

# HPLC를 이용한 Langmuir Parameter의 추산

이선묵<sup>1</sup>, 윤태호<sup>2</sup>, 김인호<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 60616, Illinois Institute of Technology, Chicago, Illinois, USA

<sup>2</sup> 305-764, 대전광역시 유성구 궁동 충남대학교 화학공학과

(접수일자 : 2003. 4. 18 / 채택일자 : 2003. 5. 28)

## Simple estimation of Langmuir parameters by HPLC experiments

Sun-Mook Lee<sup>1</sup>, Tae-Ho Yoon<sup>2</sup> and In-Ho Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 60616, Illinois Institute of Technology, Chicago, Illinois, USA

<sup>2</sup> 305-764, Dept. Chem. Eng., Chungnam Nat'l Univ., Yusung-Gu, Gung-Dong, Daejeon, Korea

### 요 약

HPLC 칼럼을 사용하여 단일성분의 등온흡착 곡선을 구하는 실험을 수행하였으며, 파라미터를 계산하기 위하여 equilibrium-dispersive model을 Macsyma<sup>®</sup>(Macsyma Inc., Arlington, MA, USA.)로 전산모사하여 파라미터들을 계산하였다. 전산모사와의 적합성을 검증하기 위하여 시료로 카페인을 사용해 샘플의 과량주입 실험을 통하여 실험치와 계산치를 비교하였으며, 시료의 농도와 이동상의 유속 변화에 따른 용출 피크들의 변화를 관찰하였다.

ABSTRACT : A simple method of isotherm determination for HPLC is discussed. The equilibrium-dispersive model describing the behavior of elution peaks in HPLC for single component is solved numerically by using PDE solver Macsyma<sup>®</sup>(Macsyma Inc., Arlington, MA, USA) and compared to the experimental data obtained in overloaded isocratic chromatography with caffeine as model species. The effect of sample concentration and flow velocity on the band profiles of elution peaks are described.

**keywords** : HPLC, Langmuir isotherm parameter, Simulation, Overloading

### 1. 서 론

크로마토그래피의 모델링은 최적의 실험조건을 구하는데 필수적이며, 분리공정에 있어서 최적의 파라미터에 대한 정보를 신속하게 제공한다. 또한, 크

로마토그래피 공정에 있어 주어진 실험조건하의 파라미터에 대한 영향을 쉽게 예측할 수 있도록 한다[1,2]. Equilibrium-dispersive model은 고정상과 이동상간의 순간적인 평형을 가정하여 실험에 적용될 수 있으며, 피크의 폭이 넓어지는 현상을 시료의 분산계수로

\* corresponding author : ihkim@cnu.ac.kr

부터 해석할 수 있다. 이러한 가정은 MPLC나 HPLC와 같이 칼럼의 단효율이 커질수록 부합하는 경향을 보인다[3,4].

고정상과 이동상간의 시료 농도에 대한 관계는 등온흡착 곡선으로부터 유도되어질 수 있는데, Langmuir 형태의 등온흡착 곡선이 실험적으로 많이 선호된다[5]. Langmuir isotherm 중 2개의 파라미터는 여러 가지 실험방법으로 계산되는데, 그 중에서도 체류시간을 이용한 방법(RTM)이 선호되고 있다[6]. 이러한 등온흡착 곡선은 현재 활발하게 연구가 진행되고 있는 SMB 크로마토그래피에 있어 필수적인데, 이것은 SMB 크로마토그래피의 운전조건을 결정짓는 중요한 파라미터들이 시료의 등온흡착곡선으로부터 계산되어지기 때문이다. 이러한 SMB 크로마토그래피는 기존의 회분식 크로마토그래피에 비하여 연속적인 분리가 가능하므로, 단위 고정상당 생산효율이 높으며, 용매의 절감을 실현할 수 있다[7,8].

본 연구에서는 Macsyma<sup>®</sup>를 이용하고 크로마토그램의 시뮬레이션을 통하여 비교적 단순한 방법으로 Langmuir 등온흡착곡선의 파라미터들을 계산하고자 하였으며, 신속한 시뮬레이션을 통하여 파라미터들을 보정하고, 이로부터 크로마토그램이 나타내어지도록 하였다.

## 2. 이 론

Langmuir parameter의 계산을 수행하기 위하여 용출되는 피크의 형태는 equilibrium-dispersive model로부터 추산되어지며, 이때 물질수지식은 다음과 같다[9].

$$\begin{aligned} \frac{\partial C_i}{\partial t} + F \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} \\ = D_{i,a} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \end{aligned} \quad (1)$$

여기서, C = 이동상중에 시료의 농도,  
q = 고정상중에 시료의 농도,  
i = 시료중의 성분,  
z = 칼럼의 길이,  
t = 시간,  
u = 이동상의 선속,

F = 상비로써  $\frac{1-\epsilon}{\epsilon}$ 이며,  $\epsilon$ 는 고정

상중의 공극을

Da = 축방향 분산계수이다.

또한 Da는 단일성분인 경우 다음과 같이 나타내어진다.

$$Da = Hu/2 \text{이다.} \quad (2)$$

등온흡착곡선을 계산하기 위하여, 실험적으로 잘 알려진 Langmuir isotherm이 많이 사용되어지며 단일성분에서 다음과 같이 표현된다.

$$q = \frac{aC}{1+bC} = \frac{bq_s C}{1+bC} \quad (3)$$

여기서, a, b = Langmuir isotherm parameters,

qs = saturation capacity, a/b로써 고

농도 이동상에서의 고정상에 흡착량이다[10].

체류시간을 이용한 계산법(Retention Time Method ; RTM)은 Langmuir isotherm parameter를 구하는 첫 번째 방법으로 다음과 같은 식을 사용하였다.

$$a = \frac{t_r - t_0}{F t_0} \quad (4)$$

$$L_f = \left[ 1 - \frac{\sqrt{t_f - t_0 - t_p}}{t_r - t_0} \right]^2 \quad (5)$$

$$b = \frac{L_f F v (t_r - t_0)}{n_m} \quad (6)$$

여기서, tR = 미량의 시료를 주입했을 때 체류 시간,

t0 = 이동상의 불감시간,

tf = 피크 전면의 체류시간,

tp = 시료 주입에 의한 펄스의 폭,

Fv = 이동상의 유속,

nm = 주입된 시료의 양이다.

등온흡착곡선의 파라미터를 다른 방법으로 계산

하기 위하여 Macsyma<sup>®</sup>를 사용하였으며, 이때 식(1)부터 (3)을 이용하였다[11].

### 3. 실험재료 및 방법

실험에 사용된 시료는 카페인(Sigma, USA)이었으며, 이동상은 HPLC 등급의 메탄올과 물(Duksan, Korea)을 25:75의 부피비로 혼합하여 사용하였다. 또한, 실험에 사용하기 전에 0.2 $\mu$ m 필터로 여과하여 30분간 탈기시킨 후 사용하였다.

HPLC는 고압펌프(M-930, Younglin, Korea), UV 가변파장 검출기(M-720, Younglin, Korea) 그리고, 시료주입장치(7725i, Rheodyne, USA)를 부착하였다. 칼럼은 Nova-pak C18(내경 3.9 mm×길이 150 mm)이었으며, 충전된 고정상의 입자크기는 4  $\mu$ m, 평균 기공크기는 60 Å이었다. 용출실험에서 크로마토그램은 254 nm 파장에서 흡광도를 Autochro-Win (Younglin, Korea)를 사용하여 PC를 통해 기록하였다. 모든 실험은 등용매 조건이었고, 시료의 주입량은 20  $\mu$ l, 실온(25 °C)에서 수행되었다.

### 4. 실험결과

#### 4.1. 축방향 분산계수의 계산

축방향 분산계수는 HPLC 칼럼에 소량의 시료를 주입하여 용출하는 크로마토그램의 폭 변화로부터 계산되었다. 일반적인 HPLC 칼럼에서 축방향 분산계수는  $1 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/s의 범위를 갖는데[4], 식 (2)로부터 Da는 소량의 시료를 주입하였을 때  $3.43 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/s로 계산되었으며, 이 값은 저분자량 물질의 값과 잘 일치하였다.

#### 4.2. Langmuir isotherm parameter의 계산

RTM으로 식 (3)의 a, b값을 계산하기 위하여 각 농도별로 소량의 시료를 주입하여 크로마토그램을 얻었으며, 이때 이동상의 유속은 0.7 ml/min이었다(Figure. 1). 식 (4)-(6)을 이용하여 a, b를 계산하였으며, 필요한 파라미터값들은 Table 1에 나타내었다. 이로부터 얻어진 Langmuir 등온흡착 곡선은 다음과 같다.

$$q = \frac{4.44C}{1 + 0.19C} \quad (7)$$

식 (7)의 등온흡착곡선을 통하여 식 (1)과 (3)을 Macsyma<sup>®</sup>로 시뮬레이션을 수행한 결과를 Figure 2에 나타내었으며, 실험치와 계산치간에 많은 편차를 보였다. 따라서, 실험치와 더욱 잘 부합하도록 Langmuir isotherm parameter를 구하기 위하여 식 (8)을 이용해 a 값의 계산을 수행하였다[12].

$$a = \frac{t_r \times u_0 / L - \varepsilon}{(1 - \varepsilon) \times \beta} - 1 \quad (8)$$

여기서, L = 칼럼의 길이,

$u_0$  = 이동상의 선속,

$\beta$  = 입자의 기공도,

$\varepsilon$  = 칼럼의 공극율이다.

시료의 농도가 등온흡착 곡선의 선형영역에 위치하는 경우 얻어진 체류시간(tR)은 Figure 1에 나타낸 바와 같이 피크의 형태가 좌우 대칭이며, 이 때 얻어진 tR 값은 피크의 최상점에서의 값이다. 이 값을 식 (8)에 넣어 계산한 경우, 구해진 a 값은 7.45였다. 그리고, b 값을 얻기 위하여 PDE solver인 Macsyma<sup>®</sup>를 사용하였고, 얻어진 b 값들을 사용하여 얻어진 크로마토그램을 Figure 3에 나타내었다. Figure 3에 보인 바와 같이 b 값이 2.1일때 실험치와 계산치는 잘 부합하였기에 다음과 같은 등온흡착 곡선으로 결정하였다.

$$q = \frac{7.45C}{1 + 2.1C} \quad (9)$$

#### 4.3. 시료의 농도와 이동상의 유속에 따른 크로마토그램의 변화

Figure 4에 등용리 조건에서 각기 다른 농도의 카페인에 대한 크로마토그램의 계산치와 실험치를 나타내었으며, 각 농도는 0.1, 0.2, 0.25 mg/ml이었다. Figure 4에 나타난 바와같이 실험치와 계산치는

일차하였으며, 농도가 증가할수록 시료의 체류시간이 감소하고 용출되는 피크의 형태는 비대칭성을 보였다. 이동상의 유속을 변화시켰을 경우, 용출되는 피크를 Figure 5에 나타내었으며, 이동상의 유속이 감소할수록 시료의 체류시간은 감소하고, 용출되는 피크의 형태는 점차로 넓어짐을 보였다. 높은 유속에서는 크로마토그램상의 피크가 좁아지는 현상을 보이는데 이것은 고정상과 이동상의 접촉시간이 감소함에 기인하는 것이다.

## 5. 결 론

단일성분계에서 equilibrium-dispersive model에 근거한 물질수지식으로부터 구해진 등온흡착곡선을 토대로 실험과 계산을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. RTM을 통한 Langmuir 등온흡착곡선의 파라미터들은 계산이 부정확하였고, Macsyma<sup>®</sup>로 계산되어진 Langmuir 등온흡착곡선의 파라미터로부터 계산된 크로마토그램은 실험치와 잘 부합하였다. 그리고, 시료의 농도가 증가하여 비선형 영역에 위치할수록 시료의 체류시간은 감소하고, 피크의 형태도 비대칭성이 증가하였다.

## 6. 감 사

본 연구는 초정밀 생물분리기술 연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

## 7. 참고문헌

1. Guan, H., Broyles, S. and Guiochon, G.: J. of Chromatogr., A, 734, 49(1996).
2. Lin, W. B., Wang, F. S. and Lee, W. C.: Ind. Eng. Chem. Res., 37, 11(1998).
3. Golshan-Shirazi, S. and Guiochon, G.: J. of Chromatogr., A, 658, 149(1994).
4. Lin, B., Ma, Z., Golshan-Shirazi, S. and Guiochon, G.: J. of Chromatogr., A, 500, 185(1990).
5. Felinger, A. and Guiochon, G.: J. of Chromatogr., A, 796, 59(1998).
6. Guiochon, G., Golshan-Shirazi, S. and Katti, A. M.: Fundamental of preprative and nonlinear chromatography, Academic Press, Boston, MA(1994).
7. Nicoud, R. M.: Pharm. Technol. Eur., 11, 28(1999).
8. Juza, M.: J. Chromatogr. A, 865, 35(1999).
9. Bellot, J. C. and Condoret, J. S.: Process Biochem., 26, 363(1991).
10. Felinger, A. and Guiochon, G.: AIChE Journal, 40, 4(1994).
11. Kim, I. H. Lee, S. M. and Whang, W. S.: Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 14, 371(1999).
12. Kim, I. H. and Kim, J. T.: Kor. J. Chem. Eng., 15, 6(1998).

## Table List

Table 1. Parameters used in RTD method

$t_R(\text{sec.})$	$t_0(\text{sec.})$	F	$t_r(\text{sec.})$	$t_p(\text{sec.})$	$n_m(\mu\text{g})$
216	70.98	0.46	210	1.2	0.04
215	70.98	0.46	208	1.2	0.04
214	70.98	0.46	206	1.2	0.04

Figure List

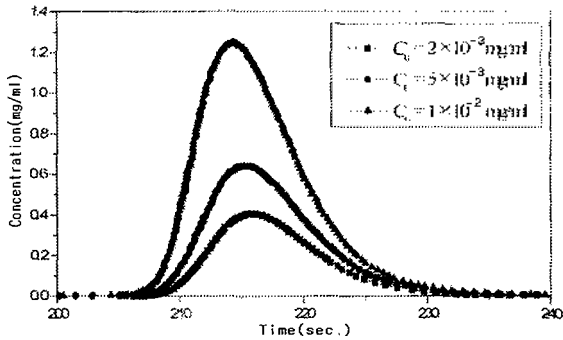


Fig. 1. Chromatograms of experiments at different concentration of caffeine; mobile phase flow rate=0.7 ml/min., sample loading amount=20 μl, wavelength=254 nm.

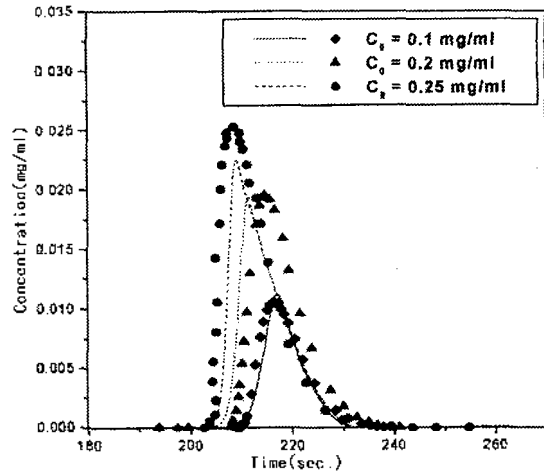


Fig. 4. Comparison of experiments and calculated values at different concentration of caffeine with a=7.45, b=2.1 of Langmuir isotherm parameters; mobile phase flow rate=0.7 ml/min., sample loading amount=20 μl, wavelength=254 nm.

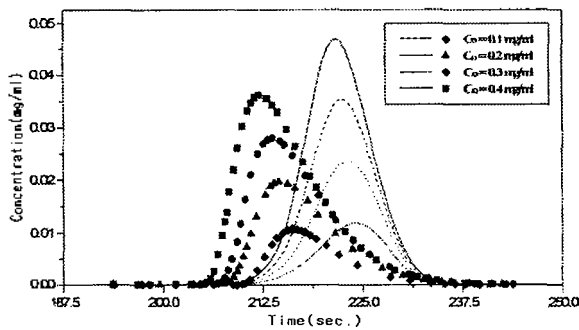


Fig. 2. Comparison of experiments and calculated values at different concentration of caffeine with a=4.44, b=0.19 of Langmuir isotherm parameters; mobile phase flow rate=0.7 ml/min., sample loading amount=20 μl, wavelength=254 nm.

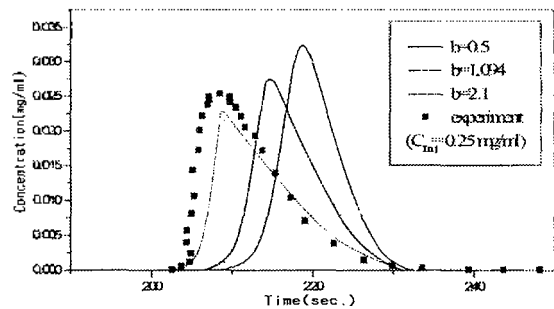


Fig. 3. Comparison of experiments and calculated values at different Langmuir isotherm parameter b with a=7.45; mobile phase flow rate=0.7 ml/min., sample loading amount=20 μl, wavelength=254 nm.

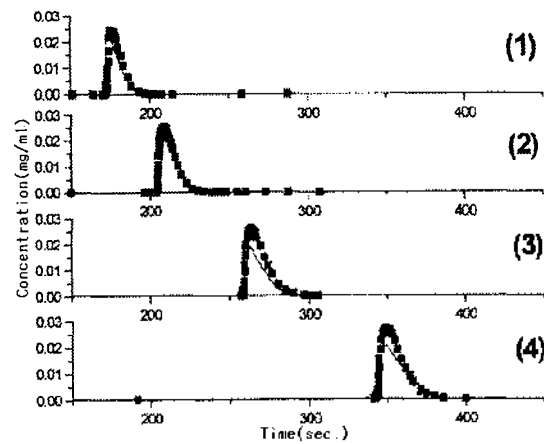


Fig. 5. Chromatograms of experiments and calculated at different flow rate of mobile phase ; sample loading amount=20 μl, wavelength=254 nm, wavelength=254 nm, mobile phase flow rate: (1)=0.8 ml/min, (2)=0.7 ml/min, (3)=0.5 ml/min, (4)=0.4 ml/min.