

모세관 기체 크로마토그래피에서 HETP에 영향을 미치는 인자

나 영진·정용안·†노경호
초정밀분리기술센터, 인하대학교, 화학공학과
(접수 : 2002. 1. 19., 게재승인 : 2002. 2. 18.)

Factors Affecting HETP in Capillary Gas Chromatography

Young Jin Ra, Yong An Jung, and Kyung Ho Row†

Center for Advanced Bioseparation Technology, Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2002. 1. 19., Accepted : 2002. 2. 18.)

The elution profiles with different flow rates of mobile phase were experimentally measured to investigate the effects on HETP in capillary gas chromatography. Based on the correlation coefficient (r^2), the first and second moments as well as HETP were determined from the elution curves, and the parameters used in empirical equations were estimated. The empirical equations were expressed in terms of mobile phase velocity, and the theoretical Golay equation was considered. The samples were d-limonene and perillyl alcohol, potential anticancer agent mainly was contained in the peel of orange. From the experimental results, HETP of the samples were increased with mobile phase velocities. The correlation coefficient of d-limonene was in the range between 0.8265 and 0.8465, while that of perillyl alcohol was between 0.9353 and 0.9374. The total HETP was composed of H_g , H_l and H_c , and H_g had the greatest effect on HETP, but H_l showed a negligible effect. In terms of HETP, the optimum velocity of mobile phase was present.

Key Words : HETP, Golay Equations, d-limonene, perillyl alcohol

서론

크로마토그래피는 여러 성분이 혼합되어 있는 물질을 관을 통과 시킴으로써 적절한 시간안에 각각의 성분으로 분리하고자 하는 것이 목적이다. 두 피크 사이의 분리도는 체류시간의 차이와 피크 평균 폭의 비율로서 정의된다(1).

초기의 크로마토그래피는 기체와 증기의 혼합물을 분리하기 위해서 활성탄과 같은 고체 흡착제에서 선별적인 흡탈착을 이용하였다. 이러한 다공성 고체는 많은 표면적을 갖고 있기 때문에 고순도 분리가 가능하게 된다(2). 그러나 세공의 크기와 분포로 인해서 체류시간이 길어지고 운반체가 액체이면 관을 지나가는데 많은 압력이 걸리게 된다. 이러한 문제를 해결하는 방법중의 하나로서 모세관을 사용하게 된다. 특히 기체인 경우 모세관에서는 압력강하가 매우 작게 되며, 다공성 고체가 포함되지 않기 때문에 일반 충전탑보다 길이가 매우 길며, 보통 10 m 이상이 사용된다. 물질에 대한 선택도는 관 내벽에 고정상을 코팅하여 얻게 되며 시료에 따라 고정상이 다르게 된다. 충전탑에서의 체류 메커니즘은 van

Deemter식에 의하여 많은 매개변수들이 알려져 있지만(3), 비교적 모세관 기체 크로마토그래피에서 사용되는 Golay 식에 대한 연구는 많지 않았다.

귤이나 오렌지 등의 감귤류의 표피에 포함된 성분 중에서 d-limonene은 식물을 구성하는 필수적인 성분으로서 monoterpene 으로부터 자연적으로 생성된다(4). 또한 레몬과 같은 향기가 있기 때문에 음료, 제과, 제약, 화장품 산업에 주로 사용되었으나, 최근에는 세정제인 CFC 113 및 1,1,1 TCE가 규제물질로 지정됨에 따라 유망한 대체 세정제의 성분으로 사용되고 있으며(5), 최근의 연구에서는 d-limonene이 항암제로서의 효능이 있다는 연구결과가 발표되었다(6). 또한 감귤류를 구성하고 있는 성분들에는 d-limonene뿐만 아니라 다른 여러 가지 성분들이 포함되어 있다. 이 중에서 perillyl alcohol (POH) 의학적으로 항암제로서의 치료 효과가 입증됨으로써 사용 범위가 확대되고 있으며, 유방암, 백혈병, 대장암, 췌장암, 폐암 등의 치료효과가 뛰어나며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(7-8). POH는 (R)-(+)-POH, (S)-(-)-POH의 이성질체를 가지고 있으며 식물로부터 직접 추출, 화학적 구조가 비슷한 물질로부터 합성 및 박테리아와 같은 세균들로부터 세포배양에 의해서 얻어지고 있다(9).

본 연구에서는 d-limonene 및 POH를 모세관 기체 크로마토그래피를 사용하여 분석하고, 용출곡선으로부터 Golay 식에서의 매개변수를 계산하여 이들 물질들에 대한 체류 메커

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

니즘을 HETP에 의하여 규명하고자 한다.

이론적 배경

평균 단높이인 H는 다양한 부분들의 합으로 다음과 같이 Golay 식으로 나타낼 수 있다.

$$H = H_g + H_l + H_c \quad (1)$$

H_g 와 H_l 는 기체상과 액체상이 띠넓힘 (band broadening) 현상에 각각 기여하는 부분, H_c 는 관 외의 기체부분으로 인한 기여를 나타낸다. 모세관에서 H_g 는 Golay 식에 의해 배출구의 운반기체의 속도인 u 와 관련되어 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$H_g = \left(\frac{2D_g}{u} + \frac{(1+6k+11k^2)}{96(1+k)^2} \cdot \frac{d_c^2}{D_g} \cdot u \right) f \quad (2)$$

$$= \left(\frac{B'D_g}{u} + \frac{C_g u}{D_g} \right) f$$

여기서 k 는 체류인자이고, d_c 는 관의 지름, f 는 압력보정인자이다. f 는 압력강하가 낮을 때에는 거의 1에 가깝고, 도입부 압력이 매우 높을 때의 최대치는 9/8이다. D_g 는 대기압 상태에서 이동상에 들어있는 용질의 확산계수이다. H_l 는 다음의 관계로부터 나타낼 수 있다.

$$H_l = \frac{6k}{(1+k)^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_l} \cdot ju = C_l \cdot ju \quad (3)$$

여기에서 d_f 는 액체 막의 평균 두께이며, D_l 는 액체 정지상에 있는 용질의 확산계수이고, j 는 기체 압축률의 보정인자이다. HETP에 미치는 장치의 영향을 주로 주입속도에 따른다고 가정하면, H_c 는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$H_c = \frac{\sigma_i^2 u^2}{(1+k)^2 L} = Du^2 \quad (4)$$

여기에서 σ_i^2 는 주입속도의 편차이고, L 은 관의 길이이다. f 값이 1에 근사하면 HETP에 대한 실험 데이터는 아래 식에 맞게 된다.

$$H = \frac{B'D_g}{u} + C_g \cdot \frac{u}{D_g} + C_l \cdot ju + Du^2 \quad (5)$$

체류시간 t_R 과 피크의 폭인 w 로부터 이론단수 N 은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$N = 5.54 \times \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (6)$$

여기에서 $w_{1/2}$ 는 피크 중간 높이의 폭이다.

또한 HETP값은 관의 길이를 이론단수로 나눈 값이며, 다

음과 같이 나타낼 수 있다.

$$HETP = \frac{N}{L} \quad (7)$$

모멘트방법에서의 n^{th} absolute moment를 μ_n , n^{th} central moment를 μ'_n 이라고 하며 각각의 정의 식은 아래와 같다.

$$\mu_n = \frac{\int_0^\infty C_{\text{exp}} t^n dt}{\int_0^\infty C_{\text{exp}} dt} \quad (8)$$

$$\mu'_n = \frac{\int_0^\infty C_{\text{exp}} (t - \mu_1)^n dt}{\int_0^\infty C_{\text{exp}} dt} \quad (9)$$

여기에서 C_{exp} 는 실험에 의한 농도분포곡선이며, t 는 시간이다. 따라서 모세관 기체 크로마토그래피에 시료를 주입하여 얻은 용출곡선으로부터 1,2차 모멘트를 구할 수 있게 된다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용된 표준 시료 물질인 perillyl alcohol은 Aldrich. Co., d-limonene은 Sigma Co.에서 각각 구입하였으며, 이들 물질을 메탄올에 10mg/ml의 농도로 녹여 사용하였다. 분석에 사용된 GC 기기는 Hewlett-Packard(HP) Model 5890 gas chromatography(GC) system을 사용하였고, 검출기는 flame ionization detection(FID) system, 시료의 주입부피는 1 μ L, 주입구 온도 250 $^{\circ}$ C, 검출기 온도 300 $^{\circ}$ C, 오븐의 온도는 50 $^{\circ}$ C에서 80 $^{\circ}$ C까지 10 $^{\circ}$ C/min, 80 $^{\circ}$ C에서 250 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C/min의 속도의 승온 온도 프로그램을 적용하고, 운반기체인 N_2 의 유속은 0.2 - 1.4 mL/min의 속도로 HP-5(crosslinked 5% PH ME siloxane, 30 m \times 0.32 mm) capillary column에서 각각 분석하였다. Data acquisition system은 HP 3365 Series II CHEMSTATION(Version. A. 03. 34)를 사용하였다.

결과 및 고찰

Golay 식에서 사용된 매개변수를 추정하기 위해서 d-limonene과 POH 두 가지 물질을 기체크로마토그래피에서 유량을 각각 0.2에서 1.4 mL/min로 변화시키면서 각각의 유량에 대한 체류시간(t_R)과 피크의 폭($w_{1/2}$)을 측정하였다. 관내부의 평균 온도인 100 $^{\circ}$ C에서 유량을 유속으로 환산하면 4.94, 7.24, 9.46, 11.6, 13.6, 17.5, 21.2, 24.7 및 28.0 cm/s으로 된다. 시료인 d-limonene 및 POH를 동일한 모세관 기체 크로마토그래피 조건으로 일정한 유속에 대해서 실험으로부터 측정된 값(t_R , $w_{1/2}$)과 식 (6), (7), (8), (9)에 의해서 N , HETP, μ_1 및 μ'_2 을 구하였으며, 이를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 식에 의해서 구한 μ_1 은 수학적인 평균값의 정리에 의하여 각각의 유속에 대해서 실험으로부터 측정된 d-limonene과 POH의 체류시간과 거의 동일하게 나타났으며, μ'_2 (skewness)

Table 1. Parameters of d-limonene and POH

	flow rate(ml/min)	u (cm/s)	w _{1/2} (min)	t _r (min)	N	HETP (mm)	μ ₁	μ ₂
d-limonene	0.2	4.94	0.075	16.246	259,944	0.12	16.246	0.001013
	0.3	7.24	0.056	13.491	321,530	0.09	13.489	0.000652
	0.4	9.46	0.048	11.996	346,019	0.09	11.995	0.000198
	0.5	11.60	0.043	10.807	349,932	0.09	10.807	0.000327
	0.6	13.60	0.040	9.885	338,300	0.09	9.884	0.000276
	0.8	17.50	0.054	8.542	138,600	0.22	8.535	0.000543
	1.0	21.20	0.052	7.744	122,900	0.24	7.736	0.000481
	1.2	24.70	0.046	7.145	133,700	0.22	7.137	0.000433
	1.4	28.00	0.047	6.712	113,000	0.27	6.698	0.000506
S-POH	0.2	4.94	0.089	23.319	380,320	0.08	23.301	0.000870
	0.3	7.24	0.088	20.409	297,981	0.10	20.379	0.000865
	0.4	9.46	0.079	19.022	321,194	0.09	18.983	0.000964
	0.5	11.60	0.079	17.786	280,810	0.11	17.747	0.000853
	0.6	13.60	0.096	16.797	169,600	0.18	16.756	0.001764
	0.8	17.50	0.093	15.338	150,700	0.20	15.272	0.003484
	1.0	21.20	0.098	14.493	121,200	0.25	14.422	0.003785
	1.2	24.70	0.107	13.697	90,800	0.33	13.607	0.005389
	1.4	28.00	0.097	13.103	101,100	0.30	13.029	0.004045

Table 2. Parameters of HETP Equations (d-limonene)

Equation	C ₀	C ₁ (B')	C ₂ (C')	C ₃ (C _i)	C ₄ (D)	r ²
1. $H=B'D_g/u+C'u/D_g+C_1u+Du^2$	-	0.470156	0.000043	0.000000	0.000012	0.826501
2. $H=C_0/u+C_2u+C_3u^2$	-	0.031937	0.000642	0.000011	-	0.826336
3. $H=C_0+C_1/u+C_2u+C_3u^2$	0.000000	0.031936	0.000642	0.000011	-	0.826336
4. $H=C_0+C_1/u+C_2/u^2+C_3u+C_4u^2$	0.000000	0.000000	0.168445	0.000804	0.000007	0.846542

Table 3. Parameters of HETP Equations (POH)

Equation	C ₀	C ₁ (B')	C ₂ (C')	C ₃ (C _i)	C ₄ (D)	r ²
1. $H=B'D_g/u+C'u/D_g+C_1u+Du^2$	-	0.151044	0.000064	0.000000	0.000003	0.935329
2. $H=C_0/u+C_2u+C_3u^2$	-	0.007767	0.001103	0.000002	-	0.935206
3. $H=C_0+C_1/u+C_2u+C_3u^2$	0.000000	0.007712	0.001105	0.000002	-	0.935198
4. $H=C_0+C_1/u+C_2/u^2+C_3u+C_4u^2$	0.000000	0.000000	0.052426	0.001108	0.000002	0.937423

는 이동상의 유속에 따라서 다소 증가하고 있음을 보였다. 또한 유속이 증가함에 따라 이론단수(N)는 감소하였으며, HETP는 증가하고 있음을 나타내고 있다. 이는 피크의 폭이 모세관 기체 크로마토그래피에서는 매우 작고 거의 일정하지만 유속이 증가함에 따라서 체류시간이 감소하여 이론단수로 표시되는 관효율이 감소하고 따라서 HETP는 증가하게 된다.

Table 2에서는 d-limonene에 대해서 HETP를 유속에 대한 관계식으로 비례, 반비례, 제곱의 함수형태로 나타냈으며, ExcelTM에 내장된 해찾기(Solver)를 사용하여 각각의 매개변수를 구하였다. C₀, C₁(B'), C₂(C'), C₃(C_i) 및 C₄(D)는 식 (5)에서 사용된 상수값이다. 유속의 값을 변화시키면서 체류시간 및 피크 폭으로부터 HETP를 계산 하였으며, f는 압력강하를 나타내는 것으로 실험에 있어서 관의 출구와 입구에서 압력강하가 거의 없는 것으로 가정하여 값을 1로 하였다. d_c는 관의 지름으로 0.32 mm, d_r는 컬럼 내부의 액체 막의 평균 두께로 제조회사에서 제시한 0.25 μm이며, j는 기체의 압

축변화가 없는 것으로 가정하여 1로 하였다. 또한 σ_i는 시료 주입시의 과정이 매우 빠른 시간 내에 이루어지기 때문에 0으로 하였다. 이러한 값들을 상수로 하였고, 이동상에서의 d-limonene, perillyl alcohol의 확산계수 D_g는 0.07, 0.06 cm²/sec로 가정하였다.

상관도(r²)는 회귀분석으로 구해진 곡선이 얼마나 잘 맞는지를 나타내는 척도로서 이것은 0에서부터 1사이의 값을 갖는다. 보통 0.8이상 이 되어야만 상관관계가 있으며 1이 되면 완벽하게 상관관계가 있음을 의미한다(10). Table 2에서 표시된 실험식에 대해서 구한 상관도는 0.8265에서 0.8465범위에 있었으며 실험식의 종류에 대해서 큰 차이를 나타내지는 않았지만, 상관도 값이 다소 작았으며 이는 실험과정 및 계산과정에서의 오차도 원인이지만 다른 종류의 실험식도 고려해 볼 수 있다. Table 2와 동일한 방법으로 Table 3에서는 POH에 대해서 HETP를 적용하였다. 상관도는 0.9353에서 0.9374 범위의 값을 POH가 d-limonene에 비해서 상관관계가 크다는 것을 알 수 있다. Table 2와 Table 3에서 구한 상관도 값은

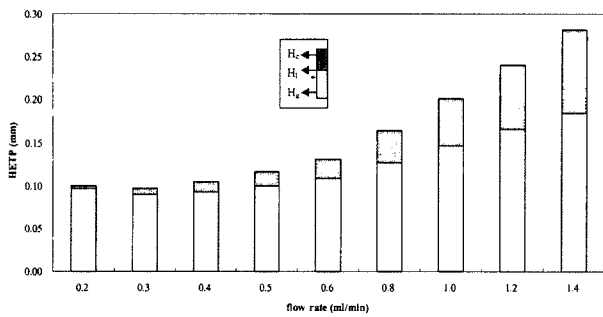


Figure 1. Effect of H_g , H_l and H_c on the HETP (d-limonene).

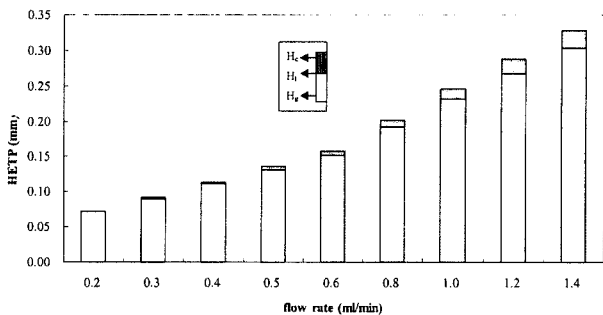


Figure 2. Effect of H_g , H_l and H_c on the HETP (POH).

이동상의 유속에 반비례하는 매개변수를 갖는 값들이 가장 큰 값을 나타냈으며, 유속에 비례 또는 제곱에 비례하는 부분들의 매개변수 값들이 작은 값을 나타내었다. 이는 유속에 대한 HETP의 영향이 전체적으로 반비례하고 있다는 것을 보여주고 있다

HETP는 한 단의 길이에 상응하는 높이로서 일정한 관의 길이에 단수가 많을수록 피크의 형태는 날카롭게 되며 가능한 이 값은 작게 되어 관의 효율을 증대하여 궁극적으로 물질간의 분리도를 개선시키는 것이 중요하다. 충전물이 포함되어 있지 않는 모세관 기체 크로마토그래피에서는 HETP를 H_g , H_l 및 H_c 로 나눌 수 있다. d-limonene에 대해서 실험으로부터 측정된 HETP를 H_g , H_l 및 H_c 의 합으로 나타내었으며, 이들 값이 전체 HETP에 어떠한 영향을 미치는지를 고찰하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 HETP는 $H_g > H_c > H_l$ 의 순서로 영향을 주고 있었으며, 유속이 증가함에 따라 H_g 와 H_c 는 증가하였지만, H_l 은 거의 변화가 없었다. 따라서 H_l 은 시료가 액체상에서 체류하여 락스현상(adsorption)에 기여하는 부분으로 HETP에는 거의 영향을 주지 않음을 알 수 있다. POH에서도 d-limonene과 마찬가지로 H_g 가 HETP에 가장 크게 영향을 주고 있었으며, H_l 은 거의 영향을 주지 않고 있었다 (Figure 2. 참조). 유속이 증가함에 따라 H_g 와 H_c 는 증가하였지만 H_l 은 거의 변화가 없어 유속증가에 상관없이 HETP에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 그러나 d-limonene과는 달리 POH에서는 유속증가에 따라서 H_g 가 차지하는 부분이 H_c 보다 훨씬 커져 시료가 기체상에서 확산이 락스현상에 기여하는 주요 부분으로 HETP에 크게 영향을 주고 있었다.

van Deemter 식과 마찬가지로 Golay 식에서 HETP는 이동상 유속의 함수로 표시되며 이는 최적 이동상의 유속이 존재할 수 있다는 것을 의미한다. 이동상의 유속을 실험과 Golay 식에 의하여 계산된 HETP에 대해서 표시한 결과를 Figure 3

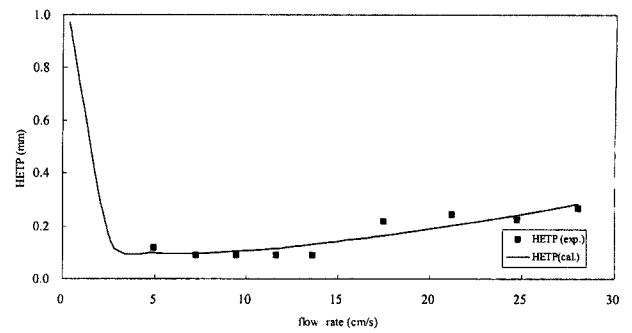


Figure 3. Comparison of calculated and experimental HETP of d-limonene.

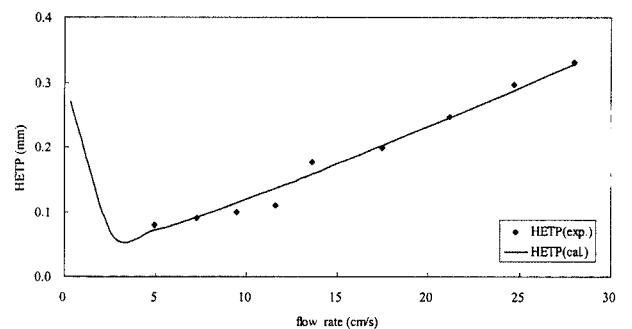


Figure 4. Comparison of calculated and experimental HETP of POH.

(d-limonene), Figure 4 (POH)에 나타내었다. Figure 3에서 볼 수 있듯이 최적이동상의 유속 (5 cm/sec)을 지나서는 유속이 증가함에 따라 HETP값이 증가하였고 실험값과 계산값이 비교적 잘 일치하였다. 유속이 매우 낮은 범위에서는 체류시간이 매우 증가하여 비현실적이기 때문에 계산식에 의해 HETP를 표시하였다. 유속이 0에 근접하는 부분에서는 HETP값이 크게 증가하는 것을 알 수 있었고, 이는 축방향 진행에 비해 다양한 확산과 저항이 차지하는 비중이 증가함으로써 인해 락스현상이 발생하였으며 HETP값의 급격한 증가를 초래했다. Figure 4에서도 마찬가지로 HETP와 유속의 관계를 보여주고 있다.

요 약

모세관 기체 크로마토그래피에서 HETP에 영향을 미치는 인자를 고찰하기 위해서 이동상의 유량에 대한 체류분포곡선을 측정하였다. 상관도(r^2)를 기준으로 측정된 분포곡선으로부터 1,2차 모멘트와 HETP를 계산하여, 실험식의 매개변수를 추산하였다. 실험식은 이동상의 유속에 대한 함수로서 표시되었으며 이론적인 Golay 식도 고려하였다.

실험에 사용된 시료는 꿀 표피에 많이 포함된 향암제인 d-limonene와 POH이었다. 실험결과에 의하면, 유속이 증가함에 따라 d-limonene과 POH의 HETP가 증가하였다. d-limonene의 상관도는 0.8265에서 0.8465이었고, POH에서는 0.9353에서 0.9374범위를 나타내었다. H_g , H_l 및 H_c 를 각각 계산하여 전체 HETP에 미치는 영향을 고찰한 결과, d-limonene과 POH의 H_g 가 HETP에 가장 큰 영향을 주었지만, H_l 은 거의 영향을 미치지 않았다. HETP에 관하여 최적 이동상의 유속이 존

재하였다.

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 인하대학교와 초정밀분리기술센터의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Hadden, Nina, Fred Barmann, Fred MacDonald and Miner Munk (1971), Basic Liquid Chromatography, Varian Acrograph.
2. Berezkin, V. G. , Irina V. Malyukova and Damien S. Avoce (2000), Use of equations for the description of experimental dependence of the height equivalent to a theoretical plate on carrier gas velocity in capillary gas?liquid chromatography, J. Chrom. A, 872, pp111-118.
3. Jung, Y. A. and K.H. Row (1998), Extraction and purification of perillyl alcohol from Korean orange peel by reversed-phase high-performance liquid chromatography, J. Chrom. A, 828, 445-449.
4. Mark, A. M., L. T. Amy (1996), Inhibition of metabolic activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by limonene, Cancer Letters, 104, 211.
5. Jung Y.A. and K.H. Row (1998), Extraction and Purification of Perillyl Alcohol from Korean Orange Peel by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, J. Chromatogr., Vol.828, pp.445-449.
6. Zhibin, R., N. G. Michael (1994), Inhibition of ubiquinone and cholesterol synthesis by the monoterpene perillyl alcohol, Cancer Letters, 76, 185.
7. Reddy, B. S., C-X.Wang, H. Samaha, R. Steele, R. Lubet, G. J. Kelloff, and C. V. Rao (1997), Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol, Cancer Research, 57, 420.
8. Stark, M. J., D. B. Yvette, H. M. Jamie, A. S. Ayoubi, L. C. Ramela (1995), Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol, Cancer Letters, 96, 15.
9. Kang, D.H., M.S. Yeo, S.K. Kim, H.S. Yun, Y. M. Koo, and K.H. Row (2001), Chromatographic Analysis of Ceramide III of *Saccharomyces cerevisiae* , Korean J. Chem. Eng., in review.
10. Row, K. H. (2001), Excel for Chemical Engineering , pp118-136.