

## FIA에 의한 유기산의 해리상수 측정에 관한 연구

이재성<sup>†</sup> · 박현미 · 김희진 · 이강봉 · P. K. Dasgupta\*

한국과학기술연구원 특성분석센터

\*Texas Tech University, Department of Chemistry and Biochemistry, Lubbock TX 79409, U. S. A.  
(1994. 3. 17. 접수)

## A Study on the Measurement of Dissociation Constant of Organic Acid with FIA

Jae-Seong Rhee<sup>†</sup>, Hyun-Mee Park, Hee-Jin Kim, Kang-Bong Lee, Purnendu K. Dasgupta\*

Korea Institute of Science & Technology, Advanced Analysis Center

\*Texas Tech. University, Department of Chemistry & Biochemistry, Lubbock TX 79409, U. S. A.  
(Received Mar. 17, 1994)

**요약:** 빠른 시간내에 적은 시료로 (mg 단위) FIA와 Diode Array Spectrophotometry를 이용하여 해리상수를 구할 수 있는 방법을 개발하는 데 실험의 비중을 두었고, 그 대상으로 Bromo Cresol Green을 사용하였다. 소량의 산·염기를 가할 때 제일 sensitive한 발색반응을 보이는 지시약의 pK는 7.0임이 컴퓨터에 의해 계산되었다. Spectrophotometry를 이용한 Bromothymol Blue와 Bromocresol Green은 Kielland 방법에 의한 Activity를 보정해 준 후 pKa가 각각 7.31과 4.82를 얻었다(Reported value by Bishop 7.30, 4.79). FIA에 의한 Bromocresol Green의 pKa 값은 4.78을 얻어 다른 방법과 유사함을 알 수 있었다.

**Abstracts:** The point of present study was focused on developing the method for the determination of dissociation constant by means of FIA conjunction with Diode Array Spectrophotometry or spectrophotometry along with small amount of Bromocresol Green(mg order) within short time. On the calculation with computer, the indicator with pK=7 has been shown the most sensitive reaction when little amount of base or acid has been added. The pKa of Bromothymol Blue and Bromocresol Green were measured as 7.31 and 4.82 respectively with spectrophotometry after activity correction by Kielland method (Reported value by Bishop, 7.30 and 4.79). The pKa of Bromocresol Green by FIA was obtained as 4.78 and was comparable with other values determined by other methods.

**Key words:** FIA, dissociation constant, Bromothymol Blue, Bromocresol Green

### 1. 서론

Flow Injection Analysis(FIA)는 일정한 양의 시료를 (1 $\mu$ L~1mL) 공기로 분절되지 않고 연속적으로 흐

르는 적절한 시약속에 주입되도록 설계되어 있고, 재현성이 매우 큰 방법으로 주입된 시료는 분산영역을 형성하며 이동상과 화학변화를 일으켜 발생한 물리적, 화학적 성질을 검출기에 의하여 감지되도록 구성된다.

있다. 가장 간단한 FIA System은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 작은 내부구경의 Delay Line을 통과하도록 이동상을 밀어 주는 펌프(P), 정확한 재현성을 지니고 시료를 이동상에 주입할 수 있는 루프형 Injector(S), 반응 코일, 검출기 등으로 되어 있다. 이 FIA는 Kinetics에 응용을 하여 이동상과 시료용매의 흐름을 검출기에 정지시켜 반응속도를 측정한다든지 시료에 들어 있는 몇 개의 성분을 반응속도나 평형상수 차이를 이용하여 정량하는 데도 사용되어 왔다.

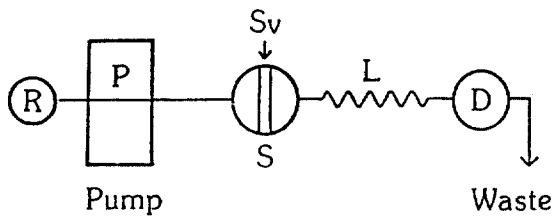


Fig. 1. Experimental setup on measurement of dissociation constant of organic acid. R: 0.1N HOAc / 1N NaOAc with  $5 \times 10^{-5}$ M BCG, S: Rheodyne 150 microliter loop injector, L: Teflon delay line 0.8mm i. d. 120cm in length, D: HP 8451A diode array detector equipped with 40 microliter flow cell & HP-85 microcomputer.

본 연구에서는 FIA Kinetics의 새로운 분야로서 유기산의 해리상수를 측정하려고 시도하였고 연구가 성공적으로 정립될 경우 신물질 창출에서부터 발생하는 새로운 문제점, 즉 화학적 성질 중 하나인 해리상수 등을 FIA를 이용하여 신속하게 측정할 수 있는 방법을 모색하려고 하였다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### 2. 1. 기기 및 재료

Gilson Peristaltic miniplus 3 pump 및 Rainin의 Tygon pump tubing을 이용하여 carrier와 sample을 도입하였고 Delay Line으로 0.8mm i. d. 120cm의 Omnifit사의 Knotted Teflon tube를 사용하였다. Rheodyne 6 port injector로 150 $\mu$ L의 시료(0.1N NaOH)를 주입하였고 Detector로 40 $\mu$ L Quartz flow cell과 HP 9121 model 3.5" two Disk Drive가 설치된 HP 8451A Diode Array Spectrophotometer를 사용

하여 HP 7470A Plotter로 data output을 얻었다.

### 2. 2. 시약

Bromthymol Blue와 Bromocresol Green, NaOH, Sodium Acetate, Acetic Acid는 Sigma의 reagent grade를 더 이상 정제함이 없이 사용하였다. 물은 재증류수를 1시간 정도 끓여서 Soda lime의 trap을 설치한 다음 사용하였다. 0.1N NaOH는 50% NaOH 용액을 한 달 정도 놓아 두었다가 모든 침전이 가라앉은 다음 약 30mL를 200mL로 묽힌 후 0.1N HCl로 적정하여 표정한 후 이 용액 약 40mL를 다시 취해 1L로 묽혀 정확히 0.10N NaOH 용액을 만들었다. Carrier로서 1N NaOAc/0.1N HOAc와 Bromocresol Green  $5 \times 10^{-5}$ M 용액을 사용하였다.

### 2. 3. 실험방법

#### 2. 3. 1. pK에 의한 지시약의 감응도 변화 계산법

유기약산은 산의 형태로 있을 때 염기성 물질과 반응하여 평형상태를 만든다. 유기산의 감응도를 보기 위해 해리상수에 따른 염기성 지시약의 농도 분율을 계산하여야 되는데, 우선 지시약의 농도를 결정하고 여기에 강산이나 강염기가 첨가되었을 때의 변화를 charge balance 공식에 집어 넣고 구한다.<sup>12</sup>

지시약 분류에 영향을 주는 수소이온농도는 컴퓨터 Basic Program으로 계산한 후 자동도식화해서 Fig. 2와 같은 결과를 얻도록 한다.<sup>3</sup>

#### 2. 3. 2. Spectrophotometry에 의한 Bromothymol Blue 및 Bromocresol Green의 pKa 측정

두 유기산의 해리상수를 측정하기 위해서 산·염기 형태의 molar absorptivity를 알아야 하는데,  $4 \times 10^{-5}$ M의 유기산을 0.1N HCl이나 NaOH 용액에 1:1 혼합한 후 스펙트럼을 비교하여 보면 615nm와 432nm에서 최대 흡수도를 갖는 염기성, 산성 형태의 흡광도를 얻는다(Fig. 3). pH 약 7.5, 8.0, 13.0(실제 각각 7.357, 7.992, 12.215)의 완충용액을 Koltthoff가 제안한 방법을 사용했는데, 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mL에 0.1N NaOH 41.1mL를 집어 넣어 pH 7.5인 완충용액을 만들었고 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mL에 0.1M NaOH 46.7mL를 혼합하여 pH 8.0인 완충용액을 0.1N NaOH로 약 pH 13인 buffer를 만들었다.  $4 \times 10^{-5}$ M Bromothymol Blue 5.0mL를 50.0mL의 buffer 용액과 혼합하고 phosphate buffer, borax로 calibration된 pH meter를 이

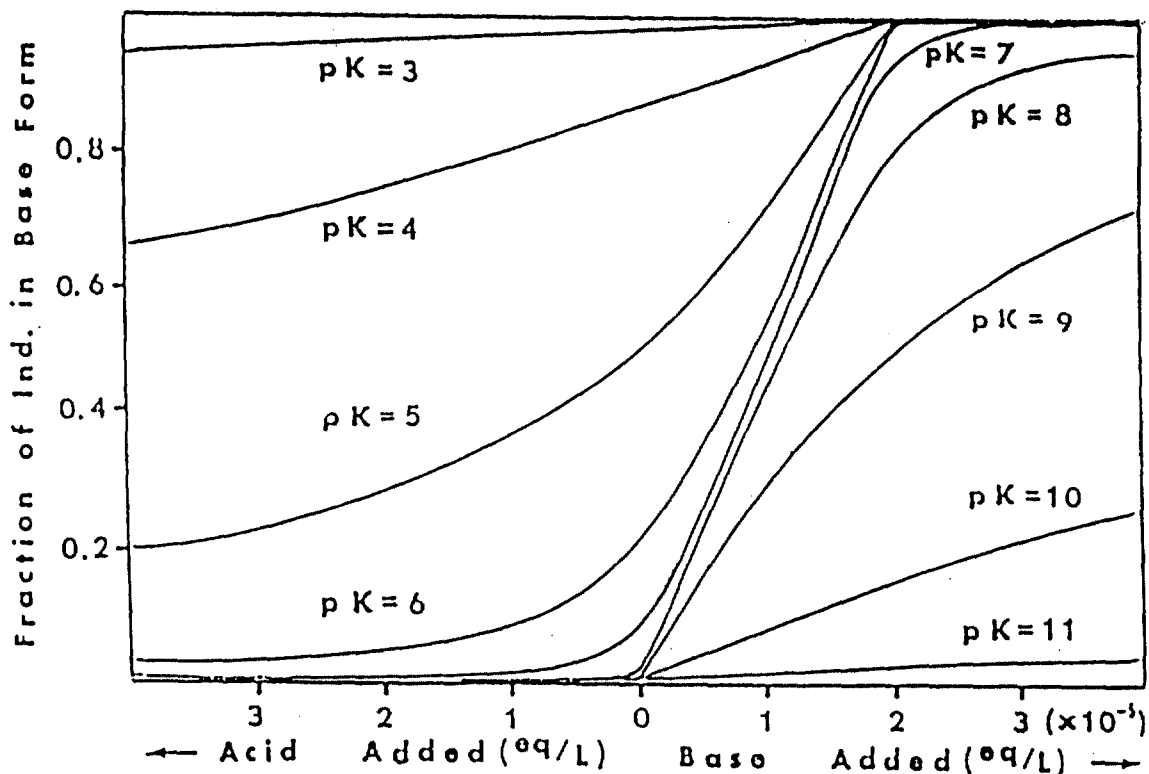


Fig. 2. Response of indicator with various pK value toward added strong acid or base.

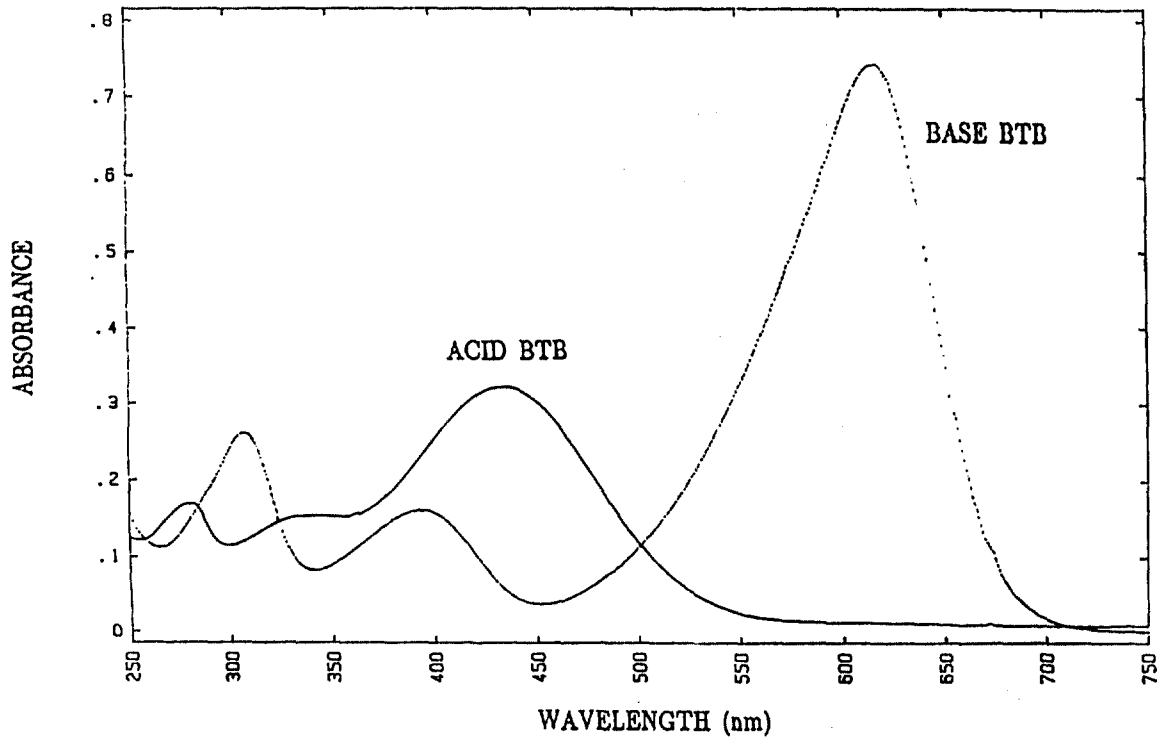


Fig. 3. Absorption of Bromothymol Blue for acid form and base form.

용액 pH를 측정한 다음 가시 영역에서 스펙트럼을 얻는다(Fig. 4). 다른 pH에서 얻은 분광학적인 결과로부터 대략적인 pKa값을 얻을 수 있으나 정확한 pKa값은 Kielland 방법에 의한 활동도를 보정해 준 후 가능하다. 즉 스펙트럼에서 얻은 농도와 용액 속에 있는 이온 종류를 계산하여 활동도를 컴퓨터를 이용하여 구하고 해리상수를 얻을 수 있도록 Basic program을 작성하고 활용하도록 한다.

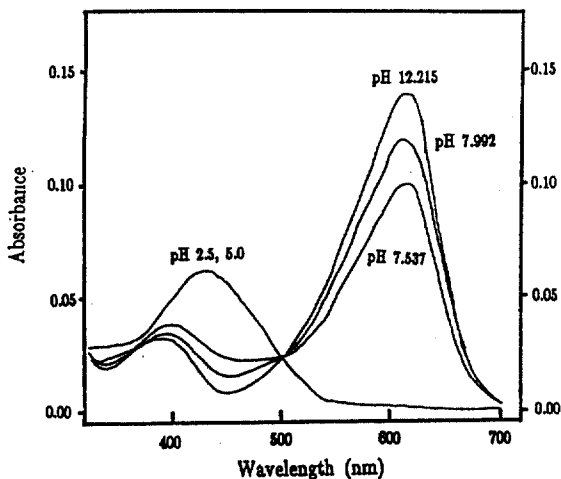


Fig. 4. Absorption pattern of Bromothymol blue at different pH(7.537, 7.992, 12.215).

Bromocresol Green으로 Bromothymol Blue와 동일한 방법을 사용하여 pKa를 구할 수 있으나 다만 사용한 완충용액의 종류로서는 pH 2.5, 3.0, 4.5, 5.0, 5.5, 7.5, 8.0을 사용하였다. 완충용액의 조제방법으로는 pH 2.5, 3.0, 4.5, 5.0, 5.5인 완충용액을 0.1M potassium hydrogen phthalate 100mL에 차례로 0.1M HCl 77.6mL, 44.6mL 또는 0.1M NaOH 17.4mL, 45.2mL, 73.2mL를 혼합하여 조제하고 pH 7.5와 8.0인 완충용액은 0.1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mL에 0.1M NaOH 82.2mL와 93.4mL를 섞어서 만들었다.

### 2. 3. 3. FIA에 의한 유기산 Bromocresol Green의 해리상수 측정

Peristaltic pump를 이용하여 flow rate 0.3~0.7mL/min으로 조정하고, 시료(0.1N NaOH)는 150μL Reodyne loop injector로 주입하도록 한다. Delay line

으로 0.8mm i. d. 120cm 되게 조정하고 40μL flow cell 이 있는 Hewlett Packard 8451 A Photodiode Array Spectrophotometer를 사용하여 Time mode로 Dispersion factor를 구한다든지 일정한 시점에서의 350nm~800nm 사이의 흡광도를 구하도록 한다. Data file은 HP-85 micro computer를 이용하였다. Carrier의 Buffer System은 0.1M NaOAc와 0.1M HOAc를 사용하였으며, Bromocresol 5×10<sup>-5</sup>M도 함께 carrier에 흘러 주었다. 시료의 Dispersion factor는 일정한 파장에서의 시간에 따른 분율을 계산하여 정할 수도 있고 (HP spectrometer: time mode), 지시약을 사용할 경우 다음의 순서에 의해 역시 환산되어질 수 있다. 지시약의 흐름에 강산이나 강염기를 가해서 Isobestic wavelength를 정하고, 이 파장에서의 시료만의 총 흡광도를 측정하여 A<sub>0</sub>라 한다. 시간 t에서 시료의 Isobestic point에서의 흡광도를 A<sub>t</sub>라 하면 이 때의 dispersion factor D는 A<sub>0</sub>/A<sub>t</sub>의 값이 된다. 여기서부터 Henderson-Hasselbalch식에 의해 단면의 pH가 계산되어지고, 몰 흡광도를 아는 다른 두 파장에서부터 유기산의 해리상수가 얻어지게 된다. 여기에 Kielland 방법으로 활동도를 보정하면 정확한 유기산의 해리상수가 얻어진다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3. 1. pKa에 의한 지시약의 감응도 변화

미량의 산이나 염기를 가했을 때 지시약의 해리상수에 의한 감응도의 변화를 보기 위해서 C molar의 산성형 지시약 HA가 있다고 가정하고 여기에 부피가 변하지 않고 강산(C<sub>A</sub> molar)이나 강염기(C<sub>B</sub> molar)가 가해졌다고 가정하면,

$$[H^+] + C_B = [A^-] + [OH^-] + C_A \quad (1)$$

라는 식을 얻을 수 있으며, 여기에 지시약과 물의 해리상수를 각각 K와 K<sub>w</sub>라 할 때 아래의 수소이온에 대한 3차방정식을 얻는다.

$$[H^+]^3 + [H^+]^2 (K + C_B - C_A) + [H^+][K(C_B - C_A - C) - K_w] - K \cdot K_w = 0 \quad (2)$$

따라서 주어진 K, C, C<sub>B</sub>, C<sub>A</sub>에 대해 수소이온은 간단

한 컴퓨터 프로그램에 의해서 그 값을 얻게 되고 염기 상태의 지시약은 해리상수와 함께 얻어질 수 있다. Fig. 2는 이런 계산의 결과이며 산이나 염기가 가해졌을 때  $2 \times 10^{-5}M$ 의 지시약이 해리상수로서 3에서 11까지 변하면 염기성 지시약의 분율이 어떻게 변하는지 도식한 것이다. 이 때의 중요성을 살펴보면 강염기를 가했을 때 해리상수 pK가 7.0일 때 제일 감도가 좋았고 실제로는 해리상수가 6에서 8 사이가 이상적일 것이다. 직선적인 증가는  $2 \times 10^{-6}M$  염기를 가했을 때 시작하지만  $d[A^-]/dC_B$ 의 값이 염기가 전혀 가해지지 않았을 때보다 변화가 적기 때문에 실제로 감도의 영향은 무시할 수 있다.

**3. 2. Spectrophotometry를 이용한 Bromocresol Green과 Bromothymol Blue의 pKa 측정**

Bishop이 기술한 "Indicator"의 저서에서 보고된 Bromothymol Blue의 해리상수는 25°C에서  $pK_a=7.30$ 이다. 유기산의 해리상수를 측정하는 방법을 정립하기 위해서 0.1 molar pH 7.50, 8.00 phosphate buffer 속에서 감지된  $3.33 \times 10^{-6}M$ 의 BTB의 흡광도를 측정하고 ionic strength 및 그 때의 정확한 pH를 측정하면 Kielland 방법으로 activity correction을 하여 정

확한 해리상수를 측정할 수 있다. 50mM phosphate (pH 7.00), borax buffer(pH 9.80)로 calibration한 pH meter로 수소이온의 활동도를 측정하여 pH 7.537, 7.992, 12.215의 값을 얻었다. 이 때의 ionic strength는 buffer 용액에 의해 지배되므로 유기산에 의한 factor는 무시할 수 있다.

이온세기는 전체의 해리상수와 활동도 등을 종합한 컴퓨터프로그램에 의해서 총괄적으로 계산되는데, pH 7.5, 8.0일 때의 이온세기는 0.12093과 0.1235mol/L였다. Spectrometry에서 얻은 615nm에서의 흡광도 0.999, 0.119를 이용해서 molar absorptivity가 42,000인 BTB의 음이온 형태의 농도가 계산되고 여기에 size parameter, dielectric constant를 도입하여 pH 7.5, 8.0일 때 각각 활동도계수를 구하면 수소이온계수 0.8177, 0.8168, 수산이온계수 0.7378, 0.7360, 염기형태의 지시약 0.8570, 0.8565를 얻었고, 이 값을 농도의 해리상수에 곱하여 활동도를 보정한 해리상수  $pK_a$ 로서 7.273과 7.350을 각각 얻었다. 따라서 이것들의 평균치인  $pK_a=7.31$ 을 BTB의 활동도가 보정된 해리상수로 얻었다. 이때 이용한 파장은 615nm, 432nm를 사용하였으며 pH 1.0과 2.5에서 측정한 산성형태의 BTB의 흡광도는 각각 0과 1800이었고 pH 13.0에서 측정한

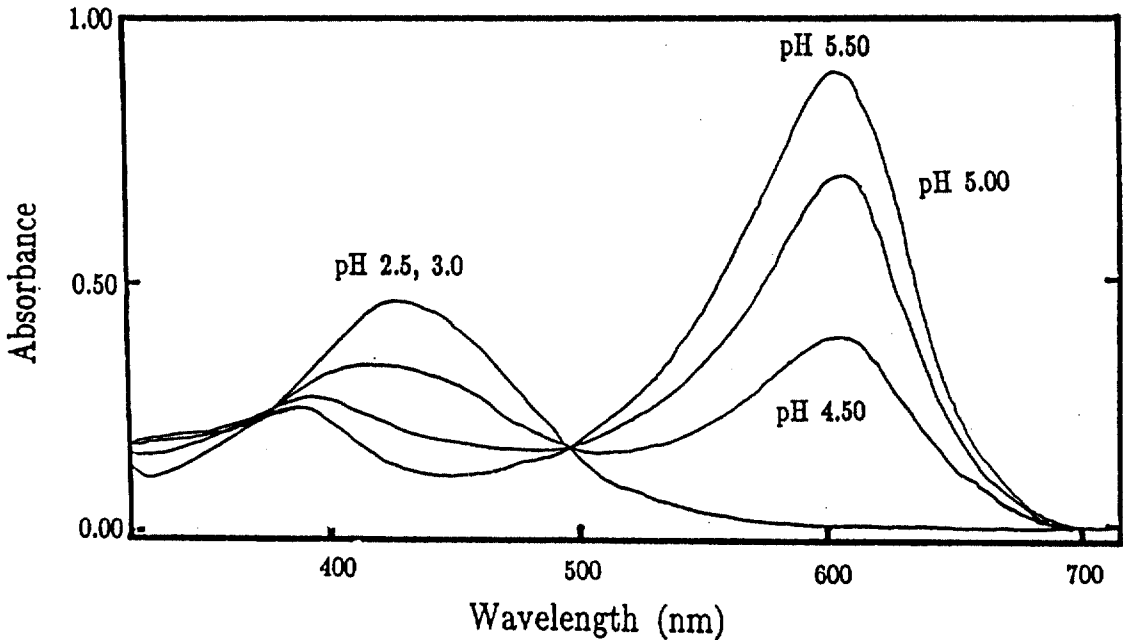


Fig. 5. Absorption pattern of Bromocresol Green at different pH(4.476, 4.970, 5.472).

염기성형 BTB의 몰 흡광도는 3900, 42000이었다. BTB의 size는 원자결합의 거리 및 각도를 계산하여 14Å을 얻었다.

Bromocresol Green의 해리상수를 측정하기 위하여 pH 2.5, 3.0, 4.5, 5.0, 5.5, 7.5, 8.0인 완충용액을 만들어 이용하였고 실제 해리상수 측정을 위하여 pH 4.5, 5.0, 5.5를 사용하였다(Fig. 5). 스펙트럼은 완충용액 20mL에 0.01% BCG 2mL를 혼합한 후 pH 2.5, 3.0에서 산성형태의 몰 흡광도를, pH 7.5와 8.0에서 염기성 형태의 몰 흡광도를 측정하여 계산하였다. 얻어진 몰 흡광도는 산성형태로 615nm와 441nm에서 0과 17277을 염기성형태의 몰 흡광도는 41004와 2611을 각각 얻었다. BTB에서 계산한 순서와 마찬가지로 Phosphate buffer와 KHP buffer로 calibration한 pH meter를 사용해 정확한 pH를 측정된 결과 4.476, 4.970, 5.472를 얻었고 ionic strength는 0.10476, 0.13566, 0.12895였다. 이때 활동도계수는  $f_H=0.8236$ ,  $f_{OH}=0.7496$ ,  $f_{Base}=0.8330$ 이  $I=0.10476$ 일 때 컴퓨터 계산에 의해 얻어졌고,  $f_H=0.8131$ ,  $f_{OH}=0.7281$ ,  $f_{Base}=0.8237$ 은  $I=0.1357$ 일 때 또  $f_H=0.8151$ ,  $f_{OH}=0.7324$ ,  $f_{Base}=0.8255$ 는  $I=0.12895$ 일 때 각각 얻었다. Activity correction된 해리상수로서  $pK_a=4.820, 4.791, 4.838$ 이 측정되었으나 평균으로 4.816, 즉  $K_a=6.61 \times 10^{-5}$ 의 해리상수를 얻어 보고된  $pK_a$ 값 4.79와 근사하였다.

### 3. 3. FIA를 이용한 유기산(BCG)의 해리상수 측정

150 $\mu$ L의 0.1N NaOH가 시료(BCG) 및 0.1N NaOAc/0.1N HOAc의 흐름에 주입하면 dispersion factor에 의해 pH gradient가 형성되고 이에 따라 시료의 발색에 의해 dissociation constant를 결정하였다. 사용한 파장은 isosbestic point의 508nm, 염기성 지시약의 최소 흡수를 보이는 441nm를 택하였다(Fig. 6). Dispersion factor는 오차의 범위를 줄이고자 3~10 사이의 범위를 잡았고, 측정 시간 간격은 5초로 두어 spectrophotometer의 측정 및 컴퓨터의 data handling에 충분한 시간을 주도록 하였다.<sup>14)</sup>

Dispersion factor는 강산이나 강염기 상태에서 언제나 동일한 흡수를 보이는 508nm에서 흡광도를 측정하고 0.1N NaOH 주입시 나타나는 동일 파장에서의 흡광도를 비교하면 계산되어지고, 여기에서 그 때의 pH도 Henderson-Hasselbalch 공식에 의해서 계산된다.  $D > 3$ 일 때의 pH는,

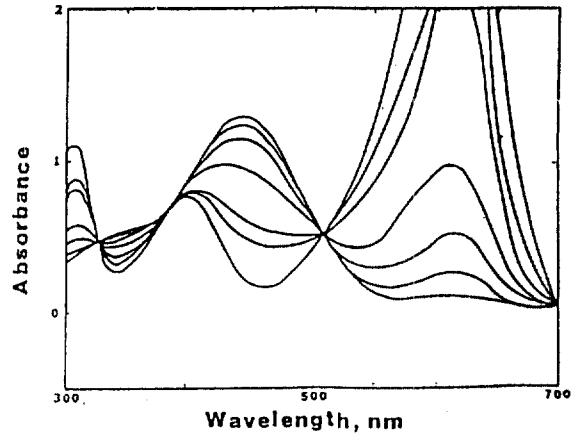


Fig. 6. pH dependent overlay spectra of Bromocresol Green measured by a single injection in FIA system.

$$pH = pK_{HOAc} - \log(1 - 2/D)$$

따라서 615nm, 441nm의 흡광도에서 구한 농도와 앞서 기술한 방법으로 활동도를 보정하면 Bromocresol Green의 해리상수  $pK_a$ 는  $4.78 \pm 0.10$ 의 값을 얻었고 이것은 Bishop의 보고한 값 4.79와 비슷한 결과를 보여 주고 있다.

이 방법의 단점으로는 해리상수를 측정하려는 시료의 분자량과 mol-absorptivity를 알아야 한다는 점이 지만, 적은 시료로 단시간내에 해리상수를 측정할 수 있는 제일 편리한 방법임이 확인되었다.

### 4. 결론

FIA에 의한 유기산의 해리상수 측정은 방법의 편의성에 의하여 유용하게 사용될 수 있고 Bromocresol Green의 해리상수로서  $4.78 \pm 0.10$ 의 값을 얻었다. 해리상수의 측정으로 추출의 효율을 조절할 수 있고 이에 대한 천연물이나 신물질 합성의 추출법에 의한 정제에 이용할 수 있다. Spectrophotometry를 이용한 수동적 해리상수 측정법으로 Bromocresol Green은 4.82, Bromothymol Blue는 7.31(Reported value 7.30)을 각각 나타내어 두 방법이 상호 보완적으로 사용될 수 있음이 증명되었다.

**5. REFERENCE**

1. Kolthoff, I. M ; Sandell, E. B. ; Mehan, E. J. ; Bruckenstein, S., *Quantitative Chemical Analysis*, 4th ed., Mcmillan, New York, 1971.
2. Bishop, E., *Indicators*, Pergamon Press Ltd., New York, 1972.
3. Poole, L. ; Borchers, M., *Some Common basic Program*, 3rd ed., Osborn/McGraw Hill, Berkly, 1979.
4. Ruzicka, J. ; Hansen, E. H., *Flow Injection Analysis*, John Willson & Sons, New York, 1981.
5. Valcarcel, M; Luque de castro M. D., *Flow Injection Analysis*, John Willy & Sons, New York, 1987.