임상검사기기학 및 기초통계

중원대학교 임상병리학과

홍석현



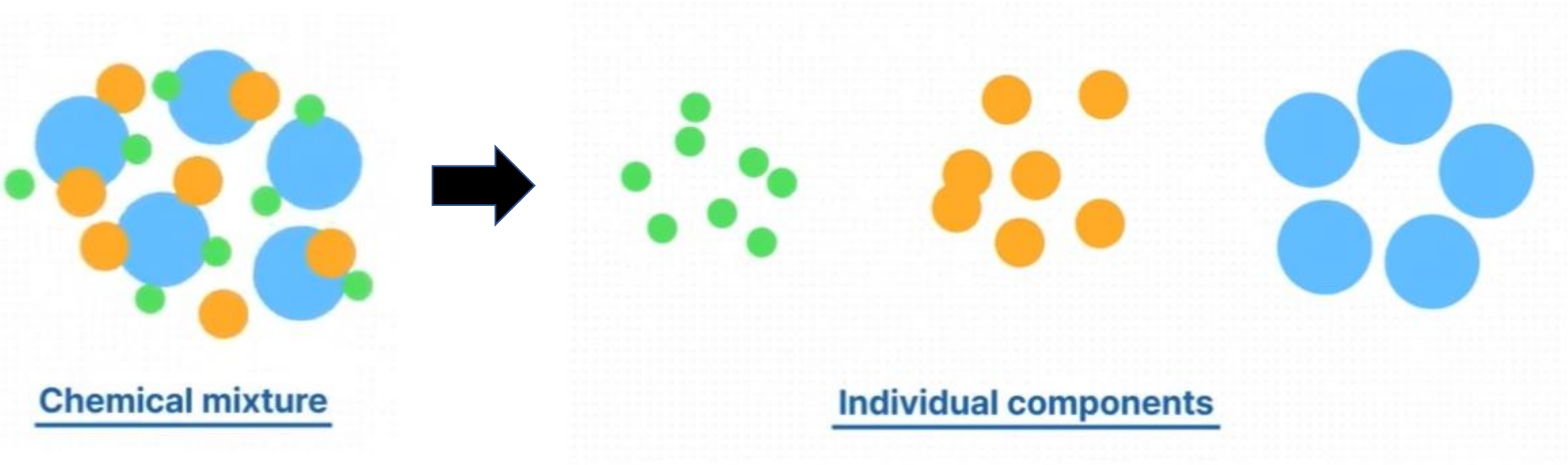
HPLC 장비

7장 : 크로마토그래피 (Chromatography)

• 크로마토그래피(Chromatography)

➢ 크로마토그래피(Chromatography)

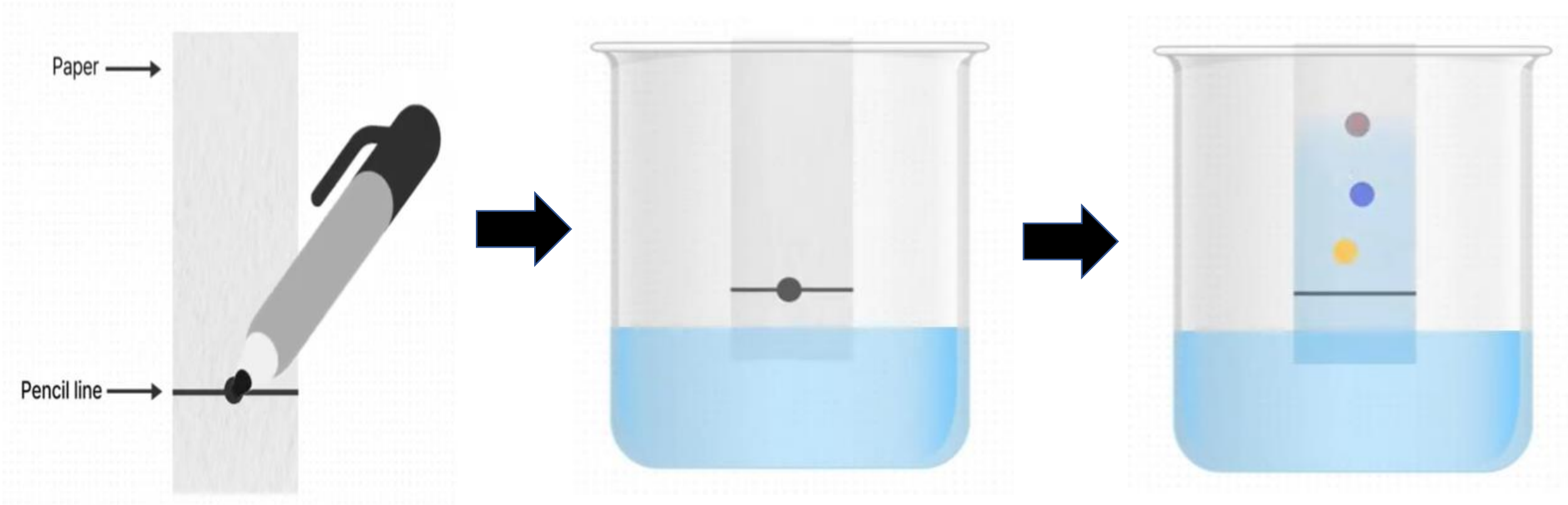
- 원리: 분자량 크기와 이온성 및 친화성 크기에 따라(이동속도 차이) 분리하는 기구
(혼합물에서 특정물질을 추출하여 분리)



• 크로마토그래피(Chromatography)

➢ 종이 크로마토그래피

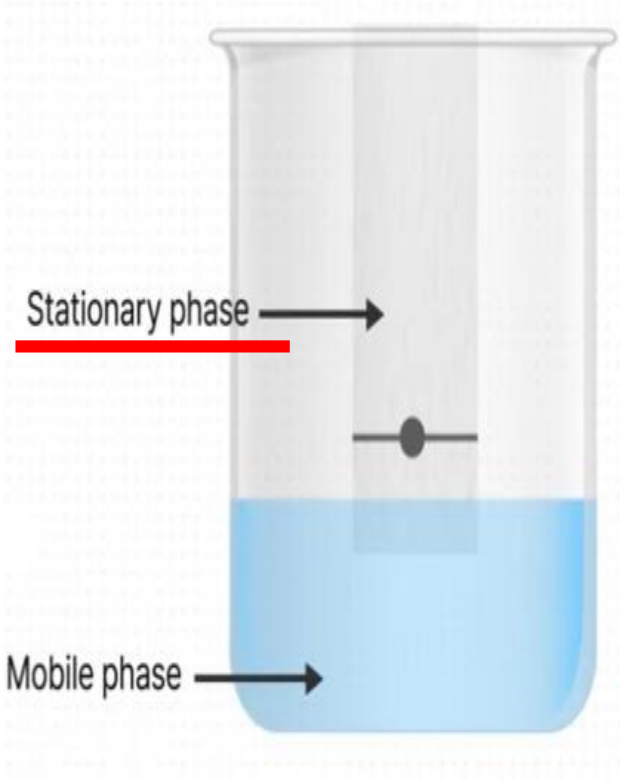
1단계 2단계 3단계



- 크로마토그래피(Chromatography)-용어(1)

1. 고정상(정지상, Stationary phase)

- 의미: 움직이지 않고 고정되어 있는 상
- 이동상에 실린 시료 성분들이 고정상과 상호작용하면서 머무는 시간(체류 시간)이 달라지고, 이 차이로 성분들이 분리
- **친화도(고정상에 부착정도)**에 따라 이동속도가 달라짐
  : 고정상에 **친화도가 높을수록**(흡착이 잘 됨) 늦게 이동



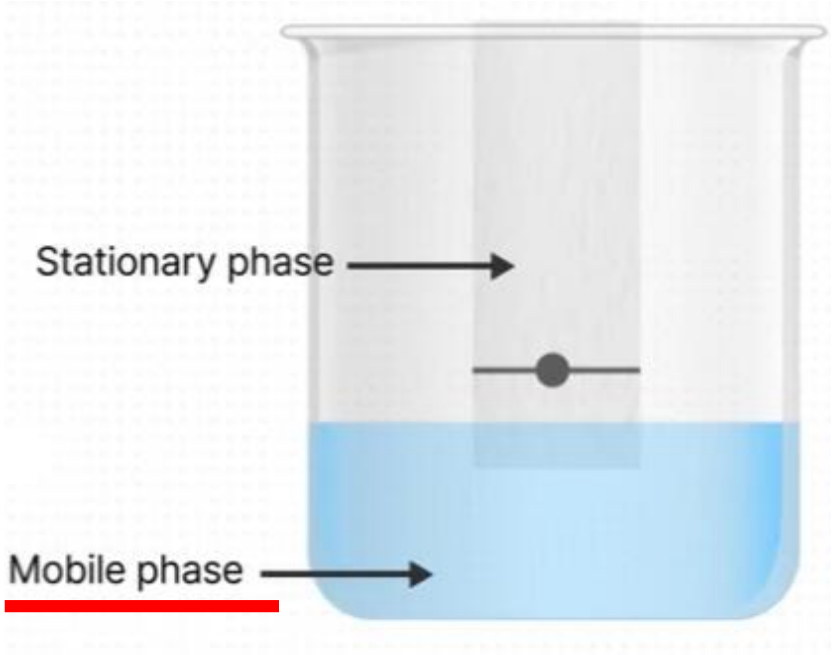
- ex) 고정상 종류
  1) 종이 크로마토그래피 → 종이의 섬유(cellulose)
  2) 박층(Thin layer) 크로마토그래피 → 실리카겔, 알루미나
  3) 컬럼(column) 크로마토그래피 → 실리카겔, 알루미나, 이온교환수지
  4) 가스 크로마토그래피 → column 내벽에 코팅된 액체나 고체

• 크로마토그래피(Chromatography)-용어(1)

2. 이동상(Mobile phase)

- 의미: 시료를 운반하며 고정상을 통과하는 움직이는 상
- 시료의 각 성분이 이동상에 잘 녹으면 빠르게 이동
- 시료 성분을 고정상 위로 이동, 각 성분의 고정상과의 상호작용 차이로 분리
- ex) 이동상 종류

1) 종이/박층 크로마토그래피 → 용매(에탄올, 액체)
2) 액체 크로마토그래피(LC, HPLC) → 액체 용매
4) 가스 크로마토그래피(GC) → 기체(질소, 수소 등)



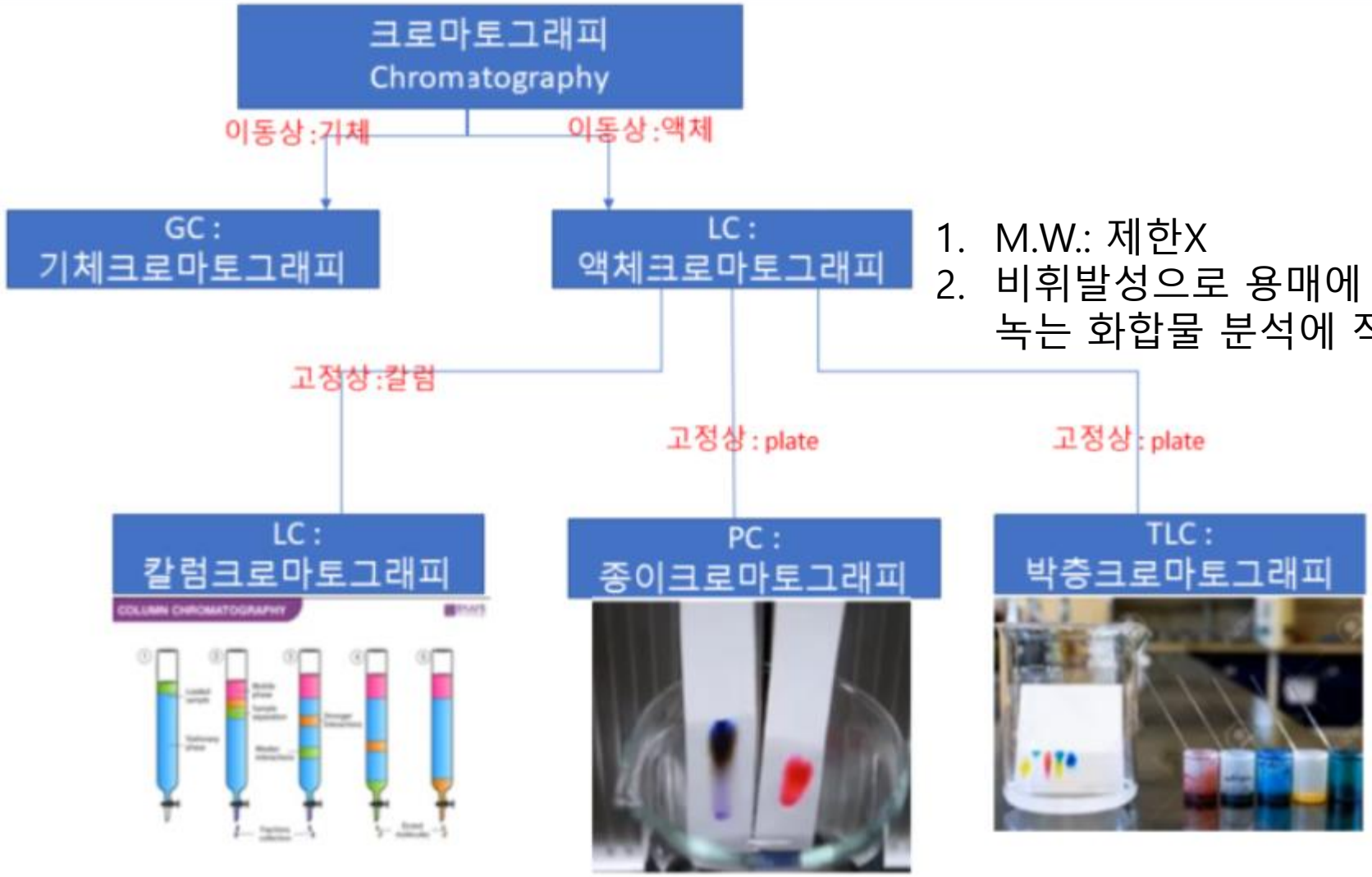
• 크로마토그래피(Chromatography)-용어(2)

- Chomatography: 방법
  - 분리 기술(방법) 자체를 의미
  - 고정상과 이동상 사이의 상호작용 차이를 이용해 성분별로 분리하는 실험 방법
- Chromatograph: 기기(장치)
  - 크로마토그래피 실험을 수행하는 기계나 장치
- Chromatogram: 결과(데이터)
  - 크로마토그래피 분석 결과로 얻는 그래프나 기록지



1. M.W.<500
2. 열에 안정한 휘발성 화합물 분석에 적합

크로마토그래피의 분류



1. M.W.: 제한X
2. 비휘발성으로 용매에 잘 녹는 화합물 분석에 적합

• 크로마토그래피(Chromatography) 분류

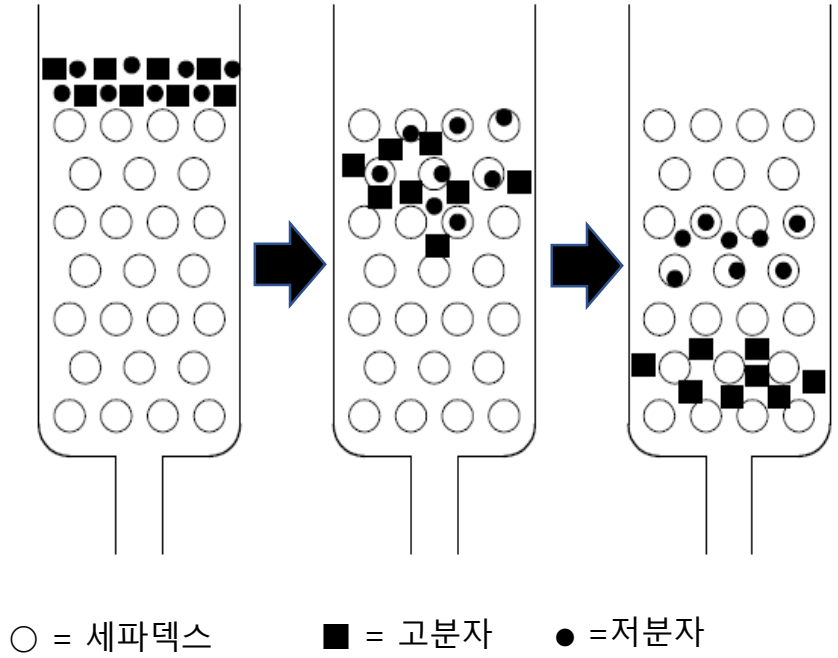
➢ 크로마토그래피(Chromatography)

- **고정상**(정지상, Stationary phase)에 따른 분류

고정상	종류	비고
Column	관 크로마토그래피	관 형태에 고정상을 채우고 이동상을 흘림
Planner	종이 크로마토그래피 (paper, PC)	종이를 고정상으로 사용
	박층(Thin Layer, TLC)	얇은 막 위에 얇게 고정상 도포

- **이동상**(Mobile phase)에 따른 분류

가스 크로마토그래피(GC)	이동상이 기체
액체 크로마토그래피(LC)	이동상이 액체(대표: HPLC)



• 크로마토그래피(Chromatography) - 분류

➢ 크로마토그래피(Chromatography)

1. 액체 크로마토그래피

1) Column –LLC / LSC

LLC - a. 분배(partition)

LSC
- b. 흡착(adsorption)
- c. 이온교환(Ion exchange)
- d. 크기 배제(size exclusion)
- e. 친화성(affinity)

2) Planner

a. 박층(thin layer)

b. 종이(paper)

2. 가스 크로마토그래피

1) 기체-고체 크로마토그래피(GSC)

2) 기체-액체 크로마토그래피(GLC)

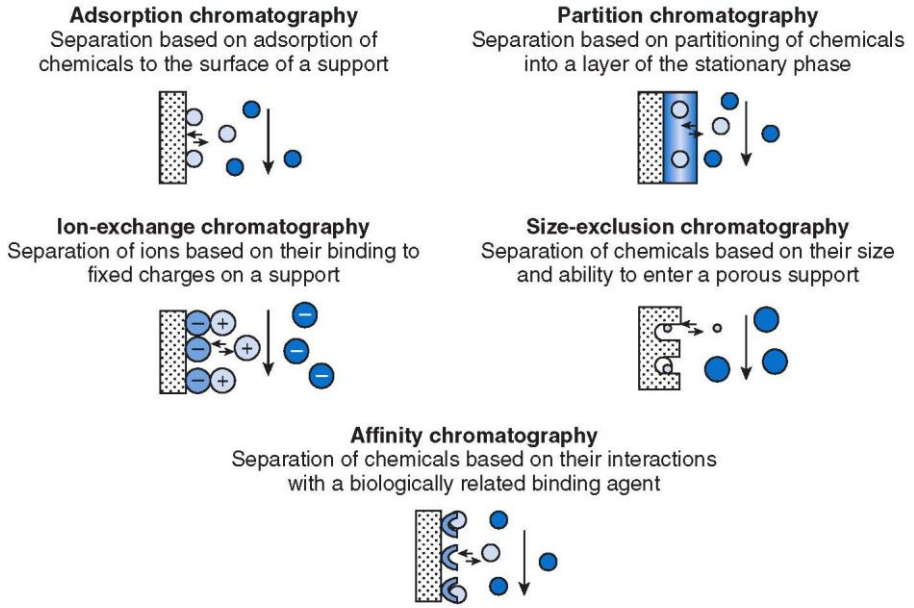


그림 9.11 분리 메커니즘에 기초한 액체 크로마토그래피의 주요 유형

- LLC – liquid / liquid chromatography
- LSC – liquid / Solid chromatography

• 크로마토그래피(Chromatography): LC-Column

➢ 분배(partition) – **고정상: 액체** / 이동상: 액체

- 원리: **분배 계수(용해도)** 차이에 의해 성분을 분리
- Partition(분배): 어떤 물질이 두 상(phase) 사이에 나누어 분포하는 현상
- 이동상에 용해된 성분의 혼합물이 column에 도입
- 친화도에 따라 이동: 이동상에 더 강하게 끌리는 화합물은 column을 통해 빠르게 이동,
  : 고정상에 더 강하게 끌리는 화합물을 column을 통해 느리게 이동
- 흡착제: Silica, Aluminia(알루미나) 등

※ 분배계수(partition Coefficient, K)

: 분배 평형 상태에서 용질이 두 상에 존재하는 농도 비

- C_1: 고정상에 존재하는 용질의 농도
- C_2: 이동상에 존재하는 용질의 농도

$$K = \frac{C_1}{C_2}$$

→ K가 큼: 용질이 고정상에 더 많이 존재 → 이동이 느림

K가 작음: 용질이 이동상에 더 많이 존재 → 이동이 빠름

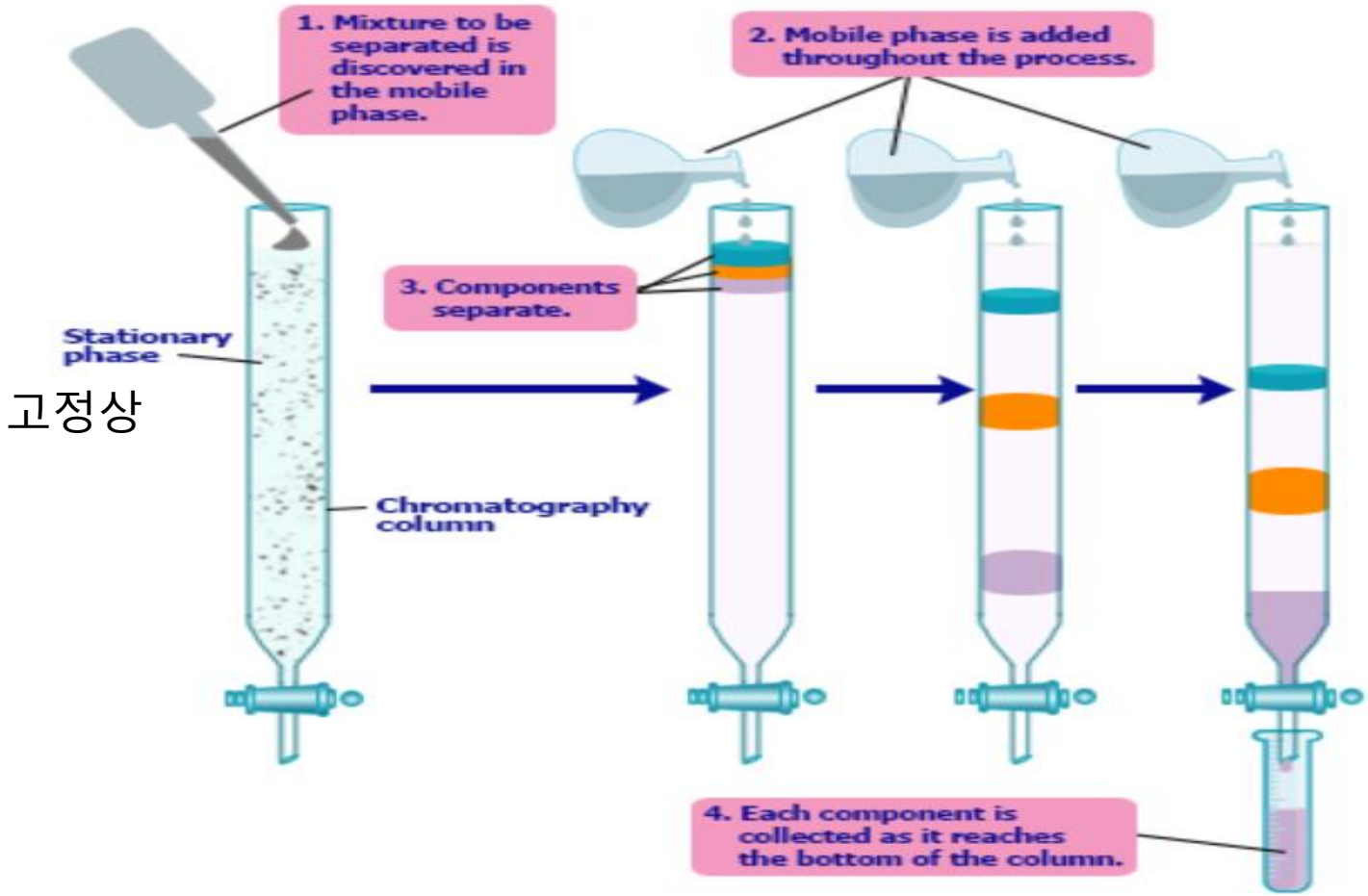
• 크로마토그래피(Chromatography): LC-Column

➢ 분배(partition) - **고정상: 액체** / 이동상: 액체

- 친화도에 따라 이동: 이동상에 더 강하게 끌리는 화합물은 column을 통해 빠르게 이동,
  : 고정상에 더 강하게 끌리는 화합물을 column을 통해 느리게 이동

1) Normal phase(순상)
- 극성: 고정상(극성) > 이동상(비극성)
- 고정상의 극성이 크기 때문에
  비극성 화합물이 먼저 용출

2) Reverse phase(역상)
- 극성: 고정상(비극성) < 이동상(극성)
- **극성화합물이 먼저 용출**
- 일반적으로 많이 사용됨(HPLC)



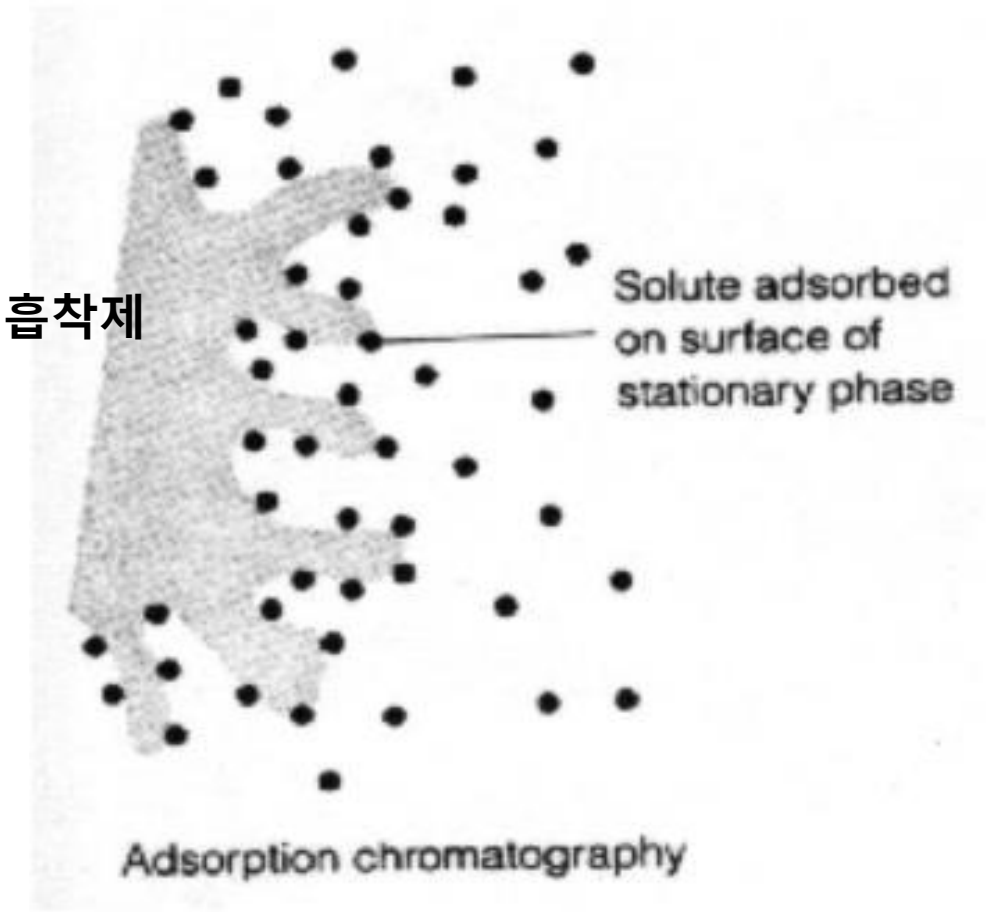
• 크로마토그래피(Chromatography): LC-Column

➢ 흡착(adsorption) - 고정상: 고체 / 이동상: 액체

- 고정상(고체)의 표면 **<u>흡착력(물리·화학적 인력</u>**)에 따라 성분이 분리

  → 흡착 성질이 있는 용질만 고정상의 표면에 흡착됨

- 흡착제 종류: Silica(산성), Aluminia(염기성)



• 크로마토그래피(Chromatography): LC-Column

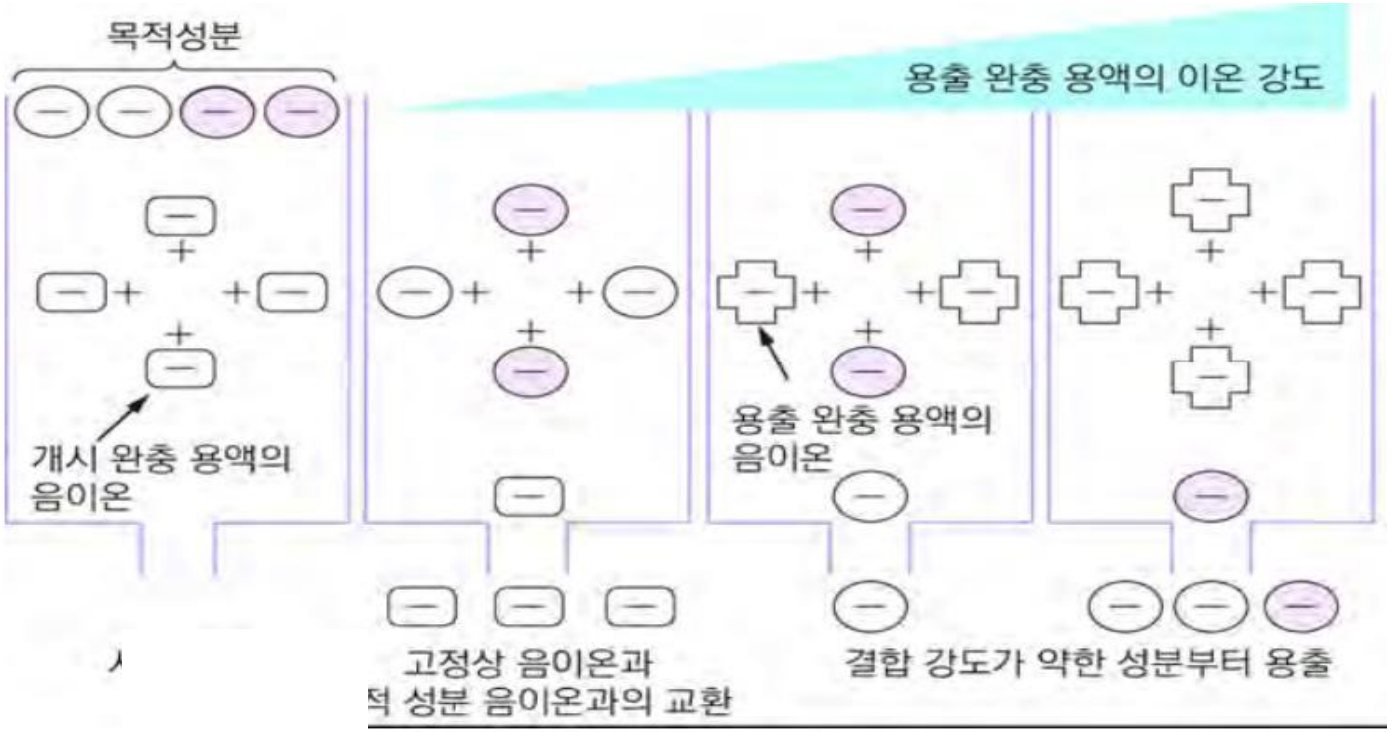
➢ 이온교환(Ion exchange, IEC) - 고정상 : 고체(전하 띰) / 이동상: 액체

- 시료 성분의 **<u>전하 차이</u>**를 이용해 분리

→ 시료 통과하면 고정상 표면의 전하와 반대 전하를 가진 분자들이 전기적 인력으로 결합

1) 음이온 교환 크로마토그래피: 고정상(-), 이동상(+) → 음이온이 늦게 용출

2) 양이온 교환 크로마토그래피: 고정상(+), 이동상(-) → 양이온이 늦게 용출



★ 임상적용

- 아미노산, 헤모글로빈 변종 분리 및 분석에 이용

- 단백질, 펩타이드 뉴클레오타이드 정제에 사용

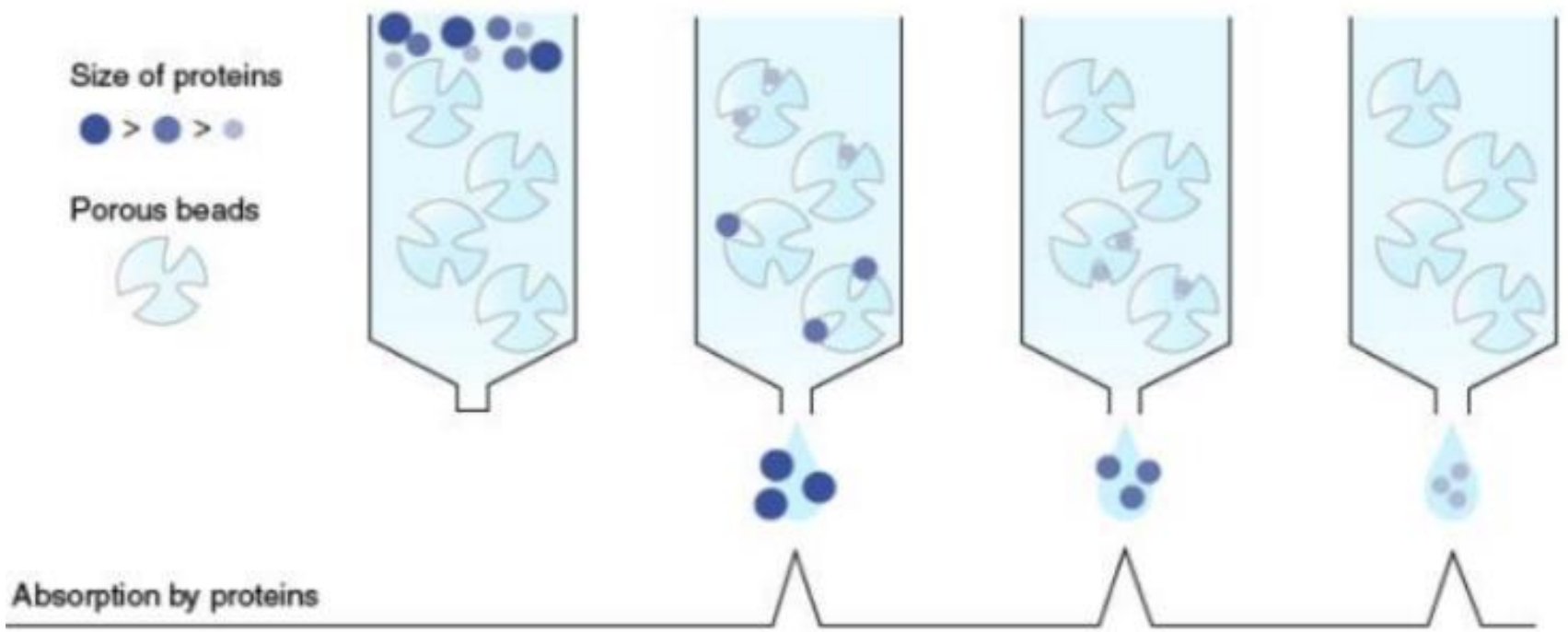
• 크로마토그래피(Chromatography): LC-Column

➢ 분자체, 크기 배제(size exclusion, SEC) - 고정상: 고체(다공성 지지대) / 이동상: 액체

- **분자 크기**에 따라 분석물을 분리
- 다공성 지지대: 시료 성분과 상호작용이 거의 없거나 비활성 표면을 가짐

1) 겔 여과, Gel filtration chromatography(GFC): 이동상 - 수용성 물질

2) 겔 투과, Gel permeation chromatography(GPC): 이동상 – 비수용성 물질(유기용매)



• 크로마토그래피(Chromatography): LC-Column

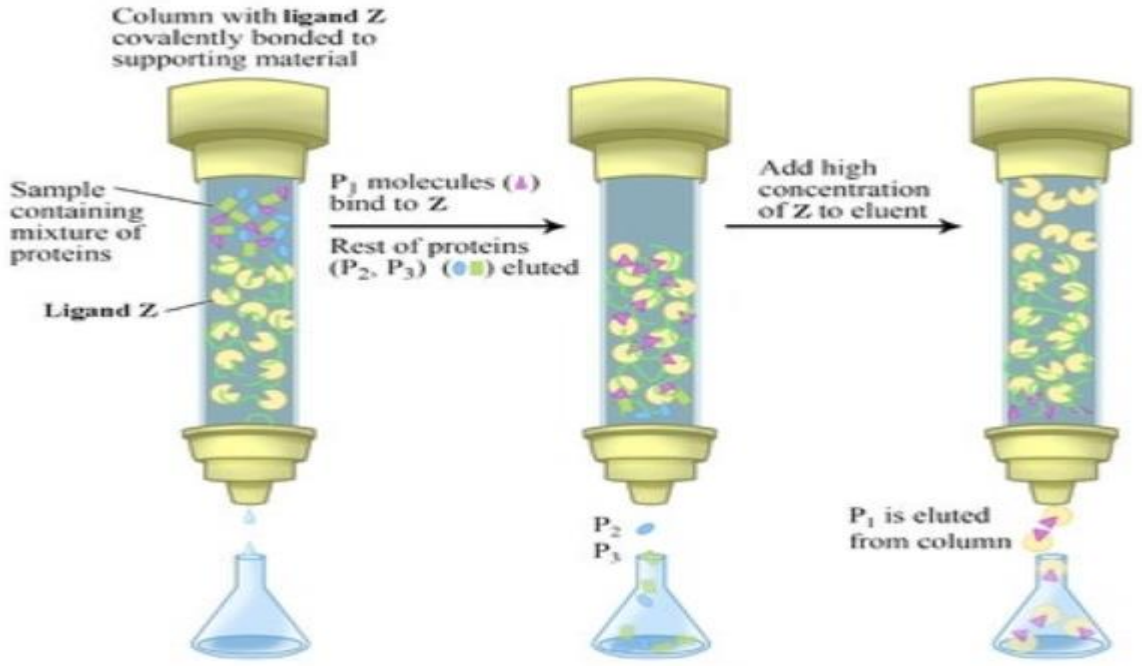
➢ 친화성(Affinity, AC) - 고정상: 고체(ligand) / 이동상: 액체

- 분리기준: 분자 간의 고유한 결합 **특이성**

- 원리

1) 특정 생물학적 결합(항원-항체, 효소-기질, 리간드-수용체)의 선택성

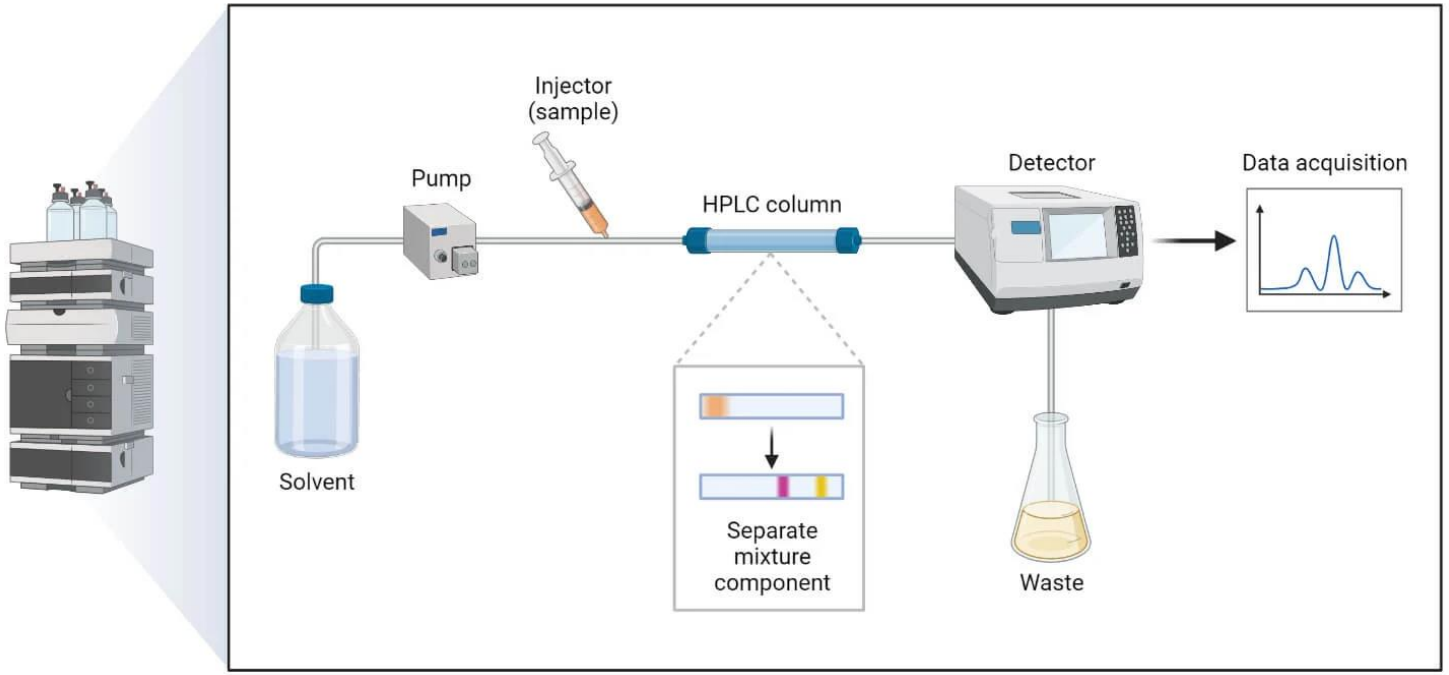
2) 고정상에 특정 ligand를 결합시켜 두고, 시료 중에서 그 ligand와 결합하는 물질만 선택적으로 결합



• 크로마토그래피(Chromatography) - HPLC

➢ HPLC: 고속액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography)

- 이동상(액체)에 압력을 가하여 그 유속을 높여 시료성분을 짧은 시간에 높은 분해능으로 분리하고 검출하는 방법(상위버전: UHPLC)
- 분리모드: 분배, 흡착, 이온교환, 크기배제 응용
- 임상응용: HbA1C 정량, 아미노산 분석, 비타민, 지방산, 혈청 크레아티닌, 혈청 요산 등



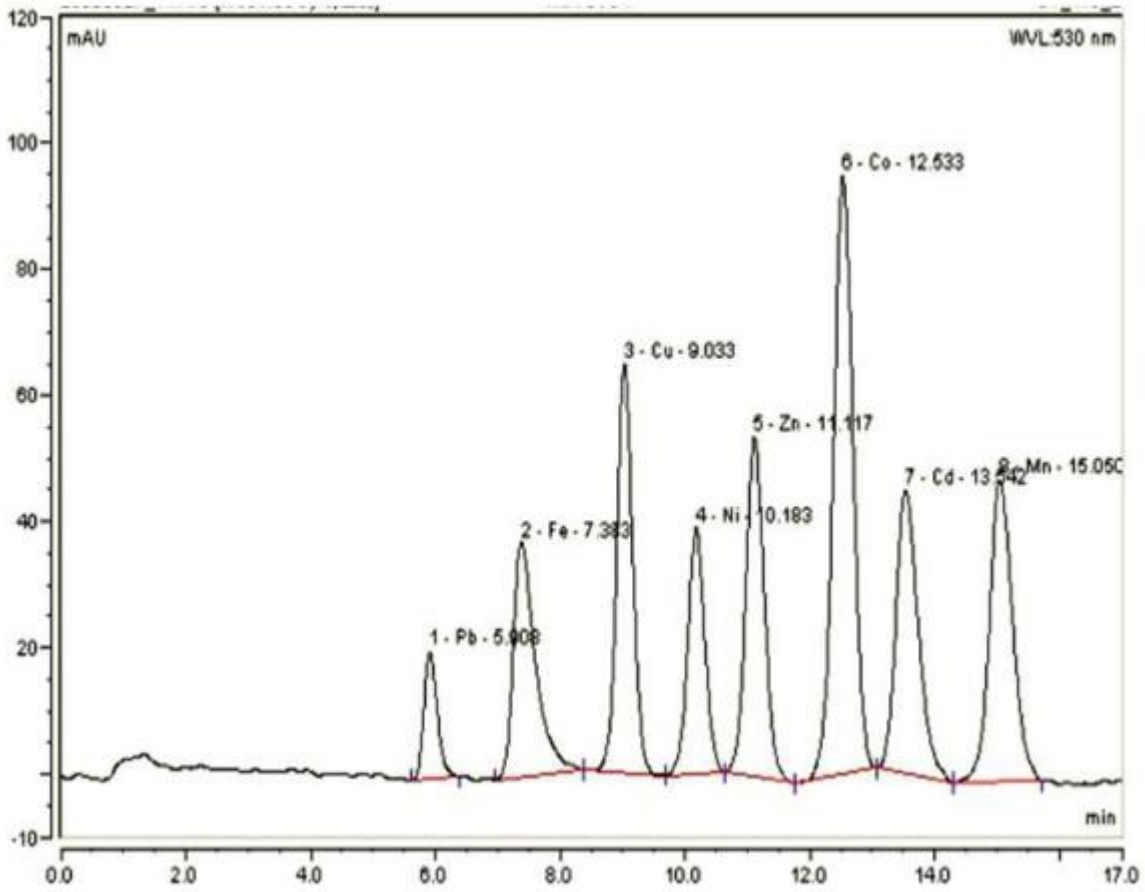


column(직선형)

구성 요소	역할
Pump (펌프)	액체를 **고압으로 밀어줌**
Injector (주입기)	분석할 **시료를 넣는 곳**
Column (컬럼) - **직선형**	**분리의 핵심 공간** (혼합물이 여기서 분리됨)
Detector (검출기)	빠져나온 성분을 **탐지/기록**
컴퓨터/출력기	결과를 **그래프로 출력** (피크 형태)

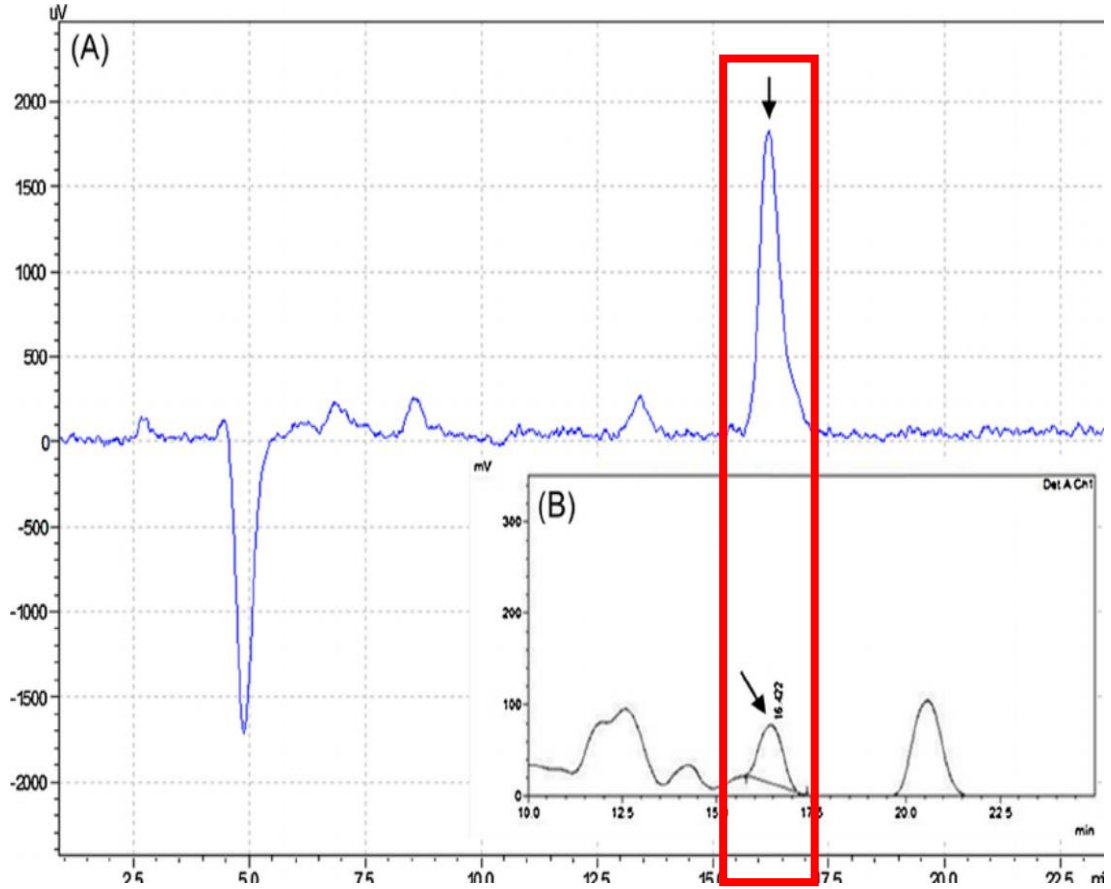
• 크로마토그램(Chromatogram) – HPLC 결과 예시

화장품 분석 시 다음과 같은 Chromatogram가 나옴



화장품, 아이새도우, 납(Pb), 철(Fe), 구리(Cu), 니켈(Ni), 아연(Zn), 코발트(Co), 카드뮴(Cd), 망간(Mn), 피리딘-2,6-디카르복실릭 애씨드(PDCA), 4-(2-피리딜아조)레소시놀(PAR), 이온크로마토그래피(IC), 컬럼후반응(post-column reaction)

(A) 멜라토닌 chromatogram
(B) 후추 잎 조직 시료의 chromatogram



→멜라토닌(A): 시간 약 16분쯤에서 Peak
후추잎(B): 시간 약 16분쯤에서 높은 농도를 보임

• 크로마토그래피(Chromatography): LC-planner

➢ 종이(paper), 박층(thin layer) - 고정상: 종이, silica gel(박층)/이동상: 액체

- 고정상이 '종이'면 종이 크로마토그래피(PC), '얇은 막'이면 박층 크로마토그래피(TLC)
- 종이: Cellulose 성분이어서 혼합물 중의 극성물질은 Cellulose와 결합(느리게 이동)

→ 비극성 물질은 빠르게 이동

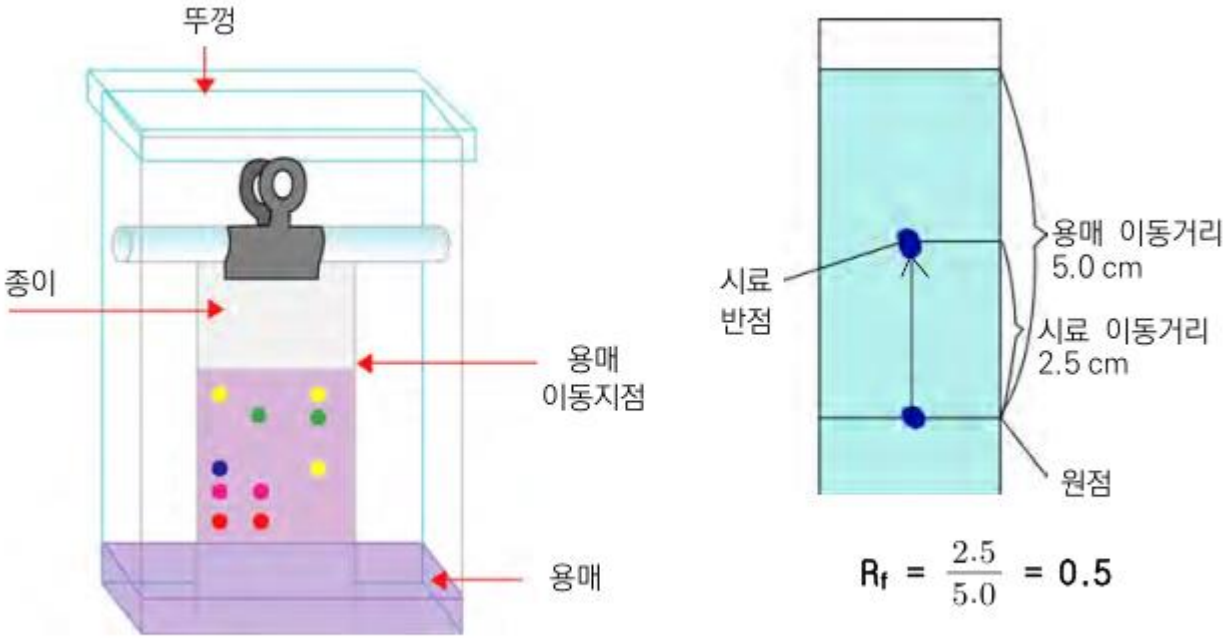


그림 6-4 종이 크로마토그래피

• 크로마토그래피(Chromatography) – Gas chromatography

➢ Gas chromatography

- 이동상(기체): 불활성 가스(He, N_2, Ar) / 고정상: 액체 또는 고체
- 시료: 기체 또는 휘발성 액체
- 원리: 친화도 차이(이동상과 함께 이동할지, 고정상에 결합될지 결정)
- 분석물질(기체): 휘발성 물질, 스테로이드(성 호르몬), 약물 분석, 지용성 비타민
- **가스 저장기, Capillary Column(모세관): 코일형**

※ Capillary column
: 가느다란 모세관 내부 벽에 고정상을 얇게 코팅

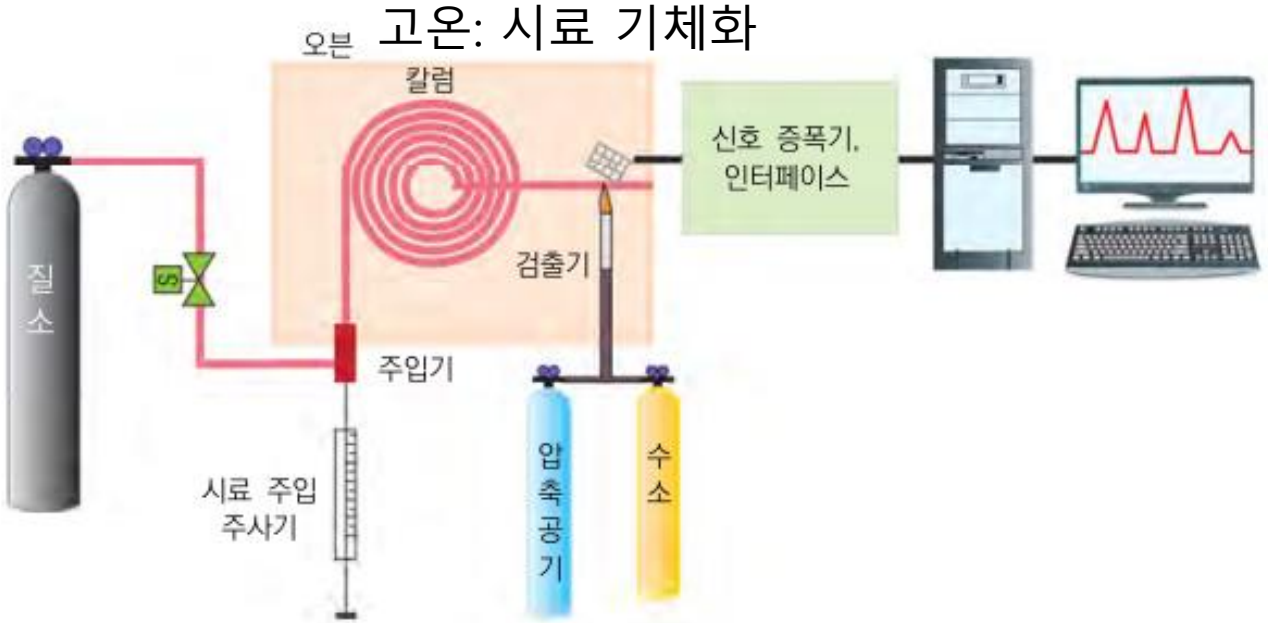
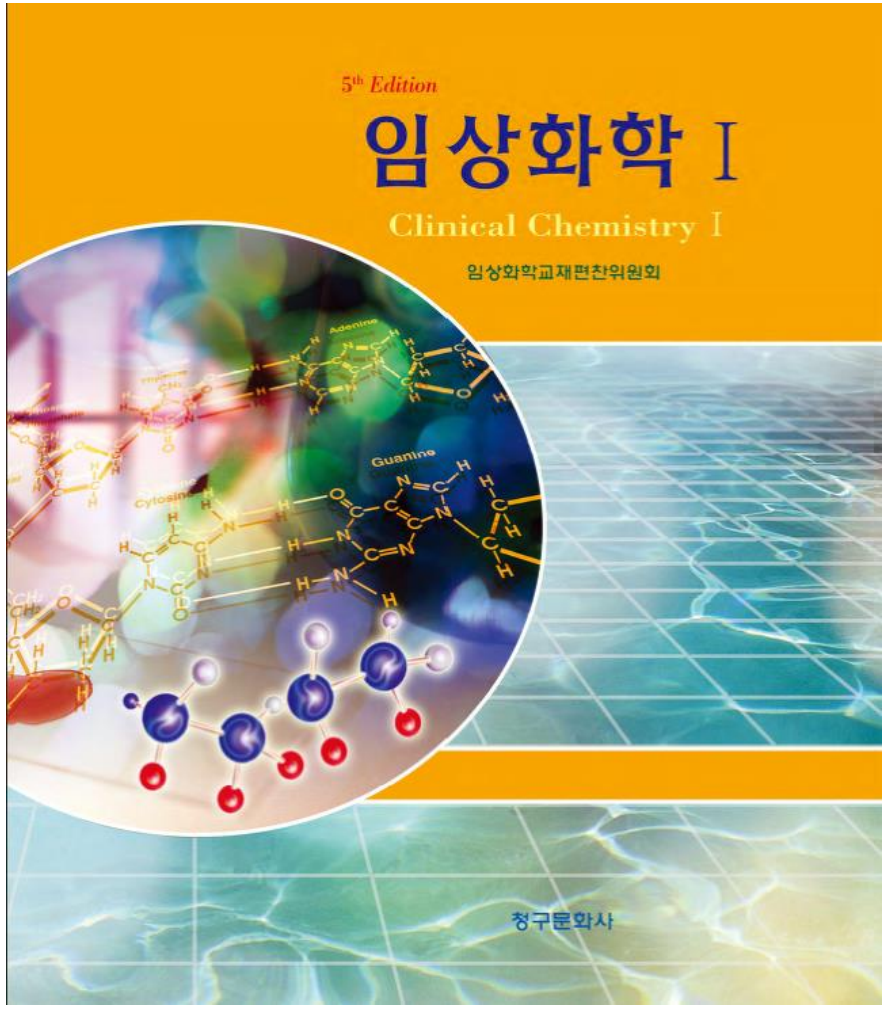
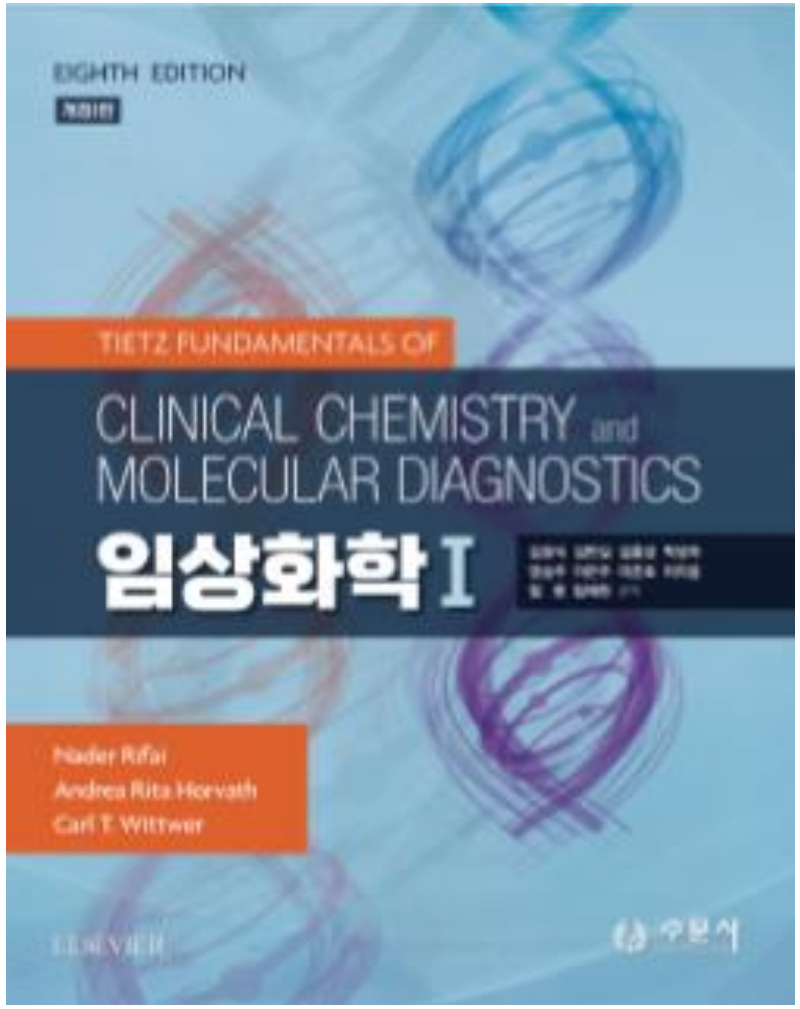


그림 6-9 가스 크로마토그래피(GC) 구성

- 출처


5th Edition
임상화학 I
Clinical Chemistry I
임상화학교재편찬위원회
청구문화사


EIGHTH EDITION
TIETZ FUNDAMENTALS OF
CLINICAL CHEMISTRY and
MOLECULAR DIAGNOSTICS
임상화학 I
Nader Rifai
Andrea Rita Horvath
Carl T. Wittwer