

모세관 전기영동 장치용 Photodiode Array 다채널 검출기의 개발에 관한 연구

홍승국 · 김해동*

경희대학교 기초과학연구소, 문리과대학 화학과
(1997. 8. 1 접수)

Development of a Multi-channel Detector for Capillary Electrophoresis System

Seung Guk Hong, Hai-Dong Kim*

Research Institute of Basic Sciences and Department of Chemistry,
Kyung Hee University Seoul, 130-701, Korea

(Received August 1, 1997)

요 약: 수 많은 광검출기들이 직선으로 집적된 광다이오드 어레이를 이용한 모세관 전기영동장치용 다채널 검출기를 개발하였다. 본 연구에서 사용된 광다이오드 어레이는 1024개의 광검출소자를 가지고 있으며 275~675 nm 파장범위에서 시료의 흡수분광스펙트럼을 검출할 수 있다. 이 장치는 30 ms내에 전 파장영역의 스펙트럼을 얻을 수 있으며, PC에 의하여 시료분석에 필요한 여러 가지 조건들을 제어할 수 있도록 설계하였다. 개발된 검출기의 성능을 L-ascorbic acid와 alizarin yellow GG를 사용하여 시험하였다. 본 연구에서 개발한 모세관 전기영동장치용 다채널 검출기의 재현성 실험결과 상대 표준편차는 5.6%이었다.

Abstract: A photodiode array multichannel detector system for capillary electrophoresis was developed. The photodiode array detector for capillary electrophoresis (CE-PDA) has 1024 photodetectors and can analyze sample by measuring UV/VIS absorption spectrum in 275~675 nm wavelength range. The CE-PDA instrument can get a spectrum in 30 ms during sample separation and can be programmed by a PC to control various experimental conditions required for sample analysis. The performance of the multi-channel CE-PDA instrument was tested using L-ascorbic acid and alizarin yellow GG mixture. The reproducibility test of the CE-PDA system showed 5.6% RSD.

Key words: CE, photodiode array, multi-channel detector

1. 서 론

용액내에 존재하는 분자들은 대부분 양이온이나 음이온으로 존재하게 된다. 용액에 전기장을 걸어 주게 되면 각 이온들은 전기장에 대한 인력 또는 반발력에 의하여 반대되는 전극으로 이동을 하게 된다. 이러한 현상을 전기영동으로 정의하고 있다.¹ 전기영동에 의하여 이동되는 각 이온들은 이동도의 차이를 나타내게 된다. 이러한 이동도의 차이에 의하여 물질을 분리

할 수 있는데, 이동도는 각 이온의 크기와 전하량에 관련된다.²

전기영동법은 1937년 스웨덴의 생화학자 Tiselius에 의하여 처음 도입되었다. Tiselius의 실험은 완충용액 중에서 수행하였기 때문에 전류에 의한 열(Joule heating)이 발생되어 열 확산 현상이 나타난다. 또한 열 대류에 의하여 용액이 혼합되어 분리효율이 좋은 결과를 얻을 수 없었다. 그 이후 1967년에 Hjerten은 처음으로 모세관을 이용한 전기영동 실험

을 수행하였으며,³ Virtanen⁴과 Mikkers⁵는 각각 유리 와 테프론으로 만들어진 안지름 200 μm 의 모세관으로 전기영동 실험을 시도하였다. 모세관 전기영동법은 1980년 초에 Jorgenson과 Lukacs에 의하여 안지름 75 μm 인 용융 실리카 모세관이 사용되면서 더욱 발전되었다.⁶ 특히 Jorgenson은 모세관 전기영동법에 대한 이론을 정립시켰으며, 연산 파라미터와 분리 정도 사이의 상관관계를 확립시킴으로써 분석의 한 방법으로서 모세관 전기영동법의 가능성을 제시하였다. 모세관 전기영동법에는 여러 가지 작동방법이 소개되고 있는데, 가장 간단한 방법인 모세관 구역 전기영동법(capillary zone electrophoresis, CZE)이 있고, 그 외에 마이셀 동전기 크로마토그래피(micellar electrokinetic chromatography, MEKC),⁷ 모세관 겔 전기영동법(capillary gel electrophoresis, CGE),^{8,9} 모세관 등전위 집중법(capillary isoelectric focusing, CIEF),^{10,11} 모세관 등속 전기영동법(capillary isotachophoresis, CITP) 등이 있다. 각 작동 방법들은 완충액의 농도, 전압, pH와 같은 실험조건을 조절하거나 또는 계면활성제를 완충용액에 가함으로써 쉽게 상호 전환되어진다. 본 연구에서는 모세관 구역 전기영동법을 사용하여 분리, 분석하였다.

전통적인 전기영동법에서 보여지는 열 확산과 대류에 대한 영향을 제거하기 위하여 폴리 아크릴아미드(polyacrylamide)나 아가로스 겔(agarose gel)과 같은 항대류매체(anti-convective media) 중에서 대류의 영향을 최소화시킴으로써 분리능을 향상시킬 수 있었다.¹² 이러한 전기영동법은 많은 발전이 있어 왔지만, 시간이 많이 걸리고 겔의 제조가 쉽지 않으며, 자동화 시스템의 도입이 어렵다는 단점을 지니고 있다. 그러나 모세관 전기영동법을 이용하면 분석 시간을 단축할 수 있을 뿐만 아니라, 자동화 시스템으로 검출할 수 있는 장점이 있다. 또한 아주 작은 안지름의 모세관을 사용하기 때문에 피부에 대한 표면적의 비가 커서 열이 모세관 벽을 통하여 효과적으로 발산되므로 대류의 영향을 거의 제거할 수 있다. 따라서 넓은 현상은 단지 확산에 의해서만 영향받게 되므로 매우 높은 분리능을 가질 수 있다. 시료의 한번 주입량은 nanoliter 단위이므로 매우 적은 양의 시료라 하더라도 분석할 수 있다. 그리고 시료의 분산에 의한 넓은 현상을 최소화하기 위하여 현재는 고전압을 pulse 형태로 가하여 높은 분리 효율을 얻고자 하는

연구가 진행되고 있다.^{13,14} 특히 double-stranded DNA와 같은 분자의 경우 매우 효율적으로 분리능이 향상되는 것이 보고되고 있다.¹⁵

모세관 전기영동법의 검출기로는 UV/VIS 흡광 검출기, 레이저 유도 형광 검출기, 전도도 검출기, 질량 분석 검출기 등이 사용되고 있다. 레이저 유도 형광 검출기의 경우 가장 감도가 뛰어나다(검출한계: $10^{-14} \sim 10^{-16}$ M). 그러나 가격이 비싸고 경우에 따라 시료를 유도체화 해야 할 필요가 있다. UV/VIS 흡광 검출기는 넓은 파장 범위에서 시료를 검출할 수 있으며, 분석 성분을 변형하지 않아도 검출할 수 있으므로 가장 널리 사용되고 있다.¹⁶ 대부분의 모세관 전기영동장치는 광전자 증배관(photomultiplier tube, PMT)을 사용하여 단일파장에서만 검출할 수 있다.

본 연구에서는 1024개의 광검출 소자(photodiode)를 지닌 photodiode array(PDA) 검출기를 사용하였다. PMT 검출기를 사용한 단일 채널 검출기는 시료의 최대 흡수파장을 알고 있어야 하기 때문에 먼저 시료의 흡광도 spectrum을 얻어야 한다. 그러나 PDA를 사용한 다채널 검출기의 경우에는 분리와 동시에 검출가능한 전 파장의 spectrum을 얻을 수 있다. 때문에 다채널 검출기는 혼합물의 분리할 수 있으며, 동시에 시료의 spectrum을 분석하여 정성분석을 할 수 있다. 본 연구에서 개발한 장치는 1024개의 광검출 소자에서 data를 얻는데 30 ms내에 검출할 수 있기 때문에 50개의 data를 얻어 summing average 방법에 의하여 S/N(signal-to-noise)를 증가시켜도 1.5초 내에 spectrum을 얻을 수 있다. Summing average 방법을 사용하기 위해 얻는 data의 수를 조절하면 data를 얻는 시간 간격을 자유롭게 조절할 수 있다. 다채널 모세관 전기영동장치의 대부분은 PC(personal computer)에 의하여 제어함으로써 시료의 분리, 검출을 편리하게 하였다. 그리고 CE-PDA 장치를 개발한 후 L-ascorbic acid를 사용하여 재현성 실험을 수행하였고, L-ascorbic acid와 alizarin yellow GG의 혼합물을 사용하여 물질 분리 실험을 하였다.

2. 실험

2.1. 시 료

모세관 전기영동장치는 완충액의 pH에 따라 전기삼투 흐름(electroosmotic flow: EOF)이 매우 민감

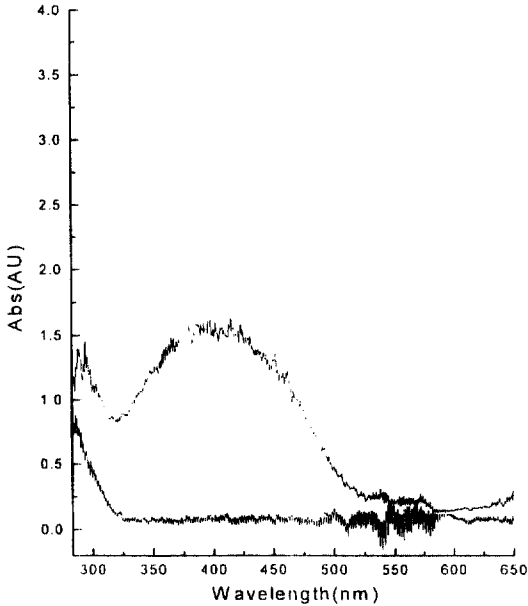


Fig. 1. Absorption spectra of 0.1 M L-ascorbic acid and 0.1 M alizarin yellow GG.

하게 변화한다.¹⁷ 완충용액은 선택된 pH 범위에서 높은 완충용량을 가지고 있어야만 하며, 검출 파장 범위에서 낮은 흡광도를 유지하여야만 한다. 그리고, 전류의 발생을 최소화하기 위하여 낮은 이동도를 지니고 있어야 한다. 본 연구에서는 pH가 6.8인 완충용액을 사용하여 실험하였다.

본 연구에서 개발한 모세관 전기영동장치를 테스트하기 위하여 표준시료로써 Duksan pharmaceutical사의 special grade인 L-ascorbic acid 0.1 M과 Junsei Chemical사의 extra pure grade의 alizarin yellow GG 0.1 M을 사용하였다. L-ascorbic acid의 파장에 대한 흡수 spectrum을 Fig. 1에 나타내었다. L-ascorbic acid는 Fig. 1에서 보이듯 283~325 nm까지 흡수를 일으킨다. Alizarin yellow GG의 파장에 대한 흡수 spectrum은 Fig. 1에 함께 나타내었다. Alizarin yellow GG는 ascorbic acid의 경우보다 넓은 범위인 283~525 nm까지 흡수를 일으키는 것을 볼 수가 있었다.

2.2. 실험장치

본 연구에 사용된 장치는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 분광기, 제어장치, 고전압 전원, 모세관으로 구성되어 있다. PC는 digital out channel을 통하여 고전압 전원을 제어하였고, 8254 counter/timer를 사용하

여 분광기를 작동시켰다. Lamp에서 나온 빛은 모세관을 통과한 후 spectrograph에 도달하게 되고, grating에 의해 파장별로 분산되어 PDA에 의해 검출할 수 있다. 빛의 intensity는 분광기에 의하여 analog 신호로 바뀌고, analog 신호는 ADC(analog-to-digital converter)에 의하여 digital 신호로 바뀌어 PC에 저장되게 하였다.

2.2.1. 분광기

광원으로는 Hamamatsu사의 deuterium lamp를 사용하였다. Deuterium lamp는 UV 파장 범위의 빛을 방출한다. 많은 종류의 분자들은 UV 파장 범위에서 최대 흡수 파장을 나타내므로 deuterium lamp는 시료를 검출하는데 유리한 장점이 있다. Deuterium lamp의 spectrum에서 보듯이 300~525 nm와 625~650 nm 범위에서 강한 intensity를 보여주는 것을 볼 수 있다. 650 nm 이상의 data는 잡음으로 의미가 없다.

광원으로부터 나온 빛을 lens($f=5$ cm)를 통하여 평행광으로 만들어 준 후 같은 lens를 사용하여 모세관에 집중시켰다. 모세관을 통과한 빛은 광섬유를 통하여 spectrograph까지 도달하게 된다. Spectrograph는 Oriels사의 125 mm spectrograph(model number: 77400)이다. Spectrograph의 내부에는 2개의 거울과 grating(model number: 77416, groove

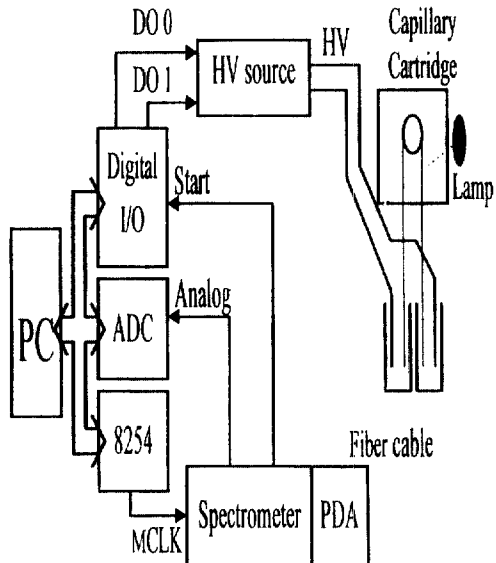


Fig. 2. Schematic diagram of the multichannel capillary electrophoresis system.

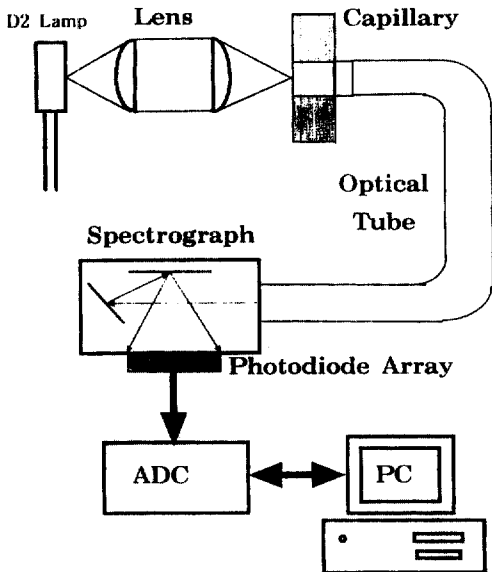


Fig. 3. Block diagram of the CE-PDA optical detection system.

spacing: 400 L/mm, spectral range: 300 ~900 nm) 으로 구성되어 있다. Grating에 의해 분산된 빛은 Photodiode array(PDA)에 각 파장에 따라 검출된다. PDA는 EG & G사의 제품(model number: RL 1024SAQ-011)을 사용하였다. PDA에는 1024개의 광검출 소자가 배열되어 있으며, 이용 가능 파장 범위는 275~675 nm이다. 본 연구에서는 283~650 nm의 범위를 사용하였다. PDA에 의해 검출된 빛은 analog 신호로 바뀌게 되고, 바뀐 analog 신호는 ADC에 의해 digital 신호로 바뀌어 PC에 저장된다. CE-PDA 검출 장치를 Fig. 3에 나타내었다.

Sensor board는 EG & G사의 RC100을 사용하였다. RC100의 전원으로 +5 V, +12 V, -12 V를 공급하였다. Master clock(MCLK)은 ADC board의 8254 counter/timer를 이용하여 1 cycle이 30 μ s로 설정하였으며, signal start 신호는 RC1000에서 자체적으로 발생하도록 하였다. PDA 내부에 있는 shift register는 MCLK에 따라 1024개의 광검출 소자를 순차적으로 검출할 수 있게 한다. MCLK와 signal start 신호, video out 신호에 대한 timing diagram을 Fig. 4에 나타내었다. Scan start 신호가 나오게 되면 master clock에 따라 sample-and-hold(S/H) 신호가 발생되어 순차적으로 1024개 광검출 소자의 신호들이 나오게 된다. 광검출 소자의 신호는 sensor board를 통하

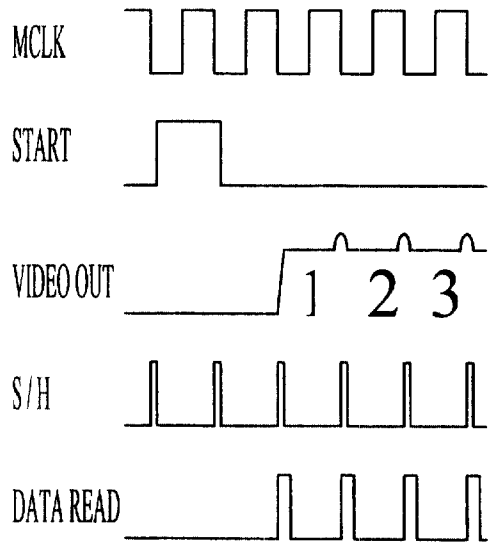


Fig. 4. Timing diagram of the PDA controller.

여 video out 신호로 나오게 되고, amplifier를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 data 신호는 ADC board를 사용하여 12-bit digital 신호로 변환한 후에 PC에 저장되게 하였다.

2.2.2. 제어장치

ADC board는 Computer Boards사의 CIO-DAS 16/JR을 이용하였다. CIO-DAS16/JR의 ADC는 Burr-Brown사의 ADS7800(12bit ADC, full scale ± 10 V, conversion time: max 2.7 μ s)이다. CIO-DAS16/JR은 4개의 digital in/out channel을 가지고 있다. Digital out channel(DO 0, DO 1)은 고전압 발생장치를 제어하는데 사용되었고, digital in channel(DI 0)은 scan start 신호를 확인하는데 사용하였다. Spectrometer에서 나오는 analog 신호는 analog in channel 1에서 읽어 들였다. Data 신호는 oscilloscope에서 크기를 확인한 후 CIO-DAS16/JR의 gain을 설정하였다. RC1000의 scan start 신호가 나오면 S/H 신호에 의하여 analog data를 읽어 들인 후 ADC에 의하여 digital 신호로 변환하였다. 고전압 발생장치는 Spellman사의 CZE2000을 사용하였다. 이 고전압 전원장치는 -30~+30 kV까지 전압을 발생시킬 수 있으며, 외부 PC에서 작동방식과 출력 전압을 조절할 수 있도록 제작하였다.

2.2.3. 모세관

모세관은 Beckman사의 capillary tube를 사용하였

다. 모세관의 재질은 용융 실리카이기 때문에 화학적, 전기적으로 안정하고, 자외선, 적외선 영역의 빛을 흡수하지 않는다는 특성을 지닌다. 내부는 silanol기가 존재하여 pH의 변화에 따라 EOF를 조절할 수 있으므로 본 연구 조건과 일치하였다. 표면은 폴리이미드 (polyimide) 코팅이 되어 있어서 쉽게 휘어질 수 있기 때문에 사용하기가 편리하였다. 검출기와 연결된 부분은 열을 이용하여 폴리이미드 코팅을 벗겨내 cartridge에 장착하여 사용하였다. 모세관의 안지름은 75 μm , 바깥 지름은 375 μm , 총 길이는 75 cm이었으며, 유효 길이는 70 cm이었다.

2.3. 실험 방법

2.3.1. 시료의 주입

모세관 전기영동법에서는 시료를 분리하기 전에 증류수와 완충용액을 사용하여 모세관 내벽에 흡착되어 있는 이물질들을 제거하여야 하고, 모세관 내부를 완충용액으로 채워야만 한다. 모세관 내부를 완충용액으로 채우기 위하여 N_2 gas를 사용하여 외부에서 압력을 가하였다. 시료의 주입 방법으로는 압력 차이를 이용하여 주입하는 방법인 유체역학적 주입법(hydrodynamic injection method)과 전압의 차이를 이용한 동전기 주입법(electrokinetic injection method)이 있다. 본 실험은 동전기 주입법에 의하여 시료를 주입하였다. 동전기 주입법은 Na^+ 나 Cl^- 등과 같은 이온의 matrix 효과로 인해 용액의 전도도가 변화하게 되어 주입량이 차이가 날 수 있는 단점이 있다. 왜냐하면 주입량은 전압과 비례하는데 전도도에 의하여 전압의 변화가 생길 수 있기 때문이다. 반면에 이 방법은 별다른 장치의 도움이 필요하지 않고, 완충용액의 matrix만 일정하게 유지시키면 비교적 재현성 있는 주입량이 결정되는 장점이 있다.¹⁸

2.3.2. 시료의 전개

주입된 시료를 분리하기 위하여 고전압을 사용하게 되는데, 이때 고전압의 작동 방식으로는 전류를 일정하게 하는 방법과 전류를 일정하게 하는 방법이 있다. 본 연구에서는 전압을 일정하게 하여 시료를 전개하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분광기의 표준화

본 연구의 광원으로는 Hamamatsu사의 deuter-

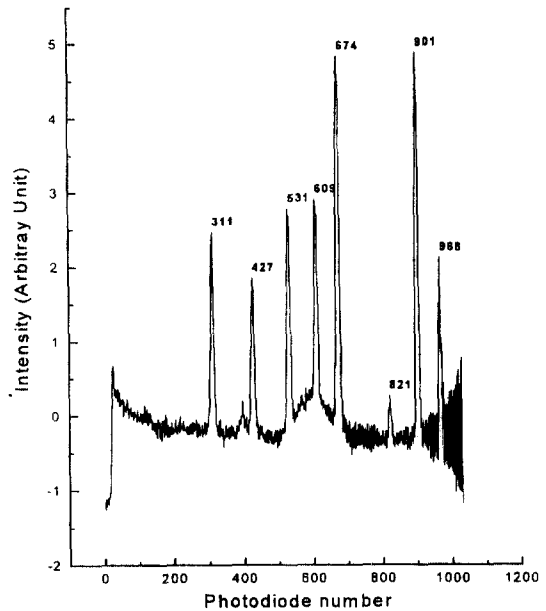


Fig. 5. Spectra of a mercury lamp obtained by home-built spectrometer.

ium lamp를 사용하였는데, 이때 파장을 보정하기 위하여 mercury lamp를 이용하였다. Mercury lamp는 일정한 파장에서 특성적인 spectrum을 얻을 수가 있다. 본 연구에서 사용한 spectrograph는 280 nm 이상의 파장을 검출할 수 있으므로, 분광기를 표준화하기 위하여 310.2 nm에서 575.7 nm에 나타난 peak를 이용하였다. 본 연구에 사용된 분광기를 이용하여 mercury lamp의 특성적인 spectrum을 검출한 결과를 광검출 소자의 수에 대한 intensity로 Fig. 5에 나타내었다. 본 연구에 사용된 분광기의 파장은 광검출 소자의 수에 따라 식 (1)에 의하여 유도하여 환산하였다.

$$\lambda = 0.48 * (P - \text{No}) + 100.70 \quad (1)$$

P - No: Photodiode number

식 (1)에 의하여 구해진 파장 중에서 280~675 nm의 범위를 이용하여 본 연구에 사용된 시료의 흡수계수를 측정하였다.

3.2. 다채널 모세관 전기영동장치 제어 프로그램

본 연구에서 CE-PDA 장치를 제어하기 위하여 사용한 program은 Boland사의 C++ 3.1이다. 이 program의 flow chart를 Fig. 6에 나타내었다. Flow

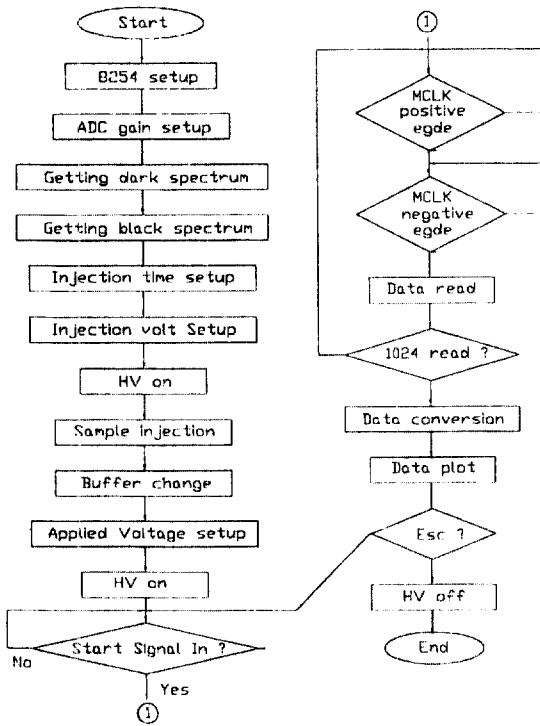


Fig. 6. Flow chart of CE-PDA control program.

chart에 나타난 바와 같이 먼저 8254 counter/timer를 설정하였다. 8254 counter/timer는 clock을 발생하게 되고, 이 clock은 sensor board의 MCLK 신호로써 사용하게 된다. ADC의 gain은 sensor board에서 발생된 video 신호를 oscilloscope에서 확인한 후 설정하도록 하였다. Dark spectrum과 blank spectrum은 absorbance unit(AU)를 계산하기 위하여 PC에 저장한 후 시료 주입 시간과 시료를 주입하기 위해 공급되는 voltage를 설정하여 시료를 주입하였다. 시료 용기를 완충용액 용기로 바꾼 후 주입된 시료를 전개시키기 위한 voltage를 설정하여 시료를 전개시켰다. 그리고 sensor board에서 발생된 start 신호를 확인하여 MCLK에 따라서 data를 얻었다. 1024개의 data를 모두 얻은 후 PC에 저장하였다. 그 후 scan start 신호가 나올 때까지 기다린 후 다음 1024개의 data block을 얻도록 하였다. 얻어진 data를 식 (2)에 의하여 AU로 바꾸어준 후 일정범위의 흡광도를 합하여 시간에 대한 spectrum을 만들게 하였다. 전개가 모두 끝난 후 data spectrum과 dark spectrum, blank spectrum을 식 (2)에 대입하여 전

파장에 대하여 AU를 구하여 저장하였다.

$$AU = -\log \left[\frac{SD-DD}{BD-DD} \right] \quad (2)$$

SD: Sample data

BD: Blank data

DD: Dark data

3.3. 다채널 모세관 전기영동 장치의 성능 시험

본 연구에서 개발한 다채널 모세관 전기영동장치의 성능을 시험하기 위하여 표준시료로써 L-ascorbic acid와 alizarin yellow GG를 사용하였다. L-ascorbic acid를 사용하여 검출시간에 대한 재현성을 확인하였고, 두 시료의 혼합물을 사용하여 분리 시험을 하였다. 각 실험을 하기 전에 283~675 nm의 파장범위의 dark 신호와 blank 신호를 구하였다. 두 신호는 각 파장 당 150개의 data를 합한 후 평균하여 구하였다. Dark 신호와 blank 신호는 식 (2)에 의하여 AU로 환산하는데 사용하였다.

3.3.1. 표준시료의 분석

본 연구에 사용된 검출기는 다채널 방식이기 때문에 시간이 지남에 따라 시료를 검출하면, 시간, 파장, 흡광도를 이용하면 시료가 분리되는 동시에 시료 분석이 가능한 3차원 UV/VIS spectrum을 얻을 수 있다. 만약 전기영동법에 의하여 시료의 분리가 일어나지 않는다면 단일 파장 검출기로는 정성분석이나 정량분석을 할 수 없다. 그러나 PDA를 사용한 경우에는 시료가 분리되지 않는다고 하더라도 시료의 표준 UV/VIS spectrum을 알고 있다면 시료 분석이 가능하다. L-ascorbic acid의 흡광도와 시간, 파장에 대한 3차원 graph를 Fig. 7에 나타내었다. 각 시료가 나타나는 일정 시간에서 spectrum을 보면 Fig. 1에서 보여지는 spectrum과 같음을 알 수 있다. L-ascorbic acid의 경우에는 283~325 nm의 범위에서 흡수를 일으키지만, AU가 약 0.7로 적은 것을 알 수 있었다. 그러나 alizarin yellow GG는 283~500 nm의 범위에 흡수를 일으키고, 최대흡수 AU는 약 1.7AU인 것을 알 수 있다. 그러므로 325~500 nm 범위의 어느 한 파장을 선택하여 검출한다면 L-ascorbic acid의 경우에는 검출되지 않을 것이고, 283~325 nm 범위의 한 파장에서 검출하여도 L-ascorbic acid의 AU가 작기 때문에 검출은 어려울 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에

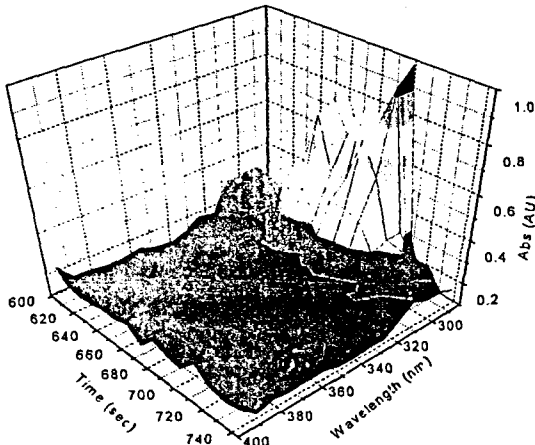


Fig. 7. Three-dimensional spectrum of 0.1 M L-ascorbic acid.

서 사용된 PDA 검출기는 각각의 최대 흡수 파장에서 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 283~500 nm의 data를 합하여 구할 수 있기 때문에 AU가 크지 않다고 하더라도 검출할 수 있다.

3.3.2. 기기의 재현성 실험

L-ascorbic acid의 경우 검출 속도가 빠르고, 떠넘힘 현상이 크지 않으므로 peak 검출시간의 재현성을 얻을 수가 있었다. 0.1 M L-ascorbic acid를 6번 검출하여 재현성을 알아보았다. 재현성 실험결과와 조건을 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보여지는 AU는 283~350 nm 범위의 AU값을 모두 합하여 구하였다. 전압을 21 kV로 설정하여 검출하였을 때, 평균 검출시간은 496초로 나타나고, 표준편차는 31.9초였다. 그리고 상대 표준편차는 6.4%였다.

3.3.3. 검출 파장 범위에 따른 검출 곡선의 변화

0.1 M L-ascorbic acid를 검출하는데 있어서 검출

Table 2. Peak area and detection time at different wavelength ranges

Data number	Wavelength (nm)	Detection time (sec)	Peak width (AU)
1	300~350	474	1.97
2	330~400	474	1.37
3	350~400	474	1.11
4	290~300	481	6.50
5	400~450	474	0.63
6	283~350	481	2.08

파장의 범위를 다르게 함으로 S/N의 크기를 조절할 수 있다. 0.1 M L-ascorbic acid의 경우 Fig. 1에 나타난 바와 같이 본 연구에서 개발한 장치를 사용하면 283~325 nm 파장범위에서 흡수를 나타내는 것을 알 수 있었다. 0.1 M L-ascorbic acid를 21 kV로 10초간 주입하였을 때 검출 파장 범위에 따라 변화된 ascorbic acid의 검출결과를 Table 2에 나타내었다. 모든 data는 검출 파장 범위내의 각 photodiode에 해당하는 data를 합하여 구하였다. 검출 파장 범위를 290~300 nm로 설정하였을 때 가장 peak의 넓이가 큰 것을 알 수 있었다. 검출시간에 있어서도 같은 data를 분석했음에도 차이가 있는 것을 발견할 수 있었다. PDA에 의해 검출 가능한 전 파장에서 시료를 검출할 수 있으므로 가장 S/N가 큰 파장 범위를 구하여 검출할 수 있었다.

Table 1. Reproducibility of the CE-PDA system using 0.1 M L-ascorbic acid

Data number	Injection time (sec)	Power supply (kV)	Detection time (sec)	Peak width (AU)
1	10	21	509	2.123
2	10	21	481	2.176
3	10	21	474	2.391
4	10	21	460	2.389
5	10	21	488	2.459
RSD(%)			3.7	5.6

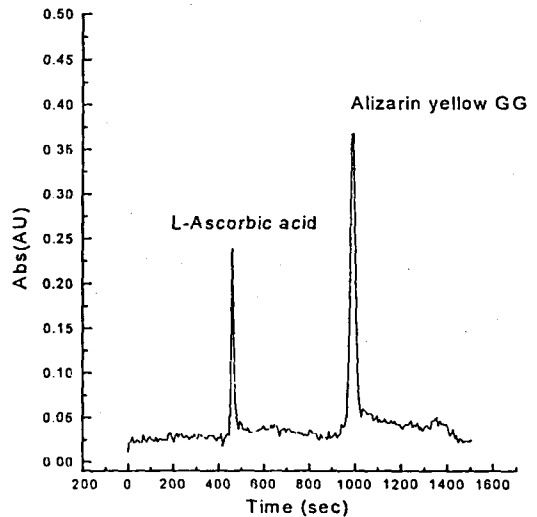


Fig. 8. Separation of a 0.1 M L-ascorbic acid and 0.1 M alizarin yellow GG mixture sample.

3.3.4. 혼합물의 분리 실험

PDA를 사용하면 시료의 검출에 있어서 여러 가지 방법에 의하여 spectrum을 구할 수 있다. 어느 한 파장만을 선택하여 시간에 대한 흡광도를 구할 수 있으며, 각 시료의 최대 흡수 파장범위만을 선택하여 검출할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 일정 파장 범위의 흡광도를 검출한 후 각 파장에 대한 흡광도를 모두 합하여 시간에 대한 흡수 spectrum을 얻었다. 이때 시료는 L-ascorbic acid와 alizarin yellow GG를 사용하여 분리 실험을 하였다. 일정 파장 범위는 두 시료가 모두 흡수를 일으킬 수 있는 283~500 nm 범위의 흡광도를 검출하여 합하였다. 두 물질이 분리된 spectrum을 Fig. 8에 나타내었다. 혼합물의 주입은 25 kV로 15초간 하였으며, 21 kV로 분리하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 1024개의 광검출 소자가 배열되어 있는 다채널 방식의 photodiode array(PDA) 검출기를 사용한 결과, 283~675 nm의 파장 범위에서 검출이 가능하였다. 8254 counter/timer를 사용하여 발생 시킨 master clock(MCLK)의 1 cycle을 30 μ s로 설정하였기 때문에 전 파장을 검출하는데 30 ms내에 검출할 수 있었다. 모든 data는 50개 구간 후 평균하였는데, 50번 합하여 평균을 구하면 S/N을 약 7배 향상시킬 수 있었고, 평균한 data를 1.5초 내에 얻을 수 있었다.

개발된 CE-PDA 장치의 검출 시간과 검출 peak의 넓이에 관한 재현성을 조사하였다. L-Ascorbic acid의 검출 시간의 상대 표준 편차는 6.4%였고, 검출 peak 넓이의 상대 표준 편차는 20.1%였다. 검출 시간에 비하여 검출 peak 넓이는 매우 재현성이 떨어짐을 알 수가 있었다. 그 이유는 중성 용매에 L-ascorbic acid가 녹아 있는 경우, 265 nm가 최대 흡수 파장이나, 검출 파장 범위는 283 nm부터 350 nm이기 때문에 신호의 크기가 작았다. 만약 검출 범위를 최대 흡수 파장 범위까지 확장을 시킨다면 검출 peak 넓이에 대한 재현성을 얻을 수 있을 것이다. 또한 본 연구에 사용된 grating의 spectral range가 300~900 nm의 범위이기 때문에 283~300 nm까지는 잡음이 심하다. 잡음의 영향 때문에 재현성 있는 data를 얻지 못하였다. 본 연구에서 개발된 CE-PDA 장치로 물질 분리

실험을 하기 위하여 표준시료로써 L-ascorbic acid와 alizarin yellow GG를 사용하였다. L-ascorbic acid의 검출 시간과 재현성 실험에서 구한 평균 검출 시간을 비교한 상대 오차는 7.83%였다.

CE-PDA 장치에서는 빛을 검출기에 도달하게 하기 위하여 광섬유를 사용하므로 광원과 모세관, 검출기를 일렬로 배열할 필요가 없어 자유로운 이동이 가능하였다. 본 연구에서는 시료의 주입과 출력 고전압의 제어를 자동화하지 못하고, 가변 저항에 의하여 제어를 하였다. 그러므로 시료의 전개를 위하여 고전압을 공급할 때, 출력 고전압을 항상 재현성 있게 유지하지 못하였다. 출력 고전압을 재현성 있게 유지할 수 있다면 검출 시간의 재현성이 좀더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다. 광학장치의 개선과 시료의 주입의 자동화, 고전압 제어의 자동화가 이루어지면 본 연구에서 얻어진 재현성보다 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비와 1996년 교육부 기초과학 육성연구비(BSRI-96-3439)의 지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 324(1997).
2. H. J. Issaq, G. M. Janini and I. E. G. M. Muschik, *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 817(1998).
3. F. M. Mikker, F. M. Everaerts, and P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, **169**, 11(1979).
4. R. Virtanen, *Acta. Polytech. Scand.*, **123**, 1(1974).
5. F. E. P. Mikker and P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, **169**, 11(1979).
6. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *Science*, **222**, 266(1983).
7. T. Terabe, K. Otsuka and T. Ando, *Anal. Chem.*, **57**, 834(1985).
8. A. Vinther and H. Sceberg, *J. Chromatogr.*, **559**, 2(1991).
9. J. Noolandi, J. Rousseau, G. W. Slater, C. Turnel and M. Lalande, *Phys. Rev. Letter*, **58**, 2428(1987).
10. J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **58**, 743A(1986).
11. T. Wehr, M. Zhu, R. Rodriguez, D. Bruke and K. Duncan, *Am. Biotechnol. Lab.*, **8**, 22(1990).
12. M. W. McDonnel, M. N. Simon and F. W. Stadler.

- J. Mol. Biol.*, **110**, 114(1977).
13. G. P. Carle, M. Frank and M. V. Olson, *Science*, **232**, 65(1986).
 14. C. Heller, C. Pakleza and J. L. Viovy, *Electrophoresis*, **16**, 1423(1995).
 15. J. Sudor and M. Novotny, *Nucleic Acids Research*, **23**, 2538(1995).
 16. R. A. Ewing, R. A. Wallingford and T. M. Olefirowicz, *Anal. Chem.*, **61**, 292A(1989).
 17. E. Kenndler and W. Friel, *J. Chromatogr.*, **595**, 313(1992).
 18. X. Hwang, M. J. Gordon and R. N. Zare, *Anal. Chem.*, **60**, 375(1988).