

흡착평형식의 결정을 위한 Frontal Analysis와 Pulsed Input Method와의 비교

최용석 · 이주원 · 노경호[†]

인하대학교 공과대학 화학공학과
(2000년 1월 11일 접수, 2000년 3월 29일 채택)

Comparison of Frontal Analysis and Pulsed Input Method for Determining Adsorption Isotherm

Yong Seok Choi, Ju Weon Lee and Kyung Ho Row[†]

Dept. of Chem. Eng., College of Eng., Inha University
(Received 11 January 2000; accepted 29 March 2000)

요 약

크로마토그래피 공정에서 가장 기본이 되는 것이 흡착평형식이다. 역상 액체크로마토그래피에서 thymidine과 5'-GMP의 흡착평형식을 구하기 위해 frontal analysis(FA)와 pulsed-input method(PIM)의 두 가지 방법을 이용하였다. Langmuir 흡착평형식으로 가정하여 매개변수 a 와 b 값을 FA와 PIM의 방법에 의해서 구하였다. FA에서는 고정상의 농도를 용출곡선으로부터 측정하고 회귀분석을 하였고 PIM에서는 Langmuir 흡착평형식의 매개변수를 최적화방법에 의해 구하였다. FA와 PIM의 방법으로부터 구한 thymidine과 5'-GMP의 흡착평형식은 유사하였다. FA 방법에 비해서 PIM의 장점은 시료의 양이 적게 소모되고 실험방법이 간편하였다.

Abstract – Adsorption isotherm is the most fundamental information related to chromatography process. To calculate the parameters of Langmuir adsorption isotherm, a and b , of thymidine and 5'-GMP, frontal analysis(FA) and pulsed-input method(PIM) were adopted in RP-HPLC. In FA, the concentrations of stationary phase were measured from the elution curves and the isotherm was determined by regression analysis, while the parameters of the isotherm in PIM was obtained by optimization method. Comparing between results from the two methods, the adsorption isotherms of thymidine and 5'-GMP were very similar. The superiority of PIM over FA were that the consumption of sample was less and only one or two injections of sample were required.

Key words: Frontal Analysis, Pulsed Input Method, Adsorption Isotherm, Thymidine, 5'-GMP

1. 서 론

HPLC(High-Performance Liquid Chromatography)는 가장 널리 사용되는 분석기기 중의 하나로서 매년 수 십억 달러의 HPLC장치가 판매되어 주로 생화학 물질의 분리와 분석에 사용되고 있다. HPLC의 장점은 장치가 비교적 간단하고 감도가 좋아서 정확하게 정량을 할 수 있고 비휘발성 성분 또는 열적으로 불안정한 물질을 쉽게 분리할 수 있다[1]. 물질을 분리하고 환경오염물질을 제거하는데 흡착의 특성을 이용한다. 흡착평형식은 크로마토그래피에서의 물질의 체류 및 흡착량을 연구하는데 필수적으로 제조용 혹은 산업용 흡착공정을 설계하거나 분석하는데 매우 중요한 역할을 한다. 이러한 면에서 흡착평형식은 크로마토그래피에서 광범위한 농도범위에서 정량적으로 두 상간에 용질의 평형분포를 나타내 준다. 그러므로 흡착이 일어나는 동안에 이동상, 용질, 흡착제뿐만 아니라 이들간의 상호작용에 대해서 흡착평형식으로부터 얻을 수 있다[2]. 이러한 중요성에 근거하여 흡착평형식을 빠른 시

간에 정확하고 편리하게 측정하는 방법이 요구되어짐에 따라 HPLC를 이용하여 흡착평형식을 결정하는 방법이 기존의 static method[3, 4]에 비해서 많이 이용되고 있다.

흡착평형식은 선형과 비선형으로 나눌 수 있고 비선형 흡착평형식은 다시 위로 볼록한 곡선과 아래로 볼록한 곡선형태로 나눌 수 있다. 선형 흡착평형식은 용질의 고정상과 이동상의 농도가 비례관계에 있는 경우이다. 시료량이 많은 제조용 공정에서는 비선형 흡착평형식을 이용하여 보다 잘 표시할 수 있고 이 경우 시료량이 작은 경우에 비해서 체류시간과 peak의 모양이 시료, 흡착제, 이동상에 따라서 큰 영향을 받는다. 흡착평형곡선이 위로 볼록한 곡선인 경우는 비선형 흡착평형식의 전형적인 형태로서 주입량이 많아짐에 따라 peak의 tailing과 체류시간의 감소를 일으키고 아래로 볼록한 경우는 peak의 fronting과 체류시간의 증가하게 된다.

예전부터 흡착평형식은 주로 static method에 의하여 측정하였다[3, 4]. 이는 용액에 흡착제를 넣은 양에 대해 용질의 농도 변화를 측정해 계산하는 방법이다. 그러나 이 방법은 시간이 많이 걸리며 평형에 도달했는지가 불확실하고 정확한 실험을 하기 위해서는 많은 양의 용질과

[†]E-mail: rowkho@inha.ac.kr

흡착제를 필요로 한다. 특히, 역상 크로마토그래피에서는 비극성 흡착제가 사용되는데 이때 용매는 물을 기본으로 하는 극성용매이므로 실험적으로 어려움이 있다. 크로마토그래피를 이용하여 흡착평형식을 결정하는 방법은 이런 문제점을 해결하기 위해 peak의 용출곡선을 이용하게 된다. 크로마토그래피 컬럼의 입구에서 용질의 농도를 계단함수적으로 증가시키거나 감소시키는 방법이 있다. 용질의 농도를 증가시킬 때 컬럼 출구에서 용질의 농도가 급속히 증가하다가 일정해지며 농도를 감소시킬 때는 용질의 농도가 일정하다가 점차로 아래로 불룩하게 감소한다. 체류부피와 이동상 중 용질의 농도간의 곡선에 있어서 앞 경계선과 뒷 경계선의 차이는 앞부분의 경우 self-sharpening과 뒷부분의 경우 확산 거동이 일어나기 때문이다. 흡착평형식이 아래로 불룩한 경우는 항상 이와 같은 경향을 나타낸다[5]. 본 연구에서는 용출곡선으로부터 thymidine과 5'-GMP의 흡착평형식을 측정하기 위해서 FA와 PIM의 두 가지 방법을 사용하였다. 이들 방법은 dynamic method이고 기존에 널리 사용되는 FA보다 우수한 PIM방법을 이용하여 흡착평형식을 구하여 서로 비교하였다.

2. 이론적 배경

FA는 James, Phillips, Schay와 Szekely에 의해 흡착평형식의 결정을 목적으로 개발되고 독립적으로 사용되었다[6, 7]. 컬럼의 주입구에서의 시료의 농도를 계단함수적으로 변화시키면서 지속적으로 주입을 하면 하나의 파과곡선이 형성된다. 크로마토그래피 컬럼에 주입된 시료의 양을 m_{in} , 컬럼에서 나오는 시료의 양을 m_{out} 이라고 하면 다음과 같은 물질수지식이 성립된다[7].

$$m_{in} - m_{out} = m_{acc.} \quad (1)$$

$m_{acc.}$ 는 컬럼내에 있는 시료의 양이고 m_{in} 과 m_{out} 은 각각 다음과 같이 구할 수 있다.

$$m_{in} = \int_0^t C_0 q(t) dt \quad (2)$$

$$m_{out} = \int_0^t C_{eff}(t) q(t) dt \quad (3)$$

C_0 는 컬럼에 주입된 시료의 농도이고 C_{eff} 는 컬럼을 빠져나가는 시료의 농도이다. 그리고 $q(t)$ 는 이동상의 유량이다. $m_{acc.}$ 에서 컬럼내의 이동상에 존재하는 시료의 양을 뺀 값이 고정상에 흡착된 시료의 양이 된다. 따라서 C_0 를 바꾸어서 각기 다른 흡착량을 구할 수 있었다.

다른 방법으로는 PIM을 이용하여 흡착평형식의 매개변수를 구하였다. 흡착평형식의 매개변수의 의존성을 알게 되면 peak의 형태를 수치적으로 계산할 수 있고 수율, 순도 등을 고려한 overload된 조건에서 isocratic과 gradient 이동상의 조성을 최적화할 수 있게 된다. 단일성분에서는 간단한 Langmuir 흡착모델이 주로 사용되었다.

$$C_s = \frac{aC_m}{1 + bC_m} \quad (4)$$

용질이 크로마토그래피 컬럼을 통과할 때 고정상과 이동상에서의 용질의 농도는 물질수지식으로부터 다음의 일차 편미분방정식과 초기 및 경계조건으로 표시된다[8].

$$u \frac{\partial C_m}{\partial x} + \varepsilon \frac{\partial C_m}{\partial t} + (1 - \varepsilon) \frac{\partial C_s}{\partial t} = 0 \quad (5-1)$$

$$t=0, \quad C_m(x, t)=0 \quad (5-2)$$

$$0 \leq t \leq \tau \quad C_m(0, t)=C_0$$

u 는 이동상의 선속도이며, ε 은 공극률이다. 식 (5)는 축방향의 확산을 고려하지 않은 식이다. 식 (4)과 (5)를 해석하기 위해 유한차분법(FDM)

이 사용되어 식 (5)를 다음과 같이 표시하였다.

$$u \Delta t (C_{m, x+\Delta x, t} - C_{m, x, t}) + \varepsilon (C_{m, x+\Delta x, t+\Delta t} - C_{m, x+\Delta x, t}) + (1 - \varepsilon) (C_{s, x+\Delta x, t+\Delta t} - C_{s, x+\Delta x, t}) = 0 \quad (6)$$

식 (5)에서는 이동상내에서의 분산을 고려하지 않았기 때문에 컬럼의 길이 방향에 대한 변화량 Δx 를 그 컬럼의 이론단값(HETP)으로 가정하였다. 일정한 양을 주입하여 얻은 peak로부터 크로마토그래피 컬럼의 길이를 이론단수(N)로 나누어서 이론단값으로 정하였다. 식 (5)의 해를 구하기 위해서 Langmuir 흡착평형식의 매개변수 a, b 의 값을 알아야 한다. 매개변수 a 값은 체류인자(k')와 phase ratio(β)를 알면 작은 주입량에서의 (7)에 사용된 K 로부터 계산할 수 있다.

$$k' = K\beta \quad (7)$$

$$\beta = \frac{V_s}{V_l} = \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \quad (8)$$

K 는 평형상수이며 k' 은 체류인자이다. 여기서 V_s 와 V_l 은 각각 컬럼내에서의 고정상의 부피와 이동상의 부피를 말한다. k' 은 다음의 식으로부터 구할 수 있다.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (9)$$

Langmuir 흡착평형식의 매개변수 b 는 최적화에 의해서 구해졌다. 용출곡선은 초기 임의의 값 b 로부터 실험으로부터 나온 용출곡선의 체류시간을 비교하여 반복계산을 통하여 시간영역에서 비교하여 구하였다.

3. 실험

본 실험에 사용한 시료는 thymidine과 5'-GMP- Na_2 (Guanosine 5'-monophosphate Disodium salt)로서 각각 Sigma와 Fluka에서 구입하였다. Frontal analysis를 이용하여 thymidine의 흡착평형식을 구하기 위해 시료의 농도를 0.200, 0.600, 1.400, 2.400, 3.800 mg/ml를 만들었다. 이동상은 물과 메탄올을 95/5 vol%로 사용하였고 유속은 1 ml/min으로 고정시켰다. 위의 다섯가지 농도를 이용하여 컬럼을 설치하거나 설치 안된 상태에서의 peak의 면적을 이용하여 흡착평형식의 매개변수를 구하였다. Thymidine의 overload 조건에서 흡착평형식을 PIM으로 구하기 위해 50 mg/ml의 농도를 만들어 0.015, 0.066, 0.200 ml의 주입부피에서의 용출곡선을 각기 얻었다.

5'-GMP의 흡착평형식을 FA로 구하였다. 이동상은 HPLC-grade water에 sodium phosphate($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 용해하여 15 mM을 만들었다. 시료는 위에서 만든 buffer solution에 sample을 용해하여 각 0.125, 0.250, 0.500, 1.000, 그리고 2.000 mg/ml의 농도로 만들었다. 주입부피는 컬럼 내에서 sample이 평형을 지속할 수 있는 충분한 양인 5 ml로 고정하였다. 모든 용매는 감압 펌프(Division of Millipore, Waters Co.)와 필터(HA-0.45 μm , FH-0.5 μm , Division of Millipore, Waters Co.)를 이용하여 감압 여과한 후 사용하였다. 이동상 내에 잔존하는 공기를 제거하기 위해 이동상의 저장용기에 헬륨을 30 ml/min으로 탈기하였다. 이동상의 유량은 1 ml/min으로 고정하였다.

PIM을 이용하여 5'-GMP의 흡착평형식을 구하기 위해 시료의 농도를 10 mg/ml로 만들고 주입부피를 0.010, 0.050, 0.100 ml로 변화시키면서 주입하였다. 모든 실험과정에서 사용된 HPLC는 Waters사의 600E 펌프(multisolute delivery system), 486detector(UV-visible tunable wavelength absorbance), U6K injector를 사용하였고, data acquisition system으로 Millennium32를 사용하였다. Lichrosper 100 RP-18(15 μm , Merck) 층전물을 스테인레스강($3.9 \times 300 \text{ mm}$)에 충전하였다. UV detector의 파장은 300 nm로 고정하였고 모든 실험은 상온에서 행하였다.

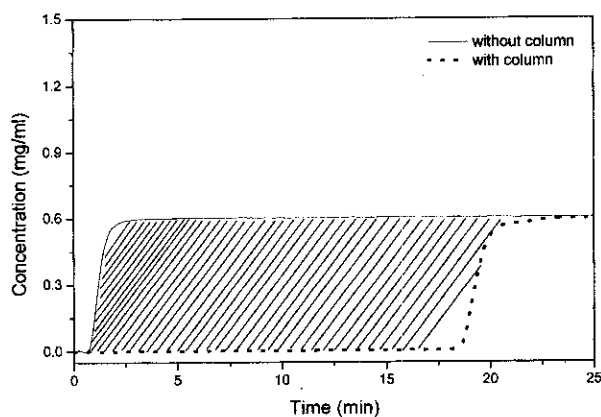


Fig. 1. Breakthrough curves of thymidine with the concentration, 0.6 mg/ml by FA.

4. 결과 및 고찰

Fig. 1은 thymidine의 0.6 mg/ml의 농도에서 FA로부터 구해진 파곡선을 나타낸다. 일정한 농도의 시료를 시료주입 루프에 넣고 일정한 조성의 이동상을 계속 흘려주면 크로마토그래피 컬럼을 HPLC에 설치한 경우와 설치하지 않은 경우에 대해서 용출곡선이 달라지게 된다. 크로마토그래피 컬럼을 설치하지 않는 경우에는 단면적에서 속도차이에 의한 농도분포만이 존재하며 이는 매우 작기 때문에 Fig. 1에서 보는 바와 같이 매우 급한 경사를 갖게 된다[9]. 폭 넓어짐 현상이 없는 이상적인 크로마토그래피에서는 곡선의 앞 경계는 직사각형 형태로 나타난다. 컬럼을 설치한 경우에는 S자형의 만곡부가 생긴다. 이는 self-sharpening 효과와 축 방향 분산간에 유사 정상상태가 형성되어 앞 경계에 폭 넓힘 현상이 일어나기 때문이다. 물질전달 저항과 흐름의 분포가 일정하지 않음으로 인해 생기는 축 방향 분산효과는 곡선의 뒷 경계에는 거의 영향을 미치지 못하나 농도분포의 모양에는 영향을 미친다. Fig. 1에서 빗금친 부분은 컬럼내에 축적된 양(m_{acc})이고 이동상에 존재하는 양을 빼면 흡착된 양이 된다. 주입농도가 변함에 따라서 흡착농도의 변화가 Fig. 2에 나타나 있다. 따라서 주입농도와 흡착된 양을 식 (4)에 적용하여 a, b를 회귀분석에 의하여 구할 수 있다.

Pulse injection으로부터 thymidine의 크로마토그램을 Fig. 3에 나타내었다. 시료의 주입부피가 커짐에 따라 peak의 체류시간이 줄어드는 전형적인 Langmuir 형태를 나타내었다. 시료를 주입하여 얻은 peak로부터는 평형 및 속도상수들을 얻을 수 있으며 moment method, Fourier 영역, 시간영역 등에서 실험값과 모델값의 비교를 통해서 얻을 수 있

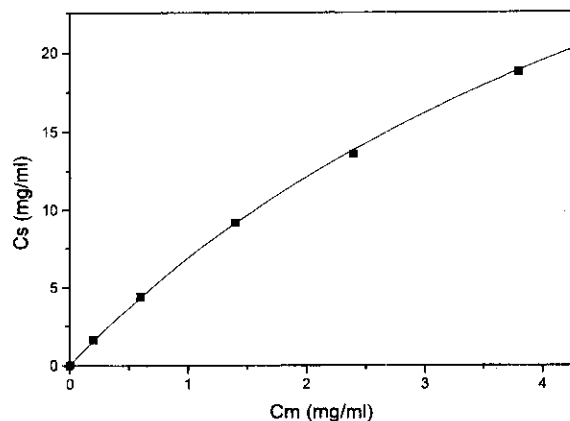


Fig. 2. Langmuir adsorption of thymidine by FA.

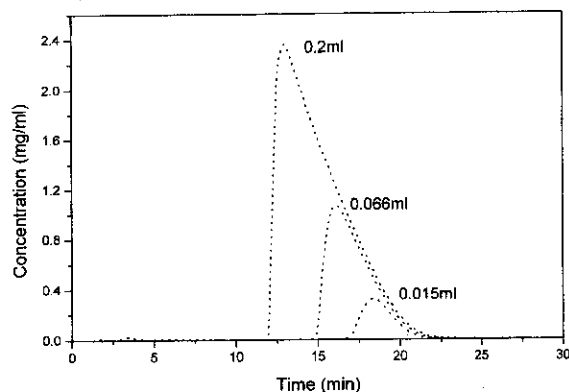


Fig. 3. Variation of peak shapes with injection volumes of thymidine. (50 mg/ml concentration with 0.015, 0.066, 0.200 ml injection volume)

Table 1. Comparison of the parameters of Langmuir isotherm of thymidine

	a(-)	b(ml/mg)
FA	7.990	0.160
PIM	7.850	0.120

다[10]. 그러나 이 경우는 수학적 모델이 선형 미분 방정식인 경우로 제한하여 비선형 Langmuir 흡착평형식에 적용하기 위해서는 시간영역에 대해서 식 (6)의 해를 반복적으로 구해서 Langmuir parameter b를 구하였다. 우선 주입량의 증가에 따른 peak의 모양의 변화에 대해서 실험적으로 확인하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 주입부피가 증가함에 따라서 thymidine의 용출곡선은 대칭의 Gaussian 형태에서 peak의 front의 경사가 급격하게 되는 Langmuir 흡착평형식을 보여주고 있다. 제일 작은 peak의 주입부피는 0.015 ml이고 0.200 ml의 제일 큰 peak에서는 비대칭적이다. 최적화 방법에 의한 a, b는 각기 7.850, 0.120 ml/mg이었다(Table 1참조). Thymidine에 대한 Langmuir 흡착평형식은 Fig. 4에서 볼 수 있다.

Sodium phosphate를 buffer로 하고 PIM을 이용하여 5'-GMP의 용출곡선으로부터 Langmuir 흡착평형식의 실험상수 a와 b값을 구하였다. 크로마토그래피가 분리능력이 우수한 것은 시료간의 체류시간이 다르기 때문이며 이는 다양한 종류의 용매에 의해서 가능하게 된다. 그러나 복잡하거나 유사한 구조를 가진 물질들에서는 용매에 의해서만 분리가 힘들게 된다. 적당한 buffer는 체류시간에 영향을 주고 농도에 의해서 다성분의 물질들간에 체류시간이 변화하도록 조절할 수 있게 되므로

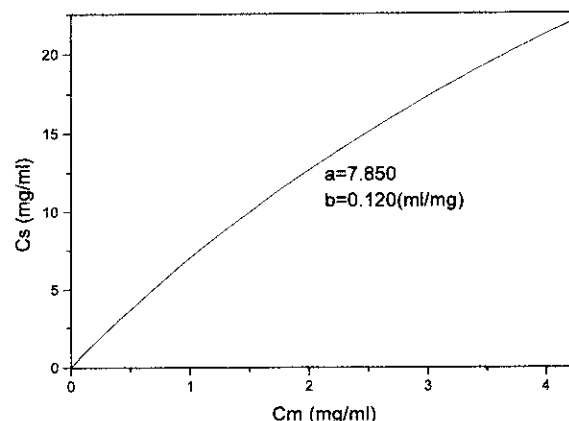


Fig. 4. Langmuir adsorption of thymidine by PIM.

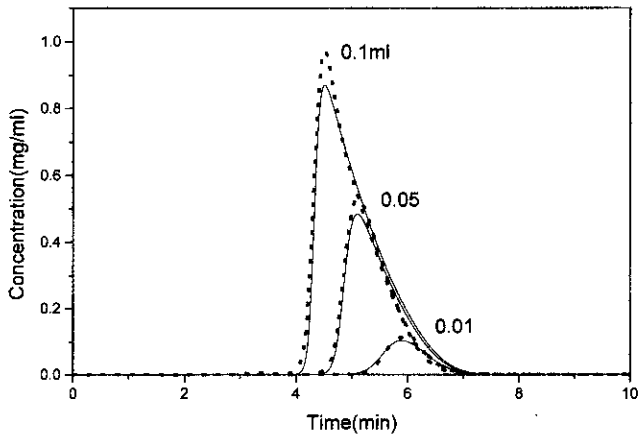


Fig. 5. Comparison of the experimental data and calculated elution profiles.

(10 mg/ml concentration with 0.010, 0.050, 0.100 ml injection volume of thymidine)

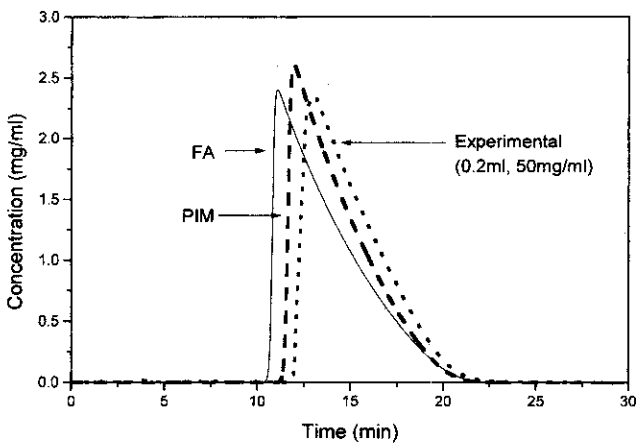


Fig. 6. Comparison of experimental elution profile with the two methods.

(50 mg/ml concentration with 0.200 ml injection volume of thymidine)

buffer를 사용한다. Fig. 5에서는 pulse injection에서 5'-GMP의 주입부피가 증가함에 따른 peak의 변화를 실험값과 계산된 값을 비교한 결과 매우 잘 일치하였다. FA와 PIM을 이용하여 구한 흡착평형식을 이용하여 계산한 용출곡선과 실험값을 Fig. 6에서 비교하였고 매개변수 a , b 를

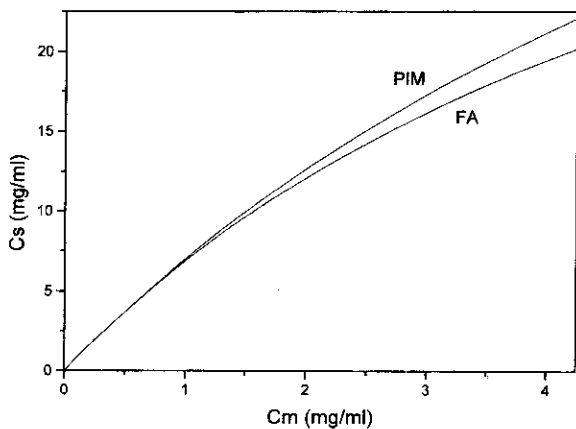


Fig. 7. Comparison of Langmuir adsorption isotherms by FA and PIM.

Table 2. Comparison of the parameters of Langmuir isotherm of 5'-GMP

	a(-)	b(ml/mg)
FA	2.149	0.300
PIM	1.845	0.137

Table 1에 각기 나열하였다. 5'-GMP와 동일한 15 μ m의 충전물에 대해서 FA와 PIM의 두 가지 방법에 의해서 구한 Langmuir 흡착평형식을 Fig. 7에 나타내었고 이때의 매개변수 a , b 를 Table 2에 나열하였다. FA에 의하여 흡착평형식을 구하는 실험에서 이동상의 저장조에서부터 검지기까지의 부피를 정확하게 고려하기가 곤란하고 또한 선정된 시료는 정확하게 Langmuir 흡착을 보이고 있지 않기 때문에 실험상수 a 와 b 값이 서로 차이가 생긴다. 따라서 실험값과 FA와 PIM의 두 가지 방법으로 구한 용출곡선에서 정확하게 일치하지 않았다.

5. 결 론

Thymidine과 5'-GMP의 흡착평형식을 구하기 위해 frontal analysis와 pulsed-input method를 이용하여 서로의 결과값을 비교하였다. 두 가지 시료 모두 주입부피가 커짐에 따라 채류시간이 감소하는 Langmuir 형태를 나타내었으며 이에 Langmuir 식을 대입하여 a 값과 b 값을 구하였다. 두 시료 모두 두 가지의 방법에 의해 구해진 결과값이 유사하였으며 pulsed-input method는 좀더 간단한 방법으로 흡착평형식을 구할 수 있었다.

감 사

본 연구는 인하대학교 학술진흥연구비(특성화연구비)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

사용기호

- a : parameter of Langmuir isotherm
- b : parameter of Langmuir isotherm
- C_0 : concentration of the solute into the column [μ g/ml]
- C_{eff} : concentration of the solute out of the column [μ g/ml]
- C_m, C_{m_i} : concentration of the solute in the mobile phase, i component [μ g/ml]
- $C_{m_{x,t}}$: concentration of the solute in the mobile phase at time t and distance x [μ g/ml]
- C_s, C_{s_i} : concentration of the solute in the stationary phase, i component [μ g/ml]
- $C_{s_{x,t}}$: concentration of the solute in the stationary phase at time t and distance x [μ g/ml]
- k' : retention factor of the solute
- K : equilibrium constant of the solute
- $m_{acc.}$: amount of accumulated solute in the column [μ g]
- m_{in} : amount of the solute into the column [μ g]
- m_{out} : amount of the solute out of the column [μ g]
- $q(t)$: volumetric flow rate of the mobile phase [ml/min]
- t_0 : dead time [min]
- t_R : retention time of the solute [min]
- u : superficial flow rate of the mobile phase [cm/min]
- V_s, V_l : volume of the stationary phase and mobile phase in the column

- [ml]
 x : axial distance of the column [cm]
 β : ratio of mobile phase volume to stationary phase volume in the column
 ϵ : porosity of the packing

참고문헌

1. Row, K. H.: "Principles and Applications of Liquid Chromatography," Inha Univ., Chap. 2(1999).
2. Choi, Y. S., Lee, J. W. and Row, K. H.: *J. of the Korean Industrial and Engineering Chemistry*, **9**, 430(1998).
3. Guiochon, G., Golshan-Shirazi, S. and Katti, A.: "Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography," Academic Press, Inc., New York, NY(1994).
4. Barford, R. A.: in "HPLC in Biotechnology," Hancock, W. S., Ed., Academic Press, New York, 63(1992).
5. DeVault, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**, 532(1943).
6. Schay, G. and Szekely, G.: *Acta Chim. Hung.*, **5**, 167(1954).
7. James, D. H. and Phillips, C. S. G.: *J. Chem. Soc.*, 1066(1954).
8. Akgerman, A. and Zardkoohi, M., *J. Chem. Eng. Data*, **41**, 185(1996).
9. Choi, Y. S. and Row, K. H.: "Adsorption Equilibrium of Single Components by Frontal Analysis and Pulsed Input Method," The 5th Korea-Japan Separation Technology Symposium, Seoul, August 19-21, 525(1999).
10. Row, K. H. and Lee, W. K.: *J. Chem. Eng. Japan*, **19**, 173(1986).