

## Frontal Analysis와 Pulse Input Method를 이용한 Loxoprofen의 등온흡착식 결정

이 은 · 박 준 섭 · † 김 인 호  
충남대학교 화학공학과  
(접수 : 2006. 6. 9., 게재승인 : 2006. 10. 11.)

### Determination of Loxoprofen Adsorption Isotherms by Frontal Analysis and Pulse Input Method

Eun Lee, Joon Sub Park, and In Ho Kim†  
Department of Chemical engineering, Chungnam National University, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea  
(Received : 2006. 6. 9., Accepted : 2006. 10. 11.)

Frontal analysis (FA) and Pulsed input method (PIM) have been frequently utilized to measure isotherm of single solute, as well as non-competitive isotherms of two solutes in chromatography (1). FA and PIM were used in this study as complementary methods to measure adsorption isotherms of loxoprofen racemate in HPLC. Prior to FA and PIM experiments, measurements of loxoprofen solubility were made at hexane/ethanol = 50/50, 80/20, 95/5 (v/v) with acetic acid (0.5%) for adjusting pH. The last composition (95/5) of hexane/ethanol allows us to separate loxoprofen racemate into two forms (retentate, extract). PIM and FA were used to determine the isotherms of re-and ex-loxoprofen.

**Key Words** : Loxoprofen enantiomer, frontal analysis, pulse input method

#### 서 론

흡착 분리 공정을 개발하는데 있어서 가장 중요한 전 단계의 하나는 화합물이 분리되는 흡착평형을 결정하는 것이다. 흡착평형 연구는 고정상과 이동상의 물질 사이의 상관관계 규명을 통해 액체 크로마토그래피를 분리정제 공정으로 확장시키기 위함이 그 목적이다(2).

등온흡착식을 결정하는 방법은 전통적으로 정적 방법에 의해 측정되는데, 이 방법은 용액에 흡착제를 넣어 용질의 농도변화를 측정하고 이로부터 등온흡착 곡선상의 점들을 각각 구하는 것이다. 그러나 이 방법은 정확한 측정을 위해서 필요한 용질과 흡착제의 양이 너무 많으며, 평형의 도달 여부에 대한 불확실성과 실험 시간이 많이 소요되는 단점을 지니고 있다(3).

이런 이유로 동적인 방법이 제시가 되는데 그 대표적인 방법이 Frontal Analysis (FA)이다(4). 칼럼의 주입구에서의

시료의 농도를 계단 함수적으로 변화시키면서 지속적으로 주입을 하면 하나의 파과곡선이 형성된다. 앞서 정적방법의 여러 가지 농도의 시료를 만드는 것은 시간과 노동의 소모가 많은 일이므로 액체 크로마토그래피의 구배 용매 조성 용출법을 사용하면 이러한 수고를 덜 수 있고 또한 농도변화도 정확하다.

Frontal analysis는 등온흡착 곡선을 계산하기 위하여 시간  $t_{0,plant}$ 에서 농도  $C^H$ 인 시료를 연속적으로 주입하면, 고정상과 이동상간의 동적평형에 도달할 때까지 흡착이 일어나게 된다. 이때 주입되어지는 시료의 양은 검출기를 통해 plateau에 도달할 정도로 충분한 양이어야 한다(Fig. 1.(A)). 이때 고정상에 흡착되어진 양은 식(1)로부터 수치적분을 통해 계산되어질 수 있다. 또한 장치상의 불용공간으로 인해 발생하는  $t_{0,plant}$ 는 칼럼을 탈착한 상태에서 실험적으로 계산할 수 있다.

$$V_{plant}(C^H - C^I) + V_c[\epsilon_s(C^H - C^I) + (1 - \epsilon_s)(q(C^H) - q(C^I))] = \dot{V} \int_0^{t_{el}^{max}} [C^H - C(t)] dt \quad (1)$$

여기서  $q^H = q(C^H)$ 이며,  $V_{plant}$ 는 칼럼의 부피,  $V_c$  칼럼내 공극의 부피,  $C$ 는 이동상 중의 샘플의 농도,  $\epsilon_s$ 는 총 공극

† Corresponding Author : Department of Chemical engineering, Chungnam National University, 220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

Tel : +82-42-821-5685, Fax : +82-42-822-8995

E-mail : ihkim@cnu.ac.kr

를,  $q$ 는 칼럼에 흡착된 성분의 총량,  $V$ 는 이동상의 유량  
 윗첨자 I, II는 농도 스텝이다.

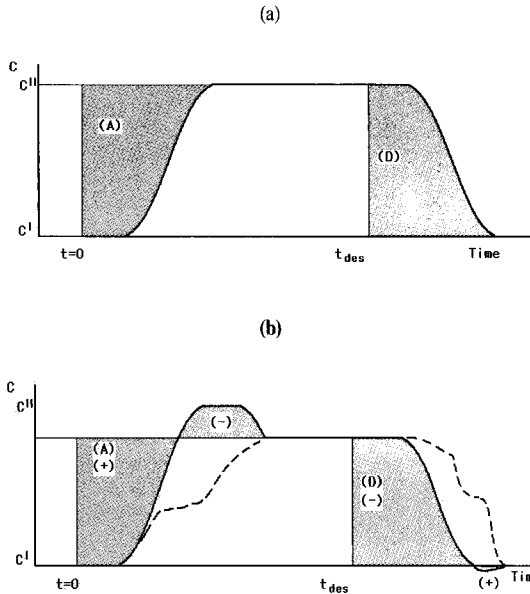


Figure 1. Typical breakthrough curves for adsorption and desorption of a pure component (a) and binary mixture (b) (Solid line: weakly adsorbed component (retentate), dashed line: more adsorbed component (extract)).

또한, 이 방법은 이성분계 혼합물에서의 경쟁적인 등온  
 흡착 곡선의 계산에도 적용되어질 수 있다. Fig. 1.(B)에서  
 고정상과 친화력이 약한 성분은 실선으로 나타내었으며,  
 친화력이 강한 성분은 점선으로 나타내었다. 이성분계 혼  
 합물의 용출곡선을 보면, plateau 상에서 오히려 주입되는  
 시료의 농도보다 높은 값을 나타내는 현상이 발생한다.  
 이것은 고정상 중에 흡착되어 있는 성분 중 친화력이 약  
 한 성분이 친화력이 강한 성분에 의하여 탈착되므로 발생  
 하게 되는데 “displacement effect”라고 한다. 대부분의 이성  
 분계 혼합물계에서 발생하는 현상이며, 이 면적에 해당하  
 는 만큼의 양을 흡착된 양에서 감해주어야 한다. 이를 산  
 술적으로 나타내기 위하여 각 면적에 양과 음의 표시를  
 하였다. 또한 Langmuir 등온흡착 거동을 따르는 경우 파과  
 곡선의 전면에서 급한 기울기가 관측이 되며, 변곡점 ( $t_R$ )  
 으로부터 흡착된 양을 식 (2)를 통해 계산할 수 있다.

$$t_R = t_{plateau} + t_0 \left[ 1 + \frac{1 - \epsilon_i}{\epsilon_i} \cdot \frac{q(C^{II}) - q(C^I)}{C^{II} - C^I} \right] \quad (2)$$

이와 같은 수식으로부터 흡착된 양을 계산할 수 있고, 등  
 온흡착 곡선의 계산에 필요한 매개변수들은 최소 자승법  
 으로 계산할 수 있다.

등온흡착식을 결정하는 다른 방법으로는 Pulse Input Method  
 (PIM)이 있다. PIM은 주입부피와 농도에 따른 용리띠의 변  
 화를 이용하여 체류인자와 평형상수를 구하여 등온흡착식  
 의 매개변수를 추산하는 방법으로서 컬럼의 phase ratio  
 ( $\beta$ )와 각 용리띠의 체류시간 ( $t_R$ )과 dead time ( $t_0$ )으로 평

형상수를 계산할 수 있다. 농도 변화에 따른 용리띠가  
 Langmuir 등온흡착식을 따른다면, 충분히 적은 양의 시료  
 일 경우 등온흡착곡선의 기울기는 초기 기울기와 비례하  
 는 선형 구간에 존재하게 되고, 고정상에 흡착된 시료의  
 양은 식 (3)와 같이 표현된다(5).

$$C_{Si} = H_i \cdot C_{Mi} \quad (3)$$

그리고,  $t_R$ 과  $H$ 와의 관계는 식 (4)와 같이 정의된다.

$$t_R = t_0 \cdot \left( 1 + \frac{(1 - \epsilon)}{\epsilon} \cdot H_i \right) \quad (4)$$

여기에서  $H$ 는 Henry 상수로서 고정상과 용리액간의 평형  
 상수이다.  $t_R$ 과  $t_0$ 는 실험에 의해 구할 수 있으며, 식 (4)에  
 의해서  $H$ 를 구하여 식 (3)에 대입하여 고정상에 흡착된 농  
 도 ( $C_S$ )를 구할 수 있다.

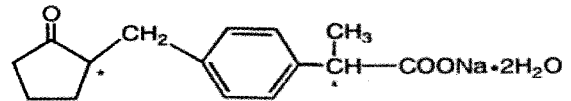


Figure 2. Chemical structure of loxoprofen and its two chiral centers.

비스테로이드 (NSAID) 계열의 소염진통제인 loxoprofen  
 을 이용하여 FA와 PIM을 수행하였다. Fig. 2에 loxoprofen  
 의 화학구조를 나타내었으며, 두 개의 chiral center로 인하  
 여 네 개의 enantiomer가 존재한다. Loxoprofen의 enantiomer  
 분리는 이미 보고되어 있으며(6), 고정상의 선택 또는 이동  
 상의 조성변화 등의 변수를 변화시킴에 따라 두 성분, 네  
 성분의 분리조작이 가능하다(7). 본 논문에서 사용된 용리  
 액 조건에서는 두 성분으로 분리가 되는 조건이며 FA와  
 PIM을 이용하여 등온흡착식의 매개변수를 결정하였다.

칼럼 안에서 이동상과 고정상의 관계를 나타내는 흡착평형  
 식으로는 Langmuir 등온흡착식 중 다성분계에서 사용되는 경  
 쟁적 등온흡착식을 사용하였다.

$$q_i = \frac{a_i C_i}{1 + \sum_{i=1}^n b_i C_i} \quad (5)$$

여기서,  $q_i$ 는 고정상에 흡착된 성분  $i$ 의 농도이고,  $a_i, b_i$   
 는 Langmuir 파라미터,  $C_i$ 는 이동상에서의 성분  $i$ 의 농도  
 이다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

시료인 loxoprofen racemate는 Sun Fine Chem. Ltd. (충북  
 오송)측으로부터 분말 형태로 공급받았으며, 별도의 정제  
 과정을 거치지 않고 이동상에 용해시킨 후 멤브레인 필터  
 (0.22  $\mu$ m GVPP, Millipore, USA)를 통한 여과 과정을 거

친 후 시료로서 사용하였다. 실험에 사용된 용매는 hexane (95% n-hexane, J. T. Baker, USA), ethanol (99.9%, J. T. Baker, USA), acetic acid (Assay min. 99.7%, Junsei Chem., Japan)를 사용하였으며 모든 용매는 0.22  $\mu\text{m}$ 의 멤브레인 필터로 걸러낸 후 용매 내에 잔존하는 공기를 제거하기 위해 sonicator (Brason, USA)로 20분간 탈기 후 사용하였다. Loxoprofen 용해도 측정을 위해 spectrophotometer (CE 1020, CECIL, UK)를 사용하였으며 흡광도 측정 파장은 630 nm 이었다. HPLC 장치로는 Fig. 3과 같이 FA의 경우 eluent pump로는 6000A (Waters, USA), feed pump로는 Model 1330 (Bio-rad, USA)와 분취를 위해 Fraction Collector (Model 2110, Bio-rad, USA)를 사용하였고, PIM의 경우 6000A 펌프 (Waters, USA)와 Automatic sampling system (Model AS-100T, Bio-rad, USA)의 자동시료주입기를 사용하였으며, 영인기기의 M720 detector와 데이터 수집 시스템으로 Clarity (DataApex, ver. 2.1.0.15, Czech)를 사용하였다. Kromasil TBB (*tert. Butylbenzoyl*, spherical type, 10  $\mu\text{m}$  particles) 충전물 (Eka Chemical, Sweden)을 stainless-steel 칼럼 (3.9  $\times$  300 mm)에 충전하였다. UV detector의 파장은 225 nm로 고정하였고 모든 실험은 상온에서 수행하였다. 이동상은 loxoprofen이 이성분으로 분리가 되는 조성으로 hexane / ethanol을 부피비 95 / 5를 택하였다.

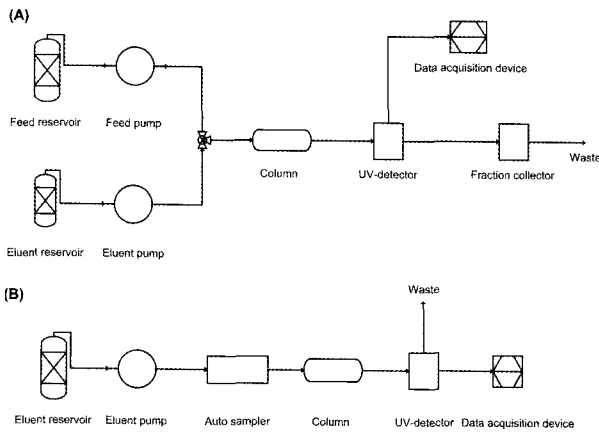


Figure 3. Experimental setup for racemic loxoprofen adsorption isotherm measurements. (A) FA, (B) PIM.

**Frontal analysis**

FA를 수행하기 위해 시료는 hexane 95% 조건에서 loxoprofen 0.5, 1, 2, 3 mg/ml의 농도로 eluent의 유량은 0.8 ml/min, feed의 유량은 0.2 ml/min으로 실험하였다.

각 농도에서 시료를 칼럼을 HPLC에 설치한 경우와 설치하지 않은 경우에 대해 주입한 후 용출곡선을 얻었으며, 파곡선이 시작되는 시간에서부터 분취하여 정량분석을 하였다. 식 (1)을 사용하여 각 성분에 대한 칼럼 내에 축적된 loxoprofen의 양을 계산하였다. 이렇게 구한 고정상에 흡착된 농도 ( $C_s$ )와 이동상 내에서의 농도 ( $C_m$ )을 이용하여 최소 사승법을 사용하여 Langmuir 매개변수  $a, b$ 를 계산하였다.

**Pulse input method**

PIM을 수행하기 이동상 hexane 95%의 조건에서 0.2, 0.4,

0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/ml의 시료 농도로 20  $\mu\text{l}$ 를 주입하였으며 유량은 1 ml/min으로 하였다. 각 농도에 따른 용리타의  $t_0$ 와  $t_R$ 를 이용하여 식 (4)을 이용하여 평형상수를 구하였고, 식 (3)를 이용하여 이동상 내의 농도 ( $C_m$ )에 따른 고정상에 흡착된 농도( $C_s$ )를 계산하였다. 회귀분석을 통해 Langmuri 매개변수  $a, b$ 를 계산하였다.

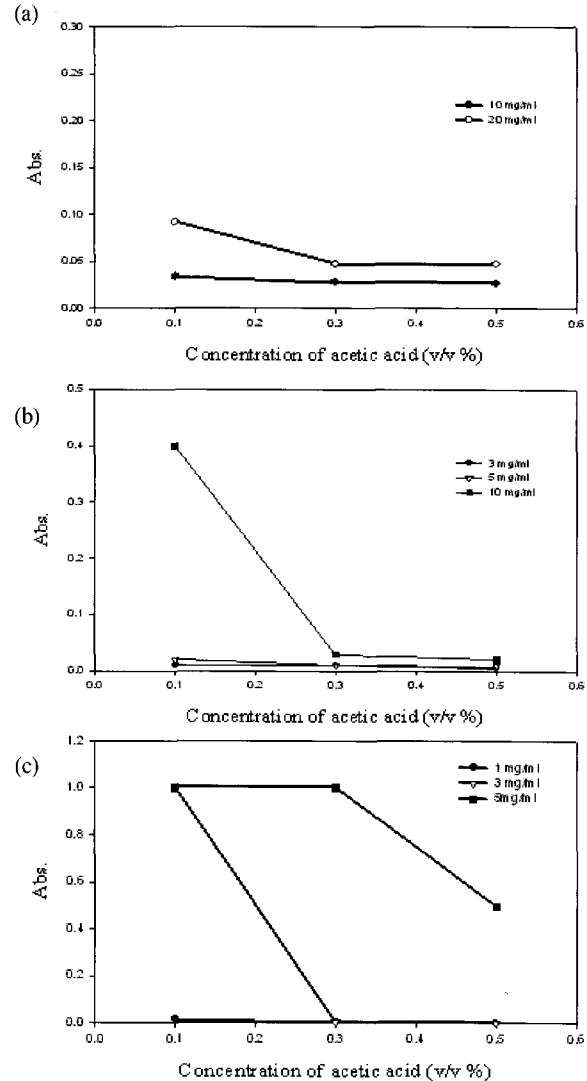


Figure 4. Change of loxoprofen solubility according to the increase of acetic acid concentration ((a) hexane : ethanol = 50 : 50, (b) hexane : ethanol = 80 : 20, (c) hexane : ethanol = 95 : 5).

**결과 및 고찰**

**Loxoprofen의 용해도 측정 및 초산과 농도결정**

Fig. 4는 hexane의 부피비를 (a) 50, (b) 80, (c) 95%로 고정시키고 다른 양의 loxoprofen을 이 용액 10 ml에 용해시켰을 때의 흡광도를 나타낸 것이다. Fig. 4의 세 가지 조건에서 acetic acid의 농도가 증가할수록 용액의 흡광도가 감소하는 것을 볼 수 있다. 용해되지 않은 loxoprofen이 630 nm의 빛을 흡수하며 용해도가 증가할수록 흡광도는 감소

한다. 따라서 acetic acid는 용해도가 최대값을 갖는 조건인 0.5%로 결정하였다. Fig. 3(a)는 20 mg/ml의 농도에서 0.1 이하의 흡광도를 보였지만, (c)의 경우 5 mg/ml의 농도에서 0.4 이상의 흡광도를 보였다. Hexane의 조성이 증가할수록 용해도의 감소를 의미하는데, 이는 극성의 loxoprofen이 비극성의 hexane에서 낮은 용해도를 갖는 이유로 해석된다. 이 실험 결과를 토대로 loxoprofen이 최대의 용해도를 갖는 조건으로 FA와 PIM을 위한 loxoprofen의 농도를 결정하였다. hexane 95%의 조성에서 0.2~3 mg/ml의 loxoprofen 농도로 실험하였다.

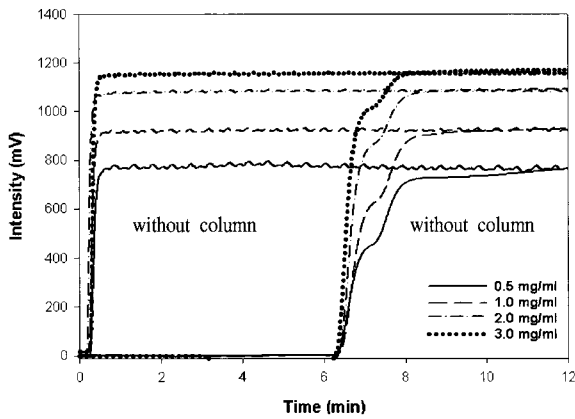


Figure 5. Breakthrough curves of racemic loxoprofen mixtures.

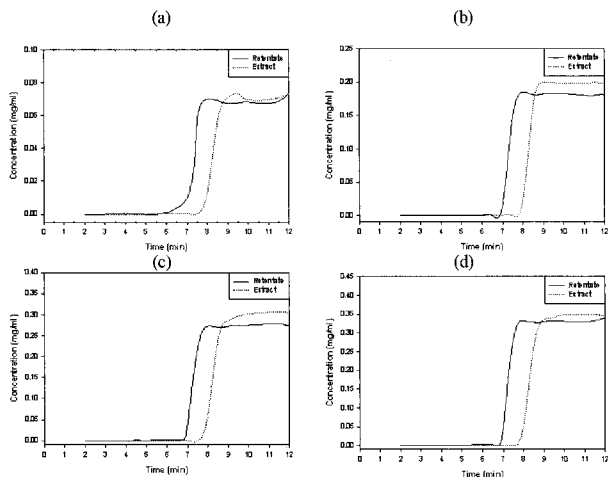


Figure 6. Breakthrough curves of fraction collected samples of Fig. 5 in FA. Sample concentrations (a) = 0.5 mg/ml, (b) = 1.0 mg/ml, (c) = 2.0 mg/ml, (d) = 3.0 mg/ml).

Frontal analysis

Fig. 5는 여러 농도에서 칼럼을 장착하여 FA를 수행한 크로마토그램과 칼럼을 탈착한 상태에서 얻은 크로마토그램을 보여주고 있다. 칼럼이 없는 상태에서 dead time (t<sub>0</sub>)는 0.2분이며, 각 농도에서 6.2분부터 8.3분까지 두 개의 파과곡선이 형성되며 그 이후에는 평형상태이다. 6.2분부터 8.3분 사이에서 두 성분의 양을 알기 위해서 30초 간격으로 분취하여 정량분석을 하였다(Fig. 6). Fig 7은 0.5 mg/ml의 농도에서 FA를 수행한 후 정량분석한 크로마토그램으로서 각 성분의 크로마토그램에서 빗금친 부분이 고

정상에 흡착된 양이며, 빗금친 부분을 식 (1)을 사용하여 적분하여 계산하였다. 최소자승법을 사용하여 Langmuir 매개변수 a, b를 추산하였다. 등온흡착식은 다음과 같다.

$$C_{s, re} = \frac{5.282 C_{M, re}}{1 + 0.1412 C_{M, re} + 0.2139 C_{M, ex}}$$

$$C_{s, ex} = \frac{6.413 C_{M, ex}}{1 + 0.2139 C_{M, ex} + 0.1412 C_{M, re}}$$

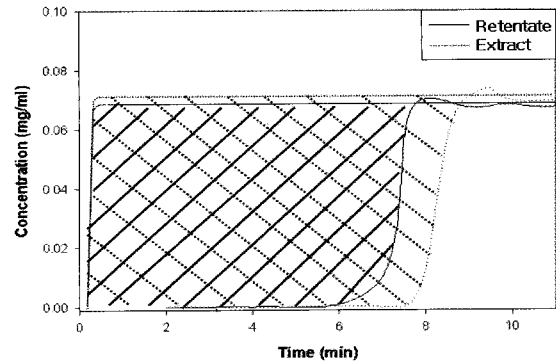


Figure 7. Breakthrough curve of fraction collected sample of (A) in Fig. 6.

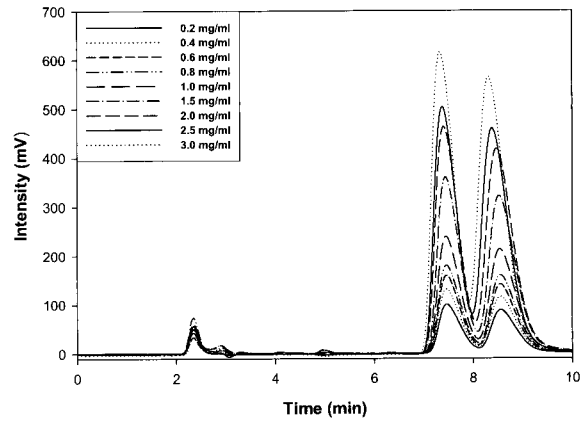


Figure 8. Chromatogram of loxoprofen with increase of concentration (Mobile phase flow rate of 1 ml/min, injection volume 20 μl).

Pulse input method

동적 방법에 의해서 등온흡착식을 구하는 경우 흡착질과 흡착제 사이에 물질전달의 영향이 존재하게 된다. Fig. 8은 물질전달에 영향을 줄 수 있는 주입부피, 이동상의 유속, 이동상의 조성비와 같은 실험조건을 일정하게 유지하고 racemic loxoprofen의 농도만을 변화시켜 구해진 크로마토그램이다. Fig. 7로부터 dead time (t<sub>0</sub>)는 2.343분이며 racemic loxoprofen의 농도 변화에 따른 체류시간을 알 수 있고, 농도가 증가할수록 Langmuir 등온흡착식을 따르는 비선형 거동을 보였으며 농도가 증가할수록 두 enantiomer들의 체류시간이 감소하는 경향을 보였다. 각 데이터 포인트에서 용리체의 체류시간 (t<sub>R</sub>)과 dead time (t<sub>0</sub>)을 이용하여 Henry 상수 H를 계산하였고, Eq (3)를 사용하여 이동상의 농도 (C<sub>m</sub>)에 따른 고정상에 흡착된 양 (C<sub>s</sub>)를 계산하

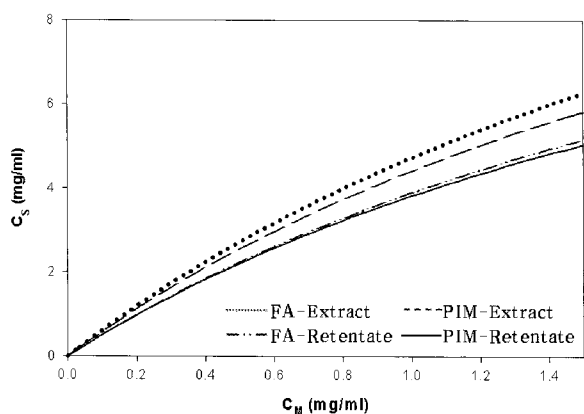
였다. 회귀분석에 의해 두 enantiomer에 대한 등온흡착식을 추산하였다. 등온흡착식은 다음과 같다.

$$C_{S, re} = \frac{5.245 C_{M, re}}{1 + 0.1667 C_{M, re} + 0.2054 C_{M, ex}},$$

$$C_{S, ex} = \frac{6.061 C_{M, ex}}{1 + 0.2054 C_{M, ex} + 0.1667 C_{M, re}}$$

**Table 1.** Comparison of the parameters of competitive Langmuir isotherm of retentate and extract-loxoprofen

	$a_{re}(-)$	$b_{re}(ml/mg)$	$a_{ex}(-)$	$b_{ex}(ml/mg)$
FA	5.282	0.1412	6.413	0.2139
PIM	5.245	0.1667	6.061	0.2054



**Figure 9.** Comparison of competitive Langmuir isotherms from FA and PIM.

FA와 PIM의 두가지 방법으로 구한 competitive Langmuir 등온흡착식을 Fig. 9에 나타내었고 이 때의 매개변수 a, b를 Table 1에 나열하였다. 두 가지 방법으로 구한 등온흡착식이 정확히 일치하지 않다. 이는 이성분계에서 FA방법에서 검출기는 두 성분 중 하나에 대하여 선택적으로 검출이 가능한 장치를 사용하여 좀 더 정확한 정량분석과 파과곡선에서의 정확한 적분식이 요구되며, PIM에서는 비선형 Langmuir 흡착평형식에 대한 좀 더 정확한 식이 요구되기 때문이다.

이상의 결과로부터 이동상의 조성비, 이동상의 유속, 주입농도와 같은 조업조건 변화와 loxoprofen의 체류시간 사이의 상관관계를 규명함으로써 크로마토그램의 시간적 또는 경제적 조작과 분리도를 향상시키는데 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

### 요 약

본 실험의 목적은 frontal analysis (FA)와 pluse input method (PIM) 방법으로 흡착분리공정에 있어서 중요한 전 단계의 하나인 등온흡착식을 결정하는데 있다. FA를 수행

하기에 앞서 대상물질이었던 loxoprofen의 용해도를 측정하여 hexane / ethanol = 95 / 5일 때 시료의 농도를 0.2 ~ 3 mg/ml로 결정하고, pH 조절을 위한 acetic acid는 0.5%로 결정하였다. 이동상의 주성분인 hexane의 조성이 증가함에 따라 용해도는 감소하였지만 분리도는 증가하는 경향을 확인하였다. 이런 용해도와 분리도 사이의 trade-off 또한 흡착분리과정에서의 조작변수가 될 수 있음을 의미한다. FA로 구한 이성분계 등온흡착식은

$$C_{S, re} = \frac{5.282 C_{M, re}}{1 + 0.1412 C_{M, re} + 0.2139 C_{M, ex}},$$

$$C_{S, ex} = \frac{6.413 C_{M, ex}}{1 + 0.2139 C_{M, ex} + 0.1412 C_{M, re}}$$

로 결정하였고, PIM으로 구한 이성분계 등온흡착식은

$$C_{S, re} = \frac{5.245 C_{M, re}}{1 + 0.1667 C_{M, re} + 0.2054 C_{M, ex}},$$

$$C_{S, ex} = \frac{6.061 C_{M, ex}}{1 + 0.2054 C_{M, ex} + 0.1667 C_{M, re}}$$

로 결정하였다.

### 감 사

본 연구는 과학재단 지원 인하대학교 초정밀 생물분리 기술 연구센터 (BSEP ERC)의 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Lisee, O., P. Hugo, and A. Seidel-Morgenstern (2001), Frontal analysis method to determine competitive adsorption isotherms, *J. Chromatogr. A* **908**, 19-34.
- Kim, S. Y., T. Song, J. K. Lee, S. S. Suh, and M. H. Chio (2002), Adsorptive correlations of chromatography for ibuprofen enantiomers, *HWAHAK KONGHAK*, **40(3)**, 324-329.
- Jana, J. and F. John (1984), Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **316**, 53-68.
- Row, K. H. (1999), The principals and applications of liquid chromatography, Inha University Pub. Department, Incheon, Korea.
- Choi, Y. J., S. K. Han, S. T. Chung, and K. H. Row (2004), Chromatographic Separation of Bupivacaine Recemate by Mathematical Model with Competitive Langmuir Isotherm, *Korean J. Chem. Eng.* **21(4)**, 829-835.
- Kanazawa, H., A. Tsubayshi, Y. Nagata, and Y. Matsushima (2002), Stereospecific analysis of loxoprofen in plasma by chiral column liquid chromatography with a circular dichroism-based detector, *J. Chromatogr. A* **948**, 303-308.
- Yoon, T. H. and I. H. Kim (2003), Chiral separation of loxoprofen racemate using SMB (Simulated Moving Bed) chromatography, Ph. D. Dissertation, Dept. of Chemical Engineering, Chungnam Nat'l University, Daejeon, Korea.