

역상 액체 크로마토그래피에서 씨클로덱스트린 착물을 이용한 페놀유도체들의 머무름 거동 및 분리

문영자 · 강삼우*

대전실업전문대학 식품영양과

*한남대학교 이과대학 화학과

(1997. 11. 20 접수)

Retention Behavior and Separation of Phenol Derivatives through Cyclodextrin Complexes in Reversed-Phase Liquid Chromatography

Young-Ja Moon and Sam-Woo Kang*

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

*Department of Chemistry, Han Nam University, Taejeon 300-791, Korea

(Received November 20, 1997)

요 약: 15여종의 페놀 유도체들의 용량인자는 씨클로덱스트린의 농도, 이동상 중 유기용매의 종류와 농도, 온도 등에 영향을 받았다. 페놀유도체들의 머무름은 α -, β -씨클로덱스트린과의 내포착물 형성에 기인하며, α -씨클로덱스트린보다 β -씨클로덱스트린을 첨가하였을 때가 내포착물 형성이 훨씬 효과적이었다. 또한 시료의 머무름에 영향을 주는, MeOH, MeCN, THF 유기용매 중 메탄올 용액에서 내포착물 형성효과가 가장 강하고, 메탄올 용액의 농도가 증가할수록 k' 값이 감소하였다. $[CD]_T$ 에 대한 용량인자를 구하여 내포착물의 해리상수, K_D 값을 측정하고, pK_D 를 메탄올농도에 대해 도시한 직선의 절편으로부터 100% 물에서의 K_D 값을 구하였다. 한편, 분리인자, α 는 씨클로덱스트린의 농도뿐만 아니라 K_D 값 등에 상당히 영향을 받기 때문에, 씨클로덱스트린을 이동상에 첨가하고, 이동상 중 유기용매의 농도와 컬럼온도를 조절하여 페놀 유도체의 몇 가지 이성질체들을 이상적으로 분리하였다.

Abstract: The capacity factor of fifteen phenol derivatives was determined with respect to the concentration of α - or β -cyclodextrin [CD], the type as well as the content of organic solvent in the mobile phase, and the temperature. The effect of the inclusion complex formation between solutes and α - or β -cyclodextrin on their retention and selectivity has been investigated. The inclusion effect of β -cyclodextrin was the most effective in aqueous methanol, whereas only a poor effect was observed in aqueous tetrahydrofuran and aqueous acetonitrile. 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. It was possible to estimate the k_D values in 100% water from a linear plot of pK_D vs. water content in the solution by extrapolation. The separation factor, α , of two compounds has been found to be affected not only by the $[CD]_T$ but also by their K_D values. Under optimum conditions, some mixtures of phenol derivatives were able to separate successfully.

Key words: Cyclodextrin, Phenol, Liquid chromatography

1. 서 론

역상 액체 크로마토그래피(reversed-phase liquid

chromatography, RPLC)에서 머무름 메카니즘(retention mechanism)을 설명하는 많은 연구가 진행되었
다. Arunyanart들은 미셀 이동상을 이용한 액체 크로

마토그래피에서의 선택성(selectivity)에 대한 연구에서 시료의 머무름에 대한 미세 효과를 설명하기도 했다.^{1,2} 그리고 Marcus들은 crown ether를 첨가한 수용액에서 할로알칸을 추출할 수 있었으며, crown ether를 정지상으로 하여 아미노산을 분리하는 연구도 한 바 있다.^{3,4}

최근에 액체 크로마토그래피에서 이동상이나 정지상으로 α -, β -, γ -씨클로덱스트린(α -, β -, γ -cyclodextrins, CDs)이나 그 유도체를 이용한 연구가 진행되고 있다.⁵⁻¹² 씨클로덱스트린은 α -(1,4)-linked D-glucopyranose 단위가 6개 혹은 그 이상으로 된 원형의 소중합체(cyclic oligomer)이며¹² 동공의 크기가 다르고 소수성인 특성을 지니고 있어 씨클로덱스트린의 내부 공간 내에 유기화합물의 소수성부분이 침투하여 host-guest 내포착물을 형성할 수 있어서, 정지상이나 이동상으로 이용이 가능하다.

지방족 및 방향족 화합물들이라도 수용액에서 씨클로덱스트린과 host-guest 내포착물을 형성할 수 있기 때문에 이동상에 유기용매만을 사용하였을 때보다도 씨클로덱스트린을 첨가하여 이동상으로 사용하는 것이 이점이 될 수 있다. 씨클로덱스트린의 동공 크기와 시료분자의 크기나 기하학적인 구조, host-guest 사이의 반데르 발스 인력, 수소결합 및 소수성간의 상호작용 그리고 씨클로덱스트린 고리(ring)의 무리에너지(strain energy) 등과 같은 인자들이 시료분자들의 분배에 영향을 준다. 따라서, 씨클로덱스트린을 사용한 이동상과 시료분자와의 상호작용에 의한 머무른시간의 변화는 guest 분자 구조에 의존하기 때문에 순수 또는 혼합용매로 구성된 이동상과의 상호작용에 의한 것보다 다양한 머무름을 기대할 수 있어서, 이온성 또는 중성의 유기물, 무기물들이나 여러 구조 이성질체나 기하 이성질체를 선택적으로 분리하는데 매우 효과적이다.

Amstrong¹²에 의해 α -씨클로덱스트린을 첨가한 전개용매를 사용하여 얇은 층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)법으로 벤조산들의 R_f 값을 측정한 결과 o -, m - 및 p -이성질체의 분리에 효과적이었음이 알려진 후, 씨클로덱스트린을 이용한 여러 종류의 정지상과 이동상에 대한 다양한 용질의 머무름 거동에 대해 Sybilska,^{6,7} Debowski⁸⁻¹¹ 등에 의해 많은 연구가 계속 진행되고 있다.

또한 내포착물의 형성에 기인하는 머무른시간(re-

tention time)의 변화는 내포착물의 안정도와 관계가 있으므로 이동상에 첨가된 씨클로덱스트린의 농도와 시료분자의 머무른시간의 관계로부터 착물의 해리상수(dissociation constant)를 결정하였다.¹³

RPLC에서의 머무름 예측에 관한 대부분의 연구는 일정한 온도에서 정지상이나 이동상의 조성변화에 따른 머무름을 예측하는 것이었고, 또 부분적인 몇 가지 시료분자와 그 유도체들의 분리에 중점을 두고 있었다.

본 연구에서는 역상 액체 크로마토그래피에서 α - 및 β -씨클로덱스트린을 첨가한 유기용매를 이동상으로 하고, 분리관으로는 역상계에서 많이 이용하고있는 ODS(octadecylsilane)를 사용하여, 페놀 유도체들의 머무름거동을 조사하려고 한다. 용량인자들은 시료분자와 정지상과의 인력에도 기인되지만 이동상의 씨클로덱스트린과 시료분자와의 내포착물을 형성하는 안정도에 따라 변화될 것이다. 그리고 착물의 안정도는 씨클로덱스트린의 동공의 크기와 시료분자의 구조에 따라 영향을 받는다. 그러므로 시료분자의 용량인자를 구하여 이들의 머무름 메카니즘을 규명하고 시료분자와 α -, β -씨클로덱스트린의 내포착물의 안정성을 비교한다. 또한 씨클로덱스트린의 농도에 대한 시료분자의 용량인자와의 관계식을 이용하여 내포착물의 해리상수를 측정하고자 한다. 그리고 이동상에 첨가한 유기용매가 내포착물의 형성에 영향을 미치지 때문에 유기용매의 종류와 농도에 따른 용량인자를 측정하여 여러가지 시료들의 몇 가지 이성질체들을 분리하는데 알맞는 최적조건을 규명하려고 한다.

2. 실험

2.1. 실험기기 및 기구

본 연구에서 사용한 기기는 Pye-Unicam 제품의 Liquid Chromatograph로써 펌프는 PU 4010 이중펌프, 검출기는 PU 4020 분광광도검출기, 시료주입기는 20 μ 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.

2.2. 시료, 이동상 및 용매

본 연구에서 사용한 페놀류는 15종이며, 이들 모두

Aldrich사 특급시약으로 사용하였다. 이동상으로 사용한 유기용매는 HPLC용 methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran을 사용하였다. 이동상에 첨가한 α -, β -씨클로덱스트린은 Sigma사 제품인 특급시약을 정제하지 않고 사용하였으며, 실험에 사용한 모든 증류수는 1차 증류수를 Millipore Milli-Q를 통과시켜 증류한 탈이온수를 사용하였다.

2.3. 실험법

시료는 각각의 흡광도를 고려하여 HPLC용 메탄올에 녹여 10^{-3} ~ 10^{-5} M로 만들었으며, 이동상의 유기용매 및 씨클로덱스트린(CD)을 주어진 실험조건에 따라 일정한 농도로 이동상을 만든 다음 0.45 μ m millipore 여과지로 흡인여과한 후 초음파진동기를 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 머무른시간도 일정하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min으로 고정시켰으며, 일정 시간마다 실제로 용출되어 나오는 이동상을 뷰렛을 이용하여 확인한 결과 유속과 일치하였다. 시료는 시료주입용 microsyringe로 20 μ 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 증가시켰으며 THF-H₂O의 경우와 MeCN-H₂O의 경우는 25 $^\circ\text{C}$ 를 유지하였다. 용량인자, k' 는 시료의 머무름을 나타내는 값으로 다음과 같이 표시된다.

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

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료의 머무름에 대한 유기용매의 영향

씨클로덱스트린의 내포착물 형성은 수용액에서 더 쉽게 이루어지나, 순수한 물만을 이동상으로 하였을 때 씨클로덱스트린의 용해도가 제한되어 있고 또한 머무른시간이 너무 길어져서 시료의 분리에 어려움이 있으므로 이동상으로 물-유기 용매의 사용이 필요하다. 역상계에서 시료의 머무름값과 분리도(resolution,

Table 1. Effect of organic solvents on capacity factors

Compound	Organic solvent					
	40% MeOH		40% MeCN		40% THF	
	No addition	2 mM β -CD	No addition	2 mM β -CD	No addition	2 mM β -CD
Phenol	4.59	3.89	2.46	2.19	2.70	2.55
<i>m</i> -Fluorophenol	7.33	6.29	3.41	3.08	3.90	3.82
<i>p</i> -Fluorophenol	6.05	5.28	2.90	2.68	3.40	3.18
<i>o</i> -Nitrophenol	11.26	10.80	6.15	5.63	4.90	4.55
<i>m</i> -Nitrophenol	8.06	7.12	3.42	3.21	4.30	4.18
<i>p</i> -Nitrophenol	6.85	6.04	3.16	2.81	4.50	3.96
<i>o</i> -Cresol	10.27	8.92	4.77	4.07	4.75	4.14
<i>m</i> -Cresol	9.68	8.14	3.76	3.49	3.60	3.46
<i>p</i> -Cresol	9.87	7.98	3.82	3.45	4.10	3.41
<i>o</i> -Chlorophenol	11.21	9.29	4.47	4.01	4.35	4.23
<i>m</i> -Chlorophenol	16.45	13.86	5.60	4.99	6.35	5.82
<i>p</i> -Chlorophenol	15.45	12.81	5.26	4.63	5.57	5.18

Temperature: 25 $^\circ\text{C}$.

Rs), 그리고 내포착물의 형성상수(formation constant) 등은 이동상의 유기용매의 종류와 농도 등에 크게 의존된다. 몇 종류의 페놀 유도체들의 용량인자를 유기용매에 씨클로덱스트린을 가한 용리액에서 측정한 결과는 Table 1과 같다. 본 연구에서 선택한 유기용매는 40% MeOH, 40% MeCN, 40% THF이며, 온도 25°C에서 β -씨클로덱스트린을 가했을 때와 가하지 않은 상태에서 측정한 결과, MeCN나 THF보다 MeOH 용액에서 씨클로덱스트린을 가했을 때 k' 값이 씨클로덱스트린을 가하지 않았을 때 k' 값보다 작았다. 이것은 β -씨클로덱스트린과 페놀 유도체의 내포착물 형성이 MeOH 용액에서 비교적 쉽고 MeCN나 THF 용액에서는 착물형성이 약하게 나타났기 때문으로 생각된다. β -씨클로덱스트린과 시료분자의 착물형성은 이 메탄올에 가장 잘 형성된다. 그리고 또한 메탄올용액에서의 머무름값의 변화가 가장 다양하기 때문에 분리도를 증대시킬 수 있는 이점이 있어, 이동상으로는 유기용매 중에서 메탄올이 가장 좋다는 결론을 얻을 수 있다. 이동상에서 유기용매의 농도가 또한 시료의 k' 값에 영향을 준다. 이동상에 첨가한 메탄올의 영향으로 β -씨클로덱스트린과 페놀 유도체 분자사이의 내포착물 형성에 의한 머무름변화를 보기 위하여 4 mM β -씨클로덱스트린, 온도 25°C에서 메탄올농도를 25~50%까지 5% 간격으로 변화시키면서 페놀 유도체들의 용량인자를 측정하여 이동상의 메탄올 농도에 따른 $\log k'$ 값을 Fig. 1에 나타내었다. 여기서 보면 메탄올농도가 증가할수록 k' 값은 더욱 감소하는 현상을 볼 수 있다. 이동상에 첨가한 메탄올농도가 증가하게 되면 정지상과 시료의 소수성 상호작용이 감소하게 되어 메탄올농도가 증가할수록 시료의 용량인자는 감소하게 된다. 또한 크로마토그래피분리에 영향을 주는 변수 중에 분리도(α 나 Rs)를 증대시키는데 이동상의 조성 변화가 가장 효과적으로 많이 사용되고 있다. 분리시간이나 분리도의 증대에 영향을 미치는 용량인자 값의 범위는 대략 $1 \leq k' \leq 10$ 이므로 메탄올의 농도가 30~50%일 때 시료의 머무름이 적당하여 분리에 있어서 효율적인 조건이 되었고, 더 낮은 농도일 경우에 이성질체들의 분리도가 약간 증대됨을 볼 수 있다.

3.2. 이동상에 첨가되는 씨클로덱스트린에 의한 시료의 머무름변화

역상 액체크로마토그래피에서 정지상과 시료분자

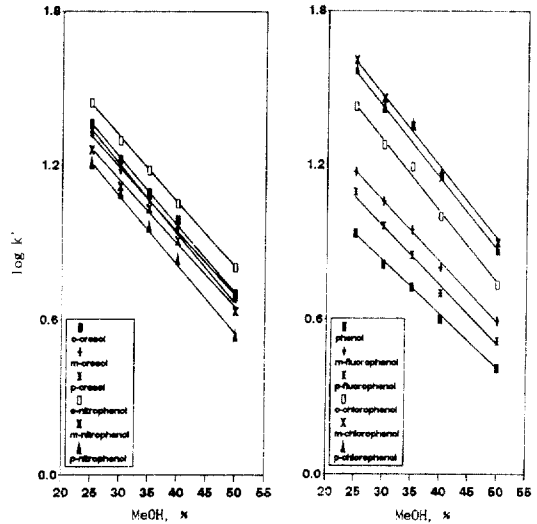


Fig. 1. Effect of methanol content in mobile phase on $\log k'$ of phenol derivatives: mobile phase, MeOH/H₂O=X/(100-X), containing 4 mM β -CD; T=25°C.

사이의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)은 시료분자의 머무름값을 결정함에 있어 중요한 역할을 한다. 이 소수성 상호작용은 이동상의 유기용매 종류와 농도에 의해 영향을 받을 뿐만 아니라, 이동상에 첨가되는 다른 물질에 의해서도 영향을 받기 때문에 이동상에 씨클로덱스트린을 첨가하였을 때 머무름의 변화를 기대할 수 있다.

이동상에 첨가한 씨클로덱스트린이 시료의 머무름에 대하여 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 몇 가지의 페놀 유도체를 선택하여, 40%의 메탄올 농도와 온도 25°C에서 씨클로덱스트린의 농도를 2.0 mM, 4.0 mM로 변화시켜 측정한 시료의 k' 값과 β -씨클로덱스트린을 이루고 있는 glucose 단위수와 같은 농도의 D-glucose를 첨가하여 k' 값을 측정한 것을 Table 2에 수록하였다. Table 2에서 씨클로덱스트린을 첨가한 상태와 첨가하지 않은 상태에서 비교해보면 α -, β -씨클로덱스트린을 첨가했을 경우 시료의 용량인자, k' 값은 씨클로덱스트린을 첨가하지 않았을 때보다 감소하였고, 이동상의 α -, β -씨클로덱스트린의 농도가 증가함에 따라 페놀 유도체들의 용량인자는 감소하게 되는데 이것은 씨클로덱스트린과 페놀 유도체가 내포착물을 형성하는 특성에 기인되고, 또한 내포착물 형성에 의해 시료인 페놀 유도체들은 정지상과의 소수성 상호작용이 감소됨으로써

Table 2. Effect of CD concentration in mobile phase on capacity factors

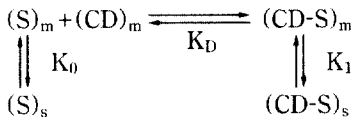
Compound	No addition	Concentration of α-CD		Concentration of β-CD		Concentration of Glucose
	0.0 mM	2.0 mM	4.0 mM	2.0 mM	4.0 mM	28.0 mM
Phenol	4.59	4.25	3.91	3.89	3.76	4.60
m-Fluorophenol	7.33	6.55	6.50	6.29	6.05	7.35
p-Fluorophenol	6.05	5.36	5.36	5.28	5.19	6.15
o-Nitrophenol	11.26	11.15	11.10	10.80	10.62	11.31
m-Nitrophenol	8.06	7.36	7.20	7.12	6.91	8.03
p-Nitrophenol	6.85	6.45	6.35	6.35	5.67	6.82
o-Cresol	10.27	9.52	8.77	8.92	8.81	10.34
m-Cresol	9.68	8.29	8.23	8.14	8.05	9.65
p-Cresol	9.87	8.82	8.36	7.98	7.52	9.87
o-Chlorophenol	11.21	10.43	9.64	9.29	8.80	11.26
m-Chlorophenol	16.45	14.82	14.41	13.86	13.05	16.44
p-Chlorophenol	15.45	13.82	13.28	12.81	11.50	15.50

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

정지상에 대하여 머무른시간이 짧아지기 때문에 시료의 용량인자는 씨클로덱스트린의 농도가 증가할수록 감소하는 것이다. 또한 α-씨클로덱스트린을 첨가했을 경우보다 β-씨클로덱스트린을 첨가했을 경우 용량인자가 더 많이 감소되는 것으로 보아 내포착물의 형성을 위한 β-씨클로덱스트린의 능력이 α-씨클로덱스트린의 능력보다 크다는 것을 알 수 있다. 그리고 내포착물을 형성할 수 없는 D-glucose를 첨가하여 측정한 k'값과 씨클로덱스트린을 첨가하지 않았을 때와의 k'값이 별로 큰 변화가 없는 것으로 보아 정지상에 대한 시료의 머무름 변화는 역시 시료와 β-씨클로덱스트린의 내포착물의 형성에 기인된다는 것을 알 수 있다.

3.3. 시료의 머무름에 의한 내포착물의 해리상수 측정

이동상에 씨클로덱스트린이 첨가되어 있을 때 컬럼에 있는 시료분자를 S라 하면



로 나타낼 수 있다. 여기서 아래첨자, 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), $K_0 = \frac{[(S)_s]}{[(S)_m]} \quad (2)$

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

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

여기서, Φ 는 컬럼의 상비이다.

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

$$k' = \Phi \frac{K_0 K_D}{K_D + ([CD]_T - [(CD-S)_m])} \quad (5)$$

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

$K_0 \Phi$ 는 CD가 첨가되기 전의 용량인자, k'_0 이다. 그러므로 식 (5)는

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{k'_0} + \frac{[CD]_T}{K_D k'_0} \quad (6)$$

으로 나타낼 수 있으며 Love와 Arunyanart¹⁴에 의하여 micellar chromatography에서 씨클로덱스트린을 함유하고 있는 유기 용매 이동상에서 시료분자의 머무름 특성을 서술할 때 제안된 식과 같다.¹⁵

이동상에 가해진 β-씨클로덱스트린의 농도에 따른 시료들의 1/k'값을 도식한 결과는 Fig. 2~4에 나타내

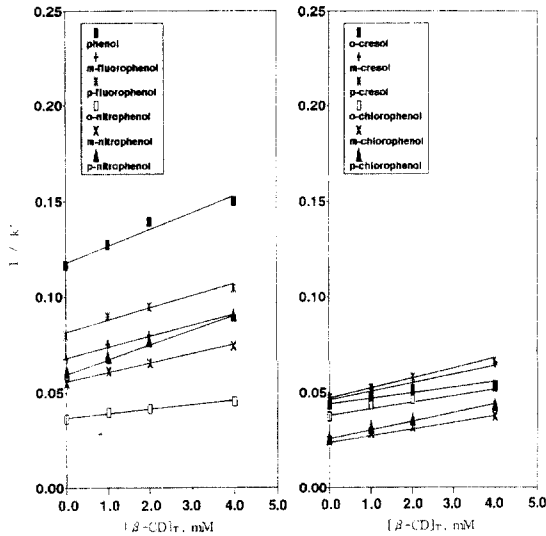


Fig. 2. Plot of $1/k'$ against $[\beta\text{-CD}]_T$ of phenol derivatives: mobile phase, methanol/H₂O (25/75); T=25°C.

었다. β-싸클로덱스트린과 시료 각각의 내포착물의 해리상수는 이 그림들의 직선에서 절편과 기울기를 구하여 식 (6)으로부터 계산이 가능하다. 이동상에 있는 싸클로덱스트린의 농도($[\beta\text{-CD}]_T$)가 증가하면 k' 값은 감소한다. β-싸클로덱스트린과 페놀 유도체에 의한 내포착물의 메탄올농도에 따른 해리상수를 계산하여 Table 3에 실었다. β-싸클로덱스트린의 내포착물 형성은 메탄올용액에서 보다 100% 물에서 더 쉽기 때

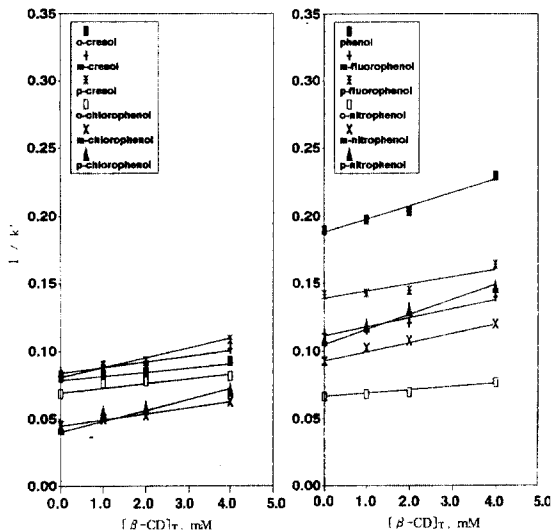


Fig. 3. Plot of $1/k'$ against $[\beta\text{-CD}]_T$ of phenol derivatives: mobile phase, methanol/H₂O (35/65); T=25°C.

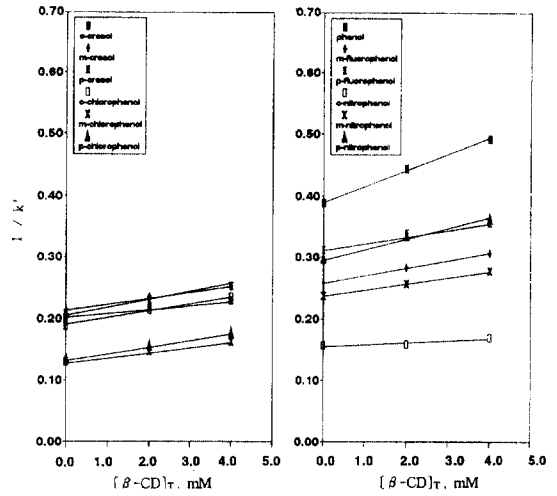


Fig. 4. Plot of $1/k'$ against $[\beta\text{-CD}]_T$ of phenol derivatives: mobile phase, methanol/H₂O (50/50); T=25°C.

문에 100% 물에서의 K_D 값보다 50% 메탄올용액에서 얻어진 K_D 값이 더 크다는 것이 합당하다. 액체 크로마토그래피에서 이동상에 유기용매를 첨가하지 않으면 시료분자의 머무른시간이 너무 길어지기 때문에 k' 값을 정확히 측정하기 어렵다. 머무른시간을 짧게 하기 위해서는 이동상에 유기용매의 첨가가 불가피하게 된다. 따라서 순수한 물속에서의 K_D 값 측정이 어렵다. 여러가지 농도의 메탄올 이동상에서 측정된 K_D 값을 이용하여 순수한 물에서 K_D 값을 얻고져 pK_D 값을 메탄올농도에 대하여 도식해 본 결과 직선을 얻을 수 있었고(Fig. 5) 이 직선의 절편에서 100% 물에 대한 pK_D 를 예측하여 순수한 물에서의 K_D 값 측정이 가능하였다. 얻어진 K_D 값을 Table 3의 오른쪽 컬럼에 수록하였다. Nitrophenol에 있어서 온도 20°C, pH 10인 수용액에서 측정된¹⁵ *o*-, *m*-, *p*-nitrophenol의 K_D 값(2.80×10^{-3} , 6.80×10^{-3} , 9.80×10^{-4})보다는 약간 큰 값으로 추정되었다. 이성질체사이의 분리도는 β-싸클로덱스트린의 농도뿐만 아니라, β-싸클로덱스트린과 페놀 유도체의 내포착물의 K_D 값에도 의존되므로 이동상에 β-싸클로덱스트린을 첨가하여 피이크의 분리도를 증진시킬 수 있다. 그리고 또한 이동상의 종류가 변화되지 않는다면, β-싸클로덱스트린농도와 이동상의 유기용매의 농도조성을 달리하여 분리도를 변화시킬 수 있다.

3.4. 이성질체의 분리

Table 3. Dissociation constants of β -CD inclusion complexes measured in aqueous methanol at 25°C and estimated values in 100% water

Compound	Concentration of methanol			100% Water
	25%	35%	50%	
Phenol	1.43×10^{-2}	1.89×10^{-2}	1.77×10^{-2}	
<i>m</i> -Fluorophenol	1.24×10^{-2}	1.57×10^{-2}	2.47×10^{-2}	5.71×10^{-3}
<i>p</i> -Fluorophenol	1.37×10^{-2}	2.41×10^{-2}	3.28×10^{-2}	6.57×10^{-3}
<i>o</i> -Nitrophenol	1.70×10^{-2}	2.46×10^{-2}	5.82×10^{-2}	4.71×10^{-3}
<i>m</i> -Nitrophenol	1.17×10^{-2}	1.44×10^{-2}	2.68×10^{-2}	4.88×10^{-3}
<i>p</i> -Nitrophenol	8.53×10^{-3}	1.11×10^{-2}	2.06×10^{-2}	3.59×10^{-3}
<i>o</i> -Cresol	1.84×10^{-2}	2.75×10^{-2}	3.47×10^{-2}	1.02×10^{-2}
<i>m</i> -Cresol	1.04×10^{-2}	2.06×10^{-2}	2.55×10^{-2}	4.83×10^{-3}
<i>p</i> -Cresol	9.61×10^{-3}	1.29×10^{-2}	2.10×10^{-2}	4.69×10^{-3}
<i>o</i> -Chlorophenol	1.03×10^{-2}	2.54×10^{-2}	1.74×10^{-2}	
<i>m</i> -Chlorophenol	7.88×10^{-3}	1.04×10^{-2}	1.85×10^{-2}	3.37×10^{-3}
<i>p</i> -Chlorophenol	6.27×10^{-3}	6.80×10^{-3}	1.47×10^{-2}	2.15×10^{-3}

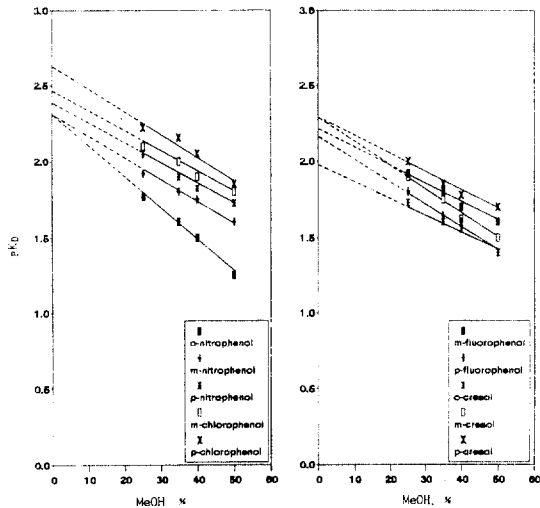


Fig. 5. Plot of pK_D of phenol derivatives against methanol content in mobile phase; $T=25^\circ\text{C}$.

페놀 유도체들의 이성질체 분리는 앞에서의 여러가지 실험 결과로부터 유기용매의 농도, β -씨클로덱스트린 농도뿐만 아니라 내포착물의 K_D 값에 영향을 받는다. β -씨클로덱스트린과의 내포착물 형성에 의하여 분리가 되는 시료에 대하여 분리를 시도하였다. 이동상을 30~50% 메탄올 용액, 온도를 25~40°C로 하고 β -씨클로덱스트린을 첨가한 상태와 첨가하지 않은 상태에서 페놀 유도체들의 이성질체의 분리를 비교하여 그 결과를 Fig. 6~9에 나타내었다.

Ethylphenol 이성질체에 대한 Fig. 6에서 40%

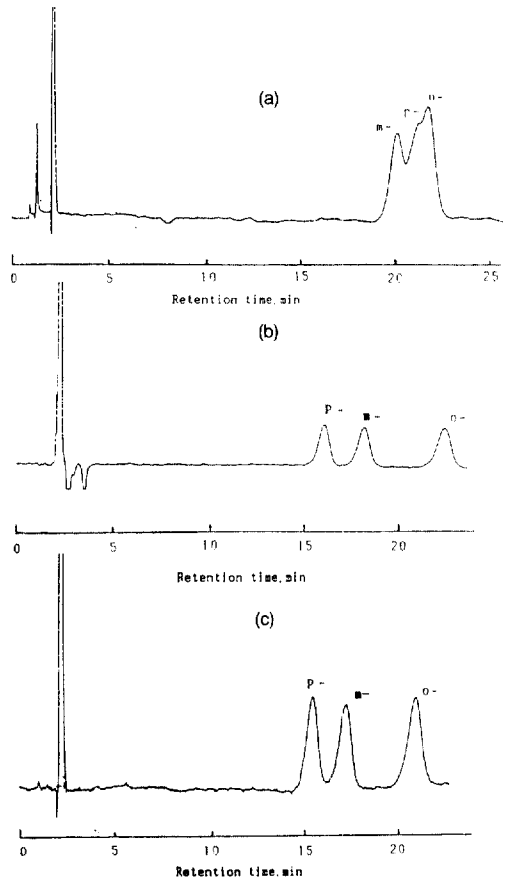


Fig. 6. Separation of ethylphenol isomers: mobile phase, 40% MeOH (a), 40% MeOH containing 7 mM β -CD at $T=25^\circ\text{C}$ (b) and 40% MeOH containing 7 mM β -CD at $T=30^\circ\text{C}$ (c).

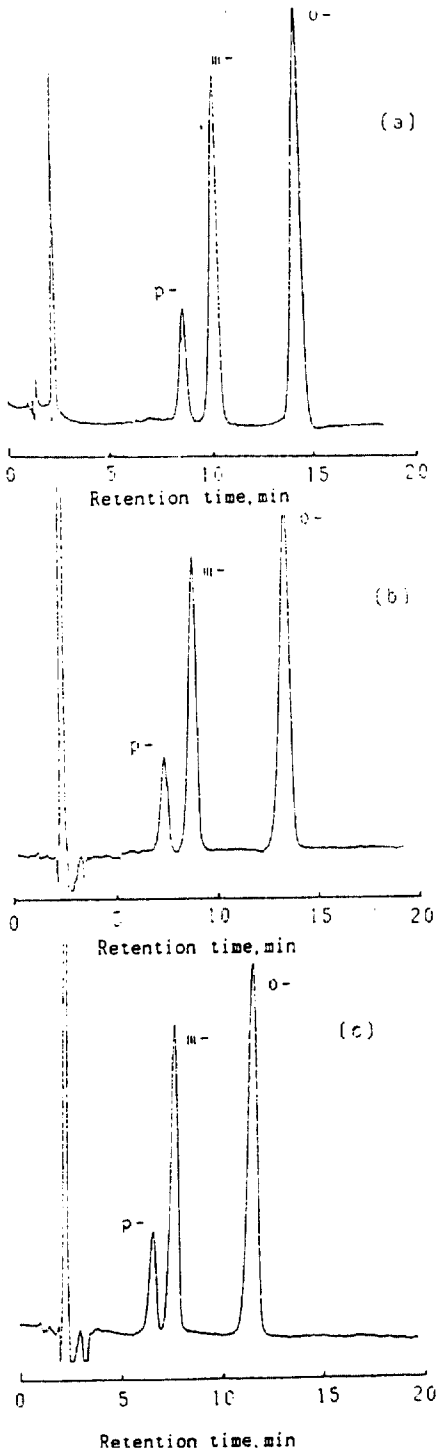


Fig. 7. Separation of nitrophenol isomers: mobile phase, 40% MeOH (a), 40% MeOH containing 7 mM β -CD at $T=30^{\circ}\text{C}$ (b) and 40% MeOH containing 7 mM β -CD at $T=40^{\circ}\text{C}$ (c).

MeOH 이동상에 β -씨클로덱스트린이 첨가되지 않았을 때의 용리순서는 $m < p < o$ 순이며 o -, p -ethylphenol의 $\alpha=1.00$ 으로 분리가 어렵고 m -, p -ethylphenol의 $\alpha=1.07$ 로 분리 또한 어렵지만{Fig. 6(a)}, 7 mM의 β -씨클로덱스트린의 첨가로 인하여 $p < m < o$ 순으로 용리 순서가 전환되면서 세가지 이성질체의 분리가 가능하였다{Fig. 6(b)}. 이 용리순서의 전환은 역시 착물의 안정도에 의한 것이며, 씨클로덱스트린 농도의 증가로 착물형성의 정도가 달라지기 때문이다. 그리고 온도의 상승으로 더욱 이상적으로 분리되었다{Fig. 6(c)}. 이들 유도체들의 머무름은 온도의

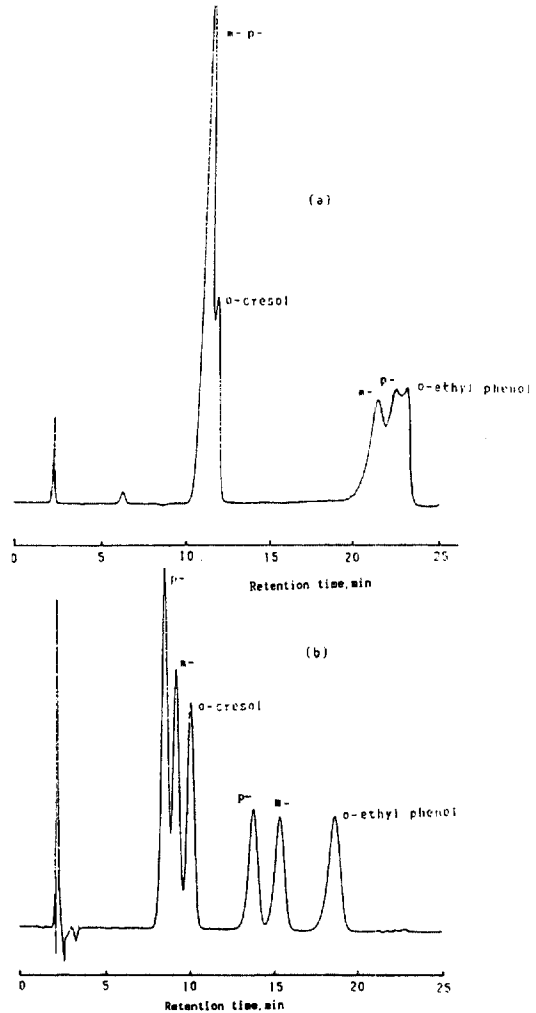


Fig. 8. Separation of cresol and ethylphenol isomers: mobile phase, 40% MeOH (a), 40% MeOH containing 7 mM β -CD (b) at $T=30^{\circ}\text{C}$.

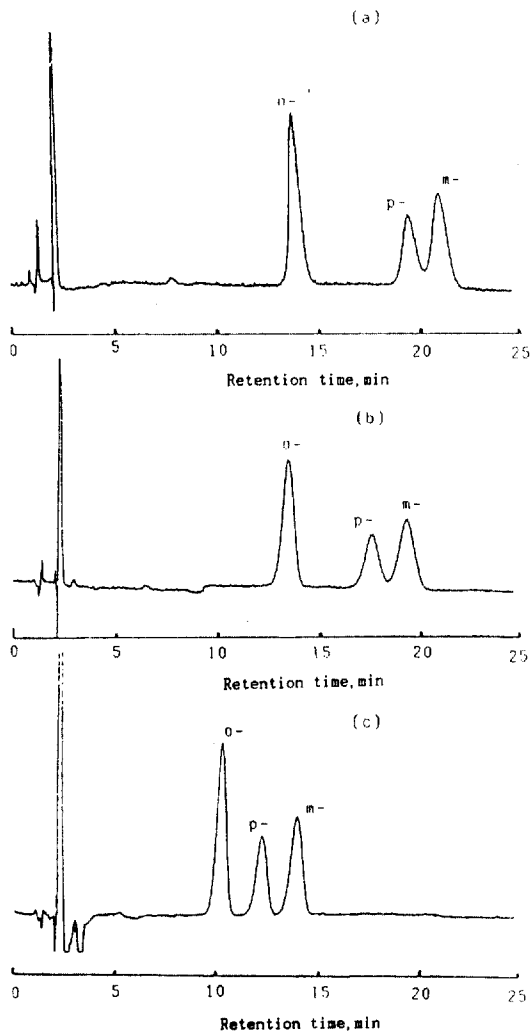


Fig. 9. Separation of chlorophenol isomers: mobile phase, 40% MeOH at T=25°C (a), 40% MeOH containing 9 mM α -CD (b) and 40% MeOH containing 7 mM β -CD (c) at T=30°C.

영향을 받는데, 온도를 상승시키면 정지상과 시료들의 순간적인 쌍극자형성에 의한 인력이 급격히 감소하게 되고, 이동상의 점도(viscosity)가 감소하게 되어, 시료의 머무름시간이 짧아졌으나 분리 효능은 다소 감소하여 온도를 40°C로 상승시켰을 경우 몇 가지 이성질체들을 분리하는데 분리도는 저하하였다.

Nitrophenol 이성질체들을 40% MeOH 용액에 7 mM β -씨클로덱스트린을 첨가한 이동상을 사용하여 이들을 분리하였고{Fig. 7(b)} 온도의 상승으로 분리도를 더욱 증대시킬 수 있었다{Fig. 7(c)}.

Fig. 8에서는 cresol과 ethylphenol 이성질체들의 혼합물을 분리시킨 결과, 분리도가 충분하지는 않았으나 7 mM의 β -씨클로덱스트린을 첨가시켜 다소 분리도가 증가되었다{Fig. 8(b)}.

Fig. 9는 chlorophenol 이성질체들에 대하여 이동상에 α -씨클로덱스트린을 첨가시켰을 때{Fig. 9(b)}와, β -씨클로덱스트린을 첨가시켰을 때{Fig. 9(c)}의 분리결과를 비교해 본 것이다. 페놀 유도체들과 씨클로덱스트린의 내포착물 형성에 의한 머무름의 변화와 분리시간 그리고 이성질체들의 분리도로 보아 α -씨클로덱스트린보다는 β -씨클로덱스트린이 페놀 이성질체들의 분리에 훨씬 효과적임을 알 수 있었다.

4. 결 론

이동상의 유기용매의 종류와 농도, α -, β -씨클로덱스트린의 농도변화, 컬럼의 온도변화와 같은 인자들이 페놀 유도체들의 정지상에 대한 머무름에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하고, 측정된 용량인자로부터 시료들의 최적 조건을 선택하여 몇 가지 페놀 유도체들의 이성질체의 분리를 시도하였던 바, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 이동상으로 MeOH, MeCN, THF 용액을 사용하여 시료의 머무름에 대한 유기용매의 효과를 본 결과, β -씨클로덱스트린과 페놀 유도체들의 내포착물 형성 효과가 MeOH 용액에서 가장 강하고, THF 용액에서 가장 약했기 때문에 이동상의 유기용매를 메탄올로 선택하였고, 메탄올의 농도를 증가시키면 정지상과 시료의 소수성 상호작용이 약화되어 k' 값이 감소되었다. 메탄올의 농도가 30~50%일 때가 페놀 유도체들의 이성질체의 분리에 가장 효율적이었다.

2. β -씨클로덱스트린농도에 따른 머무름변화를 측정해 본 결과, β -씨클로덱스트린의 농도를 증가시키면, 씨클로덱스트린과 내포착물 형성으로 인하여 페놀 유도체의 머무름은 감소하고 β -씨클로덱스트린의 내포착물 형성능력이 α -씨클로덱스트린보다 크다는 것을 알 수 있었다.

3. β -씨클로덱스트린의 농도에 따른 $1/k'$ 을 도시한 결과 직선 관계가 성립되고, 그 직선의 기울기로부터 K_D 값을 측정하고, 이동상의 메탄올 함량에 따르는 pK_D 를 도시하여, 직선을 얻었으며, 여기서 100% 물에서의 K_D 값을 계산하였다. 메탄올 용액에서 얻어진

K_D 값은 100% 물에서의 K_D 값보다 더 컸다.

4. 페놀 이성질체를 분리하기 위해, 분리도를 증대시키기 위한 수단으로 β -씨클로텍스트린 농도를 증가시키고 이동상의 온도와 유기용매 농도의 조성을 적당히 변화시켜, 페놀 유도체들의 몇 가지 이성질체들을 7 mM β -씨클로텍스트린, 40~50% 메탄올용액, 25~30°C에서 이상적으로 분리하였다. 또한 이동상에 α -씨클로텍스트린을 첨가하여 분리했을 때보다는 β -씨클로텍스트린을 이동상에 첨가하여 분리했을 때, 더욱 이상적으로 분리되었다.

참 고 문 헌

1. P. Yarmchuk, R. Weinberger, R. F. Hirsch and L. J. Cline Love, *Anal. Chem.*, **54**, 2233 (1982).
2. M. Arunyanart and L. J. Cline Love, *Anal. Chem.*, **56**, 1557 (1984).
3. Y. Marcus and L. E. Asher, *J. Phy. Chem.*, **82**, 1246 (1978).
4. T. Shinbo, T. Yamaguchi, K. Nishimura and M. Sug-iura, *J. Chromatogr.*, **405**, 145 (1987).
5. J. Debowski, D. Sybilska and J. Lipkowski, *J. Chromatogr.*, **237**, 303 (1982).
6. D. Sybilska, J. Lipkowski and J. Woycikowski, *J. Chromatogr.*, **253**, 95 (1982).
7. D. Sybilska, J. Debowski, J. Jurczak and Zukowski, *J. Chromatogr.*, **286**, 163 (1984).
8. J. Debowski, J. Jurczak and D. Sybilska, *J. Chromatogr.*, **282**, 83 (1983).
9. J. Debowski, G. G-Strazza and D. Sybilska, *J. Chromatogr.*, **349**, 131 (1985).
10. J. Debowski, J. Jarczok, D. Sybilska, J. Zukowski, *J. Chromatogr.*, **329**, 206 (1985).
11. J. Debowski and D. Sybilska, *J. Chromatogr.*, **353**, 409 (1986).
12. W. L. Hinze and D. W. Armstrong, *Analytical Letters*, **13**(A12), 1093 (1980).
13. T. K. Korpela and J. P. Himanen, *J. Chromatogr.*, **290**, 351 (1984).
14. L. J. Cline Love and M. Arunyanart, *Acs Symp. Ser.* **297**, 226 (1986).
15. K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takajanagi and T. Ando, *Anal. Chem.*, **58**, 2668 (1986).