

제조용 액체 크로마토그래피에서 HETP에 영향을 미치는 인자

최 두 찬 · 최 대 기* · 노 경 호

인하대학교, 화학공학과, *한국과학기술연구원, CFC 대체기술센터
(1996년 7월 16일 접수, 1996년 9월 9일 채택)

Factors Affecting HETP in Preparative Liquid Chromatography

Du Chan Choi, Dai-Ki Choi*, and Kyung Ho Row

Dept. of Chem. Eng., Inha university, Incheon 402-751, Korea

*CFC Alternatives Technology Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791

(Received July 16, 1996, Accepted September 9, 1996)

요 약 : HETP(Height Equivalent to a Theoretical Plate)는 크로마토그래피 공정에서 관의 효율을 나타내는 정량적 인자이다. 본 연구에서는 시료의 농도와 주입량, 이동상의 유속과 조성이 제조용 액체 크로마토그래피의 HETP에 미치는 영향을 고찰하였다. 시료는 thymidine이고 이동상은 1.5~5.5ml/min의 유속에서 일정용매조성법으로 물과 organic modifier로서 메탄올을 사용하였으며 제조용 크로마토그래피 column은 길이가 500mm, 내경이 9.8mm이다. 시료의 농도와 주입부피 및 유속이 증가함에 따라 HETP는 거의 선형적으로 증가하여 관의 효율이 감소하였다. 시료 주입부피의 영향은 관의 효율에 매우 중요하게 작용하여 동일한 주입량에 대하여 주입부피가 10배로 증가함에 따라 HETP는 약 2배 정도로 커졌다. 이동상의 유속이 증가함에 따라서 HETP는 주로 이동상과 고정상의 물질전달저항에 의해서 증가하였다.

Abstract: In chromatographic separation, HETP(height equivalent to a theoretical plate) is a useful quantitative parameter and it is widely designated as column efficiency. The effects of operating conditions (sample concentration, injection volume, flow rate and mobile phase composition) on HETP were investigated in preparative liquid chromatography (PLC). Water and organic modifier of methanol were used as mobile phase. The sample of thymidine was injected into preparative C18 columns. The system was run by a isocratic mode in 1.5~5.5ml/min. The larger amounts of sample and higher flow rates of mobile phase increased HETP, which means that column efficiencies were worse. As the weight of sample injected into a chromatographic system could be prepared with different concentrations and injection volumes, for the same amount of sample, HETP was approximately increased two times with the ten-fold injection volume. HETP was mainly affected by the resistance of stationary and mobile phase mass transfer in the intraparticle section of packings at higher velocities.

1. 서 론

액체 크로마토그래피(LC)는 기체크로마토그래피(GC)에 비하여 낮은 감지도와 긴 체류시간이 있다는 단점이 있으나 시료검출에 안정성이 있으며 분석물질

의 범위가 광범위하여 GC로는 해결하기 어려웠던 비휘발성 성분까지도 분리가 가능하게 되었다. 특히 고압용 충전물과 관의 제작이 보편화되고 검출기의 성능이 보완됨으로써 제약산업, 생화학, 식품산업 및 정밀유기화학 등을 중심으로 필수적인 장치로 자리잡

아 가고 있다. 제조용 액체 크로마토그래피(preparative liquid chromatography, PLC)는 분석용 장치의 분리능을 그대로 유지하면서 시료의 처리용량은 증가시키는 것을 목적으로 한다. 크로마토그래피는 고순도의 분리가 가능하다는 장점이 있으나 용질이 희석되며 주로 회분식공정으로 이루어지고 있다[1].

고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)에서 관의 효율은 일반적으로 HETP(height equivalent to a theoretical plate)로 표현되고 있다[2]. HETP는 Knox에 의해서 최초로 이동상의 유속과 연관되었고[3], 관의 효율을 최적화하기 위한 접근 방법으로서 HETP에 영향을 주는 이동상의 유속, 이동상의 조성 및 관의 온도 등을 연구하였다[4]. PLC에서는 시료의 양과 관의 크기 및 충전물의 직경이 증가하기 때문에 시료의 확산, 분산 및 관내에서 시료간의 상호작용 등이 일어난다. 이로 인하여 흡착 등온선이 비선형의 형태로 나타나고 분리 효율이 감소하게 된다[5]. 따라서 PLC에서 효율적인 분리를 하기 위해서는 여러 가지 조업 변수들을 조합하여 최적의 분리 조건을 구하는 것이 중요하다[6]. 이를 위해서 크로마토그래피의 peak에 관한 연구가 주목받기 시작하면서 관의 효율에 관한 다각적인 해석이 등장하였다. Giddings를 표시로 하여 다양한 모델들이 제시되었다[7-10]. Barber는 tailing이 일어난 peak로부터 이론단수(N , number of theoretical plate)를 계산하는 기하학적 방법을 개발하였다[11]. Guiochon 등은 확산계수의 압력의존성과 확산계수가 단높이에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며 고농도의 시료가 주입된 LC에 대한 컴퓨터 모사를 하였다[12, 13]. 최근에는 Berthold가 Gaussian 함수를 변형한 EMG(exponentially modified Gaussian)함수까지 수학적 모델을 확장하였다[14]. Wu와 Gu는 분리되지 않는 peak pair에 대하여 비대칭인자를 고려하여 정확한 peak 면적을 구하여 정량분석을 하였고 다변수 선형회귀법과 EMG 함수를 사용하여 peak 높이의 비율에 따른 이론단수 계산식을 개발하였다[15]. Gai와 Wu는 크로마토그래피상에서의 통계적 적률의 계산과 비회전성(deconvolution)에 대한 접근을 시도하였다[16]. 특히 Guillaume과 Guinchard는 이동상의 유속과 관의 온도 등을 실험 변수로 하여 에스테르계 물질을 분리하는 STO-LC(simplex trifactor optimization liquid chromatography) 방법을 개발하여 HETP의 온도 의존성을 보고하였다[17].

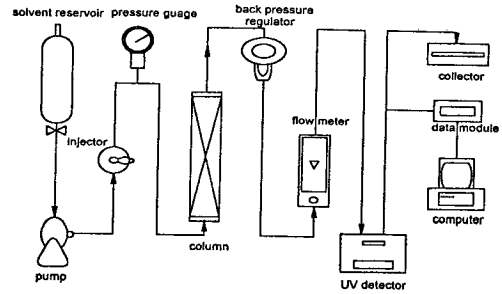


Fig. 1. Flow diagram of PLC.

본 연구에서는 시료의 농도, 시료의 주입부피, 이동상의 유속 및 organic modifier 양의 변화가 HETP에 미치는 영향과 유속에 따른 HETP의 관계로부터 확산과 물질전달이 peak broadening에 기여하는 영향을 고찰하였다.

2. 실험

실험에 사용된 제조용 액체 크로마토그래피 장치의 개략도는 Fig. 1에 나타내었다. HPLC metering pump(Model 2396-26, TSP)와 U6K injector(2ml sample loop), 6000psi까지 압력을 조절할 수 있는 back pressure regulator(Tescom co., Model 26-1722), rotameter 등으로 구성되어 있다. 시료의 검출은 10초마다 시료를 채취하여 254nm의 파장에서 UV detector(영인과학 Co.)를 on-line으로 연결하였다. 관은 pore size 120Å, particle size 40~63µm인 octadecylsilica(YMC Co.)으로 충전되었으며 크기는 500mm×9.8mm I.D.이다.

실험에 사용한 시료인 thymidine는 Sigma Co.에서 구입하였으며 HPLC grade의 물에 용해하여 각각 500~10,000ppm의 저장용액을 만들어 사용하였다. 역상 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)로서 이동상은 물을 사용하였고 organic modifier는 메탄올이다. 물은 실험실에서 제조한 증류수이며 탈이온화 한 후에 사용하였으며 메탄올은 Baker(Phillipsburg NJ, U.S.A.)에서 구입한 HPLC 용매이고 더 이상 정제없이 사용하였다. 모든 실험은 상온에서 실시하였다. 각 실험변수의 범위는 Table 1에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

이론단수(N , number of theoretical plate)는 일정

Table 1. Experimental Variables

Variables	Range
injection volume	0.1, 0.5, 1.0, 2.0 ml
concentration	0.5, 1.0, 2.5, 5, 10 mg/ml
sample amount	0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 mg
flow rate	1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 ml/min
volume percentage of organic modifier	1, 5, 10, 20, 25 %

Table 2. Number of Theoretical Plate

coefficient(α)	% peak height
4	60.7
5.54	50
9	32.4
16	13.4
25	4.4
16	tangent

한 충전물이 있는 관과 특정한 시료에 대해서 peak의 폭과 체류시간의 관계로부터 얻어진다. 관 효율로서 표시되는 N은 peak의 높이에 따라 계수가 달라진다. Table 2에 peak의 높이에 따라서 각기의 계산 방법을 나타내었다. Peak tailing 또는 fronting이 심하지 않은 경우에는 tangent 방법과 peak 높이의 1/2 지점에서의 peak 폭을 사용하며 일반적으로 다음 관계식으로 나타낼 수 있다.

$$N = \alpha \cdot \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2 \quad (1)$$

α : coefficient

t_R : retention time

$W_{h/2}$: Peak width at half height

본 실험에서는 Fig. 2를 제외한 모든 HETP는 peak 높이의 1/2에서의 peak 폭을 사용하고 $\alpha=5.54$ 로서 구하였다. 역상 액체 크로마토그래피에서 HETP는 관내의 충전물과 시료에 대한 관의 효율을 나타내며 peak의 sharpness를 결정하게 된다. HETP는 이동상의 유속, 이동상의 조성, 관의 온도, 시료의 주입량 및 관의 크기와 같은 실험변수에 의해서 주로 영향을 받는 것으로 알려졌다. HETP는 이론단수 N과 관의 길이 L의 비로 표현되며 다음 관계

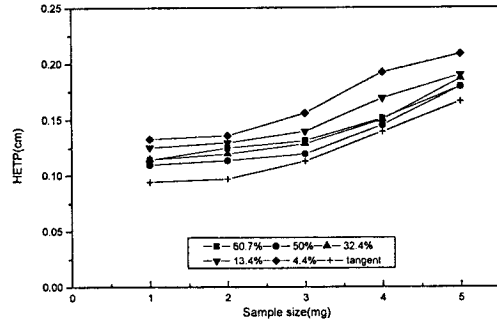


Fig. 2. HETP at different peak heights(5% MeOH, 1mg/ml, 5.5ml/min).

식에 의해서 구하였다.

$$HETP = \frac{L}{N} = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{h/w}} \right) \quad (2)$$

Table 2에서 구한 N과 Eq. (2)에 의한 HETP는 분석용 기기에서 흡착평형식이 선형적인 좌우 대칭의 이상적인 peak를 가정하여 계산한 것으로 peak 높이에 대하여 일정한 값을 나타내어야 한다. 그러나 실제 제조용 규모의 장치에 대해서는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 peak 높이에 따라서 기준선에 가까울수록 (% 값이 작을수록) 일정한 체류시간에 대해서 peak의 폭이 커지기때문에 N값은 작아지고 HETP는 큰 값을 갖게 된다. PLC에서는 많은 시료의 양이 사용되기 때문에 실제 peak의 폭이 분석용에 비해서 큰 값을 갖게 되고 원료의 주입량이 g단위 이상으로 증가하게 되면 peak의 모양이 비대칭성을 갖게 된다. 따라서 분석용 기기에 적용되는 계산식을 그대로 제조용 장치에 적용하기에는 특히 시료량이 많은 경우에는 계산식의 변형을 할 필요가 생기게 된다. Peak broadening은 위에서 언급한 열역학적 효과에 기인하는 흡착등온선의 비선형성과 확산이나 물질전달저항(예를 들면 와류확산, 축방향 분자확산, 막 물질저항, 흡착-탈착 속도)에 의해서도 영향을 받는다[18]. 따라서 HETP에 대한 식은 이러한 peak broadening에 대한 항목을 포함하고 있어야 한다.

분석용 크로마토그래피가 시작된 이후로 용출되는 band의 형태, 관의 효율, 용질과 고정상사이의 물리화학적 특성에 대한 크로마토그래피 peak의 관계에 대한 연구가 수행되었다. Gaussian function은 크로마토그래피에서 분자의 거동에 대한 이상적인 모델로

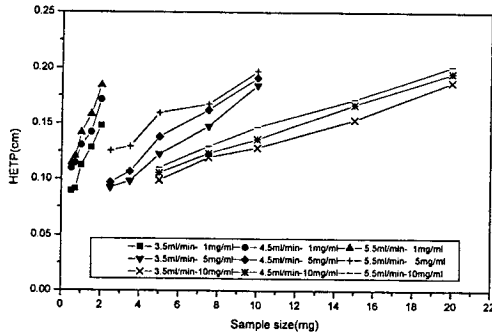


Fig. 3. Effect of sample size on HETP(5% MeOH).

생각되어졌으나 이 함수로 표현될 수 있는 완전대칭성의 peak는 실제로는 매우 드물다. 관내에서의 영향이나 비이상적인 과정에 대한 수학적인 항목들이 포함되어져야 한다. 따라서 개선된 형태의 Gaussian 함수형태, 즉 Gram-Charlier, Edgeworth-Cramer series 등이 비교적 비대칭성이 적은 peak에 대하여 제안되거나 지수적으로 보완된 비대칭 통계함수가 사용되었다[19].

3. 1. 시료량의 영향

Fig. 3은 1000~10,000 μ g/ml의 thymidine 농도에서 물과 메탄올의 조성을 95/5(v/v, %)로 고정하고 이동상의 유량과 시료의 주입량을 각기 3.5~5.5ml/min, 0.5~2.0 μ g/ml으로 변화시키는 경우 HETP의 계산결과를 나타내고 있다. 높은 유량보다는 낮은 유량에서 좋은 관효율을 가지며 이는 시료와 고정상과의 접촉시간이 충분하기 때문이다. 관내로 주입된 시료량은 시료의 농도와 주입량을 곱하면 된다. 일정한 유량에서 주입된 시료의 양이 동일하면 예를 들면, 10mg의 시료가 주입된 경우 낮은 농도(5mg/ml)보다 높은 농도(10mg/ml)에서 column efficiency가 더 좋은 이유는 5mg/ml에서는 주입부피가 2ml이고 10mg/ml에서는 1ml로서 주입부피가 2배가 된다. 희석된 농도에서는 시료에 포함된 과도한 이동상은 HETP를 증가시키게 된다. PLC에서 원료물질의 주입은 volume overload 또는 concentration overload의 방법을 택하게 되는데 전자는 HETP를 증가시키는 요인이 되며 이는 조절조건에서 고려해야 할 사항이다. 주입부피에 대한 HETP의 영향을 구체적으로 고찰한 결과가 Fig. 4에서 보여주고 있다. 주입되는 시료의 질량을 1.0mg으로 일정하게 유지하였다. 주

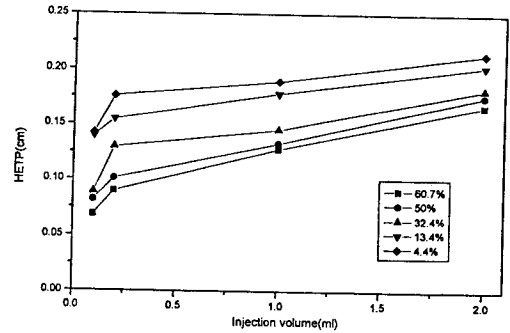


Fig. 4. Effect of injection volume on HETP(5.5ml/min, 5% MeOH, 1.0mg sample size).

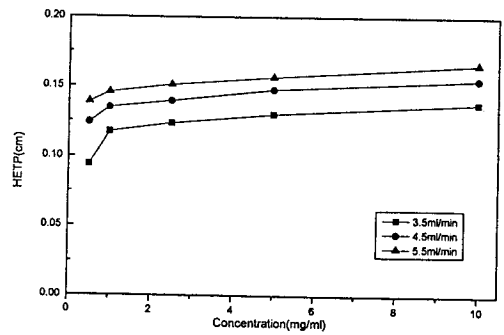


Fig. 5. Effect of concentration of thymidine on HETP(5% MeOH, 1.0ml injection volume).

입부피가 감소함에 따라서 즉, 시료 농도가 증가하면 HETP가 낮아지게 되는 것을 보여주고 있다. 이는 시료의 주입질량이 동일하더라도 시료가 이동상내로 도입될때 저농도의 시료는 많은 주입부피내에서 시료의 band를 형성하기 때문이다. 이는 고농도의 시료에 비해서 주입시간이 증가하는 것과 같은 효과를 갖게 된다. 주입부피가 10배로 증가함에 따라서 HETP는 약 2배정도로 커졌다.

일정한 시료 주입부피에 대하여 시료의 농도를 변화시키면 주입질량이 증가하게 되며 Fig. 5에서는 실험한 결과를 보여주고 있다. PLC와 분석용 크로마토그래피의 가장 큰 차이점은 시료 주입량이다. 후자가 μ g - 1mg인데 비해서 전자는 10²mg - g의 주입량이다. 시료의 농도가 증가하면 매우 높은 농도를 제외하고서는 거의 일정한 체류시간을 갖게된다. 시료의 농도가 증가하면 시료의 양이 많아지게 되고 peak의 면적이 커지면 peak의 폭도 커져서 HETP는 증가하게 된다. Concentration overload에서는 시료의 흡착

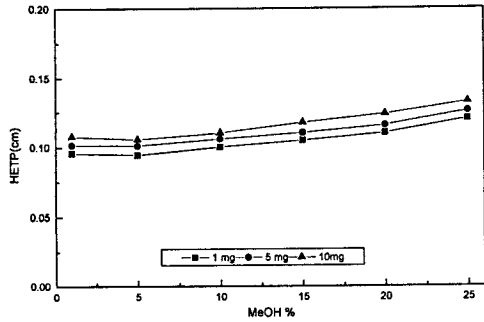


Fig. 6. Effect of mobile phase composition on HETP (4.5ml/min, 1.0ml injection volume).

평형식이 비선형성을 보이게 되기 때문에 높은 시료의 농도, 주입부피를 특징으로 하는 PLC에서는 원료 주입조건이 낮은 HETP를 갖도록 조업조건을 설정하는 것이 고순도 분리를 하기 위한 전제조건이 되기 때문에 매우 중요하다.

3.2. 이동상의 조성에 의한 영향

역상 액체 크로마토그래피의 충전물은 C_{18} 으로 도포되어 있기 때문에 이동상으로 극성이 높은 물을 사용하는데 methanol, acetonitrile 등과 같은 organic modifier를 첨가하여 시료의 체류시간을 조절할 수 있다. Organic modifier의 양이 증가하면 물보다 낮은 극성을 갖기때문에 C_{18} 표면에 흡착하여 시료의 체류시간이 감소하게 된다[20, 21]. Fig. 6에서는 이동상에서 메탄올의 % 조성의 변화가 HETP에 미치는 영향을 보여주고 있다. 이동상에서 메탄올 퍼센트가 증가함에 따라 HETP는 거의 선형적으로 비례하여 약간 증가하였다. 이동상내에 메탄올의 양이 증가하면 시료의 체류시간은 짧아지고 peak의 폭이 거의 변하지 않기 때문에 HETP가 증가한다. Horvath와 Melander는 일정한 유속과 온도에서 물과 메탄올의 이동상에서 메탄올의 농도가 증가하면 이동상의 점도가 감소하여 고정상과 이동상 사이의 표면장력이 감소함을 보여 주었다[22]. 이 결과는 용매의 극성과 점도를 감소시킴에 따라 이동상과 고정상 사이의 용질의 물질전달이 빠르게 일어남을 의미한다. 물질전달에 의해서 일어나는 peak band broadening 효과는 감소한다. 따라서 HETP는 감소하게 되고 메탄올 퍼센트의 증가와 함께 이동상의 점도와 극성이 감소하여 용량계수(capacity factor)가 작게 된다.

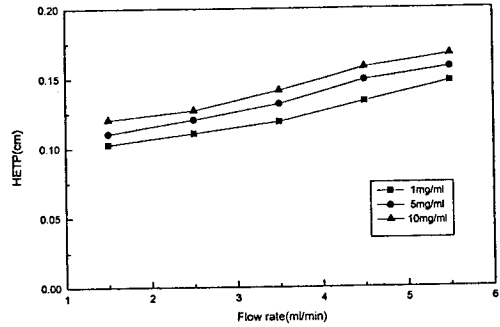


Fig. 7. Effect of flow rate on HETP(5% MeOH, 1.0ml injection volume).

3.3. 유속의 영향

일정한 이동상의 조성에서 시료 주입량에서 이동상의 유속변화는 시료의 체류시간을 변화시켜주는 중요한 조업변수이다. PLC에서는 생산량이 유속에 직접 연관이 되기때문에 유속에 대한 영향을 반드시 고려해야한다. 이동상의 유속이 낮게되면 시료의 체류시간이 늘어나게 되며 시료는 충전물표면과 세공내에서의 유속에 의한 물질전달에 의하여 영향을 받게된다. 이동상의 진행방향에 따라서 시료의 확산이 증가하게 되어서 peak의 폭이 증가하게 된다. 유량이 빨라지면 이동상내의 시료가 C_{18} 고정상과 접촉할 시간이 줄고 체류시간이 짧아서 HETP는 증가하게 된다. 따라서 일반적으로 이동상의 유량은 최적값이 존재하게 된다. 유량과 시료의 양이 HETP에 미치는 영향을 Fig. 7에서 보여주고 있다. 본 실험에서 유량의 범위는 1.5~5.5ml/min로서 1.5ml/min 보다 작으면 체류시간이 너무 길어지게 되어 그 이하의 범위에서는 실험하지 않았다. Fig. 7에서는 유량과 시료의 농도에 따라서 HETP가 증가하였다.

HETP에 대한 유속 영향의 연구는 1952년 Lapidus와 Amundson을 시작으로 1956년 van Deemter 등에 의하여 더욱 확장되어 확산과 물질전달이 관의 효율에 미치는 영향을 설명하고 있다[23, 24]. HETP와 평균유속의 관계는 van Deemter equation에 의하여 다음과 같다.

$$HETP = A + \frac{B}{V} + Cv \tag{3}$$

여기서 A, B, C는 각각 외류확산, 축확산 및 고정상과 이동상에서의 물질 전달이 HETP에 미치는 영

Table 3. Individual and Total HETPs with Carrier Velocities

v (cm/min)	u (cm ³ /min)	H ₁ (cm)	H ₂ (cm)	H ₃ (cm)	H (cm)
4.6	3.5	0.024	0.014	0.074	0.112
5.9	4.5	0.024	0.011	0.096	0.131
7.3	5.5	0.024	0.009	0.116	0.149

(1.0mg injection, 5% MeOH)

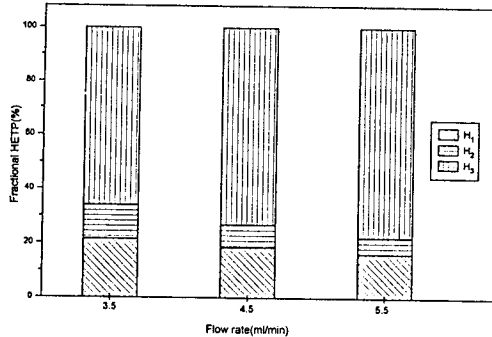


Fig. 8. Contribution of H₁, H₂ and H₃ on fractional HETP with different flow rates.

향을 나타내는 상수이며 v (cm/s)는 평균유속이다. 4.6, 5.9, 7.3cm/min의 유속에서 A, B, C의 값은 세 개의 알고 있는 HETP값으로부터 구하였다. Eq. (3)에서 유속에 대한 영향이 없는 A항을 H₁, 유속에 대한 영향이 반비례하는 B/v항을 H₂, 유속에 대한 영향이 선형인 Cv항을 H₃로 하면 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{HETP} = H_1 + H_2 + H_3 \quad (4)$$

Table 3에서는 평균유속이 4.6, 5.9, 7.3cm/min에서 전체 HETP와 H₁, H₂, H₃를 보여주고 있다. H₁은 유속에 관계없이 0.024cm로 일정하고 H₂는 유속의 증가에 따라 감소하고 있으며 H₃는 증가하고 있다. Fig. 8에서는 일정한 이동상의 유량에서 전체 HETP에 미치는 H₁, H₂, H₃의 %를 나타내고 있다. 유량이 증가함에 따라 고정상과 이동상의 물질전달저항에 의한 H₃의 영향이 커짐을 알 수 있다.

4. 결 론

이동상에서 메탄올의 양의 증가보다는 시료의 양과

유량이 증가함에 따라 HETP는 거의 선형적으로 증가하였다. PLC에서는 시료의 양이 증가하여 관의 효율을 감소시킨다. 본 실험에서는 시료 주입량이 HETP에 중요한 영향을 나타내어 동일한 주입량에 대해서 주입부피가 10배 증가함에 따라 HETP는 약 2배로 증가하였다. 따라서 PLC에서는 시료의 주입부피와 농도를 조절하면 관의 효율을 향상시킬 수 있다. 또한 이동상의 유속이 증가함에 따라 HETP는 주로 이동상과 고정상의 물질전달저항에 의해서 증가하였다.

감 사

본 연구는 1996년도 인하대학교 교내연구비의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 노경호, 최대기, 황경업, 이윤용, 화학공업과 기술, **8**, 425(1990).
2. G. Guinchon, *J. Chromatogr.*, **185**, 3(1979).
3. J. H. Knox, *J. Chrom. Sci.*, **15**, 352(1977).
4. L. A. Jones, J. J. Glennon, and W. H. Reiss, *J. Chromatogr.*, **595**, 209(1992).
5. Q. Ching Wang, F. Svec, and J. J. Frechet, *Anal. Chem.*, **65**, 2243(1993).
6. F. Charton, M. Baily, and G. Guinchon, *J. Chromatogr.*, **687**, 13(1994).
7. J. C. Giddings, "Dynamics of Chromatography", Part I, M. Dekker, New York, NY(1965).
8. E. Crushka, L. R. Snyder, and J. H. Knox, *J. Chrom. Sci.*, **13**, 25-37(1975).
9. C. Horvath and H. J. Lin, *J. Chromatogr.*, **149**, 43(1978).
10. J. H. Knox, *J. Chrom. Sci.*, **15**, 352-364(1977).
11. W. E. Barber and P. W. Carr, *Anal. Chem.*, **55**, 1939(1981).
12. G. Guinchon, S. Golshan-Shirazi, and A. Jaulmes, *Anal. Chem.*, **60**, 1856(1988).
13. M. Martin and G. Guinchon, *Anal. Chem.*, **55**, 2302(1983).
14. A. Berthold, *Anal. Chem.*, **63**, 1879(1991).
15. N. S. Wu and G. H. Gu, *Chromatographia*, **32**,

- 373(1991).
16. C. P. Cai and N. S. Wu, *Chromatographia*, **31**, 593(1991).
 17. Y. Guillaume and C. Guinchart, *J. Chrom. Sci.*, **33**, 204(1995).
 18. H. P. Lettner, O. Kaltenburnner, and A. Jungbauer, *J. Chrom. Sci.*, **33**, 191(1995).
 19. J. Olive and J. O. Grimalt, *J. Chrom. Sci.*, **33**, 194(1995).
 20. Y. W. Lee, K. H. Row, M. S. So, I. A. Pounina, and A. V. Larin, *J. Liquid Chromatogr.*, **18**, 3077 (1995).
 21. J. D. Kim, K. H. Row, M. S. So, I. A. Pounina, and A. V. Larin, *J. Liquid Chromatogr.*, **18**, 3091 (1995).
 22. C. Horvath and W. R. Melander, *J. Chrom. Sci.*, **15**, 393(1977).
 23. L. Lapidus and N. R. Amundson, *J. Phys. Chem.*, **59**, 416(1955).
 24. van Deemter, J. J. Zuiderweh, and A. Klin-kinberg, *Chem. Eng. Sci.*, **5**, 271(1956).