

역상 액체 크로마토그래피에 의한 Iron(III)porphyrin 착화합물들의 분리 및 용리거동에 관한 연구

姜昌禧* · 金仁煥† · 李 垣

*제주대학교 자연과학대학 화학과

†대구대학교 사범대학 화학교육과

경희대학교 문리과대학 화학과

(1993. 9. 7 접수)

Separation and Elution Behavior of Some Iron(III)porphyrin Complexes by Reversed-Phase Liquid Chromatography

Chang-Hee Kang*, In-Whan Kim†, and Won Lee

*Department of Chemistry, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

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

Department of Chemistry, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

(Received September 7, 1993)

요 약. 몇 가지 iron(III)porphyrin 착화합물을 합성하고, 이들에 대하여 역상 액체 크로마토그래피에서의 최적 분리조건 및 용리거동을 조사하였다. 분리관, 흐름속도, 용리액의 조성 등을 변화시킨 실험에서 분리관은 NOVA-PAK C₁₈, 용리액은 methanol/water의 이성분 혼합용매를 적당히 조절하였을 때 용량인자가 최적 분리조건인 $0 \leq \log k' \leq 1$ 범위를 만족시켰다. 용리거동에 관련된 인자들로는 용리액의 세기, 분포비(D_c) 및 분리관의 온도변화에 따른 엔탈피(ΔH°), 엔트로피(ΔS°), 보정온도(β)를 조사하여 분리 메카니즘을 규명하였다. 이성분 용매계에서 용리 세기 및 물의 부피분율과 용량인자($\log k'$)와의 관계를 조사한 결과 이들간에는 직선성이 잘 성립되었으며, 부피비와 용량인자와의 관계에서도 비교적 직선성을 잘 나타내었다. 이러한 결과로부터 시료의 용리 메카니즘이 소용매성 효과에 기인하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 열역학적인 방법으로 용리거동을 조사하기 위하여, van't Hoff plot으로부터 엔탈피, 엔트로피를 구하였다. 엔탈피와 용량인자와의 상관관계를 조사한 결과 iron(III)porphyrin 착화합물과 정지상과의 상호작용은 온도변화에 관계없이 일정함을 알 수 있었고, 정지상과의 소용매성 결합 과정은 등평형 거동을 나타내었다.

ABSTRACT. Some iron(III)porphyrin complexes were prepared, and identified by the spectroscopic methods. Elution behavior of iron(III)porphyrin complexes was investigated by reversed-phase HPLC. The optimum conditions for the separation of iron(III)porphyrin complexes were examined with respect to flow rate and mobile phase strength. These complexes were successfully separated on NOVA-PAK C₁₈ column using methanol/water(95/5) for [T₂CF₃PP]Fe(R) and methanol/water (98/2) for [(P)Fe(C₆F₅)] as a mobile phase. It was found that these complexes were largely eluted in an acceptable range of capacity factor value ($0 \leq \log k' \leq 1$). The dependence of the capacity factor (k') on the volume fraction of water in the binary mobile phase as well as the dependence of k' on the liquid-liquid extraction distribution ratio (D_c) in methanol-water/*n*-pentadecane extraction system showed a good linearity. It means that the retention of iron(III)porphyrin complexes on NOVA-PAK C₁₈ column is largely due to the solvophobic effect. Also, there was a good linear dependence of the capacity factor(k') on the column temperature and enthalpy calculated by van't Hoff plot. From these results, it was confirmed that the retention mechanism of iron(III)porphyrin complexes in reversed-phase liquid chromatography was in-

riant under the condition of various temperature, and the solvophobic binding process exhibited isoequilibrium behavior.

서 론

Porphyrin 화합물은 유리된 상태 또는 금속과 결합된 착화합물 형태로 천연적으로 생성되며, 주로 생체내에 존재하는 것으로 알려져 있다. 금속-porphyrin 착화합물은 산소 운반체 또는 전자전달체로 작용하여 신진대사에 관여함으로써 생체내에서 생화학적으로 중요한 역할을 하며, 널리 알려진 시토크롬, 헤모글로빈, 크로로필, 비타민 B₁₂ 등이 그 대표적인 예이다¹. Porphyrin은 고리의 중심에 있는 네 개의 질소원자가 전이금속을 수용하여 배위결합할 수 있는 이상적인 공간을 가지고 있어서 여러가지 금속과 안정한 착화합물을 형성하는 우수한 리간드이다. 특히 2가 음이온 porphyrin이 2가의 금속 양이온과 착화합물을 잘 형성하는 경향이 있으며 이들의 안정도는 Irving-Williams 계열에 따른다고 알려져 있다². 현재까지 금속 porphyrin에 대한 연구 경향을 보면, 주로 porphyrin 고리의 메조-위치, 즉 methine기의 수소 대신 치환체가 결합된 메조-치환형이나 베타-위치, 즉 porphyrin기의 수소 대신 치환체가 결합된 베타-치환형의 porphyrin 화합물을 리간드로 사용하여 철, 니켈, 코발트, 마그네슘 등과 같은 금속들과 착화합물을 합성하고^{3,4}, 그 구조나 전자스핀상태 또는 물리화학적 성질을 규명하기 위한 연구에 관심이 집중되어 왔다.^{5,6} 국내에서도 porphyrin 화합물에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며, 특히 생체내에서 생화학적 반응을 규명하기 위하여 금속-porphyrin 착화합물의 특성인 산화-환원 반응성 및 그 메카니즘 규명을 위한 전기화학적 연구에 많은 관심을 보이고 있다.

금속-porphyrin을 생체 및 천연물 시료로부터 분리하기 위한 방법으로는 크로마토그래피 및 용매 추출에 의한 분리법이 주로 이용되고 있다.⁷ HPLC에 의한 분리, 확인방법은 1978~1982년에 S. K. Hajibrahim 등이 생체 시료로부터 Zn-protoporphyrin, Mg-protoporphyrin, Ni-ethioporphyrin들의 분리를⁸ 시도한 이래 계속해서 연구 결과들이 발표되고 있지만 의외로 그리 많지는 않은 편이다. 또 대부분의 경우 실리카와 같이 비교적 극성이 큰 정지상과,

hexan, 클로로포름, 아세톤 등과 같이 비교적 극성이 작은 용매를 용리액으로 사용한 정상(normal phase) 분리법을 주로 이용하고 있고⁹⁻¹⁰, 역상(reversed-phase) 분리법이 이용된 것은 비교적 최근의 일이다. 더욱이 역상 액체 크로마토그래피에서 그 분리 메카니즘을 규명하기 위한 연구는 아직까지 거의 이루어지고 있지 않은 상태이다. 최근에 역상 액체 크로마토그래피에 의해 금속킬레이트화합물을 분리하기 위하여 비극성 C₁₈ 분리관을 사용한 역상법에서의 용리거동 및 메카니즘에 대한 연구 결과들이 F. Vlácil 등에 의해 발표되었다^{11,12}. 역상분리법에 의한 금속킬레이트의 분리는 C₁₈ 분리관을 사용하여 금속킬레이트의 극성, 용해도, 기하학적 구조 등과 같은 물리화학적 성질의 차이에 의해 분리시키는 방법을 택하고 있으며¹³⁻¹⁷, 특히 역상분리법에서 금속킬레이트의 분리 메카니즘은 소용매성 효과(solvophobic effect)에 크게 기인하는 것으로 발표된 바 있다¹⁸.

본 연구와 관련된 역상 HPLC 연구들을 살펴보면, 먼저 1984년 Lim 등이 dicarboxylic porphyrin과 Fe, Co, Cu, Zn과의 금속-porphyrin 착화합물들을 methanol/NH₄OAc 용리액을 사용하여 분리함으로써 동시 분석의 가능성을 제시하였다¹⁹. 그 후 1986년 Kennedy 등은 ODS 분리관을 사용하여 섬유 중에 존재하는 porphyrin carboxylic acid의 정량을 시도하였으며²⁰, 1987년 Takayama는 분리관과 CH₃CN/water 용리액을 사용하여 uroporphyrin, coproporphyrin 등을 분리하는데 성공하였다²¹. 또 1989년 Dixon 등은 극성 Silicagel 분리관과 비극성 C₈ 분리관에서 CH₃CN/methanol/CH₃COOH/pyridine 혼합 용매를 용리액으로 사용하여 iron porphyrin 착화합물을 분리하였다²². 일반적으로 탄소수가 많고, 거대고리 화합물인 porphyrin 유도체와의 착화합물인 금속-porphyrin의 경우 porphyrin에 결합된 치환기의 극성 정도에 따라 친수성 또는 소수성의 성질이 결정된다. 현재까지 알려진 천연금속-porphyrin에서는 친수성 작용기를 갖고 있는 경우가 많으나, 합성 금속-porphyrin의 경우는 주로 소수성 작용기를 갖

는 메조-치환형이 많이 합성되고 있고, 본 연구에서 사용된 iron(III)porphyrin류들 역시 메조-치환형으로 소수성이 큰 화합물들이다. 본 연구에서는 이러한 금속-porphyrin을 비극성 C_{18} 분리관을 사용하여 역상 액체 크로마토그래피를 분리하기 위한 조건, 용리거동 및 분리 메카니즘을 조사하고, 동시분리 가능성을 검토하기 위하여 몇 가지 iron(III)porphyrin 착화합물을 시료로 사용하여 다음과 같은 내용으로 연구를 수행하였다.

첫째, 축방향 리간드의 종류가 다른 aryl(tetra-*p*-trifluoromethylphenylporphinato) iron(III); [T_pCF_3PP]Fe(R), (R = C_6H_5 , C_6F_4H , C_6F_5) 착화합물과 porphyrin 거대고리의 메조-위치 치환체가 다른 pentafluorophenylporphinato iron(III); [(P)Fe(C_6F_5), (P = TPP, T_pCH_3PP , T_pCF_3PP)] 착화합물을 합성하여 그 구조를 원소 분석법, 질량 분석법, 자외-가시선 분광광도법, 적외선 분광법, 핵자기공명 분광법으로 확인하였다.

둘째, 합성한 몇 가지 iron(III)porphyrin 착화합물들에 대한 역상 액체 크로마토그래피에서의 분리 가능성 및 용리거동을 알아보기 위하여, 이에 요구되는 분리관의 종류, 흐름속도 등과 같은 최적 분리 및 기기조건을 조사하였다.

셋째, 용리액의 조성과 용량인자(capacity factor, *k'*), 및 용량인자와 분포계수와의 상관관계를 조사, 검토함으로써 이들 착화합물의 용리거동 및 분리 메카니즘을 고찰하였다.

넷째, 온도를 변화시키면서 크로마토그램을 측정하여 분리관내에서 용질이 이동사에서 정지상으로 이동될 때 표준전이엔탈피를 구하였고, 용량인자(*k*)와 엔탈피와의 상관관계로부터 iron(III)porphyrin 착화합물의 C_{18} 분리관내에서의 분리 메카니즘을 열역학적 측면에서 조사, 규명하였다.

실 험

사용기기 및 시약. Iron(III)porphyrin 착화합물의 구조 확인에는 VG 70-70 Mass Spectrometer, Service de Microanalyse Elemental analyzer, Perkin-Elmer 580B IR Spectrometer, BRUKER WM 400 FT-NMR Spectrometer(400 MHz for 1H -

NMR) 및 Perkin-Elmer 559 UV-Visible Spectrophotometer를 각각 사용하였다. 또한 iron(III)porphyrin 착화합물들의 분리에 사용한 HPLC는 Varian Model VISTA 5500 Liquid Chromatograph로서 영인 과학사의 YOUNGIN Model D 520A Integrator와 UV-Vis 검출기가 부착된 것이다. 분리관은 Waters사의 NOVA-PAK C_{18} (3.9 mm×15 cm, N=11,600 Particle size=4 μ m)을 각각 사용하였다. 그리고 iron(III)porphyrin 착화합물들의 분포비 측정에서 착화합물의 농도는 KONTRON사의 UKIKON 860 UV-Visible Spectrophotometer를 사용하였고, 시료의 혼합은 국제이화학상사의 SH-SV형 Shaker, 실험에서 사용된 초순수의 제조에는 Millipore사의 Milli-Q/-RO Reagent Water Purification System을 사용하였다. HPLC 시료용 iron(III)porphyrin 착화합물들은 주로 Houston 대학 화학과에서 합성한 것을 사용하였으며, 정제 및 구조확인에 필요한 magnesium sulfate, benzene, heptane, toluene, benzonitrile 등은 Aldrich사와 Fluka사의 특급 시약을 사용하였다. 또한 HPLC 실험에서 용리액 또는 용매로 사용한 CH_3OH , CH_2Cl_2 , CH_3CN , THF 등은 Merck사의 액체 크로마토그래피용 시약으로 Millipore membrane filter로 거르고 초음파 세척기에서 용존 기체를 제거한 다음 사용하였다. 그리고 모든 실험에 사용한 물은 Millipore사의 초순수 제조장치로 정제한 후 용존 기체를 제거하여 사용하였다.

실험방법

Iron(III)porphyrin 착화합물의 합성. 본 실험에서 사용한 두 종류의 iron(III)porphyrin 착화합물은 aryl(tetra-*p*-trifluoromethylphenylporphinato) iron(III); [$(T_pCE_3PP)Fe(R)$], (R = C_6H_5 , C_6F_4H , C_6F_5)와 pentafluorophenylporphinato iron(III); [(P)Fe(C_6F_5), (P = TPP, T_pCH_3PP , T_pCF_3PP)]이다. 여기서 [$(T_pCF_3PP)Fe(R)$]의 R은 phenyl(C_6H_5), tetrafluorophenyl(C_6F_4H), pentafluorophenyl(C_6F_5)이고, [$(T_pCF_3PP)Fe(R)$]형 착화합물은 문헌의 방법으로²³⁻²⁶ 암실에서 합성하였으며, 축 방향 리간드가 chloro기인 [$(T_pCF_3PP)FeCl$]을 먼저 합성하였다. ($T_pCF_3PP)FeCl$]을

benene에 녹여, Schlenk tube에 넣은 다음 phenylmagnesium bromide, tetrafluorophenylmagnesium bromide, pentafluorophenylmagnesium bromide의 벤젠 용액 각각을 한 방울씩 서서히 가하면서 아르곤 기류하의 상온에서 약 2일간 반응시켰다. 반응생성물은 물 소량을 가하여 가수분해시킨 후 분리된 벤젠 용액층을 탈수시키고, 거른 다음 염기성 알루미늄이나 충전된 판에서 분리하였다. 분리된 생성물은 용액을 감압증류시킨 후, 이를 다시 benzene/heptane=2/1 또는 toluene/heptane=2/1 또는 toluene/heptane=2/1 혼합용매에서 재결정시켜 최종생성물을 얻어냈다. [(P)FeCl]을 먼저 합성한 후, [(P)FeCl]를 pentafluorophenyl magnesium bromide를 Grignard 반응시켜 최종생성물을 얻어냈다.

HPLC의 분리조건 선택. 분리관의 종류에 따라 iron(II)porphyrin 착화합물의 분리 상태를 비교하기 위하여 사용된 분리관은 NOVA-PAK C₁₈, μBONDAPAK C₁₈ 및 YOUNGIN PAK C₁₈ 세 가지이다. 농도가 약 30~50 μl/ml이 되도록 시료를 CH₂Cl₂에 녹이고, 이 용액 5 μl를 micro syring로 HPLC에 주입시켜 410 nm 검출과장에서 크로마토그램을 작성하였다. 용리액의 조성 및 흐름속도를 [(T_pCF₃PP)Fe(R)]형 착화합물들의 경우 methanol/water=95/5와 0.8 ml/min에 [(P)Fe(C₆F₅)]형 착화합물은 methanol/water=98/2와 1.0 ml/min로 하여 각각 측정하였다.

용리액의 최적 흐름속도를 선택하기 위하여 [(T_pCF₃PP)Fe(R)]형 착화합물은 methanol/water=95/5 용리액을 사용하여 0.4~1.0 ml/min 범위내에서, [(P)Fe(C₆F₅)]형 착화합물은 methanol/water=98/2 용리액을 사용하여 0.4~1.4 ml/min의 범위내에서 0.2 ml/min의 간격으로 흐름속도를 변화시키면서 각각의 크로마토그램을 얻어내고, 전체 머무름 시간이 10분을 넘지 않으면서 분리도가 가장 좋은 용리액의 흐름속도를 선택하였다. 이 때 분리관은 NOVA-PAK C₁₈을 사용하였으며, 검출과장은 410 nm이다.

가장 양호한 시료 용매를 선택하기 위하여 시료들에 대해 비교적 큰 용해력을 갖는 유기용매 중에서 극성 정도가 다른 네 가지 용매, 즉 CH₃CN, THF, CH₂Cl₂, C₆H₆을 선정하여 실험하였다. 이들 용매 각각에 시료 농도가 대략 30~50 μl/ml 정도가 되

도록 시료를 녹인 후 용액 약 5 μl를 HPLC에 주입시켜 크로마토그램을 얻어내고, 분리도가 가장 좋은 용매를 선택하였다. 이 때 용리액의 조성, 용리액의 흐름속도 및 검출과장은 앞의 조건과 같다.

용량인자(k')의 측정. 용리액의 용매 세기에 따른 분리도의 영향을 확인하기 위하여, [(T_pCF₃PP)Fe(R)] 착화합물들의 경우 0.8 ml/min의 흐름속도로 methanol/water=92/8~100/0의 범위내에서, 또 [(P)Fe(C₆F₅)] 착화합물들은 1.0 ml/min의 흐름속도로 methanol/water=95/5~100/0의 범위내에서 에탄올과 물의 혼합비율을 변화시키면서 실험하였다. HPLC의 실험은 앞에서와 동일한 조건으로 각각의 크로마토그램을 작성한 후 다음 식에 따라 용량인자(k')를 계산하였다. 식에서 t는 식료의 머무름 시간(retention time)이고, t₀는 불감시간(dead time)이다.

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

분포비 측정. 배치법으로 분포비를 측정하기 위하여 정지상의 모델인 n-pentadecane 10 ml를 분별 깔대기에 넣고, 각 iron(III)porphyrin 착화합물들을 CH₂Cl₂에 녹인 용액 50 μl와 HPLC에서 용리액으로 사용한 에탄올과 물의 혼합액 10 ml를 가한 다음 shaker에서 10분간 혼합시켜 시료가 두 상에 충분히 분배되도록 하였다. 두 층을 분리시키고 두상에 분배된 iron(II)porphyrin 착화합물들의 농도를 최대 흡수과장(410 nm)에서 자외-가시선 분광광도계로 측정하였다. 이 때 두 층에 분포된 시료의 분포비(D_i)는 다음 식에 따라 계산하였으며, 식에서 C_{M.org}는 유기용매층(n: pentadecane)의 시료 농도이고, C_{M.aq}는 수용매층(methanol/water)의 시료 농도이다.

$$D_i = C_{M.org} / C_{M.aq}$$

온도 변화에 따른 용량인자 측정. 시료의 용리 거동을 열역학적 방법으로 규명하기 위하여 온도의 변화에 따른 시료의 머무름과 분리도를 조사하였으며, [(T_pCF₃PP)Fe(R)] 착화합물들의 경우 6~30°C에서 6°C 간격으로, [(P)Fe(C₆F₅)] 착화합물들은 3~23°C에서 5°C 간격으로 분리관의 온도를 변화시키면서 크로마토그램을 작성하였다. 이 때 HPLC의 분리조건은 앞 실험에서 확인된 최적 분리조건을

따랐으며, 분리관의 온도는 universal column heater 및 저온항온조를 사용하여 조절하였다.

결과 및 고찰

역상 HPLC의 최적 조건 선택. 역상 HPLC로 iron(III)porphyrin 착화합물을 분리하는데 있어서 최적 조건을 확인하기 위하여 용리액의 흐름속도, 시료용매 및 용리액의 조성을 변화시키면서 최적 분리조건을 조사하였고, 그 결과를 Table 1에 수록하였다. 시료는 축방향 리간드의 종류가 다른 [(T_pCF₃PP)Fe(R)]형 착화합물 즉 [(T_pCF₃PP)Fe(C₆H₅)], [(T_pCF₃PP)Fe(C₆F₅H)], [(T_pCF₃PP)Fe(C₆F₅)] 3종과 porphyrin 거대고리의 구조가 다른 [(P)Fe(C₆F₅)]형 착화합물 즉 [(T_pCF₃PP)Fe(C₆F₅)], [(T_pCH₃PP)Fe(C₆F₅)], [(TPP)Fe(C₆F₅)] 3종을 사용하였다. 일반적으로 용리액의 흐름속도는 분리도와 전체 용리시간에 영향을 주므로 시료의 분리도를 향상시키면서 적합한 용리시간을 갖는 최적 용리액의 흐름속도를 결정할 필요가 있다. [(T_pCF₃PP)Fe(R)] 착화합물들의 경우 전체 용리시간은 0.4 ml/min일 때 16.74 min이었고, 1.0 ml/min일 때 6.76 min이었다. [(P)Fe(C₆F₅)] 착화합물의 경우에도 [(T_pCF₃PP)Fe(R)]과 비슷한 결과를 나타냈으며 전체 용리시간은 0.4 ml/min일 때 16.68 min이었으며, 1.4 ml/min일 때 4.74 min이었다. 본 연구에서는 분리도 및 봉우리의 넓이가 가장 이상적이고, 반복 실험시 머무름 시간의 재현성이 가장 양호한 흐름속도를 선택하였으며, [(T_pCF₃PP)Fe(R)] 착화합물의 경우 0.8 ml/min, [(P)Fe(C₆F₅)]의 경우 1.0 ml/min을 최적 흐름속도로 결정하였다. 시료 용매를 선택하기 위하여 시료들에 대해 비교적 큰 용해력을 갖는 유기용매 중에서 극성이 다른 CH₃CN, THF, CH₂Cl₂, C₆H₆ 네 종류의 용매를 선정하여 비교하였다. 실험 결과 용매세기가 비슷한 CH₂Cl₂(ε°=0.42), C₆H₆(ε°=0.32)가 가장 적합한 것으로 나타났으며, 모든 실험에서 시료들은 CH₂Cl₂에 녹여 사용하였다.

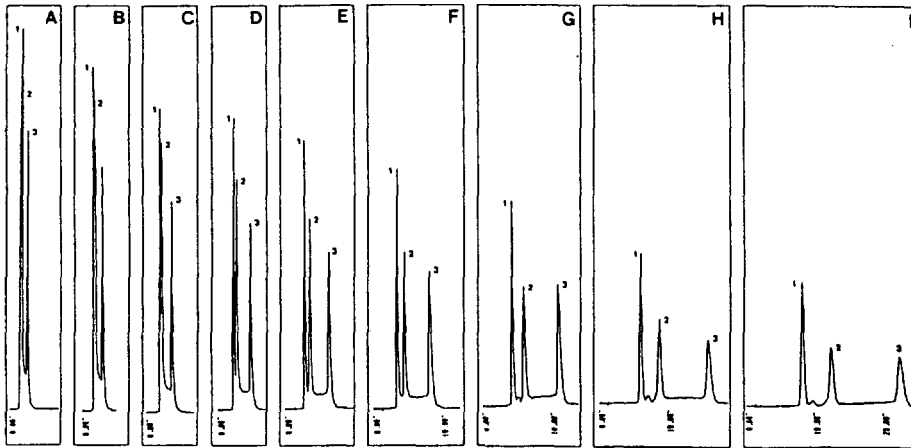
용리액의 조성 및 용리 세기의 영향. 액체 크로마토그래피에서 분리도를 향상시키려면 용리액의 세기를 증가시켜 분리도에 영향을 미치는 주요 인자인 용량인자(capacity factor, k')를 조절하면 된다.

Table 1. Optimum conditions for HPLC operation

Descriptions	Conditions	
	[(T _p CF ₃ PP)Fe(R)]	[(P)Fe(C ₆ F ₅)]
Column	NOVA-PAK C ₁₈	NOVA-PAK C ₁₈
Mobile phase	Methanol/Water (95/5)	Methanol/Water (98/2)
Flow rate	0.8 ml/min	1.0 ml/min
Injection volume	5 μl/	5 μl/
Detection wavelength	410 nm	410 nm
Chart speed	0.5 cm/min	0.5 cm/min

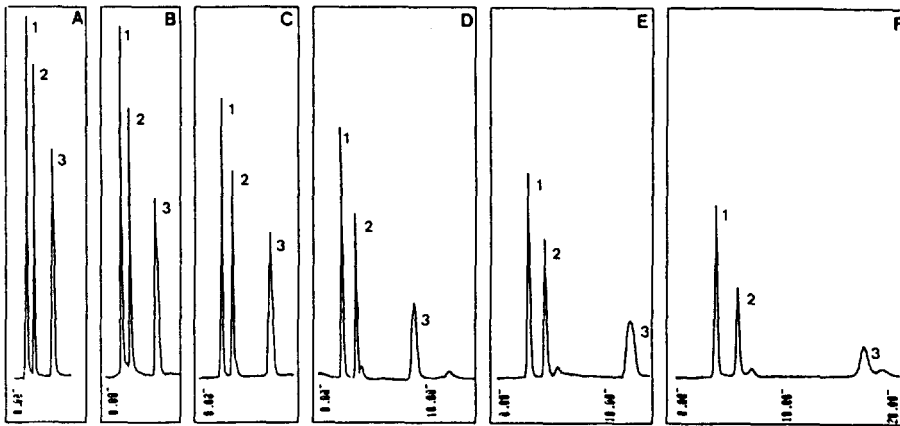
그러나 용리액의 세기를 증가시킬 경우 머무름 시간이 길어져서 분리도는 향상되지만 크로마토그램의 봉우리 넓힘 현상이 나타나는 경향이 있기 때문에 결과적으로 분리도의 향상을 위해서는 용량인자(k')가 최적범위 0 ≤ logk' ≤ 1 사이의 값을 갖도록 조절하는 것이 바람직하다²⁷. 본 연구에서는 용리액의 세기가 분리도에 미치는 영향을 조사하고, 최적 용리액의 조성비를 구하기 위하여 용리액의 조성 변화에 따른 크로마토그램을 작성하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이 때 사용한 용리액은 메탄올과 물의 이성분 혼합용매이다.

먼저 [(T_pCF₃PP)Fe(R)] 착화합물의 크로마토그램을 보면 용리액을 100% 메탄올만 사용했을 때는 [(T_pCF₃PP)Fe(C₆F₅)]와 [(T_pCF₃PP)Fe(C₆F₅H)]의 봉우리가 분리되지 않고 서로 중첩되어 나타났으나 물의 함량을 조금씩 증가시키기에 따라 서서히 분리도가 증가하고 있다. 그러나 methanol/water 비율이 94/6 이하가 되도록 물의 양을 증가시키면 분리도는 향상되지만 봉우리 넓힘 현상이 서서히 일어나면서 머무름 시간도 10 min 이상으로 증가하는 것을 볼 수 있다. 용량인자가 0 ≤ logk' ≤ 1의 범위를 만족시키는 용리액의 조성비는 methanol/water가 93/7~96/4의 범위이다. 그러나 머무름 시간의 증가, 봉우리 넓힘 현상 및 봉우리 넓이의 감소 등을 고려하면, methanol/water가 95/5일 때가 이들 시료의 분리에 가장 적합할 것으로 판단된다. 이와 같은 경향은 [(P)Fe(C₆F₅)] 착화합물들에서도 비슷하게 나타나는 것을 Fig. 2에서 볼 수 있다. 용리액의 조성비에 따른 logk' 값을 보면 methanol/water이 96/4~97/3에서



1. $[(TpCF_3PP)Fe(C_6F_4H)]$, 2. $[(TpCF_3PP)Fe(C_6F_5)]$, 3. $[(TpCF_3PP)Fe(C_6H_5)]$

Fig. 1. Chromatograms of $[(TpCF_3PP)Fe(R)]$ complexes by the variation of mobile phase compositions (Mobile phase compositions, MeOH/Water; A: 100/0, B: 99/1, C: 98/2, D: 97/3, E: 96/4, F: 95/5, G: 94/6, H: 93/7, I: 92/8).



1. $[(TpCF_3PP)Fe(C_6F_5)]$, 2. $[(TPP)Fe(C_6F_5)]$, 3. $[(TpCH_3PP)Fe(C_6F_5)]$

Fig. 2. Chromatograms of $[(P)Fe(C_6F_5)]$ complexes by the variation of mobile phase compositions (Mobile phase compositions, MeOH/Water; A: 100/0, B: 99/1, C: 98/2, D: 97/3, E: 96/4, F: 95/5).

적합한 $\log k'$ 값의 범위를 나타내고 있다. 그러나 methanol/water의 비가 97/3 이하가 되도록 물의 함량을 증가시키면 크로마토그램의 봉우리가 완만해지기 시작하며, 약간의 꼬리잡기 현상이 일어나는 동시에 머무름 시간 또한 증가한다. 이러한 점을 종합적으로 고려하여 $[(P)Fe(C_6F_5)]$ 착화물의 분리에는 $0 \leq \log k' \leq 1$ 범위를 약간 벗어나지만 methanol/water의 조성비가 98/2인 혼합용매를 용리액으

로 선정하였다. 한편 용리액의 조성비에 따라 각각의 iron(III)porphrin 착화합물들로부터 구한 $\log k'$ 값과 Snyder식으로부터 구한 용매의 용리세기(eluotropic strength, ϵ^*)를 도시하여 Fig. 3, 4에 각각 나타내었다. ϵ^* 와 $\log k'$ 과의 관계를 보면 $[(TpCF_3PP)Fe(R)]$ 과 $[(P)Fe(C_6F_5)]$ 착화합물들이 모두 비교적 직선성을 잘 나타내고 있는 것을 확인할 수 있다. 이와 같이 ϵ^* 와 $\log k'$ 의 관계가 거의 직선적으로 비례하는 것

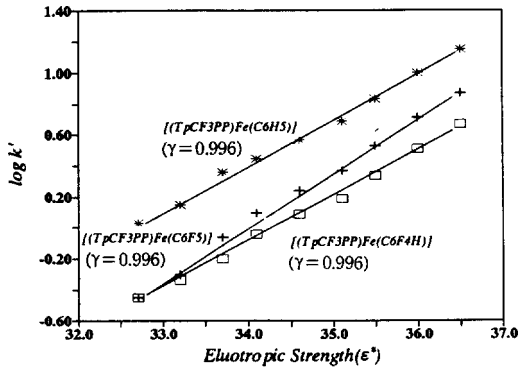


Fig. 3. Relationship between eluotropic strength (ϵ^*) of mobile phase and $\log k'$ of $[(T_p,CF_3PP)Fe(R)]$ complexes.

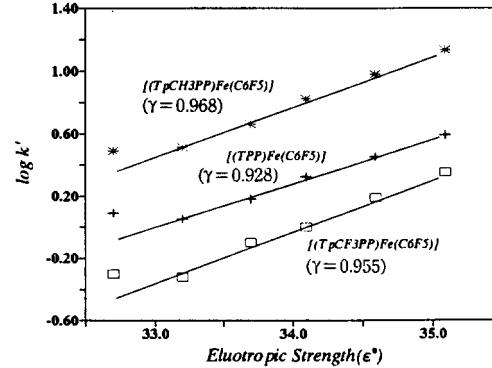


Fig. 4. Relationship between eluotropic strength (ϵ^*) of mobile phase and $\log k'$ of $[(P)Fe(C_6F_5)]$ complexes.

으로 보아 이들의 분리 메카니즘이 소수성 효과에 기인할 것으로 예상된다.

Iron(III)porphyrin 착화합물의 머무름 메카니즘.

역상 액체 크로마토그래피에서 금속착화합물을 분리함에 있어서 분리관에서 이들의 머무름 메카니즘은 현재까지 두 방향으로 규명되고 있다. 첫째는 용량인자(k')에 대한 이 동상의 조성 또는 분포상수와의 상관관계를 고려한 것이고, 둘째는 분리관내에서 시료의 머무름을 열역학적 측면에서 고찰한 것이다²⁸⁻³¹. 본 연구에서는 금속착화합물의 분리에 영향을 주는 몇 가지 인자들에 대하여 조사하였으며, 용량인자(k')와 용리액 조성과의 관계, 용량인자(k')와 분포비와의 관계, 용량인자(k')와 온도와의 상관관계로부터 iron(III)porphyrin 착화합물의 머무름 메카니즘을 규명하였다.

용량인자(k')와 용리액 조성과의 관계. 실리카겔에 옥타데칸기(C_{18})가 화학적으로 결합된 역상 HPLC 분리관내에서 금속착화합물의 머무름은 두 가지 메카니즘, 즉 소용매성 효과와 친실란올성 효과에 의해 일어난다고 생각할 수 있다. 따라서 머무름을 나타내는 용량인자(k')는 다음 식과 같이 두 가지 메카니즘에 의한 각각의 기여도의 합으로 나타낼 수 있다^{12,28}.

$$k' = k_1' + k_2' \quad (1)$$

여기서 k_1' 은 소용매성 효과에 의한 머무름에 관련된 용량인자이고, k_2' 은 친실란올성 효과에 의한

머무름과 관련된 용량인자이다. k_1' 은 이성분 용매계에서 물의 부피분율(ϕ_{H_2O})과 지수함수의 관계에 있음이 이미 밝혀졌다^{12,32}. 또 k_2' 은 극성시료와 실란올과의 상호작용에 의한 머무름을 나타내는 정상법에서 중요한 인자이고, 이성분 용매계에서 극성이 큰 성분의 부피분율의 역수와 비례 관계에 있음이 알려졌다³³. 따라서 이것을 methanol/water 용매계에 적용시키면 이 식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$k' = a \exp(b\phi_{H_2O}) + (c + d\phi_{H_2O})^{-1} \quad (2)$$

식에서 a, b, c 및 d 는 실험적으로 얻어지는 상수이다. 본 연구에서 사용된 금속착화합물은 전기적으로 비교적 중성인 화합물로 역상 액체 크로마토그래피에서 용리 중 친실란올성에 의한 상호작용은 아주 작을 것으로 예상되므로 식에서 둘째 항은 거의 무시할 수 있다. 따라서 이 식은 $\log k'$ 을 취하여 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\log k' = -\log a + b\phi_{H_2O} \quad (3)$$

또한 Jandera 등³¹의 연구 결과에 의하면 물과 methanol, acetonitrile 등의 이성분 혼합용매계를 이동상으로 사용했을 때 $\log k'$ 과 유기성분의 부피분율 사이에는 다음 식과 같은 관계가 성립하는 것으로 알려져 있다.

$$\log k' = a - n\phi_{org} \quad (4)$$

여기서 a 와 n 은 상수이다. 물을 사용한 이성분 용매계에서 $\phi_{org} = 1 - \phi_{H_2O}$ 이므로, ϕ_{org} 항을 ϕ_{H_2O} 로 바

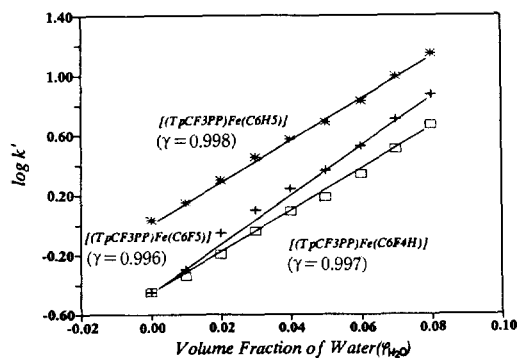


Fig. 5. Dependence of $\log k'$ of $[(T_pCF_3PP)Fe(R)]$ complexes on the volume fraction of water in MeOH/Water mixture solvent.

꾸면 이 식은 식(3)과 잘 일치하며, $\log k$ 와 ϕ_{H_2O} 와의 관계를 나타내 준다. 따라서 만일 본 연구에서 사용된 iron(III)porphyrin 착화합물의 분리관내에서의 머무름이 주로 소용매성 메카니즘에 의해 일어난다면 식 (3) 또는 식 (4)에 따라 $\log k'$ 와 ϕ_{H_2O} 를 도시하였을 때 서로 직선관계를 나타내게 될 것이다.

본 연구에서는 iron(III)porphyrin 착화합물들의 분리에서 이동상으로 메탄올과 물의 이성분 혼합용매를 사용하였고, 이동상에서 물의 부피분율과 $\log k'$ 의 상관관계를 조사하기 위하여 ϕ_{H_2O} 와 $\log k'$ 을 도시하고, 그 결과를 Fig. 5, 6에 각각 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 각 iron(III)porphyrin 착화합물들에 대해 $\log k'$ 와 이동상에서 물의 부피분율 (ϕ_{H_2O})과의 관계는 비교적 직선성을 잘 유지하고 있으며 식 (3)을 만족시키고 있다. 이러한 결과로부터 역상 액체 크로마토그래피의 분리관내에서 iron(III)porphyrin 착화합물의 머무름은 소용매성 효과 즉 본 연구의 경우 용매로 물을 사용하였기 때문에 소수성 효과에 크게 기인하고 있음을 확인할 수 있었다.

용량인자(k')와 분포비(D_c)와의 관계. 앞에서 확인된 바와 같이 시료의 머무름이 실제로 소용매성 효과에 기인한다면 역상 분리관내에서 용질의 이동상과 정지상에 대한 상호 작용은 분리관이 아닌 배치법으로도 확인이 가능할 것이다. 이들 시료들을 이동상과 동일한 혼합용매와 정지상과 동일한 구조의 옥타데칸 용매를 사용하여 추출하였을 때도 분리관내에서와 같은 경향을 나타낼 것으로 추정된다. 즉, 배치법에서 시료가 두 상에 분배되는 정도 역시

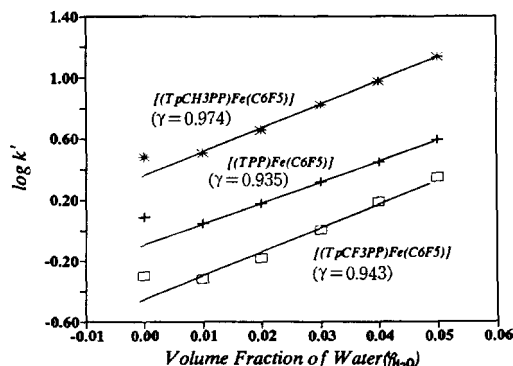


Fig. 6. Dependence of $\log k'$ of $[(P)Fe(C_6F_5)]$ complexes on the volume fraction of water in MeOH/Water mixture solvent.

Table 2. Capacity factor (k') and liquid-liquid distribution ratio (D_c) for $[T_pCF_3PP)Fe(R)]$ and $[(P)Fe(C_6F_5)]$ complexes

Complexes	k'	D_c
$[T_pCF_3PP)Fe(R)]$		
(C_6F_4H)	1.53	1.20
(C_6F_5)	2.32	1.49
(C_6H_5)	4.88	2.10
$[(P)Fe(C_6F_5)]$		
(T_pCF_3PP)	0.66	0.79
(TPP)	1.51	2.81
(T_pCH_3PP)	4.56	8.26

Organic phase: *n*-Pentadecane, Aqueous phase: Methanol/Water (95/5, 98/2), Detection wavelength (λ_{max}): 410 nm.

분리관내에서 이동상과 정지상에 분배되는 분포비와 같은 경향을 나타내야 할 것이다. 따라서 역상 액체 크로마토그래피에서 측정된 용량인자(k')는 배치법에서 구한 분포비(D_c)와 간단한 선형 함수관계를 나타내야 하며 그 관계식은 다음과 같다.¹²

$$k' = (V_m/V_M - 1) + r'D_c \quad (5)$$

식에서 V_m 은 분리관내의 이동상의 부피, V_M 은 불감부피(dead volume)이며, $r' = jr$ 이고, $r = m_s/V_m$ 이다. 여기서 m_s 는 정지상의 질량이며, j 는 상관계수로서 상수이다. 본 연구에서는 분리관의 정지상인 비극성 옥타데칸(C_{18}) 모델로서 *n*-pentadecane을 사용하고, HPLC의 실험에서 이동상으로 사용한 용

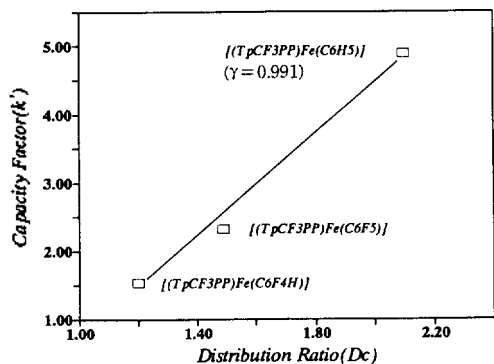


Fig. 7. Relationship between capacity factor (k') and distribution ratio (D_c) by the extraction from aqueous Methanol into *n*-Pentadecane for $[(T_pCF_3PP)Fe(R)]$ complexes.

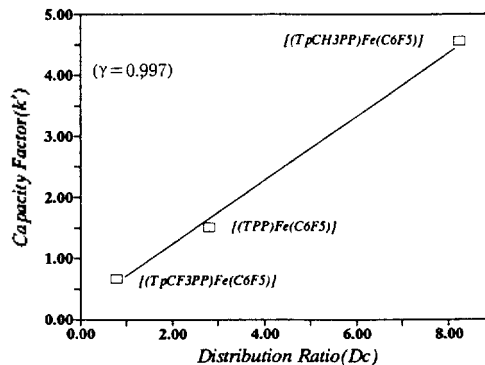


Fig. 8. Relationship between capacity factor (k') and distribution ratio (D_c) by the extraction from aqueous Methanol into *n*-Pentadecane for $[(P)Fe(C_6F_5)]$ complexes.

리액인 methanol/water=95/5 및 methanol/water=98/2의 혼합액 각각을 사용하여 배치법으로 iron(III) porphyrin 착화합물들에 대한 D_c 값을 각각 측정하였으며 그 결과를 Table 2에 수록하였고, K 과 D_c 를 도시한 관계곡선은 Fig. 7, 8에 각각 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 D_c 와 k' 과의 관계는 비교적 직선성을 잘 유지하였으며, 식 (5)을 만족시키는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 본 연구에서 사용한 iron(III)porphyrin 착화합물들의 분리관내에서의 머무름은 앞에서 확인된 바와 같이 소용매성 효과에 크게 기인한다는 사실을 배치법에 의해 간접적으로 재확인 할 수 있다.

용량인자(k')와 온도와의 관계. 일반적으로 기체 크로마토그래피에서는 온도가 용리거동에 영향을 주는 중요한 인자로 잘 알려져 왔지만 액체 크로마토그래피에서는 시료의 머무름에 미치는 온도의 영향을 크게 고려하지는 않았다. 그러나 온도의 증가가 용매의 점도를 감소시켜 컬럼의 효율을 증가시킨다는 사실이 알려지면서³⁴ 열역학적인 함수와의 관계 등 온도의 영향을 액체 크로마토그래피에서 시료의 용리거동 해석에 이용하기 위한 연구가 많이 시도되고 있다³⁵. 크로마토그래피에서 용량인자(k')는 용질이 정지상과 상호 작용할 때의 열역학적 평형상수 (K)와 $k' = \Phi K$ 의 관계를 갖는다³⁶. 여기서 Φ 는 상비율(phase ratio) 즉 이동상의 부피비이며, NOVA-PAK C_{18} 분리관의 경우 대략 1/2.6 정도이다³⁷. 또 평형상수 K 와 ΔG° (Gibbs free energy)와의 관계는

$\Delta G^\circ = -RT \ln K$ 이며, 열역학 제 2법칙에서 $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ 이므로 세 식을 종합하면 용량인자는 다음과 같이 표준엔탈피와 표준엔트로피의 관계식으로 나타낼 수 있다.

$$\ln k' = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R + \ln \Phi \quad (6)$$

본 연구에서는 분리관의 온도를 변화시키면서 크로마토그램을 작성하여 그 결과를 Fig. 9, 10에 보였고, (6)식에 의해 용량인자와 온도와의 관계를 도시한 van't Hoff plot의 결과를 Fig. 11, 12에 나타내었다. 또 van't Hoff plot의 기울기($-\Delta H^\circ/R$)로부터 용질이 이동상에서 정지상으로 전이될 때의 표준전이엔탈피를 구하고, 절편($\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$)으로부터 표준전이엔트로피를 계산하여 Table 3에 수록하였다. 결과에서 보는 바와 같이 용질의 머무름 시간은 온도가 증가할수록 감소하였으며, van't Hoff plot에서 $1/T$ 과 $\ln k'$ 의 관계는 모든 시료들에서 양호한 직선성을 나타냈다. 이는 시료로 사용한 iron(III)porphyrin 착화합물들의 머무름 메커니즘이 온도의 변화에 무관하게 일정함을 의미한다. 또 van't Hoff plot으로부터 구한 ΔH° 는 음의 값을 나타냈으며, 이는 이동상에서 정지상으로의 분배가 발열과정임을 의미하고³⁸, ΔS° 는 무시해도 좋을 만큼 작은 값을 보였다. 역상 액체 크로마토그래피에서 시료의 머무름 메커니즘을 보다 역학적으로 해석하기 위한 방법으로 Melander 등은 엔탈피-엔트로피 보정(enthalpy-entropy compensation) 현상을 이용하여 열역학적인

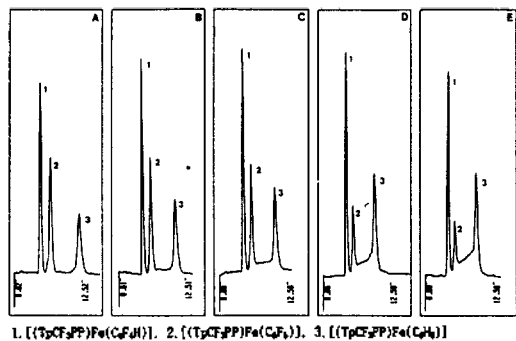


Fig. 9. Chromatograms of [(TpCF₃PP)Fe(R)] complexes by the variation of column temperatures (Temperature; A: 6°C, B: 12°C, C: 18°C, D: 24°C, E: 30°C).

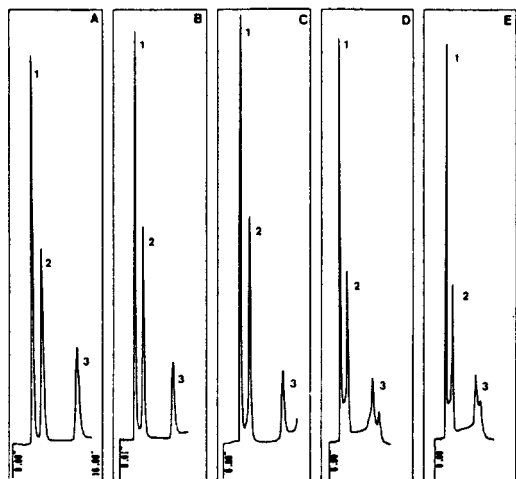


Fig. 10. Chromatograms of complexes [(P)Fe(C₆F₅)] complexes by the variation of column temperatures (Temperature; A: 3°C, B: 8°C, C: 13°C, D: 18°C, E: 23°C)

관계로부터 머무름 메커니즘을 설명하였다. 엔탈피-엔트로피 보정 현상은 extra-thermodynamic approach 방법 중의 하나로 이 중 대표적인 것이 linear free energy relationship이며, 관계식은 $\Delta H^\circ = \beta\Delta S^\circ + \Delta G_\beta^\circ$ 로 나타낼 수 있다²⁹. 이 식에서 β 는 보정온도(compensation temperature)로 일련의 화학 반응들에서 그 과정에 관련된 속도나 평형상수의 변화량이 0이 되는 온도를 말하며, 이것을 isokinetic 또는 isoequilibrium 온도라 한다. 또 ΔG_β° 는 온도 β 에서 물리화학적 상호작용에 관련된 Gibbs 자유에

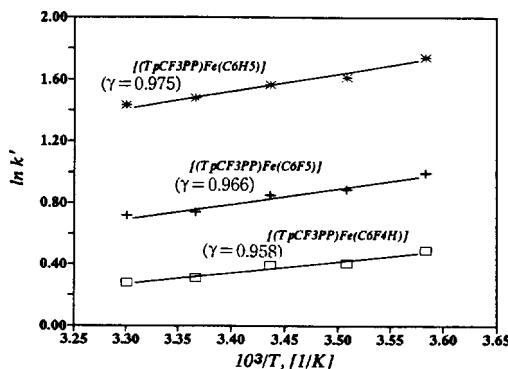


Fig. 11. Van't Hoff plots for $\ln k'$ of [(TpCF₃PP)Fe(R)] complexes in reversed-phase chromatography using NOVA-PAK C₁₈ column.

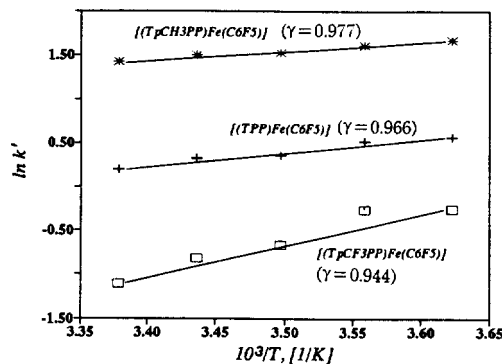


Fig. 12. Van't Hoff plots for $\ln k'$ of [(P)Fe(C₆F₅)] complexes in reversed-phase chromatography using NOVA-PAK C₁₈ column.

너지이다. 또한 이 식은 앞의 열역학 제2법칙의 식 ($\Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$)과 결합하면 일정 온도 T에서의 Gibbs 자유에너지 변화를 나타내는 식인 $\Delta G_T^\circ = \Delta H^\circ (1 - T/\beta) + T\Delta G_\beta^\circ/\beta$ 로 바뀔 수 있다. 이 식은 다시 $\Delta G^\circ = -RT\ln k'$ 이므로 다음과 같이 크로마토그래피에서 용량인자와의 관계식으로 나타낼 수 있다.

$$\ln k_T' = \frac{-\Delta H^\circ}{R} (1/T - 1/\beta) - \Delta G_\beta^\circ/R\beta + \ln \Phi \quad (7)$$

여기서 k_T' 은 온도 T에서의 용량인자이다. 이 식에서 만약 $-\Delta H^\circ$ 와 $\ln k_T'$ 과의 관계가 직선관계를 나타낸다면 엔탈피-엔트로피 보정 현상이 일어나는 것으로 해석할 수 있고, 정지상과 용질 사이의 가역결합(reversible binding)이 근본적으로 동일한 메

Table 3. Effect of temperature on the $\ln k'$ for $[(T_pCF_3PP)Fe(R)]$ and $[(P)Fe(C_6F_5)]$ complexes

Complexes	$\ln k'$					$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	ΔS° (kcal/mol·K)	r
$[(T_pCF_3PP)Fe(R)]$	6°C	12°C	18°C	24°C	30°C			
(C ₆ F ₅ H)	0.49	0.41	0.40	0.31	0.28	1.47	-2.41×10^{-3}	0.958
(C ₆ F ₅)	0.99	0.89	0.85	0.75	0.72	1.92	-3.05×10^{-3}	0.966
(C ₆ F ₅)	0.74	1.61	1.57	1.48	1.43	2.09	-2.17×10^{-3}	0.975
$[(P)Fe(C_6F_5)]$	3°C	8°C	13°C	18°C	23°C			
(T _p CF ₃ PP)	-0.25	-0.27	-0.67	-0.82	-1.11	7.36	-2.51×10^{-2}	0.944
(TPP)	0.57	0.51	0.35	0.32	0.20	3.03	-7.94×10^{-3}	0.966
(T _p CH ₃ PP)	1.67	1.61	1.50	1.42	2.00	7.36	-2.04×10^{-3}	0.977

r : Correlation coefficient, Mobile phase: Methanol/Water (95/5, 98/2), Flow rate: 0.8 ml/min, 1.0 ml/min.

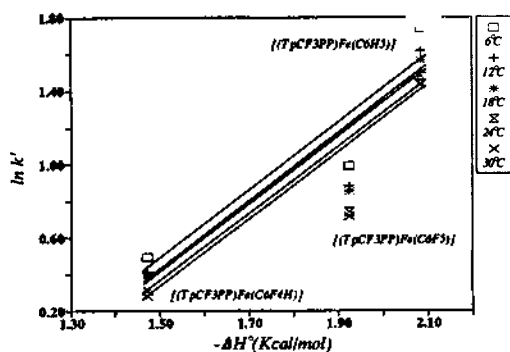


Fig. 13. Compensation plots according to $-\Delta H^\circ$ and $\ln k'$ values for $[(T_pCF_3PP)Fe(R)]$ complexes.

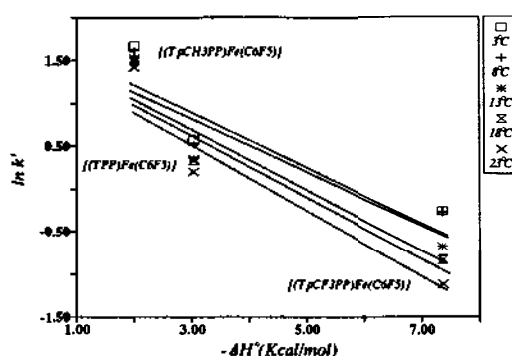


Fig. 14. Compensation plots according to $-\Delta H^\circ$ and $\ln k'$ values for $[(P)Fe(C_6F_5)]$ complexes.

카니즘에 의한 것으로 볼 수 있다. 또 직선의 기울기, $R^{-1}(1/T - 1/\beta)$ 로부터 보정 온도 β 를 구할 수 있으며, 이 값이 거의 일정하다면 시료의 머무름 메카니즘이 동일하며 동평형 거동(isoequilibrium behavior)을 하는 것으로 볼 수 있다²⁶.

본 연구에서는 분리관의 온도 변화에 따른 엔탈피와 엔트로피를 구하고, compensation plot에서 직선성을 확인하기 위하여, ΔH° 와 $\ln k'_T$ 과의 관계를 도시하여 Fig. 13, 14에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 $[(T_pCF_3PP)Fe(R)]$ 착화합물들의 경우 시료의 수가 적긴 하지만 각 온도에서 $-\Delta H^\circ$ 와 $\ln k'_T$ 과의 상관계수가 각 온도에서 0.862, 0.858, 0.854, 0.840, 0.845로 어느 정도 직선성을 나타내고 있다. $[(P)Fe(C_6F_5)]$ 착화합물들의 경우에도 Fig. 14에서 $-\Delta H^\circ$ 와 $\ln k'_T$ 과의 관계는 각 온도에서 상관계수가 0.831, 0.819, 0.863, 0.883, 0.901로 비교적

직선성을 나타내는 것으로 볼 수 있다. 이로부터 역상 HPLC의 분리에서 각 시료들은 엔탈피-엔트로피 보정 현상을 나타내며, 정지상인 옥타데실실리카(octadecylsilica) 지지체와 시료의 상호작용이 온도변화에 무관하게 동일한 메카니즘에 의해 분리됨을 확인할 수 있었다. 특히 $[(T_pCF_3PP)Fe(R)]$ 보다 $[(P)Fe(C_6F_5)]$ 착화합물들에서 직선의 기울기로부터 구한 보정온도가 각 온도에서 거의 동일한 값을 나타냈다. 이는 $[(P)Fe(C_6F_5)]$ 착화합물들과 정지상과의 소용매성 결합 과정이 $[(T_pCF_3PP)Fe(R)]$ 착화합물들에 비해 더 동평형 거동을 나타내고 있음을 보여 준다.

이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. R. W. Hay, "Bio-inorganic Chemistry", p. 135, Wiley, New York, U.S.A., 1984.
2. J. E. Huheey, "Inorganic Chemistry", 2nd Ed., p. 733, Harper International, New York, U.S.A., 1978.
3. D. L. Drakin, J. B. Kim, J. B. Paine, A. W. Johnson, and P. S. Clezy, "The porphyrins", Vol. I, Chap. 2~6, Dolphin Ed., Academic Press, New York, U.S.A., 1979.
4. K. M. Kadish and M. M. Morrison, *Bioinorganic Chem.*, **7**, 107 (1977).
5. D. Lancon, P. Cocolios, R. Guillard, and K. M. Kadish, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4472 (1984).
6. C. Gueutin, D. Lexa, M. Momenteau, and Jean-Michel Savéant, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1874 (1990).
7. W. I. White, R. C. Bachmann, and B. F. Burnham, "The porphyrins", Vol. I, Chap. 12, D. Dolphin Ed., Academic Press, New York, U.S.A., 1979.
8. M. L. Richter and K. G. Rienits, *FEBS Lett.*, **116**, 211 (1980).
9. W. A. Spencer, J. F. Gaiobardes, M. A. Curtis, and L. B. Bogers, *Sep. Sci. and Tech.*, **17**, 797 (1982).
10. M. Dellinger and D. Brault, *J. Chromatogr.*, **422**, 73 (1987).
11. C. Horvath, W. Melander, and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **126**, 129 (1976).
12. F. Vlácil and V. Hamplová, *Col. Czecho. Chem. Commun.*, **50**, 2221 (1985).
13. O. Liska, J. Lehotay, E. Brandsteterova, G. Guiochon, and H. Colin, *J. Chromatogr.*, **172**, 384 (1979).
14. R. M. Smith and L. E. Yankey, *Analyst.*, **107**, 744 (1982).
15. A. M. Bond and G. G. Wallace, *J. Liq. Chromatogr.*, **6**(10), 1799 (1983).
16. S. Inchinoki and M. Yamazaik, *Bunseki Kagaku*, **31E**, 319 (1984).
17. A. M. Krstulovic and P. R. Brown, "Reversed-Phase High Performance Liquid chromatography", John Wiley & Sons Inc., New York, U.S.A., 1982.
18. W. Lee, D. W. Lee, Y. J. Kim, and H. C. Kim, *J. Korean Chem. Soc.*, **32**, 3 (1988).
19. C. K. Lim, J. M. Rideout, and T. J. Peters, *J. Chromatogr.*, **317**, 333 (1984).
20. S. W. Kennedy, D. C. Wigfield, and G. A. Fox, *Anal. Biochem.*, **157**, 1 (1986).
21. M. Takayama, *J. Chromatogr.*, **423**, 313 (1987).
22. D. W. Dixon, L. Amis, M. S. Kim, and J. Callahan, *J. Chromatogr.*, **462**, 411 (1989).
23. J. W. Buchler, "The porphyrins", Vol. I, Chap. 10, D. Dolphin Ed., Academic Press, New York, U.S.A., 1979.
24. P. Cocolios, G. Lagrange, and R. Guillard, *J. Organomet. Chem.*, **253**, 65 (1983).
25. K. M. Kadish, D. Sazou, Y. M. Liu, A. Saoiabi, M. Ferhat, and R. Guillard, *Inorg. Chem.*, **27**, 1198 (1988).
26. K. M. Kadish, A. Tabard, W. Lee, Y. H. Liu, C. Ratti, and R. Guillard, *Inorg. Chem.*, **30**(7), 1542 (1991).
27. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd Ed., p. 49~56, Wiley, New York, U.S.A., 1979.
28. C. Horváth, W. R. Melander, and I. Molnár, *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).
29. A. Nahum and Horváth, *J. Chromatogr.*, **203**, 53 (1983).
30. W. R. Melander and C. Horváth, *Chomatographia*, **18**, 353 (1984).
31. P. Jandera, H. Colin, and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **54**, 435 (1982).
32. W. R. Melander, B. K. Chen, and C. Horváth, *J. Chromatogr.*, **185**, 99 (1979).
33. J. Narkiewicz, M. Jaroniec, M. Borówko, and A. Patrykiew, *J. Chromatogr.*, **157**, 1 (1978).
34. L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **179**, 167 (1979).
35. I. W. Kim, G. Y. Choi, M. H. Lee, C. H. Kang, and W. Lee, *J. Korean Chem. Soc.*, **36**, 697 (1992).
36. W. Melander, D. E. Campbell, and C. Horváth, *J. Chromatogr.*, **158**, 215 (1978).
37. L. C. Sander and L. R. Field, *Anal. Chem.*, **52**, 2009 (1980).
38. M. Diack, R. N. Compton, and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **639**, 129 (1993).
39. J. Hine, "Physical Organic Chemistry", p. 81~91, McGraw-Hill, New York, U.S.A., 1972.