

환경 오염물질의 정량법 개발과 거동에 관한 연구(Ⅱ) : 역상 액체 크로마토그래피에서 알킬페놀류의 분리 최적화

李大云[†] · 李善柱 · 朴英薰 · 金慶燮

연세대학교 화학과

(1993. 12. 27. 접수)

A Study on the Development of Analytical Methods and Behaviors of Environmental Pollutants(Ⅱ) : Optimization for Separation of Alkylphenols by Reversed- Phase Liquid Chromatography

Dae Woon Lee[†], Yong-Ju Lee, Young Hun Park, Ho Seob Kim

Department of Chemistry, Yonsei University, Seoul, 120-749 Korea

(Received Dec. 27, 1993)

요약 : 정지상과 이동상에 대하여 선택성의 차이가 크지 않은 알킬페놀류에 대해 2차 화학평형 이론을 적용하여 분리도에 미치는 pH 영향을 연구하였다. 이동상으로는 물-아세토니트릴을 사용하였으며, pH는 탄산나트륨-완충 용액으로 조절하였다. 인접한 봉우리간의 선택성을 최대로 하는 pH 값은 k'_{HA}/k'_{A^-} 와 평균 해리상수값(ΔpK)으로부터 구하였으며, 이 방법에 의해 결정된 최적 pH는 11.18이었다.

선택성의 효과를 최대로 얻기 위하여 pH와 용매의 선택성을 동시에 고려하였다. 결정된 최적의 pH 조건 하에서 메탄올, 아세토니트릴, 테트라하이드로퓨란, 물의 4성분 혼합 용매 시스템을 이용하였고, 통계적인 심플렉스 방법인 overlapping resolution maps(ORM)을 사용하여 최적 용매 조성을 결정하였다. 이 방법에 의하여 결정된 최적 용매 조성비는 MeOH : ACN : THF = 14.4 : 81.8 : 2.8이었다.

Abstract : As for analytes which did not represent the differences of the selectivity on the stationary and mobile phase, secondary chemical equilibrium theory was applied to study pH effects on the separation of alkylphenols. Mobile phase was consisted of an aqueous sodium carbonate-bicarbonate buffer and acetonitrile. The maximum selectivity for adjacent peak pairs was predicted from those values of k'_{HA}/k'_{A^-} and ΔpK . The optimum pH determined by this method was 11.18. pH and solvent selectivity were considered at the same time to invoke the full range of selectivity effects possible for separations. Quaternary mixture composed of methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran and water was adjusted to optimum pH 11.18. As the statistical simplex technique of an overlapping resolution map (ORM) was used to predict the optimized solvent system. The optimum solvent, which gives complete separation of alkylphenols, was determined as follows MeOH : ACN : THF = 14.4 : 81.8 : 2.8.

Key words : RPLC, Alkylphenols, Separation Optimization

1. 서 론

크로마토그래피에서 가장 중요한 문제 중의 하나는 최적의 분리 조건을 찾는 것으로써 특히 신속하고 정확한 분리를 위해서는 최적화(optimization) 과정이 필요하다. 화학 과정(chemical processes)의 수학적인 최적화는 빠르게 발전하는 분야로써 분석 과정에서 뿐만 아니라, 촉매 합성 등의 광범위한 영역에 응용되고 있다.¹

본 연구실에서는 페놀 유도체들을 치환기에 따라 세 그룹으로 나누고, 4성분 혼합용매 시스템을 이용하여 ORM(overlapping resolution maps)에 의해서 각 그룹에 따라 분리 최적화를 수행하여 최적 용매 조성을 결정한 바 있다.² 이때 클로로페놀류와 니트로페놀류는 바탕선 분리가 이루어진 반면, 메틸페놀류는 완전한 분리가 이루어지지 않았다.

메틸페놀류를 포함한 알킬 치환체에 관한 연구는 계속 진행되어 왔으며 Jinno³들은 알킬벤젠을 분리하기 위하여 VVW이나 소수성 인자(hydrophobic parameter)와 같은 물리상수와 용량 인자 사이의 상호 관련성을 조사하였고, Dimov⁴들은 알킬벤젠의 구조적 특성과 머무름 사이의 관계를 보고하였다. 알킬페놀 구조 이성질체를 분리하려는 노력이 기체 크로마토그래피법에 의하여 시도되어졌고^{5,6}, 이성질체의 분리에 효율적인 정상 액체 크로마토그래피법을 이용하여 오르토, 베타, 파라에틸페놀류는 분리하였으나, 크시레놀류의 경우는 완전한 분리에 어려움이 있었다.⁷

이처럼 정지상과 이동상 사이에 용질이 분포되는 1차 평형(primary equilibrium)에 의하여 선택성을 나타내지 않는 알킬페놀류와 같은 시료에 대하여 Foley^{8~10}들은 2차 화학 평형(secondary chemical equilibrium)의 일반적인 이론을 제시하였으며, pH가 분리 최적화에 있어서 중요한 인자임을 보고하였다. 이러한 이론으로부터 최적 용매 조성을 예상하는 공식을 유도하였고 이것을 산-염기 평형에 대하여 실험적으로 증명하였다. Lopes¹¹들은 역상 액체 크로마토그래피에서 분리 최적화를 위한 인자로써 유기 용매를 효과 뿐만 아니라 pH를 동시에 고려하는 것이 더 효율적이라고 보고하였으며, 분리의 최적 조건을 결정할 수 있는 용리 모델을 제시하였다. 또한 Schoenmakers¹²들은 역상 액체 크로마토그래피에서 용질의 머무름과 선택성에

대한 pH의 효과를 체계적으로 연구하여 보고하였다.

본 연구에서는 정지상과 이동상에 대하여 큰 선택성을 보이지 않는 알킬페놀류를 대상 시료로, 최적 분리 조건을 결정하기 위하여 2차 화학 평형 이론을 이용하여 최적의 pH 조건을 구하였으며, 이 조건하에서 ORM 방법을 이용하여 최적 용매 조성을 결정함으로써 pH와 용매의 선택성을 동시에 고려하였다. 또한 분리가 어려운 몇 가지 시료에 대하여 용매의 선택성을 조사하였다.

2. 실험

측정기기 및 실험방법: LC 시스템은 영인과학 제품의 Liquid Chromatograph 910형 Solvent Delivery Module이며 UV 검출기는 Spectromonitor III(LDC, Inc.)를, 시료 주입기는 Rheodyne 7125를 사용하였다. Data는 IMI사 제품인 Chromatograph-PC 소프트웨어를 이용하여 처리하였다. 시료 및 용매 거름 기구는 Millipore 제품을, pH 미터는 Horiba 제품의 F-8AT를 사용하였다. 시료 검출 파장은 280nm, 감도는 0.05 AUFS, 이동상의 유속은 1.0mL/min., pH는 유기 용매를 섞기 전의 완충 용액의 pH로 하였고¹¹, 컬럼의 온도는 30°C로 하였다.

한편, ORM 방법은 IBM PC에서 Mathecad (MCAD)와 Pascal 프로그램으로 계산하여 수행하였고, 등고 곡선은 Epson LQ-2500 Printer로 도시하였다.

시료: 사용한 17가지 알킬페놀류는 phenol(1), 2-methylphenol(2), 3-methylphenol(3), 4-methylphenol(4), 2, 3-dimethylphenol(5), 2, 4-dimethylphenol(6), 2, 5-dimethylphenol(7), 2, 6-dimethylphenol(8), 3, 4-dimethylphenol(9), 3, 5-dimethylphenol(10), 2-propylphenol(11), 4-propylphenol(12), 4-ethylphenol(13), 2, 3, 5-trimethylphenol(14), 2, 4, 6-trimethylphenol(15), 2, 3, 6-trimethylphenol(16), 3, 4, 5-trimethylphenol(17)로서, 메탄올에 녹여 조제하였다.

이동상 및 정지상: 이동상으로는 HPLC용 메탄올(J. T. Baker), 아세토니트릴(Mallinckrodt), 테트라

히드로퓨란(J. T. Baker)과 초순수 제조 장치(milli Q)로 정수한 물을 사용하였고, 탄산나트륨과 탄산수소 나트륨 두 용액의 분율로써 이동상의 pH를 변화시켰으며, 50mM의 염소산나트륨으로 이온 세기를 0.1로 고정하였다. 이동상은 부피 %로 유기 용매와 탄산나트륨 완충 용액을 혼합하여 조제하였다. 정지상으로는 Hamilton사의 PRP-1 컬럼($250 \times 4.1\text{mm I.D.}$)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

2차 화학 평형에 의한 pH 최적화: 역상 액체 크로마토그래피에서 17가지 알킬페놀류를 동시에 분리하기 위하여 SCE 이론을 적용하여 pH 조건을 결정하는 실험을 수행하였다. Foley들^{9~11}은 선택성을 가장 중요한 인자로 간주하고 이것을 최적화하기 위한 일반적인 접근법을 유도하였다.

SCE에서 페놀류는 컬럼 내에서 중성 상태(HA)와 해리된 상태(A^-)가 동시에 머무르나 그 머무름의 정도는 어느 정도 차이가 있으며¹³, 평형에 대한 용량 인자를 k'_{HA} 와 k'_{A^-} 의 합으로 나타낼 수 있다. 또, 이들을 수소이온 농도와 해리상수, K로 나타낸 다음, $k'(1+K/[H^+])$ vs. $(K/[H^+])$ 의 도시로부터 절편과 기울기를 구하여 한계 용량 인자(k'_{A^-} 와 k'_{HA})를 결정할 수 있다.

$$k'(1+K/[H^+]) = k'_{\text{HA}} + (K/[H^+])k'_{\text{A}^-} \quad (\text{i})$$

한 쌍의 시료에 대한 선택성, α 는 평형 인자 $[H^+]$ 의 함수이며 α 가 최대가 되는 최적의 수소 이온 농도, $[H^+]_{\text{OPT}}$ 는 $[H^+]$ 에 관하여 1차 미분함으로써 구할 수 있으며, 대상 시료들의 한계 용량 인자값은 거의 차이가 없다($k'_{\text{HA}(1)} \approx k'_{\text{HA}(2)}$, $k'_{\text{A}^-(1)} \approx k'_{\text{A}^-(2)}$)는 가정을 적용하여 최종적인 수소이온 농도의 최적화값을 구할 수 있다.

$$\text{pH}_{\text{OPT}} = \text{pK}_{\text{AVG}} + (1/2)\log(k'_{\text{HA}}/k'_{\text{A}^-}) \quad (\text{ii})$$

만약에 앞의 가정이 성립하지 않는다면, 2차 화학 평형을 억압하는 것으로 시료는 충분히 분리될 것이다.

(ii)식으로부터 얻은 최적 pH인 pH_{OPT} 는 해리상수의 평균값(pK_{AVG})에 의존할 뿐만 아니라, (i)식으로부터 얻은 한계 용량 인자값의 비($k'_{\text{HA}}, k'_{\text{A}^-}$)에도 영향 받음을 알 수 있다.

17가지 알킬페놀류의 해리상수(pK_a)값은 9.98에서 10.89 사이로서 용리가 지나치게 느린 시료들을 제외하고, 10가지 알킬페놀류에 관하여 2차 화학 평형의 최적화 이론을 적용시켰으며, 이때 이동상의 조성은 30% ACN으로 하였다. 이동상의 pH를 변화시키면서 10가지 시료에 대한 용량 인자를 측정하였고, 평형상수값과 이동상의 수소이온 농도, 시료의 용량 인자값

Table 1. Optimization of Mobile Phase pH for the Separation of Alkylphenols in 30% ACN

No	Alkylphenols ^a	pK _a	k' _{HA}	k' _{A⁻}	r ^b	pH _{OPT} ^c
1	Phenol	9.98	4.03	0.00	0.601	-
3	3-methylphenol	10.09	7.64	0.43	0.998	-
4	4-methylphenol	10.26	6.75	0.47	0.965	10.78
2	2-methylphenol	10.26	8.29	0.78	0.994	10.81
10	3, 5-dimethylphenol	10.15	12.16	0.97	0.968	10.82
9	3, 4-dimethylphenol	10.32	14.16	1.62	0.991	10.75
7	2, 5-dimethylphenol	10.40	18.11	2.68	0.994	10.63
5	2, 3-dimethylphenol	10.54	14.39	2.28	0.957	10.77
6	2, 4-dimethylphenol	10.59	14.26	3.11	0.959	10.91
8	2, 6-dimethylphenol	10.62	17.37	3.63	0.944	10.94

^a Alkylphenols are listed in order of elution

^b Correlation coefficient

^c $\text{pH}_{\text{AVG}} + (1/2)\log(k'_{\text{HA}}/k'_{\text{A}^-})_{\text{AVG}}$

을 (i)식에 대입하여 $k'(1+K / [H^+])$ vs. $(K / [H^+])$ 의 plot으로부터 절편값인 k'_{HA} 와 기울기값인 k'_A 를 측정하였다. 인접한 봉우리쌍의 최적 pH값은 (ii)식을 이용하여 구하였다. 이 결과를 Table 1에 정리하였으며 폐놀의 경우, 상관계수가 0.601로써 좋은 직선성을 나타내지 않아 폐놀과 메타 크레졸의 봉우리쌍은 제외시켰다. 이때, 시료의 용리순서는 pK_a 값에 따라 결정되며, 용리순서를 예측할 수 있었다. Table 1에서 알 수 있듯이 가장 분리가 어려운 시료인 (5)와 (6)의 최적 pH는 10.91이었고 (9)와 (10)의 최적 pH는 10.75였다.

또한 각 봉우리쌍들의 선택성 α 를 구하여 pH에 관하여 Fig. 1에 도시하였는데, 4가지의 가장 분리가 어려운 봉우리쌍들의 선택성이 가장 크게 나타난 pH는 11.18이었다. 따라서 pH 10.75, 10.91, 11.18의 세 점에

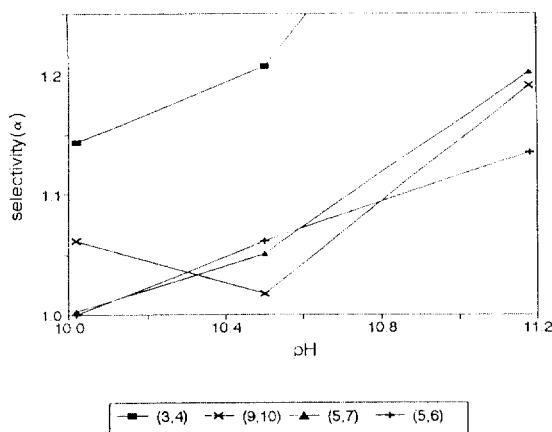


Fig. 1. Selectivity as a function of pH for the least separated peak pairs of alkylphenols in 30% ACN.

서 각 시료쌍들간의 용량 인자를 측정한 결과(Table 2), 이동상의 pH가 11.18인 경우에는 모든 봉우리쌍들의 선택성이 가장 커짐을 알 수 있었고, 이 조건하에서 Fig. 2의 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 이때 17가지 알킬페놀류 중 14가지를 분리할 수 있었으며, 분리가 어려웠던 (2)와 (3) 및 (6)과 (7) 시료들의 분리가 가능하였다.

Table 2. Selectivity(α) of Alkylphenols at Different pH of Eluent in 30% ACN.

No.	Alkylphenols ^a	pH		
		10.75	10.91	11.18
1	Phenol	2.85	3.13	3.94
3	3-methylphenol	1.24	1.30	1.39
4	4-methylphenol	1.35	1.39	1.42
2	2-methylphenol	1.42	1.45	1.42
10	3, 5-methylphenol	1.07	1.10	1.16
9	3, 4-methylphenol	1.53	1.52	1.57
7	2, 5-methylphenol	1.10	1.14	1.18
5	2, 3-methylphenol	1.05	1.06	1.08
6	2, 4-methylphenol	1.24	1.25	1.26
8	2, 6-methylphenol			

^a Alkylphenols are listed in order of elution

등용매 용리법에 의한 용매 최적화: 2차 화학평형 이론을 적용하여 최적의 pH를 결정함으로써 알킬페놀류의 분리도는 향상되었으나 17가지 알킬페놀류를 모두 분리할 수는 없었다. 따라서 pH와 용매의 선택성을 동시에 고려하기 위하여¹⁴, 이미 결정된 pH 11.18의 조건에서 용매 조성의 최적 조건을 결정하는 실험을 수행하였다. 통제적인 심플렉스 방법을 사용하기 위하여 선택성의 차이가 있는 메탄올, 아세토니트릴, 테트라하이드록산과, 기준 용매로 물을 사용하였다.¹⁵ k' 값이 적합하도록 혼합 용매 조성을 결정하여 ORM 방법을¹⁶ 사용하여 최적의 용매 조성을 결정하였다.

SCE-LC 이론을 적용시켰던 14가지 알킬페놀류의 시료를 ORM 방법에 적용시키기 위하여 가능한 봉우리쌍을 계산하면 $14C_2 = 91$ 가지의 봉우리쌍이 존재한다. 이 봉우리쌍들 중에서 분리도가 좋은 ($Rs \geq 1.5$) 봉우리쌍을 제외하여 모두 26개의 봉우리쌍으로 ORM 등고 곡선을 작성하여 Fig. 3에 나타내었다. 원하는 Rs 값을 0.27 이하로 하였을 때 비로서 영역을 나타내었고, 그 이상의 분리도에 대해서는 영역을 도시하지 않았다. 그러나 이 영역에서는 pH만을 고려하였을 때보다 분리도가 좋지 않았기 때문에, 가장 분리가 어려운 봉우리쌍인 (5)와 (6), (9)와 (10)의 봉우리쌍들을 제외하고 24개의 봉우리쌍으로 ORM 등고 곡선을 작성하였다. 원하는 Rs 값을 1.0 이하로 하였을 때 영역을

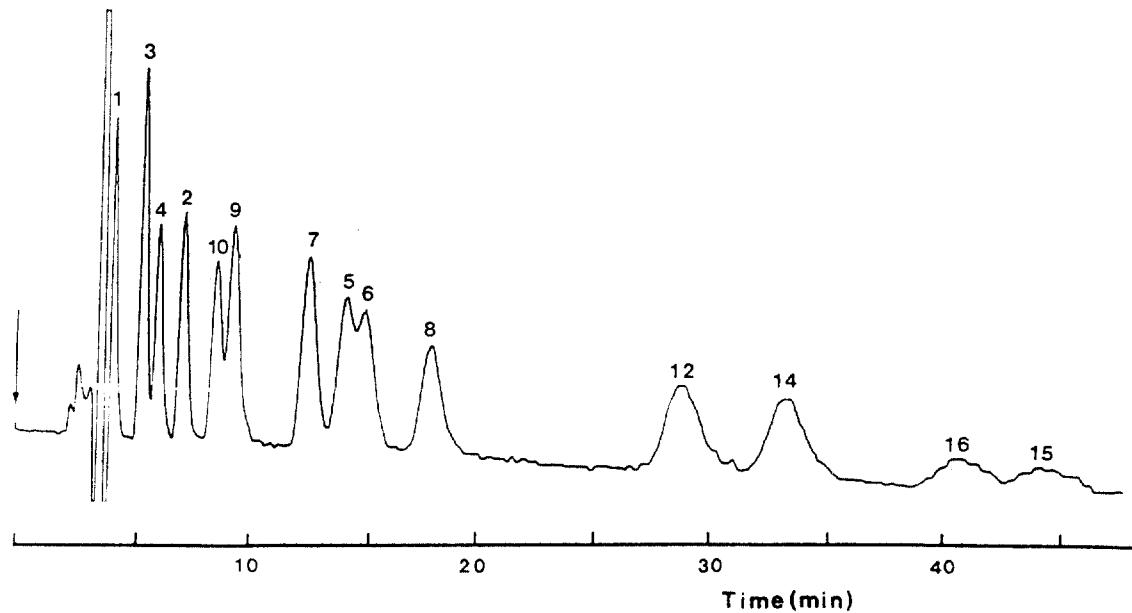


Fig. 2. Chromatogram of alkylphenols in 30% ACN at pH 11.18.

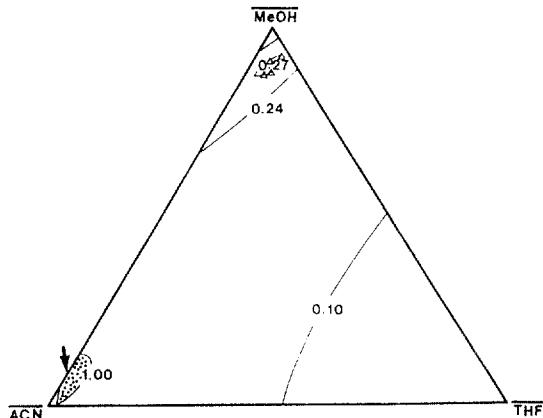


Fig. 3. Overlapping resolution map for 24 pairs of peaks.

The arrow indicates the optimum region ($R_{id} > 1.0$)

Numbers : R_{id} values.

결정한 최적 용매 조건이 SCE-LC계의 30% ACN과 유사한 용매 조성이었기 때문에 분리에 별다른 차이가 없었으며, 13가지의 알킬페놀류를 분리할 수 있었다.

분리가 어려운 몇 가지 알킬페놀류의 용매 선택성 : 알킬페놀류의 분리 최적화를 위하여 최적 pH를 구하였고, 이 pH 조건하에서 최적 용매 조성을 결정하였으나 여전히 분리가 어려운 시료가 있었다. 따라서 이들 몇 가지의 알킬페놀류만을 선택하여 용매의 선택성이 분리도에 미치는 영향에 대해 조사하였다. ORM 등 고곡선의 최적 용매 조성으로 결정하였던 아세토니트릴 영역에서 분리할 수 없었던 시료들을 두 가지 그룹으로 나누었다. I 그룹은 (9), (10), (13)이며, II 그룹은 (5), (6), (7), (12)이다.

이 7가지의 시료들만을 대상으로 하여 ORM 등 고곡선을 작성하였다. I 그룹은 원하는 R_s 값을 0.47 이하로 하였을 때 ORM 등 고곡선의 테트라히드로퓨란에서 영역이 나타났고, II 그룹은 원하는 R_s 값을 0.27 이하로 하였을 때 메탄올에서 영역이 나타났다. ORM 등 고곡선의 결과로부터 한 가지 용매를 선택하였는데, I 그룹은 테트라히드로퓨란을, II 그룹은 메탄올을 용매로 하여 용매 세기를 조절함으로써 30% THE

도시하면, 이 조건에서 최적 용매 조성은 MeOH : ACN : THF = 14.4 : 81.8 : 2.8로 Fig. 4의 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 결과적으로 pH만을 고려하였을 때보다 분석 시간을 단축할 수 있었고, ORM에 의하여

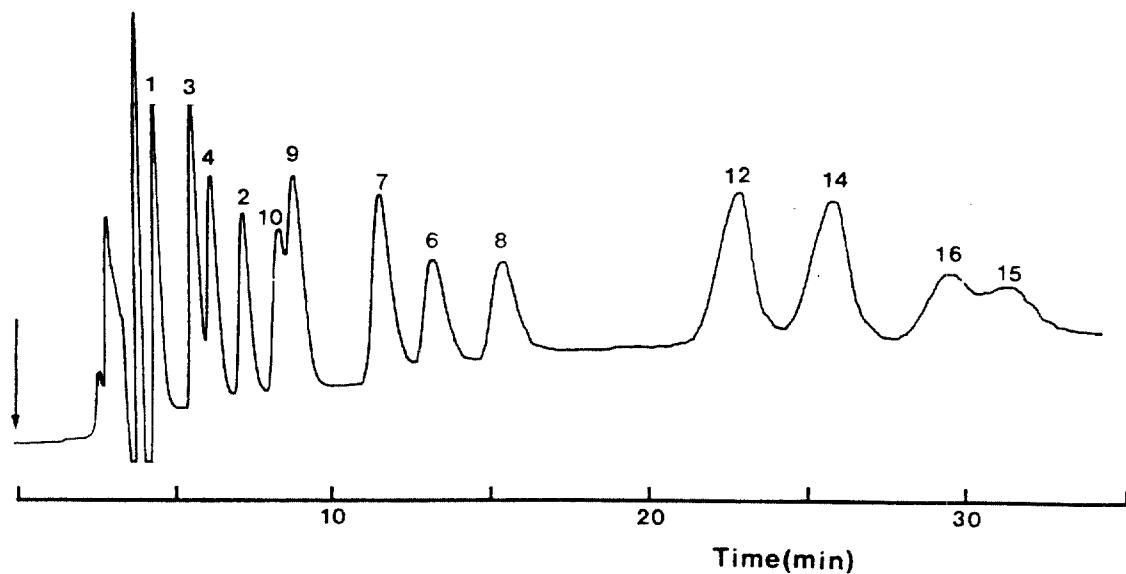


Fig. 4. Chromatogram of alkylphenols at the optimum conditions.

pH = 11.18 : Solvent composition : MeOH : ACN : THF = 14.4 : 81.8 : 2.8

와 55% MeOH에서 각 그룹에 대한 크로마토그램을 얻었으며 각각의 시료들이 분리됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 그러나 I 그룹을 테트라히드로퓨란이 아닌 메탄올을 용매로 하여 용매 세기를 조절함으로써 50% MeOH에서 크로마토그램을 구하였으나, 테트라히드로퓨란을 용매로 하였을 때 분리할 수 있었던 (9)와 (13)의 시료를 메탄올을 용매로 하여서는 분리할 수 없었다. 결과적으로 I 그룹은 테트라히드로퓨란에 대하여, II 그룹은 메탄올에 대하여 용매의 선택성을 나타냄을 알 수 있었다.

한편, Fig. 5에서 볼 수 있듯이 분석 시간이 길어지면서 봉우리들은 띠 넓어짐과 함께 꼬리 끌기(tailing) 현상이 나타났으며, 특히 메탄올을 용매로 하였을 때 두드러졌다. 이 원인은 폴리스티렌-디비닐벤젠 수지의 특성이며 PRP-1 컬럼의 큰 제한점이다.^{17, 18} 본 연구에서는 시료들을 주로 해리 정도에 따라 분리하였기 때문에 용리 거동에 대한 정지상과 이동상의 영향력은 비교적 약하다. 그러나 소수성이 강한 고분자수지의 결합 자리에 용질의 강한 흡착이 일어나며, 메탄올과 같은 알코올류의 용매는 아세토니트릴이나 테트라히드로퓨란에 비하여 용매 세기가 약하기 때문에 정지상과 용질의 강한 상호 작용의 결과로써 꼬리 끌기 현상

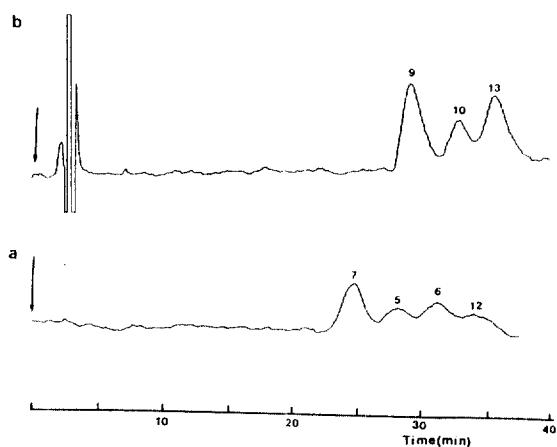


Fig. 5. Chromatogram of alkylphenols (a) in 30% THF(Group I) (b) in 55% MeOH(Group II) at pH 11.18.

이 관찰된다고 할 수 있다. 반면에 테트라히드로퓨란은 고분자의 미세 다공성 구조를 펑윤시켜 결합 자리의 활성을 감소시키기 때문에 봉우리 모양을 향상시킬 수 있다.

감사의 글

이 연구는 1992년 교육부 기초과학 육성연구비
(BSRI-92-331)의 지원을 받아 수행한 것으로 연구자
들은 교육부에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. S. J. Schmitz, H. Zwanziger, and H. Engelhardt, *J. Chromatogr.*, **544**, 381(1991).
2. D. W. Lee, S. W. Lee, M. J. So, and B. Y. Cho, *J. Korean Chem. Soc.*, **37**, 513(1993).
3. K. Jinno and K. Kawasaki, *Chromatographia*, **17**, 337(1983).
4. N. Dimov and Ov. Mekenyany, *J. Chromatogr.*, **471**, 227(1989).
5. R. W. Thring, E. Chornet, and R. P. Overend, *J. Chromatogr.*, **467**, 441(1989).
6. J. Hrvnak and M. Steklac, *J. Chromatogr.*, **286**, 353(1984).
7. N. Nomura, R. Kaneko, and M. Hara, *J. Liq. Chromatogr.*, **15**, 885(1992).
8. J. P. Foley and W. E. May, *Anal. Chem.*, **59**, 102 (1987).
9. J. P. Foley and W. E. May, *Anal. Chem.*, **59**, 110 (1987).
10. J. P. Foley, *J. Chromatogr.*, **441**, 347(1989).
11. R. M Lopes and P. J. Shoenmakers, *J. Chromatogr.*, **592**, 157(1992).
12. P. J. Shoenmakers, S. Molle, C. M. G. Hayes, and L. G. M. Uunk, *Anal. Chim. Acta*, **250**, 1(1991).
13. C. Horvath, "High Performance Liquid Chromatography : Advances and Perspectives", Academic Press, New York, Vol. 1(1980).
14. F. Szokoli, Zs. Nemeth, and Inczedy, *J. Chromatographia*, **29**, 265(1990).
15. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", Wiley Interscience, New York(1979).
16. J. C. Berridge, "Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations", John Wiley & Sons, New York, (1985).
17. L. D. Bowers and S. Pedigo, *J. Chromatogr.*, **371**, 243(1986).
18. L. D. Bowers and S. Pedigo, *J. Chromatogr.*, **279** (1990).