

제조용 액체 크로마토그래피에서 조업조건 최적화

최두찬, 장경곤, 노경호, 정성택
인하대학교, 화학공학과

Optimum Strategy of Operating Conditions in Preparative Liquid Chromatography

Du Chan Choi, Kyung Kon Chang, Kyung Ho Row, Sung Taik Chung
Dept. of Chem. Eng., Inha University

서론

액체 크로마토그래피(LC)는 기체크로마토그래피(GC)에 비하여 감지도가 낮고 체류시간이 길다는 단점이 있으나 시료검출에 안정성이 있으며 분석물질의 범위가 광범위하여 GC로는 해결하기 어려웠던 비휘발성 성분까지도 대상으로 삼을 수 있다. 특히 고압용 충전물과 관의 제작이 보편화되고 검출기의 성능이 보완되어 소량 다성분계의 제약산업, 생화학, 식품산업 및 정밀유기화학 등의 분야에서 필수적인 장치로 자리잡아 가고 있다.

제조용 액체 크로마토그래피(preparative liquid chromatography, PLC)는 분석용 장치의 분리능을 그대로 유지하면서 시료의 처리용량은 증가시키는 것을 목적으로 한다. 크로마토그래피는 이론적으로는 100% 분리가 가능하다는 장점이 있으나 분리매체로 외부의 용리액을 사용하기 때문에 용질이 희석되며 주로 회분식 공정으로 이루어진다는 단점이 있다. 그러나 rotary annulus 크로마토그래피와 moving feed 크로마토그래피와 같은 연속식 크로마토그래피가 등장하고 size exclusion 순환분리법과 다양한 column switching 기법등이 개발되어 고전적 크로마토그래피의 회분식 제한성과 극소성을 해결하고 있다. 현재 연속공정으로서 상업화된 것은 1960년대 UOP(universal oil products)에서 SORBEX⁽¹⁾ 공정으로 개발한 연속식 크로마토그래피가 대표적이며 미국, 일본 등 구미선진국을 중심으로 크로마토그래피의 제조용 규모로의 scaleup에 관한 연구가 생물분리공정을 중심으로 활발히 진행되고 있다.

PLC는 시료의 양과 관의 크기 및 충전물의 직경이 증가하기 때문에 고정상 내에서의 확산, 이동상 내에서의 시료분산등이 일어난다. 이로 인하여 흡착등온선이 비선형의 형태로 나타나고 분리효율이 감소하는 원인이 된다⁽²⁾. 따라서 PLC를 이용하여 효율적인 분리를 하기 위해서는 여러 가지 조업변수들을 조합하여 최적의 분리조건을 구하는 것이 중요하다.

최적 조업조건을 결정하기 위하여 크로마토그래피의 peak에 관한 연구가 주목받기 시작하면서 관의 효율에 관한 다각적인 해석이 등장하였다. 이러한 연구는 Gidding에 의해 최초로 등장한 이후 E. Cruska⁽³⁾등에 의해서 더욱 발전되었다. Barber등은 tailing을 일으키는 peak로부터 이론단수를 계산하는 기하학적 방법을 개발하여 비대칭성 peak 형태에 대한 해석을 시도하였으며 Berthold등은 비대칭성을 고려한 지수형태의 새로운 이론단수 계산 함수를 제안하였다. Joaquim⁽⁴⁾은 이러한 이론을 더욱 발전시켜 물질수지식과 크로마토그래피 함수와의 관계로부터 적합한 모델 선정을 위한 연구를 수행하기도 하였다.

본 연구에서는 nucleosides의 하나인 thymidine을 선정하고 실험변수인 이동상의 조성과 유속, 시료의 양이 PLC의 HETP에 미치는 영향을 실험적으로 고찰하고 변수에 따른 HETP값을 실험식에 의하여 구하여 최적분리조건을 수학적으로 예측하는 것을 목적으로 한다.

실 험

본 실험에 사용된 시료는 HPLC grade의 thymidine($C_{10}H_{14}N_2O_5$, 1-[2-Deoxy- β -D-ribofuran osy-methyluracil])으로 SIGMA Co.에서 구입하였으며 탈이온화한 증류수에 용해하여 일정농도의 저장용액을 만들어 사용하였다. 이동상은 증류수와 메탄올을 일정용매 조성법(isocratic mode)을 사용하여 메탄올의 농도를 증가시키면서 실험하였다. 메탄올은 Baker (Phillipsburg NJ, USA)에서 구입한 HPLC 용매이고 증류수는 실험실에서 제조하여 탈이온화 한후에 더 이상 정제없이 사용하였다.

실험에 사용된 제조용 액체 크로마토그래피 장치는 pump(Model 2326-26, TSP), U6K injector(2ml sample loop), 3000psi까지 측정가능한 pressure gauge(Span instrument co.), back pressure regulator(Tescom co., Model 26-1722) 등으로 구성되어 있으며 Fig. 1에 나타내었다. 시료의 검출은 UV-VIS spectrophotometer(Varian co.)를 사용하였으며 Column은 500×9.8 mm I.D의 규격으로 pore size 120Å, particle size 40~60nm인 YMC-GEL ODS로 충전되었다.

모든 실험은 상온에서 행하였으며 시료의 검출은 관을 통과한 용리액을 10초 간격으로 채취하여 254nm의 파장에서 측정하였다. 시료의 농도와 주입량, 이동상의 조성과 유속을 실험변수로 하였고 변수의 범위는 Table 1.에 나타내었다.

이론단수(N, number of theoretical plate)는 다음식을 사용하여 계산하였다.

$$N = 5.54 \cdot (t_R / w_{1/2})^2$$

여기서 t_R 은 체류시간, $w_{1/2}$ 은 peak 높이의 1/2에서의 peak 폭을 나타낸다. HETP는 이론단수 N과 관의 길이 L의 비로서 표현되며 다음식으로 구하였다.

$$H = L / N$$

Fig. 1. Block diagram of liquid Chromatography

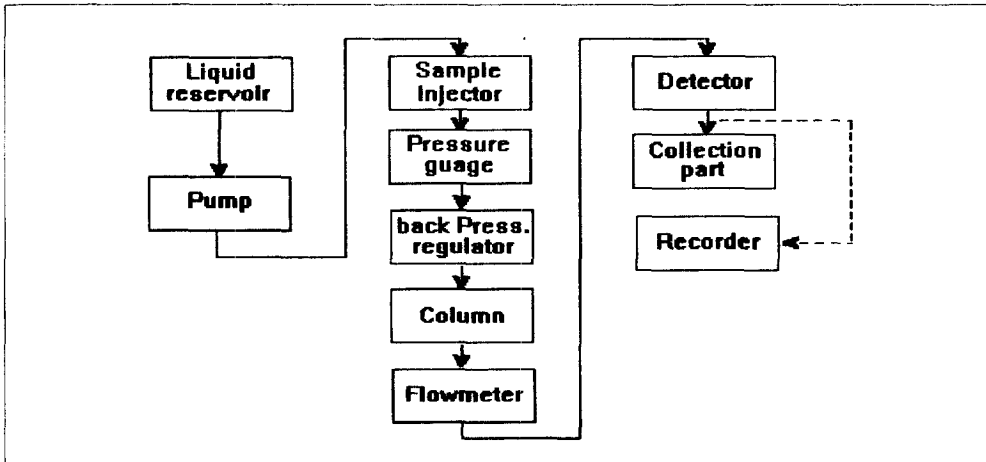


Table. 1. Experimental variables

sample concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.5 ~ 10
mobile phase composition(v/v, %)	Water/MeOH(99/1 ~ 80/20)
sample amount(mg)	0.5 ~ 20
flow rate(ml/min)	1.5 ~ 5.5

결과 및 고찰

Sample size가 HETP에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1000~10,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 이동상의 조성을 95/5(v/v, %)로 고정하고 flow rate와 sample size를 3.5~5.5ml/min, 0.5~2.0 $\mu\text{g/ml}$ 로 변화시키면서 실험하였다. 실험한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 전반적으로 시료주입량이 증가함에 따라 HETP도 선형적으로 증가하는 경향을 나타냈으며 고농도에서의 HETP의 변화율보다 저농도에서의 변화율이 상대적으로 큰 것으로 나타나고 있어 저농도에서 시료주입량의 증가가 HETP에 보다 큰 영향을 미치고 있었다.

Fig. 2는 injection volume이 HETP에 미치는 영향을 나타내고 있으며 Fig. 1에서 graph가 단리되는 현상을 설명하고 있다. Graph의 횡축은 10mg/ml의 농도에서 시작하여 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지를 나타내고 있으며 주입되는 시료의 절대량(mg)을 일정하게 유지하기 위하여 injection volume(ml)을 변화시키면서 실험하였다. Fig. 2는 저농도일지라도 injection volume의 양이 많아지면 고농도일 경우보다 오히려 HETP가 증가하고 있음을 보여주고 있는데 이는 Fig. 1에서 시료의 양이 증가하면 HETP가 단조증가하여 관의 효율이 감소하는 것과는 다른 결과를 나타내고 있다. 이러한 현상은 저농도의 시료가 고농도의 시료에 비하여 이동상내의 순간적인 확산으로 인한 zone spreading 효과가 상대적으로 크게 작용하여 나타나는 결과로 설명된다.

이동상의 유속이 HETP에 미치는 영향은 Fig. 3에 나타나 있으며 모든 sample size에 대하여 유속이 증가함에 따라 HETP가 비례적으로 증가하고 있음을 알 수 있었다. 이동상의 조성과 관의 온도 등을 고정한 상태에서 저속에서는 시료입자가 이동상내에 비교적 장시간 남아 있게 된다. 그러나 고속에서는 시료입자가 이동상내에서 고정상과 반응할 시간이 감소하게 되며 이러한 현상은 HETP가 증가하여 관의 효율을 감소시키는 원인으로 작용한다. 일반적인 경우 이동상의 유속은 크로마토그래피의 HETP에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 작용하고 있다.

Fig. 4는 이동상의 조성 변화에 따른 HETP의 변화를 보여주고 있다. 메탄올의 농도를 1%에서 20%까지 증가시키면서 실험한 결과, 초기 1%에서 5%까지는 HETP의 변화가 거의 없었으나 5%이후의 메탄올 농도에서는 HETP의 변화가 선형적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

Column내에 주입된 thymidine의 무게(W, mg), 이동상의 유속(F, ml/min), 이동상내의 메탄올 농도(M, vol.%)를 독립변수로 하여 이들의 변화가 HETP(cm)에 미치는 영향은 다음과 같은 일차식의 형태로 나타내었다.

$$HETP = 0.0749 + 0.0032W + 0.0106F - 0.0009M$$

윗식에 의하면 이동상내에 포함된 시료의 양과 유속의 증가는 관의 효율을 감소시켰으며 유속의 영향이 상대적으로 크게 작용하고 있는 것으로 나타났다. 이동상내에 포함된 메탄올 %의 증가는 관의 효율을 증가시키는 것으로 나타났으나 커다란 영향을 미치고 있는 것으로 나타나지는 않았다.

참고문헌

1. Bourghton, D. B., *Chem. Eng. Pro.*, 73, 49(1977)
2. Hans P. Lettner, Oliver Kaltenburner and Alios Jungbauer, *J. of Chromatogra. Sci.*, vol 33, August, 1995
3. Crushka E. Snyder L. R. and Knox J. H., *J. of Chromatogra. Sci.*, 13, 25(1975)
4. Joaquin Olive and Joan. O. Grimalt, *J. of Chromatogra. Sci.*, 33, 194(1995)

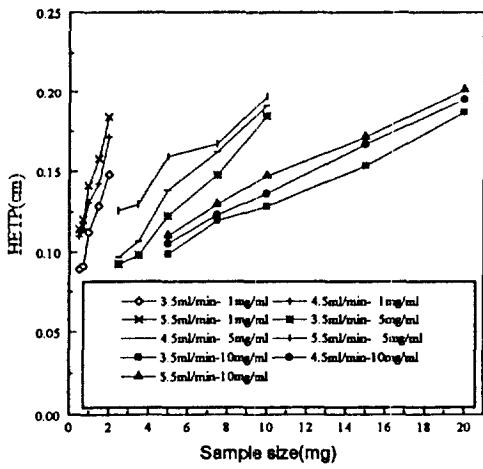


Fig. 1. Effect of sample size on HETP (5% MeOH)

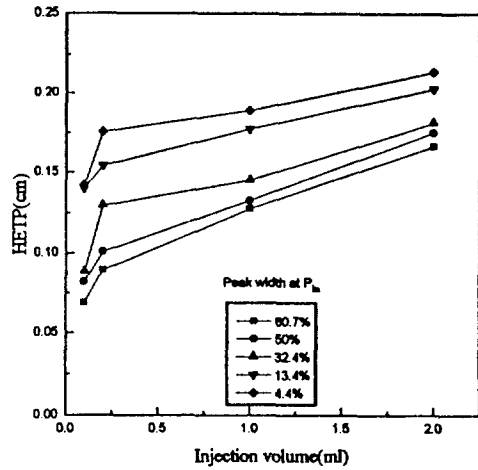


Fig. 2. Effect of injection volume on HETP (5.5 ml/min, 5% MeOH, 1.0 mg sample size)

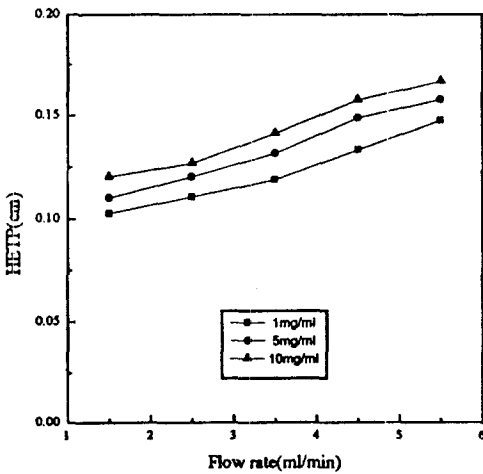


Fig. 3. Effect of flow rate on HETP (5% MeOH, 1.0 ml injection volume)

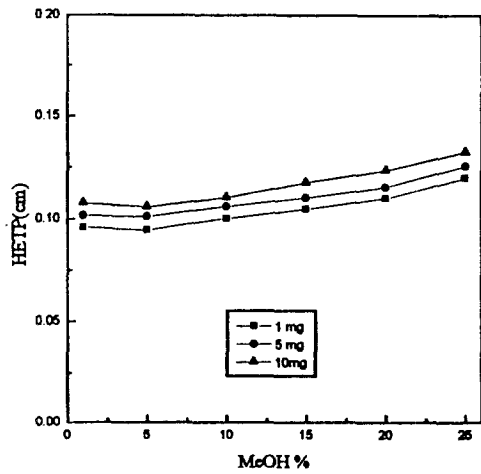


Fig. 4. Effect of mobile phase composition on HETP (4.5 ml/min, 1.0 ml injection volume)