

## 단이론에 의한 주입부피와 농도의 변화에 따른 용출곡선의 예측

한순구 · 홍승표 · 노경호<sup>†</sup>

인하대학교 화학공학과, 초정밀생물분리기술센터

402-701 인천시 남구 용현동 253

(2002년 11월 11일 접수, 2003년 2월 26일 채택)

## Estimation of Elution Profiles with Injection Volumes and Concentrations by Plate Theory

Soon Koo Han, Seong Pyo Hong and Kyung Ho Row<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering and Center for Advanced Bioseparation Technology,

Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea

(Received 11 November 2002; accepted 26 February 2003)

### 요 약

크로마토그래피 분리에서 주입부피와 농도에 따라서 피크 폭이 변하게 된다. 단이론을 통해 가우시안 형태를 갖는 피크의 용출곡선을 예측하였다. 선형적인 흡착평형식으로 표시되는 2-deoxycytidine(dCyd)에 대해서 주입부피와 농도에 따른 실험값과 계산된 용출곡선을 비교하였다. 주입부피가 커지는 경우에는 정확한 HETP를 계산하기 위해서  $H_{injection}$ 을 고려해야 한다. 또한 비선형 흡착평형식을 갖는 2-deoxyadenosine(dAdo)에 대해서도 용출곡선을 속도론에 의하여 계산하였다. 주입부피와 농도에 따라서 체류시간이 유사한 dCyd의 가우시안 피크는 단이론에 의해서 예측이 가능하였지만 dAdo는 Langmuir 비선형 흡착식으로 나타냈고 속도론에 의한 계산 결과는 실험값과 일치하였다.

**Abstract** – In a chromatographic separation, the width of a peak was affected by injection volume and concentration. The elution profiles of Gaussian peaks were predicted by the plate theory. For 2-deoxycytidine(dCyd), the experimental data with injection volumes and concentrations were compared with the calculated elution profiles in linear equilibrium. When the injection volume was larger,  $H_{injection}$  should be included to calculate HETP accurately. Also for 2-deoxyadenosine(dAdo), elution profiles were calculated by the rate theory in nonlinear isotherm. The good agreements between the two values of dCyd by plate theory and of dAdo by rate theory were observed.

Key words: Elution Profiles, Injection Volume, Concentration, Plate Theory, HETP

### 1. 서 론

크로마토그래피는 분리와 분석기술에서 가장 널리 사용되는 기술이다. 기체 크로마토그래피는 물질의 휘발성, 분자량, 처리량 등 많은 제약조건이 있기 때문에 물질의 분리 및 분석에는 주로 액체 크로마토그래피가 사용된다. 액체크로마토그래피의 경우 낮은 칼럼의 효율과 낮은 이동상의 유속으로 인한 긴 분석시간을 향상시키기 위하여 이동상을 높은 압력으로 밀어주는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)가 개발되면서 열에 민감한 생물 공정의 생산물을 분리하는데 있어서는 액체 크로마토그래피의 유용성은 증대되고 있다[1].

액체 크로마토그래피의 우수한 성능으로 인해서 응용이 점차 많아짐에 따라서 분리에서의 최적화를 이루는 실질적인 문제에 대해서 관심의 초점이 모아지고 있다. 최적화의 대상은 물질의 분리도, 분리시간,

최대 분리가 가능한 양이다. 물질의 분리도는 두 인접 피크간의 체류시간의 차이와 기준선에서 피크의 평균 폭에 의해서 정의된다. 분리도를 크게 하기 위해서는 칼럼 내에서의 체류시간의 차이가 분명히 존재하여야 한다. 분리도는 가장 우선 다루어져야 하고 이를 위해서 이동상의 종류와 조성에 대한 최적화가 이루어져야 한다. 체류시간 대신에 무반응 시간(dead time)을 고려한 체류인자(retention factor)를 사용하여 분리도를 표시한다[2].

흡착 분리 공정을 개발하는데 있어서 가장 중요한 전 단계의 하나는 화합물이 분리되는 흡착평형을 결정하는 것이다[3]. 흡착평형식(adsorption isotherm)은 최근 크로마토그래피의 체류를 연구하는데 기본적인 수단으로 많은 관심을 끌고 있다. 이 평형식은 제조용 혹은 산업용 크로마토그래피를 설계하거나 분석하는 데 매우 중요한 역할을 한다. 이러한 면에서 흡착평형식은 크로마토그래피 공정에서 양적으로 두 상간에 용질의 평형 분포를 넓은 농도 범위에 걸쳐 나타내 준다. 그러므로 흡착이 일어나는 동안에 이동상, 용질, 흡착제뿐만 아니라 이들 간의 상호작용에 대해서 흡착평형식으로부터 얻을 수 있다[4]. 많은 경우

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

에 있어서 흡착평형식을 측정하는 것이 이러한 상호작용 혹은 크로마토그래피 공정설계의 필요한 데이터를 얻을 수 있는 유일한 방법이다. 흡착평형식을 빠른 시간에 정확하고 편리하게 측정하는 방법이 요구되어짐에 따라 HPLC를 이용한 흡착평형식의 측정방법이 많이 이용되고 있다. 흡착평형식은 선형과 비선형으로 나눌 수 있고 비선형은 다시 위로 볼록한 곡선과 아래로 볼록한 곡선형태로 나눌 수 있다. 선형일 때는 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 피크의 모양이 시료, 흡착제, 이동상에 따라서 큰 영향을 받는다[5]. 크로마토그래피에서 단이론은 증류와 향류식 추출의 유사성을 기초로 두고 있다[6, 7]. 물질의 용량인자와 이론단수를 이용하여 각 물질에 대한 농도 분포곡선을 이 단이론에 의해서 예측할 수 있다. 단이론을 이용하여 계산된 농도분포곡선은 피크의 모양, 분리도의 계산, 분리의 범위, 그리고 분리된 피크에서 불순물의 양을 예측하는 것을 가능하게 한다[1]. Hagel[8]은 겔 크로마토그래피를 이용하여 단이론을 바탕으로 HETP를 통해 용출곡선을 얻을 수 있는 식과 피크의 주입부피를 통해 HETP를 구할 수 있는 식을 제안하였다.

본 연구에서는 deoxynucleoside 중에서 2-deoxycytidine(dCyd)와 2-deoxyadenosine(dAdo)를 시료로 선정하고 피크의 HETP에 미치는 시료의 주입부피와 농도의 영향을 고찰하였다. 일정용매조성용출법에서 시료의 주입량에 따라서 선형과 비선형 흡착평형식을 결정하고 선형 흡착평형식에서는 단이론, 비선형 흡착평형식에서는 속도론을 이용하여 용출곡선을 예측하는 것이다.

## 2. 이 론

단이론에 의해서 크로마토그래피용 칼럼은 수학적으로 N개의 부분으로 나누어진 평형단으로 구성된다고 가정한다. 칼럼의 이론단수 N은 다음 식으로 계산한다.

$$N = 16 \left( \frac{t_i}{w_i} \right)^2 \quad (1)$$

여기서  $t_i$ 는 i 물질의 체류 시간,  $w_i$ 는 피크의 폭이다. 각 단은 이동상의 부피( $v_m$ )와 고정상의 부피( $v_s$ )로 구성되어 있다.  $v_m$ 과  $v_s$ 는 각기 다음 식에 의해서 구하였다.

$$v_m = \frac{V_{column} \cdot \epsilon_{tot}}{N}, \quad v_s = \frac{V_{column} \cdot (1 - \epsilon_{tot})}{N} \quad (2)$$

$V_{column}$ 는 칼럼 내의 부피이고  $\epsilon_{tot}$ 는 칼럼 내의 전체부피에 대한 이동상의 부피의 비율이다. 이동상이 각 단과 단 사이에 연속적으로 통과하고 있을 때 이동상과 고정상 사이에 용질은 평형을 이루면서 흡착과 탈착을 하면서 칼럼 내를 이동한다.

임의의 한 단 n에 대한 물질수지식은 다음과 같다.

$$c_{n-1}dv - c_n dv = d[(v_m + K v_s) c_n] \quad (3)$$

$v_n$ 는 시작점에서 n단까지 이동상의 부피이고  $c_n$ 는 n단에서의 용질의 농도이다. 그리고 K는 평형 상수로서 다음과 같이 정의된다.

$$K = \frac{\text{Concentration of Solute in Stationary Phase}}{\text{Concentration of Solute in Mobile Phase}} \quad (4)$$

작은 농도범위에서 평형 상수는 농도와 무관하고 온도에 대해서는 지수함수 관계식을 가지고 있다.  $\beta$ 를 고정상의 부피에 대한 이동상의 부피의 비로 나타내면 k와 평형상수 K는 다음과 같은 관계가 있다.

$$K = k\beta \quad (5)$$

위의 식 (3)은 1계 선형 미분방정식으로 다음과 같은 해를 얻을 수 있다.

$$c_N = \sum_{i=N-r}^{N-1} \frac{(av)^i}{i!} e^{av} \quad (6)$$

a는 상수로서 다음과 같이 정의하였다.

$$a = \frac{1}{(v_m - K v_s)} \quad (7)$$

$r$ 은 용질이 처음 주입되었을 때 채워지는 이론단의 단수를 의미한다.  $r$ 은 주입부피를 한 단의 이동상의 부피( $v_m$ )로 나눈 값을 올림하여 양의 정수로 한다.

실험값을 통해 체류인자를 구하는 식은 다음과 같다.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (8)$$

$t_R$ 은 용질의 체류시간이고  $t_0$ 는 고정상과 상호작용이 없는 물질의 무반응 시간이다. 체류부피에서 계산된 체류인자와 van Deemter 식을 통해 얻어진 zone broadening에서 주어진 전체 단수에 관하여 간단한 단이론을 적용하였다. 회석된 농도에서는 다음 식에서 보는 바와 같이 에리함수(error function)를 이용하여 선형의 가우시안 용출곡선을 모사할 수 있다[9].

$$C = \frac{C_0}{2} \left[ \operatorname{erf} \left( \frac{V - V_R}{V_R} \sqrt{\frac{L}{2H}} \right) - \operatorname{erf} \left( \frac{V - V_{sample} - V_R}{V_R} \sqrt{\frac{L}{2H}} \right) \right] \quad (9)$$

C는 출구의 농도,  $C_0$ 는 입구의 농도, V는 이동상의 주입부피,  $V_R$ 는 체류 부피, L은 칼럼의 길이, H는 단높이,  $V_{sample}$ 은 시료의 주입량이다. 준제조용 겔 filtration에서 단백질 혼합물의 분리 경우 주입 부피에 대한 영향에 관한 연구에 완벽하게 적용할 수 있다[9].

일반적으로 액체 겔 크로마토그래피에서 시료영역의 확산은 다음과 같다[11].

$$\sigma_{tot}^2 = \sigma_{injector}^2 + \sigma_{column}^2 + \sigma_{detector}^2 + \sigma_{tubings}^2 + \sigma_{connector}^2 \quad (10)$$

$\sigma$ 는 표준편차이고 피크 폭의 1/4배이다. 검지기와 tubing, 연결부에 의한 피크 폭에서 영향은 전체 피크 폭에 대해 작은 값( $\leq 5\%$ )을 가지기 때문에 단순화하면 다음과 같다.

$$\sigma_{tot}^2 \approx \sigma_{injector}^2 + \sigma_{column}^2 \quad (11)$$

여기서  $\sigma_{injector}^2$ 는 주입 부피  $V_s$ 와  $K_{injector}$ 를 사용하여  $\sigma_{injector}^2 = V_s^2/K$ 로 나타낸다[8]. 이론단수 N은 체류부피  $V_R$ 를 이용하여  $N = (V_R/\sigma)^2$ 로 나타낸다. 식 (11)을 다시 정리하여 쓰면 다음과 같다.

$$\sigma_{tot}^2 \approx V_s^2 K^{-1} + V_R^2 N^{-1} \quad (12)$$

시료 주입부에서 생기는 피크의 확산은 주입부피와 피크의 표준편차  $\sigma$ 를 통해 얻어진  $K_{injector}$  인자를 통해 나타낼 수 있다[11].

크로마토그래피에서 피크 벌어짐(broadening)은 van Deemter 식에서 낮은 물질전달과 와류확산으로 인해 시료 영역에서 많은 양의 용질의 분산으로 인해 생기게 된다[12, 13]. 시료 주입 영역에 의해서 피크 벌어짐에 영향을 고려하여 HETP로 나타내었다.

$$H \approx H_{injection} + H_{column} \approx \frac{V_{sample}^2 L}{K_{injector} V_R^2} + 2\lambda d_p + \frac{V_0}{V_R} \left( 1 - \frac{V_0}{V_R} \right) d_p^2 u \frac{1}{30D_s} \quad (13)$$

$\lambda$ 는 충전물의 모양에 따른 인자로서 충전물의 크기가 일정하고 균일하게 충전되면 그 값은 감소한다. 편류는 충전이 제대로 되지 않으면 생

기게 되고 이로 인해서  $\lambda$ 는 큰 값을 가지게 된다.  $V_{sample}$ 은 주입부피,  $V_0$ 는 무용 부피(dead volume)를 나타낸다.

### 3. 실험

#### 3-1. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 표준시료 2-deoxycytidine(dCyd)와 2-deoxyadenosine(dAdo)는 Sigma에서 구입하였다. HPLC-grade의 메탄올은 J. T. Baker에서 구입하였고 물은 2차 증류한 증류수를 사용하였다.

HPLC는 영린기기의 M930 Solvent Delivery Pump, 486 검지기(M 7200 Absorbance Detector, 영린기기), Rheodyne injection valve(50  $\mu$ l sample loop)로 구성되어 있다. 데이터 저장 시스템은 Autochrowin(ver. 1.42, 영린기기)이고 PC에 설치하여 사용하였다. 스테인레스 칼럼(3.90  $\times$  300 mm, Waters)에 Lichrosper 100 RP-18(15  $\mu$ m, Merck) 충전하여 사용하였다.

#### 3-2. 실험방법

주입부피에 따른 용출곡선의 변화를 알아보기 위해 각각 시료의 농도가 0.35 mg/ml이 되도록 2차 증류수에 녹여 준비하였다. 준비된 시료의 주입부피를 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 ml로 바꾸어 주입하여 용출곡선을 얻었다. 농도에 따른 용출곡선의 변화를 알아보기 위해 0.35, 0.7, 1.4 mg/ml의 농도가 되도록 2차 증류수에 녹인 시료를 준비하였다. 시료의 주입부피는 0.02 ml로 고정하였다.

모든 실험에서 이동상의 유속은 1 ml/min으로 하였고, 이동상은 2차 증류한 증류수와 메탄올로 구성하였고 조성은 물/메탄올=90/10(vol.%)이다. 이동상내의 잔존하는 공기를 제거하기 위하여 이동상 저장용기에 헬륨을 넣어주었다. 모든 실험에서 UV 검출기는 254 nm를 사용하였고 모든 실험은 상온에서 수행하였다.

### 4. 결과 및 고찰

#### 4-1. 주입부피가 HETP에 미치는 영향과 용출곡선의 예측

크로마토그래피에서 시료가 칼럼 입구에서 주입될 때에는 거의 펄스로 들어가지만 출구에서는 피크의 폭이 넓어지는데 이를 피크 벌어짐 또는 넓어짐이라 하며, 칼럼내의 다중 경로, 분자확산, 물질전달등과 같은 요인에 기인한다. 이러한 피크 벌어짐 정도는 HETP로 나타낼 수 있으며, 분석용 뿐 만 아니라 분리·분취를 목적으로 하는 제조공에서 HETP는 신중하게 고려되어야 할 사항이다. 역상 액체 크로마토그래피에서 HETP는 관내의 충전물과 시료에 대한 관의 효율을 나타내면서 피크의 효율을 결정하게 된다. HETP는 실험으로부터 얻은 용출곡선에서 구한 이론단수  $N$ 과 관의 길이  $L$ 의 비로 표시된다. van Deemter은 용질의 피가 넓어지는 현상에 대해서 물질전달 등 여러 가지 메커니즘에 대한 많은 인자들과 이동상이 칼럼을 통과하는 속도를 고려하여 단 높이를 결정하는 식을 유도하였다. van Deemter 식에서는 와류확산과 측방향 확산 및 고정상과 이동상에서의 물질전달이 HETP에 미치는 영향을 고려하였다. 시료주입부에서 생기는 피크 벌어짐과 주입부피와 체류부피를 고려하고 피크 폭은 일정한 상수 값에 반비례 관계를 적용하였다. 가우시안 피크 모양을 가지는 dCyd의 실험을 통해 얻은 피크의 폭을 통하여 표준 편차  $\sigma_{tot}$ 를 구하였다. 체류 부피와 이론단수를 식 (12)에 넣어  $\sigma_{column}^2$ 을 구하고 앞에서 구한  $\sigma_{tot}^2$ 를 통해  $\sigma_{injector}^2$  값을 구하였다. 주입부피를 식 (12)에 대입하여 계산하면 일정한 상수값,  $K_{injector}$ 은 무차원수로서 9.5이었다.  $\lambda$ 는  $K_{injector}$ 와 같은 방법으로 식 (13)으로부터 계산한 결과로 0.39를 얻을 수 있었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 계산된 상수값을 적용하여 계산한 HETP와 실험값을 비교하였을 때 dCyd의 경우 잘 일치하였다. dCyd에서는 주입부피가 커질수록 피크의 높이는 증가

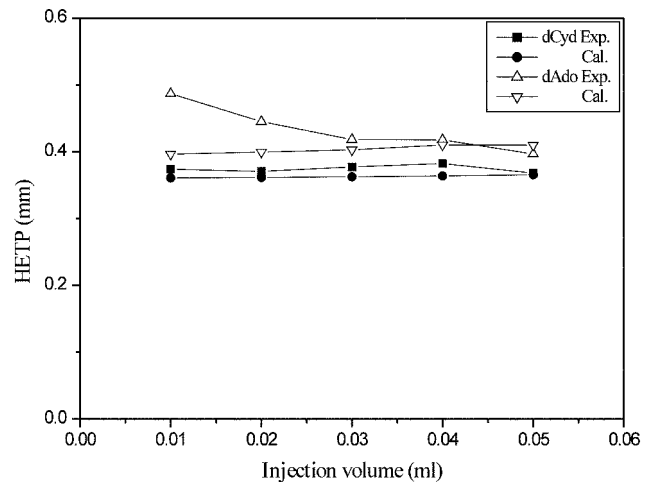


Fig. 1. Comparison of the calculated values and experimental datas with injection volume of 2'-deoxycytidine (dCyd) and 2'-deoxyadenosine (dAdo) (concentration: 0.35 mg/ml, flow rate: 1 ml/min).

하고 피크 폭도 증가하게 된다. 체류 시간은 비교적 동일하고 HETP는 주입부피에 따라 점차 감소하였고 계산된 HETP도 비교적 작은 범위 내에서 감소하였다. 실제 실험값을 통해 얻은 이론단수의 감소 경향과 일치하였다. 이는 HETP는 주입부피에 따른 주입부에서의 확산 인자와 칼럼내에서 이동상내의 시료와 고정상간의 와류확산과 물질전달에 따른 인자의 합으로 되어 있기 때문에, 체류시간이 동일한 가우시안 피크의 경우 칼럼에 의한 인자는 일정한 값을 가지게 된다. 실험 구간에서 주입부피에 따른 HETP 변화량이 칼럼에 의한 HETP와 비교했을 때 극히 미미하기 때문에, HETP에 영향을 주는 것은 크로마토그래피의 주입부에서 주입부피에 따른 확산 인자이다. 반면에 dAdo의 실제 실험에서 얻은 용출곡선은 피크가 비대칭이었지만 선형적인 좌우 대칭을 가지는 가우시안 피크로 가정하여 각 주입부피에서 피크 폭을 실험적으로 측정하였다. 주입부피가 작으면 계산된 HETP 값과 실험값과의 오차가 심하게 발생하지만 주입부피가 늘어나면서 점차 오차가 감소하게 되는 경향을 보였다. 이는 주입 부피가 증가함에 따라 체류 시간이 감소하고 또한 피크 폭이 증가하는 비선형적인 피크 모양으로 인해 HETP값이 감소하였기 때문이다.

칼럼 내에서 시료를 주입하게 되면 이동상과 고정상간에는 시료의 농도차이에 의해 물질전달이 일어나게 된다. 이동상으로부터 충전물의 외부표면까지의 확산, 외부표면에서 다공성 충전물 내부로의 확산 그리고 분배 또는 흡착과정의 세 단계로 일어나게 된다. 선형 크로마토그래피에서는 고정상과 이동상의 시료의 평형농도가 비례한다. 즉, 흡착평형식이 1차 직선으로 표시된다. 작은 농도에서의 직선의 기울기는 평형상수로서 값을 취한다. 이러한 선형 크로마토그래피에서는 시료의 용출곡선과 체류 시간은 시료의 조성과 주입량에 무관하다. 흡착평형식의 직선이 아닌 비선형인 경우에는 평형상태에서 고정상과 이동상의 각 성분의 농도는 더 이상 비례하지 않게 된다. 비선형 크로마토그래피에서는 용출곡선의 모양, 피크의 높이와 체류시간이 시료의 조성과 양에 의존한다. 동일한 농도(0.35 mg/ml)에서 dCyd의 주입부피를 0.01 ml에서 0.05 ml까지 주입하여 Fig. 1의 용출곡선을 얻었다. 실험적 용출곡선으로부터 각 주입량에서 체류시간은 거의 일정하였고 피크의 모양도 가우시안 형태로 동일하였다. 피크의 높이는 주입량에 따라 비례적으로 증가하고 피크폭도 증가하였다. 체류 시간이 일정하기 때문에 주입량에 따라 피크의 폭이 점차 증가하게 되어서 이론단수는 주입량에 따라 감소하였다. 이는 희석된 농도에서 시료의 주입량이 증가하게 되면 과도한 이동상의 양이 HETP를 증가시켰다. 피크에서 약간의 꼬리 끌기

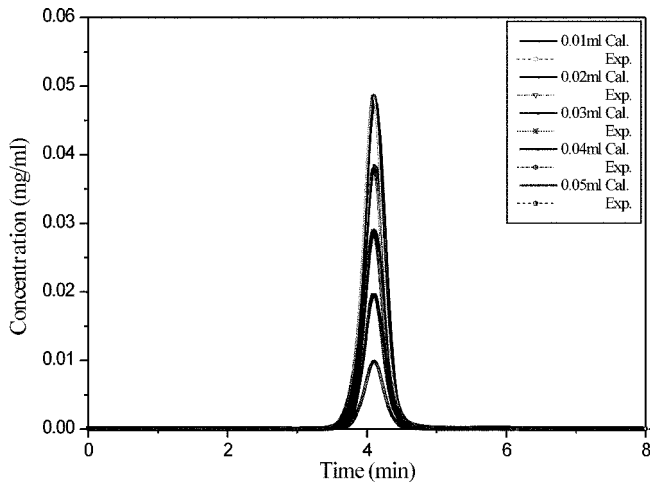


Fig. 2. Comparison of the calculated values and experimental datas with injection volumes of 2'-deoxycytidine (dCyd) (concentration: 0.35 mg/ml, flow rate: 1 ml/min).

(tailing)는 시료의 -OH기와 고정상과 이동상에 포함된 물에 의하여 체류시간 분포가 커졌기 때문이다. 단이론에서는 선형평형식을 사용하기 때문에 계산된 용출곡선에서는 꼬리 끌기와 fronting이 나타나지 않지만 피크 형태와 체류시간이 실험값과 비교하여 잘 일치하였다(Fig. 2). 이는 dCyd 경우 실험에 사용된 0.35 mg/ml의 농도에서 선형적인 흡착 평형식으로 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있다. 계산에 사용된 이론단 수는 주입량이 증가함에 따라 감소하여서 많은 주입부피에서도 용출곡선을 계산할 수 있다. 용출곡선에서 꼬리 끌기나 fronting이 심하지 않기 때문에 단이론에 의한 용출곡선 예측이 가능하였다. 앞에서 구한  $K_{injection}$ 를 이용한 HETP값을 적용하여 얻은 용출곡선과 실험값을 비교했을 때 비교적 잘 일치하였다.

#### 4-2. 농도가 HETP에 미치는 영향과 용출곡선의 예측

일정한 주입부피에서 서로 다른 농도로 주입한 경우에서도 단이론에 의한 용출곡선의 예측이 가능한 여부를 확인하였다. 일정한 시료 주입 부피에 대해서 시료의 농도를 증가시키면 시료의 주입량이 증가하게 된다. 따라서 시료의 농도가 증가하게 되면 주입되는 시료의 양이 많아지게 되고 피크의 면적과 폭도 커지게 된다. dCyd의 농도를 각각 0.35, 0.70, 1.4 mg/ml로 하고 일정한 주입부피 0.02 ml에서 용출곡선을 얻었다(Fig. 2). 주입농도에 따라 피크의 높이는 비례적으로 증가하였다. 피크의 모양도 주입농도에 무관하게 일정한 모양을 가지고, 체류시간을 기준으로 대칭적인 가우시안 피크의 형태를 보여 주고 있다. 피크의 폭도 주입농도에 따라 점차적으로 증가하는 경향을 보여주고 있다. 앞의 주입 부피에 대한 실험 결과와 마찬가지로 dCyd의 흡착평형식은 선형적임을 알 수 있다. 단이론을 바탕으로 계산된 용출곡선과 실험을 통해 얻은 용출곡선을 비교(Fig. 3)하였을 때 잘 일치함을 알 수 있었다. dCyd의 경우에서 농도를 50 mg/ml를 하여 주입부피 0.02 ml로 주입하였을 때도 일정한 체류 시간을 가지며 좌우 대칭적인 가우시안 피크를 나타내었다. 동일한 이동상에서 dCyd의 농도를 10 mg/ml로 하고 주입부피를 0.02, 0.03 0.04 ml로 주입하여 얻은 용출곡선에서도 앞에서와 같이 동일한 결과를 얻을 수가 있었다. dCyd의 경우 주입 질량이 1 mg 이하인 경우 용출 곡선은 일정한 체류시간을 가지며 피크 모양의 선형적인 좌우 대칭인 가우시안 피크를 얻을 수 있었다. 이를 통해 dCyd의 경우 희석된 농도에서 많은 주입부피를 주입하거나 높은 농도에서도 식 (9)를 사용하여 얻은 용출곡선이 실험 결과와 잘 일치함을 알 수 있다. 선형적인 흡착평형식을 가지는 이동상 조성에서는 단이론을 적용하여 시

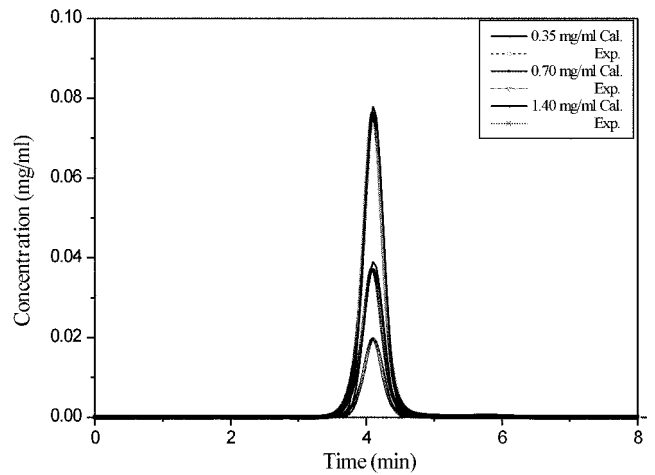


Fig. 3. Comparison of the calculated values and experimental datas with concentration of 2'-deoxycytidine (dCyd) (injection volume: 0.02 ml, flow rate: 1 ml/min).

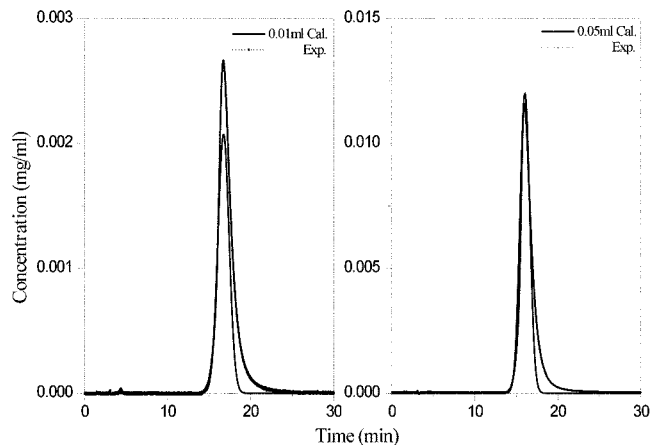


Fig. 4. Comparison of the calculated values and experimental datas with injection volumes of 2'-deoxyadenosine (dAdo) (concentration: 0.35 mg/ml, flow rate: 1 ml/min).

료의 용출 곡선을 계산하는 값과 실험값이 비교적 잘 맞음을 알 수 있다. Fig. 4에서는 dAdo의 농도를 0.35 mg/ml로 고정하고 주입부피를 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 ml로 변화시켜 각각의 용출곡선을 얻은 것 중 0.01, 0.05 ml에서 실험값과 계산된 값을 비교하였다. dCyd보다 꼬리 끌기가 심하게 생겼고, 피크 모양이 주입부피에 따라 서로 모양이 다르며, 체류시간이 점차적으로 감소하는 비대칭성이 증가하였다. 이는 0.35 mg/ml에서 dAdo의 흡착평형식을 선형으로 하기는 곤란하다는 것을 의미한다. 따라서 단이론으로 계산된 용출곡선으로 예측하기는 어렵다. Fig. 3에서처럼 실험값과 계산된 값이 잘 일치하지 않았다.

용출곡선에서의 비대칭성이 일어나는 원인을 고찰하였다. dCyd와 dAdo의 두 시료가 이동상에서 확산도를 Wilke-Chang 식을 이용하여 계산하였다[15]. 물질의 비점에서의 물 부피는 Shroeder 방법으로 계산하였고[16], 이동상의 점도는 Grunberg와 Nissan 방법을 사용하여 예측하였다[17]. 계산된 결과 dCyd의 확산도는  $7.51 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , dAdo의 확산도는  $7.35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 이었다. dAdo가 이동상에서의 확산도가 dCyd보다 근소한 차로 작았다. 용출곡선의 꼬리 끌기가 일어날 정도의 차는 아니라고 사료된다. 따라서 두 시료의 용출곡선의 비대칭성에 미치는 영향이 확산도보다는 시료의 분자 구조에 따른 고정상과의 흡착 및 탈착에서 물질전달에 기인한 것으로 보인다. 또한 dCyd는 dAdo보다 물에 대한 용해도가 큰 것으로 보아, dAdo의 소수성이 상대적으로 dCyd

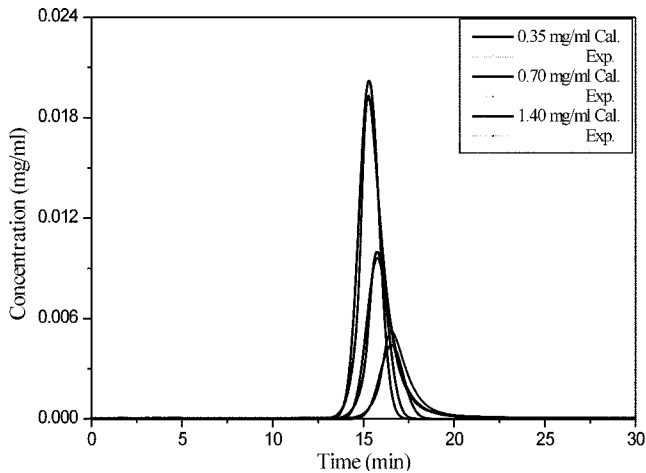


Fig. 5. Comparison of the calculated values and experimental datas with concentration of 2'-deoxyadenosine (injection volume: 0.02 ml, flow rate: 1 ml/min).

보다 비극성  $C_{18}$ 과의 흡착이 강해서 비선형 흡착평형식을 갖게 되었다. Fig. 5에서는 dAdo의 주입량을 0.02 ml로 일정하게 하고 농도를 변화시켜 얻은 용출 곡선과 계산된 값을 비교하였다. 실험값은 Fig. 5에서 보는 것과 같이 주입농도가 증가함에 따라 피크의 비대칭성이 증가하게 되고 체류시간도 감소하는 경향을 보였다. Fig. 4에서 주입부피의 증가에서와 마찬가지로 주입농도가 커지면 피크의 후반부에서 단이론에 의한 용출곡선은 실험값과 큰 차이를 보였다. 단이론에 의한 용출곡선을 예측하는 식 (9)의 경우에는 칼럼 내의 물질전달과 확산이 고려되지 않았다. 이로 인해 용출 곡선에 나타나게 되는 꼬리 끌기를 무시하고 가우시안 피크로 가정하여 피크의 폭을 계산하였다. 이를 적용하여 용출 곡선을 예측하는 것은 바람직하지 않음을 알 수 있다. 또한 비선형적인 흡착평형식을 가지는 물질의 경우에서 단이론을 적용한 식보다는 물질의 흡착평형식을 구한 후 흡착평형식을 통해 용출 곡선을 예측하는 것이 적당하였다.

시료 주입부가 피크의 HETP에 미치는 영향을 고찰하였다(Fig. 6 참조). 일정한 농도에서 주입부피를 크게 하면 칼럼에 주입되는 용매의 양이 많아져서 피크 폭이 증가하게 된다. 이로 인해 이론단수가 감소하게 되어 HETP는 증가하게 된다. 동일한 체류시간을 가지는 가우시안 피크에서는 식 (13)에서 보는 것과 같이 칼럼에 의한  $H_{column}$ 는 일정한 값을

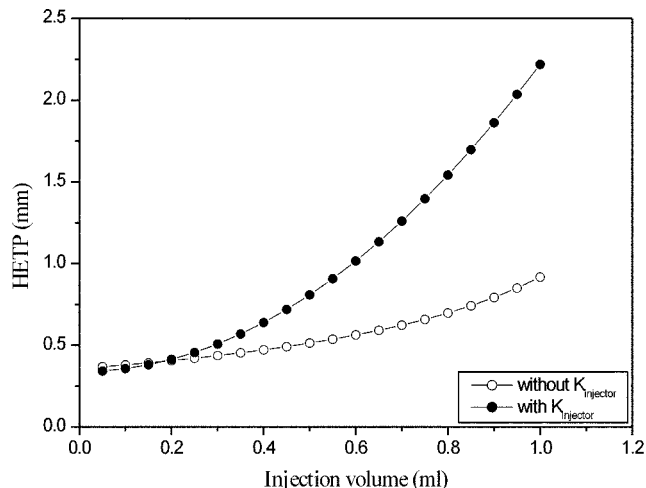


Fig. 6. Estimation HETP of with  $K_{injector}$  and without  $K_{injector}$  of 2'-deoxycytimine (concentration: 0.35 mg/ml, flow rate: 1 ml/min).

가지기 때문에  $H_{column}$ 보다  $H_{injection}$ 이 피크의 HETP에 미치는 영향이 크다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서의 0.01-0.05 ml의 주입부피 양이 작아서  $H_{injection}$ 이 피크의 HETP에 미치는 영향이 무시할 만 하였다. 시료 주입부  $H_{injection}$ 이 피크의 HETP에 영향을 미치는 주입부피 양을 고찰하였다. 가우시안형 피크 모양을 가지는 dCyd의 실험값을 사용하여 주입부피에 따른 이론단수를 구하였다. 가우시안 피크에서는 일정한 체류시간을 가지기 때문에 HETP를 계산하면 피크의 폭에 의해서 변하게 된다. 계산결과는 Fig. 6에 나타나있다. 특히, 주입부피를 크게 할수록 HETP간의 차이가 점차 나타나기 시작했고, 주입부피가 0.4 ml인 경우 계산된 HETP간의 차이가 커지기 시작하였다. 이는 dCyd의 경우 본 연구에서 실험한 주입부피 0.01-0.05 ml에서 구한 HETP가  $10^{-2}$  mm의 값을 가지는 반면,  $H_{injection}$ 은  $10^{-4}$  mm의 값을 가지고 있어서 피크의 HETP에 미치는 영향을 무시할 수 있기 때문이다. 식 (13)에서 주입부피는 제곱의 형태로 나타내고 있기 때문에 주입부피가 0.4 ml보다 작게 되면 주입부피 제곱항의 값이 크지 않기 때문에  $K_{injector}$ 를 생략할 수 있다. 주입부피가 0.4 ml 이상이면 주입부피에 의한 영향이 포함된 주입부  $H_{injection}$ 을 고려해야 한다. 선형 흡착평형식을 갖는 시료에서는 주입부피를 크게 하게 되면 시료 주입부에 의한  $H_{injection}$ 을 고려해 주어야 한다.

#### 4.3. 속도론에 의한 비선형 흡착평형식 결정

Fig. 3에서 보는 것과 같이 dAdo의 경우 낮은 농도에서 비대칭적인 용출 곡선을 보였다. 흡착평형식을 비선형 Langmuir형으로 가정하고 칼럼내에서의 물질수지식을 사용해 흡착평형식을 결정하기 위해서 PIM (Pulsed-Input Method)[17]을 적용하였다. dAdo의 농도를 10 mg/ml로 하고 주입부피를 0.01, 0.02, 0.03 ml로 변화시켰을 때 Fig. 7에서처럼 점차 체류시간이 짧아지는 Langmuir형태의 용출곡선을 얻었다. Langmuir 흡착 매개변수를 구하기 위해 0.01, 0.02, 0.03 ml 세 개의 주입부피로부터 얻은 피크의 체류시간을 외삽하여 매우 희석된 농도에서의 체류시간을 구하였다. 이동상 조성에서 아세트나이트릴을 과량으로 주입하여 칼럼의 무용 부피를 구하였다. 이를 통해  $t_0$ 는 2.998 min를 얻을 수 있었다. 외삽을 통해 얻은 체류시간  $t_R$ 과  $t_0$ 를 식 (8)을 이용하여 체류인자  $k$ 를 얻었다.  $\beta$ 는 5.12이고 식 (5)에 대입하여 평형상수  $K$ 를 얻었다. Langmuir 매개변수  $a$ 는 매우 희석된 농도에서의 평형상수  $K$ 인 25를 취하였다. 시료가 크로마토그래피 칼럼을 통과하면서 고정상과 이동상에서 시료의 농도변화는 일차 편미분방정식으로 표현된다. 축방향 확산을 고려하지 않고 흡착평형식과 물질수지식을 유한차분법을 사용하여 계산된 체류시간과 실험값이 일치하도록 반복 계산을 하였다. 유한차분법을 적용하여 계산한 결과  $b$ 는 0.0011 ml/ $\mu$ g이었다. PIM에 의해서 결정

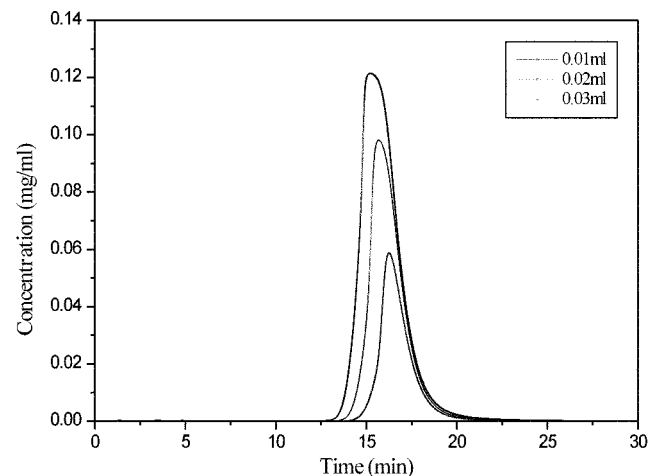


Fig. 7. Plot of elution profile with injection volumes of 2'-deoxyadenosine (concentration: 10 mg/ml, flow rate: 1 ml/min).

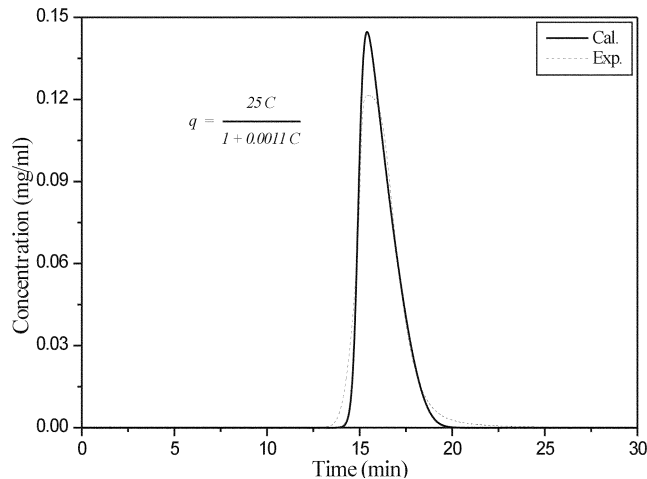


Fig. 8. Comparison of experimental data and calculated values with PIM (10 mg/ml concentration, 0.03 ml injection volume of 2'-deoxy-adenosine).

된 비선형 흡착평형식을 이용하여 계산된 용출곡선과 실험값을 비교하였을 때 잘 일치함을 알 수 있다(Fig. 8).

## 5. 결 론

주입부피와 농도에 따라서 피크의 체류시간과 폭은 물질에 따라서 다르다. 가우시안 형태를 가지는 dCyd에서는 작은 주입부피에서 HETP에 영향을 미치는 영향을 무시할 수 있지만, 주입부피가 증가함에 따라 인젝터에 의한 영향을 고려해야 한다. 단이론을 적용하여 선형적인 흡착평형식을 가지는 dCyd의 계산된 용출곡선은 실험값과 비교하였을 때 잘 일치하였다. 또한 일정한 주입부피에서 농도를 변화시켰을 경우에서도 두 값은 잘 일치하였지만, 비선형 Langmuir 흡착평형식을 갖는 dAdo에 대해서는 속도론에 의해서 용출곡선을 계산해야 한다.

## 감 사

본 연구는 인하대학교 고순도 분리연구실에서 수행하였으며, 인하대학교와 초정밀분리기술센터의 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Lee, J. W. and Row, K. H., "Optimization of Solvent Selectivity and Gradient Mode for Deoxyribonucleosides in RP-HPLC," *HWAHAK KONGHAK*, **35**(5), 769-775(1997).
2. Lee, J. W. and Row, K. H., "Optimum Condition for Resolution of Deoxyribonucleosides," *HWAHAK KONGHAK*, **36**(2), 343-346(1998).
3. Renato, R. and Massimo, M., "Adsorption Equilibria of Dimethylnaphthalene Isomers," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **35**, 199-206(1996).
4. Choi, Y. S., Lee, J. H. and Row, K. H., "Adsorption Characteristics of Liquid Chromatography with Preparative Packings," *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **9**(3), 430-434(1998).
5. Row, K. H. and Lee, W. K., "Separation of Close-Boiling Components by Gas-Liquid Chromatography," *J. Chem. Eng. Japan*, **19**(3), 173-180(1986).
6. Row, K. H. and Larin, A. V., "A Chromatographic Theory Based on the Concept of A Layer of Equilibrium Adsorption," *Korean J. Chem. Eng.*, **12**(4), 442-447(1995).
7. Row, K. H. and Larin, A. V., "Computational Algorithm to Predict Peak Profiles in Preparative High-Performance Chromatography," *Korean J. Chem. Eng.*, **12**(5), 512-515(1995).
8. Hagel, L., "Apparent Pore Size Distributions of Chromatography Media," *J. Chromatogr. A.*, **743**(1), 33-42(1996).
9. Karger, B. L., Snyder, L. R. and Horvath, C., *An Introduction to Separation Science.*, Wiley, New York(1973).
10. Hagel, L. and Jaason, J. C., *Size-Exclusion Chromatography.* in Chromatography, (Ed. E. Heftmann), Elsevier, Amsterdam, A267-A307(1992).
11. Kirkland, J. J., Yau, W. W., Stoklosa, H. J. and Dilks, C. H., "Sampling and Extra-column Effects in High-performance Liquid Chromatography; Influence of Peak Skewon Plate Count Calculations," *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 303-316(1977).
12. Hagel, L., Eds Janson, J. C. and Rydén, L., *Gel filtration. in Protein Purification, Principles, High Resolution Methods, and Application.*, VCH, New York, 63-106(1989).
13. Dawkins, J. V., *Size Exclusion Chromatography.* in Polymer Characterisation., (Eds C. Booth, and C. Price). Pergamon Press, Oxford, Chapter 12, 231-258(1989).
14. Wilke, C. R. and Chang P., *Correlation of Diffusion Coefficients in Dilute Solutions*, *AIChE J.*, **1**, 264-270(1955).
15. Partington, J., *An Advanced Treatise on Physical Chemistry*, Vol. I, *Fundamental Principles, The Properties of Gases*, Longmans, Green, New York(1949).
16. Grunberg, L. and Nissan, A. H., "Mixture Law for Viscosity", *Nature*, **164**, 799-800(1949).
17. Choi, Y. S., Lee, J. W. and Row, K. H., "Comparison of Frontal Analysis and Pulsed Input Method for Determining Adsorption Isotherm," *HWAHAK KONGHAK*, **38**(4), 474-478(2000).