ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
(*Journal of the Korean Society of Analytical Sciences*)
Vol. 6, No. 3, 1993
Printed in the Republic of Korea

미셀 액체 크로마토그래피에서 두 가지 파라미터의 반복 회귀 최적화

김인환 · 김상태*
대구대학교 사범대학 화학교육과
*육군 제3사관학교 대학부 화학과
(1993. 4. 10. 접수)

Iterative Regression Optimization of Two-Parameters in Micellar Liquid Chromatography

In-Whan Kim, Sang-Tae Kim*
Department of Chemistry Education, Taegu University, Kyungsan 713-714, Korea
**Department of Chemistry, The Third Military Academy, Youngchun 771-849, Korea*
(Received Apr. 10, 1993)

요약 : 두 가지 파라미터를 이용한 반복 회귀 최적화법을 미셀 액체 크로마토그래피에서 아미노산과 펩티드류의 분리에 적용하였다. 실험에 사용한 파라미터들은 계면활성제(surfactant)인 SDS와 2-propanol의 농도이다. 이 최적화 방법은 작은 횟수의 초기 실험 수행으로 효과적인 최적화점을 얻을 수 있었다.

Abstract : The iterative regression optimization strategy using two parameters is described and applied to the separation of amino acids and peptides by means of micellar liquid chromatography. The parameters examined are the concentration of surfactant and 2-propanol.

This approach results in an efficient optimization using a small number of initial experiments.

Key words : Micellar Liquid Chromatography, Optimization Separation of Amino acids and Peptides.

1. 서 론

역상 액체 크로마토그래피에서 효과적인 분리방법에 대한 연구는 실험조건과 머무름 거동의 이론적인 관계가 불분명하여 상당히 복잡하고 어려운 결과를 가져오고 있다. 특히, 혼합시료 중에 미지의 물질이 한두 개가 포함되면 더욱더 해석이 복잡해진다. 많은 크로마토그래피 연구자들은 이런 이유 때문에 적절한 실험결과를 이용하여 만족스러운 분리 방법과 용리거동을 설명하고자 노력했었고, 또 좋은 결과를 보고한 이래로[1,2,3] 이 분야에 개인용 컴퓨터를 이용하는 좋은 방법들도 최근에 보고된 바 있다.[4] 여기서 효과적인 실험 계

획의 필요성은 MLC(Micellar Liquid Chromatography), IP-LC와 같은 이온, 비이온형의 시료분리를 위한 액체 크로마토그래피에서 특히 중요하다. 이러한 분리에 필요한 이동상의 변수들은 혼합시료의 분리최적화에서의 파라미터라고 할 수 있고, 가능한 파라미터들의 수는 계면활성제의 종류와 농도, 유기변형제(organic modifier)의 종류나 농도, 온도, pH, 그리고 이온강도 등 많이 있다. 이 중에서 어떤 파라미터를 선택하여야 할 것이며, 또한 선택된 파라미터의 범위(parameter space) 내에서 최소의 실험으로 최적화분리의 문제해결을 위한 효과적인 방법을 연구 · 검토할 필요가 있다.

본 연구에서는 이런 최적화 방법을 최초로 연구 보고한 Drouen과 그 공동연구자[5,6]들의 반복 회귀 최적화법(iterative regression optimization method)을 이용하여 아미노산과 펩티드의 혼합 시료 분리에 적용해 보고자 한다.

2. 이 론

반복 회귀 최적화법은 Drouen과 공동연구자들[5,6]이 주로 역상의 HPLC에 적용하여 왔었다. 두 개 파라미터를 이용한 최적화 연구에 대한 기초원리는 *Fig.* 1. (a)에서와 같이 P_1은 첫번째 파라미터, 즉 이동상의 변수가 혼합시료를 분리할 수 있는 최소, 최대의 범위를 나타내며, P_2는 두번째 파라미터의 범위로서 이것을 파라미터 범위(parameter space)라고 한다.

Fig. 1 에서와 같이 평면의 X, Y축은 조사되어지는 파라미터의 관계가 있고 Z축으로 나타낸다면 측정된 크로마토그램의 기준(criterion)에 의해 분리 정도를 나타낼 수 있다. 파라미터 범위의 측정 부분내에서 직접 측정하지 않은 크로마토그램은 컴퓨터로 두 파라미터의 모든 조건을 조합하여 예측하여 볼 수 있고 그 결과를 기준치(criterion value, r)로서 분리의 정도에 대한 결과를 나타내어 준다. 이것을 지표 등고선과 같이

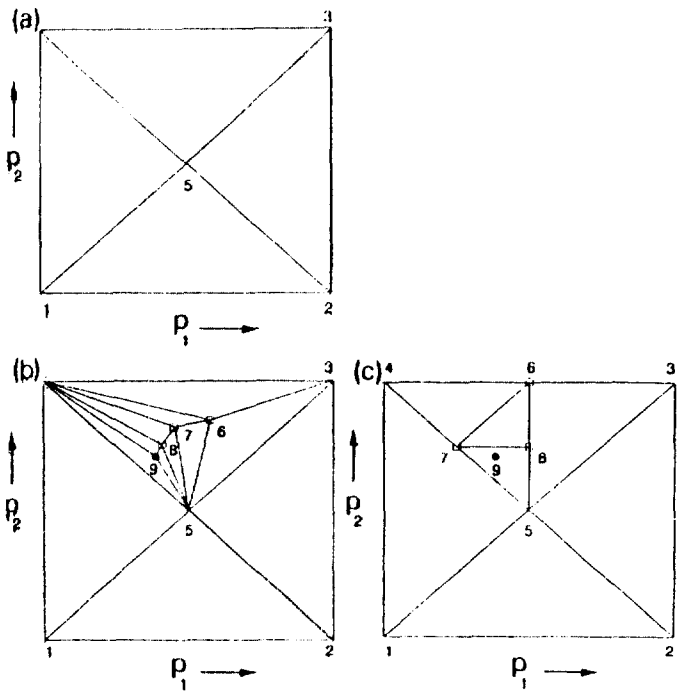

Fig. 1. Experimental design for a two-parameter optimization by means of the iterative regression strategy. (a) The initial experiments; (b) a possible set of consecutive experiments in the case of a direct measurement of the predicted optimum in combination with a retention behavior showing a strong curvature as a function of the parameters; (c) a possible set of consecutive experiments when the next measurement is chosen in the subspace containing the predicted optimum and is located as far from the other measurements as possible.

3차원의 Z축으로 표시할 때 응답 결과(response surface)라고 부른다.

최적화에 대한 궁극적인 목표는 최소의 측정실험을 수행하여 정확한 응답결과를 얻어내는 것이다.

강력한 최적화 처리를 위해서 반복회귀법에서는 초기의 실험횟수가 부과되는 파라미터수의 증가에 따라 증가하게 된다. 즉 1개 파라미터의 경우 2회, 2개 파라미터의 경우는 5회, 그리고 3개 파라미터는 15회의 초기실험이 최소한 요구된다.

Fig. 1(a)에서와 같이 1, 2, 3, 4, 5의 초기실험 조건의 위치를 나타내고 있고 이 선정된 파라미터에서 머무름현상(ln k')과 선형의 함수관계가 있을 때 최적화 위치에 도달이 용이하다. 컴퓨터는 삼각형의 세부 파라미터 범위를 154, 125, 235, 435로 찾아가면서 시료분자들의 측정자료를 이용하여 최적의 크로마토그램을 찾아 이동상의 조건과 머무름현상(ln k')을 예측해 준다. 이러한 방법으로 분리 정도를 비교하여 파라미터 전 범위에 대한 기준치, r값을 표시하며 응답결과에 대한 정보를 제공한다. 이것은 예측된 최적화 위치이며 이 응답결과를 계속 수정하기 위해서는 부가적인 실험의 측정이 세부적인 파라미터 범위에서 수행되어진다.

Fig. 1(b)에서 초기의 5개 실험을 수행한 후 6번째 실험은 원래 345삼각형을 346, 356, 456으로 더 세분화시킨다. 또, 삼각형 456에서 7번째 실험은 또 다른 세 개의 삼각형으로 세분화되어진다.

이 부가적인 실험은 더 세분된 범위에서 수행될 때 정확한 예측을 할 수 있게 된다. 이와 같이 예측된 최적화 조건에서 직접 측정한 결과가 잘 일치될 때 이 위치가 실제의 최적화 분리조건으로 결론짓게 된다. 측정실험의 파라미터 범위내에서 ln k'값과 선형관계가 유지될 때는 초기실험으로 최적화점의 결정이 가능하다. 그러나 *Fig.* 1(b)에 나타난 것처럼 선형의 관계가 벗어날 경우에는 최적화조건이 다른 위치로 나타날 것이고 그 과정은 측정과 예측의 결과가 일치될 때까지 반복되어 불필요한 실험 측정의 횟수를 증가시키는 결과가 된다.

이런 문제를 해결하기 위해서 초기의 많은 실험을 수행하는 모델을 선택하거나 *Fig.* 1(c)와 같은 방법으로 측정 조건과 먼 위치에 다음 실험 측정 조건을 선택하고 부가적인 실험 측정을 시도하면서 더 작은 삼각형의 최적화 위치로 접근해 가는 방법도 가능하다. 이와 같은 수행과정을 거쳐서 최적 조건을 구하는

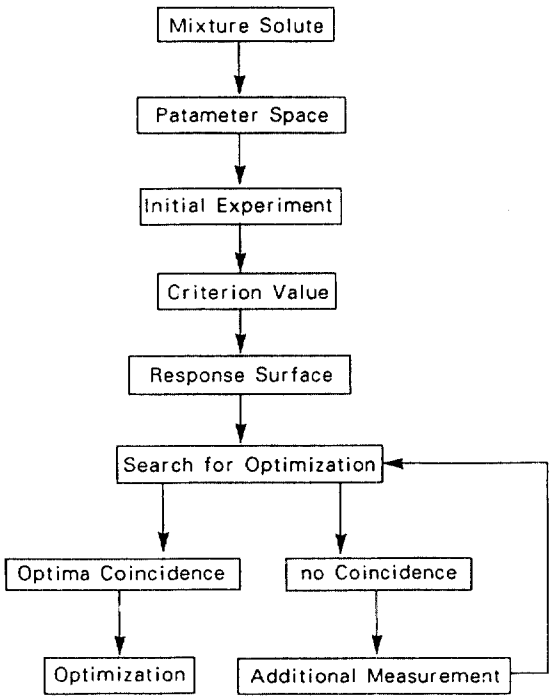

Fig. 2. Flow chart for the iterative regression optimization strategy.

optimization 수행과정에 대한 순서도를 *Fig.* 2에 나타내었으며, 최대기준치 r을 갖는 예측치의 최적화점을 얻고 실측한 결과와 비교하여 일치될 때까지 부과적인 실험을 계속 수행해 나간다.

3. 실 험

MLC에서 두 가지-파라미터의 최적화에 대한 사용과 관련 의미를 설명하기 위해서 15개 아미노산과 펩티드의 시료에 대한 머무름 현상을 유기 변형제(2-propanol)와 계면활성제(surfactant)의 농도를 함수로 실험을 수행했다.

본 연구에서 사용한 HPLC는 모델 2350 ISCO liquid chromatograph이고 분리관은 LichroCART C_{18} column(4mm I.D × 12.5cm L, particle size 5-μm)을 사용하였으며 모든 실험은 40℃로 항온 유지시켜서 유속 1ml/min(Vo=0.86ml)으로 수행하였다. Silica precolumn은 실제 분석 column을 보호하고 실리케이트로 이동상을 포화시켜 사용하였다.

시료와 계면활성제, SDS(sodium dodecyl sulfate)

는 Sigma사제이다.

계면활성제 용액은 2차증류수를 0.45μm nylon filter에 여과시킨 후 녹여 사용하였다. pH는 2.5로 phosphate 완충용액으로 고정시켜 사용했고 이온강도는 0.02M 범위내에서 조절했다.

유기변형제인 2-propanol(PrOH)을 필요한 양만큼 첨가한 후에 pH와 이온 강도를 조절했다.

조성이 다른 이동상에서 분리되는 정도를 평가하는 software는 반복 회귀 최적화의 적용방법에 사용하는 Version을 사용했으며[6] 이것은 Turbo-Pascal compiler version 5.5(Borland, Scotts Valley, CA)를 사용했다.

컴퓨터는 컬러모니터에 Graphic Adapter가 부착되고 1 Mbyte memory와 640k byte의 80287 coprocessor가 부착된 DeskPro 286(COMPAQ computer)을 사용했다.

4. 결과 및 고찰

Fig. 3은 *Table* 1에 표시된 15개의 아미노산과 펩티드 혼합물의 분리에 대한 파라미터 범위를 나타내고 있다. 2-Propanol과 계면활성제에 대한 농도 범위는

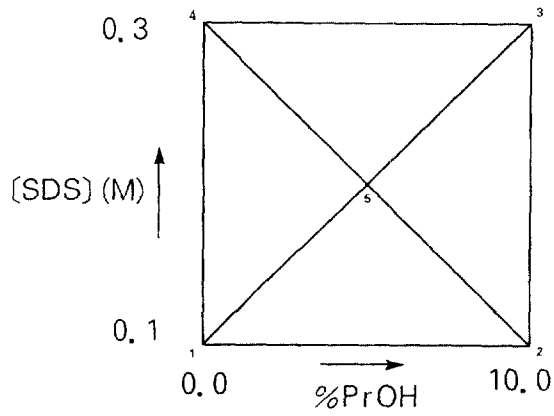

Fig. 3. Parameter space selected for the separation of the fifteen-component amino acid peptide mixture. [SDS] indicates the concentration of surfactant(M) and %PrOH is the percentage of 2-propanol organic modifier.

Table. 1. Concentration of the surfactant(SDS) and the percentage of 2-Propanol(PrOH) used in the chromatographic experiments regarding the mixture of fifteen amino acids and peptides, together with the identities and capacity factors(k') of the solutes.

Mobile Phase		Composition				
SDS(M)		0.1	0.1	0.3	0.3	0.2
PrOH(%)		0.0	10.0	10.0	0.0	5.0
Components		k'				
1. ser	(S)	1.87	1.22	0.56	0.73	0.59
2. Asp	(D)	2.06	1.06	0.49	0.73	0.53
3. Glu	(E)	2.56	1.22	0.52	0.96	0.62
4. Thr	(T)	3.46	1.43	0.63	1.13	0.68
5. Ala-Tyr	(AY)	4.46	2.72	0.98	1.32	1.49
6. Ala	(A)	5.73	2.31	0.83	1.97	1.34
7. Cysh	(C)	5.89	2.04	0.84	2.04	1.32
8. Pro	(P)	7.03	1.70	0.80	2.33	1.31
9. Cys	(C/2)	9.53	3.67	0.86	2.03	1.42
10. Val	(V)	13.06	4.20	1.62	4.11	2.99
11. Leu	(L)	19.30	8.20	2.65	6.22	5.19
12. Arg	(R)	22.20	12.87	2.72	5.35	5.43
13. Leu-Trp	(LW)	25.65	11.01	3.46	7.06	6.59
14. Lys-Phe	(KF)	30.90	25.70	5.47	8.01	9.80
15. Gly-Phe-Leu	(GFL)	40.17	18.70	5.16	11.42	10.35

크로마토그래피법의 물리적인 제한 사항을 고려하여 결정했다. 즉, 계면활성제의 최소 농도는 CMC(critical micelle concentration) 이상이며 모든 시료들의 머무름 시간을 고려하였고 미셀의 기울기 용리방법을

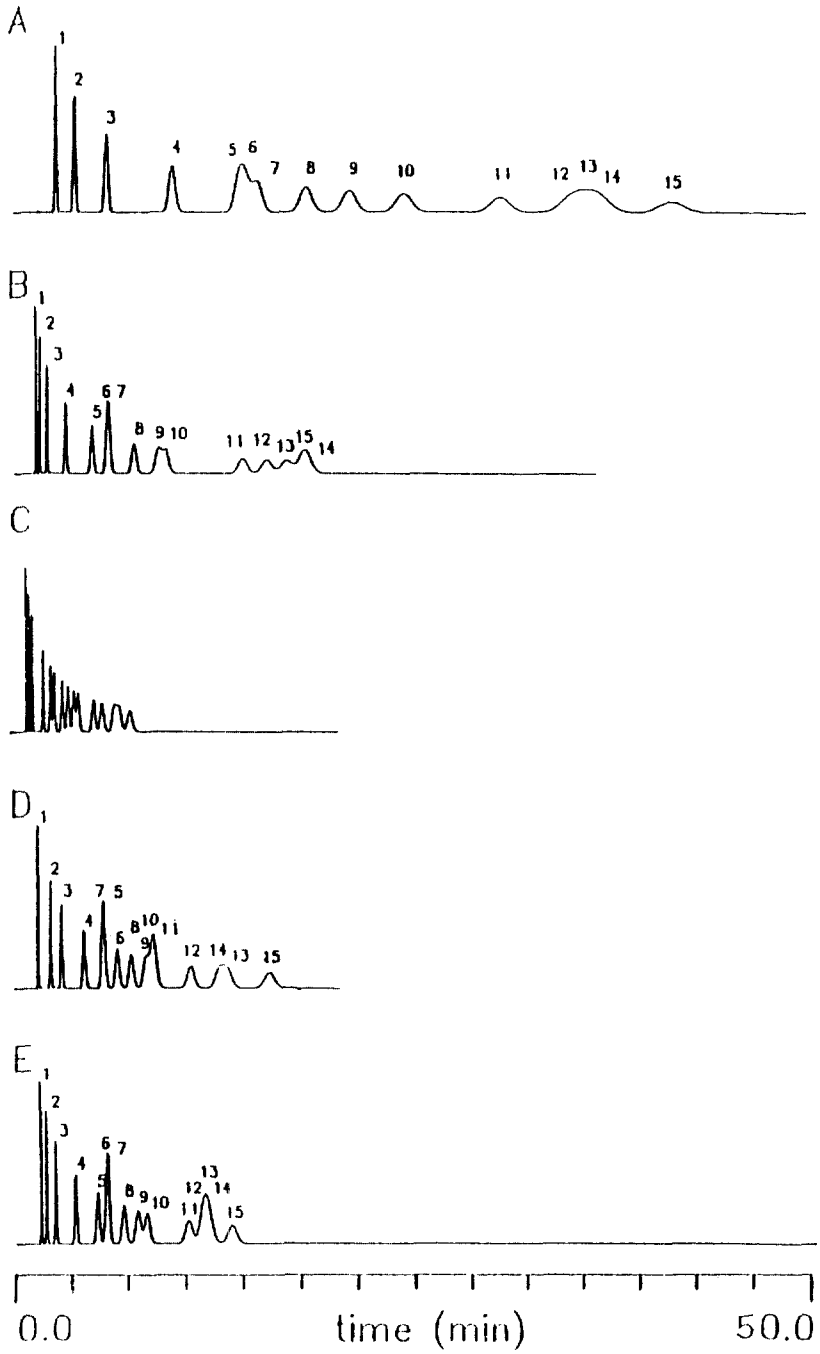

Fig. 4. Five simulated chromatograms using retention data of the fifteen compounds from Table 1 and assuming 2500 plates and equal areas for all components. The indentification numbers of the solutes refer to Table 1.

기초로 하여 농도를 정했다.[7] 한편, 최대 미셀농도는 이동상의 점도를 고려했고(펌프의 압력이 2000psi 이하) 모든 크기 인자(capacity factor, k')들은 1.0 이상의 범위이며 2-propanol의 최대농도는 머무름시간, 점도, 그리고 미셀과의 화합 등을 고려했다. 유기 변형제의 농도가 너무 높으면 미셀의 형성이나 미셀 자체가 분해되는 변화가 가능하다. 또 시료분자들이 약산성이므로 pH와 이온강도를 phosphate 완충용액으로 일정하게 고정하였다.

또한 5종류의 이동상 조성으로 측정한 머무름거동에 관한 크기인자(k')를 *Table* 1에 나타내었다.

그리고 *Fig.* 4는 초기조건에서 각 시료에 대한 크로마토그램을 나타낸 것이다. 여기서 *Fig.* 4(A)는 0.1M-SDS, *Fig.* 4(B)는 0.1M-SDS와 10% PrOH, *Fig.* 4(C)는 0.3M-SDS와 10% PrOH, *Fig.* 4(D)는 0.3M-SDS, 그리고 *Fig.* 4(E)는 0.2M-SDS와 5% PrOH에서의 크로마토그램들이다.

초기의 5개 실험조건으로 모든 혼합시료 분자들을 항상 잘 분리된 크로마토그램으로 만들 수는 없다. 여기서 분리의 정도를 구분하는 기준은 여러 가지 제안된 방법이 있으나 최소분리도(minimum resolution, $Rs_{min.}$)를 이용했다. 즉 크로마토그램에서 시료들 중에 인접한 한 쌍의 최저 분리도값을 기준치(criterion value, r)로 정하여 어떤 파라미터의 조건이 분리분석에 좋은지 구별하게 된다. 물론 최소분리도, Rs_{min}를 크로마토그램의 분리최적화에 적용할 경우에는 분석시간을 고려할 수 없는 단점이 있다. 이와 같이 실제 측정한 크로마토그램을 기초로 반복 회귀 최적화법의 프로그램은 모든 파라미터 범위내에서 크로마토그램을 예측하여 시뮬레이션하게 된다. 따라서 예측된 크로마토그래피에서 최소분리도, Rs_{min}값이 기준치로써 모든 파라미터 범위내에서 표시될 때 *Fig.* 5와 같은 응답결과(response surface)를 나타낼 수 있다. 이 등고선 모양에서 점선으로 나타낸 것은 각 파라미터 범위에서 같

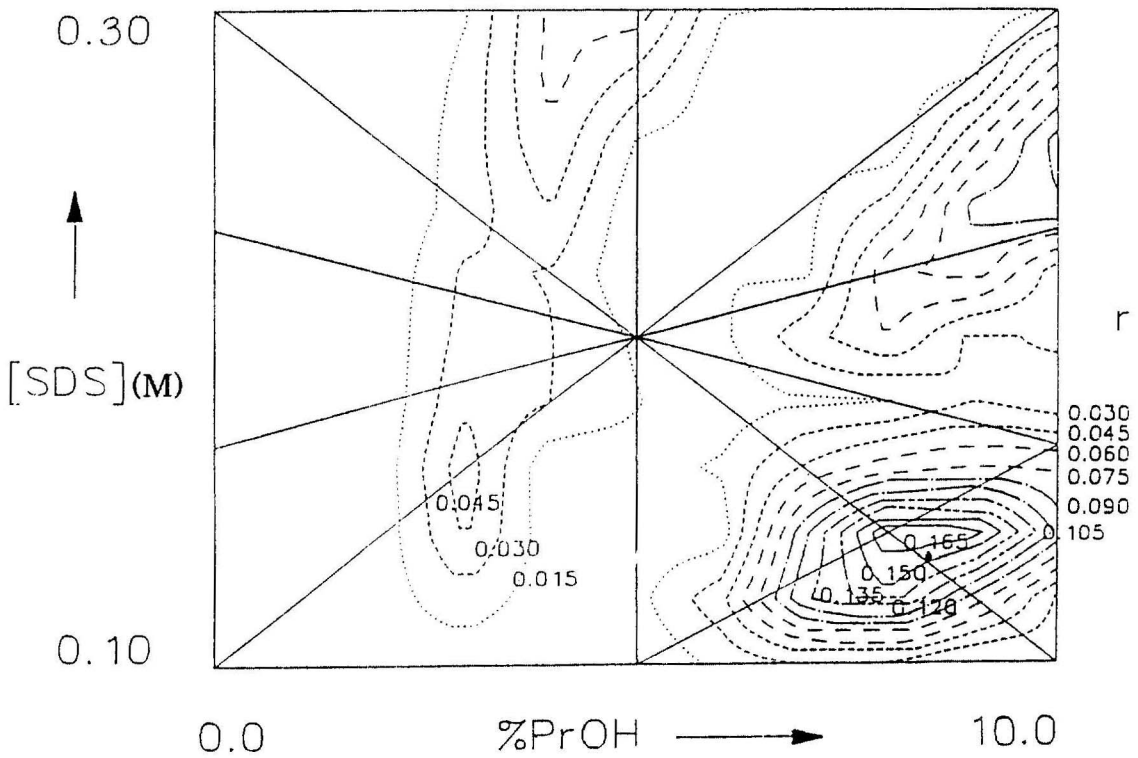

Fig. 5. A contour plot indicating the minimum resolution that will be observed in chromatograms of the fifteen-components mixture described in Table 1 when recorded at different mobile phase compositions.

은 기준치 r을 갖는 점을 연결하여 나타낸 것이며 (isoresponse surface), 그 결과로서 최적의 기준치 (optimization criterion value)를 0.13M-SDS와 8.0%-PrOH로 예측할 수 있었다.

이 파라미터의 조성으로부터 직접 측정한 크로마토그램과 컴퓨터가 시뮬레이션한 예측 크로마토그램을 *Fig.* 6(A). (B)에 나타내었다. 측정한 크로마토그램 (*Fig.* 6(B))은 예측한 크로마토그램(*Fig.* 6(A))에 비해 불순 피이크가 나타나 있고 피크 모양도 대칭성이 상당히 결여되어 있지만 두 크로마토그램은 대단히 유사하고 예측한 결과가 잘 일치하고 있다고 볼 수 있다. 이것은 모든 혼합시료들과 두 파라미터 범위 사이에 규칙적인 선형관계가 유지되고 있음을 나타내고 있으며, 이는 머무름 거동을 예측할 수 있음을 보여 주고 있다.

만약 최적의 위치에서 직접 측정한 크로마토그램이 잘 일치되지 않을 경우에는 *Fig.* 1(b)와 같이 새로운 위치의 최적화점을 찾기 위해 제 6, 7, 8 등의 부가적인 실험을 계속 수행해 나가야 한다. 앞에서 언급한 바와 같이 최적의 분리와 최소의 분석시간을 필요로 한다면 최소분리도, Rs_{min}로서 적용하는 것은 다소 부적합하며 이 문제를 해결하기 위해서는 여러 형태의 기준치가 제시된 바 있는[8] 다른 방법을 사용해야 할 것이다.

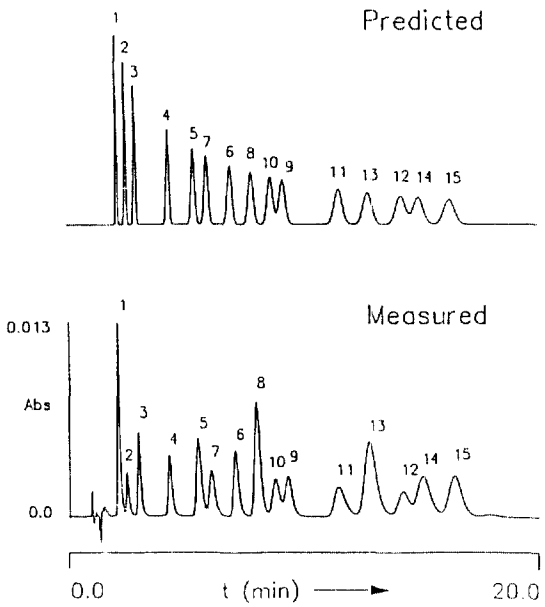

Fig. 6. Chromatograms of the fifteen component mixture at 0.13M-SDS and 8.0% 2-Propanol. (A) The chromatogram predicted on the basis of the linear retention model used in the optimization, assuming 4000 plates and equal areas for all components. (B) The measured chromatogram. The numbering refers to Table 1.

5. 결 론

미셀 액체 크로마토그래피는 용리 메카니즘의 특이성 때문에 반복 회귀 최적화법에 적용하는 것은 상당히 비효과적으로 알려져 있다. 그러나 유기 변형제인 2-propanol과 계면활성제인 SDS의 농도 변화가 머무름 현상에 많은 변화를 주지만 측정된 결과는 상당히 규칙적이고 반복 회귀 최적화법에서 요구하는 선형 모델에 잘 일치되었다.

따라서 초기의 매우 제한된 5종류의 파라미터 조건이지만 혼합시료의 머무름 거동을 예측할 수 있게 했고 선택된 파라미터 범위내에서 실제 측정 횟수를 줄이면서 최적의 분리조건을 찾을 수 있게 했다.

결과적으로 어떤 혼합 시료분자를 분리하려면 최적의 분리를 위한 파라미터의 종류와 그 범위를 결정해야 하며 chromatograph의 물리적인 특성과 컴퓨터가 분리 정도를 인지할 수 있는 기준치를 결정함으로써 최소의 측정 횟수와 짧은 분석시간의 결과를 얻도록 계획을 해야 할 것이다.

결국 본 연구는 미셀 액체 크로마토그래피에서 두 가지 파라미터를 이용하는 최적화 분리모델을 반복 회귀 최적화법으로 제시하였다. 앞으로 반복 회귀 최적화법을 효과적으로 적용시키기 위해서는 온도나 pH와 같은 파라미터를 더 첨가시켜 더 많은 파라미터를 이용한다면 더 다양하고 섬세한 분리와 더 정확한 머무름 거동을 예측할 수 있으리라 생각된다.

인용문헌

1. J. C. Berridge, Techniques for Automated Method Optimization of HPLC Separations, Wiley, Chichester, 1985.
2. P. J. Schoenmakers, Optimization of Chromatographic Selectivity-a Guide to Method Development,

Elsevier, Amsterdam, 1986.
3. L. R. Snyder, J. L. Glajch and J. J. Kirkland, Practical HPLC Method Development, Wiley, New York, 1988.
4. J. L. Glajch and L. R. Snyder, Computer-Assisted Method Development for High-Performance Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1990.
5. A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet, P. J. Schoenmakers and L. de Galan, *Chromatographia*, **16**, 48(1982).
6. A. C. J. H. Drouen, Ph. D. Thesis, Delft University of Technology. Delft, 1985.
7. L. S. Madamba-Tan, J. K. Strasters and M. G. Khaledi, *Anal. Chem.*, submitted for publication.
8. P. M. J. Coenegracht, A. K. Smilde, H. J. Metting and D. A. Doornbos, *J. Chromatogr.*, **485**, 195(1989).
9. D. W. Armstrong, T. J. Ward and Berthod, *Anal. Chem.*, **58**, 579(1986).
10. M. F. Borgerding, R. L. Wiliams, W. L. Hinze and F. H. Quinn, *J. Liq. Chromatogr.*, **12**, 1367(1989).