

## 제조용 충전물을 사용한 액체 크로마토그래피의 흡착특성

최 용 석 · 이 종 호 · 노 경 호

인하대학교 화학공학과

(1998년 2월 11일 접수, 1998년 3월 30일 채택)

### Adsorption Characteristics of Liquid Chromatography with Preparative Packings

Yong Seok Choi, Chong Ho Lee, and Kyung Ho Row

Dept. of Chem. Eng., Inha University

(Received February 11, 1998, Accepted March 30, 1998)

**요 약 :** 제조용 액체 크로마토그래피는 주로 생화학물질에서 유용성분을 분리하는데 사용된다. 본 연구에서는 제조용 충전물(15 $\mu$ m)이 채워진 역상 액체 크로마토그래피를 이용하여 sample size에 따른 흡착특성을 고찰하였다. 시료는 향미제인 5'-GMP이고 이동상은 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 수용액 20mM과 메탄올을 97:3 (vol.%)으로 혼합하여 사용하였다. 실험결과에 의하면 sample size가 증가해도 체류인자는 거의 일정하였지만 1 $\mu$ g 이상에서는 peak의 모양이 비대칭성이 되었다. 또한 sample size가 증가함에 따라서 이론단수는 감소하였고 농도가 작은 경우 peak width가 크기 때문에 이론단수는 더 작았다. 본 실험조건에서 5'-GMP는 Freundlich 비선형흡착식에 비교적 잘 일치하였다.

**Abstract :** Preparative HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) is mainly used for separating useful component from biological samples. By reversed-phase HPLC packed with preparative packings (15 $\mu$ m), the adsorption characteristics with sample size were investigated. Sample was 5'-GMP, a flavor enhancer, and the composition of mobile phase was 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution:methanol (97:3 vol.%). From the experimental results, the effect of sample size on retention factor was negligible, but the peak was asymmetrical above 1 $\mu$ g of sample. In addition, the increase in sample size deteriorated the number of theoretical plates, and at small concentration, the number of theoretical plates was less because of large peak width. In the experimental condition, the adsorption isotherm of 5'-GMP was relatively well represented by Freundlich equation.

#### 1. 서 론

최근 각종 오염물질로 인한 질병에 대한 위험성이 커짐에 따라 건강에 대한 관심도 증가되며 이에 대한 연구가 광범위하게 진행되어 왔다. 새로운 의약품 개발중 특히 천연 식물에 포함이 된 유용성분들을 이용하기 위한 연구가 많이 진행되고 있으며 이들을 추출하여 상품화하기 위한 많은 노력을 기울이고 있다. 몇 가지 예를 들면, 택솔(taxol)은 주목 나무에서 추출되는 taxane ring의 구조를 갖는 화합물을 말한다. 이 물질은 유방암, 자궁암, 후두암, 그리고 폐암등의 치료에 탁월한 성능을 가지고 있음이 임상실험으로 규명되고 미국의 FDA의 승인을 공식적으로 획득한 성분이다[1]. 녹차의 생리활성물질인 카테킨(catechin)은 이 성분과 생체내에서의 작용에 관한 연구는 미비한 실정이나 최근 많은 항암작용이 보고되고 있어 우수한 항암제로 대두되고 있다. 감귤류를 구성하고 있는 성분들에는 항암효과가 있는 성분들이 다수 포함되어 있다. 이 중에서 페릴릴알코올은 유방암, 백혈병, 췌장암, 폐암등에 대한 항암제로서의 치료효과가 입증이 됨으로써 사용범위가 확대되고 있는 물질이다. 그 외에도 인지질(phospholipids), 아이소플라본(isoflavone), 베타카로틴( $\beta$ -carotene), 베타글루칸( $\beta$ -glucan)등은 천연식물에 포함되어 있는 유용한 물질이다[2].

HPLC(high performance liquid chromatography)는 모든 분리 분석방법중에서 가장 널리 사용되고 있으며, 매년 수십억 달러의 HPLC 장치가 판매되어 주로 생화학 물질에 이용되고 있다. HPLC

의 장점은 장치가 간단하고 비교적 감도가 좋아서 정확하게 정량을 할 수 있고, 비휘발성 성분 또는 열적으로 불안정한 물질을 쉽게 분리할 수 있는데 있다. 그리고 기체 크로마토그래피에 비해서 많은 양을 처리할 수 있기 때문에 제조용으로 쉽게 적용할 수 있다. 즉 분리시간이 빠르고 다양한 이동상과 고 기능성 충전물로 인한 분리도가 우수하다. 일반적으로 분석시간이 1시간 이내이며 연속적인 작동으로 이전에 비해 적은 조작시간이 소요된다[3]. 분석용 HPLC는 혼합물의 정량과 정성분석을 목적으로 하는 반면에 제조용 액체 크로마토그래피는 원료 혼합물질을 그램 또는 킬로그램 규모로 주입하여 분리 정제를 목적으로 한다. 주입량이 적은 분석용에 비해서 제조용 크로마토그래피에서는 순도와 단위시간당 생산량이 중요하며 따라서 많은 양의 원료를 분리하기 위한 작업조건은 분석용 크로마토그래피와는 차이가 있게 된다[4, 5]. 분석용 크로마토그래피의 분리도와 column의 효율 (number of theoretical plates)이 제조용에 비해서 우수한 것은 충전물의 크기가 작기 때문이다(주로 10 $\mu$ m 이하). 이러한 작은 충전물에서는 압력강하가 매우 크고 가격이 비싸다. 제조용 충전물을 사용하는 경우 sample size의 증가로 인하여 peak의 모양이 비대칭성으로 되고 있으며 흡착평형식은 비선형으로 표시된다[6, 7].

본 연구에서는 단일성분에 대해서 제조용 충전물이 채워진 column에서 흡착특성을 규명하기 위하여 시료의 농도와 주입부피를 증가시켰다. 실험에 사용된 5'-GMP-Na<sub>2</sub>(guanosine 5'-monophosphate disodium salt)는 향미제로 사용되는 식품첨가제이다.

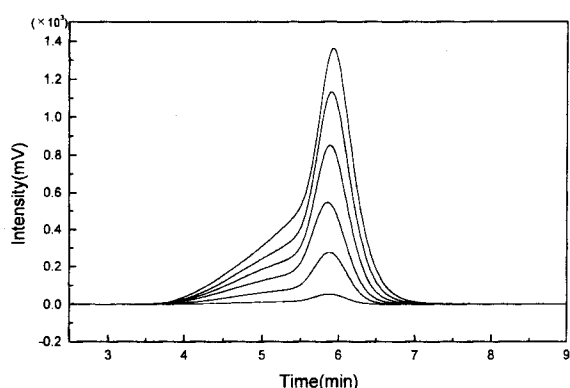


Fig. 1. Shift in peak shapes with injection volume (0.167 mg/ml sample concentration, injection volume  $\mu\text{l}$ , from the top : 250, 200, 150, 100, 50, 10).

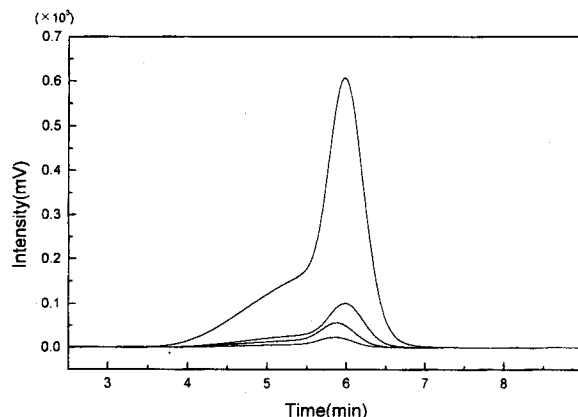


Fig. 2. Shift in peak shape with sample concentration (10  $\mu\text{l}$  injection volume, sample concentration, mg/ml, from the top : 1.667, 0.333, 0.167, 0.033).

제조용 충전물을 사용한 column에서 sample size가 증가하는 경우 peak의 모양, 체류시간, 관의 효율 및 비대칭성을 고찰하고 선형 또는 비선형흡착식에 의하여 계산된 elution profiles와 실험값을 비교하는 것이 본 논문의 목적이다.

## 2. 실험방법

본 실험에 사용한 시료는 5'-GMP-Na<sub>2</sub>로서 Fluka에서 구입하였다. 시료를 HPLC-grade 물에 용해하여 1.667 mg/ml의 용액을 만든 후 0.033 mg/ml까지 희석시켜 사용하였다. 주입부피는 10  $\mu\text{l}$ ~250  $\mu\text{l}$ , 시료농도는 0.033~0.167 mg/ml이었다. 이동상은 Baker Co.(Phillipsburg NJ, USA)에서 구입한 HPLC-grade 메탄올에 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 수용액 20 mM을 3:97 (vol.%)로 혼합하여 사용하였다. 모든 용매는 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(HA-0.45  $\mu\text{m}$ , FH-0.5  $\mu\text{m}$ )를 이용하여 감압 여과한 후 사용하였다. 이동상 내에 잔존하는 공기를 제거하기 위해 이동상의 저장용기에 헬륨을 100 ml/min으로 탈기하였다. 이동상의 유량은 1 ml/min으로 고정하였다.

HPLC는 Waters사의 600E pump(multisolvent delivery system), 486 detector(UV-visible tunable wavelength absorbance), U6K injector(2 ml sample loop)를 사용하였고, data acquisition system은 CHROMATE(v.2.1, Interface Eng.)를 PC에 설치하여 사용하였다. LiChrospher 100 RP-18(15  $\mu\text{m}$ , Merck) packing을 stainless steel(3.9 $\times$ 300 mm)에 충전하였다. UV detector의 파장은 254 nm로 고정하였고 모든 실험은 상온에서 행하였다. Dead time은 100  $\mu\text{l}$ 의 메탄올을 주입하여 얻은 peak들 중 제일 작은 peak로부터 1.25분 이었고 따라서 dead volume은 1.25 ml이었다.

## 3. 결과 및 고찰

제조용 packing material(15  $\mu\text{m}$ )을 사용하여 시료의 농도와 주입부피를 증가시켜서 peak의 변화를 비교하였다. 무게를 기준으로 한 시료량은 시료의 농도와 주입부피로 결정되므로 일정한 농도로 시료의 주입부피를 증가시키거나 일정한 주입부피로 시료의 농도를 증가시키면 따라서 시료량은 증가하게 된다.

5'-GMP 용액의 주입부피를 변화시키는 경우 peak 모양의 변화가 Fig. 1에 나타나 있다. 시료의 농도는 0.167 mg/ml로 고정하였고 가장 높은 점을 기준으로 위에서부터 250, 200, 150, 100, 50, 10 ( $\mu\text{l}$ )를 주입한 것으로 무게를 기준으로 한 sample size는 각기 83.5, 41.8, 16.7, 8.35, 4.18, 1.67  $\mu\text{g}$ 에 해당된다. 일정한 농도로 주입부피

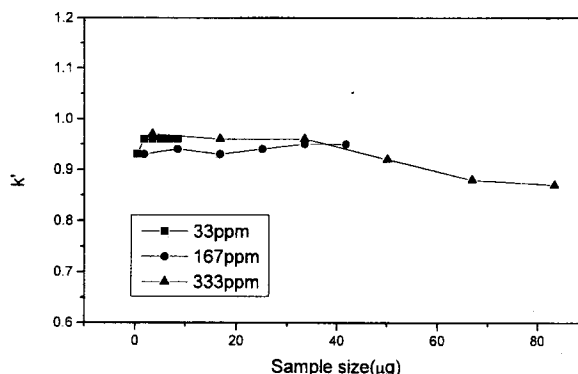


Fig. 3. Effect of  $k'$  on sample size with sample concentrations.

를 증가시키면 5'-GMP의 체류시간은 거의 일정하고 제일 작은 주입부피에서는 peak의 모양이 대칭을 이루고 있지만 주입부피가 증가함에 따라서 fronting이 생기기 시작하고 peak의 좌측부분의 곡면의 기울기가 완만해 지고 있다. 이는 Gaussian 형태와는 매우 다른 차이를 보이고 있다. 이에 비해서 주입부피를 고정하고 sample 농도를 증가시키는 경우 peak의 모양이 Fig. 2에서 보여지고 있다. 시료의 주입부피를 10  $\mu\text{l}$ 로 고정시키고 peak의 최고점을 기준으로 위에서부터 1.667, 0.333, 0.167, 0.033 mg/ml이고 각기 16.67, 3.33, 1.67, 0.33  $\mu\text{g}$ 에 해당된다. Fig. 1에서와 마찬가지로 체류시간은 거의 변화가 없고 fronting이 생김을 알 수 있다.

무게를 기준으로한 시료량의 증가에 따라서 체류인자의 변화를 Fig. 3에 나타냈다. 33, 167, 333 mg/ml의 용액 10~250  $\mu\text{l}$ 를 주입하였다. 체류인자( $k'$ )는 다음 식으로부터 계산하였다.

$$k' = \left( \frac{t_R - t_0}{t_0} \right) \quad (1)$$

$t_R$ 은 시료의 체류시간이고  $t_0$ 은 고정상에 흡착되지 않은 물질의 체류시간으로 dead time이다. 5'-GMP의 농도에 대해 시료량이 증가함에 따라 시료의 농도에 상관없이 체류인자가 거의 일정하였다 [8]. 일반적으로 체류인자는 시료의 양에 따라서 변하거나 일정하다. 이를 정확히 규명하기 위해서는 이동상과 고정상에서 시료의 흡착평형식을 알아야 하며 이후에 이를 다루기로 한다. 시료의 양이 column의 효율에 미치는 영향은 Fig. 4에 나타내었다. 시료의 농도 범위는 0.033~0.333 mg/ml, 주입부피는 10~250  $\mu\text{l}$ 이고 이는

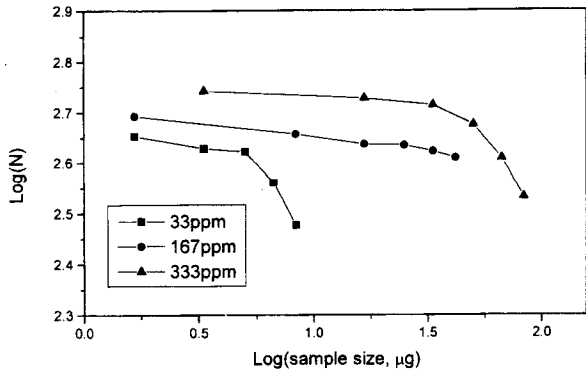


Fig. 4. Relationship of the logarithm of the column efficiency as a function of sample size.

0.33~83.25 mg에 해당된다. Column 효율은 이론단수(number of theoretical plates)로서 표시하고 기준선에서 측정된 peak의 폭(w)과 체류시간( $t_R$ )을 이용하여 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

시료량과 column 효율의 관계를 Fig. 4에서는 log-scale에서 나타내었다. 시료량이 증가함에 따라 column 효율이 감소하였다. 분석용 packing에서의 실험결과와 비교해 볼 때 시료의 농도에 상관없이 sample size가 증가함에 따라 column 효율이 감소하였지만 제조용에서는 일정한 sample size에서 시료의 농도가 크면 주입부피가 작고 따라서 column 효율은 증가하였다. 이는 시료의 농도보다는 주입부피에 의해서 column 효율이 영향을 받는 것을 의미한다[9].

시료량이 증가함에 따라서 peak 모양을 고찰하기 위해서 5'-GMP의 농도 0.033, 0.167, 0.333 mg/ml에 대해서 주입부피를 10~250 µl까지 증가시켜 peak의 비대칭인자( $A_s$ )와 skewness(S)를 구하였다.  $A_s$ 는 peak 높이의 10%지점에서 측정된 값으로 다음과 같이 정의하였다[10, 11].

$$A_s = \left( \frac{g}{f} \right) \quad (3)$$

$f$ 는 peak의 앞쪽에서 peak의 최대치까지의 거리이고,  $g$ 는 peak의 최대치에서 peak의 뒤쪽까지의 거리이다.  $A_s < 1$ 이면 peak가 fronting,  $A_s > 1$ 이면 peak가 tailing이 일어난 경우이다. 시료량과  $A_s$ 의 관계를 Fig. 5에 나타내었다. 일정농도에서 주입 부피가 증가하여 sample size가 증가하게 되면 peak 면적이 커지게 되고 peak는 fronting이 점점 완화되어서  $A_s$ 가 증가하였다.

Peak는 높이에 대한 시간의 함수,  $h(t)$ 로 나타내어지고,  $n$ 번째 central moment는 다음과 같이 정의된다.

$$\mu_n = \frac{\int_0^\infty (t - \mu_1)^n h(t) dt}{\mu_0} \quad (4)$$

여기서  $\mu_0$  = peak의 면적,  $\mu_1$  = residence time,  $\mu_2$  = peak의 variance,  $\mu_3$  = peak의 비대칭 정도와 방향이고, peak skewness(S)는 다음과 같이 나타낸다[11].

$$S = \frac{\mu_3}{\mu_2^{3/2}} \quad (5)$$

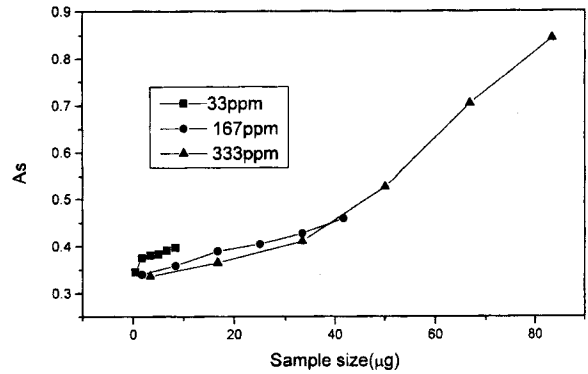


Fig. 5. Effect of sample size on asymmetry factor.

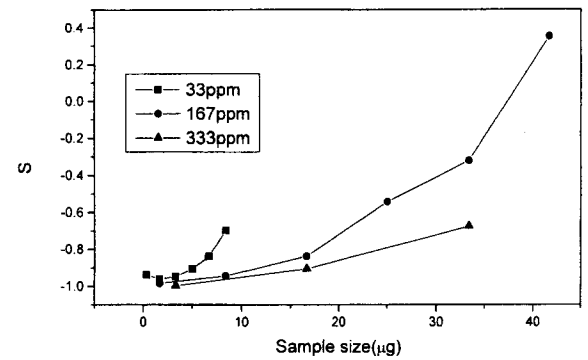


Fig. 6. Effect of sample size on skewness.

5'-GMP의 농도 0.033, 0.167, 0.333 mg/ml에 대해 주입부피를 10~250 µl까지 증가시켜서 각각의 central moment를 spreadsheet를 이용하여 수치적으로부터 계산하고 S를 구하였다. 시료량이 0.333 mg/ml의 농도에서 150 µl보다 크거나 1.667 mg/ml의 농도에서 10 µl보다 큰 범위에서는 peak의 형태가 flat-top이 되어서 정확한 central-moment를 계산하지 못하기 때문에 제외하였다. S값은 실험값에 대한 오차를 줄이기 위해서 intensity가  $10^{-3}$  mV가 되는 부분을 baseline으로 정하였다. Fronting이 생기는 peak에서의 skewness는 식 (5)에 의하면 음수를 가지게 된다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 S는 시료량에 따라 증가한다. 큰 농도에서는 시료량이 증가함에 따라 S값이 완만하게 증가하는데 비해서 적은 농도에서는 시료량이 증가함에 따라 S값이 급하게 증가함을 알 수 있다. 이는 이전  $A_s$ 와 마찬가지로 시료량이 증가함에 따라 fronting이 심한 peak로부터 대칭성의 peak형태로 변하기 때문이다. 시료가 낮은 농도와 큰 주입부피로 주입될 때 높은 농도와 작은 주입부피에 비해서 peak의 대칭성이 증가하게 된다. 이는 분석용 packing을 사용한 경우와는 상반되는 결과이다[4].

본 실험에 사용된 5'-GMP는 메탄올과  $KH_2PO_4$  수용액 20 mM을 3:97 (vol.%)의 이동상 조건에서 peak의 모양이 fronting으로 나타났다(참조 Fig. 7). 주입농도는 0.333 mg/ml, 주입부피는 10 µl로서 sample size는 3.333 µg이다. 이런 fronting을 갖는 peak에 대한 흡착평형식을 알기 위해서 선형 및 비선형 흡착평형식을 적용해 보았다. Fig. 7에서는 다음의 선형흡착식과 단이론에 의하여 계산한 peak와 비교하였다[12, 13].

$$c_s = Kc_m \quad (6)$$

선형흡착식에서는 고정상과 이동상의 농도의 비가 일정한 상수값

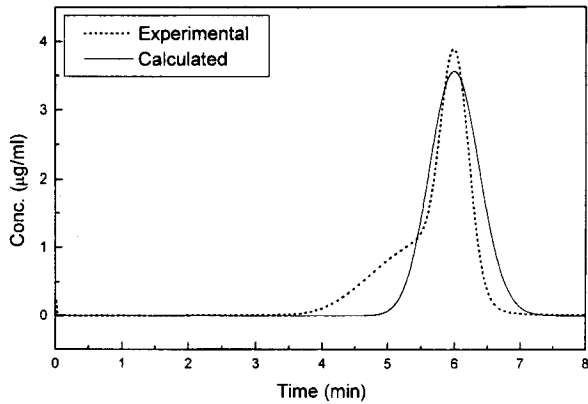


Fig. 7. Comparison of experimental data with calculated peak by linear adsorption isotherm.

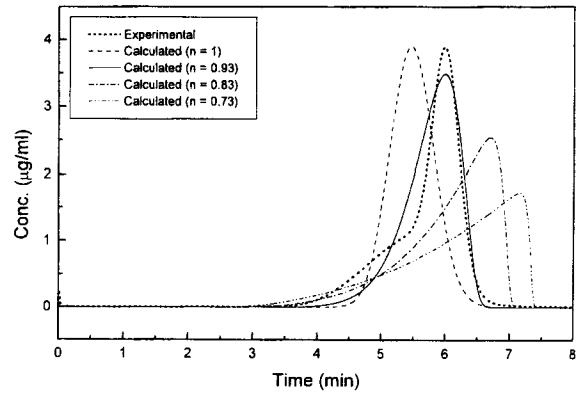


Fig. 9. Comparison of experimental data with calculated peak by nonlinear Freundlich adsorption isotherm.

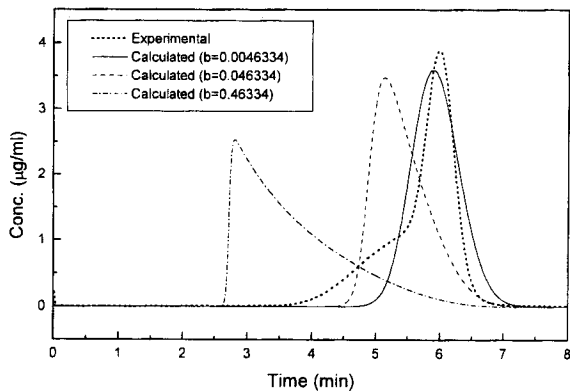


Fig. 8. Comparison of experimental data with calculated peak by nonlinear Langmuir adsorption isotherm.

으로 흡착평형상수( $K$ )로 정의되며 이 경우에는 2.03이었다. 선형 흡착식에서 계산된 peak는 좌우가 대칭인 Gaussian peak로서 체류시간은 잘 일치하였지만 fronting부분에서는 서로 일치하지 않았다. 다음과 같은 두 가지 비선형흡착식을 적용하였다.

$$c_s = \frac{ac_m}{1 + bc_m} \quad (7)$$

$$c_s = Kc_m^{1/n} \quad (8)$$

식(7)은 Langmuir 흡착평형식이고 식(8)은 Freundlich 흡착평형식이다[6, 7]. Fig. 8에서는  $a$ 값이 이전 선형 흡착평형식에서의  $K$ 값과 같은 2.03조건에서  $b$ 값의 변화에 따른 계산된 peak를 보여주고 있다. Sample size가 일정한 조건에서  $b$ 값이 작아지게 되면 식 (6)에서와 같이 Gaussian 형태를 갖고  $b$ 값이 커짐에 따라서 맨 왼쪽에 있는 직각삼각형 모양의 형태를 갖는다. Langmuir 흡착평형식에서는 peak의 앞부분이 매우 sharp하기 때문에 fronting을 갖는 experimental data와는 일치하기 곤란하였다. Freundlich평형식에서는  $K$ 가 1.8인 경우  $n$ 값의 변화에 따라서 계산된 peak가 Fig. 9에서 보여주고 있다.  $n$ 이 1이면 식 (7)에서 보는 바와 같이 선형흡착평형식으로 되어서 peak의 모양이 Gaussian형태가 되지만  $K$ 가 1.80으로 작기 때문에 실험값보다 앞쪽으로 위치하게 된다.  $n$ 값이 작아짐에 따라 고정상 농도의 영향이 커지기 때문에 peak의 앞부분이 fronting되기 시작한다. 이 경우  $n = 0.93$ 에서 실험값과 가장 잘 일치하였다. 보다 실험값과 근접하기 위해서는 다른 복잡한 형

태의 흡착평형식이 필요하게 된다.

#### 4. 결 론

분리를 목적으로 하는 제조용 크로마토그래피에서 시료의 주입 농도, 주입부피가 변하게 됨에 따라 분리도와 수율이 영향을 받게 된다. 본 연구에서는 5'-GMP시료와 역상 HPLC를 사용하여 이러한 영향을 고찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 메탄올과  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  수용액 20mM을 3:97 (vol.%)의 이동상 조성에서 sample size가 증가함에 따라 주입량이 1µg 이상에서 peak의 모양이 Gaussian 형태에서 fronting을 갖는 비대칭성 peak로 되었다.
- 2) Sample size가 증가함에 따라서 체류인자는 변화가 거의 없었지만 이는 Gaussian peak의 형태가 아닌 fronting을 갖는 peak 형태이었고  $A_s$ 와  $S$ 가 증가하였다.
- 3) Sample size가 증가함에 따라서 이론단수는 감소하였고 농도가 작은 경우 peak width가 크기 때문에 이론단수는 더 작았다.
- 4) 본 실험조건에서 5'-GMP는 Freundlich 비선형흡착식에 비교적 잘 일치하였다.

#### 감 사

본 연구는 과학재단(Grant No. 971-1107-048-2)의 연구비 지원에 의하여 고순도 분리 연구실에서 수행되었습니다.

#### 사 용 기 호

- $A_s$  : asymmetry factor defined by Eq.(3) [-]
- $a, b$  : parameters used in Langmuir adsorption isotherm [-]
- $c_m$  : concentration of solute in mobile phase [mg/ml]
- $c_s$  : concentration of solute in stationary phase [mg/ml]
- $f$  : distance from peak front to peak maximum measured at 10% peak height by Eq.(3) [cm]
- $g$  : distance from peak at maximum to peak end measured at 10% peak height by Eq.(3) [cm]
- $K$  : Equilibrium constant [-]
- $k'$  : retention factor [-]
- $N$  : number of theoretical plates [-]
- $n$  : parameter used in Freundlich adsorption isotherm [-]

S : skewness defined by Eq.(5)  
 t : elution time [min]  
 $t_0$  : retention time of unretained compound [min]  
 $t_R$  : retention time [min]  
 w : peak width [min]  
 $\mu_n$  : nth order central moment [-]

### 참 고 문 헌

1. 정성택, 노경호, 박영광, "Taxol의 연구개발동향", 정밀화학, 통권 45호, 여름호, pp. 34-42(1997).
2. 노경호, 정용안, "천연식물에 포함된 유용성분의 의학적 이용 (I)", 정밀화학, 통권 47호, 신년호, pp. 16-25(1998).
3. 노경호, 최대기, 황경엽, 이윤용, "크로마토그래피를 이용한 분리", 화학공업과 기술, 8, 425(1990).
4. 최두찬, 최대기, 노경호, 공업화학, 7, 985(1996).
5. L. R. Snyder, "Principles of Adsorption Chromatography", Marcel Dekker, Inc., New York(1968).
6. K. H. Row and A. V. Larin, *Korean J. Chem. Eng.*, 12, 442 (1995).
7. K. H. Row and A. V. Larin, *Korean J. Chem. Eng.*, 12, 512 (1995).
8. 이종호, 노경호, "제조용 액체 크로마토그래피에서 시료량이 Column의 효율과 분리도에 미치는 영향", 인하대학교 산업과 학기술연구소 논문집 (1998).
9. N. T. Miller, *J. Chromatogr.*, 550, 301(1991).
10. J. P. Foley and J. G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 55, 730(1983).
11. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", John Wiley & Sons, Inc., New York(1979).
12. 이주원, 노경호, 공업화학, 8, 403(1997).
13. 이주원, 노경호, 화학공학, 35, 769(1997).