

양이온교환 고성능액체크로마토그래피에서 라이소자임의 모멘트 분석

고관영 · 김인호[†]

충남대학교 공과대학 화학공학과
 34134 대전광역시 유성구 대학로 99
 (2016년 2월 23일 접수, 2016년 4월 15일 수정본 접수, 2016년 4월 27일 채택)

Moment Analysis (MA) of Lysozyme in Cation Exchange High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kwan Young Ko and In Ho Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea
 (Received 23 February 2016; Received in revised form 15 April 2016; accepted 27 April 2016)

요 약

양이온교환 고성능액체크로마토그래피에서 라이소자임을 분석하고, 실험결과인 크로마토그램을 통해 모멘트 분석을 수행하였다. 용리 인산완충용액은 1.0, 0.75, 0.5 M의 소금을 포함하였다. 실험변수는 유량, 용리 완충용액중 소금 농도, 시료의 농도로 하였다. General rate (GR) model을 도입하여 1차와 2차 모멘트를 해석하였다. 1차 모멘트 해석에서 평형상수 K 를 구할 수 있으며, 이는 L/u_0 vs. $(\mu_1 - t_0)/(1 - \epsilon_e)(1 - \epsilon_p)$ 를 도식화했을 때의 기울기이다. 2차 모멘트 해석에서 입자내 확산계수는 이론단수 실험자료에서 계산하였다. 모멘트 분석결과를 통해 여러 물질전달 현상이 이론단 상당높이(HETP)에 주는 영향을 알아보기 위해 van Deemter plot을 작성하고, 총괄 이론단 상당높이(H_{total})에 기여하는 H_{ax} , H_p 그리고 H_d 를 조사하였다. 그 중 입자내 확산계수를 나타내는 H_d 가 가장 지배적이었고, 외부 물질전달 계수를 나타내는 H_p 의 영향이 가장 미미했다.

Abstract – The moment analysis of lysozyme was implemented using chromatograms that were obtained from weak cation exchange column in high performance liquid chromatography system. Three elution sodium phosphate buffers containing 1.0, 0.75, 0.5 M sodium chloride were used. Experiments were conducted by varying flow rate, elution sodium chloride concentration, and lysozyme solute concentration. The general rate (GR) model was employed to calculate the first moment and the second moment. By plotting L/u_0 vs. $(\mu_1 - t_0)/(1 - \epsilon_e)(1 - \epsilon_p)$ equilibrium constants (K) were obtained from first moment analysis. Intra-particle diffusivity was obtained from theoretical plate number data. Based on the results of moment analysis, van Deemter plots were drawn in order to investigate the contributions of H_{ax} , H_p and H_d to total Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP, H_{total}). The effect of intra-particle diffusion (H_d) was the most dominant factor contributing to HETP while external mass transfer (H_p) was negligible factor.

Key words: Moment Analysis, Lysozyme

1. 서 론

모멘트 분석(Moment analysis; MA)은 실험결과인 크로마토그램을 분석하여 컬럼 내에서 시료의 동특성을 정량화하여 용리경향을 파악하는데 목적이 있다. MA는 1960년대부터 van Deemter 및 Knox의 방정식을 토대로 시작되었다. 초기에는 peak의 면적을 나타내는 zero moment로 시작하여 시료의 용리시간을 나타내는 first moment,

peak의 너비를 나타내는 second moment, peak의 대칭성에 관련된 third moment 순서로 연구가 발전했다. 현재는 peak의 뾰족한 정도를 나타내는 fourth moment에 대한 연구 결과도 있다(Fig. 1)[1].

MA연구는 주로 HETP와 유량사이의 관계를 선형적으로 나타낼 수 있는 general rate (GR) model을 중심으로 발전되어 왔으며, 분리공정을 위한 동특성을 파악하는 데는 용리시간과 peak의 너비를 나타내는 first와 second moment만으로도 충분하기 때문에 본 연구에서는 두 moment만 다루었다. First moment는 상평형 열역학의 영향을 받기 때문에 평형상수(K)를 알 수 있다. Second moment는 peak의 너비에 영향을 주는 인자를 axial dispersion, external mass transfer, intra-particle diffusion, adsorption/desorption으로 분류하여 각각의 전달계수들을 계산함으로써 컬럼 내부의 물질전달현상

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Fig. 1. Four moments which is indicated in a chromatogram.

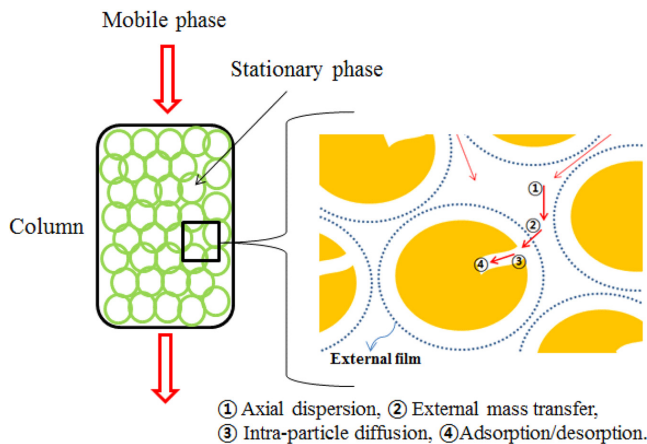


Fig. 2. Scheme of mass transfer processes in the column.

을 정량적으로 알 수 있다(Fig. 2)[2]. 최종적으로 물질전달현상을 분석한 결과를 이용해 컬럼의 길이를 이론단수로 나눈 값인 이론 단 상당높이(Height equivalent to a theoretical plate; HETP)와 유량사이의 관계를 정성적으로 나타낼 수 있다.

라이소자임(pI=11.0)은 동물의 조직, 체액 등에 분포되어 있다. 그 중에서도 난백에 포함된 함량이 3.5% 정도로 가장 높고, 계란으로부터 분리하는 것이 다른 동식물로부터 분리하는 것에 비해 용이하다[3]. 라이소자임은 분자량이 14,300으로 염기성 단백질로 pI가 11이기 때문에 pH 11이하에서는 양이온화 되고, 라이소자임을 분리할 때에는 양이온교환(cation exchange)방법을 주로 사용한다[4].

고성능액체크로마토그래피(High performance liquid chromatography; HPLC)는 혼합물에서 분리·정제하는 데 유용한 장치이기 때문에 HPLC에 양이온교환 컬럼을 결합하여 양이온교환 HPLC를 구성하였다[5]. 라이소자임은 단백질 크로마토그래피 연구에서 대표물질로 쓰이며 본 연구에서도 MA를 적용하기 위한 단백질로 선정하였다. 컬럼 내에서 라이소자임을 탈착시킬 염(salt)의 농도 3가지, 라이소자임 표준 시료농도 3가지, HPLC의 유량 3가지를 실험변수로 설정하여 총 27가지의 크로마토그램을 얻고, MA를 수행하여 분리특성을 조사하였다. 양이온교환 HPLC 크로마토그래피를 사용하여 라이소자임을 분리할 때 MA를 적용한 것은 문헌조사 결과 본 연구가 처음인 것으로 사료된다. MA의 결과는 공정의 최적 조건을 찾을 수 있는 정보를 제공하고, 크로마토그래피 전산모사에 도움이 되는 인

자를 제공하여 scale-up 부분에 도움이 될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 단백질 시료를 효율적으로 분리할 수 있는 조건을 찾기 위해, 이온교환 컬럼 내부에서 일어나는 전달현상을 분석하여 시료의 분리 동특성을 파악하고, 이론과 실험을 병행하는 방법을 제시하고자 한다.

2. 이 론

MA를 위해 먼저 필요한 인자인 컬럼의 전체 공극률(ϵ_t), 컬럼에서 고정상으로 채워진 부분을 제외한 외부공극률(ϵ_e), 고정상 입자에서 기공에 대한 내부공극률(ϵ_i) 및 시료가 고정상과 상호작용 없이 용리되는 시간인 dead time (t_0)을 계산하였다.

$$\epsilon_t = 0.487 \times D_c \times D_c \times L \quad (1)$$

L 은 컬럼의 길이를, D_c 는 컬럼의 직경을 나타낸다. 식 (2)에 ϵ_t 와 ϵ_i 값을 대입하여 ϵ_e 값을 계산하였다.

$$\epsilon_t = \epsilon_e + (1 - \epsilon_e)\epsilon_i \quad (2)$$

계산한 ϵ_t 와 ϵ_e 값을 사용하여 식 (3)을 통해 t_0 을 계산하였다.

$$t_0 = (L/u_0) \{ \epsilon_e + (1 - \epsilon_e)\epsilon_i \} \quad (3)$$

u_0 는 컬럼 내부에서 이동상의 선속도이다.

실험결과인 크로마토그램으로부터 MA를 통해 컬럼 내부에서 용리평형(retention equilibrium)에 관련된 first moment (μ_1)와 peak의 너비를 결정하는 second moment (μ_2)의 경향을 알 수 있다. 용리시간(retention time)으로부터 first moment를 계산하여 평형상수(equilibrium constant, K)값을 식 (4)을 통해 구하였다.

$$\mu_1 = \frac{\int_0^\infty C_e(t)dt}{\int_0^\infty C_e(t)dt} = \frac{L}{u_0} [\epsilon_e + (1 - \epsilon_e) \{ \epsilon_i + (1 - \epsilon_i)K \}] \quad (4)$$

$C_e(t)$ 는 컬럼 출구에서 시간에 따른 시료의 농도기울기이다. 실험으로 얻은 크로마토그램은 x 및 y축이 각각 시간(s)과 전기적 신호(mV)에 대한 그래프이기 때문에 그래프의 최고점을 실험에 사용한 시료의 농도로 나눔으로써 $C_e(t)$ 를 얻었다. u_0 는 컬럼 내에서 고정상을 제외한 부분을 지나가는 선속도를 의미하기 때문에 ml/min의 단위를 cm/s로 변환하고, 고정상 사이로 지나가기 때문에 ϵ_e 로 나누어서 계산하였다. 식 (4)을 x축을 L/u_0 , y축을 $(\mu_1 - t_0)/[(1 - \epsilon_e)(1 - \epsilon_i)]$ 로 하여 도식화 했을 때의 기울기가 평형상수(K)를 나타낸다.

Second moment에 대한 식은 (5)~(10)와 같다.

$$\mu_2 = \frac{\int_0^\infty C_e(t)(t - \mu_1)^2 dt}{\int_0^\infty C_e(t)dt} = \frac{2L}{u_0} (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d + \delta_{ads}) \quad (5)$$

$$\delta_0 = \epsilon_e + (1 - \epsilon_e) \{ \epsilon_i + (1 - \epsilon_i)K \} \quad (6)$$

$$\delta_{ax} = \frac{\epsilon_e D_L}{u_0^2} \delta_0^2 \quad (7)$$

$$\delta_f = (1 - \epsilon_e) \left(\frac{R_p}{3k} \right) \{ \epsilon_i + (1 - \epsilon_i)K \}^2 \quad (8)$$

$$\delta_d = (1 - \epsilon_e) \left(\frac{R_p^2}{15D_e} \right) \{ \epsilon_i + (1 - \epsilon_i)K \}^2 \quad (9)$$

$$\delta_{ads} = (1 - \epsilon_e)(1 - \epsilon_i) \left(\frac{K^2}{k} \right) \quad (10)$$

D_L 은 axial dispersion coefficient, k_f 는 external mass transfer coefficient, D_e 는 intra-particle diffusivity, R_p 는 고정상 입자의 반지름이다.

δ 는 물질전달과정의 영향 정도를 나타내며, 이 때 하첨자로 쓰인 ax, f, d, ads는 각각 axial dispersion, external mass transfer, intra-particle diffusion, adsorption/desorption을 의미한다. 하지만 HPLC에서 흡·탈착의 반응속도가 매우 빠르기 때문에 adsorption/desorption에 관한 moment 값은 무시한다[6,7]. 따라서 본 연구에서는 세 가지 전달현상만 고려하였다.

실험결과로부터 axial dispersion, external mass transfer, intra-particle diffusion 순서대로 필요한 인자를 계산하였다. 먼저, axial dispersion moment에 필요한 D_L 계산식은 분자확산과 eddy확산으로 구성되어 있고, 아래와 같다.

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u_0 \quad (11)$$

d_p 는 고정상 입자의 직경이고, γ_1 과 γ_2 는 geometrical coefficient로 구형입자로 채워진 컬럼에서는 0.7과 0.5로 쓴다[8]. D_m 은 이동상에서 용질의 확산계수(molecular diffusivity)이며, 식 (12)인 Wilke-Chang 방정식으로 계산할 수 있다[9].

$$D_m = \frac{7.4 \times 10^{-8} T \sqrt{\alpha_{sv} M_{sv}}}{\eta_{sv} V_{b,a}^{0.6}} \quad (12)$$

식 (12)에서 하첨자 sv, a는 각각 용매와 용질을 의미한다. V_b 는 끓는점에서의 몰부피, α 는 회합도(degree of aggregation), T는 절대온도, η_{sv} 는 용매의 점도, M은 용질의 분자량이다.

다음으로 external mass transfer coefficient (k_f)를 구하기 위해 Wilson-Geankoplis correlation을 사용했고, 식(13)에 나타났다.

$$Sh = \left(\frac{1.09}{\epsilon_e} \right) Sc^{1/3} Re_p^{1/3} \quad (13)$$

$$Sh = \frac{2k_f Re_p}{D_m} \quad (14)$$

$$Sc = \frac{\eta}{\rho_p D_m} \quad (15)$$

$$Re_p = \frac{2u_0 R_p \rho_p}{\eta} \quad (16)$$

식 (13)에 식 (14)~(16)를 대입하여 k_f 를 구할 수 있다. ρ_p 는 컬럼 내 고정상 입자의 밀도로서 $(1-\epsilon_p)$ 로 나타낼 수 있다[2,8]. 식 (13)~(16)은 세 가지의 무차원수(Sh, Sc, Re_p)를 이용해 정의되었다. Sherwood number (Sh)는 mass transfer중에서 diffusion이 차지하는 비율을, Schmidt number (Sc)는 viscous diffusion과 molecular diffusion의 비율, 마지막으로 Re_p 는 inertial force와 viscous force의 비율이다.

W_b 는 크로마토그램의 폭이며, 용질에 대한 컬럼의 이론단수(N)을 식 (17)로 계산하고, 식 (18)를 통해 HETP값인 H_{total} 을 계산할 수 있다.

$$N = 16 \left(\frac{t_R - t_0}{W_b} \right)^2 \quad (17)$$

$$H_{total} = \frac{L}{N} \quad (18)$$

GR model은 HETP와 유량의 상관관계를 식(19)와 같이 나타낸다.

$$H_{total} = \frac{2\epsilon_e D_L}{u_0} + \frac{2\delta_f}{\delta_0^2} u_0 + \frac{2\delta_d}{\delta_0^2} u_0$$

$$= H_{ax} + H_f + H_d \quad (19)$$

마지막 계수인 D_e 는 식 (18)를 통해 얻은 H_{total} 값에서 앞서 D_L 과 k_f 를 통해 계산한 H_{ax} 와 H_f 값을 빼고, H_d 에서 D_e 를 역추산하였다.

한편, H_{ax} 는 유량에 의존적인 H_f 와 고정상 내부에서 용질분자의 확산이동을 의미하는 H_d 로 나누어 고려할 수 있기 때문에 식 (19)을 식 (20)로 고쳐 다시 쓸 수 있다.

$$H_{total} - H_f = H_{ax} + H_d = \frac{2\epsilon_e D_L}{u_0} + \frac{2\delta_d}{\delta_0^2} u_0 \quad (20)$$

식 (11)과 (20)을 결합하여 식 (21)을 얻을 수 있다.

$$H_{total} - H_f = \frac{2\epsilon_e \gamma_1 D_m}{u_0} + 2\epsilon_e \gamma_2 d_p + \frac{2\delta_d}{\delta_0^2} u_0$$

$$= \frac{B}{u_0} + A + C u_0 \quad (21)$$

식 (21)은 $H_{total} - H_f$ 와 유량간의 관계를 나타낸 van Deemter equation 이고, A, B, C를 van Deemter coefficient라고 한다. MA를 통해 물질전달계수들을 정량적으로 분석하고, van Deemter coefficient를 MATLAB에 적용시켜 정성적인 결과를 확인하였다.

3. 실험 재료 및 방법

3-1. 재료

평형 완충용액은 pH 9.2 30 mM sodium phosphate buffer (Sigma aldrich, U.S.A.)를 사용했고, 용리 완충용액은 평형 완충용액에 sodium chloride(DUKSAN, Korea)을 서로 다른 세 가지의 농도(0.5, 0.75, 1.0 M)가 되도록 용해시켜 제조했다. 라이소자임 시료는 평형 완충 용액 10 ml에 라이소자임 표준시료(Sigma aldrich, U.S.A.)를 30, 50, 70 mg을 섞어 3, 5, 7 mg/ml의 농도로 만들고, 실린지 필터로 불순물을 제거했다.

3-2. 방법

등용리 방법(isocratic method)을 사용했다. 이온교환 크로마토그래피에서는 2가지의 이동상(평형 및 용리 완충용액)이 필요하기 때문에 대부분 펌프를 2대 사용하지만, 본 연구에서는 두 이동상과 펌프에 연결되는 유로를 3 way valve로 연결함으로써 110B solvent delivery module pump(Beckman, USA) 펌프 1대로 구현하였다. 기포는 filter에서 걸러졌고, 시료는 샘플주입밸브인 RHEODYNE 7010 (Rheodyne, California, U.S.A.)를 통해 직경이 5 μ m 입자로 채워진 4.6×250 mm 사이즈의 HP HENENCHEM, WCX-300 (Agilent, U.S.A.) 컬럼으로 주입되었다. 컬럼의 온도를 25 °C로 유지하기 위해 BAS LC-22C Temperature Controller (SpectralLab Scientific Inc., Canada) 모델의 컬럼오븐을 사용하였다. 783A programmable absorbance detector (Applied Biosystems, U.S.A.) 모델의 UV과장은 단백질이 가장 잘 검출하는 280 nm로 설정했다. 검출된 전기적 신호를 Autochro Data Module (Younglin Instrument, Korea) 프로그램을 통해 디지털 신호로 바꾸어 PC로 확인하였다(Fig. 3). 샘플의 양은 20 μ l, 펌프의 유량은 0.5, 1.0, 1.5 ml/min로 했다. 시료의 세

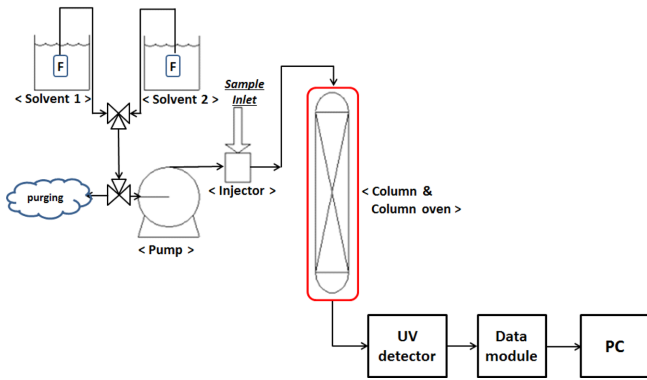


Fig. 3. Flow sheet of the system in this study for lysozyme analysis.

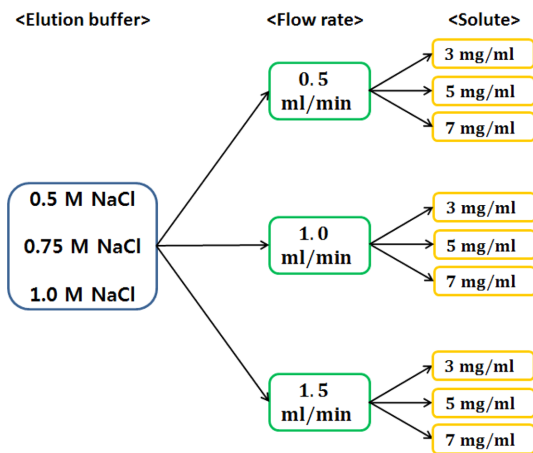


Fig. 4. Scheme of 27 experimental cases in this study for analyzing lysozyme.

가지 농도, 용리 완충용액의 NaCl농도 및 유량을 각각 3가지씩 설정하여 총 27가지의 크로마토그램을 얻었다(Fig. 4). 각 변수에 대한 분리특성을 알아보고, 이를 기반으로 MA를 수행하였다.

4. 결과 및 고찰

4-1. 라이소지임 분석결과

용리 완충용액의 NaCl농도가 0.5, 0.75, 1.0 M의 순서로 실험을 수행했고, 3, 5, 7 mg/ml의 lysozyme 표준시료를 0.5, 1.0, 1.5 ml/min에 대한 결과를 살펴보았다. 이로써 시료의 농도, 유량, NaCl 농도가 결과에 각각 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 실험의 정밀도를 위해 같은 시료를 3회씩 분석하였으나 결과에 큰 차이가 없어 하나의 결과만을 Fig. 5에 나타냈다.

농도변화, 유량변화, elution buffer변화에 대한 각각의 결과를 Fig. 5에 나타냈다. Fig. 5A는 다른 농도의 시료를 1.0 M NaCl 용리 완충용액에서 1.0 ml/min으로 주입했을 때의 결과이다. 용리시간은 시료의 농도에 상관없이 673초(11.2분)근방이었다. 농도가 커질수록 peak의 면적은 순서대로 약 6900, 11480, 15100 mV·sec로 정비례에 가까웠다. Fig. 5B는 1.0 M NaCl 용리 완충용액을 사용해서 3 mg/ml의 시료를 서로 다른 유량(0.5, 1.0, 1.5 ml/min)으로 분석한 결과이다. 용리시간은 유량에 반비례했으며, 용리시간은 유량이 큰 순서대로 455초(7.58분), 673초(11.2분), 1398초(23.3분)이

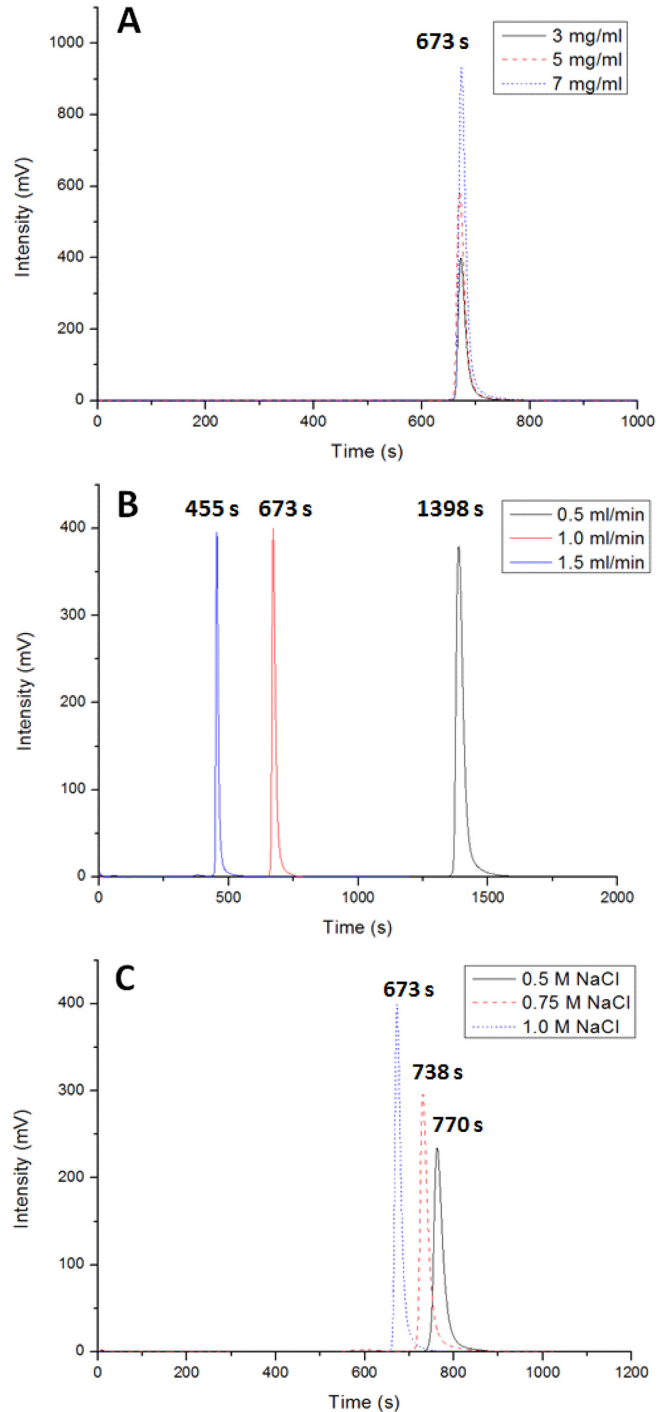


Fig. 5. Chromatograms among different (A) solute concentrations, (B) three flow rates, and (C) NaCl concentration in elution buffer in CE-HPLC.

었다. 1.0 ml/min일 때의 용리시간(673초)을 기준으로 했을 때, 1.5 ml/min에서는 약 1.5배 빨리 용리됐고, 0.5 ml/min에서는 약 2배 늦게 시료가 용리되었다. 이를 통해 한 용매 내에서 용리시간은 유량에 비례하는 것을 알 수 있었다. Fig. 5C는 세 가지의 용리 완충용액에서 3 mg/ml의 시료를 1.0 ml/min에서 분석한 결과이다. NaCl이 많이 포함되어 있는 순서대로 용리시간은 673초(11.2분), 738초(12.3분), 770초(12.8분)이었다. 세 peak의 면적이 6600±300 mV·sec로 큰 차이가 없는 점을 고려하면, NaCl의 농도가 클수록 peak의 형태가 뽀

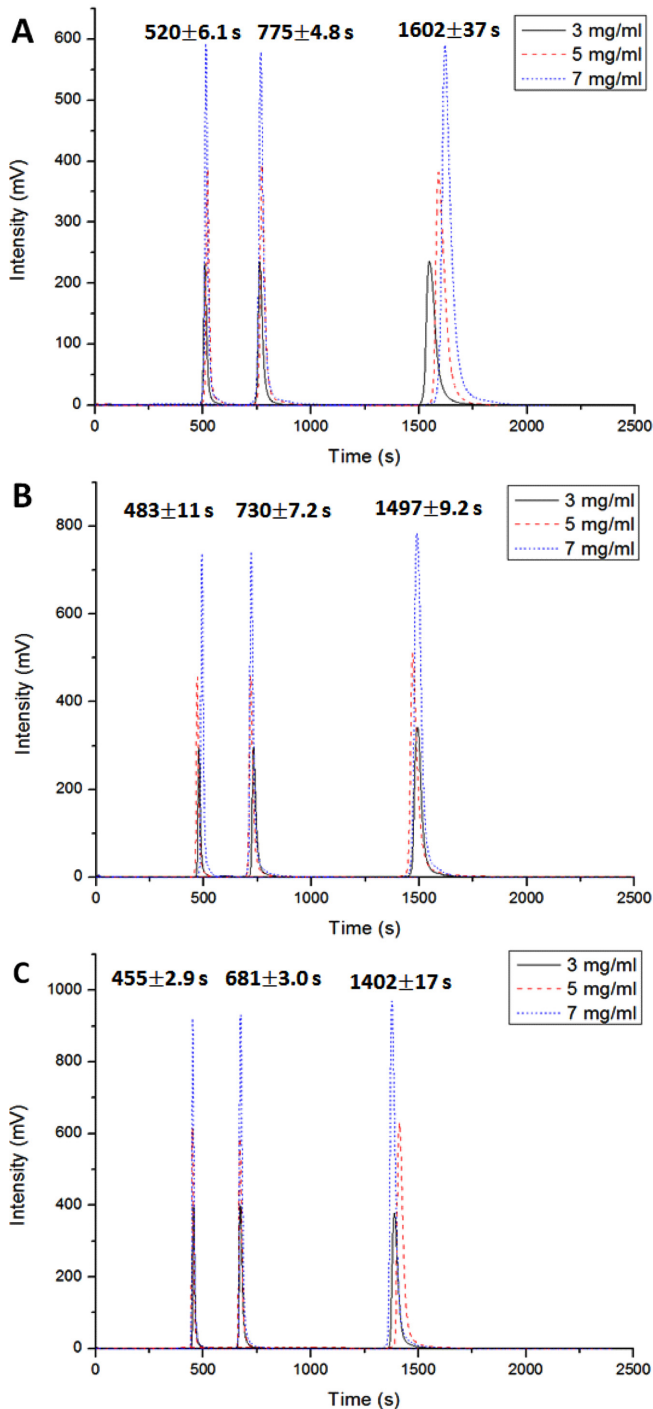


Fig. 6. Chromatograms for 9 cases with three solute concentrations in each elution buffer containing (A) 0.5 M, (B) 0.75 M, and (C) 1.0 M NaCl at three flow rates.

축해지고 용리시간이 짧아짐을 알 수 있는데, 이는 교환하는 이온의 양의 증가로 탈착이 빠르게 일어나기 때문이다.

시료를 탈착시키는 NaCl의 농도 차이에 대한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. Fig. 6에서 가장 낮은 크로마토그램은 3 mg/ml, 가장 높은 크로마토그램은 7 mg/ml를 나타낸다. Fig. 6A는 세 가지 농도의 시료를 0.5, 1.0, 1.5 ml/min에서 0.5 M NaCl로 탈착한 9가지의 크로마토그램이다. 시료는 농도에 관계없이 평균 520초(8.67분), 775(12.9분), 1602초(26.7분)에 용리되었다. 0.5 ml/min에서 3 mg/ml의 크

로마토그램이 비교적 많이 벗어났지만 결과 값(1602초; 26.7분)에 비하면 작은 차이므로 실험오차로 볼 수 있다. Fig. 6B는 0.75 M NaCl을 사용했을 때의 크로마토그램이다. 시료들은 0.5 M NaCl일 때보다 빠른 483초(8.05분), 730초(12.2분), 1497초(24.9분)에 검출되었고, 각각의 표준편차를 크로마토그램에 나타냈다. Fig. 6C는 1.0 M NaCl에서의 결과이고, 용리시간은 455초(7.58분), 681초(11.4분), 1402초(23.4분)였다. Fig. 6A, 6B, 6C를 보면 유량이 1.5 ml/min에서 NaCl의 농도가 커질 때에는 용리시간이 약 30초, 1.0 ml/min에서는 약 50초, 0.5 ml/min에서는 약 100초가 앞당겨지는 경향을 볼 수 있었다.

4-2. 라이소자임 MA결과

HETP와 유량이 선형관계를 갖는 GR model을 사용하여 moment분석을 하였다. First moment는 식 (4)를 통해 계산할 수 있고, moment값은 용리시간을 나타내며, 평형상수(K)를 구할 수 있다. Second moment는 axial dispersion, external mass transfer, intra-particle diffusion의 합으로 표현할 수 있고, 물질전달계수와 HETP 값을 결정한다. Axial dispersion coefficient 계산 시 필요한 용질의 molecular diffusivity (D_m)는 Wilke-Chang 방정식을 통해 계산했다. D_L 을 사용해 δ_{ax} 및 H_{ax} 를 계산하였다. External mass transfer coefficient (k_f)는 Wilson-Geankoplis 상관관계식을 통해 구했고, 결과를 바탕으로 δ_f 및 H_f 를 계산하였다. H_{total} 에서 H_{ax} , H_f 값을 빼주어 H_d 값을 얻고, δ_d 와 D_e 값을 계산하였다. MA에 필요한 컬럼에 대한

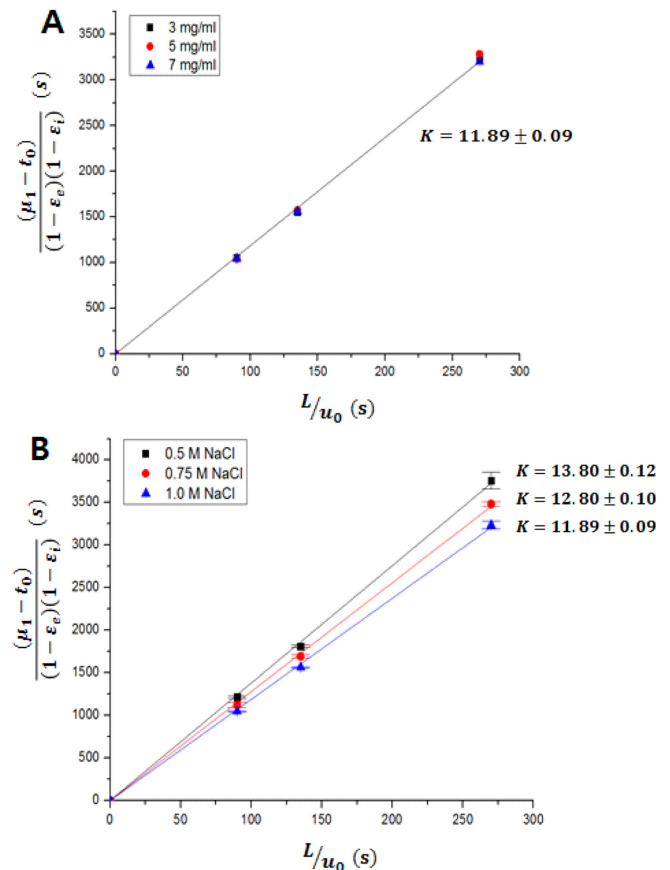


Fig. 7. (A) First moment plot of lysozyme at various concentrations in elution buffer containing 1.0 M NaCl, (B) Plots of the first moment at various elution buffers with a solute concentration, of 3 mg/ml.

고유상수들을 먼저 계산하였다. 사용한 컬럼의 직경 및 길이를 식 (1)에 대입하여 전체 공극률(ϵ_t)을 구한 결과, 0.62였다. 컬럼 안에 고정상의 총 내부공극부피가 평균 0.7 ml 이므로 내부공극률(ϵ_p)을 0.17로 하였고[9], 식 (2)를 통해 외부공극률(ϵ_e)을 계산한 결과 0.54였다. 공극률 계산을 토대로 식 (3)을 통해 hold-up time (t_0)을 계산한 결과, 유량이 빠른 순서(1.5, 1.0, 0.5 ml/min)대로 56, 83, 167초였다.

Fig. 7A는 Fig. 5A에 근거하여 1.0 M NaCl 용리 완충용액에서 세 가지 시료를 주입한 first moment값을 도식화한 것이다. 그래프의 기울기인 평형상수는 11.89, 표준편차는 0.09였다. 용질의 농도는 first moment에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. Fig. 7B는 세 종류의 용리 완충용액에서의 first moment 분석결과이다. NaCl의 농도가 높은 순서대로 1.0 M에서 11.89, 0.75 M에서 12.8, 0.5 M에서는 13.8이었다. 염(NaCl)의 농도가 0.25 M씩 증가할 때마다 K값은 약 1씩 작아졌다. 고정상과 흡착된 시료를 탈착시키는 데에 이온이 정량적으로 증가함에 따라 용리시간을 규칙적으로 앞당겼음을 예측할 수 있었다. 탈착시키는 이온의 양이 정비례하여 늘어나기 때문에 규칙적으로 변화하는 것을 짐작할 수 있었다. first moment는 용질 농도와 관계없이 용리 완충용액 내의 염의 농도, 즉 용매의 변화에 영향을 받았다.

Second moment는 axial dispersion, external mass transfer, intra-particle diffusion 순서로 정량분석하고, van Deemter plot을 통해 정성적 결과를 살펴보았다.

Axial dispersion 및 external mass transfer coefficient에 관한 결과를 Table 1에 나타냈다. 용매의 점도는 증류수에 NaCl을 녹인 용액의 점도를 적용했으며, 농도가 높은 순서대로 0.00972, 0.009503, 0.009286 g/cm·s였다[10]. Wilke-Chang equation (식 12)을 통해 D_m 을 계산하였고, NaCl의 농도가 낮아질수록 $1.72 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ 에서 $1.80 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ 까지 0.4씩 증가했다. 이는 D_m 이 점도에 반비례하기 때문이다. D_L 은 D_m 과 유량에 비례하기 때문에 NaCl의 농도가 낮을수록, 유량이 커질수록 값이 증가했다. 최소값은 1.0 M NaCl 용리 완충용액에서 0.5 ml/min일 때 $1.23 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ 였고, 0.5 M의 1.5 ml/min일 때 $1.33 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ 였다. 1.0 M에서 0.5 M로 갈수록 0.3씩 규칙적으로 증가하였다. External mass transfer coefficient (k_f) 값도 용리가 늦는 용매일수록 감소했다. 즉, NaCl의 농도가 작아질수록 증가했으며, 각각의 용매에서 1.31, 1.28, $1.25 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ 였다. NaCl 농도가 작을수록 고정상의 외막을 침투하는 전달력이 감소하는 것으로 볼 수 있다. Intra particle diffusivity 결과를 Table 2에 나타냈다. H_{total} 에서 H_{ax} 와 H_f 빼서 H_d 를 얻고, δ_d 와 D_e 를 역추산하였다. D_e 값은 NaCl의 농도가 낮을수록 감소했고, 농도 및 유량이 증가할 때에는 값이 커졌다. 유량이 증가하면 유체의 흐름이 빨라지기 때문에 D_e 가 증가한 것으로 보인다. D_e 의 최댓값은

Table 1. Results about axial dispersion and external mass transfer coefficients of lysozyme

	Superficial Velocity [cm/s]	NaCl conc. in Elution Buffer		
		1.0 M	0.75 M	0.5 M
$D_m \times 10^{-3} [\text{cm}^2/\text{s}]$		1.72	1.76	1.80
	0.093	1.23	1.26	1.29
$D_L \times 10^{-3} [\text{cm}^2/\text{s}]$	0.185	1.25	1.28	1.31
	0.278	1.28	1.30	1.33
$k_f \times 10^{-2} [\text{cm}^2/\text{s}]$	-	1.31	1.28	1.25

Table 2. Results about intra particle diffusivity of lysozyme

	Solute Concentration	Superficial Velocity [cm/s]	NaCl Conc. in Elution Buffer		
			1.0 M	0.75 M	0.5 M
$D_e \times 10^{-8} [\text{cm}^2/\text{s}]$	3 mg/ml	0.093	5.46	5.32	5.15
		0.185	7.43	5.98	5.30
		0.278	7.90	7.20	5.95
	5 mg/ml	0.093	5.04	4.97	3.32
		0.185	5.19	5.07	3.47
		0.278	6.72	5.36	4.14
	7 mg/ml	0.093	4.46	4.38	2.64
		0.185	4.54	4.50	3.20
		0.278	5.76	5.26	3.34

Table 3. Van Deemter coefficients; A, B and C

	NaCl Conc. in Elution Buffer		
	1.0 M	0.75 M	0.5 M
A	2.70×10^{-4}	2.70×10^{-4}	2.70×10^{-4}
B	1.30×10^{-3}	1.33×10^{-3}	1.36×10^{-3}
C	0.260	0.280	0.390

1.0 M의 용리 완충용액에서 1.5 ml/min로 3 mg/ml를 분석할 때 $7.90 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ 였고, 반대로 최솟값은 0.5 M의 용리 완충용액에서 0.5 ml/min로 7 mg/ml를 분석할 때 $2.64 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ 였다.

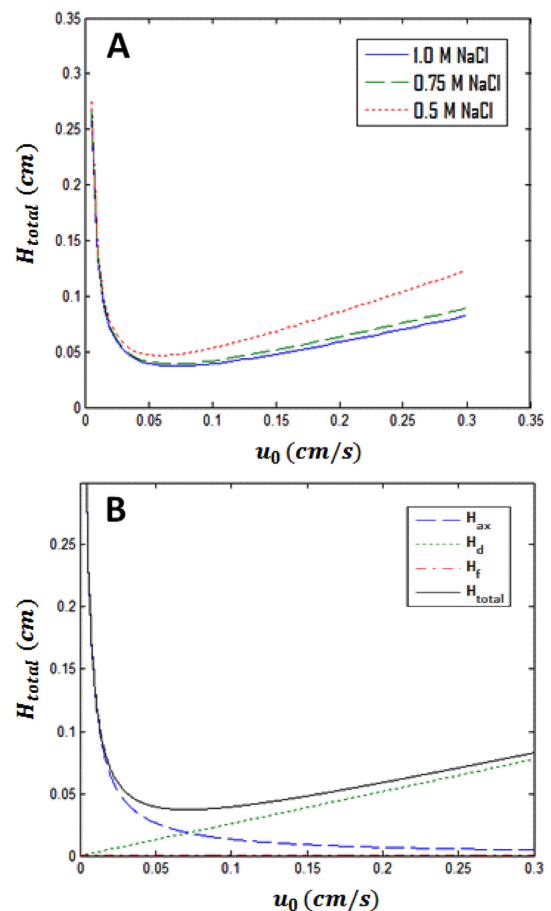


Fig. 8. (A) Correlation between HETP and the flow rate upon changing the NaCl concentration in elution buffer, (B) Contribution of each mass component to the H_{total} in 1.0 M elution buffer.

위와 같은 정량적 결과를 정성적으로 표현하기 위해 계산한 van Deemter coefficient A, B, C를 Table 3에 나타냈다. A는 2.70×10^{-4} 이며, B는 NaCl의 농도가 높은 순서대로 1.30, 1.33, 1.36×10^{-3} 이었다. C값은 각각의 시료농도에서 유량에 대한 평균값을 구하고, 농도에 대한 평균값을 다시 계산하여 C로 사용했다. C는 1.0, 0.75, 0.5 M의 NaCl에서 각각 0.26, 0.28, 0.39였다. 각각의 용매에 대한 van Deemter plot을 Fig. 8A에 나타냈다. 용리가 가장 늦은 완충용액의 H 값이 가장 컸다. 1.0 M NaCl 용리 완충용액에서의 실험결과를 기반으로 각각의 전달현상이 H_{total} 에 주는 영향을 Fig. 8B에 나타냈다. H_{ax} 가 RP-HPLC일 때보다 더 넓은 범위의 유량에 영향을 미치고, 약 0.1 cm/s 이상부터는 H_d 가 지배적이었다. H_f 는 영향력이 미미했다.

5. 결 론

양이온교환 HPLC에서 라이소자임을 3가지 시료농도, 이동상 및 유량에 대한 27가지의 크로마토그램을 분석하여 각각의 MA를 비교하였다.

열역학적인 first moment는 용질의 농도에 상관없이 용매의 조성에 따라 변화했다. 용리 완충용액의 NaCl농도가 작을수록 first moment값이 커졌다. x축을 L/u_0 , y축을 $(\mu_1 - t_0)/[(1-\epsilon_e)(1-\epsilon_i)]$ 으로 하여 평형상수(K)를 구한 결과는 1.0 M, 0.75 M, 0.5 M NaCl 용리 완충용액 순서대로 11.89, 12.8, 13.8이었다.

용리 완충용액의 NaCl 농도가 작아질수록 용질의 용리시간이 길어졌지만, 점도는 내려갔다. 따라서 점도의 영향을 받는 molecular diffusivity (D_m)값이 용리시간이 길어지는 방향으로 증가했다. Axial dispersion coefficient (D_L)는 D_m 과 비례하기 때문에 같은 경향을 보였다. External mass transfer coefficient (k_f) 값은 NaCl의 양이 감소할수록 점도가 규칙적으로 작아짐에 따라 k_f 값이 작아졌다. Intra-particle diffusivity (D_e)는 NaCl의 농도가 감소할수록 작아졌다.

Van Deemter coefficient를 계산하여 van Deemter plot을 통해 정성적 결과를 살펴본 결과, 용리가 빠른 용매의 곡선 경사가 완만했다. 일정 지점까지 H_{ax} 와 H_d 가 H_{total} 에 영향을 주다가 일정 유량을 넘어서면 H_d 가 지배적이었고, H_f 는 영향이 미미했다.

감 사

본 연구는 충남대학교 CNU 학술연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

Nomenclature

t_R	: Retention time
t_0	: hold-up time
K	: Partition or equilibrium coefficient
t_p	: Parking time
L	: Column length [cm]

D_c	: Diameter of a column [cm]
D_L	: Axial dispersion coefficient [cm^2/s]
D_m	: Molecular diffusivity [cm^2/s]
V_b	: Molar volume at the boiling point [cm^3/mol]
M	: Molecular weight [g/mol]
k_f	: External mass transfer coefficient [cm^2/s]
ρ_p	: Density of particles
D_e	: Intra-particle diffusivity [cm^2/s]

Greek letters

k	: Capacity factor
ϵ_t	: Total porosity of a column
ϵ_e	: External porosity of a column
ϵ_i	: Internal porosity of a column
μ_1	: First moment [s]
μ_2	: Second moment [s]
γ	: Geometrical coefficient
α	: Degree of aggregation
η_{sv}	: Viscosity of the solvent [g/cm·s]

References

- Otto, G., "Interpretation of Asymmetric Curves in Linear Chromatography," *Anal. Chem.*, **43**(14), 1934-1937(1971).
- Miyabe, K., "Moment Analysis of Chromatographic Behavior in Reversed-phase Liquid Chromatography," *J. Sep. Sci.*, **32**, 757-770(2009).
- Kim, H. M., Kim, A. R., Lee, C. S., and Kim, I. H., "Identification of Proteins in Egg White using Ion Exchange Cartridge and RP-HPLC," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(4), 713-717(2012).
- Ko, K. Y. and Kim, I. H., "The Effect of pH and Temperature on Lysozyme Separation in Ion-exchange Chromatography," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**(1), 98-105(2014).
- Miyabe, K. and Suzuki, M., "Chromatography of Liquid-phase Adsorption on Octadecylsilyl-silica Gel," *AIChE J.*, **38**, 901-910(1992).
- Suzuki, M., *Adsorption engineering*, Kodansha, Elsevier, Tokyo, Japan(1990).
- Liu, Z., Roininen, J., Pilkkinen, I., Saari, P., Sainio, T. and Alopaeus, V., "A New Moment Analysis Method to Estimate the Characteristic Parameters in Chromatographic General Rate Model," *Computers and Chemical Engineering*, **55**, 50-60(2013).
- Choi, D. Y. and Row, K. H., "Estimation of Kinetic and Rate Parameters of Peptides by Moment Analysis," *J. Ind. Eng. Chem.*, **10**, 1052-1057(2004).
- http://www.sanderkok.com/techniques/hplc/column_properties.html.
- Kestin, J., Khalifa, H. E. and Correia, R. J., "Tables of the Dynamic and Kinematic Viscosity of Aqueous NaCl Solutions in the Temperature Range 20-150 °C and the Pressure Range 0.1-35 MPa," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **10**(1), 71-87(1981).