

## 방향족 술폰산 및 카르복시산의 역상 이온-상호작용 크로마토그래피

姜三祐<sup>†</sup> · 吳海範\* · 李承錫

한남대학교 이공대학 화학과

\*전주우석대학 이학부 화학과

(1987. 7. 21 접수)

## Reversed-Phase Ion-Interaction Chromatography of Aromatic Sulfonic and Carboxylic Acids

Sam-Woo Kang<sup>†</sup>, Hae-Beom Oh\*, and Seung-Seok Lee

Department of Chemistry, Han Nam University, Dae Jeon 300-791, Korea

\*Department of Chemistry, Jeonju woo Seok College, Wanju 565-800, Korea

(Received July 21, 1987)

**요약.** 역상 액체 크로마토그래피에 의한 방향족 술폰산 및 카르복시산들의 머무름 기구와 분리를 브롬화 도데실트리메틸 암모늄 (DTAB)을 포함하는 이동상에서 연구하였다. 머무름 기구는 DTAB가 정지상에 일차층을 형성하고 반면 음이온 시료와 이동상에 존재하는 다른 공존 음이온들이 경쟁적으로 이차층을 형성하는 이온-상호작용 모델임을 확인하였다. 시료들의 용량인자들은 pH, 여러 유기용매들의 농도, 이동상에 존재하는 공존 음이온 및 시료의 작용기 등 여러 인자들에 의해 영향을 받았다. 그리고 몇 가지 유기 혼합시료들을 최적 조건하에서 상호 분리를 시도하였다.

**ABSTRACT.** The retention mechanism and separation of various aromatic sulfonic and carboxylic acids on reversed-phase liquid chromatographic column were studied in the mobile phase containing dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB). The retention mechanism was found to be followed the ion-interaction model where the DTAB occupies a primary layer at the stationary phase while the sample anions and other co-anions in the system compete for forming the secondary layer. The capacity factors of samples were influenced by the several factors such as pH, concentration of various organic solvents, co-anions in the mobile phase and functional groups in sample molecules. Some mixtures of organic samples were attempted to separate under optimum condition.

### 서론

무기 및 유기이온 화합물들을 분리하는 방법으로 널리 이용되는 이온쌍 크로마토그래피 (IPC) 법은 분리하고자 하는 시료와 이온쌍을 형성할 수 있는 반대이온을 시료에 따라 다양하게 선택할 수 있기때문에 효과적인 분석방법으로 활발하게 연구가 진행되고 있다<sup>1~16</sup>.

IPC를 이용한 분리과정에서 반대이온과 시료

이온, 그리고 분리관사이에 일어나는 머무름 기구가 많은 관심을 끌고 있는데, 정상 크로마토그래피에서는 이온-쌍 모델이 존재하고, 역상 크로마토그래피에서는 이온-쌍 모델과 이온-상호작용 모델이 있는 것으로 알려졌다.

역상계에서 이온-쌍 모델은 solvophobic effect로 머무름 기구를 설명하는 학설로서, IPC를 이용한 초기의 논문들은 이 모델로 설명하였다<sup>2,3</sup>. 그러나 Kissinger<sup>4</sup>에 의하면 이온-쌍 모델에 의해

서만 머무름이 진행되지는 않는다고 하였다. Knox 와 Jurand 는<sup>7</sup> 이온-상호작용 모델에 의한 머무름이 진행된다고 주장하였고, 많은 연구결과가 이 모델로 설명되었다<sup>8~10</sup>. 그러나 이 두가지 모델중 어느 한쪽 모델로만 머무름이 일어나는 것이 아니라 두 모델에 의한 머무름이 서로 경쟁적으로 일어나며, 실험조건에 따라서 어느 한쪽 모델에 의한 머무름이 우세하게 진행되는 논문도 많이 발표되었다<sup>11~14</sup>. Hoffman 과 Liao 는<sup>11</sup> 생화학적 물질을 분리하면서 이온-상호작용 모델로 머무름 기구를 설명하였지만, 시료분자의 소수성이 증가할수록 용량인자가 증가하는 것은 이온-상호작용 모델로만 설명할 수 없으며, solvophobic interaction(이온-쌍)도 작용한다고 주장하였다. Iskandarani 와 Pietrzyk 는<sup>13~14</sup> 무기 및 유기음이온을 분리하면서 반대이온으로 사용한 tetraalkylammonium 이온이 알킬기의 탄소수가 작을 때는 이온-쌍 모델을 따르고 알킬기의 탄소수가 많을 때는 소수성이 강해서 반대이온이 먼저 분리관에 흡착되기 쉽기 때문에 이온-상호작용 모델을 따른다고 하였다.

본 연구에서는 실리카 표면이 알킬기로 처리된 ODS 분리관을 사용한 역상계에서 Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB)을 반대이온으로 사용하여 방향족 슬폰산과 카르복시산들의 머무름 기구를 규명하고자 하였고, 이를 위하여 머무름에 영향을 주는 여러 조건하에서 시료들의 용량인자들을 측정하였다. 그리고 이를 토대로하여 최적조건하에서 여러 혼합시료들을 상호분리하였다. 한쪽 모델로만 머무름이 일어나는 것이 아니라 두 모델에 의한 머무름이 서로 경쟁적으로 일어나며, 실험조건에 따라서 어느 한쪽 모델에 의한 머무름이 우세하게 진행된다는 논문도 많이 발표되었다<sup>11~14</sup>. Hoffman 과 Liao 는<sup>11</sup> tetrabutylammonium 염을 반대이온으로 사용하여, ADP, ATP, nucleotide, uridine 및 adenosine 같은 생화학적 물질을 분리하면서 이온-상호작용 모델로 머무름 기구를 설명하였지만, 시료분자의 소수성이 증가할수록 용량인자가 증가하는 것은 이온-상호작용 모델로만 설명할 수 없으며, solvophobic interaction (이온-

쌍)도 작용한다고 주장하였다. Iskandarani 와 Pietrzyk 은<sup>13,14</sup> polystyrene-divinylbenzene 혼성 중 합체의 일종인 PRP-1 칼럼을 이용하여 몇가지 tetraalkylammonium 이온을 이동상에 넣고 무기 및 유기음이온을 분리하면서, 반대이온으로 사용한 tetraalkylammonium 이온이 저급일 때는 소수성이 작으므로 이온-쌍 모델을 따르고, 고급일 때는 소수성이 강해서 칼럼에 흡착되기 쉽기 때문에 이온-상호작용 모델이 우세하다고 하였다.

본 연구에서는 실리카 표면이 알킬기로 처리된 ODS 칼럼을 이용한 역상계에서, DTAB를 반대이온으로 사용해서 극성인 이동상에 첨가하고 방향족 슬폰산과 카르복시산들에 대한 머무름 기구를 규명하고자 하였고, 주로 DTAB를 반대이온으로 사용하여 시료의 용량인자에 영향을 미칠 것으로 예상되는 여러가지 조건을 체계적으로 알아보려고 하였다. 그리고 이를 토대로 하여, 최적조건에서 몇 가지의 시료 혼합물을 분리함으로써 ODS를 이용한 이온-쌍 크로마토그래피법이 방향족 슬폰산과 카르복시산들의 분리에 유용하게 쓰일 수 있음을 밝히고자 하였다.

## 실 험

### 시 약

본 실험에서 사용한 모든 시약은 Tokyo Kasei, Aldrich, B. D. H., Junsei Chemicals 등의 회사에서 구입한 G. R 등급 내지 특급시약을 정제하지 않고 사용하였다. Acetonitrile(AN)을 비롯한 모든 유기용매는 E. Merck 회사 등으로부터 구입한 크로마토그래피용을 사용하였으며 증류수는 이차증류하여 이온교환수지에 통과시킨 탈이온수를 사용하였다.

### 측정기기 및 분리관

본 실험에서 사용한 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 장치는 Pye-Unicam 회사 제품으로, 펌프는 PU4010이중펌프, 검출기는 PU4023 RI 검출기로 바탕선의 안정도를 조사하였고, PU 4020 분광광도 검출기로 시료들을 분석하였다. 칼럼에 시료를 주입하기 위한 injector는 20 $\mu$ l rotary valve injector를 사용하였으며, 기록기는

PM8251 기록기와 CDP-4 Computing 기록기를 병용하였다. 그리고 본 실험에서 분리관은 25cm × 4.6mm partsil10 ODS를 사용하였다.

**실험방법**

**용액의 조제.** 유기용매, 증류수, 반대이온 및 전해질 등을 주어진 실험조건에 따라 일정한 농도로 이동상을 만든 다음, ultrasonic bath에서 용액속에 녹아있는 공기를 제거하고, 0.45μm millipore 여과지로 걸러내어 사용하였다. 또한 이동상을 pH2.0과 3.0인 완충용액으로 만들 때는 HCl-NaCl을 사용하여 조절하였고, pH4.0~7.0인 완충용액은 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 용액을 각각 1.0mM 농도로 만들어 주어진 pH에 알맞도록 혼합하여 사용하였다.

**시료의 분리.** 분리관에 시료를 주입하기전에 이동상을 통과시켜, 이동상과 분리관사이에 평형이 되도록 하였다. 완전한 평형이 이루어지도록 분리관에 통과시키지 않은 이동상과, 용출된 이동상이 RI 검출기에 대한 감응도가 동일하여 질때까지 통과 시켰다. 평형이 이루어졌을 때 바탕선이 일정하게 안정되었고, 각 시료의 머무른 시간도 일정하였다. 이동상의 유속은 1.0 ml/min으로 고정시켰고, 일정 시간마다 실제로 용출되어 나오는 이동상의 양을 측정하여 계기에 나타난 유속과 일치함을 확인하였다. 시료의 흡착평형수에 따라 1.0 × 10<sup>-5</sup>에서 1.0 × 10<sup>-3</sup>M 농도로 만들어 20μl씩 주입하였으며, 시료의 검출은 자외선 분광광도 검출기로 254nm의 파장에서 측정하였다. 또한 모든 실험은 실온에서 수행하였다. 그리고 시료들의 머무름은 용량인자(k')로 표시하였으며 분리관의 틈새부피는 질산이온을 사용하여 측정하였다.

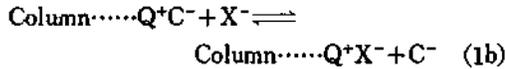
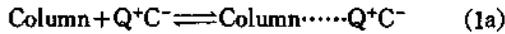
한편, 혼합시료들은 앞에서 얻은 용량인자를 토대로하여 알맞은 조건을 선택하여 몇 가지 가능한 시료들의 분리를 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**DTAB 존재하에서 시료들의 머무름 기구**

이온-상호작용 모델은, 반대이온이 칼럼에 먼저 흡착되고 시료이온이 co-anion과 이온교환이

일어나서 전기적 이중층(electrical double layer)을 형성한다는 학설로 (1)식과 같이 간단히 나타낼 수 있다.



또한 Pietrzyk 등이 이온상호작용 모델에 관한 평형 관계를 다음과 같은 식으로 유도해 냈다<sup>13</sup>.

$$\frac{1}{k'} = \frac{A}{[Q^+]} + B[C^-] + F[X^-] \quad (2)$$

여기서 k'는 시료의 용량인자이며, [Q<sup>+</sup>]는 반대이온의 농도이고, [C<sup>-</sup>]는 co-anion의 농도 [X<sup>-</sup>]는 시료이온의 농도이며 A, B, F는 상수이다. 따라서 머무름 기구가 이온-상호작용 모델을 따른다면 1/k'는 [Q<sup>+</sup>]<sup>-1</sup>, [C<sup>-</sup>] 및 [X<sup>-</sup>] 등의 농도에 정비례 관계가 있다고 할 수 있다.

한편, 서론에서 언급한 것처럼 두 가지 모델에 의한 머무름이 서로 경쟁적으로 일어나고 있으나, 일반적으로 반대이온의 소수성이 강할수록 이온-상호작용 모델에 의한 머무름이 우세하고 소수성이 약할수록 이온-쌍 모델에 의한 머무름이 우세하게 진행된다는 학설이 있다.

본 실험에서는 소수성이 강한 dodecyl기로 치환되어 있는 DTAB를 반대이온으로 사용했으므로 이온-상호작용 모델이 우세하다고 추측할 수 있다.

이와같은 현상의 머무름 기구에 대하여 몇 가지 실험적 근거를 토대로 설명하고자 한다.

첫째, DTAB를 반대이온으로 사용했을 때, DTAB의 농도에 따른 시료들의 용량인자가 Table 1~3에 나타나 있다. 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O (v/v) 이동상에서 DTAB의 농도가 증가하면 시료들의 용량인자도 증가하였는데, 이들의 관계를 알아보기 위하여 그림으로 도시한 것이 Fig. 1이다. 몇 가지 시료들의 (k')<sup>-1</sup> 값들이 모두 [DTAB]<sup>-1</sup>에 정비례함을 알 수 있다. 그리고, 1.0mM DTAB를 첨가한 40%MeOH-60%H<sub>2</sub>O 이동상에서 co-anion으로 첨가한 Cl<sup>-</sup> 이온의 농도와 시료들의 1/k' 값과의 관계를 도시한 그림이 Fig. 2에 나타나 있는데, co-anion의 농도가

Table 1. Capacity factor of aromatic sulfonic acids on the ODS column as a function of the concentration of DTAB

Compound	Concentration of DTAB, mM. <sup>a</sup>			Concentration of DTAB, mM. <sup>b</sup>		
	0.5	1.0	5.0	1.0	10	50
BSA	2.64	5.36	10.82	1.00	3.00	3.82
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA	3.82	6.73	14.45	1.09	3.55	4.27
<i>p</i> -CH <sub>3</sub> BSA	3.91	7.09	15.55	1.09	3.73	4.55
<i>p</i> -Cl BSA	5.09	11.27	24.73	1.27	4.45	5.91
<i>p</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> BSA	6.27	12.09	29.64	1.55	5.00	7.36
Sulfosalicylic	16.36	37.27	>50	2.00		
1-NSA	7.91	14.91	39.00	1.64	5.82	7.73
1-NOH-4-SA	4.64	8.27	21.55	1.14	3.91	4.45
1-NOH-5-SA	3.64	6.64	17.36	1.00	3.09	3.64
1-NOH-8-SA	9.27	26.27	>50	1.86	7.54	10.45
2-NH <sub>2</sub> -1-NSA	7.18	12.09	35.36	1.45	5.36	7.27
N-1,5-DSA	14.55	34.64	>50	1.45	12.36	14.00
N-2,7-DSA	13.82	31.00	>50	1.45	11.55	12.91

<sup>a</sup> 40% MeOH. <sup>b</sup> 60% MeOH. BSA: Benzenesulfonic acid, NSA: Naphthalenesulfonic acid, NOH-SA: Naphtholsulfonic acid, N-DSA: Naphthalene disulfonic acid.

Table 2. Capacity factor of aromatic carboxylic acids on the ODS column as a function of the concentration of DTAB

Compound	Concentration of DTAB, mM. <sup>a</sup>			Concentration of DTAB, mM. <sup>b</sup>		
	0.5	1.0	5.0	1.0	10	50
BA	4.36	8.55	22.18	1.64	4.95	6.91
<i>o</i> -Cl BA	4.00	8.27	21.55	1.55	4.50	6.09
<i>m</i> -Cl BA	13.55	32.91	>50	2.68	9.55	14.27
<i>p</i> -Cl BA	13.73	33.82	>50	2.73	9.64	14.50
<i>o</i> -CH <sub>3</sub> BA	4.73	9.73	23.82	1.82	5.09	7.18
<i>m</i> -CH <sub>3</sub> BA	7.09	15.09	38.09	2.09	6.00	7.91
<i>p</i> -CH <sub>3</sub> BA	7.18	15.18	37.23	2.09	6.09	8.09
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BA	5.45	12.45	30.18	1.82	5.91	7.91
<i>o</i> -Br BA	4.91	9.82	24.73	1.82	5.45	7.91
Anisic	5.45	8.36	21.73	1.68	4.50	6.09
<i>p</i> -NH <sub>2</sub> salicylic	1.82	1.91	2.00	1.45	1.73	1.82
<i>o</i> -BBA	14.45	40.18	>50	2.73	9.45	13.00
1-Naphthoic	10.36	23.36	>50	2.55	8.77	12.92
3,5-DNBA	7.73	16.73		2.18	7.64	10.18

<sup>a</sup> 40% MeOH. <sup>b</sup> 60% MeOH. BA: Benzoic acid, BBA: Benzoylbenzoic acid, DNBA: Dinitrobenzoic acid.

증가하면 모든 시료의  $1/k'$  값도 증가되어 정비례함을 보여주고 있다. 또한 1.0mM의 DTAB와 0.01M의 NaCl 용액이 들어있는 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O 이동상에서 칼럼에 주입한 시료의 양과  $1/k$  사이의 관계를 Fig. 3에 도시하였다. 이

결과도 주입한 시료의 양이 증가하면  $1/k'$  값도 정비례함을 나타내고 있는데, 이들 모두 (2)식을 만족시켜 주고 있다. 이상의 결과로 보아서 DTAB를 반대이온으로 사용할 때는 이온-상호작용에 의한 머무름이 우세하게 진행된다고 할

Table 3. Capacity factor of aromatic polycarboxylic acids on the ODS column as a function of the concentration of DTAB

Compound	Concentration of DTAB(mM) in 40% MeOH					Concentration of DTAB(mM) in 60% MeOH				
	0.0	0.2	0.5	1.0	5.0	0.0	0.5	1.0	5.0	10
Phthalic	0.00	2.27	5.82	15.27	44.91	0.00	1.18	1.64	4.00	6.18
Homophthalic	0.00	2.18	4.73	10.82	35.64	0.00	1.09	1.36	3.27	4.45
1, 2, 3-BTCA	0.00	2.36	17.64	>50		0.00	1.27	1.91	10.27	17.91
1, 2, 4-BTCA	0.00	2.36	19.36	>50		0.00	1.27	2.00	10.36	21.36
1, 3, 5-BTCA	0.00	2.36	25.00	>50		0.00	1.18	2.36	14.73	34.91
1, 2, 4, 5-BTeCA	0.00	4.73	44.18	>50		0.00	1.34	2.82	23.36	
Mellitic	0.00	5.36	>50	>50		0.00	3.36	5.18		

BTCA: Benzenetricarboxylic acid, BTeCA: Bezenetetracarboxylic acid.

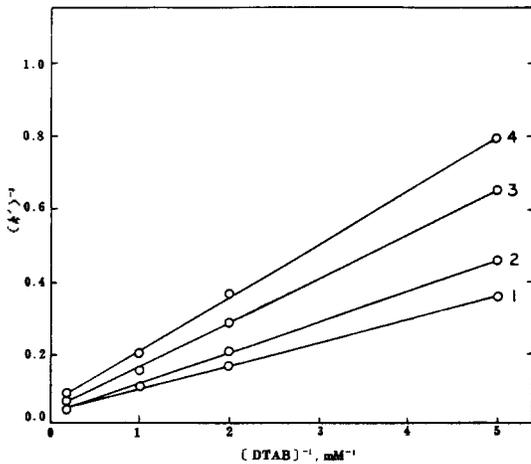


Fig. 1. The effect of DTAB concentration on the reciprocal capacity factors of aromatic acids in 40% MeOH 1: *p*-Cl BSA, 2: 1-NOH-4-SA, 3: BA, 4: BSA.

수 있다.

둘째, Table 1~3에 있는 실험결과로부터 다가유기산들과 일가의 산들에 대한 용량인자를 비교해 보면 다음과 같다. 40% MeOH 하에서 1.0 mM DTAB 를 사용하였을 때는, BSA(5.36) 및 1-NSA(7.91)보다 sulfosalicylic(16.36), N-1,5-DSA(14.55) 및 N-2,7-DSA(13.82)처럼 2가산들의 용량인자가 크며, carboxylic acid 들도 benzoic(8.55)에 비해 phthalic (15.27) 및 homophthalic (10.82) 등과 같이 2가산들의 용량인자가 크며 3가 이상의 산들은 50 이상으로 현저히 증가하였다. 그 원인은, 다가의 산들은 정전적 인력이 작용할 수 있는 자리수가 많기 때문

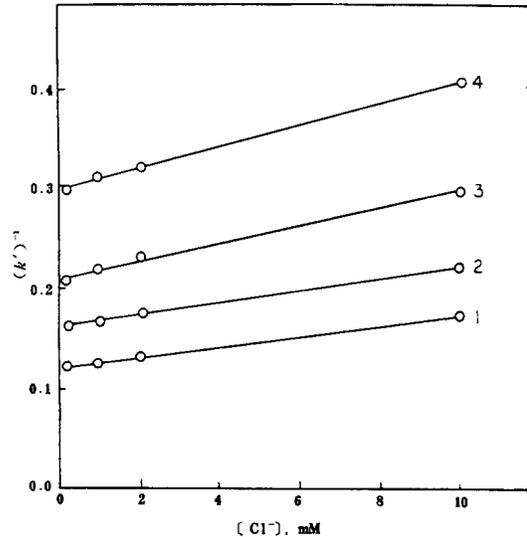


Fig. 2. The effect of ionic strength on the reciprocal capacity factors of aromatic acids. Mobile phase; 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O (v/v) containing 1.0mM DTAB. 1: Anisic, 2: *o*-Cl BA, 3: *m*-NO<sub>2</sub> BSA, 4: BSA.

에 이온-상호작용 모델로 머무름이 일어나는 DTAB 를 사용할 때는 용량인자가 증가한다고 할 수 있다.

세째, Cantwell 과 Puon 은<sup>8</sup> 이온-상호작용 모델에 의해 머무름이 일어날 경우에는 이온세기와 반대이온의 용량인자 사이에 다음과 같은 관계가 있음을 밝혀냈다.

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{C_1} + \frac{C_2}{\mu^{1/2}} \quad (3)$$

여기서 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 은 상수이고, μ 는 이온세기이

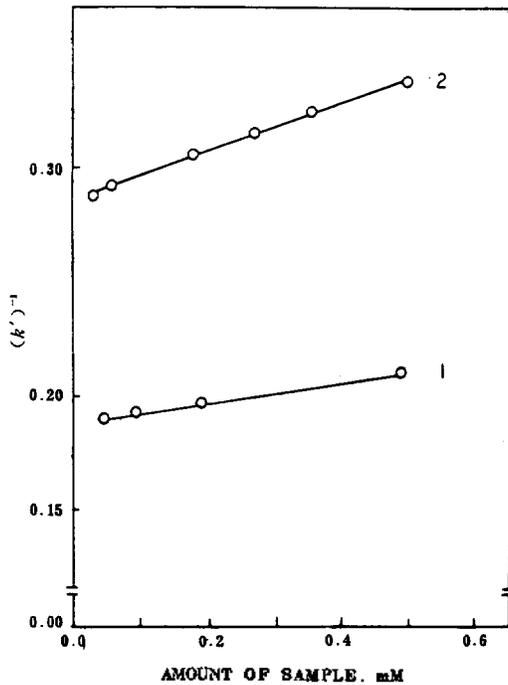


Fig. 3. The effect of amount of analytes on the reciprocal capacity factors of aromatic acids. Mobile phase; 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O(v/v) containing 1.0mM DTAB and 0.01M NaCl. 1: o-Cl BA, 2: m-NO<sub>2</sub> BA.

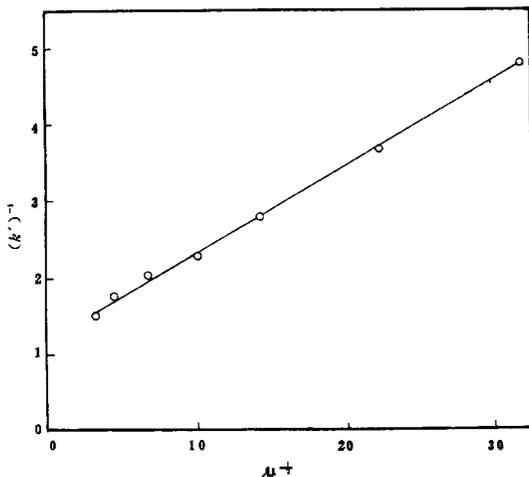


Fig. 4. The effect of ionic strength on the reciprocal capacity factors of DTAB. Mobile phase; 10% MeOH-90% H<sub>2</sub>O(v/v) containing NaCl.

다. 이온의 세기와 반대이온인 DTAB의 용량 인자와의 관계를 Fig. 4에 도시하였다. DTAB는  $\mu^{1/2}$ 에 대하여 정비례 관계가 성립하여 (3)식을 만족시켜 주고 있다. 따라서 DTAB를 반대이온으로 사용할때는 이온-상호작용 모델에 의한 머무름이 우세하게 진행된다고 할 수 있다.

이상의 결과로부터 ODS를 이용한 방향족 유기산들의 머무름 기구는 소수성이 강한 DTAB를 사용할때는 이온-상호작용 모델이 우세하다고 결론지을 수 있다.

**시료의 머무름에 영향을 미치는 여러가지 인자**  
**반대이온으로 사용한 DTAB 농도의 영향.**  
 반대이온으로 첨가한 DTAB의 농도와 시료의 용량인자와의 관계를 알아보기 위하여 40% MeOH와 60% MeOH 이동상하에서 DTAB의 농도에 따라 시료들의 용량인자를 측정하여 Table 1~3에 나타나 있다. DTAB의 농도가 증가될수록 모든 시료들의 용량인자도 증가하였음을 확인할 수 있는데, 그 원인은 DTAB의 농도가 증가할수록 칼럼에 흡착된 DTA<sup>+</sup> 이온의 수도 증가되므로 시료이온들과 이온-상호작용을 일으킬 수 있는 자리수가 많아지게 되어, 시료이온의 머무름 시간이 증가하기 때문이다.

**이동상에 첨가한 유기용매의 종류와 농도의 영향.**  
 1.0mM DTAB용액하에서 이동상에 첨가한 유기용매의 종류에 따른 시료들의 용량인자 값이 Table 4에 나타나 있다. 모든 시료들은 유기용매의 종류에 따라 용량인자가 MeOH > EtOH > AN의 순으로 감소된 것을 볼 수 있는데 이것은 유기용매의 극성이 작을수록 solvent strength가 증가되기 때문에 DTA<sup>+</sup>가 정지상에 대한 흡착량이 감소하기 때문이다.

한편, 이동상에 첨가된 MeOH의 농도가 증가하면 모든 시료들의 용량인자 값이 감소되는 것을 Table 1~3에서 볼 수 있는데, 이 원인도 MeOH의 농도가 증가하면 solvent strength가 증가하여 DTA<sup>+</sup> 및 유기시료들이 정지상에 배향하려는 성질이 작아지기 때문이다.

시료에 치환되어 있는 작용기의 종류와 위치의 영향. 유기시료에 치환된 작용기의 종류에 따라서 분자의 소수성에 영향을 미치므로 용

Table 4. Capacity factor of aromatic acids on the kind of organic solvent\*

Compound	Organic solvent			Compound	Organic solvent		
	AN	MeOH	EtOH		AN	MeOH	EtOH
BSA	1.27	5.36	4.91	<i>o</i> -Cl BA	2.55	8.27	7.41
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA	1.82	6.73	6.05	<i>o</i> -CH <sub>3</sub> BA	2.91	9.73	6.27
<i>p</i> -CH <sub>3</sub> BSA	1.91	7.09	6.27	<i>m</i> -CH <sub>3</sub> BA	3.64	15.09	7.86
<i>p</i> -Cl BSA	2.18	11.27	9.22	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> BA	3.73	15.18	7.64

\*Mobile phase; 40% organic solvent-60% H<sub>2</sub>O(v/v) containing 1.0×10<sup>-3</sup>M DTAB.

량인자의 차이가 나타날 것으로 생각된다. 40% MeOH, 1.0mM DTAB 용액 하에서 측정된 시료들의 용량인자를 Table 1에서 비교해 보면 다음과 같은 순서로 증가하였다.

BSA(5.36) < *m*-NO<sub>2</sub> BSA(6.73) < *p*-CH<sub>3</sub> BSA(7.09) < *p*-Cl BSA(11.27) < *p*-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> BSA(12.09) < 1-NSA(14.91) < sulfosalicylic(37.27)

일반적으로 작용기의 소수성이 증가할수록 용량인자도 큰 값을 가지는데, 그 원인은 분리관에 흡착된 DTA<sup>+</sup> 이온과 시료가 쌍을 형성하면 소수성이 더욱 커져서 H<sub>2</sub>O-MeOH 이동상과의 친화력이 감소하기 때문이다.

1.0mM DTAB, 40% MeOH 하에서 카르복시산들에 대한 용량인자를 Table 2에서 비교해 보면, 위와 같은 원인으로

*p*-NH<sub>2</sub> salicylic(1.91) < anisic(8.36) < benzoic(8.55) < *o*-CH<sub>3</sub>BA(9.73) < *o*-Br BA(9.82) < 1, naphthoic(23.36) < *o*-benzoyl BA(40.18)의 순서로 작용기의 소수성이 증가할수록 큰 값을 가지고 있다.

한편 분자식이 같은 시료일지라도 작용기의 위치에 따라서 소수성의 정도가 달라지기 때문에 머무른 시간의 차이가 생긴다. 친수성 원자단이 있는 경우를 비교해 보면, 40% MeOH 이동상에서는 1-naphthol-5-SA(6.64) < 1-naphthol-4-SA(8.27) < 1-naphthol-8-SA(26.27)의 순서로 증가되었다. 이것은 -OH 원자단이 -SO<sub>3</sub>H 원자단과 멀리 떨어질수록 -SO<sub>3</sub>H 기는 -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>로 이온화되어 DTA<sup>+</sup> 이온과 이온-상호작용을 일으키는데 반해서, -OH기는 극성인 이동상에 친화력으로 작용하므로 시료의 머무름을 방해하는 역할을 하기 때문에 용량인자가 감소하는 것

으로 여겨진다. 그러나 친수성 원자단인 -OH기가 -SO<sub>3</sub>H기와 인접해 있는 1-naphthol-8-SA의 경우는 머무른 시간이 많이 증가되었는데, 그 원인은 DTA<sup>+</sup> 이온과 -SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 이온이 정전기적 인력이 작용할 때, 그 힘을 -OH 원자단이 강하게 해주고, 다른 부분은 소수성이 강하기 때문에 극성인 이동상과의 친화력이 약해져서 용량인자가 증가 한다고 볼 수 있다.

그리고 소수성을 띤 작용기로 치환된 시료들의 용량인자를 치환기의 위치에 따라 비교한 결과, 친수성 작용기로 치환된 시료와 정반대 현상을 보였다. Table 2에 나와있는 chlorobenzoic acid 들과 methylbenzoic acid 들의 용량인자 값을 보면, *o*-Cl BA(8.27) < *m*-Cl BA(32.91) < *p*-Cl BA(33.82), *o*-CH<sub>3</sub> BA(9.73) < *m*-CH<sub>3</sub> BA(15.09) < *p*-CH<sub>3</sub> BA(15.18) 첨가와 같이 오르토 < 메타 < 파라의 순으로 증가하였음을 알 수 있다.

**이동상에 첨가한 co-Anion 농도의 영향.** 이온의 세기가 시료의 머무름에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이동상에 염소이온을 첨가하여 보았다. 염소이온의 농도에 따라 측정된 시료들의 용량인자 값이 Table 5에 나타나 있다. 염소이온의 농도가 상당히 높을 때는 용량인자는 큰 영향을 받지 않았으나, 2.0mM 이상으로 커지면 많은 영향을 받음을 알 수 있었다. 시료이온과 염소이온이 같은 음전하를 띠고 있기 때문에 경쟁적으로 반대이온과 이온-상호작용을 일으키려고 하는 경쟁효과에 의해 시료들의 머무른 시간이 상대적으로 짧아진다고 볼 수 있다.

**pH의 영향.** 본 연구에서 사용한 시료들은 모두 유기산이므로 칼럼에 흡착되는 시료들의 머무른 시간은 pH에 많은 영향을 받는다.

따라서 pH의 영향을 알아보기 위해 이동상에 반대이온을 첨가하지 않았을 때와 첨가하였을 때의, pH에 따른 시료들의 용량인자 값을 측정 한 결과를 Table 6에 표시하였다. Table 6에서 보는 바와같이 반대이온 DTAB가 존재하지 않을 때는 용량인자가 작을뿐 아니라 pH가 증가할수록 크게 감소함을 보여준다. 이것은 본 연구에서 사용한 분리관이 소수성이므로 pH가 증가할수록 시료가 이온화 함으로 흡착이 감소하기 때문이다. 낮은 pH에서 시료가 일부 분자상태로 존재함으로 분자흡착이 일어난다. 특히 pK<sub>a</sub> 값이 큰 시료들이 낮은 pH에서 용량인자가 큼을 보여준다.

한편, DTAB를 첨가하였을 때는 DTAB가 없을 때와 반대현상으로 나타났음을 확인 할 수 있다. 즉 낮은 pH에서는 작은 값을 가지고 있다가 pH가 증가하면 용량인자가 급격히 증가되었다가 일정한 값을 유지하였다. DTAB를 반대이온으로 사용했을 때는 머무름 기구가 이온-상호작용 모델이기 때문에 분리관은 DTA<sup>+</sup>이온이 일차 흡착층을 이루어 양전기를 띠고 있다. 그런데 낮은 pH에서는 유기산이 분자상태로 존재하기 때문에 분리관과 정전기적 인력이 작용하지 못함으로 머무름 시간이 짧아지는 것이다. pH가 증가하면 시료들은 이온상태로 전리됨으로 분리관과 정전기적 인력이 작용함으로 머무름

Table 5. Capacity factor of aromatic sulfonic acids on the ODS column as a function of the ionic strength in the presence of DTAB\*

Compound	Concentration of Chloride Ion, mM					
	0.0	0.2	1.0	2.0	10	100
BSA	5.36	3.36	3.18	3.18	2.64	1.82
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA	6.73	4.77	4.36	4.36	3.45	2.64
<i>p</i> -CH <sub>3</sub> BSA	7.09	5.64	5.55	5.26	4.09	2.73
<i>p</i> -Cl BSA	11.27	8.09	7.91	7.82	5.82	4.45
<i>p</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> BSA	12.09	9.18	9.18	9.00	7.27	4.91

\* Mobil phase; 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O(v/v) containing 1.0×10<sup>-3</sup>M DTAB.

시간이 증가된다고 볼 수 있다.

#### 혼합시료의 분리

지금까지의 실험결과를 토대로해서 benzenesulfonic acid 들의 혼합물을 분리할 수 있는 최적 조건은 1.0mM DTAB, 0.01M NaCl, pH를 2.0으로 완충시킨 40% MeOH 이동상으로는 8종의 시료를 분리할 수 있었다. 이들 조건하에서 혼합시료를 분리한 chromatogram이 Fig. 5에 나타나 있다. 그리고 benzoic acid와 그 유도체들의 혼합시료를 효과적으로 분리 할 수 있는 조건은 Fig. 6에 나와 있듯이, 1.0mM DTAB, 0.01M NaCl, pH를 3.0으로 완충시킨 40% MeOH를 이동상으로 사용하였을 때는 12종의 시료를 분리할 수 있었다.

Table 6. Capacity factor of aromatic acids on the ODS column as a function of pH in the absence and presence of DTAB\*

Compound	pK <sub>a1</sub>	Absence of DTAB						1.0×10 <sup>-3</sup> M DTAB					
		pH						pH					
		2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
BSA		1.27	0.81	0.77	0.55	0.50	0.42	2.86	5.82	6.50	6.73	6.73	6.73
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA		1.45	1.00	0.91	0.64	0.55	0.45	3.45	8.09	9.00	9.09	9.14	9.09
1-NSA		1.82	1.45	1.45	1.18	0.73	0.52	12.18	28.55	31.27	32.64	32.73	32.73
BA	4.20	3.00	3.00	3.00	0.82	0.73	0.05	3.18	3.27	4.00	6.50	11.95	12.09
<i>o</i> -Cl BA	2.92	3.00	2.91	1.82	0.77	0.64	0.45	3.82	4.55	10.09	10.14	10.27	10.27
<i>p</i> -Cl BA	3.98	6.64	6.55	6.27	1.64	1.55	0.77	7.64	7.82	12.18	27.41	27.82	27.82
Phthalic	2.89	1.36	1.36	1.27	0.73	0.45	0.33	1.73	3.36	7.41	11.95	12.64	12.73
Homophthalic	3.72	1.82	1.82	1.73	0.78	0.55	0.36	2.27	2.55	4.00	11.27	11.64	11.82

\* Mobile phase; 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O(v/v) containing 0.01M NaCl.

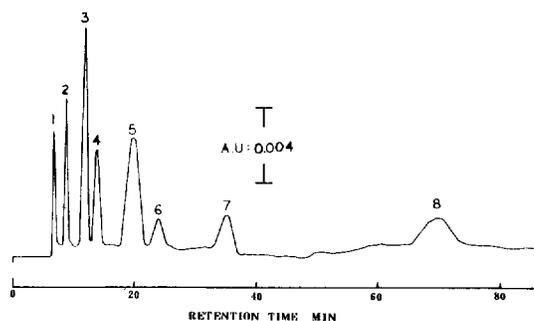


Fig. 5. Separation of aromatic sulfonic acids at pH 2.00. Mobile phase; 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O(v/v) containing  $1.00 \times 10^{-3} M$  DTAB and 0.01M NaCl. 1: 2-NH<sub>2</sub>-1-NSA (0.2 $\mu$ g), 2: BSA (2.8 $\mu$ g), 3: *m*-NO<sub>2</sub> BSA (0.15 $\mu$ g), 4: *p*-CH<sub>3</sub> BSA (3.4 $\mu$ g), 5: *p*-Cl BSA (11.5 $\mu$ g), 6: *p*-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> BSA (1.86 $\mu$ g), 7: 1-NSA (0.9 $\mu$ g), 8: 1-NOH-8-SA (0.8 $\mu$ g).

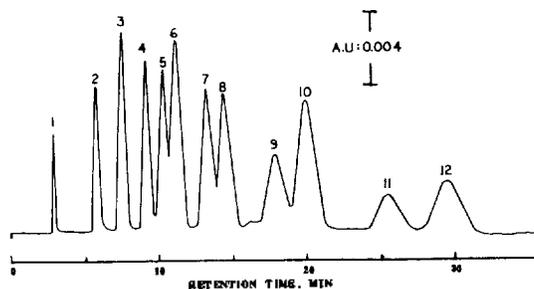


Fig. 6. Separation of aromatic carboxylic acids at pH 3.00. Mobile phase; 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O(v/v) containing  $1.00 \times 10^{-3} M$  DTAB and 0.01M NaCl. 1: *p*-NH<sub>2</sub> salicylic (0.3 $\mu$ g), 2: 1,2,3-BTCA (0.5 $\mu$ g), 3: Homophthalic (0.72 $\mu$ g), 4: BA (0.4 $\mu$ g), 5: 1,2,4-BTCA (0.17 $\mu$ g), 6: Anisic (0.06 $\mu$ g), 7: *m*-NO<sub>2</sub> BA (0.13 $\mu$ g), 8: *p*-CH<sub>3</sub> BA (0.22 $\mu$ g), 9: 1,2,4,5-BTeCA (0.2 $\mu$ g), 10: *p*-Cl BA (0.63 $\mu$ g), 11: 1-Naphthoic (0.34 $\mu$ g), 12: 3,5-DNBA (0.08 $\mu$ g).

본 연구는 1986년도 한국과학재단 연구비 지원에 의하여 이루어진 것이며 이에 사의를 표하는 바이다.

### 인용문헌

1. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to modern liquid chromatography", 2nd. Ed., P.454, Wiley, New York, 1979.
2. K. G. Wahlund and U. Lund, *J. Chromatogr.*, **122**, 269 (1976).
3. D. P. Wittmer, N. O. Nuescle and W. G. Haney, Jr., *Anal. Chem.*, **47**, 1422 (1975).
4. P. T. Kissinger, *Anal. Chem.*, **49**, 883 (1977).
5. J. H. Knox and G. R. Laird, *J. Chromatogr.*, **122**, 17 (1976).
6. J. H. Knox and J. Jurand, *ibid*, **125**, 89 (1976).
7. J. H. Knox and J. Jurand *ibid*, **149**, 287 (1978).
8. F. F. Cantwell and S. Poun, *Anal. Chem.*, **51**, 623 (1979).
9. B. A. Bidlingmeyer and F. V. Warren, Jr., *ibid.*, **54**, 2351 (1982).
10. T. D. Rotsch and D. J. Pietrzyk, *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 88(1981).
11. N. E. Hoffman and J. C. Liao, *Anal. Chem.*, **49**, 2231 (1977).
12. C. T. Hung and R. B. Taylor, *J. Chromatogr.*, **202**, 333 (1980).
13. Z. Iskandarani and D. J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **54**, 1065 (1982).
14. Z. Iskandarani and D. J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **54**, 2427 (1982).
15. D. J. Pietrzyk, E. P. Kroeff and T. D. Rotsch, *ibid*, **50**, 497 (1978).
16. E. P. Kroeff and D. J. Pietrzyk, *ibid*, **50**, 502 (1977).