

초임계 유체를 이동상으로 사용함으로써 기체 크로마토그래피로 분리하기 힘든 비휘발성 화합물들의 분리

표동진[†] · 김훈주^{*}

강원대학교 자연과학대학 화학과

^{*}럭키중앙연구소 분석센터

(1992. 3. 16 접수)

Separation of Non-Volatile Compounds Unsuitable for GC Using Supercritical Fluid as Mobile Phase

Tong Jin Pyo[†], Hoon Ju Kim^{*}

Department of Chemistry, Kang Weon National University, Chun Cheon 200-701, Korea

^{*}Chemical Analysis Center, Lucky Central Research Institute, Tae Jeon 305-606, Korea

(Received Mar. 16, 1992)

요 약. 본 연구에서는 이동상 성질이 GC와 HPLC와는 전혀 다른 초임계 유체 크로마토그래피(SFC)를 사용함으로써 종래의 크로마토그래피의 방법으로는 분석하기 힘든 물질을 분석하는 방법을 개발하였다. GC로는 분리하기 힘든 긴 고리를 가진 Hydrocarbons이나 Mink Oils, Soybean oils 등이 SFC로 잘 분리될 수 있었다. 그 이유는 SFC에서는 시료가 갖고 있는 낮은 기화성이나 열에 불안정한 점 등이 이동상을 초임계 상태의 이산화탄소를 사용함으로써 극복되어질 수 있었다.

이 연구에서는 한걸음 더 나아가 극성이 강한 지방산 및 농약류를 분석하는 방법을 개발함으로써 SFC의 가장 큰 약점인 극성이 있는 시료의 처리 문제를 극복하고자 시도하였다.

ABSTRACT. In this work, we developed supercritical fluid chromatographic methods for the samples which are difficult to analyze with conventional GC or HPLC. Long-chain Hydrocarbons, mink oils and soybean oils unsuitable for GC because of their low volatility or limited thermal stability were separated by SFC due to the high solvating properties of supercritical carbon dioxide fluids.

In our research, a new method for the analysis of polar fatty acids and pesticides was developed. This method should be used to overcome problems with polar samples in SFC.

Key Words : Supercritical fluids, Modifier

1. 서 론

이동상으로서 액체는 아니고 기체도 아닌 초임계 유체를 사용하는 크로마토그래피를 Supercritical Fluid

Chromatography(SFC)라 부른다. 초임계 유체는 몇 가지 특성을 나타내는데, 먼저 압력과 밀도와의 관계를 살펴보면 동일 온도에서 밀도는 직선적인 비례관계는 아니지만 압력에 비례함을 알 수 있다. 특히 임계점 근

처에서는 압력이 조금만 증가하여도 밀도는 급격히 증가한다.¹ 크로마토그래피에서 이동상으로 사용한 물질의 밀도가 증가하게 되면 일반적으로 이동상의 용매 강도가 증가하게 된다. 앞의 사실(압력증가→밀도증가→용매강도증가)로부터 GC에서 온도 programming을 하여 손쉽게 solute를 분리시키는 것처럼 SFC에서는 압력변화(=밀도변화)를 시키는 조작으로 간단하게 solute를 분리시킬 수 있다는 hint를 얻을 수 있다. LC에서는 용매 강도를 변화시키려면 eluent 자체의 종류나 조성을 바꾸어야 하므로 압력 변화(압력 programming)만으로 용매강도를 변화시킬 수 있는 SFC보다 조작이 더 복잡하다.

다음에 온도와 밀도와의 관계를 살펴보면 동일 압력에서 농도가 높아지면 밀도는 작아짐을 알 수 있다. 그러므로 온도 변화(온도 programming)가 초임계 유체의 용매 강도를 변화시킬 수 있는 인자(온도변화→밀도변화→용매강도변화)는 되나 압력변화에 비해 온도 변화는 정도가 작아 현재 많이 사용되고 있지 않다.

초임계 유체의 물리적 성질을 기체와 액체와 비교해보면 SFC가 GC, LC에 대해 원리적으로 다른 점을 쉽게 이해할 수 있다. 초임계 유체의 물리적 성질 가운데 먼저 밀도를 보면 초임계 유체는 액체와 거의 같다. 이는 이동상으로 밀도가 매우 작아 solvent 특성이 없는 기체를 이동상으로 사용하는 GC와는 달리 SFC에서는 이동상이 solvent 특성을 갖게 되어 GC로는 분리하기 힘든 분자량이 큰 물질, 열에 약한 물질을 SFC로 분리할 수 있는 요인이 된다. 다음으로 확산계수를 보면 기체에 비해서 값이 작지만 액체에 비해서는 훨씬 커서 LC에 비해 SFC는 분리시간이 짧고 이동상이 평형에 도달하는 시간이 빠르다. 점도는 액체에 비해 훨씬 작다. 이는 LC에서는 이동상이 점도가 커서 컬럼을 길게 연결하여 사용하기 힘들지만(압력이 컬럼에 많이 걸리므로) SFC에서는 긴 컬럼(=capillary column)도 사용할 수 있다는 것을 암시해 준다. 이러한 SFC 기술은 지난 5년간 급성장하면서 많은 사람의 관심을 끌어들였다. 이것은 이 기술의 적용분야가 학문적인 분석화학분야 뿐만 아니라 industrial 분야에서도 주목받았기 때문이다. 이런 대표적인 예로는 oil residus² 분석, pharmaceutical³ 물질의 분석, 그리고 열에 불안정한 Carbonate Pesticides⁴의 분석 등이 있다.

이번 연구에서는 유도체를 만든다거나 Oven의 온도

를 고온으로 유지시키지 않고서는 분석하기 어려운 물질들을 초임계 유체를 이동상으로 사용함으로써 Mild condition에서도 좋은 chromatograms을 얻을 수 있었다. Long-Chain Hydrocarbons, Mink oils, Soybean oils 등이 좋은 예이며, 더 나아가 극성이 있는 지방산이나 농약류의 분석에도 Mobile phase에 극성이 있는 Modifier⁵를 섞음으로써 분리가 가능했다.

2. 실험

실험에 사용한 초임계 유체 크로마토그래피는 CCS 5000과 Lee Scientific 600이며 column은 Deltabond Cs (100 × 1.0mm I.D., 250 × 1.0mm I.D., CCS), Nucleosil CN(100 × 1.0mm I.D., ALLTECH)과 Nucleosil OH (150 × 0.5mm I.D., ALLTECH) 등이다. 이동상으로는 고순도(SCOTT 회사 99.999%)의 초임계 유체 CO₂를 사용했으며, 이동상의 밀도와 압력을 변화시키기 위해 density programming과 pressure programming 기법을 사용했다. 검출기로는 주로 불꽃 이온화 검출기가 사용되었다. Restrictor로는 stainless integral restrictor와 frit restrictor가 사용되었다. 이 논문에서 사용된 Insecticide와 Fungicide의 화학명은 다음과 같다. ThioliX: 1, 4, 5, 6, 7, 7-Hexachloro-5-norbornene-2, 3-dimethanol sulfite, Kitazine : S-benzyl-o, o-diisopropyl phosphorothioate, Captan : N-(trichloromethylthio) cyclohex-4-ene-1, 2-dicarboximide, Hinosan: 0-Ethyl-S, S-diphenyl dithio phosphate, Parathion: 0,0-Diethyl-0-4-nitrophenylphosphorothioate, DDVP : 2, 2-Dichlorovinyl dimethylphosphate. 비교적 Polar한 Fatty Acids, Pesticides, Insecticides의 분석을 위해서는 Fig. 1과 같은 방법을 고안해서 사용하였다. Fig. 1을 보면 pump에서 나온 초임계 CO₂는 물로 포화된 μ -Porasil column을 통과하게 된다. 여기에 사용한 μ -Porasil column은 Waters사 제품의 normal phase용 HPLC column으로서 실험실에서 사용 후 폐기한 column인데 작용기는 -OH이다. 이 -OH group에 H₂O가 hydrogen bond로 결합되어 있다가 초임계 CO₂가 column을 통과하면 H₂O는 초임계 CO₂에 녹아 들어간다고 예상된다. 즉 nonpolar한 초임계 CO₂가 μ -Porasil column을 통과하면서 polar한 특성을 지니게 된다. 결과적으로 μ -Porasil을 통과한 초임계 CO₂는 새로운 polarity를 갖는 이동상으로 변화되

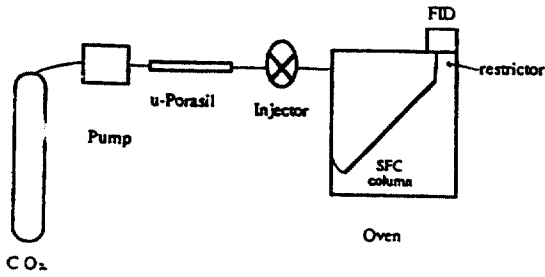


Fig. 1. Modifier를 섞는 기본기기 구성도

어 polar한 시료의 분석이 가능하게 된다.

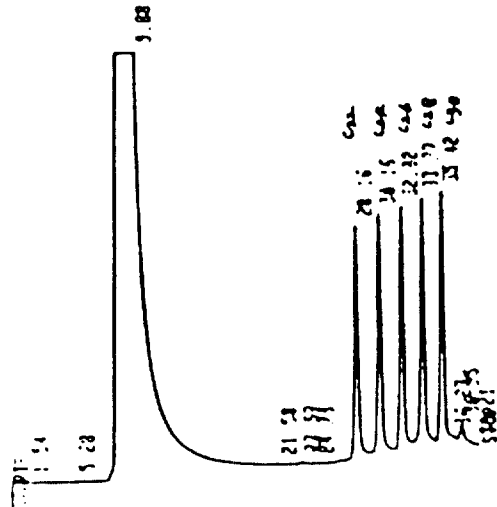
3. 결과 및 고찰

3.1. long-chain hydrocarbon 분석

Fig. 2의 아래쪽 Chromatogram은 C₁₂H₂₆, C₁₃H₂₈, C₁₄H₃₀과 C₁₆H₃₄을 SFC로 분리한 것이고 위쪽 chromatogram은 C₂₂H₄₆, C₂₄H₅₀, C₂₆H₅₄, C₂₈H₅₈, C₃₀H₆₂를 SFC로 분리한 것이다. Hydrocarbon은 GC로도 비교적 잘 분석되는 물질이나 chain이 긴 Hydrocarbon은 휘발성이 작아져서 약간의 문제점이 있다. 즉 사슬이 긴 hydrocarbon은 휘발성이 작아서 injector의 온도를 높게 하지 않으면 chain이 짧은 것에 비해 상대적으로 peak가 작게 나온다. 또한 근본적으로 chain이 길어지면 휘발성이 작아져서 GC로 분석하기가 힘들게 된다. SFC에서는 injector가 HPLC와 비슷하게 solvating power를 갖는 이동상이 injector내의 sample loop을 통과하여 column으로 들어가기 때문에 injector 안에서의 휘발성 문제가 없게 된다. Fig. 2의 위쪽 Chromatogram을 보면 hydrocarbon의 chain이 길어지더라도 peak의 크기가 작아지지 않는 것을 알 수 있게 된다.

3.2. Soybean oil과 Mink Oil의 분석

Fig. 3은 Soybean Oil을 derivatives를 만들지 않고 그대로 injection한 chromatogram이다. Soybean oil의 주 성분은 triglyceride로서 휘발성이 작아서 GC로 분석하기 매우 힘들다. 이를 초임계 유체를 이동상으로 사용하고 FID를 detector로 쓰면 Fig. 3에서 보는 것처럼 자연스럽게 분리가 된다. 이는 이동상인 초임계 CO₂가 갖는 Soybean oil에 대한 solvating power가 크기 때문



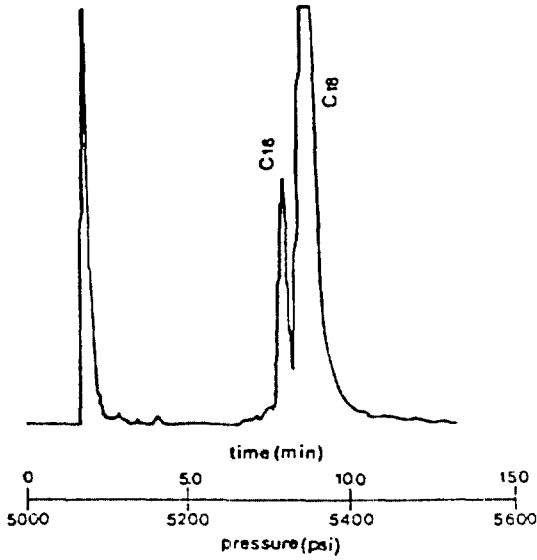


Fig. 3. Soybean Oil의 SFC Chromatogram
 Column : deltabond Cs (100×1.0 mm I.D.), Mobile phase : CO₂ Pressure programming : initial pressure : 5000 psi, pressure rate : 40 psi/min, final pressure : 5600 psi, Oven Temperature : 150 °C Isothermal, Restrictor : stainless integral restrictor, 10 ml/min at 1,500 psi, Detector : FID, Detector Temperature : 350 °C, Sample solvent : Hexane

4는 Milk oil을 SFC로 분리한 예이다. 여기서는 Pressure programming 대신에 density programming을 사용하였다.

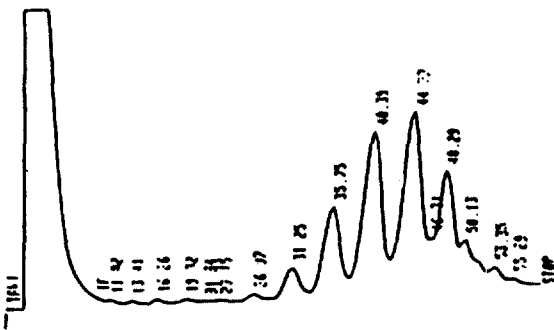


Fig. 4. Mink Oil의 SFC Chromatogram
 Density programming : initial density : 0.40 g/ml, initial time : 7 min, density rate : 0.002 g/ml per min

3.3. Insecticides, Fungicides, Fatty Acids의 분석

Insecticide, Fungicide, 그리고 fatty acid는 비교적 polar한 비휘발성 물질에 속한다. 이러한 화합물에 대해 SFC 실험을 할 때 항상 문제가 되는 것은 이동상의 Polarity이다. SFC의 이동상은 초임계 CO₂가 많이 사용되고 있는데, 초임계 CO₂는 polarity가 큰 solute를 elution시키기가 어렵다. 이러한 점을 해결하기 위해서 formic acid 같은 polar한 물질을 초임계 CO₂에 섞어서 이동상으로 사용하게 된다. 이러한 물질을 modifier라 하는데, 이러한 modifier를 사용한 초임계 CO₂를 사용하여 polar한 시료를 분석하는 방법들이 많이 개발되고 있는데, 이 방법들에는 약간의 문제점이 있다. 첫번째 문제점은 Modifier가 SFC 기기를 오염시킨다는 점이다. Modifier는 tubing, injector, 특히 pump에 깊숙히 침투해 있다가 다음 분석시 천천히 흘러나와 분석 평형에 도달하는 시간을 길게 할 뿐 아니라 pump 등을 쉽게 부식시킨다. 두번째는 실험실을 오염시킨다는 점이다. 이동상을 pump에 주입하는 과정에서 많은 양의 modifier(예를 들면 formic acid)가 기체상태로 실험실 내에 확산되어 지독한 냄새를 내게 된다. 냄새를 적게 내게 하기 위해서 system 전체를 hood 안으로 옮길 수 있으나 gas line 문제 등 현실적인 어려움이 많다. 이러한 점들을 해결하기 위해서 우리는 Fig. 1과 같은 새로

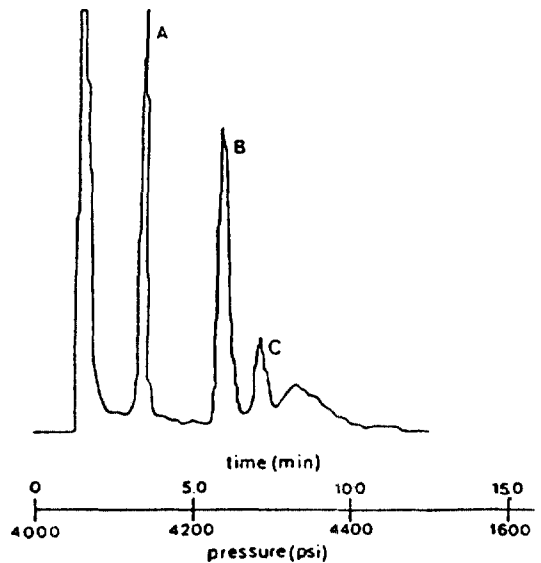


Fig. 5. Insecticide와 Fungicide의 SFC Chromatogram
 A : Thiolix, B : Kitazine, C : Captan

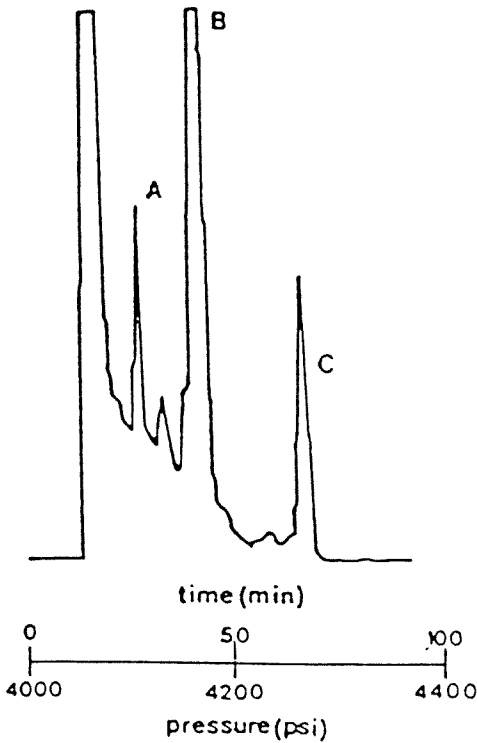


Fig. 6. Insecticide와 Fungicide의 SFC Chromatogram

A : Hinosan B : parathion, C : DDVP

Column : deltabond C₁₈ (250 × 1.0mm I.D.), Pressure programming : initial pressure : 1800 psi, initial time : 2 min, pressure rate : 70 psi/min, final pressure : 4500 psi, Oven Temperature : 70 °C Isothermal, Restrictor : stainless integral restrictor, 10 ml/min at 1,500 psi, Detector : FID, Detector Temperature : 300 °C

운 방법을 고안하게 되었다. Fig. 1의 방법은 위의 두 가지 문제점들을 해결해 주면서 polar한 modifier를 고압의 초임계 유체에 섞을 수 있는 방법이다. Pump를 사용해서 CO₂를 초임계 유체상태로 먼저 만들고 그 다음에 μ -Porasil column을 사용해서 H₂O가 섞이면서 H₂O도 압력을 받아 초임계 유체상태가 된다. Fig. 1의 장치틀을 사용해서 Fatty Acids를 derivatization하지 않고 그대로 injection해서 얻은 chromatogram이다.

위에서 설명한 초임계 CO₂에 극성용매인 H₂O를 혼합하여 SFC의 이동상으로 사용하는 Fig. 1의 방법의 첫번째 장점은 다른 방법과는 달리 pump에 modifier가 침투하여 있지 않음으로써 pump의 부식도 방지하고 다음 분석(pure CO₂만 사용하게 되는 분석)시 다른 방

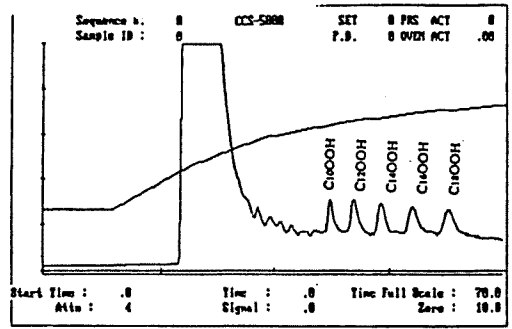


Fig. 7. Fatty acid의 SFC chromatogram

법에 비해 평형상태에 빨리 도달되어 분석시간을 단축하게 된다. 두번째는 현실적으로 분석비용이 절약된다. 현재 순수한 CO₂보다 formic acid가 premixed된 CO₂가 2배 이상 비싼데, 이 방법을 쓰면 순수한 초임계 CO₂로 극성 시료의 분석이 가능하다. 세번째는 실험실 환경을 오염시키지 않는다. 한편, 이 방법의 한 가지 문제점은 재현성이 떨어진다는 것이다. μ -porasil column에 물을 포화시킨 후 3~4번 위와 같은 방법으로 분석한 후에는 그 뒤 실험에서는 재현성이 현저히 떨어진다. 이것은 μ -Porasil column이 H₂O를 안정적으로 공급할 수 있는 능력이 한계가 있기 때문이다.

따라서 우리 실험실에서 H₂O를 일정하게 더 지속적으로 공급할 수 있는 device의 개발이 진행중이다. SFC 분리실험을 통해 얻은 결론 중의 하나는 SFC 기법의 주된 장점은 그것의 flexibility라는 점이다. Fluid를 사용하는 chromatographic separation에서 optimization은 주로 다양한 parameters를 사용함으로써 얻어지고 있다. Gas Chromatography(GC)를 사용하는 분석에서는 oven의 온도를 바꾼다거나 programming하는 것, 혹은 적합한 고정상을 선택함으로써 optimization을 시킬 수 있다. 한편으로 liquid chromatography(HPLC, GPC, TLC, IC)에서는 particles 형태로 column 안에 충전되어 있는 stationary phase의 선택 뿐만 아니라 eluent composition의 변화나 programming을 통해서 optimization을 이룩할 수 있다. 그러나 SFC에 들어오면 위에서 언급한 모든 parameters 등이 separation에 영향을 주게 된다. 즉 stationary phase의 선택(capillary column이든 packed column이든), mobile phase의 선택

또는 mobile phase의 programming, analysis temperature의 선택 등이다. 이외에도 용매 밀도의 변화나 압력의 변화 등은 SFC separation에서 매우 중요한 parameters가 된다. 이러한 다양한 parameters가 SFC를 이용한 analysis에 각각 영향을 미치기 때문에 이 기법은 다른 어떤 크로마토그래피 기법들보다 더 flexible하다고 볼 수 있다. 이러한 SFC의 장점을 이용하면 GC와 LC로서 해결하기 힘든 시료의 분석에 큰 도움을 받을 수 있다.

감사의 글

이 연구를 수행함에 있어 기기 사용을 허락해 주신 렉키중앙연구소, 관세청에 감사드리며 학술진흥재단,

과학재단에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. R.M. Smith, "Supercritical Fluid Chromatography", Royal Society of Chemistry, London, 1988
2. E. Lundanes and T. Grebrokk, *J. Chromatogr.*, **349**, 439 (1985).
3. B.E. Richter, *J. High Resolution Chromatogr.*, **8**, 297 (1985).
4. B.W. Wright, R.D. Smith, *J. of High Resolution Chromatogr.*, **8**, 8 (1985).
5. C.R. Yonker, S.L. Frye, D.R. Kalkwarf, R.D. Smith, *J. Phys. Chem.*, **90**, 3022(1986).