

역상 고성능 액체 크로마토 그래피에 의한
Pd(II)-isonitrosoethylacetoacetate imine 유도체
킬레이트의 용리거동에 관한 연구

김 현
(한국화장품(주) 기술개발연구소)

A Study on the Elution Behavior of Pd-Isonitroso ethylacetoacetate
imine Chelates by Reversed-phase High Performance Liquid
Chromatography

Kim, Hyun
(Hankook Cosmetics Co.LTD., R & D Center)

요 약

본 연구는 역상 HPLC를 이용하여 Pd(IEAA-NR)₂ (R=H, CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₆H₅, C₄H₉) 킬레이트를 동시 분리하기 위한 최적분리조건을 조사하고 이들의 용리거동에 관련된 인자들과의 관계를 검토하였는데 그 결과는 다음과 같다.

1. 각 Pd(IEAA-NR)₂ 킬레이트의 분리에 대한 기기의 최적조건을 실험적으로 측정된 결과는 다음과 같다.

분리관 : Micropak MCH-5 (4.0 mm I.D. x 15 cm L, Particle size 5 μm)

용리액 : MeOH / H₂O (73/27)

흐름속도 : 0.7 ml/min.

시료주입량 : 4 μl

검출기 : UV 검출기 (254 nm)

2. 용리액의 흐름속도는 0.7ml/min. 일때 적당한 분리 시간과 좋은 분리도를 나타내었다.

3. 시료 용매가 킬레이트의 머무름 시간에는 큰 영향을 주지 않았으며 금속 킬레이트간의 겹침 현상이 줄어들고 봉우리 면적이 큰 CH₃CN을 사용하였다.

4. 용리액의 조성은 MeOH/H₂O 의 비가 73/27 으로서 대개의 경우에 log k' 값이 0 <

$\log k' \leq 1$ 을 잘 만족하지 않았으며 전체적으로 적당한 분리시간과 좋은 분리도를 나타내었다.

5. Pd(IEAA-NR)₂ 킬레이트의 $\log k'$ 값을 이성분 용매계에서 물의 부피 분율에 대하여 plot 한 결과 이들이 직선적인 관계를 가지는 것으로 보아 Pd(IEAA-NR)₂ 의 머무름은 소수성 효과(Hydrophobic effect)에 크게 기인 한다는 것을 알 수 있었다.

서 론

각종 의약품, 화장품, 농약, 식품, 생체 및 환경시료중에 함유되어 있는 미량 금속의 분리 정량법으로는 AAS, ICP 등과 같은 분광학적 방법과 더불어 최근에는 고성능액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography) 가 널리 이용되고 있다. 그 중에서도 금속이온을 적당한 킬레이트 시약으로 반응시켜 금속킬레이트를 형성시킨 다음 역상법 (reversed phase) 1)-11)에 의한 분리가 주로 이용되고 있으며, 본 연구에서도 이를 채택하였다. 본 연구에서는 Isonitrosoethylacetoacetate (IEAA) imine 유도체를 리간드로 사용하여 Pd(II) 착물을 합성하고 이들 금속 킬레이트 들을 Micropak MCH-5 분리관을 사용하여 역상 HPLC 로 분리하기 위한 최적 분리조건을 조사하였다. 12)-18)

실 험

1. 시약 및 기기

1.1 시 약

본 연구에서 금속 킬레이트의 합성에 사용한 amine 류 (ammonia, methylamine, ethylamine, n-propylamine, n-butylamine 및 benzylamine) 및 모든 시약들은 1급 또는 특급 시약으로서 정제하지 않고 사용하였다. 또한, 용리액 및 시료의 용매로 사용한 methanol, acetonitrile, methylenechloride, methylisobutylketone 등은 HPLC grade 그리고 n-dodecane, n-hexane은 Millipore membrane filter 로 걸러 사용하였다. 모든 실험에서 사용한 물은 탈염장치를 통과시킨 후 사용하였으며 합성한 Pd(IEAA-NR)₂ 킬레이트들은 재결정하여 진공 데시케이터에 보관하였다.

1.2 기 기

- HPLC : Varian, UV-VIS detector
- UV-VIS spectrophotometer : Milton Roy, Spectronic 1201
- FT-IR spectrophotometer : Mattson, Galaxy, 6030E
- FT-NMR spectrophotometer : Bruker, AM-300
- Elemental analyzer : Perkin-Elmer, 283

2. 실험

2.1 Pd(IEAA-NR)₂의 합성

PdCl₂(0.35g, 0.002mol) 및 H-IEAA(0.63g, 0.004mol)을 에탄올 40ml에 녹이고 30% Ammonia 및 4가지 alkylamine(40% methylamine, 50% ethylamine, n-propylamine, n-butylamine 및 benzylamine) 0.0024mol을 가한 후 4시간 교반환류 시켰다. 이 용액을 증발 시키고 생성된 침전물을 거르고 난후 에탄올-클로로포름(1:1)으로 재결정하였다.

위의 방법으로 합성한 Pd(IEAA-NH)₂를 여러가지 아민들과의 아민교환 반응으로 Pd(IEA-A-NR)₂(R=CH₃, C₂H₅, C₃H₇, C₄H₉, C₆H₅-CH₂)를 합성하였다. 즉, Pd(IEAA-NH)₂(0.42g, 0.001mol)을 에탄올-클로로포름(1:1) 50ml에 녹이고 alkylamine 0.002mol을 가한 후 4시간 교반 환류시켰다.

이 용액을 증발시키고 생성된 침전물을 거르고 난 후 에탄올-클로로포름(1:1)으로 재결정 하였다. 수득율은 50-70% 였다.

2.2 크기 인자 (k')의 측정

각 금속 킬레이트의 용리거동을 나타내는 capacity factor는 앞에서 합성한 착물들을 소량씩 녹인 후 Table 1의 조건하에서 HPLC로 분리하여 얻어진 크로마토그램으로 부터 구하였으며 이를 Table 2.에 나타내었다. 2.3 금속 킬레이트의 분포비 측정 금속 킬레이트의 머무름 순서와 그 메카니즘을 조사하기 위하여 stationary phase의 모델인 n-dodecane / n-hexane 10ml를 취하여 분액 깔대기에 넣고 각 금속 킬레이트용액을 μ l 취하여 가하였다. 여기에 용리액으로 사용한 극성 유기 용매와 물의 혼합액인 methanol과 water를 섞은 이 성분 혼합 용액을 10ml씩 가한 다음 15분간 진탕시켜 금속 킬레이트가 두 상에 충분히 분배되도록 하였다.

두 층으로 분리 시킨후 각 상에 분포된 금속 킬레이트의 농도를 UV-VIS 분광법으로 abs-orbnance를 측정하여 구한 다음 분포계수를 구하였으며 이를 Table 2.에 나타내었다. 이 때 측정 파장은 HPLC 검출 파장과 같은 254nm이다.

결과 및 고찰

1. Pd(II) 착물의 구조

합성한 Pd(II) 착물들은 오렌지색 또는 노란색의 결정으로서 모두 공기중에서 안정하여 물에는 거의 녹지 않았으나, 일반적인 유기용매 (chloroform, acetonitrile, alcohol 등)에는 상당히 녹았다. 본 실험에서는 합성된 착물들의 종류, 색깔 및 원소 분석결과는 Table 2와 같다. 또한 금속 킬레이트의 구조 확인에는 IR(Table 3), ¹H NMR(Table 4), ¹³C NMR(Table 5)등을 사용했다. 원소 분석의 결과에 의하면 모든 Pd(II) 착물은 금속과 리간드가 1:2의 몰비로 결합되어 있음을 알 수 있다.

이들 착물들은 모두 반자기성의 사각 평면 구조를 가질 것으로 생각된다. 위의 결과들을 요약하면 Pd(IEAA-NR)₂ 착물에서 두 개의 IEAA-NR 이민리간드는 모두 N-O의 질소 원자를 통해서 배위된 대칭적인 5원-5원 고리를 가진 것을 확인할 수 있었다.

2. 용리액의 흐름속도에 대한 영향

일반적으로 용리액의 흐름속도는 분리도와 전체 용리시간에 영향을 미치므로 Pd(IEAA-NR)₂ 킬레이트의 분리도와 그 관계를 조사하기 위하여 용리액의 흐름속도를 0.5-0.9 ml/min의 범위에서 변화시켜 가면서 얻은 머무름 시간을 Table 6에 수록하였다.

결과에서 보면 relative retention time이 일정할 경우 흐름 속도가 커질수록 시료의 용리에 적당한 것으로 생각되지만 흐름 속도가 커지면 분리관의 압력이 서서히 증가하여 장시간 용리시킬 경우 분리도의 재현성을 감소시킬 가능성이 있다. 따라서 이와 같은 점을 고려하여 용리시간이 10분대이고 적당한 압력을 나타내는 0.7 ml/min.가 가장 적당한 흐름 속도라고 생각된다.

3. 시료 용매가 분리도에 미치는 영향

Pd(IEAA-NR)₂ 킬레이트는 시료를 녹이는 용매에 따라 용리거동에 어느 정도 영향을 미칠 것으로 생각되어 대표적인 용매 CH₃CN, CH₃OH, CH₂Cl₂, MIBK 등을 사용하여 용매에 따른 머무름 시간과 봉우리 넓이를 Table 7에 나타내었다. 결과에서 보면, 용매-용리액 사이의 상호작용은 금속 킬레이트의 용리 거동에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 이들 금속 킬레이트를 동시 분리시키기 위하여 적당한 용리시간과 봉우리 넓이를 나타낸 CH₃CN를 시료용매로 사용하였다.

4. 용매세기의 영향

용매의 세기가 분리도에 미치는 영향을 조사한 결과 용리액의 세기에 따른 일련의 크로마토그램을 Fig 1에 나타내었다. 물의 분율이 증가할수록 즉 용매세기가 증가할수록 전반적으로 좋은 분리도를 나타내고 있으나 (D) (E)의 경우는 용리시간이 너무 길어지고 봉우리의 폭이 넓어짐을 볼 수 있었다. 여기서 가장 좋은 분리도와 적당한 용리시간을 보여주는 것은 (C)의 경우(73/27)이다. 용매세기와 k'과의 관계를 Fig 2, 3에 나타내었다.

Abstract

Liquid Chromatographic behavior of Pd(II) in Isonitrosoethylacetoacetate imine IEAA-NR; R=H, CH₃, C₂H₅, n-C₃H₇, n-C₄H₉, C₆H₅-CH₂) Chelates were investigated by r-eversed phase high performance liquid chromatography on Micropak MCH-5 Column using Methanol/Water as mobile phase.

The optimum condition for the separation of Pd-Isonitrosoethylaceto acetate i-mine chelates were examined with respect to the flow rate, mobile phase strength. It was found that Pd(IEAA-NR)₂ chelates were eluted in an acceptable range of the 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 mixture with in the binary mobile phase was examined.

Also, the dependence of k' on the liquid-liquid extraction distribution constant in methanol-water / n-alkane extraction system was on system was investigated for Pd(IEAA-NR)₂. Both kinds of dependence are linear, which suggests that the retention of the electroneutral metal chelates be largely due to the solvophobic effect.

참고 문헌

1. V. ANDRISANO, V. CAVRINI, G. SCAPINI, J. SOC. Cosmet. Chem., 43, 69-83(3/4 1992)
2. J.M.Greenwood, H.Veening, B.R.Willefond, J.Organometal. Chem., 38, 345 (1969).
3. Maria Ines Rocha Miritello Santoro, Patricia Maria B.G, Cosmetics & Toiletries, 71-74, 6(1993)
4. A.M.Bond, G.G.Wallace, Anal. Chem. Acta, 164, 223 (1984).
5. A.M.Bond, G.G.Wallace, Anal. Chem., 56, 2085 (1984).
6. R.M.Smith, A.M.Butt, A.Thakur, Analyst., 100, 35 (1985).
7. J.N.King, J.S.Friz, Anal.Chem., 59, 703 (1987).
8. W.Lee, D.W.Lee, Y.J.Kim, H.C.Kim, J.Korean Chem. Soc.,
9. I.Susumu, Y.Mitsure, Bunseki Kagaku, E 319, 31 (1982).
10. I.Susumu, T.Morita, Y..Mitsuru, J.Liq. Chromatogr., 7, 2467 (1984).
11. I.Sumumu, M.Toshihiro, et al., Bunseki Kagaku, 32, 285 (1983).
12. A.Nahum, .Horvath, J.Chromatogr., 203, 53 (1983).
13. W.R.Melander, C.Horvath, Chromatographia, 18, 353 (1984).

14. P.Jandera, H.Colin, G.Guiochon, Anal. Chem., 54, 453 (1982).
15. H. Colin, A.Krstulovis, G.Guiochon, Z.Yun, J.Chromatogr., 255, 295 (1983).
16. F.Vlácil, V.Hamplova, C.Czecho, Chem. Commun., 50, 2221 (1985).
17. L.R.Snyder, J.J.Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd Ed., pp49-66, Wiley, New York (1979).
18. L.R.Snyder, J.Chromatogr., 179, 167 (1979).

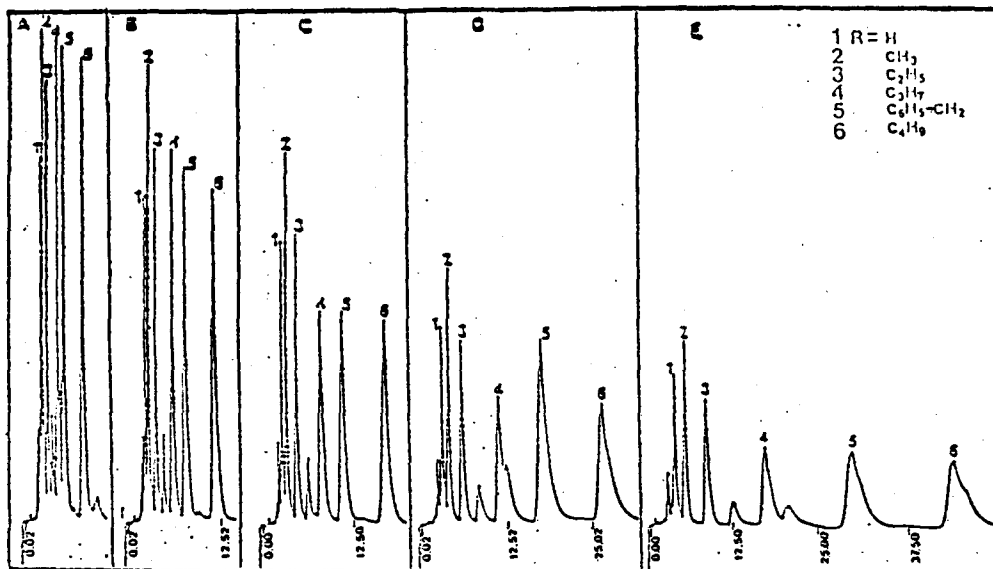


Fig. 1. Chromatogram of Pd(IEAA - NR)₂ chelates as a function of mobile phase composition.

Remark :

1) Mobile phase : MeOH/H₂O (A) 80/20 (B) 75/25 (C) 73/27 (D) 70/30 (E) 65/35

2) Flow rate : 0.7ml/min

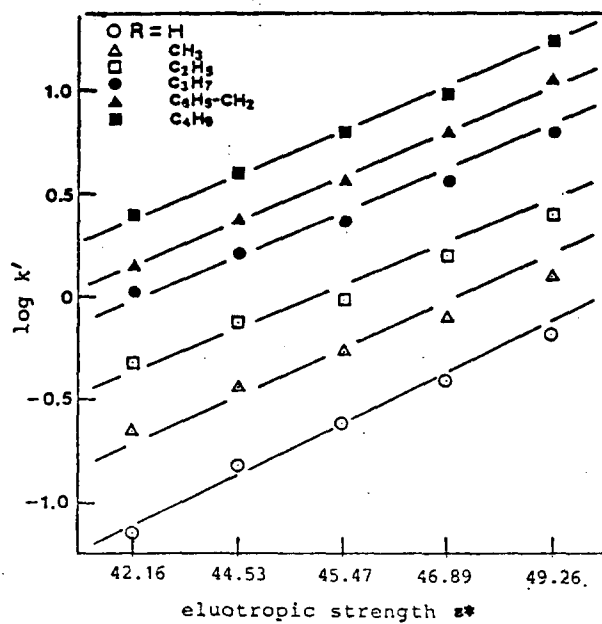


Fig. 2. Relationship between eluotropic strength ϵ^* of the mobile phase and $\log k'$ of Pd(IEAA - NR)₂ chelates.

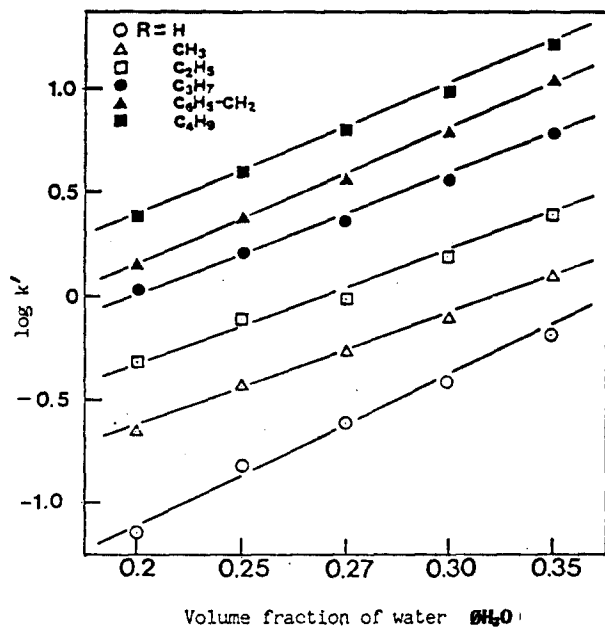


Fig. 3 Dependence of $\log k'$ of $\text{Pd}(\text{IEAA-NR})_2$ chelates on the volume fraction of water in mixture with methanol.

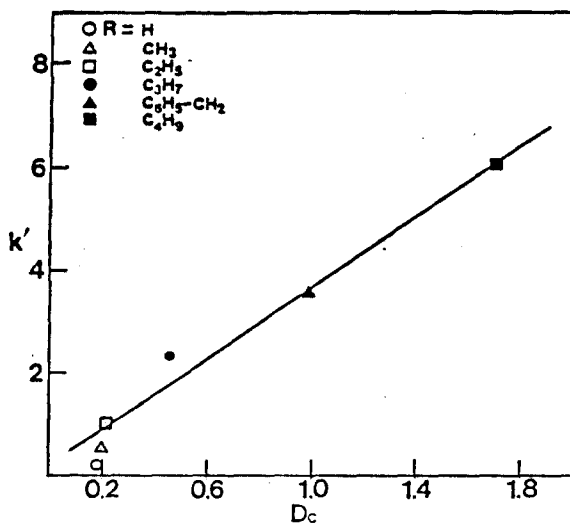


Fig. 4. Dependence of capacity factor (k') of $\text{Pd}(\text{IEAA} - \text{NR})_2$ chelates on their distribution ratio (D_c) for extraction from aqueous methanol into *n* - dodecane/*n* - hexane.

Table 1. HPLC operating condition

Description	Condition
Column	Micropak MCH-5(4.00mmID × 15cm 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	4 μ l
Detection	UV 254 nm, AUFS 0.02
Chart speed	0.5 cm/min

Table 2 Capacity factor (k') and liquid - liquid distribution ratio (Dc) of Pd(IEAA - NR)₂ chelates.

Metal chelates	k'	Dc
R = H	0.24	0.18
R = CH ₃	0.52	0.20
R = C ₂ H ₅	1.04	0.22
R = C ₃ H ₇	2.36	0.45
R = C ₆ H ₅ - CH ₂	3.62	0.94
R = C ₄ H ₉	6.05	1.71

Remark :

- 1) Determination of distribution ratio : $Dc = C_{u, org} / C_{u, aq}$
- 2) Aqueous phase : MeOH/Water (73/27)
- 3) Organic phase : n - dodecane/n - hexane
- 4) Shaking time : 15min

Table 3. Important infrared spectral data of Pd(II) Complexes^a (cm⁻¹)

Complex	N-H str	C = O str	N-O str
Pd(IEAA-NH) ₂	3312 w	1688 s	1190 m
Pd(IEAA-NMe) ₂	-	1694 s	1211 m
Pd(IEAA-NEt) ₂	-	1725 s	1223 m
Pd(IEAA-NPr) ₂	-	1711 s	1211 m
Pd(IEAA-NBu) ₂	-	1711 s	1206 m
Pd(IEAA-NBz) ₂	-	1723 s	1209 m

^aS: strong, m: medium, w: weak

Table 4. ¹H-NMR spectral data of Pd(II) complexes

Complex	Chemical shift (ppm)		
	-OCH ₂ CH ₃	=C-CH ₃	=NR
Pd(IEAA-NH) ₂	1.28 t, 4.25q	2.32 s	8.19 s (H)
Pd(IEAA-NMe) ₂	1.32 t, 4.28q	2.18 s	3.32 s(CH ₃)
Pd(IEAA-NEt) ₂	1.35 t, 4.32q	2.25 s	1.15 t, 3.72 q(CH ₂ CH ₃)
Pd(IEAA-NPr) ₂	1.30 t, 4.22q	2.15 s	0.95 t, 1.48 m, 3.68 t(CH ₂ CH ₂ CH ₃)
Pd(IEAA-NBu) ₂	1.31 t, 4.30q	2.23 s	0.97 t, ~1.4 m, 3.78 t(CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃)
Pd(IEAA-NBz) ₂	1.28 t, 4.25q	2.17 s	5.19 s, ~7.3 m(CH ₂ C ₆ H ₅)

^as: singlet, t: triplet, q: quartet, m: multiplet

Table 5. ¹³C-NMR spectral data of Pd(II) complexes

Complex	Chemical shift (ppm)					
	-OCH ₂ CH ₃	C=O	=C-CH ₃	C=N-O	C=NR	=NR
Pd(IEAA-NH) ₂	13.96, 60.34	179.11	21.66	159.34	149.70	-
Pd(IEAA-NMe) ₂	14.13, 61.53	173.52	16.99	161.66	148.82	35.92
Pd(IEAA-NEt) ₂	14.67, 61.54	171.55	15.87	161.89	149.07	14.67 42.21
Pd(IEAA-NPr) ₂	14.03, 61.48	173.41	23.33	161.96	149.01	11.32 16.08 48.85
Pd(IEAA-NBu) ₂	14.07, 61.55	171.34	20.19	167.06	149.06	14.07 16.10 32.21 47.29
Pd(IEAA-NBz) ₂	14.07, 61.68	175.31	17.35	161.64	149.14	49.69 126.92 127.10 128.54 137.93

Table 6 Effect of flow rate on the retention time for Pd(IEAA-NR)₂

Chelates.

Metal	Alkyl	Amount (μg/ml)	flow rate										
			Ion groups Added					retention time					
			0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	
			retention time					relative retention time					
Pd	H	50	4.16	3.62	3.04	2.73	2.38	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	Methyl	50	5.08	4.49	3.73	3.39	2.93	1.22	1.24	1.23	1.24	1.23	
	Ethyl	50	6.85	6.67	5.07	4.67	3.99	1.65	1.70	1.67	1.71	1.68	
	Propyl	50	11.38	10.38	8.48	7.82	6.71	2.74	2.85	2.79	2.86	2.82	
	Benzyl	50	15.49	14.25	11.61	10.07	9.05	3.72	3.94	3.82	3.95	3.80	
	Butyl	50	23.61	21.28	17.58	16.04	13.62	5.68	5.88	5.78	5.88	5.72	

Remarks : 1) Mobile phase : MeOH / H₂O (73/27) 2) Injection volume : 4μl

Table 7. The peak area and Retention Time of Pd(IEAA-NR)₂ chelates in Solvents.

Metal Chelate	Amount Added. (μg/ml)	Solvent	Retention Time (min)	Peak Area(x10)
Pd(IEAA-NH) ₂	50	CH ₃ CN	2.99	16.58
		CH ₃ OH	2.98	15.8
		CH ₂ Cl ₂	3.01	27.9
		MIBK	3.05	14.9
Pd(IEAA-NCH ₃) ₂	50	CH ₃ CN	3.65	23.1
		CH ₃ OH	3.64	24.4
		CH ₂ Cl ₂	3.8	31.7
		MIBK	3.72	22.6
Pd(IEAA-NC ₂ H ₅) ₂	50	CH ₃ CN	4.91	23.5
		CH ₃ OH	4.91	22.3
		CH ₂ Cl ₂	5.19	27.4
		MIBK	4.91	19.5
Pd(IEAA-NC ₃ H ₇) ₂	50	CH ₃ CN	8.11	33.1
		CH ₃ OH	8.06	17.1
		CH ₂ Cl ₂	8.66	26.8
		MIBK	8.2	14.6
Pd(IEAA-NC ₆ H ₅ -CH ₂) ₂	50	CH ₃ CN	11.3	37.5
		CH ₃ OH	-	-
		CH ₂ Cl ₂	11.98	20.8
		MIBK	11.28	7.9
Pd(IEAA-NC ₄ H ₉) ₂	50	CH ₃ CN	17.05	48.9
		CH ₃ OH	16.8	50.2
		CH ₂ Cl ₂	17.94	23.4
		MIBK	17.09	12.7

Table 8. Colors, melting points, and elemental analysis data of Pd(II) complexes

Complex	Color	M.P. (°C)	Calc. (%)			Found (%)		
			C	H	N	C	H	N
Pd(IEAA-NH) ₂	orange	175	34.29	4.29	13.33	34.01	4.11	13.19
Pd(IEAA-NMe) ₂	yellow	177	37.50	4.91	12.50	37.72	4.85	12.33
Pd(IEAA-NEt) ₂	yellow	175	40.34	5.46	11.76	40.62	5.63	11.65
Pd(IEAA-NPr) ₂	yellow	132	42.86	5.95	11.11	42.53	6.07	11.02
Pd(IEAA-NBu) ₂	yellow	133	45.11	6.39	10.53	44.97	6.51	10.76
Pd(IEAA-NBz) ₂	yellow	226	52.00	5.00	9.33	52.32	4.91	9.51