

## 역상 액체 크로마토그래피에서 페놀류의 분리 최적화 및 미량 페놀류의 농축-분리에 관한 연구

李大云\* · 李聖遠† · 蘇政靜‡ · 趙炳蓮

연세대학교 이과대학 화학과

†대웅제약 중앙연구소

‡삼성 종합화학연구소

(1993. 2. 10 접수)

## A Study on Optimization for Separation of Phenols and Preconcentration-Separation of Trace Phenols in Reversed-Phase Liquid Chromatography

Dai Woon Lee\*, Sung Won Lee†, Min Jeong So‡, and Byung Yun Cho

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

†Daewoong Pharmaceutical Co., Ltd., Kyunggi-Do 462-120, Korea

‡Samsung General Chemicals Co., Ltd., Kyunggi-do, Korea

(Received February 10, 1993)

**요 약** 본 연구는 역상 액체 크로마토그래피에서 25가지 페놀류를 분리-분석하기 위한 용매의 최적 조건을 결정하고 미량의 페놀류를 농축-분리하는데 그 목적을 두었다. 페놀류를 클로로 페놀, 메틸 페놀과 니트로 페놀로 분류하고 각각을 사성분 혼합 용매 시스템을 도입하여 최적 분리조건을 결정하였다. 분리 최적화는 통계적인 심플렉스 방법으로 overlapping resolution maps(ORM)를 사용하여 최적 용매조성을 결정하였으며, pH와 온도의 최적화 효과도 알아보았다. 또한 분리도를 향상시키고 분석시간을 줄이기 위해서 ORM-Prism 방법을 사용한 등선택성 다성분 기울기 용리 시스템을 도입하였다. 환경 오염수로부터 미량의 페놀류를 농축-분리하기 위해서 비극성 흡착제인 XAD-2와 강음이온교환 수지인 Dowex 1-X8로 구성되는 직렬 컬럼을 사용하여 그 농축-분리 성능을 평가하였다. 농축 효율을 평가하기 위해서 시료용액의 부피를 1 L까지 증가시켰을 때 페놀을 제외한 모든 페놀류는 90% 이상의 회수율을 나타내었고, 검출 한계는 5 ppb이었다. 한편 시판의 C<sub>18</sub> 카트리지와 비교한 결과 XAD-2/Dowex 1-X8법의 농축 효율과 선택성이 좋음을 알았다.

**ABSTRACT.** The purpose of this study is to optimize the selectivity of mobile phase solvents for separation of 25 phenols in reversed phase liquid chromatography and to accomplish the simultaneous preconcentration and separation of trace phenols from water samples. Phenols used in this study were classified into three groups, chloro-, methyl-, and nitrophenols. Quaternary solvent mobile phases were employed to improve the selectivity. Overlapping resolution maps(ORM) as a statistical simplex techniques was used to predict the optimum solvent system. Additional criterion such as pH and temperature were also investigated. In order to improve the resolution and decrease the analysis time, isoselective multisolvent gradient elution system was employed with ORM-Prism method. The simultaneous preconcentration and separation of trace phenols from water samples were performed by using XAD-2/Dowex 1-X8 tandem column. When the extraction efficiency was evaluated by sampling up to 1 L of distilled water, recovery of the phenols, except phenol, was above 90% and the limit of detection of the phenols

was 5 ppb. The XAD-2/Dowex 1-X8 method was superior to C<sub>18</sub> cartridge in terms of recovery and selectivity.

## 서 론

HPLC를 이용하여 페놀류를 정확하고 신속하게 분리-분석하기 위해서는 최적화(optimization) 과정이 필요하다<sup>1</sup>. 분리의 최적조건을 결정하는 변수로는 일반적으로 이동상의 조성<sup>2-5</sup>, pH<sup>6-8</sup>, 온도<sup>9</sup> 등이 있으며 두 세 가지 변수를 동시에 최적화하는 방법<sup>10,11</sup>도 많이 응용되고 있다. 이동상의 조성을 최적화하는 방법은 Glajch<sup>2</sup>, Snyder<sup>12</sup> 그리고 Schoenmakers<sup>4</sup>에 의해 많이 연구되었는데, Glajch<sup>2</sup>은 Snyder<sup>12</sup>들이 제시한 용매 선택성 삼각형(solvent selectivity triangle)과 혼합 디자인 통계법(mixture design statistical technique)을 연결한 COF(chromatographic optimization function)과 ORM(overlapping resolution maps) 방법을 이용하여 이동상의 용매강도와 선택성을 최적화하여 15가지 나프탈렌 혼합물을 수분내에 분리하였다. 이때 이동상과 시료와의 친화력 차이로 인하여 각 이동상에 대한 용리순서가 일정하지 않은 경우에는 ORM 방법이 더 적절하다고 보고하였다. 또한 Drouen<sup>3</sup>은 상대적 분리도 곱(relative resolution product,  $r$ )이라는 기준을 사용하여 8가지 클로로페놀의 바탕선 분리를 얻었고, Schoenmakers<sup>4</sup>은 6가지 벤젠 및 알콜 유도체들을 분리도 곱(resolution product,  $IR_s$ )을 이용하여 최적 용매조성을 결정하여 분리할 수 있었다. 최근에는 여러가지 기준을 동시에 사용하여 보다 정확한 분리조건을 찾는 방법이 시도되고 있다. Coenegracht<sup>5</sup>은 혼합 디자인 통계법과 여러가지 기준(multi-criteria)을 이용하여 6가지 벤젠 유도체들을 분리하는 방법을 제시하였다. 이밖에 미국 EPA에서 제정한 11가지 주요 페놀 오염 물질에 대한 분리가 Lee<sup>13,14</sup>에 의하여 보고되었는데, ORM 방법을 사용한 결과 분리시간이 수분 이내로 단축되고 모두 바탕선 분리가 되는 좋은 결과를 얻었다. 본 연구에서는 RPLC에서 25종의 페놀류를 등용매 용리법으로 이동상의 pH와 온도변화에 대한 분리도의 영향을 조사하고 COF와 ORM 방법을 이용하여 최적의 용매조성을 결정하였다. 또한 분리도를 향상시키고 분석시간을 줄이기 위하여 등선

택성 기술기 용리법(isoselective gradient elution)<sup>12</sup>을 이용하여, ORM-Prism 방법으로 최적 기술기 용매조성을 결정하였다.

환경오염수 중 대부분의 페놀류들은 극히 미량으로 존재하고 매질이 복잡하기 때문에 크로마토그래피 시스템에 직접 적용할 수 없으므로 시료 전처리가 중요하다. 시료 전처리 기술은 액체-액체 추출법(LLE), 액체-고체 추출법(LSE), Headspace analysis<sup>15</sup> 및 Membrane process<sup>16</sup> 등이 있다. 최근에는 용질을 고체 흡착제에 흡착시킨 후 소량의 유기 용매로 탈착시키는 액체-고체 추출법을 주로 사용한다. SPE(solid phase extraction)로 언급되는 이 방법에 가장 많이 사용되는 흡착제는 활성탄(active carbon)<sup>17</sup>, 거대그물형 고분자 수지(macroreticular polymeric resins)<sup>18</sup>, 폴리우레탄폼(polyurethane foams)<sup>19</sup>, 결합형 실리카(bonded-phase silanized silicas)<sup>20</sup> 등이다. 시료 전처리에서 자동화와 더불어 나타나는 최근의 경향은 선택적인 농축법이다. Corcia<sup>21</sup>은 흑연 탄소 검정(graphitized carbon black, GCB)과 숄폰산형 양이온 교환 수지의 직렬 컬럼을 이용하여 실제 시료로부터 8가지 염기성 화합물, triazines을 농축-분리한 후 HPLC로 분석하였다. 회수율은 95~100%이고 검출 한계는 10 ng/l이었다. 그리고 9가지 산성 제조제를 선택적으로 분석하기 위해 GCB와 강음이온교환 수지를 포함하는 카트리지를 사용하여 농축-분리한 후 HPLC로 분석하였다<sup>22</sup>. 시료의 매질에 관계없이 회수율은 94~100% 이었고 이 분석 방법은 염기성, 중성, 약산 화합물의 방해를 받지 않았으며 검출 한계는 0.1µg/l이었다. Chriswell<sup>23</sup>은 페놀류를 다공성 음이온 교환 수지에 흡착, 아세톤으로 탈착시켜 GC로 분석하였다. 이 때 알콜류와 같은 중성 유기물의 방해받지 않고 ppb~ppm의 농도 범위에서 정확한 결과를 얻었다.

본 연구에서는 환경 오염수로부터 미량의 페놀류를 선택적으로 검출하기 위해 SPE-HPLC 분석방법을 개발하고자 한다. 약산인 페놀류를 간단하고 신속한 방법으로 동시 농축-분리하기 위해서 Amberlite XAD-2와 음이온교환 수지인 Dowex 1-X8의

직렬 컬럼을 이용하였다. 환경 시료에 적용하기 위하여 다양한 실제 매질에 페놀류를 첨가하여 농축함으로써 그 효과를 조사하였고 여러가지 방해 화합물을 함께 첨가하여 페놀류에 대한 Amberlite XAD-2/Dowex 1-X8 직렬 컬럼의 선택성 여부를 평가해 보았다.

## 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. 기울기 용리법에는 Spectra-Physics사의 SP8800 Ternary Gradient System 펌프를 사용하였다. 기록계는 Shimadzu사의 Chromatopac C-R6A 적분기, 초음파 진동기는 Smithkline 제품의 Branson Ultrasonic Cleaner, 항온조는 JEIO Tech.사의 RC10V를 사용하였다. 시료 및 용매 거름기구는 Millipore 제품용, 주사기는 Hamilton 제품의 microsyringe를, pH 미터는 Orion Research사의 Digital ionalyzer/501을 사용하였다. 시료 검출파장은 280 및 254 nm이고, 이동상의 유속은 1.0 ml/min으로 고정하였다.

**시 료.** 본 연구에서 사용한 페놀류는 phenol (Ph), *o*-cresol(*o*-MP), *m*-cresol(*m*-MP), *p*-cresol(*p*-MP), *o*-chlorophenol(*o*-CP), *m*-chlorophenol(*m*-CP), *p*-chlorophenol(*p*-CP), *o*-nitrophenol(*o*-NP), *m*-nitrophenol(*m*-NP), *p*-nitrophenol(*p*-NP), 2,3-dimethylphenol(2,3-DMP), 2,4-dimethylphenol(2,4-DMP), 2,5-dimethylphenol(2,5-DMP), 2,6-dimethylphenol(2,6-DMP), 2,3-dichlorophenol(2,3-DCP), 2,4-dichlorophenol(2,4-DCP), 2,5-dichlorophenol(2,5-DCP), 2,4-dinitrophenol(2,5-DMP), 2,5-dinitrophenol(2,5-DNP), 2,3,5-trimethylphenol(2,3,5-TMP), 2,4,6-trimethylphenol(2,4,6-TMP), 2,4,5-trichlorophenol(2,4,5-TCP), 2,4,6-trichlorophenol(2,4,6-TCP), *p*-ethylphenol(*p*-EP), 4-chloro-*m*-cresol(4-Ch-*m*-MP), 4,6-dinitro-*o*-cresol(4,6-DN-*o*-MP), pentachlorophenol(PCP)로서, 이들은 모두 일급 또는 특급 시약으로

단순중류 및 재결정하여 사용하였다.

**이동상 및 정지상.** 이동상으로는 HPLC용 메탄올(Mallinckrodt), 아세트니트릴(BDH), 테트라히드로퓨란(Mallinckrodt)을 HPLC용 물과 부피비로 혼합하여 사용하였다. 정지상으로는 Waters사의  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 칼럼(10  $\mu$ m, monomeric, 30 cm $\times$ 3.9 mm I.D.) Novapak C<sub>18</sub> 칼럼(4  $\mu$ m, 15 cm $\times$ 3.9 mm I.D.)을 사용하였다. 페놀류의 농축과 회수를 위한 컬럼은 sintered glass filter가 달린 내경 0.8 cm, 길이 12 cm인 pyrex관을 사용하였고 고체 흡착제는 Rohm & Hass 사의 스티렌-디비닐벤젠 공중합체 수지인 Amberlite XAD-2(40-100 mesh)와 Dow chemicals 사의 음이온 교환수지 Dowex 1-X8(200 mesh)을 사용하였다.

**용매 용리법에 의한 페놀류의 분리 최적화.** 페놀류를 치환기의 종류에 따라 클로로페놀, 니트로페놀과 메틸페놀류로 분류하여 각각에 대하여 용매 최적화 실험을 수행하였다. 선택성의 차이가 있는 메탄올, 아세트니트릴 및 테트라히드로퓨란을 용매로 선택하고 물을 기준용매로 하여 시료의 용량인자 값  $k'$ 이 적합하도록 7개의 혼합용매 조성을 결정하고, COF와 ORM 방법을 이용하여 최적화하였다. 이때 분리도( $R_s$ )는 두 봉우리 머무름 시간( $t_R$ )과 봉우리 폭( $t_w$ )를 측정하여  $R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / 0.5(t_{w1} + t_{w2})$  식으로 계산하였다. 또한 COF 및 ORM 방법은 IBM PC/AT 에서 MCAD와 Pascal 프로그램으로 계산하여 수행하였다. 최적 용매 조성을 결정한 후 pH를 3.00~4.75까지 변화시키며 pH 최적화를 하고 온도 25°C~50°C까지 5°C씩 변화시키며 온도 최적화를 수행하였다.

**기울기 용리법에 의한 페놀류의 분리 최적화.** 세 가지 페놀류에 대해 각각 메탄올을 기준으로 초기 용리되는 봉우리를 분리가 최대로 이루어지는 초기 조성을 결정하고 나중 용리되는 봉우리들의 감도를 고려하여 나중 조성을 결정하여, 이를 기준으로 7개의 혼합용매조성을 결정하였다. 메탄올, 아세트니트릴과 테트라히드로퓨란을 용매로 등선택성 다성분 기울기 용리법과 ORM-Prism 방법을 이용하여 기울기 용리에 대한 페놀류의 최적 용매조성을 결정하였다.

**페놀류의 농축.** 정제 건조된 XAD-2와 Dowex 1-

X8을 각각 1.0 g, 0.12 g을 정확히 평량하여 XAD-2는 40% 메탄올로, Dowex 1-X8은 물로 팽윤시킨 후 컬럼에 충전하였다. 두 컬럼을 물로 세척하고 Dowex 1-X8 컬럼은 상대이온을  $\text{Cl}^-$ 에서  $\text{OH}^-$ 로 바꾸어주기 위해 7 ml의 2M NaOH를 흘려주고 25 ml의 물로 세척한 후 메탄올 2 ml를 흘려주었다. pH 3.0으로 조절된 물에 일정한 농도가 되도록 working solution을 가해 시료 용액을 조제한 다음 시료 용액을 두 컬럼을 이용하여 농축 및 회수하였다(Fig. 1). 즉, 농축 및 회수 과정은 (1) XAD-2에 흡착, (2) XAD-2로부터 탈착과 Dowex 1-X8에 재흡착, (3) Dowex 1-X8로부터 탈착의 세 단계로 구분된다. 시료 용기를 용리 펌프에 연결하여 시료 용액을 유속 10 ml/min으로 XAD-2 컬럼에 용리시킨 후(1), XAD-2 수지에 남아 있는 물을 제거하기 위해 NaOH에 의해 pH 12.5로 조절된 메탄올 1.5 ml를 흘려준 다음(2-a), Dowex 1-X8에 재흡착시킨다(2-b). 두 컬럼을 분리하고 방해물질을 제거하기 위해 2 ml의 메탄올을 Dowex 1-X8 컬럼에 흘려주고, 건조한 후 5 ml의 물을 흘려주어 Dowex 1-X8 컬럼에 남아 있는 메탄올을 제거하고 건조시킨 다음 0.35 M  $\text{NaNO}_3$ /물 0.2 ml를 채워주었다(3-a). Dowex 1-X8 컬럼으로부터 페놀류를 탈착시키기 위해 0.53% 인산과 0.35 M  $\text{NaNO}_3$ 를 포함하여 90% 메탄올-물로 용리시키면서 5 ml를 받았다. 회수액 5 ml를 검정법을 이용하여 HPLC 정량하였다.

### 결과 및 고찰

**동용매 용리법에서 페놀류의 분리 최적화.** 페놀류의 분리 최적화를 위해 Berridge<sup>1</sup>가 소개한 케모메트릭(chemometrics) 방법을 이용하였는데, 이 방법은 세 단계의 과정으로 나뉜다. 먼저 최적화 기준(optimization criterion)을 결정한다. 즉, 무엇을 최적화할 것인가를 정하는 단계로서 기준은 선택변수( $\alpha$ ), 분리도( $R_s$ ), 봉우리인자( $P$ ), chromatographic response function(CRF), COF, 상대분리곱 인자( $r$ ) 등을 결정한다. 제 2, 3단계로 실험 디자인의 선택과 평가방법을 결정한다. 실험 디자인은 연속적과 동시적 디자인이 있는데 최근에는 연속적 디자인의 일종인 심플렉스 격자형 디자인(simplex lattice de-

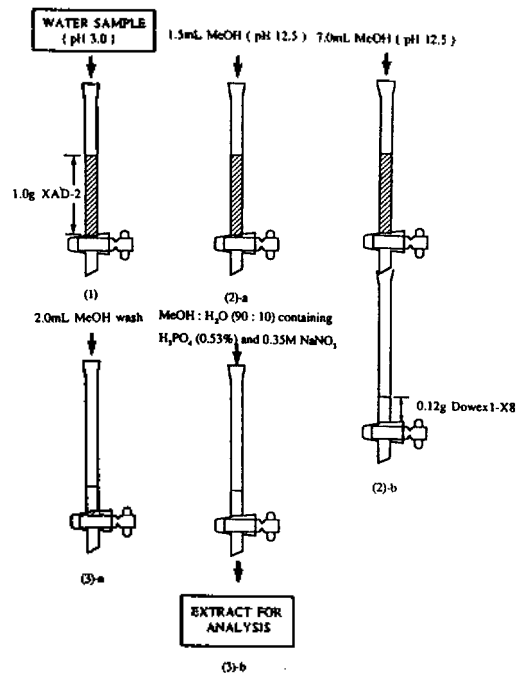


Fig. 1. Analytical scheme. (1) Adsorption to XAD-2; (2)-a, Washing of XAD-2; (2)-b, Desorption from XAD-2 and Readsorption to Dowex 1-X8; (3)-a, Washing of Dowex 1-X8; (3)-b, Desorption from Dowex 1-X8.

sign)을 많이 사용한다. 본 실험에서 사용한 COF 값은 시료의 머무름의 순서가 변할 경우 이를 반영하지 못하므로 정확한 분리 조건을 결정할 수 없었다. 따라서 이러한 단점을 보완한 ORM 방법을 사용하여 최적의 용매조성을 결정하였다.

ORM 방법에 적용시키기 위해 우선 10가지 클로로페놀류의 시료 중 가능한 봉우리 쌍을 계산하면,  ${}_{10}C_2 = 45$ 가지의 봉우리 쌍이 존재한다. 이 봉우리 쌍들 중에서 각 혼합 용매에 대해 용리순서가 변하지 않거나 분리도가 좋은( $R_s \geq 1.5$ ) 봉우리 쌍을 제외하고 남은 2개의 봉우리 쌍으로 ORM 등고곡선을 작성하였다(Fig. 2). 이때 원하는  $R_s$  값을 1.0~1.7까지 변화시켜 보았고, 최적의  $R_s$  값을 보이는 영역은  $\text{MeOH} : \text{ACN} : \text{THF} = 63 : 3 : 34$ 인 조성임을 알 수 있었다. 이 조건에서 Fig. 3의 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 결과적으로 *p*-chlorophenol과 *m*-chlorophenol의 봉우리 쌍을 제외하고는 모두 바탕선 분리가 되는 결과를 얻었다.

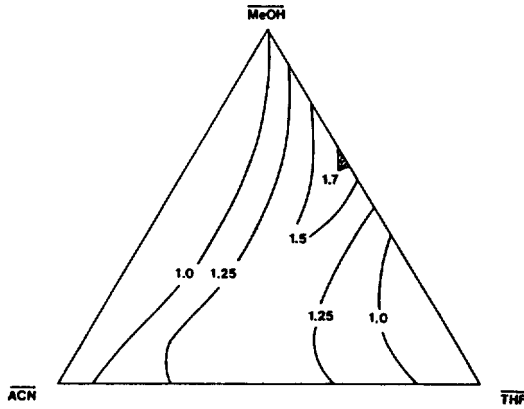


Fig. 2. Overlapping resolution map for chlorophenols. Optimum mobile phase is indicated in dotted region. Numbers:  $R_{sd}$  values.

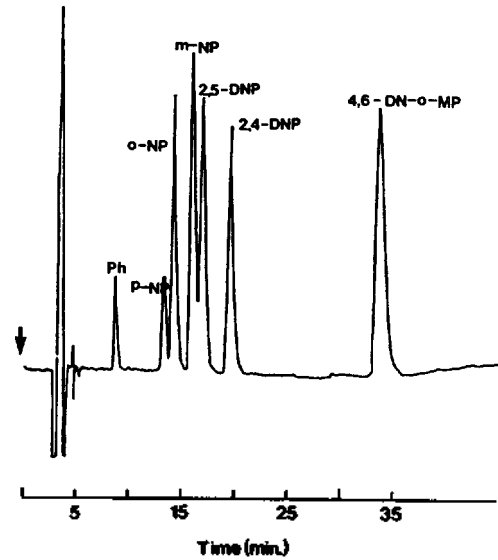


Fig. 4. Chromatogram of nitrophenols using a mobile phase with optimum selectivity.

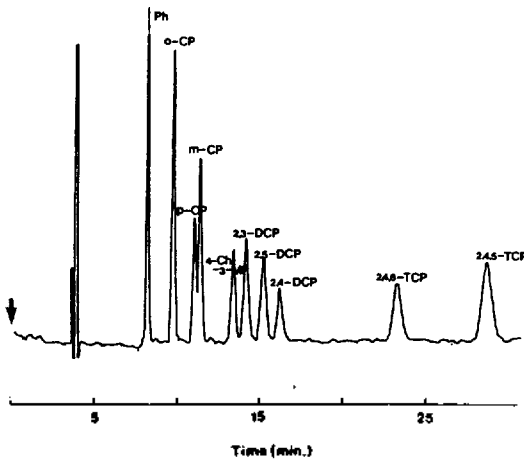


Fig. 3. Chromatogram of chlorophenols using a mobile phase with optimum selectivity.

클로로페놀류와 마찬가지로 7가지 니트로페놀류의 분리를 위한 최적의 용매조성을 결정하였다. 분리도가 가장 좋은 용매조성은  $\overline{\text{MeOH}} : \overline{\text{ACN}} : \overline{\text{THF}} = 14 : 80 : 6$ 으로 결정되었고, 이 조건에서 크로마토그램을 얻은 결과, 약 35분 이내에 *m*-nitrophenol과 2,5-dinitrophenol을 제외하고 모두 바탕선 분리가 가능하였다(Fig. 4). 메칠페놀류에서는 ORM 등고곡선에서 원하는  $R_s$ 값을 0.3 이하로 하였을 때 비로서 영역을 나타내었고, 이 영역에서  $\overline{\text{MeOH}} : \overline{\text{ACN}} : \overline{\text{THF}} = 11 : 12 : 77$ 을 최적 용매조성으로 결정하여 크로마토그램을 얻었으나, 예상한 바와 같이 phe-

놀과 *p*-methylphenol을 제외하고는 거의 분리가 되지 않았다.

**pH 최적화.** 본 연구에서 시료로 사용한 25가지 페놀류들의  $pK_a$ 값은 4.02~10.88의 매우 다양한 값을 갖는다. 그러나 RPLC에서는 정지상의 특성 때문에 pH 2~8.5으로 이동상의 pH가 제한되기 때문에<sup>14</sup>, 실제로 이동상에 대한 pH의 최적화를 할 수 있는 시료는  $pK_a$ 값이 4.09~9.99 정도인 니트로페놀류 뿐이다. 이미 니트로페놀류의 최적 용매조성을 결정했으므로 그 조성에서의 최적 pH만을 결정하는 실험을 수행하였다. 최적화 기준으로는 상대적 분리도 곱(relative resolution product,  $r$ )을 사용하였는데,  $r$ 값은 다음과 같다<sup>7</sup>.

$$r = \frac{\prod_{i=1}^{n-1} R_{s+1,i}}{\left[ \sum_{i=1}^{n-1} R_{s+1,i} / (n-1) \right]^{n-1}} \quad (1)$$

식 (1)을 이용하여 pH를 3.00~4.75로 변화시켰을 때  $r$ 값의 변화를 계산하였다.  $r$ 값이 최대가 되는 pH 4.20을 최적 pH 조건으로 결정하여 이 조건에서 니트로페놀류의 크로마토그램을 얻었다(Fig. 5). pH 조건을 최적화한 결과 모든 시료를 바탕선 분리를 할 수 있었고 분석 시간이 약 40% 이상 단축되었다.

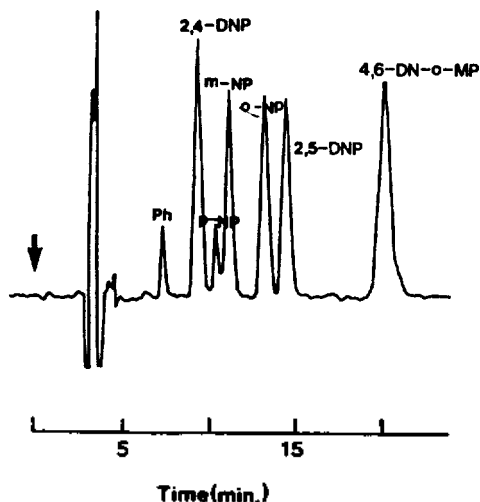


Fig. 5. Chromatogram of nitrophenols using a mobile phase with optimum pH.

**온도 최적화.** 온도 변수의 최적화는 온도가 시료의 머무름의 선택성에 크게 영향을 미치는 경우에만 효과적으로 적용될 수 있기 때문에 크게 제한된 방법이다. 본 연구에서는 25가지 페놀유도체들에 대하여 이미 결정된 최적 용매조성에서 온도를 25°C에서 50°C까지 5°C씩 변화시키면서 온도에 대한 선택성의 영향을 조사하여 보았다. 결과적으로 온도의 변화에 대해 선택성의 변화가 없었으므로 실온(25°C)을 최적 온도 조건으로 택하였다.

**기울기 용리법에 의한 페놀류의 분리 최적화.** 등용매 용리법으로 만족할 만한 분리도를 얻지 못하였기 때문에 기울기 용리법을 수행하였다. 등선택성 기울기 용리를 사용하였고, ORM-Prism 방법을 이용하여 페놀류의 기울기 용리에 대한 최적 용매 조성을 결정하였다. 메틸페놀류의 최적 분리 조건은 초기 용리되는 붕우리들의 분리가 최대로 이루어지는 초기 조성을 30%로 결정하였고 나중 용리되는 붕우리들의 감도를 고려하여 나중 조성을 70%로 결정하였다. 기울기 파라미터  $b$ 값<sup>23</sup>을 변화시켜 최적 분리도를 나타내는  $b$ 값을 0.01로 결정하였고, 이 조건에서 크로마토그램을 얻었다. 등용매 용리법보다 분리능은 향상되었지만 *m*-methylphenol, *o*-methylphenol의 붕우리 쌍과 2,4-dimethylphenol, 2,5-dimethylphenol의 붕우리 쌍은 이 조건에서도 분리할 수 없었다. 클로로페놀류에 대해서, 기울기 용

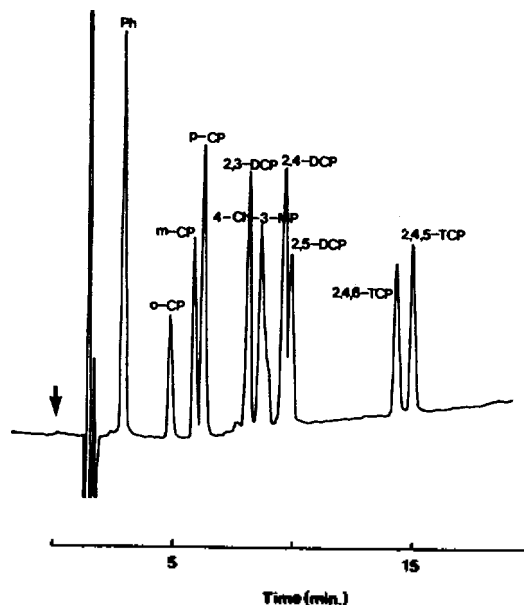


Fig. 6. Chromatogram of chlorophenols with optimum selectivity in gradient elution (Optimum  $b=0.05$ ).

리법을 사용하여 최적화된 결과 분리능은 향상되었고 분석시간을 50% 이상 단축시킬 수 있었다. 따라서 클로로페놀류의 경우 기울기 용리법을 수행하여 분리-분석하는 것이 더 효과적인 방법임을 알 수 있었다(Fig. 6). 니트로페놀류는 약 17분 이내에 모두 분리할 수 있었지만, 등용매 용리법의 분리 결과와 유사하였고, 오히려 바탕선이 불안정하다는 단점이 있었다. 이는 기울기 용리시 용매로 사용되는 테트라히드로퓨란의 양이 증가함에 따라 두드러지게 나타나는데, 용매 자체가 약간의 흡광도를 나타내기 때문이라고 추측된다. 따라서 니트로페놀류의 분리는 등용매 용리법을 사용하는 것이 더 적합하였다.

**페놀류의 농축.** 본 연구에서는 여러가지 페놀유도체 중에서 환경오염수 중 존재 가능성이 크고 독성이 커서 미국 환경보존협회가 주요 환경오염 물질로 정한 11가지 페놀류를 대상 물질로 하였다. 11가지 페놀류를 농축 및 회수한 후 HPLC로 정확히 정량하기 위해 최적 분리조건을 결정하였다. 재현성과 정확한 정량을 고려하여 등용매 용리법을 선택하여 COF 방법을 이용하여 결정한 최적용매 조성은 MeOH : ACN : H<sub>2</sub>O = 27.5 : 26.5 : 46.0 (pH 3.5)이다. 이 조건에서 얻은 11가지 페놀 치환체의 크

로마토그램에서 가장 늦게 용리되는 pentachlorophenol과 바탕선 분리가 되지 않는 *o*-chlorophenol, 2,4-dinitrophenol을 제외한 phenol, *p*-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, *o*-nitrophenol, 2,4-dimethylphenol, 4-chloro-*m*-cresol, 4,6-dinitro-*o*-cresol, 2,4,6-trichloro-phenol을 대상시료로 선택하여 실험 조건을 결정하였다. 한편 흡착제인 XAD-2와 Dowex 1-X8에 대한 페놀류의 흡착능은 돌파법(breakthrough method)을 이용하여 결정하였는데, XAD-2와 Dowex 1-X8의 양은 각각 1.0 g과 0.12 g이면 충분한 것으로 관찰되었다. 이때 XAD-2 수지에 대한 페놀류의 흡착은 주로 분산작용력에 의한 물리적 흡착이므로 페놀류의 해리를 억제하기 위해 시료용액의 pH를 3.0으로 조절하였다.

**탈착 용매의 최적화.** XAD-2 컬럼에서의 탈착 용매는 XAD-2로부터 페놀류를 탈착시키고 Dowex 1-X8 컬럼에 다시 흡착시킬 때 영향을 끼치지 않아야 한다. Dowex 1-X8에 대한 페놀류의 흡착은 pH의 함수이므로 시료 수용액의 pH가 페놀류의  $pK_a$ 보다 최소한 2 정도 클 때 페놀류는 완전히 흡착된다<sup>23</sup>. 따라서 XAD-2 컬럼에서의 탈착 용매를 염기성화하기 위해서 NaOH를 사용하였는데, 유기 용매는 NaOH의 용해성을 고려하여 메탄올, 아세트 니트릴 및 테트라히드로퓨란 중에서 메탄올을 선택하였다. 이때 매질이 수용액이 아니므로 페놀류가 이온화되도록 하기 위해 용액의 pH를 12.5로 조절하였다. 시료 용액을 용리시킨 후 XAD-2 수지에 남아 있는 물은 탈착 효율을 감소시키므로 수지에 남아 있는 물을 제거하기 위해 XAD-2 컬럼의 틈새 부피에 해당하는 메탄올(pH 12.5) 1.5 ml는 버린 다음 Dowex 1-X8 컬럼을 연결하여 7 ml의 메탄올(pH 12.5)을 용리시켰다.

Dowex 1-X8 컬럼에서의 탈착 용매는 HPLC의 이동상과 비슷하고 그 부피가 소량이어야 하는데, 이는 용매 증발 단계를 거치지 않고 시료를 직접 HPLC에 주입할 수 있기 때문이다. 본 실험에서는 우선 탈착 용매로 메탄올/물을 선택하였다. 이는 페놀류와 이온 교환될 상대 이온이 녹아야 하고 또한 완전히 해리되지 않은 페놀류가 Dowex 1-X8에 분자 흡착되는데 이를 탈착시키려면 유기용매를 사용해야 하기 때문이다. 탈착용매의 부피를 소량화하기 위

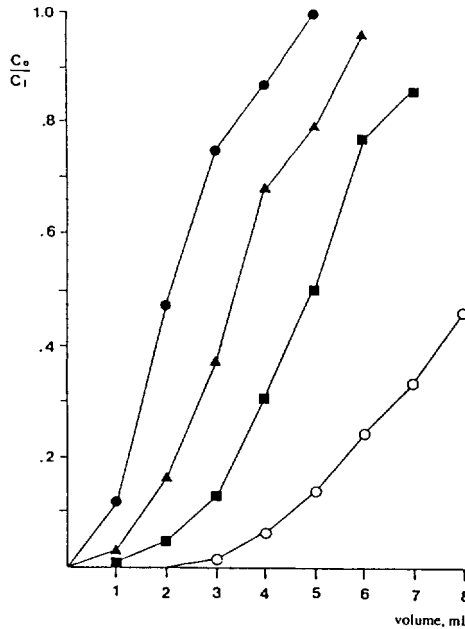


Fig. 7. Elution curves by frontal chromatography on the Dowex 1-X8 column of 2,4-dinitrophenol various methanol/water mixtures. (●), MeOH/H<sub>2</sub>O (90 : 10) + 0.35 mole/l NaNO<sub>3</sub>; (▲), MeOH/H<sub>2</sub>O (80 : 20) + 0.35 mole/l NaNO<sub>3</sub>; (■), MeOH/H<sub>2</sub>O (70 : 30) + 0.35 mole/l NaNO<sub>3</sub>; (○), MeOH/H<sub>2</sub>O (60 : 40) + 0.35 mole/l NaNO<sub>3</sub>.

해서 용매 강도를 크게 해야 한다. 일반적으로 이온교환 크로마토그래피에서 용매 강도는 이동상의 상대 이온의 함수이다. 용매 강도가 큰 상대이온 중<sup>25</sup>에서 citrate, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, oxalate는 메탄올에 녹지 않고 I<sup>-</sup>의 수용액은 쉽게 산화되어 탈착 효율이 떨어지므로 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>를 선택하였다. 메탄올/물의 부피비와 NaNO<sub>3</sub>의 농도를 결정하기 위해서 Dowex 1-X8 컬럼에서 머무름이 클 것으로 예상되는 2,4-dinitrophenol( $pK_a$ , 4.09)의 전단 크로마토그래피 실험을 수행한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에서 알 수 있듯이 가장 효과적인 탈착 용매는 0.35 M NaNO<sub>3</sub> 메탄올/물(90 : 10)이었으며, 이 용매 5 ml로 정량적인 탈착이 가능하므로 탈착용매의 부피는 5 ml로 결정하였다.

**농축 효율과 검출 한계.** 시료 용액의 부피 변화에 따른 XAD-2/Dowex 1-X8 직렬 컬럼에 대한 페놀류의 농축 효율을 Table 1에 나타내었다. 시료의 부피를 0.25 l, 0.50 l 및 1.0 l로 증가시켰을 때 break-

Table 1. Effect of sample<sup>a</sup> volume on the recovery of phenols

Compound	% Recovery <sup>b</sup>		
	250 ml	500 ml	1000 ml
phenol	81.9	55.5	51.0
<i>p</i> -nitrophenol	95.2	95.0	91.6
2,4-dinitrophenol	94.5	94.9	95.3
<i>o</i> -nitrophenol	96.2	95.7	95.9
2,4-dimethylphenol	94.3	96.2	96.7
4-chloro- <i>m</i> -cresol	97.5	99.5	97.1
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	92.5	95.7	94.7
2,4,6-trichlorophenol	94.8	96.9	95.1

<sup>a</sup>Concentration of compound spiked: 25 µg/l. <sup>b</sup>Each data was the average of six measurements.

through volume이 작은 phenol을 제외한 나머지 페놀류는 90% 이상의 회수율을 나타내었다. 시료 중에서 phenol은 극성이 가장 크고, 물에 대한 용해도가 크므로 XAD-2와 같은 비극성 수지와와의 인력이 약하게 되어 흡착 과정에서 큰 손실이 일어난다. phenol의 손실을 줄이기 위해 용해도를 감소시키는 salting out 시약으로 NaCl을 첨가(5%)하여 흡착을 증가시켜 phenol의 회수율을 10% 증가시킬 수 있었다. 50 ppb와 5 ppb의 두 농도에서 XAD-2/Dowex 1-X8법의 정확성을 평가해 본 결과, 시료의 농도와 무관하게 거의 일정한 회수율을 얻었다. 또한 1.0 l의 시료용액을 용리시켰을 때 검출 한계는 약 5 ppb이었다.

**매질 효과.** XAD-2/Dowex 1-X8법을 실제 환경 오염수에 적용하기 위한 기초 실험으로 시료의 매질을 중류수에서 수돗물, 강물 및 바닷물로 바꾸어 실험을 수행한 결과(Table 2) XAD-2/Dowex 1-X8법은 시료의 매질에 의한 영향을 거의 받지 않음을 알 수 있었다. Phenol을 제외한 모든 페놀류의 회수율은 90% 이상이었으며 각 매질에서 phenol의 회수율을 비교해 보면 시료의 매질이 바닷물일 경우에 phenol의 회수율이 10% 이상 증가함을 알 수 있었다. 이것은 바닷물에 포함된 무기 염류에 의해서 phenol이 salting out 효과를 받아 XAD-2 수지로의 흡착이 증가하기 때문이다.

**농축법의 상호 비교.** XAD-2/Dowex 1-X8법의 결과에 비해 C<sub>18</sub> 카트리지로 농축·분리할 경우에

Table 2. Matrix effect on the extraction efficiency of XAD-2/Dowex 1-X8 method with 500 ml water samples<sup>a</sup>

Compound	% Recovery <sup>b</sup>		
	Tap water	River water	Sea water <sup>c</sup>
phenol	40.9	44.0	58.0
<i>p</i> -nitrophenol	91.3	95.2	92.5
2,4-dinitrophenol	92.2	97.2	92.4
<i>o</i> -nitrophenol	98.3	98.9	95.6
2,4-dimethylphenol	96.7	98.0	93.4
4-chloro- <i>m</i> -cresol	97.8	98.4	97.6
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	93.2	98.5	92.7
2,4,6-trichlorophenol	97.9	95.4	97.7

<sup>a</sup>Water was spiked with 25 µg/l of each compound.

<sup>b</sup>Mean values were calculated from seven determinations. <sup>c</sup>The XAD-2 column was washed by 10 ml distilled water before desorption with MeOH (pH 12.5).

Table 3. Comparison of the efficiency of concentration methods<sup>a</sup>

Compound	% Recovery <sup>b</sup>	
	C <sub>18</sub> cartridge	This method
phenol	9.6	91.6
<i>p</i> -nitrophenol	13.9	96.9
2,4-dinitrophenol	40.2	94.9
<i>o</i> -nitrophenol	32.9	94.1
2,4-dimethylphenol	70.4	95.1
4-chloro- <i>m</i> -cresol	85.4	93.1
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	88.2	95.7
2,4,6-trichlorophenol	87.6	93.3

<sup>a</sup>Concentration of compound spiked: 100 µg/l; Sample volume: 100 ml. <sup>b</sup>Each data was the average of four measurements.

phenol, *p*-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, *o*-nitrophenol의 회수율이 좋지 않았다. 즉, C<sub>18</sub> 카트리지는 소수성 화합물일 경우에는 회수율이 좋으나, 페놀류와 같은 극성 유기 화합물의 경우에 breakthrough volume이 작아 손실이 많았으므로 회수율이 좋지 않았다.

**XAD-2/Dowex 1-X8법의 선택성.** 시판되는 1 g C<sub>18</sub> 카트리지와 XAD-2/Dowex 1-X8 직렬 컬럼간의 농축 효율과 선택성을 비교하였다. 먼저 C<sub>18</sub> 카트리지를 메탄올과 물로 활성화시킨 후 페놀류를 흡



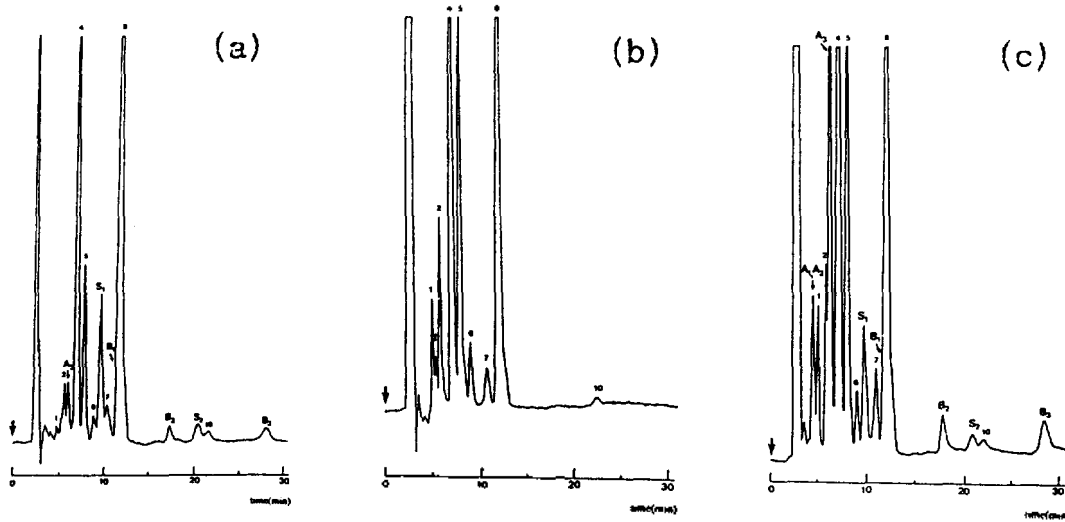


Fig. 8. Chromatograms (a) the standard sample, (b) the sample by XAD-2/Dowex 1-X8 method, and (c) the sample by C<sub>18</sub> cartridge method. The sample contains eight phenols (125 µg/l), three benzenes (250 µg/l), three anilines (125 µg/l) and two benzene sulfonic acids (25 mg/l). Peak ID, 1-10; phenols; B<sub>1</sub>: benzene; B<sub>2</sub>: chlorobenzene; B<sub>3</sub>: 1,3-dimethylbenzene; A<sub>1</sub>: aniline; A<sub>2</sub>: chloroaniline; A<sub>3</sub>: phenylenediamine; S<sub>1</sub>: benzene sulfonic acid; S<sub>2</sub>: toluene sulfonic acid; I: impurity.

착시키고 공기 건조 후 5 ml 메탄올로 탈착시켜 HPLC로 정량하였다(Table 3). XAD-2/Dowex 1-X8 직렬 컬럼은 약산 유기 화합물만을 선택적으로 농축·분리하기 위해서 고안한 것이다. 이를 평가하기 위해서 가상적인 방해 물질을 공존시켜 페놀류의 선택적 농축·분리를 시도하였다. 선택한 방해 물질은 환경 오염수에 존재할 수 있는 공해성 유기 화합물로서 중성 화합물로는 벤젠, 클로로벤젠 및 디메틸벤젠을, 염기성 화합물로는 아닐린, 클로로아닐린 및 페닐렌디아민을, 산성 화합물로는 벤젠술폰산과 톨루엔술폰산을 선택하였다. 100 ml 물(pH 3.0)에 페놀류와 함께 방해 화합물을 일정 농도로 첨가하여 가상 환경 오염수를 조제하였다. 이를 농축 과정을 거치지 않고 직접 HPLC에 주입한 것, XAD-2/Dowex 1-X8 직렬 컬럼으로 농축과정을 거친 것과 C<sub>18</sub> 카트리지 농축과정을 거친 것의 크로마토그램을 각각 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8에서 알 수 있듯이 XAD-2/Dowex 1-X8에 의한 농축 과정에 의해 방해 물질이 모두 제거되고 페놀류가 정량 농축되었으나 C<sub>18</sub> 카트리지에 의한 농축과정에서 아닐린, 클로로아닐린이 제거되었을 뿐, 그외의 방해 물질은 페놀류와 함께 흡착 및 탈착되었다.

### 결론

25종의 페놀유도체를 치환기에 따라 methylphenols, chlorophenols, nitrophenols의 세 그룹으로 나누고 통계적인 심플렉스 방법을 사용하여 최적 분리조건을 결정하였다. 등용매 용리법을 사용하여 최적화하는 경우, 사용한 혼합 용매의 변화에 따라 용리 순서가 변하였기 때문에 COF 방법보다 ORM 방법을 사용하는 것이 적합하였다. ORM 방법을 사용하여 최적용매 조건을 선택하여 분리한 결과 클로로페놀과 메틸페놀은 거의 바탕선 분리가 가능하였다. 그러나 pK<sub>a</sub>값이 다양한 니트로페놀류는 용매 변화만으로는 거의 분리가 되지 않았으며, 이동상의 pH 조건을 최적화함으로써 그 분리를 향상시킬 수 있었다. 상대적 분리도 곱의 최적화 기준을 사용하여 pH 4.2의 최적 조건을 결정하였고, 그 결과 분리능이 향상되었으며 분석시간을 40% 이상 단축시킬 수 있었다. 온도에 대한 최적화를 시도한 결과, 각 페놀류들은 온도의 변화에 대한 분리도의 선택성의 변화가 없었다. 기울기 용리법은 등선택성 다성분 기울기 용리를 사용하였고, ORM-Prism 방법을 통하여 최적 기울기 용매조성을 결정하였다.

기울기 용리법에서, 메틸페놀류의 분리능은 향상되었지만 모든 시료를 분리할 수 없었기 때문에 다른 방법의 적용이 필요함을 입증할 수 있었다. 그러나 클로로페놀류는 분리능이 향상되고 분석시간이 50% 이상 단축되는 효과를 얻었다. Amberlite XAD-2와 Dowex 1-X8의 직렬 컬럼으로 수용액 속에 미량 존재하는 페놀류를 선택적으로 농축·분리한 후 HPLC 분리·분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 1g의 비극성 흡착제인 Amberlite XAD-2 컬럼을 농축 컬럼, 0.12 g의 강음이온교환 수지인 Dowex 1-X8 컬럼을 분리 컬럼으로 하는 직렬 컬럼을 사용하여 90% 이상의 좋은 회수율을 얻었다. XAD-2 컬럼에서 탈착 용매는 7 ml의 메탄올(pH 12.5)이다. Dowex 1-X8 컬럼에서는 머무름이 큰 2,4-dinitrophenol의 전단 크로마토그래피 실험을 수행하여 탈착 용매를 0.35 M NaNO<sub>3</sub>와 인산(0.53%)을 포함하는 메탄올/물(90 : 10) 5 ml로 결정하였다. 시료용액의 부피를 0.25 l, 0.5 l 및 1 l로 증가시켰을 때 phenol을 제외하고는 모든 페놀류에 대해 90% 이상의 회수율을 나타내었고 검출 한계는 1 l의 시료용액을 용리시켰을 때 약 5 ppb이었다. XAD-2/Dowex 1-X8 법을 실제 시료에 적용하기 위해서 매질을 500 ml의 수돗물, 강물 및 바닷물로 한 결과 시료의 매질에 관계없이 90% 이상의 회수율을 얻었다. XAD-2/Dowex 1-X8법의 농축 효율과 선택성을 C<sub>18</sub> 카트리지와 비교한 결과 XAD-2/Dowex 1-X8법은 극성 페놀류의 농축·분리에 적합한 방법이었으며 벤젠류, 아닐린류 및 벤젠술폰산류를 페놀류와 함께 첨가하여 조제한 가상 환경 오염수로부터 페놀류를 선택적으로 농축·회수할 수 있었다.

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

#### 인 용 문 헌

- J. C. Berridge, "Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations", John Wiley & Sons, New York, 1985.
- J. L. Glajch, J. J. Kirkland, and K. M. Squire, *J. Chromatogr.*, **199**, 57 (1980).
- A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet, and L. De Galan, *J. Chromatogr.*, **352**, 127 (1986).
- P. J. Schhoenmakers, A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet, and L. De Galan, *Chromatographia*, **15**, 688 (1982).
- P. M. J. Coenegracht, A. K. Smilde, and A. Knevelman, *J. Liq. Chromatogr.*, **12**, 77 (1989).
- S. N. Deming and M. L. H. Turoff, *Anal. Chem.*, **50**, 546 (1978).
- P. R. Haddad, A. C. J. H. Drouen, H. A. H. Billiet, and L. De Galan, *J. Chromatogr.*, **282**, 71 (1983).
- G. A. Taylor, *J. Chromatogr.*, **395**, 375 (1987).
- C. M. Noyes, *J. Chromatogr.*, **266**, 451 (1983).
- J. C. Berridge, *J. Chromatogr.*, **244**, 1 (1982).
- J. P. Bounine, G. Guiochon, and H. Colin, *J. Chromatogr.*, **298**, 1 (1984).
- L. R. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", Wiley Interscience, New York, 1979.
- H. K. Lee, S. F. Y. Li, and Y. H. Tay, *J. Chromatogr.*, **438**, 429 (1988).
- C. P. Ong, H. K. Lee, and S. F. Y. Li, *J. Chromatogr.*, **464**, 405 (1989).
- J. Namiesnik, T. Gorecki, and M. Biziuk, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 1 (1990).
- R. G. Melcher and P. L. Morabito, *Anal. Chim. Acta*, **62**, 2183 (1990).
- A. Lagana, G. Goretti, B. M. Petronio, and M. Rotatori, *J. Chromatogr.*, **219**, 263 (1981).
- D. J. Pietrzyk and C. H. Chu, *Anal. Chem.*, **49**, 757 (1977).
- L. C. Hansen, *J. Chromatogr.*, **99**, 123 (1974).
- L. Renberg, *J. Chromatogr.*, **214**, 327 (1981).
- M. Battista, A. D. Corcia, and M. Marchetti, *Anal. Chem.*, **61**, 935 (1989).
- A. D. Corcia, M. Marchetti, and R. Samperi, *Anal. Chem.*, **61**, 1363 (1989).
- C. D. Chriswell, R. C. Chang, and J. S. Fritz, *Anal. Chem.*, **47**, 1325 (1975).
- K. A. Cohen, J. W. Dolan, and S. A. Grillo, *J. Chromatogr.*, **316**, 359 (1984).
- L. R. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", John Wiley and Sons, New York, 1973.