

역상 액체크로마토그래피에 의한 1-(2-Pyridylazo)-2-Naphthol과 킬레이트를 형성하는 금속이온의 분리

姜三祐* · 朴善子

한남대학교 이과대학 화학과
(1998. 1. 21 접수)

Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation of Metal Ions by Chelate Formation with 1-(2-Pyridylazo)-2-Naphthol

Kang Sam Woo* and Park Sun Ja

Department of Chemistry, Hannam University, Taejon 306-791, Korea

(Received January 21, 1998)

요 약. 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol(PAN)은 많은 금속이온들과 착색된 착물을 형성함으로 분광시약 또는 금속지시약으로 널리 사용된다. 본 연구는 PAN을 이동상에 첨가하여 Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) 및 Fe(III)이온들과 착물을 형성시켜 역상 액체크로마토그래피법으로 분리하였다. 이들 금속착물들은 570 nm에서 분광광도 검출기로 검출되었고, 이들 금속이온의 머무름을 조사하기 위하여 이동상의 pH, 이온세기 및 유기용매 조성의 변화에 따른 크로마토그램과 용량인자를 측정하였다. 이상의 실험결과에서 얻은 최적조건하에서 금속이온을 분리한 결과 좋은 크로마토그램을 얻었으며, 검출한계(S/N)도 ppb 단위까지 검출이 가능함을 알 수 있었다.

ABSTRACT. 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol (PAN) has been widely used as a spectrophotometric reagent and metalochromic indicator for many metal ions. In this work, the chelate reagent of PAN was used as mobile phase additive for the separation of metal ions by reversed phase chromatography. Metal ions could be detected by monitoring the effluent at 570 nm with spectrophotometric detector. In order to investigate retention behaviors of the metal ions, the chromatograms and capacity factors were obtained as the variation of pH, ionic strength and composition of organic modifier in mobile phase. Under the obtained optimum conditions, the mixtures of Fe(III), Ni(II), Cu(II), Zn(II) and Co(II) could be separated successfully and the calibration curves under the recommended conditions showed an excellent linearity. The detection limits (S/N) were feasible at the nanogram level.

서 론

액체크로마토그래피에 의한 금속이온의 분리는 전통적으로 이온교환법이 사용되어왔다. 그러나 최근에는 금속이온들을 킬레이트 착물을 형성시켜 흡착 또는 분배 크로마토그래피법에 의한 분리가 널리 시도되고 있다. 이와 같은 방법은 분리하고자 하는 금속이온의 착물을 직접 UV/VIS 분광광도 검출기로서 검출할 수 있는 장점을 가지고 있다. HPLC법에 의한 금속착물의 분리에 많이 사용되는 대표적인 킬레이트 시약으로는 dithiocarbamic acids,¹⁻⁴ 8-hydroxy-quinoline,⁵⁻⁹ β -keto-amines,¹⁰⁻¹¹ β -diketones¹²⁻¹³ 및 acetylacetonones¹⁴⁻¹⁶ 등이 광범위하게 연구되었다. 이들

방법은 실리카 정지상을 사용한 정상계와 ODS 컬럼과 같은 결합정지상을 사용한 역상계에서 금속이온을 분리하였으며, 금속이온들은 사전에 금속킬레이트 화합물로 합성하거나 용매로 추출하여 컬럼에 주입하여 분리하였다. 그러나 이러한 방법은 시료를 조제해야하는 번거로움이 있으며 간혹 컬럼 내에서 용리중에 착물이 분해되거나 역상계에서 킬레이트 착물의 용해도 제한 때문에 분리효율이 저하되어 정상적인 분리가 불가능한 경우가 생길 수 있다. 이러한 점을 보완하기 위하여 역상계에서 비교적 수용성에 용해도가 큰 킬레이트 시약을 이동상에 첨가하여 분리시키는 방법이 이용되고 있다. 이 방법은 금속이온

을 사전에 킬레이트 시약으로 용매 추출하거나, 합성하지 않고 직접 컬럼에 주입하여 분리할 수 있다. Daryl A. Roston¹⁷은 4-(2-pyridylazo) resorcinol(PAR)을 이동상으로 하여 ODS 컬럼상에서 Cu(II), Co(II), Ni(II) 및 Fe(II)를 분리하고, UV 검출기로 254 nm에서 ppb 수준까지 검출이 가능하였다. Yoshio Shijo 등¹⁸은 역상계에서 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulpho-propylamino)-phenol를 이동상으로 하여 575 nm에서 Cu(II), Co(II), Ni(II), Cr(III) 및 V(V)를 분리 및 정량 하였다. Hiroko Wada 등¹⁹은 4-hydroxy-3-(pyridylazo)-naphthalene-1-sulphonic acid와 tetrabutylammonium bromide를 이동상에 첨가하여 Fe(III), Co(II) 및 Ni(II)의 착물을 550 nm에서 이온쌍 방법으로 분리 검출하였다.

본 연구는 여러 금속이온과 가시영역에서 흡광계수가 큰 착물을 형성하는 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol(PAN)을 직접 acetonitrile-water 이동상에 첨가하여 ODS 컬럼을 사용한 역상계에서 Fe(III), Ni(II), Zn(II), Cu(II) 및 Co(II)의 분리를 시도하였다. 또한 분리에 미치는 여러 인자들을 조사하여 최적조건에서 이들 금속이온들을 효과적으로 분리 및 정량하였으며, 가시영역인 570 nm에서 분광광도 검출기로 ppb 수준까지 검출이 가능하였다.

실 험

기 기. 본 실험에서 사용한 HPLC는 Gilson사 제품으로 Gilson 306 pump, Gilson 118 UV/Vis Detector, Gilson 805 Manometric Module로 구성된 것이며 시료 주입기는 20 μ L rotary valve injector를 사용하였다. 컬럼은 Phenomenex사의 Lichrosorb 5 ODS column(150 mm \times 3.2 mm)을 사용하였다.

시 약. 킬레이트 시약인 PAN은 Dojindo 제품을 사용하였고, 분리하려는 금속이온은 원자흡광용 표준용액(1000 mg/L, Junsei 제품)을 사용하였다. 용매인 acetonitrile은 Tedia chemicals의 HPLC용을 사용하였으며 물은 일차 증류수를 Millipore Milli-Q에 통과시킨 탈 이온수를 사용하였다. 또한 기타 모든 시약은 BDH chemicals 제품을 사용하였다.

실험방법

용리액 조제. 이동상에 첨가한 킬레이트 시약은,

PAN 0.2492 g을 acetonitrile 100 mL에 용해시킨 0.01 M 용액을 저장용액으로 사용하였고, 실험조건에 따라 acetonitrile-water 용매로 묽혀 사용하였다. 이동상의 pH는 0.10 M 아세트산 완충용액을 사용하여 조절하였다. 또한 모든 이동상은 사용 전에 약 30분간 ultrasonic bath에서 산소를 제거한 후 0.45 μ m millipore 여과지로 흡인 여과하였다.

시료용액 조제. 1000 ppm 금속표준 용액을 일차적으로 10 ppm으로 묽혀 저장용액으로 사용하였으며, 금속이온의 가수분해를 방지하기 위하여 질산을 소량 가하였다. 시료용액을 필요에 따라 이 저장용액을 다시 묽혀 사용하였다.

HPLC 분리. 컬럼에 시료를 주입하기 전에 이동상을 통과시켜 이동상과 정지상이 완전히 평형이 되도록 약 500 mL 흘려주었다. 평형이 이루어졌을 때 비탄성이 안정하였고 각 시료의 머무른 시간이 일정하였다. 이동상의 흐름속도를 1.0 mL/min으로 고정하였고, 모든 실험은 실온에서 수행하였다. 시료는 20 μ L rotary valve를 통해서 주입하였고, 모든 시료의 검출은 PAN 시약과 각 착물의 파장의 겹침이 작고 금속착물의 흡수파장이 공통으로 크게 나타나는 570 nm에서 검출하였다. 이동상은 실험직전에 새로이 제조하여 사용하였다.

결과 및 고찰

pH 영향. PAN은 주계 원자로 피리딘질소, 아조 질소 그리고 히드록실 산소를 가진 새자리 리간드로 금속이온과 착물을 형성하는 성질이 크며, pH에 따라 금속이온과 1:1 또는 1:2의 비로 킬레이트를 형성한다.²⁰ 일반적으로 산성용액에서는 1:1 킬레이트를 형성하나 pH 증가에 따라 1:2 킬레이트가 우세하게 형성된다. 따라서 HPLC에서 킬레이트 형성에 의한 금속이온의 분리는 이동상의 pH에 크게 영향을 받을 것으로 생각된다. 실제로 Fig. 1은 이동상의 pH 변화에 따른 Fe(III), Ni(II), Zn(II), Cu(II) 그리고 Co(II)의 용량인자를 보여준다. 용리액의 pH는 컬럼 정지상의 안정성을 고려하여 pH 4.0에서 7.0사이에서 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 Ni(II)과 Fe(III)를 제외하고 나머지 이온들은 pH가 증가할수록 용량인자가 증가하는 경향을 보였다. 이와 같은 현상은 pH가 증가할수록 킬레이트의 안정성이 증가할

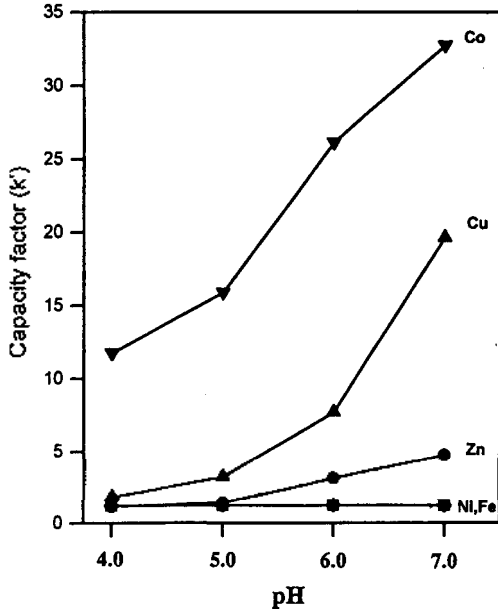


Fig. 1. Effect of pH on the capacity factors of metal ions. Mobile phase: acetonitrile-water (75:30 v/v) containing 5.0×10^{-4} M PAN.

뿐만아니라 금속이온과 리간드의 비가 1:2인 킬레이트 화합물을 형성하여 금속시료의 머무름이 증가되기 때문이라고 생각된다. 특히 Fe(III)의 용량인자가 작은 것은 양전하를 띤 착물을 형성함으로 소수성 정지상에 대한 머무름이 감소하기 때문이라고 생각된다. 이들 금속이온들을 상호 분리하기 위해서는 머무른 시간, 용량인자등 모든 조건을 종합적으로 고려해야한다. 이러한 조건을 조사한 결과 pH 6.0이 가장 최적실험 조건임을 알 수 있었다. pH 7.0에서는 분리시간이 길고 크로마토그램의 봉우리 너비가 넓어져 봉우리 높이가 크게 감소하는 현상이 나타났다. pH 5.0에서는 Zn(II), Ni(II) 및 Fe(III) 봉우리들이 겹쳐 상호분리가 되지 않고 꼬리떨기도 크게 나타났다. pH 6.0이 대체적으로 가장 적절한 조건이었으나, Ni(II)과 Fe(III)의 분리는 전혀 분리가 불가능하였다.

용매의 영향. 역상 크로마토그래피에서 이동상의 종류와 조성이 머무른 시간 및 분리도에 크게 영향을 준다. 역상계에서 주로 사용하는 유기용매는 메탄올과 아세토니트릴 용매이며, 이 두 용매에 대한 분리도를 조사한 결과 아세토니트릴이 메탄올보다 좋은 결과를 얻었다. 즉 같은 함량에서 아세토니트릴이 분리시간 및 분리도가 좋은 결과를 보여 주었으며, 메

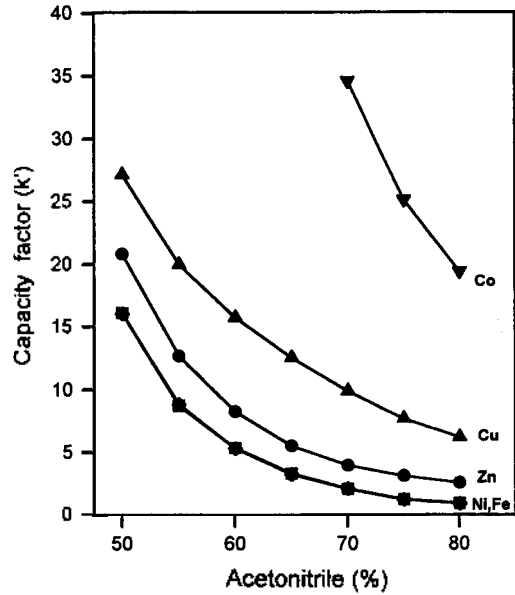


Fig. 2. Effect of acetonitrile percentage on the capacity factors of metal ions. Mobile phase: acetonitrile-water (v/v) containing 5.0×10^{-4} M PAN, pH 6.0.

탄올을 사용하였을 때는 크로마토그램의 꼬리떨기 현상이 나타났고, 컬럼에 걸리는 압력도 아세토니트릴보다 크게 나타났다. 따라서 본 실험에서는 아세토니트릴과 물을 혼합한 용매를 사용하였다.

Fig. 2는 이동상인 아세토니트릴의 조성변화에 따른 금속이온의 용량인자를 나타내었다. 아세토니트릴 함량이 증가할수록 모든 시료들의 용량인자가 감소되는 것을 볼 수 있는데, 그 원인은 역상계에서 유기용매의 농도가 증가할수록 이동상의 용매세기가 증가하여 금속시료의 머무름이 감소하기 때문이다. 이동상을 선택할 때에는 분리도와 분리시간을 함께 고려해야한다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 아세토니트릴의 조성이 감소하면 분리도는 증가하나 분리시간이 길어졌고, 반면 아세토니트릴의 조성이 크게 증가하면 분리시간은 짧으나 분리도는 감소되었다. 따라서 본 실험에서 acetonitrile-water(50:50, v/v)에서 acetonitrile-water(80:20, v/v)까지 변화시키면서 용량인자를 측정된 결과 분리도와 분리시간을 함께 고려할 때 acetonitrile-water의 비가 75:25 v/v 일 때 금속이온의 분리에 대한 최적 조건임을 알았다. Fig. 3은 5.0×10^{-4} M PAN을 포함하는 acetonitrile-water(75:25 v/v)이동상의 pH를 간격 5.0, 6.0 및 7.0로 조절한

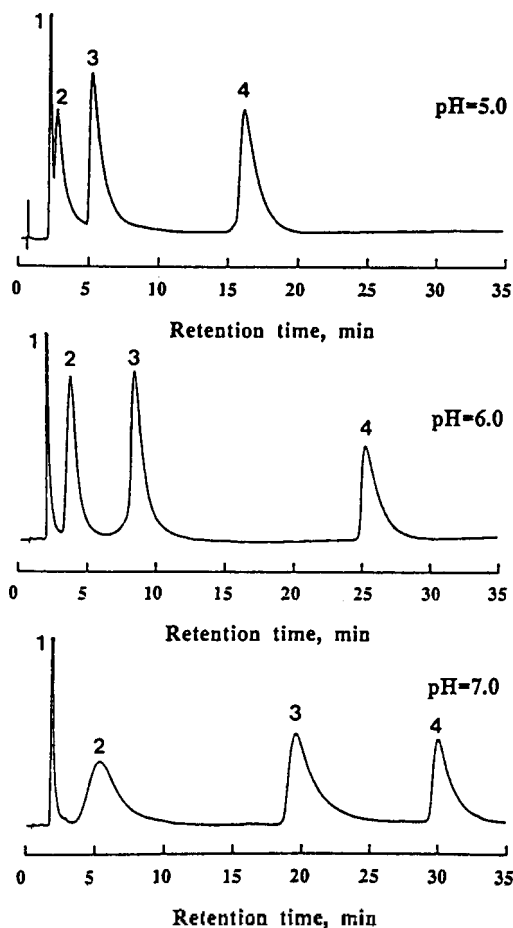


Fig. 3. Chromatograms of metal ions in the various pH. Mobile phase: acetonitrile-water (75:25 v/v) containing 5.0×10^{-4} M PAN, Amount of metal ions: 1. Fe(III), 2. Zn(II), 3. Cu(II): 80 ng, 4. Co(II): 40 ng.

Fe(III), Zn(II) Cu(II) 및 Co(II) 혼합시료의 크로마토그램이다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 5.0에서는 Fe(III)와 Zn(II)의 분리도가 좋지 않았으며 pH 7.0에서는 봉우리 넓힘현상이 크고 분리시간도 길게 나타났다. pH 6.0에서는 분리도 및 분리시간이 다른 두 실험조건에 비해 훨씬 양호한 결과를 보이고 있다.

PAN과 전해질의 농도 영향. 금속이온을 PAN으로 킬레이트화시켜 분리하기 때문에 크로마토그램의 분리도는 이동상에 포함된 PAN의 농도에 영향을 받을 것으로 기대된다. 본 실험에서 PAN의 농도변화에 따른 머무른 시간을 조사한 결과 시료의 머무름에는 별 영향이 없었다. 그러나 PAN의 농도가 검출기의 감도와 크로마토그램 봉우리의 너비에는 영

향을 주었다. PAN의 농도가 증가하여 1.0×10^{-3} M 이상일 때에는 검출기의 감도가 떨어지고 크로마토그램의 바탕선도 불안정하여 신호잡음이 증가하였다. 반면에 PAN의 농도를 감소시켜 1.0×10^{-4} M 이하가 되면 바탕선은 매우 안정되었으나 검출기의 감도가 저하되어 봉우리 높이가 감소하였다. 본 연구에서 PAN농도를 5.0×10^{-6} M~ 1.0×10^{-2} M 범위로 조절해 본 결과 5.0×10^{-4} M이 적절한 농도이었음을 알 수 있었다. 또한 이동상에 전해질을 첨가하여 이온세기 변화에 따른 용량인자를 측정하였다. 본 실험에서 사용한 전해질은 NaCl, NaNO₃, Na₂SO₄ 및 NaClO₃였다. 이들을 이동상에 첨가했을 때 금속이온 시료의 머무름이 크게 감소하였으나 이들 전해질 종류에 따른 큰 차이점을 발견할 수 없었다. 그러나 acetonitrile-water, 75:25 v/v 이동상에서 이들 전해질의 용해도 제한 때문에 그 중 용해도가 가장 큰 NaClO₃를 택하여 이 전해질의 농도변화에 따른 용량인자를 측정하여 Fig. 4에 도시하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 대체적으로 NaClO₃농도가 증가할수록 용량인자가 감소하는 경향을 보였으며, 특히 Co(II)의 경우 용량인자가 크게 감소하여 분리시간이 크게 단

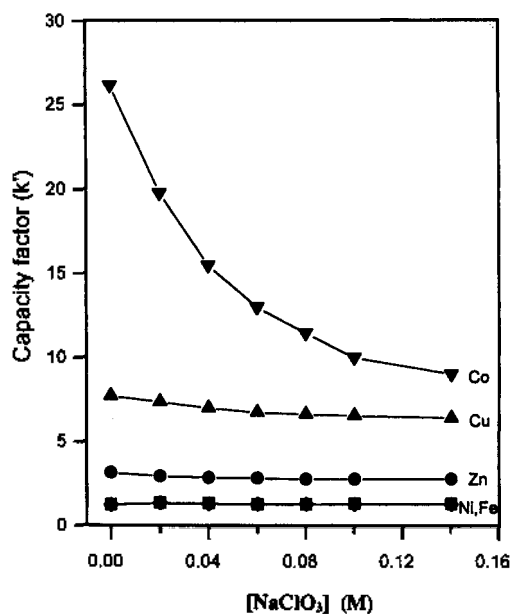


Fig. 4. Effect of ionic strength on the capacity factors of metal ions. Mobile phase: acetonitrile-water (75:25 v/v) containing of 5.0×10^{-4} M PAN and sodium chloride, pH 6.0.

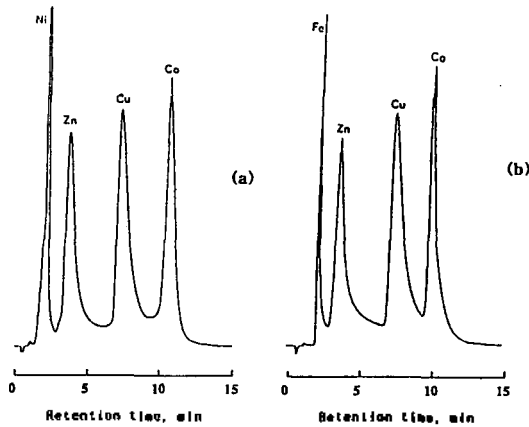


Fig. 5. Chromatograms of metal ions under the optimum conditions. Mobile phase: acetonitrile-water (75:25 v/v) containing of 5.0×10^{-4} M PAN and 0.1 M NaClO₃, pH 6.0. Amount of metal ions: Fe(III), Zn(II), Cu(II): 80 ng, Ni(II), Co(II): 40 ng.

측될 뿐 아니라, 분리도도 향상시킬 수 있었고 봉우리의 높이도 크게 증가하여 검출한계를 낮출 수 있었다. 이상의 실험결과로부터 이동상의 최적조건으로는 5.0×10^{-4} M PAN, 0.1 M NaClO₃, pH 6.0 및 acetonitrile-water(75:25 v/v)이였으며, 이러한 이동상으로 (a) Ni(II), Zn(II), Cu(II), Co(II) 및 (b) Fe(III), Zn(II), Cu(II), Co(II) 두 혼합시료를 분리한 크로마토그램을 Fig. 5에 표시하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 전해질 NaClO₃을 가했을 때 크로마토그램이 가하지 않았을 때(Fig. 3, pH 6.0)의 크로마토그램보다 분리도, 분리시간 그리고 봉우리높이가 크게 향상되어 분리를 보다 효과적으로 할 수 있음을 알 수 있다.

검량곡선. 위의 실험에서 얻은 최적조건(Fig. 5의 조건)에서 금속이온을 정량하기 위한 검량곡선을 작성하였다. 그 결과를 Table 1에 요약하였고, 이중 Cu(II), Zn(II) 및 Fe(III)의 검량곡선을 Fig. 6에 도시하였다. Table 1에서 나타난 결과와 같이 주어진 농도범위에서 각 성분의 상관계수가 거의 1에 가까운 양호한 지선을 보였으며 검출한계(S/N=3)도 ppb 수준까지 가능한 것으로 확인되었다.

방해이온의 영향. 본 연구에서 사용한 금속이온을 분리하는데 방해가 될 것으로 예상되는 여러 금속이온들, 즉 Cr(III), Mn(II), Pb(II), Cd(II), Hg(II), Ca(II) 및 Mg(II)이온의 영향을 조사하였다. 이들 방해이온을 가하였을 때와 가하지 않았을 때의 크로마토

Table 1. Calibration of metal ions

Metal ions	Linear regression parameters				Detection limits (ppb) (S/N=3)
	Slope	Intercept	Corr. coeff. (f)	Range of conc.	
Fe(III)	47173.4	27502.6	0.997	0.50-0.8	150
Zn(II)	81050.5	-9470.8	0.997	0.50-0.8	50
Cu(II)	107672.0	-15906.0	0.999	0.50-0.8	30
Co(II)	180009.2	-110119.1	0.998	0.20-0.4	15
Ni(II)	297993.4	67296.5	0.997	0.10-0.2	20

x=metal ion concentration, y=peak area Experimental conditions are same as in Fig. 5.

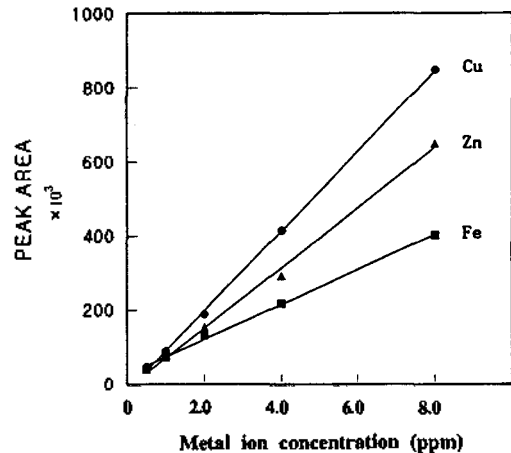


Fig. 6. Calibration curves of metal ions. Experimental conditions are same as in Fig. 5.

그램의 면적을 비교하여 이들 면적이 $\pm 3\%$ 오차범위내에서 일치할 때를 허용한계로 정하였다. 그 결과 이들 이온을 분리하려는 금속이온의 20배의 농도를 가하여도 방해를 받지 않는 것으로 확인되었다. 또한 음이온 F⁻, Cl⁻, Br⁻, SCN⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻ 등의 음이온에 의해 방해를 받지 않았으나, 금속이온과 착물화합물을 형성하는 성질이 큰 CN⁻ 및 EDTA는 방해를 받는 것으로 나타났다.

결론

역상액체크로마토그래피에서 금속이온을 분리하는데 종래의 용매추출이나 킬레이트를 합성하여 분리하지 않고 직접 이동상에 킬레이트시약을 첨가하여 컬럼 내에서 착물을 형성시켜 분리를 시도하였

다. 본 실험에서 Fe(III), Ni(II), Zn(II), Cu(II) 및 Co(II)의 크로마토그램에 영향을 주는 이동상의 여러 실험조건에서 얻은 결과는 다음과 같다.

1. 이동상의 pH를 4.0에서 7.0까지 변화시켜 본 결과 pH 6.0에서 가장 좋은 크로마토그램을 얻었다.

2. 이동상의 acetonitrile-water의 비를 변화시켜 본 결과 75:25(v/v)에서 분리도 및 분리시간이 적당하였다.

3. 이동상에 NaClO₃을 가하여 크로마토그램을 얻은 결과 NaClO₃을 가하지 않았을 때보다 분리시간이 단축되고 더 좋은 분리도를 얻었고 봉우리 높이도 증가하였다.

4. 이동상의 최적조건 5.0 × 10⁻⁴ M, 0.1 M NaClO₃, acetonitrile-water(75:25 v/v), pH 6.0에서 검량곡선을 얻은 결과 상관계수가 0.997-0.999로 양호한 직선성을 보였으며, 검출한계는 ppb 수준까지 검출이 가능하였다.

5. 방해이온으로 Ca²⁺, Mg²⁺, Cr³⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺ 이온을 분석이온 농도의 20배까지 첨가하여도 크로마토그램의 면적의 ±3% 허용범위내에서 방해를 받지 않았으며, CN⁻, EDTA을 제외하고 F⁻, SCN⁻, PO₄³⁻, Cl⁻, Br⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻ 등 여러 음이온들도 방해하지 않았다.

본 논문은 한남대학교 교비의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

- Bond, A. M.; Wallace, G. G. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1706.
- Bond, A. M.; Wallace, G. G. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 718.
- Shih, Y. T.; Carr, P. W. *Anal. Chim. Acta.* **1982**, *142*, 55.
- Schwedt, G.; Fresenius, Z. *Anal. Chem.* **1977**, *288*, 50.
- Weneclawiak, B.; Fresenius, Z. *Anal. Chem.* **1982**, *310*, 144.
- Weneclawiak, B.; Bickman, F. *Bunseki Kagaku*, **1984**, *E67*, 33.
- Bond, A. M.; Nagaosa, Y. *Anal. Chim. Acta.* **1985**, *178*, 97.
- Karcher, B. D.; Krul, I. S. *J. Chromatogr. Sci.* **1987**, *25*, 472.
- Baiocchi, C.; Saini, G.; Bertolo, P.; Cartoni, G. P.; Pettiti, G. *Analyst(London)*, **1988**, *113*, 805.
- Uden, P. C.; Pares, D. M.; Waters, F. M. *Anal. Lett.* **1975**, *8*, 795.
- Tollinche, C. A.; Risby, T. H. *J. Chromatogr. Sci.* **1978**, *16*, 448.
- Suzuki, N.; Saitoh, K. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1977**, *50*, 2907.
- Gurira, R. G.; Carr, P. W. *J. Chromatogr. Sci.* **1982**, *20*, 461.
- Huber, J. F. K.; Kraak, J. C.; Veenig, H. *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 1554.
- Saitoh, K.; Satoh, M.; Suzuki, N. *J. Chromatogr.* **1974**, *92*, 291.
- Saitoh, K.; Suzuki, N. *J. Chromatogr.* **1975**, *109*, 333.
- Roston, D. A. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 241.
- Shijo, Y.; Sakai, K. *J. Chromatogr.* **1985**, *333*, 33.
- Wada, H.; Nezu, S.; Ozawa, T.; Nakagawa, G. *J. Chromatogr.* **1984**, *295*, 413.
- Anderson, R. G.; Nickless, G. *Analyst(London)*, **1967**, *92*, 207.