

## 초임계 유체 크로마토그래피에서 새로운 분리방식인 변형제 조성 프로그래밍법 개발

김호현 · 표동진

강원대학교 자연과학대학 화학과

(1997. 5. 10. 접수)

### Development of New Separation Technique, Modifier Composition Programming in Supercritical Fluid Chromatography

Hohyun Kim, Dongjin Pyo

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received May. 10, 1997)

**요약** : 초임계 유체 크로마토그래피(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)는 종래의 크로마토그래피 방법으로 분석하기 어려운 물질을 분석해 내는 기술로서 발전이 되어 왔다. 그러나 초임계 유체 CO<sub>2</sub>는 극성이 큰 시료들을 용출(elution)시키기가 어려워 초임계 CO<sub>2</sub>에 극성을 지닌 변형제(modifier)를 섞어서 이동상으로 사용하였다. 기존의 간단하고 효과적인 방법으로는 변형제로 포화된 Silica Column을 사용하였는데, 이 방법의 가장 큰 단점은 변형제의 양을 조절할 수 없다는 것이다. 따라서 본 연구에서는 초임계 CO<sub>2</sub>에 변형제를 지속적으로 첨가시키며, 변형제의 양을 조절할 수 있는 새로운 방법을 개발하였고, 첨가된 수분(H<sub>2</sub>O)의 양은 perfluorosulfonate ionomer (PFSI) film을 이용하여 만든 amperometric microsensor로서 측정하였다. 실제로 이 방법을 사용하여 PAH 혼합물을 변형제 조성 프로그래밍법으로 분리해 본 결과 좋은 크로마토그램을 얻었다.

**Abstract** : Supercritical Fluid Chromatography(SFC) has been developed as an analytical technique for the compounds that is difficult to analyze by conventional chromatography. Since supercritical fluid CO<sub>2</sub> is difficult to elute solutes with high polarity, modified supercritical CO<sub>2</sub>, was used as a mobile phase. In conventional method, silica column which is saturated with modifier was used. However, with this method, we can not control the quantity of modifier. In this paper, we developed a new method which can control quantity of modifier mixed in supercritical fluid CO<sub>2</sub>. The quantity of H<sub>2</sub>O mixed was measured with amperometric microsensor which was made by perfluorosulfonate ionomer(PFSI) film. we have also obtained a good supercritical fluid chromatogram of PAH mixture by use of a modifier composition programming method.

**Key words** : supercritical fluid chromatography, modifier programming

#### 1. 서론

크로마토그래피에서 이동상을 초임계 유체로 사용

된 예가 Klesper, Corwin, Turner에 의해 처음으로 보고되었던<sup>1</sup> 1962년 이후 지금까지 많은 변화가 거듭되어 왔다. 특히, 최근 몇 년 사이에 그 기술이 급성장하

면서 초임계 유체 크로마토그래피(Supercritical Fluid Chromatography, SFC)는 종래의 크로마토그래피 방법으로 분석하기 힘든 물질을 분석하는 방법으로서 많은 사람들의 관심을 끌어 왔다.

초임계 유체는 몇 가지 특성을 나타내는데, 먼저 압력과 밀도와의 관계를 살펴보면 동일 온도에서 밀도는 직선적인 비례관계는 아니지만 압력에 비례함을 알 수 있다. 또한 임계점 근처에서는 압력이 조금만 증가하여도 밀도는 급격히 증가한다.<sup>2</sup> 크로마토그래피에서 이동상으로 사용한 물질의 밀도가 증가하게 되면 일반적으로 이동상의 용매강도가 증가하게 된다. 앞의 사실로부터 GC에서 컬럼의 온도 변화를 이용하여 손쉽게 용질을 분리시키는 것처럼 SFC에서는 압력 변화(=밀도 변화)를 이용하여 용질을 분리하게 된다.

SFC의 이동상으로 쓰이는 초임계 유체의 밀도는 GC(Gas Chromatography)에서 이동상으로 사용하는 기체보다 약 200~500배 정도 크기 때문에 GC로는 분리하기 어려운 물질, 즉 분자량이 크고 기화가 잘 되지 않는 물질이나 열에 약한 물질을 분리할 수 있는 요인이 된다. 그러나 SFC의 이동상으로 많이 쓰이는 초임계 유체들은 상대적으로 비극성인 경우가 많다. 초임계 이동상으로 가장 많이 쓰이고 있는 CO<sub>2</sub>의 경우, 아주 높은 압력에서도 대표적인 비극성 용매인 헥산보다도 극성이 적다.<sup>3</sup> 분리를 잘 하기 위해서는 용질의 극성이 이동상과 정지상 사이에 있어야 하는데, 이동상인 초임계 CO<sub>2</sub>의 경우 극성이 매우 적어 여러 가지 극성을 띤 시료나 이들을 포함하는 혼합물을 분리하는데 어려움이 따른다. 실제 시료의 경우 여러 가지 화합물이 복합체로 존재하는 경우가 대부분이며, 비극성 화합물로만 이루어진 시료는 거의 없기 때문이다. 따라서 SFC를 일반적인 분리 기술로써 발전시키기 위해서는 비극성인 CO<sub>2</sub>보다 훨씬 더 극성을 띠는 이동상이 필요하다. 이와 같은 필요성 때문에 NH<sub>3</sub>와 같은 극성을 띠는 이동상을 사용하기도 하지만 더 좋은 방법은 비극성인 초임계 CO<sub>2</sub>에다 극성 유기용매(H<sub>2</sub>O, methanol, formic acid 등), 즉 변형제(modifier)를 섞어서 사용하는 방법이다. 초임계 이동상에 용해되는 용질의 용해도는 이동상에 첨가되는 변형제에 의해 큰 영향을 받는다. 변형제의 사용은 Jentoft와 Gouw<sup>4</sup>, 그리고 Novotony<sup>5</sup>에 의해 보고되었다. Novotony는 n-pentane을 이동상으로 사용하고 이에 0.1%의 iso-

propanol을 첨가시켰을 때 polynuclear aromatic hydrocarbons의 K값이 20~25% 감소한다고 보고하였다. 이러한 현상의 원인은 초임계 이동상에 변형제를 첨가시켜 주면 이동상의 극성이 변하게 되며 또한 변형제는 column 충전제의 비활성화(deactivation)를 유도하기 때문이다.

Capillary SFC에서는 대부분의 경우 이동상으로서 순수한 CO<sub>2</sub>를 사용하는데, 이는 검출기로서 불꽃 이온화 검출기(Flame Ionization Detector, FID)를 많이 사용하기 때문이다. 실제 formic acid와 물(H<sub>2</sub>O)을 제외한 대부분의 변형제를 사용하는 경우 이들이 FID의 signal에 영향을 주므로 사용하기가 어렵다.<sup>5</sup> Packed column SFC에서는 극성성분을 분리할 때 변형제의 사용은 필수적이며<sup>6</sup>, 변형제를 섞음으로써 이동상의 용매강도를 증가시키는 이러한 방법들은 널리 쓰이고 있다. 여러 문헌들에서는<sup>7-9</sup> packed column SFC에 변형제를 첨가시켜 주었을 때, 이것이 봉우리 모양(peak shape), 선택성(selectivity), 머무름 시간(retention time) 등에 미치는 영향에 대해 보고하였다.

초임계 유체에 변형제를 첨가시키는 가장 간단하고 효과적인 방법은 변형제로 포화된 silica column을 사용하는 것이다.<sup>10-11</sup> 즉, 펌프와 주입기(injector) 사이에 변형제로 포화된 column을 설치함으로써, 초임계 유체가 이 column을 통과할 때 변형제가 초임계 유체에 녹아 들어가게 만드는 것이다. 그러나 이 방법에서는 변형제를 함유하는 silica column의 수용 능력에 한계가 있기 때문에 이동상에 첨가되는 변형제의 양에도 한계가 있다는 것과 또한 변형제의 양을 조절할 수 없다는 단점이 있다. 다른 문헌들에서도<sup>12-14</sup> 일정량의 변형제를 첨가하는 방법을 개발하여 사용하고 있다. 그러나 이 방법에서도 마찬가지로 변형제의 양을 조절할 수 없으며, 변형제의 지속적인 첨가가 60~90분 정도로 짧은 편이다. 따라서 초임계 유체에 첨가되는 변형제 수용능력의 한계 극복 및 변형제의 양을 정확히 측정하고 조절하는 것이 필요하다.

본 논문에서는 초임계 유체에 변형제를 지속적으로 첨가시키며, 변형제의 양을 조절할 수 있는 새로운 방법을 개발하였고, 변형제의 양을 측정하기 위해 perfluorosulfonate ionomer(PFSI) film을 이용해서 만든 sensor(amperometric microsensors)를<sup>15</sup> 이용하였다. 이 sensor를 이용해 초임계 CO<sub>2</sub>에 변형제로서

첨가된 변형제( $H_2O$ , methanol)의 양을 측정하였다. 또한 실제 PAH 혼합물을 변형제 조성 프로그래밍법으로 분리해 본 결과 좋은 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

## 2. 실험

실험에 사용한 기기는 변형제(modifier)를 첨가하기 위한 Micro-LC pump (Prodigix 4P, Micro-Tech Scientific)와 초임계 유체  $CO_2$ 를 첨가하기 위한 syringe pump(ISCO, Model 260D)를 사용하였으며, mixing device로는 Micro-Tech Scientific사에서 나온 Dynamix-Plus mixer를 개조하여 만들었다. 이동상으로는 고순도(Scott 회사, 99.999%)의 초임계 유체  $CO_2$ 를 사용하였으며 물( $H_2O$ )을 변형제로 사용하였다.

초임계  $CO_2$ 에 물을 첨가시켜 주기 위해 본 실험에서는 새로운 장치(mixing device)를 개발(Fig. 1)하여 사용하였다. 이 mixing device의 특징은 종전과는 달리 변형제(modifier)를 일정량이 아닌, 지속적인 공급(Micro-LC pump 이용)이 가능하며 또한 변형제의 양을 조절할 수가 있다.

이동상인 초임계  $CO_2$ 가 mixing device를 통과했을 때 얼마만큼의 수분이 첨가되었는지를 알아보기 위해 일정 시간 간격으로 수분의 양을 측정하였는데, 이 측정을 위해 고분자막, 즉 perfluorosulfonate(PFSI) ionomer film<sup>16</sup>을 이용하였다. Pt-wire(80mm×0.6mm)에 PFSI film을 입힌 후, 또 하나의 Pt-wire로 촘촘하게 감아 sensor를 만들고 이것을 플라스틱 튜브 속에 설치하였다. Fig. 2에서는 본 실험에 사용한 sensor의 단면도를 나타내었다. 양쪽 전극(Pt-wire) 사이의 전압차이를 측정하기 위해 일정량의 전류(0.1 $\mu$ A)를 공급해 주었고, sensor의 출력을 기록하기 위해 strip chart recorder(linear)를 사용하였다.

건조 공기와 시료 기체(sample gas)를 번갈아 sensor로 보내기 위해 110V AC전원 장치로 작동하는 솔레노이드 밸브(solenoid valve)를 사용했으며, 110V AC 전원장치는 programmable process controller(ChronTol, Model CD-4)에 의해 프로그램된 시간에 따라 솔레노이드 밸브(solenoid valve)의 개폐(on-off)가 조절된다. 건조 공기를 만들기 위해, 실내 공기를 charcoal과 silica gel을 거쳐서(상대습도: 약 5%)

magnesium perchlorate( $Mg(ClO_4)_2$ )를 통과(상대습도: 0%)시켰다.

초임계  $CO_2$ 에 첨가된 수분의 양을 측정하기 위한 장치의 전체적인 배열을 Fig. 3에 나타내었다.

## 3. 결과 및 고찰

초임계 유체 크로마토그래피에서 이동상으로 가장 많이 사용하고 있는 초임계  $CO_2$ 는 극성이 큰 용질을 용출시키기가 어렵기 때문에, 이러한 점을 해결하기 위해  $H_2O$ , alcohol, formic acid 등의 극성을 띤 물질을 초임계  $CO_2$ 에 섞어서 이동상으로 사용하게 된다. 그러나  $H_2O$ 나 formic acid와 같은 물질을 변형제로 사용할 경우 이들이 펌프 속에 남아 있게 되어 펌프 부식의 원인이 되고, 또한 methanol의 경우 이것이 펌프 속에 깊숙이 침투해 있다가 다음 분석시 천천히 흘러

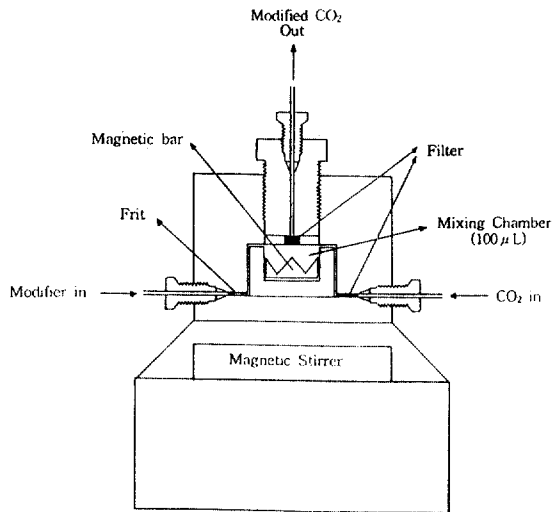


Fig. 1. Mixing device.

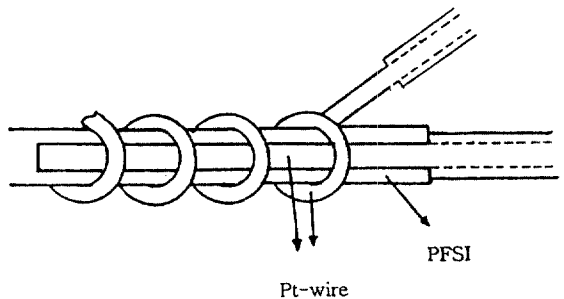


Fig. 2. Modifier sensor.

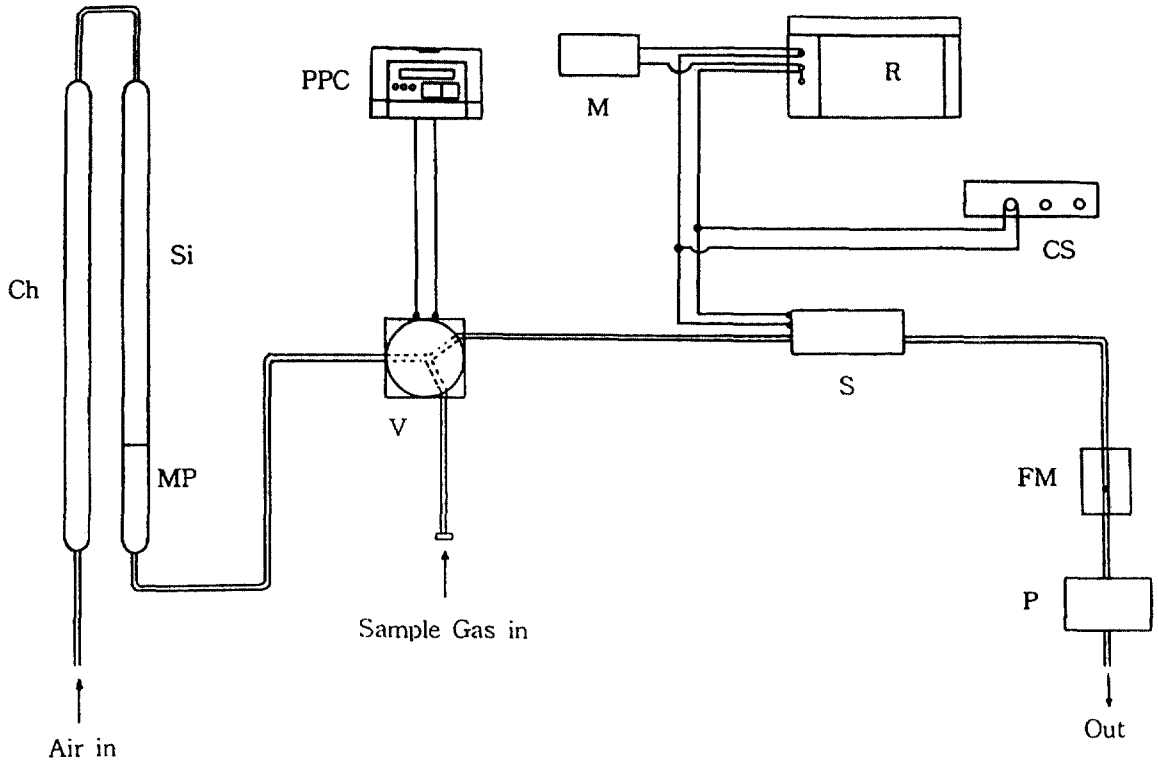


Fig. 3. Schematic diagram of the mixing device used to measure water content : Ch, charcoal ; Si, silica gel ; MP, magnesium perchlorate ; PPC, programmable process controller ; V, solenoid valve ; M, multimeter ; R, recorder ; CS, current source ; S, sensor ; FM, flow meter ; P, pump.

나오게 되어 분석 평형에 도달하는 시간을 길게 만드는 요인이 된다. 그리고 formic acid나 methanol과 같이 몸에 해로운 변형제(modifier)가 기체상태로 실험실 내부에 확산되어 실험실을 오염시키기도 한다. 이러한 점들을 해결할 수 있는 방법은 초임계 CO<sub>2</sub>에 변형제를 첨가시킬 때 포화 컬럼을 쓰는 것이다.<sup>10,11,17</sup>

그러나 포화 컬럼을 사용할 때의 문제점은 초임계 유체에 녹아 있는 modifier의 양이 짧은 시간만 일정한 농도로 유지되며 그 이후로는 급격히 떨어지기 때문에 계속해서 컬럼에 수분을 재충전시켜야 한다는 점과 modifier의 양을 조절할 수 없다는 사실이다. 즉, 초임계 CO<sub>2</sub>에 첨가되는 변형제의 양이 시간이 경과함에 따라 변함으로써 실험의 재현성이 떨어진다는 것이다. 이러한 점들을 해결하기 위해 본 연구에서는 포화 컬럼 대신에 modifier를 미량으로 첨가할 수 있는 Micro-LC pump를 이용하고, 초임계 CO<sub>2</sub>와 modifier가 잘 섞일 수 있도록 새로운 mixing device를 개발하였

다. 이번 실험에 사용한 modifier로는 수분을 사용하였고, mixing device의 단면도는 Fig. 1에 나타내었다. 초임계 CO<sub>2</sub>를 공급하는 syringe 펌프와 modifier를 공급하는 Micro-LC 펌프, 그리고 주입기(injector) 사이에 이 장치를 십자형태로 연결하여, 초임계 CO<sub>2</sub>와 수분을 섞어서 injector로 보낼 수 있도록 고안하였다.

이러한 mixing device를 이용하여 수분을 첨가시키게 되면, 종전의 포화 컬럼이 지녔던 문제점들을 모두 해결하게 된다. 즉, Micro-LC pump로부터 변형제를 계속해서 공급할 수 있으므로 시간의 구애를 받지 않는다는 점과 Micro-LC pump의 유속을 변화시킴으로써 변형제의 양을 조절할 수 있다는 특징이 있다. 더 나아가서는 변형제의 양을 분석 중에 gradient시킬 수 있으며, 여러 가지 다양한 극성 시료들을 분리할 수 있는 가능성이 높아졌다고 할 수 있다.

수분을 측정하는 화학적 방법 중에 가장 널리 알려져 있고 널리 사용되는 방법은 Karl Fischer 반응을

이용한 방법이다. 그러나 이 방법으로 초임계 CO<sub>2</sub>에 첨가된 수분의 양을 측정하려 할 때 감도(sensitivity)가 충분치 않으며, 기체 시료를 다루는 데 어려움이 따르기 때문에 재현성 있는 실험 결과를 얻기가 어렵다. 따라서 본 연구에서는 기체 시료 중에 포함되어 있는 수분에 민감하고 빠르게 반응하는 sensor를 사용하게 되었다.<sup>15</sup>

이 sensor의 원리는 두 전극을 PFSI film을 사이에 두고 밀착하도록 만든 후, 이를 주위 환경에 노출시키면 주위 환경에 있는 수분이 고분자막에 흡착되고, 흡착된 수분은 고분자막 속으로 분배된다. 두 전극에 일정한 전류를 가해 주면 고분자막 속으로 분배된 수분은 전기적으로 분해되는데, 이 때 두 전극 사이의 전압 차이를 측정함으로써 sensor 주위 환경에 있는 수분의 양을 측정할 수가 있다. 전극으로는 Pt-wire를 사용했고, 하나의 Pt-wire에 PFSI film을 입힌 후 또 하나의 Pt-wire로 촘촘하게 감아 만든 sensor를 이용하였다. 그 단면도는 Fig. 2에 나타내었다.

시료 기체(수분이 첨가된 CO<sub>2</sub>)를 sensor에 주입하기 위해 stainless steel로 된 three-way solenoid valve(Honeywell Inc., USA)를 사용하였고, 기준점(0%의 상대습도)을 잡기 위해 두 개의 유리관(100 cm×3.5 cm)에 각각 charcoal, silica gel과 magnesium perchlorate(Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)를 채운 후 이 속으로 실내 공기를 차례로 통과시켜 건조 공기를 만들고, 이 건조 공기를 주입했을 때의 sensor 감응(response)

을 기준점(0% 상대습도)으로 삼았다. 이번 연구에서 사용된 solenoid valve는 110V AC로 작동하는 것으로 programmable process controller(ChronTron, Model CD-4)에 프로그램을 입력하여 개폐(on-off)를 조절하였다. Sensor를 플라스틱 튜브 속에 설치하고 두 Pt-wire에 0.1 $\mu$ A의 일정한 전류를 공급한 후, 두 단자를 기록기(recorder)에 연결시켜 전압 차이를 측정하였는데, 수분 측정을 위한 장치의 전체적인 배열은 Fig. 3에 나타내었다.

수분으로 포화된 공기(100% 상대습도)를 만들기 위해 Flek-Sampler에 공기를 채운 후 과량의 물을 넣어 이것이 일정 온도에서 평형상태에 도달할 때까지 방치하였다. 이렇게 수분으로 포화된 공기를 솔레노이드 밸브를 통해 일정 시간 간격으로 주입한 결과 sensor에 닿고 흐른 수분의 양과 두 전극 사이의 전압 차이에 좋은 상관관계를 나타내었다. Fig. 4는 이것을 도시하였다. 이와 같이 수분에 민감하게 감응하는 sensor를 이용해 미지 기체시료 중에 포함된 수분의 양을 측정하기 위해서는 표준곡선(standard curve)이 필요했다. 18.8%, 37.1%, 47.2%, 58.3%, 70.4%, 100%의 일정한 상대습도(relative humidity)를 갖는 여섯 가지 표준 기체시료를 만들어 20 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C에서 각각 10초간 sensor에 노출시켰을 때의 전압 차이를 측정해 이를 Fig. 5에 도시하였다. 일정한 상대습도를 갖는 표준기체시료는 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 용액의 농도를 조절하여 만들 수 있었다.<sup>18</sup> 순수한 CO<sub>2</sub>는 sensor에 감응을

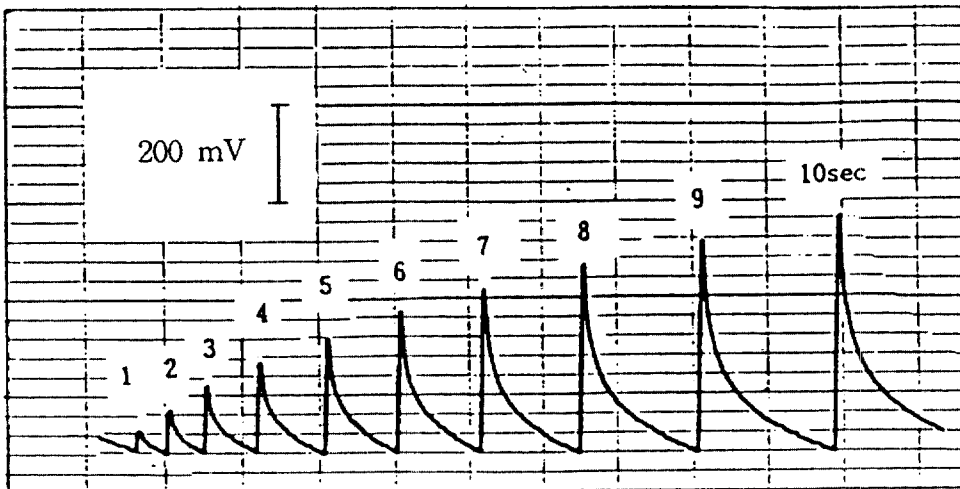


Fig. 4. Relative peak heights at different time intervals for air saturated with water.

하지 않았기 때문에 Fig. 5의 표준곡선을 이용하여 초임계 CO<sub>2</sub>에 첨가된 수분의 양을 측정할 수 있었다.

수분의 양을 조절하기 위해 본 실험에서는 Micro-LC pump를 이용하여 유속을 0.1, 0.2, 0.3, ~1.0 μL/min으로 변화시켜 가며 수분의 양을 달리하였고, 초임계 CO<sub>2</sub>의 압력도 1500psi와 2000psi로 하여 밀도를 달리하였다. Fig. 6은 mixing device를 통과하여 나온 수분의 양을 sensor로 측정하여 Micro-LC pump의 유속에 따른 전압차를 나타낸 것이고, Fig. 7은 이를 상대습도에 대해 도식한 것이다. 이 실험으로부터 얻

은 결과로 초임계 CO<sub>2</sub>의 압력이 1500psi에서는 수분의 양을 0.1 μL/min~0.5 μL/min까지 변화시킬 수 있으며, 2000psi에서는 수분의 양을 0.1 μL/min~0.8 μL/min까지 변화시킬 수 있었다. 따라서 압력이 높아질수록 수분의 양을 더욱 많은 범위내에서 조절할 수가 있을 것이다. 그리고 Micro-LC pump의 사용과 새로 개발된 mixing device로 변형제를 지속적으로 공급함으로써 종전의 포화 컬럼의 시간적 구애를 없애 버렸고, 변형제의 gradient가 가능하게 되었다. Fig. 8은 실질적인 분석을 위한 on-line system 계통도이다.

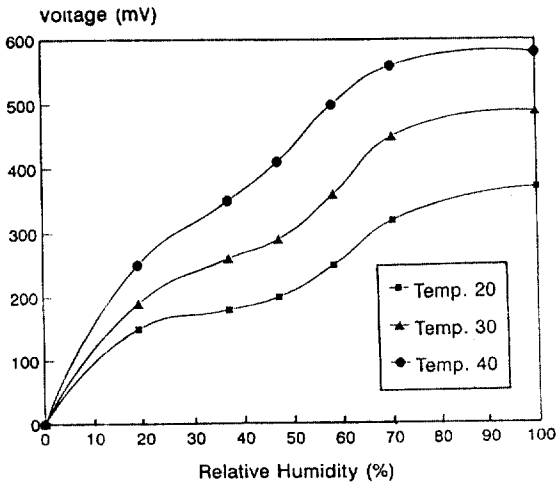


Fig. 5. Sensor response with various relative humidity levels. (18.8%, 37.1%, 47.2%, 58.3%, 70.4%, 100% RH)

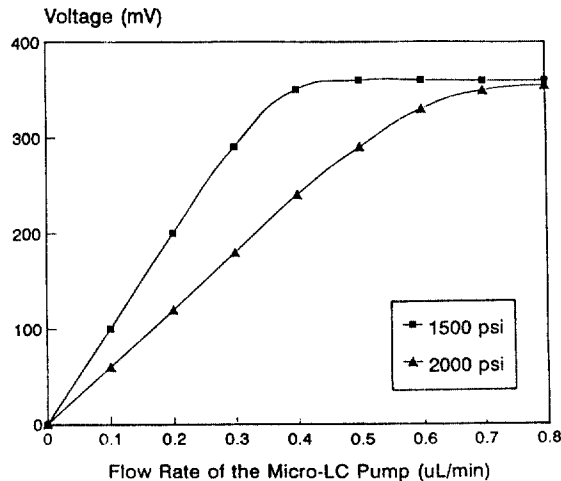


Fig. 6. Plots of the sensor response versus various flow rate of the Micro-LC pump.

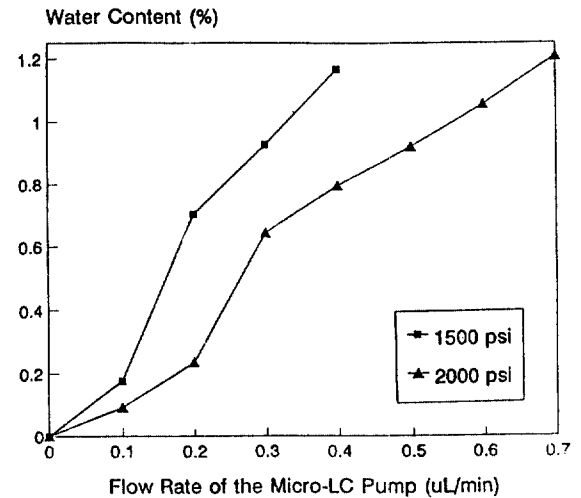


Fig. 7. Measurements of the water content in supercritical CO<sub>2</sub> at various flow rate of Micro-LC pump.

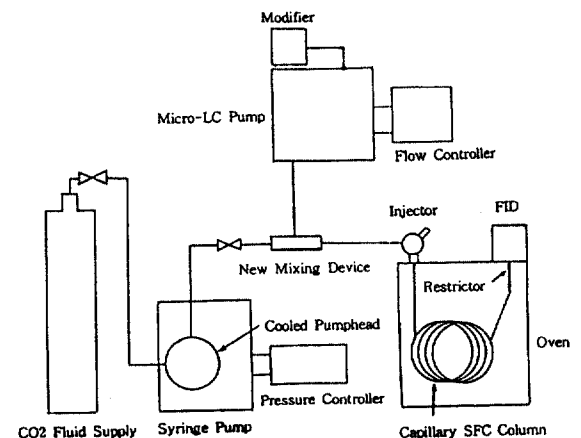


Fig. 8. Schematic diagram of on-line modifier addition system using new mixing device.

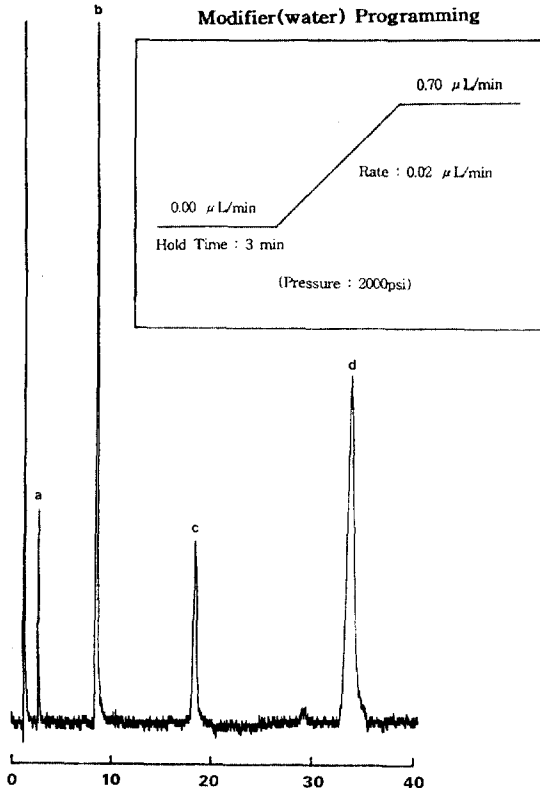


Fig. 9. The chromatogram of Polyaromatic hydrocarbons.  
(a) Naphthalene, (b) Anthracene, (c) Pyrene, (d) Chrysene

Fig. 9는 4가지의 polyaromatic hydrocarbons를 변형제 조성 프로그래밍기법으로 분리한 예이다. chrysene의 경우 조금 tailing이 관찰되었지만 좋은 분리능의 크로마토그램이 얻어졌다.

### 감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. E. Klesper, A. H. Corwin, D. A. Turner, *J. Org. Chem.*, **27**, 700(1962).
2. R. M. Smith, "Supercritical Fluid Chromatography", Royal Society of Chemistry, London(1988).
3. C. R. Yonker, S. L. Frye, D. R. Lalkwarf, R. D. Smith, *J. Phys. Chem.*, **90**, 3002(1986).
4. R. E. Jentoft, T. H. Gouw, *J. Chromat. Sci.*, **8**, 138 (1970).
5. M. Novotny, W. Bertsch, A. Zlatkis, *J. Chromatogr.*, **61**, 17(1971).
6. B. W. Wright, R. D. Smith, *J. Chromatogr.*, **355**, 367(1986).
7. S. Schmidt, L. G. Blomberg, and E. R. Campbell, *Chromatographia*, **25**, 775(1988).
8. A. L. Blilie, T. Greibrokk, *Anal. Chem.*, **57**, 2239 (1985).
9. C. R. Yonker, R. D. Smith, *J. Chromatogr.*, **361**, 25 (1986).
10. H. Engelhardt, A. Gross, R. Mertens, M. Petersen, *J. Chromatogr.*, **477**, 169(1989).
11. H. E. Schwartz, P. J. Barthel, S. E. Moring, T. L. Yates, H. H. Lauer, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **330**, 204(1988).
12. D. J. Pyo, H. Hwang, *Anal. Chim. Acta*, **280**, 103 (1993).
13. D. J. Pyo, D. W. Ju, *The Analyst*, **118**, 253(1993).
14. D. J. Pyo, D. W. Ju, *Anal. Sci.*, **10**, 171(1994).
15. D. W. Ju, D. J. Pyo, *J. Korean Chemical Soc.*, **37**, 6 (1993).
16. H. Huang, P. K. Dasgupta, *Anal. Chem.*, **62**, 1935 (1990).
17. B. L. Karger, R. C. Castells, P. A. Sewell, A. Hartkopf, *J. Phys. Chem.*, **75**, 3870(1971).
18. R. C. Weast, Ed. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 70th ed.; CRC press, Boca Raton, FL, p E-43s, (1989)