

제 1 차 년 도
연 차 보 고 서

KSRI-90-49-IR

첨단계측기기 개발

Development of Advanced Scientific Instruments

초임계 크로마토그래피에 의한 다차원 분석시스템 개발

Development of Multidimensional Analytical System by
Supercritical Fluid Chromatography

연 구 기 관

재단법인 한국표준연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “초임계 크로마토그래피에 의한 다차원 분석시스템개발”의
1차년도 보고서로 제출합니다.

1990. 5. 5

주관연구기관: 한국표준연구소

총괄책임자: 허 귀 석

참여연구원: 김 달 호

이 공 주

서 정 기

요 약 문

I. 제 목

초임계 크로마토그래피에 의한 다차원 분석시스템 개발

II. 연구의 목적 및 중요성

산업이 발달하면서 유기 화학 제품의 수가 크게 증가하고 자연에 존재하는 유기물의 이용도가 커짐에 따라 유기물의 분리 및 분석에 대한 수요가 급격히 증가하고 있다. 수백만가지로 존재하는 복잡한 유기물의 분석은 적당한 분리방법이 우선 되어야 하는데 오늘날에는 크로마토그래피법이 가장 널리 사용되고 있다. 유기물의 다양한 성질 때문에 한가지 크로마토그래피법으로 모든 유기물을 분석하기란 불가능하다. 유기물의 약 20%를 차지하는 휘발성 물질은 분리능이 큰 모세관 기체 크로마토그래피 (GC)에 의해 복잡한 시료를 효과적으로 분리할 수 있으나 휘발성이 작고 열적으로 불안정한 유기물의 주종(80%)을 이루는 물질은 액체 크로마토그래피에 의해 이루어지고 있다. 그러나 액체 크로마토그래피는 이동상으로 액체를 사용하므로 분석효율과 분석효과가 GC에 비해 크게 떨어지고 사용할 수 있는 검출기가 UV나 fluorescence 등으로 물질에 따라 특이하게 사용되어야 한다. 이러한 LC와 GC의 문제점을 해결하기 위한 노력으로 초임계 유체를 이용한 초임계 크로마토그래피법이 개발되어 광범위한 부분의 유기물질의 분석을 가능하게 함으로서 SFC법의 이용이 크게 늘어나리라 기대된다.

본 연구에서는 휘발성이 작은 고분자량 유기물을 고분해능으로 분리할 수 있는 SFC를 개발하고 이를 이용한 다차원 분석시스템을 개발 하므로써 유기물의

정확한 분석법의 확립을 목적으로 한다. 이를 위해 1차 년도에는 SFC를 제작하여 성능을 시험하였고 최적 조건을 구하기 위한 기초 실험이 행해졌다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 초임계 크로마토그래프(SFC) 제작 및 개발.
2. SFC 시스템의 분석조건 확립과 성능 평가 실험.

IV. 연구 결과 및 활용방안

1. 연구 결과

- 1) GC를 이용한 SFC 분석시스템 구성
- 2) 이를 이용한 SFC 분석법의 분석조건 확립과 시스템의 성능 평가 실험으로 26종의 n-alkane 시료를 분석하였다.
- 3) 고체 기질 속의 고분자량의 비휘발성 물질이나 열에 불안정한 유기물을 분석하는데 유용한 SFE/SFC 장치 제작
- 4) SFC oven 제작
- 5) 이상적인 restrictor를 고안하기 위한 linear capillary restrictor의 내경 및 길이 변화에 따른 이동상의 유속을 측정하여 최적 규격을 결정
- 6) FID 검출기의 설계

2. 활용 방안

이상의 연구 결과는 SFC 시스템이 분리효율이 크다는 것을 확인하였으며 앞으로 고분리능을 갖는 capillary SFC 시스템의 제작과 비휘발성 유기물을 신속하게 고분리능으로 분석할 수 있는 다차원 크로마토그래피 시스템의

개발에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다. SFC 시스템의 개발은 복잡한 비휘발성 유기물로 구성되어있는 환경, 의료, 식품등의 시료를 분하는데 널리 이용될 것이다.

SUMMARY

I. Title

Development of multidimensional analytical system by supercritical fluid chromatography (SFC)

II. Objectives

Demands of analysis and identification of organic compounds are dramatically increased as the industries are growing, many products are spread in daily life, and measurements of organic compounds in nature are required. Chromatography methods have been used as main analytical tool for several millions of organic compounds. Only one chromatography method is not enough to analyze all organic compounds because of diverse properties of organic compounds. Although capillary gas chromatography (GC) with MS and FID is a highly efficient techniques for organic analysis, it has limitation to analyze the only volatile compounds without pretreatment. Non-volatile organics which cover 70-80% of total organic compounds are mainly analyzed by liquid chromatography (LC) method having UV or fluorescence detector. Limitation of LC is low separation efficiency and restraint of detection.

Recently, SFC using supercritical fluid is developed to overcome the limitation of GC and LC. Advantages of SFC are 1) high separation efficiency, 2) usage of universal detector such as FID and MS, and 3) high

resolving power using supercritical fluid to analyze non-volatile organic compounds.

In this research, main objective is establishment of accurate organic analytic techniques for non-volatile organic compounds by developing the SFC system having high separation efficiency and construction of multi-dimensional SFC system. In first year, SFC was designed and constructed using GC system, its analytical conditions were established, and evaluation test of its performance was done.

III. Contents and the Scope of Research

- 1) Design and construction of supercritical fluid chromatography.
- 2) Establishment of analytical conditions for SFC and evaluation test of system performance.

IV. Results and applications

1. Results

- 1) Construction of SFC system using GC.
- 2) Establishment of SFC analytical conditions and evaluation test of SFC performance using sample composed of 26 kinds of n-alkane.
- 3) Design and construction of SFE/SFC apparatus which is used for the analysis of non-volatile and heat unstable organic compounds in solid substrate.
- 4) Construction of SFC oven.

- 5) Determination of optimum dimension of restrictor by measuring the fluid velocity varying the length and internal diameter of linear capillary restrictor.
- 6) Design of FID detector for SFC.

2. Applications

Above results exhibited that SFC is a complementary analytical methods having high separation efficiency of LC and GC for volatile and non-volatile organic compounds. Furthermore, development of capillary SFC system having higher separation efficiency and construction of on-line SFE/SFC will be utilized for the development of multi-dimensional chromatography system. This system will be useful for the analysis of non-volatile organic compounds which are existed in complicated matrices such as environmental, food and clinical samples.

CONTENTS

Chapter 1.	Introduction -----	1
Chapter 2.	SFC and Multidimensional Analysis -----	5
Section 1.	Properties of Supercritical Fluid -----	5
Section 2.	Applications of SFC -----	12
Section 3.	Columns and Restrictors for SFC -----	17
1.	Capillary Columns and Packed Columns -----	17
2.	Restrictors -----	21
Section 4.	Multidimensional Analysis using SFC -----	22
1.	Multidimensional Chromatography -----	22
2.	LC/GC Multidimensional Analysis -----	24
3.	Multidimensional Analysis by SFC -----	27
Section 5.	Instruments and Experimental Methods -----	32
1.	Instrumental Considerations of SFC system -----	34
2.	Design and Building of SFC System -----	36
3.	Test of performance -----	47
4.	Design and Building of SFE system -----	49
Section 6.	Results and Discussion -----	49
Chapter 3.	Conclusions -----	62
References	-----	63

목 차

제 1 장 서 론 -----	1
제 2 장 SFC 와 다차원 분석 -----	5
제 1 절 초임계유체의 특성 -----	5
제 2 절 SFC의 응용 -----	12
제 3 절 SFC의 분리관과 Restrictor -----	17
1. Capillary column SFC 와 packed column SFC -----	17
2. Restrictor -----	21
제 4 절 SFC를 이용한 다차원 분석법 -----	22
1. Multidimensional chromatography -----	22
2. LC/GC 다차원 분석법 -----	24
3. SFC 에 의한 다차원 분석법 -----	27
제 5 절 실험장치 및 방법 -----	32
1. SFC 장치의 고찰 -----	34
2. SFC 장치의 설계 및 제작 -----	36
3. 성능평가 -----	47
4. SFE 설계 및 제작 -----	49
제 6 절 결과 및 고찰 -----	49
제 3 장 결 론 -----	62
참고문헌 -----	63

제 1 장 서 론

수백만 가지로 존재하는 복잡한 유기물을 분석하기 위해서는 적당한 분리방법의 개발이 항상 우선적으로 이루어져야만 가능하다. 그러므로 크로마토그래피 방법은 오늘날 가장 널리 쓰이고 있는 유기물 분리, 분석 방법으로 이용되고 있다. 그러나 한가지 크로마토그래피법으로는 모든 유기물의 분석이 불가능하여 여러가지 크로마토그래피 법이 개발되어 사용되고 있는데 이중에서 모세관 기체 크로마토그래피(capillary GC)가 가장 널리 사용되고 있다. 모세관 기체 크로마토그래피는 다른 크로마토그래피법에 비하여 분해능이 우수하나 기체화되기 어려운 비휘발성 물질은 분리가 어렵다. 비휘발성 상태로 존재하는 유기물이 보다 많은 까닭에 이러한 점을 해결하기 위하여 액체 크로마토그래피법이 개발되었으나 분리관으로 모세관을 사용할 수가 없어 분해능이 좋지 않은 단점이 있다. 초임계 유체는 밀도가 액체에 비하여 아주 작고 극성은 기체에 비하여 크므로 휘발성이 작은 고질량 유기물을 모세관 크로마토그래피를 이용하여 고분해능으로 분리할 수 있어 이러한 유기물의 정확한 분석에 널리 이용될 수 있다.

초임계 유체 크로마토그래피에 대한 연구는 약 20년전 부터 이루어져 왔으며 1980년초까지는 그에 대한 연구가 아주 조금씩 이루어져 오다가 기술적인 문제가 해결되기 시작하면서 최근 6-7년간 이에 대한 연구가 급격히 이루어지고 있다. 특히 이동상을 초임계 상태로 유지시키는데 필요한 온도와 압력을 다루는 장치의 개발과 모세 분리관(capillary columns)의 개발이 이루어짐에 따라서 고분해능으로 화합물을 밀도프로그래밍법(density programming)에 의해서 분석할 수 있게 되었다.

최근 몇십년동안 크로마토그래피 방법은 이동상으로 기체나 액체를 사용하는

방법이 주종을 이루어 왔다. 기체 크로마토그래피는 1952년에 개발되어 최근에는 모세관 컬럼을 분리관으로 사용함으로써 고분해능의 분리가 가능하게 되었다. 분리관이 비어있는 모세관(open tubular column)을 기체 크로마토그래피(GC)의 분리관으로 사용할 경우 분리관에 걸리는 압력이 낮으므로 10-100m 길이의 긴 분리관을 사용할 수 있게 되었으며, 그로 인하여 컬럼의 분리능이 커져 복잡한 시료를 효과적으로 분리할 수 있게 되었다. GC는 휘발성 있는 유기물의 분석에 광범위하게 이용되고 있으나 비 휘발성 물질과 극성 물질의 분석에는 직접 사용할 수 없는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 1960년대 후반부터 액체 크로마토그래피법이 개발되었다.

액체 크로마토그래피(LC)는 액체-액체 사이의 분배와 흡착현상을 이용하는 분리 방법으로서 이를 사용하여 종래의 GC로서 분석이 어려웠던 여러 분석을 효과적으로 할 수 있게 되었다. GC와 LC의 중요한 차이는 이동상으로 쓰이는 기체와 액체의 밀도가 다르다는 것이다. 액체와는 달리 낮은 밀도를 가진 기체는 큰 확산계수를 가지므로 효율적으로 짧은 시간안에 분석이 이루어지게 할 수 있으나, 반면에 기체는 낮은 밀도를 갖기 때문에 시료의 용해력(solvating power)이 약하여 비휘발성 화합물의 분석이 어려운 단점이 있다. LC에서는 용매의 극성을 변화시킬 수 있어 비휘발성 물질의 분석이 가능하나 GC와 같이 모세관 컬럼을 사용하는데 기술적인 문제점이 해결되지 않으므로 분석효율과 분석 속도가 GC에 비하여 크게 떨어지고 있다.

그러나 휘발성이 작고 열적으로 불안정한 유기물이 전체 유기물의 80% 이상을 차지하고 있는 까닭에 LC가 널리 사용되고 있다. 이러한 GC와 LC가 가지고 있는 문제점을 해결하기 위하여 기체와 액체의 중간되는 물리화학적 성질을 가진 이동상으로서 초임계 유체에 대한 인식이 일어났다. 1978년 이전에는 분리관을 충전제로 채워서 만든 packed column에 의한 SFC가 연구 되었으나

1978년에 capillary column이 소개 되면서 부터 모세관을 이용한 초임계 크로마토그래피(capillary SFC)가 개발되었다. 특히 고정상(stationary phase)을 모세관 컬럼에 화학적으로 결합시킨 bonded-phase capillary column의 개발은 초임계 유체를 이동상으로 사용할 수 있게 하는 중요한 기술적인 밑거름이 되었다.

밀도 프로그래밍법(density programming)이 개발됨으로서 SFC법으로서 현재 GC나 LC로 하고 있는 대부분의 분석이 수행 가능해짐에 따라 앞으로 SFC법의 이용은 크게 늘어날 것으로 보인다. 초임계 유체는 액상과 기체상이 전환되는 임계점 근처나 그 이상으로 압력과 온도가 가해질때 초임계상태에 놓이게 되는데 초임계유체는 기체 보다 크며 액체의 밀도에 근접한 밀도를 갖는다. 초임계 유체는 압력이 증가함에 따라 밀도가 증가함으로 유체의 용해도가 증가하여 SFC에서 밀도 프로그래밍(density programming)을 함으로써 밀도가 다른 복잡한 혼합물의 분리에 적합하다. 초임계유체는 액체 용매와는 달리 적외선 영역에서 흡수가 비교적 작으므로 적외선(IR) 분광기와 연결하여 분리된 성분을 확인할 수 있는 분석시스템을 개발하기가 비교적 용이하다. 또한 초임계유체는 쉽게 상온 상압에서 휘발함으로 질량 분석기와의 연속 분석시스템을 구성함으로서 GC-MS처럼 복잡한 화합물을 분리, 분석할 수 있는 SFC-MS의 개발이 가능하다. 이러한 SFC에 의한 다차원분석 시스템은 복잡한 유기물의 분석시 GC 처럼 분석대상 유기물의 휘발성에 제한을 받지 않을 뿐더러 LC 처럼 용매의 적외선 흡수도나 비휘발성으로 인한 문제점을 갖지 않는 까닭에 유기물 분석에 보다 광범위하게 이용될 수 있다.

초임계 크로마토그래피를 질량분석법(MS)이나 FTIR법과 같은 다른 분석기술과 결합함으로서 복잡한 유기 혼합물의 분리 및 정성, 정량이 단일 분석에 의하여 이루어질 수 있어 이 결합기술 (interfacing)에 대한 연구가 활발히 진행되고

있다. SFC를 MS와 연결할 경우 SFC에서 사용하는 고압의 flow를 MS의 진공 chamber에 연결시켜야 하는 문제점이 있으며 아주 미량의 시료를 분석시에 시료와 carrier eluent의 분리가 이루어진 후 농축 시료가 MS의 ionization chamber에 주입되도록 해야 한다. 그러므로 SFC column을 통하여 용출되는 eluent의 압력을 낮추기 위한 restrictor의 개발과 시료를 eluent로부터 효과적으로 분리할 수 있는 장치의 개발이 SFC-MS분석 시스템 개발의 선결과제이다. SFC를 FTIR에 연결하여 SFC에서 분리된 유기물의 FTIR spectrum을 사용함으로써 SFC-MS에서 확인하기 어려운 유기이성체 화합물의 분석시스템을 개발할 수 있다. 기존의 GC-FTIR에서 주로 사용하고 있는 light pipe cell과의 연결은 미량의 시료를 분석시에는 분석감도가 낮아 적절치 못하므로 SFC에서 분리되어 나오는 시료를 농축시켜서 FTIR을 얻을 수 있는 연결장치 (interface)의 개발이 이루어져야 한다.

제 2 장 SFC와 다차원 분석

제1절 초임계 유체의 특성

초임계 유체(SF)란 어떤 물질에 임계온도 이상에서 압력을 가하여도 그 물질 분자들이 결집되지 않고 독립된 분자처럼 행동하는 상태로 임계 온도와 임계압력에서 gas phase와 liquid phase가 동일한 밀도로 평형을 이루는 유체를 말한다. 초임계 유체의 밀도는 0.2~0.89 g/mL으로 $10E-4 \sim 10E-3$ g/mL인 기체에 비하여 크며 액체의 밀도 (1 g/mL)에 가깝다. 유체의 임계 압력으로부터 400 atm (6000 psi) 정도로 압력프로그래밍을 하면 초임계 유체의 밀도를 증가시킬 수 있다. 초임계 유체의 밀도와 용해력과는 밀접한 관계가 있으며 용질의 용해도는 밀도가 증가함에 따라 커진다. 한편 초임계 유체의 점도는 $10E-4 \sim 10E-3$ g/cm·s 로서 $\sim 10E-4$ g/cm·s인 gas와 유사하다. Fig.1은 순수한 물질의 온도-압력 상태도이며 초임계 영역을 사선으로 나타내었다.

이 초임계 영역의 유체를 크로마토그래피의 이동상으로 사용하면, GC나 LC에서 분리하기 어려운 시료를 쉽게 분리할 수 있는데 이는 초임계 유체의 밀도, 점도 및 확산계수등 물리적 특성에 의해 설명된다. 순수한 물질의 온도와 압력에 따른 밀도 변화를 Fig.2에 나타내었다 [1]. 환산압력(reduced temperature, $Pr=P/P_c$)이 1.0보다 크고, 환산온도(reduced temperature, $Tr=T/T_c$)의 영역이 0.9에서 1.2 사이일때 환산밀도(reduced density, $Pr=P/P_c$)는 기체의 환산밀도인 0.1 부터 액체의 환산밀도인 2.5 정도까지

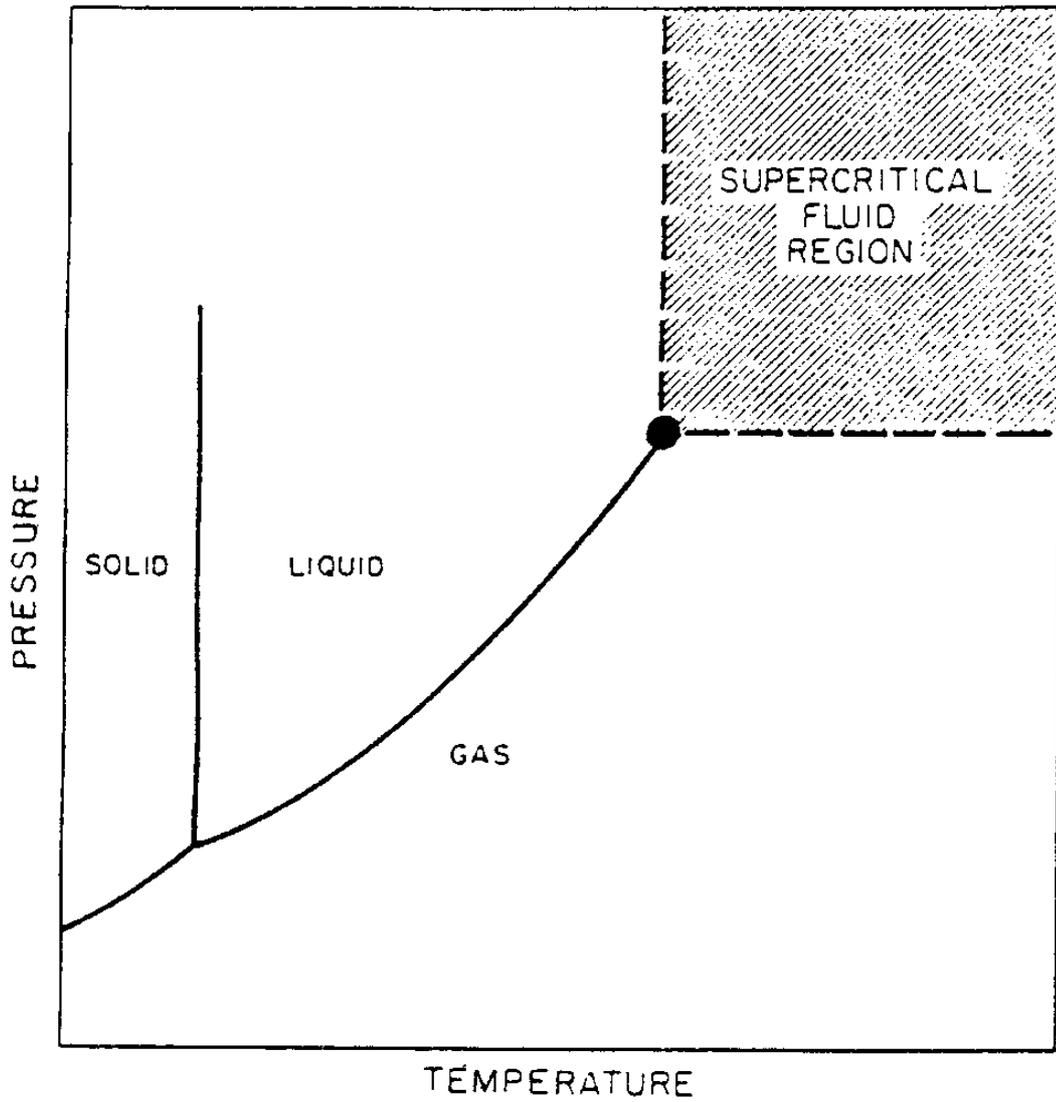


Fig. 1. Pressure-Temperature Diagram for a Pure Component.

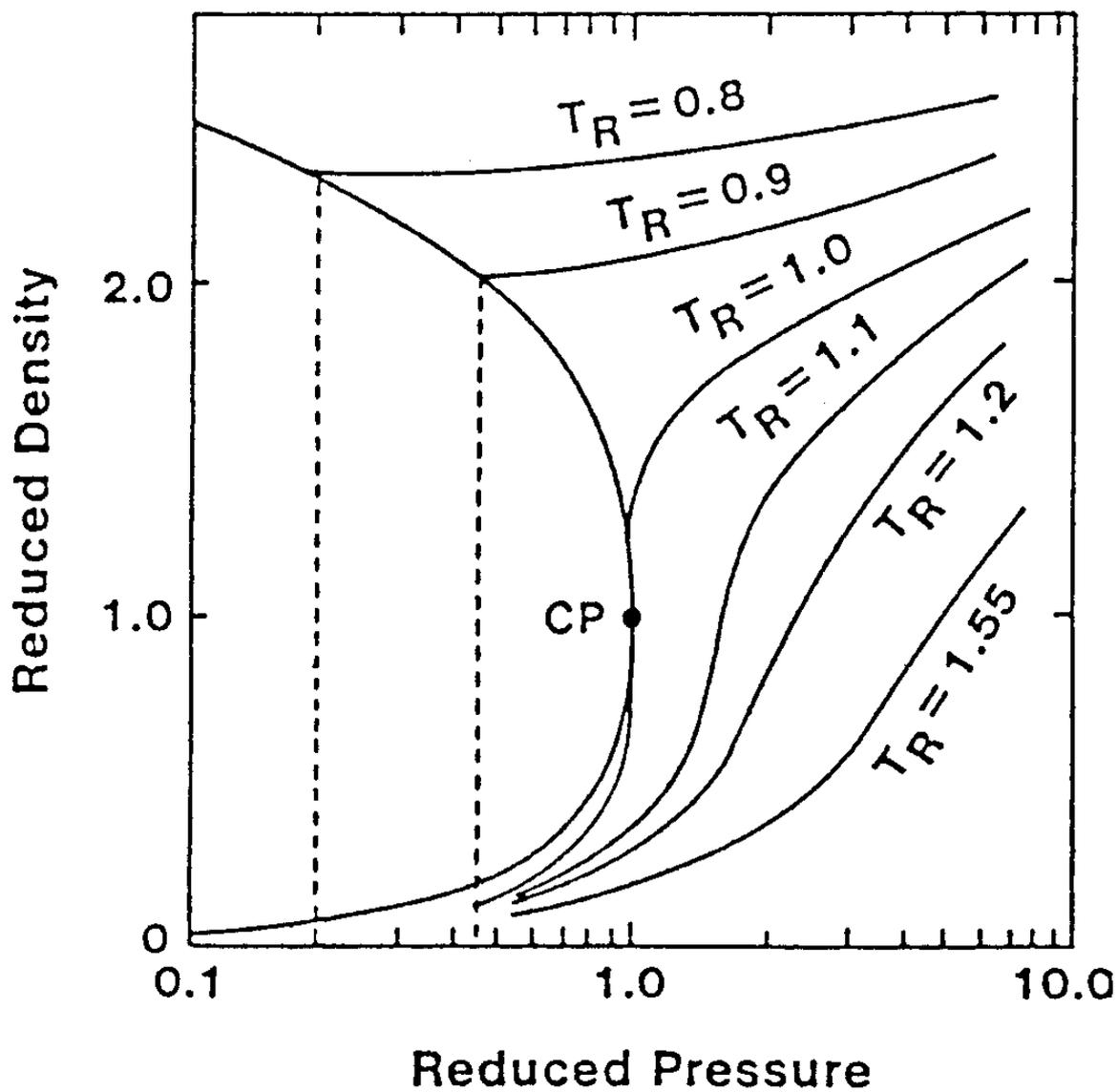


Fig. 2. Variation of the Reduced Density of a Pure Component in the Vicinity of its Critical Point.

변하는 것을 볼 수 있다. 초임계 유체의 환산밀도가 액체의 환산밀도에 가까워지면 액체 용매와 비슷한 용해력을 가지게 된다. 따라서, GC에서는 기체의 낮은 밀도로 인해 용해력 (solvating power)이 작아 분리하기 어려웠던 비휘발성 물질들에 대해 SF를 이동상으로 사용하면 분리가 가능하며, 밀도프로그래밍법에 의해 이동상인 초임계유체의 용해력을 변화시킬 수 있으므로 복잡한 혼합물의 분리에도 유용하게 이용할 수 있다.

SFC (supercritical fluid chromatography)에서는 주로 초임계 상태의 CO_2 를 이동상으로 사용하는데 이는 CO_2 가 화학적으로 안정하며 임계온도(31.1°C)와 임계압력(72.8 atm)이 낮고 검출기에 대한 바탕응답이 적으며 독성이 없는 특징을 가지고 있기 때문이다. Fig.3은 이산화탄소의 온도와 압력에 따른 확산계수의 변화를 나타낸다 [1]. 이로부터 임계영역에서 확산계수가 증가하며 일반 액체에 대한 용질의 확산계수보다 10~100배정도 큰 것을 알 수 있다. 이와같이 질량전달이 액상에서 보다 초임계유체상에서 더 신속하게 일어나므로 SFC가 LC법에 비해 단위시간당 분리효율(N/t_R)이 더 좋으며 더 빠른 최적 선형속도(U_{opt})를 갖는다. 따라서 SFC는 LC에 비해 분리효율이 높고 분석시간이 짧아 LC에서 분석하기 어려운 복잡한 혼합물의 분리가 가능하다. Fig.4는 이산화탄소의 점도를 온도와 압력에 따라 도시한 것이다. 초임계 영역에서 점도가 급격히 변하는 것을 알 수 있다. 초임계유체의 점도는 가스상과 비슷하고 액체상보다 낮다. 그러므로 HPLC에 비해 컬럼내의 압력강하가 적어 컬럼의 단위길이당 이론단의 수가 크므로 분리효율이 증가하게 되며, 좀더 긴 컬럼을 사용할 수 있어 분리효율을 증가시킬 수 있다.

SFC에서 이동상으로 사용되고있는 액체와 기체의 종류는 Table 1과 같다[2]. CO_2 외에 N_2O (nitrous oxide)와 NH_3 (ammonia)도 이동상으로 사용하고 있으며 이들은 CO_2 보다 더 큰 극성을 가지며, 1급 알킬아민류와같이 초임계 CO_2 와

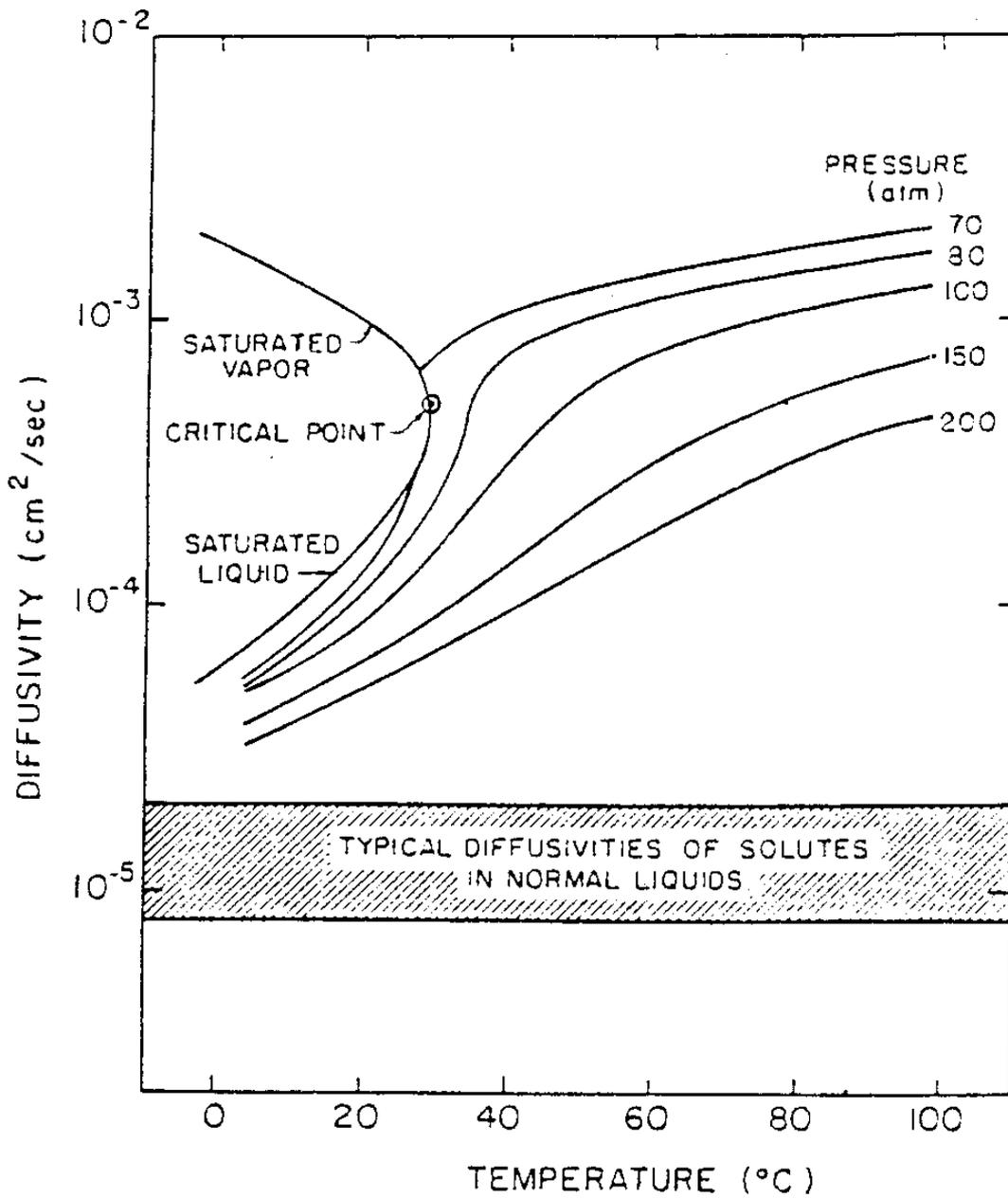


Fig. 3. Diffusivity Behavior of Carbon Dioxide.

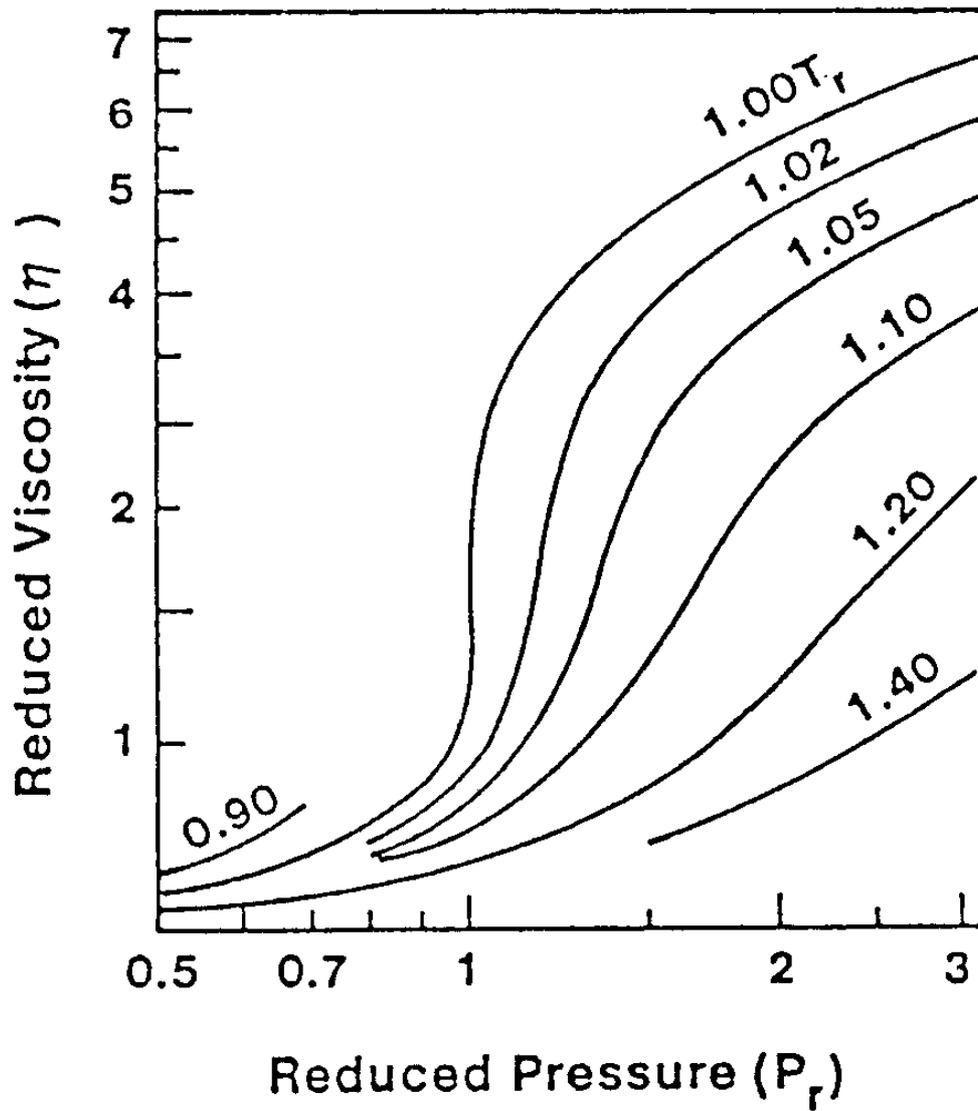


Fig. 4. Viscosity Behavior of Carbon Dioxide

Tab. 1. Properties of Some Chemicals that Selected for Supercritical Fluid Phase.

Compound	Critical Data			
	bp (°C) at 1 atm ^a	T _c (°C)	P _c (atm)	ρ _c (g · cm ⁻³)
Carbon dioxide	-78.5	31.3	72.9	0.448
Ammonia	-33.4	132.3	111.3	0.24
Water	100	374.4	226.8	0.344
Methanol	64.7	240.5	78.9	0.272
Ethanol	78.4	243.4	63.0	0.276
Isopropanol	82.5	235.3	47.0	0.273
Ethane	-88	32.4	48.3	0.203
n-Propane	-44.5	96.8	42.0	0.220
n-Butane	-0.05	152.0	37.5	0.228
n-Pentane	36.3	196.6	33.3	0.232
n-Hexane	69.0	234.2	29.6	0.234
2,3-Dimethylbutane	58.0	226.8	31.0	0.241
Benzene	80.1	288.9	48.3	0.302
Dichlorodifluoromethane	-29.8	111.7	39.4	0.558
Dichlorofluoromethane	8.9	178.5	51.0	0.522
Trichlorofluoromethane	23.7	196.6	41.7	0.554
1,2-Dichlorotetrafluoroethane	3.5	146.1	35.5	0.582
Chlorotrifluoromethane	-81.4	28.8	39.0	0.58
Nitrous oxide	-89	36.5	71.4	0.457
Diethyl ether	34.6	193.6	36.3	0.267
Ethyl methyl ether	7.6	164.7	43.4	0.272
Xenon	-107.1	16.6	58.0	1.105

^a 1 atm = 1.01 X 10⁵ pascal.

화학반응을 일으켜 사용하기 어려운 경우에 이용할 수도 있다. 극성의 유체는 특히 의약품이나 이들의 대사물과 같은 극성시료의 분리에 적합하다. 초임계 n-pentane은 고분자량인 탄화수소와 같은 물질의 분리에 적합하며, 초임계 xenon은 SEC-FTIR에 적합하고 진공 UV영역에서 NMR 영역까지 적용할 수 있다. 또한 순수한 CO₂ 유체에 변성제(modifier)로써 methanol, isopropanol, methylene chloride, acetonitrile 등을 혼합하여 이동상의 극성을 변화시키는 방법도 이용되고 있다[5, 6].

제2절 SFC의 응용

GC에서 분리가능한 화합물들은 휘발성이 크고 열적으로 안정한 화합물이다. 이는 질량이동(mass transfer)이 gas상에서 일어나야 하므로 어느정도 휘발성이 있어야 하며 분리관내에서 시료의 증기압을 높여주기 위해 온도를 높여주어야 하므로 시료가 열에 안정해야하기 때문이다. Gouw와 그의 동료들은[7] 화합물들중의 15 % 정도가 열에 의해 분해되지 않고 기체화 할 수 있다고 보고한바 있다. 시료의 휘발성을 크게 하고 극성을 감소시키거나 열에 대한 안정도를 향상시키기 위해 화학적으로 유도체를 만들면 GC로도 분석이 가능하나 여러가지 제약이 따른다.

HPLC(high performance liquid chromatography)법에서는 분석온도가 상온이나 그보다 조금 높은 범위를 가지므로 시료가 열적으로 안정해야할 필요는 없으며 질량이동이 액체상에서 일어나므로 휘발성이 없는 시료가 분석대상이 된다. 그러나 일반적인 HPLC의 packed column은 (2,500 theoretical plates) GC의 capillary column에 비해 (200,000 theoretical plates) 분리효율이 낮다. GC와 HPLC는 선택성(selectivity)면에서 차이가 있으므로 선택성을 고려하지

않고 두 방법의 efficiency를 일대일로 비교하는 것은 큰 의미가 없을 수 있으나 일반적으로 HPLC는 GC에 비해 복잡한 혼합물을 분리하는데 어느정도 제한을 받고 있는 것은 사실이다. HPLC의 두번째 단점은 사용가능한 검출기에 제한이 있다는 점이다. HPLC에서는 주로 UV와 fluorescence detector가 사용되므로 고감도의 검출이 되기 위해서는 시료중에 UV나 fluorescent를 흡수하는 작용기(chromophore or fluorophore)가 존재하여야 한다. 물론 그외에 electrochemical detector도 사용되지만 전기적으로 민감한 시료에만 고감도를 가진다. 보편적 검출기로서 RI(refractive index) 검출기도 사용되지만 감도가 낮고 기울기용리(gradient)에서는 사용할 수 없는 단점이 있다. HPLC에서 시료를 검출 가능하게 하거나 감도를 높이기 위해서 또는 극성을 감소시키거나 분리효율을 높이기 위해 화학적으로 유도체화하는 방법이 이용될 수 있으나 여러가지 제약이 따른다.

시료의 특성상 GC나 HPLC로 분리하기 어려운 것은 초임계유체 크로마토그래피(SFC)를 이용하여 높은 분리효율과 감도로서 짧은 분석시간내에 분석이 가능하다[8]. Table 2에 최근까지 SFC에 의해 분리가능한 화합물의 종류 및 예를 나타내었다[2, 4]. 이 화합물들은 반응성이 크거나, 열적으로 불안정하거나 또는 비휘발성인 화합물들로서 기존의 GC나 LC방법으로 분리가 곤란하였던 시료들이다. 또한 SFC는 LC에서 사용할 수 없었던 GC의 universal detector를 사용할 수 있으므로, LC법에서 처럼 검출감도가 낮은 시료를 유도체화 할 필요없이 좋은 감도로서 검출할 수 있다. SFC를 이용한 몇가지 화합물들의 분리 예를 Fig.5와 Fig.6에 나타내었다. Fig.5는 열적으로 불안정한 carbamate pesticide를 초임계 CO₂ 유체를 사용하여 SFC로 분리한 크로마토그램이다[4]. 살충제의 분석은 환경관리와 보건적인 측면에서 관심이 높은 분야이며 이들은 대부분 온도에 민감하며 많은 것들이 발색단을 가지고

Table 2. Examples of the Applications of SFC.

Substance determined or Material analysed
Polynuclear aromatic hydrocarbons
Hydrocarbons
Coal and petroleum derivatives, refinery residues, diesel, kerosine, gasoline, coal liquefactions
Carboxylic acids
Alcohols
Aldehydes, ketones
Fatty acids, fatty acid esters, lipids, glycerides
Carbohydrate and sucrose esters
Vitamins
Pesticides, carbamates, herbicides
Drugs: caffeine, codeine, methocarbamol, oxyphenbutazone, phenylbutazone, theophylline, trichothecene mycotoxins
Erythromycin
Prostaglandins
Metal chelates
G C stationary phases
Phosphine oxide enantiomers
S- or P-containing compounds in cigarette smoke, pesticides
Halogenated compounds
Foods: vegetable and butter oils, cheese, coffee, tobacco, chamomile
Liquid crystal
Waxes
Insect sex hormone
Terpenes
Phosphine oxide enantiomers
Amino acid enantiomers

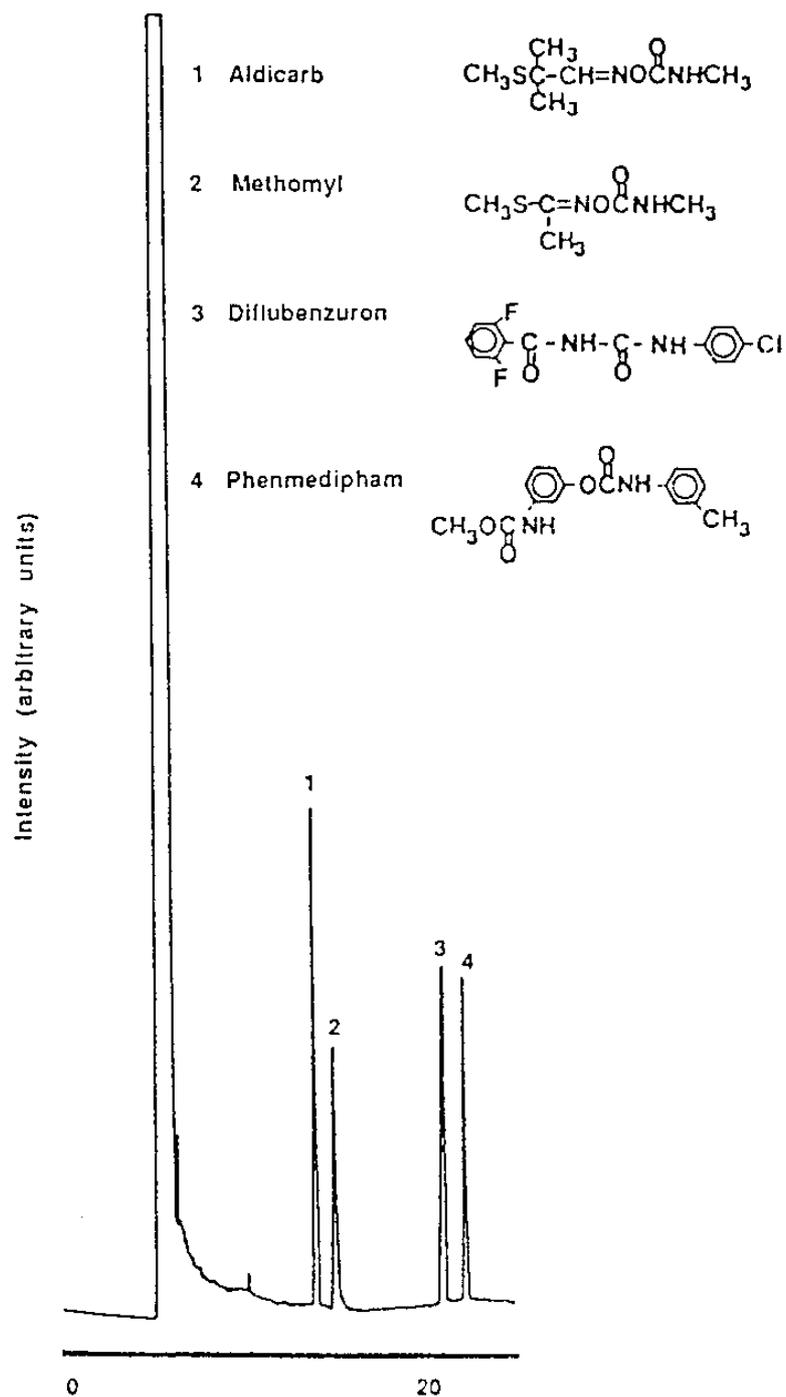


Fig. 5. Capillary Supercritical Fluid Chromatogram of thermally Labile Carbamate Pesticides. Conditions: Fused Silica Column (Methylpolysiloxane Stationary Phase, 15 m x 50 μ m i.d.) ;CO₂ Mobile Phase at 100 °C, Multilinear Density Program.

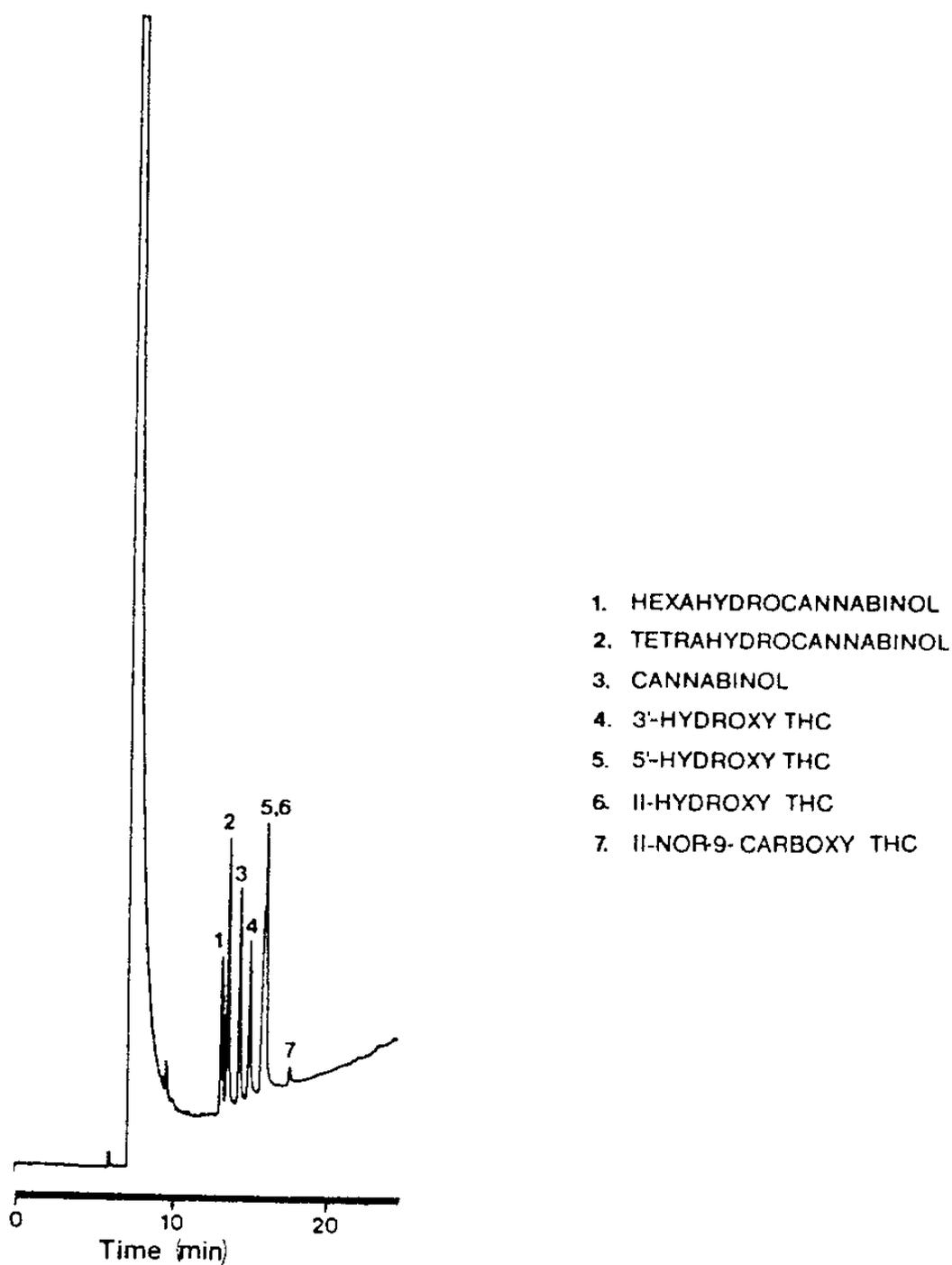


Figure 6. Capillary supercritical fluid chromatogram of tetrahydrocannabinol and six metabolites. Conditions: supercritical CO_2 at 120°C ; $15\text{-m} \times 50\text{-}\mu\text{m}$ i.d., SE-33 column; density-programmed from 0.40 g/ml after a 7-min hold to 0.56 g/ml at 0.01 g/ml/min ; FID at 280°C .

있지 않아 GC와 LC로서 미량의 시료를 분리하기가 곤란하다. SFC에 의해 100 °C의 초임계 유체를 사용하여 열에 의한 분해를 줄이면서 분리된 카바메이트 시료는 FID에 의해 고감도로 정량이 가능하였다. 살충제와 그 대사에 의해 생성된 복잡한 혼합물도 SFC의 밀도프로그래밍법을 써서 쉽게 분리할 수 있다. 또한 잔류 살충제와 같이 복잡한 기질속에 포함된 시료들을 NPD 검출기와 같은 selective detector를 사용하여 보다 큰 감도로써 정량이 가능하다. SFC는 GC에 비해 극성작용기를 가진 화합물의 분리에 유용성이 크며 시료가 복잡하거나 steric hindrance 등의 문제점에 의해, 유도체화 하기 어려운 시료의 분리에 이용될 수 있다. 대부분의 의약품은 큰 분자량을 가지며 극성이 큰 물질이다. 사용제한 의약품중의 하나인 tetrahydrocannabinol과 그 대사 생성물의 크로마토그램을 Fig.6에 나타내었다[9]. 이 의약품은 유도체화 한후 capillary GC로 분리하는 방법이 일반적이었으나 capillary SFC에 의해 유도체화 하지 않고 바로 분석할 수 있다.

제3절 SFC의 분리관과 Restrictor

1. Capillary column SFC와 packed column SFC

Capillary SFC는 가스크로마토그래피법(GC)을 좀 더 발전시킨 방법으로 볼 수 있으며 특히 유체의 밀도가 작을때 유용한 방법으로서 높은 분리효율이 필요시 사용한다. Packed column은 capillary column에 비해 분리관 내에서의 압력강하 (pressure drop)가 크다. 그러나 컬럼의 길이, 내경, 고정상의 입자크기를 적절히 선택하면 그룹형태의 시료의 분리와 같은 비교적 덜 복잡한 시료혼합물을 분리할 경우 단위 시간당 이론단수(N/t_R)를 크게 할 수 있으므로 SFC에서 효과적인 분리방법으로 사용가능하다. 한편 capillary

column은 작은 주입용량(loading capacity)과 그에 따른 낮은 검출한계(detection limit) 등의 단점을 가지고 있으며 초입계 유체의 극성을 변화시키기 위해 가하는 변성제(methanol, acetonitrile)의 영향이 packed column에 비해 작다[10]. Table 3에 여러가지 분석용 SFC 분리관의 특징을 나타내었다[11]. Packed column은 외형상 기존의 HPLC용 컬럼(4.6 mm i.d.)과 narrow bore column (~ 1 mm i.d.) 그리고 microcolumn (<0.5 mm i.d.)로 분류할 수 있으며, 또한 아직 상업화되지는 않았지만 packed fused-silica 모세분리관은 충전형과 모세관형 분리관의 중간에 해당되는 특징을 가지므로 충전형에 비해 분리효율이 크고 모세관형 분리관에 비해 시료주입 용량이 큰 특징을 가지고 있다[3]. 모세 분리관과 충전 분리관을 여러 측면에서 장단점을 비교하면 다음과 같다.

Efficiency and Speed : Table 3에 3 μ m 입자가 충전된 10 cm x 4.6 mm 충전형분리관과 10 m x 0.05 mm 모세관형 분리관의 이론단수(N)와 머무름시간(t_R) 그리고 시간당 이론 단수(N/t_R)를 나타내었다. 이 값들은 $h-v$ (reduced plate vs. reduced velocity) 곡선에서 최적 분리효율을 나타내는 조건으로부터 얻은 값들이다[5]. 충전형분리관의 경우 최적 분리효율을 가질때 $h \approx 2$ 이고 $v \approx 3$ 이며 모세분리관의 경우는 $h \approx 0.8$ 과 $v \approx 5$ 의 값을 가진다. 따라서 충전형 분리관의 이론단수는 $N=L/hd_p$ 에 의해 16,666이고 모세분리관의 경우는 $N=L/hd_c$ 에 의해 250,000의 값을 가진다. 이 값들을 비교해 볼때, 충전형 분리관은 모세분리관에 비해 낮은 분리효율을 가지나 분리시간이 빠르므로 간단한 sample을 신속히 분리하는데 적합한 것을 알 수 있다. 한편 모세분리관은, 충전형 분리관에 비해 더 큰 분리효율이 필요할 경우 즉, 복잡한 시료혼합물의 분리에 적당함을 알 수 있다.

Pressure drop : Table 3에 압력강하 (pressure drop, ΔP) 값을 나타내었다.

Table 3. Analytical Columns for SFC.

Parameters	Packed column		Open-tabular capillary column
	conventional	narrow-bore micro	
i.d. (mm)	4.6	1.0	0.025-0.1
Length (cm)	10-30	10-30	100-2000
Tube materials ^a	ss	ss	fs
Film thickness (μm)	—	—	0.05-0.5
Particle size (μm)	3-10	3-10	—
Stationary phase		chemically bonded silica, alumina, polymeric resin	polysiloxanes
Commercially available	yes	yes	yes
FID compatible	no	yes	yes
N^b	16,666	—	250,000
$t(\text{s})^b$	30	—	3000
$N/t(\text{s}^{-1})^b$	555	—	8.3
$\Delta p(\text{atm})^b$	67	—	0.1

^a ss = stainless steel; fs = fused silica.

^b See ref 20 for further details. N = number of theoretical plates; t = retention time; N/t = theoretical plates per unit time; Δp = pressure drop.

모세 분리관의 경우 압력강하는 거의 무시될 수 있으며 충전형 분리관의 경우는 67 atm의 큰 값을 가진다. SFC에서 시료의 머무름값(t_R)은 밀도변화에 민감한 차이를 보이므로 압력강하값이 크면 머무름 데이터의 정밀도와 정확도가 떨어진다. 또한 컬럼내에서 초임계 유체의 밀도가 점차 작아지므로 시료의 용해도에 영향을 미치게 되고 분리도에 좋지 않은 영향을 준다.

Selectivity : HPLC는 이동상의 종류와 조성을 변화시키거나 고정상을 변화시켜 시료의 분리에 있어 선택성을 변화시킬 수 있는 반면 SFC는 GC와 같이 주로 고정상을 변화시켜 선택성을 변화시킬 수 있다. 그러므로 선택성의 변화를 통해 최적분리를 하는데 HPLC에 비해 한계가 있는 SFC의 경우 HPLC에서는 사용할 수 없는 모세관형 분리관을 사용하면 큰 이론단수(N)을 가지게 되므로 이런 단점을 보완할 수 있는 잇점이 있다. 한편 낮은 분리효율을 가지는 충전형 컬럼의 경우는 그룹형태의 (group-type)의 시료혼합물을 분리하는데 큰 선택성을 가지므로 그 나름대로 유용성을 가지고 있다. 그 예로 Schwartz들은 가솔린중의 paraffin과 olefin 그리고 aromatic compound를 SF₆ 초임계 유체를 이동상으로 하여 분리하였으며[11], Rawdon들은 Ag를 침윤시킨 (impregnated) silica를 고정상으로 하여 olefin에 대한 선택성을 향상시켰다[12]. 또한 Christensen(13)과 Campbell들[14]은 amino 분리관을 사용하여 PAH 혼합물을 방향족 탄소의 수에 따라 분리하였다.

Retention Control and Choice of Fluid : CO₂ 초임계 유체는 SFC의 이동상으로서 여러가지 장점을 가지고 있지만 경우에 따라 극성이 아주 큰 물질을 분리하기 위해서는 이동상의 극성을 크게 하기 위해 methanol 이나 acetonitrile 같은 변성제(modifier)를 소량 첨가한다[15, 16]. 이 경우 충전형 컬럼이 모세관형 분리관에 비해 변성제 첨가에 따른 효과가 크다[17]. 적절한 머무름 값을 얻기 위해 극성이 큰 유체인 NO₂ 나 NH₃ 를 사용한다.

값이 비싼 xenon을 이동상으로 사용하는 경우는 유체의 소모량이 작은 모세분리관이나 packed microcolumn을 사용하는 것이 유리하다. 한편 NH_3 를 이동상으로 사용하는 경우 모세분리관의 고정상이나 fused silica 자체에 손상을 주므로 PRP-1 (Hamilton Co.)와 같은 고분자 고정상으로 충전된 분리관을 사용하는 것이 유리하다.

2. Restrictor

초임계 유체크로마토그래피(SFC)에서는 컬럼내의 압력을 임계압력 이상으로 유지시키고 분리된 시료를 검출기에 공급하기 위해 상압으로 내리는 restriction 장치가 필요하다. 즉, restrictor는 컬럼내의 유체를 초임계상태로 유지시키고 컬럼과 검출기 사이에서 시료를 도입시키는 인터페이스 역할을 한다. 또한 모세분리관 SFC에서는 실험적인 방법에 의해 선택된 restrictor를 이용하여 적절한 선형유속을 유지시킨다. Restrictor가 SFC에서 분리에 미치는 영향이 매우 중요하므로 그것의 제원이나 그외에 분리에 미치는 변수들에 대한 연구가 필요하다.

이상적인 restrictor의 조건은 균일하고 펄스가 없는 유체를 유지시키고 막힘이 없어야 하며 유속을 쉽게 조절할 수 있거나 쉽게 교환할 수 있는 구조여야 한다. 또한 열적으로 불안정한 화합물의 열분해나 비휘발성 시료의 침적없이 초임계 유체에서 가스상태로 전환하여 검출기로 완전히 전달할 수 있는 구조를 가져야 한다. 극성이 큰 시료나 고분자량의 시료들은 restrictor 내에서 침적되어 검출기 신호에 spiking을 일으키는 것이 보고되었다[18]. 이런 현상은 초임계 유체에서 가스상으로 상변화가 일어나는 부분에 대한 열전달을 개선하여 줄일수 있으며[19], 다른 방법은 restrictor에서 상변화가 일어나는 부분이 최소화 되도록 그 구조를 고안하는

것이다. SFC에서 시료의 용해도는 이동상의 압력을 변화시켜 조절하고 이동상의 선형유속은 restrictor의 구조를 변화시켜 조절하므로, restrictor는 간단하고 정확하게 유속을 조절 가능하도록 설계 되어야 한다. 또한 고압에 견딜 수 있도록 기계적 강도가 커야 하고 extra-column zone broadening effect가 작도록 고안해야 한다. 지금까지 크게 다섯가지 종류의 restrictor가 사용되고 있으며 그 구조는 Fig.7과 같다[20,21]. Linear restrictor는 짧은 길이(2~10 cm)를 가진 내경 5~10 μm 정도의 capillary 튜브를 사용하고 있으며 이것은 고분자탕이거나 극성이 큰 시료를 분리할 경우 관내에 시료의 침적현상이 일어나므로 이런 현상을 줄이기 위해서는 이동상의 온도를 높여주어야 한다. Drawn(tapered) restrictor는 linear형에 비해 압력강하가(상변화가) 좁은 범위에서 일어나도록 설계되었으므로 검출기의 spiking을 줄이는 효과를 갖는다. 반면 그 구조를 재현성 있게 만들어 내기가 까다롭고 높은 압력에서는 기계적 강도가 약하여 잘 부서지는 단점이 있다.

제4절 SFC를 이용한 다차원 분석법

1. Multidimensional chromatography

복잡한 화합물을 분리하기 위해서 지금까지 많은 분석법이 개발되었으나, 대부분의 방법이 복잡한 전처리 과정을 거치며 각각의 성분들을 완전히 분리하기에 어려웠다. Wise와 그의 동료들은[22] PAH의 분석을 위해서 fractionation법을 개발했으며, Davies와 그의 동료들은[23] 이 방법을 retention gap technique[24] 을 사용한 on-line LC/GC 분석법으로 발전시켰다. 일반적으로 다차원분석법은 둘이나 그 이상의 독립된 여러 단계의 분리방법을 결합한 것으로 여러 단계의 분리과정을 거치므로 그 과정에서 고분리능으로

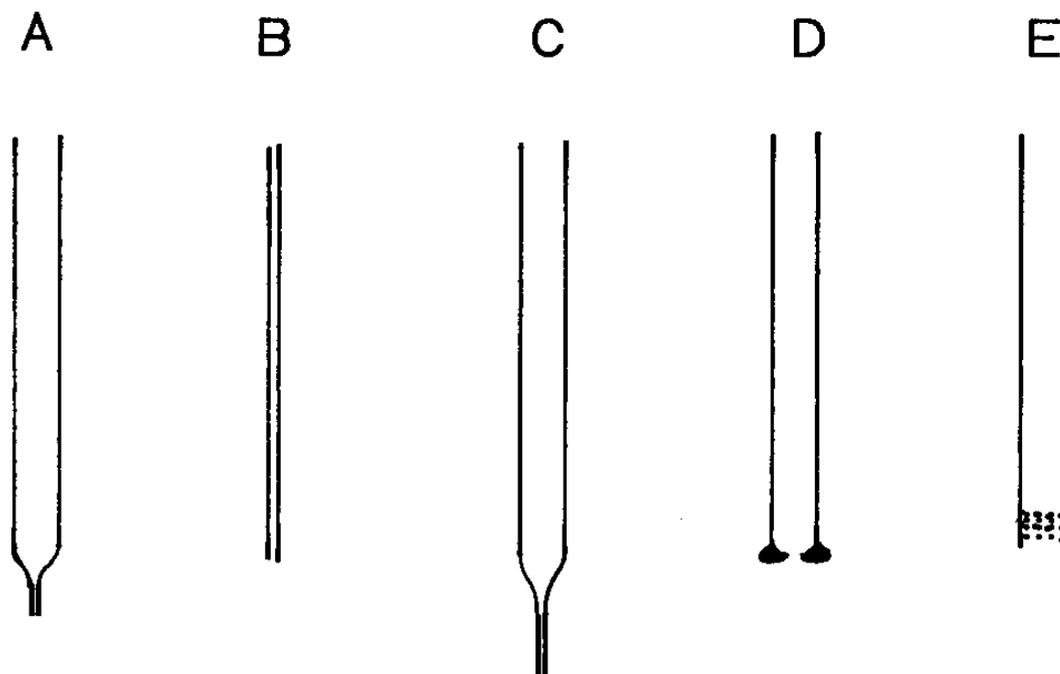


Fig. 7. Current SFC Restrictors at Detector Inlets: (A)Metal, Crimped; (B)Fused Silica ,Long, 5-10 μm I.D.; (C)Fused Silica, Tapered, Drawn in Flame; (D)Fused Silica, Melted and Opened by Abrasion; (E)Ceramic Frit in Fused Silica.

분리되어 복잡한 기질중에 있는 혼합물을 분리후 정성, 정량할 수 있는 방법으로서 유용하다. LC방법은 용매의 종류나 조성 그리고 고정상을 변화시켜 다양한 시료에 대해 큰 선택성을 얻을 수 있으므로, GC와 결합시킨 LC/GC 방법은 복잡한 시료를 선택적으로 분리해 내는데 유용한 방법이다.

초임계유체 크로마토그래피에서도 다차원 크로마토그래피를 이용하여 복잡한 유기질 속에 들어있는 높은 비점(b.p.)의 oil 잔류물을 분리하는 연구가 수행되었다[25]. 또한 SFE를 GC나 SFC와 연결한 SFE/GC, SFE/SFC 방법도 이용되고 있다[26, 27]. SFE법을 사용하면 초임계유체가 가스와 비슷한 점도를 가지므로 고체속으로 용이하게 침투할 수 있으며, 높은 확산계수를 가지므로 복잡한 기질로부터 빠른 질량 이동효과를 얻을 수 있어 추출에 소요되는 시간을 줄일 수 있다. 또한 초임계유체의 용매강도는 밀도가 증가함에 따라 증가하므로 추출압력을 변화시켜, 추출하려는 시료에 적당한 용매강도를 선택할 수 있다. 또한 CO₂ 와 N₂O 와 같은 초임계 유체는 상압에서 가스상으로 존재하므로 시료를 추출한 후 용매로부터 분리해 내는데 용이하여 GC와 on-line으로 연결하는 다차원 분석법을 구성할 수 있다. 또 SFC에서 이동상으로 사용하는 초임계유체를 추출용매로 사용하므로 SFE/SFC에서는 용매 피이크의 영향을 없앨 수 있다.

2. LC/GC 다차원 분석법

HPLC를 GC와 연결하는 LC/GC 방법은 LC의 특성상 복잡한 시료를 선택적으로 분리해 내는데 유용한 방법이다. 반면 LC/GC법은 Table 4에 나타낸 바와 같이 그 응용범위가 좁은 단점을 가지고 있다[28]. 그 첫째 이유로서 GC는 모든 복잡한 시료의 분리에 적용할 수 없으며 유기물질중에 15~20 %만이 분리가능한 점이다. 둘째로 이동상이 액체인 LC법과 기체인 GC법을 결합하려면 액체상을

Table 4. Typical Applications of LC/GC.

Sample	Analyzed	Analytes
Sorghum		Atrazine
Butter		Pesticides
Coal tars		PAC PCB
Petroleum fuels		PAC Chemical classes
Urine		Diethylstilbestrol, Heroin metabolites
Toothpaste		Dyestuff
Raspberry sauce		Raspberry ketone
Olive oil		Wax esters
Hops		Pesticides
Aqueous samples		PCB Pesticides
Fish extracts		PCB
Diesel particulate extracts		PAC
Plasma		Broxaterol
Triglycerides		Plasticizers
Shale oil,		Chemical classes
Ignite tars		
Bacteria		Triglyceride esterification products

Table 5. LC Eluent Properties Required for Successful On-Line LC/GC.

To facilitate LC/GC interfacing, the LC eluent should

- solubilize the solutes and elute them in a narrow band;
- not be irreversibly retained by the LC stationary phase;
- be compatible with both LC and GC detectors;
- have a lower boiling point than that of the solutes of interest;
- have a high vapor pressure to promote rapid solvent evaporation;
- have a low polarity to efficiently wet the silanized retention gap surface
under solvent-flooding conditions;
- have a polarity similar to that of the GC stationary phase to improve phase
soaking characteristics;
- be distilled, LC grade, degassed, filtered, and stored in glass vessels; and
- be free from contaminants such as buffer salts and particulate matter.

기체상으로 인터페이스 하는데 어려운 점이 있다. 즉, LC에서 분리되어 나오는 피이크의 부피가 작아야 하며 낮은 비점과 비극성의 용매를 사용하는 정상용리법(normal-phase LC)의 경우는 용질에서 용매를 제거하는데 어느정도 수월하나, 극성의 H₂O 용매를 사용하는 역상 LC (reversed-phase LC)인 경우는 시료에서 용매를 제거하기가 매우 어렵다. Table 5에 LC/GC에서 효과적인 연결을 위해 필요한 LC용매의 조건을 나타내었다.

3. SFC에 의한 다차원 분석법

초임계 온도와 압력 이상에서 물질은 기체와 액체의 중간적인 성질을 가지는 초임계 유체로 존재하며, HPLC와 SFC 그리고 GC의 근본적인 차이는 이동상으로 어떤 유체를 사용하는가에 달려 있다. 각 크로마토그래피법에서 사용할 수 있는 이동상을 결정짓는 중요한 물리적 성질들은 밀도와 용질의 확산계수 그리고 점도이다. Table 6에 이동상의 물리적 상태에 따른 물리적 성질과 그 범위를 나타내었으며 초임계유체는 액체와 기체의 물리적 성질들의 중간에 해당하는 성질을 가지고 있음을 알 수 있다. 초임계 유체 크로마토그래피(SFC)에서 들 수 있는 중요한 특징의 하나는 초임계유체의 밀도를 변화시켜 용매의 강도(solvent strength)를 변화시킬 수 있다는 점이다. SFC는 낮은 임계온도를 갖는 유체의 밀도를 변화시킴으로써 기존의 GC나 LC에서 분리하기 어려웠던 비휘발성이고 열적으로 불안정한 시료들을 분리하는데 유용한 방법이다.

이렇게 크로마토그래피의 이동상으로써 여러가지 장점을 가진 초임계 유체의 여러 특징들은 초임계유체 추출법(SFE)에서도 유용하게 이용된다[29]. SFE는 기존의 Soxhlet 장치를 이용하여 시료를 전처리하던 추출법에 비해 추출에 소요되는 시간을 현저히 줄일수 있으며, 추출압력을 변화시켜 용매강도

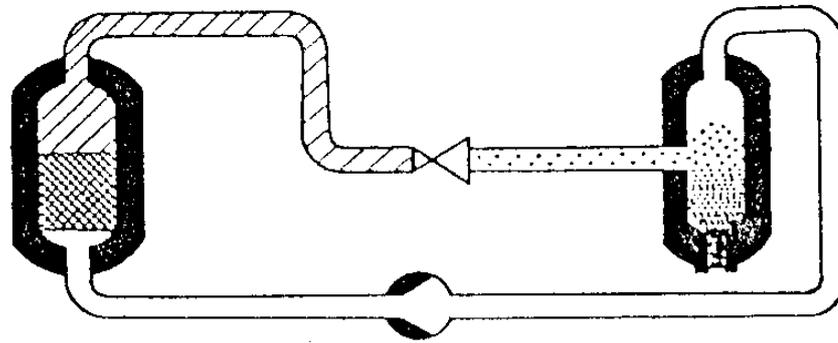
Table 6. Properties of Mobile Phase Used in Chromatography.

Mobile phase	Density (g/mL)	Viscosity (poise x 10^{-4})	Diffusivity (cm^2)
Gas	$(0.6-2.0) \times 10^{-3}$	0.5 - 3.5	0.01 - 1.0
Supercritical fluid	0.2 - 0.9	2.0 - 9.9	$(0.5 - 3.3) \times 10^{-4}$
Liquid	0.8 - 1.0	30 - 240	$(0.5 - 2.0) \times 10^{-5}$

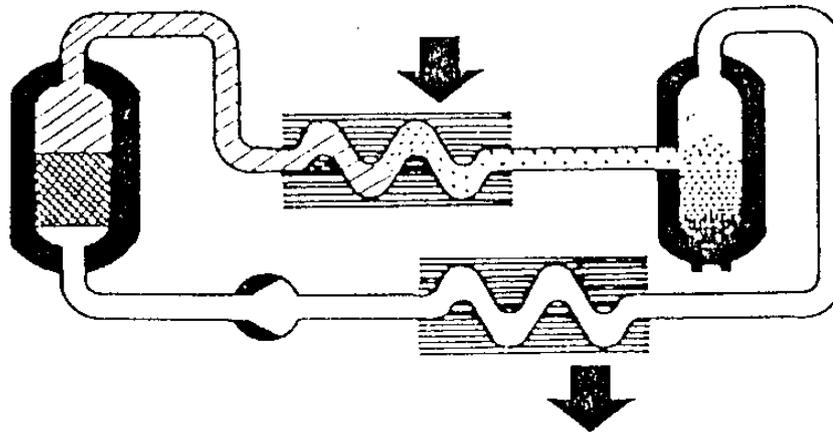
(solvent strength)를 변화시키거나 메탄올 같은 극성변성제를 첨가하므로써, 기질속에 들어 있는 원하는 시료를 선택적으로 추출할 수 있다. 또한 SFE법은 GC, SFC 방법들과 다차원 분석시스템을 구성할때 여러가지 잇점을 가지고 있으며, 낮은 추출온도(40 °C ~ 50 °C)를 사용하므로 분석시료가 열분해되는 것을 막을 수 있다. On-line SFE/GC법은 고체기질속에 존재하는 유기 시료들을 분석하는데 매우 유용한 방법으로써 기존의 추출법으로는 몇일이 걸리는 작업을 한시간 이내에 높은 회수율을 가지고 수행할 수 있다. 또한 중간에 농축과정이 필요없이 시료의 손실과 오염을 막고, interface valve를 사용하여 쉽게 자동화가 가능하다. 한편 SFE/SFC법은 시료의 추출과 분리에 초임계유체를 이용하므로 고체 기질속에 분포하는 고분자량의 비휘발성 물질이나 열에 불안정한 유기물을 분리하는데 유용한 분리방법이다. 또한 SFE법은 상온 상압에서 기체상태인 초임계 CO₂ 를 추출액으로 사용하므로 용매와 용질을 쉽게 분리할 수 있는 이점이있다.

추출액으로부터 용질을 분리하는 방법은 Fig.8에 나타낸 바와같이 압력을 변화시키는 방법 (A), 온도를 변화시키는 방법(B) 그리고 흡착컬럼을 사용 하여 시료를 농축한 후 탈착시켜 분리관에 주입하는 방법(C) 등을 쓴다. 다차원 분석법에 이용되는 SFE법은 dynamic extraction법과 static extraction법이 있다. Dynamic extraction법은 초임계 유체를 일정 시간 동안 (약 10 ~ 30 분간) 추출용기 속으로 흘려주어 추출되어 나오는 유체로부터 용질을 분리하여 분리관에 주입하는 방법이며 그 예를 Fig.9에 나타내었다. 추출되어 나오는 유체는 cryofocusing restrictor 끝에서 상압으로 팽창되면서 용질이 분리되고, cryogenic cooling manifold에 용질이 축적되며, 밸브를 조작 하여 CO₂ 유체를 분리관으로 흐르게하면서 온도를 높여주면 시료가 분리관에 주입되도록 고안되었다. 한편 static extraction법은 초임계 유체를 추출용기에 주입하여

(A)



(B)



(C)

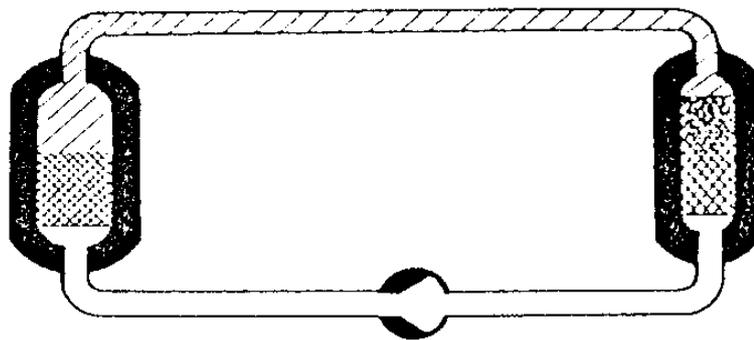


Fig. 8. Schematic Diagram of Typical SFE Systems. Separation of Solutes from the Fluid by Pressure Change (A), by Temperature Change (B), and by adsorbent Column (C). Left: Extraction Stage, Right: Separation Stage.

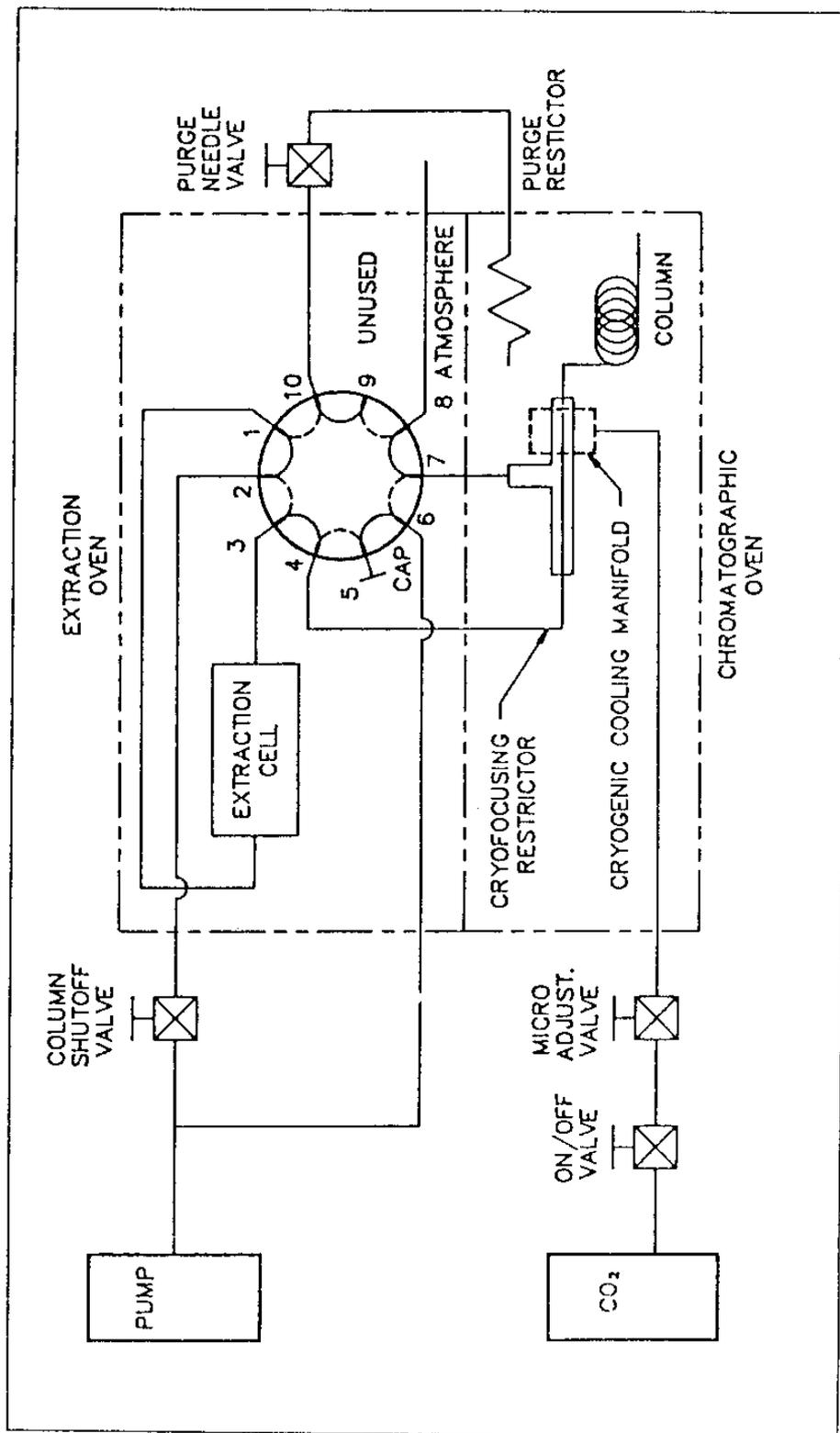


Fig. 9. A Schematic Representation of the On-Line Dynamic SFE Apparatus. Flow is Shown in the Extract Position.

일정 시간 추출한 후 추출액의 일부를 switching valve의 sample loop를 통해 분리관에 주입하는 방법이다(Fig.10). 그림에서 보는 바와같이 six port switching valve 2개와 sample loop, 추출 용기 그리고 그림에 나타나지는 않았지만 back-pressure regulator로 구성되어있다. A단계에서 CO₂를 추출용기 속으로 흘려주면 back-pressure regulator에 의해 압력이 걸리게 된다. Pressure gauge를 보아 원하는 추출압력이 되었을때 B와같이 밸브를 조작하여 추출용기 부분이 닫힌 상태로 한 후 일정시간 추출한다. 충분히 추출되었을때 C와같이 추출액을 sample loop에 채워 D 에서 분리관에 주입하도록 고안되어있다. SFE/SFC 외에도 SFE/SFC/SFC, SFC/SFC 등의 초임계 유체를 이용한 다차원 분석법이 가능하며, 이런 분석법이 개발되면 한가지 방법으로는 분리하기 어려웠던 복잡한 시료를 분리하는데 유용한 방법으로서 초임계유체의 여러가지 장점을 이용할 수 있으므로 기존의 LC와 GC 또는 다른 다차원 분석법으로 분리하기 어려운 시료들에 효과적으로 적용할 수 있다.

제5절 실험장치 및 방법

본 연구에서 제작된 초임계 크로마토그래피 시스템은 초임계 유체 공급용 실린더, 이를 운반하기 위한 펌프와 펌프컨트롤러, 시료주입 장치, 분리관, 분리관 온도조절장치, restrictor, 검출기, 검출기 신호처리장치로서 구성되어있다. SFC 펌프의 압력 및 밀도프로그래밍에 의한 펌프의 효율을 시험하였고 시료주입장치로서 switching valve형의 액체시료주입용 injector를 사용하였다. 분리관으로서는 C18 분리관을 사용하였으며 분리관과 injector의 연결은 fused-silica capillary glass tube 를 사용하였다. 분리관 내에서 초임계 CO₂ 상태를 유지하고 일정한 압력을 유지하기 위한 restrictor는 open

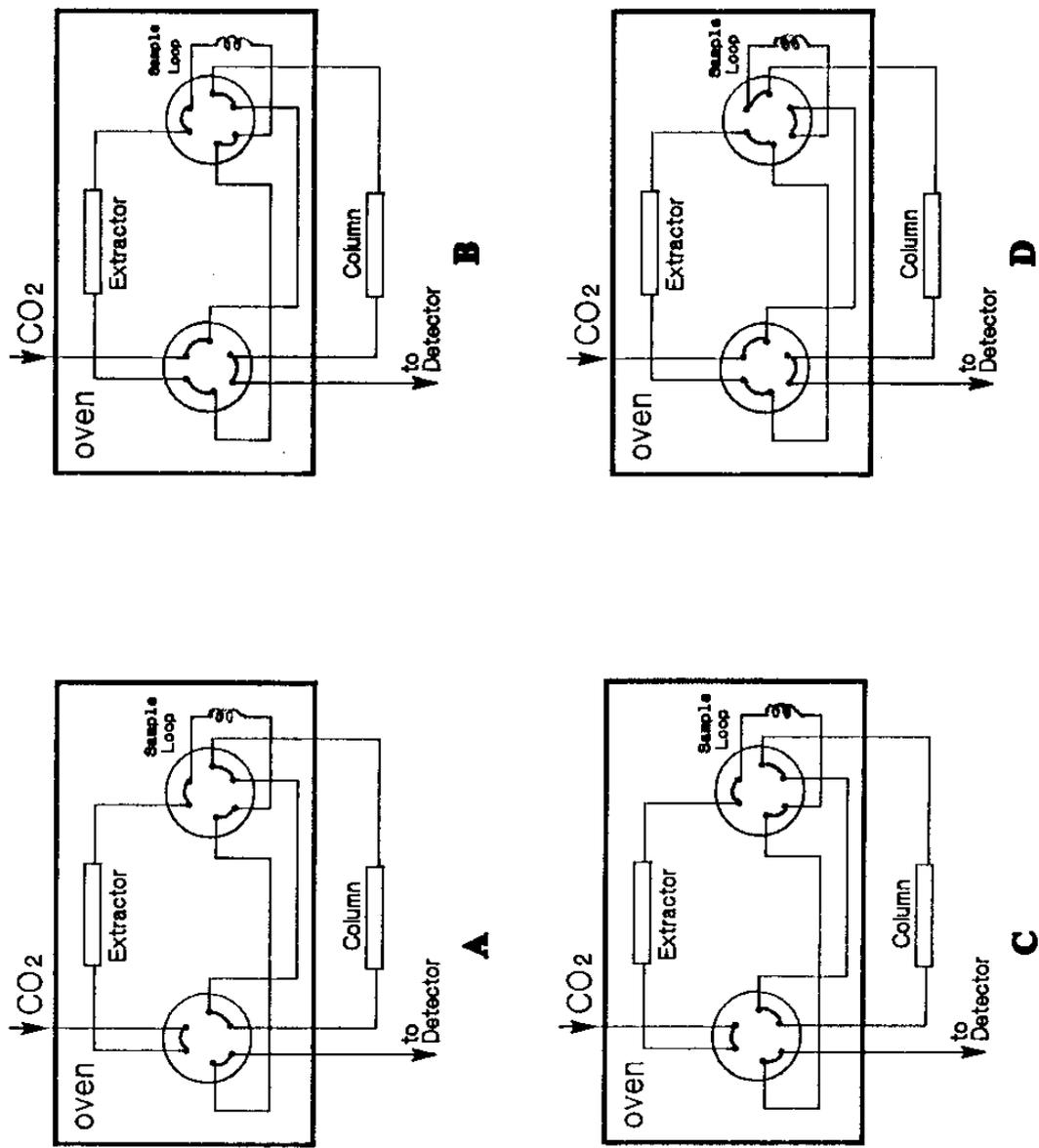


Fig. 10. A Schematic Representation of the On-line Static SFE Apparatus.

tube형의 fused-silica capillary glass tube (15 μ m i.d)를 사용하였다. 최적 분리를 위해 capillary의 내경 및 길이 변화에 따른 flow rate를 측정하여 restrictor의 최적 규격을 결정하였으며 FID detector의 jet 끝과 restrictor 끝 간의 거리를 변화시켜 상압으로 분사될때 형성되는 flow의 확산형태가 FID 검출기에 미치는 영향을 최소화하였다. SFC 오븐은 제작이 완료된 상태이고 온도조절 성능을 보완중에 있으며 SFC에서 널리 사용되고 있는 FID 검출기는 설계를 끝낸 후 제작중에 있다. 또한 시료의 전처리 방법으로써 이용되고 있는 solvent extraction의 단점인 복잡한 처리과정과 그에 따른 낮은 시료회수율, 시료의 분해, 긴 처리시간을 개선하기 위해 on-line SFE/SFC 다차원분석장치를 설계하여 제작하였다.

1. SFC 장치의 고찰

초임계유체 크로마토그래피법은 여러가지 분리인자들을 변화시켜 시료의 머무름을 조절할 수 있다는 점에서 액체 크로마토그래피 (LC) 와 기체 크로마토그래피 (GC) 법에 비해 유연성이 큰 장점이 있다. 초임계 유체의 특성상, 각각의 분리인자를 변화시키기 위해서 압력을 정확히 조절하기 위한 syringe펌프나 일정한 압력을 유지시키면서 초임계유체의 유속을 일정하게 유지시키는 restrictor, 온도를 정확히 조절할 수 있는 오븐 등이 필요하다. 기체크로마토그래피(GC)분석법은 분석온도를 변화시키거나 모세분리관의 고정상을 변화시켜 시료의 머무름을 조절하며 액체 크로마토그래피법은 이동상의 조성 및 충전 컬럼의 고정상을 변화시켜 시료의 머무름을 조절한다. 그러나 초임계유체 크로마토그래피법은 위의 방법들이 사용한 모든 분리인자를 변화시킬 수 있다. 즉, 모세 분리관이나 충전형분리관을 모두 사용할 수 있으며 그것들의 고정상을 변화시킬 수 있고 이동상의 종류 및 그의 조성과

분석시스템의 온도를 변화시키는 방법을 모두 사용할 수 있다. 그뿐만 아니라 초임계 유체의 밀도를 변화시키거나 압력을 변화시키는 방법을 써서 용매의 강도를 조절할 수 있다. 위에 열거한 용매의 조성, 온도, 압력, 밀도는 단독으로 변화시킬 수도 있고 두가지를 함께 변화시켜 시료의 머무름을 조절함으로써 최적의 분리조건을 설정할 수 있다.

초임계 유체 크로마토그래피(SFC)법에서 넓은 범위의 머무름 값을 갖는 복잡한 시료의 분리를 위해서는 분석시작에서부터 끝까지 일정하게 압력을 유지시키는 isobaric 방법보다, 압력이나 밀도를 변화시키는 압력 / 밀도 프로그래밍법이 널리 이용되고 있다. 또한 초임계 유체의 압력과 밀도에 따라 시료의 용해도를 조절할 수 있으므로 온도를 프로그래밍 하는 방법보다 응용 가능성이 크며 널리 이용되고 있다. 밀도는 시료의 머무름과 직접적인 함수관계에 있으며[4] 압력은 초임계 유체 크로마토그래피(SFC) 장치를 통해 직접 모니터링이 가능 하며 쉽게 조절이 가능하다. 따라서 이동상에 대한 P-V-T 데이터를 알고 있으면 컴퓨터를 이용하여 압력과 밀도를 상호 연관지어, 압력을 변화시키므로써 밀도를 정확히 조절할 수 있다. 이와같이 용매의 gradient를 압력으로 표시하는 것 보다 밀도로서 표시하는 것이 시료의 머무름과 연관시키기에 편리하다.

직접 모니터링하여 조절하기 쉬운 분리인자인 압력을 밀도와 연관짓는 방법은 다음과 같다. 밀도가 낮은 가스인 경우 이상기체법칙 ($PV/RT=1$)에 의해 압력을 밀도로 전환할 수 있다. 여기서 V는 molar volume이며, 가스의 분자량(M)을 알면 molar density를 mass density(ρ)로 바꿀 수 있다. 즉 mass density, ρ , 는 M/V 이다. 그러나 대부분의 초임계유체는 높은 밀도를 가지므로 이상기체의 법칙에 잘 맞지 않는다. 그리고 유체에 따라 고유한 값인 compressibility factor를 추가하여 이상기체방정식을 초임계유체까지 확장시켰다. 그결과 얻은

관계식은 $PV/RT=Z$ 이며 Z 이 compressibility factor이다. 또한 Pitzer는 Z 을 결정하는 여러 인자들중 분자에 고유한 항을 하나의 환산인자로 표시하여 acentric factor(w)라고 하였다. 이 인자 w 는 분자의 크기나 모양에 따라 다른 값을 가지며 그 값은 물질의 임계온도의 70 % 되는 온도와 임계온도에서 그 물질의 증기압의 비에 해당하는 값을 가진다. 그러므로 일정한 온도 압력에서 acentric factor를 알면 compressibility factor Z 을 구할수 있고 V 를 결정할 수 있으므로($V = ZRT/P$), mass density를 유체의 분자량으로부터 구할수 있다 ($\rho=M/V$). 따라서 주사형펌프의 pressure transducer를 통해 압력을 측정하여 그 값을 밀도로 환산하고 밀도를 변화시키는데 필요한 압력의 변화를 컴퓨터의 소프트웨어를 통해 계산한 후 그 값만큼 펌프를 작동시켜 분석시스템의 밀도를 유지시키거나 변화시킬 수 있다.

2. SFC장치의 설계 및 제작

초임계유체 크로마토그래피는 초임계유체 공급용 실린더, 이를 운반하기 위한 펌프와 펌프 컨트롤러, 시료주입장치, 분리관, 분리관 온도 조절장치, 검출기, 검출기 신호처리 장치로서 구성되어 있다(Fig.11). 초임계유체로서는 고순도의 액화 탄산가스(Scott Specialty Gas Co., USA, SFC grade)를 사용하였다. 검출장치로서 불꽃이온화 검출기 (FID)를 사용하므로, 실험에 사용된 탄산가스는 99.999 % 이상의 순도를 가지는 제품을 선택하였다. SFC grade 액체탄산가스 실린더는 액체 탄산가스가 액체상태로 용이하게 배출될 수 있도록 내부에 dip tube를 내장시켰으며 액체 탄산가스 위의 head pressure가 1,500 psi로 유지되게 하기 위해 헬륨가스가 충전되었다. 실린더와 SFC 펌프간의 연결은 일반 기체실린더를 사용할때와는 달리 압력조절장치를 중간에 사용하지 않고 직접 1/8 인치 S.S.관을 사용하여 연결하였으며 실린더에서 발생할 수

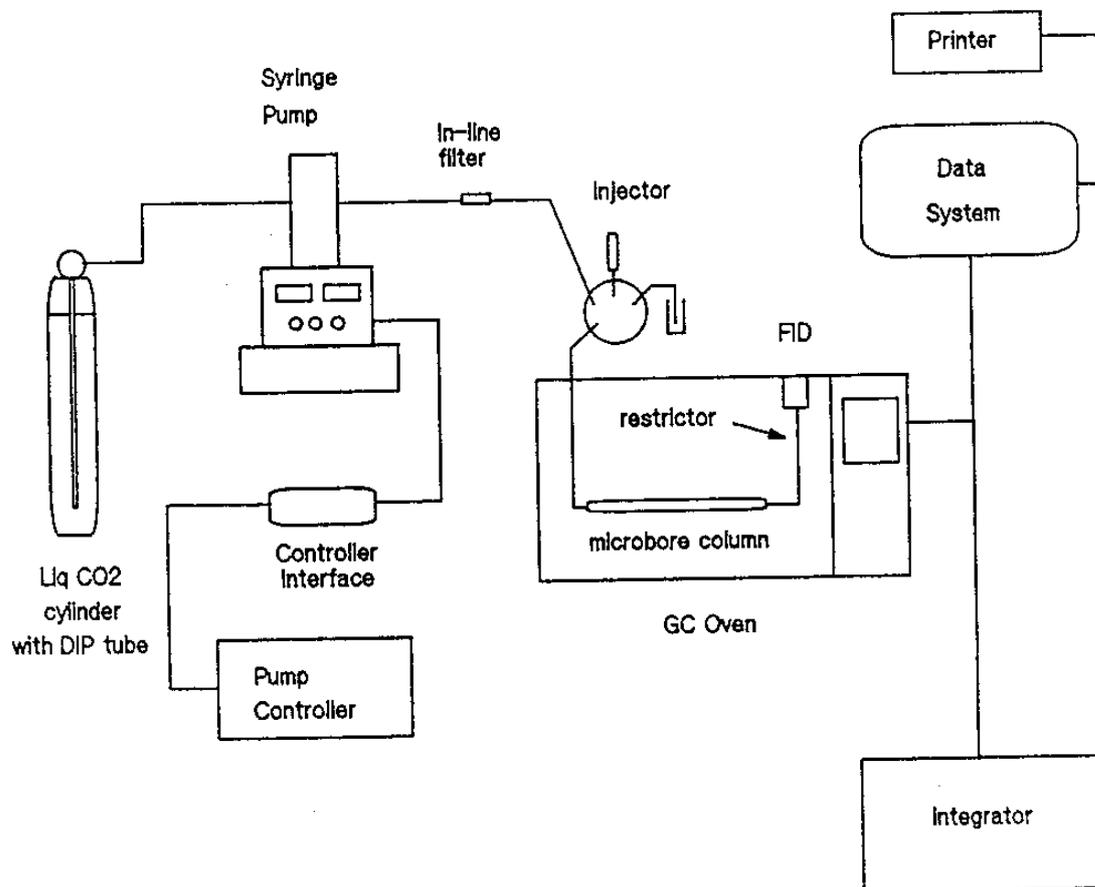
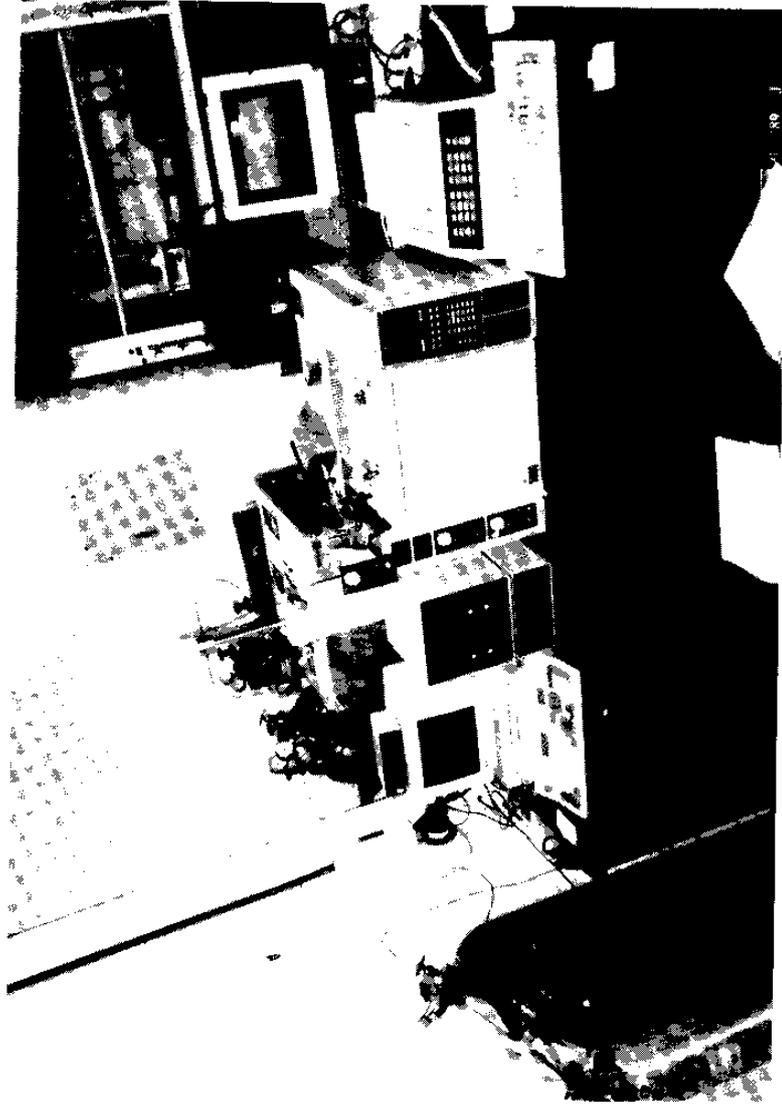


Fig. 11. A Schematic Diagram of Supercritical Fluid Chromatography System.



Overview of the Supercritical Fluid Chromatograph which was Constructed.

있는 입자성 불순물을 제거하기 위해서 in-line filter를 중간에 연결하였다. 일반적으로 gas 실린더에 사용되는 pressure regulator는 액화가스가 pressure regulator 내에서 발생하는 압력차로 인해 기화되므로 사용할 수 없다. SFC 펌프로서 주사형펌프 (syringe pump)를 구입하여 (ISCO Co., USA, Model 11500) 사용하였다. 주사형펌프는 널리 사용되고 있는 피스톤형 펌프와는 달리 필스기 거의 없고, 아주 낮은 유속으로 ($0.02 \mu\text{L} \sim 600 \mu\text{L}$) 유체를 공급할 수 있으므로 SFC 분리관으로서 packed microbore column 이나 capillary column을 사용시 적합하다. 본 실험에서는 50 mL 용량의 주사형 펌프를 사용하였다. 대용량의 주사형 펌프도 상업화되어 있지만 이는 이동상을 1회 주입하여 사용할 수 있는 시간이 긴 장점이 있으나 큰 부피에 압력을 가하여 압력을 조절하거나 밀도를 변화시키므로 재현성이 떨어지는 단점이 있다.

SFC에서 가장 많이 사용되고 있는 이동상은 CO_2 이며 상온에서 기체상태이므로 펌프의 용량만큼 CO_2 를 채우기 위해서 두가지 방법이 사용된다. 한가지 방법은 cooling jacket을 펌프실린더 주위에 설치하여 유체 저장실린더로 부터 고압으로 펌프에 채워진 CO_2 가 액체 상태를 유지하도록 하는 방법이며 이 방법을 사용하면 실린더의 90~95%가 채워지게 된다. 이때 실린더의 온도는 보통 $10 \sim 20^\circ\text{C}$ 를 유지시켜준다. 두번째 방법은 CO_2 저장실린더의 head pressure를 1500 psi로 유지시켜 주기 위해 윗공간에 고압의 헬륨 가스를 채우는 방법이며 이렇게하면 CO_2 만의 head pressure 보다 2배 이상의 압력을 갖게 된다. 이 방법을 사용하면 펌프실린더의 90~100%가 채워질 수 있다. 지금까지 헬륨은 CO_2 에 거의 용해 되지 않는 것으로 알려져 있으나, 헬륨의 head pressure에 따른 헬륨의 CO_2 에 대한 용해도에 관한 연구 결과에 의하면 이방법을 사용할 경우 소량의 헬륨이 이동상에 존재하여 시료의 머무름 값에 영향을 주는 것으로 알려지고 있다[32].

본 실험에서 주사형 SFC 펌프에 액체 탄산가스를 주입시에는 펌프실린더 내의 압력을 350 psi 이하로 낮춘 후 탄산가스 용기의 밸브와 펌프주입 밸브를 열어 실린더에 신속하게 충전하였다. 펌프는 10,000 psi까지 압력을 높일 수 있게 제작되어 있으나 SFC분석에서는 최고 6,000 psi 이상에서는 사용하지 않았다. 이는 고압으로 갈수록 유체의 유속이 급격히 커져 FID 불꽃이 꺼지게 되고 SFC 연결부분에서 leak가 생길 우려가 크기 때문이다. ISCO 펌프의 펌핑압력의 정확도는 2% 이내였으며, 압력의 재현성도 1% 이내로서 나타났다. SFC 펌프의 압력 및 유속을 시간에 따라 임의로 일정하게 변화시키기 위해 펌프컨트롤러를 사용하였으며, 펌프 컨트롤러는 IBM PC에 장착된 data acquisition board와 controller interface box로 구성되어 있다. 유속 조절기능은 SFC에서 사용되지 않으므로 SFC 컨트롤러 구성에서 제외되었다. 초임계유체의 solvating power는 유체의 밀도에 따라 크게 변하므로 시간에 따라 밀도변화가 가능하도록 컨트롤러의 기능이 구성되었다. 또한 압력변화에 따른 프로그래밍 기능도 포함되어 있으나 탄산가스가 비이상기체이므로 압력변화와 유체의 solvating power간의 직선성이 없어 대개 밀도프로그래밍 기능을 SFC에서 주로 사용하였다. 펌프 컨트롤러는 펌프의 상태를 계속 모니터하면서 압력이나 밀도등의 파라미터를 표시하며 정해진 임의의 값으로 유지시키거나 변화시키게 된다. 펌프컨트롤러를 사용하여 압력프로그래밍시 압력의 시간에 따른 변화와, 밀도 프로그래밍시 밀도의 시간에 따른 변화는 매우 정확하고 재현성 있게 얻어졌다 (Fig.12).

SFC의 시료 주입은 0.5 μ L internal loop를 내장한 switching valve (Valco Co., USA)를 사용하였다(Fig.13). 이는 polyimide 재질의 rotor로 되어 있어서 고압에서 견딜 수 있다. Injector와 syringe pump와의 연결은 1/16 inch S.S. 관을 사용하였으며 펌프에서 발생한 이물질이 injector에 끼지 않도록

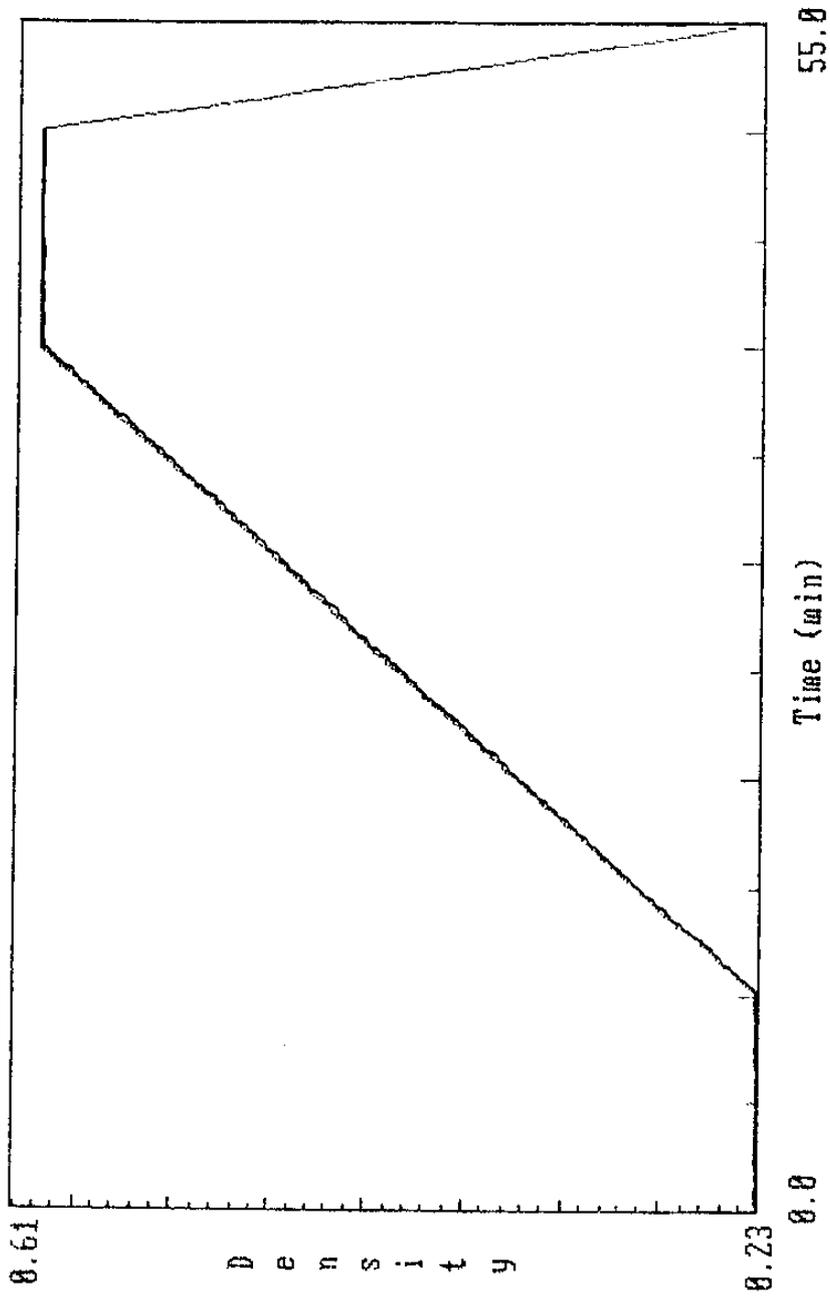


Fig. 12. Plot of Linear Density Gradient of SFC System by SFC Syringe Pump.

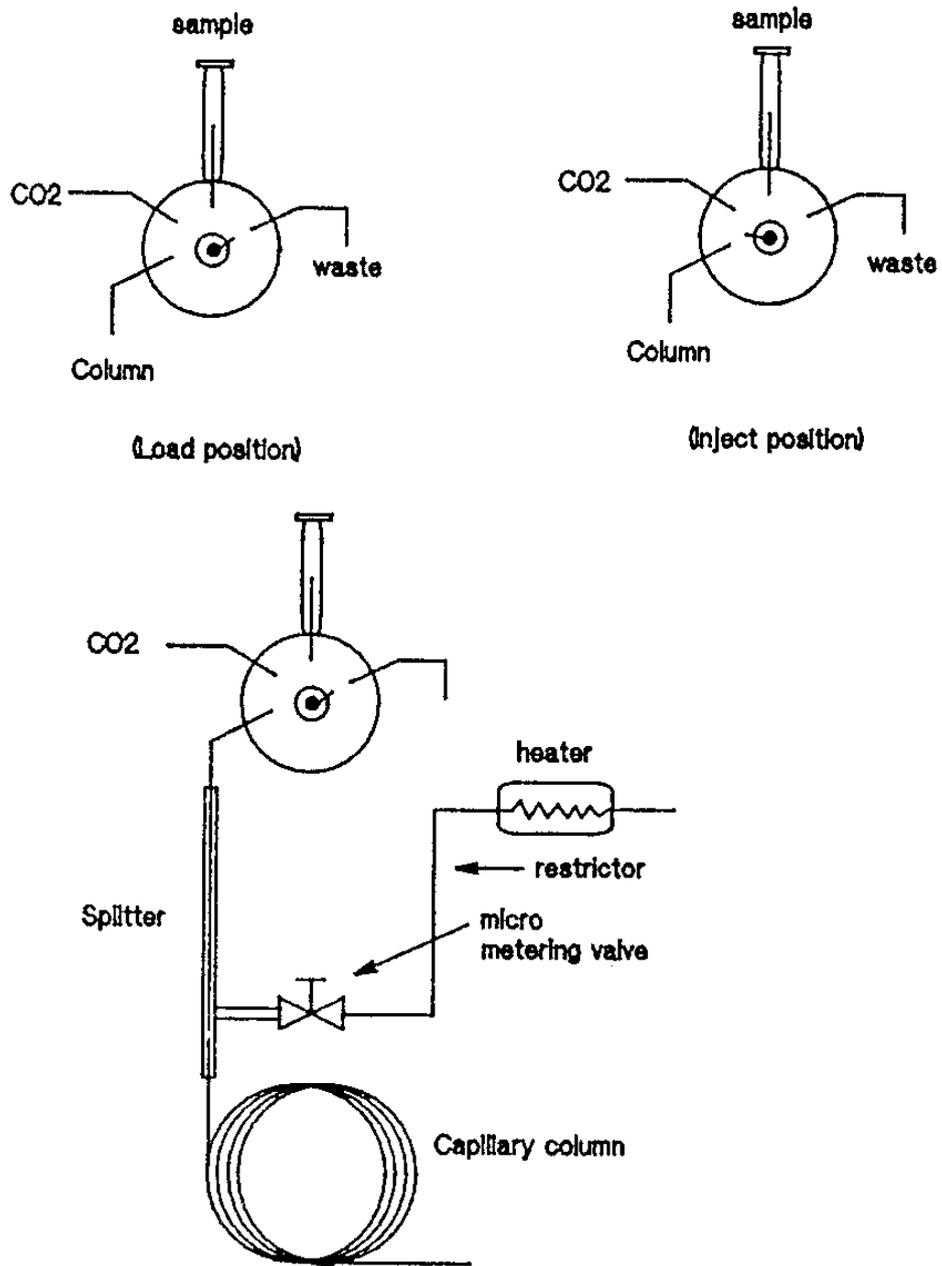


Fig. 13. A Schematic Diagram of SFC Injection Devices.

사이에 in-line filter를 장착하였다. 0.5 μ L 시료 양은 1 mm microbore 분리관에는 적합하나 모세분리관을 사용할 경우에는 너무 많은 양의 시료가 주입되는 까닭에 이를 split할 수 있는 splitter를 설치해야 한다. Splitter (Fig.13)는 micrometering valve와 restrictor로서 구성하였다. 이때 restrictor의 가느다란 구멍으로 탄산가스가 확산이 되면서 freezing이 발생하므로 이를 방지 하기 위해서 heater를 장착해야 한다.

SFC분리관으로서는 내경이 아주 작은(1 mm) microbore packed column (길이 25 cm, S.S. tube)를 사용하였다. 본 실험에서는 linear aliphatic hydrocarbon이 고정상으로 되어 있는 C18 분리관을 SFC 성능검사에 주로 사용하였다. Microbore packed column은 모세분리관(capillary column)에 비해 분리효율이 낮으나 많은 양의 시료를 주입할 수 있어 보다 높은 감도로서 시료를 분석할 수 있을 뿐만 아니라 시료주입이 비교적 간단한 장점도 있다. Injector와 분리관의 연결은 내경이 아주 작은 fused silica capillary tube(내경 50 μ m, 외경 300 μ m)를 사용 함으로서 주입된 시료의 확산에 의한 extra column band broadening을 일으키지 않도록 하였다. Silica capillary tube를 S.S. 분리관과 injector에 연결하기 위해서 polymer 재질의 microferrule (Upchurch Co., USA)이 사용되었다.

컬럼내의 압력을 임계압력이상으로 유지시키고 분리된 시료를 검출기에 공급하기 위해 상압으로 내리려면 restriction 장치가 필요하다. 이상적인 restrictor의 조건은 균일하고 펄스가 없는 유체상태를 유지시키고 막힘이 없어야 하며 유속을 쉽게 조절가능하거나 쉽게 교환가능하므로써 유속조절이 가능해야 한다. 또한 열적으로 불안정한 화합물이나 비휘발성인 시료의 열분해나 침전이 없이 초임계유체에서 가스 상태로 변환하여 검출기로 완전히 전달될 수 있는 구조를 가져야 하며, 기계적 강도가 크고 extra-column zone

broadening effect가 작도록 설계되어야 한다. 본 실험에서는 길이가 30"인 아주 가느다란 fused-silica capillary tube (내경 15 μm , 외경 300 μm)를 restrictor로서 사용하였다. Restrictor와 분리관의 연결은 microferrule 로써 연결하였다. 최적분리를 위해 capillary의 내경 및 길이 변화에 따른 flow rate를 측정하여 restrictor의 최적규격을 결정하였으며 FID detector의 jet 끝과 restrictor 끝간의 거리를 변화시켜 dead volume의 변화를 최소화 하면서 초임계유체가 restrictor 끝에서 상압으로 분사될때 형성되는 flow의 확산형태가 FID 검출기에 미치는 영향을 최소화하였다. FID 뿐만 아니라 SFC/MS에서도 restrictor는 인터페이스로서 매우 중요한 기능을 하므로 그 구조가 분리능에 미치는 영향이 크다[33]. 따라서 앞으로 SFC/MS의 인터페이스 개발을 위해 restrictor의 구조에 대한 연구를 통해 실험조건에 맞는 restrictor 개발에 대한 연구를 진행할 예정이다.

SFC에서 분리관의 온도를 초임계온도 이상으로 유지해주고 온도에 따라 시료의 머무름값을 조절하기 위해서 온도조절이 가능한 oven이 필요하다. 일정한 압력에서 분리온도가 높아지면 시료의 확산이 빨라져 높은 분리능을 나타내며 동시에 밀도가 낮아져서 분리능이 증가한다. SFC 시스템의 예비 성능평가 시험을 위해 Hewlett-Packard 5890A GC(USA)의 오븐을 사용하였으며, SFC용 오븐은 따로 제작하여 온도조절 성능을 보완중에 있다. 제작된 오븐의 구조는 Fig.14와 같으며 이는 모터와 팬, 히터, 온도센서, 절연된 오븐몸체, 오븐몸으로 구성되어 있다. 팬의 구동을위해 직류모터를 사용하였으며 오븐에서 모터축을 통해 전달되는 열을 방열할 수 있도록 모터앞과 뒤에 방열 팬을 장착하였고, 모터 축 bearing의 윤활유가 고온에서 견딜 수 있도록 주문 제작 하였다(모터 rpm, 1350 rpm). 팬은 날개의 구배를 크게 하여 바람이 수직 방향으로 불게 함으로써 히터의 열을 효율적으로 분산되게 하였다. 히터는

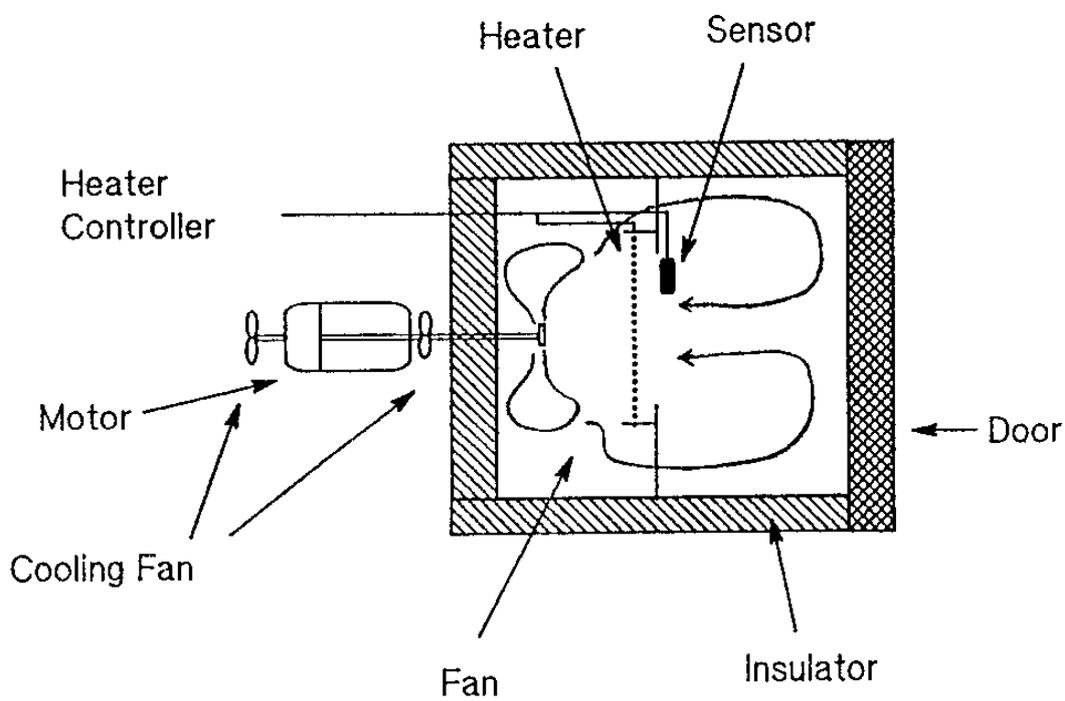
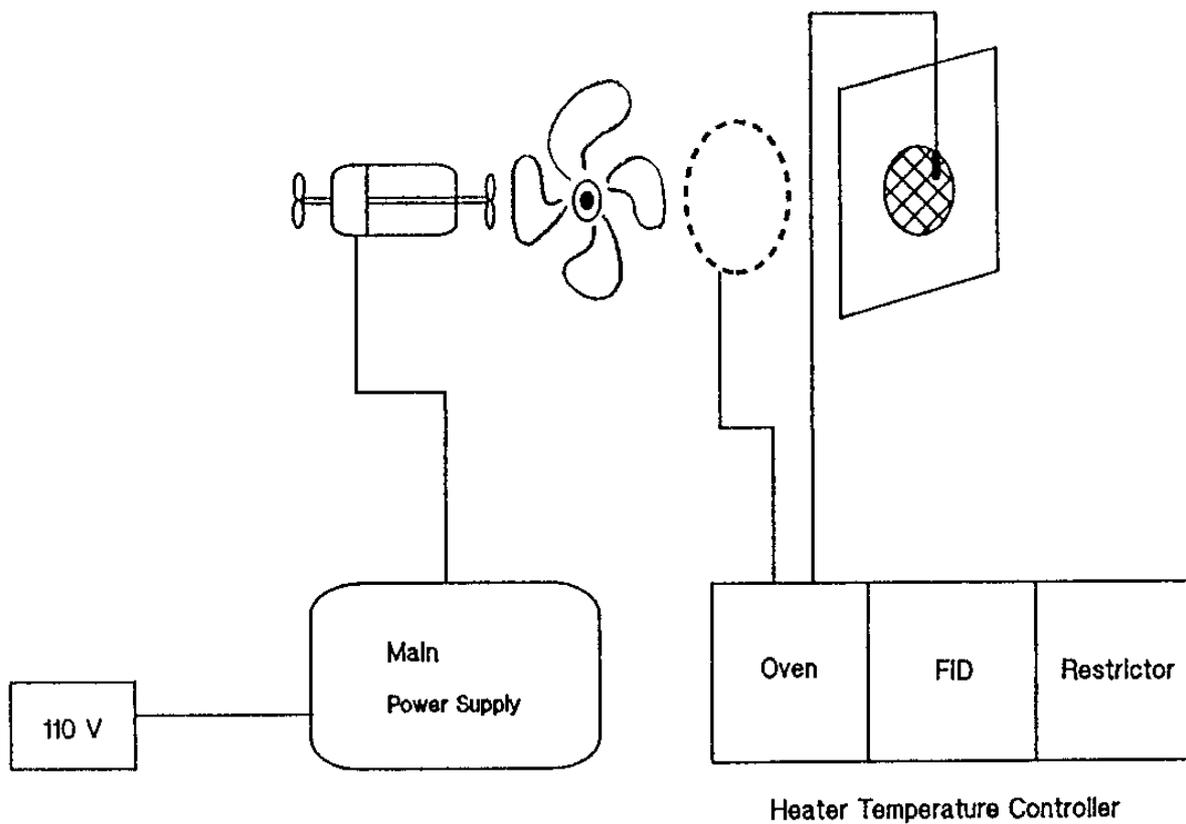
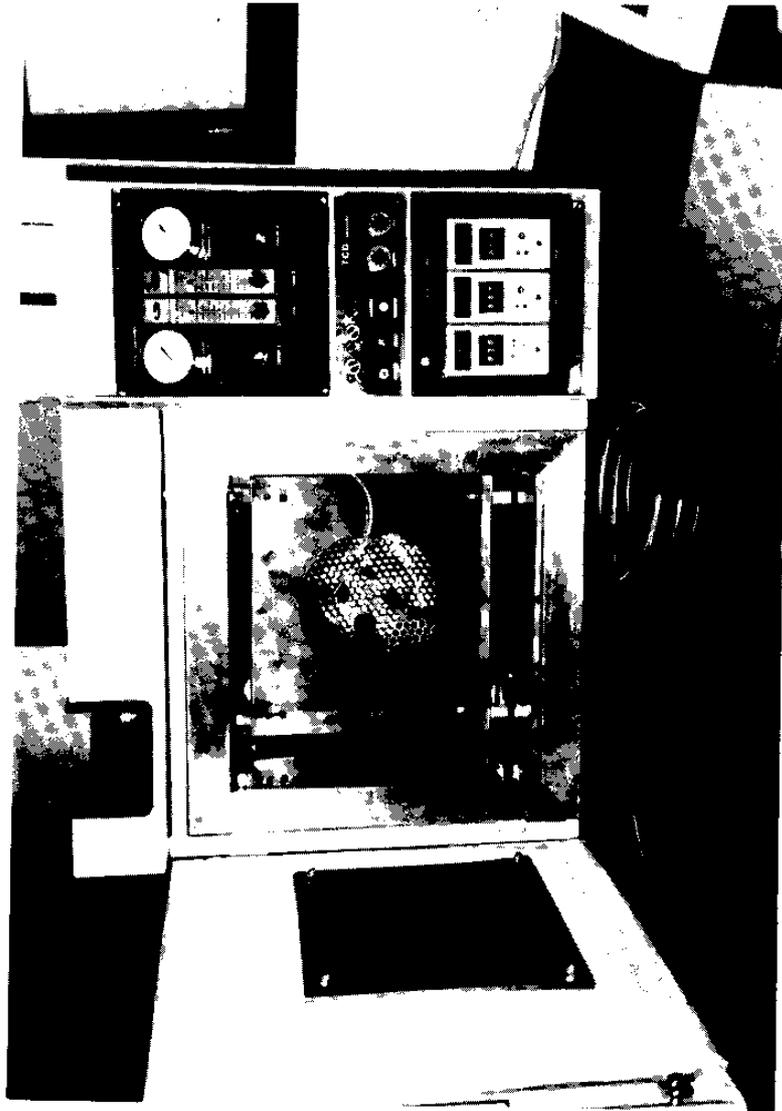


Fig. 14. A Schematic Diagram of SFC Oven.



Overview of the SFC Oven which was Designed and Built.

1800 W 의 열선을 사용하였으며, 온도센서는 Pt-100 센서를 사용하였다. 팬 앞에는 가운데에 그물형의 구멍이 뚫린 바람막이 판을 설치함으로써 히터의 열이 직접 오븐 앞면으로 전달되지 않고 퍼져서 오븐 앞면으로 휘어 든 후 다시 오븐 가운데로 대류 되도록 함으로써 오븐 내의 온도분포가 보다 효율적으로 균일하게 유지되게 하였다. 오븐의 내면은 S.S. 판을 사용하였고 절연재는 고온에서 견딜수 있는 암면 (ceramic wool, 금강암면)을 사용 하였다. 오븐의 전기회로는 모터와 히터의 전원을 공급하는 main power supply와 온도 조절부로 구성하였다. 온도조절부는 오븐, FID, splitter, restrictor의 히터를 조절하기 위해서 3개의 온도조절장치를 장착시켰다.

SFC시스템의 일차 성능 시험에는 HP GC의 불꽃 이온화검출기 (FID)를 사용하였다. FID의 연료로서 사용되는 수소와 공기의 유량은 일반 GC 분석에서 사용하는 조건과 같게 사용하였다(수소 30 mL/min, 공기 300 mL/min). FID의 신호는 integrator (Spectra-physics Co. USA, Model 4290)와 chromatographic workstation (Waters Co., USA, Baseline 810)을 사용하여 처리하였다. 본 실험에서 설계 제작중인 FID (Fig.15)의 몸체는 flame jet, ignitor, cathod, heater, sensor, H₂ 와 air inlet으로 구성되어 있고 FID 신호는 elctrometer로써 amplify한 후 integrator에서 처리하게 설계하였다. 히터의 온도제어는 오븐몸체에 장착된 온도조절 장치를 사용하게 하였으며 설계가 끝나 제작중에 있다.

3. 성능 평가

SFC펌프의 성능평가와 시료의 주입장치, 분리관, restrictor의 효율평가는 HP5890A GC를 사용하여 수행하였다. 이들로 구성된 전체 시스템의 성능을 평가하였으며 SEC오븐, FID검출기, 펌프컨트롤러, 초임계유체 추출장치가 제작

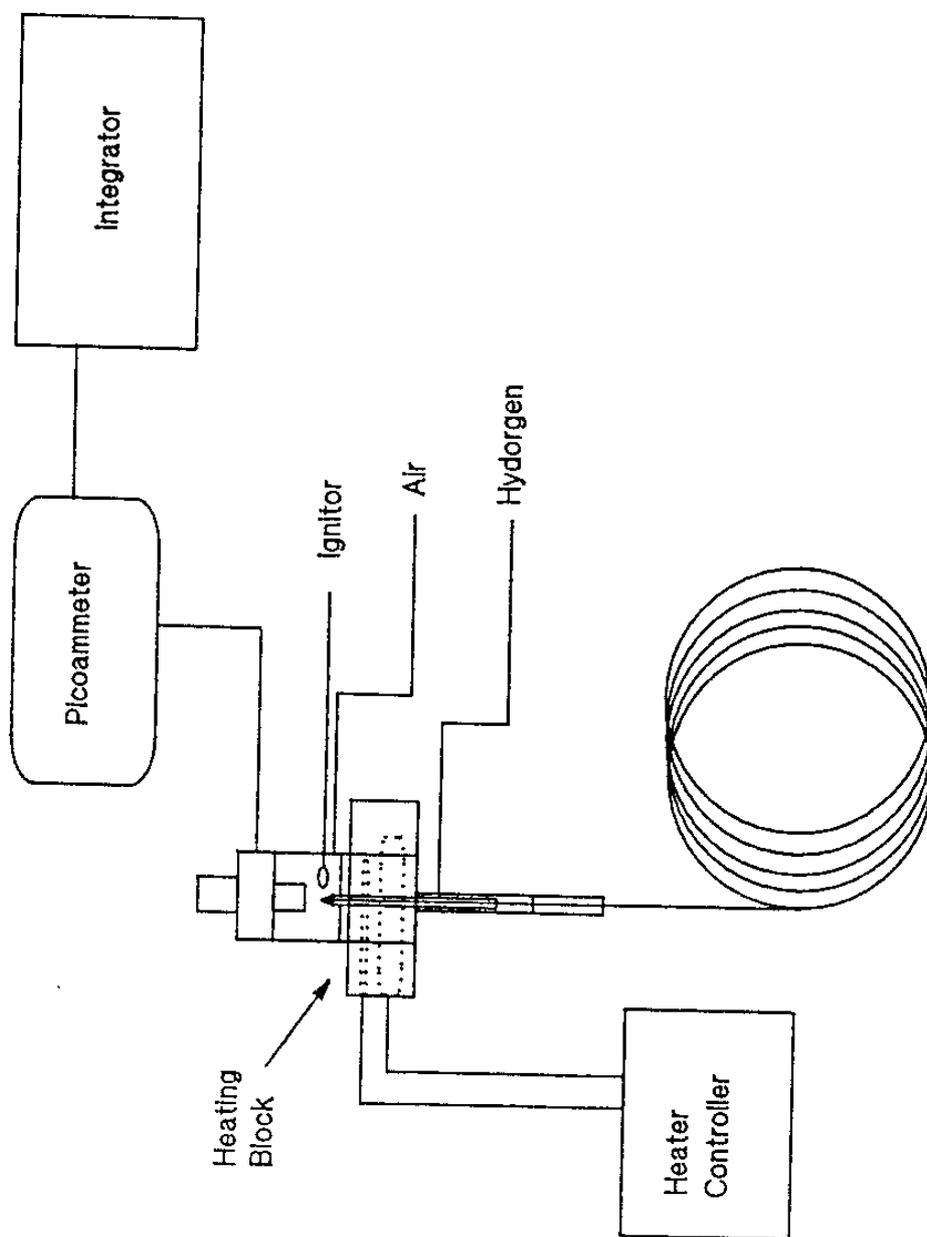


Fig. 15. A schematic Diagram of FID for SFC System.

완료되면 새로 구성된 SFC 시스템의 전체적인 성능평가를 같은 조건에서 수행하여 성능을 비교할 계획이다. 일차 제작된 SFC 시스템의 성능평가는 GC로 분석하기 어려웠던 긴 사슬을 가지는 n-alkane을 포함하는 standard mixture를 시료로 하여 0.5 μ L 를 주입후 압력프로그래밍법에 의해 시도하였다. 이로부터 얻어진 크로마토그램을 통해 머무름시간의 재현성, 분석시간, peak의 tailing, noise 정도 등을 평가하였다. 현재 제작된 SFC 오븐의 온도조절기능에 대한 보완과 성능평가를 진행중이며 또한 FID의 설계를 완료하였으며 제작이 되면 검출한계 및 직선농도범위를 평가할 계획이다.

4. SFE 설계 및 제작

SFE/SFC 분석시스템을 구성하기 위해 dynamic SFE system이 설계 제작되었다(Fig.16, 17). Fig.16은 수작업을 통해 valve를 조작하여 SFC에 시료를 도입하는 방법으로 3개의 valve와 extraction cell, 압력을 유지하기 위한 restriction 장치, accumulator로 구성되어 있다. Valve를 조작하여 CO₂ 를 extraction cell로 일정시간동안 흘려주고 추출되어 나오는 유체를 accumulator에 흘려보내 시료를 흡착시키고 CO₂ 는 vent line을 통과해 버린다. 이렇게 일정 시간동안 시료를 흡착한 후, valve를 조작하여 초입계 CO₂ 가 직접 accumulator를 통과하게 한 후 분석관으로 주입되게 설계되었다. Fig.17는 위의 과정들을 자동화하기 위해 설계한 SFE 장치로서 3개의 switching valve를 사용하여 자동화가 가능하도록 설계하였다.

제6절 결과 및 고찰

휘발성이 작거나 열에 불안정한 유기시료를 고분해능으로 분리, 분석할 수

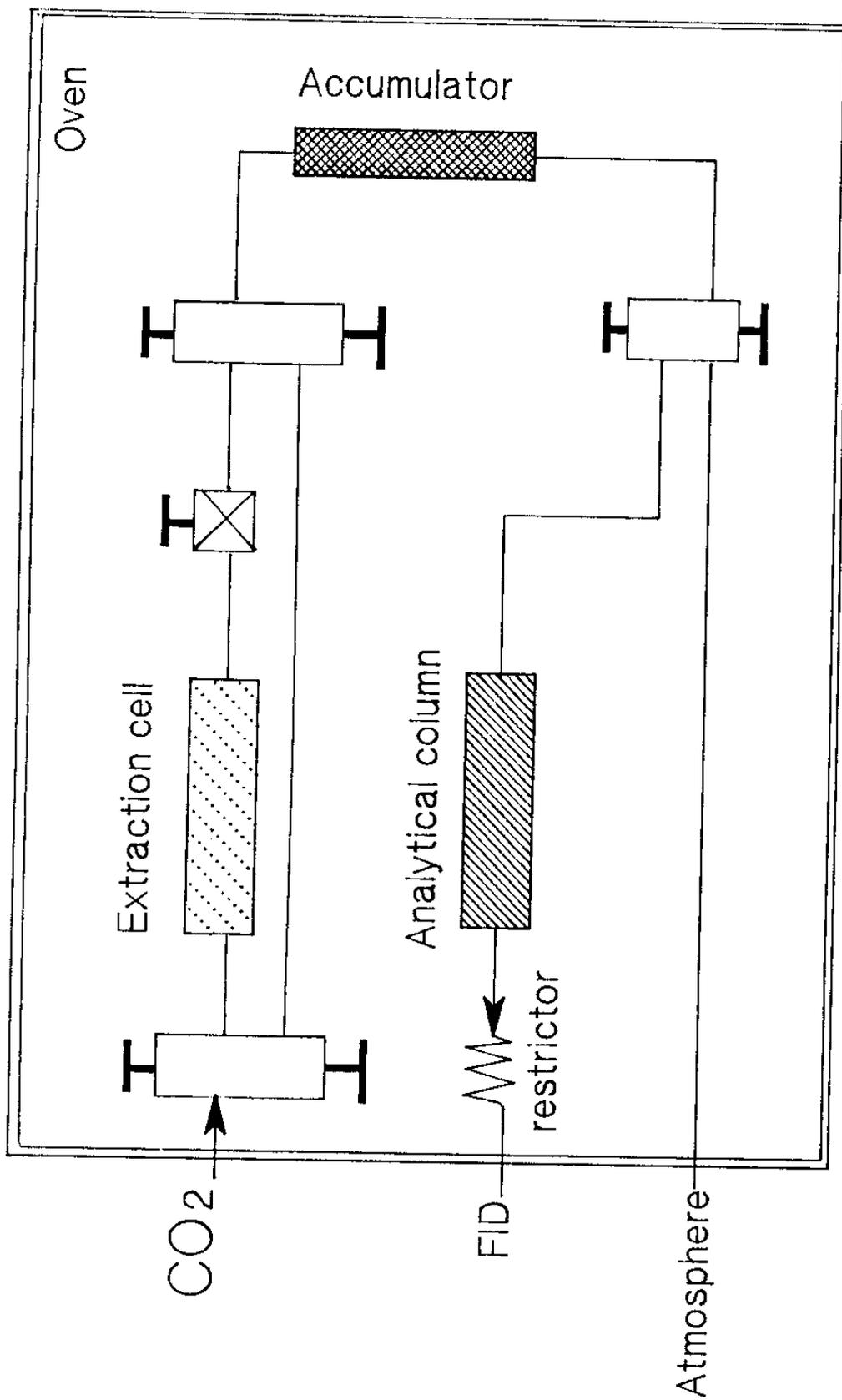


Fig. 16. A schematic Diagram of SFE System.

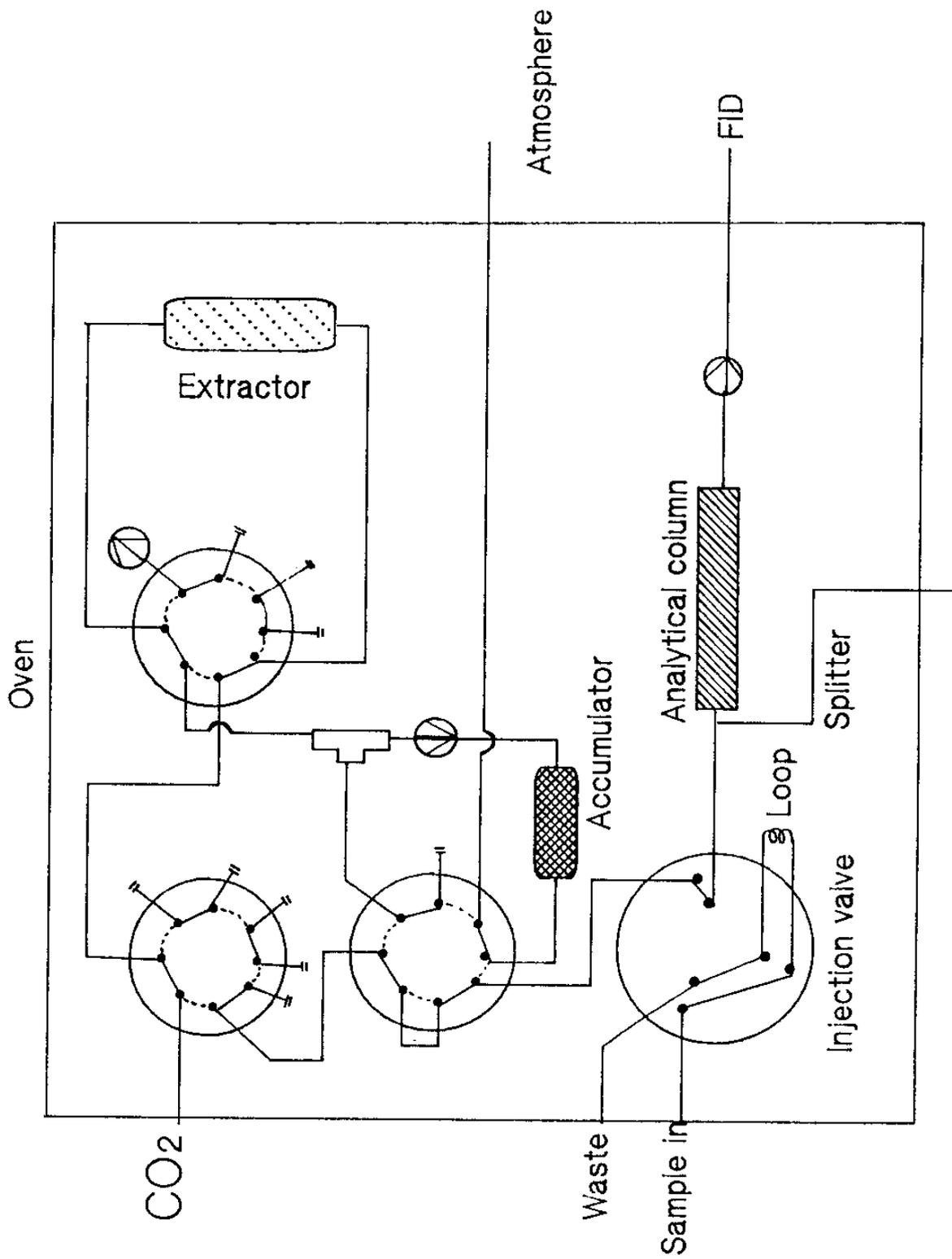


Fig. 17. A schematic Diagram of Automated SFE System.

있는 SFC 분석 시스템을 개발하기 위하여, 일차 제작된 SFC 시스템에 대한 pump와, restrictor, oven의 성능을 평가하였으며 전체적인 시스템의 성능을 평가하기 위해 n-alkane을 시료로하여 머무름시간의 재현성, 분석시간, peak tailing, noise 정도 등을 알아보았다. 또한 설계가 완료되어 제작된 SFC oven의 성능평가가 진행되고 있으며, FID 검출기는 설계가 완료되어 제작중에 있다. 자체 제작한 SFC가 구성되면 전체적인 성능평가를 실시할 계획이다. 본 실험에서 사용한 펌프는 10,000 psi 까지 압력을 높일 수 있게 제작되어 있으나 SFC 분석에서는 최고 6,000 psi 이상에서는 사용하지 않았다. 이는 고압으로 갈수록 유체의 유속이 급격히 커져 FID 불꽃이 꺼지게 되고 SFC 연결부분에서 leak가 생길 우려가 있기 때문이다. 본 실험에서 사용된 펌프의 펌핑 압력의 정확도는 2% 이내이며 압력의 재현성은 1% 이내이다.

실험에 적합한 restrictor의 규격을 정하기 위해 내경이 15 μm 와 40 μm 인 fused silica capillary tube를 사용하여 압력변화에 따른 flow rate의 변화를 측정하였다. Table 7에 내경 40 μm restrictor를 사용하였을 경우 flow rate를 나타내었다. 1300 psi 이상에서는 이동상의 적정 유속인 30 mL/min을 넘으며 2000 psi 이상에서는 이동상의 유속이 과도하여 비누 방울 유량계로는 측정하기가 곤란하였다. Table 8에는 내경 15 μm 인 restrictor를 사용하였을 경우의 유속을 나타내었다. 이동상의 압력이 3500~4000 psi 에서도 이동상은 적정 유속 30 mL/min에 가까운 값을 나타냄을 알 수 있다. 따라서 15 μm 의 내경을 갖는 restrictor를 사용하는 것이 넓은 범위의 압력을 변화시켜 시료의 머무름을 조절 하기에 유리하였다. 또한 30" 길이의 15 μm restrictor를 사용하여 n-alkane mixture를 분리해 본 결과 펄스가 없는 유체상태를 유지하였으며, 시료가 비휘발성 임에도 불구하고 침적에 의한 막힘이나 spiking 현상이 없었다. 또한 tailing이 없이 sharp한 peak를 얻을 수 있어

Table 7. Flow Rate of the FID System as a function of Pressure in 40 μ m i.d. Restrictor.

Pressure (psi)	Flow Rate (mL / min)
1200	32
1300	40
1400	43
1500	46
2000	78

Table 8. Flow Rate of the FID System as a function of Pressure in 15 μm i.d. Restrictor.

Pressure (psi)	Flow Rate (mL / min)
1500	10
2000	16
2500	22
3000	28
3500	35
4000	38

restrictor로서 충분한 기능을 나타냄을 확인하였다. 한편 유체의 압력을 5000 psi 이상으로 할 경우 초임계유체의 유속이 과도하여 FID의 정상 작동이 불가능하였으므로 Fig.18과 같이 FID 검출기의 jet 끝과 restrictor 끝간의 거리를 변화시켜 dead volume을 최소화하면서 상압으로 분사되는 초임계유체의 확산 형태가 FID 검출기에 미치는 영향을 최소화 하였다. 높은 압력에서도 FID를 정상가동할 수 있는 최적조건은, jet와 restrictor 끝의 간격이 1.5 cm 이었다. Restrictor의 구조가 분리능에 미치는 영향이 크므로 앞으로 SEC/MS의 인터페이스 개발을 위해서도 이에대한 연구가 좀 더 있어야 한다.

본 실험에서 구성된 SEC 시스템의 성능평가를 위해 GC로 분석하기 어려운, 긴 사슬을 가지는 n-alkane (C6 ~ C40)의 standard mixture를 시료로 하여, 0.5 μ L를 주입후 압력 프로그래밍법에 의해 분석한 결과 Fig.19과 같은 크로마토그램을 얻었다. 분리조건은 90 °C에서 carbon dioxide를 초임계 이동상으로 하여 2000 psi에서 4000 psi까지 압력 프로그래밍하였으며, 분리관은 C18(Spherisorb C18, 250 x 1 mm i.d., 3 μ m)을 사용하였다. 시료는 benzen과 methylene chloride에 녹여 각 물질이 200 ppm의 농도를 갖도록 혼합물을 만들어 0.5 μ L를 주입하였다. 분리된 peak의 확인은 각각의 standard 를 주입하여 얻은 머무름시간(t_R)과 비교하여 확인하였다. Fig.19에서 휘발성이 비교적 큰 C15~C22 의 머무름 간격이 좁아 이의 분리도를 높이고, 비 휘발성인 C32~C40 에서는 머무름 간격이 크고 분리시간이 길어 머무름시간이 길어질수록 peak의 tailing도 심하므로 이를 개선하기 위해 압력변화속도를 변화시켜 최적분리를 시도하였다. 그 결과 Fig.20 과같은 크로마토그램을 얻었다. 분리조건은 Fig.19의 경우와 같으며 단 2000 psi 에서 5000 psi까지 압력프로그래밍을 하여 단위 시간당 밀도의 증가를 크게하였으며 그 결과 일찍 용리되는 시료의 분리간격을 크게 하고 분리 시간도 단축하였으며

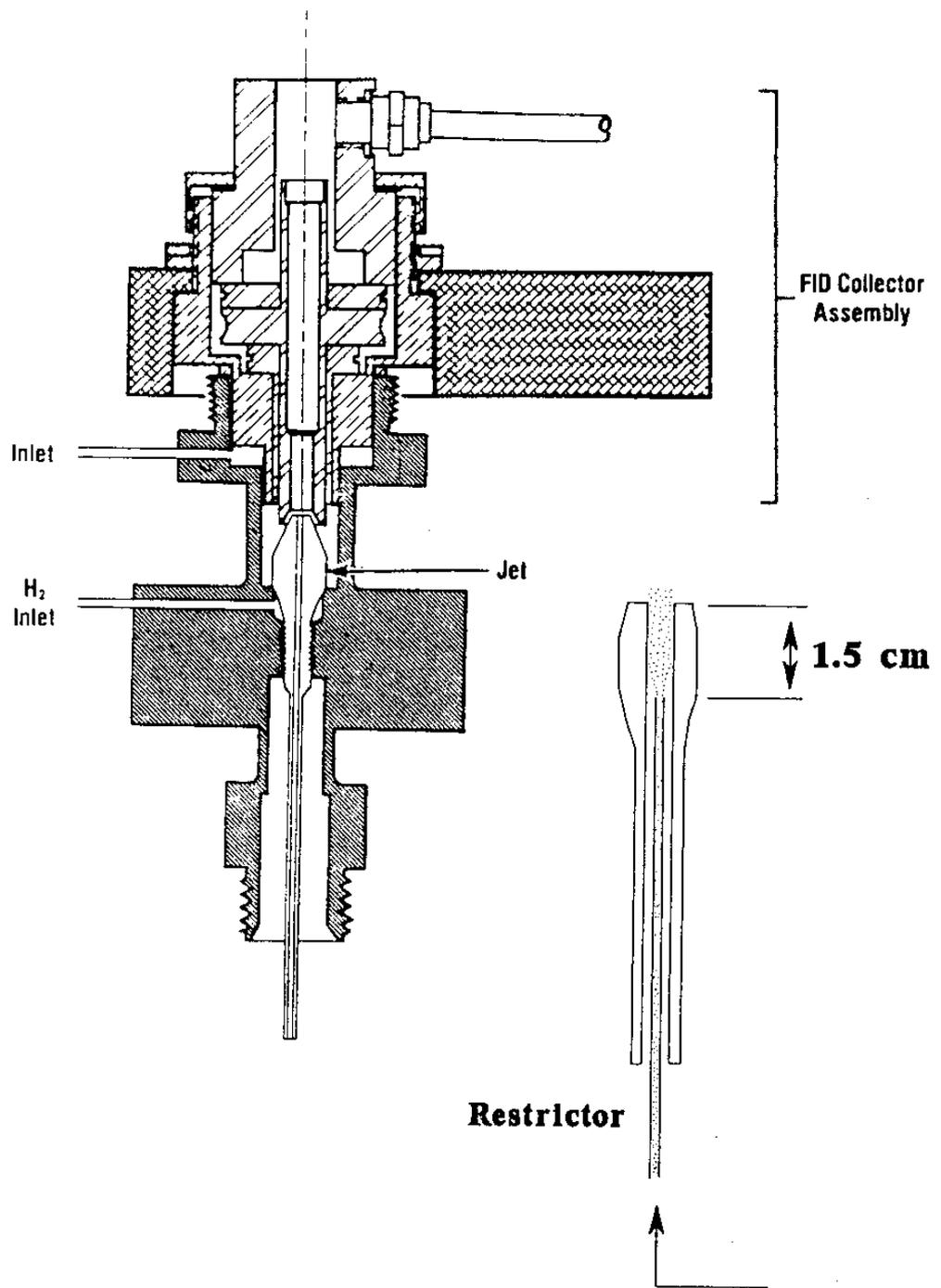


Fig. 18. A Diagram of the FID System and a Representation of the Gap between the FID Tip and the Restrictor end.

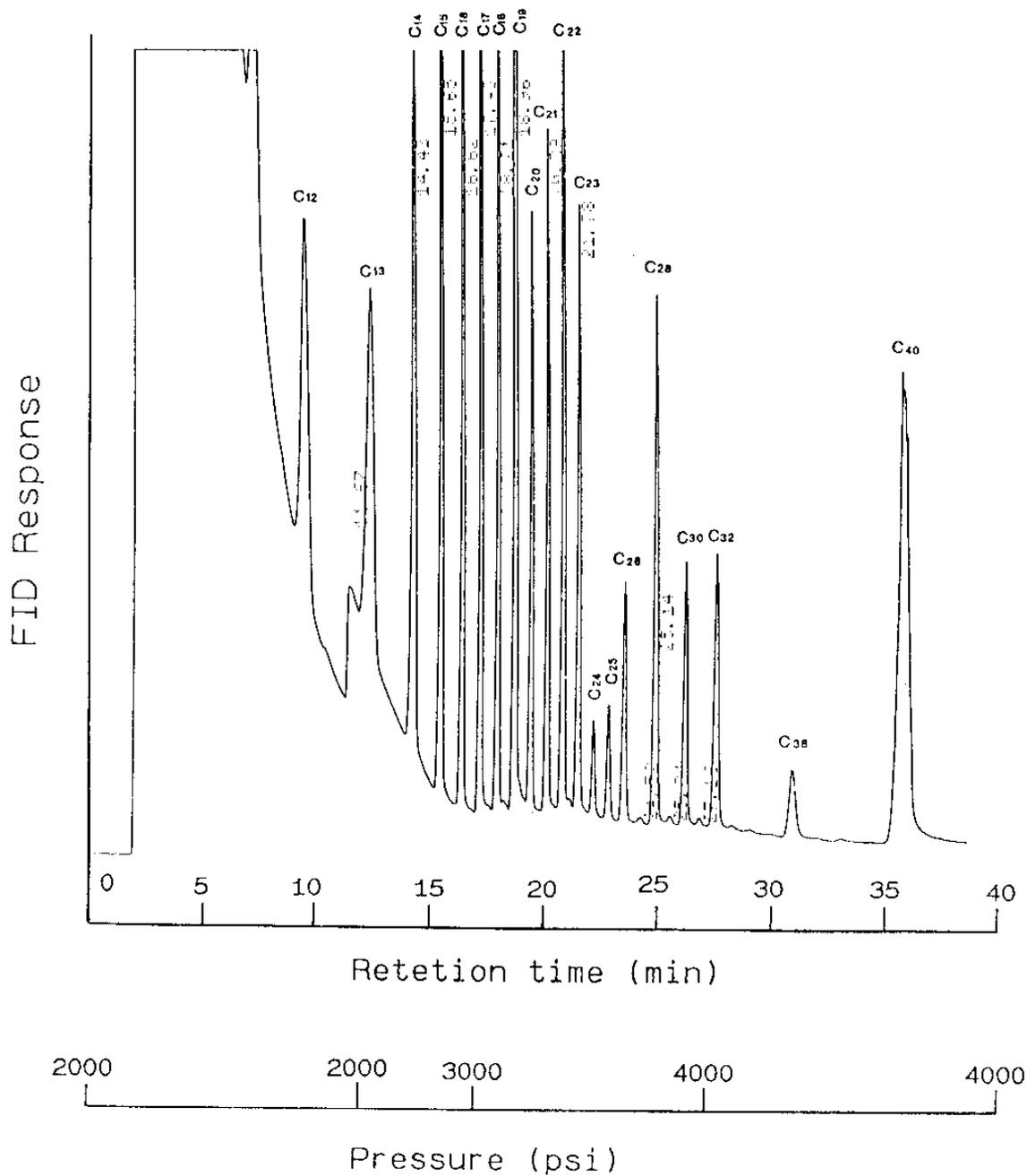


Fig. 19. SFC Chromatogram of a Mixture of n-Paraffins(C6-C40) on a C18 column. Conditions: Carbon Dioxide Mobile Phase at 90 °C, Linear Pressure Gradient was 2000 psi (hold for 12 min), a Pressure Ramp to 3000 psi in 5 min ,then to 4000 psi in 10 min, with FID.

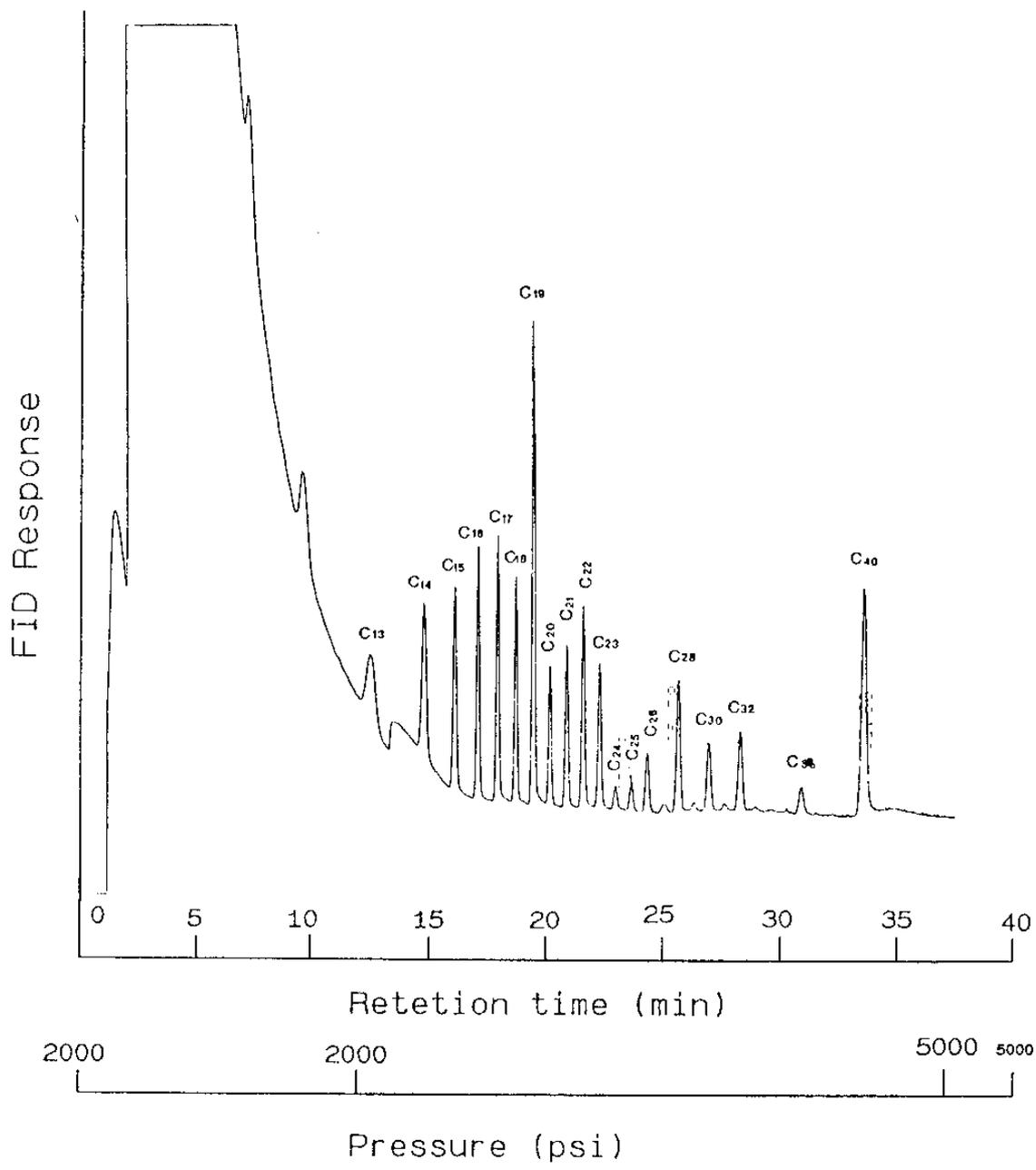


Fig. 20. SFC Chromatogram of a Mixture of n-Paraffins(C6-C40) on a C18 column. Conditions: Carbon Dioxide Mobile Phase at 90 °C, Linear Pressure Gradient was 2000 psi (hold for 12 min), a Pressure Ramp to 5000 psi in 25 min with FID.

peak의 tailing을 작게 하였다. 좁더 분리시간을 줄이고 전체적으로 고분리도를 얻기위해 압력 변화를 구간 별로 다르게 한 결과 Fig.21과 같은 크로마토그램을 얻었다. 분리조건은 앞의 경우와 같으며 2000 psi에서 3560 psi 까지 13분간 그리고 3560 psi 에서 5200 psi 까지 7분간 압력프로그래밍을 하여 뒷 부분의 압력 변화속도를 크게 하였다. 머무름시간의 재현성을 알아보기 위해 같은 조건에서 혼합 시료를 4회 주입하고 6가지 시료의 재현성을 알아 본 결과 머무름 시간의 RSD는 평균 2.7 % 로서 재현성이 컸다(Table 9). 32분의 짧은 분리시간으로 26종의 n-alkane standard mixture를 분리할 수 있었으며 용매 peak를 제외한 각 성분의 peak는 tailing이 없이 좋은 대칭성을 보였다. 반면 용매 peak의 tailing이 크므로, 빨리 용리되는 C12 이하의 휘발성이 큰 화합물의 분석이 어려운 단점이 있다. 그러나 SFC system은 GC로써 어려운 비휘발성 화합물의 분석에 유용한 방법이므로 용매의 tailing으로 인한 분석상의 문제는 실제 분석에서 큰 문제가 되지 않는다. 또한 SFE 방법을 SFC와 연결해 분석시스템을 구성하면 용매 peak의 영향이 없게 되므로 휘발성이 낮은 시료의 동시분석도 가능하다.

압력프로그램시 압력이 높아짐에 따라 baseline의 signal이 약간 drift 되는 것이 관찰되었다. 이는 압력이 높아지면 유속이 증가하여 CO₂ 속에 들어 있는 소량의 유기불순물에 의해 signal 값이 증가하는 것으로 생각된다. 그러나 큰 noise나, drift를 일으키지 않으므로 분석에는 영향을 주지 않았다. 이와같이 본 실험에서 일차 제작된 SFC 시스템의 분리효율이 큰 것은 확인되었으며 앞으로 보다 고분리능을 갖는 capillary SFC 시스템과 on-line SFE/SFC 분석시스템의 제작과 비휘발성 유기물을 신속하게 고분해능으로서 분석할 수 있는 다차원 크로마토그래피 시스템의 개발에 이 연구결과가 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

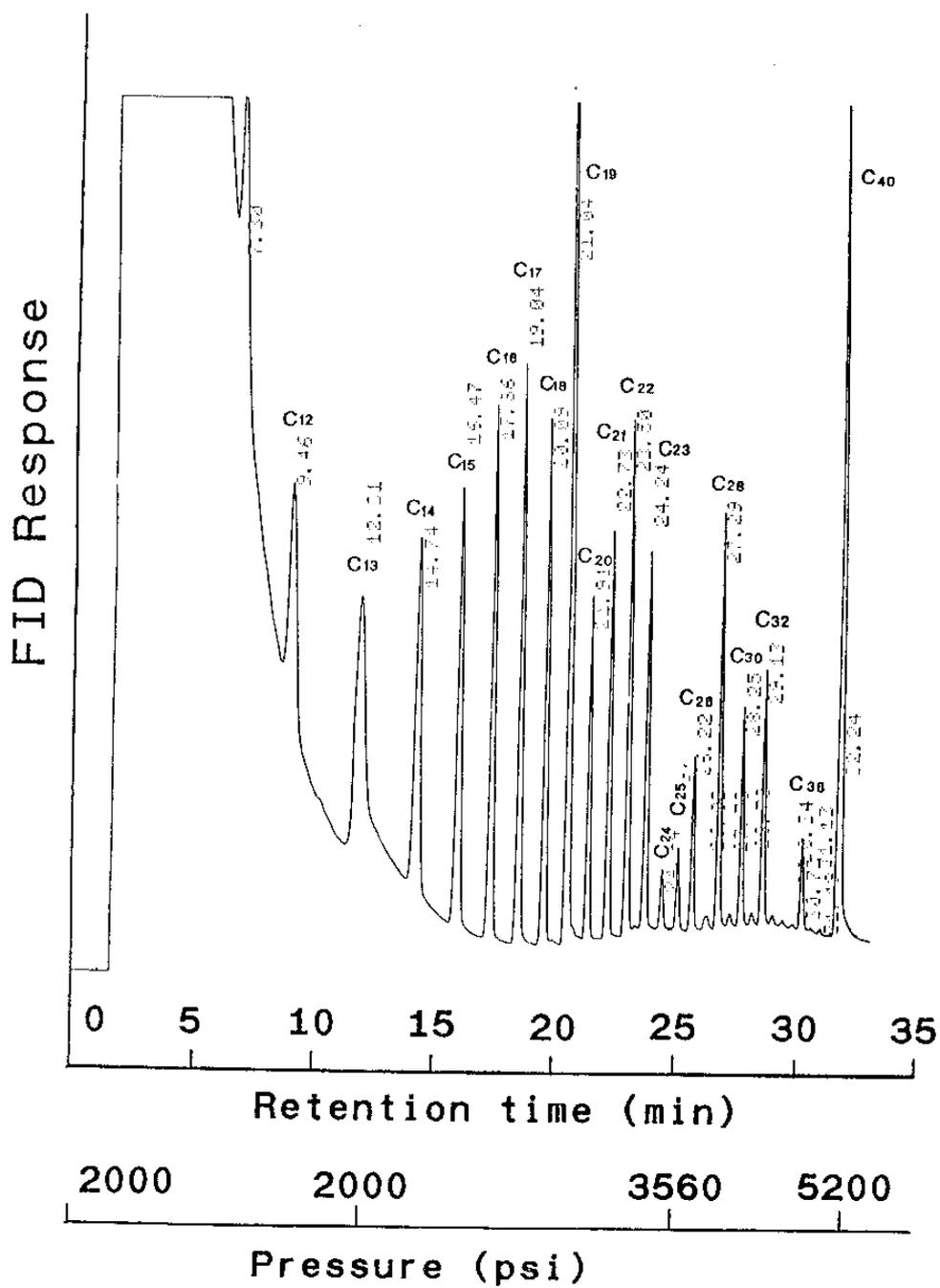


Fig. 21. SFC Chromatogram of a Mixture of n-Paraffins(C6-C40) on a C18 column. Conditions: Carbon Dioxide Mobile Phase at 90 °C, Linear Pressure Gradient was 2000 psi (hold for 12 min), a Pressure Ramp to 3560 psi in 13 min ,then to 5200 psi in 7 min, with FID.

Table 9. Reproducibility of the Retention Time.

Sample	Carbon number	Reproducibility (RSD, %)
Dodecane	12	5.34
Hexadecane	16	2.63
Docosane	22	2.50
Octacosane	28	2.59
Octatriacontane	38	0.87
Tetracontane	40	2.49

제 3 장 결 론

SFC는 GC와 HPLC가 가지고있는 단점을 보완할 수 있는 제 3의 chromatography 분석법으로서 종래의 HPLC나 GC법으로 분석이 어렵거나 효율적으로 분석이 되지 않던 시료에 이용성이 크다. 최근에와서 SFC가 본격적으로 개발되어 사용되기 시작하고 있으므로 기존의 chromatography법에 비해 보완 개선할 점이 많이 남아있다. 본 연구에서는 비휘발성 유기물에 대한 분리능이 우수한 초임계 유체 크로마토그래피법을 개발하기 위해 GC를 이용하여 SFC 분석 시스템을 구성하고 초임계 유체의 압력 변화에 따른 분리 성능을 microbore 분리관에 대해 26 종의 n-alkane 시료를 이용하여 측정하였으며, 그 결과 짧은 분리 시간과 높은 분리능으로 분리가 가능하였다. 또한 이들 시료들에 대한 이상적인 restrictor 를 고안하기 위해 linear capillary restrictor의 내경 및 길이 변화에 따른 이동상의 유속을 측정하여 최적 규격을 결정하였다. 또한 고체 기질 속에 포함된 고분자량의 비휘발성 물질이나 열에 불안정한 유기물을 분석하는데 유용한 SFE/SFC 장치를 제작하였다. 제작이 완성되어 온도조절 성능을 보완중인 SFC oven과, 설계가 끝나 제작중인 FID 검출기가 완성 되어 SFC 분석 장치 및 다차원 분석 장치를 자체 개발하게 되면 휘발성이 작은 유기물을 고분해능으로 분리 분석할 수 있는 SFC 분석장치개발에 대한 선진국과의 기술적 차이를 없앨 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. C.T. Lira, "Supercritical Fluid Extration and Chromatography", Edited by B.A. Charpentier, M.R. Sevenants, American Chemical Society, pp.1 (1988).
2. K.D. Bartle, "Supercritical Fluid Chromatography", Edited by R.M. Smith, Royal Society of chemistry, pp.1 (1988).
3. C.M. White and R.K. Houck, HRC CC, J. of High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 9, 4-17 (1986).
4. M.L. Lee and K.E. Markides, Science, 235, 1342-1347 (1987).
5. J.C. Fjeldsted and M.L. Lee, Anal. Chem., 56, 619A-627A (1984).
6. D. Leyendecker, et. al., J. of Liq. Chromatogr., 10, 1917-1947 (1987).
7. T.H. Gouw and R.E. Jentoft, J. Chromatogr., 68, 303-323 (1972).
8. T.L. Chester, J. of Chromatogr. Sci., 24, 226-229 (1986).
9. D.W. Later, et. al., J. of Chromatogr. Sci., 24, 249-253 (1986).
10. H.E. Schwartz, LC.GC, 5,14-22(1987).
11. H.E. Schwarz and R.G. Brownlee, J. Chromatogr., 353, 77 (1986).
12. T.A. Norris and M.G. Rawdon, Anal. Chem., 56, 1767 (1984).
13. R.G. Christensen, HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 8, 824 (1985).
14. R.M. Campell and M.L. Lee, Anal. Chem., 58, 2247 (1986).
15. M. Novotny, et. al., J. Chromatogr., 61, 17 (1971).
16. D.R. Gere, et. al., Anal. Chem., 54, 736 (1982).
17. B.W. Wright and R.D. Smith, J. Chromatogr., 355, 367 (1986).
18. R.D. Smith, et. al., Anal. Chem., 58, 2057-2064 (1986).
19. E.J. Guthrie and H.E. Schwartz, J. of Chromatogr. Sci., 24, 236-241 (1986).

20. T. Greibrokk, et. al., J. of Chromatogr., 394, 429-441 (1987).
21. C.K. Huston, Jr. and R.A. Bernhard, J. of Chromatogr. Sci., 27, 231-234 (1989).
22. W.E. May and S.A. Wise, Anal. Chem., 56, 225-232 (1984).
23. I.L. Davies, et. al., Anal. Chem., 60, 204-209 (1988).
24. K. Grob, Jr. and G. Karrer, J. Chromatogr., 334, 129-155 (1985).
25. J.M. Levy, et. al., J. of Chromatogr. Sci., 27, 341-346 (1989).
26. B.W. Wright, et. al., Anal. Chem., 59, 38 (1987).
27. S.B. Hawthorne and D.J. Miller, J. Chromatogr. Sci., 24, 258 (1986).
28. I.L. Davies, et. al., Anal. Chem., 60, 683A (1988).
29. S.B. Hawthorne, et. al., J. of Chromatogr, Sci., 27, 347-354 (1989).
30. K.S. Pitzer, J. Am. Chem. Soc., 77, 3427 (1955).
31. K.S. Pitzer, et. al., J. Am. Chem. Soc., 77, 3433 (1955).
32. N.L. Porter, et. al., HRC CC, J. of High Resolut. Chromatogr. Cromatogr. Commun., 10, 477-478 (1987).
33. R.D. Smith, et al., Mass Spectrometry Rev., 6, 445-496 (1987).

86. 1.

BIBLIOGRAPHIC DATA SHEET		1. 관라번호	2. 수행부서 유기분석연구실	3. 발행일 1990. 5.
4. 제목/부제 초임계 크로마토그래피에 의한 다차원분석시스템 개발 (1차년도)			7. 주제분야 0704	
5. 저자(공저자) 허귀석, 김달호, 이공주, 서정기		8. 수행기관 보고서번호 KSRI-90-49-IR		
6. 수행기관(KSRI 이외의 공동 혹은 위탁연구기관) 한국표준연구소		9. 계약번호		
		10. 자료내역		
11. 위탁기관 과학기술처				
12. 보증사항				
13. 초록(주요 참고문헌이나 관련문헌이 있을 경우 여기에 명시한다) 비휘발성 유기물을 고분해능으로 그리고 고감도로서 분석할 수 있는 초임계 크로마토그래피를 이용한 다차원 분석시스템의 개발을 위한 연구를 수행하였다. 초임계 크로마토그래프 시스템을 제작하였으며, 제작된 SFC 시스템에 대한 주사형 펌프, restrictor, oven 의 성능을 평가하였다. 전체적인 시스템의 성능을 평가하기 위해 n-alkane 혼합성분을 시료로하여 머무름 시간의 재현성, 분석시간, peak tailing, noise 등에 대한 실험을 수행하였다. 이상적인 restrictor 를 고안하기 위하여 이의 내경 및 길이 변화에 따른 이동상의 유속을 측정하여 최적조건을 결정하였으며, 고체 가질속에 포함된 고분자량의 유기물을 분석하기 위한 초임계 추출장치를 제작하였다.				
14. 키워드(6~12개) 초임계 크로마토그래피, 다차원 분석시스템, 비휘발성 유기물, 성능평가, 초임계 추출장치, restrictor.				
15. 예포구분 01		16. 해제기간		17. 면수 74
				18. 가격

'86. 1.

BIBLIOGRAPHIC DATA SHEET		1. REPORT NO.	2. PERFORMING LAB. Org. Anal. Lab.	3. REPORT DATE 1990. 5.
4. TITLE/SUBTITLE Development of Multidimensional Analytical System by Supercritical Fluid Chromatography (I)				7. SUBJECT CATEGORY 0704
5. AUTHOR(S) G.S. Heo, D.H. Kim, K.J. Lee, J.K. Suh			8. PERFORMING ORGANIZATION REPORT NO. KSRI-90-49-IR	
6. PERFORMING ORGANIZATION NAME Korea Standards Research Institute			9. CONTRACT OR GRANT NO.	
			10. TYPE OF REPORT	
11. SPONSORING ORGANIZATION MOST				
12. SUPPLEMENTARY NOTES				
13. ABSTRACT Supercritical chromatography system which can be used as multidimensional analytical system for analysis of non-volatile organic compounds with high resolution and high sensitivity was designed and assembled, and tested for its performance. Syringe type SF pump, restrictor, and oven were tested. n-Alkane mixture was used as test sample for the performance, and reproducibility of retention time, analysis time, peak tailing, and noise of the analysis were evaluated. A optimum condition for restrictor was determined by varying the internal diameter and length of the restrictor.				
14. KEYWORDS supercritical fluid chromatography, multidimensional analytical system, nonvolatile organic compound, supercritical fluid extractor, restrictor.				
15. CLASSIFICATION 01		16. SCHEDULE OF DECLASSIFICATION		17. NO. OF PAGES 74
				18. PRICE

KOREA STANDARDS RESEARCH INSTITUTE

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학 기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외 적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.