

Ibuprofen Racemate의 HPLC 분리실험과 FEMLAB 전산모사 연구

이 은 · ¹장 상 목 · ¹김 종 민 · ²김 우 식 · † 김 인 호
충남대학교 화학공학과, ¹동아대학교 화학공학과, ²경희대학교 화학공학과
(접수 : 2006. 5. 4., 게재승인 : 2006. 6. 20.)

Experimental and FEMLAB Simulation Study of Ibuprofen Racemate Separation in HPLC

Eun Lee, Sang Mork Chang¹, Jong Min Kim¹, Woo Shick Kim², and In Ho Kim†
Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea
¹Department of Chemical Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea
²Department of Chemical Engineering, Kyunghee University, Yongin 446-701, Korea
(Received : 2006. 5. 4., Accepted : 2006. 6. 20.)

FEMLAB is a powerful interactive environment for modeling, solving all kinds of scientific and engineering problems based on partial differential equations (PDEs). Separation process of chiral compound in HPLC columns was simulated by FEMLAB. To study change of elution profile with isotherm models, non-competitive and competitive Langmuir adsorption isotherm were adopted. Separated material was (R, S)-ibuprofen [(R, S)-2-(4-isobutyl phenyl) propionic acid], an anti-inflammatory agent, which retain the pharmacological activity in the (S)-(+)-enantiomer. Sample concentrations were changed from 0.5 mg/ml to 2.0 mg/ml at a flow rate of 1 ml/min and flow rate varied from 1 ml/min to 3 ml/min at an ibuprofen concentration of 2.0 mg/ml and 20 µl of injection volume. Simulated results were well fitted with experimental data.

Key Words : FEMLAB, Ibuprofen, HPLC, langmuir isotherm

서 론

화학공학에서 전산모사는 실험과 이론의 결합을 통해 새로운 공정에 대한 이해와 개발 비용을 감소, 분석조건과 조업조건을 최적화 등에 사용된다. 현재 사용되고 있는 전산모사 프로그램으로 ASPEN, MACSYMA, BIO-PRO DESIGNER 등이 있다. 이러한 전산모사 프로그램 중 FEMLAB (Finite Element Modeling Laboratory)은 선형 및 비선형 편미분 연립방정식 (PDE, Partial Differential Equations)으로 구성되어있는 이 공학 분야의 물리적인 현상을 MATLAB을 기반으로 해석하는 수치해석 소프트웨어이다.

크로마토그래피는 혼합된 시료 성분이 이동상과 고정상 사이를 흐르면서 흡착작용, 분배작용, 이온 교환 작용 또는 배제작용 등에 의해 각 성분으로 분리하는 공정으로 정성 및 정량 분석과 분취 목적에 이용된다. 고성능액체크

로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)는 액체크로마토그래피보다 더 작은 입자를 사용하여 높은 압력을 가하여 고속으로 분리하는 분석도구이다. 컬럼에서의 시료의 분리는 시료가 이동상에 녹아 컬럼안의 고정상으로 이동하며 이때 분배계수 (K)의 차이 때문에 이동상이 전개됨에 따라 분리가 일어나며, 크로마토그래피 시스템에서 분리된 시료 성분은 검출기에서 검출되어 농도와대 시간 그래프로 표현된다(1).

(R, S)-ibuprofen [(R, S)-2-(4-isobutyl phenyl) propionic acid]은 1969년에 개발되고 1984년에 FDA의 승인을 얻은 약품으로서 비스테로이드제로서 소염제나 관절염 치료제로 사용된다. 이 중 (S)-ibuprofen만이 약리학적으로 항염증 작용을 하고 (R)-ibuprofen은 약효가 없거나 독성을 가지고 있다고 알려져 있다. 따라서 HPLC로 (S)-ibuprofen을 분리하고자 많은 연구가 수행되었다(2).

본 연구에서는 FEMLAB 을 이용하여 HPLC의 전산모사 연구를 위해(3) R, S-form racemate ibuprofen의 성분 분리 실험과 전산모사를 수행하고 두 크로마토그램을 비교하였다. 전산모사를 위한 가정으로 크로마토그래피 공정은 등온상태이고, 공정에서 분산계수와 물질전달계수는 일정하며, ibuprofen racemate에서 R-form과 S-form의 성분비는 1 : 1이

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel : +82-42-821-7675, Fax : +82-42-822-8995
E-mail : ihkim@cnu.ac.kr

라 가정했다. 등온흡착식에 따른 용리도의 변화를 알아보기 위해 Langmuir 등온흡착식에서 경쟁적 등온흡착식과 비경쟁적 등온흡착식 각각 적용시켜 비교하였다.

재료 및 방법

수학적 모델

HPLC의 모델링은 미분형 물질 수지식을 바탕으로 평형-확산 모델을 적용하였다. 평형-확산 모델은 Giddings, van Deemter와 Haarhoff and Van der Linde이 발표하였다. 이는 속도론적 물질전달이 빠르지만 무한히 빠르지 않는 경우이다. 평형-확산 모델의 물질 수지식은 FEMLAB에서 다음과 같다(4, 5).

$$D_{eff} \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} - v_1 \cdot \frac{\partial c_i}{\partial x} = (1 + \phi \cdot \frac{dn}{dc}) \cdot \frac{\partial c_i}{\partial t} \quad (1)$$

여기서,

$\phi = S \frac{\rho(1-\epsilon)}{\epsilon}$: The phase ratio of the column (m³/m³)

$v_1 = \frac{v}{\epsilon A}$: The linear velocity of the mobile phase in the column (m/s)

C_i = concentration of component i in the mobile phase (mol/m³)

n_i = equilibrium concentration of component i in the stationary phase (mol/m³)

v = mobile phase flow (m³/s)

D_{eff} = apparent dispersion coefficient (m²/s)

S 는 고정상 입자의 비표면적 (m²/kg)이고, ρ 는 입자의 밀도 (kg/m³), ϵ 은 컬럼의 공극률, A 는 컬럼의 단면적 (m²), n_i 는 고정상에 흡착된 성분 i 의 농도 (mol/m³)이다. D_{eff} 는 다음과 같다.

$$D_{eff} = \frac{HL}{2t_0} = \frac{Hv_l}{2} = \frac{Lv_l}{2N} \quad (2)$$

여기서,

H = column height equivalent to a theoretical plate (HETP)

t_0 = holdup time of the column ($t_0 = L/v_l$)

L = end of the column of length

v_l = local average mobile phase velocity

N = number of theoretical plate

두 성분의 초기조건과 경계조건은 다음과 같다. 초기조건

$$c_i(x, t=0) = 0 \quad \text{for } 0 \leq x \leq L \quad (3)$$

경계조건

$$c_b(x) = c_b e^{-a(x-0.01)^2} \quad (4)$$

여기서 a 는 $1 \cdot 10^5/m^2$ 이고, 시간 $t = 0$ 에서 starting point는 $x = 0.01$ m이다.

컬럼 안에서 이동상과 고정상의 관계를 나타내는 흡착 평형식으로 Langmuir 흡착등온 모델 중 비경쟁적 등온흡착식과 경쟁적 등온흡착식을 사용하였다(6, 7). 본 전산모사에서는 Langmuir 등온흡착식 각 성분에 대한 미분 형태로 적용되어지며 다음과 같다.

비경쟁적 등온흡착식

$$n_i = \frac{n_{oi} K_i C_i}{1 + K_i C_i} \quad (5)$$

경쟁적 등온흡착식

$$n_i = \frac{n_{oi} K_i C_i}{1 + \sum_j^n K_j C_j} \quad (6)$$

여기서,

K_i = ratio of adsorption coefficient and desorption coefficient (k_a/k_b)

n_{oi} = column saturation capacity

Langmuir 등온흡착식의 매개변수 중 $n_{oi}K_i$ 값은 체류인자와 상률과 Eq. (8)을 사용하여 H_i 로부터 계산할 수 있다. 시료의 농도가 충분히 낮아 두 성분 상호간에 비경쟁적인 선형 등온흡착식의 거동을 따르는 경우 고정상에 흡착된 시료의 양은 다음과 같다(6).

$$C_{Si} = H_i \cdot C_{Mi} \quad (7)$$

그리고, t_R 과 H 와의 관계는 Eq. (8)와 같이 정의된다(8).

$$t_R = t_0 \cdot (1 + \frac{(1-\epsilon)}{\epsilon} \cdot H_i) \quad (8)$$

여기에서 H 는 Henry 상수로서 고정상과 용리액 간의 평형상수이다. t_R 과 t_0 는 실험에 의해 구할 수 있으며, Eq. (8)에 의해서 H 를 구하여 Eq. (7)에 대입하여 고정상에 흡착된 농도 (C_s)를 구할 수 있다. K_i 는 회귀분석에 의해 구할 수 있다.

전산모사

(R, S)-ibuprofen의 성분 분리를 하기 위해 FEMLAB의 Chemical Engineering Module에서 convection and diffusion module을 사용하여 1D의 전산모사를 수행하였다. 전산모사는 Fig. 1과 같은 절차에 의해 수행하였으며, 전산모사에 필요한 데이터는 Table 1에 주어졌다. 전산모사의 변수변화는 실험조건의 변화에 따랐으며, ibuprofen의 농도를 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml로 유속을 1, 2, 3 ml/min로 변화시켰으며 FEMLAB에 사용되는 단위로 단위환산을 하였다. Fig. 2는 전산모사에 필요한 특정 계수, 변수, 함수를 시스템에 적용시키기 위한 주요 메뉴로서 Table 1의 초기값과 특성치

등의 상수값을 Constants dialog box에 입력하고, 시스템 전체에서 유효한 변수의 수식을 입력하는 Scalar Expression에 성분에 대한 Langmuir 등온흡착식을 적용시켰으며, 시스템의 경계면에서의 성분의 조건과 농도, 물질수지식에 대한 계수와 함수를 Boundary Condition과 Subdomain Condition에 정의하였다.

Table 1. Data for FEMLAB simulation

NAME	VALUE	UNIT
Column		
Size	4.6 × 250	mm
packing material	5	μm
ϕ	0.53	
S (specific surface area)	340	m ² /g
ϕ (column phase ratio)	2.02 × 10 ⁸	m ² /m ³
v	1.667 · 10 ⁻⁸ (1)	m ³ /s (ml / min)
	3.333 · 10 ⁻⁸ (2)	
	5.000 · 10 ⁻⁸ (3)	
D _{eff}	7.87 · 10 ⁻⁷	m ² /s
D _{eff2}	7.87 · 10 ⁻⁷	m ² /s
c ₀₁	1.21 (0.25)	mol/m ³ (mg/ml)
	2.42 (0.5)	
	4.85 (1.0)	
c ₀₂	1.21 (0.25)	mol/m ³ (mg/ml)
	2.42 (0.5)	
	4.85 (1.0)	
K ₁	8.05 · 10 ⁻³	m ³ /mol
K ₂	1.39 · 10 ⁻²	m ³ /mol
n ₀₁	7.35 · 10 ⁻⁷	mol/m ²
n ₀₂	7.06 · 10 ⁻⁷	mol/m ²

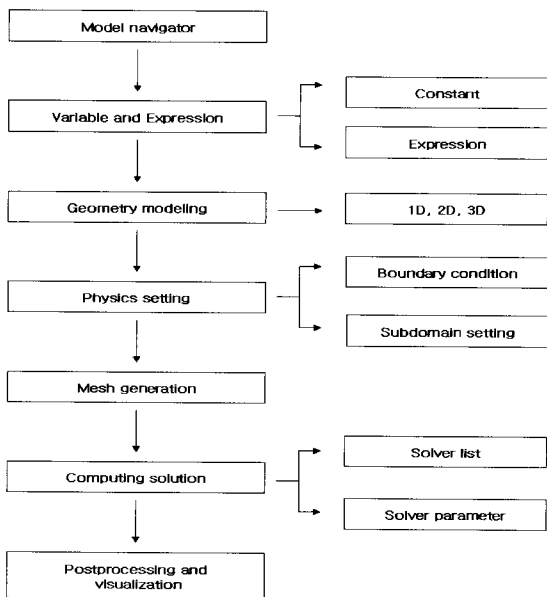


Figure 1. Flow diagram of simulation in FEMLAB.

재료 및 기기

분리대상 물질인 ibuprofen은 Sigma Aldrich사의 제품을 별도의 정제과정없이 이동상과 동일한 용매에 용해시킨 후 멤브레인 필터 (0.22 μm GVPP, Millipore, USA)를 통한

여과 과정을 거친 후 사용하였다. 이동상 용매는 hexane (95% n-hexane, J. T. Baker, USA), tert-butyl methyl ether (t-BME, J. T. Baker, USA), acetic acid (Assay min. 99.7%, Junsei Chem., Japan)를 사용하였으며, hexane, tert-butyl methyl ether는 멤브레인 필터 (0.22 μm GVPP, Millipore, USA)를 통한 여과 과정을 거친 후 sonicator (Brason, USA)로 20분간 탈기 한 후 사용하였다.

실험장치는 용매 이송 펌프 (6000A Solvent delivery system, Waters, USA)와 검출기 (Model M720, Younglin, Korea)를 사용하였다. 칼럼은 Kromasil KR100-5CHI-TBB (4.6 mm × 250 mm, particle size = 5 μm, Eka Chemical, Sweden)를 구입하여 사용하였다. 데이터 수집 시스템으로 Clarity (DataApex. ver. 2.1.0.15, Czech)를 사용하였다.

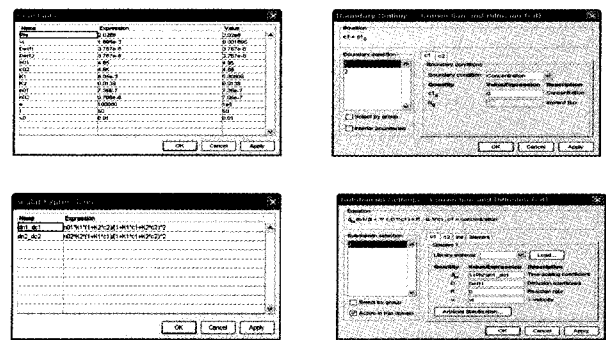


Figure 2. Graphic user interface for simulation of (R, S)- ibuprofen separation.

실험방법

이동상은 hexane / t-BME (45/55 v/v%)로 사용하였으며, pH 조절을 위해 acetic acid 1 v/v%를 첨가하여 사용하였다. 시료의 주입은 100 μl 주사기를 사용하였고, 샘플 루프는 20 μl를 사용하였다. 검출기의 파장은 220 nm이고 상온에서 실험하였다.

Ibuprofen을 Kromasil KR100-5CHI-TBB column을 이용하여 분리한 후 분리된 두 enantiomer들의 등온흡착식을 구하기 위해 Pulse input method를 사용하였다(1, 8). 이동상 hexane / t-BME의 조성이 45 / 55에서 1 v/v%의 acetic acid를 첨가하고, ibuprofen을 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 3, 5, 9, 10 mg/ml의 농도로 주입하였다.

결과 및 고찰

흡착평형식은 평형상태에서 고정상에 포함되어 있는 물질의 양과 이동상에 포함되어 있는 양 간의 관계를 나타내는 식으로서 본 연구에서 비경쟁적 Langmuir 등온흡착식과 경쟁적 Langmuir 등온흡착식을 사용하여 전산모사 하였다. 등온흡착식의 매개변수를 추산하기 위하여, HPLC를 이용한 (R, S)-ibuprofen 분리 실험에서 동일 이동상의 조건과 유속에서 10,000배 희석한 acetonitrile을 주입하여 2.213분의 dead time (t₀) 얻었고, 두 성분의 이론단수 (number of theoretical plates), 이론단높이 (HETP; Height Equivalent

to a Theoretical Plate)을 계산, Eq. (2)를 사용하여 측방향 확산계수 ($Deff$) $Deff_s = 3.783 \times 10^{-8}$, $Deff_R = 3.777 \times 10^{-8}$ 을 얻었다. PIM을 통해 농도가 0.1~0.3 mg/ml에서는 $t_{R,S} = 4.823$ 분, $t_{R,R} = 6.577$ 분으로 측정되어 t_R 에 변화가 없는 선형 조건임을 알 수 있었고, 농도가 증가할수록 t_R 이 감소함을 Fig. 3에 나타내었다. 각 농도에서 구한 t_R 과 Eq. (8)를 이용하여 $n_{0S}K_S = 1.324$ 과 $n_{0R}K_R = 2.241$ 을 얻었으며, Eq. (7)를 이용하여 고정상에 흡착된 농도를 구하여 Fig. 4에 비경쟁적 등온흡착곡선을 나타내었다. 회귀분석을 통하여 $K_S = 0.03923$, $K_R = 0.06751$ 을 추산하였다. 고정상에 대한 성분간 상호작용을 고려해야 하는 경쟁적 등온흡착식의 매개변수는 비경쟁적 등온흡착식에서 구한 매개변수를 적용하였다.

Fig. 5는 등온흡착식에 따른 용리도의 변화를 나타낸 것으로, 낮은 농도에서는 등온흡착식에 용리도의 변화가 적기 때문에 ibuprofen의 농도를 0.5 mg/ml (A)에서 4.0 mg/ml (B)로 증가시켜 용리도의 변화를 관찰하였다. Eq. (5), (6)에서 비경쟁적 등온흡착식에서 고정상에 흡착되는 양은 그 성분의 농도만의 함수이지만, 경쟁적 등온흡착식에서 고정상에 흡착되는 양은 두 성분의 함수로 표현된다.

두 성분의 컬럼포화용량 (n_{0i}) $n_{0R} = 33.21$, $n_{0S} = 34.23$ 비슷하고, 분배계수 (K_i)값은 $K_R = 0.06751$, $K_S = 0.03923$ 로 R-form이 1.7배 크기 때문에 경쟁적 등온흡착식을 적용했을 때 두 성분의 용리도는 비경쟁적 등온흡착식을 적용했을 때에 비해 면적이 작아지고, 농도가 높을수록 (B) 경쟁적 등온흡착식과 비경쟁적 등온흡착식에서 고정상에 흡착되는 농도 (n)의 차는 커진다. A의 용리도에서는 두 성분 모두 정규분포 형태를 띠고 있지만, B의 두 성분의 용리도는 꼬리 끌기 현상이 나타나 비대칭 형태를 띠고 있다. 이런 현상은 Fig. 3에서 농도가 0.1 ~ 0.3 mg/ml에서는 $t_{R,S} = 4.823$ 분, $t_{R,R} = 6.577$ 분으로 측정되어 t_R 에 변화가 없는 선형 흡착 조건이며, Fig. 4에서도 ibuprofen의 농도가 0.1 ~ 0.3 mg/ml 정도까지는 Langmuir 등온흡착식이 선형성을 나타냄과 부합된다.

Fig. 6은 컬럼 안에서 두 성분의 분리 과정을 전산모사한 것으로 시간 1, 90, 280초에서 각 성분들이 컬럼을 통과할 때의 고정상(A), 이동상(B)에서의 두 성분의 농도 분포를 보여준다. 1초에서 컬럼으로 두 성분이 주입되고 K_i 값이 1.7배 큰 R-form이 S-form보다 컬럼 앞쪽에서 흡착되고, 시간이 지남에 따라 두 성분의 K_i 차이로 점점 더 분

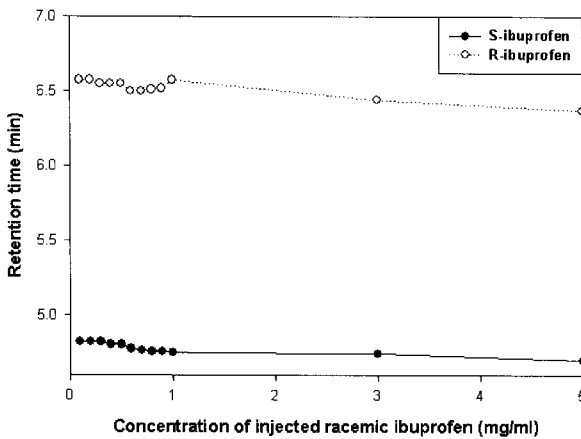


Figure 3. Retention times of ibuprofen enantiomers at different concentrations.

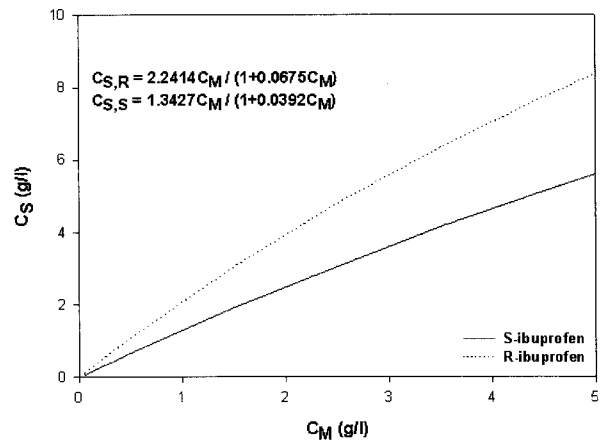
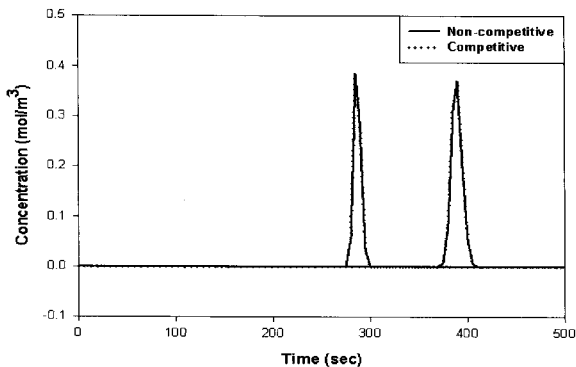
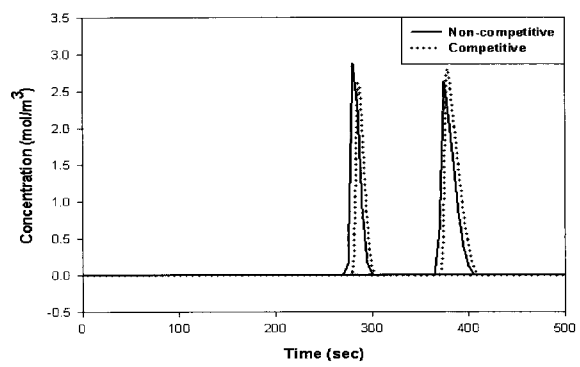


Figure 4. Adsorption isotherm of ibuprofen enantiomers.

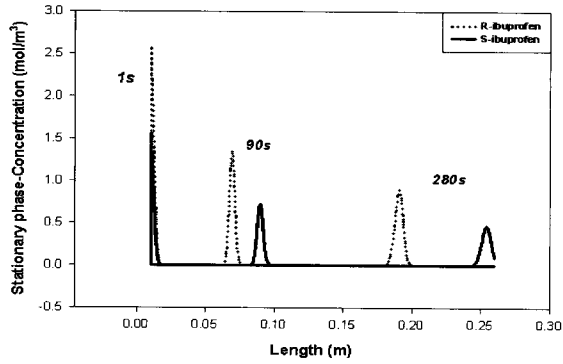


(A)

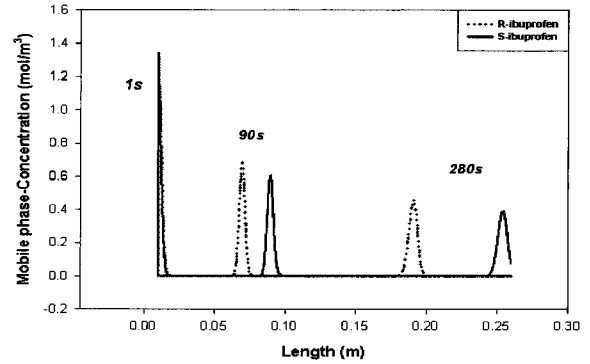


(B)

Figure 5. Comparison of simulated elution profiles of ibuprofen with non-competitive and competitive isotherms (A: sample concentration = 0.5 mg/ml, B: sample concentration = 4.0 mg/ml).

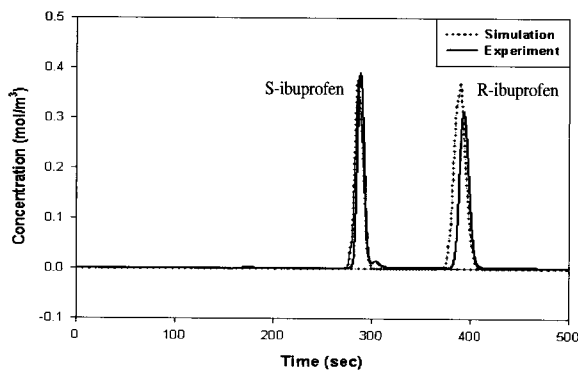


(A)

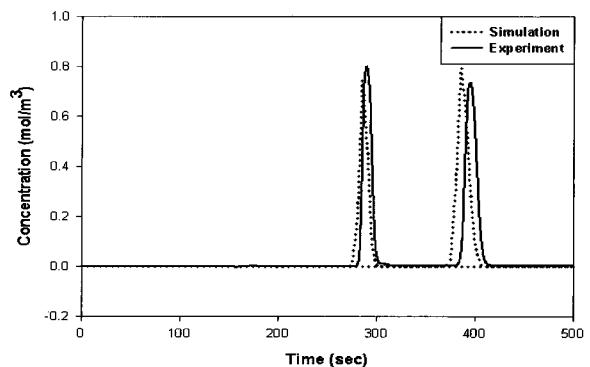


(B)

Figure 6. Simulated concentration profiles of R-ibuprofen and S-ibuprofen in the stationary phase (A) and mobile phase (B) during the migration through the column at times 1, 90, 280 s.



(A)



(B)

Figure 7. Comparison of experimental and calculated elution profile of ibuprofen (A; sample concentrations = 0.5 mg/ml, B: sample concentrations = 1.0 mg/ml at flow rate 1.0 ml/min).

리가 확실히 일어나는 것을 볼 수 있다. 270~280 초 사이에서 성분 S-form이 컬럼 밖으로 용출이 되어서 검출기에서 검출이 된다. 성분 R-form은 이 시간에도 컬럼의 고정상에 흡착되어 있다가 350초 이후에 컬럼 밖으로 용출되어 검출기에서 검출된다.

Fig. 7은 1 ml/min의 유속, hexane / t-BME = 45 / 55의 이동상의 조성에서 ibuprofen의 농도를 0.5 mg/ml (A), 1.0 mg/ml (B)로 변화시키면서 전산모사를 수행한 결과와 실험결과를 비교한 것이다. 유속과 이동상의 조성이 같고 시료의 농도가 증가하면 시료의 양이 많아지게 되고 용리피의 면적이 커지면 용리피의 폭도 커져서 HETP는 증가하게 된다. B의 경우 전산모사의 체류시간은 앞으로 당겨지고 용리피도 비정규분포 모양을 띠는 것을 볼 수 있다.

Fig. 8은 ibuprofen의 농도가 2.0 mg/ml, hexane / t-BME = 55 / 45의 이동상의 조성에서 유속을 1, 2 ml/min로 변화시키면서 전산모사를 수행한 결과와 실험결과를 비교한 것이다. 이동상의 유속변화는 시료의 체류시간을 변화시켜주는 중요한 조업변수이다. 이동상의 유속이 낮게 되면 시료의 체류시간이 늘어나게 되며 시료는 고정상의 표면과 세공 내에서의 유속에 의한 물질전달에 의하여 영향을 받게 된다. 이동상의 진행방향에 따라서 시료의 확산이 증가하게 되어서 용리피의 폭이 증가하게 된다. 유속이 빨라지면 이동상내의 시료가 고정상과 접촉할 시간이 줄고 체류시간도 짧아져 두 성분간 분

리도가 떨어지게 된다. 농도와 이동상의 조성이 같고 유속을 증가시켰을 때 실험결과와 전산모사결과는 체류시간이 감소하는 비슷한 경향을 보인다. 전산모사와 실험값의 차이는 Eq. (1)에서 고정상 내의 세공에서 유효확산과 속도론을 고려하지 않았고, 축 방향 확산계수 (D_{eff})를 구하기 위한 실험상의 이론단수와 이론단높이의 정확성이 떨어지기 때문이라 사료된다.

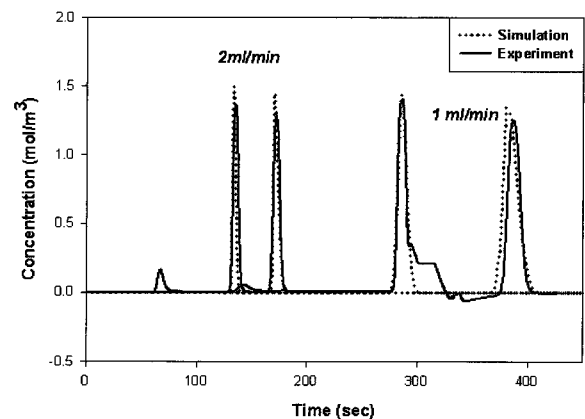


Figure 8. Comparison of experimental and calculated elution profile with flow rate from 1 ml/min to 2 ml/min (sample concentrations = 2.0 mg/ml).

요 약

전산모사 프로그램인 FEMLAB을 이용하여 chiral center를 가지고 있는 racemate인 ibuprofen의 R-form과 S-form의 분리 전산모사 결과와 Kromasil KR100-5CHI-TBB 칼럼을 사용하여 HPLC를 통한 실험데이터를 비교 분석하였다. Hexane / t-BME / acetic acid (45 : 55 : 1 v/v%)의 이동상의 조건에서 이론단수 (number of theoretical plates), 이론단 높이 (HETP; Height Equivalent to a Theoretical Plate)을 구하여 축방향 확산계수 (D_{eff})를 계산하였다. PIM (Pulsed Input Method)을 사용하여 분석한 결과 ibuprofen의 농도가 증가할수록 Langmuir 등온흡착식을 따르는 비선형 거동을 보였고, 각 농도에서의 체류시간 (t_R)과 phase ratio를 이용하여 비경쟁적 Langmuir 등온흡착식의 매개변수를 추산하였고, 이 매개변수를 이용하여 경쟁적 Langmuir 등온흡착식을 결정하였다. 실험을 통해 얻은 데이터를 FEMLAB 적용하여 등온흡착식의 변화에 따른 용리피의 변화와 두 성분이 컬럼을 이동하는 동안 두 성분간 분리 과정을 관찰하였다. Ibuprofen의 농도, 유속을 변화시키면서 실험결과와 전산모사결과를 비교한 결과 실험결과와 전산모사결과가 비슷한 경향성을 보였다. 이와 같이 FEMLAB 전산모사 프로그램의 실험적용 가능성을 확인하였고, 실험과 일치하는 전산모사데이터를 얻기 위해서 고정상내의 세공에서의 물질전달을 포함하는 물질수지식의 적용과 비선형 흡착평형식에 대한 좀 더 정확한 식이 요구된다.

감 사

본 연구는 과학재단 특정기초연구 (R01-2005-000-10245-0)의 지원을 받아 수행하였으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Guiochon, G., Golshan-Shirazi, A. M. and S. Katti (1994), Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, Academic Press, Boston.
2. Park, J. S., B. L. Kim, T. H. Yoon, and I. H. Kim (2005), Separation Characteristic of Ibuprofen in Kromasil HPLC Column, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**(3), 244-249.
3. Yu, H. W. and C. B. Ching, (2003), Calculation of Nonlinear Chromatographic Band Profiles using Computational Fluid Dynamics, *Chromatographia* **58**, 793-796.
4. Kasche, V. (1999), Simulation of Liquid Chromatography and Simulated Moving Bed (SMB) Systems, Technische Universität Hamburg-Harburg, Arbeitsbereich Biotechnologie II, Hamburg.
5. Kim, L. M., S. K. Han, D. K. Choi, and K. H. Row (2005), Nonlinear Adsorption Isotherm of Single and Multi-Components of 2'-Deoxyribonucleosides, *Kor. Chem. Eng. Res.* **43**(2), 230-235.
6. Choi, Y. J., S. K. Han, S. T. Chung, and K. H. Row (2004), Chromatographic Separation of Bupivacaine Racemate by Mathematical Model with Competitive Langmuir Isotherm, *Kor. J. Chem. Eng.* **21**(4), 829-835.
7. Francois J., M. Sepulveda, F. Charton, and I. Quinones (1999), Determine of binary competitive equilibrium isotherms from the individual chromatographic band profiles, *Chemical Engineering Science* **54**, 1677-1696.
8. Adachi, S., Panintrarux, C., and R. Matsuno (1997), Methods for Estimating the Parameters of Nonlinear Adsorption Isotherms of Langmuir and Freundlich Types from a Response Curve of Pulse Input of an Adsorbate, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**(10), 1626-1750.