

총 설

식품포장재내 비휘발성 잠재 이행물질들의 스크리닝을 위한
이차원크로마토 그래피와 범용검출기의 이용

윤찬석^{1,†} · 이근택²

¹독일 프라운호퍼 공정공학 및 포장연구소, ²강릉원주대학교 식품가공유통학과

The Use of the Online Two-dimensional Liquid Chromatography Coupled
with a Universal Detector for the Screening of Non-volatile
Potential Migrants in Food Packaging Materials

Chan Suk Yoon^{1 †} and Keun Taik Lee²

¹Fraunhofer Institute for Process Engineering and Packaging, Giggenhauserstrasse 35, D-85354 Freising, Germany

²Department of Food Processing and Distribution, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, Gangwon 210-702, Rep. of Korea

Abstract For screening test of the non-volatile compounds which migrate from food packaging materials into food-stuffs, the traditional high performance liquid chromatography (HPLC) systems suffer from the lack of universal detector with high sensitivity and universality and high efficiency HPLC separation column which provides complete separation of complex mixtures into all individual substances. In this work, the use possibility of online two-dimensional liquid chromatography (2D-LC) system coupled with a charged aerosol detector (CAD), a universal detector, was reviewed. 2D-LC system permits to improve peak capacity and resolving power for complex mixtures. Charged aerosol detector (CAD) offers a new feasibility for detection of any non-volatile compounds with high sensitivity and constant response factor in a calibration range. The combination of size exclusion chromatography (SEC) and normal phase HPLC (NP-HPLC) is most frequently used for the separation of the natural and synthetic polymers which are mainly used as raw materials for the manufacture of food packaging materials. However, there is no commercial software available for data acquisition and handling and therefore the quantification in 2D-LC analysis is still rare.

Keywords Online two-dimensional liquid chromatography, Charged aerosol detector, Food packaging materials, Migration

서 론

플라스틱필름이나 종이 혹은 골판지등과 같은 식품포장재질은 각각의 사용 목적에 따라 단체 혹은 복합재질로 이용 될 수 있고, 프린팅, 광택처리, 라미네이션, 코팅등 다양한 공정을 거쳐 최종적으로 완성된다. 다양한 복합 폴리머와 천연 폴리머, 첨가제, 유기용제 등이 식품포장재질의 제조를 위한 원료물질로서 주로 이용되고 있다. 또한 알려진 원료물질들 이외에 반응부산물이나 미반응 물질들과 같은 NIAS(not intentional added substances), 즉, 의도하지 않은 물질들이 포장재 내에 잔류하거나 혹은 여러 단계의 가

공 공정을 거쳐 생성 될 수 있다. 이러한 모든 포장재 제조 관련 물질들은 잠재적으로 식품으로의 이행 가능성을 내포하고 있으며 식품과의 바람직하지 못한 반응을 일으킬 소지가 있다¹⁾.

식품포장재 내 잠재적 이행물질의 정성/정량 분석을 위한 전통적인 접근 방법으로 유기용매를 이용한 추출, 식품모사용매(food simulants)를 이용한 특정이행과 총이행 실험, 크로마토그래피 분석 등이 이용되어져 왔다. 특히 특정이행(specific migration) 실험을 통한 정성과 정량 분석을 위해서는 GC-FID(gas chromatography - flame ionization detector), HPLC-UV(high performance liquid chromatography-ultraviolet), HPLC-FL(high performance liquid chromatography-fluorescence), GC-MS(gas chromatography-mass spectrometer), LC-MS(liquid chromatography-mass spectrometer) 등과 같은 방법이 주로 이용되고 있다. 이 가운데 식품포장재에 잔류하

[†]Corresponding Author : Chan Suk Yoon
Fraunhofer Institute for Process Engineering and Packaging,
Giggenhauserstrasse 35, D-85354 Freising, Germany
E-mail : <chan-suk.yoon@fraunhofer.kr>

는 비휘발성의 잠재적 이행물질의 분석을 위해 HPLC가 가장 효과적인 분석 시스템으로 폭넓게 이용되고 있다. 하지만 일반적인 일차원(one-dimensional) HPLC시스템을 이용한 비휘발성 물질들의 분석에는 두 가지 중요한 제약이 따른다. 첫째, 높은 효율을 갖는 분리방식의 부재이다. 다시 말해서 일차원 HPLC시스템은 제한된 길이의 분리컬럼(separation column) 한 개를 사용하기 때문에 한 크로마토그램내에서 개별적인 피크로 분리될 수 있는 물질의 수는 검출된 피크가 갖는 폭(peak width)에 의해 제한 될 수 밖에 없다. 또한 선택된 분리방법이 분석하고자 하는 대상 물질에 대한 선택성(selectivity)이 충분하지 않을 경우 몇몇 피크들은 겹쳐질 수 있고 겹쳐진 피크는 실질적으로 하나 이상의 물질이 검출 되었을 가능성이 있다. 즉, 일차원 HPLC분석은 컬럼이 갖는 피크용량(peak capacity)과 분리능(resolution)에 큰 제약을 받게 된다. 그리고 시료 속에 존재하는 총 화합물의 수가 선택된 컬럼의 용량을 초과할 경우 피크의 겹침은 필연적으로 나타나게 된다. 앞서 언급했듯이 식품포장재는 다양한 재질로 구성될 수 있고 또한 다양한 원료 물질과 부산물들이 잔류할 수 있다. 이러한 물질들이 일차원 HPLC 분석에서 컬럼이 갖는 피크용량을 쉽게 초과할 수 있을 것이다.

두번째로 GC시스템의 FID와 같이 높은 감도를 갖는 범용 검출기의 부재이다. 식품포장재내의 잠재적 이행물질의 분석을 위한 스크리닝 방법의 개발을 위해서는 분석물질의 이화학적 특성과는 무관하게 검출이 가능한 검출기가 필수적으로 요구된다. 2D-LC 분리에서 이용되는 검출기는 일반적인 일차원 분석에서 이용되는 검출기들과 기본적으로 다르지 않다. 2D-LC 시스템과 함께 조합되는 검출기로는 ultraviolet(UV)-, fluorescence(FL)-, reflection index(RI)-, evaporative light scattering(ELS)- 검출기와 mass spectrometer(MS) 등이 있다. 하지만 이러한 검출기들은 검출원리에 따른 고유의 단점들을 갖고 있다. UV와 FL의 검출을 위해서는 분자 구조 내에 반응그룹(chromophorous groups)들이 포함되어 있어야만 한다. 실례로 폴리에틸렌 계열 재질에 열 안정제로 주로 사용되는 Irganox PS 800(dodecyl 3-(3-dodecoxy-3-oxo-propyl)sulfanylpropanoate)과 Irganox PS 802(dioctadecyl 3,3'-thiodipropionate)와 같은 첨가제들은 분자 구조 내 UV반응그룹이 존재하지 않기 때문에 UV 검출기를 이용한 분석이 불가능하다. 또한 FL 검출기는 UV 검출기와 비교하여 높은 감도를 얻을 수 있으나 매우 높은 선택성이 문제가 된다. 즉, 분자 내 FL 반응 구조가 없는 물질의 검출을 위해서는 유도체화 과정이 요구된다. 그리고 이러한 시료의 전처리 과정은 매우 복잡하기 때문에 그 적용범위가 매우 제한적이다. RI와 ELSD는 범용검출기(universal detector)로서 많이 이용되고 있다. 하지만 RI검출기는 낮은 감도와 기울기 용리(gradient elution)가 불가

한 부분이 큰 약점으로 지적되고 있다. ELSD는 RI와 비교하여 높은 감도를 보이고 기울기 용리가 가능한 검출기로 알려져 있다. 그러나 검량선의 비선형성과 UV, FL, MS등과 비교하여 감도가 많이 낮은 것으로 보고되고 있다²⁾. Górecki 등³⁾은 ELSD 검출기의 재현성(reproducibility)과 정밀성(precision)이 매우 불안정 한 것으로 보고하였다. 이러한 이유에서 현재까지 식품포장재에서 이행되는 물질들의 분석을 위한 효과적인 스크리닝(screening) 방법은 현재까지 존재하지 않고 있다.

본 연구에서는 식품포장재내 비휘발성 잠재이행 물질들을 위한 스크리닝 방법의 개발을 위해 기존의 일차원 HPLC 분석방법의 단점을 극복할 수 있는 방법으로 새로운 범용 검출기와 이차원 크로마토그래피(two-dimensional chromatography; 이하 2D-LC) 분리 방법을 적용한 스크리닝 방법의 개발 가능성을 알아 보고자 한다.

본 론

1. 이차원크로마토그래피 (2D-LC)

시료속의 복잡한 혼합물을 효율적으로 분석하기 위해서는 높은 분리능과 피크용량(peak capacity)을 갖는 분석방법을 필요로 한다. 하지만 하나의 분리컬럼과 등용매 용리(isocratic elution) 나 기울기 용리를 이용하는 일반적인 일차원크로마토그래피(one-dimensional chromatography)는 충분한 피크용량과 분리능을 제공하지 못한다. 반면 다차원크로마토그래피는 피크용량과 분리능을 획기적으로 향상시킬 수 있는 분리방식의 하나로 최근 많이 연구되어지고 있는 추세이다.

액상크로마토그래피(liquid chromatography)에는 정상(normal phase), 역상(reverse phase), 크기배제(size exclusion), 이온교환(ion exchange)등 다양한 분리방식이 존재하며, 각 분리방식은 분석대상 물질에 대해 다른 선택성을 보인다. 일반적으로 이차원크로마토그래피 시스템은 이러한 서로 다른 분리방식 두 가지가 조합되어 구성된다. 하지만 몇몇 분리방식의 조합은 사용된 이동상들의 불 혼화성(immiscibility)이나 첫 번째 차원의 이동상과 두 번째 차원의 컬럼 정지상의 부조화(incompatibility) 로 인하여 조합이 불가능 한 경우가 있다⁴⁾.

2D-LC 시스템은 온라인(on-line) 시스템과 오프라인(off-line) 시스템으로 구분된다. 오프라인 방식은 첫번째 차원에서 분리된 분액(effluent)을 별도의 용기에 인위적으로 수집하여 이 분액을 두 번째 차원에 주입하여 크로마토그램을 얻는 방식이다. 이와는 반대로 온라인 시스템은 서로 다른 두 가지 차원이 두 개의 동일한 용량의 루프(loop)가 장착된 스위칭밸브(switching valve)로 연결되어 인위적인 분액의 수집 없이 첫번째 차원에서 분리된 모든 용출액이 두

번째 차원으로 도입되는 소위 **comprehensive** 분리방식이다. 따라서 오프라인의 분석의 수집과정에서 발생할 수 있는 시료의 손실과 오염, 시간적 낭비 그리고 재현성 저하 등을 온라인 방식을 통해 극복할 수 있다⁴⁾. 하지만 온라인 2D-LC의 실행은 간단하지 않다. 왜냐하면 위에서 언급한 바와 같이 두 차원 사이의 컬럼 정지상과 이동상의 용화성 (compatibility)과 스위칭 밸브의 프로그래밍과 같은 실질적인 작동조건의 최적화에 많은 어려움이 따르기 때문이다^{4,5)}.

1.1. 피크용량

피크용량은 크로마토그래피 시스템의 효율을 나타내는 요소 중 하나로 한 크로마토그램 내에 분리될 수 있는 피크의 총 개수를 의미하며 컬럼의 분리능을 나타내는 지표로서 이용된다. 등용매 용리를 이용하는 일차원크로마토그래피에서 피크용량 (P_{1D})은 다음과 같이 정의 될 수 있다⁶⁾.

$$P_{1D} = 1 + \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \ln\left(\frac{t_{R1}}{t_{Rn}}\right) \quad (1)$$

여기서 N 은 이론단수, t_{R1} 와 t_{Rn} 은 처음과 마지막 피크의 검출시간이다. 한편 이차원크로마토그래피의 피크용량(P_{2D})은 공식 2와 같이 정의 될 수 있다⁷⁾.

$$P_{2D} = P1 \times P2 \times \sin\theta = \left[1 + \frac{\sqrt{N_1}}{4} \cdot \ln\frac{t_{R1}}{t_{Rn}}\right] \times \left[1 + \frac{\sqrt{N_2}}{4} \cdot \ln\frac{t_{R2}}{t_{R2}}\right] \times \sin\theta \quad (2)$$

- P_{2D} : 이차원크로마토그래피에서 피크용량
 $P1$: 첫 번째 차원의 피크용량
 $P2$: 두 번째 차원의 피크용량
 θ : 분리각도
 N_1 : 첫 번째 차원의 이론단수
 N_2 : 두 번째 차원의 이론단수

t_{R1} 와 t_{Rn1} : 첫 번째 차원에서 처음과 마지막 피크의 검출시간
 t_{R2} 와 t_{Rn2} : 두 번째 차원에서 처음과 마지막 피크의 검출시간

1.2. 직교분리

식 (2)에서 첫번째와 두번째 차원 사이의 분리각도를 의미하는 θ 는 이차원크로마토그래피에서 매우 중요한 의미를 갖는다. 왜냐하면 선택된 두 차원이 완전히 다른 선택성을 가질 때 최상의 결과를 얻을 수 있기 때문이다⁴⁾. 즉, 다시 말해서 분리각도(θ)가 90도 일때 이차원크로마토그래피는 최대의 피크용량을 얻을 수 있으며, 이것을 일컬어 완전한 직교 (orthogonal) 분리가 되었다고 말한다. 따라서 2D-LC 분리에서 두 차원 사이의 직교성 평가는 반드시 수행 되어야 한다. 하지만 두가지의 다른 분리 시스템 사이의 수치화된 분리각도를 계산하여 대입하는 것은 매우 어려운 문제이다. 따라서 2D-LC의 직교성 평가를 위하여 다양한 방법이 보고되고 있다. 이 가운데 간단하지만 매우 효과적인 방법 두가지를 소개하고자 한다.

Gilar 등⁸⁾은 각 차원에서 검출된 피크들의 머무름 시간들을 표준화(normalization)하여 이용하는 기하학적 직교성 개념 (Geometric orthogonality concept)을 고안하였다. Gilar등의 직교성 검정법에 따르면 각 차원에서 검출된 피크들의 검출시간을 equation 3에 따라 표준화하여 표준화된 피크 검출 시간들의 분포를 Fig. 1과 같이 표시하였다. 그리고 일정한 구획내에 분포된 표준화된 검출시간들의 점유율을 계산하여 서로 다른 두 분리 방식의 직교성을 검정하였다. 이때 표준화된 검출시간들은 각 차원에서 0에서 1사이의 값을 갖는다. 여기서 Fig. 1-C는 전체 100개의 구획 가운데 63개의 구획이 1, 2 차원의 표준화된 검출시간에 의해서 점유되어 있음을 보여주고 있다. 즉, 두 차원 사이의 분리방식에 상관관계가 전혀 없는 완전한 직교 분리의 대표적인 예를 보여주고 있다. Fig. 1-A는 직교분리가 전혀 이루어지지 않은 예를 보여주고 있다. 즉, 두 차원의 분리 방식이 동일하여 의미 없는 같은 분리가 두 번 반복하여 이루어 졌음을 의미한다.

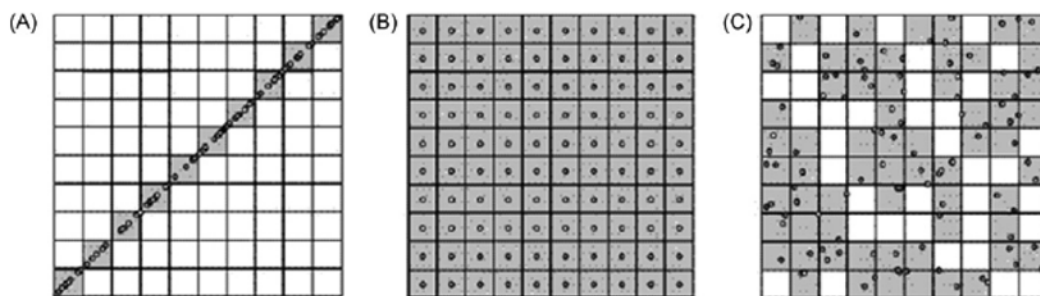


Fig. 1. Geometric orthogonality concept. Hypothetical separation of 100 analytes in 10 × 10 normalized space. (A) Nonorthogonal system, 10% area coverage represents 0% orthogonality. (B) Hypothetical ordered system, full area coverage. (C) Random, ideally orthogonal system, area coverage is 63% representing the 100% orthogonality⁸⁾.

$$RT_{i(norm)} = \frac{RT_i - RT_o}{RT_p - RT_o} \quad (3)$$

RT_i (norm) : 분석물의 표준화된 머무름 시간

RT_i : 분석물의 머무름 시간

RT_p : 최초로 용출된 피크의 머무름 시간

RT_o : 마지막으로 용출된 피크의 머무름 시간

실질적인 직교성 검정을 위한 표준화된 검출시간의 구획 점유율은 equation 4에 의해 계산될 수 있다⁸⁾. 직교성 값은 0에서 1사이에서 표시될 수 있으며, % 값으로도 표시가 가능하다. 서로다른 두 분리 시스템의 직교성이 높을 수록 1 혹은 100%에 가까워진다.

$$O(\%) = \frac{\Sigma bins - \sqrt{P_{max}}}{0.63P_{max}} \times 100 \quad (4)$$

O : 직교율 (%)

Σbins : 검출된 피크들을 포함하는 구획의 수

P_{max} : 모든 구획들의 합

Gilar등⁸⁾은 이러한 기하학적 직교성 검정방법을 기초로 하여 보다 실질적인 2D-LC분석의 피크용량을 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$N_p = P_1 P_2 \frac{\Sigma bins}{P_{max}} \times 100 \quad (5)$$

P₁P₂ : 2D-LC 피크용량

Σbins : 검출된 피크들을 포함하는 구획의 수

P_{max} : 모든 구획들의 합

또 다른 직교성 검정법으로 Van Gysegheem등^{9,10,11)}은 두 차원 사이에 관계를 분석물질들의 retention factor(K) 값들의 피어슨 상관관계(pearson-correlation coefficients r)를

이용하여 평가하였다. 두 차원 사이의 k의 r이 양의 값 1에 근접할 수록 두 차원간의 상관도가 높아짐을 의미하며, 이는 직교분리가 이루어지지 않았음을 나타낸다. 반면 r값이 0에 근접할수록 두 차원간의 분리방식에 상관성이 없음을 의미하고, 높은 직교성을 나타내게 되는 것으로 설명하고 있다. 이와 동시에 두 차원에서 얻어진 k값들의 구획내 분포를 시각적으로 확인하여 Fig. 2에서와 같이 직교성 평가를 위해 두 차원 사이의 상관계수 값만을 이용했을 때 드러날 수 있는 수학적 수치를 이용한 판단의 오류를 극복하였다. Fig. 2-A와 2-B는 r값이 0에 매우 근접하여 두 그림 모두 이용된 두 차원 사이의 직교성이 우수한 것으로 판단할 수 있다. 하지만 Fig. 2-B는 공간의 이용률이 10%로 이상적인 직교분리의 모델이 될 수는 없다. 결론적으로 2D-LC의 직교분리를 위해서는 나타내고자 하는 retention parameter들의 구획내의 공간적인 분포가 매우 중요함을 알 수 있다. 이와 동시에 두 차원 사이의 상관계수 계산은 매우 간단하지만 효과적인 직교성 검증을 위해 이용될 수 있을 것이다.

1.3. 2D-LC의 분석의 실례

대부분의 액상크로마토그래피 분리 방식들이 분석하고자 하는 대상물질에 따라 다양하게 결합될 수 있다. RP×RP, RP×NP, NP×RP, SEC×RP 혹은 NP, NP 혹은 RP×SEC 등 다양한 조합이 가능하다. 그러나 앞서 언급한 바와 같이, 분리방식의 이상적인 조합을 위해서는 두 차원간의 직교분리의 가능성이 우선적으로 고려되어야 한다.

동일한 분리방식을 갖는 RP×RP 조합은 천연항산화제^{13,14)}, 방향족 화합물(aromatic compounds)¹⁵⁾, 허브 추출물에서의 항산화제와 페놀산(phenolic acids)¹⁶⁾, 천연약제추출물¹⁷⁾의 분리를 위해 연구되어져 왔다. 그러나 앞서 언급한 바와 같이, 동일한 분리방식간의 조합은 같은 분리를 두번 반복한 것에 불과하다. 따라서 두 차원간에 직교성이 매우 떨어 지므로 높은 피크용량을 얻는데 한계가 있고 또한 2D-LC분

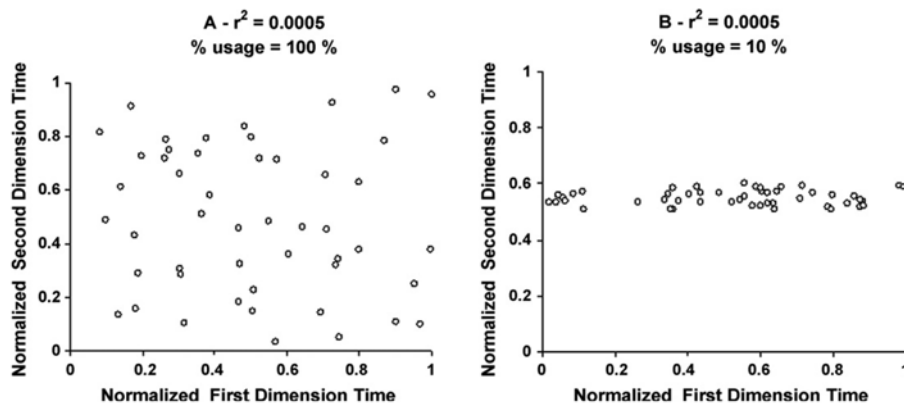


Fig. 2. Demonstration of the weakness of the correlation coefficient as a metric of separation space utilization in 2D-LC systems¹²⁾.

리의 본연의 목적에 부합하지 못하는 단점이 있다.

NP×RP 혹은 RP×NP 조합은 지질시료(lipidic samples)¹⁸⁾, 레몬오일¹⁹⁾, 약제혼합물 (pharmaceutical mixture)²⁰⁾등을 분리하는데 주로 이용 되고 있다. 하지만 근본적으로 RP와 NP 에 이용되는 이동상 사이에 용해성이 매우 떨어지기 때문에 두 가지 이상의 이동상 조합을 최적화 시키는 것은 매우 어려운 문제이다^{20,21)}. 하지만 이러한 이동상 호환성 문제를 극복하기 위하여, 비수역상 (nonaqueous RP) 분리 와 NP의 조합, RP와 친수성 NP의 조합 혹은 첫 번째 차 원에 소구경 (microbore) NP 컬럼을 사용하여 두 번째 RP 차원으로 넘어가는 용출액의 양을 최소화 하는 방법 등 을 연구하였다⁵⁾.

SEC와 NP혹은 RP의 조합은 합성 폴리머(synthetic polymers), 바이오 폴리머(biopolymers), 올리고머 분리분석을 위해 주로 이용되고 있다^{12, 22)}. 잘 알려진 바와 같이SEC는 분자량의 크기, 좀 더 정확히 말하면 분자의 기하학적 부피 (hydrodynamic volume)에 따라 분리되는 방식이고, NP와 RP는 정지상과 이동상의 소수성 혹은 극성에 의해 분리되는 분리 방식이기 때문에 2D-LC를 위한 조합에서 최상의 직교분리를 가능케 한다. Gilar등⁸⁾에 의하면 SEC와 RP혹은 NP와의 조합은 펩타이드 분석을 위해 최상의 직교분리를 가능하게 한다고 보고하였다. 식품포장을 위해 이용되는 대다수의 폴리머들이 유기용매에 우수한 용해성을 보이기 때문에, NP는 RP보다 더 자주 이용된다. 반면 RP는 주로 수용성 폴리머의 분석을 위해 SEC와 조합된다. 하지만 그 사용빈도는 그리 높은 편은 아니다^{12,22)}.

SEC 컬럼은 다른LC컬럼과 비교하여 상대적으로 컬럼의 길이가 길고 긴 분석시간이 요구된다. 따라서 SEC는 폴리머를 위한2D-LC분리에서 보통 첫 번째 차원에 주로 이용되어 왔다. 특히 식품포장재에 존재하는 잠재적 이행물질들 가운데 분자량이 약 1,000 g/mol이상이 되는 물질들은 인간의 소화기관(gastrointestinal tract)내 흡수가 되지 않는 것으로 알려져 있다²³⁾. 따라서 2D-LC 분석에서SEC를 첫 번째 차원을 위한 분리방식으로 적용 할 경우 우리가 목표로

하지 않는 1,000 g/mol 이상의 분자량을 갖는 물질들을 쉽게 샘플로부터 제거할 수 있고, 또한 두 번째 차원에서 검출될 수 있는 불필요한 분석 방해물질의 피크들을 사전에 제거할 수 있는 장점이 있다. 즉, 다시 말해서 SEC를 첫 번째 차원으로 이용할 경우 분리방식으로서의 이용뿐만 아니라 시료의 정제 과정으로서의 이용도 동시에 이루어지게 된다. 하지만 하나의SEC 컬럼의 분리효율이 좋지 못하기 때문에 동일한 여러 개의 컬럼들을 연결하여 분리효율을 높이는 방법이 주로 사용된다⁸⁾. 하지만 우리가 목표로 하는 이행물질들의 분자량 범위가 매우 좁기 때문에 이와 같은 컬럼의 다중연결을 통하여서도 SEC 분리효율의 큰 향상을 기대할 수는 없다. 이는 2D-LC분석의 전체적인 분리효율에도 부정적인 영향을 끼친다. 이를 보완하기 위하여 최근 연구에서는 첫 번째 차원에서 기올기 용리를 이용한 전체적인 분리능을 향상시키기 위해, NP 나 RP가 첫 번째 차원으로 SEC와 함께 조합되어 적용되는 추세이다²⁴⁾. Table 1은 SEC와 NP 의 조합을 이용한 폴리머 분리의 사례들을 보여 주고 있다.

1.4. SEC×NP-HPLC 2D-LC분리를 위한 이동상

2D-LC 분리에서 이동상의 용해성은 매우 중요한 고려 사항 중 하나이다. 앞서 언급한 바와 같이 2D-LC분리에서 SEC는 천연 혹은 합성 폴리머의 분석을 위해 매우 유용한 분리 방식이다. Tetrahydrofuran(THF)은 대표적인 극성 용매인 물과 비극성 용매인 헥산 혹은 헵탄과 같은 탄화수소 계열 용매들과도 용해성이 매우 우수하기 때문에 이 차원 분리의SEC를 위한 이동상으로 가장 선호되는 용매이다. 또한 대부분의 폴리머 시료들은 THF에 잘 용해되기 때문에 그 효용가치는 매우 높다고 할 수 있다. 한편 THF는 일반적으로 SEC 컬럼에 충전된 다공성 겔(S-DVB gels)에 대한 70~80% 정도의 높은 팽창부피(swelling volume) 갖는다. 충전제(S-DVB gels)의 팽창부피는 크로마토그램상의 피크형태(peak shape)에 영향을 미치기 때문에 감도(sensitivity)에도 직접적으로 영향을 줄 수 있다.

Table 1. 2D-LC combinations using SEC and NP for the separation and characterization of polymers.

1 st Dimension		2 nd Dimension		Detection	Application	Reference
NP-IE	THF-hexane	SEC	THF	UV	Styrene-methacrylate (co)polymers	24
NP-IE	ACN-DCM	SEC	THF	UV, ELSD	Poly (methyl methacrylate) (PMMA)	25
NP-IE	THF-Cyclohexane	SEC	THF	UV, ELSD	Butyl acrylate grafted onto poly (styrene-butadiene)	26
NP-GE	Trichloromethane-Cyclohexane	SEC	Trichloromethane-Cyclohexane	UV, RI, ELSD	Methyl methacrylate grafted onto polybutadiene	27
NP-GE	Heptane-DCM and DCM-Methanol	SEC	Chloroform	UV, IR	Styrene-methacrylate (co)polymers	28

GE : Gradient elution, IE : Isocratic elution

즉 THF에 의해 충전제의 높은 팽창부피는 검출된 피크의 좁은 피크폭과 피크의 꼬리 끌림이 줄어든 대칭형 피크의 생성을 가능하게 한다^{29,30,31}). 반면 SEC 컬럼의 충전제에 대한 팽창부피가 서로 다른 용매를 혼합하여 사용할 경우 Fig. 3-A와 같이 심한 꼬리 끌림현상이 발생하게 된다. 하지만 두 가지 용매의 혼용하여 사용할 때 그 팽창부피가 서로 유사하고 높다면 팽창부피가 큰 단일용매의 사용할 때와 마찬가지로 폭이 좁은 대칭형 피크를 얻을 수 있을 것이다(Fig. 3-B). SEC 컬럼의 용매에 따른 충전제의 팽창부피는 컬럼제 조사를 통해 정확한 정보를 얻을 수 있을 것이다. NP차원을 위해 가장 일반적으로 사용될 수 있는 이동상의 조합은 tetrahydrofuran-cyclohexane, dichloromethane-heptane, dichloromethane- acetonitrile, dichloromethane-methanol, trichloromethane-cyclohexane 등이 대표적이다⁵). 결론적으로 폴리머 분리분석을 위해 가장 선호되는 SEC와 NP를 이용한 2D-LC의 이동상의 선택은 대표성을 갖는 몇 개의 용매의 조합을 통해서 어렵지 않은 선택이 가능할 것이다.

1.5. NP×SEC×CAD 2D-LC 시스템 구성

Fig. 4는 새로운 범용 검출기인 CAD가 결합된 온라인 NP×SEC 2D-LC 시스템 구성을 보여주고 있다. 대부분의 일반적인 온라인 2D-LC 시스템은 첫 번째 차원에서 분리된 용출액이 동일한 부피를 갖는 루프가 장착된 멀티포트

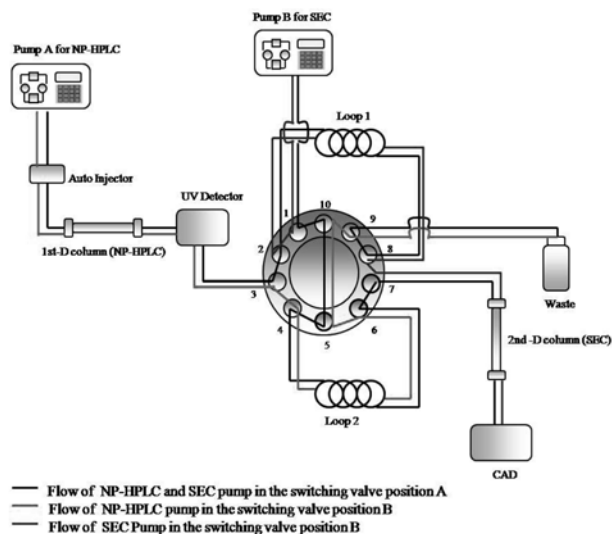


Fig. 4. Schematic of the on-line two-dimensional chromatography system.

스위칭 밸브(multi-port switching valve)를 거쳐 두번째 차원으로 전달된다. 멀티 포트 밸브에는 10 포트 밸브가 가장 일반적으로 사용되고 이외에도 8 포트와 6포트의 밸브를 한 개 이상 사용한 연결도 가능하다. Fig. 4에서 파란색과 붉은 색의 선으로 표시된 이동상의 이동경로는 10 포트 밸브의 포지션 변경(position A와 B)에 따른 이동경로의 변화

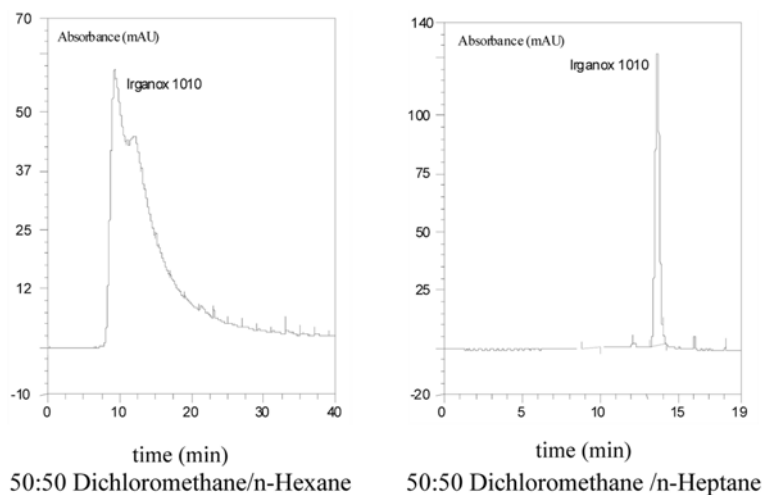


Fig. 3. SEC chromatograms of Irganox 1010 (polymer antioxidants) separated with two different mobile phase compositions

Conditions

Mobile phase	Chromatogram A : Dichloromethane (50%) / n-Hexane (50%), Isocratic Chromatogram B : Dichloromethane (50%) / n-Heptane (50%), Isocratic		
Column	Column: Shodex Semi-micro SEC column, KF-401 HQ (250 × 4.6 mm, 3 μm)		
Oven temperature	: 35°C,	Flow rate	: 2 ml/min,
Injection volume	: 10 μl	Detection	: UV 240 nm

를 보여 주고 있다. 주입된 시료는 첫번째 차원(NP-HPLC)에서 각 물질의 물리화학적 성질에 따라 분리가 되고 UV 검출기에 의하여 분리된 물질들의 흡광도가 기록된다. 이후 첫 번째 차원에서 분리된 용출액은 일정한 시간차를 두고 교대로 각 루프로 흘러 들어가 수집된다. 이때 각 루프의 용량에 맞게 용출액을 수집하기 위해 첫 번째 차원의 유속에 따라 스위칭 밸브의 포지션 변경 시간을 조절하게 된다. 하나의 루프에 용출액이 채워지는 동안 다른 루프에 수집된 용출액은 두 번째 차원SEC로 흘러 들어가 분리된다. 따라서 두 번째 차원에서의 분석시간은 첫 번째 차원에서 분리된 용출액이 하나의 루프에 채워지는 시간보다 최소한 짧거나 같아야 한다³²⁾. 최종적으로 두 번째 차원에서 각 물질의 분자크기(molecular size)에 따라 분리된 물질들은 두 번째 차원에 연결된 검출기 (CAD)에 의해 최종적으로 검출 된다.

1.6. 분석결과와 처리

Fig. 5는 2D-LC 분석에서 얻어진 피크들을 이용하여 정성(qualification)과 정량(quantification) 분석을 하기 위한 피크의 처리과정을 보여주고 있다. 2D-LC 분석을 통해 얻어진 피크들은 설정된 스위칭밸브의 포지션 변경 시간에 따라 잘라서 이차원 등고선 그래프(contour plot)나 삼차원 피크볼륨(peak volume)의 형태로 시각화하여 나타낼 수 있다. 최종적인 정량분석은 삼차원 피크의 볼륨을 계산하여 완성된다.

GC를 이용한 이차원 분리분석의 경우 얻어진 자료의 수집과 처리를 위해HyperChrom GC×GC Data Interpretation Software(Thermo Scientific)와 같이 이미 상업화된 컴퓨터 소프트웨어가 개발되어 있어 그 이용이 다방면으로 확대되고 있다. 그러나 2D-LC 에서 정량분석은 간단하지 않다. 왜냐하면 현재 2D-LC 분석의 결과 처리를 위해 개발된 소프트웨어가 없기 때문이다³³⁾. 많은 연구자들은 Matlab(The MathWorks, Natick, MA, USA)과 같은 전문 수학 컴퓨터 프로그램을 이용하여 자체적으로 프로그래밍하여 정량분석에 이용하고 있다^{33, 34)}. 하지만 정량분석을 위한 프로그래밍 자체가 일반인이 구현하기에는 어려움이 많다. 이러한 이유에서 지금까지 2D-LC 분리분석은 주로 정성분석에 초점을 맞추어 왔다.

2. 범용검출기의 이용

앞서 언급한 바와 같이 높은 감도를 갖는 범용검출기의 부재는 식품포장재내 비휘발성 물질의 동시분석을 위해 큰 제약점으로 지적되고 있다. 이를 위해 2005년 ESA (Chelmsford, MA, USA)사는 새로운 범용검출기인 CAD를 개발하였다. CAD는 분석대상 물질의 화학적 구조나 특성과는 상관없이 감도가 높은 검출이 가능한 범용검출기이다. CAD의 검출원리를 Fig. 6에 나타내었다. HPLC에서 분리된 분석대상물질을 포함한 이동상은 질소가스와 함께

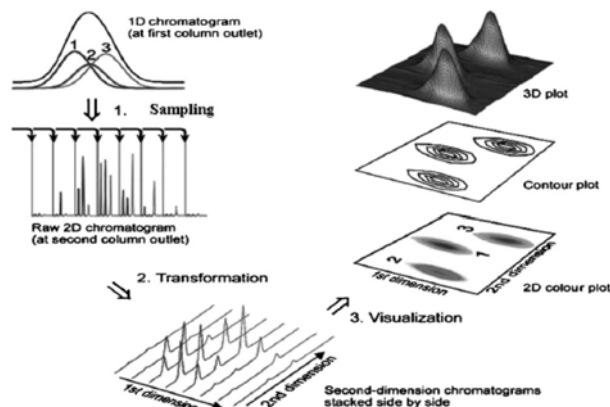


Fig. 5. Diagram of the flow of information as it is collected and analyzed in a comprehensive 2D separation experiment.

Step 1 shows that the collection and transfer of aliquots of first dimension column effluent and subsequent separation in the second dimension column produces a series of sequential second dimension chromatograms collected as one string of data. Steps 2 and 3 show how the sequential second dimension chromatograms can be reshaped to produce a variety of different representations of the 2D chromatogram¹²⁾.

drying tube속으로 분무되고 동시에 이동상과 휘발성 물질들은 증발되고 건조된 비 휘발성 분석대상 물질 입자들이 생성된다. 두번째 질소가스 공급관으로부터 도입된 질소가스는 고전압의 백금 코로나바늘에 의해 이온화되고 drying tube속에서 건조된 비 휘발성 입자들은 이온화된 질소가스에 의해 하전된다. 최종적으로 하전된 입자들이 고감도의 electrometer에 의해서 검출된다.

CAD의 반응은 분석물의 이화학적 특성에 의해 영향을 받지 않으며 감도는 ppb범위의 검출한계 (LOD)에 이를 만큼 충분한 것으로 보고되었다³⁵⁾. CAD 검출기의 가장 차별화된 검출 특성은 물질의 이화학적 특성과 무관하게 검출할 수 있는 범용성이다. 실제로 폴리머의 첨가제로 주로 이용되는Irganox PS 800과 Irganox PS 802는 분자구조내에 UV 반응 그룹이 없어UV 검출기로 분석이 불가능하다. 하지만 CAD 검출기로는 검출이 가능하였다 (Fig. 7). McCarthy 등³⁶⁾은 다양한 이화학적 특성을 갖는 비 휘발성 물질의 분석에서 CAD는 항상 일정한 값의 반응계수 (response factor : peak area/concentration), 넓은 dynamic range, 나노그램(ng) 수준의 높은 감도 그리고 상대표준편차 10% 이내의 우수한 재현성을 보고하였다. Pistorino 와 Pfeifer³⁷⁾는 3종류의 HPLC 검출기를 이용하여 polyketides를 분석하여 그 결과를 비교하였으며, CAD는 ELSD (evaporated light scattering detector)와 MS보다 우수한 LOD값을 보인 것으로 보고하였다. 마찬가지로 Takahashi 등³⁸⁾은 폴리에틸렌글리콜 (분자량 1000 g/mol)을 이용하여 ELSD와 감도를 비교한 결과 CAD가 10배 정도 낮은 LOD 값을 보인 것으

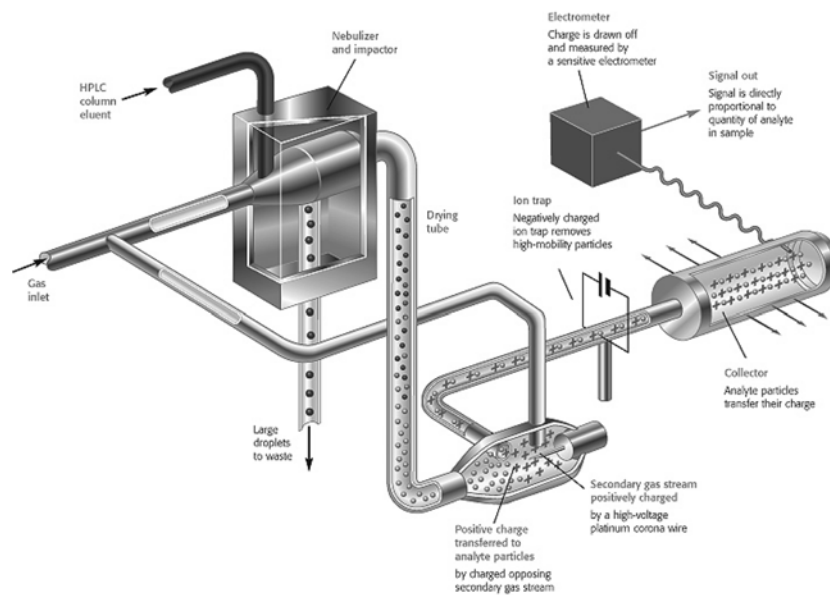


Fig. 6. Schema of the operation principle of the charged aerosol detector (CAD)³⁵⁾.

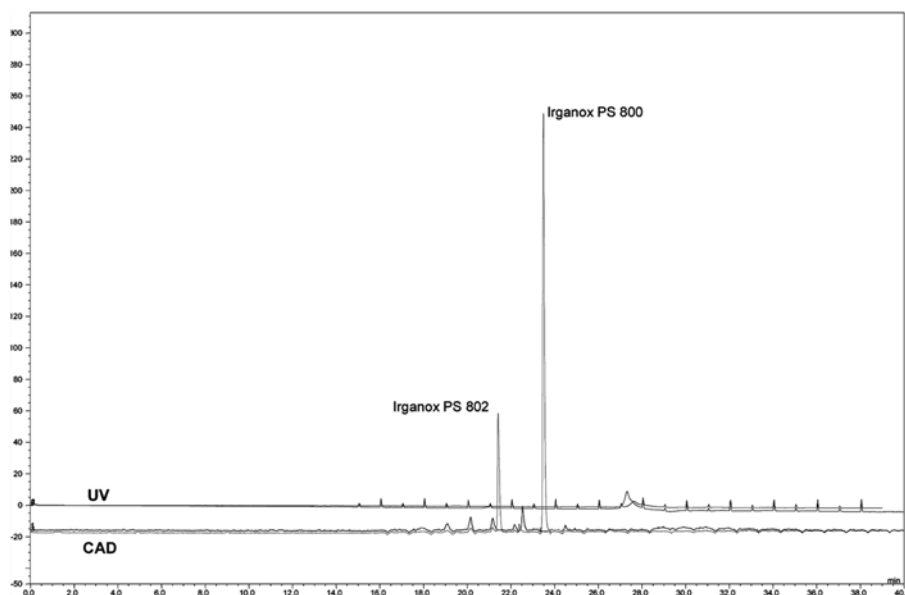


Fig. 7. UV and CAD chromatograms of Irganox PS 800 and PS 802.

Conditions

Mobile phase	Chromatogram A : Dichloromethane (30%) / n-Heptane (70%), Isocratic		
Column	: Phenomenex, Diol column (LiChrospher Diol 250 × 4.6 mm, 5 μm)		
Oven temperature	: 40°C,	Flow rate	: 2 ml/min,
			Injection volume : 25 μl
Detection	UV	: 240 nm	
	CAD	: Gas pressure 35 psi, none filter mode, 100pA range	

로 보고하였다. 하지만 휘발성 물질의 검출이 불가능한 점³⁵⁾, 그리고 이동상 중 유기용매의 함량에 따른 감도의 변화³⁾는 CAD의 약점으로 지적되고 있다. 그럼에도 불구하고 2D-

LC분리 시스템과 결합된 CAD는 식품포장재 내에 존재하는 잠재적 비 휘발성 이행물질의 분석에 새로운 가능성을 제시할 것으로 기대된다.

결론

식품포장재내에서 식품으로 이행가능한 비휘발성의 잠재적 이행물질의 동시분석을 위한 2D-LC분석의 이용 가능성을 알아보았다. 2D-LC분석을 통해 계산된 피크용량과 피크 분리능은 분석방법의 분리효율을 평가하는 지표이다. 또한 이러한 지표는 2D-LC분석에서 실질분석에서 보다 이론적으로 과대평가되는 경향이 있다. 하지만 분명한 것은 2D-LC분석은 일차원적 분석에서 보다 거의 배수에 이르는 높은 분리효율을 얻을 수 있다는 점이다. 지금까지 살펴본 바와 같이 SEC와 NP의 조합은 식품포장재의 제조를 위한 원료물질로 사용되는 폴리머의 분석을 위해 가장 적합한 조합이 될 것으로 생각된다. 또한 SEC와 NP가 조합된 대부분의 2D-LC는 SEC를 두 번째 차원으로 이용하였지만 이는 앞서 언급한 바와 같이 필요에 따라 언제든지 선후 조합을 달리하여 적용할 수 있을 것이다. 2D-LC분석에 결합되는 CAD는 현재까지 범용검출기로 이용되고 있는 ELSD나 RI검출기보다 휘발성 물질을 제외한 다양한 이화학적 특성을 갖는 물질에 대해 높은 감도와 안정적인 반응계수를 보일 것으로 기대 된다. 마지막으로 2D-LC의 정성/정량 분석을 위한 전문 소프트웨어는 분석 효율성과 수요의 증가에 따라 머지않은 시일내에 개발되고 실용화 될 것으로 기대된다.

참고문헌

- Peter, J. F., John, W. G. and Castle, L. 2001. Analysis for organic residue from aid to polymerization used to make plastics intended for food contact. *Food Additives and Contaminants*. 18: 461-471.
- Lucena, R., Cárdenas, S. and Valcárcel, M. 2007. Evaporation light scattering detection : trends in its analysis uses. *Anal. Bioanal. Chem.* 388: 1663-1672.
- Górecki, T., Lynen, F., Szucs, R. and Sandra, P. 2006. Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection. *Anal. Chem.* 78: 3186-3192.
- Dugo, P., Cacciola, F., Kumm, T., Dugo, G. and Mondello, L. 2008. Comprehensive multidimensional liquid chromatography : Theory and applications. *J. Chromatogr. A*. 1184: 353-368.
- Jandera, P. 2006. Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 29: 1763-1783.
- Giddings, J. C. 1967. Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods. *Anal. Chem.* 39: 1027-1028.
- Chang, T. 2003. Recent Advances in Liquid Chromatography Analysis of Synthetic Polymers. *Adv. Polymer Sci.* 163: 231-245.
- Gilar, M., Olivova, P., E.Daly, A. and Gebler, C. 2005. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Anal. Chem.* 77: 6426-6434.
- Van Gysegheem, E., Van Hemelryck, S., Daszykowski, M., Questier, F., Massart, D.L. and Vander Heyden, Y. 2003. Determining orthogonal chromatographic systems prior to the development of methods to characterise impurities in drug substances. *J. Chromatogr. A*. 988: 77-93.
- Van Gysegheem, E., Crosiers, I., Gourvénce, S., Massart, D.L. and Vander Heyden, Y. 2004. Determining orthogonal and similar chromatographic systems from the injection of mixtures in liquid chromatography-diode array detection and the interpretation of correlation coefficients color maps. *J. Chromatogr. A*. 1026: 117-128.
- Van Gysegheem, E., Jimidar, M., Sneyers, R., Redlich, D., Verhoeven, E., Massart, D.L. and Vander Heyden, Y. 2005. Orthogonality and similarity within silica-based reversed-phased chromatographic systems. *J. Chromatogr. A*. 1074: 117-131.
- Stoll, D. R., Li, X., Wang, X., Carr, P. W., Porter, S.E.G. and Rutan, S.C. 2007. Fast comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1168: 3-43.
- Cacciola, F., Jandera, P., Blahová, E. and Mondello, L. 2006. Development of different comprehensive two dimensional systems for the separation of phenolic antioxidants. *J. Sep. Sci.* 29: 2500-2513.
- Cacciola, F., Jandera, P. and Mondello, L. 2007. Temperature effects on separation on zirconia columns: Applications to one- and two-dimensional LC separations of phenolic antioxidants. *J. Sep. Sci.* 30: 462-474.
- Ikegami, T., Hara, T., Kimura, H., Kobayashi, H., Hosoya, K., Cabrera, K. and Tanaka, N. 2006. Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions. *J. Chromatogr. A*. 1106: 112-117.
- Kivilompolo, M. and Hyötyläinen, T. 2007. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of lamiaceae herbs : Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J. Chromatogr. A*. 1145: 155-164.
- Chen, X., Kong, L., Su, X., Fu, H., Ni, J., Zhao, R. and Zou, H. 2004. Separation and identification of compounds in *Rhizoma chuanxiong* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1040: 169-178.
- Mondello, L., Tranchida, P.Q., Stanek, V., Jandera, P., Dugo, G. and Dugo, P. 2005. Silver-ion reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography combined with mass spectrometric detection in lipidic food analysis. *J. of Chromatogr. A*. 1086: 91-98.
- Dugo, P., Favoino, O., Luppino, R., Dugo, G. and Mondello, L. 2004. Comprehensive Two-Dimensional Normal-Phase (Adsorption)Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 76: 2525-2530.
- François, I., Villiers, A. and Sandra, P. 2006. Considerations on the possibilities and limitations of comprehensive normal phase-reversed phase liquid chromatography (NPLC×RPLC). *J. Sep. Sci.* 29: 492-498.

21. Blahová, E., Jandera, P., Cacciola, F. and Mondello, L. 2006. Two-dimensional and serial column reversed-phase separation of phenolic antioxidants on octadecyl-, polyethyleneglycol-, and pentafluorophenylpropyl-silica columns. *J. Sep. Sci.* 29: 555-566.
22. Jandera, P. 2007. Column selection for two-dimensional LCxLC, LC.GC Europe, October 2007. Online version.
23. SCF. 2002. Note for Guidance (to petitioners applying for approval of substances to be used in food-contact materials). Scientific Committee for Food (available at: <http://www.cpf.jrc.it/webpack/>).
24. Van der Horst, A. and Schoenmakers, P. J. 2003. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers. *J. Chromatogr. A* 1000: 693-709.
25. Jang, X., Van der Horst, A., Lima, V. and Schoenmakers, P. J. 2005. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography for the characterization of functional acrylate polymers. *J. Chromatogr. A* 1076: 51-61.
26. Adrian, J., Esser, E., Hellmann, G. and Pasch, H. 2000. Two-dimensional chromatography of complex polymers Part 1. Analysis of a graft copolymer by two-dimensional chromatography with on-line FTIR detection. *Polymer* 41: 2439-2449.
27. Siewing, A., Lahn, B., Braun, D. and Pasch, H. 2003. Two-Dimensional Chromatography of Complex Polymers. IV. Analysis of the Grafting Reaction of Methyl Methacrylate onto polybutadiene. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 41: 3143-3146.
28. Kok, S.J., Hankemeier, Th. and Schoenmakers P.J. 2005. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with on-line Fourier-transform-infrared-spectroscopy detection for the characterization of copolymers. *J. Chromatogr. A* 1098: 104-110.
29. Stuurman, H. W. and Köhler, J. 1987. Characterization of some commercial poly(styrene-divinylbenzene) copolymers for reversed-phase HPLC. *Chromatographia* 23: 341 ~ 349.
30. Bowers, L. D. and Pedigo, S.. 1986. Solvent strength studies on polystyrene-divinylbenzene columns. *J. Chromatogr.* 371: 243-251.
31. Ells, B., Wang, Y. and Cantwell, F. F. 1999. Influence of solvent uptake and swelling by poly(styrene-divinylbenzene) column packings on sample sorption rate and band broadening in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 835: 3-18.
32. Murphy, R. E., Schure, M. R. and Foley, J. P. 1998. Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Anal. Chem.* 70: 1585-1594.
33. Kallio, M., Kivilompolo, M., Varijo, S., Jussila, M. and Hyötyläinen, T. 2009. Data analysis programs for comprehensive two-dimensional chromatography. *J. Chromatogr. A* 1216: 2923-2927.
34. Fraga, C. G. and Corley, C. A. 2005. The Chemometric resolution and quantification of overlapped peaks from comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1096: 40-49.
35. ESA Inc. online. 2009. http://www.coronacad.com/CAD_Overview. accessed on 10. Nov. 2009.
36. McCarthy, R., Gamache, P. and Asa, D. 2005. Development and evaluation of Corona Charged Aerosol Detection (CAD) : a new universal detector for HPLC, As published in LabPlus international June.
37. Pistorino, M. and Pfeifer, B. A., 2008. Polyketide analysis using mass spectrometry, evaporative light scattering, and charged aerosol detector systems. *Anal. Bioanal. Chem.* 390: 1189-1193.
38. Takahashi, K., Kinugasa, S., Senda, M., Kimizuka, K., Fukushima, K., Matsumoto, T., Shibata, Y. and Christensen, J. 2008. Quantitative comparison of corona-charged aerosol detector and an evaporative light-scattering detector for the analysis of synthetic polymer by supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1193: 151-155.