

## 역상 크로마토그래피에서 모멘트 방법과 van Deemter 식을 이용한 고리형 아데노신 일인산의 분리특성 연구

이일송 · 고관영 · 김인호<sup>†</sup>

충남대학교 화학공학과  
34134 대전광역시 유성구 궁동 220  
(2015년 2월 12일 접수, 2015년 3월 31일 수정본 접수, 2015년 4월 3일 채택)

### Analysis of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP) Separation via RP-HPLC (reversed-phase high-performance liquid chromatography) by the Moment Method and the van Deemter Equation

Il Song Lee, Kwan Young Ko and In Ho Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea  
(Received 12 February 2015; Received in revised form 31 March 2015; accepted 3 April 2015)

#### 요 약

고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)에서 C18(octadecyl silica, ODS) 칼럼에서 고리형 아데노신 일인산(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)의 크로마토그램을 얻은 후, 모멘트 분석을 수행하였다. 일반속도 모델(general rate model, GR model)을 기반으로 first absolute moment와 second central moment를 계산하였다. 모멘트 분석의 중요한 세 가지 계수인 분자확산계수(molecular diffusivity,  $D_m$ ), 외부물질전달계수(external mass transfer coefficient,  $k_f$ ), 입자내부확산계수(intra-particle diffusivity,  $D_p$ )는 각각 Wilke-Chang 식, Wilson-Geankoplis 식을 이용하고 이론단수(theoretical plate number) 식과 van Deemter 식을 비교하여 계산하였다. 실험은 각각 세 가지의 이동상 조성, 용질 농도, 유량 조건에서 수행하였다. Van Deemter 그래프를 그려 모멘트 분석결과를 정성적으로 정리했으며, 이론단 상당높이(height equivalent to a theoretical plate, HETP,  $H_{total}$ )에  $H_{ax}$ ,  $H_f$ ,  $H_d$ 가 미치는 영향을 알아보기 위해 van Deemter coefficient를 비교했다. HETP에 가장 큰 영향을 주는 요인은 입자내부확산( $H_d$ )이었으며 외부물질 전달( $H_f$ )는 그 영향이 매우 작았다.

**Abstract** – The moment analysis of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) was performed using chromatograms that were obtained with the pulse input method from an octadecyl silica (ODS) high-performance liquid chromatography (HPLC) column. The general rate (GR) model was employed to calculate the first absolute moment and the second central moment. Three important coefficients for moment analysis, which are molecular diffusivity ( $D_m$ ), external mass transfer coefficient ( $k_f$ ), and intra-particle diffusivity ( $D_p$ ), were estimated by the Wilke-Chang equation, Wilson-Geankoplis equation, and comparing van Deemter equation to theoretical plate number equation, respectively. Experiments were conducted by various conditions of flow rates, methanol volume ratio of the mobile phase, and solute concentration. After the moment analysis, results were organized by van Deemter plots. Also van Deemter coefficients were compared each other to effect  $H_{ax}$ ,  $H_f$ , and  $H_d$  on height equivalent to a theoretical plate (HETP,  $H_{total}$ ). The value of intra-particle diffusion ( $H_d$ ) was the primary factor which makes for HETP whereas external mass transfer ( $H_f$ ) was disregardable factor.

Key words: HPLC, Parameter Estimation, Moment Analysis, Van Deemter Equation, General Rate Model

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

\*이 논문은 서울대학교 김화용 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서 론

고성능액체크로마토그래피(HPLC)는 혼합물의 분리와 정제에 유용한 장치이다. 특히 octadecyl silica(ODS)를 흡착제로 사용하는 역상크로마토그래피법은 액체크로마토그래피의 분리 연구에서 많이 사용된다[1]. HPLC의 크로마토그램은 용출 시간을 결정하는 상평형 열역학(phase-equilibrium thermodynamics)에 가장 많은 영향을 받기 때문에[2] 크로마토그램의 경향과 분리메커니즘은 열역학적 계산으로 얻는 체류인자와 분리계수를 통해 알 수 있다[3]. 상평형 열역학은 오직 피크의 용출 위치에만 영향을 주지만 피크의 락 넓힘 현상(band spreading)과 피크의 대칭성은 물질전달속도론(mass transfer kinetics)의 영향을 받는다. 따라서 칼럼 내의 kinetic 연구는 물질전달 현상이 피크 넓힘 현상(peak broadening)에 미치는 영향을 알 수 있으므로 scale-up 설계 시 시뮬레이션을 위한 필수적인 항목이다[4].

칼럼 내의 모멘트 분석은 1960년대부터 van Deemter 식과 Knox 식을 기반으로 수행되었다. Kinetic 현상들은 용출되는 피크의 위치와 관련이 있는 first absolute moment와, 피크의 너비 및 락 넓힘 현상과 연관된 second central moment로 나눌 수 있다[5]. 1970년대에는 general plate 식과 물질전달계수를 통해 락 넓힘 현상의 정도를 나타내는 second central moment 값을 계산하였다[6]. 1980년대에는 물질전달현상을 축방향분산(axial dispersion), 외부물질전달(external mass transfer), 입자내부확산(intra-particle diffusion), 흡착 및 탈착(adsorption/desorption)으로 세분화하였다. 이 요인들을 고려하여 이론단 상당높이(height equivalent to a theoretical plate, HETP)를 계산하는 일반속도 모델(general rate model, GR model)이 만들어졌다[7,8]. 1990년대부터는 역상 칼럼(reversed-phase column), 겔 여과 칼럼(gel filtration column), 이온 교환 칼럼(ion exchange column) 등 다양한 종류의 칼럼 내에서의 GR model과 모멘트 분석에 대한 이론이 정립되었으며, 이를 다양한 실험방법에 적용하였다. Tallarek 등[9-13]은 분광법(spectroscopic method)을, Miyabe와 Sajonz 등[14-16]은 다양한 조작법으로 실험과 이론의 결과를 비교 분석하였다. 2000년대부터 Miyabe 등은 모멘트 분석을 액체 크로마토그래피(liquid chromatography, LC)에서 HPLC까지 확대시켰다. 또한, 고정상(stationary phase)이나 리간드(ligand)에 대한 속도론이 구체적으로 특성화 되었으며 전달방법 각각에 대한 속도론은 정량적 정확성을 향상시키기 위하여 구체적으로 연구되었다[2,3,17-20]. 칼럼 내부의 물질전달 연구 초기에는 이론을 정립하기 위하여 대부분 석유화학물질을 분석하였다[17-19]. 1990년대에서 2000년대까지는 유리 칼럼(glass column)이나 이온 교환 칼럼(ion exchange column)을 통해 분리되는 이성질체 및 단백질까지 모멘트에 대한 연구가 확산되었다[4,14-16,20].

본 연구에서는 분자량이 329.206 g/mol인 고리형 아데노신 일인산(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)을 역상 HPLC(RP-HPLC) 칼럼으로 분석하였다. cAMP는 대추에 들어있는 천연 약물로 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, Spoto 등[21]은 역상 HPLC를 이용하여 cAMP의 kinetic에 관한 연구를, Zhang 등[22]은 HPLC를 이용하여 대추가 포함하고 있는 cAMP를 분석하였다. 세포막 안쪽에 존재하는 아데닐산 사이클라아제(adenylate cyclase)에 의해 아데노신 삼인산(adenosine triphosphoric acid, ATP)에서 만들어지는 cAMP는 세포 간 신호 전달 경로에 관여하는 2차 신호 전달자이다. 체내에서 cAMP 활성화는 단백질 기작에 의해 발생되며 암, 심장질환에 대한

대응력을 높여주는 효과가 있다. cAMP의 모멘트 분석을 위하여 GR model을 사용하였고, 평형상수(K)는 first absolute moment를 통해 계산하였다. 분자확산계수(molecular diffusivity,  $D_m$ )는 Wilke-Chang 식을 통해 계산한 후, 축방향분산계수(axial dispersion coefficient,  $D_{ax}$ )를 구하였다. 입자내부확산계수(intra particle diffusivity,  $D_e$ )는 van Deemter 식과 이론단수(theoretical plate number, N)를 비교하여 얻었다. 모멘트 분석을 통해 얻는 parameter들을 이용하여 정량적 결과인 van Deemter coefficient를 계산하고, 정성적 결과를 van Deemter 그래프를 도식화하였다.

## 2. 이 론

모멘트 분석을 통해 크로마토그래피의 거동을 효과적으로 이해할 수 있다. 용리평형(retention equilibrium)은 first absolute moment ( $\mu_1$ ), 물질전달속도론은 second central moment ( $\mu_2$ )에 의해 결정된다. 흡착평형상수(adsorption equilibrium constant, K)는 식 (1)과 같이 용출 피크의 위치로부터 결정된다.

$$\mu_1 = \frac{\int_0^\infty Ce(t)dt}{\int_0^\infty C_e(t)dt} = \frac{L}{u_0} [\epsilon_e + (1 - \epsilon_e) \{ \epsilon_p + (1 - \epsilon_p) K \}] \quad (1)$$

여기서  $C_e(t)$ 는 칼럼 출구에서 시간에 따른 농도의 변화율, L은 칼럼의 길이,  $u_0$ 는 이동상의 표면속도를,  $\epsilon_e$ 는 칼럼의 공극률을,  $\epsilon_p$ 는 칼럼 내 고정상 입자의 공극률을 의미한다.

식 (1)를 통해 평형상수(K)를 결정할 수 있으며 x축을  $L/u_0$ , y축을  $(\mu_1 - t_0)/(1 - \epsilon_e)$ 으로 하여 도식화 했을 때, 기울기는 평형상수(K)를 의미한다. 여기서  $t_0$ 는 고정상과의 상호작용이 없는 용질이 용출되는 시간인 hold-up time을 의미하며 식 (2)와 같이 쓸 수 있다.

$$t_0 = (L/u_0) \{ \epsilon_e + (1 - \epsilon_e) \epsilon_p \} \quad (2)$$

Second central moment는 식 (3)-(8)을 통해 구할 수 있다.

$$\mu_2 = \frac{\int_0^\infty Ce(t)(t - \mu_1)^2 dt}{\int_0^\infty C_e(t)dt} = \frac{2L}{u_0} (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d + \delta_{ads}) \quad (3)$$

$$\delta_0 = \epsilon_e + (1 - \epsilon_e) \{ \epsilon_p + (1 - \epsilon_p) K \} \quad (4)$$

$$\delta_{ax} = \frac{\epsilon_e D_L}{u_0^2} \delta_0^2 \quad (5)$$

$$\delta_f = (1 - \epsilon_e) \left( \frac{R_p}{3k_f} \right) \{ \epsilon_p + (1 - \epsilon_p) K \}^2 \quad (6)$$

$$\delta_d = (1 - \epsilon_e) \left( \frac{R_p^2}{15D_e} \right) \{ \epsilon_p + (1 - \epsilon_p) K \}^2 \quad (7)$$

$$\delta_{ads} = (1 - \epsilon_e) (1 - \epsilon_p) \left( \frac{K^2}{k} \right) \quad (8)$$

여기서  $D_L$ 은 축방향분산계수(axial dispersion coefficient),  $k_f$ 는 외부물질전달계수(external mass transfer coefficient),  $D_e$ 는 입자내부확산계수(intra-particle diffusivity),  $R_p$ 는 고정상 입자의 반지름이다.

$\delta$ 는 second central moment에서 여러 가지 물질전달과정의 영향을 나타내며, 이 때 하첨자로 쓰인 ax, f, d, ads는 각각 축 방향 확산,

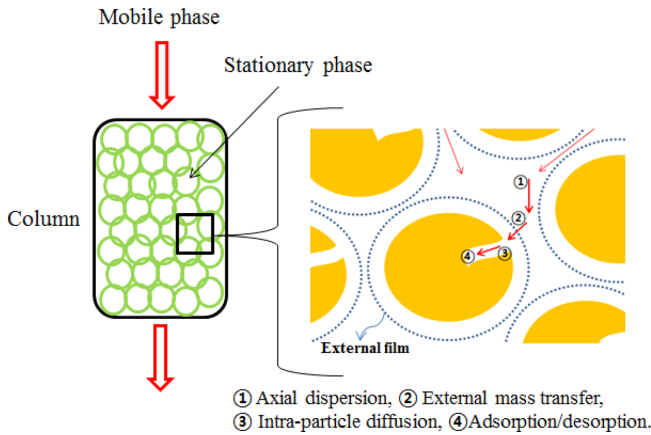


Fig. 1. Scheme of mass transfer processes in the column.

외부물질전달, 입자내부확산, 흡·탈착의 모멘트를 의미한다. 칼럼 안에서 용질의 물질전달 거동은 축 방향 확산, 외부물질전달, 입자 내부확산, 흡·탈착의 순서로 이루어지는데(Fig. 1), 역상크로마토그래피에서 흡·탈착의 반응속도가 매우 빠르기 때문에 모멘트 값을 무시한다. 따라서 본 연구에서는 흡착 및 탈착 반응속도를 제외하고 세 가지 kinetic에 대해서만 고려하였다.

유체로부터 고정상 입자로 물질이 이동할 때의 외부물질전달계수인  $k_f$ 를 계산하기 위해 사용한 Wilson-Geankoplis 식을 식 (9)에 나타내었다.

$$Sh = \left( \frac{1.09}{\epsilon_e} \right) Sc^{1/3} Re_p^{1/3} \quad (9)$$

$$Sh = \frac{2k_f Re_p}{D_m} \quad (10)$$

$$Sc = \frac{\eta}{\rho_p D_m} \quad (11)$$

$$Re_p = \frac{2u_0 R_p \rho_p}{\eta} \quad (12)$$

식 (9)에 식 (10)-(12)를 대입하여  $k_f$ 를 구할 수 있으며  $\rho_p$ 는 칼럼 내 고정상 입자의 밀도,  $\eta$ 는 이동상의 점도를 의미한다.

이동상 내 용질분자확산계수(molecular diffusivity,  $D_m$ )은 Wilke-Chang 식으로 결정할 수 있으며 식 (13)과 같다.

$$D_m = \frac{7.4 \times 10^{-8} T \sqrt{\alpha_{sv} M_{sv}}}{\eta_{sv} V_{b,a}^{0.6}} \quad (13)$$

식 (13)의 하첨자 sv, a는 각각 용매와 용질을 의미한다[23].  $V_b$ 는 끓는점에서의 몰부피,  $\alpha$ 는 회합도(degree of aggregation), M은 분자량이다.

HETP( $H_{total}$ )는 이론단수(N) 또는 세 가지 물질전달과정을 통해 구할 수 있다. 이론단수를 통한 계산법은 식 (14), (15)에 나타내었다.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 \quad (14)$$

$$H_{total} = \frac{L}{N} \quad (15)$$

칼럼 내 세 가지 물질전달과정을 이용하여 HETP를 구하는 방법은 식 (16)과 같다.

$$H_{total} = \left( \frac{\mu_2}{\mu_1} \right) L = \frac{2\epsilon_e D_L}{u_0} + \frac{2\delta_f}{\delta_0^2} u_0 + \frac{2\delta_d}{\delta_0^2} u_0 = H_{ax} + H_f + H_d \quad (16)$$

$H_{ax}$ 의 영향은 유량에 의존적인  $H_f$ 와 고정상 내부에서 용질분자의 확산이동을 의미하는  $H_d$ 와는 분리하여 고려할 수 있으며 식 (16)을 식 (17)로 고쳐 다시 쓸 수 있다.

$$H_{total} - H_f = H_{ax} + H_d = \frac{2\epsilon_e D_L}{u_0} + \frac{2\delta_d}{\delta_0^2} u_0 \quad (17)$$

구형입자로 채워져 있는 HPLC 칼럼의 축방향분산계수( $D_L$ )은 분자확산과 에디확산(eddy diffusion)으로 구성된 축 방향 분산으로부터 유추하여 계산할 수 있다. 이를 수식화하면 식 (18)과 같다.

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u_0 \quad (18)$$

여기서  $\gamma_1$ 과  $\gamma_2$ 는 geometrical coefficient로 구형입자로 채워진 칼럼에서 보통 0.7과 0.5로 쓴다[4].

식 (17), (18)을 결합하여 식 (19)를 얻을 수 있으며 일반적으로 식 (19)가 많이 쓰인다.

$$H_{total} - H_f = \frac{2\epsilon_e \gamma_1 D_m}{u_0} + 2\epsilon_e \gamma_2 d_p + \frac{2\delta_d}{\delta_0^2} u_0 = \frac{B}{u_0} + A + C u_0 \quad (19)$$

식 (19)는  $H_{total} - H_f$ 와 유량간의 관계를 세 개의 계수 A, B, C를 도입하여 나타낸 van Deemter 식이다.

이러한 모멘트 방법은 역상 HPLC, 이온교환크로마토그래피, 기체크로마토그래피를 이용한 모멘트 분석에 다양하게 사용되었다 [24-27].

### 3. 실험

#### 3-1. 실험재료 및 방법

실험에 사용한 이동상은 메탄올(SAMCHUN, Korea)과 3차 증류수를 각각 10/90, 20/80, 30/70의 부피비로 혼합하여 만든 메탄올 10, 20, 30% 용액이다. 각각의 용매 1 L에 potassium phosphate monobasic (SIGMA, USA) 6.8045 g을 첨가하여 0.05 M의 완충용액을 만들고, hydrogen chloride(SAMCHUN, Korea)를 이용하여 pH를 4.75±0.01로 맞추었다.

실험에서 사용한 샘플은 cyclic adenosine monophosphate(SIGMA, USA) 분말을 각각 3.29, 13.2, 23.0 µg씩 3차 증류수 10 ml에 용해시켜 1.0, 4.0, 7.0 mM로 만들었다.

#### 3-2. HPLC 실험

이 실험에서 사용한 HPLC 시스템은 Fig. 2에 개략적으로 나타내었다. Valve(Beckman, USA)에 샘플 20 µL를 주입한 뒤 110B solvent delivery module pump(Beckman, USA)를 이용하여 이동상이 칼럼으로 흐르도록 하였다. 칼럼은 고정상 입자의 직경이 5 µm인 Vydac ODS(4.6×250 mm, The Nest Group, USA)를 사용하였으며 783A programmable absorbance detector(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 280 nm의 파장에서 cAMP를 검출하였다. 검출된 전기적

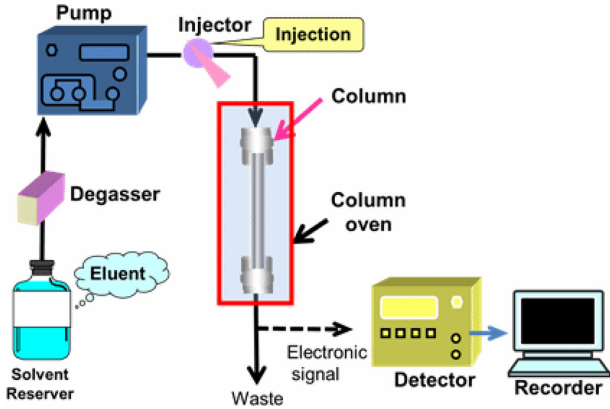


Fig. 2. HPLC system.

신호를 Autochro data module(Younglin, Korea)을 이용하여 디지털 신호로 바꿔 시각화하였다.

실험은 각각 세 가지 이동상(메탄올 10, 20, 30%), 샘플 농도 (1.0, 4.0, 7.0 mM), 유량(0.5, 1.0, 1.5 mL/min)으로 하여 27가지 경우에 대한 크로마토그램을 얻었다.

4. 결과 및 고찰

모멘트 분석을 위하여 GR model을 사용하였다. First moment는 평형상수(K)와 관계되며 식 (1)을 통해 계산된 용출 시간을 의미한다. RP-HPLC에서 second moment는 축방향분산, 내부물질전달, 입자내부확산을 가리키며 HETP 값을 결정한다. 분자확산계수(D<sub>m</sub>)는 식 (13)에 나타낸 Wilke-Chang 식, 축방향분산계수(D<sub>L</sub>)는 식 (18)을 통해 결정하며 외부물질전달계수(k<sub>f</sub>)는 Wilson-Geankoplis 식을 통해 계산한다. 식 (16)에 나타낸 H<sub>total</sub>에서 H<sub>ax</sub>과 H<sub>f</sub>를 빼주어 H<sub>d</sub> 값을 구한 후, 식 (7)을 통해 입자내부확산계수(D<sub>e</sub>)를 계산하였다.

Fig. 3은 메탄올 20%의 이동상에서 세 가지 다른 용질 농도에 대한 first moment값을 보여준다. (μ<sub>1</sub>-t<sub>0</sub>)/(1-ε<sub>m</sub>)과 L/u<sub>0</sub>에 대해 직선을 도식화하여 평형상수(K)를 계산한 결과, K값은 0.91이고 편차는 ±0.061이었다. 이는 동일한 이동상의 조건에서 용질의 농도차이는 크로마토그램의 평형상수에 큰 영향을 주지 않음을 의미한다. 세

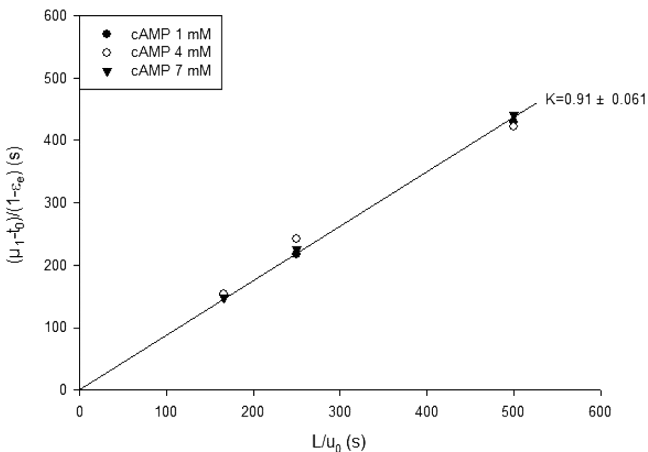


Fig. 3. First moment plot of cAMP at various concentration (Methanol/Water=20/80 vol.%).

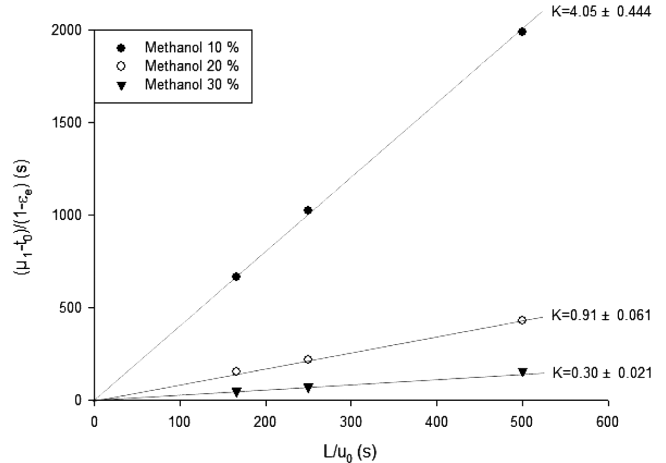


Fig. 4. Plots of the first moment at various mobile phases with a solute concentration, 1.0 mM.

가지 이동상에서 하나의 용질 농도에 대한 first moment와 유량 사이의 관계를 Fig. 4에 나타내었다. K값은 이동상에 따라 메탄올 10, 20, 30%에서 각각 4.05, 0.91, 0.30이다. 그래프에서 메탄올의 부피분율이 증가함에 따라 평형상수가 작아졌고, 따라서 용출 시간이 감소한다. 이는 메탄올의 부피분율이 증가함에 따라 이동상의 극성도(polarity)가 감소함으로써 극성을 띠는(polar) cAMP와 이동상간의 결합력이 감소하고, 극성을 띠지 않는(non-polar) 고정상과 이동상간의 흡착력이 증가하여 상대적으로 cAMP-고정상의 흡착력을 감소시키며 고정상에 흡착하는 시간을 짧게 만드는 것으로 해석된다. 따라서 first moment는 용질의 농도와 상관없이 이동상의 조성에 영향을 받으며 유량 또는 이동상의 메탄올 부피분율이 감소하면 first moment가 증가하였다.

Second moment는 세 가지 전달계수를 이용하여 분석할 수 있다. 계산한 분자확산계수(D<sub>m</sub>), 축방향분산계수(D<sub>L</sub>)를 Table 1에 나타내었다. D<sub>m</sub>의 값은 8.666×10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup>/s에서 9.895×10<sup>-4</sup> cm<sup>2</sup>/s로 이동상의 메탄올 부피분율이 10%에서 30%로 증가함에 따라 증가하였다. D<sub>L</sub>은 식 (18)에서 볼 수 있듯이 D<sub>m</sub>이 증가함에 따라 커지고, u<sub>0</sub>와는 정비례관계이다. 식 (5)에서 알 수 있듯이 D<sub>L</sub>의 증가에 따라 axial dispersion moment (δ<sub>ax</sub>)의 값이 커진다. δ<sub>ax</sub>의 값의 증가는 칼럼 내에서 분산의 영향 증가를 의미하며 이는 용출 피크의 폭을 더 넓게 만든다. 이와 같은 경향은 이전 연구[5,28]에서도 볼 수 있었다.

Table 1. Molecular diffusivity calculated by the Wilke-Chang equation at each mobile phase, axial dispersion coefficients according to the mobile phase and flow rate, and external mass transfer coefficients obtained by the Wilson-Geankoplis equation

	Superficial velocity [cm/s]	Vol.% of methanol		
		10	20	30
D <sub>m</sub> × 10 <sup>4</sup> [cm <sup>2</sup> /s]	-	8.666	9.270	9.895
D <sub>L</sub> × 10 <sup>4</sup> [cm <sup>2</sup> /s]	0.050	6.191	6.615	7.052
	0.100	6.317	6.740	7.177
k <sub>f</sub> × 10 <sup>2</sup> [cm <sup>2</sup> /s]	0.050	6.442	6.865	7.302
	0.100	4.808	4.821	4.819
	0.100	3.029	3.037	3.036
	0.150	2.311	2.318	2.317

Wilson-Geankoplis 식을 외부물질전달계수( $k_f$ )를 계산하는데 사용하였고 계산한  $k_f$ 값은 Table 1에 정리하였다. 이동상의 메탄올 부피분율을 고정시키고 유량을 증가시키면  $k_f$ 값이 감소하는 반면, 유량을 고정시키고 메탄올의 부피분율을 증가시키면  $k_f$ 의 값은 증가 후 감소한다. 이는 식 (9)-(12)를  $k_f$ 에 대해 정리하여 설명할 수 있다.  $k_f$ 를 정리하여 다시 쓰면  $k_f = I \left( \frac{M_{sv} \alpha_{sv} \eta_{sv}}{u_0} \right)^{2/3}$  ( $I$ 는 상수)이다. 이동상의 메탄올 부피분율을 고정시키고 유량을 증가시키면 이동상의 조성과의 관련이 있는  $M_{sv}$ ,  $\alpha_{sv}$ ,  $\eta_{sv}$ 는 모두 상수가 되어  $k_f = m \left( \frac{1}{u_0} \right)^{2/3}$  ( $m$ 은 상수) 형태의 감소함수가 되어 유량의 증가에 따라  $k_f$ 값이 감소한다. 반대로 유량을 고정시키고 이동상의 메탄올 부피분율을 증가시키면, 이로 인해 값이 증가하는  $M_{sv}$ 의 영향으로 값이 증가하지만 부피분율의 증가로 값이 감소하는  $\alpha_{sv}$ 와  $\eta_{sv}$ 의 감소량이 더 크기 때문에  $k_f$ 값은 감소한다. 메탄올 부피분율에 따른  $M_{sv}$ ,  $\alpha_{sv}$ ,  $\eta_{sv}$  각각의 값과 곱은 Table 2에 정리하였고  $\alpha_{sv}$ 는 보고된 문헌[23]을 통해 구하였다. 식 (6)에서 보듯이  $k_f$ 값의 감소는 external moment  $\delta_f$ 의 값을 증가시키며 유량의 증가와 이동상의 조성변화를 통해 고정상 바깥의 이동상 필름 두께가 감소할 것으로 추측된다.

입자내부확산은 식 (7)을 통해 알 수 있고 intra-particle diffusion moment ( $\delta_d$ )는 식 (14)-(16)을 통해 구할 수 있다. Table 3에 용질의 농도, 유량, 이동상의 메탄올 부피분율에 따른 입자내부확산계수 ( $D_e$ )의 값을 정리하였다.  $D_e$ 의 값은 이동상의 메탄올 부피분율에 증가함에 따라, 용질의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보인 반면 유량과의 두드러진 경향성을 보이지 않았다. 이는 용매의 메탄올 부피분율과 용질의 농도가 증가하면 입자의 세공(pore) 안에서 용질의 운동속도가 감소하여 확산속도가 감소하기 때문으로 보인다. 따라서 메탄올의 부피분율이 커지거나 용질의 농도가 증가하면 intra-particle diffusion moment ( $\delta_d$ )의 값은 감소하였다.

Fig. 5는 4.0 mM의 cAMP를 세 가지 다른 이동상의 농도 조건에서 실험하여 얻은  $H_{total} - H_i$ 와  $u_0$ 의 관계를 도식화한 것이다.  $u_0$ 가 약 0.02 cm/s보다 작은 범위에서는 곡선이 거의 선형이며 이동상의 농

Table 2. Values of molecular weight, degree of aggregation, and viscosity at each mobile phase

	Vol.% of methanol		
	10	20	30
$M_{sv}$ [g/mol]	19.442	20.824	22.226
$\alpha_{sv}$	2.5593	2.5111	2.4546
$\eta_{sv}$ [g·mol <sup>-1</sup> ·s]	0.009385	0.008998	0.008610
$\alpha_{sv} \cdot M_{sv} \cdot \eta_{sv}$	0.4670	0.4705	0.4697

Table 3. The intra-particle diffusivity according to flow rate, mobile phase, and solute concentration

solute concentration	superficial velocity [cm/s]	Vol.% of methanol		
		10	20	30
1.0 mM	0.050	57.93	11.72	4.155
	0.100	50.37	13.00	4.093
	0.150	44.08	12.36	4.035
$D_e \times 10^6$ [cm <sup>2</sup> /s]	0.050	27.01	8.422	3.252
	0.100	31.99	10.41	3.460
	0.150	28.58	9.495	3.801
7.0 mM	0.050	19.86	7.579	2.929
	0.100	25.24	8.137	2.928
	0.150	21.58	7.357	2.629

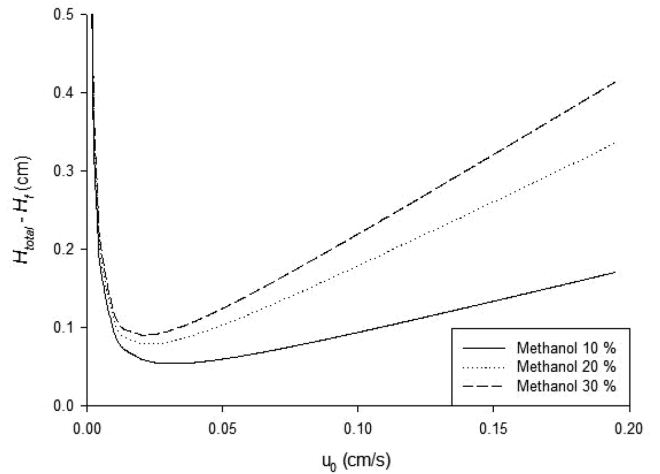


Fig. 5. Correlation between HETP and the flow rate upon changing the methanol ratio of the mobile phase.

Table 4. Van Deemter coefficient upon changing the composition of the mobile phase at one solute concentration, 4.0 mM

	vol.% of methanol		
	10	20	30
A	0.000348	0.000348	0.000348
B	0.000844	0.000903	0.000964
C	0.852	1.698	2.098

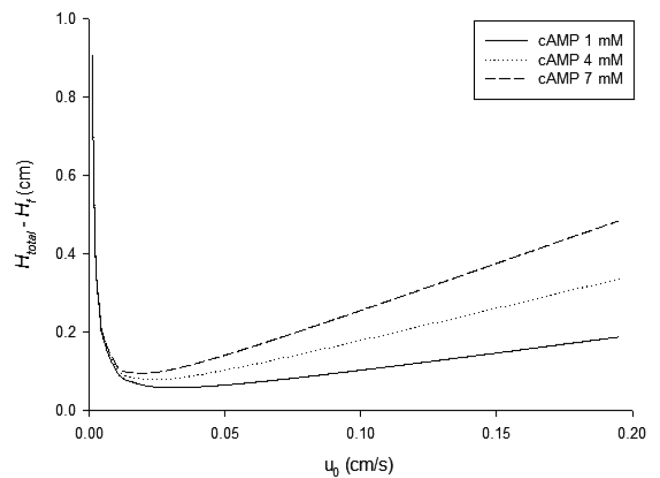


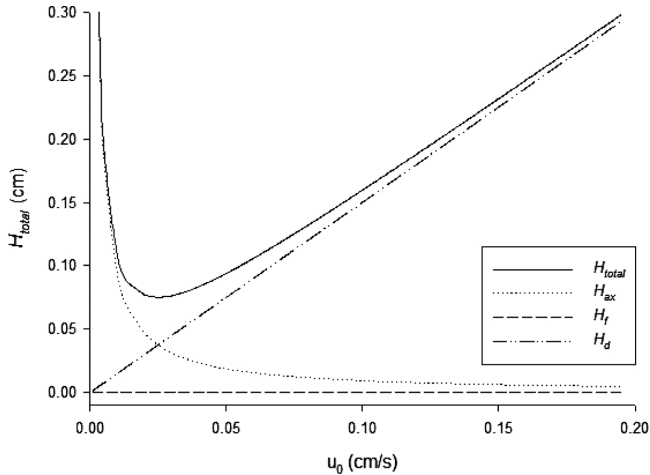
Fig. 6. Correlation between HETP and the flow rate upon changing the solute concentration on mobile phase composition (Methanol/Water = 20/80 vol.%).

도의 차이에 의한 뚜렷한 차이가 나타나지 않는다. 하지만 유량이 약 0.02 cm/s보다 커져 그래프의 변곡점을 지나는 지점부터 기울기의 차이가 나타나며, 이 기울기는 이동상 농도의 비와 비례했다. 식 (19)를 통해 계산한 van Deemter coefficient A, B, C는 Table 4에 정리하였다. A, B, C값을 비교한 결과 HETP의 값에 가장 크게 기여하는 값은 입자내부확산과 관련된 C값이었다.

Fig. 6는 메탄올 부피분율 20%의 이동상과 세 가지 다른 용질의 농도에 관한 HETP 곡선이고 이 조건에서 계산한 van Deemter coefficient A, B, C는 Table 5에 정리하였다. Table 3에서 볼 수 있

**Table 5. Van Deemter coefficient upon changing the cAMP concentration at one mobile phase (Methanol/Water=20/80 vol.%)**

	Concentration of cAMP		
	1.0 mM	4.0 mM	7.0 mM
A	0.000348	0.000348	0.000348
B	0.000903	0.000903	0.000903
C	0.938	1.698	2.462



**Fig. 7. Contribution of each mass component to the  $H_{total}$  with a solute concentration, 4.0 mM (Methanol/Water = 20/80 vol.%).**

듯이 용질의 농도는 입자내부확산계수( $D_e$ )에 큰 영향을 주며, 식 (7)과 식 (17)을 통해 용질의 농도변화는 HETP값에서 중요한 변수임을 알 수 있다. 한편, 용질분자의 농도차이에 의한  $D_e$ 의 값의 변화보다 이동상의 농도변화에 의한  $D_e$ 의 변화가 더 크기 때문에 Fig. 6보다 Fig. 5의 곡선의 편차가 더 크다. van Deemter coefficient A의 값은 Table 4, 5에서 같은 값을 가지고 있다. Table 5에서는 B값은 일정한 반면 Table 4에서는 이동상의 메탄올 부피분율에 따라 증가하여 Fig. 5에서 변곡점의 위치를 높였다. C값의 변화는 Table 4보다 Table 5에서 더 크다. 이는 HETP의 값이 이동상의 조성보다 용질의 농도에 더 의존적임을 보여주며 여기서 가장 큰 요인은 분자내부확산임을 반증한다. 즉 칼럼 안에서 높은 용질의 농도는 칼럼의 분리능을 감소시켜 HETP의 값이 커지고 용출되는 피크의 폭이 넓어짐을 의미한다.

Fig. 7은 4.0 mM의 cAMP를 메탄올 20%의 이동상 조건에서 실험하여 얻은 결과로, HETP의 값을 결정하는 세 가지 물질전달방법의 영향은 나타낸다. 외부물질전달과 관련된  $H_f$ 값은 거의 0이므로 HETP값에 미미한 영향을 끼친다. 축방향확산과 관련된  $H_{ax}$ 값은  $u_0$ 가 약 0.02 cm/s 이하의, 즉 유량이 작은 조건에서 HETP값에 큰 영향을 끼치다가 그 영향은 유량의 증가에 의해 점점 작아진다. 입자내부확산을 나타내는  $Cu_0$ 는 비교적 큰 값을 가지고 있어서  $H_{total}$ 은 변곡점 이후로 직선의 형태로 증가하며 이를 통해 용출 피크의 퍼짐 현상은 유량에 종속적임을 알 수 있다. 용질을 가장 효과적으로 분리할 수 있는 유량은 HETP의 값이 가장 작은 지점에서 갖는다. Fig. 6에서 이동상의 메탄올 부피분율이 20%이고 cAMP의 농도가 각각 1.0, 4.0, 7.0 mM일 때 HETP값이 가장 작은 곳에서의 유량은 각각 0.30, 0.22, 0.19 mL/min으로, 이 조건에서 가장 효과

적으로 cAMP를 분리할 수 있다. HETP에서 물질전달방법의 영향은  $H_d$ ,  $H_{ax}$ ,  $H_f$ 의 순으로 크며 이러한 경향은 기체 크로마토그래피에 대해 보고된 문헌[29]에서도 볼 수 있었다.

## 5. 결 론

모멘트 분석과 van Deemter 그래프를 이용하여 크로마토그래피를 이용한 cAMP 분리의 정량적, 정성적 연구를 진행하였다. RP-HPLC 실험을 통해 평형상수 K와 세 가지 물질전달계수를 얻었으며 van Deemter 식을 이용하여 HETP와 유량간의 관계를 파악하였다. 평형상수 K는 이동상의 메탄올 부피분율 10%, 20%, 30%로 증가할 때 용질의 농도와 관계없이 각각 4.05, 0.91, 0.30의 값을 가졌다. Wilke-Chang 식을 통해 구한 분자확산계수( $D_m$ )는 이동상의 메탄올 분율이 커질수록 증가했고, 축방향분산계수( $D_L$ )는  $D_m$ 과 유량에 비례했다. 외부물질전달계수( $k_f$ )는 Wilson-Geankoplis 식으로 구했고, 그 값은 유량의 증가에 따라 감소하지만 이동상의 메탄올 부피분율이 커질수록 증가하다가 식에서 회합도  $\alpha$ 와 점도  $\eta$ 값의 감소량이 커지면 그 값이 작아진다. 입자내부확산계수( $D_e$ )는 이동상의 메탄올 부피분율과 용질의 농도 증가에 따라 감소한다. HETP값에는 입자내부확산, 축방향분산, 외부물질전달의 순서로 큰 영향을 준다. 따라서 최선의 분리 조건을 찾기 위해 이동상의 조성을 바꾸는 것보다 용질의 농도 또는 유량변화를 통해 분자내부확산을 조절하는 것이 더 효과적이다[30].

## 감 사

본 연구는 한국연구재단 기초연구 프로그램에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## Nomenclatures

Ce(t)	: Concentration profiles of the sample at the exit of the column
$u_0$	: Superficial velocity
L	: Column length
K	: Adsorption equilibrium constant
$D_L$	: Axial dispersion coefficient
$R_p$	: Radius of particle
$k_f$	: External mass transfer coefficient
$D_e$	: Inter-particle diffusivity
$d_p$	: Particle diameter
$D_m$	: molecular diffusivity
Sh	: Sherwood number
Sc	: Schmidt number
$Re_p$	: Reynolds number of a particle
T	: Absolute temperature
M	: Molecular weight
$V_b$	: Molar volume at the normal boiling point
$t_R$	: Retention time
$w_b$	: Peak width
N	: Plate number of the column
$\epsilon_e$	: Void fraction of a column

- $\epsilon_p$  : Porosity  
 $\mu_1$  : First absolute moment  
 $\mu_2$  : Second central moment  
 $\gamma$  : Geometrical coefficient  
 $\eta$  : Viscosity  
 $\alpha$  : Degree of aggregation

## References

- Miyabe, K. and Suzuki, M., "Chromatography of Liquid-phase Adsorption on Octadecylsilyl-silica Gel," *AIChE J.*, **38**, 901-910 (1992).
- Miyabe, K. and Guiochon, G., "Measurement of the Parameters of the Mass Transfer Kinetics in High Performance Liquid Chromatography," *J. Sep. Sci.*, **26**, 155-173(2003).
- Miyabe, K., "Moment Analysis of Chromatographic Behavior in Reversed-phase Liquid Chromatography," *J. Sep. Sci.*, **32**, 757-770(2009).
- Choi, D. Y. and Row, K. H., "Estimation of Kinetic and Rate Parameters of Peptides by Moment Analysis," *J. Ind. Eng. Chem.*, **10**, 1052-1057(2004).
- Wilson, E. J. and Geankoplis, C. J., "Liquid Mass Transfer at Very Low Reynolds Numbers in Packed Beds," *Ind. Eng. Chem. Fundamen.*, **5**, 9-14(1966).
- Grushka, E., Snyder, L. R. and Knox, J. H., "Advances in Band Spreading Theories," *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 25-37(1975).
- Seirafi, H. A. and Smith, J. M., "Mass Transfer and Adsorption in Liquid Full and Trickle Beds," *AIChE J.*, **26**, 711-717(1980).
- Gunn, D. J., "Axial and Radial Dispersion in Fixed Beds," *Chem. Eng. Sci.*, **42**, 363-373(1987).
- Tallarek, U., Albert, K., Bayer, E. and Guiochon, G., "Measurement of Transverse and Axial Apparent Dispersion Coefficient in Packed Beds," *AIChE J.*, **42**, 3041-3054(1996).
- Tallarek, U., Bayer, E. and Guiochon, G., "Study of Dispersion in Packed Chromatographic Columns Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance," *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1494-1505(1998).
- Tallarek, U., Bayer, E., Dusschoten, D. V., Scheenen, T., As, V. H., Guiochon, G. and Neue, U. D., "Dynamic NMR Microscopy of Chromatographic Columns," *AIChE J.*, **44**, 1962-1975(1998).
- Tallarek, U., Dusschoten, D. V., As, V. H., Guiochon, G. and Bayer, E., "Mass Transfer in Chromatographic Columns Studied by PFG NMR," *Magn. Reson.*, **16**, 699-702(1998).
- Tallarek, U., Dusschoten, D. V., As, H. V., Bayer, E. and Guiochon, G., "Study of Transport Phenomena in Chromatographic Columns by Pulsed Field Gradient NMR," *J. Phys. Chem. B.*, **102**, 3489-3497(1998).
- Sajonz, P., Guan-Sajonz, H., Zhong, G. and Guiochon, G., "Application of the Shock Layer Theory to the Determination of the Mass Transfer Rate Coefficient and its Concentration Dependence for Proteins on Anion Exchange Columns," *Biotechnol. Prog.*, **13**, 170-178(1997).
- Sajonz, P., Kele, M., Zhong, G., Sellergen, B. and Guiochon, G., "Study of the Thermodynamics and Mass Transfer Kinetics of Two Enantiomers on a Polymeric Imprinted Stationary Phase," *J. Chromatogr. A.*, **810**, 1-17(1998).
- Miyabe, K. and Guiochon, G., "Kinetic Study of the Concentration Dependence of the Mass Transfer Rate Coefficient in Anion-exchange Chromatography of Bovine Serum Albumin," *Biotechnol. Prog.*, **15**, 740-752(1999).
- Miyabe, K., Canazzini, A., Gritti, F., Kele, M. and Guiochon, G., "Moment Analysis of Mass Transfer Kinetics in Silica Monolithic Columns," *Anal. Chem.*, **75**, 6975-6986(2003).
- Miyabe, K. and Guiochon, G., "Surface Diffusion in Reversed-phase Liquid Chromatography," *J. Chromatogr. A.*, **1217**, 1713-1734(2010).
- Gritti, F. and Guiochon, G., "Importance of Sample Intraparticle Diffusivity in Investigations of the Mass Transfer Mechanism in Liquid Chromatography," *AIChE J.*, **57**, 346-358(2011).
- Silva Jr, I. J. D., Veredas, D., Carpes, M. J. S. and Santana, C. C., "Chromatographic Separation of Bupivacaine Enantiomers by HPLC: Parameter Estimation of Equilibrium and Mass Transfer Under Linear Conditions," *Adsorption*, **11**, 123-129(2005).
- Spoto, G., Whitehead, E., Ferraro, A., Di, Terlizzi PM., Turano, C. and Riva, F., "A Reverse-phase HPLC Method for cAMP Phosphodiesterase Activity," *Anal. Biochem.*, **196**, 207-210(1991).
- Zhang, Y., Lu, P., Wang, H., Zhang, J., Li, H. and Liu, J., "Simultaneous HPLC Determination of cAMP and cGMP in Commercial Jujube Juice Concentrate," *Food Science*, **30**, 321-322(2009).
- Miyabe, K. and Isogai, R., "Estimation of Molecular Diffusivity in Liquid Phase Systems by the Wilke-Chang Equation," *J. Chromatogr. A.*, **1218**, 6639-6645(2011).
- Choi, D. Y. and Row, K. H., "Estimation of Kinetic and Rate Parameters of Peptides by Moment Analysis," *J. Ind. Eng. Chem.*, **10**, 1052-1057(2004).
- Won, H. J. and Kim, I. H., "Prediction of Formic Acid Chromatogram in Gradient Elution Chromatography," *Biotechnol. Bio-process Eng.*, **6**, 31-36(2001).
- Kim, J. T. and Kim, I. H., "Pulse Response Test in Medium Pressure Protein Chromatography," *Korean J. Chem. Eng.*, **15**, 575-579(1998).
- Wang, Y. J. and Gerard, C., "The Use of Moment Analysis in Inverse Gas Chromatography," *Macromolecules*, **22**, 3781-3788(1989).
- Lee, C. H., Kang, J. H. and Row, K. H., "Parameter Estimation of Perillyl Alcohol in RP-HPLC by Moment Analysis," *Biotechnol. Bio-process Eng.*, **7**, 16-20(2002).
- Ra, Y. J., Jung, Y. A. and Row, K. H., "Factors Affecting HETP in Capillary Gas Chromatography," *Korean J. Biotechnol. Bio-eng.*, **17**, 88-92(2002).
- Park, I. S. and Ahn, D. Y., "Estimation of Mass Transfer Parameters of Large-pore Particles by Chromatography," *Korean Chem. Eng. Res.*, **27**, 331-338(1989).