

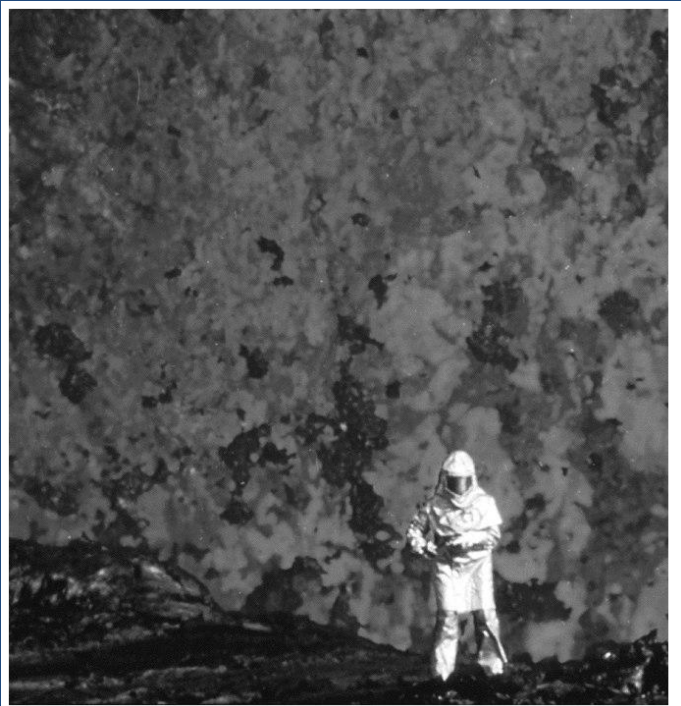
Daniel C. Harris

Exploring Chemical Analysis

Fourth Edition

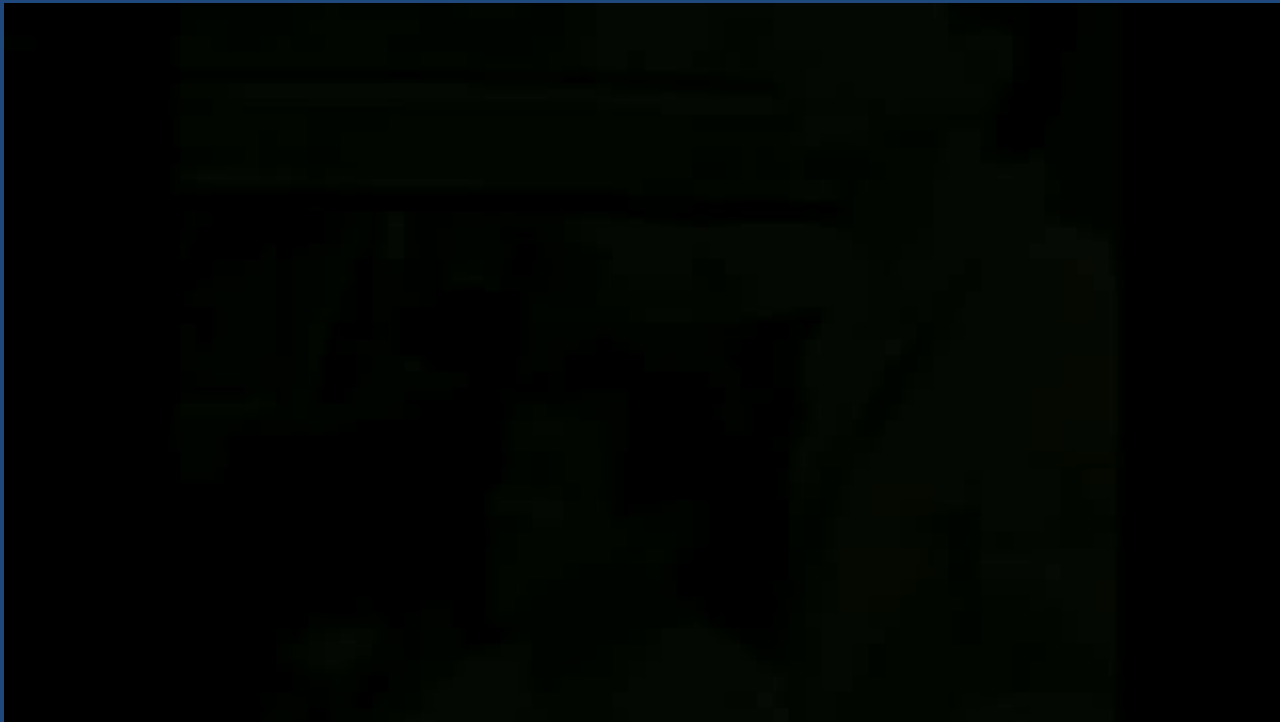
Chapter 21: Principles of Chromatography and Mass Spectrometry

21장 크로마토그래피의 원리와 질량분석법



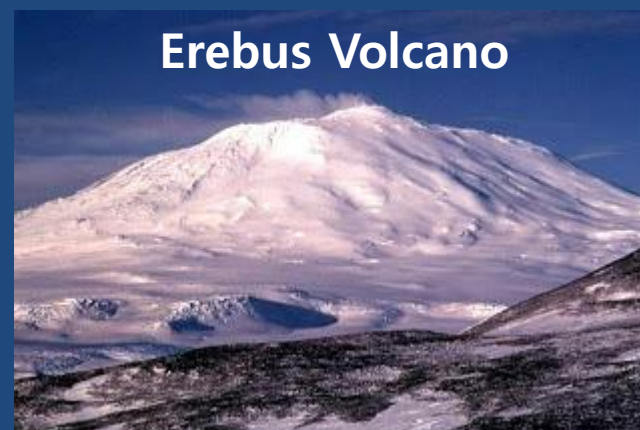
Katia and Maurice Krafft	
Born	April 17, 1942 (Katia), March 25, 1946 (Maurice)
Died	June 3, 1991 Mount Unzen, Japan
Cause of death	Killed by the 1991 eruption of Mt. Unzen
Nationality	French

Katia Krafft





로봇 Dante는 남극대륙에 있는 Erebus 화산에서 나온 방출물을 분석하기 위해 기체크로마토그래프 장비를 지니고 있다.

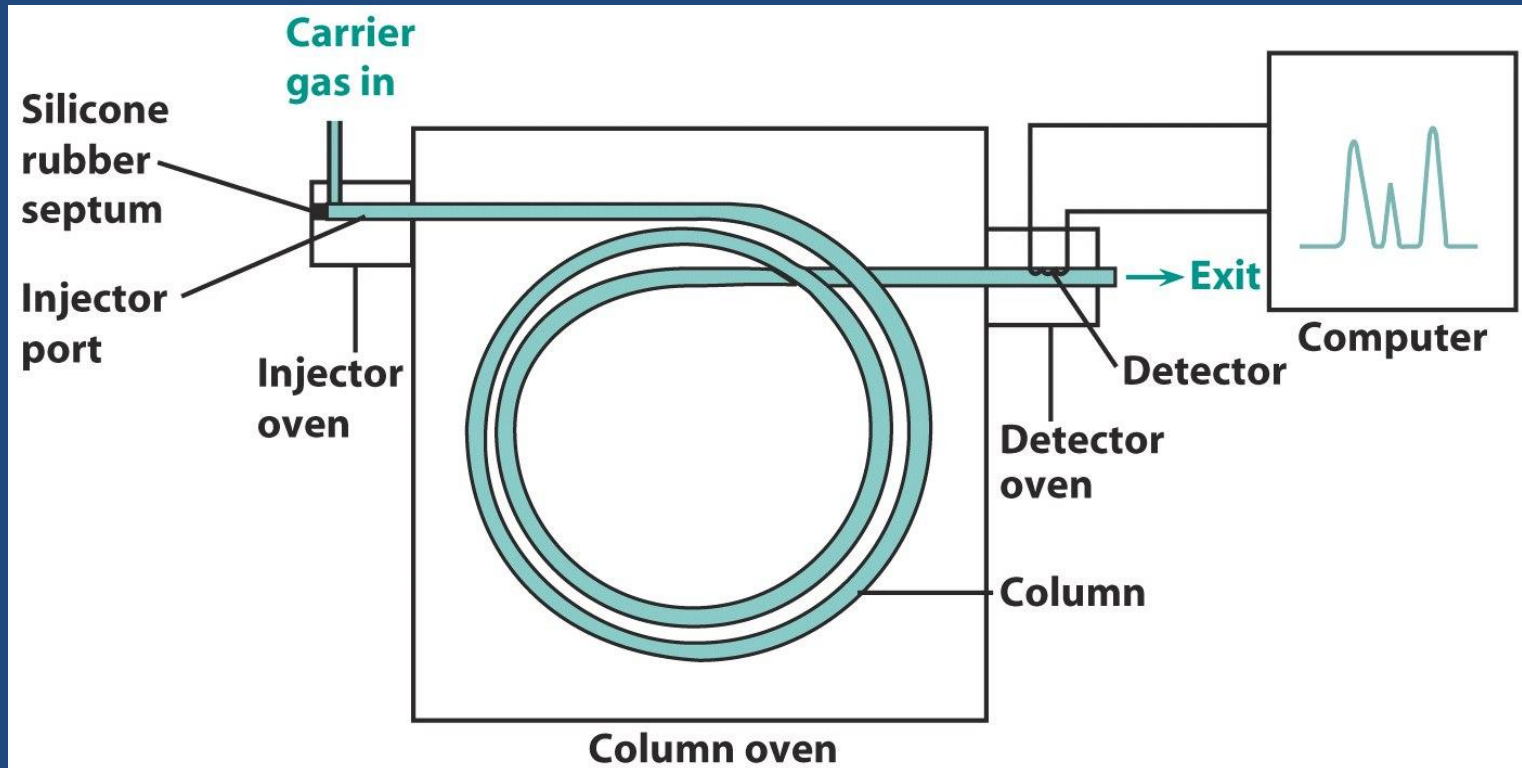


Erebus Volcano

Dante is designed to obtain samples of gas from magma in the crater lake in the Mount Erebus for a better understanding of chemistry through the use of **gas chromatography** on-board and measure the temperature inside the volcano and the radioactivity present in the volcanic material is.

21-1 크로마토그래피란?

- 크로마토그래피 (chromatography)
 - 칼럼 내에서 머무르는 시간의 차이를 이용하여 화합물을 분리하는 방법



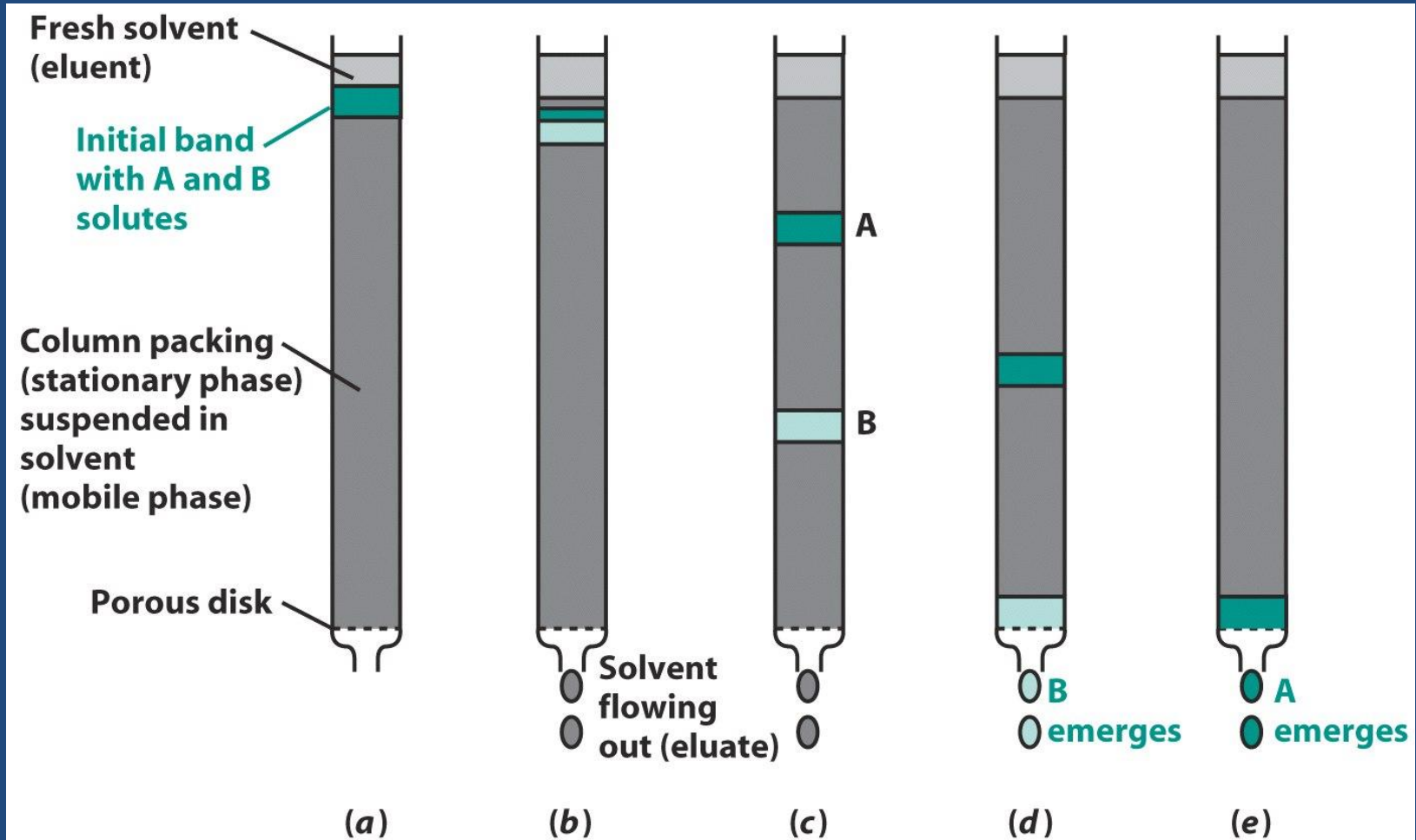
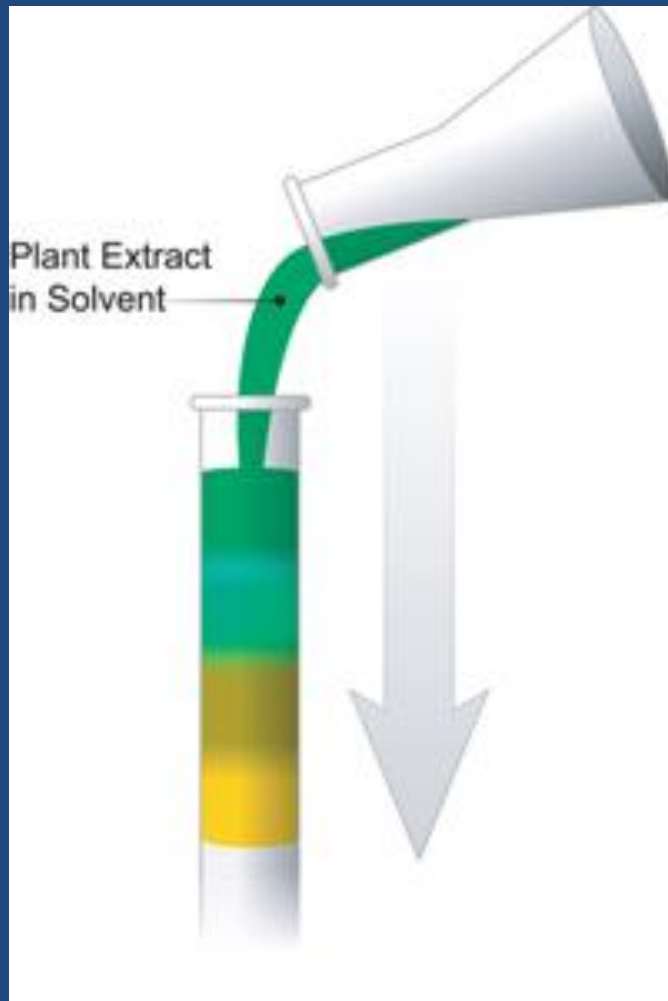


그림 21-1. 크로마토그래피 분리. 용질 A는 용질 B보다 **정지상에 대한 친화력이 더 크다.** 그래서 **A는 B보다 칼럼에 더 오래 머문다.** 크로마토그래피란 용어는 1903년에 M. **Tswett**의 실험으로부터 유래되었는데 그는 고체 CaCO_3 (정지상)로 채워진 칼럼과 탄화수소 용매 (이동상)로 식물의 색소를 분리했다. 색깔을 띤 띠들의 분리이기 때문에 "색"이라는 뜻을 가진 그리스어의 크로마토스 (chromatos)로 부터 크로마토그래피란 이름이 유래되었다.



Mikhail Tsvet (1872~1919)



Born	14 May 1872 (Asti, Italy)
Died	26 June 1919 (aged 47)
Nationality	Russia
Fields	botany
Known for	adsorption chromatography

Mikhail Tsvet invented chromatography in 1906 during his research on plant pigments. He used liquid-adsorption column chromatography with calcium carbonate as **adsorbent** and petrol ether/ethanol mixtures as **eluent** to separate chlorophylls and carotenoids. He first used the term "chromatography" in print in 1906 in his two papers about chlorophyll in the German botanical journal, *Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft*. In 1907 he demonstrated his chromatograph for the German Botanical Society

- 이동상 (mobile phase)

- 칼럼을 통해 이동하는 용매
- 기체 : 기체 크로마토그래피 (GC)
- 액체 : 액체 크로마토그래피 (LC)

- 정지상 (stationary phase)

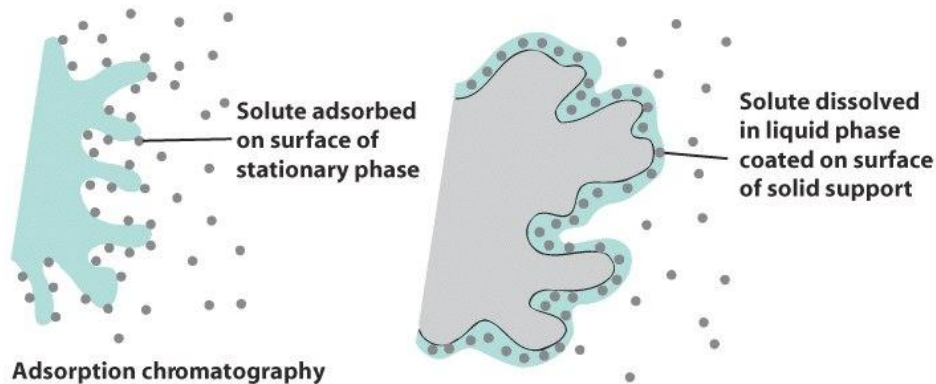
- 칼럼 안에 고정되어 머물고 있는 물질
 - 고체
 - 고체 입자에 코팅된 액체
 - 모세관의 안 벽에 코팅된 액체

Eluent in



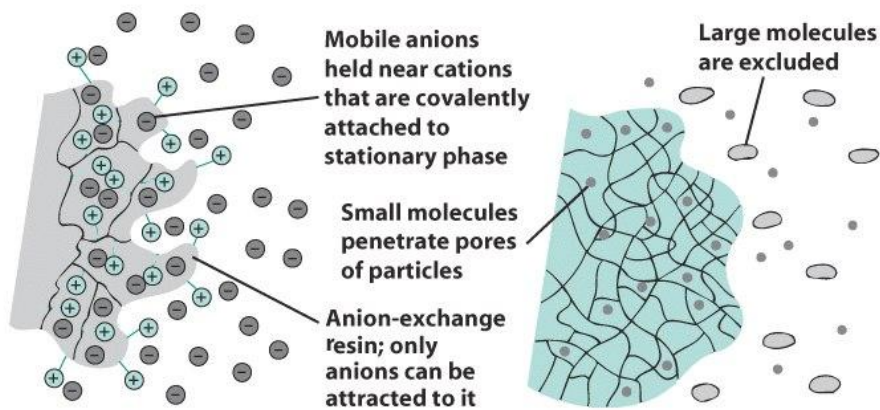
Eluate out

- **용리액 (eluent)** : 칼럼으로 들어가는 유체
- **용출액 (eluate)** : 칼럼에서 나오는 유체
- **용리 (elution)** : 크로마토그래피 칼럼으로부터 액체 혹은 기체를 통과시키는 과정



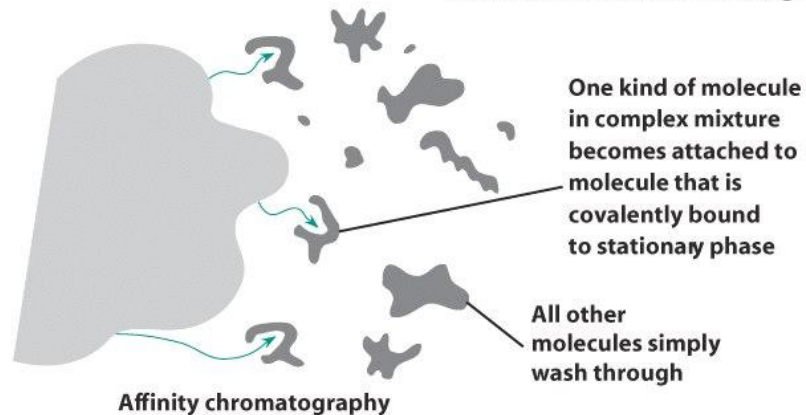
Adsorption chromatography

Partition chromatography



Ion-exchange chromatography

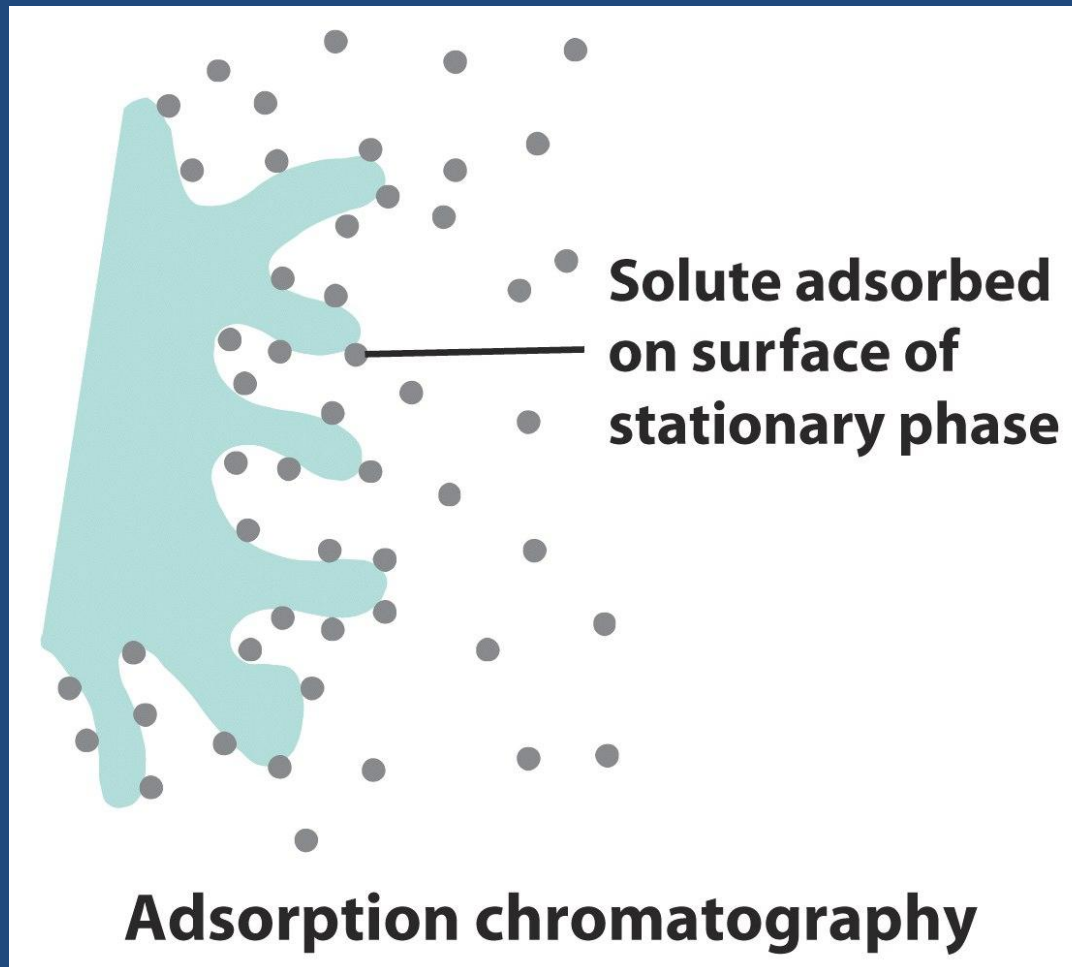
Molecular exclusion chromatography



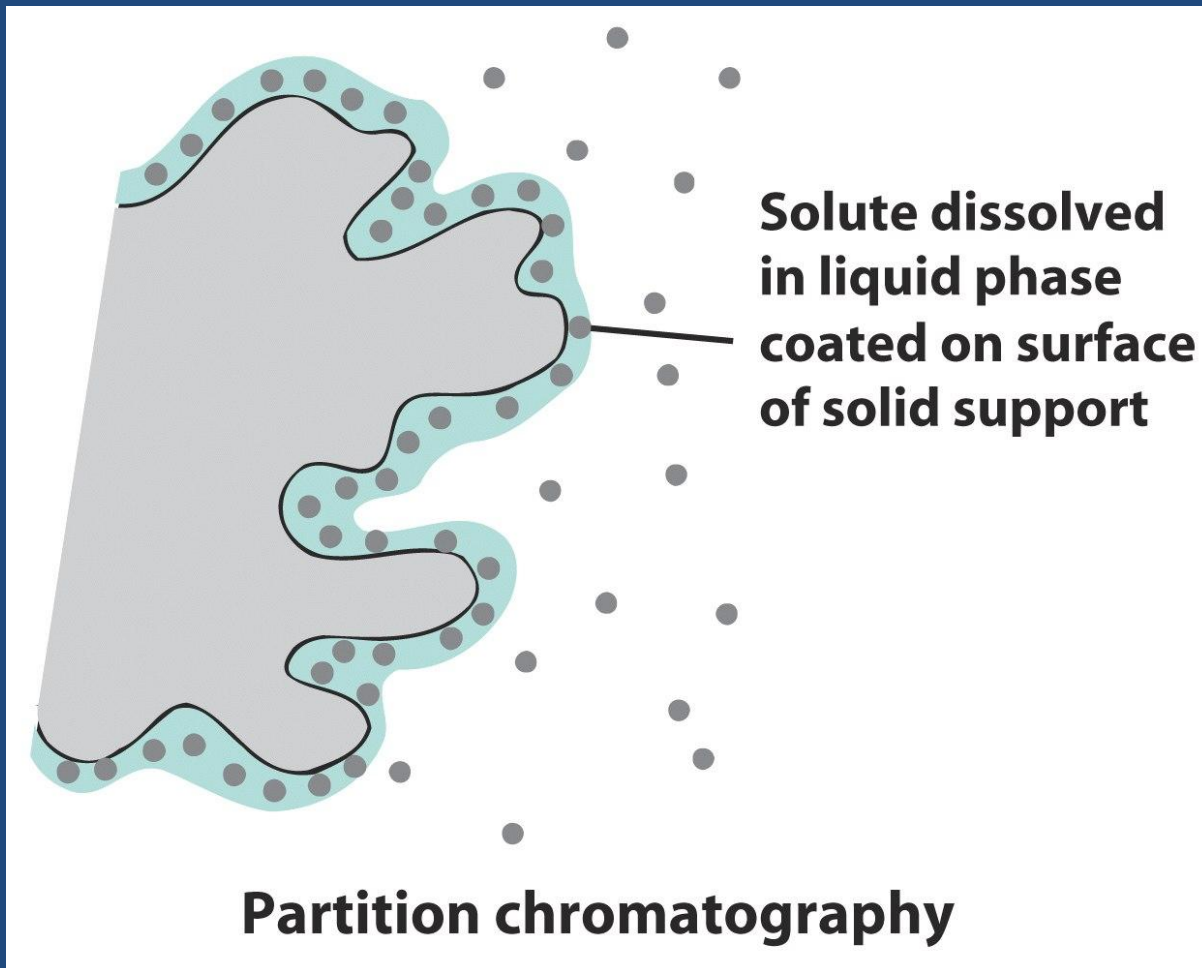
Affinity chromatography

그림 21-2. 용질과 정지상의 상호작용 형태에 따른 크로마토그래피의 종류

- 흡착 (adsorption) 크로마토그래피
 - 고체 정지상 + 액체 또는 기체 이동상
 - 용질은 고체 입자 표면에 흡착



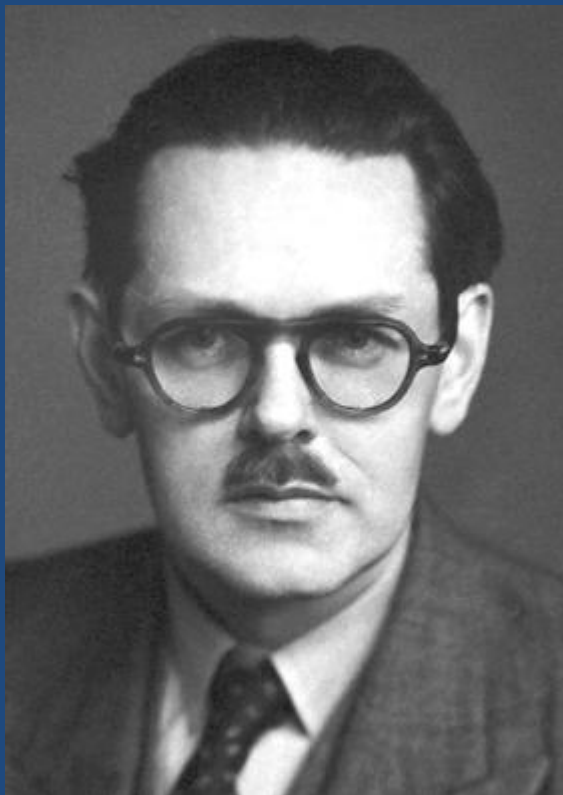
- 분배 (partition) 크로마토그래피
 - 고체 지지체 위에 코팅된 얇은 액체 정지상
 - 용질은 정지상과 이동상 사이에서 평형





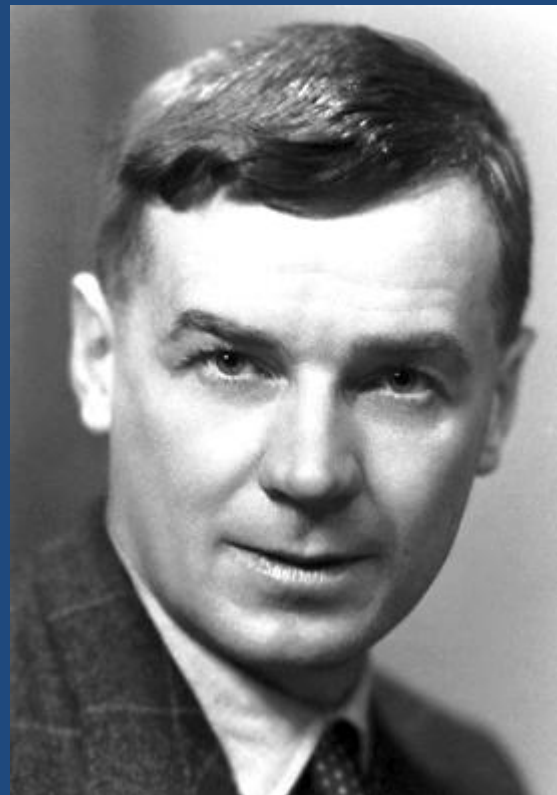
The Nobel Prize in Chemistry 1952

"for their invention of partition chromatography"



Archer John Porter Martin

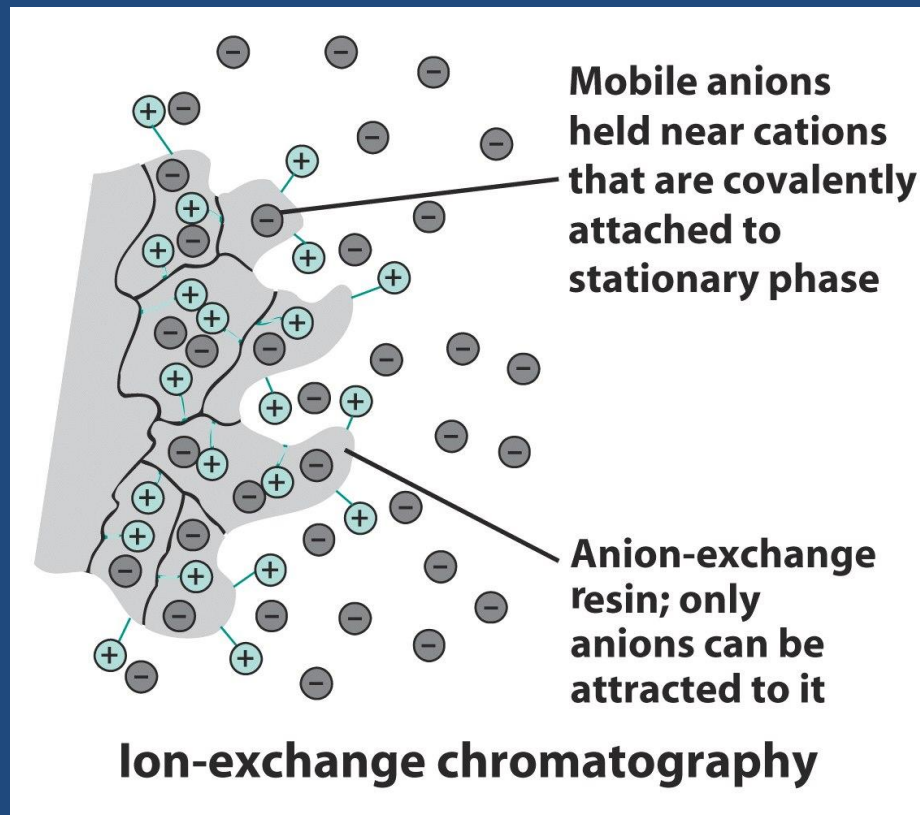
1910~2002, United Kingdom



Richard Laurence Millington Synge

1914~1994, United Kingdom

- 이온교환 (ion exchange) 크로마토그래피
 - 수지 (resin)에 $-\text{SO}_3^-$ 또는 $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ 같은 이온성기가 공유결합으로 붙은 정지상
 - 액체 이동상
 - 용질과 정지상 : 전기적 인력



Ion Exchange Chromatography

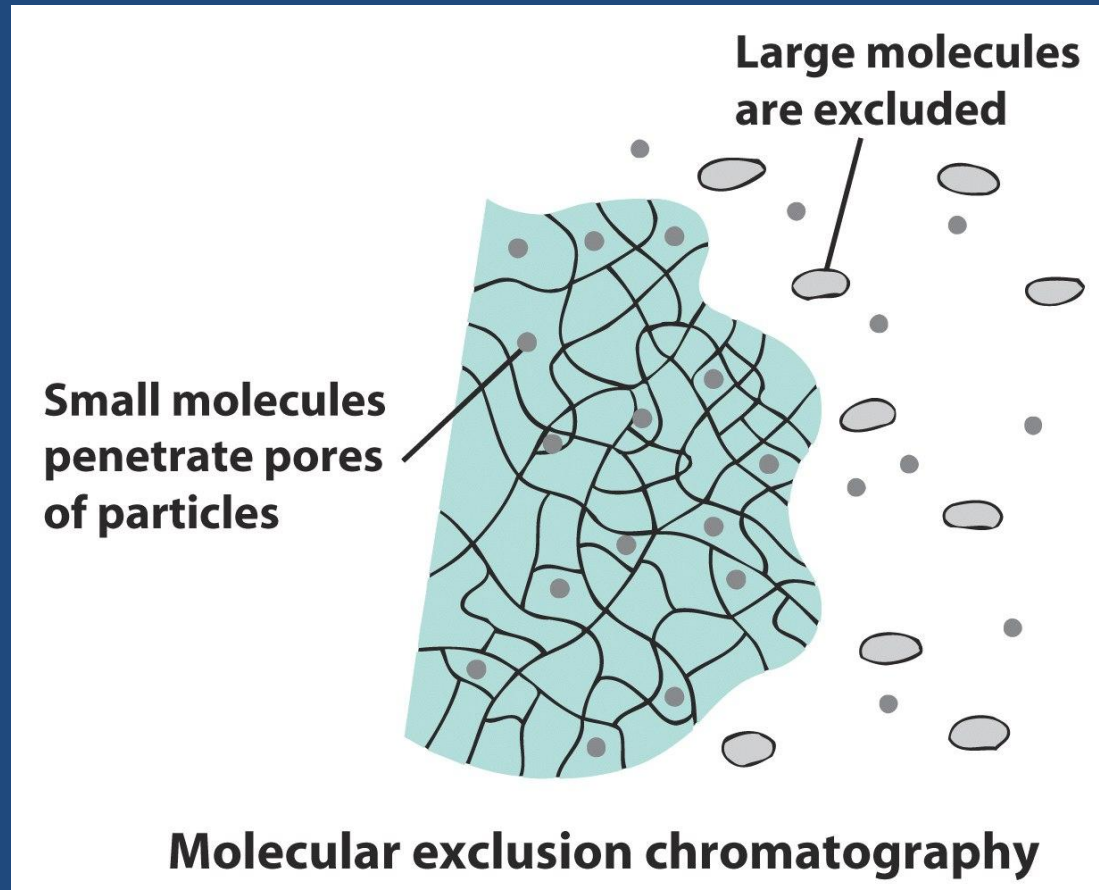
GE Healthcare
Life Sciences

The principle of
Ion Exchange Chromatography



imagination at work

- 분자배제 (molecular exclusion) 크로마토그래피
 - gel permeation, gel filtration, molecular sieve
 - 정지상과 용질 사이의 인력은 없음
 - 정지상의 구멍 → 큰 분자는 배제 → 빨리 통과



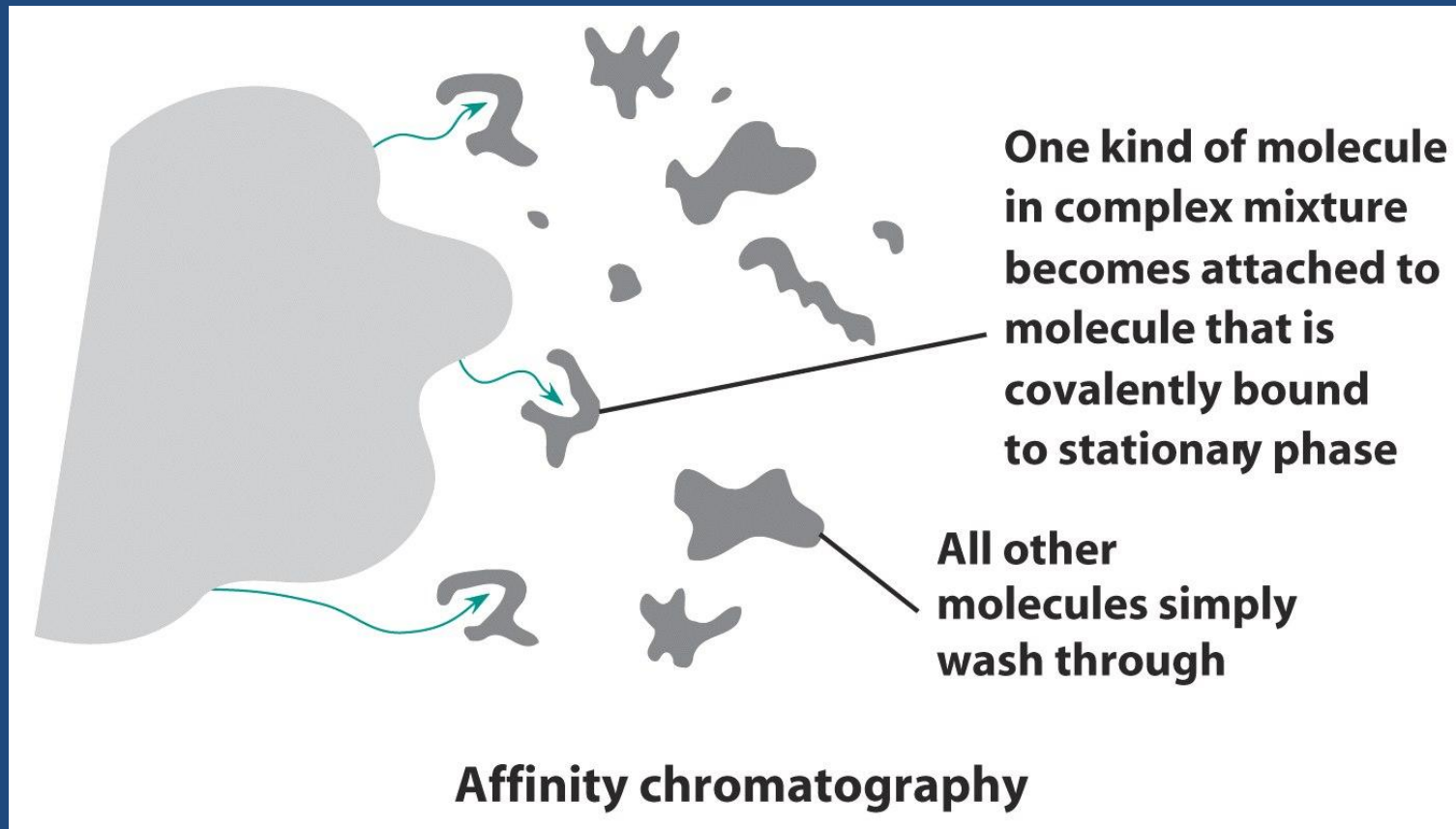
Gel filtration chromatography

GE Healthcare
Life Sciences



imagination at work

- 친화 (affinity) 크로마토그래피
 - 가장 선택적
 - 정지상에 고정된 분자와 용질 간의 선택적 상호작용 (항원 항체)



Affinity chromatography

GE Healthcare
Life Sciences

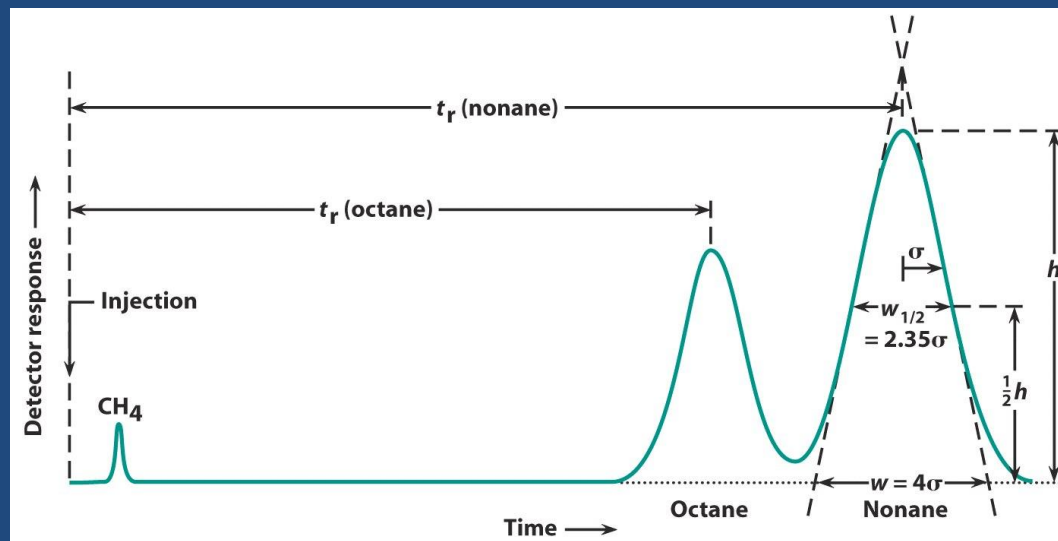
The principle of
Affinity Chromatography



imagination at work

21-2 크로마토그램의 해석

- 크로마토그램 (chromatogram)
 - 시간에 대한 검출기의 감응
 - 봉우리 : 칼럼에서 용출되는 물질
 - 머무름 시간 (retention time) t_r : 용질이 주입된 후 검출기에 도달하는 시간



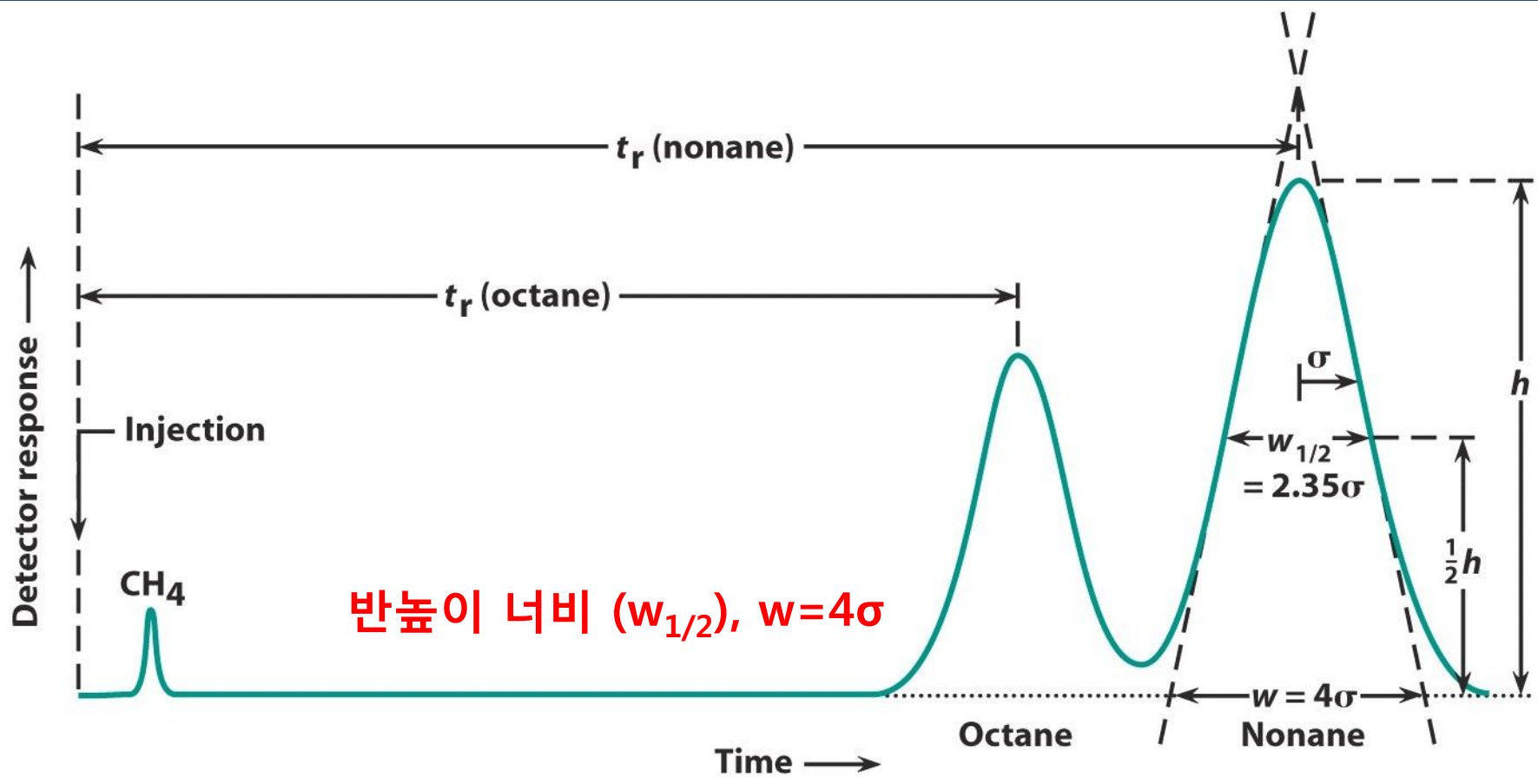
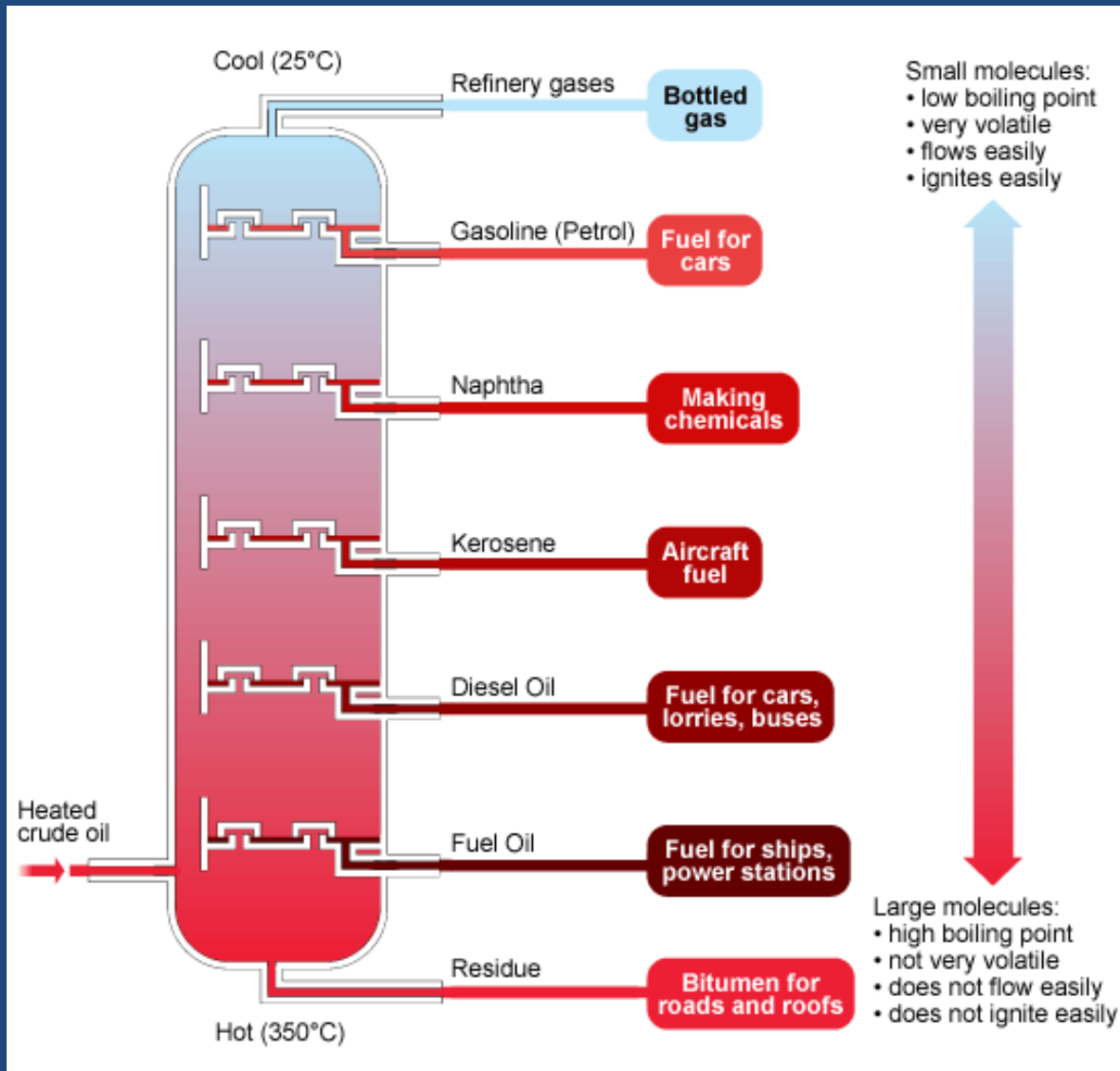


그림 21-3. 머무름 시간과 반높이 너비측정을 보이는 기체 크로마토그램 도식. 바탕선 너비 (w)는 Gauss 곡선의 가장 가파른 부분에서 탄젠트를 바탕선에 대해 외삽하여 얻는다. Gauss 곡선의 표준편차는 σ 이다. GC 에서 $0.1\sim 1\ \mu\text{L}$ 이 시료와 함께 주입한 적은 부피의 CH_4 는 보통 첫번째 용출된다.

이론단 (theoretical plate)

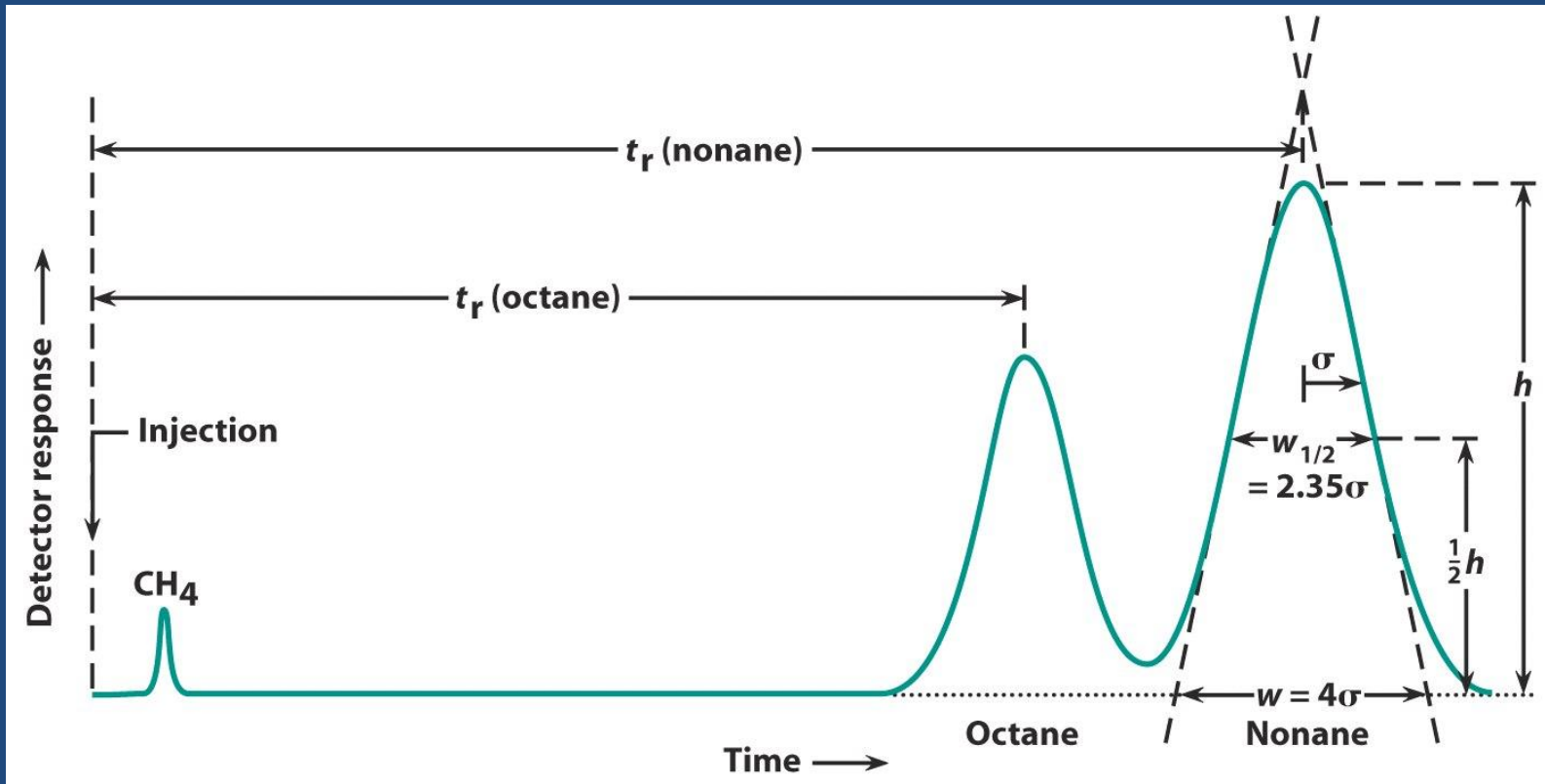


- 증류 칼럼

- 액체와 증기가 평형을 이루는 칸 (plate)으로 구성
- 칼럼의 단수 증가 → 분리 효율 증가

- 이론단

- 용질 분자가 이동상과 정지상 사이에서 평형을 이루는 불연속적인 칸
- 이론단 수의 증가 → 띠너비 감소



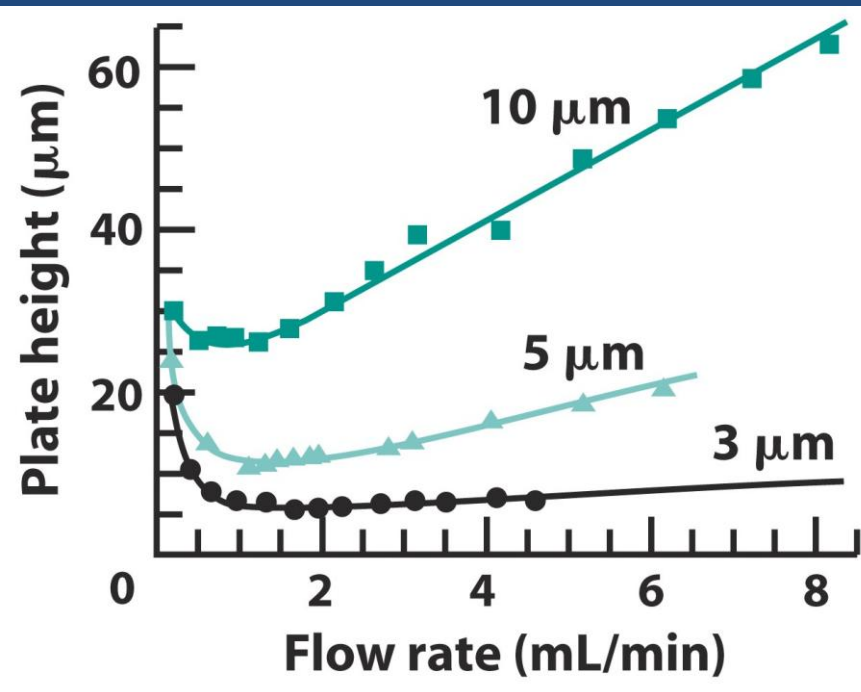
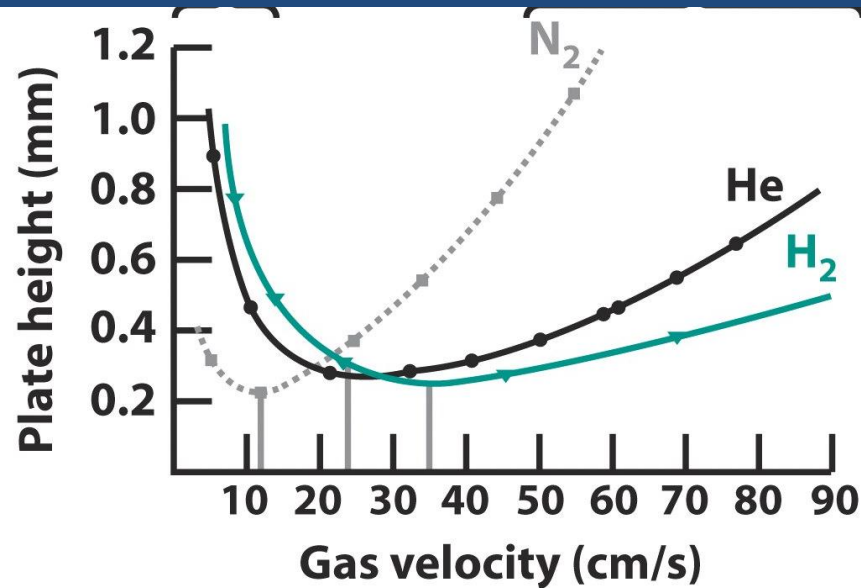
- 칼럼의 이론단수, N

$$N = \frac{5.55t_r^2}{w_{1/2}^2}$$

- 단높이 (plate height), H
 - L : 칼럼의 길이

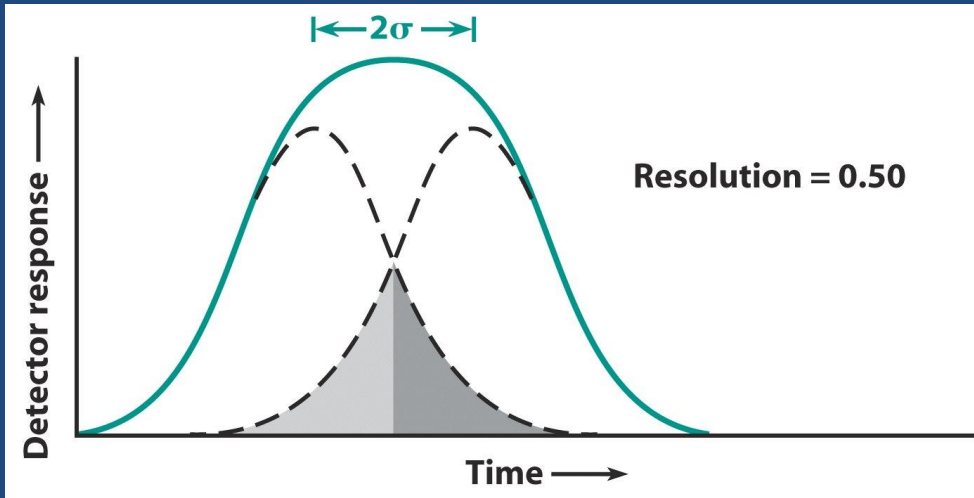
$$H = \frac{L}{N}$$

- 단높이 감소 \rightarrow 이론단수 증가 \rightarrow 봉우리 나비 감소 \rightarrow 분리 효율 증가
- GC : 100 ~ 1000 μm , HPLC : ~10 μm



GC : 100 ~ 1000 μm
HPLC : ~10 μm

분리도 (resolution), R_s



$$R_s = \frac{\Delta t_r}{w_{av}} = \frac{0.589 \Delta t_r}{w_{av1/2}}$$

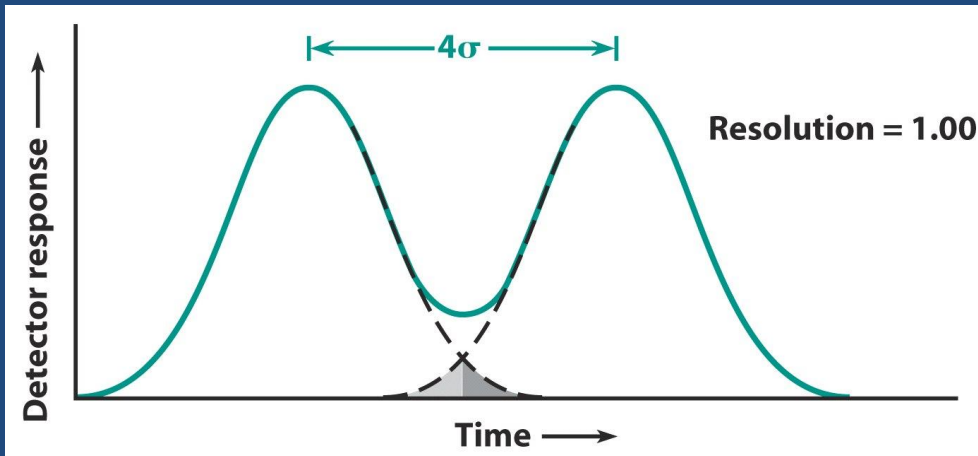


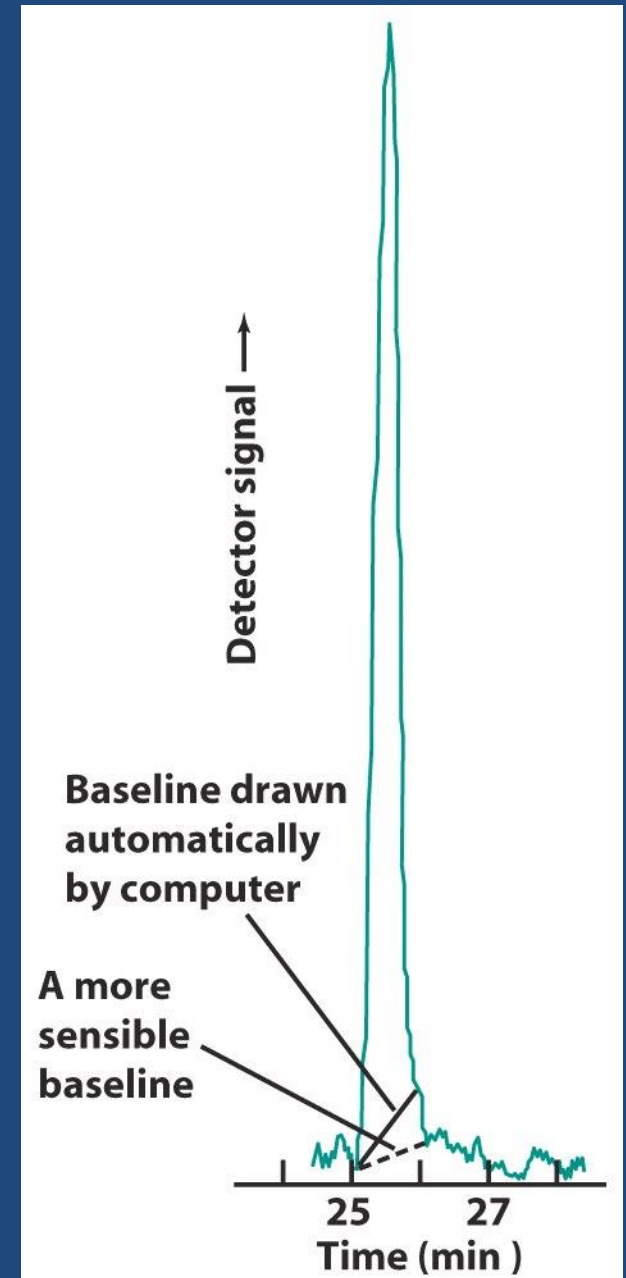
그림 21-4. 같은 면적과 크기의 Gauss 봉우리들의 분리도. 점선은 각각의 봉우리, 실선은 두 봉우리의 합, 그림자는 중첩 면적.

정성 및 정량분석

- 정성분석 (qualitative analysis)
 - 머무름 시간의 비교 : 표준시료, 미지시료
 - 소량첨가 (spike) : 미지시료에 표준시료를
spike → 봉우리의 크기가 증가 → 미지시료 =
표준시료
 - MS 또는 IR을 이용

- 정량분석 (quantitative analysis)
 - 봉우리 면적 \propto 시료의 농도
 - 내부 표준법 : 실험 조건의 변화 \rightarrow 내부표준과 시료에 동일한 효과 \rightarrow 내부표준과 시료의 봉우리 면적을 비교

그림 21-5. 크로마토그래피 봉우리의 면적을 얻기 위한 바탕선. 컴퓨터는 사람이 만드는 것과 같은 바탕선을 그리지 않을 수도 있다.



5-4 내부 표준 (internal standard)

- 내부 표준

- 분석 물질과는 다른 화합물로서 미지 시료에 첨가하는 기지 양의 화합물
- 분석물의 신호와 내부 표준의 신호를 비교하여 분석 물질의 농도 확인
- 기기의 감응이 매 측정마다 조금씩 변할 때 유용
 - HPLC, 이동상의 유속이 변하면 검출기의 감응이 변화, 표준물의 감응이 변한 만큼 시료의 감응도 변화
 - 시료의 준비, 시료의 손실이 있는 경우 내부 표준도 시료 만큼 손실, 표준물질 대 분석물의 비는 일정

$$\frac{\text{분석물질 신호의 면적}}{\text{분석물질의 농도}} = F \left(\frac{\text{표준물 신호의 면적}}{\text{표준물의 농도}} \right)$$

$$\mathbf{X} \quad \frac{A_x}{[X]} = F \left(\frac{A_s}{[S]} \right) \quad [X], [S]: \text{서로 섞은 후 분석물과 표준물의 농도}$$

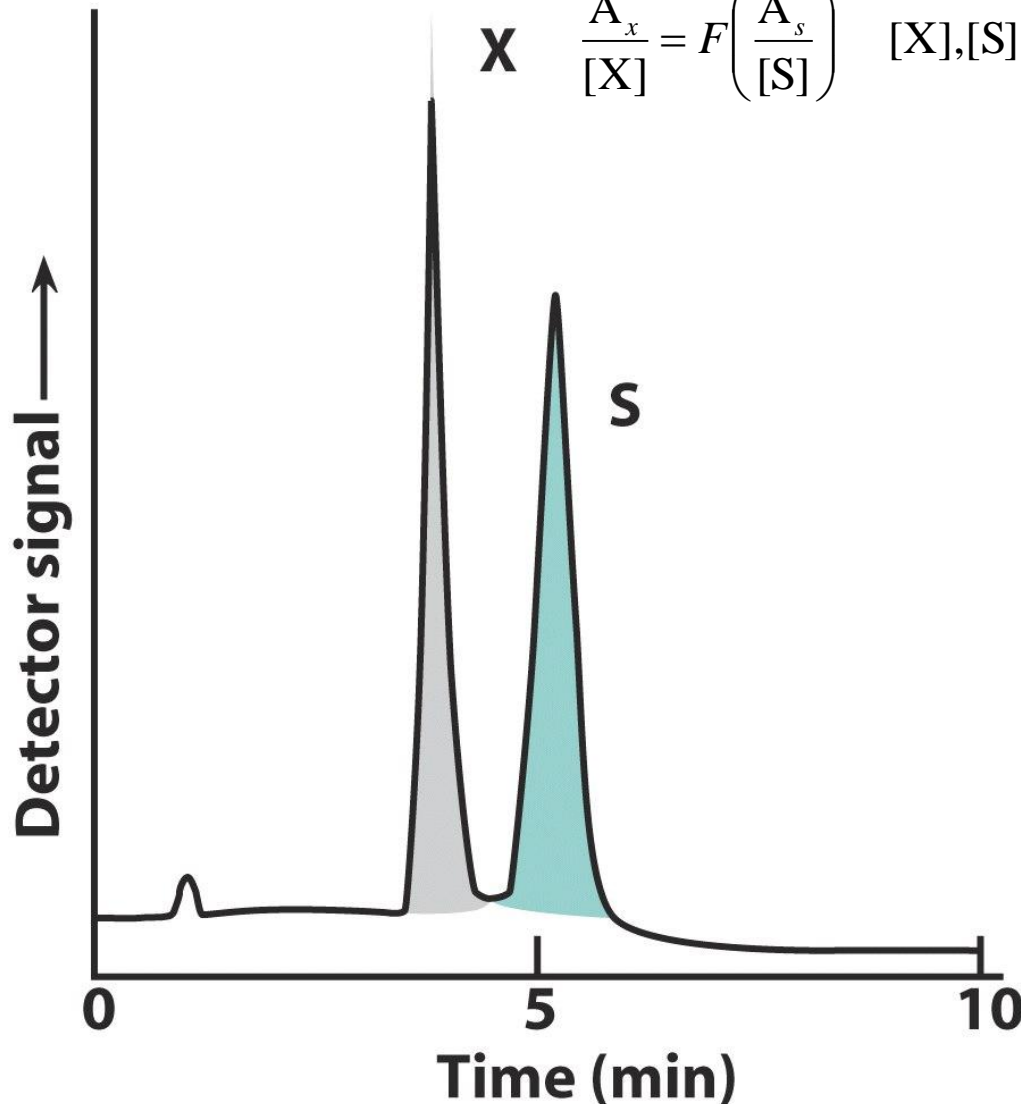


그림 5-6. 내부 표준 사용을 설명하는 크로마토그램. 아는 양의 표준물을 미지 시료 X에 첨가한다. 피크의 면적으로부터 미지 시료에 X가 얼마나 들어있는지 알 수 있다. 그러기 위해서 별도 실험을 통해 각 화합물의 기지 양에 대한 상대 감응을 측정할 필요가 있다.

대규모 분리

- 분석용 크로마토그래피
 - 혼합물을 분리, 확인, 정량, 소규모
 - 길고 얇은 칼럼 사용 : 좋은 분리도
- 제조용 크로마토그래피
 - 혼합물 중의 성분을 유리, 대규모
 - 짧고 굵은 칼럼 : 분리도 감소
- 2 mg의 혼합물 분리 → 1.0 cm 직경의 칼럼
- 20 mg의 혼합물 분리 → ? cm

- 규모 계산식
$$\frac{\text{큰 주입(g)}}{\text{작은 주입(g)}} = \left(\frac{\text{큰 칼럼의 반경}}{\text{작은 칼럼의 반경}} \right)^2$$
- 분리도를 유지하면서 규모를 크게
 - 칼럼의 단면적 \propto 분석물질의 질량
 - 칼럼의 길이는 일정하게 유지
 - 부피 흐름 속도 \propto 칼럼의 단면적
 - 시료 부피 \propto 분석물의 질량