

## 이온 크로마토그래피용 Open Tubular Capillary 컬럼의 개발

表東震\* · 金虎顯†

강원대학교 자연과학대학 화학과

서울의과학연구소

(2000. 11. 9 접수)

### Development of Open Tubular Capillary Columns for Ion Chromatography

Dongjin Pyo\* and Hohyun Kim†

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Seoul Medical Science Institute, Seoul 140-809, Korea

(Received November 9, 2000)

**요 약.** 본 연구에서는 적은 양의 시료를 분석할 수 있는 이온 크로마토그래피용 open tubular capillary 컬럼을 개발하였다. 내경이 작은 모세관 컬럼을 사용하는 경우 이동상의 유속은 보통 1-10  $\mu\text{L}/\text{min}$  정도 되고 컬럼의 길이는 1.0-5.0 m 정도이다. 컬럼은 fused silica 모세관(내경: 50  $\mu\text{m}$ )과 DMECHA latex particles를 이용하여 만들었다. 또한 이런 모세관 컬럼에 맞는 새로운 전도도 셀과 억압장치도 함께 개발하여 사용하였다. 이 모세관 컬럼을 이용하여 실제 음이온들(fluoride, nitrite, nitrate, chlorate, phosphate, sulfate)을 분석한 결과 재현성 있고 좋은 크로마토그램을 얻었다.

**ABSTRACT.** In this study, open tubular capillary columns for ion chromatography were developed to analyze trace amount of ions in samples. When small I.D. capillary columns are used in ion chromatography, the typical flow rate of the mobile phase is 1-10  $\mu\text{L}/\text{min}$  and the typical column length is 1.0-5.0 m. The capillary columns were made using fused silica capillary(I.D.: 50  $\mu\text{m}$ ) and DMECHA latex particles. The new conductivity cell and suppressor were also developed and made for capillary column ion chromatography. When several anions(fluoride, nitrite, nitrate, chlorate, phosphate, sulfate) were analyzed using these capillary columns, reproducible and good chromatograms were obtained.

### 서 론

양·음이온으로 존재하는 무기 및 유기물들을 분리, 검출하는 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC)는 1972년 H. Small 등에 의해 처음 소개되었고, 1975년 Small, Sreven 및 Bauman 등에 의해 화학적 억제컬럼과 전기 전도도 검출기를 사용한 새로운 이온 교환 크로마토그래피(Ion Exchange Chromatography, IEC)가 사용되기 시작했다.<sup>1</sup> 이 이온 교환 크로마토그래피는 분리컬럼과 전기 전도도 검출기 사이에 화학적 억제컬럼(chemical suppressor)을 장착하여 사용함으로

써 용리액의 전도도가 높음에 따라 검출 이온의 감도가 낮아지는 문제를 해결하였고 이로 인해 매우 급속도로 발전되었다.

이온 크로마토그래피의 초기 대상 시료는  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  및  $\text{SO}_4^{2-}$  등의 간단한 무기 음이온이었으며, ppm 농도 범위로 약 30분 이내에 재현성이 좋은 분리분석이 가능하였다. 이후 이온 크로마토그래피의 활용범위가 확대되어 무기이온의 경우는 1976년 알칼리 및 알칼리 토금속, 1980년경에는 금속-EDTA 착이온, 1983년에는 전이금속, 그리고 1986년에는 희토류금속의 분석이 가능해 졌다. 한편 유기시료

의 경우는 1977년에 저급 유기산과 아민류, 1980년경에는 알킬 술폰산류와 당 및 알코올류, 그리고 1982년에는 아미노산류가 가능해 졌다.<sup>2,3</sup> 이러한 이온 크로마토그래피의 발전은 전형적 무기이온의 분석법이었던 적정법, 침전법, 무게분석법 및 비색법의 많은 제한점과 단점들을 극복하였다.

현재 이온 크로마토그래피는 환경 및 임상시료 중에 함유된 미량 이온성 화합물의 분리·검출에 가장 많이 사용되는 분석방법중의 하나이다. 미국에서는 환경시료 중 F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 및 S<sup>2-</sup> 등의 분석법이 이온 크로마토그래피를 이용한 분석법으로 공인되어 있고, 국내에서도 수질환경시료 중 음이온인 F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 및 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>의 정성 및 정량분석 시험법이 이온 크로마토그래피를 이용한 분석법으로 환경저 체 91-85호로 고시된 바 있다.<sup>4</sup> 그리고 대기시료 중에서도 미량으로 존재하는 nitrite, nitrate, sulfate 등의 분석에도 사용되고 있다. 또한 이온 크로마토그래피는 해수중 음이온들의 정량분석과 생체시료중 유기산들의 정량분석 및 무기 양·음이온들의 정량분석에도 활용되고 있다.

최근에 발생되는 수질오염물질들(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>와 같은 질소화합물과 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 같은 인 화합물)은 시냇물, 호수, 냇지, 하천 등으로 흘러 들어가 부영양화를 일으키며 어패류의 폐죽음을 일으키고 있으며 또한 SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> 같은 대기오염물질들은 생명체나 건물, 시설물 등에 피해를 주고 공기 중에서 HNO<sub>3</sub>와 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 변하여 산성우를 야기해 더욱 심각한 피해를 주고 있다. 현재 이와 같은 수질오염물질들 및 대기오염물질들은 이온 크로마토그래피에 의해 주로 측정되는데, 이러한 환경오염물질들이 자연계에 워낙 미량으로 존재하기 때문에 시료채취에 많은 시간을 소모하게 되는데 모세관 컬럼을 쓰면 이 같은 문제점을 해결할 수 있다.

앞에서 언급한 바와 같이 이온 크로마토그래피는 주로 미량의 이온성 화합물들을 분리, 검출하는데 많이 사용되는데 모세관 컬럼을 사용하게 되면 보통 이온 크로마토그래피 컬럼 때보다 필요한 시료의 양이 1/100~1/1000로 감소하게 된다. 따라서 미량 이온들의 분석을 위해 모세관 컬럼을 사용하는 이온 크로마토그래피가 개발된다면 종래의 이온 크로마토그래피 보다 몇 가지 큰 장점을 갖게 될 것이다. 이 장점들은: 적은 양의 시료로도 분석이 가능하고,<sup>5</sup> 분리효율의 향상,<sup>6</sup> 훨씬 적은 양의 용매 사용,<sup>7</sup> 빠른 분석시간<sup>8</sup> 등을 들 수 있다.

고성능 액체 크로마토그래피에서는 이미 이러한 작은 내경의 모세관 컬럼을 이용한 연구가 수행된 바 있으며,<sup>9</sup> 이에 대한 이론적인 연구와<sup>10</sup> 아울러 실제 다양한 시료에 적용된 바 있다.<sup>11</sup> 그러나 이온 크로마토그래피에서는 아직 이러한 시도가 거의 이루어져 있지 않으며 초보적인 실험데이터만을<sup>12</sup> 찾아볼 수 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 open tubular capillary 컬럼 형태의 이온 크로마토그래피용 모세관 컬럼을 독자적으로 개발하였기에 보고하고자 한다.

이온 크로마토그래피용 open tubular capillary 컬럼은 latex particles를 fused silica capillary 내벽에 장착시키는 형태로 개발하였다. 이 latex 입자들은 매우 작은 직경(약 200~600 nm)을 가지고 있으며 음이온 교환 그룹인 -R<sub>3</sub>N<sup>+</sup>를 나란으로 포함하고 있다. 따라서 fused silica capillary 내벽을 처리하여 active surface silanol group의 수를 최대한 크게하고 latex particles를 통과시켜 silanol group의 음전하와 latex particles의 양전하 사이의 정전기적 인력을 이용해 컬럼을 제작하였다.

또한 본 연구에서는 실제 시료 분석을 위해 위와 같은 방법으로 제작한 이온 크로마토그래피용 open tubular capillary 컬럼을 기존의 본 연구실에서 개발한 모세관 컬럼용 전도도 셀과 역압장치<sup>13</sup> 함께 사용하였다. 그리고 이를 실제 시료에 적용한 결과 앞서 개발한 이온 크로마토그래피용 packed capillary 컬럼처럼<sup>14</sup> 좋은 크로마토그램을 얻었다.

## 실 험

본 연구에 사용한 모든 시약은 analytical reagent grade이었으며, 물은 종류시킨 후 deionize시킨 것을 사용하였다. 펌프는 micro-HPLC 펌프(Micro-Tech Scientific, Model Prodigix 4P, Sunnyvale, USA)를 사용하였으며 oven은 Varian 3400 GC oven(Sunnyvale, USA)을 사용하였다. 그리고 용리액의 전도도는 Dionex model QIC-2 Analyzer 전도도 검출기(Sunnyvale, USA)로 측정하였다.

본 연구에서 개발한 open tubular capillary 컬럼은 fused silica capillary(내경: 50 μm)에 DMECHA latex particles(직경: 559 nm)를 내벽에 장착시키는 형태로 개발하였으며 이를 확인하기 위해 SEM(Scanning Electron Microscope) 이미지를 통해 확인하였다(Fig. 1)

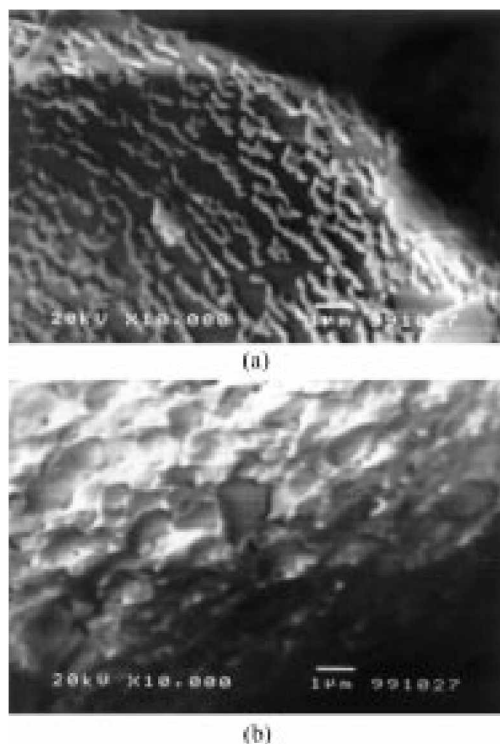


Fig. 1. SEM images of an inside open tubular capillary column. (a) before. (b) after a coating of DMEOHA latex particles.

한편 역압장치는<sup>13</sup> 양이온 교환막 튜브인 Nafion 811x perfluorosulfonate membrane tube(Du Pont polymer products division, Wilmington, DE)로 제작하였으며 (Fig. 2) 전도도 셀은<sup>13</sup> 두 개의 27gauge 백금 피하주사 바늘(point style #1, PN 21127, Hamilton Co., Reno, NV)을 약 10 mm 길이의 microbore PTFE 튜브(외경: 2.70 mm, 내경: 0.010 mm) 속으로 삽입시켜 간격이 2 µm되게 제작하였다(Fig. 3).

그리고 Fig. 4는 위와 같은 실험을 하기 위해 고안된 장치의 전반적인 보식도이다.

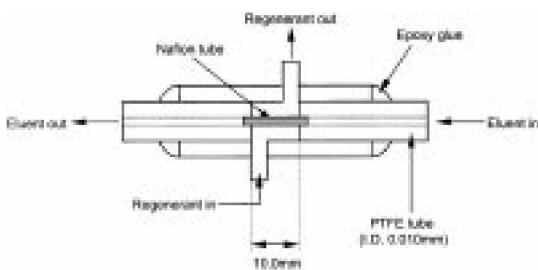


Fig. 2. Schematic diagram of the Nafion suppressor.

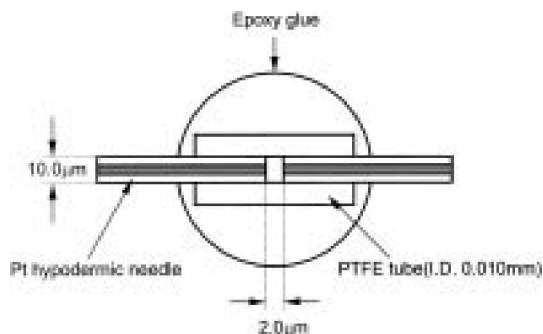


Fig. 3. Schematic diagram of the micro-volume conductivity cell.

### 결과 및 고찰

모세관 컬럼 이온 크로마토그래피(capillary column ion chromatography)가 가지는 가장 큰 장점은 적은 양의 시료로도 분석이 가능하며 분리 효율이 향상된다는 점이다. 그리고 대부분의 환경시료중에 양·음이온들이 미량으로 존재한다는 것을 고려하면 모세관 컬럼 이온 크로마토그래피의 개발은 필수적이라 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 이온 크로마토그래피용 open tubular capillary 컬럼을 개발하였으며 실제로 이를 이용하여 음이온들을 분석한 결과 좋은 분리능을 보여주었다.

본 연구에서 개발한 open tubular capillary 컬럼은 fused silica capillary(내경: 50 µm)에 DMEOHA latex particles(직경: 559 nm)를 내벽에 장착시키는 형태로 개발하였다. 이를 위해 우선 0.5% HF 용액, Methylene Chloride, 0.1M NaOH 용액을 각각 30분, 10분, 30분씩 흘려주어야 한다. 이렇게 하여 fused silica capillary 내벽의 active surface silanol group의 수를 최대한 크게하고 DMEOHA latex particles를 통과시켜 silanol group의 유전하와 latex particles의 양전하 사이의 정전기적 인력을 이용해 DMEOHA latex particles를 내벽에 붙게 하였다. 이와 같은 방법으로 제작된 open tubular capillary 컬럼은 실온에서 24시간 정도 건조시킨 뒤 사용하였다.

또한 본 연구에서는 위와 같은 방법으로 제작된 컬럼의 분리효율 향상을 위해 1.0 m 컬럼과 3.5 m 컬럼 두 가지를 제작해 (1) 용리액의 유속, (2) 용리액의 농도 그리고 (3) 온도 등을 변화시켜가며 실험하였다.

우선 1.0 m 컬럼에서 용리액의 농도를 10 mM NaOH, 온도를 30 °C로 일정하게 한 뒤 용리액의 유속

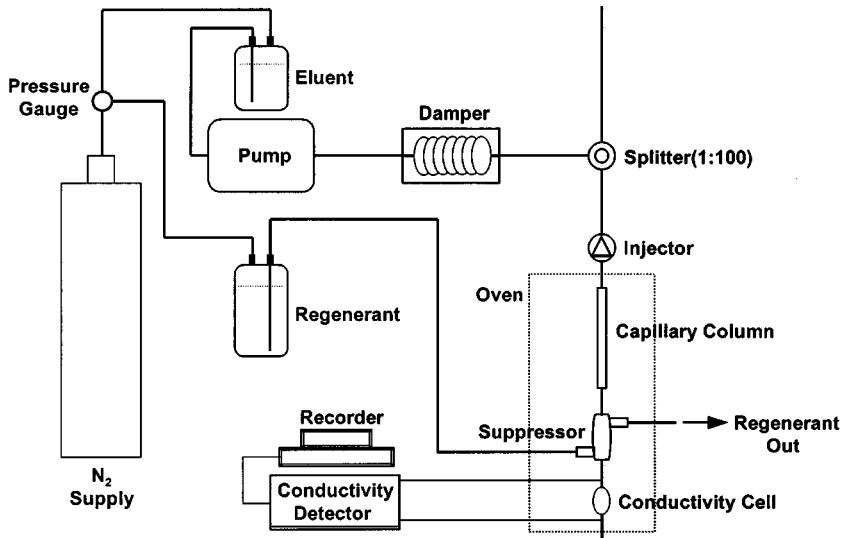


Fig. 4. The overall ion chromatographic system using the capillary column, suppressor and conductivity cell.

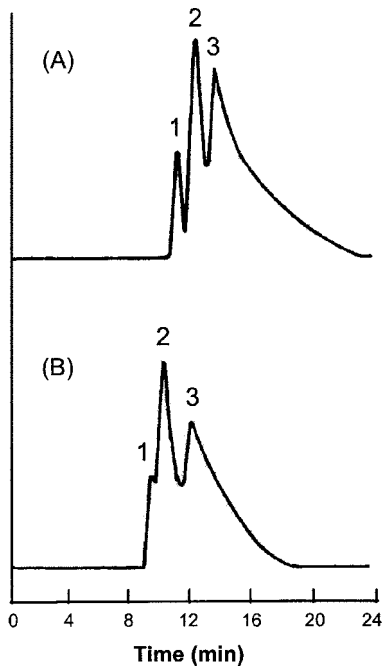


Fig. 5. Chromatograms of the anion mixtures with different flow rates. Peak 1) fluoride, 2) nitrite, 3) chlorate. Conditions: eluent=10 mM NaOH, column length=1.0 m, temperature=30 °C. (A) 0.7  $\mu\text{L}/\text{min}$ , (B) 1.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

을 변화시켜가며 실험하였다. 다음의 Fig. 5는 이에 대한 크로마토그램을 보여주는 것이다. 이 크로마토그램에서 보듯이 Fig. 5(a)의 유속에서는 fluoride와

nitrite가 잘 분리되었으나 nitrite와 chlorate의 피크가 겹침을 보였고 또한 피크 tailing이 심하게 나타났다. 그리고 Fig. 5(b)의 유속에서는 fluoride, nitrite, chlorate의 모든 피크가 겹쳤을 뿐만 아니라 피크 tailing 또한 심하게 나타났다. 위 크로마토그램에서 보듯이 1.0 m 컬럼에서 fluoride, nitrite, chlorate를 모두 겹침없이 분리하기 위해서는 유속을 너무 낮추어야 하는데, 유속을 0.7 ml/min 이하로는 조절하기 어렵기 때문에 1.0 m 컬럼에서는 더 이상 실험을 할 수 없었다.

다음으로 3.5 m 컬럼에서, 첫 번째로 용리액의 농도를 10 mM NaOH, 온도를 30 °C로 일정하게 한 뒤 용리액의 유속을 변화시켜가며 실험하였다. 다음의 Fig. 6은 이에 대한 크로마토그램을 보여주는 것이다. 이 크로마토그램에서 보듯이 Fig. 6(a)의 유속에서는 fluoride, nitrite, chlorate의 세 피크가 모두 잘 분리되었으나 Tailing이 심하게 나타남을 알 수 있었다. 그리고 Fig. 6(b)의 유속에서는 fluoride, nitrite, chlorate의 모든 피크가 잘 분리되었고 약간의 피크 tailing을 보였다. 따라서 용리액의 유속 조건을 5.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 결정하였다.

다음 두 번째로 용리액의 농도를 변화시켜가며 실험하였다. 이를 위해 용리액의 유속은 앞서 실험에서 결정한 유속 조건(5.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ )으로 고정하고 온도는 30 °C로 일정하게 한 뒤 용리액의 농도를 10 mM과 50 mM로 달리 하여 실험하였다. 다음의 Fig. 7은 이에 대한 크로마토그램을 보여주는 것이다. 이 크로마토그램에서 보듯이

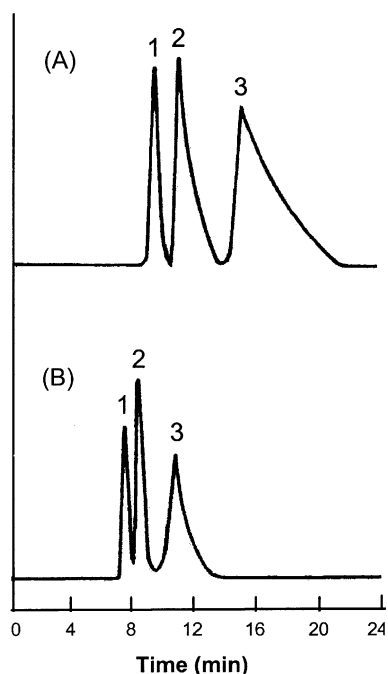


Fig. 6. Chromatograms of the anion mixtures with different flow rates. Peak 1) fluoride, 2) nitrite, 3) chlorate. Conditions: eluent=10 mM NaOH, column lengths=3.5 m, temperature=30 °C. (A) 3.0 µL/min, (B) 5.0 µL/min.

Fig. 7(a)의 농도에서는 fluoride, nitrite 그리고 chlorate의 세 피크가 모두 잘 분리되었으나 약간의 tailing이 나타남을 관찰할 수 있었다. 그리고 Fig. 7(b)의 농도에서는 fluoride, nitrite, chlorate의 모든 피크가 잘 분리되었고 tailing이 현저히 줄어들음을 알 수 있었다. 따라서 용리액의 농도 조건은 50 mM로 결정하였다.

다음 마지막으로 온도를 변화시켜가며 실험하였다. 이를 위해 용리액의 유속과 농도는 앞서 실험에서 결정한 유속 조건(5.0 µL/min)과 농도조건(50 mM NaOH)으로 고정하고 온도를 30 °C와 50 °C로 달리하여 실험하였다. 다음의 Fig. 8은 이에 대한 크로마토그램을 보여주는 것이다. 이 크로마토그램에서 보듯이 Fig. 8(a)와 Fig. 8(b)의 온도에서 fluoride, nitrite, chlorate의 모든 피크가 잘 분리됨을 알 수 있었다. 그러나 Fig. 8(b)의 조건하에서, nitrite, nitrate, chlorate를 분리할 경우 nitrate와 chlorate의 피크가 겹치기 때문에 온도는 30 °C로 결정하였다.

위의 네 가지 분리효율 향상 실험을 통해 얻은 조건들(컬럼 길이: 3.5 m, 용리액의 유속: 5.0 µL/min,

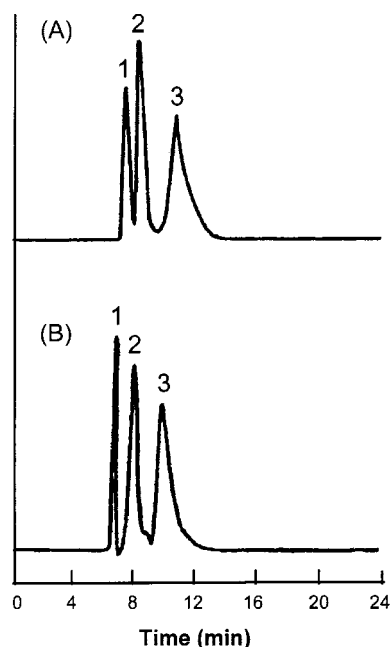


Fig. 7. Chromatograms of the anion mixtures using different eluents. Peak 1) fluoride, 2) nitrite, 3) chlorate. Conditions: flow rate=5.0 µL/min, column lengths=3.5 m, temperature=30 °C. (A) 10 mM NaOH, (B) 50 mM NaOH.

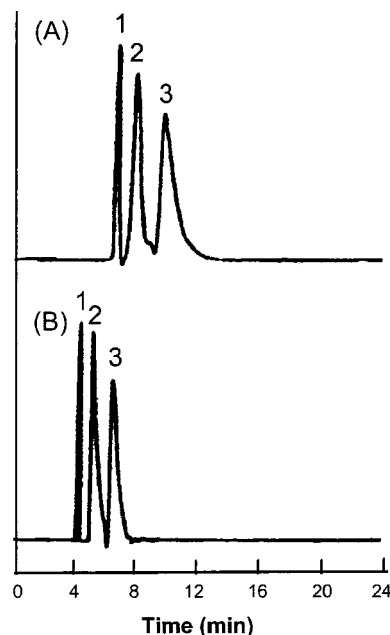


Fig. 8. Chromatograms of the anion mixtures with different temperatures. Peak 1) fluoride, 2) nitrite, 3) chlorate. Conditions: eluent=50 mM NaOH, column lengths=3.5 m, flow rates=5.0 µL/min. (A) 30 °C, (B) 50 °C.

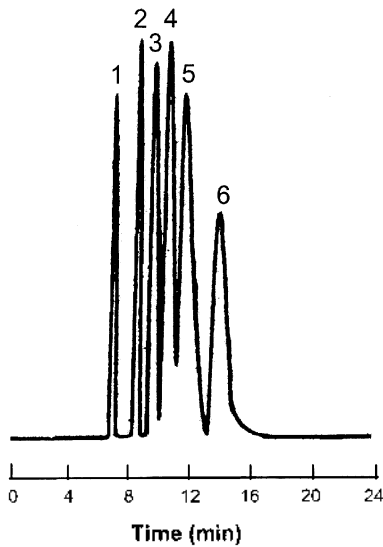


Fig. 9. Chromatograms of a anion mixture using newly developed open tubular capillary column (column length: 3.5 m). Peak 1) fluoride, 2) nitrite, 3) nitrate, 4) chlorate, 5) phosphate, 6) sulfate. Conditions: eluent=50 mM, flow rates=5.0  $\mu$ l/min temperature=50 °C.

Table 1. Analytical results of retention times of fluoride, nitrite, nitrate, chlorate using newly developed packed capillary column for micro-column IC

Sample ion	Retention time min <sup>a</sup> ±SD <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup> (%)
Fluoride	6.75±0.09	1.33
Nitrite	8.21±0.13	1.58
Nitrate	9.48±0.12	1.27
Chlorate	10.8±0.15	1.62
Phosphate	11.9±0.19	1.60
Sulfate	13.6±0.21	1.54

<sup>a</sup>mean value of five independent replicates(n=5), expressed in min. <sup>b</sup>SD, standard deviation. <sup>c</sup>RSD, relative standard deviation

용리액의 농도: 50 mM NaOH, 온도: 30 °C)로 fluoride, nitrite, nitrate, chlorate, phosphate 그리고 sulfate를 분리한 결과 좋은 크로마토그램을 얻을 수 있었다(Fig. 9). 또한 위 조건에서 머무름 시간에 관한 재현성 실험을 한 결과 상대표준 편차가 1.6% 이하로 좋은 재현성을 보여주었다(Table 1).

## 결론

이온 크로마토그래피(IC)는 주로 미량의 이온성 화합

물질을 분리, 검출하는데 많이 사용되는데 open tubular capillary 컬럼(내경: 50  $\mu$ m, 길이: 3.5 m)을 사용하게 되면 보통 IC 컬럼(내경: 4.6 mm, 길이: 250 mm) 때 보다 필요한 시료의 양이 1/100~1/1000로 줄어들게 된다. 따라서 본 연구에서는 이온 크로마토그래피용 open tubular capillary 컬럼을 개발하였고, 기존에 개발한 모세관 컬럼용 전도도 셀과 억제컬럼을 이용하여 실제 시료분리에 적용하였다. 또한 IC용 open tubular capillary 컬럼의 분리 향상을 위해 3.5 m 컬럼에서 용리액의 유속, 용리액의 농도 그리고 온도 등을 변화시켜가며 실험한 결과 좋은 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 본 연구의 결과로 이온 크로마토그래피에서 미량 환경 오염물질의 분석에 open tubular capillary 컬럼을 이용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었고, 나아가 이온 크로마토그래피의 소형화도 현장에서 직접 분리/분석을 할 수 있으리라 기대된다.

본 연구는 한국과학재단 산학협력연구(98-2-03-0101-3)에 의해 지원되었으며 실험기자재를 지원해 주신(주)인성하이텍에도 감사드립니다.

## 인용문헌

- Small, H.; Steven, T. S.; Bauman, W. C. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 1801.
- Fritz, J. S.; Gierde, D. T.; Pohlandt, C. *Ion Chromatography*, Huthing: Heidelberg, 1982.
- Small, H. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 235.
- Samsung IC manual, Seoul, 1993.
- Hirata, Y.; Nakata, F.; Horibata, M. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1988**, *11*, 81.
- Lee, M. L.; Markides, K. E. *Science* **1987**, *235*, 1342.
- Saito, T.; Takeuchi, M. *JEOL News* **1989**, *25A*, 14.
- Schoenmakers, P. J. *J. High resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1988**, *11*, 278.
- Liu, G.; Djordjevic, N. M.; Emi, F. *J. Chromatogr.* **1992**, *592*, 239.
- Knox, J. H. *J. Chromatogr. Sci.* **1980**, *18*, 453.
- Herbut, G.; Kowalczyk, J. S. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1981**, *4*, 27.
- Muler, S.; Scheidegger, D.; Haber, C.; Simon, W. J. *J. High resolut. Chromatogr.* **1991**, *14*, 174.
- Pyo, D.; Kim, H. *Anal. Sci. & Tech.* **1999**, *12*(2), 89.
- Kim, H.; Pyo, D. *Anal. Sci. & Tech.* **1999**, *12*(6), 521.