

환경 오염물질의 정량법 개발과 거동에 관한 연구(Ⅲ): 미량 페놀류의 HPLC 정량을 위한 온 라인 농축

李大云[†] · 金珍英 · 朴英薰 · 文明熙*

연세대학교 이과대학 화학과

*강릉대학교 화학과

(1993. 12. 27. 접수)

A Study on the Development of Analytical Methods and Behaviors of Environmental Pollutants(Ⅲ) : On-Line System for Preconcentration and Separation of Trace Phenols by HPLC

Dai Woon Lee[†], Jin Young Kim, Young Hun Park, Myeong Hee Moon*

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

*Department of Chemistry, Kangreung University, Kangreung 210-702, Korea

(Received Dec. 27, 1993)

요약 : 환경오염수에 미량 존재하는 페놀류를 정량하기 위한 분석법의 개발을 위하여 8가지 페놀류를 대상 시료로, 고체상 추출법을 이용한 전처리 방법을 연구하였다. XAD-4와 Dowex 1×8 수지를 연결하여 HPLC로 분석하는 온 라인 시스템을 만들어 농축과 분리의 선택성을 높이며 자동화에 중점을 두었다. 시료를 XAD-4 컬럼에 용리시켜 페놀류를 분자흡착으로 농축시킨 후 염기성 아세토나트릴을 용리시켜 탈착시키고 계속해서 Dowex 1×8 컬럼에 음이온교환으로 페놀류만을 선택적으로 재흡착시킨다. Dowex 1×8 컬럼에 재흡착된 페놀류를 물로 세척한 후 HCl을 포함하는 메탄올 용액으로 재탈착시킨다. 전처리 단계는 switching 밸브에 의해 온 라인으로 연결하였고 탈착된 페놀류를 HPLC에 직접 주입하여 신속하고 신뢰성 있는 정량이 가능하였다. 각 페놀류는 90% 이상의 회수율을 나타내었다. 본 분석법의 활용성을 평가하기 위해 환경오염수에서 페놀류와 공존 가능한 유기 화합물들을 첨가시켜 조제한 실험실적 오염수를 만들어 방해 효과를 조사한 결과, 페놀류만을 선택적으로 농축·분석할 수 있었다.

Abstract : The purpose on this study was to develop a new improved chromatographic method for determination of trace phenols from environmental waste water. The research was carried out with selected 8 phenols, and solid-phase extraction was employed as sample pretreatment method. The coupling of XAD-4 and Dowex 1×8 resin as preconcentration column increased the selectivities toward interferences coexisted in matrix. Automation was accomplished with on-line process of pretreatment and HPLC system. After elution of sample through XAD-4 column, phenols were adsorbed by dispersion force, then displaced from it by ACN basified, simultaneously and selectively readsorbed via anion exchange on Dowex 1×8. Dowex 1×8 column was washed by water. Phenols readsorbed were removed from Dowex 1×8 column by a minimum volume of methanol containing HCl. Each pretreatment step was connected by switching valves and the eluate was directly on-line injected to ob-

tain fast and reliable results into the HPLC. Recovery of phenols was greater than 90%. To examine utility of this method, analysis of phenols from laboratory waste water sample which was added some organic pollutants to find with phenols on environmental waste water were also accomplished without their interference effects.

Key words : Phenols, HPLC, On-line Concentration

1. 서 론

페놀류와 같은 유기물 분석에는 크로마토그래피 방법이 주로 사용되는데, 환경 시료 속에 존재하는 유기 오염물은 대부분 미량이며, 복잡한 매질 때문에 크로마토그래피 시스템에 적용하기 위해서는 농축 등의 전처리가 필요하다.^{1,2} 시료 전처리 기술은 다양하게 연구, 개발되어 왔는데, 이 중 고체상 추출법(SPE)^{3,4}은 최근 많은 연구가 진행되는 분야로 고체 흡착제에 시료를 통과시킨 후 소량의 유기용매로 탈착시켜 용질을 농축, 정제하는 방법이다. 흡착제와 용리액의 선택은 시료의 성질, 흡착제의 성질, 흡착제와 용질의 상호 작용, 매질 효과 등을 고려하여야 한다.¹ 흡착제⁵의 경우는 활성탄, 고분자수지, 이온교환수지 등이 다양하게 사용되는데, 그 종류와 충전되는 양에 따라 용량 인자가 결정되어야 하고 용질의 최대 머무름을 나타내는 돌파부피(breakthrough)를 결정해야 한다.⁶ 특히 이온교환 수지는 시료와 탈착용매의 pH, 극성 및 이온강도의 조절로 단계별 분리가 용이하며 이온교환, 수소결합 및 분자흡착 등의 여러 메카니즘을 보이므로 비극성 흡착제와 함께 보완적으로 사용되어 시료 전처리의 효과를 높일 수 있다.⁷

이러한 특성으로 인해서 SPE는 다양한 시료에 응용되는데, Frei⁸들은 C₁₈, PRP-1 및 이온교환수지로 충전된 컬럼들을 직렬로 연결하여 산업 폐수로부터 그들의 극성에 따라 유기화합물을 농축하고 분리·분석하였다. 또 Mill⁹들은 C₁₈과 sulfonate기를 함께 가지는 고분자수지를 이용한 triazine 제초제의 상호작용 메카니즘을 연구하였는데, 소수성 매트릭스로부터의 탈착과 이온교환 작용기에 재흡착이 공간적으로 효과적이라 때문에 극성을 띠는 유기화합물에 대해 좋은 선택성을 갖는다고 보고하였다.

선택적 흡착제의 사용과 더불어 시료 전처리에서 보이는 또 하나의 경향은 자동화이다. 자동화된 방법들

은 분석 시간과 비용을 줄이며 시료의 조작과 이에 따른 오차가 작기 때문에 실험의 안정성을 증가시킬 수 있다. 특히 SPE는 자동화가 용이하고 기존의 크로마토그래피 분석기들과 쉽게 연결될 수 있다. Mayer¹⁰은 자동화된 SPE로 triazine 제초제를 농축·분석했는데, 수동으로 한 경우와 비교할 때 시료 처리량을 200%, 정밀도를 5% 증가시킬 수 있었다. 또 밸브를 이용한 switching 방법¹¹은 두 가지 이상의 다른 분리 방법을 연결하거나 동시에 수행하도록 하는데, 크로마토그래피 시스템의 분석컬럼에 온 라인으로 주입할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 최근 연구 동향에 비추어, SPE를 통해 환경오염수로부터 8가지 페놀류를 분석하기 위한 농축 및 분리의 방법을 개발하고, 각 농축 컬럼에서의 전처리 단계를 switching 밸브를 이용하여 HPLC 시스템에 시료를 직접 주입하는 온 라인 시스템을 구성하였다. 이러한 연구 결과가 복잡한 매질을 갖는 환경 시료에 존재하는 미량 유기물에 대한 회수 및 분석에 대한 정보를 제공함으로써 분석기술 향상을 위한 기초 자료로 활용되는 것을 그 목적으로 하였다.

2. 실 험

측정 기기 및 기구: 사용한 기기는 Waters Associates 제품의 Liquid Chromatograph로써 펌프는 M-45 Solvent Delivery System, 검출기는 M-440 Absorbance Detector를 사용하였다. 기록기는 Shimadzu사 Chromatopac CR-6A 적분기를 사용하였다. 시료 검출 파장은 280nm, 감도는 0.05 AUFS, 이동상의 유속은 1.0mL/min으로 고정하였고, 용리에 사용된 펌프는 Serva Elution Pump이다.

시료 : 시료는 Phenol, p-Nitrophenol, o-Nitrophenol, 2, 4-Dimethylphenol, 4-Chloro-m-cresol, 4, 6-Dinitro-o-cresol, 2, 4-Dichlorophenol 2, 4, 6-Tric-

chlorophenol, Aniline, Phenylenediamine, Benzoic acid, Nitrobenzene, Benzenesulfonic acid, Chlorobenzene, Toluene, Naphthalene으로서, 이들은 모두 1급 또는 특급 시약으로 정제 없이 사용하였다.

수지 : Rome & Haas 제품인 Amberlite XAD-2(40-100 mesh), XAD-4(40-100 mesh)를 내경 3.0mm, 길이 50mm 컬럼에 충진하여 사용하였고, 음이온교환수지는 Dow Chemical사 제품인 Dowex 1×8(100-175 mesh)을 내경 3.0mm, 길이 20mm인 컬럼에 충진하여 사용하였다. 이 때 수지는 두 개의 컬럼에 따로 충진한 후 switching 밸브를 이용하여 연결하였다.

이동상 및 정지상 : 이동상으로는 HPLC용 메탄올(J.T. Baker), 아세토니트릴(J.T. Baker)과 Milli-Q 초순수 제조 장치로 정수한 물은 적당한 부피비로 혼합하여 사용하였다. 이동상은 인산을 사용하여 pH 3으로 만든 후, 고형 미립자를 제거하고 초음파 진동기로 이동상 속에 녹아 있는 기체를 제거한 후 사용하였다. 정지상으로는 μ -Bondapak C₁₈(3.9×300mm, 10 μ m) 컬럼을 사용하였으며, 온도는 30°C로 고정시켰다.

고체상 추출법과 역상 HPLC의 온라인 연결 : 페놀류가 2.5mL/min의 유속으로 XAD-4 수지를 통과

하여 농축된 후, XAD-4로부터 탈착되어 Dowex 1×8 수지에 재흡착되고 Dowex 1×8로부터 재탈착되어 HPLC에 주입되는 4단계로 구성되며, 농축장치의 상세도를 Fig. 1에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

XAD-4 수지에 대한 페놀류의 흡착과 탈착 : 8가지 페놀류에 대해 XAD-2와 XAD-4에 대한 농축 효과를 알아보고 XAD-2와 XAD-4를 1:1로 혼합한 경우와 비교하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 XAD-4가 좋은 회수율을 보였기 때문에 실험에서는 XAD-4를 흡착재로 선택하였다. XAD-4에서 시료들의 머무름은 pH에 따라 크게 변하는데 시료가 중성형일 때 흡착이 커지므로 모든 실험의 시료 용액은 pH를 3으로 조절하였다. XAD-4는 XAD-2보다 유효 면적이 크기 때문에 페놀에 대해서 높은 회수율을 보였고 혼합수지는 표면적이 균일하지 않기 때문에 XAD-2나 XAD-4보다 페놀을 제외하고는 전체적으로 회수율이 감소했다. 이 결과는 Dressler¹²의 보고와도 일치한다.

본 실험에서 XAD-4로부터 페놀류를 탈착시키는 용

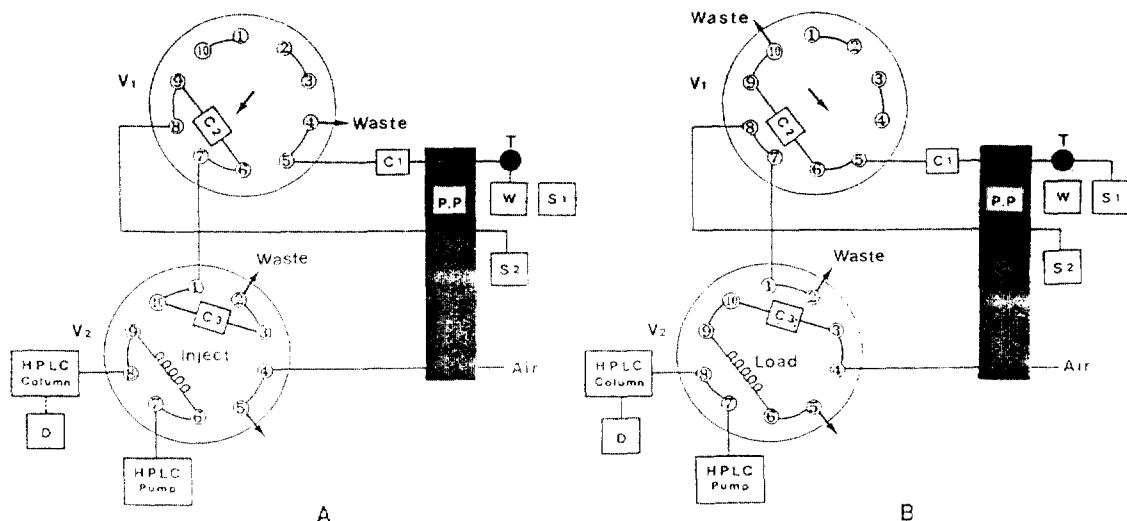


Fig. 1. The schematic diagram of an on-line pretreatment system.

A : loading of water sample on C1 and desorption of phenols from C1 : B : readsorption of phenols on C2 and put eluate in loop

C1 : concentration column : C2 : isolation column : C3 : empty column : P.P. : peristaltic pump : W : water sample : S₁ : desorption solvent (from C1) : S₂ : desorption solvent (from C2) : D : detector : V₁, V₂ : switching valve : T : "T" three way valve.

Table 1. Recoveries of Phenols^a by Using Different XAD Resine

Compound	% Recovery \pm SD ^b		
	XAD-2	XAD-4	XAD-2+XAD-4(1:1)
Phenol	68.4(\pm 0.6)	92.4(\pm 1.0)	92.1(\pm 0.6)
p-nitrophenol	92.8(\pm 3.5)	94.5(\pm 1.7)	91.4(\pm 0.8)
o-nitrophenol	101.2(\pm 3.2)	96.8(\pm 1.1)	90.6(\pm 1.8)
2, 4-dimethylphenol	92.4(\pm 1.2)	95.3(\pm 1.6)	86.8(\pm 1.3)
4-chloro-m-phenol	90.9(\pm 0.6)	97.1(\pm 1.5)	89.1(\pm 0.9)
4, 6-dinitro-o-cresol	100.1(\pm 4.5)	98.8(\pm 0.8)	91.8(\pm 1.7)
2, 4-dichlorophenol	99.7(\pm 0.7)	93.2(\pm 0.4)	88.3(\pm 0.2)
2, 4, 6-trichlorophenol	99.8(\pm 0.4)	94.2(\pm 0.2)	86.6(\pm 0.1)

^a Concentration of compound spiked : 0.5 μ g / 25mL^b SD : Standard deviation calculated from five measurements

때는 Dowex 1×8에 다시 흡착시킬 때 영향을 끼치지 않아야 한다. XAD-4 컬럼에서 탈착용매가 폐놀류의 음이온교환수지 컬럼에서의 흡착에 미치는 영향을 알아보기 위해 메탄올(MeOH)과 아세토니트릴(ACN)을 사용했을 때 회수율을 비교해 보았다. MeOH의 경우 ACN보다 회수율이 10~40% 감소되었는데 이는 음이온교환수지가 가지는 작용기와 MeOH와의 수소결합에 의한 인력으로 폐놀음이온들이 이온교환수지에 완전히 흡착되지 못하기 때문이다.

따라서 실험에서는 NaOH로 pH를 조절한 ACN을 탈착용매로 하여 XAD-4로부터 폐놀류를 탈착시켰으며, 이때 탈착용매의 부피는 5mL이고 NaOH의 용해도를 고려하여 90% ACN으로 결정하였다.

Dowex 1×8에 대한 폐놀류의 흡착과 탈착: 폐놀류의 이온교환수지에 대한 흡착은 이온교환, 수소결합 및 π 인력 등에 의해 이루어지므로 이온교환수지의 상태 이온과 유기용매의 영향을 받는다. 상대이온이 폐놀음이온보다 수지에 대한 선택성이 큰 경우 Dowex 1×8에 대한 폐놀류의 등온 흡착은 고분자수지를 사용한 경우와 유사하며, 상대이온의 선택성이 작은 경우에는 주로 이온교환에 의해 폐놀류가 흡착된다.

본 실험에서는 폐놀류를 Dowex 1×8에 선택적으로 흡착시키기 위해 상대이온을 OH⁻로 바꾸고 이온교환이 주 메카니즘이 되도록 하였다. 음이온교환수지에 폐놀류의 흡착은 pH의 함수이고 시료의 pH가 폐놀류의 pK_a보다 최소한 2 정도 클 때 해리된 폐놀음이온들

이 완전히 흡착된다. 따라서 XAD-4 컬럼에서의 탈착용매는 pH를 12.5로 조절하였다.

Dowex 1×8 컬럼에서의 탈착용매는 폐놀음이온들과 이온교환될 상태이온을 포함하며 완전히 해리되지 않은 상태의 분자흡착으로 붙어 있는 폐놀류를 탈착시키기 위해 유기용매를 사용해야 한다. 실험에서는 탈착 유기용매로 MeOH를 선택하고 이온교환될 상태이온으로는 폐놀음이온보다 선택성이 큰 Cl⁻을 선택하고자 HC1을 첨가했다. MeOH 용액 내에서 HC1의 농도를 결정하기 위한 실험에서 HC1의 농도가 0.25M에서 0.50M으로 증가했을 때 회수율은 증가했으나 1.0M일 때는

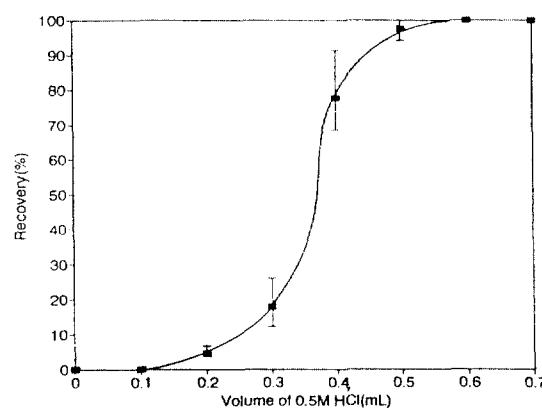


Fig. 2. Elution curve for phenols from Dowex 1×8 column.

Table 2. Effects of Sample^a Volumes on the Recoveries of Phenols^b

Compound	% Recovery ± SD ^b		
	25mL	250mL	500mL
Phenol	92.4(±1.0)	65.5(±0.4)	41.2(±0.3)
p-nitrophenol	94.5(±1.7)	86.8(±2.3)	79.0(±1.1)
o-nitrophenol	96.8(±1.1)	94.8(±2.5)	84.2(±0.9)
2, 4-dimethylphenol	95.3(±1.6)	84.4(±0.9)	80.2(±0.8)
4-chloro-m-phenol	97.1(±1.5)	84.3(±0.1)	82.0(±0.7)
4, 6-dinitro-o-cresol	98.8(±0.8)	88.0(±0.9)	89.7(±1.1)
2, 4-dichlorophenol	93.2(±0.4)	84.8(±0.5)	86.6(±0.3)
2, 4, 6-trichlorophenol	94.2(±0.2)	93.9(±0.3)	88.0(±0.2)
R _{AVE} ^c	95.7(±1.8)	88.1(±4.1)	84.2(±3.7)

^a Amount of compound spiked : 0.5μg^b SD : Standard deviation calculated from five measurements^c R_{AVE} : Average recovery of 7 phenols(except phenol)

회수율의 증가는 없었으므로 HCl의 농도는 0.50M으로 결정하였다.

탈착용매의 부피를 결정하기 위한 실험에서는 Fig. 2와 같은 용리 곡선을 얻을 수 있었다. 0.2mL를 홀리는 동안 페놀류는 4.6% 0.5mL 이후에는 2.6%가 탈착되었으므로 농축 효율을 증가시키기 위해 0.2mL~0.5mL를 받아서 회수율을 계산하였다.

또 Dowex 1×8 컬럼의 온도가 20°C와 50°C일 때 회수율을 비교해 보았다. 실험결과 20°C에서 시료의 회수율은 60~80%를 나타냈고, 50°C일 때 70~100%로 회수율의 증가를 보였다. 이는 이온교환의 과정이 비교적 느리게 일어나기 때문인데 이 점을 감안하여 탈착용매의 용리 속도는 0.04mL/min.으로 했다.

농축 효율 : 시료 용액의 부피를 증가시킴에 따른 농축 효율을 Table 2에 나타내었다. 시료 부피를 증가시켰을 때 phenol을 제외한 나머지 페놀류에 대해서 회수율은 80~90% 이상이었다. phenol은 극성이 크고, 물에 대한 용해도가 크므로 비극성 수지인 XAD-4와의 인력이 약하게 되어 농축 과정에서 큰 손실이 일어난다.

XAD-4/Dowex 1×8 농축법의 선택성 : 복잡한 매질 속에서 페놀류만을 선택적으로 농축하기 위해 고분자 수지와 음이온교환수지의 특성을 연관지어 보다 효과적인 전처리를 시도하였다. 이 분석법의 선택성을 평

가하기 위해서 실제 환경 오염수 속에 존재 가능한 유기화합물들을 가상적인 방해 물질로 공존시켜 페놀류만의 농축·분리를 검사하였다. 방해 물질은 중성, 염기성, 산성 화합물 8가지를 선택하였다.

Fig. 3에는 8가지 페놀류의 표준시료를 HPLC에 주입한 것으로 모든 시료를 바탕선 분리할 수 있었다. 여기에 가상 방해물질을 일정 농도 첨가해서 실험실적 오염수 표준물질을 만들었으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 이 시료를 XAD-4와 Dowex 1×8에 농축한 후 앞의 실험에서 결정한 최적 조건으로 탈착하였다. 염기성 화합물인 아닐린과 페닐렌디아민은 pH 3에서 이온형으로 존재하여 XAD-4에 거의 흡착되지 않았고, 니트로벤젠, 클로로벤젠, 톨루엔 및 나프탈렌과 벤젠솔폰산이 XAD-4 컬럼에서 탈착은 되었지만 Dowex 1×8 컬럼에 재흡착되지 못했다. 벤젠솔폰산은 강산성의 화합물로 음이온교환수지에 이온교환으로 흡착될 수 있지만 탈착 유기용매인 ACN 속에서는 해리되는 정도가 약하여 OH⁻와 이온교환되지 못하므로 Dowex 1×8에 흡착되지 못하는 것으로 생각된다.

Fig. 5은 Dowex 1×8 컬럼에 재흡착되어 남아 있던 유기물들을 탈착시킨 후 온 라인으로 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램이다. XAD-4/Dowex 1×8 흡착제로의 농축 과정을 거친 후 방해물들이 제거된 페놀류의 크로마토그램을 Fig. 4의 표준 용액으로 얻은

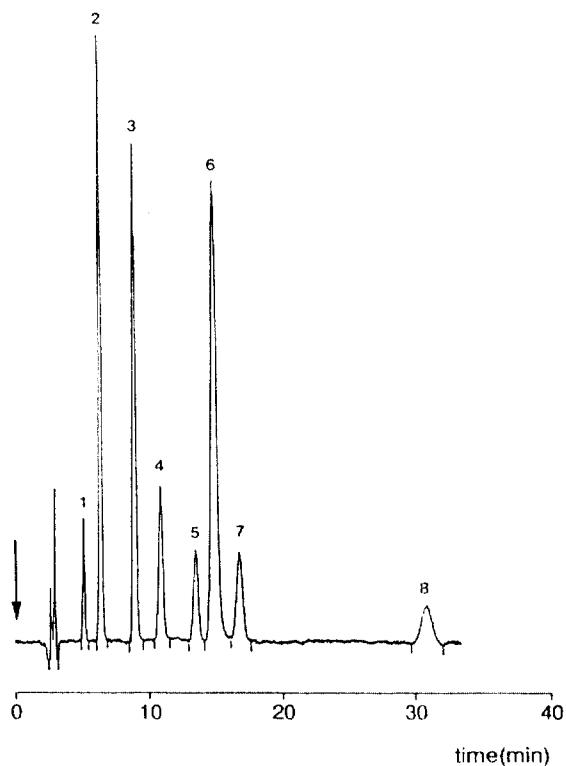


Fig. 3. Chromatogram of 8 phenols.

Methanol / Acetonitrile / Water : 8 / 22 / 50
(pH 3)

Peak ID, 1 : Phenol : 2 : *p*-Nitrophenol : 3 : *o*-Nitrophenol : 4 : 2, 4-Dimethylphenol : 5 : 4-Chloro-*m*-cresol : 6 : 4, 6-Dinitro-*o*-cresol : 7 : 2, 4-Dichlorophenol : 8 : 2, 4, 6-Trichlorophenol.

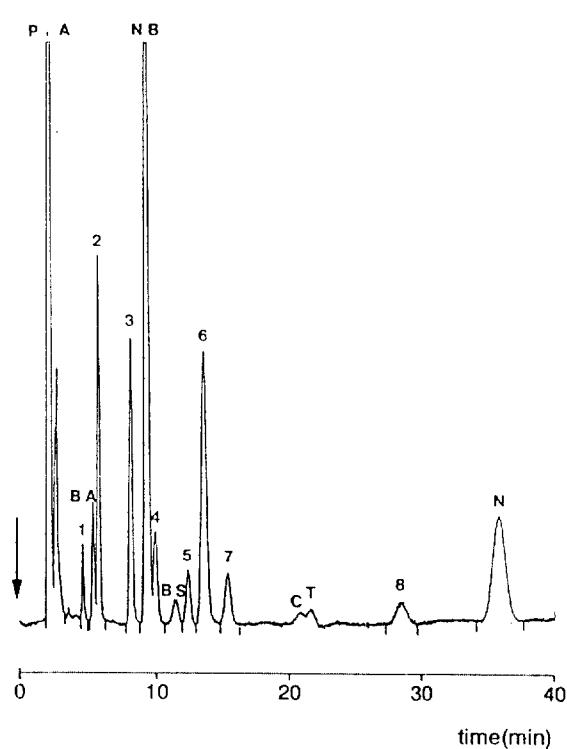


Fig. 4 Chromatogram of the standard sample.

The sample contains 8 phenols and 8 interfering compounds. Peak ID, A: Aniline; P: Phenylendiamine; BA: Benzoic acid; NB: Nitrobenzene; BS: Benzene sulfonic acid; C: Chlorobenzene; T: Toluene; N: Naphthalene.

Peak numbers refer to Fig. 3.

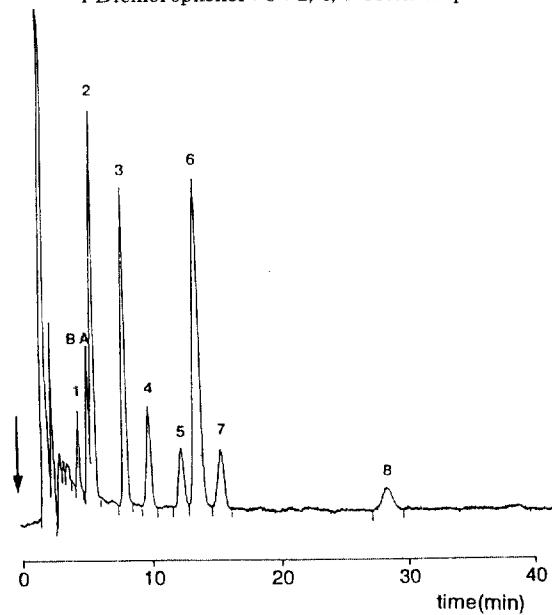


Fig. 5. Chromatogram of eluate after desorption from Dowex 1×8 column by 0.3mL of methanol containing 0.5M HCl.

BA : Benzoic acid ; Peak ID refer to Fig. 4.

것과 비교해 볼 수 있다. 벤조산의 경우는 페놀류와 마찬가지로 벤젠고리를 가지며 약산성의 유기물로 제거할 수 없었다. 그러나 다른 방해 물질을 거의 완벽하게 제거함으써 실제 환경시료에 적용이 가능할 것으로 예상된다.

감사의 글

이 연구는 1993년도 교육부 기초과학 육성연구비(BSRI-93-331)의 지원을 받아 수행한 것으로 연구자들은 교육부에 감사를 드립니다.

인용문헌

1. R. W. Frei and K. Zech, "Selective Sample Handling and Detection in High-Performance Liquid Chromatography". Part A, Elsevier, Amsterdam, (1988).
2. S. Ahuja, "Ultratrace Analysis of Pharmaceuticals and Other Compounds of Interest", John Wiley & Sons, Inc, New York, pp. 130~138(1986).
3. J. S. Fritz and G. A. Junk, *J. Chromatogr.*, **625**, 87 (1992).
4. M. J. M. Wells, A. J. Rossano, and E. C. Roberts, *Anal. Chim. Acta*, **236**, 131(1990).
5. S. K. Poole, T. A. Dean, and J. W. Oudsema, *Anal. Chim. Acta*, **236**, 3(1990).
6. I. Lisk, A. Kuthan, and J. Krupcik, *J Chromatogr.*, **509**, 123(1990).
7. E. Durhan, M. Lukasewycz, and S. Baker, *J Chromatogr.*, **629**, 67 (1993).
8. M. W. F. Nielsen, J. Jong, and R. W. Frei, *Anal. Chem.*, **57**, 806(1985).
9. M. S. Mill, E. M. Thurman, and M. J. Pedersen, *J. Chromatogr.*, **629**, 11(1993).
10. C. Y. L. Hsu and R. R. Walters, *J. Chromatogr.*, **629**, 61(1993).
11. K. A. Ramsteiner, *J. Chromatogr.*, **456**, 3(1988).
12. M. Dressler, *J. Chromatogr.*, **165**, 167(1979).