

역상 액체 크로마토그래피에 의한 Ni(II)-Isonitrosoethylacetoacetate Imine 유도체 킬레이트의 용리 메카니즘에 관한 연구

金仁煥 · 崔廷烈[†] · 李萬浩[†] · 姜昌禮[‡] · 李 堉^{*}

대구대학교 사범대학 화학교육과

[†]경북대학교 공과대학 공업화학과

[‡]제주대학교 자연과학대학 화학과

^{*}경희대학교 문리과대학 화학과

(1992. 4. 1 접수)

A Study on the Elution Mechanism of Ni(II)-Isonitrosoethylacetoacetate Imine Chelates by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

In-Whan Kim, Gang-Yeol Choi[†], Man-Ho Lee[†], Chang-Hee Kang[‡], and Won Lee^{*}

Department of Chemistry Education, Taegu University, Kyongsan 713-714, Korea

[†]Department of Industrial Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

[‡]Department of Chemistry, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

^{*}Department of Chemistry, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea

(Received April 1, 1992)

요 약. 역상 액체 크로마토그래피에 의하여 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR)(R-H, CH₃, C₂H₅, *n*-C₃H₇, *n*-C₄H₉, C₆H₅-CH₂) 킬레이트의 동시 분리 및 분석을 위한 최적조건을 Micropak MCH-5 분리관을 사용하여 조사하고 이들의 용리거동에 대한 인자들과의 관계를 검토하였다. 용리액으로 methanol/water의 이성분 용매를 사용하였으며, 모든 금속 킬레이트의 용매 세기 인자는 $0 \leq \log k' \leq 1$ 의 범위임을 확인하였고, 각 금속 킬레이트의 $\log k'$ 값과 이성분용매계 중의 물의 부피분율을 도시한 결과 직선 관계가 성립하였다. 또한 배치법으로 측정된 분포비(D_c) 값과 k' 값을 도시하여 본 결과 직선 관계가 성립됨으로써 금속 킬레이트의 용리 메카니즘이 주로 소용매성 효과 즉 소수성효과에 기인함을 확인하였다. 한편 금속 킬레이트의 머무름에 미치는 용량 인자와 온도와의 관계를 조사한 결과 좋은 직선성을 나타내고 있으며, 뿐만 아니라 직선의 기울기로부터 엔탈피(ΔH)와 엔트로피(ΔS)를 구하고, 엔탈피와 용량 인자와의 값을 도시한 결과도 직선관계가 성립하였다. 직선의 기울기로부터 구한 보정 온도(β)는 773.47 °K이었다. 이 결과 역상 HPLC에서 Ni(II)-Isonitrosoethylacetoacetate imine 킬레이트의 용리 메카니즘의 주로 소수성 효과에 기인함을 재확인 할 수 있었다.

ABSTRACT. Liquid Chromatographic behavior of Ni(II) in Isonitrosoethylacetoacetate Imine(IEAA-NR), Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR)(R=H, CH₃, C₂H₅, *n*-C₃H₇, *n*-C₄H₉, C₆H₅-CH₂) chelates were investigated by reversed-phase HPLC on Micropak MCH-5 column using methanol/water as mobile phase.

The optimum conditions for the separation of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates were examined with respect to the effect of the flow rate, sample solvent, mobile phase strength and column temperature. It was found that metal chelates were properly eluted in an acceptable range of capacity factor value ($0 \leq \log k' \leq 1$). The dependence of the logarithm of capacity factor (k') on the volume fraction of water in the binary mobile phase as well as on the liquid-liquid extraction distribution ratio (D_c) in methanol-

water/*n*-alkane extraction system showed the good linearties, and the dependence of the logarithm of capacity factor (k') on the column temperature and on the enthalpy exhibited the good linearties, and the compensation temperature (β) from the slope was 773.47°K. It was suggested that the retention of metal chelates was largely affected by the hydrophobic effect.

서 론

최근 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)의 응용범위는 매우 다양하여 각종 의약품, 식품, 농약, 생체 및 환경 시료 중에 함유되어 있는 미량의 유해 유기 물질의 분석 뿐만 아니라, 금속 이온의 분리 및 정량 등과 같은 무기 분석 화학 분야에 까지도 널리 확대되어 가고 있다¹⁻⁴. HPLC에 의한 금속 이온의 동시분리 분석에 주로 이용되고 있는 킬레이트 시약으로는 acetylacetone 등과 같은 β -diketone류, dithizone, dithiocarbamate, 8-hydroxyquinoline 등이 있다.

지금까지 역상 HPLC를 이용한 유, 무기 혼합시료의 동시 분리 및 분석방법의 개발 뿐만 아니라 시료가 용리되는 메카니즘을 규명하고 머무름을 예측할 수 있는 연구 또한 다각적으로 이루어지고 있다.

현재 시료의 머무름 메카니즘에 관한 연구는 몇 가지 관점에서 진행되고 있는데, 예를 들면, F. Vlácil 등⁵은 금속-diethylsithiocarbamate(DDTC) 킬레이트의 머무름에 기여하는 인자 중에 소용매성 상호작용(Solvophobic interaction)과 친실란올기성 상호작용(Silanophilic interaction)이 기여하는 정도를 실험적으로 측정하여 킬레이트의 머무름이 주로 소용매성 상호작용에 의해 일어난다는 것을 확인하였고, 다른 여러 킬레이트들의 머무름에도 이 결과가 적용될 수 있을 것이라고 예상하였다.

국내에서는 Lee 등⁶⁻⁷이 몇가지 금속-DTC 및 isonitrosoacetylacetone(H-IAA)의 imine 유도체 등에 대한 용리 거동을 조사하여 본 결과, 이들의 머무름 메카니즘이 주로 소용매성에 기인한다는 것을 발표한 바가 있다.

다음 Jandra 등⁸⁻¹²에 의하면 열역학적인 측면에서 용질이 용리되는 메카니즘에 관한 연구가 진행되고 있는데, 그 중에서 가장 대표적인 방법이 extra-thermodynamic approach로, 이는 유사한 화학 반응

과정의 분석이나 물리화학적인 현상의 중요한 특징을 해석하는데 주로 이용되고 있다.

이러한 extra-thermodynamic approach 중에서 엔탈피-엔트로피 보정(exthalpy-entrophy compensation)에 의한 접근 방법이 있는데, 이것은 본질적으로 비슷한 물리화학적 과정이나 현상들에 대한 전체 자유에너지의 변화는 그에 상응하는 엔탈피 변화에 대하여 직선적인 관계를 나타낸다는 것이다. 이러한 현상을 이용하면 시료의 머무름 값을 분석하여 머무름 메카니즘을 설명할 수 있다. 한편 어떠한 물리적 파라미터가 머무름 메카니즘에 가장 크게 영향을 미치는가에 대한 연구들에 따르면, Horvath 등¹³은 평형상수가 머무름에 영향을 주며, Jinnó 등¹⁴⁻¹⁶은 C₂, C₈ 및 C₁₈ Column에서 알킬 벤젠의 log k' 값과 Van der Waals 부피, 분자가 연결 지수(connectivity index), 소수성 인자들과의 상관관계를 조사한 결과 C₂ 및 C₈ Column에서는 분자가 연결지수가, C₁₈ Column에서는 Van der Waals 부피가 좋은 상관관계를 갖는다고 발표한 바 있다. 그러나 이들은 phenol 등 유기 시료가 주된 대상이었으며, 금속 킬레이트의 머무름에 대해서는 아직 연구가 부족하기 때문에 이 방향으로 좀 더 구체적인 머무름 메카니즘의 연구가 필요하다고 생각되어진다.

본 연구에서는 β -diketone류를 isonitroso화 반응을 시켜 α -isonitroso- β -diketone류의 일종인 isoitrosoethylacetoacetate(H-IEAA)의 imine 유도체를 합성하고, 이를 리간드로 하는 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR)(R=H, CH₃, C₂H₅, *n*-C₃H₇, C₆H₅-CH₂, *n*-C₄H₉) 금속 킬레이트들을 역상 HPLC법에 의한 동시분리 가능성 및 용리 거동을 알아보기 위하여, 이에 요구되는 용리액의 흐름 속도 등과 같은 최적 분리 및 기기 조건을 조사하였다. 아울러 용리액의 조성과 용량인자(capacity factor, k'), 용량 인자와 분포 계수와의 상관관계, 온도에 따른 열역학적 관계 등을 조사 검토함으로써 이들 금속 킬레이트의 용리 거동

및 머무름 메카니즘을 고찰하고자 한다.

실 험

측정 및 실험 기구

본 연구에서 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR)(R=H, CH₃, C₂H₅, *n*-C₃H₇, *n*-C₄H₉, C₆H₅-CH₂) 금속 킬레이트의 분리에 사용한 HPLC는 Varian사제 Model VISTA 5500 liquid chromatography로 UV-Vis 검출기와 영인 과학사의 Young-in Model D 520A integrator가 부착된 것이고, 분리관은 Varian Micropak MCH-5 Column(4.00 mm I.D.×15 cm L., *K'* = 14.3, Particle Size 5 μ)이며, 분리관의 온도 조절은 Universal Column Heater를 이용하였다. 또한 금속 킬레이트의 분포비 측정에는 Varian사의 DMS 90 UV-Visible spectrophotometer와 국제이화학상사의 SH-SV형 진탕기를 사용하여 측정하였다. 그리고 합성된 금속 킬레이트의 구조 확인에는 Perkin-Elmer 283 Elemental Analyzer, Beckerman DU-4 UV-Vis Spectrophotometer, Mattson Galaxy 6030E FT-IR Spectrophotometer, Bruker AM-300 FT-NMR Spectrometer를 사용하였다. 한편 모든 실험에서 사용한 물의 정제에는 Milipore사의 Milli-Q/RO Reagent Water Purification System 및 Milipore Membrane Filter로 정제하였으며, Hamilton 사제, 10 μl Microsyringe로 시료를 주입하였다.

시 약

본 실험에서 사용한 amine류(ammonia, methylamine, ethylamine, *n*-propylamine, butylamine 및 *n*-benzylamine) 및 모든 시약들은 특급 시약으로서 정제하지 않고 그대로 사용하였다. Isonitrosoethylacetoacetate(H-IEAA)는 이미 보고된 방법¹⁷에 따라 합성하였다. 또한 용리액 및 시료의 용매로 사용한 methanol, acetonitrile, methylisobutylketone, acetone, chloroform, methylenechloride 등은 HPLC용 Burdick & Jackson Lab. Inc. 사제이며, *n*-dodecane은 Aldrich사제로써 Millipore Membrane Filter(type FH, pore size 0.45 μ)로 거른 후 초음파 세척기에서 용존기체를 제거하여 사용하였다. 모든 실험에서 사용한 물은 탈염장치를 통과시킨 후 정제하여 사용하였고 합성한 금속 킬레이트들은

재결정하여 진공 데시케이터에 보관하고 필요에 따라 소량씩 녹이고, 5 μm Sep-Pak으로 거른 후 사용하였다.

실험방법

금속 킬레이트의 합성¹⁸. NiCl₂(0.29 g, 0.002 mol) 및 H-IEAA(0.63 g, 0.004 mol)을 에탄올 40 ml에 녹이고 30% NH₄OH 0.0024 mol을 가한 후 4시간 동안 교반환류시켰다. 다음 용액을 증발시키고, 생성된 침전물을 거른 후 에탄올-클로로포름(1:1)으로 재결정하여 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NH')를 얻었다. 또한 합성한 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NH')를 여러가지 아민들과의 아민교환반응으로 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR)(R=alkyl기)를 합성하였다.

즉, Ni(IEAA-NH)(IEAA-MH') 0.001 mol를 에탄올-클로로포름(1:1) 50 ml에 녹이고 alkylamine(40% methylamine, 50% ethylamine, *n*-propylamine, benzylamine, 또는 *n*-butylamine) 0.02 mol을 가한 후 4시간 동안 교반 환류시켰다. 이 용액을 증발시키고 생성된 침전물을 거른 후 에탄올-클로로포름(1:1)으로 재결정하였다.

금속 킬레이트의 크로마토그램 작성. 용리액의 흐름속도와 금속 킬레이트의 분리도와의 관계를 조사하기 위하여 각 금속 킬레이트의 농도가 50 μg/ml이 되도록 methanol에 녹인 용액 3 μl를 Microsyringe로 HPLC에 주입시켰다. MeOH/H₂O 혼합액을 용리액으로 사용하고 흐름속도를 0.5~0.9 ml/min 사이로 변화시켜 가면서 크로마토그램을 작성하였는데, 각 금속 킬레이트의 분리를 위한 최적 기기와 용리 조건은 Table 1과 같다.

용량인자(*k'*)의 측정. 용리액의 조성 및 용리 세기의 영향을 검토하기 위해서 MeOH와 H₂O의 비율을 변화시켜 가면서 얻은 크로마토그램으로부터 다음 식에 의하여 용량인자를 계산하였다.

$$k' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

여기서, *t*는 시료의 머무름 시간(retention time)이고, *t*₀는 불감시간(dead time)이다. 또한 금속 킬레이트의 머무름에 대한 온도의 영향을 검토하기 위하여 적당한 MeOH/H₂O 용리액을 Universal Column Heater를 이용하여 온도를 25°C (또는 상온)

Table 1. HPLC operating conditions

Descriptions	Conditions
Column	Micropak MCH-5(4.00 mm I.D. × 15 cm L $k' = 14.3$, particle size 5 μ m)
Mobile phase	MeOH/H ₂ O(73/27)
Flow rate	0.7 ml/min
Injector volume	3 μ l
Detection	UV 254 nm, AUFS 0.02
Chart speed	0.5 cm/min

부터 5°C 간격으로 변화시킨 분리관을 통과시키면서 작성한 크로마토그램으로부터 시료들의 k' 값을 각각 구하였다.

금속 킬레이트의 분포비 측정

벡터법으로 금속 킬레이트의 분포비를 측정하기 위하여 고정상의 모델인 *n*-dodecane과 *n*-hexane을 1:1 부피비로 섞어서 10 ml 씩을 분별 깔대에 넣었다. 그리고 각 금속 킬레이트의 시료 일정량을 분리관에서 각 시료를 용리시킬 때의 최적 용리액과 같은 조성인 MeOH와 H₂O의 이 성분 혼합용액 10 ml에 잘 녹인 다음, 분별 깔대기에 넣은 후 10분간 진탕시켜 금속 킬레이트가 두 상에 충분히 분배되도록 하였다. 두 상을 완전히 분리시킨 후 자외 가시선 분광법으로 각 금속 킬레이트의 흡광도를 측정하여 각 상에 분포된 금속 킬레이트의 농도를 구하고, 다음 식에 따라 분포비를 계산한다.

$$D_c = C_{M, org} / C_{M, aq}$$

여기서 D_c 는 분포비(distribution ratio), $C_{M, org}$ 는 유기 용매층 중의 시료 농도, $C_{M, aq}$ 는 수용액층 중에서의 시료 농도이다. 이때 측정 파장은 254 nm이다.

결과 및 고찰

용리액의 흐름 속도에 대한 영향

용리액의 흐름도는 분리도와 전체 용리시간에 영향을 주기 때문에 최적의 흐름 속도를 결정하기 위하여 흐름 속도를 0.5~0.9 ml/min 범위에서 변화시켜가면서 얻은 머무름 시간을 Table 2에 수록하였다.

Table 2. Effect of flow rate on the retention time of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates

Metal Ion	Alkyl groups	Amount Added (μ g/ml)	Flow rate (ml/min)				
			0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
Ni	H	50	5.78	4.82	4.20	3.65	3.29
	Methyl	50	7.77	6.47	5.64	4.92	4.43
	Ethyl	50	9.97	8.33	7.26	6.36	5.71
	Propyl	50	13.63	11.46	10.11	8.76	7.87
	Benzyl	50	17.13	14.34	12.49	10.99	9.86
	Butyl	50	20.45	17.12	14.87	13.11	11.75

Mobile phase: MeOH/H₂O (70/30), Injection volume: 3 μ l.

결과에서 보면 흐름속도가 0.5 ml/min에서 0.9 ml/min로 증가할수록 머무름 시간은 감소하지만 상대적 머무름 시간은 큰 차이가 없었다. 따라서 흐름속도를 증가시키면 시료의 용리 시간이 짧아지므로 시료의 용리에 적당한 것으로 생각되지만, 흐름속도가 증가하면 분리관의 압력이 서서히 커지면 서 장시간 많은 시료를 용리시킬 경우 머무름 시간, 봉우리 기 및 분리도의 재현성을 감소시킬 가능성이 있다. 그러므로 본 연구에서는 분리도 및 봉우리 넓이가 가장 이상적이고, 전체 시료의 용리 시간이 적당하며, 반복 실험시 머무름 시간의 재현성이 가장 좋은 0.7 ml/min을 최적 흐름 속도로 결정하였다.

시료용매가 분리도에 미치는 영향

금속 킬레이트를 녹이는 용매에 따른 크로마토그램에 미치는 영향을 조사하기 위해서 대표적인 용매 MeOH, CH₃CN, CH₂Cl₂, CHCl₃, MIBK 등을 사용하여 용매에 대한 머무름 시간과 봉우리 넓이를 비교하여 본 결과를 Table 3에 수록하였다.

먼저 각 용매들의 용매의 극성의 크기 $\epsilon^{0.6}(\text{Al}_2\text{O}_3)$ 를 비교해 보면 MeOH(0.95)가 가장 크고, CH₃CN(0.65), MIBK(0.43), CH₂Cl₂(0.42), CH₃Cl(0.40)순으로 감소하는데, Saunders는 이 $\epsilon^{0.6}(\text{Al}_2\text{O}_3)$ 이 감소할수록 k' 값이 증가한다고 보고한 바 있다⁹. 그러나 Table 3의 결과에 따르면 각 금속 킬레이트의 머무름 시간은 butyl의 경우만 제외하고는 CH₃CN > MeOH \geq CH₂Cl₂ > CHCl₃ > MIBK 순서로 줄어들었다.

이와 같이 각 용매에 머무름 시간이 $\epsilon^{0.6}(\text{Al}_2\text{O}_3)$ 의

Table 3. The peak area and retention time of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates in various solvents

Metal chelate	Amount added (µg/ml)	Solvent	Retention time (min)	Peak area (×10)
R=H	50	CH ₃ CN	4.53	3.09
		CH ₃ OH	4.09	1.91
		CH ₂ Cl ₂	4.07	2.78
		CHCl ₃	3.91	2.40
		MIBK	2.89	2.54
R=CH ₃	50	CH ₃ CN	6.10	2.29
		CH ₃ OH	5.48	2.08
		CH ₂ Cl ₂	5.48	2.18
		CHCl ₃	5.26	1.94
		MIBK	5.29	2.17
R=C ₂ H ₅	50	CH ₃ CN	7.86	2.15
		CH ₃ OH	7.06	1.83
		CH ₂ Cl ₂	7.06	2.32
		CHCl ₃	6.73	1.60
		MIBK	6.80	1.90
R=n-C ₃ H ₇	50	CH ₃ CN	10.81	1.88
		CH ₃ OH	9.89	2.10
		CH ₂ Cl ₂	9.70	1.92
		CHCl ₃	9.21	1.80
		MIBK	9.38	1.75
R=C ₆ H ₅ -CH ₂	50	CH ₃ CN	13.53	1.80
		CH ₃ OH	12.44	1.20
		CH ₂ Cl ₂	12.17	1.80
		CHCl ₃	11.50	1.48
		MIBK	11.78	1.46
R=n-C ₄ H ₉	50	CH ₃ CN	10.12	2.00
		CH ₃ OH	15.00	1.48
		CH ₂ Cl ₂	14.50	1.77
		CHCl ₃	13.81	1.50
		MIBK	14.07	1.82

크기 순서와 차이가 있는 것이 용매의 양이 극소량이기 때문에 용매-용리액 사이의 상호 작용이 금속 킬레이트의 용리거동에 영향을 미치는 정도가 다른 인자에 비해서 극히 작기 때문이라고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 이 금속 킬레이트들을 동시 분리시키기 위해서 적당한 용리시간과 봉우리 넓이를 가지는 MeOH를 시료의 용매로 사용하였다.

용리액의 조성 및 용리 세기의 영향

용리액의 세기가 분리도에 미치는 영향 및 최적

용리액의 조성비를 구하기 위하여 용리액의 조성에 따른 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었고, 이로부터 구한 $\log k'$ 값을 Table 4에 수록하였다.

먼저 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) 킬레이트의 크로마토그램(Fig. 1)을 보면 메탄올과 물의 함량이 80/20(A)인 경우보다 물의 함량을 소량씩 증가시키면 분리도는 서서히 향상되지만 봉우리 넓힘 현상이 일어나면서 머무름 시간도 30 min 이상으로 증가하는 것을 볼 수 있다. 특히 MeOH/H₂O의 함량이 60/40(E)인 크로마토그램은 머무름 시간이 너무 길고(46.15 min) 봉우리 넓힘과 꼬리 끌기 현상이 아울러 나타나는 것을 볼 수 있다. 따라서 용량 인자의 값이 최적 범위인 $0 \leq \log k' \leq 1$ ^{20,21}을 만족하는 조성비인 70/30(C)을 이들 시료의 용리액으로 선택하였다. 한편 용리액의 조성비에 따른 각각의 금속 킬레이트의 크로마토그램으로부터 구한 $\log k'$ 값과 Snyder 식²⁰으로부터 구한 용매의 용리 세기(eluotropic strength, ϵ^*)와의 관계를 Fig. 2와 Table 4에 나타내었다.

과에서 보는 바와 같이 각 혼합 용매의 용리 세기에 대한 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) 킬레이트들의 $\log k'$ 과의 관계는 비교적 좋은 직선성을 보여준다. 이와 같이 $\log k'$ 과 ϵ^* 의 관계가 직선적으로 비례하는 것으로 보아 이들 킬레이트들의 분리 메커니즘이 소수성 효과에 기인하는 것으로 예상된다.

금속 킬레이트의 머무름 메커니즘

역상 액체 크로마토그래피에서 금속 킬레이트를 분리함에 있어서 분리관 내에서 이들의 머무름 메커니즘은 현재까지 두가지 방향으로 검토되고 있는데, 첫째는 용리액의 용량 인자(k')에 대한 용리액의 조성 및 분포 상수와의 상관 관계를 고려한 것이고^{8,12,21}, 둘째는 시료의 머무름을 열역학적 측면에서 고찰한 것이다.^{9,11,13}

따라서 본 연구에서는 금속 킬레이트의 용리 메커니즘에 영향을 주는 몇가지 인자들을 고찰하기 위하여, 용량 인자에 미치는 용리액의 조성, 분포비 및 온도 등의 영향을 조사하였다.

용량 인자(k')와 머무름 조성과의 관계. ML₂형 금속 킬레이트의 머무름은 고정상인 실리카겔에 옥타데칸기(C₁₈)가 화학적으로 결합된 역상 HPLC 분리관 내에서 두가지 메커니즘, 즉 소용매성 메커니즘(Solvophobic mechanism)과 친실란올성 메커니즘

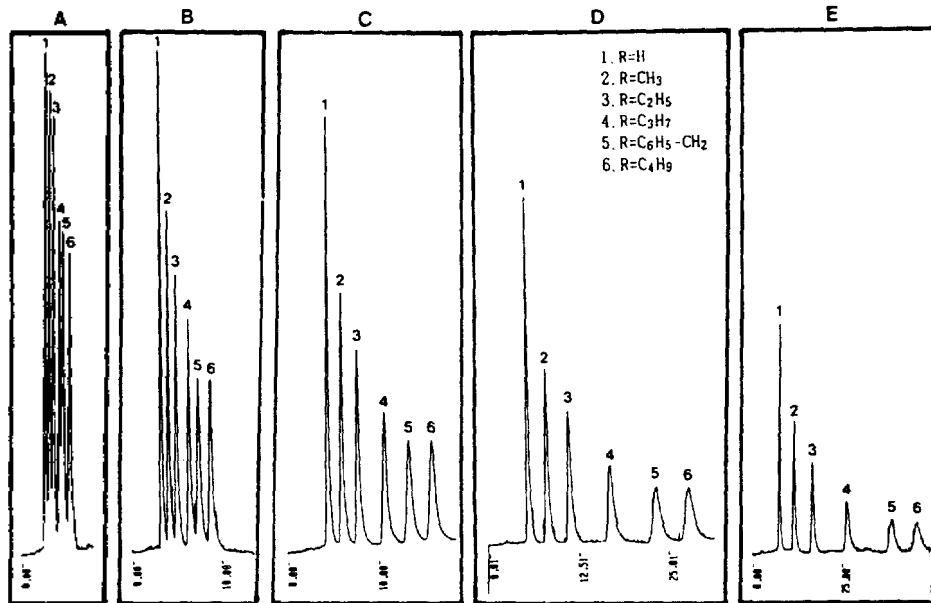


Fig. 1. Chromatogram of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates as a function of mobile phase composition. Mobile phase: MeOH/Water. (A)80/20 (B)75/25 (C)70/30 (D)65/35 (E)60/40. Flow rate; 0.7 ml/min.

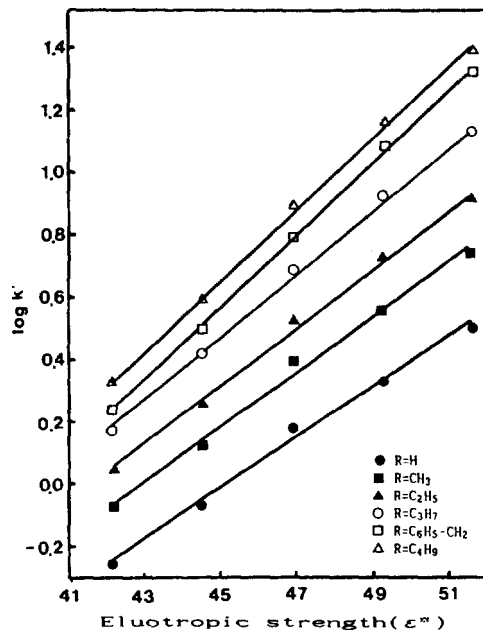


Fig. 2. Relationship between eluotropic strength (ϵ^*) of the mobile phase and $\log k'$ of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates.

(Silanophilic mechanism)에 의해서 일어난다고 가정한다면, 머무름을 나타내는 용량인자(k')는 다음과

같은 두 항의 합 즉, 두가지 메카니즘에 의한 각의 기여의 합으로 나타낼 수 있다^{22,23}.

$$k' = k_1' + K_2' \quad (1)$$

여기서 k_1' 은 소용매성 효과에 의해 일어나는 시료의 머무름에 관계하는 용량인자이고, k_2' 는 친실란올성 효과에 의해 일어나는 시료의 머무름에 관련된 용량 인자이다. 우선 소용매성 효과에 의해서 일어나는 시료의 머무름 k_1' 은 이성분 용매계의 물의 부피분율(ϕ_{H_2O})과 지수함수의 관계가 있음을 이미 보고된 바 있다²⁴.

$$k_1' = a \exp(b\phi_{H_2O}) \quad (2)$$

여기서 a 와 b 는 실험적으로 얻어진 상수이다.

다음은 극성인 시료와 고정상 중의 실란올기와의 상호작용에 의해 일어나는 머무름인 k_2' 에 대하여 고려해 보면, 이러한 친실란올성 메카니즘은 정상(normal phase)에서 아주 중요하게 작용한다. 이성분 용매중에 포함된 성분 중 더 극성인 성분의 부피분율(ϕ_X)과 k_2' 사이에는 다음과 같은 식이 성립한다²³.

$$k_2' = (c + d\phi_X)^{-1} \quad (3)$$

Table 4. Capacity values ($\log k'$) of mobile phase composition for Ni(IEAA-MH)(IEAA-NR) chelates

Eluent	$\log k'$						
	(ϵ^*)	R=H	R=CH ₃	R=C ₂ H ₅	R=C ₃ H ₇	R=C ₆ H ₅ -CH ₂	R=C ₄ H ₉
MeOH/H ₂ O							
80/20	42.16	-0.26	-0.08	0.04	0.17	0.24	0.33
75/25	44.53	-0.07	0.12	0.26	0.42	0.50	0.60
70/30	46.89	0.18	0.40	0.53	0.70	0.81	0.90
65/35	49.29	0.33	0.56	0.73	0.93	1.09	1.16
60/40	51.62	0.50	0.74	0.92	1.13	1.32	1.39

Flow rate: 0.7 ml/min, Injection volume: 3 μ l, Detection Wavelength: 254 nm.

여기에서 c , d 는 실험적으로 얻어진 상수이다. (2) 식과 (3)식을 (1)식에 대입하면 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$k' = a \exp(b\phi H_2O) + (c + d\phi H_2O)^{-1} \quad (4)$$

식 (4)에서는 두가지 메카니즘이 거의 비슷한 정도로 작용할 경우 $\log k'$ 과 ϕH_2O 사이에는 직선관계가 성립할 수 없음을 알 수 있다. 그러나 앞에서 설명한 바와 같이 본 연구에서 합성한 금속 킬레이트의 경우는 비교적 전기적으로 중성인 시료이기 때문에 역상 HPLC에서 거의 소용매성 효과에 의해서 머무름이 일어날 것으로 예상되므로, 식 (4)의 둘째항은 거의 무시할 수 있을 것이다. 그러므로 식 (4)를 간단히 나타내면 다음과 같다.

$$\log k' = \log a + b\phi H_2O \quad (5)$$

한편 Jandra 등의 연구에 따르면 물과 methanol, acetonitrile 등과 같은 이성분 혼합 용매계에서 $\log k'$ 과 유기성분의 부피분율(ϕ_{org}) 사이에는 다음과 같은 관계식이 성립한다.

$$\log k' = a - n\phi_{org} + d\phi_{org}^2 \quad (6)$$

이성분 용매계에서는 $\phi_{org} = 1 - \phi H_2O$ 의 관계가 성립하므로 이를 식 (6)에 대입하고, ϕH_2O 항에 비하여 ϕ_{org}^2 항이 무시할 정도로 작다고 예상되므로 이를 정리하면 결국 식 (5)와 같은 물리적 의미를 갖는 식이 됨을 알 수 있다. 따라서 금속 킬레이트의 머무름이 주로 소용매성 메카니즘에 의해서 일어난다면 식 (5)에 의해서 $\log k'$ 과 ϕH_2O 를 도시하였을 때 직선 관계가 성립할 것이다.

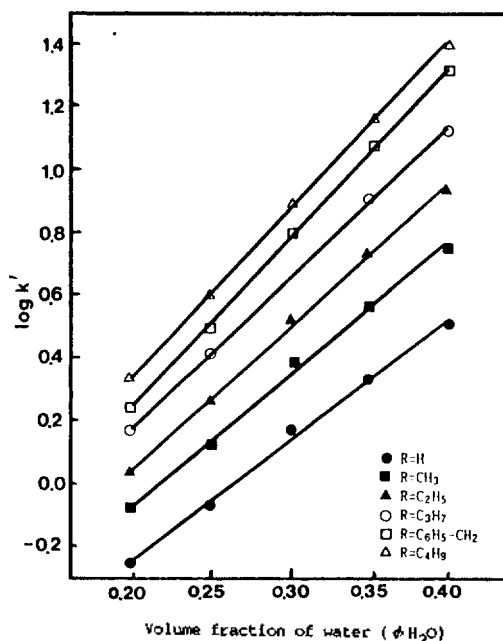


Fig. 3. Dependence of $\log k'$ of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates on the volume fraction of water in mixture with methanol.

본 연구에서는 금속 킬레이트를 분리함에 있어서 물과 methanol의 이성분 혼합용매를 사용하여 $\log k'$ 과 ϕ 를 도시하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 각 금속 킬레이트들의 $\log k'$ 값과 이동상의 물의 부피 분율(ϕH_2O)은 식 (5)와 같이 비교적 직선성을 잘 나타내고 있으므로 본 연구에서는 금속 킬레이트들의 머무름은 소용매성 효과 즉 소수성 효과에 크게 기인한다는 것을 예측할 수 있었다.

용량인자(k')와 분포비(D)간의 관계. 앞절에서

Table 5. Capacity factor (k') and liquid-liquid distribution ratio (D_c) of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates

Metal chelate	k'	D_c
R=H	1.52	0.47
R=CH ₃	2.50	0.61
R=C ₂ H ₅	3.37	0.67
R= <i>n</i> -C ₃ H ₇	5.00	0.69
R=C ₆ H ₅ -CH ₂	6.51	0.76
R= <i>n</i> -C ₄ H ₉	7.96	0.85

Aqueous phase: MeOH/Water (70/30), Organic phase: *n*-dodecane/*n*-hexane (50/60), Shaking time: 15 min.

이미 설명한 바와 같이 역상 LC에서 금속 킬레이트의 머무름이 소수성 효과에 기인한다면 분리관 내에서 일어나는 상호작용은 이동상 대신 매탄올과 물을 혼합한 극성 용매를 사용하고, 정지상 대신 *n*-dodecane과 *n*-hexane 유기용매를 사용한 배치법에 의해 금속 킬레이트를 추출하였을 경우도 비슷한 경향을 나타낼 것으로 생각된다. 즉, 역상 HPLC에서 금속킬레이트의 k' 는 배치법에서 얻어진 분포비(D_c)와 간단한 선형함수관계를 나타내어야 하며, 그 관계식은 다음과 같다⁵.

$$k' = (V_m/V_M - 1) + \gamma D_c \quad (7)$$

여기에서 V_m 은 분리관 내의 이동상의 부피, V_M 은 불감부피(dead volume)이다. 그리고 $\gamma = j\gamma'$ 로 주어 지는데 $\gamma = m_s/V_M$ 이다. 이 때 m_s 는 정지상의 질량이며, j 는 상관계수이고, 분포비 $D_c = C_{M,org}/C_{M,aq}$ 이다. 본 연구에서는 이와같은 상관관계가 성립되는가를 확인하기 위해서 배치법으로 각 금속 킬레이트들의 D_c 값을 측정하여 Table 5에 각각 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이 각 금속 킬레이트들의 k' 와 D_c 와의 관계는 비교적 직선성을 잘 유지하고 있으며, 식 (7)을 잘 만족하고 있음을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 사용한 금속 킬레이트의 머무름은 소용매성 효과에 크게 기인한다는 것을 배치법에서도 확인할 수 있었다.

용량인자(k')와 온도와의 관계. 일반적으로 기체 크로마토그래피에서 온도의 중요성은 시료의 용리 거동에 영향을 주는 인자로서 널리 알려져 왔지만, 액체 크로마토그래피에서는 시료의 머무름에 미치는

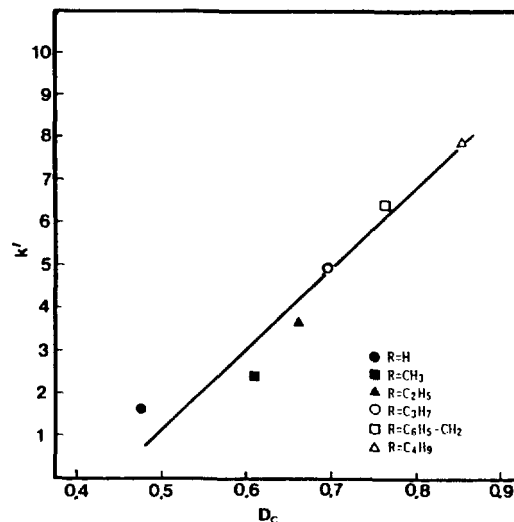


Fig. 4. Dependence of Capacity factor (k') of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates on their distribution ratio (D_c) for the extraction from ratio (D_c) from aqueous methanol into *n*-alkane.

온도의 영향을 별로 고려하지 않았다. 그러나 온도의 증가가 용매의 점도를 감소시켜 컬럼의 효율을 증가시킨다는 결과가 보고된 바 있다²⁶. 따라서 최근에는 열역학적인 함수와의 관계 등 온도의 영향은 액체 크로마토그래피에서 시료의 용리 거동을 해석 하는데 널리 사용되고 있다. 크로마토그래피에서 시료의 머무름은 용량 인자(k') 값으로 나타낼 수 있는데, k' 은 용질이 정지상과 상호 작용할 때의 열역학적인 평형 상수(K)와 다음과 같은 관계를 가진다²⁶.

$$k' = \Phi K \quad (8)$$

여기에서 Φ 는 상비율(phase ratio) 즉, 이동상의 부피에 대한 정지상의 부피의 비이다. 또한 평형 상수 K 와 ΔG° (Gibbs free energy)와의 관계는 식 (9)와 같고, 열역학 제 2법칙은 식 (10)과 같다.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (9)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (10)$$

(8)~(10)식을 결합하면 용량인자는 다음과 같이 표준 엔탈피 변화와 표준 엔트로피 변화와의 관계로 나타낼 수 있다.

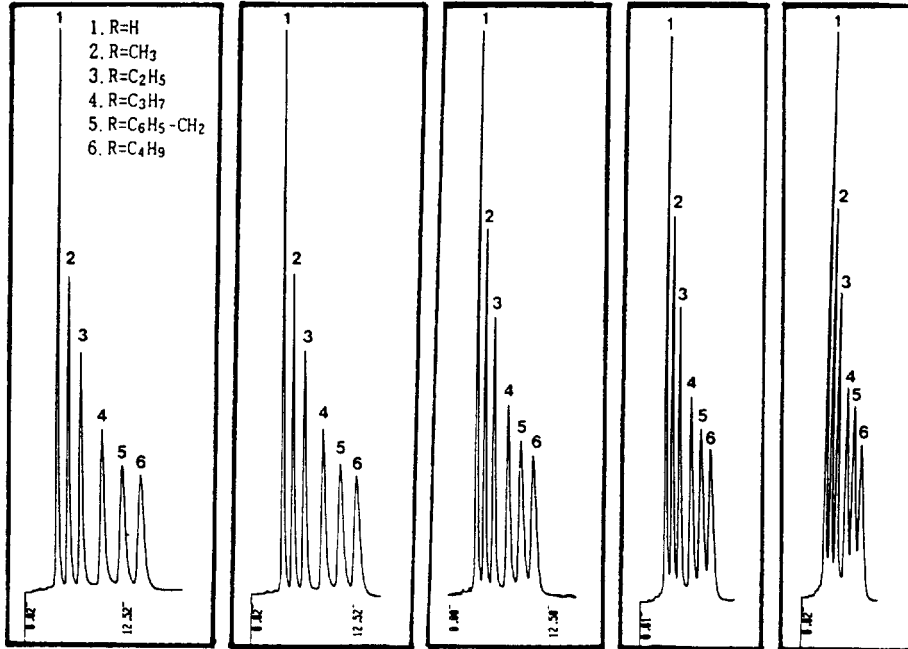


Fig. 5. Chromatograms of Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) chelates as a various column temperatures. Mobile phase; MeOH/Water (70/30). Flow rate; 0.7 ml/min. Temperature; (A)30°C (B)35°C (C)45°C (D)55°C (E)65°C

$$\ln k' = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R + \ln \Phi \quad (11)$$

상비율 Φ 값은 Knox 등²⁷이 표피형 중합체인 충전제(Polymeric Pellicular Packing)의 물리적인 상수로부터 이 값을 구하였는데, 그 값은 $\Phi=1/25$ 이라고 발표한 바 있다. 그러나 Sander 등²⁸은 Φ 값이 다공성이 큰 미세한 실리카 충전제의 경우 지지체의 큰 표면적으로 인해 상당히 차이가 있을 것으로 보고 물리적인 모델을 만들어 실험한 결과 μ -Bondapak C₁₈ Column의 경우 $\Phi=1/2.6$ 이라고 보고하였다. 본 연구에서는 Micropak MCH-5 Column에 관한 자료가 없기 때문에 μ -Bondapak C₁₈ column의 값을 인용하여 나머지 항을 계산하였으며, ΔH° 값은 식 (11)에서 보는 바와 같이 상비율과 무관한 값을 가짐을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 온도에 따른 크로마토그램(Fig. 5)으로부터 용량 인자의 값을 구하고, 식 (11)에 의하여 용량 인자와 온도와의 관계를 도식한 Van't Hoff Plot (Fig. 6)의 기울기($-\Delta H^\circ/R$)로부터 용질이 이동상에서 정지상으로 전이될 때의 표준 전이 엔탈피를 구하였다. 그리고 절편($\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$)으로부터 표준 전이 엔트로피를 계산하여

Table 6에 수록하였다.

결과에서 보는 바와 같이 모든 엔탈피의 값은 음의 값이며, ΔS° 값은 $-\Delta H^\circ$ 값에 비해 무시해도 좋을 만큼 작은 값을 나타내고 있다. 이 결과는 물의 어는점 근처의 온도에서조차도 엔탈피가 음의 값을 갖는다고 보고한 Melander의 연구 결과와 잘 일치하고 있다²⁶. 또한 온도와 용량 인자가 직선성을 나타내므로 킬레이트의 머무름은 물의 어는점까지도 소수성 효과(Hydrophobic effect)가 작용하여, 물의 어는점 근처의 온도에서조차도 엔탈피가 음의 값을 갖는다고 보고한 Melander의 연구 결과와 잘 일치하고 있다²⁶. 또한 금속 킬레이트의 $\ln k'$ 와 ΔH° 값의 크기를 상대적으로 비교해 보면 $\ln k'$ 값이 감소할수록 ΔH° 값이 증가하는 결과를 얻었다. 비록 본 연구에서는 각 금속 킬레이트에 대하여 독립적으로 메탄올의 함량의 변화에 따르는 엔탈피 값을 구하지는 못하였으나, Table 6에서 보는 바와 같이 메탄올의 함량이 증가하면 $\ln k'$ 값이 감소하므로 이 결과는 메탄올의 함량이 증가하면 비례적으로 ΔH° 값이 증가한다는 Sander 등²⁸의 연구 결과와 잘 일치하는 경향을 나타내고 있다.

용량인자(k')와 엔탈피-엔트로피 보정현상과의 관계. Melander 등^{26,27}은 어떤 온도에서 측정된 용량인자와 그에 대응하는 엔탈피 사이에 직선관계가 있다는 것은 자유에너지와의 관계를 밝혀주는 엔탈피-엔트로피 보정현상에 기인한다는 것으로 설명하였으며, extra-thermodynamic 접근 방법을 택하여 시료의 머무름을 해석하였다. 이러한 접근 방법중의 하나가 엔탈피-엔트로피 보정 현상인데 이것은 전

체적인 자유에너지의 변화와 그에 대응하는 엔탈피의 변화 사이에 직선 관계가 나타나는 현상을 말해준다. 만약 그러한 관계가 있다면, 근본적으로 평형 과정 혹은 화학 반응은 각각 isoequilibrium 혹은 isokinetic 과정이라 말할 수 있으며 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\Delta H^\circ = \beta \Delta S^\circ + \Delta G_\beta^\circ \quad (12)$$

윗 식은 온도가 β 일 때, 엔탈피의 변화는 엔트로피의 변화에 의해 보정되고 자유에너지의 변화는 온도에 대해 독립적이라는 것을 말해준다. 즉 화합물들이 특정한 화학적 변화를 할 때 엔탈피-엔트로피 보정 현상이 관찰되면, 그 때 ΔG_β° 는 일정한 값이 되며 이를 보정온도라 한다. (10) 식에 의하여 isoequilibrium 과정에의 자유에너지의 변화(ΔG_β°)는 다음과 같다.

$$\Delta G_T^\circ = \Delta H^\circ - (1 - 1/\beta) + T\Delta G_\beta^\circ/\beta \quad (13)$$

윗 식은 보정 온도가 조건 변화에 대하여 일정하면 그 머무름 메카니즘도 일정하다는 것을 나타낸다. 온도 변화에 따라서 반응 메카니즘이 변하지 않고 엔탈피가 일정하다면, (11) 식에 의한 Van't Hoff Plot가 직선 관계를 갖는다. 다시 말하면 어떤 계가 isoequilibrium 변화를 하면 Van't Hoff Plot이 직선을 나타내고 기울기가 양의 값을 갖는 것은 고정상의 알킬 사슬에 대한 흡착 엔탈피가 일정하고 음의 값을 갖는다는 것을 말해주는 것이다.

(11)식과 (13)식을 합하면 다음과 같다.

$$\ln k_T' = -\Delta H^\circ/R(1/T - 1/\beta) - \Delta G_\beta^\circ/R + \ln \Phi \quad (14)$$

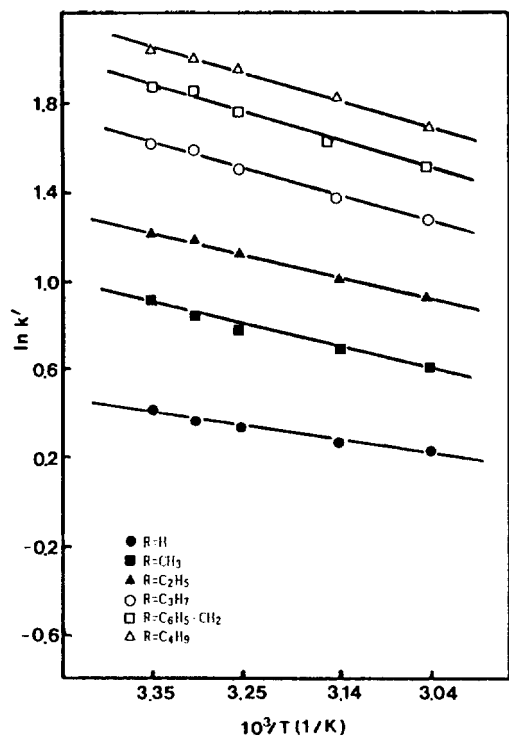


Fig. 6. Van't Hoff plot for $\ln k'$ in the Micropack MCH-5 column.

Table 6. Effect of temperature on the $\ln k'$ for Ni(IEAA-NR)(IEAA-NR) chelates

Metal chelate	$\ln k'$ at temperature(°C)						$-\Delta H^\circ$	ΔS°
	25	30	35	45	55	65		
R=H	0.42	0.29	0.14	-0.09	-0.29	-0.58	0.9993	-3.3072
R=CH ₃	0.92	0.76	0.62	0.40	0.20	0.05	0.9408	-2.7748
R=C ₂ H ₅	1.21	1.12	0.97	0.75	0.55	0.31	0.9424	-2.6019
R=n-C ₃ H ₇	1.61	1.52	1.37	1.14	0.94	0.71	0.9482	-2.4207
R=C ₆ H ₅ -CH ₂	1.87	1.79	1.64	1.40	1.18	0.93	1.0066	-2.4983
R=n-C ₄ H ₉	2.07	1.99	1.84	1.60	1.37	1.13	1.0117	-2.3946

Mobile phase: MeOH/Water (70/30), Flow rate: 0.7 ml/min, Injection volume: 3 μ l.

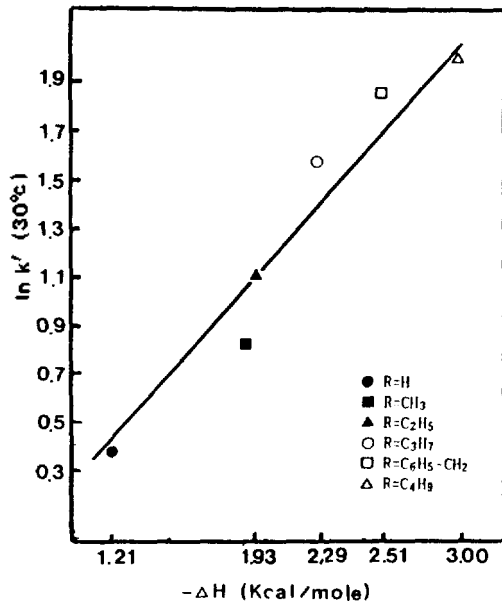


Fig. 7. Compensation plot according to $\ln k'$ and $-\Delta H^\circ$ values.

여기에서 k_T' 는 온도 T 에서의 용량 인자이다. 본 연구에서는 온도(T)를 변화시켜 가면서 측정된 시료의 용량인자(k_T')와 그에 해당하는 엔탈피 변화가 직선성을 나타내고 있는지를 알아보았으며, 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 직선의 기울기로부터 $1/R$ ($1/T - 1/\beta$)로부터 보정 온도 β 를 구할 수 있으며, 이 값이 일정하다면 시료의 머무름 메커니즘이 동일하다는 것을 알 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 분리관의 온도 변화에 따른 엔탈피와 엔트로피값을 구하고, 그로부터 엔탈피-엔트로피 보정을 일으키는 보정온도를 구하여 시료의 머무름 메커니즘을 설명하고자 하였다. 결과에서 보는 바와 같이 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) 킬레이트의 경우 $\ln k' = 1.0103(-\Delta H^\circ) - 0.8528$ 이고, 기울기로부터 구한 β 는 773.48°K이다.

Melander 등²⁶에 의하여 β 가 약 625°K 근처(신뢰한계를 적용하여 약 400~900°K)이면 시료의 분리가 소용매성 효과에 기인한다고 보고된 바 있는데, 본 연구서 구한 β 값은 Melander 등이 제시한 범위에 들어가므로 본 연구에서는 Ni(IEAA-NH)(IEAA-NR) 킬레이트들의 용리 메커니즘이 소용매성 효과에 기인한다는 앞의 결과를 재확인할 수 있었다.

인용문헌

1. D. W. Hausler and L. T. Taylor, *Anal. Chem.*, **53**, 1223 (1981).
2. K. Saitoch and N. Suzuki, *J. Chromatogr.*, **109**, 333 (1975).
3. S. K. Hajibrahim, P. J. C. Tibetts, C. D. Watts, J. R. Maxwell, G. Eglinton, H. Colin, and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **50**, 549 (1978).
4. W. I. White, R. C. Bachmann, and B. F. Burnham, "The Porphyrins", D. Dolphin Ed., Vol. 1, Chap. 12, Academic Press, New York, 1979.
5. F. Vlacil, V. Hamplova, and C. Czecho, *Chem. Commun.*, **50**, 2221 (1985).
6. I. W. Kim, S. H. Kang, J. H. Lim, K. S. Park, and W. Lee, *J. Korean Soc. Anal. Sci.*, **1**, 19 (1988).
7. Y. H. Lee, J. H. Lim, C. H. Kang, and W. Lee, *J. Korean Soc. Anal. Sci.*, **3**, 313 (1990).
8. P. Jandera, H. Colin, and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **54**, 435 (1982).
9. A. Nahum and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **203**, 53 (1983).
10. C. Horvath, *LC, Lig. Chromatogr., HPLC Mag.*, **1**, 552 (1983).
11. W. R. Melander and C. Horvath, *Chromatographia*, **18**, 353 (1984).
12. H. Colin, A. Krstulovic, G. Guiochon, and Z. Yun, *J. Chromatogr.*, **255**, 295 (1983).
13. C. Horvath, W. R. Melander, and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).
14. K. Jinno and K. Kawasaki, *Chromatographia*, **17**, 337 (1983).
15. B. L. Narger, J. r. Gant, A. Hartkope, and P. H. Weiner, *J. Chromatogr.*, **128**, 65 (1976).
16. A. Tchapla, H. Colin, and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **56**, 621 (1984).
17. R. Adams, *Org. Reac.*, **7**, 353 (1960).
18. K. Y. Choi, M. H. Lee, and I. W. Kim, 67th Annual Meeting of the Korean Chemical Society (1991).
19. D. L. Saunder, *Anal. Chem.*, **46**, 470 (1974).
20. L. S. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd Ed., pp. 49~66, Wiley, New York (1979).
21. J. L. Glajch, J. J. Kirkland, K. M. Squird, and J. M. Minor, *J. Chromatogr.*, **199**, 57 (1980).
22. A. Hulanicki, *Talanta*, **14**, 1371 (1967).

23. J. Narkievicx, M. Jaronice, M. Borowko, and A. Patrykiew, *J. Chromatogr.*, **157**, 1 (1987).
24. W. R. Melander, B. K. Chen, C. Horvath, *ibid.*, **185**, 99 (1979).
25. L. R. Synder, *J. Chromatogr.*, **179**, 167 (1979).
26. W. Malander, D. E. Campbell, C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **158**, 215 (1978).
27. J. H. Knox, G. Vasvari, *ibid.*, **83**, 181 (1973).
28. L. C. Sander, L. R. Field, *Anal. Chem.*, **52**, 2009 (1980).