

역상 액체 크로마토그래피에서 페놀류의 머무름거동에 미치는 용매와 온도의 영향에 관한 연구

李大云* · 李厚權 · 陸根成[†] · 李寅錫[‡] · 趙炳蓮

연세대학교 이과대학 화학과

[†]한국화학연구소

[‡]대전대학교 이과대학 화학과

(1993. 2. 10 접수)

A Study for the Effect of Solvent and Temperature on the Retention Behavior of Phenols in Reversed-Phase Liquid Chromatography

Dai Woon Lee*, Hoo Keun Lee, Keun Sung Yook[†], In Ho Lee[‡], and Byung Yun Cho

Department of Chemistry, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

[†]Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-606, Korea

[‡]Department of Chemistry, Taejon University, Taejon 300-716, Korea

(Received February 10, 1993)

요 약. 역상 액체 크로마토그래피를 이용하여 페놀류를 효과적으로 분리·분석하는데 기본적으로 필요한 용리거동을 조사하고, 이를 바탕으로 머무름을 예측하는데 이 연구의 목적을 두었다. 정지상으로는 monomeric C₁₈ 컬럼(μ -Bondapak)과 polymeric C₁₈ 컬럼(201TP)을 사용하여 상호 비교하였으며, 이동상으로는 메탄올-물과 아세토니트릴-물 혼합액을 사용하고, 대상물질로는 25종의 페놀류를 선택하였다. 엔탈피-엔트로피 상쇄현상을 조사하였을 때 nitrophenols의 머무름은 이동상에 관계없이 methylphenols와 chlorophenols의 머무름과는 달랐으며, 메탄올-물 이동상에서 methylphenols와 chlorophenols는 상쇄현상이 있기 때문에 그 머무름 메커니즘은 조성과 관계없이 일정하였고, 아세토니트릴-물에서는 머무름 메커니즘이 더욱 복잡함을 알았다. Monomeric C₁₈ 컬럼과 polymeric C₁₈ 컬럼에서의 페놀류의 머무름을 비교하였을 때, polymeric C₁₈ 컬럼에서 정지상과 시료의 소수성 상호작용이 더 큼을 알 수 있었다. 메탄올-물 및 아세토니트릴-물 계에서 이동상의 조성 및 컬럼 온도가 변화할 때 쉽게 계산할 수 있는 π 와 $\sigma+E$, 파라미터를 이용하여 페놀류의 머무름을 예측할 수 있는 관계식을 구하였다.

ABSTRACT. The purpose of this study was to investigate the retention behavior of phenols and to predict their retention in RPLC. The retention data of twenty-five phenols were measured on a μ -Bondapak C₁₈ and a polymeric C₁₈ columns with methanol-water and acetonitrile-water as a mobile phase. From the observation of enthalpy-entropy compensation phenomenon, the following conclusions are drawn with regard to the retention mechanism: 1) the retention mechanism of nitrophenols is different from that of methyl- and chlorophenols in both mobile phases; 2) in methanol-water mobile phase, the retention mechanism of methyl- and chlorophenols is consistent in the range of methanol-water composition; 3) on the other hand, in the case of acetonitrile-water mobile phase, the retention mechanism depends on the volume fraction of acetonitrile. It means that the retention mechanism can not be explained only by a simple interaction. Based on retention data as compared with two columns, it may be said that the hydrophobic interaction of phenols with polymeric C₁₈ column was greater than that with

monomeric C₁₈ column. The equations for predicting the retention of phenols were derived by using hydrophobic substituent constant (π) and the sum of Hammett's constant (σ) and Taft's steric constant (E_s).

서 론

HPLC를 이용하여 페놀류를 체계적으로 분리-분석하기 위해서는 다양한 조건에서 머무름을 측정하여 머무름 거동에 대한 기초 조사가 선행되어야 한다. 페놀류의 HPLC에서의 머무름 거동과 메카니즘에 관한 연구는 주로 RPLC에서 이루어졌는데, 현재 RPLC에서 용질의 머무름은 정지상, 이동상과 용질사이의 소수성 효과에 기인한다는 solvophobic theory가 일반적으로 수용되고 있다¹⁻⁴. Solvophobic theory는 용질과 정지상간의 상호작용에 관한 용매의 영향을 설명하고 있으나, 실제 머무름 메카니즘에 관해서는 자세한 정보를 주지 못한다. 따라서 메카니즘을 해석하기 위한 여러가지 시도가 이루어졌는데, 그중의 하나가 용질의 머무름을 열역학적 에너지와 연관시켜 머무름 메카니즘을 규명하려는 연구이다. 그 중 대표적인 방법이 외적-열역학 근사법(extra-thermodynamic approach)의 일종인 엔탈피-엔트로피 상쇄(enthalpy-entropy compensation)이다⁵. 이것은 본질적으로 유사한 물리-화학적 현상에 대한 전체 자유에너지 변화는 이에 대응하는 엔탈피 변화와 직선적인 관계를 나타낸다는 것으로 Melander⁶에 의해 HPLC에서 머무름 메카니즘을 규명하는데 처음으로 도입된 후, 컬럼, 이동상, 다양한 용질에 대해 많은 연구가 이루어졌다⁷⁻¹¹. 페놀류에 관한 엔탈피-엔트로피 상쇄연구는 Laub¹²들이 9종의 페놀 치환체를 대상으로 한 것이 유일하다¹². 이때 사용한 컬럼은 비극성 ODS이며, 이동상은 THF-물 용액이었다. THF 0~20% 범위에서 페놀류의 엔탈피-엔트로피 상쇄현상을 조사하였을 때 아무런 경향도 보이지 않았다. 따라서 Laub¹²들은 9종의 페놀 치환체들의 THF-물에서의 머무름 메카니즘은 이동상의 조성이 변화할 때 변하며, 용질-정지상간의 상호작용도 페놀류들이 서로 동일하지 않다고 결론지었다. 이 연구에서는 Laub¹²들이 사용한 9종의 페놀치환체는 어떤 경향을 관찰하기에는 시료의 수가 너무 적다. 따라서 본 연구에서는 더 많은 종류의 페놀치환체를 대상시료로 선택하고 μ -Bondapak C₁₈

컬럼과 polymeric C₁₈ 컬럼에서 이동상의 조성 및 온도가 변화할 때 엔탈피-엔트로피 상쇄현상을 조사하여 조건의 변화에 따른 머무름 메카니즘의 변화 여부를 알아보고, 두 컬럼에서의 결과를 비교 조사하여 페놀류 전체의 RPLC에서의 머무름 메카니즘을 제시하였다.

한편 HPLC에서 최적 분리조건을 찾기 위해서는 이동상 조성, 컬럼온도, 정지상 종류 등 여러가지 분리조건의 변화에 따른 머무름 변화를 정량적으로 예측하는 것이 필요하다. RPLC에서는 분자구조 등과 같은 분자성질을 나타내는 물리-화학적 파라미터와 머무름 사이의 관계를 이용하여 머무름을 예측하는 연구가 많이 진행되었다. 즉, 분자열지수(χ)¹³, 분자길이와 폭의 비(L/B)¹⁴, 소수성 파라미터($\log P$ ^{15,16}, π ^{17,18}), van der Waals 부피(VWV)¹⁹ 등과 같은 분자성질을 나타내는 파라미터와 RPLC에서의 머무름 사이의 관계가 연구되고 있다. 페놀류의 머무름 예측에 관한 연구는 극소수에 불과하며 모두 이동상의 조성변화¹⁸⁻²²나 정지상의 변화²³에 대한 예측이었다. Jinno^{17,18}은 소수성 치환기 상수, π 와 Hammett 상수, σ 를 사용하여 이동상의 조성변화에 따른 $\log k'$ 과의 관계식을 얻었다. Hanai 등²⁰⁻²²은 CH₃CN-물계에서 페놀류의 머무름과 VWV, π -에너지 효과, 수소결합 효과와의 관계를 막연하게 표시하였다. 위의 연구들은 모두 일정한 온도에서 정지상이나 이동상의 조성 변화에 따른 머무름 예측에 관한 것이었다. 그러나 컬럼 온도의 영향이 점차 인식되면서 RPLC를 분리기구로 최대한 활용하기 위해서는 이동상의 조성과 함께 컬럼온도를 적절히 조절하는 것이 강조되고 있다^{24,25}. 따라서 본 연구에서는 머무름 거동의 결과를 바탕으로 두 컬럼에서 이동상의 조성과 컬럼 온도가 변화할 때 페놀류의 머무름에 영향을 미치는 주요 인자들을 조사하여, 페놀류의 머무름을 예측할 수 있는 간단한 관계식을 얻었다.

실 험

측정기기 및 기구. 본 연구에서 사용한 기기는 Waters Associate 제품의 Liquid Chromatograph로서 펌프는 M-45 Solvent Delivery System, 검출기는 M-440 Absorbance Detector(fixed wavelength), 시료 주입기는 U6K Universal Injector를 사용하였다. 기록계는 Shimadzu사의 Chromatopac 6R-6A 적분기, 초음파 진동기는 Smithkline 제품의 Branson Ultrasonic Cleaner, 항온조는 JEIO Tech.사의 RC10 V를 사용하였다. 시료 및 용매 거름기구는 Millipore 제품을, 주사기는 Hamilton 제품의 microsyringe를, pH 미터는 Orion Research사의 Digital ionalyzer/501을 사용하였다. 시료 검출과장은 280 및 254 nm이고, 이동상의 유속은 1.0 ml/min으로 고정하였다.

시료, 이동상 및 정지상. 본 연구에서 사용한 페놀류는 모두 일급 또는 특급 시약으로 단순종류 및 재결정하여 사용하였다. 이동상으로는 HPLC용 메탄올(Mallinckrodt), 아세트니트릴(BDH), 테트라히드로퓨란(Mallinckrodt)을 HPLC용 물과 부피비로 혼합하여 사용하였다. 정지상은 Waters사의 μ -Bondapak C₁₈ 컬럼(10 μ m, monomeric, 30 cm \times 3.9 mm I.D.)과 Vydac사의 201TP 컬럼(10 μ m, polymeric 25 cm \times 4.6 mm I.D.)을 사용하였다.

실험방법. 페놀류의 흡광도를 고려하여 HPLC용 메탄올에 녹여 약 10⁻⁴M로 시료 용액을 제조하고

크기가 0.5 μ m 이상인 입자를 제거한 후 10 μ 씩 주입하였다. 이동상중의 유기용매 부피 %는 μ -Bondapak C₁₈ 컬럼에서 메탄올 40~80%, 아세트니트릴 30~80%, polymeric 컬럼에서는 메탄올 40~70%, 아세트니트릴 20~50%이며, 각각 10%씩 변화시켰다. 각 조성에서 컬럼의 온도를 20~40 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C씩 변화시키며, 각 온도에서 시료들의 용량인자, k' ($k' = (t_R - t_0)/t_0$) 값을 구하였다. 여기서 t_R 은 시료의 머무름 시간, t_0 는 시료를 녹인 메탄올의 머무름 시간이다. 모든 시료에 대해 각 조건에서 3번이상 머무름 시간을 측정하였으며, 컬럼의 온도는 항온조를 이용하여 일정하게 유지시켰다.

결과 및 고찰

페놀류의 머무름에 미치는 온도의 영향. Polymeric C₁₈과 μ -Bondapak C₁₈ 컬럼에서 머무름에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 온도를 20~40 $^{\circ}$ C까지 5 $^{\circ}$ C씩 변화시키며 페놀류의 용량인자 값들을 측정하였다. 얻어진 용량인자 값들은 식 (1)에 의해 절대온도를 독립변수로 하여 선형 회귀분석(linear regression)을 수행하였다.

$$\ln k' = -\Delta H^{\circ}/RT + \Delta S^{\circ}/R + \ln \Phi \quad (1)$$

여기서 ΔH° 는 용질이 이동상에서 정지상으로 전

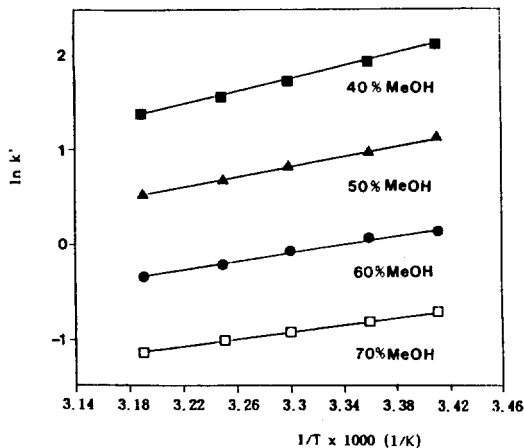


Fig. 1. Van't Hoff plots for 2,3-dichlorophenol in various MeOH compositions (pH 3.50) on polymeric C₁₈ column.

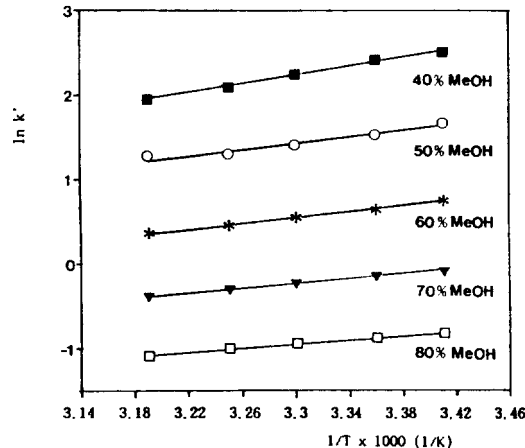


Fig. 2. Van't Hoff plots for 2,3-dichlorophenol in various MeOH compositions (pH 3.50) on μ -Bondapak C₁₈ column.

이할 때의 표준 전이 엔탈피이며, ΔS° 는 표준 전이 엔트로피, Φ 는 정지상과 이동상의 부피비이다. 식 (1)에서 $\ln k'$ 과 $1/T$ 과의 관계(van't Hoff plot)가 직선성을 보일 경우, 그 머무름 메커니즘은 조사한 온도 범위에서 일정함을 나타낸다. 표준 전이 엔탈피는 기울기($-\Delta H^\circ/R$)로부터 계산되며, 정지상에 대한 용질의 친화도를 나타내는 것이다.

Fig. 1과 2는 페놀류 중 대표로 2,3-dichlorophenol을 선택하여 메탄올-물 이동상에서 두 컬럼에서의 van't Hoff plots이다. 각각의 유기용매 조성에서 좋은 직선관계($r > 0.99$)를 볼 수 있다. 이러한 직선 관계는 본 연구에서 사용한 이동상의 조성, 컬럼에 상관없이 모든 페놀류들에서 관찰할 수 있었다. Table 1과 2에는 polymeric C_{18} 및 μ -Bondapak C_{18} 컬럼에서 이동상의 조성이 각각 20%와 40% 아세

토니트릴일 때의 용량인자와 엔탈피 값들을 나타내었다. 메탄올과 아세토니트릴의 모든 조성에서 모든 시료에 대한 엔탈피 값을 두 컬럼에서 조사한 결과, 엔탈피 값들은 이동상 중에 유기용매의 조성이 증가함에 따라 일직선상으로 증가하는 경향을 보였고, 치환기의 개수가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이것은 이동상내에 유기용매의 조성이 증가함에 따라 정지상으로의 친화도가 감소하는 것을 보여 주는 것이다. 또한 치환기의 개수가 증가함에 따라 용질의 소수성이 증가하기 때문에 비극성 정지상으로의 친화도가 증가하는 것이다. 이러한 경향은 Laub들¹⁷이 THF-물 이동상에서 페놀류에 대하여 얻었던 결과와 유사한 것이다. 치환기에 따른 특징은 nitrophenols의 경우 methylphenols와 chlorophenols에 비해 상당히 작은 엔탈피 값을 보였지

Table 1. $\ln k'$ and enthalpy values of phenols at 20% ACN (pH 3.50) on polymeric C_{18} column

Solute	Column Temp. $1/T \times 10^3$ (K ⁻¹)					r^a	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)
	3.41	3.36	3.30	3.25	3.19		
phenol	0.34	0.25	0.18	0.07	0.01	0.994	3.025
<i>p</i> -cresol	1.19	1.11	1.02	0.91	0.84	0.997	3.246
<i>o</i> -cresol	1.28	1.18	1.11	1.00	0.90	0.997	3.390
<i>m</i> -cresol	1.18	1.08	1.00	0.90	0.81	0.998	3.318
2,6-dimethylphenol	2.04	1.93	1.83	1.71	1.63	0.997	3.749
2,3-dimethylphenol	2.03	1.91	1.82	1.70	1.60	0.998	3.858
2,4-dimethylphenol	2.10	2.00	1.90	1.79	1.69	0.999	3.717
2,5-dimethylphenol	2.07	1.99	1.84	1.77	1.67	0.996	3.690
2,3,5-trimethylphenol	2.79	2.68	2.57	2.50	2.34	0.996	3.907
2,4,6-trimethylphenol	2.86	2.75	2.64	2.52	2.41	0.999	4.078
<i>o</i> -chlorophenol	1.46	1.34	1.27	1.13	1.04	0.994	3.781
<i>p</i> -chlorophenol	1.84	1.72	1.61	1.52	1.38	0.999	4.047
<i>m</i> -chlorophenol	1.91	1.77	1.66	1.53	1.43	0.997	4.325
2,3-dichlorophenol	2.75	2.61	2.50	2.33	2.18	0.997	5.123
2,5-dichlorophenol	2.80	2.64	2.52	2.40	2.25	0.998	4.835
2,4-dichlorophenol	2.95	2.80	2.67	2.52	2.41	0.997	4.902
2,4,6-trichlorophenol	3.78	3.60	3.51	3.30	3.18	0.991	5.399
2,4,5-trichlorophenol	4.09	3.88	3.77	3.54	3.39	0.993	6.265
4-chloro- <i>m</i> -cresol	2.64	2.52	2.41	2.22	2.14	0.991	4.682
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	2.58	2.36	2.20	2.07	1.92	0.993	5.804
<i>p</i> -nitrophenol	1.03	0.89	0.73	0.61	0.49	0.998	4.909
<i>m</i> -nitrophenol	1.15	1.01	0.88	0.74	0.63	0.998	4.724
<i>o</i> -nitrophenol	1.53	1.43	1.32	1.23	1.11	1.000	3.758
2,4-dinitrophenol	1.38	1.18	1.00	0.85	0.75	0.990	5.728
2,5-dinitrophenol	1.69	1.51	1.36	1.21	1.09	0.996	5.406

^aCorrelation coefficient of van't Hoff plot.

Table 2. $\ln k'$ and enthalpy values of phenols at 40% ACN (pH 3.50) on μ -Bondapak C_{18} column

Solute	Column Temp. $1/T \times 10^3$ (K ⁻¹)					r^a	$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)
	3.41	3.36	3.30	3.25	3.19		
phenol	0.11	0.04	-0.05	-0.13	-0.17	0.992	2.631
<i>p</i> -cresol	0.54	0.46	0.37	0.29	0.23	0.997	2.849
<i>o</i> -cresol	0.64	0.55	0.48	0.41	0.36	0.993	2.522
<i>p</i> -ethylphenol	0.98	0.90	0.82	0.71	0.65	0.995	3.064
2,6-dimethylphenol	1.12	1.04	0.97	0.89	0.84	0.995	2.557
2,3-dimethylphenol	1.02	0.93	0.85	0.79	0.73	0.994	2.595
2,4-dimethylphenol	1.04	0.97	0.91	0.85	0.78	0.999	2.309
2,5-dimethylphenol	1.08	0.97	0.93	0.83	0.78	0.985	2.659
2,3,5-trimethylphenol	1.46	1.37	1.28	1.21	1.16	0.992	2.738
2,4,6-trimethylphenol	1.55	1.46	1.38	1.31	1.24	0.997	2.778
<i>o</i> -chlorophenol	0.70	0.62	0.55	0.48	0.41	0.999	2.597
<i>p</i> -chlorophenol	0.87	0.77	0.68	0.60	0.52	0.998	3.137
<i>m</i> -chlorophenol	0.94	0.84	0.75	0.69	0.60	0.997	2.996
2,3-dichlorophenol	1.33	1.24	1.15	1.09	1.01	0.997	2.851
2,5-dichlorophenol	1.46	1.37	1.29	1.21	1.12	0.999	3.032
2,4-dichlorophenol	1.46	1.36	1.30	1.22	1.14	0.996	2.812
2,4,6-trichlorophenol	2.01	1.92	1.83	1.77	1.69	0.997	2.851
2,4,5-trichlorophenol	2.09	2.00	1.89	1.83	1.74	0.997	3.143
4-chloro- <i>m</i> -cresol	1.26	1.18	1.09	1.02	0.95	0.999	2.963
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	1.60	1.50	1.38	1.28	1.10	0.995	4.415
<i>p</i> -nitrophenol	0.47	0.39	0.29	0.18	0.10	0.998	3.428
<i>m</i> -nitrophenol	0.59	0.48	0.38	0.29	0.22	0.995	3.352
<i>o</i> -nitrophenol	0.99	0.89	0.80	0.73	0.66	0.995	2.957
2,4-dinitrophenol	0.81	0.71	0.59	0.47	0.24	0.988	4.997
2,5-dinitrophenol	1.07	0.93	0.85	0.73	0.66	0.990	3.670

^aCorrelation coefficient of van't Hoff plot.

만, 머무름 시간이 더 빠른 것을 감안하면 이동상과의 상호작용이 다른 페놀류에 비하여 더 큰 것을 알 수 있다. 즉 니트로 치환기들의 경우 이동상과 분자간 수소결합을 형성하기 때문에 이동상과의 상호작용이 증가하는 것이다. 그러나 *o*-nitrophenol의 경우 인접한 히드록시기와의 분자내 수소결합을 형성하기 때문에, 그 용리거동이 dimethylphenol들과 유사할 정도로 수소성의 증가를 나타내었다. 결론적으로 페놀류들은 본 연구에서 조사한 온도범위에서 일정한 머무름 메커니즘을 가지는 것으로 나타났고, 엔탈피 값들과 용량인자들로부터 치환기에 따른 머무름 특성을 알 수 있었다.

엔탈피-엔트로피 상쇄현상과 머무름 메커니즘과의 관계. Melander⁶은 어떤 온도에서 측정된 용량인자와 그에 대응하는 엔탈피 사이에 직선관계가

있다는 것은 자유 에너지와의 관계를 밝혀주는 엔탈피-엔트로피 상쇄(compensation)현상에 기인하는 것으로 설명될 수 있다고 하였다. 엔탈피-엔트로피 상쇄현상은 전체적인 자유에너지의 변화와 그에 대응하는 엔탈피의 변화 사이에 직선관계가 나타나는 것을 가리키는 것으로, 만약 그러한 상관관계가 있다면 근본적으로 평형과정 혹은 화학반응은 각각 isoequilibrium 혹은 isokinetic 과정이라 말할 수 있으며 다음과 같은 관계식으로 표시된다.

$$\Delta H^\circ = \beta \Delta S^\circ + \Delta G^\circ_\beta \quad (2)$$

식 (2)는 온도가 β 일 때, 엔탈피 변화는 엔트로피 변화에 의하여 상쇄되고 자유에너지 변화는 온도에 대하여 독립적이라는 것을 말해준다. 즉 화합물들이 특정한 화학적 변화를 할 때 엔탈피-엔트로피 상쇄

Table 3. Results of enthalpy-entropy compensation plots ($\ln k'$ vs. $-\Delta H^\circ$) at 303 K

Solute	Column	Mobile phase ^a	Slope	Intercept	$\beta(K)$	R^2	n
25 Phenols	μ -Bondapak C ₁₈	40~80% MeOH	1.08 (32.3)	-3.24 (-28.3) ^b	864	0.895	124
20 Phenols ^c	μ -Bondapak C ₁₈	40~80% MeOH	1.12 (42.3)	-3.27 (-35.6)	924	0.949	99
5 Phenols	μ -Bondapak C ₁₈	40~80% MeOH	0.837 (8.66)	-2.84 (-8.82)	611	0.765	25
23 Phenols ^d	μ -Bondapak C ₁₈	30~80% ACN	0.922 (6.05)	-2.36 (-5.47)	682	0.236	115
25 Phenols	Polymeric C ₁₈	40~70% MeOH	0.933	-4.31	692	0.703	100
17 Phenols ^e	Polymeric C ₁₈	40~70% MeOH	1.05 (30.9)	-4.58 (-29.1)	818	0.935	68
8 Phenols	Polymeric C ₁₈	40~70% MeOH	0.707	-3.77	528	0.452	32
25 Phenols	Polymeric C ₁₈	20~50% ACN	0.797	-2.28	583	0.423	100
17 Phenols	Polymeric C ₁₈	20~50% ACN	1.31 (21.1)	-3.60 (-17.4)	1438	0.871	68

^aHydro-organic solvent. ^bThe number in a parenthesis shows the t statistic for each instance. ^cFive nitrophenols (*o*-, *m*-, *p*-, 2,4-, 2,5-) are excluded as outliers. ^d4,6-dinitro-*o*-cresol and 2,4-dinitrophenol are excluded as outliers. ^eSix nitrophenols and phenol, 2,4,6-trimethylphenol are excluded as outliers.

현상이 관찰되면, 그 때의 β 와 자유에너지는 일정한 값이 되며 β 를 상쇄온도(compensation temperature)라 한다. 식 (2)는 식 (1)과 $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ 의 관계로부터 크로마토그래피 시스템에 적용할 수 있는 다음과 같은 식을 유도할 수 있다.

$$\ln k' = -\Delta H' (1/T - 1/\beta)/R - \Delta G^\circ_p/R\beta + \ln \Phi \quad (3)$$

식 (3)은 기준온도(T)에서 조건을 변화시켜 가며 측정된 용량인자와 그에 해당하는 엔탈피 변화가 직선성을 나타내면 상쇄온도가 일정한 값을 갖게 되므로 상쇄현상이 있다는 것을 나타낸다. 이러한 상쇄현상이 관찰된다면 용질들의 머무름이 근본적으로 동일한 메커니즘을 거쳐서 일어난다고 말할 수 있다^{6,7}. 본 연구에서는 선택한 페놀류들의 치환기 및 이동상의 조성이 변화할 때 나타나는 머무름 메커니즘의 변화를 알아보려고 하였다. 식 (3)에 의해 $\ln k'$ 와 $-\Delta H^\circ$ 의 관계를 각 컬럼에서 각 이동상의 조성범위에서 조사하였다. 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 이때 기준온도는 통계적 변화를 줄이기 위하여 실험에서 사용한 온도들의 harmonic mean인

30°C로 정하였다.

메탄올-물 이동상에서 $-\Delta H^\circ$ 를 독립변수로 하여 25종의 페놀류들에 대하여 회귀분석한 결과 μ -Bondapak C₁₈ 및 polymeric C₁₈ 컬럼에서 결정계수(R^2)가 각각 0.895, 0.703으로 얻어졌다. Fig. 3과 4에 이들의 compensation plot을 나타내었다. 여기서 보다 뚜렷한 직선관계를 찾기 위하여 전체적인 경향에서 많이 벗어나는 이상치(outlier)들을 제외하였다. 이상치로는 μ -Bondapak C₁₈ 컬럼상에서 *o*-nitrophenol, *m*-nitrophenol, *p*-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol과 2,5-dinitrophenol을 polymeric C₁₈ 컬럼상에서는 니트로 치환기를 가지는 6종의 페놀류와 phenol 및 2,4,6-trimethylphenol을 제외시켰다. 이때 결정계수는 각각 0.949, 0.935로 증가하였다. 이와 같은 결과들은 본 연구의 메탄올 이동상의 조성범위에서 methylphenols와 chlorophenols의 머무름 메커니즘은 변하지 않고 일정함을 의미하는 것이다. 즉 이상동의 조성이 변화함에 따라 ΔH° 값의 변화가 일직선상에서 나타나기 때문에 엔탈피-엔트로피 상쇄현상이 관찰되는 것이다. 이러한 경향은 이

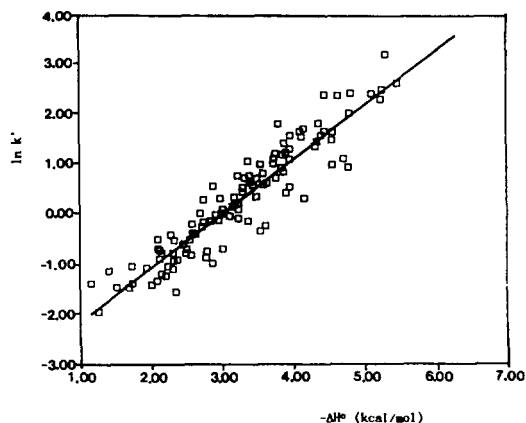


Fig. 3. Plot of $\ln k'$ vs. $-\Delta H^\circ$ for 25 phenols in 40~80% MeOH-H₂O solvents on μ -Bondapak C₁₈ column at 30°C.

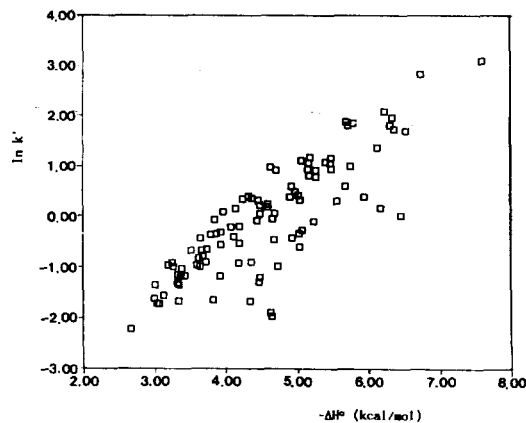


Fig. 4. Plot of $\ln k'$ vs. $-\Delta H^\circ$ for 25 phenols in 40~70% MeOH-H₂O solvents on polymeric C₁₈ column at 30°C.

동상 중에서 메탄올의 조성이 증가할수록 비극성 정지상의 표면에 흡착하는 메탄올의 양이 증가하는 것을 감안하면, 페놀류들의 머무름에서 분배현상보다는 흡착현상이 더 큰 영향을 미친다고 생각할 수 있다. 이상치로 제외시킨 페놀류들의 회귀분석 결과는 결정계수가 0.765, 0.452로 상채현상이 있다고 단정하기 어렵다.

아세트니트릴-물 이동상에서의 경우 μ -Bondapak C₁₈ 컬럼상에서는 상채현상이 거의 나타나지 않았지만 polymeric C₁₈ 상에서는 이상치들을 제외하였을 때 $\ln k'$ vs. $-\Delta H^\circ$ plot의 결정계수가 0.871로 증가하였다. 이러한 차이는 아세트니트릴-물의 조성 범위가 두 컬럼에서 각각 다르기 때문이다. Zhu²⁶는 아세트니트릴-물 이동상에서 아세트니트릴의 조성이 약 50% 이하에서는 아세트니트릴의 조성이 증가함에 따라 정지상에 흡착하는 아세트니트릴의 양은 증가하지만 그 이상에서는 일정한 흡착량을 보인다고 보고한 바 있다. 본 연구에서 선택한 monomeric 및 polymeric 상에서 아세트니트릴-물 이동상의 조성 범위는 각각 30~80%, 20~50%이기 때문에 위와 같은 차이를 보인 것으로 추측된다. 즉 polymeric 컬럼상의 아세트니트릴 조성범위에서는 정지상을 완전히 포화시키지 못하기 때문에 아세트니트릴의 조성이 증가할수록, 정지상에 흡착하는 아세트니트릴의 양이 증가하는 것을 의미하는 것으로, 이는 정지상의 구조와 특성을 감안할 때 흡착현상의 영

향에 의해 엔탈피-엔트로피 상채현상에 접근하는 것이라 생각할 수 있다. 아세트니트릴 이동상에서도 니트로페놀들은 다른 페놀류에 비하여 상이한 머무름 거동을 보여주었다.

아세트니트릴 이동상에서 이상치를 제외한 후에도 그 결과가 좋지 못한 것은, 아세트니트릴 이동상에서 페놀류의 머무름 메커니즘은 메탄올에 비하여 보다 복잡한 영향을 받는다는 것을 의미한다. 이러한 현상은 아세트니트릴과 메탄올의 화학적 성질로 설명할 수 있다. 메탄올은 수소결합 주체 및 받체로서 작용하기 때문에 수소결합 능력을 갖는 용질에 대해서는 선택성이 뛰어나다. 반면에 아세트니트릴은 수소결합 받체로서만 작용하기 때문에 수소결합 선택성은 덜하지만, 자체가 π 전자들을 가지기 때문에 π - π 상호작용을 할 수 있는 용질에 대해서 선택성을 가진다²⁷. 특히 아세트니트릴 이동상에서의 페놀류들의 머무름은 Hanai²⁰에 의해서 다음과 같이 제안된 바 있는데, 이는 아세트니트릴 용매하에서는 페놀류의 머무름이 수소결합 및 π - π 상호작용에 영향을 받는 것을 나타내는 것이다.

$$\log k'(\text{Ph-OH}) = \log k'(\text{VWV}) - \log k'(\pi) - \log k'(\text{HB}) \quad (4)$$

Hanai는 식 (4)에서 페놀류의 머무름에 영향을 미치는 파라미터로 VWV 부피, π -에너지 효과, 수소결합 효과를 제안하였으며, π -에너지의 영향보다도

Table 4. Comparison of $\ln k'$ between polymeric and monomeric C_{18} columns

(a) Correlation coefficients in MeOH-H₂O mobile phase

	P40% ^a	P50%	P60%	P70%
M40% ^b	0.998	0.997	0.993	0.987
M50%	0.996	0.997	0.996	0.992
M60%	0.994	0.997	0.998	0.995
M70%	0.987	0.991	0.995	0.994

^aPolymeric C_{18} column. ^bMonomeric C_{18} column.

(b) Correlation coefficients in ACN-H₂O mobile phase

	P30%	P40%
M30% ^b	0.995	0.991
M40% ^b	0.991	0.991

수소결합 에너지 영향이 더 크다는 것을 보였다. 따라서 페놀류와 이동상간의 상호작용은 메탄올 용매일 경우 수소결합만이 고려되지만, 아세트니트릴 용매하에서는 수소결합과 함께 π - π 상호작용이 고려되어야 한다.

결론적으로 엔탈피-엔트로피 상쇄현상으로부터 메탄올 용매하에서 메틸 및 클로로페놀들은 일정한 메카니즘으로 용리되지만, 아세트니트릴에서는 보다 복합적인 메카니즘이 작용함을 알 수 있었다. 그리고 니트로페놀들은 메탄올 및 아세트니트릴 이동상에서 다른 페놀류와는 머무름 메카니즘이 다름을 나타내었다.

Monomeric C_{18} 컬럼(μ -Bondapak C_{18})과 Polymeric C_{18} 컬럼(201TP)에서의 페놀류의 머무름 비교. Polymeric C_{18} 컬럼은 기본물질인 실리카 표면에 octadecylpolysiloxane층이 다리결합(crosslinked)되어 있는 정지상으로, 보통의 octadecyl silica (monomeric C_{18})에 비하여 비극성 알킬층이 더 두껍고, 단단한 것으로 알려져 있다. 이로 인해 polymeric C_{18} 정지상에서는 더 큰 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)을 하기 때문에 정지상과 이동상 사이에서의 질량전이가 monomeric C_{18} 보다 느리다²⁸. 이러한 단점을 보완하기 위하여 사용되는 polymeric 컬럼은 실리카의 동공 크기가 더 큰 고체 지지체를 사용한다. 이러한 polymeric상의 구조는

중합화 정도와 알킬 사슬의 다리결합의 정도가 알려져 있지 않기 때문에 정확히 알기는 어렵다.

본 연구에서는 polymeric C_{18} 컬럼과 monomeric C_{18} 컬럼을 사용하여 두 컬럼에서 나타나는 페놀류의 머무름을 비교 관찰하였다. 이동상의 조성 및 컬럼 온도가 동일한 경우 페놀류의 머무름 시간은 polymeric C_{18} 컬럼에서 더 짧게 나타났는데, 이는 polymeric C_{18} 컬럼에서의 정지상의 표면적이 더 작기 때문이다. 그러나 정지상에 대한 친화도를 나타내는 엔탈피값을 비교하였을 때 polymeric C_{18} 컬럼상에서 더 작은 값을 나타내었다. 이는 페놀류들이 polymeric C_{18} 컬럼의 정지상에서 더 큰 소수성 상호작용을 하기 때문이다. 각 컬럼에서의 선택성을 비교하기 위하여 용량인자들 사이의 상관관계를 Table 4에 나타내었다. 각각의 조성에서의 높은 상관관계는 두 컬럼 사이의 선택성에 차이가 거의 없음을 보여주는 것이다.

Table 5는 각 컬럼에서의 엔탈피 값을 비교한 것이다. 컬럼사이의 엔탈피 값 차이의 평균은 메탄올 용매에서 0.826 kcal/mol, 아세트니트릴 용매에서는 0.253 kcal/mol로 나타났다. 이러한 현상은 메탄올 및 아세트니트릴의 성질 차이로부터 설명이 된다. 메탄올의 경우 그 수소결합 능력이 물과 유사하기 때문에 물과 혼합될 경우 메탄올-물의 복합체(complex)를 이룬다¹¹. 정지상은 완전히 메탄올로 포화되지 못하여 정지상 표면의 메탄올의 농도는 전체 이동상에 비해 높지 않게 되며 용질은 정지상과 직접적으로 상호작용을 하게 된다. 이 때 polymeric상의 두께가 더 크기 때문에 monomeric상보다 강한 소수성 상호작용을 하게 된다. 아세트니트릴의 경우 수소결합반계로만 작용할 수 있기 때문에, 물의 그 물구조에서 배제되어 메탄올보다는 자유롭게 존재한다²⁹. 따라서 아세트니트릴은 비극성 정지상의 표면에 우선적으로 흡착하게 되어, 용질이 정지상 표면보다는 아세트니트릴 층과 더 직접적으로 작용하게 된다. 즉 비극성 정지상의 표면에서 유기용매인 아세트니트릴이 컬럼내 전체 이동상의 조성에 비하여 더 많이 존재하는 변형된 정지상이 형성되는 것이다. 따라서 메탄올보다는 아세트니트릴 용매하에서 두 컬럼내의 상황이 더 유사하기 때문에 엔탈피의 차이가 적어지는 것이다. 이와 같은 경향은

Table 5. Enthalpy ($-\Delta H^\circ$) values of phenols at polymeric and monomeric C_{18} columns

Solute	50% MeOH-H ₂ O		30% ACN-H ₂ O	
	mono- meric	poly- meric	mono- meric	poly- meric
phenol	2.925	3.631	2.929	2.737
<i>p</i> -cresol	3.285	3.926	2.678	2.700
<i>o</i> -cresol	3.288	4.075	2.673	2.918
2,6-dimethylphenol	3.539	4.255	2.885	2.986
2,3-dimethylphenol	3.722	4.472	2.673	3.062
2,4-dimethylphenol	3.718	4.327	2.671	2.989
2,5-dimethylphenol	3.720	4.367	2.609	3.060
2,3,5-trimethylphenol	3.972	4.723	2.933	3.276
2,4,6-trimethylphenol	3.934	4.650	2.750	3.242
<i>o</i> -chlorophenol	3.432	4.186	2.710	2.812
<i>p</i> -chlorophenol	3.861	4.578	3.255	3.312
<i>m</i> -chlorophenol	3.827	4.611	3.350	3.455
2,3-dichlorophenol	4.332	5.267	3.318	3.713
2,5-dichlorophenol	4.405	5.269	3.288	3.749
2,4-dichlorophenol	4.435	5.086	3.360	3.634
2,4,6-trichlorophenol	4.618	5.703	3.036	4.144
2,4,5-trichlorophenol	5.450	6.244	3.575	4.317
4-chloro- <i>m</i> -cresol	4.552	5.196	3.072	3.461
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	4.298	5.700	7.137	5.557
<i>p</i> -nitrophenol	4.153	5.055	3.650	4.181
<i>m</i> -nitrophenol	3.897	4.683	3.364	3.999
<i>o</i> -nitrophenol	3.318	3.860	2.829	3.524
2,4-dinitrophenol	3.934	5.056	6.152	5.796
2,5-dinitrophenol	3.577	5.086	4.266	4.615

수착(sorption) 메커니즘의 한 예를 보여주는 것이다.

두 컬럼에서 페놀류의 머무름 예측. 각 컬럼에서 이동상의 조성 및 온도가 동시에 변할 때 페놀류의 머무름을 예측할 수 있는 관계식을 조사하였다. 이때 분자의 구조나 성질을 나타내는 파라미터로부터 머무름을 예측하는 QSRR(Quantitative structure-retention relationship) 방법을 사용하였다. 두 컬럼에 대해 각 이동상에서 페놀류의 머무름을 예측한 결과를 식 (5)~(8)에 나타내었다.

$$\log k'_{\text{MeOH, Monomeric}} = -0.868 - 2.39\phi + 599/T + 0.747\pi - 0.0325(\sigma + E_s) - 0.00202(\phi \pi/T)$$

$$n = 600, R^2 = 0.992, F = 15020 \quad (5)$$

$$\log k'_{\text{ACN, Monomeric}} = -1.01 - 1.70\phi + 530/T + 0.517\pi - 0.0430(\sigma + E_s) - 0.00167(\phi \pi/T)$$

$$n = 710, R^2 = 0.988, F = 12010 \quad (6)$$

$$\log k'_{\text{MeOH, Polymeric}} = -2.88 - 2.65\phi + 1190/T + 0.831\pi - 0.0461(\sigma + E_s) - 199(\phi \pi/T)$$

$$n = 480, R^2 = 0.986, F = 6894 \quad (7)$$

$$\log k'_{\text{ACN, Polymeric}} = -2.26 - 2.66\phi + 872/T + 0.738\pi - 0.0650(\sigma + E_s) - 278(\phi \pi/T)$$

$$n = 480, R^2 = 0.988, F = 7467 \quad (8)$$

앞 식들에서 π 는 소수성 치환기 상수이며, $\sigma + E_s$ 는 본 연구실에서 제안한 상수로 페놀유도체들이 이동상과 수소결합을 할 때 치환기의 입체적 방해 효과(steric hindrance)를 나타내기 위해서 *m*-, *p*-위치에 있는 치환기의 Hammett 상수 값과 Taft의 입체상수를 더한 값이다. $\phi \pi/T$ 는 잔차도표(residual plot)가 최귀모형에 적합하지 않아 이를 해결하기 위한 것으로 그 자체는 물리적, 화학적 의미가 없는 항이다.

본 연구에서 조사한 위의 관계식들은 온도와 이동상의 조성이 동시에 변화할 때의 페놀류의 머무름을 예측한 것으로 R^2 값들로부터 예측력이 뛰어난 것을 알 수 있으며 Jinno¹⁷이 페놀류의 머무름 예측에서 가장 적합하다고 주장한 σ 보다 $\sigma + E_s$ 가 더 좋은 결과를 보여주었다.

결 론

Monomeric C_{18} (μ -Bondapak C_{18}) 컬럼과 polymeric C_{18} (201TP) 컬럼의 메탄올-물 및 아세토니트릴-물 용매 시스템에서 25종의 페놀 유도체들의 머무름거동을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 메탄올-물 이동상에서 alkylphenols 및 chlorophenols는 compensation plot으로부터 머무름 메커니즘이 이동상의 조성에 관계없이 일정함을 알 수 있었으며, 반면에 아세토니트릴-물 이동상에서는 완전한 상쇄현상을 보이지 않았다. 또한 다른 페놀류와는 달리 nitrophenols는 이동상에 관계없이 다른 머무름 메커니즘을 나타내었다. Monomeric C_{18} 컬럼과 polymeric C_{18} 컬럼에서의 머무름을 비교하였을 때, polymeric C_{18} 컬럼에서 정지상과 시료의 소수성 상호작용이 더 큼을 알 수 있었다. 또한 이동상의 조성 및 온도가 동시에 변할 때 페놀류의

머무름을 예측할 수 있는 관계식을 유도하였다.

이 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비(89-03 12-04)로 수행된 것입니다. 이에 재단에 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. C. Horvath, W. Melander, and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, **125**, 129 (1976).
2. W. Melander, J. Stoveken, and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **199**, 35 (1980).
3. C. Horvath and W. Melander, *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 393 (1977).
4. B. Karger, J. R. Gant, A. Hartkopf, and P. Weiner, *J. Chromatogr.*, **128**, 65 (1976).
5. J. Leffler and E. Grunwald, "Rates and Equilibria of Organic Reactions", Wiley, New York, (1963).
6. W. Melander, D. E. Campbell, and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **158**, 215 (1978).
7. E. Tomlinson, H. Poppe, and J. C. Kraak, *Int. J. Pharm.*, **7**, 225 (1981).
8. M. Kuchar, V. Rejholec, V. Miller, and E. Kraus, *J. Chromatogr.*, **280**, 289 (1983).
9. K. Jinno and N. Ozaki, *J. Liq. Chromatogr.*, **7**(5), 877 (1984).
10. R. J. Laub and S. J. Madden, *J. Liq. Chromatogr.*, **8**(1), 187 (1985).
11. A. Opperhuizen, T. L. Sinnige, and J. M. D. Van der Steen, and O. Hutzinger, *J. Chromatogr.*, **388**, 51 (1987).
12. K. Jinno and K. Kawasaki, *Chromatographia*, **17** (6), 337 (1983).
13. M. J. M. Wells, C. R. Clark, and R. M. Patterson, *Anal. Chem.*, **58**, 1625 (1986).
14. R. H. Rohrbaugh and P. C. Jurs, *Anal. Chem.*, **59**, 1048 (1987).
15. S. F. Y. Li and H. K. Lee, *Chromatographia*, **25**(6), 515 (1988).
16. K. Jinno and K. Kawasaki, *Anal. Chem.*, **152**, 25 (1983).
17. K. Jinno and K. Kawasaki, *Chromatographia*, **18** (2), 90 (1984).
18. K. Jinno and K. Kawasaki, *J. Chromatogr.*, **316**, 1 (1984).
19. F. S. Calixto and A. G. Raso, *Chromatographia*, **14**, 596 (1981).
20. T. Hanai and J. Hubert, *J. Chromatogr.*, **302**, 89 (1984).
21. Y. Arai, M. Hirukawa, and T. Hanai, *J. Chromatogr.*, **384**, 279 (1987).
22. Y. Arai, M. Hirukawa, and T. Hanai, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**(4), 635 (1987).
23. K. Jinno and K. Kawasaki, *Chromatographia*, **18** (9), 499 (1984).
24. R. J. Laub and J. H. Purnell, *J. Chromatogr.*, **161**, 49 (1987).
25. J. Gant, J. Dolan, and L. Snyder, *J. Chromatogr.*, **185**, 153 (1979).
26. P. L. Zhu, *Chromatographia*, **21**(4), 229 (1986).
27. T. Braumann, *J. Chromatogr.*, **373**, 191 (1986).
28. C. Horvath, "High-Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives", Academic Press, New York, (1980).
29. E. D. Katz, C. H. Lochmuller, and R. P. W. Scott, *Anal. Chem.*, **61**, 349 (1989).