

초임계 유체를 이용한 비타민류의 새로운 분석법 개발

표동진[†] · 박동진 · 김호현 · 이학주 · 이태준

강원대학교 자연과학대학 화학과

(1996. 11. 18. 접수)

Development of New Analytical Method of Vitamins Using Supercritical Fluid

Dongjin Pyo[†], Dongjin Park, Hohyun Kim, Hakju Lee, Taejoon Lee

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received Nov. 18, 1996)

요약 : 초임계 유체 크로마토그래피(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)는 종래의 크로마토그래피 방법으로 분석하기 어려운 물질을 분석해 내는 기술로서 발전이 되어 왔다. 그러나 SFC에서 이동상으로 많이 사용되고 있는 초임계 유체 CO₂는 용매로서 특성이 n-hexane과 매우 비슷하여 극성이 큰 시료들을 용출(elution)시키기가 어렵다. 이러한 점을 해결하기 위하여 초임계 CO₂에 극성을 지닌 물질, 즉 변형제(modifier)를 섞어서 이동상으로 사용할 수 있다. 본 연구에서는 초임계 CO₂에 첨가된 수분(H₂O)의 양을 perfluorosulfonate ionomer(PFSI) film을 이용하여 만든 amperometric microsensor로서 측정하였다. 이와 같은 방법을 사용함으로써 포화 column보다 상당히 긴 시간 동안 일정하게 수분을 첨가할 수 있었고, 실제로 이 방법을 사용하여 순수한 CO₂ 이동상만으로는 분리하기 어려운 비타민류의 분석에 적용한 결과 좋은 크로마토그램을 얻었다.

Abstract : Supercritical Fluid Chromatography(SFC) has become a technique for solving problems that are difficult to be monitored by other chromatographic methods. However, the most widely used fluid, is no more polar than hexane. Polar samples which are difficult to be analyzed with pure supercritical CO₂ because of their high polarity can be separated by adding polar modifiers to supercritical CO₂. In this paper, a new method for monitoring the mobile phase composition in modified supercritical fluid chromatography was developed. The amount of water dissolved in supercritical CO₂ was measured by amperometric microsensor which is made of thin film of perfluorosulfonate ionomer(PFSI). The amount of water dissolved in supercritical CO₂ stayed constant for a much longer time than with a saturator column. With this new mixing device, we could get good resolutions for vitamins which are difficult to separate with pure CO₂.

Key words : Supercritical Fluid Chromatography, vitamins, modifier

1. 서론

이동상으로서 액체는 아니고 기체도 아닌 초임계 유

체를 사용하는 크로마토그래피를 Supercritical Fluid Chromatography(SFC)라 부른다. 초임계 유체는 몇 가지 특성을 나타내는데, 먼저 압력과 밀도와의 관계

를 살펴보면 동일 온도에서 밀도는 직선적인 비례관계는 아니지만 압력에 비례함을 알 수 있다. 특히 임계점 근처에서는 압력이 조금만 증가하여도 밀도는 급격히 증가한다.¹ 크로마토그래피에서 이동상으로 사용한 물질의 밀도가 증가하게 되면 일반적으로 이동상의 용매 강도가 증가하게 된다. 앞의 사실(압력 증가→밀도 증가→용매 강도 증가)로부터 GC에서 컬럼의 온도 변화를 이용하여 손쉽게 용질을 분리시키는 것처럼 SFC에서는 압력 변화(=밀도 변화)를 시키는 조작으로 용질을 분리하게 된다.

SFC의 이동상으로 쓰이는 초임계 유체의 밀도는 GC에서 이동상으로 사용하는 기체보다 약 200~500 배 정도 크기 때문에 GC로는 분리하기 어려운 물질, 즉 분자량이 큰 물질이나 열에 약한 물질을 분리할 수 있는 요인이 된다. 그러나 SFC의 이동상으로 많이 쓰이는 초임계 유체들은 상대적으로 무극성인 경우가 많다. 초임계 이동상으로 가장 많이 쓰이고 있는 CO₂의 경우, 아주 높은 압력에서도 대표적인 비극성 용매인 헥산보다도 극성이 적다.² 분리를 잘 하기 위해서는 용질의 극성이 이동상과 정지상 사이에 있어야 하는데, 이동상인 초임계 CO₂의 경우 극성이 매우 작아 여러 가지 극성을 띤 시료나 이들을 포함하는 혼합물을 분리하는 데 어려움이 따른다. 실제 시료의 경우 여러 가지 화합물이 복합체로 존재하는 경우가 대부분이며, 비극성 화합물로만 이루어진 시료는 거의 없다. 따라서 SFC를 일반적으로 분리기술로서 발전시키기 위해서는 비극성인 CO₂보다 훨씬 더 극성을 띤 이동상이 필요하다. 이와 같은 필요성 때문에 NH₃³와 같은 극성을 띤 이동상을 사용하기도 하지만 더 좋은 방법은 비극성인 초임계 CO₂에 다 극성 유기용매(물, 메탄올, formic acid 등), 즉 변형제를 섞어서 사용하는 방법이다. 초임계 이동상에 용해되는 용질의 용해도는 이동상에 첨가되는 변형제에 의해 큰 영향을 받는다. 변형제의 사용은 Jenotoft와 Gouw⁴, 그리고 Novotony⁵에 의해 보고되었다. Novotony는 n-pentane을 이동상으로 사용하고 이에 0.1%의 isopropanol을 첨가시켰을 때 polynuclear aromatic hydrocarbons의 K(capacity factor)값이 20~25% 감소한다고 보고하였다. 이러한 현상의 원인은 초임계 이동상에 변형제를 첨가시켜 주면 이동상의 극성이 변하게 되며 또한 변형제는 column 충전제의 비활성화를 유도하기 때문이다.

Capillary SFC에서는 대부분의 경우 순수한 CO₂를 사용하고 검출기로서는 flame ionization detector (FID)를 사용하고 있다. 실제 formic acid와 물을 제외한 대부분의 변형제를 사용하는 경우 이들이 FID의 signal에 영향을 주므로 사용하기가 어렵다.⁵ Packed column SFC에서는 극성 성분을 분리할 때 변형제의 사용은 필수적이며⁶, 변형제를 섞음으로써 이동상의 용매강도를 증가시키는 방법으로 널리 쓰이고 있다. 여러 문헌들⁶⁻⁸에서는 capillary column SFC와 packed column SFC에 변형제를 첨가시켜 주었을 때, 이것이 봉우리 모양(peak shape), 선택성(selectivity), 머무른 시간(retention time) 등에 미치는 영향에 대해 보고하였다.

초임계 유체에 변형제를 첨가시키는 가장 간단하고 효과적인 방법은 변형제로 포화된 실리카 column을 사용하는 것이다.^{9,10} 즉, 펌프와 주입기(injector) 사이에 변형제로 포화된 실리카 column을 설치함으로써 초임계 유체가 이 column을 통과할 때 변형제가 초임계 유체에 녹아 들어가게 만드는 것이다. 그러나 이 방법에서는 변형제를 함유하는 실리카 column의 수용능력에 한계가 있기 때문에 이동상에 첨가되는 변형제의 양에도 한계가 있다는 단점이 있다. 따라서 초임계 유체에 첨가되는 변형제의 양을 정확히 측정하고 조절(monitors)하는 것이 필요하다.

비타민의 분석은 주로 HPLC방법^{11,12}이 이용되고 있다. 정지상은 C₁₈이나 C₈이 주로 이용되고 있으며, 이동상은 유기용매를 사용하는 경우¹¹와 유기용매와 buffer 용액을 섞어 쓰는 경우¹²가 있다.

본 연구에서는 초임계 유체에 변형제를 첨가하기 위해 Teflon filter를 이용한 새로운 mixing device를 고안했으며, 이를 비타민류의 분석에 응용한 결과 좋은 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

2. 실험

실험에 사용한 기기는 Computer Chemical System(CCS) Model 5000 SFC와 Lee Scientific Model 600 SFC이며, column은 Nucleosil diol packed column(100mm×2mm)을 사용하였다. 이 장치에는 C14W loop injector(Valco)와 UV가 장착되었다. 본 실험에서는 UV 215nm의 파장을 이용하였다. 이동상

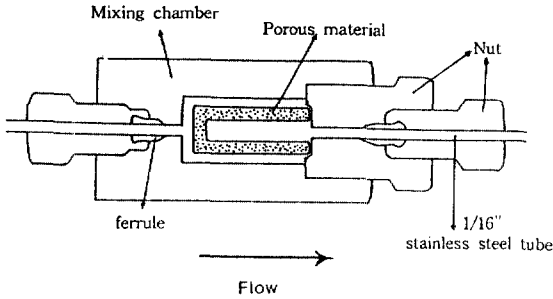


Fig. 1. Mixing device

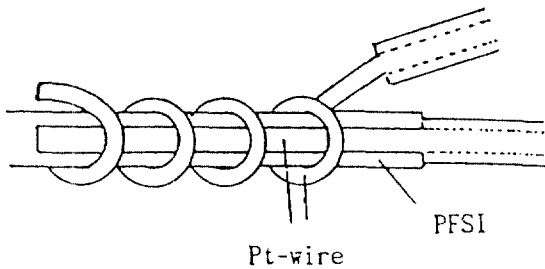


Fig. 2. Modified sensor

으로는 고순도(Scott 회사, 99.999%)의 초임계 유체 CO₂를 사용하였으며, 물(H₂O)을 변형제로서 사용하였다.

초임계 CO₂에 물을 첨가시켜 주기 위하여 본 실험에서는 새로운 장치(mixing device)를 개발(Fig. 1)하여 사용했는데, 내부에 이온 크로마토그래피용 filter (Teflon material, 40×8mm, 2μ porosity, Alltech, Deerfield, USA)를 사용한 것이 특징이다.

이동상인 초임계 CO₂가 μ-Porasil column 또는 mixing device를 통과했을 때 얼마만큼의 수분이 첨가되었는지를 알아보기 위해 일정 시간 간격으로 수분의 양을 측정하였는데, 이 측정을 위해 고분자막, 즉 perfluorosulfonate ionomer(PFSI) film¹³을 이용하였다. Pt-wire(80mm×0.6mm)에 PFSI film을 입힌 후, 또 하나의 Pt-wire로 촘촘하게 감아 sensor를 만들고 이것을 플라스틱 튜브 속에 설치하였다. Fig. 2에, 본 실험에서 사용한 sensor의 단면도를 나타내었다. 양쪽 전극(Pt-wires) 사이의 전압 차이를 측정하기 위해 일정한 전류(0.1μA)를 공급해 주었고, sensor의 출력은

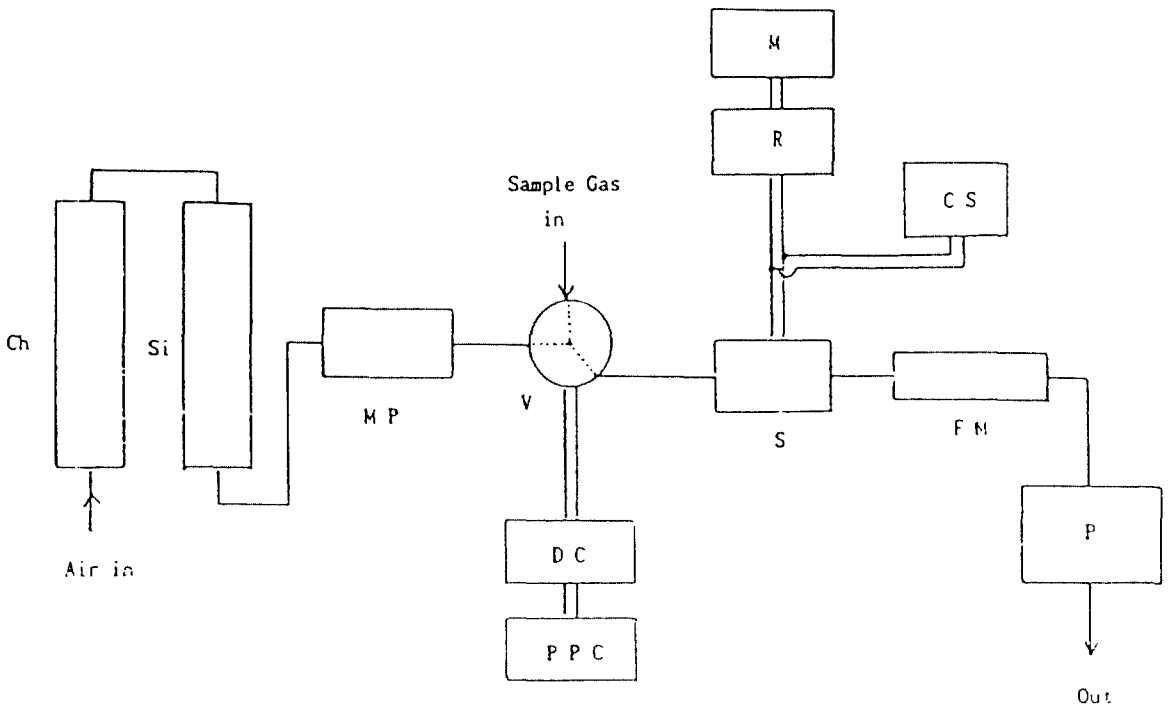


Fig. 3. An arrangement of water content measuring device : P, pump ; V, solenoid valve ; S, sensor ; FM, flow meter ; MP, magnesium perchlorate ; R, recorder ; M, multimeter ; DC, 12 volt power supply ; PPC, programmable process controller ; Ch, charcoal ; Si, silica gel ; CS, current source

기록하기 위해 strip chart recorder(Knauer, Germany)를 사용하였다.

건조 공기와 기체 시료(gas sample)를 번갈아 sensor로 보내기 위해 12V DC 전원 장치로 작동하는 solenoid valve를 사용했으며, 이때 12V DC 전원장치는 programmable process controller(ChronTol, Model CD-4)에 의해 프로그램된 시간에 따라 개폐가 조절된다. 건조 공기를 만들기 위해 실내 공기를 charcoal과 실리카겔을 거쳐서(상대습도: 약 5%) $Mg(ClO_4)_2$ 를 통과(상대습도: 0%)시켰다.

초임계 CO_2 에 첨가된 수분의 양을 측정하기 위한 장치의 전체적인 배열을 Fig. 3에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

앞에서 언급했듯이 SFC의 이동상으로 가장 많이 사용하고 있는 초임계 CO_2 는 극성이 큰 용질을 용출시키는 데 어렵기 때문에 이러한 점을 해결하기 위해 물이나 알코올, 그리고 formic acid같이 극성이 큰 물질을 초임계 CO_2 에 섞어서 이동상으로 사용하게 된다. 그런

데 물이나 formic acid와 같은 물질을 변형제로서 사용할 경우 이들이 펌프 속에 남아 있게 되어 펌프 부식의 원인이 되고, 메탄올의 경우 이것이 펌프 속에 깊숙히 침투해 있다가 다음 분석시 천천히 흘러 나오게 되어 분석 평형에 도달하는 시간을 길게 만드는 요인이 된다. 또한 formic acid나 메탄올과 같이 몸에 해로운 변형제가 기체상태로 실험실 내부에 확산되어 실험실을 오염시키기도 한다. 이러한 점들을 해결할 수 있는 방법은 초임계 CO_2 에 변형제를 첨가시킬 때 포화 컬럼을 쓰는 것이다.^{9,10,14}

그러나 포화 컬럼을 사용할 때의 한 가지 문제점은 초임계 유체에 녹아 있는 변형제의 양이 짧은 시간만 일정한 농도로 유지되며 그 이후로는 급격히 떨어진다는 사실이다. 이것을 해결하기 위해 본 연구에서는 포화 컬럼 대신에 수많은 구멍(pore)을 가진 filter를 이용해 수분을 첨가시키는 방법을 개발하였다. 이 장치의 단면도를 Fig. 1에 나타내었다. 펌프와 주입기에 이 장치를 연결하여 펌프에서 나온 초임계 CO_2 가 물로 포화된 filter를 통과할 때 수분이 첨가되도록 만들었다. Fig. 4는 이 장치(mixing device)를 통과한 후

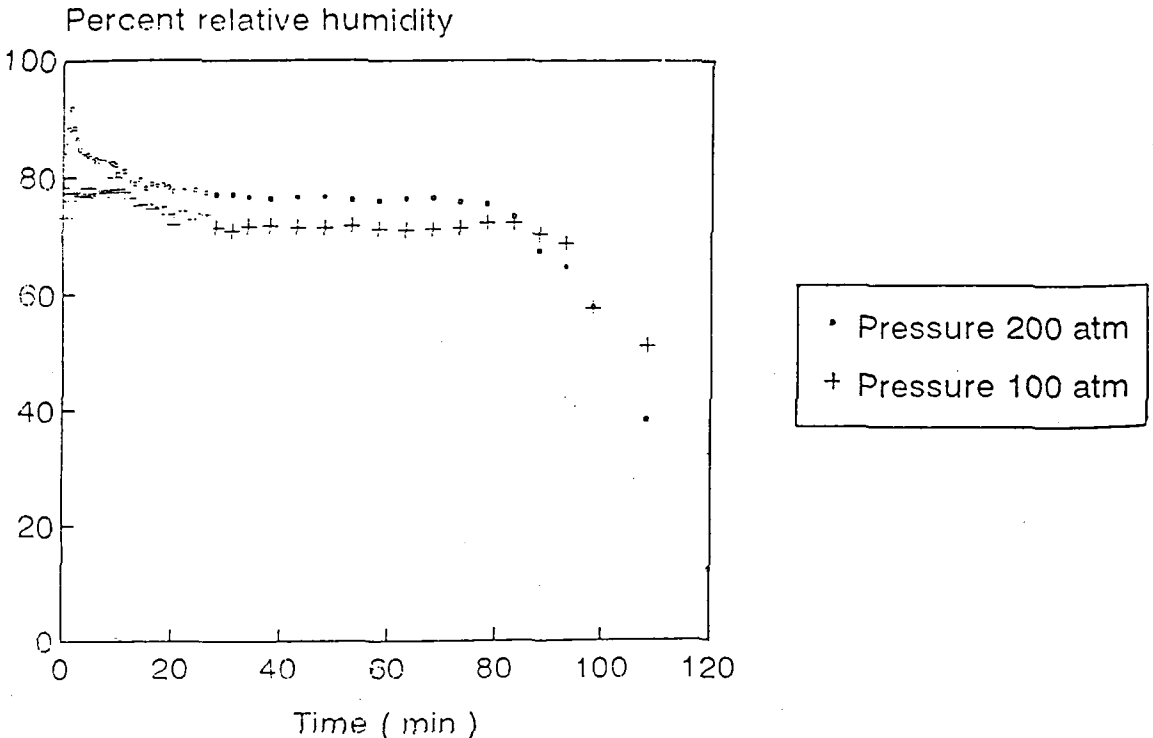


Fig. 4. Measurement values of the water content in supercritical carbon dioxide as a function of time

에 초임계 CO₂에 첨가된 수분의 양을 시간의 함수로서 도시한 것이다. Fig. 4에서 보듯이 초임계 CO₂에 첨가된 수분은 약 90분 정도까지 일정하게 지속되다가 그 이후에는 시간이 지남에 따라 감소하였다.

이러한 mixing device를 이용하여 수분을 첨가시키는 방법도 또한 90분마다 다시 수분으로 포화시켜야 한다는 문제가 여전히 남아 있다. 하지만 이 방법을 이용하면 μ -Porasil column을 사용하는 것(약 35분)보다 상당히 긴 시간 동안 일정하게 수분이 첨가된다. 따라서 초임계 CO₂에 수분을 첨가시켜 만든 새로운 이동상을 여러 가지 다양한 극성 시료들을 분리에 적용할 수 있는 가능성이 커졌다고 할 수 있다.

수분을 측정하는 화학적 방법 중에 가장 널리 알려지고 쓰이는 방법은 Karl Fischer 반응을 이용한 방법이다. 하지만 이 방법으로 초임계 CO₂에 첨가된 수분을 측정하려 했을 때 감도(sensitivity)가 충분치 않았으며, 기체시료를 다루는 데 어려움이 따르기 때문에 재현성 있는 실험 결과를 얻기가 어려웠다. 따라서 본 연구에서는 기체시료 중에 포함되어 있는 수분에 민감하고 빠르게 반응하는 sensor를 고안하게 되었다.

초임계 CO₂에 첨가된 수분의 양을 측정하기 위해서, 수분에 대해 친화력이 큰 고분자막, 즉 perfluorosulfonate ionomer(PFSI) film을 이용하여 sensor를 제작하였다. 두 전극을 PFSI film을 사이에 두고 밀착하도록 만든 후, 이를 주위 환경에 노출시키면 주위 환경에 있는 수분이 고분자막에 흡착되고, 흡착된 수분은 고분자막 속으로 분배된다. 두 전극에 일정한 전류를 가해 주면 고분자막 속으로 분배된 수분은 전기적으로 분해되는데, 이 때 양 전극 사이의 전압 차이를 측정함으로써 sensor 주위 환경에 있는 수분의 양을 측정할 수가 있었다. 전극으로는 Pt-wire를 사용했고, 하나의 Pt-wire에 PFSI film을 입힌 후 또 하나의 Pt-wire로 촘촘하게 감아 sensor를 만들었다. 그 단면도를 Fig. 2에 나타내었다. 두 개의 유리관(100cm×3.5cm)에 각각 charcoal과 silica gel을 플라스틱 튜브(13cm×3cm)에 magnesium perchlorate(Mg(ClO₄)₂)를 채운 후 이 속으로 실내 공기를 차례로 통과시켜 건조 공기를 만들고, 이 건조 공기를 주입했을 때 sensor의 감응을 기준점(0% 습도)으로 삼았다. 시료 기체(수분이 첨가된 CO₂)를 sensor에 주입하기 위해 three-way solenoid valve(Radio shack, USA)를 사용했는데, 이

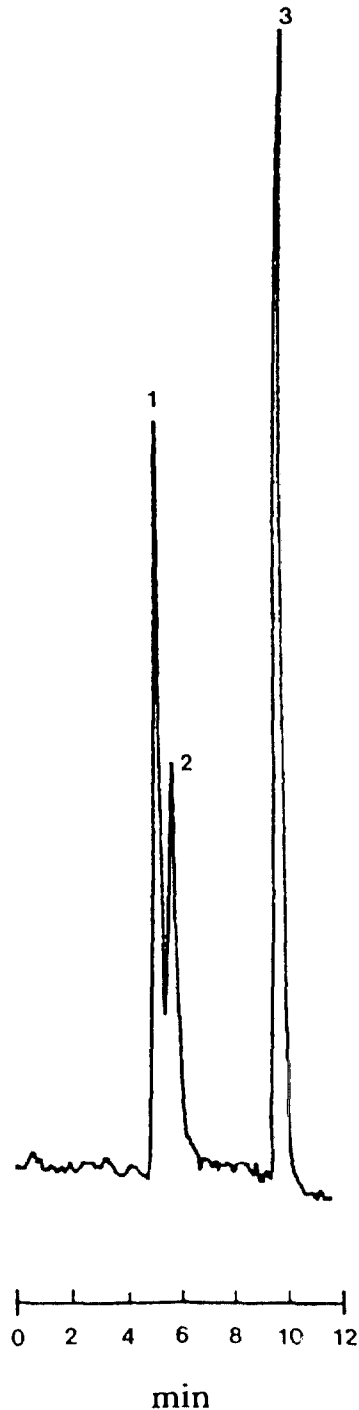


Fig. 5. The supercritical fluid chromatogram of a mixture of vitamins using UV 215nm

1: Nicotinic acid, 2: Nicotinamide, 3: Ascorbic acid

valve는 12V DC로 작동하는 것으로 programmable process controller(ChronTron, Model CD-4)에 프로그램을 입력하여 개폐(on-off)를 조절하였다. Sensor를 플라스틱 튜브 속에 설치하고 두 Pt-wire에 0.1 μ A의 일정한 전류를 공급한 후, 두 단자를 recorder에 연결시켜 전압 차이를 측정하였는데, 수분 측정을 위한 장치의 전체적인 배열은 Fig. 3에 나타냈다.^{15,16}

실제로 개발된 mixing device를 이용하여 만든 새로운 이동상(초임계 CO₂+H₂O)으로 비타민류의 혼합물을 분리해 보았는데, 예상했던 대로 좋은 크로마토그램을 얻을 수 있었다. Fig. 5~7에 이를 나타내었으며, 분리된 비타민류의 화학구조는 Table 1에 정리해서 나타내었다. 이동상으로 초임계 CO₂만을 사용해서 위의 비타민류를 분리했을 때는 분리가 잘 되지 않아 아주 넓은 봉우리들이 3분~10분 사이에 나오는 것이 관찰되었다. 비타민 B₁, B₆, B₂의 표준검량곡선(Fig. 8)과 머무름 시간의 재현성(Table 2)을 측정한 결과 50~200 μ g/mL의 농도 범위에서 좋은 직선성을 보였으며, 머무름 시간의 재현성도 만족할만한 결과를 보여 주었다.

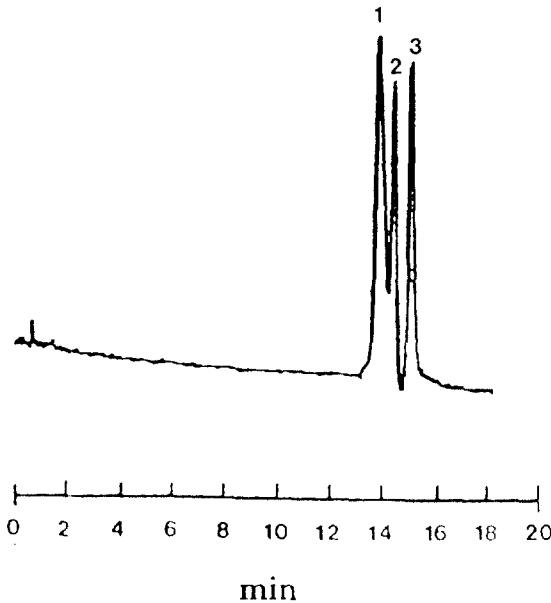


Fig. 6. The supercritical fluid chromatogram of a mixture of vitamins using UV 215nm
1: Vitamin K, 2: Vitamin E, 3: Vitamin D

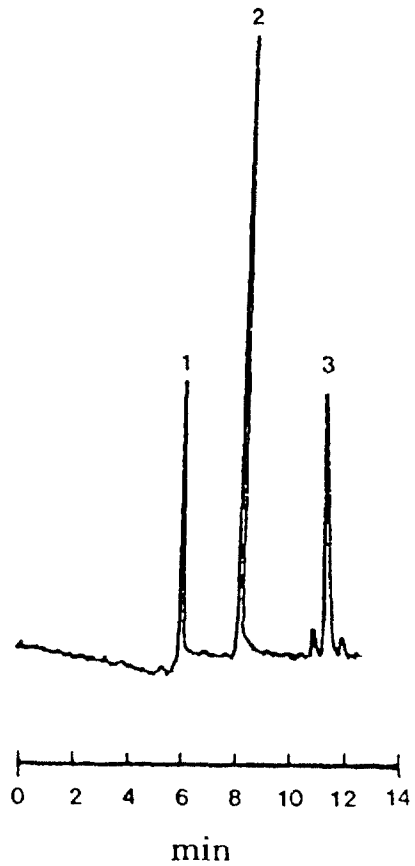


Fig. 7. The supercritical fluid chromatogram of a mixture of vitamins using UV 215nm
1: Vitamin B₁, 2: Vitamin B₆, 3: Vitamin B₂

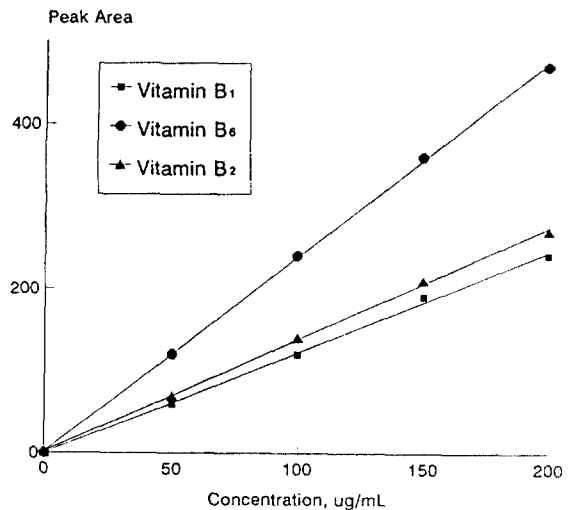


Fig. 8. Standard calibration curves of Vitamin B₁, B₆, B₂

Table 1. The Structures of studied compounds

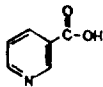
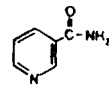
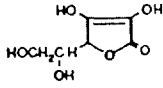
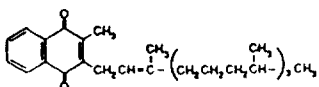
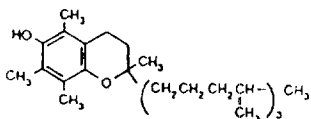
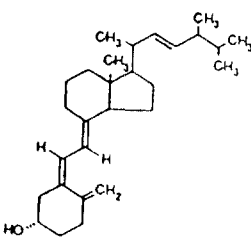
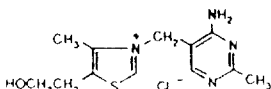
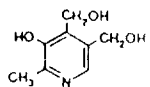
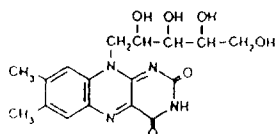
Vitamins	Structure
Nicotinic acid	
Nicotinic amide	
Ascorbic acid	
Vitamin K (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone)	
Vitamin E ([2,5,7,8-tetramethyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-chromanol, DL- α -tocopherol])	
Vitamin D (Ergocalciferol)	
Vitamin B ₁ (Thiamin)	
Vitamin B ₆ (Pyridoxine)	
Vitamin B ₂ (Riboflavin)	

Table 2. Supercritical fluid retention times of Vitamin B₁, B₆, B₂

	Mean	RSD
Vitamin B ₁	5.98	2.1
Vitamin B ₆	8.09	2.4
Vitamin B ₂	11.23	4.1

Mean : Average value of 3 times analysis.

4. 결론

초임계 유체 CO₂는 유체의 특성상 비극성 용매에 가깝기 때문에 극성을 띤 용질이 컬럼으로 주입될 경우 이들을 용리시키기가 어렵다. 본 연구에서는 초임계 CO₂에 극성을 지닌 물질, 즉 변형제(modifier)를 섞어서 이동상으로 사용하는 방법을 개발하였으며, 이 방법은 비타민류 뿐만 아니라 다른 생체내분비물(콜레스테롤, 호르몬제 등)이나 항생제들의 분석에도 그대로 적용될 수 있다. 왜냐하면 이들 대부분은 극성을 띤 작용기를 갖고 있기 때문이다.

감사의 글

이 연구를 수행할 수 있도록 지원해 준 대송교역과 산학협동재단에 감사드립니다.

참고문헌

1. R. M. Smith, "Supercritical Fluid Chromatography", Vol. I, p. 2-23, Royal Society of Chemistry, London(1988).

2. C. R. Yonker, S. L. Frye, D. R. Lalkwarf and R. D. Smith, *J. Phys. Chem.*, **90**, 3022(1986).

3. M. Novotny, W. Bertsch and A. Zlatkis, *J. Chromatogr.*, **61**, 17(1971).

4. R. E. Jentoft and T. H. Gouw, *J. Chromat. Sci.*, **8**, 138(1970).

5. B. W. Wright and R. D. Smith, *J. Chromatogr.*, **355**, 367(1986).

6. S. Schmidt, L. G. Blomberg and E. R. Campbell, *Chromatographia*, **25**, 775(1988).

7. A. L. Blilie and T. Greibrokk, *Anal. Chem.*, **57**, 2239(1985).

8. C. R. Yonker and R. D. Smith, *J. Chromatogr.*, **361**, 25(1986).

9. H. Engelhardt, A. Gross, R. Mertens and M. Petrsen, *J. Chromatogr.*, **477**, 169(1989)

10. H. E. Schwartz, P. J. Barthel, S. E. Moring, T. L. Yates and H. H. Lauer, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **330**, 204(1988).

11. P. M. Finglas and R. M. Faulks, *Food Chem.*, **15**, 37(1984).

12. D. M. Hilker and A. J. Clifford, *J. Chromatogr.*, **231**, 433(1982).

13. H. Huang and P. K. Dasgupta, *Anal. Chem.*, **62**, 1935(1990).

14. B. L. Karger, R. C. Castells, P. A. Sewell and A. Hartkopf, *J. Phys. Chem.*, **75**, 3870(1971).

15. D. J. Pyo and H. Hwang, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **13**, 110(1992).

16. D. J. Pyo and D. W. Ju, *The Analyst*, **118**, 253(1993).