 몰 질량이 높은 시료에서 더 현실적인 피크 모양이 나옵니다. 고려해야 할 또 다른 요소는 긴 폴리머 체인이 전단으로 길어지는 현상입니다.

그림 2는 0.5mL/분 및 0.25mL/분에서 측정된 높은 몰 질량 시료의 오버레이를 나타낸 것입니다. 0.50mL/분에 대한 곡선은 인위적으로 더 높은 용리 부피로 이동하고 다시 피크 모양이 바뀝니다.

온라인 광산란 검출기는 잘못된 크로마토그래피 조건을 시각화하기에 좋은 검출기입니다. 이 검출기는 사용 가능한 몰 질량이 매우 높은 검량 표준물질의 부족을 극복하기 위해 종종 필요하기 때문에 많은 계측 구성에 이미 장치가 포함되어 있습니다.

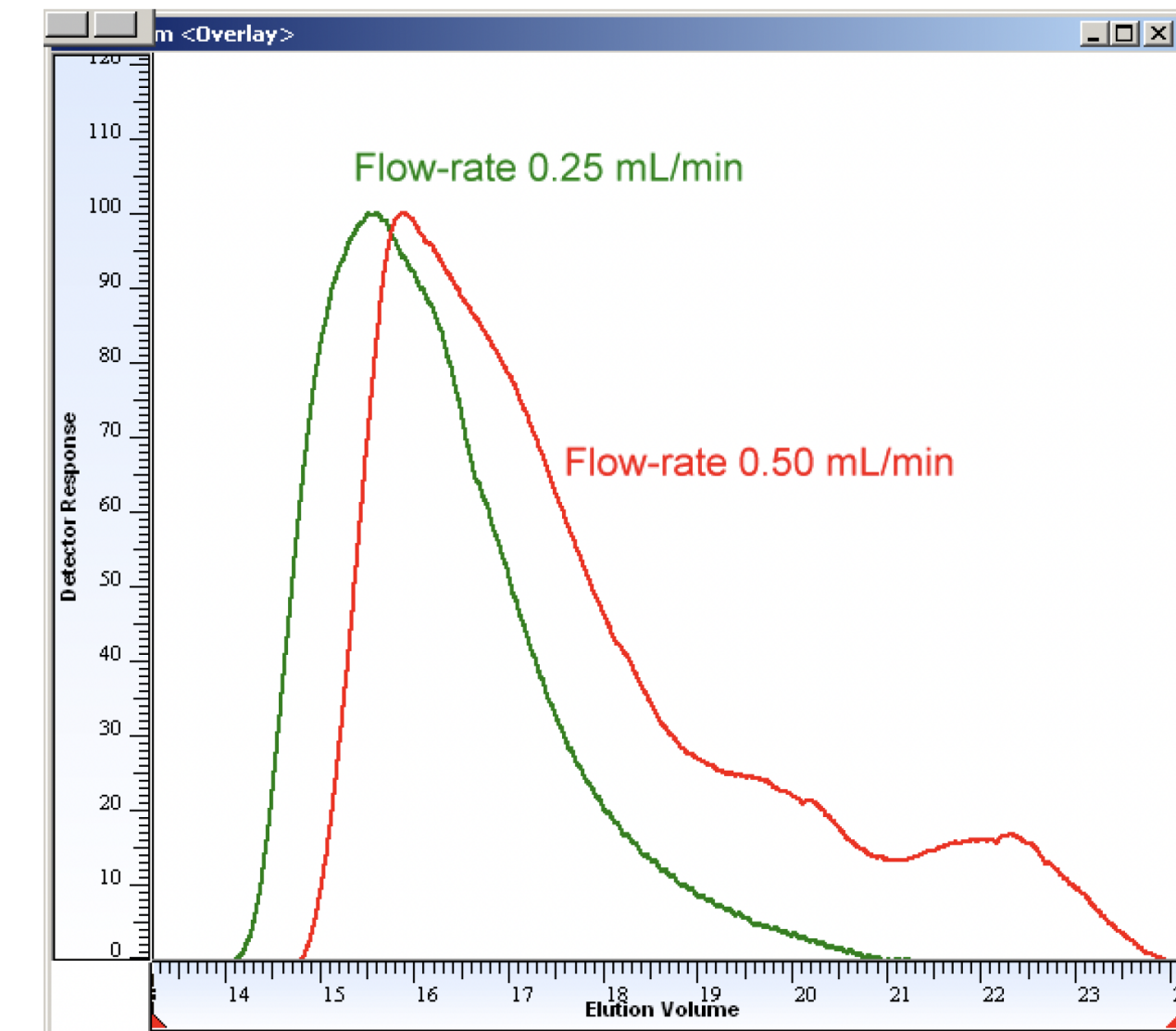


그림 2. 0.5mL/분(빨간색) 및 0.25mL/분(녹색) 유속에서 얻은 380만 Da 시료에 대한 크로마토그램 오버레이. 유속을 0.1mL/분으로 줄이면 결과가 더욱 개선될 수 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

크로마토그래피 조건

그림 3은 0.5mL/분의 유속에서 높은 몰 질량 시료에 대한 다각도 광산란 결과를 나타낸 것입니다. 측정된 몰 질량은 기본적으로 넓은 용리 부피 범위에서 일정하게 유지됩니다. 이는 잘못된 크로마토그래피 조건을 사용하여 발생하는 비효율적인 분리 때문입니다.

높은 몰 질량을 분석할 때 실질적인 또 다른 고려 사항은 검출 한계와 시료 점도입니다.

- 낮은 농도를 사용해야 하므로 농도 검출기의 S/N 비율이 낮은 경우가 많습니다. 그러나 시료 농도를 높이는 것보다 주입에 대한 용리 부피를 늘리는 것이 좋습니다. 그러면 총 주입 질량이 증가하고 신호가 개선되는 효과도 있습니다. 낮은 몰 질량에는 권장되지 않습니다. 이 경우에는 시료의 농도를 높이고 소량 주입하는 것이 좋습니다.
- 자동 시료 주입기를 사용 중이고 몰 질량이 높아 시료 점도가 높은 경우, 자동 시료 주입기 시린지의 추출 속도를 줄이는 것이 좋습니다. 그러면 주입의 재현성이 높아집니다.

높은 몰 질량 분석을 위한 모범 방식

- 낮은 농도를 사용합니다. 필요한 경우 주입량을 늘립니다.
- 인내심을 가지고 시료가 완전히 용해될 때까지 충분히 기다립니다.
- 가능하면 시료 여과를 피합니다. 이것이 불가능할 경우 공극 크기가 적절한 매체를 사용합니다.
- 낮은 유속(0.25-0.1mL/분)을 사용하고 자동 시료 주입기의 시린지 추출 속도를 줄입니다.
- 입자 크기가 큰 충전재와 공극이 큰 컬럼을 사용합니다. 크로마토그램에 의심스러운 솔더가 있는 경우 컬럼의 배제 한계를 확인합니다.

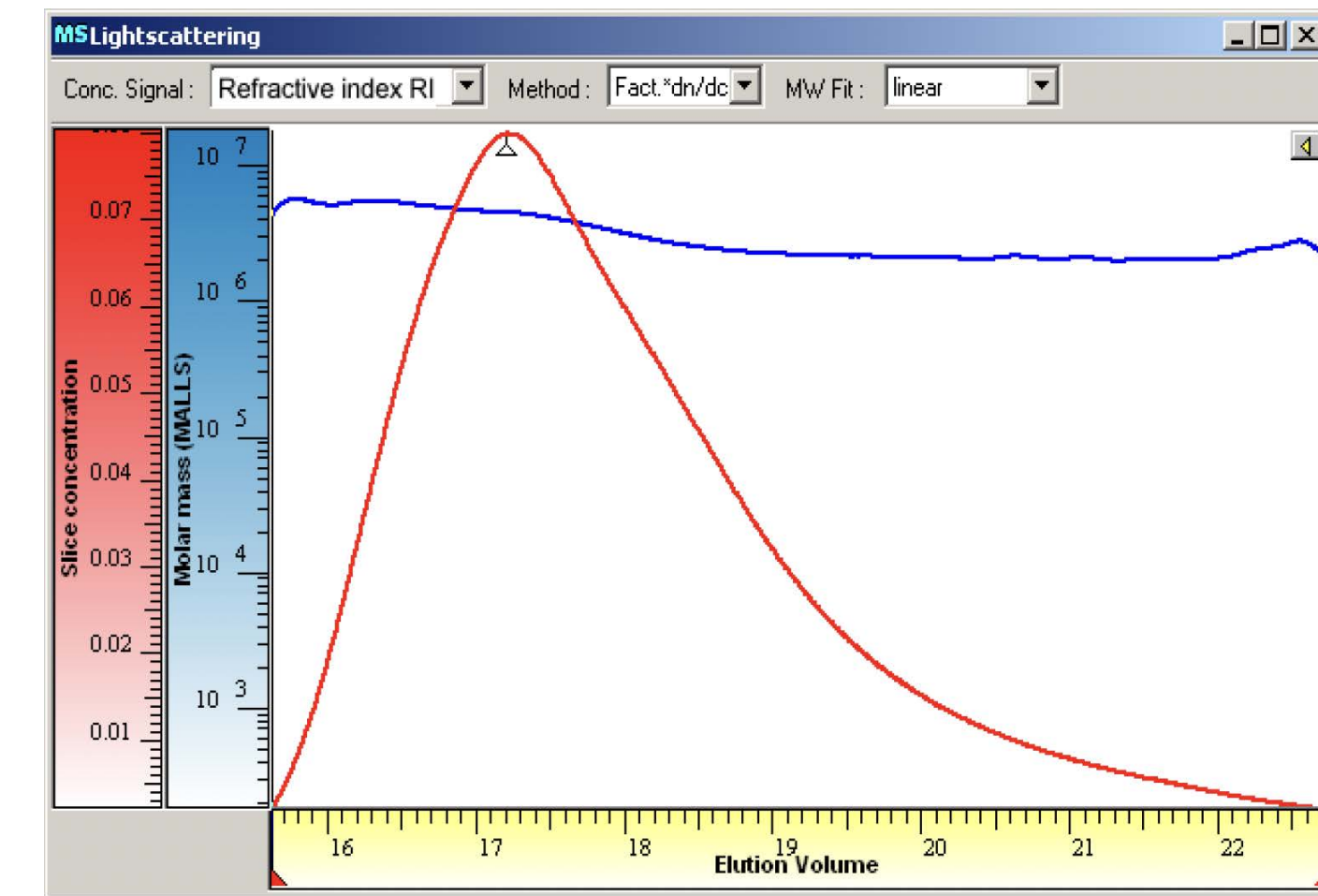


그림 3. 유속이 너무 높은(0.5mL/분) 시료 실행에 대한 슬라이스 농도 (빨간색) 및 온라인 측정된 몰 질량(MALS, 파란색).

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

1.6. 분지 분석

폴리머 재료의 장점은 많은 파라미터를 조정하여 물리적 특성을 특정 용도에 맞게 조정할 수 있다는 것입니다. 조성, 평균 몰 질량 및 몰 질량 분포의 폭 외에 응용 특성을 제어하는 또 다른 핵심 파라미터는 분지(branching)입니다. 크로마토그래피와 첨단 검출 기술은 분지형 분자를 특성화할 때 유용합니다.

분지에는 3개 이상의 체인이 연결된 분기점이 하나 이상 필요합니다. 분지는 합성 중에 원하지 않는 부반응으로 발생하기도 하며, 재료의 물리적 특성을 최적화하기 위해 의도적으로 도입해도 됩니다. 별 모양 또는 빗 모양 폴리머와 같은 정의된 구조를 합성할 수 있는 경로가 다양하게 존재합니다.

분지형 폴리머의 특성은 (용융) 점도, 유리 전이 온도, 벌크 열팽창 계수, 용해도 등의 측면에서 선형 폴리머와 크게 다릅니다. 특성 변화는 분지 유형, 분지 길이 및 분지 밀도와 같은 파라미터에 따라 달라집니다.

몰 질량 분포뿐만 아니라 분지 분포도까지 관련된 복잡한 폴리머 혼합물의 특성화는 실질적인 해결 과제로 제시됩니다. 분지 유형에 따라 깊이 있는 인사이트를 얻을 수 있는 검출과 분리 옵션이 다양하게 준비되어 있습니다.

GPC/SEC는 온라인 점도계¹(또는 덜 적합하게는 다각도 광산란)와 연계되어 별 모양 또는 빗 모양 폴리머와 같은 정의된 구조를 특성화하거나 긴 사슬 분지를 조사하는 데 사용할 수 있습니다. 적외선(IR) 검출 기능이 있는 고온 GPC(HT-GPC)를 사용하여 폴리올레핀의 단쇄 분지를 조사할 수 있습니다.²

분지 밀도가 다양한 분지 및 백본의 수에 대해 광범위한 몰 질량 분포를 나타내는 폴리머 시료의 경우, GPC/SEC의 크기 분리능이 구조를 완전히 분해하는 데 충분하지 않을 수도 있습니다. 따라서 상호작용 폴리머 크로마토그래피(예: 그래디언트 폴리머 HPLC, TGIC) 또는 2차원 크로마토그래피와 같은 대체 분리법을 적용해야 합니다.³

GPC/SEC-점도계

GPC/SEC의 한계는 용액 내 분자의 크기에 따라서만 분리된다는 것입니다. 분지된 시료에서 얻어지는 결과를 보면, 참조물질을 사용한 기존의 검량이 분지된 시료의 몰 질량을 과소평가하는 것으로 나타납니다. 여기서 해결책은 온라인 점도계 또는 광산란 검출기와 같이 몰 질량에 민감한 검출기를 사용하는 것입니다. 그러면 점도계를 구조 분석 및 범용 검량을 기반으로 한 몰 질량 측정에 사용할 수 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

온라인 점도계는 몰 질량에 민감한 검출기로 분류되지만 신호 강도는 몰 질량이 아닌 점도에 따라 달라집니다. 점도계는 용액의 분자 밀도에 대한 직접적인 접근을 제공합니다. 이러한 기기 설정(대부분의 경우 광산란 검출기도 포함)은 매우 일반적이지만 결과와 한계를 이해하려면 많은 경험이 필요합니다.

분지 분석에서 중요한 것은 Mark-Houwink 플롯으로, 여기에 고유 점도(예: 온라인 점도계를 사용하여 얻은 점도) 로그 대 범용 검량(또는 광산란 검출)을 사용하여 얻은 몰 질량의 로그가 플롯됩니다. Mark-Houwink 플롯의 기울기(Mark-Houwink 지수 α)는 용액의 분자 모양에 따라 달라집니다. 고유 점도(고체 구)의 몰 질량 의존성이 없는 경우 기울기 0이 예상됩니다. 반면, 단단한 막대의 Mark-Houwink 지수는 2입니다. 일반적인 랜덤 코일 폴리머는 용매 품질에 따라 0.5에서 0.8 범위의 Mark-Houwink 지수를 나타냅니다.

생성된 데이터를 동일한 화학 구조 및 몰 질량의 선형 사슬과 비교할 수 있다면 폴리머에 대한 분지 분석을 간소화할 수 있습니다. 그림 1은 다양한 폴리에틸렌 시료에 대한 Mark-Houwink 플롯을 나타낸 것입니다. 온라인 점도계가 장착된 HT-GPC 기기를 사용하여 이 플롯을 생성했습니다.

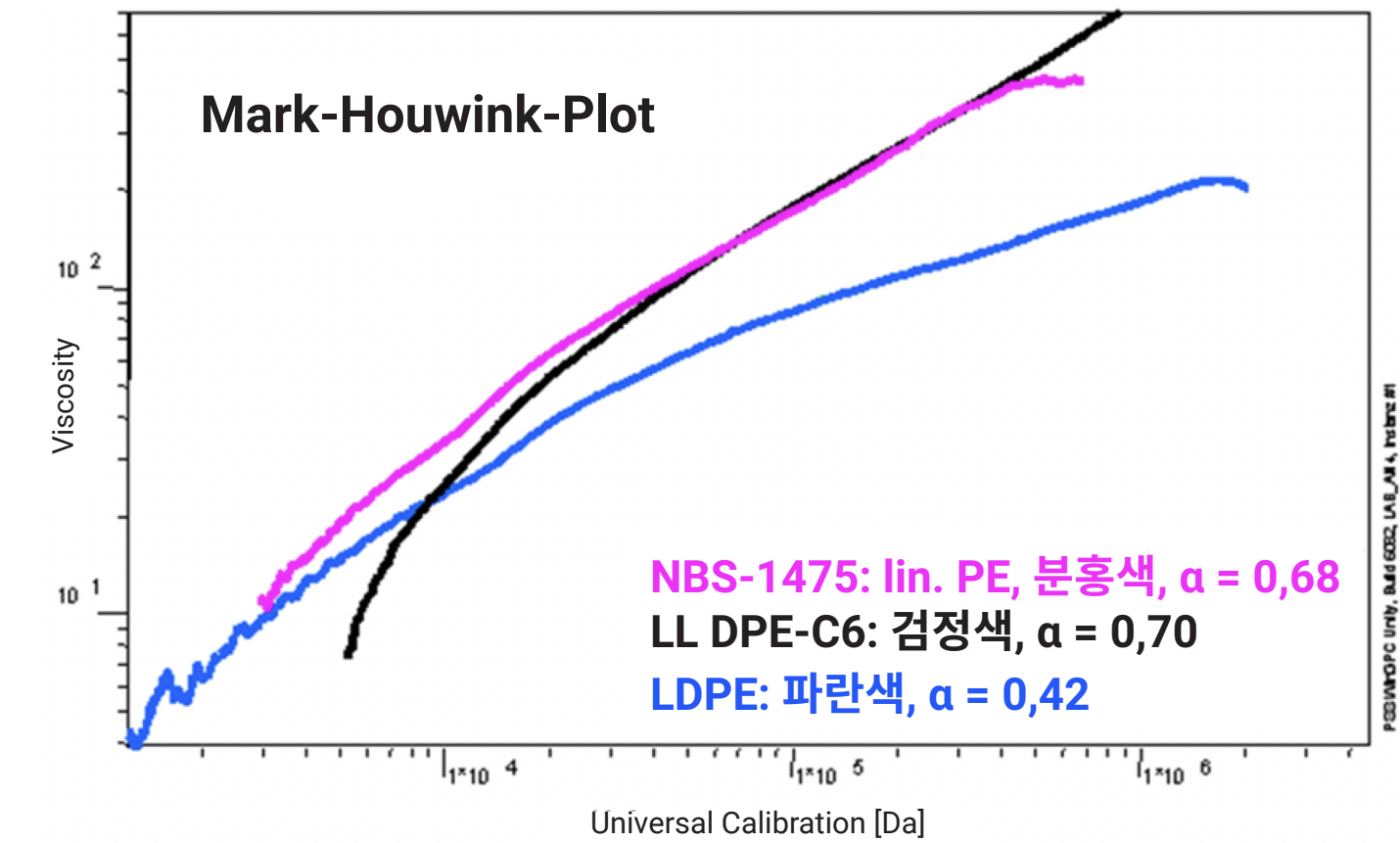


그림 1. 세 가지 시료에 대한 Mark-Houwink 플롯 오버레이: 선형 NBS-1475 (분홍색), 짧은 사슬 분지가 있는 선형 저밀도 폴리에틸렌(LLDPE, 검정색), 긴 사슬 분지가 있는 저밀도 폴리에틸렌(LDPE, 파란색).

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

단쇄 분지만 있는 선형 저밀도 폴리에틸렌(LLDPE)의 Mark-Houwink 플롯은 선형 시료 중 하나와 거의 겹치는 반면, 장쇄 분지를 포함하는 저밀도 폴리에틸렌(LDPE)은 크게 벗어납니다. 동일한 분자량에서 LDPE 체인은 선형 시료에 비해 상당히 낮은 고유 점도를 나타냅니다. 이것은 분지가 존재하기 때문에 발생하는 결과입니다. 분지 밀도가 증가함에 따라 편차가 증가합니다. 분지형 및 선형 폴리머의 Mark-Houwink 플롯을 공통 절편으로 외삽하면 분지가 처음 발생하는 몰 질량을 검출할 수 있습니다. 동일한 몰 질량에서 분지형 폴리머와 선형 폴리머의 고유 점도 비율을 취하면 분지 수에 대한 결론을 도출할 수 있는 수축 계수 g' 를 측정할 수 있습니다.

그림 2는 poly(tert-butyl acrylate), PtBuA, 스타 폴리머에 대한 GPC/SEC-점도계 결과를 나타낸 것입니다. 스타 폴리머는 중앙 코어에 여러 암(선형 체인)이 연결된 비교적 단순한 분지형 폴리머입니다.

스타 폴리머는 암 우선 접근 방식을 사용하여 합성되었습니다. 코어를 형성하기 위해 좁은 몰 질량 분포의 PtBuA 전구체 암을 소량의 이작용성 가교결합제를 사용하여 결합시켰습니다. 이는 몰 질량이 서로 다른 두 스타 폴리머가 코어에 부착된 암(길이가 대략 동일)의 수에 따라 차이를 나타낸다는 것을 의미합니다.

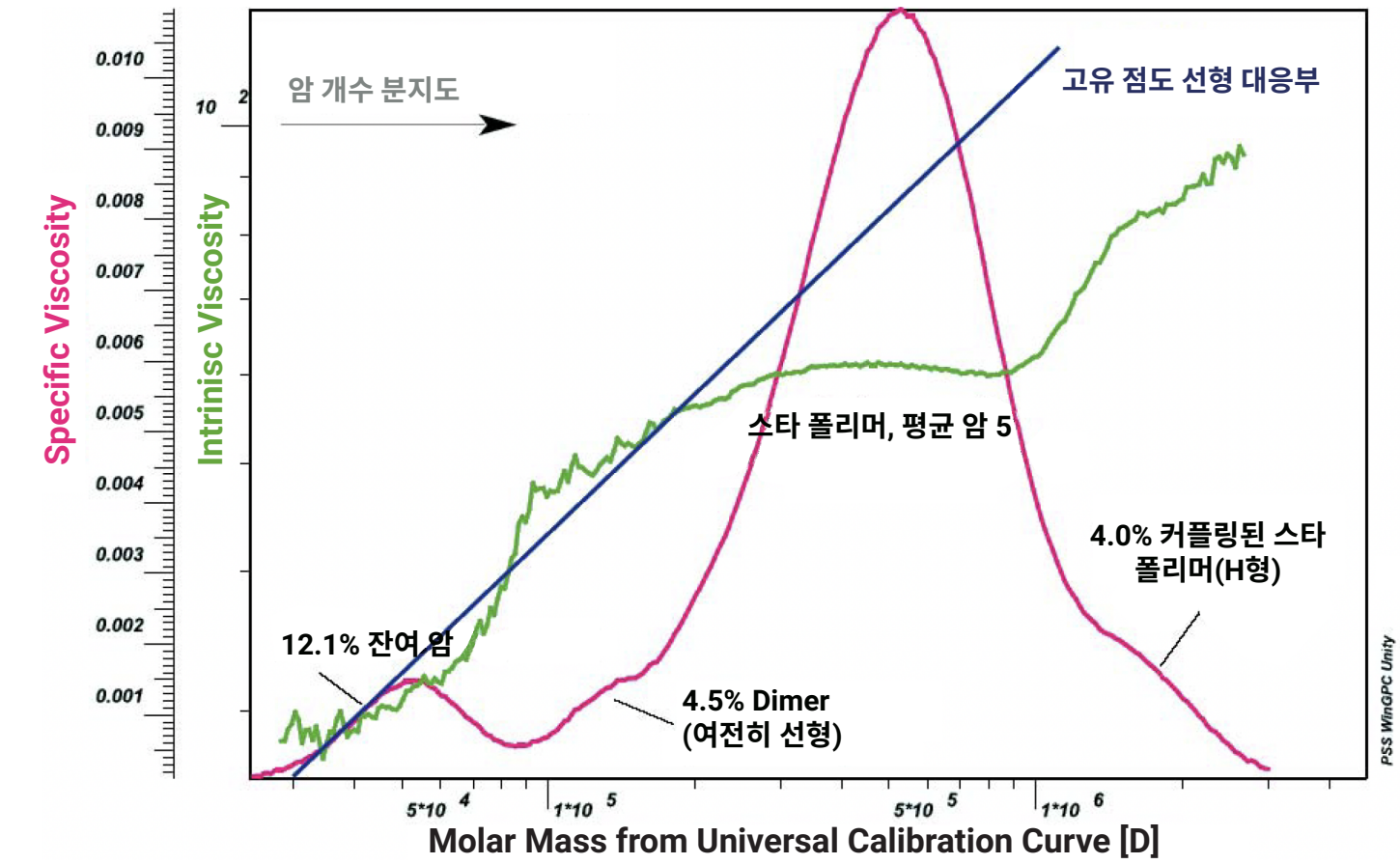


그림 2. 암 우선 스타 폴리머의 Mark-Houwink 플롯(암 결합에 의해 몰 질량 증가). 구조 변화(밀집 구체로의 무작위 코일)는 고유 점도의 최대값에 의해 반영됩니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

Mark-Houwink 플롯은 덴드리머에서도 관찰된 고유 점도의 최대값을 나타냅니다. 선형 전구체에서 시작하여 두 선형 체인의 결합은 여전히 선형 분자인 이합체를 형성합니다. 전구체 분자와 코어의 추가 반응으로 3-암 이상 있는 스타 폴리머가 생성됩니다. 여기서, 몰 질량에 따른 고유 점도의 증가는 분지형 구조의 암 수가 증가함에 따라 세그먼트 밀도가 증가하기 때문에 고유 점도가 감소하는 현상으로 상쇄됩니다. 이 분자 구조의 변화는 온라인 점도계를 사용하여 측정된 점도로 효과적으로 모니터링할 수 있습니다. 주목할 점은 최대 피크 분자량의 약 2배에서 고유 점도가 급격히 변화한다는 것입니다. 점도의 급격한 증가는 암을 통해 두 스타가 결합되면서 H-형 분자가 형성되었기 때문일 가능성이 큼니다.

위에서 설명한 합성 경로와 달리 스타 폴리머는 다기능 개시제를 사용하는 것과 같은 코어 우선 접근 방식을 통해 합성할 수도 있습니다. 이 경우 관찰 내용과 결과는 다를 수도 있습니다. 스타의 몰 질량 증가는 암의 성장으로 인해 발생하므로 구조적 변화는 없을 것입니다. 이러한 스타 폴리머의 경우 Mark-Houwink 플롯은 그림 3과 같을 것으로 예상됩니다. 각 스타 폴리머에 대해 Mark-Houwink 플롯은 동일한 몰 질량에서 더 낮은 점도로 평행하게 이동합니다. 분석 결과에서 Mark-Houwink α 는 동일하지만 Mark-Houwink K (절편)는 감소합니다. 더 낮은 고유 점도로 이동은 암의 수 증가에 비례합니다.

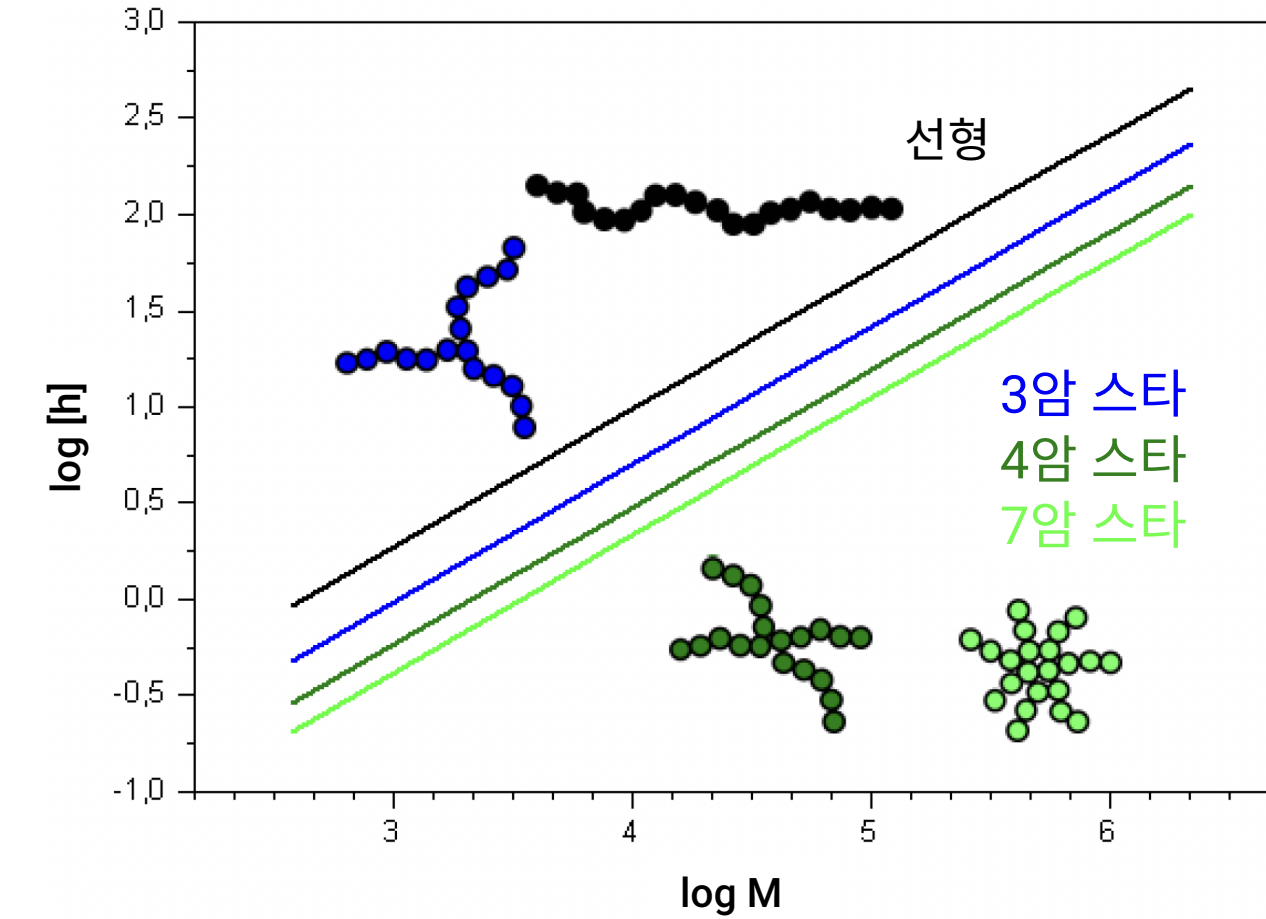


그림 3. 코어 우선을 통해 합성된 스타 폴리머에 대한 도식적 Mark-Houwink 플롯. 암은 다기능 개시제 코어에서 시작되며 몰 질량 증가는 암에 단량체 유닛의 추가 때문입니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

고급 분리 기술

앞서 언급한 바와 같이 GPC/SEC 기술의 한계는 용액 내 분자의 크기에 따라서만 분리가 이루어진다는 점입니다. 점도계 및 광산란 검출기와 같은 질량에 민감한 검출기를 사용하더라도 분지형 폴리머에 대한 분석 전략을 변경해야 하는 상황이 생깁니다.

암 우선 스타 폴리머와 같이 유체역학적 부피가 몰 질량에 따라 약간만 증가하는 경우, 크기에 따른 분리의 분리능이 제한됩니다. 이 경우 상호작용 폴리머 크로마토그래피(IPC, 화학적 조성에 의해 분리가 일어남)를 보완적 기술로 사용할 수 있습니다. 그림 4는 암이 많은 스타의 경우에도 높은 분리능으로 암 우선 스타 폴리머의 구배 분리가 가능한 크로마토그램을 나타낸 것입니다.

시료가 구조적 이질성 외에 광범위한 몰 질량 분포를 보이는 경우(예: 분지형 및 선형 체인이 존재), 동시 용리 위험이 증가합니다. 이 경우 낮은 몰 질량의 선형 체인과 유체역학적 크기가 같고 몰 질량이 큰 분지형 분자가 동일한 잔류량에서 용리됩니다. 결과적으로, 컬럼에서 용리되는 분획은 더 이상 단분산으로 간주할 수 없습니다.

2차원(2D) 분리를 적용하면 분지형 폴리머의 포괄적인 특성 분석이 가능할 수 있습니다. 2D 분리는 두 가지 독립 분리 기술을 결합하여 서로 다른 종을 정량화하는 데에도 사용할 수 있는 등고선 플롯을 생성합니다. 그림 5는 조성이 다른 선형 및 빗 모양 분자가 제대로 분리된 예를 나타낸 것입니다.

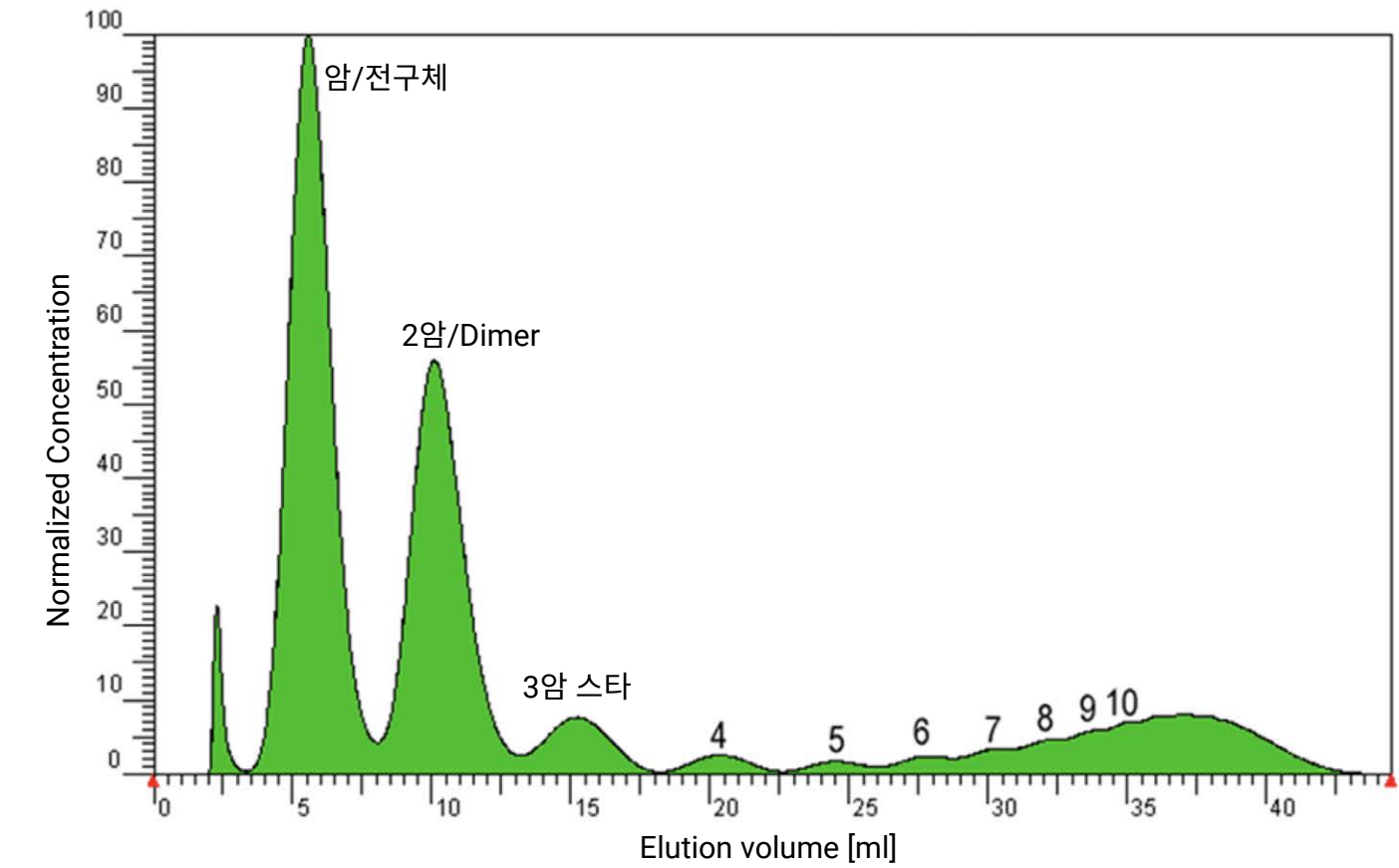


그림 4. 상호작용 폴리머 크로마토그래피(IPC)에 의한 스타 분지형 폴리머의 분리.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

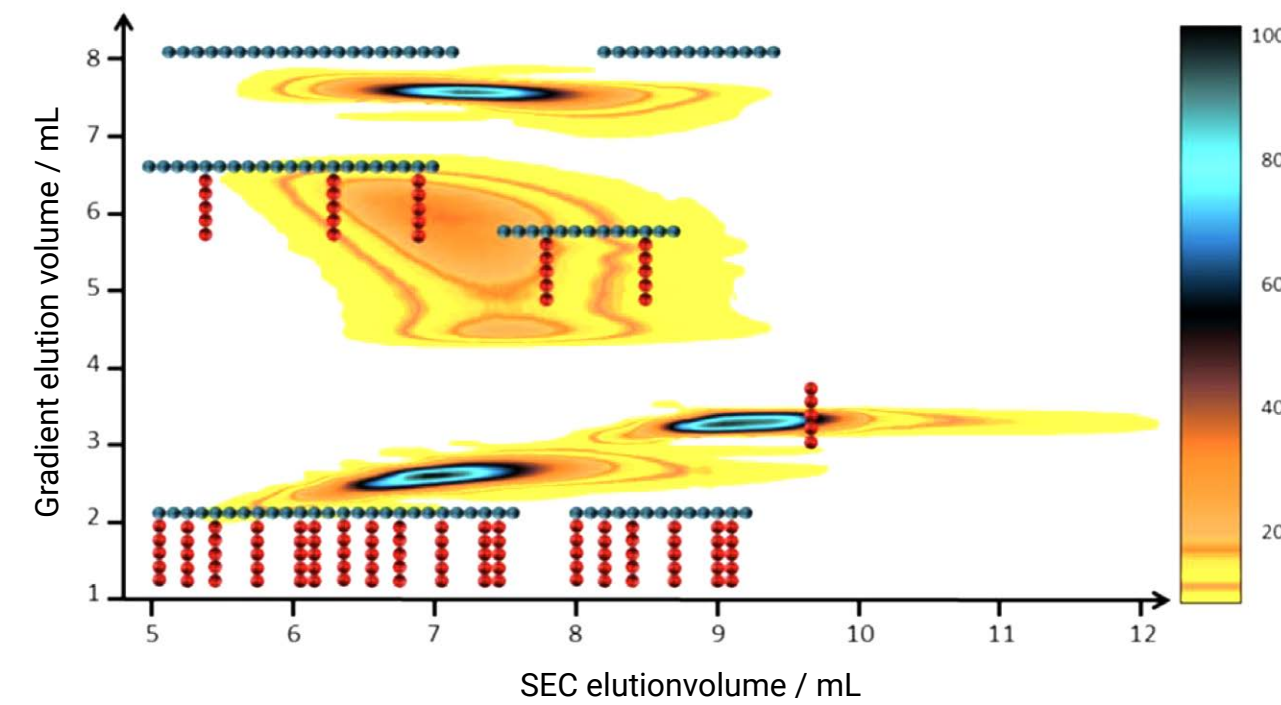


그림 5. 상호작용 폴리머 크로마토그래피(IPC)에 의한 스타 분지형 폴리머의 분리.

요약

- 분지는 중합에서 부반응으로 발생하거나 적용 특성을 조정하기 위해 도입할 수 있습니다.
- 온라인 점도계는 분자 밀도에 대한 정보를 제공하며 몰 질량으로 구조적 변화를 모니터링할 때 분지형 분자를 특성화하는 효과가 있습니다.
- 장쇄 분지를 나타내는 폴리에틸렌은 온라인 점도계로 분석할 수 있는 반면, 단쇄 분지에 대한 정보는 FTIR 검출로 얻을 수 있습니다.
- 분지형 및 선형 분자의 동시 용리가 문제가 될 수도 있습니다. 이 경우 고급 분리 기술 또는 2차원 크로마토그래피를 적용할 수 있습니다.

참고문헌

1. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC Viscometry - A Versatile Tool for Structure Determination and More. *The Column* **2012**, 8 (2), 12-16.
2. Montag, P. Tips & Tricks: GPC/SEC New Development in High-Temperature (HT) GPC/SEC. *The Column* **2008**.
3. Gerber, J.; Radke, W. Topological Separation of Linear and Star-Shaped Polystyrenes by Offline 2D Chromatography. *Polymer* **2005**, 46, 9224-9229

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

1.7. 멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

박막 형태의 멤브레인 또는 멤브레인 필터는 공극 크기와 분포가 특정 수준인 다공성 폴리머 또는 무기 재료로 만들어집니다. 멤브레인 여과 분야는 멤브레인 기술의 발전으로 오염물질 제거 및 수처리 솔루션에 대한 필요성 증가, 특정 크기를 초과하는 입자 및 미생물의 유지, 또는 용액에서 큰 용해성 거대분자의 제거 또는 추정과 같은 각종 문제를 해결하기 위해 빠르게 확장되고 있습니다. 품질 관리 및 재현성 요구가 커짐에 따라 다공성 멤브레인 재료의 공극 크기와 잔류 거동을 알아야 할 필요가 생겼습니다.

잔류 거동, 공극 크기 및 몰 질량 컷오프와 같은 멤브레인 성능 파라미터는 표준 크로마토그래피 장비로 결정할 수 있습니다. 이 멤브레인 특성화는 선택, 전처리, 마지막으로 크기 또는 분자량이 알려진 표준물질의 여과 후 GPC/SEC 분석을 수행하는 방법을 통합합니다.¹

GPC/SEC는 용액에서 용해성 거대분자를 특성화하고 크기 차이에 따라 거대분자를 분리하는 표준 기술로서, 여과되지 않은 용액과 여과된 용액을 비교하여 멤브레인의 필터 성능을 상세히 알아낼 수 있습니다.

이 접근법의 장점은 멤브레인이 실제 작동 조건에서 테스트된다는 것입니다. 멤브레인 품질로서 팽윤 또는 비영구적 다공성을 고려해야 하는 경우 이것이 특히 중요합니다.

표준물질 선택 및 전처리

원액을 준비하기 위해 알려진 크기 또는 분자량의 표준물질을 선택합니다.¹ 여과 과정에 유기 또는 수용성 용매의 사용 여부에 따라 폴리스티렌이나 덱스트란, 풀루란을 이용합니다.

물질이 넓은 몰 질량/크기 분포(다분산 지수, PDI가 높음)를 나타내는 경우, 습윤 상태에서 멤브레인의 전체 기공 크기 범위를 포괄하기에 표준물질 하나로 충분합니다. 큰 PDI가 합성 공정의 산물인 표준물질을 사용하는 것이 몰 질량 분포가 좁은 여러 시료를 혼합하는 것보다 낫습니다. 넓은 몰 질량 분포가 매끄럽고 재료가 저렴하기 때문입니다.

표준물질의 몰 질량/크기 범위는 일부가 멤브레인에 의해 유지되고 나머지는 통과할 수 있는 것으로 선택해야 합니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

그런 다음 표준물질을 원하는 용매에 녹여 원액을 얻습니다. 이 원액을 적절한 여과 조건(교차 흐름, 역압 등)을 적용하여 테스트 멤브레인에 통과시켜 여과합니다.

멤브레인 공극보다 작은 분자는 멤브레인을 통해 여과액으로 들어갈 수 있는 반면, 큰 분자는 공급측(잔류액)에 남게 됩니다. 동일한 원액을 사용하여 여러 멤브레인을 테스트할 수 있으므로 여러 멤브레인 형태의 품질 관리 또는 비교를 쉽게 수행할 수 있습니다.

GPC/SEC를 통한 시료 분석

중요한 멤브레인 특성은 원액, 여과액 및 잔류액(선택적이며 일부 접근 방식에서는 필요하지 않음)의 농도 프로파일을 구체적으로 비교하여 얻을 수 있습니다. 이렇게 채취된 시료는 등용매 펌프, 주입 시스템, 바람직하게는 막을 통과한 양을 검출할 수 있는 굴절률(RI) 검출기로 구성된 표준 GPC/SEC 크로마토그래피 시스템을 사용하여 측정됩니다.

예를 들어, 몰 질량이 다른 세 덱스트란 표준물질과 여과액으로 구성된 원액의 크로마토그램 오버레이가 그림 1에 나와 있습니다. 몰 질량 분포가 넓은 덱스트란이 사용된 경우, 크로마토그램은 최대값과 최소값을 나타내지 않고 일정한 분포로 나타납니다.

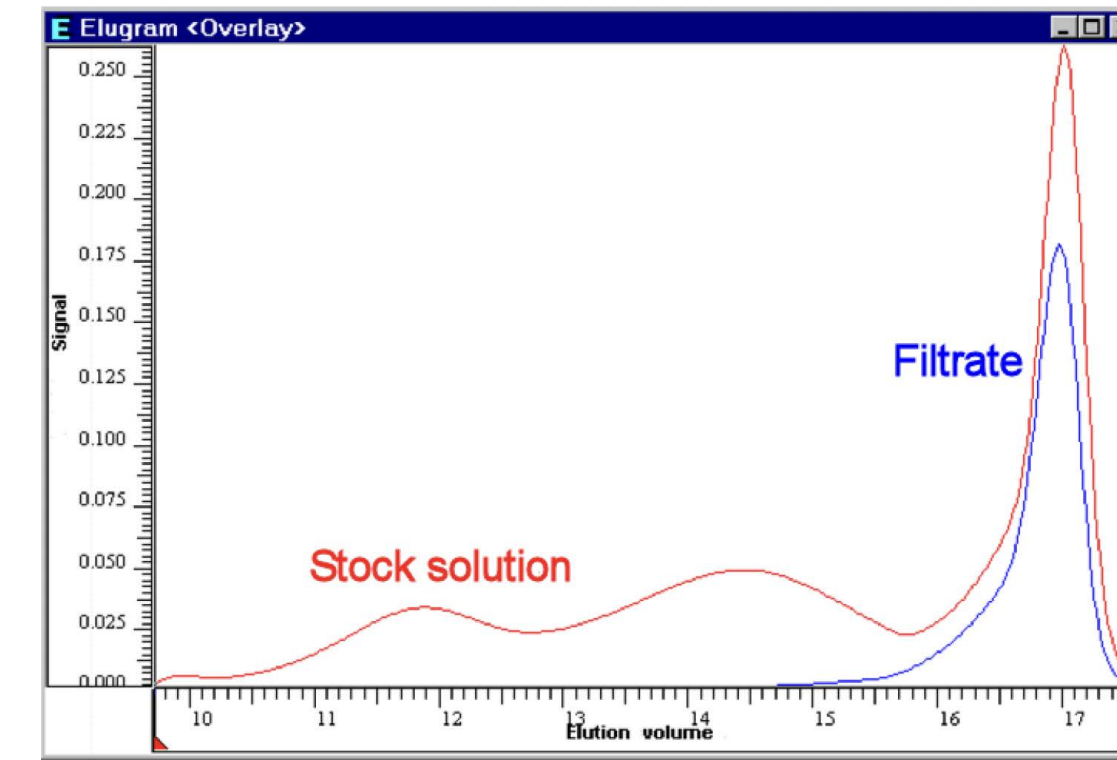


그림 1. 몰 질량(빨간색)과 여과액(파란색)이 서로 다른 세 덱스트란으로 구성된 원액의 GPC/SEC 크로마토그램 오버레이.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

원액과 여과액의 데이터를 오버레이하면 멤브레인이 낮은 용리 부피에서 GPC/SEC에서 용리되는 대부분의 높은 몰 질량/크기를 잔류시킨다는 것을 분명히 알 수 있습니다. 용리된 작은 분자의 비율(약 17mL 용리 부피 피크 비교).

크로마토그램을 비교하는 경우 예외 없이 재현 가능한 용리가 가장 중요합니다. 내부 표준물질 또는 플로우 마커를 사용하면 초기 단계에서 재현성 문제를 확인할 때 좋습니다. 플로우 마커를 사용하여 보정하면 데이터 및 결과의 품질이 향상됩니다.²

결과 및 멤브레인 파라미터

다음 단계는 다음과 같은 중요한 멤브레인 파라미터를 정량화하고 획득하는 것입니다.

- Sieve 곡선 및 머무름 효율
- 평균 공극 크기 및 공극 크기 분포
- 몰 질량 컷오프
- 크기 선택성
- 공극 접근성

그림 1과 같이 원액과 여과액의 크로마토그램을 바탕으로 이제 Sieve 곡선이라고 하는 곡선을 작성할 수 있습니다.

Sieve 곡선(S)의 값은 원액(cS), 여과액(cF) 및 (일부 응용에는 필요하지 않음) 잔류액(cR)으로부터 다음과 같이 계산됩니다.

$$S = 1 - (cF / cS)$$

그러나 다른 접근법/수식도 문헌에 설명되어 있으며, 물론 데이터에도 이를 적용할 수 있습니다.

몇 가지 멤브레인을 연속해서 특성화할 수 있으며 Sieve 곡선을 쉽게 비교할 수 있습니다.

Sieve 곡선의 몰 질량은 원액 표준물질과 동일한 유형의 표준물질을 사용하여 작성된 기존 검량선을 적용해 결정할 수 있습니다.³

또한 멤브레인의 몰 질량 컷오프를 추정할 수 있습니다. 이 몰 질량 값은 특정 시료량의 머무름을 정의합니다. 일반적으로, 90%가 몰 질량 컷오프로 사용됩니다. 그러나 머무름 파라미터를 추가하면 특정 질문에 답하거나 다른 멤브레인의 심층 비교에 유용할 수 있습니다. 예를 들어 문헌에서 가져온 파라미터를 적용하고 R_g-M 관계를 이용해 몰 질량으로부터 공극 크기를 계산할 수도 있습니다.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

그림 2는 90% 컷오프 결과와 평균 공극 크기를 포함하여 세 가지 다른 재생 셀룰로오스 멤브레인에 대한 결과입니다. 세 멤브레인 모두 서로 다른 여과 특성을 나타내며 작은 특성 차이도 오버레이 데이터로 시각화할 수 있습니다. 멤브레인의 선택성 D도 계산할 수 있습니다. 일반적으로 이 파라미터는 25% 및 75% 머무름에서 결정됩니다. $D = 1$ 인 이상적인 선택성의 경우 멤브레인은 한 크기만 공극을 통과할 수 있게 합니다. 선택성이 얻어지지 않아 선택성 파라미터 $D = \infty$ 인 경우, 모든 크기가 멤브레인을 통과할 수 있습니다.

요약

- 표준 GPC/SEC 장비를 사용하여 멤브레인을 특성화할 수 있습니다. 이를 위해 여과 실험을 통해 얻은 원액, 여과액 및 잔류액을 GPC/SEC 시료로 분석합니다.
- 플로우 마커를 사용하면 데이터 품질이 향상됩니다.
- 생성된 GPC/SEC 크로마토그램으로부터 Sieve 곡선을 계산할 수 있습니다.
- 몰 질량은 검량선을 사용하여 결정할 수 있으며 공극 크기는 R_g -M 관계로부터 계산할 수 있습니다.

참고문헌

1. Strathmann, H. Economic Assessment of Membrane Processes, in: *Separation and Purification Technology*. Marcel Dekker, **1992**.
2. Held, D.; Radke, W. Tips & Tricks: GPC/SEC Flow Marker — An Easy Concept to Increase Reproducibility, *The Column* **2016**, 12 (6), 24–27.
3. Held, D. Tips & Tricks: GPC/SEC How Do I Calibrate a GPC/SEC System? *The Column* **2008**.

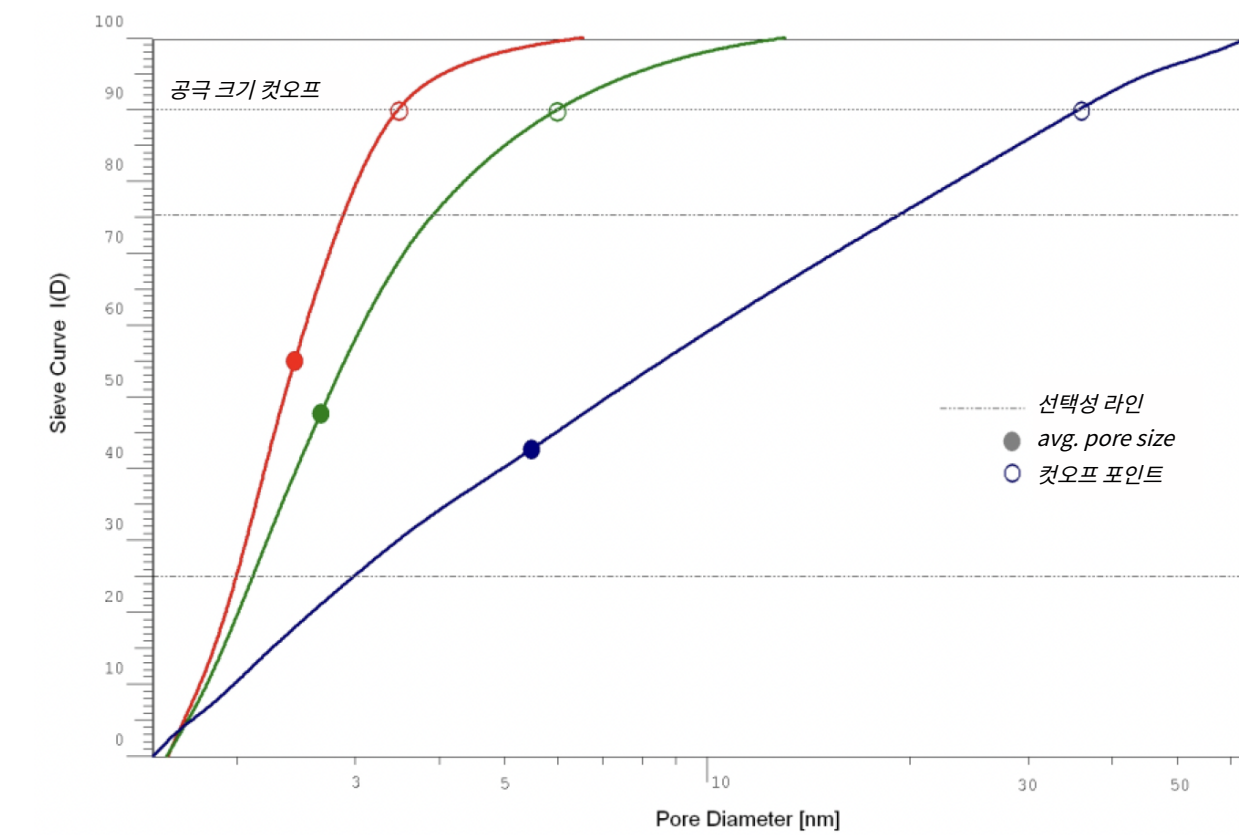


그림 2. 재생 셀룰로오스의 세 가지 평면 멤브레인에 대한 Sieve 곡선 오버레이.

내용

이 eBook 시리즈 정보

GPC/SEC 응용 소개

제품 등록 및 REACH

정량화, 그리고 평균 몰 질량 이상의 정보 확보

크기 배제 크로마토그래피를 이용한 단백질 분석

다양한 표준물질을 이용한 검량

몰 질량이 높은 시료를 분석하는 기술

분지 분석

멤브레인 필터 분석용 GPC/SEC

용어

GPC/SEC eBook 시리즈 - GPC/SEC 응용 자료

용어

BHT	Butylated hydroxytoluene (부틸화하이드록시톨루엔)	MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 ToF)
Da	Dalton (달톤) (E g/mol)	NaN₃	Sodium azide(아지드화나트륨)
DAD	Diode array detector(다이오드 어레이 검출기)	QC	Quality control(품질 관리)
DMAc	Dimethylacetamide(디메틸아세트아미드)	PDI	Polydispersity index (다분산 지수, $D = M_w / M_n$)
DMF	Dimethylformamide(디메틸포름아미드)	PLA	Poly(lactic acid)(폴리락트산)
dn/dc	Refractive index increment(굴절률 증분)	PLC	Polymer of low concern (위험성이 낮은 폴리머)
ELSD	Evaporative light scattering detector (증발 광산란 검출기)	PMMA	Polymethyl methacrylate (폴리메틸메타크릴레이트)
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry (전자 분무 이온화 질량 분석법)	PS	Polystyrene(폴리스티렌)
GPC	Gel permeation chromatography (겔 투과 크로마토그래피)	R_g	Radius of gyration(회전 반경)
LAC	Liquid adsorption chromatography (액체 흡착 크로마토그래피)	REACH	Registration, evaluation, authorization, and restriction of chemicals (화학물질의 등록, 평가, 허가 및 제한)
LC	Liquid chromatography(액체 크로마토그래피)	RI	Refractive index(굴절률, 검출/검출기)
LiBr	Lithium bromide(브롬화리튬)	SEC	Size exclusion chromatography(크기 배제 크로마토그래피)
LiCl	Lithium chloride(염화리튬)	용매(Solvent)	용질을 용해해 용액으로 만드는 액체
LS	Light scattering(광산란)	고정상(Stationary phase)	분리 장치에서 물질 분리가 일어나는 고체상
MALS	Multi-angle light scattering(다각도 광산란)	TCB	Trichlorobenzene(트리클로로벤젠)
M_n	Number-average molar mass (수 평균 몰 질량)	THF	Tetrahydrofuran(테트라히드로푸란)
이동상(Mobile phase)	크로마토그래피 시스템에 사용되는 액체 상	UV	Ultraviolet(자외선, 검출/검출기)
M_w	중량 평균 몰 질량	Ve	Elution volume(용리 부피)
M_z	z-평균 몰 질량		

추가 정보:

www.agilent.com/chem/gpc-sec

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

Agilent Community에서 기술적 질문에 대한
해답을 얻고 자료를 이용하실 수 있습니다.

community.agilent.com

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

DE11979303

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2023
2023년 6월 1일, 한국에서 발행
5994-5915KO

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

Agilent
InfinityLab

 **Agilent**
Trusted Answers

