

이론단수 20,000에 이르는 내벽이 유리로 코팅된 마이크로 스테인레스 스틸 컬럼

安賢珠 · 鄭元朝*

인하대학교 이과대학 화학과

(1996. 3. 14 접수)

A Glass-Lined Stainless Steel Microcolumn Having a Number of Theoretical Plates of 20,000

Hyun Joo An and Won Jo Cheong*

Department of Chemistry, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received March 14, 1996)

본 연구실에서는 내벽이 유리로 코팅된 마이크로 스테인레스 스틸관으로 만든 충전된 마이크로 컬럼의 제작과 응용에 관한 연구를 해오고 있다.^{1,2} 마이크로 컬럼 액체 크로마토그래피는 최근 급격한 발전을 이루고 있는 소형화 분리분석 기술들 중의 하나이다. 마이크로 컬럼 액체 크로마토그래피에 의한 분석에서는 용매소모의 감소, 분리능 및 감도의 증가 등의 장점이 있다.

기존의 실리카 모세관으로 만든 충전된 마이크로 컬럼³⁻⁷은 컬럼 효율은 우수하지만 파손되기 쉬워서 취급이 어려운 단점이 있는 반면 내벽이 유리로 코팅된 스테인레스 스틸관으로 만든 본 연구실의 마이크로 컬럼은 견고하기 때문에 취급이 쉬운 장점이 있다. 아직 컬럼 효율이 만족할 만한 수준은 아니지만 이론단수 10,000 정도는 쉽게 얻은 바 있으며 본 연구에서는 20,000에 이르게 개선되었다.

마이크로 컬럼의 효율에 영향을 미치는 요인으로서는 컬럼의 틈새부피(void volume)의 존재와 컬럼의 충전상태 등이 있다. 컬럼의 틈새부피 감소는 액체 크로마토그래피 시스템 각 부분간의 정교한 연결을 필요로 하는 기술적인 어려움이 있으며 이에 대한 개선연구는 지속적으로 진행중이다. 컬럼 충전기술 면에서 슬러리 제조 및 압력 조절방법 등 다양하게 여러 가지 방법을 시도하여 최적 조건을 찾음으로써 좋은 컬럼을 얻을 수 있다.

이 연구에서는 슬러리 충전에 있어서 슬러리 저장조(reservoir)의 용량을 최소한의 크기로 제한하고 단시간내에 고압하에서 충전하여 효율이 훨씬 우수한 컬럼을 만들 수 있었다.

실 험

시약 및 용매. 용질로 쓴 시약 *p*-nitroaniline과 propylbenzene은 Aldrich사(Milwaukee, USA) 일급 시약을 정제없이 사용하였으며 *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine은 직접 합성하여⁸ 사용하였다. 크로마토그래피 용매로는 Fisher사(Pittsburgh, USA)의 HPLC용 메탄올과 물을 한번 필터로 거른 후 정제 없이 사용하였다.

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 흐름셀(flow cell)이 장착된 Isco(Lincoln, USA) CV4 detector를 사용하여 컬럼의 틈새부피를 최소화하였다. 시료주입기에서 컬럼, 또 컬럼에서 검출기로의 연결은 내경이 0.13 mm인 스테인레스 스틸관을 이용하였고, 길이도 전체적으로 15 cm에 불과하도록 조절하였다.

검출기 신호로부터 크로마토그램을 얻는데는 영인 과학(서울, 대한민국)의 520B computing integrator를 사용하였다.

컬럼의 제작. 유리로 내벽이 코팅된 스테인레스 스틸관을 이용하여 내경이 0.5 mm, 길이가 30 cm인 컬럼을 제작하였다. 정지상은 5 μ 크기의 C18 실리카 분말인 Lichrosorb RP18을 사용하였다. 정지상의 메탄올 슬러리를 만들고 Alltech사(Deerfield, USA) slurry packer를 사용하여 충전하였다.² 정지상은 슬러리로 만들기 전에 90 $^{\circ}$ C 오븐에서 수시간 건조하였다. 슬러리 저장조의 용량인 1.2 mL를 취한 메탄올 슬러리는 충전하기 전에 초음파 진동기로 20~30분간 처리하여 뭉침을 방지하였다. 충전은 10,000 psi의 압력을 사용하여 10~15분 동안 지속하였고 충전하는 동안 진동기로 저장조 및 컬럼 부위를 계속 진동시켜 주었다. 컬럼 출구쪽에는 정지상을 지지하기 위하여 유니온을 연결하고 프릿을 장착하였다. 프릿은 유니온의 작은 구멍(내경 0.25 mm) 사이로 채워 넣은 유리섬유 프릿을 사용하였다.

컬럼효율 실험. 이렇게 제작한 컬럼들의 효율을 조사하기 위하여 *p*-Nitroaniline, *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine 및 propylbenzene 등 세 용질을 메탄올에 녹여 시료용액을 만들었다. 이들은 극성도와 머무름시간이 적절히 분포되는 용질들로서 선택

된 것이다. 용매는 90/10(vol%) 메탄올/물 혼합용매를 사용하였고 용매 유속은 0.001~0.03 mL/min의 범위에서 적절히 조절하여 여러 유속에서 각 용질들의 머무름 시간(t_r)과 봉우리의 반높이 띠나비($w_{1/2}$)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 propylbenzene 세 용질로 이루어진 시료에 대한 컬럼 이론단수를 구하여 Table 1에 요약했다. Fig. 1에 이론당 해당높이 대 용매 유속의 관계 그래프(Van Deemter Plot)를 도시하였다. 최적유속은 0.002 mL/min 부근이며 세 용질에서 뚜렷한 최소 H 값을 보인다. 최적유속에서 이론단수 20,000 정도의 컬럼효율이 얻어졌으며 이는 반복적으로 제작된 여

Table 1. The number of theoretical plates vs. flow rate of the eluent for *p*-nitroaniline, *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine and propylbenzene^a

Flow rate (mL/min)	Number of theoretical plates		
	<i>p</i> -nitroaniline	<i>N,N</i> -dimethyl- <i>o</i> -nitro- <i>p</i> -toluidine	propylbenzene
0.001	12300 \pm 850	14600 \pm 140	9400 \pm 70
0.002	17500 \pm 750	20000 \pm 950	21900 \pm 940
0.003	13000 \pm 840	15400 \pm 310	19000 \pm 680
0.005	10000 \pm 10	14900 \pm 170	18100 \pm 680
0.008	8000 \pm 480	11300 \pm 380	17100 \pm 590
0.010	7200 \pm 210	10300 \pm 580	14600 \pm 820
0.015	5400 \pm 420	7400 \pm 410	11600 \pm 550
0.020	4000 \pm 340	6100 \pm 110	9900 \pm 90
0.030	2600 \pm 360	3600 \pm 80	6400 \pm 290

^aAverages and standard deviations of three measurements are given.

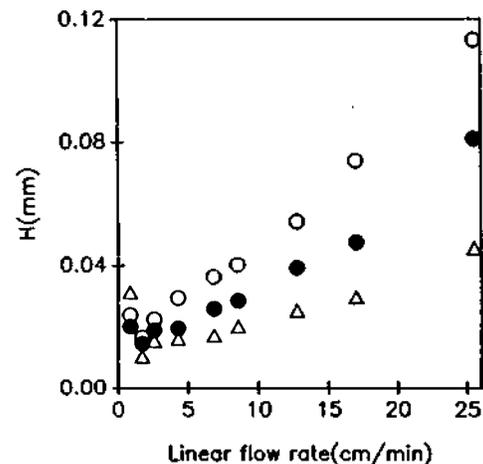


Fig. 1. The Plot of HETP vs. linear flow velocity of the eluent for *p*-nitroaniline (open circle), *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine (closed circle) and propylbenzene (triangle). The used column was the 0.5 mm I.D., 30 cm, Lichrosorb RP18 column with glass wool frit.

러 컬럼에 대해서 재현성 있게 얻어졌다. 본 연구팀은 선행 연구에서 같은 재질의 관에 같은 정지상을 이용하여 만든 컬럼의 효율을 보고한 적이 있다. 이번에 제작한 컬럼의 이론단수는 앞서 제작한 컬럼 이론단수의 2배에 해당하는 값을 나타내었다. 이렇게 파격적인 효율변화를 보이는 것은 충전기술의 개선에 기인한다고 할 수 있겠다. 슬러리 저장조의 용량을 1.2 mL로 제한하고 10,000 psi 정도의 고압을 가하여 빠른 속도로 정지상 분말을 컬럼에 충전함으로써 고밀도 충전을 할 수 있었다. 또한 충전하는 동안에도 진동기로 컬럼부위를 계속 진동시켜 정지상의 뭉침을 최소화하도록 했다. 슬러리의 양이 적으므로 충전시간도 10~15분 정도로 단축할 수 있었다.

요약하면 용량이 1.2 mL인 슬러리 저장조를 이용하여 제조한 컬럼을 사용하여 20,000에 이르는 이론단수를 얻을 수 있음을 알았다. 최적유속에서 얻은 세 용질의 크로마토그램을 Fig. 2에 실었다. 내경 4.6 mm, 길이 30 cm인 기존의 컬럼 중 가장 뛰어난 것이 이론단수 20,000~30,000 정도의 컬럼 효율을 나타내는 것에 비추어 보면 우수한 마이크로 컬럼이 제조되었다고 할 수 있겠다.

반면 충전된 실리카 컬럼^{5,7}으로는 100,000 이상의 이론단수를 얻을 수 있다는 문헌 보고와 비교하면 아직도 미흡한 수준이라고 보겠다. 그러나 이론단수 100,000의 수준은 시료루프의 크기가 0.06 μ L인 시료주입기와 실험실에서 직접 제작한 초소형 셀을 내장한 특수 검출기를 사용하고 실리카 컬럼의 출구 끝을 그대로 optical window로 활용함으로써 이루어낸 것으로서 이러한 시스템은 범용분석에 쓰일 수 있는 실용적인 것이 못된다. 실제로 일반적인 마이크로 검출기에 편리하게 연결되어 쓸 수 있도록 제작된 상업화된 실리카 컬럼(30 cm)으로는 고작 2~4만 정도의 이론단수를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다.

우리의 마이크로 컬럼도 상업화된 실리카 컬럼 정도의 효율은 얻을 수 있다고 본다. 첫째 개선 대상은 프리트 및 핏팅 연결 기술이다. 본 연구에서는 유리섬유 프리트를 사용하였다. 선행연구에서¹² 테프론 막 프리트가 유리섬유 프리트보다 컬럼효율면에서 우수하다는 것을 보인 바 있다. Van Deemter Plot(Fig. 1)에서 유속의 감소에 따라 이론단 해당 높이가 단순

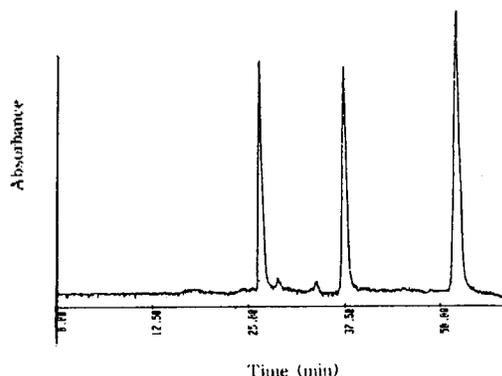


Fig. 2. The Chromatogram of *p*-nitroaniline, *N,N*-dimethyl-*o*-nitro-*p*-toluidine and propyl benzene eluted through the 0.5 mm I.D., 30 cm, Lichrosorb RP18 column with glass wool frit. Eluent: 90/10(vol%) methanol/water. Flow rate: 0.002 mL/min.

감소하지 않고 극소치가 나타난 후 더 저속에서 다시 증가하는 것은 유리섬유 프리트의 틈새부피 효과로 보여진다.¹² 이 연구에서 유리섬유 프리트를 고집한 것은 본 연구의 궁극적인 목표가 마이크로 컬럼을 LC/MS 연구에 응용하는 것이기 때문이다. LC/MS에 응용하기 위하여는 컬럼 출구에 실리카 모세관을 연결하여 써야 하며 필요에 따라 이 모세관을 다른 것으로 교체하여야 한다. 이 과정에서 테프론 막 프리트는 파손 내지 유실될 우려가 있으므로 사용하기 곤란하다. 그러나 유니온의 작은 구멍 속으로 유리섬유를 채워 넣는 프리트 기술은 어떤 형태로든 개선될 필요가 있다. 핏팅 연결도 LC/MS의 응용에 있어서 중요한 요소다. 연결되는 실리카 모세관과 유니온 핏팅 규격의 차이를 해소하는 적당한 슬리이브를 사용해야 한다. 둘째는 역사 컬럼 충전기술의 추가적인 개선이다. 예를 들어 초고압 초고속 충전 등을 시도해 볼 수 있다.

결 론

내경 0.5 mm인 스테인레스 스틸관에 용량이 1.2 mL인 슬러리 저장조를 사용하여 마이크로 컬럼을 제작하고 그 성능을 조사하여 보았다. 이론단수가 20,000 정도에 이르는 우수한 컬럼이 제작되었고 충전시간도 단축할 수 있었다. 보다 효율이 좋은 컬럼의 제작을 위해서는 컬럼의 틈새부피를 더욱

감소시키는 방법을 도입함과 더불어 보다 좋은 충전물을 이룰 수 있는 충전 조건을 찾아보아야 할 것이다.

본 연구는 과학재단의 1995년 핵심전문 연구지원비(과제번호 951-0304-033-1) 및 1995년 인하대학교 교내연구비에 의하여 지원되었음.

인 용 문 헌

1. Cheong, W. J.; Cha, K. W.; Choi, J. D. *J. Korean Chem. Soc.* **1995**, *39*, 471.
2. An, H. J.; Cheong, W. J. *J. Korean Chem. Soc.* **1995**, *39*, 863.
3. Borra, C.; Han, S. M.; Novotny, M. *J. Chromatogr.* **1987**, *385*, 75.
4. Kennedy, R. T.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1128.
5. Karlsson, K. E.; Novotny, M. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1662.
6. Bauer, H. *Chromatographia* **1989**, *28*, 289.
7. Banks, J. F.; Novotny, M. *J. Microcolumn Sep.* **1990**, *2*, 84.
8. Cheong, W. J.; Chun, S. H.; Lee, G. Y. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **1996**, *19*, 277.