

내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸 관 및 기타 재질을 이용한 마이크로 컬럼의 제작과 그의 크로마토그래피 응용에 관한 연구 (II)

安賢珠 · 鄭元朝*

인하대학교 이과대학 화학과
(1995. 9. 25 접수)

Preparation of Microcolumns Made of Glass-Lined Stainless Steel Tubing or Other Materials and Their Chromatographic Application

Hyun Joo An and Won Jo Cheong*

Department of Chemistry, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received September 25, 1995)

요 약. 내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸관, 실리카로 코팅된 스테인레스 스틸관 및 보통 스테인레스 스틸관 등 여러 재질의 관에 C18(5 μ) 고정상을 충전시켜 길이 30 cm, 내경 1 mm 및 0.5 mm인 마이크로 컬럼들을 제작하고 그 성능을 비교 조사하였다. *p*-Nitroaniline과 *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine 및 ethylbenzene 등을 시험 용질로 사용하였다. 유리 또는 실리카로 코팅된 컬럼이 보통 스테인레스 스틸 컬럼보다 효율이 우수하며 컬럼내면이 거울같이 고와야 정지상 충전이 잘되는 것을 확인하였다. 유리로 코팅된 경우 내경 0.5 mm, 길이 30 cm인 컬럼에 대해서도 이론단수가 10,000을 상회하는 결과를 얻을 수 있었다.

ABSTRACT. We have prepared microcolumns made of stainless steel tubing, glass-lined stainless steel tubing, and silica-lined stainless steel tubing and examined their performances comparatively. The length of columns was fixed as 30 cm, and the I.D.'s, either 1 mm or 0.5 mm. Octadecyl bonded silica particles (5 μ) were used as the stationary phases. *p*-Nitroaniline, *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine, and ethylbenzene were used as the test solutes. The glass-lined or silica-lined stainless steel columns showed better performances than the plain stainless steel column did. The number of theoretical plates over 10,000 were obtained even for the 0.5 mm I.D. (30 cm long) column as long as the glass-lined stainless steel tubing was used.

서 론

70년대 말경부터 Scott와 Kucera,^{1,2} Tsuda와 Novotny,^{3,4,6} 그리고 Ishii와 공동연구자^{5,7} 등에 의해 선도되기 시작한 마이크로 컬럼 액체 크로마토그래피의 연구는 더욱더 그 기술이 다양화, 정교화하면서 지속적으로 수행되어 오고 있다.⁸⁻²⁰ 이에 맞추어 매우 작은 크기의 시료루프를 가진 고압 시료주입기와 매우 작은 흐름셀(flow cell)을 갖는 검출기, 신뢰도 높은 마이크로 펌프 및 소형 피팅류 등이 상업화되어 공급되고 있다.

마이크로 컬럼의 재질로는 실리카 모세관이 주로 사용되고 있다. 내경이 320 μ 이고 3~5 μ 크기의 정지상 분말로 채워진 실리카 컬럼을 비롯하여 내경 1 mm 미만의 다양한 규격의 충전된 실리카 컬럼들이 상업화되어 있다. 반면에 스테인레스 스틸관으로 만든 충전된 컬럼으로는 내경이 1 mm 미만인 것은 아직 상업화되어 있지 않다. 컬럼 내경이 작을 수록 컬럼 내면이 거울같이 고와야 좋은 충전이 가능하기 때문이며 내경 1 mm 미만의 마이크로 컬럼은 실리카 컬럼만이 상업화된 이유가 여기에 있다. 실리카 컬

림은 파손되기 쉬워서 취급이 어려운 단점이 있다. 본 연구팀은 선행연구에서 컬럼 효율도 우수하면서 견고하여 취급하기 쉬운 마이크로 컬럼으로서 유리로 내벽이 코팅된 스테인레스 스틸관으로 만든 충전컬럼의 제작을 시도하여 그 결과를 보고한 바 있다.²¹

본 연구에서는 보통 스테인레스 스틸관, 내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸관, 그리고 내벽이 실리카로 코팅된 스테인레스 스틸관 등 세 가지 재질로 충전 마이크로 컬럼을 만들어 각 컬럼들의 성능을 비교 연구하였다.

실 험

시약 및 용매. 용질로 쓴 시약 *p*-nitroaniline과 ethylbenzene은 Aldrich사(Milwaukee, USA) 일급 시약을 정제없이 사용하였으며 *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine은 직접 합성하여²² 사용하였다. 크로마토그래피 용매로는 Fisher사(Pittsburgh, USA)의 HPLC용 메탄올과 물을 필터로 한번 거른 후 정제없이 사용하였다. 내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸관, 내벽이 실리카로 코팅된 스테인레스 스틸관 및 보통 스테인레스 스틸관과 고정상 분말들은 Alltech사(Deerfield, USA)에서 구입하였다.

실험장치. 액체 크로마토그래피에 사용한 실험 장치는 마이크로 컬럼에 부합될 수 있는 각 부분장치들을 연결하여 구성하였다. 저속 유량을 주는 펌프는 Shimadzu(Tokyo, Japan) 10AD 펌프를 사용하고, 내부 루프의 부피가 0.5 μ L인 Rheodyne(Cotati, USA) 7520 injector와 부피가 0.12 μ L인 flow cell이 장착된 Isco(Lincoln, USA) CV4 detector를 사용하여 컬럼의 void volume을 최소화하는데 힘썼다. 시료주입기에서 컬럼, 또 컬럼에서 검출기로의 연결은 내경이 0.13 mm인 스테인레스 스틸관을 이용하였고, 길이도 전체적으로 15 cm에 불과하도록 조절하였다. 검출기 신호로부터 크로마토그램을 얻는 데는 영인 과학(서울, 대한민국)의 520B computing integrator를 사용하였다.

컬럼의 제작. 유리로 내벽이 코팅된 스테인레스 스틸관, 내벽이 실리카로 코팅된 스테인레스 스틸관 및 보통 스테인레스 스틸관을 이용하여 내경 1 mm와 0.5 mm인 두 가지 크기의 컬럼을 제작하였다. 길이는 30 cm로 통일하였다. 정지상은 5 μ 크기의

C18 실리카 분말 두 종류를(Lichrosorb RP18과 Adsorbosphere C18) 사용하였다. 각 정지상의 메탄올 슬러리를 만들고 Alltech사(Deerfield, USA) slurry packer를 사용하여 충전하였다. 정지상은 슬러리로 만들기 전에 90 $^{\circ}$ C 오븐에서 수시간 건조하였다. 메탄올 슬러리는 충전하기 전에 초음파 진동기로 20~30분간 처리하여 몽침을 방지하였다. 충전은 8,000 내지 10,000 psi의 압력을 사용하여 20분 내지 1시간 동안 지속하였고 충전하는 동안 진동기로 reservoir 및 컬럼 부위를 계속 진동시켜 주었다. 컬럼 양쪽에는 정지상을 지지하기 위하여 유니온을 연결하고 프릿을 장착하였다. 우선 컬럼의 출구쪽에만 프릿을 장착하여 충전하고 충전을 마친 뒤 압력이 상압으로 돌아온 후에 입구쪽 유니온에도 프릿을 장착하고 튜빙과 핏팅으로 프릿을 제 자리에 고정하였다.²¹ 정지상 슬러리 충전 장치를 Fig. 1에 도시하였다. 프릿은 세 가지 종류를 시도하였다.²¹ 직경 1.6 mm, 두께 0.8 mm인 스테인레스 스틸 프릿, 얇은 테프론 프릿, 그리고 유니온의 작은 구멍(내경 0.25 mm) 사이로 채워 넣은 유리섬유 프릿 등이다. 이 중에서 스테인레스 스틸 프릿은 틈새 부피 효과 때문에 내경 1 mm인 컬럼에만 사용하였다.²¹ 내경 0.5 mm인 컬럼에 대해서는 테프론 프릿만을 사용하였다.

컬럼효율 실험. 이렇게 제작한 컬럼들의 효율을 조사하기 위하여 *p*-nitroaniline, *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine 및 ethylbenzene 등 세 용질을 메탄올에 녹여 시료용액을 만들었다. 이들은 극성도와 머무름시간이 적절히 분포되는 용질들로서 선택된 것이다. 용매는 90/10(vol%) 메탄올/물 혼합용매를 사용하였고 용매 유속은 0.001~0.15 mL/min의 범위에서 적절히 조절하여 여러 유속에서 각 용질들의 머무름 시간(t_r)과 봉우리의 반높이 띠너비($w_{1/2}$)를 측정하였다. 각 용질들에 대한 컬럼 이론단수(N)는 다음 식으로 계산하였다.

$$N = 5.54(t_r/w_{1/2})^2 \quad (1)$$

이론당 해당높이 H (HETP, Height Equivalent to Theoretical Plate)는 다음 식으로 계산하였다.

$$H = L/N \quad (2)$$

식 (2)에서 L 은 컬럼의 길이이다.

결과 및 고찰

p-Nitroaniline과 *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine 및 ethylbenzene 세 용질로 이루어진 시료를 이용하여 컬럼의 내경 및 관의 재질의 차이에 따른 컬럼효율의 변화를 조사하여 Table 1에 요약적으로 비교하였다. 일반적으로 내경이 1 mm인 경우의 컬럼효율이 내경 0.5 mm인 경우의 그것들보다 우수한 경향을 보였는데 이것은 연결 튜빙 등에 의해 피할 수 없이 존재하는 틈새부피(void volume)의 컬럼내 빈 공간에 대한 상대적 비율이 내경 0.5 mm인 경우에 훨씬 더 크기 때문이다.

용매의 유속을 0.003~0.150 mL/min의 범위에서 변화시키면서 *p*-Nitroaniline과 *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine 및 ethylbenzene의 머무름 시간과 반높이 봉우리 떠나비를 측정하고 이론 단수 및 이론단 해당높이를 계산하였다. Fig. 2~4에 내경 1 mm인 컬럼들에 대해서 이론단 해당높이 대 용매 유속의 관계 그래프(Van Deemter Plot)를 도시하였다. 최적유속은 0.008 mL/min 부근이다. 세 용질에서 뚜렷한 최소 *H*값을 보인다. Table 1과 Fig. 2~4를 관찰하면 내경 1 mm인 경우에는 내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸 컬럼의 효율이 보통 스테인레스 스틸 컬럼보다 두드러지게 우수하지는 않음을 알 수 있다. 이것은 내경 0.5 mm인 경우에 내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸 컬럼이 다른 컬럼들보다 눈에 띄게 우수하다는 것과 뚜렷이 대조되는

현상이다. 여기서 우리는 보통 스테인레스 스틸관을 사용하여 만든 컬럼이라도 내경 1 mm인 경우와 내경 0.5 mm 경우에는 차이점이 있음을 언급해야 하겠다. 내경 1 mm인 경우에는 소위 "mirror-finish" 처리가 된 관을 구입하여 사용하였다. 관 내면을 잘 갈아서 거울처럼 곱게 만든 것이다. 반면 내경 0.5 mm인 경우에는 그런 처리가 기술적으로 어렵기 때문에 그

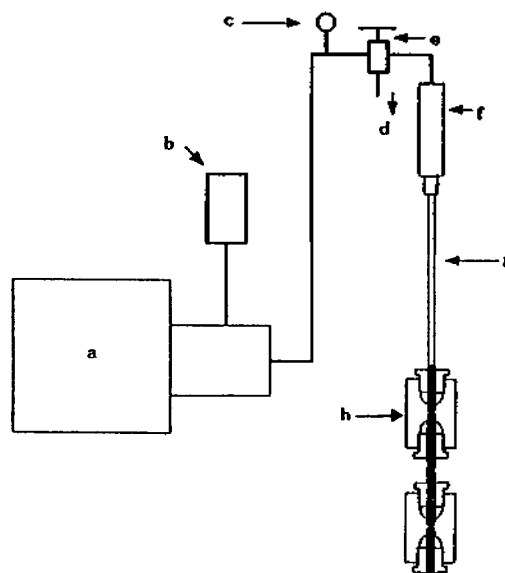


Fig. 1. Slurry packing apparatus. ^aHigh pressure pump. ^bSolvent reservoir. ^cGauge. ^dWaste. ^eValve. ^fSlurry reservoir. ^gConnecting tubing. ^hUnion attached microcolumn.

Table 1. Comparison of column efficiencies among various columns of different stationary phases, I.D.'s and frit techniques^a

Kinds of column	I.D. of column (mm)	Stationary phase	Frits	Number of theoretical plates		
				<i>p</i> -Nitroaniline	DNT ^c	Ethylbenzene
Glass-lined SS ^b	1	Lichrosorb RP 18	2 glass wool frits	10403	11893	10920
		Adsorbosphere	2 stainless steel frits	9313	11538	12928
Glass-lined SS ^b	0.5	Adsorbosphere	2 Teflon frits	10640	12240	10030
Stainless Steel	1 ^d	Adsorbosphere	2 Stainless steel frits ^e	9541	11720	10970
Stainless Steel	0.5	Adsorbosphere	2 Teflon frits	8235	8175	8392
Silica-lined SS ^b	0.5	Adsorbosphere	2 Teflon frits	8885	9120	9770

^a90/10 (vol%) Methanol/Water was used as the eluent. Flow rate of 0.008 mL/min was used for 1 mm I.D. columns, and 0.001 mL/min, for 0.5 mm I.D. columns (0.003 mL/min for silica-lined stainless steel column). ^bStainless steel. ^c*N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine. ^dSpecially treated "mirror-finish" tubing from Alltech Associates whose inside surface is made mirror-like. ^eSpecially designed frits from Alltech Associates. Each frit is composed of a hard polymer disc and a small stainless steel frit area incorporated in the center of the disc.

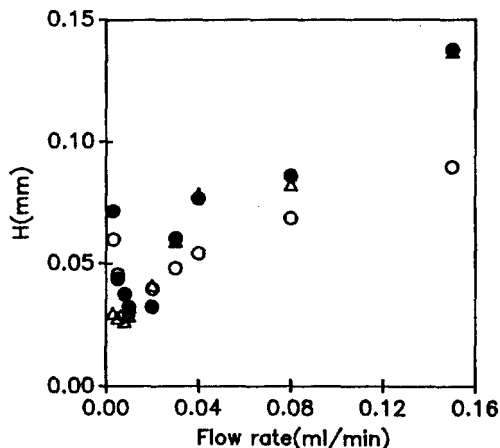


Fig. 2. The plot of HETP vs. flow rate of the eluent for *p*-nitroaniline. I.D. of column: 1 mm. Glass-lined stainless steel adsorbosphere C18 column (2 stainless steel frits): closed circle. Glass-lined stainless steel lichrosorb RP18 column (2 glass wool frits): open circle. Stainless steel adsorbosphere C18 column: triangle.

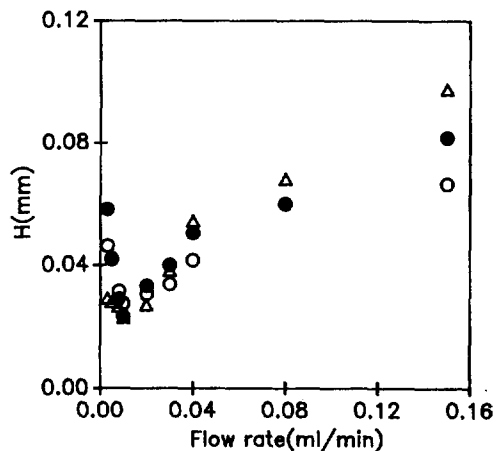


Fig. 4. The plot of HETP vs. flow rate of the eluent for ethylbenzene. I.D. of column: 1 mm. Glass-lined stainless steel adsorbosphere C18 column (2 stainless steel frits): closed circle. Glass-lined stainless steel lichrosorb RP18 column (2 glass wool frits): open circle. Stainless steel adsorbosphere C18 column: triangle.

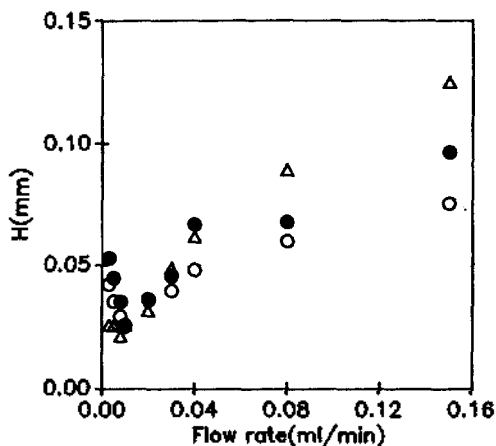


Fig. 3. The plot of HETP vs. flow rate of the eluent for *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine. I.D. of column: 1 mm. Glass-lined stainless steel adsorbosphere C18 column (2 stainless steel frits): closed circle. Glass-lined stainless steel lichrosorb RP18 column (2 glass wool frits): open circle. Stainless steel adsorbosphere C18 column: triangle.

같은 관을 구하지 못하고 평범한 스테인레스 스틸 관을 사용하였다. 내경 1mm 컬럼의 경우에 사용한 스테인레스 스틸 프리트에도 두 가지 종류가 있다. "mirror-finish"관의 경우에는 컬럼 끝 핏팅(Column

End fitting)에 동반공급된 특수 프리트를 사용하였다. 이 프리트는 지름 3.2mm인 단단한 고분자 원판 가운데에 지름 0.4mm 정도인 스테인레스 스틸 프리트 판이 박힌 구조로서 프리트 기능은 중앙의 스테인레스 스틸 프리트 판이 담당하고 주위 고분자 판은 관을 유니온에 꼭 맞게 고정하는 역할을 하도록 되어 있다. 반면 내면이 유리 코팅된 스테인레스 스틸 관에는 지름 1.6mm인 스테인레스 스틸 프리트나 유리섬유 프리트를 사용하였는데, 위에 언급한 "mirror-finish"관용 특수 프리트의 틈새부피는 유리섬유 프리트의 그것과 대강 비슷하다. 따라서 "mirror-finish"관과 특수 프리트를 갖춘 컬럼 끝 핏팅으로 만든 컬럼은 유리 코팅된 관과 유리섬유 프리트를 사용하여 만든 컬럼에 필적하는 성능을 보여준다. Fig. 2~4를 관찰하면 용리액이 고속일 때는 유리 코팅 컬럼이 우수하고 용리액이 저속일 때는 "mirror-finish" 컬럼이 우수한 면모를 보이며 최적 유속에서는 거의 비슷한 성능을 보인다. 이것은 상업적으로 한 세트에 공급되는 컬럼 끝 핏팅(특수 프리트 포함)을 사용하는 것이 실험실에서 유니온 및 유리섬유 프리트 등으로 컬럼 끝 핏팅을 짜맞추는 것보다 연결상 발생하는 틈새부피의 크기를 더 효과적으로 제한할 수 있음을 보여준다. 용리액이 저속일 때는 틈새부피의 존재가

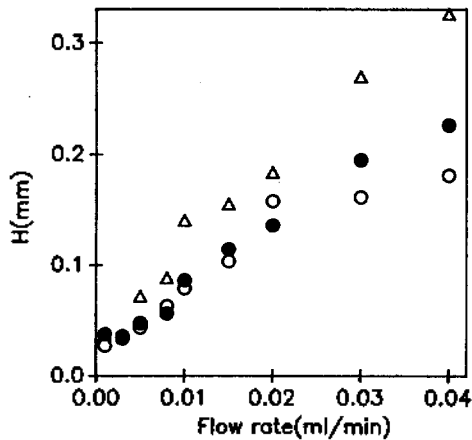


Fig. 5. The plot of HETP vs. flow rate of the eluent for *p*-nitroaniline. I.D. of column: 0.5 mm. Stationary phase: Adsorbosphere C18. Glass-lined stainless steel column: open circle. Stainless steel column: triangle. Silica-lined stainless steel column: closed circle.

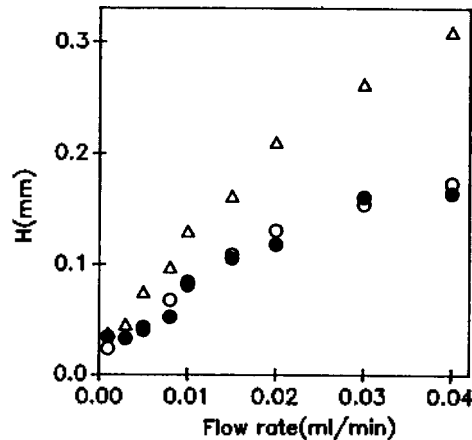


Fig. 6. The plot of HETP vs. flow rate of the eluent for *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine. I.D. of column: 0.5 mm. Stationary phase: Adsorbosphere C18. Glass-lined stainless steel column: open circle. Stainless steel column: triangle. Silica-lined stainless steel column: closed circle.

컬럼의 성능에 큰 영향을 미치는 반면, 고속에서는 컬럼 충전상태의 중요성이 상대적으로 커진다. 따라서 컬럼 충전상태는 유리코팅 컬럼이 "mirror-finish" 컬럼보다 다소 우수하다고 사료된다. 이 논문에서 자료는 수록하지 않았지만 평범한 스테인레스 스틸관과 유리섬유 프린트로 만든 내경 1 mm 컬럼의 효율은 유리 코팅컬럼 및 "mirror-finish" 컬럼보다 상당히 열등한 것도 관찰하였다.

이번에는 테프론 프린트를 장착한 내경이 0.5 mm인 컬럼들을 이용하여 용매의 유속을 0.001~0.04 mL/min의 범위에서 변화시키면서 세 용질의 이론 단수 및 이론단 해당높이의 변화 경향을 조사하였다. 내경 0.5 mm인 경우에는 "mirror-finish" 관도 구할 수 없을 뿐더러 유사한 특수 프린트도 구할 수 없었으므로 테프론 프린트를 사용하였다. Fig. 5~7에 이론단 해당높이 대 용매 유속의 관계 그래프를 도시하였다. 그림에서 보듯이 실리카 컬럼에서만 극소점을 보이며 최적 유속은 0.003 mL/min이다. 다른 컬럼들의 경우는 극소점이 확실히 드러나지 않고 개략적으로 유속의 증가에 따라 H가 단순 증가하는 듯한 경향을 보이며 최소 값은 가장 작은 유속인 0.001 mL/min일 때 얻어졌다. 내경 1 mm인 경우와 비교하여 극소치의 관찰이 어려운 것은 아마도 틱새부피가 거의 없는 테프론막 프린트를 사용함으로써 저속에서 그

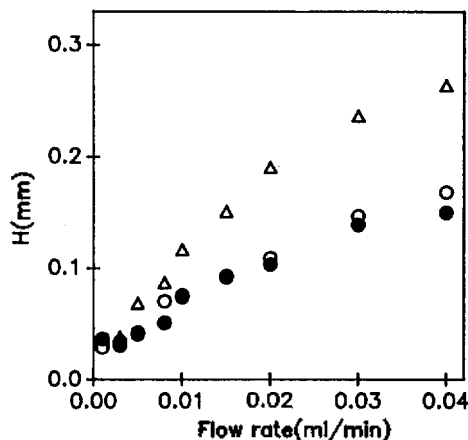


Fig. 7. The plot of HETP vs. flow rate of the eluent for ethylbenzene. I. D. of column: 0.5 mm. Stationary phase: Adsorbosphere C18. Glass-lined stainless steel column: open circle. Stainless steel column: triangle. Silica-lined stainless steel column: closed circle.

영향이 크게 나타나는 프린트의 틱새부피 효과가 제거되었기 때문으로 사료된다. 내경이 0.5 mm인 컬럼에서 눈에 띄는 점은 이론단수가 11,000에 가까운 컬럼 효율을 보이는 것은 내벽이 유리코팅된 스테인레스 스틸 컬럼 뿐인 것이다. Fig. 5~7을 살펴보면 유리 코팅 컬럼의 성능이 가장 우수하며 실리카

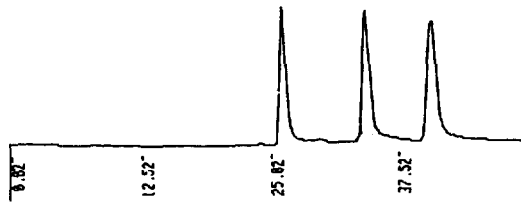


Fig. 8. The chromatogram of *p*-nitroaniline, *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine and ethyl benzene eluted through the 0.5 mm I.D., Glass-lined stainless steel column. Eluent: 90/10 (vol%) methanol/water. Flow rate: 0.001 mL/min.

코팅 컬럼도 그 성능이 유리 코팅 컬럼과 유사한 반면, 보통 스테인레스 스틸 컬럼은 그 성능이 상당히 떨어지는 것을 알 수 있다. Fig. 8에 내경이 0.5 mm인 유리코팅 스테인레스 스틸 컬럼에 대해서 최적 유속에서의 크로마토그램을 도시하였다.

요약하면 유리로 내벽이 코팅된 스테인레스 스틸관, 내벽이 실리카로 코팅된 스테인레스 스틸관 및 보통 스테인레스 스틸관을 이용하여 제조한 컬럼을 사용할 경우 내경이 1 mm인 경우에는 10,000을 상회하는 이론단수를, 내경이 0.5 mm인 경우에는 9,000 정도의 이론단수를 얻을 수 있으며 특히 내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸 컬럼에서는 내경이 0.5 mm인 경우에도 10,000을 상회하는 이론단수를 얻었다. 선행연구에²¹ 비하여 컬럼충전이 다소 개선되어 내경이 0.5 mm인 컬럼에 대해서도 10,000 이상의 이론단수를 얻을 수 있었으며 내경이 작을수록 유리 또는 실리카로 내벽을 입힌 컬럼이 정지상 충전 효율면에서 보통 스테인레스 스틸 컬럼보다 유리하다는 것을 알 수 있었다.

결 론

내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸관, 내벽이 실리카로 코팅된 스테인레스 스틸관 및 보통 스테인레스 스틸관을 이용하여 내경 1 mm와 0.5 mm인 마이크로 컬럼을 제조하여 그 성능을 비교 조사하여 보았다. 내벽이 유리 또는 실리카로 코팅된 스테인레스 스틸 컬럼이 보통 스테인레스 스틸 컬럼에 비해 효율이 우수한 것으로 나타났다.

본 연구는 과학재단의 1995년 핵심전문 연구지원

비 및 1995년 인하대학교 교내연구비에 의하여 지원되었음

인 용 문 헌

1. Scott, R. P. W.; Kucera, P. J. *J. Chromatogr.* **1976**, *125*, 251.
2. Scott, R. P. W.; Kucera, P. J. *J. Chromatogr.* **1978**, *169*, 51.
3. Tsuda, T.; Novotny, M. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 271.
4. Tsuda, T.; Novotny, M. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 632.
5. Ishii, D.; Asai, K.; Hibi, K.; Jonokuchi, T.; Nagaya, M. *J. Chromatogr.* **1977**, *144*, 157.
6. Tsuda, T.; Hibi, K.; Nakanishi, T.; Takeuchi, T.; Ishii, D. *J. Chromatogr.* **1978**, *158*, 227.
7. Ishii, D.; Tsuda, T.; Takeuchi, T. *J. Chromatogr.* **1979**, *185*, 73.
8. Kucera, P. *Microcolumn High Performance Liquid Chromatography*, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1984.
9. Novotny, M.; Ishii, D. *Microcolumn Separations*, Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1985.
10. Scott, R. P. W. *Small Bore Liquid Chromatography Columns*, Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1984.
11. Novotny, M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 500A.
12. Harvey, M. C.; Sterns, S. D. *J. Chromatogr.* **1983**, *21*, 473.
13. Borra, C.; Han, S. M.; Novotny, M. *J. Chromatogr.* **1987**, *385*, 75.
14. Novotny, M.; Alasabdro, M.; Konishi, M. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 2375.
15. Kennedy, R. T.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1128.
16. Grescentini, G.; Bruner, F.; Mangani, P.; Yafeng, G. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1659.
17. Karlsson, K. E.; Novotny, M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1662.
18. Bauer, H. *Chromatographia* **1989**, *28*, 289.
19. Banks, J. F.; Novotny, M. *J. Microcolumn Sep.* **1990**, *2*, 84.
20. Berry, V.; Van Rossum, P.; Pretorius, V. J. *Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*, 391.
21. Cheong, W. J.; Cha, K. W.; Choi, J. D. *J. Korean Chem. Soc.* **1995**, *39*, 471.
22. Cheong, W. J.; Chun, S. H.; Lee, G. Y. *J. Liq. Chromatogr.* in press.