

자외선 흡수물질을 이용한 역상 액체 크로마토그래피에 의한 비흡수 지방족 화합물들의 검출과 분리

李承錫[†] · 姜三祐 · 吳海範*

한남대학교 이과대학 화학과

*전주우석대학 이학부 화학과

(1991. 3. 13 접수)

Separation and Detection of Nonchromophore Aliphatic Compounds by Reversed-Phase Liquid Chromatography using Ultraviolet-Absorbing Reagent

Seung-Seok Lee[†], Sam-Woo Kang and Hae-Beom Oh*

Department of Chemistry, Han Nam University, Tae-Jon 300-791, Korea

Department of Chemistry, Jeonju Woo Seok College, Wanju 565-800, Korea

(Received March 13, 1991)

요 약. 역상 액체크로마토그래피에서, 간접 분광광도법으로 비발색단 물질인 지방족산, 지방족알코올 및 tetraalkylammonium 염들을 검출할 수 있었다. Benzyltriethylammonium bromide(BTEAB)를 검출시약으로 사용하였다. 또한 시료들의 머무름 기구와 시료들의 머무른 시간에 영향을 미치는 여러 가지 인자 즉, 검출시약의 농도, 메탄올의 농도, 이동상에 첨가한 화합물의 종류와 농도, 이동상의 온도와 pH, 시료분자에 있는 작용기의 종류에 대하여 알아보았다. 그리고 최적조건하에서 몇 가지 혼합시료들을 분리할 수 있었다.

ABSTRACT. Nonchromophore compounds such as aliphatic acids, alcohols and tetraalkylammonium salts could be detected by indirect photometric detection on the reversed-phase liquid chromatography. Benzyltriethylammonium bromide(BTEAB) was used as a detection reagent. Also, the retention mechanism and response of samples were investigated to the several factors such as pH, temperature, and concentration of MeOH as well as concentration of detection reagents in mobile phase. And some mixture of samples were able to be separated under optimum condition.

서 론

고성능 액체크로마토그래피(HPLC)에서 가장 중요한 부분으로 분리관용 들 수 있지만, 시료가 점점 극미량화 해감에 따라 그에 못지 않은 검출기(detector) 역시 중요한 부분을 차지한다. 검출기의 종류로는 전기전도도 검출기와 R. I.(Refractive Index) 검출기 그리고 UV검출기 등이 있다. 예전에는 자외선이나 가시광선 같은 복사선을 흡수하지 않는 이온성 시료들의 검출은 전기전도도를 사용하였다^{1,2}. 또한 R. I 검출기가 많이 사용되고 있는데, R. I 검출기는 시료의 제한을 거의 받지 않는 장점이 있으나

온도에 의한 영향에 민감하여, 시료와 이동상 간의 굴절율 차이가 있어야만 검출이 가능하고 감도가 떨어지는 단점이 있다. 그러나 UV검출기는 감도는 대단히 좋으나 시료의 제한을 받는다. 즉 시료가 발색단을 가지고 있어야만 검출될 수 있는 단점을 지니고 있다. UV검출기의 이러한 단점을 보완하고자 많은 연구가 진행되고 있는데, 자외선이나 가시광선에 대한 물 흡광계수가 큰 검출시약(Detection Agent)을 이동상에 첨가하고 분광 광도검출기를 사용하여 간접적으로 시료를 검출하는 간접 분광광도법(indirect photometric method)을 이용하면 비

발색단의 물질을 효과적으로 분리 및 검출할 수 있다. 이러한 기술을 응용하여 지방족 유기화합물과 유기 및 무기 이온성화합물 등을 UV검출기에 의한 분리연구 논문이 많이 발표되었다. 이온쌍크로마토그래피법에 의해 Herrmann 등³은 tetra-butylammonium(TBA)-*p*-toluenesulphonate를 이온쌍 양이온으로 사용하여 음료수, 과일쥬스, 요구르트 그리고 비스켓내의 인공 감미료인 cyclamate, saccharin 그리고 aspartam 등을 분석하였으며, Helboe⁴는 long-chain alkyltrimethylammonium 이온의 분리와 정량을 위해 여러 가지 종류의 bounded phase 컬럼과 반대 이온으로 *p*-toluenesulphate를 사용하여 각각에 대한 영향을 조사하였다. Schill 등⁵⁻⁷은 자외선 흡수 이온종으로서 양이온으로 1-phenethyl-2-picolinium을 사용하여 지방족 알코올, alkylsulphonate, alkylsulphate, 지방족 카르복시산, 아미노산 등을 분리 및 검출하였고, 자외선 흡수 이온종의 전하에 따라 시료들의 봉우리 방향이 결정되어지고, 또 검출시약과 시료들의 용량인자의 크기에 따라서 system peak와 시료peak의 방향이 바뀌어 진다는 것을 밝혀냈다. 이온-상호작용 모델⁸⁻¹⁰에 관한 연구를 알아보면 Bidlingmeyer 등⁸은 자외선 흡수 이온-상호작용 시약으로 cetylpyridium chloride를 사용하여 alkylsulfonate를 분리 및 검출하였으며 이동상의 이온강도에 따른 시료들의 머무른 시간과 검출감응을 조사하였는데 이동상의 이온강도가 증가할수록 시료들의 머무른 시간은 짧아졌고 검출감응은 약화됨을 알았다. Barber와 Carr는 자외선 흡수물질인 방향족 quaternaryammonium 염을 검출시약으로 사용하여 무기이온들에 대해 연구하였는데 먼저 자외선의 흡수가 약한 무기음이온들의 분리과 검출을 하였고⁹, 시료를 nmole까지 검출 할 수 있었으며 머무름과 선택성을 조절하기 위한 여러 인자를 조사하였다¹⁰. 또한 검출시약의 농도와 물 흡광계수에 따르는 시료들의 감응도와 검출에 대한 조절인자를 연구하였다¹¹. Kang¹²은 검출시약으로 양이온성 염료인 methylene blue를 사용하여 유기 및 무기음이온을 가시광선 영역인 665 nm에서 검출 및 분리를 하였다.

본 연구는 비발색단이며 양이온성인 tetraalkylammonium 염, 음이온성인 지방족 카르복시산과 아

미노산 그리고 비이온성인 지방족 알코올을 시료로 하고 검출시약으로 양이온성인 Benzyltriethylammonium bromide(BTEAB)를 극성인 이동상에 첨가하여 각각의 시료에 대한 간접 검출 및 정량가능성을 측정하고, 검출시약에 따른 머무름 기구를 규명하고자 하였고, 시료의 용량 인자에 영향을 미칠 것으로 예상되는 여러 인자들에 대해 조사하였다. 그리고 이를 토대로하여, 최적조건에서 몇 가지의 혼합시료를 분리하였다.

실 험

시약

본 실험에서 사용한 시료들은 formic acid(FA), acetic acid(HAc)와 ethanol(EtOH)은 E. Merck제품, *n*-propanoic acid(*n*-PrA), tetramethylammonium bromide(TMAB)와 isopropanol(*i*-PrOH)은 Aldrich Chemicals제품, *n*-butyric acid(*n*-BuA), succinic acid(SuA), adipic acid(AdA), DL-aspartic acid(DL-AspA), allyl alcohol(AllylOH)과 isoamyl alcohol(*i*-AmylOH)은 Kanto Chemicals제품, *n*-valeric acid(*n*-VaA)는 Waco Chemicals제품, *n*-hexanoic acid(*n*-HexA), crotonic acid(CrA), DL- α -alanine(DL- α -Ala), DL-glutamic acid(DL-GluA), *n*-pentanol(*n*-PenOH), *n*-hexanol(*n*-HexOH), *t*-butanol(*t*-BuOH), 2-pentanol(2-PenOH)와 *t*-amyl alcohol(*t*-AmylOH)은 B. D. H Chemicals제품, pimeiric acid(PiA)는 Sigma Chemicals제품, glycine(Gly)과 2-butanol(2-BuOH)은¹ Hanawa Chemicals제품, tetraethylammonium bromide(TEAB), tetrapropylammonium bromide(TPAB)와 tetrabutylammonium bromide(TBAB)는 Tokyo Kasei Chemicals제품, *n*-propanol(*n*-PrOH)은, T. J. Baker제품, *n*-butanol(*n*-BuOH)은 Tedia제품의 특급시약이었고 검출시약인 benzyltriethylammonium bromide(BTEAB)는 Fluka제품의 특급시약으로 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 이동상으로 사용한 유기용매인 메탄올은 Mallinckrodt제품 HPLC용을 사용하였고, 물은 이차중류하여 이온교환수지에 통과시킨 탈 이온수를 사용하였다.

측정기기

본 실험에서 사용한 고성능 액체크로마토그래피

(HPLC)는 Pye-Unicam 제품으로, 펌프는 PU 4010 이중 펌프, 검출기는 PU 4020 분광광도검출기로 시료들을 분석하였다. 컬럼에 시료를 주입하기 위한 injector는 20 μ rotary valve injector를 사용하였으며, 기록기는 PM 8251 기록기를 사용하였다. 이동상과 분리관의 온도를 일정하게 유지하고, 조절하기 위하여 HAAKE Instrument사의 Model FK 항온 순환기를 사용하였고, 분리관에서 water jacket를 장치하였다. 그리고 이동상의 pH를 조절하기 위해 동우 메디칼사의 DS-201HS pH meter를 사용하였다. 분리관은 실리카 표면에 알킬기를 화학적으로 결합시킨 직경이 10 μ m인 입자들을 내경이 0.46 cm, 길이가 25 cm인 스테인레스관에 고압으로 충전시켜 상용화한 Whatman사의 Partisil 10 ODS-3 분리관이었다.

실험방법

용리액 및 시료의 조제. 유기용매, 증류수와 검출시약을 주어진 실험 조건에 따라 일정한 농도로 이동상을 만든 다음, ultrasonic bath에서 용액 속에 녹아 있는 공기를 제거하고, 0.45 μ m millipore 여과지로 흡인여과하여 사용하였다. 시료는 실험 조건에 따라 일정한 농도로 만들었으며, 혼합시료의 경우 용해도를 고려하여 만들었고 정확한 시료의 조제를 위해 Bosch S-2000 Analytical Balance를 사용하였다.

실험절차. 분리관에 시료를 주입하기 전에 이동상을 통과시켜, 이동상과 분리관 사이에 평형이 되도록 하였다. 평형이 이루어 졌을 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. 시료는 1.0 mM에서 10.0 mM농도로 만들어 20 μ 씩 주입하였으며 시료의 검출은 BTEAB의 λ_{max} 인 263 nm에서 측정하였다. 모든 실험은 분리관의 온도 영향을 고려하여 25°C에서 수행하였으며, 온도 변화에 대한 시료들의 용량인자도 고찰하였다. 그리고 시료의 용량인자(k')를 다음 식을 계산하였다.

$$k' = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

여기서 T_R 은 시료의 머무른 시간이고 T_0 은 이동상의 머무른 시간이다. 실험에서 측정된 용량인자를 토대로하여 분리될 수 있는 시료들을 알맞은 조건에서 혼합하여 분리 크로마토그램을 얻었다.

결과 및 고찰

시료의 봉우리 방향

검출시약과 시료의 종류에 따른 봉우리의 방향에 대하여 살펴 보면 모든 시료에 있어서 봉우리의 방향이 같은 형태를 보였다. Fig. 1은 n-Butyric acid와 n-Valeric acid의 크로마토그램이다. Fig. 1에서 크로마토그램은 두 개의 system peak(S_1 , S_2)와 시료 peak를 보여주고 있다. S_1 은 시료의 용매로 사용한 MeOH의 system peak이고 S_2 는 검출시약인 BTEAB의 system peak이다. Fig. 1에서 S_1 의 방향이 (A)에서는 음의 방향이고 (B)에서는 양의 방향이다. 이는 용매의 MeOH 농도가 이동상의 MeOH 농도보다 적을 때는 음의 방향으로 나타나고, 반대인 경우에는 양의 방향으로 나타낸다. 이 이유는 검출시약인 BTEAB가 이동상과 정지상 사이에서 평형을 이루고 있을 때 시료를 주입하면 시료의 용매 MeOH이 이동상의 MeOH보다 적으므로 평형은 깨어지고 이동상의 BTEAB가 정지상으로 이동된다. 따라서 이동상의 BTEAB의 농도가 감소되므로 음의 방향을 나타낸다. 반대로 시료용매의 MeOH 농도가

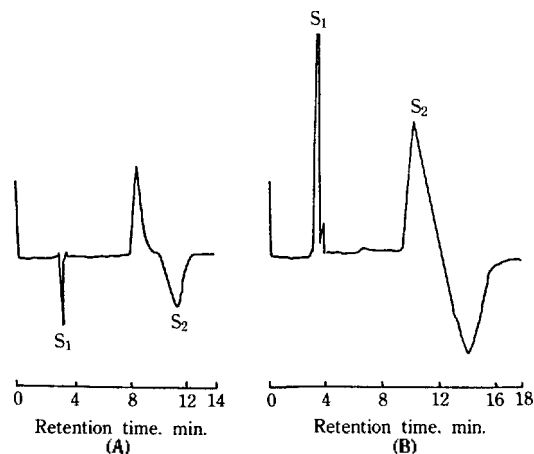


Fig. 1. Chromatograms of (A) n-BuA and (B) n-VaA. Mobile phase: 20% MeOH-80% H₂O(v/v) containing 1.0 $\times 10^{-4}$ M BTEAB and 0.5% HAc. S₁, S₂: system peak.

이동상의 MeOH보다 크면 평형은 정지상의 BTEAB가 이동상으로 이동되어 BTEAB농도가 증가되므로 양의 방향을 나타내게 된다. Fig. 1(A)에서 시료의 용량인자가 검출시약의 용량인자보다 작을 때에는 시료 peak는 양의 방향을 나타내고 system peak는 음의 방향을 나타낸다. 이는 시료가 먼저 용리될 때 정지상의 BTEAB와 coelution되므로 시료 peak는 양의 방향이고 그 결과 정지상의 BTEAB의 농도가 감소되어 다시 평형을 유지하기 위하여 이동상의 BTEAB가 정지상으로 이동되어지므로 S₂ peak는 음의 방향을 나타낸다. 반대로 Fig. 1(B)에서

Table 1. Capacity factors of analytes on the Partisil 10 ODS-3 as a function of the concentration of BTEAB in 10% MeOH with 0.5% HAc

COMPOUND	BTEAB($\times 10^{-4} M$)			
	1.00	2.00	3.00	5.00
FA	0.21	0.21	0.24	0.29
HAc	0.24	0.29	0.35	0.59
n-PrA	0.71	0.82	0.94	1.18
n-BuA	2.82	3.24	3.44	3.59
n-VaA	5.00	5.59	5.85	6.06
n-HexX	6.94	7.76	8.00	8.32
SuA	0.62	0.65	0.71	0.82
AdA	2.18	2.73	2.97	3.24
PiA	2.24	2.82	3.06	3.35
CrA	3.09	3.56	3.74	3.94
Gly	0.03	0.03	0.03	0.06
DL- α -Ala	0.06	0.06	0.09	0.12
DL-AspA	0.59	0.62	0.65	0.71
DL-GluA	0.29	0.32	0.35	0.47
TMAB	0.18	0.18	0.18	0.15
TEAB	0.35	0.29	0.24	0.21
TPAB	1.06	1.03	1.00	0.88
TBAB	1.35	1.24	1.18	1.06
EtOH	0.29	0.24	0.24	0.21
n-PrOH	0.94	0.88	0.79	0.76
n-BuOH	2.41	1.94	1.65	1.35
n-PenOH	8.71	7.94	7.65	7.53
n-HexOH	17.82	13.24	11.41	9.88
i-PrOH	0.76	0.71	0.68	0.65
AllylOH	0.53	0.47	0.47	0.41
2-BuOH	2.00	1.74	1.53	1.29
t-BuOH	1.65	1.38	1.35	1.12
2-PenOH	6.53	6.32	6.12	5.88
i-AmylOH	6.88	6.62	6.47	6.12
t-AmylOH	4.47	4.35	4.21	4.00

시료의 용량인자가 클 때에는 시료 peak는 음의 방향을 나타내고 system peak는 양의 방향을 나타냈다. 이것은 정지상의 BTEAB가 시료와 치환되어 용리되므로 S₂는 양의 방향을 나타내고 이어서 시료가 용리될 때 시료에 치환되었던 자리에 deficiency가 생겨 다시 평형을 유지하기 위하여 이동상의 BTEAB가 정지상으로 이동되어 BTEAB농도가 감소되어 음의 방향을 나타낸다.

시료의 종류에 따른 머무름 기구

검출시약으로 사용한 BTEAB가 양이온성이므로 음이온성시료인 지방족 카르복시산과 아미노산들의 머무름기구를 살펴보면 Table 1에 나타난 것과 같이 반대 이온으로 사용한 BTEAB의 농도가 증가하면 시료들의 용량인자도 증가하였는데, 이들의 관계를 알아보기 위하여 그림으로 도시한 것이 Fig. 2이다. 몇 가지 시료들의 (k')⁻¹값들이 모두 [BTEAB]⁻¹에 정비례함을 알 수 있다. 이것은 Pietrzyk 등¹⁶이 이온-상호작용 모델에 대한 이론에서 유도한

$$\frac{1}{k'} = \frac{A}{[Q^+]} + B[C^-] + F[X^-] \text{ 식 중,}$$

$$\frac{1}{k'} \text{ 과 } \frac{A}{[Q^+]} \text{ 의}$$

관계와 일치하고 있음을 의미한다. 여기서 k' 는 시

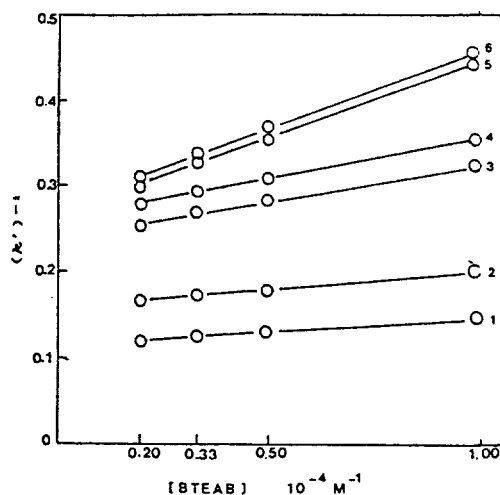


Fig. 2. The effect of BTEAB concentration on the reciprocal capacity factors of anionic analytes in 10% MeOH, 0.5% HAc. 1: n-HexA, 2: n-VaA, 3: CrA, 4: n-BuA, 5: PiA, 6: AdA.

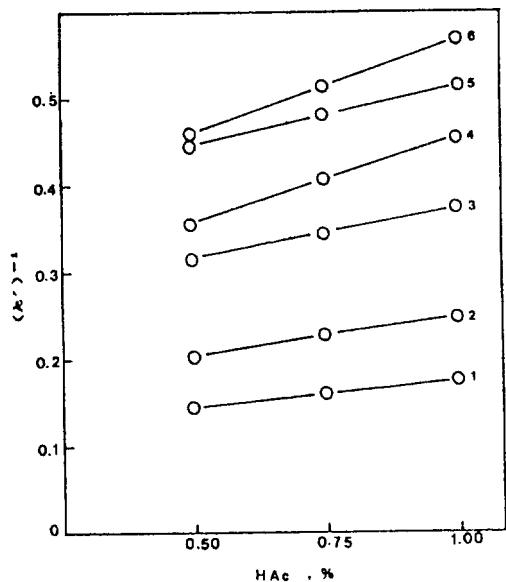


Fig. 3. The effect of HAc concentration on the reciprocal capacity factors of anionic analytes in $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 10% MeOH. 1: *n*-HexA, 2: *n*-VaA, 3: CrA, 4: *n*-BuA, 5: PiA, 6: AdA.

료의 용량인자이며, $[Q^-]$ 는 반대 이온의 농도이고 $[C^-]$ 는 co-anion의 농도, $[X^-]$ 는 시료이온의 농도이며 A, B, F는 상수이다. 그리고 $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 10% MeOH 이동상에 첨가한 Ac^- 이온의 농도와 시료들의 $(k')^{-1}$ 값과의 관계를 도식한 그림이 Fig. 3에 나타나 있는데, co-anion의 농도가 증가하면 모든 시료의 $(k')^{-1}$ 값도 증가되어 정비례함을 보여주고 있다. 이 결과 위식에 나타난 바와 같이 co-anion의 농도인 $[C^-]$ 가 $(k')^{-1}$ 에 비례한다는 이온-상호작용 모델의 조건을 만족시켜주고 있다. 이상의 결과로 BTEAB를 검출시약으로 사용할 때 음이온성 시료들과의 머무름 기구는 이온-상호작용이라 할 수 있다. 다음으로, 중성시료인 지방족 알코올과 검출시약과 같은 이온성인 tetraalkylammonium 염 시료에 대하여 살펴 보면 BTEAB의 농도가 증가함에 따라 시료들의 용량인자가 감소하였다. 이런 현상은 어떤 특정 머무름기구에 의한 것이 아니고 검출시약과 시료간의 정전기적 현상에 의해 일어나는 것이라 할 수 있다. BTEAB와 같은 전하를 갖은 tetraalkylammonium 염들은 서로간의 반발력이 있으므로 BTEAB의 농도가 증가할수록 용량인

자가 감소한다고 생각되고, 중성시료인 지방족 알코올은 BTEAB의 농도가 증가할수록 고정상에 흡착되는 검출시약의 양이 많아지므로 시료들의 흡착자리가 감소하여 용량인자가 감소될 것이다.

시료의 머무름에 영향을 미치는 여러 가지 인자 검출시약으로 사용한 BTEAB의 농도 영향. 검출시약으로 첨가한 BTEAB의 농도와 시료의 용량인자와의 관계를 알아보기 위하여 10% MeOH와 0.5% 아세트산 이동상에서 BTEAB의 농도에 따라 시료들의 용량인자를 측정된 결과가 Table 1에 나타나 있다. 먼저 검출시약과 이온성이 반대인 지방족 카르복시산과 아미노산들에 대하여 살펴 보면, 여기서 BTEAB는 반대이온 역할을 하게 되는데 BTEAB의 농도가 증가함에 따라 시료들의 용량인자가 증가함을 알 수 있는데 그 이유는 BTEAB의 농도가 증가할수록 정지상에 흡착되는 $BTEA^+$ 이온의 수도 증가되므로 시료이온들과 이온-상호작용을 일으킬 수 있는 자리수가 많아지게 되어, 시료이온의 머무름 시간이 증가하기 때문이다. 다음으로 검출시약과 같은 이온성인 tetraalkylammonium 염들의 용량인자를 보면 BTEAB의 농도증가에 따라 감소하는 현상을 보이는데 이는 BTEAB의 농도가 증가하면 정지상에 흡착되는 $BTEA^+$ 이온수는 증가하므로 정전기적 반발력에 의해 용량인자가 감소할 것이다. 중성시료인 지방족 알코올인 경우에도 양이온성 시료와 마찬가지로 BTEAB의 농도가 증가하면 지방족 알코올이 흡착할 수 있는 자리가 감소함으로써 시료의 머무름 시간이 감소한다.

이동상에 첨가한 메탄올의 농도. $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 0.5% 아세트산의 용리액하에서 메탄올의 농도 변화에 따른 시료들의 용량인자를 Table 2에 나타냈다. 이동상에 첨가하는 메탄올의 농도가 증가하면 모든 시료의 용량인자가 감소하는 현상을 보이고 있다. 이 원인은 메탄올의 농도가 증가하면 solvent strength가 증가하여 유기시료들이 정지상에 배향하려는 성질이 작아지게 되므로 메탄올의 농도가 증가할수록 시료의 용량인자는 감소하게 된다.

용량인자에 대한 온도의 영향. 이동상의 온도와 이에 따른 용량인자의 변화를 알아보기 위하여 $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 10% MeOH, 0.5% HAc 이동상하에서 온도를 25°C에서 50°C까지 변화시키면서 실험

Table 2. Capacity factors of analytes on the Partisil 10 ODS-3 as a function of the concentration of MeOH in $10 \times 10^{-4} M$ BTEAB with 0.5% HAc.

COMPOUND	MeOH(%)			
	0	5	10	20
FA	0.32	0.24	0.21	0.12
HAc	0.35	0.26	0.24	0.12
<i>n</i> -PrA	1.18	0.82	0.71	0.38
<i>n</i> -BuA	4.18	3.91	2.82	1.47
<i>n</i> -VaA	8.88	6.06	5.00	3.18
<i>n</i> -HexA	10.18	7.82	6.94	4.53
SuA	1.26	0.76	0.62	0.32
AdA	4.00	3.06	2.18	0.94
PiA	4.38	2.76	2.24	1.29
CrA	7.47	4.56	3.09	1.59
Gly	0.18	0.03	0.03	-0.06
DL- α -Ala	0.24	0.06	0.06	-0.06
DL-AspA	1.12	0.76	0.59	0.29
DL-GluA	0.85	0.47	0.29	0.09
TMAB	0.29	0.18	0.18	0.00
TEAB	1.50	0.47	0.35	0.18
TPAB	3.12	1.53	1.06	0.47
TBAB	4.32	2.18	1.35	0.64
EtOH	0.53	0.29	0.29	0.15
<i>n</i> -PrOH	1.41	1.00	0.94	0.50
<i>n</i> -BuOH	4.41	2.82	2.41	1.29
<i>n</i> -PenOH	13.35	10.59	8.71	7.47
<i>n</i> -HexOH	-	-	17.82	13.12
<i>i</i> -PrOH	1.35	0.85	0.76	0.47
AllylOH	0.82	0.53	0.53	0.29
2-BuOH	3.59	2.41	2.00	1.12
<i>t</i> -BuOH	2.85	1.88	1.65	0.88
2-PenOH	11.26	8.29	6.53	3.68
<i>i</i> -AmylOH	11.53	8.53	6.88	3.94
<i>t</i> -AmylOH	10.47	5.85	4.47	2.59

Table 3. Capacity factors of analytes on the Partisil 10 ODS-3 as a function of the temperature in $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 10% MeOH with 0.5% HAc.

COMPOUND	Temperature(°C)			
	25	30	40	50
FA	0.21	0.15	0.12	0.12
HAc	0.24	0.21	0.12	0.09
<i>n</i> -PrA	0.71	0.56	0.50	0.44
<i>n</i> -BuA	2.82	2.44	2.12	1.88
<i>n</i> -VaA	5.00	4.88	4.74	4.35
<i>n</i> -HexA	6.94	6.82	6.73	6.71
SuA	0.62	0.47	0.32	0.24
AdA	2.18	1.71	1.35	1.03
PiA	2.24	1.94	1.62	1.38
CrA	3.09	2.88	2.59	2.29
Gly	0.03	-0.03	-0.12	-0.12
DL- α -Ala	0.06	-0.06	-0.09	-0.12
DL-AspA	0.59	0.44	0.32	0.29
DL-GluA	0.29	0.26	0.18	0.12
TMAB	0.18	0.15	0.12	0.12
TEAB	0.35	0.32	0.29	0.26
TPAB	1.06	1.06	1.00	0.88
TBAB	1.35	1.32	1.18	1.12
EtOH	0.29	0.24	0.24	0.21
<i>n</i> -PrOH	0.94	0.71	0.71	0.71
<i>n</i> -BuOH	2.41	2.06	1.88	1.71
<i>n</i> -PenOH	8.71	7.06	6.50	6.12
<i>n</i> -HexOH	17.82	16.85	16.74	16.62
<i>i</i> -PrOH	0.76	0.68	0.65	0.59
AllylOH	0.53	0.41	0.41	0.35
2-BuOH	2.00	1.74	1.62	1.50
<i>t</i> -BuOH	1.65	1.38	1.35	1.35
2-PenOH	6.53	5.65	5.12	4.71
<i>i</i> -AmylOH	6.88	5.88	5.29	4.76
<i>t</i> -AmylOH	4.47	3.85	3.71	3.44

한 결과를 Table 3에 나타냈는데 온도의 증가에 따라 모든 시료의 용량인자가 점차적으로 감소하였고, 특히 용량인자 값이 큰 시료일수록 온도 변화에 대한 영향이 큰 것을 알 수 있었다. 이 이유는 온도가 증가하면 이동상의 점도가 감소하게 되어 분리효능을 증가시켜 시료의 머무른 시간이 짧아진다.

용량 인자에 대한 pH의 영향. 시료의 용량인자와 pH사이의 관계를 알아보기 위하여 이동상의 pH를 변화 시키면서 실험한 결과 Table 4에 나타나 있다. 먼저 음이온성시료를 살펴 보면 시료들이 유기산이기 때문에 컬럼에 흡착되는 시료들의 머무른

시간은 pH에 많은 영향을 받는다. Table 4에서 보는 바와 같이 낮은 pH에서는 작은 용량인자 값을 보이다가, pH가 증가하면 용량인자도 급격히 증가되다가 일정한 값을 유지하였다. 이는 $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$ 식에서 보면 낮은 pH에서는 유기산이 공통이온 효과에 의하여 평형이 왼쪽으로 이동하여 시료가 분자상태로 존재하기 때문에 컬럼과 정전기적 인력이 작용하지 못하므로 머무른 시간이 짧아지는 것이다. pH가 증가하면 평형에서 오른쪽으로 이동하기 때문에 시료들은 이온상태로 전리되므로 컬럼과 전기적 이중층을 형성하여 머무른 시간이 증가된다고 볼

Table 4. Capacity factors of analytes on the Partisil 10 ODS-3 as a function of pH in $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 10% MeOH with 0.5% HAc.

COMPOUND	pH				
	2.95	4.00	5.00	6.00	7.00
FA	0.21	0.41	0.63	0.75	0.82
HAc	0.24	0.76	0.88	1.03	1.15
<i>n</i> -PrA	0.71	1.12	2.18	2.53	2.82
<i>n</i> -BuA	2.82	3.53	6.06	6.65	6.82
<i>n</i> -VaA	5.00	10.65	21.06	21.35	21.53
<i>n</i> -HexA	6.94	15.59	-	-	-
SuA	0.62	1.03	2.06	3.12	3.41
AdA	2.18	4.03	8.18	9.91	9.97
PiA	2.24	4.59	9.35	11.56	11.88
CrA	3.09	5.93	10.29	10.53	10.97
Gly	0.03	0.09	0.12	0.15	0.12
DL- α -Ala	0.06	0.15	0.18	0.21	0.29
DL-AspA	0.59	1.88	2.76	2.93	3.12
DL-GluA	0.29	0.47	0.88	1.03	1.47
TMAB	0.18	0.26	0.62	0.74	1.41
TEAB	0.35	1.53	2.71	4.59	5.00
TPAB	1.06	4.09	8.06	8.12	10.18
TBAB	1.35	6.71	12.24	12.47	13.47
EtOH	0.29	0.24	0.21	0.21	0.18
<i>n</i> -PrOH	0.94	0.71	0.71	0.71	0.68
<i>n</i> -BuOH	2.41	2.24	2.21	2.21	1.94
<i>n</i> -PenOH	8.71	6.59	6.35	5.76	5.59
<i>n</i> -HexOH	17.82	12.06	11.65	8.29	7.53
<i>i</i> -PrOH	0.76	0.65	0.65	0.62	0.59
AllylOH	0.53	0.41	0.38	0.38	0.35
2-BuOH	2.00	1.71	1.71	1.65	1.47
<i>t</i> -BuOH	1.65	1.29	1.29	1.29	1.18
2-PenOH	6.53	5.12	4.94	4.88	4.35
<i>i</i> -AmylOH	6.88	5.21	5.06	4.94	4.59
<i>t</i> -AmylOH	4.47	3.65	3.59	3.47	3.12

수 있다. 또한 이동상의 pH에 따른 시료의 이온화 상수관계를 Table 4에서 살펴 보면 시료의 이온화 상수 근처의 pH에서 시료의 용량인자가 급격히 증가하였다. 이는

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \text{에서 } \frac{K_a}{[H^+]} = \frac{[A^-]}{[HA]} \text{로 변형시}$$

켰을 때 $K_a < [H^+]$ 인 경우 즉, $pK_a > pH$ 일 때 시료의 이온화는 낮을 것이고, $K_a = [H^+]$ 에서, 즉 $pH = pK_a$ 일 때는 시료의 이온화는 50%이고, $K_a > [H^+]$ 일 때 즉, $pK_a < pH$ 일 때는 이온화는 높을 것이다. 즉

$pH = pK_a$ 근처에서 시료의 이온화가 급격히 증가하므로 시료의 머무른 시간 또한 급격히 증가할 것이다. 양이온성 시료에서 pH에 따른 용량인자를 살펴 보면 pH의 증가에 따라 시료의 용량인자도 증가하였다. 이는 기준으로 사용한 $1 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 10% MeOH, 0.5% HAc 이동상의 pH가 2.95인데 이 이동상의 pH를 증가하기 위해 첨가한 염기성염 또는 염기화합물에 의해 발생하는 양이온에 의해 이동상에서 양이온성시료가 반발을 받아 정지상으로 배향하려는 경향이 증가할 것이다. 그러므로 시료의 용량인자는 증가할 것이다. 중성시료에서는 pH의 증가에 따라 시료의 용량인자가 감소하였다. 이는 이동상의 pH가 증가하여 $pH = 7$ 쪽으로 증가할수록 컬럼내에서 시료의 분배는 이온성을 띠고 있는 정지상보다 pH가 증가되는 이동상쪽으로 증가할 것이다. 그러므로 시료의 머무른 시간은 짧아진다.

$1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 10% MeOH, 0.5% CH_3COOH 용액하에서 측정된 시료들의 용량인자를 Table 1과 비교해 보면 먼저 음이온성시료인 지방족산에서 분자의 알킬체인이 길어질수록 소수성이 증가하여 머무른 시간도 증가함을 알 수 있다.

FA(0.21) < HAc(0.24) < *n*-PrA(0.71) < *n*-BuA(2.82) < *n*-VaA(5.00) < *n*-HexA(6.94) 또한 작용기에 따른 용량인자를 보면 $RCOOH > R(COOH)_2 > NH_2$ RCOOH순으로 감소하였다. 일반적으로는 카르복시기의 많을수록 정지상에 흡착되어 있는 양이온과 이온-상호작용이 강해 용량인자가 증가된다. 그러나 여기서 용량인자가 감소하는 이유로는 이동상에서 존재하는 Ac^- 이온과의 경쟁효과에 의한 것으로 생각된다. 그러나 Table 4에서 보면 pH변화에 따른 증가폭을 보면 2가산들이 1가산보다 큰 것을 알 수 있는데 이는 완충용액에서 나온 양이온과 Ac^- 이온 간의 정전기적 인력현상에 의해 Ac^- 이온의 방해가 작아진 원인 때문이라 생각된다. pH가 2.95일 때와 7.00일 때를 보면 다음과 같다.

n-PrA(0.71, 2.82), *n*-BuA(2.82, 6.82), *n*-VaA(5.00, 21.53), SuA(0.62, 3.41), AdA(2.18, 9.97), PiA(3.09, 10.97)

양이온성 시료인 tetraalkylammonium 염에서도 마찬가지로 알킬체인이 길어질수록 용량인자는 TMAB

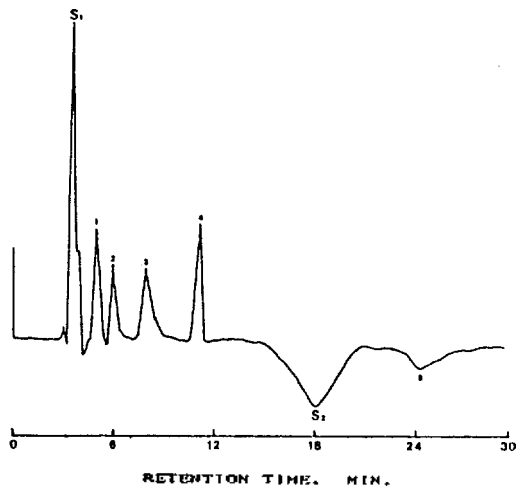


Fig. 4. Separation of aliphatic carboxylic acids and alcohols. Mobile phase: 10% MeOH-90% H₂O(v/v) containing $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB and 0.5% HAC. 1: SuA (23.4 μ g), 2: *n*-PrOH(64.3 μ g), 3: *t*-BuOH(64.0 μ g), 4: PiA(16.0 μ g), 5: *i*-AmylOH(65.0 μ g), S₁, S₂: system peak.

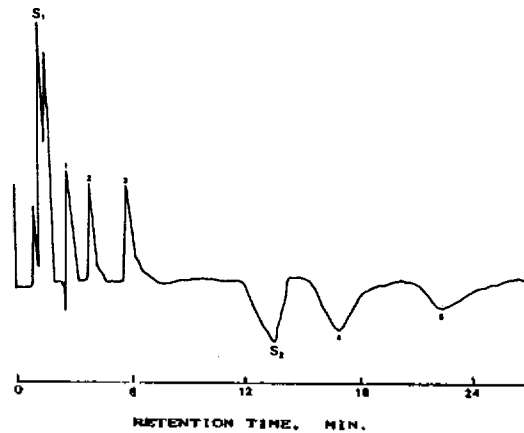


Fig. 5. Separation of aliphatic alcohols. Mobile phase: 10% MeOH-90% H₂O(v/v) containing $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB and 0.5% HAC. 1: AllylOH(136.8 μ g), 2: *n*-PrOH(64.3 μ g), 3: *t*-BuOH(64.6 μ g), 4: *t*-AmylOH(13.0 μ g), 5: *t*-AmylOH(65.0 μ g), S₁, S₂: system peak.

(0.18) < TEAB(0.35) < TPAB(1.00) < TBAB(1.35) 순으로 증가한다. 중성시료인 지방족 알코올에서도 알킬체인의 길이에 따라 용량인자가 증가한다.

EtOH(0.29) < *n*-PrOH(0.94) < *n*-BuOH(2.41) < *n*-PenOH(8.71) < *n*-HexOH(17.82) 또한 이성질체의 용량인자는 소수성에 따라 normal > iso > secondary > tertiary 순으로 감소하는 현상을 나타냈다.

n-PrOH(0.94) > *i*-PrOH(0.76)

n-BuOH(2.41) > 2-BuOH(2.00) > *n*-BuOH(1.65)

n-PenOH(8.71) > *i*-AmylOH(6.88) > 2-PenOH(6.53) > *t*-AmylOH(4.47)

혼합시료의 분리

실험을 통하여 얻은 최적조건인 $1.0 \times 10^{-4} M$ BTEAB, 10% MeOH, 0.5% HAC 이동상하에서 몇 가지 혼합물을 분리할 수 있었다. Fig. 4에는 지방족산과 알코올을 분리한 크로마토그램을 도시하였고 Fig. 5에는 지방족 알코올의 분리 크로마토그램을 나타냈다. 양이온성 시료와 음이온성 시료 대부분이 봉우리가 넓고 꼬리끝기가 심하여 분리할 수 없었다.

인용문헌

1. H. Small, T. S. Stevens, and W. C. Bauman, *Anal.*

Chem., **47**, 1801(1975).

2. T. S. Stevens, V. T. Turkelson, and W. R. Albe, *ibid.*, **49**, 1176(1977).

3. A. Herrmann, E. Damawandi, and M. Waggmann, *J. Chromatogr.*, **280**, 85(1983).

4. P. Helboe, *J. Chromatogr.*, **261**, 117(1983).

5. M. Denkerk, L. Hackzell, G. Schill, and E. Sjogren, *ibid.*, **218**, 31(1981).

6. L. Hackzell and G. Schill, *Chromatographia*, **15**, 437(1982).

7. L. Hackzell, T. Rydberg, and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **282**, 179(1983).

8. B. A. Bidlingmeyer and F. V. Warren, Jr., *Anal. Chem.*, **54**, 2351(1982).

9. W. E. Barber and P. W. Carr, *J. Chromatogr.*, **260**, 89(1983).

10. W. E. Barber and P. W. Carr, *ibid.*, **301**, 25(1984).

11. W. E. Barber and P. W. Carr, *ibid.*, **316**, 211(1984).

12. S. W. Kang, *J. Kor. Chem. Soc.*, **29**, 365(1985).

13. R. S. Jones and C. A. Stutte, *J. Chromatogr.*, **391**, 454(1985).

14. P. G. Rigas and D. J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **58**, 2226(1986).

15. P. G. Rigas and D. J. Pietrzyk, *ibid.*, **59**, 1388(1987).

16. Z. Iskandarani and D. J. Pietrzyk, *ibid.*, **54**, 1065(1982).