

[報 文]

## $\alpha$ -싸클로덱스트린을 이동상으로 사용한 몇 가지 페놀 유도체들의 크로마토그래피적 분리

문 영 자\* · 김 봉 희\*\*

\*대전실업전문대학 식품영양과

\*\*충남대학교 약학대학

## Chromatographic Separation of Some Phenol Derivatives Using $\alpha$ -Cyclodextrin in Mobile Phase

Young-Ja Moon\* and Bong-Hee Kim\*\*

\*Department of Food Nutrition, Tae Jeon Vocational Junior College  
Tae Jeon, 300-100, Korea

\*\*College of Pharmacy, Chungnam National University  
Tae Jeon, 305-764, Korea

### ABSTRACT

Chromatographic retention behavior and separation of various phenol derivatives on a Partisil 10 ODS 3 column-with mobile phase containing  $\alpha$ -cyclodextrin-were systematically studied. The decrease in  $k'$  values caused by the addition of cyclodextrins in the mobile phase was based on the formation of an inclusion complex, resulting in weakening of the hydrophobic interaction between solutes and the stationary phase. The content of the organic solvent in the mobile phase also influenced  $k'$  values of the solutes, and  $k'$  values increased with a decrease of the content of organic solvent in the mobile phase. A simple equation has been derived that reveals the hyperbolic dependence of the capacity factor on the total concentration of cyclodextrin. A plot of the reciprocal of the capacity factor against  $[(CD)]_T$  gives a straight line and the dissociation constant,  $K_D$ , of the inclusion complex can be calculated from the slope. The capacity factor decreased with increasing temperature. The enthalpy was calculated from the slope of van't Hoff plots. Under optimum conditions, some mixtures of phenol derivatives were able to separated successfully.

### 서 론

고성능 액체 크로마토그래피 (high-performance liquid chromatography, HPLC)는 많은 유기 화합물의 미량분석에, 유기 환경 오염 물질의 흡착, 분리 및 처리, 인체내의 여러 약물 검사 등에 다양

하게 사용되고 있다. M. Arunyanart들은 미셀 이동상을 이용한 액체 크로마토그래피에서의 선택성 (selectivity)에 대한 연구에서 시료의 머무름에 대한 미셀 효과를 설명하기도 했다.<sup>1),2)</sup> T. Nakagawa 들은 crown ether들을 첨가한 이동상을 이용하여, 그 수용액에서 할로알칸을 추출할 수 있었으며, crown ether들을 정지상으로 하여 아미노산을 분

리하는 연구도 한 바 있다.<sup>3)</sup>

최근에 액체 크로마토그래피에서 이동상이나 정지상으로  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -씨클로덱스트린 ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclo-dextrins, CDs)이나 그 유도체를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 씨클로덱스트린은 다양하고도 많은 유기화합물과 내포착물 (inclusion complex)을 형성할 수 있다.<sup>4)</sup> 씨클로덱스트린은  $\alpha$ -(1,4)-linked D-glucopyranose 단위가 6개 혹은 그 이상으로 된 원환체모양의 소중합체 (cyclic oligomer)로서 가장 잘 알려진 것은  $\alpha$ -씨클로덱스트린 (cyclohexaamylose),  $\beta$ -씨클로덱스트린 (cycloheptaamylose) 및  $\gamma$ -씨클로덱스트린 (cyclo-octaamylose)이다. 이들 씨클로덱스트린의 구멍 (cavity)의 내부와 표면은 다소 소수성을 지니고 있으며 구멍의 직경은 대략  $\alpha$ -씨클로덱스트린은 6.0 Å,  $\beta$ -씨클로덱스트린은 7.0 Å, 그리고  $\gamma$ -씨클로덱스트린은 8.5 Å이고, 이들의 깊이는 대략 7.0 Å이다. 씨클로덱스트린은 구멍의 크기가 다르고 내부가 소수성인 특성을 지니고 있기 때문에 씨클로덱스트린의 내부 공간 내에 guest 분자인 다양한 유기화합물의 소수성 부분이 침투하여 host-guest 내포착물을 형성할 수 있어서, 정지상이나 이동상으로 이용이 가능하다. 물에 불용인 지방족 및 방향족화합물들이라도 수용액에서 씨클로덱스트린과 host-guest 내포착물을 형성할 수 있기 때문에 액체 크로마토그래피에서 이동상에 유기용매만을 사용하였을 때 보다도 씨클로덱스트린을 첨가하여 이동상으로 사용하는 것이 이점이 될 수 있다. 씨클로덱스트린의 구멍의 크기와 시료분자의 크기나 기하학적인 구조, host-guest 사이의 반 데르 발스 인력, 수소결합 및 소수성-적 상호작용 그리고 씨클로덱스트린의 환 (ring)의 무리에너지 (strain energy) 등과 같은 인자들이 씨클로덱스트린에 대한 시료분자들의 분배에 상당한 영향을 준다. 따라서 씨클로덱스트린을 사용한 이동상과 시료분자와의 상호작용에 의한 머무름의 변화는 guest 분자의 구조 모양의 적합성에 의존하기 때문에 순수 또는 혼합용매로 구성된 이동상과의 상호작용에 의한 것보다 다양한 머무름을 기대할 수 있어서, 이온성 또는 중성의 유기물, 무기물들이나 여러 구조 이성질체 및 기하 이성질체를 선택적으로 분리하는데 매우 효과적이다.

$\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가한 전개용매를 사용하여 얇은 층 크로마토그래피 (thin layer chromatogra-

phy, TLC)법으로 벤조산들의 Rf값을 측정된 결과 o-, m- 및 p-이성질체의 분리에 효과적이었음을 D. W. Amstrong<sup>5)</sup>에 의해 처음으로 도입된 이후, 씨클로덱스트린을 이용한 여러 종류의 정지상과 이동상에 대한 다양한 용질의 머무름 거동에 대해 많은 연구가 계속되고 있고, D. Sybilka<sup>6)-8)</sup>들은 역상 액체 크로마토그래피 (reversed-phase liquid chromatography, RPLC)에서  $\alpha$ -,  $\beta$ -씨클로덱스트린을 이동상으로 하여 벤조산과 o-, m- 및 p-이성질체의 머무름을 조사하였으며 이들 용량인자 (capacity factor,  $k'$ )와 씨클로덱스트린 농도와의 관계식을 유도하였다.

J. Zukowski<sup>9)</sup>들은  $\alpha$ -,  $\beta$ -씨클로덱스트린을 이용하여 벤젠 유도체들의 분리율, K. Fujimura<sup>10)</sup>들은  $\beta$ -씨클로덱스트린을 이동상으로 하여 방향족 화합물의 머무름 거동을 조사하였고, J. Debowski<sup>11)</sup>들은  $\alpha$ -,  $\beta$ -씨클로덱스트린을 이동상으로 하여 방향족 아미노산과 알킬벤젠의 유도체를, K. Shimada<sup>12)</sup>들은 이동상으로 씨클로덱스트린을 사용하여 20개의 스테로이드들과 4개의 형광 물질들의 머무름 거동을 조사하였고, 스테로이드의 이성질체들을 분리하였다.

이제까지 RPLC에서의 머무름 예측에 관한 대부분의 연구는 일정한 온도에서 정지상이나 이동상의 조성 변화에 따른 머무름을 예측하는 것이었고, 또 부분적인 몇 가지 시료분자와 그 유도체들의 분리에 중점을 두고 있었다. 그러나 RPLC에서 컬럼온도의 영향이 점차 인식되고 있으며, 더욱 효율적으로 분리하기 위해서는 이동상의 조성과 함께 컬럼 온도를 적절히 조절하는 것이 강조되고 있다.

한편, 여러 가지의 유기시료중에서도 페놀 화합물들은 중화학공업의 발전으로 제초제, 살충제, 프라스틱, 약품, 염료 등의 합성에 많이 사용되고 있으며, 이러한 제품의 생산공장에서 유출되는 폐수중에 페놀류가 많이 검출되고 있다. 이들 페놀류는 독성이 심하여 주로 환경 오염 물질로 대두되고 있기 때문에 이들의 분석은 중요한 연구 과제가 되고 있다.

본 연구에서는 역상 액체 크로마토그래피에서  $\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가한 유기용매를 이동상으로 하고, 분리관으로는 역상계에서 많이 이용하고 있는 ODS (octadecylsilane)를 사용하여, 페놀 유도체들의 분석에 근본적으로 필요한 머무름 거동을 조사하고 시료분자의 용량인자를 구하여 시료분자와 씨클

로텍스트린 내포착물의 해리상수를 측정하고자 한다. 그리고 이동상에 첨가한 유기용매가 내포착물의 형성에 영향을 미치기 때문에 첨가한 메탄올 농도의 영향을 조사하고, 컬럼의 온도를 변화시켜 온도의 상승에 따른  $\ln k'$ 를 측정하여 시료분자들의 엔탈피(enthalpy,  $\Delta H^\circ$ )를 구하고자 한다. 실험에서 얻은 결과로 여러 가지 시료들의 몇 가지 이성질체들을 분리하는데 알맞는 최적조건을 규명하려고 한다. 따라서 본 연구에서 얻은 결과들로 페놀류들 효과적으로 분석하는데 근본적으로 필요한 용리 거동을 규명하거나 이를 바탕으로 머무름을 예측하여 이들 물질들의 최적 분리조건을 결정할 수 있을 뿐 아니라 위에서 언급한 바와 같이 산업 분야 또는 환경 오염 물질 중에서 여러 페놀 화합물들을 분석, 분리하는 데에도 활용할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험기기 및 기구

본 연구에서 사용한 기기는 Pye-Unicam 제품의 Liquid Chromatography로써 펌프는 PU 4010 이중펌프, 검출기는 PU 4020 분광광도검출기, 시료 주입기는 20  $\mu$ L용 rotary valve 주입기를 사용하였고 시료 혼합물의 분리조건을 찾을 때는 CDP-4 computing 기록기를 병행하여 사용하였다. 컬럼은 Whatman사의 제품인 Partisil 10 ODS 3 (4.6 mm i.d.  $\times$  25 cm)을 사용하였다.

### 2. 시료, 이동상 및 용매

본 연구에서 사용한 페놀류는 12종이며, 이들 모두 Aldrich사 특급시약으로 사용하였다. 이동상으로 사용한 유기용매는 HPLC용 methanol (MeOH, Mallinckrodt 제품)을 사용하였다. 이동상에 첨가한  $\alpha$ -씨클로덱스트린은 미국 Sigma사 제품인 특급시약을 정제하지 않고 사용하였으며, 실험에 사용한 모든 증류수는 1차 증류수를 Millipore Milli-Q를 통과시켜 증류한 탈 이온수를 사용하였다.

### 3. 실험법

시료는 각각의 흡광도를 고려하여 HPLC용 메탄올에 녹여  $10^{-3}$  ~  $10^{-5}$  M로 만들었으며, 이동상의 유기용매 및 씨클로덱스트린 (CDs)을 주어진 실험 조건에 따라 일정한 농도로 이동상을 만든 다음

0.45  $\mu$ m millipore 여과지로 흡인여과한 후 초음파 진동기를 이용하여 용액속에 녹아있는 기포를 완전히 제거한 후 사용하였다.

분리관에 시료를 주입하기 전에 이동상을 통과시켜, 이동상과 분리관 사이에 평형이 되도록 하였고, 평형이 이루어졌을 때는 바탕선이 일정하게 안정되었으며 각 시료들의 머무른 시간도 일정하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min으로 고정시켰으며, 일정 시간마다 실제로 용출되어 나오는 이동상을 뷰렛을 이용하여 확인한 결과 유속과 일치하였다. 시료는 시료주입용 microsyringe로 20  $\mu$ L씩 주입하였으며, 시료의 검출은 254 ~ 270 nm 범위에서 측정하였다. 기록지의 속도는 0.5 cm/min로 고정시켰으며, 모든 실험은 분리관의 온도영향을 고려하여 각 실험온도에 대하여  $\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 수행하였고, 분리관 온도는 항온조를 이용하여 25 ~ 50 $^\circ\text{C}$ 까지 매 5 $^\circ\text{C}$ 씩 증가시켰다. 용량인자,  $k'$ 는 시료의 머무름을 나타내는 값으로 다음과 같이 표시된다.

$$k' = (T_R - T_0) / T_0$$

여기서  $T_R$ 은 시료의 머무른 시간이고,  $T_0$ 은 이동상의 머무른 시간이다. 본 실험의 LC 시스템에서는  $T_0$ 값을 측정하기 위해  $1 \times 10^{-3}$  M, potassium nitrate를 사용하였다. 한편, 혼합시료들은 실험에서 얻은 용량인자를 토대로하여 분리될 수 있는 알맞은 조건을 선택하여 분리를 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 시료의 머무름에 대한 메탄올의 영향

역상 액체 크로마토그래피에서 씨클로덱스트린과 내포착물을 형성한 시료의 형성상수, 머무름 값과 분리도는 유기용매의 종류와 농도에 크게 의존되기 때문에 유기용매의 선택이 중요하다. 씨클로덱스트린의 내포착물 형성의 효과가 메탄올 수용액에서 비교적 강했기 때문에 유기용매 중에서 메탄올을 선택하였다. 그리고 또한 이동상의 유기용매의 농도는 시료의 머무름에 영향을 주기 때문에 이동상에 첨가한 유기용매의 농도가 시료의 머무름에 미치는 효과를 알아보기 위해 4 mM  $\alpha$ -씨클로덱스트린, 온도 25 $^\circ\text{C}$ 에서 메탄올의 농도를 25 ~ 50%까지 5%간격으로 변화시키면서 측정한 페놀 유도체들의 머무름 값을 Table 1에 수록하였다. 이동상에 첨가한 메탄올

**Table 1.** Effect of methanol concentration on capacity factors

Compound	Concentration of methanol					
	25%	30%	35%	40%	45%	50%
Phenol	8.13	6.28	4.76	3.91	2.87	2.10
m-Fluorophenol	14.43	11.00	8.33	6.50	4.66	3.27
p-Fluorophenol	11.94	9.00	6.65	5.36	3.81	2.84
o-Nitrophenol	26.52	19.38	14.20	11.10	7.80	5.59
m-Nitrophenol	17.02	12.59	9.41	7.20	5.11	3.68
p-Nitrophenol	14.72	11.39	8.29	6.35	4.45	3.19
o-Cresol	21.57	15.67	11.45	8.77	6.06	4.30
m-Cresol	21.18	15.17	10.74	8.23	5.76	3.86
p-Cresol	20.90	15.50	10.91	8.36	5.79	4.08
o-Chlorophenol	25.10	18.22	12.87	9.64	6.54	4.49
m-Chlorophenol	37.76	27.60	19.18	14.41	9.77	6.50
p-Chlorophenol	34.14	25.10	17.52	13.28	9.02	6.25

Mobile phase : 4 mM  $\alpha$ -CD, T=25°C

의 농도가 증가하면 역상제에서 이동상의 용매강도가 증가되므로 유기시료들이 정지상에 배향하려는 성질이 약화되기 때문에 페놀 유도체들의 용량인자는 감소하게 됨을 보여준다. 분리 시간이나 분리도의 증대에 영향을 미치는 용량인자 값의 범위는 대략  $1 \leq K' \leq 10$ 이므로 메탄올의 농도가 35~50%일때 효율적인 분리 조건이 될 수 있음을 보여주었다.

## 2. 시료의 머무름에 대한 $\alpha$ -씨클로덱스트린의 영향

이동상에 씨클로덱스트린을 첨가하면 시료분자와 씨클로덱스트린사이의 내포착물 형성으로 인하여 시료분자의 머무름 값의 변화를 기대할 수 있다. 페놀 유도체의 머무름에 미치는 이동상에 첨가된  $\alpha$ -씨클로덱스트린의 영향을 알아보기 위하여 몇 가지 페놀 유도체들에 대하여  $\alpha$ -씨클로덱스트린 농도를 2.0 mM, 4.0 mM로 변화시켜 측정된 시료의  $K'$  값과 24.0 mM D-glucose를 첨가하여 25°C에서 측정된  $K'$  값을 Table 2에 수록하였다. 이동상에  $\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가했을 경우와 첨가하지 않았을 경우를 비교하면,  $\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가했을 경우, 모든 시료의 용량인자,  $K'$ 는 크게 감소된다. 이러한 값을 갖게 되는 것은  $\alpha$ -씨클로덱스트린과 내포착물을 형성하는 페놀 유도체들은 정지상과의 수소성-적 상호작용이 감소하므로써 정지상에 머무르는 시간은 짧아지기 때문이며, 따라서 시료의 용량인자는  $\alpha$ -씨클로덱스트린의 농도가 증가할수록 감소하

**Table 2.** Effect of  $\alpha$ -CD concentration in mobile phase on capacity factors

Compound	No addition	Concentration of $\alpha$ -CD		Concentration of Glucose
	0.0 mM	2.0 mM	4.0 mM	24.0 mM
Phenol	4.59	4.25	3.91	4.70
m-Fluorophenol	7.33	6.55	6.50	7.35
p-Fluorophenol	6.05	5.36	5.36	6.11
o-Nitrophenol	11.26	11.15	11.10	11.31
m-Nitrophenol	8.06	7.36	7.20	8.03
p-Nitrophenol	6.85	6.45	6.35	6.85
o-Cresol	10.27	9.52	8.77	10.34
m-Cresol	9.68	8.29	8.23	9.65
p-Cresol	9.87	8.82	8.36	9.87
o-Chlorophenol	11.21	10.43	9.64	11.26
m-Chlorophenol	16.45	14.82	14.41	16.44
p-Chlorophenol	15.45	13.82	13.28	15.50

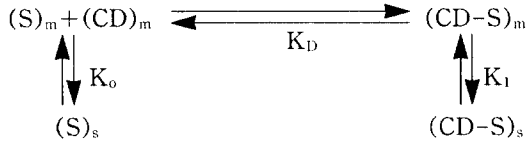
Mobile phase: Methanol/Water (40/60), T=25°C

는 것이다. 그리고 내포착물을 형성할 수 없는 D-glucose를 첨가하여 측정된  $K'$  값과 씨클로덱스트린을 첨가하지 않았을 때와의  $K'$  값이 별로 큰 변화가 없는 것으로 보아 정지상에 대한 시료의 머무름 변화는 역시 시료와  $\alpha$ -씨클로덱스트린의 내포착물의 형성에 기인된다는 것을 알 수 있다.

## 3. 시료의 머무름에 의한 $\alpha$ -씨클로덱스트린 내포착물의 해리상수 측정

이동상에 씨클로덱스트린이 첨가되어 있을때 컬럼

에 있는 시료분자를 S라 하면



로 나타낼 수 있다. 여기서 s는 정지상이고 m은 이동상이다.

CD-S의 해리상수 (dissociation constant,  $K_D$ )

$$K_D = \frac{[(S)_m][(CD)_m]}{[(CD-S)_m]} \quad (1)$$

S의 분배상수 (distribution constant),

$$K_o = \frac{[(S)_s]}{[(S)_m]} \quad (2)$$

$$CD-S의 분배상수, K_1 = \frac{[(CD-S)_s]}{[(CD-S)_m]} \quad (3)$$

$$\text{시료의 용량인자, } k' = \phi \frac{[(S)_s]}{[(S)_m] + [(CD-S)_m]} \quad (4)$$

( $\phi$ 는 컬럼의 상비)

이동상에 첨가된 CD의 전체 농도를  $[CD]_T$ 라 하면  $[CD]_T = [(CD)_m] + [(CD-S)_m]$ 이다. 식 (4)에 (1), (2)식을 대입하면

$$k' = \phi \frac{K_o K_D}{K_D + ([CD]_T - [(CD-S)_m])} \quad (5)$$

로 유도될 수 있다. 그러나 이동상에 있는  $[CD]_T$ 에 비해 시료분자의 농도는 매우 적으므로  $[CD]_T - [(CD-S)_m] \approx [CD]_T$ 이다.

$K_o \phi$ 는 CD가 첨가되기 전의 용량인자,  $k'_o$ 이다. 그러므로 식(5)는

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{k'_o} + \frac{[CD]_T}{K_D k'_o} \quad (6)$$

으로 나타낼 수 있으며<sup>10)</sup> Cline Love and Arunyanart에 의하여 micellar chromatography에서 씨클로덱스트린을 함유하고 있는 유기 용매 이동상에서 시료분자의 머무름 특성을 서술할 때 제안된 식과 같다.

몇 가지 페놀 유도체들에 대하여 25°C에서  $\alpha$ -씨클로덱스트린 농도를 1.0 mM, 2.0 mM, 4.0 mM,

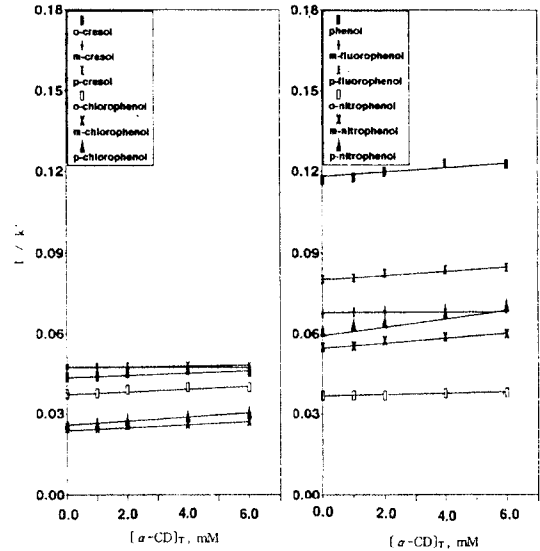


Fig. 1. Plot of  $1/k'$  against  $[\alpha-CD]_T$  of phenol derivatives: mobile phase, methanol/H<sub>2</sub>O (25/75); T = 25°C

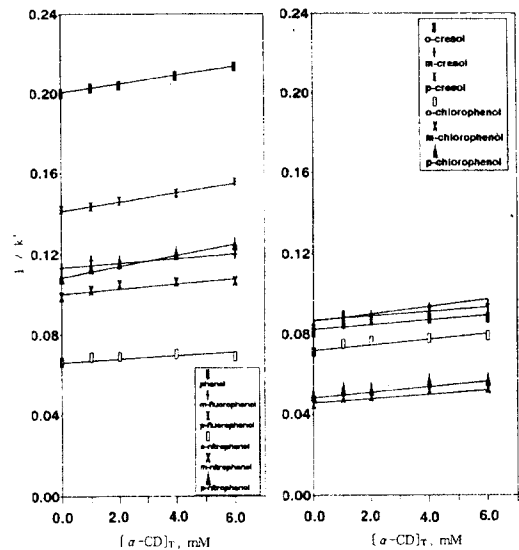


Fig. 2. Plot of  $1/k'$  against  $[\alpha-CD]_T$  of phenol derivatives: mobile phase, methanol/H<sub>2</sub>O (35/65); T = 25°C

6.0 mM로 변화시켜가면서 측정된  $k'$  값을 식(6)에 대입하여  $[CD]_T$ 에 따른  $1/k'$ 을 도시한 결과 메탄올 농도에 따라 Fig. 1, 2, 3에 나타내었고, 여기에

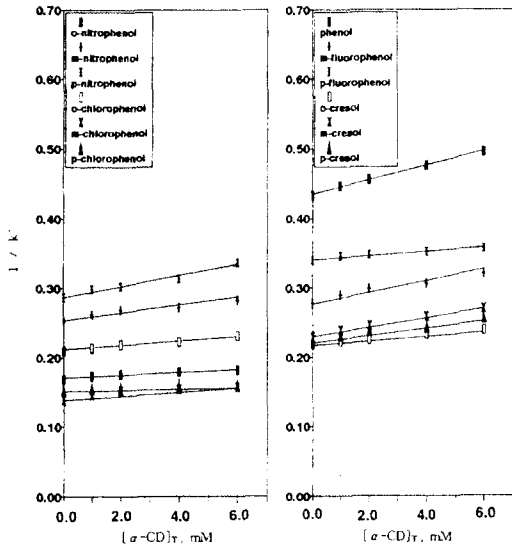


Fig. 3. Plot of  $1/k'$  against  $[\alpha\text{-CD}]_T$  of phenol derivatives: mobile phase, methanol/H<sub>2</sub>O (50/50); T = 25°C

서  $k'$  값이 직선이 성립되었다.

이동상에 있는 씨클로덱스트린의 농도가 증가하면  $k'$  값은 감소한다. 이러한 값을 갖게 되는 것은  $\alpha$ -씨클로덱스트린과 내포착물을 형성하는 페놀 유도체들의 특성에 기인하는 것으로 보인다. 식(6)으로부터 직선의 절편과 기울기를 이용하여 50% 메탄올 용액에서 페놀 유도체 내포착물의 해리상수를 계산하여 Table 3에 실었다.

#### 4. 시료의 머무름에 대한 온도의 영향

크로마토그래피에서 용질의 머무름은 단위가 없는 용량인자,  $k'$ 로 나타내며  $k'$ 는 정지상에 용질이 결합할때의 열 역학적 평형상수  $K$ 와  $k' = \Phi K$ 의 관계가 있다. 이때  $\Phi$ 는 컬럼의 상비 (phase ratio = 정지상의 부피/이동상의 부피)이다. 이 과정의 자유에너지 변화는 다음 식(7)과 같이 표시되며

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = -RT \ln(k'/\Phi) \quad (7)$$

이 식을 Gibbs 관계식인 자유에너지 변화, 식(8)에 치환하면 용량인자가 아래의 (식(9))와 같이 얻어진다.

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (8)$$

Table 3. Dissociation constants of  $\alpha$ -CD inclusion complexes measured in 50% aqueous methanol at 25°C

Compound	50% MeOH
Phenol	$2.75 \times 10^{-2}$
m-Fluorophenol	$5.50 \times 10^{-2}$
p-Fluorophenol	$9.44 \times 10^{-2}$
o-Nitrophenol	$7.24 \times 10^{-2}$
m-Nitrophenol	$5.16 \times 10^{-2}$
p-Nitrophenol	$3.78 \times 10^{-2}$
o-Cresol	$7.80 \times 10^{-2}$
m-Cresol	$5.13 \times 10^{-2}$
p-Cresol	$5.28 \times 10^{-2}$
o-Chlorophenol	$8.01 \times 10^{-2}$
m-Chlorophenol	$5.57 \times 10^{-2}$
p-Chlorophenol	$5.53 \times 10^{-2}$

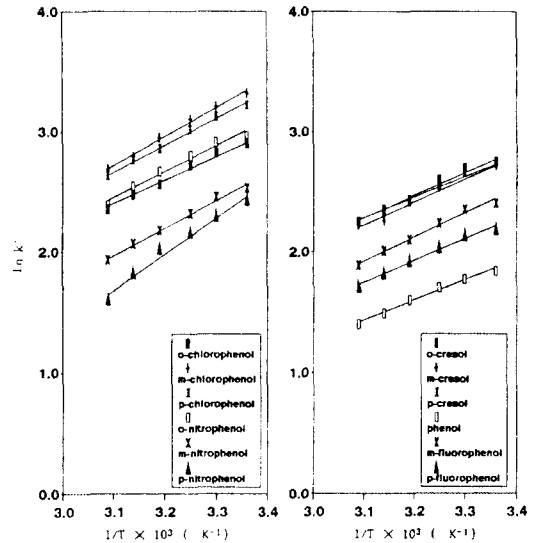


Fig. 4. Van't Hoff plots for phenol derivatives: mobile phase, 30% MeOH containing 4 mM  $\alpha$ -CD

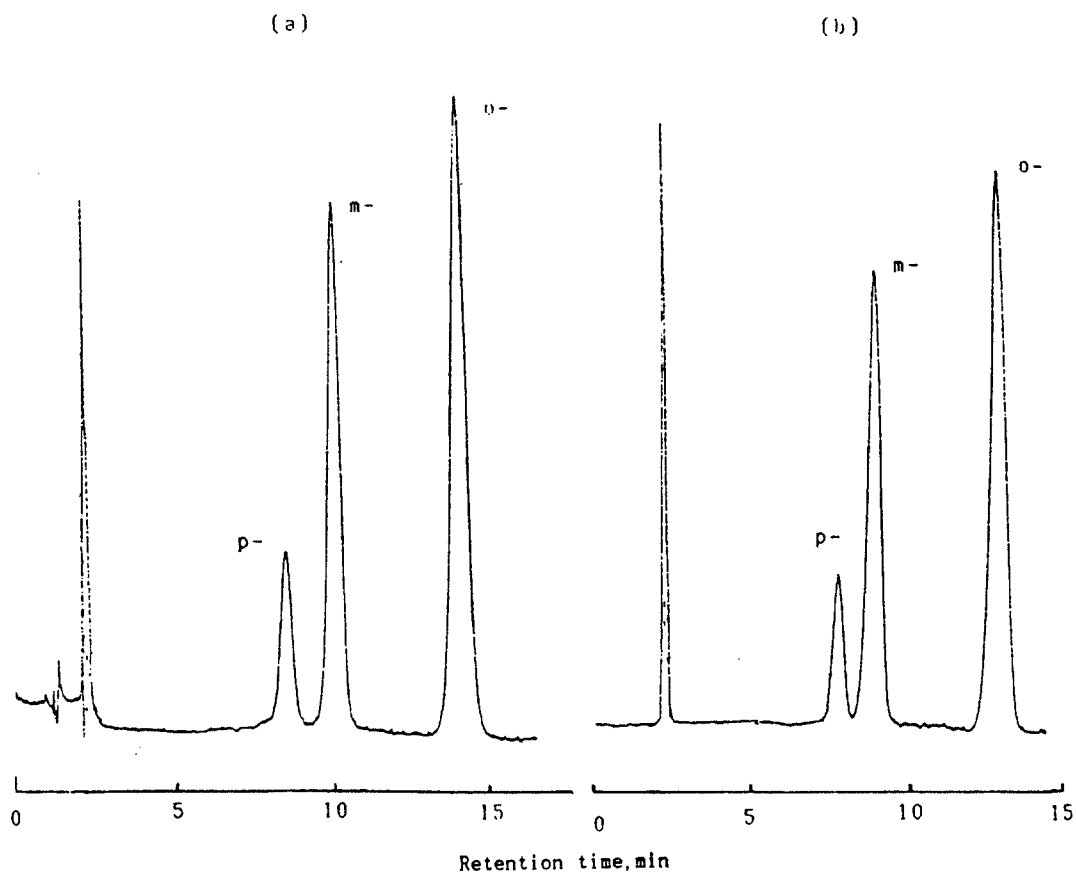
$$\ln k' = (-\Delta H^\circ)/RT + \Delta S^\circ/R + \ln \Phi \quad (9)$$

여기서  $\Delta H^\circ$ 는 엔탈피 (cal), T는 절대온도 (K)이다. 만일 머무름 메카니즘이 조사한 온도 범위에서 불변하고 엔탈피가 일정하면  $1/T$ 에 대한  $\ln k'$ 의 관계 (van't Hoff plot)는 직선을 보일 것이다.

페놀 유도체들의 머무름에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 4 mM  $\alpha$ -씨클로덱스트린, 30% 메탄

**Table 4.** Capacity factors and enthalpy values of phenol derivatives

Compound	Ln $k'$ at column temp. $1/T \times 10^3$ ( $K^{-1}$ )						$-\Delta H^\circ$ (kcal/mol)	상관계수 (r)
	3.36	3.30	3.25	3.19	3.14	3.09		
Phenol	1.84	1.77	1.70	1.60	1.49	1.40	3.27	0.994
m-Fluorophenol	2.40	2.35	2.23	2.10	2.01	1.89	3.89	0.993
p-Fluorophenol	2.20	2.14	2.04	1.93	1.82	1.72	3.64	0.994
o-Nitrophenol	2.96	2.92	2.80	2.67	2.54	2.39	4.33	0.987
m-Nitrophenol	2.53	2.45	2.32	2.18	2.07	1.93	4.52	0.996
p-Nitrophenol	2.43	2.31	2.17	2.03	1.83	1.61	5.93	0.990
o-Cresol	2.75	2.70	2.60	2.42	2.35	2.23	3.89	0.990
m-Cresol	2.72	2.66	2.54	2.42	2.26	2.22	3.99	0.989
p-Cresol	2.74	2.66	2.55	2.44	2.33	2.25	3.71	0.998
o-Chlorophenol	2.90	2.83	2.72	2.56	2.47	2.35	4.18	0.996
m-Chlorophenol	3.32	3.21	3.10	2.95	2.79	2.69	4.78	0.997
p-Chlorophenol	3.22	3.13	3.02	2.86	2.77	2.63	4.42	0.997

Mobile phase : 4 mM  $\alpha$ -CD/30% MeOH**Fig. 5.** Separation of nitrophenol isomers : mobile phase, 40% MeOH at  $T=30^\circ\text{C}$ (a) and 45% MeOH containing 9 mM  $\alpha$ -CD at  $T=25^\circ\text{C}$ (b).

올에서 온도를 25~50°C까지 5°C씩 변화시켜가며 용량인자를 측정하여, 식 (9)<sup>13)</sup>에 의해 절대온도를 독립변수로 하여 선형 회귀 분석(linear regression)한 결과 좋은 직선관계를 보였다(Fig. 4). 이 직선들의 기울기( $-\Delta H^\circ/R$ )로부터 용질이 이동상에서 정지상으로 전이할 때의 엔탈피변화를 구하여 Table 4에 수록하였다. 엔탈피 변화가 대략 3.27~5.93 kcal/mol 정도인 것으로 볼 때, 정지상과 시료들의 순간적인 쌍극자-쌍극자 형성으로 인한 반 데르 발스 인력에 의한 머무름이라는 것을 추측할 수 있다.<sup>14)</sup> 페놀 유도체들의 경우에 온도가 증가함에 따라 용량인자, K 값은 감소하는 추세를 보인다. 또한 온도를 상승시키면 정지상과 시료들의 순간적인 쌍극자 형성에 의한 인력이 급속히 감소하게 되고 이동상의 점도(viscosity)가 감소하게 되어, 시료의 머무른 시간은 짧아지나 분리 효능은 다소 감소하여 온도를 40°C로 상승시켰을 경우, 몇 가지 시료를 분리하는데 분리도는 오히려 저하되었다.

##### 5. $\alpha$ -씨클로덱스트린에 의한 페놀 이성질체들의 분리

$\alpha$ -씨클로덱스트린과 페놀 유도체들의 내포착물의 형성에 의한 머무름 거동을 살펴본 결과로, 페놀 유도체들의 분리에는 이동상에 첨가한 씨클로덱스트린의 농도, 이동상의 유기용매의 농도, 컬럼의 온도 등이 상당한 영향을 줄 것이라는 추측을 할 수 있다. 따라서 이동상을 40~45% 메탄올 용액으로 하고 온도를 25~30°C로 하여  $\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가한 상태와 첨가하지 않은 상태에서 몇 가지 페놀 유도체들의 분리를 비교해 보았다(Figs. 5, 6).

Fig. 5에서 Nitrophenol 이성질체들은 40% MeOH 용액에서도 분리가 가능하나(Fig. 5(a)) 이동상의 MeOH 농도를 증가시키고  $\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가하여 분리 시간을 단축시켜서 더욱 이상적으로 분리할 수 있었다(Fig. 5(b)).

Chlorophenol의 이성질체들(Fig. 6)인 경우, 이동상인 40% MeOH에  $\alpha$ -씨클로덱스트린이 첨가되지 않았을 때의 m-와 p-chlorophenol의 분리가 불충분하나(Fig. 6(a)), 9 mM의  $\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가하여, 머무른 시간이 짧아지고 분리도가 좋아졌으며(Fig. 6(b)), 이동상의 메탄올 농도를 증가시켜서 분리를 시도하여 더욱 좋은 결과(Fig. 6(c))를 얻었다. 이러한 그림들은 이동상에  $\alpha$ -씨클

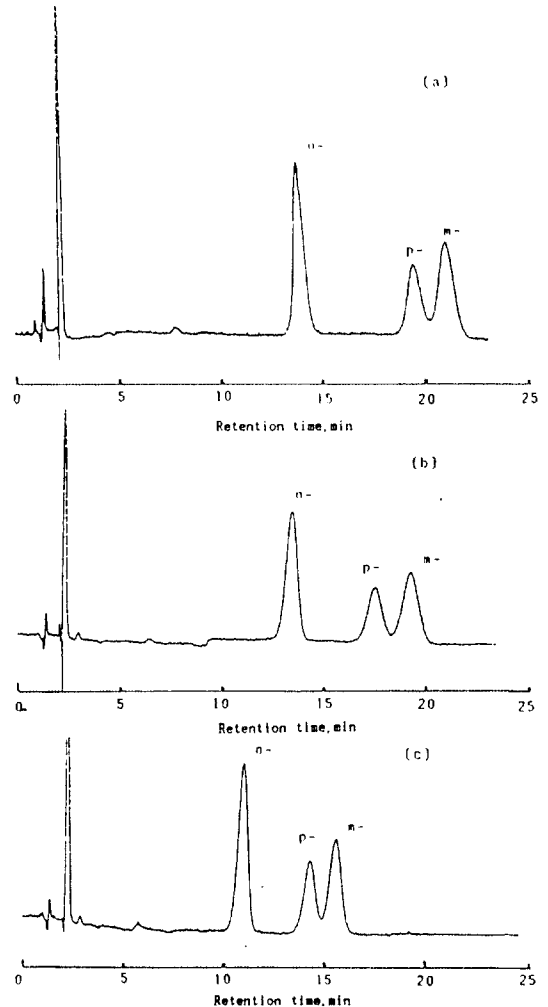


Fig. 6. Separation of chlorophenol isomers : mobile phase, 40% MeOH at T=25°C (a) 40% MeOH containing 9 mM  $\alpha$ -CD at T=30°C (b) and 45% MeOH containing 9 mM  $\alpha$ -CD at T=25°C(c).

로덱스트린을 첨가하지 않고 이성질체들을 분리한 것보다  $\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가하고 40~45% 메탄올 용액에서 각 이성질체들을 분리했을 때 더욱 이상적으로 분리된다는 것을 보여준다.

## 결 론

역상 액체 크로마토그래피를 이용하여 이동상의 메탄올의 농도와  $\alpha$ -씨클로덱스트린 농도의 변화,



컬럼의 온도 변화와 같은 인자들이 페놀 유도체들의 정지상에 대한 머무름에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하고, 측정된 용량 인자들로부터 시료들의 최적 조건을 선택하여 몇 가지 페놀 이성질체들의 분리를 시도하였던 바, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 이동상으로 메탄올을 사용하여 시료의 머무름에 대한 효과를 본 결과, 메탄올의 농도를 증가시키면 정지상과 시료의 소수성-적 상호작용이 약화되어  $k'$  값이 감소되었다. 메탄올의 농도가 35~45%일 때가 페놀 유도체들의 이성질체의 분리에 가장 효율적이었다.
2.  $\alpha$ -씨클로덱스트린을 첨가하지 않았을 때 보다 첨가하였을 때 페놀 유도체들의 용량인자,  $k'$  값이 감소하였고, 정지상에 대한 페놀 유도체들의 머무름 변화는 씨클로덱스트린과 페놀 유도체들의 내포착물 형성에 기인한다는 것을 알 수 있었다.
3.  $\alpha$ -씨클로덱스트린 농도에 따른 머무름 변화를 측정해 본 결과,  $\alpha$ -씨클로덱스트린의 농도를 증가시키면, 씨클로덱스트린과 내포착물 형성으로 인하여 페놀 유도체의 머무름은 감소한다.  $\alpha$ -씨클로덱스트린의 농도에 따른  $1/k'$  을 도시한 결과 직선관계가 성립되고, 그 직선의 기울기로부터 50% 메탄올용액에서의  $K_D$  값을 측정하였다.
4.  $\alpha$ -씨클로덱스트린과 페놀 유도체의 내포착물 형성에 있어 이동상의 온도를 상승시킴에 따라 페놀 유도체들의  $k'$  값은 감소하였다. 온도 변화에 따른  $\ln k'$  값을 도시한 직선에서 페놀 유도체들의 엔탈피를 계산하였고, 정지상에 대한 페놀 유도체들의 머무름은 반 데르 발스 인력에 의한 것임을 알 수 있었다. 분리효율에 있어서는 25~30°C가 적당하고 더 상승시켰을 경우에 머무른 시간은 많은 감소를 보였지만 분리에는 별로 효율적이지는 못했다.
5. 이성질체들의 분리도를 증대시켜 본 결과, 분리도는  $\alpha$ -씨클로덱스트린의 농도뿐만 아니라 이동상의 농도와 온도에 따라 영향을 받았으며, Chlorophenol 이성질체, Nitrophenol 이성질체들은 9 mM  $\alpha$ -씨클로덱스트린, 45% 메탄올용액, 25°C에서 이상적인 분리가 가능하였다.

## 참 고 문 헌

1. Yarmchuk P., Weinberger R., Hirsch R.F. and Cline Love L.J., Selectivity in liquid chromatography with micellar mobile Phases. *Anal. Chem.*, **54**, 2233 (1982)
2. Arunyanart M. and Cline Love L.J., Model for micellar effects on liquid chromatography capacity factors and for determination of micelle-solute equilibrium Constants. *Anal. Chem.*, **56**, 1557 (1984)
3. Nakagawa T., Shibukawa A., Kaihara A., Itamochi T. and Tanaka H., Liquid chromatography with crown ether-containing mobile phases. *J. Chromatogr.*, **353**, 399 (1986)
4. Bergeron R.J., Cycloamyloses. *J.C., Education* **54**, 204 (1977)
5. Hinze W.L. and Armstrong D.W., Thin layer chromatographic separation of ortho, meta, and para substituted benzoic acids and phenols with aqueous solution of  $\alpha$ -cyclodextrin. *Analytical Letters* **13** (A12), 1093 (1980)
6. Debowski J., Sybilska D. and Jurczak J.,  $\beta$ -Cyclodextrin as a chiral component of the mobile phase for separation of mandlic acid into enantiomers in reversed-phase systems of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **237**, 303 (1982)
7. Sybilska D., Lipkowski J. and Woycikowski J.,  $\alpha$ -Cyclodextrin as selective agent for the separation of o-, m- and p-nitrobenzoic acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **253**, 95 (1982)
8. Debowski J., Grassini-Strazza G. and Sybilska D.,  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrins as selective agents for the separation of isomers by reversed-phase high-performance thin layer and column liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **349**, 131 (1985)
9. Zukowski J., Sybilska D. and Jurczak, J., Resolution of ortho, meta, and para isomers of some disubstituted benzene derivatives via  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes, using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **57**, 2215 (1985)
10. Fujimura K., Ueda T., Kitagawa M., Takajanagi H. and Ando T., Reversed-phase retention

- behavior of aromatic compounds involving  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex formation in the mobile phase. *Anal. Chem.* **58**, 2668 (1986)
11. Debowski J., Jarczak J., Sybilska D. and Zukowski J., Separation of some aromatic amino acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography using  $\alpha$ - or  $\beta$ -cyclodextrin as mobile phase component. *J. Chromatogr.* **329**, 206 (1985)
  12. Shimada K., Oe T., Hirose Y. and Komine Y., Retention behaviour of cardiac steroids using cyclodextrin in the mobile phase in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **478**, 339 (1989)
  13. Paleologou M., Li S. and Purdy W.C., Liquid chromatographic retention behavior and separation of chlorophenols on a  $\beta$ -cyclodextrin bonded-phase column. Part 1. Monoaromatic chlorophenols: retention behavior. *J. Chromatogr. Sci.* **28**, 311 (1990)
  14. Eugene S.H. and Hans J.A., Study of the forces responsible for binding of polar substrates in the cyclohexaamylose cavity by positron annihilation techniques. *J. Phy. Chem.* **83**, 1805 (1979)