

GPC/SEC를 위한 단계적 분석 방법 개발

기술 개요

저자

Adam Bivens
Agilent Technologies, Inc.

개요

애질런트는 GPC/SEC 기술을 사용하여 시료를 측정하는 다양한 응용 분야를 위해 총체적인 솔루션을 제공합니다. 유연한 분석법 및 올바른 제품은 처리량을 최대화하고 데이터 오류를 줄임으로써 실험실 예산에 직접적인 영향을 미칩니다. 이 기술 개요는 초기단계의 화합물의 식별부터 컬럼의 수명 마지막 단계까지 분석 방법의 각 단계를 검토합니다.

서론

크기 배제 크로마토그래피(SEC) 또는 겔 여과 크로마토그래피(GFC)로도 불리는 겔 침투 크로마토그래피(GPC)는 시료 분자량 분포를 측정하는 핵심적인 방법입니다.

GPC 컬럼은 정확한 직경의 pore 및 큰 pore volume을 가지는 다공성 비드로 채워져 있습니다. 주입 후 작은 분자들이 pore로 흘러들어가고 큰 분자들은 배제되어 용매에 의해 흘러나갑니다. 이러한 분리 메커니즘은 분석 물질이 가장 큰 분자부터 작은 분자까지의 분자수에 따라 용리되도록 합니다.

정확한 분석법 개발은 데이터가 일관적이고 오류가 없도록 보장하고 각 분석법 개발에 소요되는 시간도 최소화할 수 있습니다.



Agilent Technologies

시작하기

화합물 식별

화합물 식별 결과는 보통 제품 서류 또는 안전 데이터 시트에 기재되어 있습니다.

대상 시료에 대해 아는 것이 없다면, 분광학적 방법을 사용하여 화합물을 식별할 수 있습니다. 그림 1에는 Agilent 4300 portable FTIR을 이용해 중합체를 쉽게 식별하는 과정을 보여줍니다.



그림 1. Agilent 4300 Portable FTIR을 이용하여 중합체를 쉽게 식별할 수 있습니다

잠재적인 용매-온도-고정상 화학 조합 확인

컬럼 구매 전, *Polymer-To-Solvent Reference Table for GPC/SEC*(5991-6802EN)[1]를 참조해 응용분야에 적합한 적절한 고정상과 용매를 확인합니다.

분자량(MW) 범위 확인

시료의 분자량 범위는 컬럼 선택에 매우 중요합니다.

중합체

- 분자량 범위는 제조 서류에 기재되어 있는 경우가 많습니다. 광산란, 유변학, 적정 등의 오프라인 기술을 사용해 분자량을 측정할 수도 있습니다.
- 만약 단일한 평균 분자량만이 주어져 있다면, 이 평균 분자량의 10배 값을 상한선으로, 1/100 값을 하한선으로 해 범위를 설정할 수 있습니다.

첨가물, 예비 중합체, 가소제

- 대부분의 비중합체 첨가물은 1,500Da 이하의 분자량을 가지고 있습니다. 예비 중합체와 큰 분자량의 첨가물은 보통 10KDa 이하의 분자량을 나타냅니다.

시료 cleanup

- 질량 분석기에서 큰 분자는 이온화 과정에서 조각화되고 분석을 방해합니다. 정확한 분자량 한계는 이온화 기법에 따라 달라집니다.
- 농약 성분 테스트 도중 지방, 왁스를 비롯한 큰 분자들에 의한 방해막기 위해 EPA method 3640A에서는 390Da의 분자량 상한선을 사용합니다.
- 더 자세한 정보는 5991-5321EN[2]를 참조하세요.

기기 검토

온도

- 시료가 시스템을 거치며 노출되는 모든 온도에서 용해될 수 있음을 확인합니다(노출된 캐필러리는 실온과 같다고 가정).
- 높은 온도에서만 용해된 상태를 유지할 수 있는 시료의 경우, Agilent PL-220 High Temperature GPC/SEC 시스템 (G7820A)이 용해부터 검출까지 온도 조절 기능을 제공할 수 있습니다.

압력

- 시스템 압력이 설명서에 기재된 펌프 또는 컬럼의 한계를 초과하지 않도록 확인합니다.

검출기

굴절률(RI) 검출기

- GPC에서 가장 일반적
- 광범위한 물질 검출 기능을 제공하나 UV-Vis에 비해서는 떨어지는 감도
- 시료와 용매 사이 굴절률 차이에 따라 비울적으로 나타나는 반응

자외선-가시광선(UV-Vis) 검출기

- 일반적이면서도 감도가 높은 검출기
- 시료 내 크로모포어가 있어야 하며 방해 없는 용매 필요

증기화 광산란 검출기(ELSD)

- RI 검출기보다 높은 감도
- 광범위한 성분 검출 가능
- 휘발성 시료의 경우 감도와 반응이 급감함

3중 검출(굴절률, 광산란, 점도 측정 결합)

- 복잡한 시료, 비선형적/가지형 중합체, 그래프트 중합체, 공중합체 등의 특성 규명에 필요
- 굴절률, 점도 측정, 브랜칭 정도에 대한 인라인 측정

더 자세한 정보는 다음을 참고하십시오. *A Guide to Multi-detector Gel Permeation Chromatography(5990-7196EN)*[3]

확산

- 확산은 시스템의 효율성 및 속도 극대화를 방해합니다.
- 확산이 높은 시스템은 더 긴 분석 시간, 낮은 분리능을 나타내며 이는 단순히 고효율 컬럼으로 교체하는 것만으로는 개선될 수 없습니다.
- 확산의 흔한 원인은 캐필러리, 컬럼, 피팅, 흐름 셀, 주입 루프, 시스템 dead volume 등에 있습니다.
- 고확산 및 저확산 시스템 모두의 성능을 개선할 수 있는 단계를 밟을 수 있습니다. *Instrument Setup for Fast GPC(5991-7191EN)*[4]를 참조하십시오.

분석법 개발

컬럼 선택

Polymer-To-Solvent Reference Table for GPC/SEC(5991-6802EN)[1]에서 귀하의 목적에 적합한 컬럼 고정상과 용매를 선택하십시오. 브로셔에서 분자량에 근거해 화합물을 분리할 수 있는 모든 컬럼을 확인합니다.

최고 성능의 컬럼을 선택하기 위해 효율성 및 검량 곡선을 비교합니다.

컬럼은 가장 큰 화합물을 최대한 빠르게 분리해내고 가장 작은 화합물을 최대한 느리게 분리해 분리능을 높일 수 있어야 합니다. 분자량 범위는 대상 물질의 분자량 범위와 가장 일치하며 차이가 적을수록 좋습니다. 중요하지 않은 부분은 분자량 범위를 벗어날 수 있으나, 이 경우 피크가 심하게 왜곡될 것입니다.

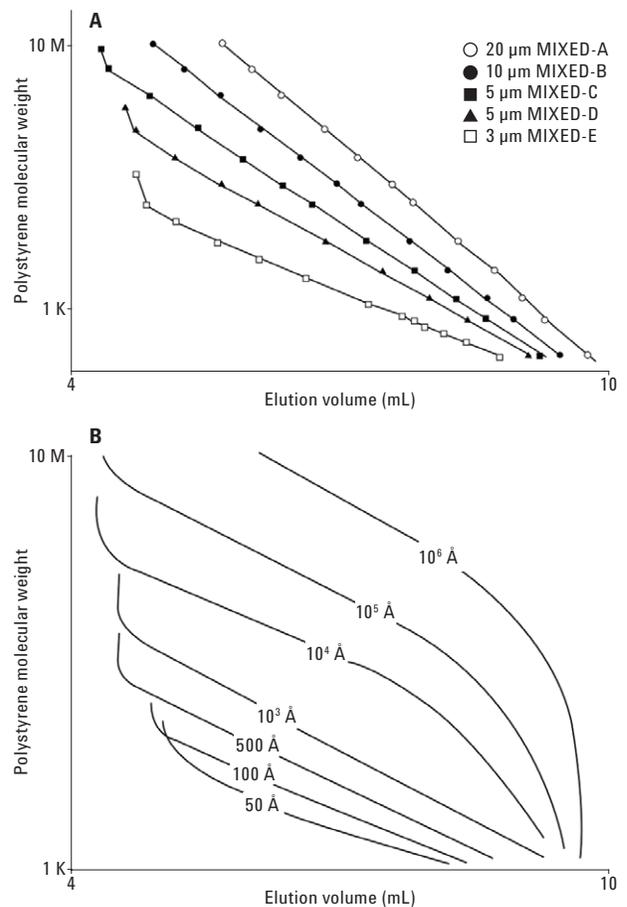


그림 2. PLgel MIXED 및 개별 pore 크기의 컬럼에 대한 검량 곡선

컬럼 선택 시 분리 능력과 높은 효율성 중 하나를 골라야 한다면, 더 우수한 분리 능력을 선택하는 것이 좋습니다. 효율성은 시스템 확산 또는 컬럼 성능 떨어짐 등에 의해 쉽게 나빠질 수 있으나, 우수한 분리 능력은 시스템의 컬럼 총 길이에만 영향을 받기 때문입니다.

분석 조건

용매

가장 일반적인 용매 시스템에 대한 가이드는 *Polymer-To-Solvent Reference Table for GPC/SEC*(5991-6802EN)[1]를 참조하십시오.

- 특성이 규명되지 않은 화합물을 분석할 때에는 물질이 매개체와 반응하지 않도록 하는 것이 중요합니다.
- 계산된 분자량을 광산란, 적정 또는 점도 측정과 같은 분리 방법에 의해 알아낸 값과 비교해야 합니다.

매개체와 반응 여부를 알 수 있는 또다른 방법은 분자량과 직접 연관되지 않은 피크 순서로, 이를테면 피크가 컬럼의 낮은 분자량 한계 이하에서 용리되거나(그림 3) 알려진 낮은 분자량의 화합물이 알려진 높은 분자량의 화합물 다음으로 용리되는 경우입니다.

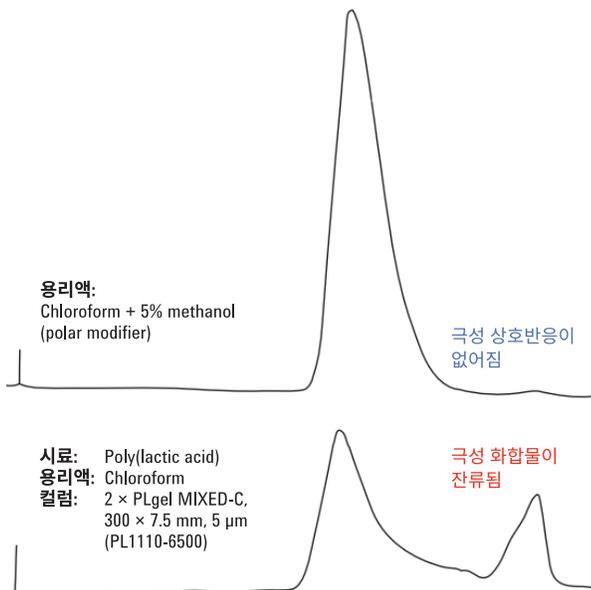


그림 3. 5% 메탄올 첨가로 아래 크로마토그램에서 보이는 극성 화합물 상호반응이 없어집니다

온도

컬럼 온도를 5~10°C 가량 높이는 것은 GPC에서 시료 점도를 낮추고 높은 효율성, 낮은 압력, 빠른 유속을 달성하는 데 큰 도움이 됩니다.

유속

GPC에서 유속은 시료에 따라 최적화되어야 합니다. 용매 속도와 효율성 간의 관계(van Deemter 곡선)는 입자 크기 및 시료 분자량에 따라 달라집니다.

큰 분자의 경우 큰 입자가 요구되며, 느린 유속에서 더 잘 분리됩니다(SI-01745)[5]. 작은 분자는 작은 입자의 컬럼에서 더 효율적으로 분리되며, 빠른 유속일수록 더 유리합니다(5990-8332EN)[6].

서로 다른 유속으로 분자량 표준물질을 반복적으로 주입하여 분석함으로써 유속을 최적화할 수 있습니다. 최적의 유속은 표준물질 피크가 분석 대상 물질의 분자량과 가장 가깝게 나타나고 분리가 잘 되는 경우입니다.(SI-01745)[5].

마지막으로, 넓은 직경의 컬럼과 높은 총 유속은 고확산 시스템의 효율과 분리능을 높일 수 있습니다. 이 전략은 고확산 시스템 성능을 최대화하는 Agilent PL Rapide 컬럼에 사용됩니다.

주입 부피

긴 중합체 사슬은 농도가 낮은 경우에도 용매의 점도를 크게 높일 수 있습니다. 시료 농도는 최대한 낮게 유지하는 것이 좋습니다. 시그널을 최대화하는 동시에 측정 결과에 영향을 주지 않는 분석 조건을 얻기 위해 여러 주입 부피와 농도를 테스트해야 합니다. 보다 자세한 사항은 *GPC/SEC Column User Guide*(5991-3792EN)[7]를 참조하십시오.

소프트웨어 파라미터

피크의 시작 부분과 꼬리 부분을 피크 적분에서 제외하는 것은 총 피크 모양의 통계적 분석을 기초하여 계산되는 Mn, Mw 및 MW의 수치에 심각한 영향을 초래할 수 있습니다. 비일관적인 수치는 중합체의 물리적, 화학적 특성을 밝혀내는 데 도움이 되지 않습니다.

피크의 시작 부분과 꼬리 부분이 누락된 상황 또는 피크의 모양이 비정상적인 경우(예: Bimodal peak)에는 계산된 분자량 분포를 직접 합치는 것이 시료 간 차이를 식별하는 데 가장 좋은 방법입니다.

필요한 유지보수

컬럼 상태 모니터링

검량: 정확한 분자량 값을 얻기 위해 컬럼을 정기적으로 검량해야 합니다. GPC/SEC에서 오류는 기하급수적으로 증가하므로, 머무름 시간에 대한 1%의 부정확함은 측정된 분자량의 10% 오류로 이어질 가능성이 높습니다.

펌프 드리프트, 컬럼 노후화, 새로운 캐필러리, 재 스웨지된 피팅, 새로 연결된 컬럼 등 모두 머무름 시간을 변화시킬 수 있습니다. 이러한 오류 발생을 방지하려면 데이터 수집 전후에 시스템을 검량하십시오. 더 자세한 정보는 다음을 참고하십시오.

- *Calibrating GPC Columns, A Guide to Best Practice*(5991-2720EN)[8]
- *Agilent Standards Brochure* (5990-7996EN)[9]

유속 마커: 분석의 끝을 표시하기 위해 톨루엔, BHT, 아세톤, 에틸렌 글라이콜 등의 작은 분자를 유속 마커로 모든 시료에 첨가합니다. 마커의 좁은 피크(그림 4, 피크 6)는 넓은 시료 피크에 분명히 나타나지 않는 컬럼 효율성을 측정하고 열화, 테일링, 머무름 시간 변화를 확인하기 위해 사용될 수 있습니다.

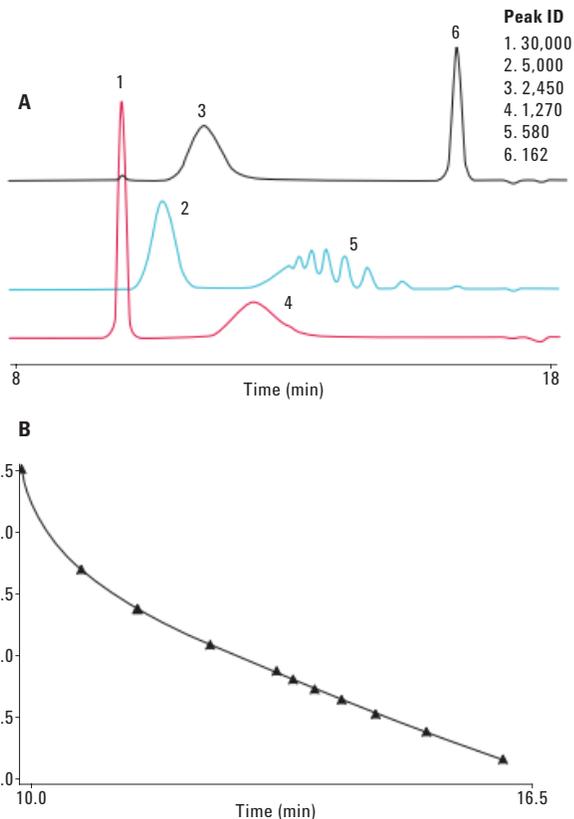


그림 4. 작은 pore 크기의 컬럼 검량

문제 해결

Agilent GPC/SEC 컬럼은 견고성과 사용 기간 면에서 탁월함을 보이거나, 시간이 지날수록 또한 소모됩니다.

GPC/SEC에만 나타나는 몇 가지 실패 사례가 있으며, 이에 대해 잘 숙지하면 연구자가 부정확한 데이터를 생성하는 것을 피할 수 있습니다.

- **큰 pore 손실** – 흐르는 용매가 천천히 가장 큰 pore들을 손상시켜 더이상 큰 분자들이 분리되지 못하게 됨.
 - **증상:** 높은 분자량 표준물질들이 더 이상 분리되지 않습니다 가장 큰 분자들이 크로마토그램의 초반에 모두 용리해 피크 또는 숄더(shoulder) 형태로 나타납니다
 - **해결책:** 정기적인 검량을 통해 pore 손상을 확인하고, 필요한 경우 컬럼을 교체해 데이터 품질을 향상시킵니다
- **베드 열화** – 입자가 지속적 사용으로 인해 서서히 상실되어 pore 크기 분포가 변화하고 전체적인 분리능과 효율성이 떨어짐.
 - **증상:** 효율성이 저하되고, 가장 높은 분자량과 낮은 분자량 검량 표준물질 간 분리 효과가 저하됩니다
 - **해결책:** 정기적인 검량과 유속 마커의 사용으로 분리 성능과 효율성 저하를 확인합니다. 효율성이 수용 가능한 수준(원래 효율성의 80%) 이하로 떨어지면 컬럼을 교체하십시오
- **화학적 부식** – 활성 화합물이 입자 표면을 변화시키고 분석 대상 물질의 접촉을 유도할 수 있습니다. 문제를 일으키는 흔한 물질로는 잔류 산화제, 라디칼 개시제, 활성 예비 중합체(예: 아크릴 클로라이드), 용매 열화 제품 등이 있습니다.
 - **증상:** 시간이 지날수록 동일한 시료가 더 잔류하게 되어 피크가 쪼개지거나 테일링 현상이 일어나게 됩니다
 - **해결책:** 주입 전에 모든 종류의 강산 또는 강염기를 중화하고, BHT를 이용해 잔류 산화제 및 라디칼 개시제를 비활성화하며, 알코올로 친핵체 및 친전자체를 없앱니다

결론

잘 개발된 GPC/SEC 분석법은 분석가들이 실험실의 시료 처리량 및 효율성을 극대화하고 작업 지연 및 오류를 피할 수 있게 해 줍니다.

애질런트는 GPC/SEC를 이용하는 분석의 총체적이며 업계 선도적인 솔루션, 모든 분석에 최적화된 분석법을 개발하는데 필요한 전문지식을 제공하는 것에 대해 매우 자랑스럽게 생각합니다.

참고 문헌

1. Adam Bivens. *Polymer-to-Solvent Reference Table for GPC/SEC*; 기술 개요, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5991-6802EN, **2016**.
2. Catherine Jones, Praveen Kutty, Alan Brookes. *An Automated System for the Routine Clean-up of Environmental Samples Prior to Instrument Analysis*; 응용 자료, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5991-5321EN, **2014**.
3. *A guide to multi-detector gel permeation chromatography*; Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5990-7196EN, **2012**.
4. Adam Bivens. *Instrument Setup for Fast GPC*; Technical overview, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 5991-7191EN, **2016**.
5. *Plate Height vs Flow Rate - Effect of Molecular Weight*; 기술 개요, Agilent Technologies, Inc. 발행물 번호 SI-01745, **2010**.

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트의 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹 사이트 (www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 8월 25일
한국에서 인쇄
5991-7272KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies