고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용한 고무 첨가제와 추출물의 분리 분석 기법

세종대학교 화학과 최성신

목 차

1. 서론
2. HPLC의 기기 구성
3. 검출기
4. 컬럼
5. 이동상 조정
6. 분석 예
7. 참고문헌

1. 서론

크로마토그래피(chromatography)는 20 세기 초 러시아의 식물학자 Tswett이 액체 이동상을 사용하여 클로로필과 크산토필과 같은 식물성 염료를 분리하기 위해 발명하였으므로, 크로마토그래피의 시작은 액체 크로마토그래피(liquid chromatography, LC)라 할 수 있다. 이동상을 액체로 사용하는 LC에는 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 이외에 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography, SEC)와 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography, IEC 혹은 ion chromatography, IC)가 있다.[1,2] 일반적으로 LC라 하면 HPLC를 의미한다.

초기 LC는 고전적인 중력 흐름을 이용하여 분리하였다. 초기 LC 컬럼은 지름 1 – 5 cm, 길이 50 – 500 cm 유리관을 사용하였으며, 정지상이 코팅되지 않은 150 – 200 mm의 고체 입자를 컬럼 충전물로 사용하였다. 이동상의 이동속도는 10 mm/min 보다 느렸으며, 분리 시간도 매우 느려 서너 시간 걸리는 경우도 발생하였다. 컬럼 효율을 높이기 위해 입자 크기를 작게 하는 노력이 지속되어 1960년대에 10 mm 이하의 입자를 합성하여 만들어 사용하는 기술이 개발되었다. 작은 입자를 충전제로 사용하면서 이동상의 이동속도가 느려져 높은 압력을 가할 필요성이 발생하였으며 이에 따라 고압에서 작동하는 정교한 기기를 필요하게 되었다. 초기 LC에 비해 분리 효율이 크게 향상되어 '고성능(high performance)'이라 불리게 되었다.

HPLC의 분리 방식은 분배 크로마토그래피(partition chromatography)이다 (그림 1). 분석물(analyte)이 정지상(stationary phase)과 이동상(mobile phase)에 분배되는 정도의 차이를 이용하여 분리하는 방식으로, 정지상과 이동상에 분포되는 분석물의 농도에 대한 평형이 이루어진다. 분석물이 정지상에 더 많이 분포될수록 머무름 시간(retention time)이 증가한다. 분석물이 정지상과 화학적 특성이 유사할수록(극성이 비슷할수록) 정지상에 더 머무르게 되며, 분석물이 이동상에 더 잘 용해될수록 이동상에 더 머무르게 된다.

이번 총설에서는 HPLC의 원리와 분석 예에 대해 소개한다. HPLC는 이동상이 액체이므로 분석물을 액체 상태로 분리한다. 고무 제품 제조에 사용하고 있는 유기물 첨가제 대부분을 HPLC를 이용하여 분석할 수 있으나, 저분자량 화합물이나 휘발성이 높은 화합물은 기체 크로마토그래피(GC)로 분석하는 것이 적절하며[3] HPLC로는 중분자량 화합물이나 휘발성이 낮은 유기물의 분석에 적절하다. HPLC는 고무 유기물 첨가제의 순도 분석은

최 성 신

1986. 서울대학교 화학교육과(학사)
1992. 한국과학기술원(박사)
1992 - 1993. 한국표준과학연구원 (박사후연구원)
1993 - 2001. 금호산업(주)(수석연구원)
2002 - 2003. 충남대학교(연구교수)
2003 ~ 세종대학교(교수)

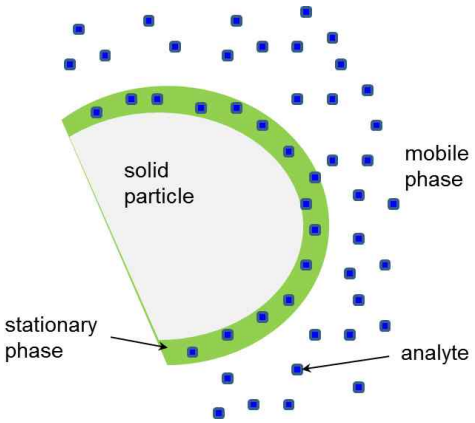


그림 1. 분배 크로마토그래피(partition chromatography)의 원리.

물론이고 배합물과 가교물에 있는 유기물을 추출하여 그 성분과 함량을 분석하는데 매우 유용한 방법이다. 추출에 대해서는 다른 참고문헌을 참고하기 바란다.[3,4]

2. HPLC의 기기 구성

고성능 액체 크로마토그래프(high performance liquid chromatograph, HPLC)의 기기 구성을 그림 2에 나타냈다. 그림 2는 최대 4가지 이동상 용매를 사용할 수 있는 4액 펌프(quaternary pump) 시스템을 나타낸 것으로, 이미 용매가 섞인 상태로 들어와 하나의 펌프로 용매를 내보낸다. 따라서 4액 펌프 시스템은 상대적으로 낮은 압력을 지원한다. 이와는 달리 2액 펌프(binary pump) 시스템은 두 개의 펌프가 각각의 용매를 펌핑하여 혼합하는 방식으로 4액 펌프 시스템에 비해 높은 압력을 지원한다. 펌프에 의해 고압으로 주입되는 이동상 액체는 압력 변동(pressure fluctuation)을 조절하는 댐퍼(damper)와 기포를 제거하는 배출 밸브(drain valve)를 지나 필터를 거쳐 불순물이 제거된다. 이후 역압 조절기(back pressure regulator)를 거쳐 시료와 함께 컬럼을 통과한다. 컬럼을 통과하면서 분리된 개개의 성분은 검출기를 통해 전기적 신호로 변환되어 머무름 시간에 따른 검출 세기로 기록된다.

위에서 기술하였듯이, HPLC용 펌프에는 2액 펌프와 4액 펌프가 있다. 2액 펌프가 4액 펌프보다 출력 압력이 높다. 그림 3은 HPLC용 왕복 펌프의 모식도이다. 펌프의 내부 부피는 보통 200 mL 혹은 그 이하이며 수십 mL 이하인 것도 있다. 출력 압력은 1,000 bar (100 MPa) 정도이다. HPLC용 왕복 펌프는 기본적으로 기울기 용리에 쉽게 적용할 수 있고 역압력 및 용매 점도와는 무관하게 일정한 흐름속도를 유지할 수 있도록 작동해야 한다. 이동상 흐름 속도는 보통 0.001 – 10 mL/min 범위 내에서 조절이 가능하다. HPLC 분석 시스템을 구축할 때는 분석 목적에 적합한 펌프 시스템을 선정할 필요가 있다.

시료 주입은 자동 시료 주입장치(autosampler)를 이용

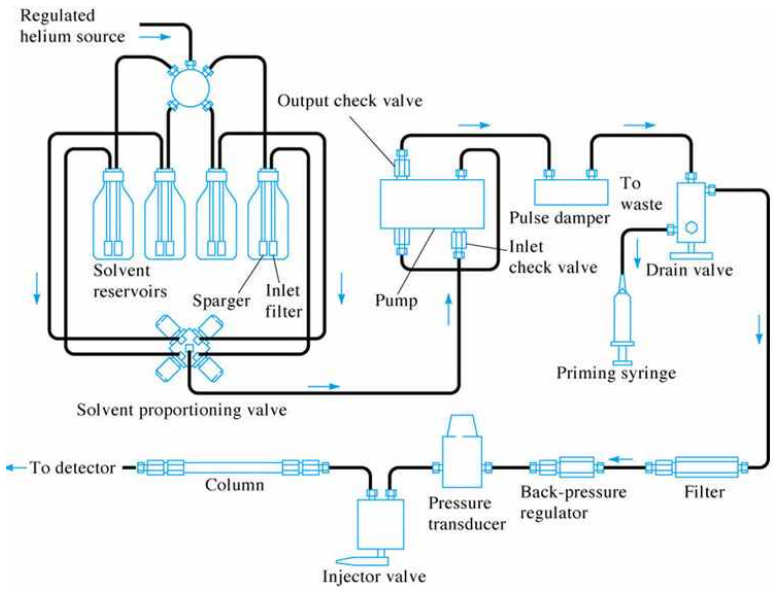


그림 2. 고성능 액체 크로마토그래프(high performance liquid chromatograph, HPLC)의 구성.
출처: D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, “Principles of Instrumental Analysis”, 6th Ed. p. 819, Thomson, USA, 2007.

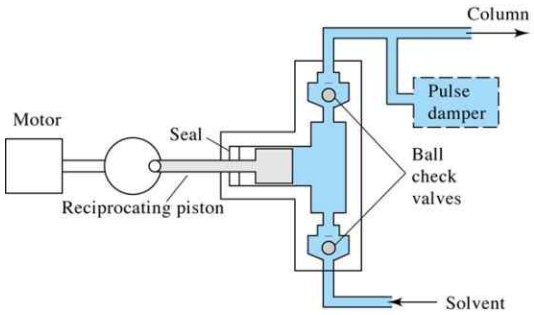


그림 3. HPLC용 왕복 펌프 모식도.
출처: D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, "Principles of Instrumental Analysis", 6th Ed. p. 820, Thomson, USA, 2007.

그림 4. HPLC용 수동 시료 주입기인 Rheodyne injector.
출처: https://revodixpump.tistory.com/15.

한 자동 시료 주입 방법과 수동 시료 주입기(manual injector)를 사용하는 수동 시료 주입 방법이 있다. 수동 시료 주입기는 주로 Rheodyne injector (그림 4)를 사용한다. 시료 주입량은 주입기에 연결된 루프(loop)의 부피에 의해 정해지며, 주입량을 바꾸고자 하는 경우에는 원하는 부피의 루프로 교체하면 된다. 그림 4에는 20 mL 루프가 장착된 Rheodyne injector이다. 루프에는 이전에 사용한 분석물이 잔류할 수 있으므로, 새로운 시료를 주입하기 전에 용매로 세척한 후 새로운 시료를 주입해야 한다. 컬럼(column)은 분석 컬럼인 주컬럼(main column)과 보호 컬럼(guard column)이 있으며, 컬럼에 대해서는 뒤에 상세히 설명하였다.

3. 검출기

HPLC의 검출기가 기본적으로 갖추어야 할 조건으로는 (1) 우수한 감도, (2) 안정성과 재현성, (3) 높은 직선적인 감응 범위, (4) 이동상 흐름속도와 무관한 빠른 감응 시간 등을 들 수 있다. GC에서도 검출기의 종류에 따라 분석물의 종류와 특성에 대한 선택성이 있듯이,[3] HPLC에서도 선택성이 있다. 특히, HPLC에서는 이동상의 종류가 다양하고 용리 방법을 달리 할 수 있기 때문에 적절한 검출기를 선택하는 것이 중요하다. HPLC에서 주로 사용하는 검출기인 자외선 검출기(UV detector, UVD), 굴절률 검출기(refractive index detector, RID), 증기화 광산란 검출기 (evaporative light scattering detector, ELSD), 그리고 질량분석 검출기(mass spectrometric detector, MSD)를 소개한다.

UVD는 분석물이 자외선 파장을 흡수하는 것을 이용한 검출 방법으로 HPLC에서 가장 널리 사용하는 방법이다. 그림 5에 UVD의 구조를 나타내었다. 컬럼을 통해 나온 분석물이 UVD로 들어가는 구조인데, 빛의 통과 거리를 늘려 빛을 효율적으로 흡수하도록 설계되었다. 광원으로 중수소 램프(D_2-lamp, 190 – 400 nm)와 텅스텐 램프(W-lamp, 350 – 2500 nm)를 사용한다. 일반적으로 190 – 600 nm 영역을 사용한다. 보통 중수소 램프를 사용하여 자외선을 흡수하는 화학종을 검출하며, 가시선 파장의 빛을 흡수하는 화학종은 텅스텐 램프를 사용하여 분석한다. 자외선과 가시선을 모두 이용하므로 자외선-가시선 검출기(UV-visible detector)로 표기하기도 하나 UV 파장을 주로 사용하므로 보통 UVD라 한다. UVD는 자외선과 가시선을 잘 흡수하는 작용기가 있는

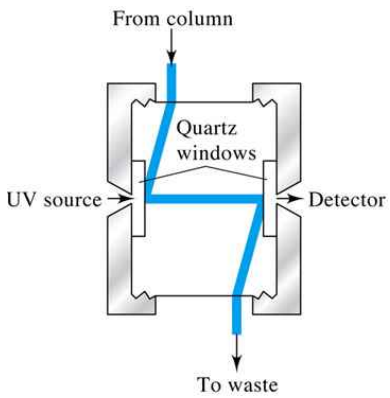


그림 5. 자외선 검출기(UV detector, UVD)의 구성.
출처: D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, "Principles of Instrumental Analysis", 6th Ed. p. 824, Thomson, USA, 2007.

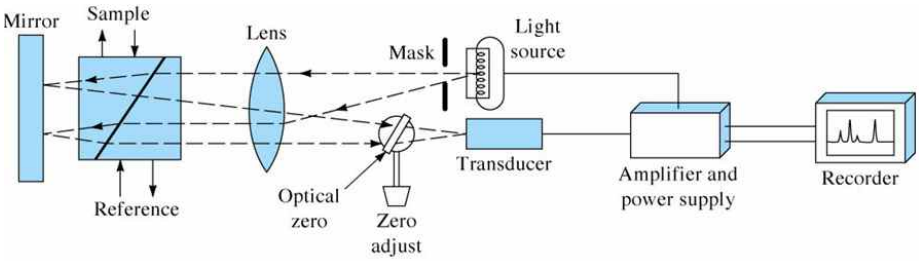


그림 6. 굴절률 검출기(refractive index detector, RID)의 구성.
출처: D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, "Principles of Instrumental Analysis", 6th Ed. p. 826, Thomson, USA, 2007.

화학종의 분석에 매우 적합하다. 특히, 벤젠 고리가 포함된 화합물은 자외선을 잘 흡수하므로 UVD가 적합하다.

RID는 기준 용매(reference)와 시료 용액(sample)의 굴절률의 차이를 이용한 것이다 (그림 6). 기준 용매는 순수한 이동상이고 시료 용액은 컬럼을 통과한 분석물과 이동상이 혼합된 것이다. RID 셀은 사선으로 놓인 창에 의해 셀이 나뉘어져 한 곳에는 기준 용매가 흐르고 다른 곳에는 시료 용액이 흐른다. 기준 용매 셀과 시료 용액 셀 사이에 창을 놓아 두 용액의 굴절률이 다를 때, 이 창에서 굴절이 잘 일어날 수 있는 각도로 창을 설치한다. 미세한 굴절의 차이에 의해 검출기에 도달하는 빛살의 상대적 위치가 달라지게 되어 출력신호의 세기가 변하게 된다. 용액의 밀도가 달라지면 굴절률이 달라진다. 따라서 동일한 화학종이어도 농도가 짙어지면 밀도가 높아져 굴절률 차이가 커지므로 출력신호 세기의 변화도 증가한다. RID는 거의 모든 용질에 감응을 보이는 이점이 있으나 다른 검출기에 비해 감도가 떨어진다. 주로 고분자 물질의 분석에 이용된다. 용액의 밀도는 온도에 민감하므로 0.01℃ 내에서 일정한 온도를 유지해야 한다. RID는 기울기 용리(gradient elution)에 사용할 수 없다.

ELSD는 작은 입자의 산란을 이용한 방법으로 분석물질의 미세한 입자를 레이저 광산란으로 측정한다. ELSD는 분무(nebulization), 증발(evaporation), 검출(detection)의 3단계로 구성되어 있다 (그림 7). HPLC 컬럼에서 분리된 분석물과 이동상을 비활성 질소 가스를 이용하여 분무기를 통해 균일하게 미세한 입자로 분무한다. 그 다음은 증발 단계로 가열된 이동관을 통과하는 동안 이동상은 기화되고 건조된 미세한 분석물 입자만 통과하게 된다. 이때 레이저(보통 670 nm)를 조사하여 분석물 입자와 충돌하여 발생한 산란광을 검출한다. 산란되는 빛의 세기를 검출하므로 이동상보다 비휘발성인 화합물은 대부분 검출이 가능하며, 모든 비휘발성

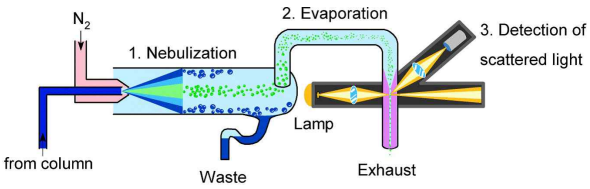


그림 7. 증기화 광산란 검출기 (evaporative light scattering detector, ELSD)의 구성.
출처: https://www.researchgate.net/figure/Principle-of-an-ELSD-2_fig8_307971644.

용질에 대해 비슷한 감응을 보인다. 검출 한계가 2 ng/10 mL로 비교적 감도가 우수하다. 휘발성이 낮은 당 화합물이나 생체 물질을 포함한 고분자 물질의 검출에 유용하다. 발색단이 없거나 미약하여 UVD로는 검출이 어려운 물질이나, RID에서 낮은 감도를 보이거나 기울기 용리를 적용하여 분리해야 할 경우에 유용하게 사용할 수 있다.

HPLC의 검출기로 질량분석기(mass spectrometer, MS)를 사용한 질량분석검출기(MSD)를 이용하면, 정량분석은 물론 분리된 개개 성분의 화학 구조를 규명할 수 있는 정성 분석도 가능하여 MSD는 매우 유용하며

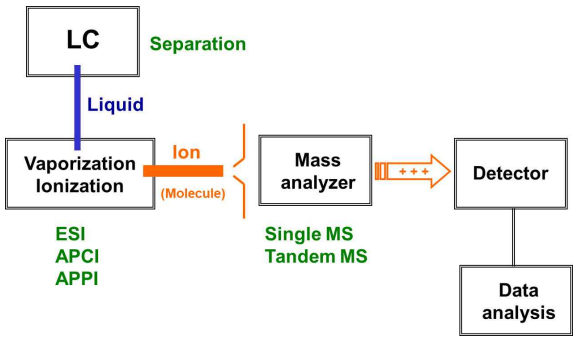


그림 8. 액체 크로마토그래프/질량분석기(liquid chromatograph /mass spectrometer, LC/MS)의 모식도.

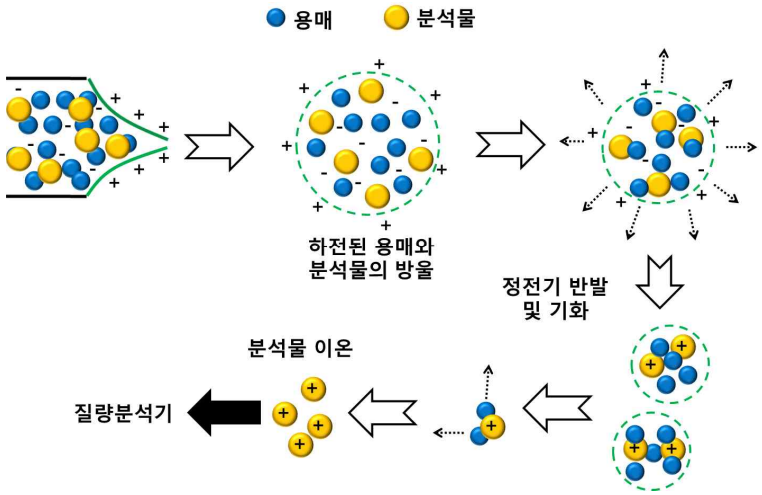


그림 9. 전자분무 이온화(electrospray ionization, ESI)의 원리.

널리 사용되고 있다. 현재 HPLC에서 사용하고 있는 MSD는 대기압 이온화 질량분석기(atmospheric pressure ionization mass spectrometer, API-MS)이다. API 방법은 액체 용액을 대기압 하에서 이온화시키는 방법으로 전자분무 이온화(electrospray ionization, ESI) 방법, 대기압 화학이온화(atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 방법, 대기압 광이온화(atmospheric pressure photoionization, APPI) 방법이 있다.[5] API-MS는 대기압 조건에서 이온을 만든 후 생성된 이온을 질량분석기로 도입하여 분석을 진행한다. 이온보다 중성 분자의 함량이 매우 높기 때문에 중성 분자를 제외한 생성된 이온만을 질량분석기로 효율적으로 도입하기 위해 API 장치와 질량분석기는 직각 방향으로 배치되어 있다 (그림 8). API 방법을 사용하면, 분석물의 특성과 이온화 방법에 따라 생성된 이온이 양이온일수도 있고 음이온일수도 있으며, 양이온과 음이온이 함께 생성될 수도 있다. 양이온을 검출하는 경우에는 이온 도입부에 음전압을 걸어 양이온만을 질량분석기로 도입할 수 있으며, 음이온을 분석하고자 하는 경우에는 이온 도입부에 양전압을 걸어 음이온만을 질량분석기로 도입할 수 있다.

3가지 이온화 방법(ESI, APCI, APPI)의 원리는 다음과 같다. ESI 방법은 액체 용액에 전기를 가하여 액체 상태에서 이온을 만드는 방법이다 (그림 9).[6] 액체 용액에 고전압(1 kV 이상)을 가하면, 액체 상태에서 분석물이 이온화된다. 분무된 용액 방울에는 이온화된 분석물과 용매가 있으며, 이들은 정전기적 반발과 용매의 휘발에 의해 더 작은 방울로 되는 과정을 거쳐 최종적으로는 분석물 이온에 붙은 용매 분자들이 떨어지고 분석물 이온이나 용매 분자와 결합된 분석물 이온이 질량분석기로 도입된다. ESI 방법은 분석물 액체 용액에 전기가 통해야만 이온이 형성될 수 있으므로, 물에 용해되거나 극성 용매에 용해될 수 있는 극성 물질의 분석에 적합하다. 따라서, HPLC의 이동상은 물이나 알코올 혹은 아민과 같은 극성이 높은 것을 사용해야 하며, 전도성을 높이기 위해 비활성염을 첨가하기도 한다.

APCI 방법은 HPLC를 통과한 용액을 기화시켜 코로나 방전(corona discharge)에 의해 이온화시키는 방법이다 (그림 10).[7] HPLC에 의해 분리된 용액을 고온 영역을 통과시켜 기화시키고, 코로나 방전으로 전자를 방출하여 기화된 용액의 대부분을 차지하는 용매 분자가 먼저 이온화되고, 용매 분자 이온이 분석물 분자와 반응하여 화학적 이온화가 진행되어 분석물 이온이 생성된다. 화학적 이온화는 식(1)과 같은 전자 이동 반응(electron

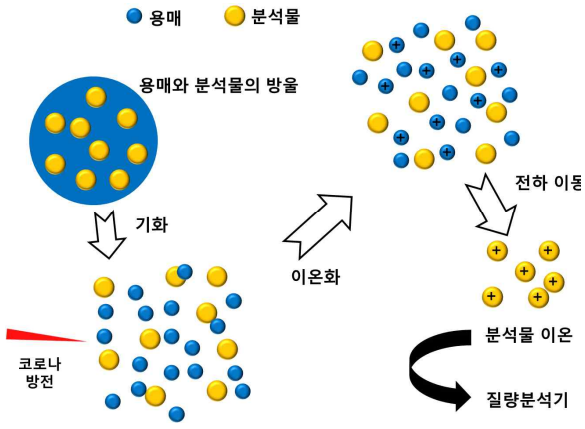


그림 10. 대기압 화학이온화(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)의 원리.

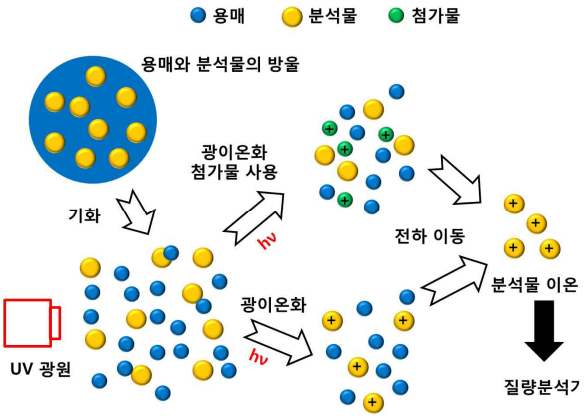


그림 11. 대기압 광이온화(atmospheric pressure photoionization, APPI)의 원리.

transfer reaction)이나 식(2)와 같은 양성자 이동 반응(proton transfer reaction)에 의해 이루어진다. 식(1)과 식(2)에서 "S"는 용매 분자이며 "M"은 분석물 분자를 의미한다. 어느 정도 열안정성이 있는 물질이면 APCI 방법으로 질량분석이 가능하다.

$$S^{\cdot+} + M \rightarrow M^{+} + S \quad (1)$$

$$SH^{+} + M \rightarrow MH^{+} + S \quad (2)$$

APPI 방법은 APCI 방법과 유사하다. 다른 점은 이온화 에너지원으로 코로나 방전 대신 자외선 광원을 사용한다는 것이다 (그림 11).[8] 기화된 시료에 자외선을 조사하여 이온화 과정을 진행하는데, 분석물 분자 자체가 자외선을 잘 흡수하는 경우에는 이온화 효율이 매우 우수하여 별도의 첨가제를 사용하지 않아도 된다. 분석물과 용매가 자외선을 잘 흡수하지 못한다면, 자외선 흡수를 잘 하는 별도의 첨가물을 사용하여 첨가물 이온과 분석물 분자 간의 화학적 이온화 과정을 통하여 분석물 이온을 만든다. APPI 방법은 자외선을 잘 흡수하고 비교적 열적으로 안정한 다환방향족탄화수소(polyaromatic hydrocarbon, PAH)와 같은 화학종의 분석에 유리하다.

4. 컬럼

HPLC용 컬럼은 고압에서 견딜 수 있으며 비활성이어야 하므로 보통 스테인레스 스틸 관으로 만든다. 분석 컬럼의 길이는 보통 10 – 30 cm 정도이다. 긴 컬럼이 필요한 경우에는 2개 이상 연결하여 사용한다. 분석 컬럼의 내부 지름은 약 4 – 10 mm인 것을 주로 사용한다. 충전물의 입자 크기는 일반적으로 5 mm 혹은 10 mm

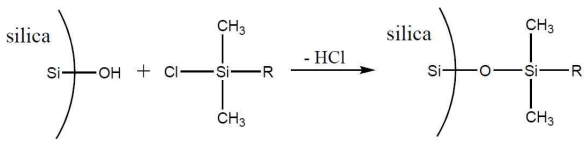
그림 12. HPLC용 보호 컬럼(guard column, 왼쪽 사진)과 분석 컬럼(주컬럼, main column, 오른쪽 사진).

그림 13. HPLC에 컬럼이 장착된 모습.

이다. 가장 일반적으로 사용하는 컬럼은 길이 25 cm, 내부 지름 4.6 mm, 입자 크기 5 mm이다.

일반적으로 보호 컬럼은 보조 컬럼으로 주컬럼인 분석 컬럼을 보호하기 위해 분석 컬럼 앞에 연결하여 사용한다. 보호 컬럼에서 용매에서 들어오는 입자성 물질과 오염 물질을 제거하며 정지상에서 비가역적으로 결합되는 성분을 제거한다. 보통 분석 컬럼의 충전제와 동일한 충전제를 보호 컬럼에서도 사용한다. 보호 컬럼의 길이는 분석 컬럼에 비해 길이가 매우 짧다. 그림 12에 보호 컬럼과 분석 컬럼의 사진을 실었으며, 그림 13에 컬럼이 HPLC 시스템에 장착된 사진을 실었다.

컬럼을 채우는 정지상인 충전물로 표피형 입자와 다공성 입자를 사용한다. 합성 구형 실리카를 기본 충전물로 주로 사용하는데 실리카 표면에는 실란올기(Si-OH)가 있어서 극성을 띤다. 실리카 표면을 개질하여 충전물 입자의 극성 정도를 조절할 수 있다. 실리카 표면의 실란올기와 반응을 잘 할 수 있는 실란 화합물을 사용하여 실리카 표면을 개질시킨다 (그림 14). 보통 실란은 R 작용기가 메틸(CH_3), 옥틸(C_8H_{17}), 옥타데실($C_{18}H_{37}$)인 것을 사용한다. 실란의 R 작용기가 메틸(CH_3), 옥틸



R = CH_3, C_8H_{17}, $C_{18}H_{37}$

그림 14. 실리카 충전제의 표면 개질.

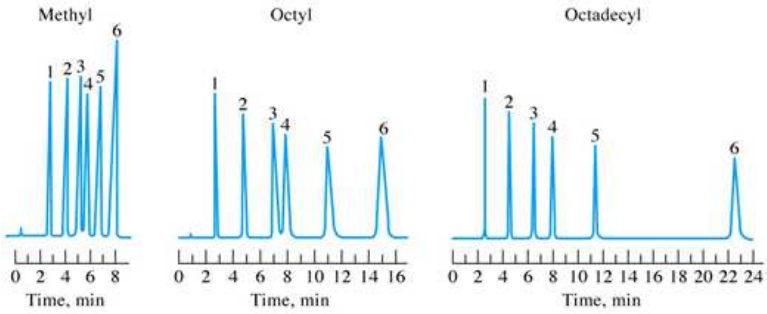


그림 15. 알킬기의 길이가 다른 실란으로 치환된 실리카 충전물로 채워진 컬럼을 사용하여 분석한 HPLC 크로마토그램 비교. Methyl, octyl, octadecyl은 치환기가 메틸(CH_3), 옥틸(C_8H_{17}), 옥타데실($C_{18}H_{37}$)인 충전물을 사용한 컬럼을 의미한다. 1: uracil, 2: phenol, 3: acetophenone, 4: nitrobenzene, 5: methyl benzoate, 6: toluene. 출처: D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, "Principles of Instrumental Analysis", 6th Ed. p. 830, Thomson, USA, 2007.

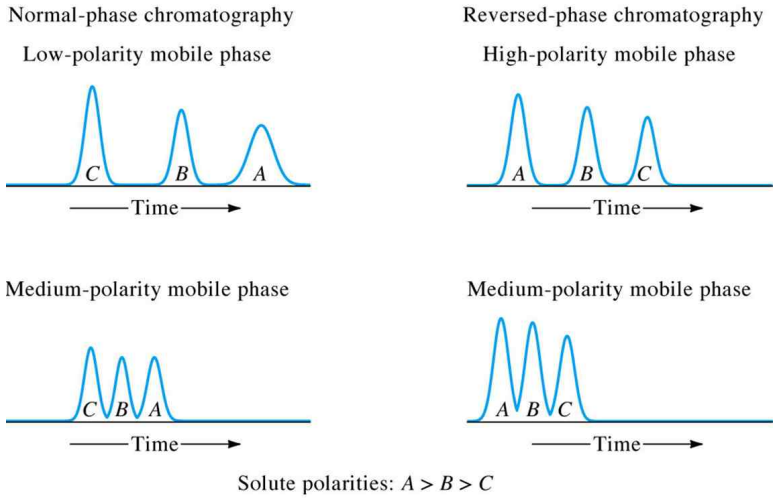


그림 16. 정상 크로마토그래피(normal-phase chromatography)와 역상 크로마토그래피(reverse-phase chromatography)의 개념도. 출처: D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, "Principles of Instrumental Analysis", 6th Ed. p. 829, Thomson, USA, 2007.

(C_8H_{17}), 옥타데실($C_{18}H_{37}$)인 것으로 표면 처리한 컬럼을 각각 C1, C8, C18 컬럼이라 부른다. R 작용기의 탄소 수가 증가할수록 극성이 낮아지며, 표면 처리 정도가 높을수록 극성은 더 약해진다. 비극성인 알킬기 이외에 극성을 더 높이기 위해 니트릴기(CN)가 있는 개질제로 처리하기도 한다.

그림 15는 알킬기의 길이가 메틸(CH_3), 옥틸(C_8H_{17}), 옥타데실($C_{18}H_{37}$)인 실란으로 치환된 충전물로 채워진 컬럼을 사용하여 분석한 HPLC 크로마토그램이다. 정지상의 극성이 줄어들수록 극성이 약한 화합물의 머무름 시간이 길어지는 것을 볼 수 있다. 특히, 상대적으로 극성이 약한 methyl benzoate와 toluene의 머무름 시간이 크게 늘어난 것을 볼 수 있다.

HPLC로 분리 조건을 설정할 때 고려해야 할 사항은 분석물의 구성과 극성 정도, 정지상의 극성을 고려한 컬럼의 종류, 그리고 이동상의 종류이다. 이동상과 정지상의 상대적 극성에 따라 LC 분리 방식을 정상 크로마토그래피(normal-phase chromatography)와 역상 크로마토그래피(reverse-phase chromatography)로 나눈다. 정상 크로마토그래피는 정지상이 극성이고 이동상은 상대적으로 비극성인 것을 사용하는 경우를 말하며, 초기에 먼저 개발되어 사용한 방법이어서 "normal"이라 한다. 역상 크로마토그래피는 정상 크로마토그래피의 반대로, 정지상이 비극성이고 이동상은 상대적으로 극성인 것을 사용하는 경우이다. 그림 16에 정상 크로마토그래피와 역상 크로마토그래피의 예를 나타내었다. 정상 크로마토그래피에서는 정지상이 극성이므로 비극성인 것이 빨리 용리된다. 또한, 이동상의 극성이 높아지면 극성 물질

의 용리 시간이 단축된다. 역상 크로마토그래피에서는 정지상이 비극성이므로 극성인 것이 빨리 용리되며, 이동상의 극성이 낮아질수록 비극성 물질의 용리 시간이 단축된다.

5. 이동상 조정

HPLC를 이용하여 분리할 때 대부분 사용할 컬럼을 먼저 결정하고 다른 분석 조건을 조정한다. 컬럼이 선정되고 나면, 분리 능력을 조정할 수 있는 방법은 이동상 시스템이다. 용매 처리 방법은 등용매 용리 (isocratic elution)와 기울기 용리 (gradient elution)가 있다. 등용매 용리는 일정한 조성의 단일 용매를 사용하는 분리 방법이다. 여기서 단일 용매란 순수한 1가지 용매를 의미하는 것이 아니라, 사용하는 용매 종류의 수는 상관 없이 용매의 조성이 일정하다는 것이다. 기울기 용리는 극성이 다른 2 – 4 가지 정도의 용매를 사용하며, 용매들의 혼합 비율은 미리 프로그램된 비율에 따라 연속적으로 혹은 단계적으로 변화시켜서 분리하는 방법이다. 보통 2가지 용매를 사용한다. 기울기 용리에서 사용하는 용매의 종류는 순수한 용매일 수도 있으며 2가지 이상이 혼합된 균일 조성의 용매를 사용할 수도 있다. HPLC 분석에서 용리 시스템은 가능하면 등용매 용리로 사용하는 것이 좋으나, 분리 효율이 우수하지 않은 경우에는 기울기 용리를 적용하여 분리 효율을 향상시켜야 한다.

등용매 용리의 경우, 2가지 용매를 혼합하여 사용하는 경우가 많다. 이런 경우에는 용매의 조성을 변화시키면 분리 효율이 다르게 나타난다. 증류수(이동상 A)와 아세토니트릴(CH_3CN, 이동상 B)의 조성비를 달리하여 등용매 용리로 분석한 결과를 그림 17에 제시하였다. 증류수와 아세토니트릴 2가지 용매를 혼합한 2액 등용매 용리로 8가지 화합물의 혼합물(benzyl alcohol, phenol, 3,4-dimethoxyacetophenone, benzoin, ethyl benzoate, toluene, 2,6-dimethoxytoluene, *o*-methoxybiphenyl)을 분리한 예이다. HPLC에서 이동상의 조성비는 부피비이다. 아세토니트릴 함량이 높은 경우에는 분석물이 빨리 빠져 나왔으나 거의 분리되지 않았으며, 증류수 함량이 증가할수록 분리는 잘 되었으나 머무름 시간은 길어졌다. 증류수 함량을 60%(아세토니트릴 함량 40%)로 높여도 phenol과 3,4-dimethoxyacetophenone은 완전히 분리되지 않았으며, 마지막에 나오는 *o*-methoxybiphenyl의 봉우리 폭은 매우 넓어졌다. 이와 같이 위 8가지 성분이 섞인 시료는 등용매 용리로는 성공적으로 분리하기 곤란하다고 할 수 있다.

그림 18은 그림 17의 8가지 화합물의 혼합물을 기울기 용리(gradient elution)로 분리한 결과이다. 그림 17의 용매 조성이 다른 등용매 용리 결과를 기반으로 증류수와 아세토니트릴의 조성비를 시간에 따라 달리하여 기

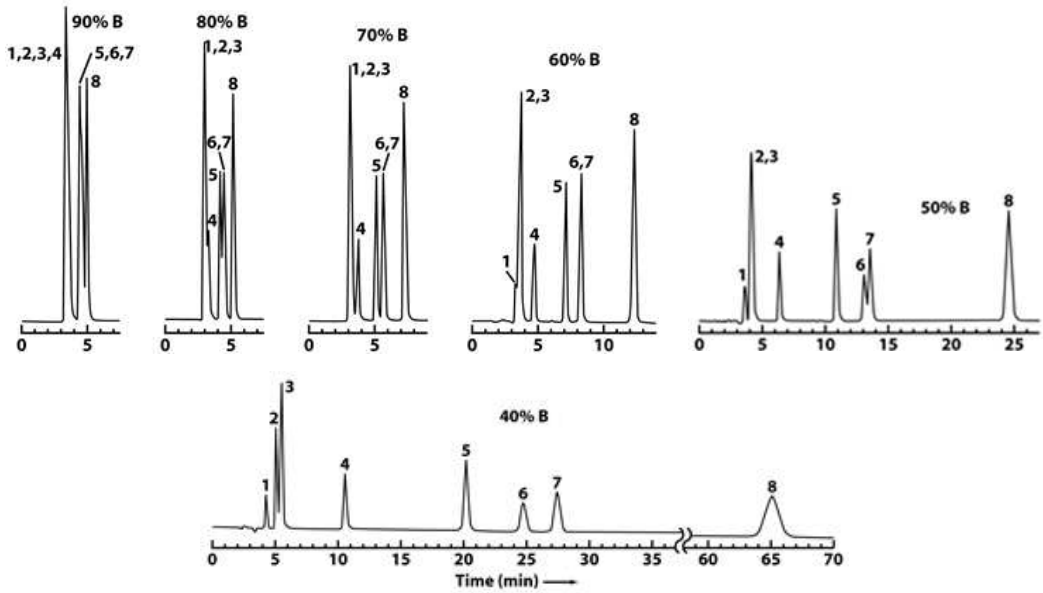


그림 17. 등용매 용리(isocratic elution)에 의한 분리 결과. 이동상 A: 증류수, 이동상 B: 아세토니트릴(CH_3CN). 검출기는 UVD이고 검출 파장은 220 nm. 1: benzyl alcohol, 2: phenol, 3: 3,4−dimethoxyacetophenone, 4: benzoin, 5: ethyl benzoate, 6: toluene, 7: 2,6−dimethoxytoluene, 8: *o*−methoxybiphenyl.
출처: D. C. Harris, "Quantitative Chemical Analysis", 7th Ed. p. 564, Freeman, USA, 2007.

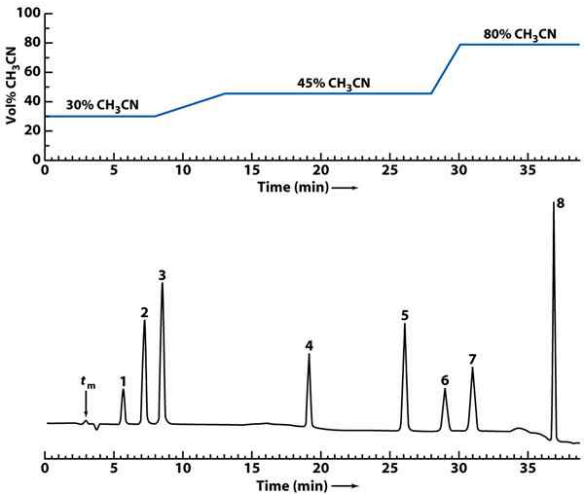


그림 18. 기울기 용리(gradient elution)에 의한 분리 결과. 이동상 A: 증류수, 이동상 B: 아세토니트릴(CH_3CN). 검출기는 UVD이고 검출 파장은 220 nm. 1: benzyl alcohol, 2: phenol, 3: 3,4−dimethoxyacetophenone, 4: benzoin, 5: ethyl benzoate, 6: toluene, 7: 2,6−dimethoxytoluene, 8: *o*−methoxybiphenyl. 출처: D. C. Harris, "Quantitative Chemical Analysis", 7th Ed. p. 565, Freeman, USA, 2007.

울기 용리를 설계하여 분리하였다. 먼저, 분리가 잘 되지 않았던 phenol과 3,4-dimethoxyacetophenone을 분리하기 위해 아세토니트릴 함량을 35%로 설정하였다. Phenol과 3,4-dimethoxyacetophenone을 분리한 후에는 나머지 성분들이 빨리 용출되면서 toluene과 2,6-dimethoxytoluene을 분리하기 위해 아세토니트릴 함량을 45%로 높였다. Toluene과 2,6-dimethoxytoluene을 분리한 후에는 나머지 성분들을 가능한 빨리 용리시키기 위해 아세토니트릴 함량을 80%로 크게 높였다. 이러한 기울기 용리 프로그램을 적용한 결과 8개 성분 모두 성공적으로 분리되었으며, 모든 봉우리가 비교적 좁게 나타났으며 분석 완료 시간도 40분 내로 크게 단축되었다. 그림 18의 기울기 용리 프로그램에서 이동상 조성을 변화시킬 때 기울기가 있는 것은 이동상 조성이 급격히 변할 때 나타날 수 있는 여러 가지 부작용을 줄이기 위한 조치이다.

6. 분석 예

가황촉진제는 열에 비교적 불안정하기 때문에 HPLC로 분석하는 것이 바람직하다. 대부분의 가황촉진제는 벤젠 고리가 포함되어 있으므로 자외선을 잘 흡수하므로 UVD를 검출기로 사용한 HPLC-UVD를 이용하면 비교적 우수한 감도의 크로마토그램을 얻을 수 있다. 가장 널리 사용되고 있는 가황촉진제는 Benzothiazole 계와 benzothiazolesulfenamide 계 화합물이다. 그림 19에 benzothiazole 계 가황촉진제인 2-mercaptobenzothiazole (MBT, M)와 2,2'-dithiobisbenzothiazole (MBTS, DM), 그리고 benzothiazolesulfenamide 계 가황촉진제인 *N*-cyclohexylbenzothiazole-2-sulfenamide (CBS, CZ, CM)와 *N*-*t*-butylbenzothiazole-2-sulfenamide (TBBS, NS), *N*,*N*′-dicyclohexylbenzothiazole-2-sulfenamide

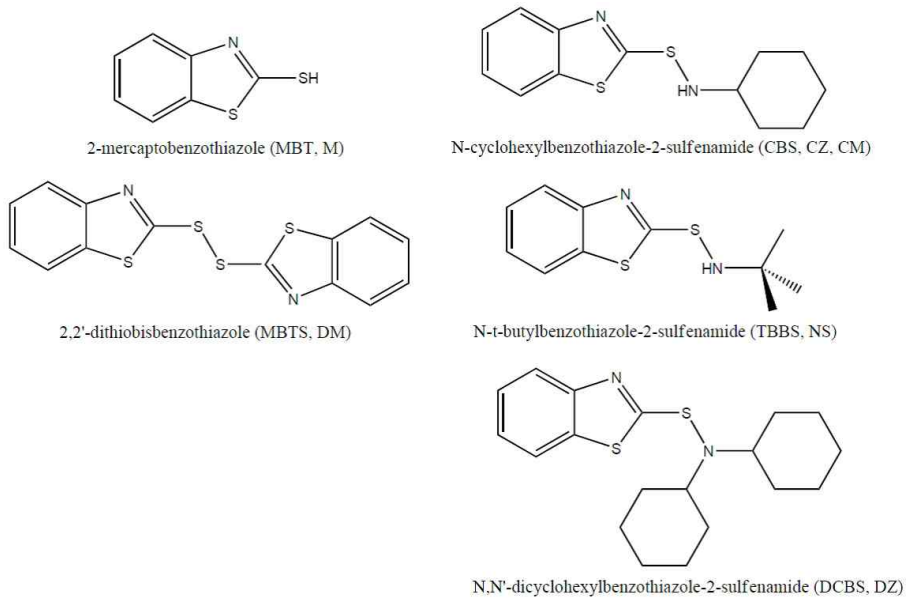


그림 19. Benzothiazole 계와 benzothiazolesulfenamide 계 가황촉진제의 화학 구조.

(DCBS, DZ)의 화학 구조를 실었다.

그림 20과 21은 가장 많이 사용하는 가황촉진제 중 TBBS와 CBS 원재료의 HPLC-UVD (검출 파장 251 nm) 크로마토그램이다. 가황촉진제는 순도가 매우 중요한데, HPLC를 이용하면 가황촉진제의 순도를 분석할 수 있으며 어떤 불순물이 함유되었는지도 파악할 수 있다. 원재료 TBBS의 HPLC-UVD 크로마토그램(그림 20)을 보면, 주요 불순물로 MBT가 있으며 다른 불순물도 약간 있는 것을 알 수 있다. MBT는 TBBS 합성 시 원재료로 사용된 것으로 추정된다. 그림 21은 원재료 CBS의 HPLC-UVD 크로마토그램으로 CBS 이외에 MBTS와 DZ가 제법 함유된 것으로 나타났으며 다른 불순물도 약간 있는 것을 볼 수 있다. MBTS는 CBS 합성 시 원재료로 사용된 것으로 여겨지며, DZ는 합성 시 과도한 반응으로 cyclohexyl 이 하나 더 붙어서 생성된 것으로 여겨진다.

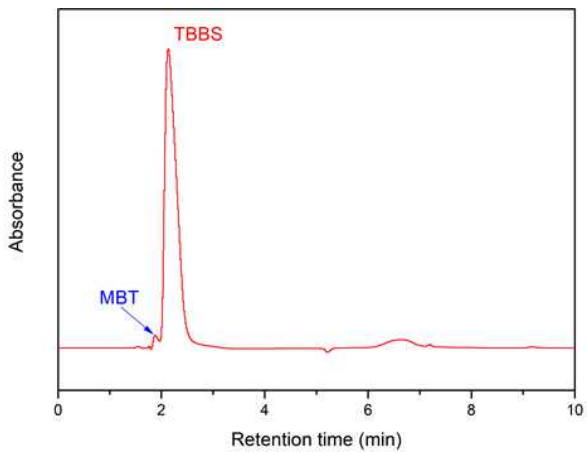


그림 20. 가황촉진제 TBBS의 HPLC-UVD (검출 파장 251 nm) 크로마토그램.

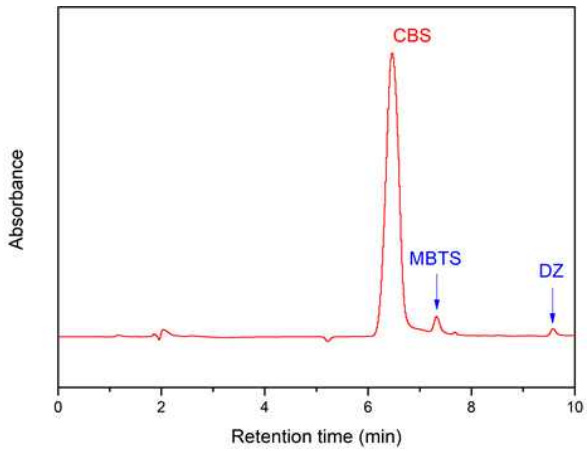


그림 21. 가황촉진제 CBS의 HPLC-UVD (검출 파장 251 nm) 크로마토그램.

HPLC는 가황촉진제 간의 반응생성물의 분석과 고무 제품의 추출물의 분석에도 유용하게 사용할 수 있다. 그림 22는 가황촉진제 OTOS와 CMB를 혼합하여 140℃에서 2분간 가열하여 반응시켜 얻은 반응생성물을 HPLC로 분석한 결과로, 반응물인 OTOS와 CMB 이외에 새로운 반응생성물이 얻어진 것을 볼 수 있다.[9] 그림 23은 황가교된 polyisoprene (IR) 가교물의 추출물에 대한 HPLC 크로마토그램이다. 가교 조건은 140℃/20분이다.[10] 가황촉진제로 TBBS 1.5 phr과 황 1.5 phr을 사용한 배합물이다. 크로마토그램에는 다양한 추출물이 검

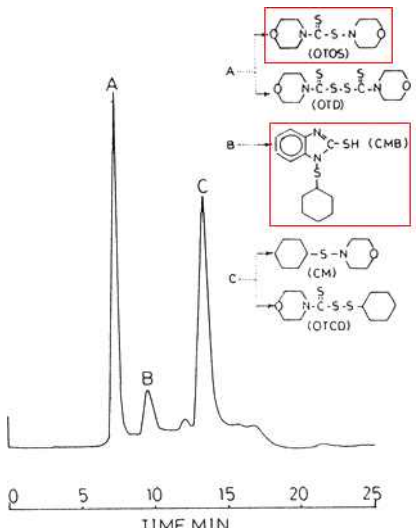


그림 22. OTOS와 CMB를 혼합하여 140℃에서 2분간 가열한 후의 반응생성물에 대한 HPLC 크로마토그램.
출처: *J. Appl. Polym. Sci.*, 34, 1977 (1987).

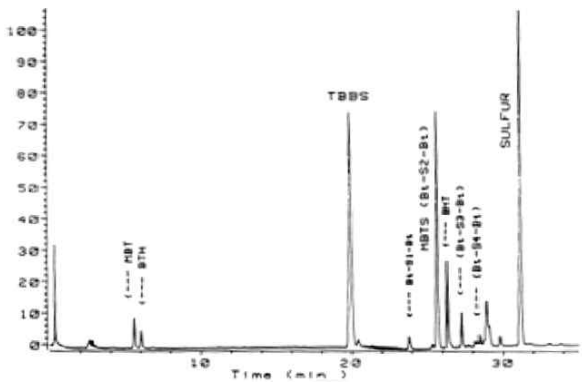


그림 23. Polyisoprene (IR) 가교물의 추출물에 대한 HPLC 크로마토그램.
출처: *Rubber Chem. Technol.*, 65, 488 (1992).

출된 것을 알 수 있으며, 미반응 TBBS와 황도 검출되었다. 미반응 TBBS와 황의 검출은 가교 반응이 완전히 이루어지지 않은 미가교 상태라는 것을 의미하므로 고무 제품의 가교 상태를 평가하는데 사용할 수 있다.

자외선 흡수제(UV absorber)와 광안정제(light stabilizer)는 플라스틱 소재뿐만 아니라 고무 소재에서도 사용하는 대표적인 고분자 첨가제이다. 자외선 흡수제 3종(Tinuvin 329, Tinuvin 234, Tinuvin 360)과 광안정제 2종(Tinuvin 123, Tinuvin 770)을 혼합한 혼합물을 HPLC로 분리하였다. 자외선 흡수제 3종(Tinuvin 329, Tinuvin 234, Tinuvin 360)과 광안정제 2종(Tinuvin 123, Tinuvin 770)의 화학 구조를 각각 그림 24와 25에 제시하였다. 이들 자외선 흡수제와 광안정제 혼합물을 HPLC로 분리할 때, 검출기로 UVD와 MSD를 사용한 결과를 각각 그림 26과 27에 제시하였다. UVD를 검출기로 사용하였을 때는 자외선 흡수제 3종은 검출되었으나, 광안정제 2종은 검출되지 않았다. 그 이유는 광안정제 2종은 검출파장의 빛을 흡수하지 않아 분리되었다고 해도 검출되지 않은 것이다. 반면, MSD를 검출기로 사용하였을 때는 자외선 흡수제 3종은 물론이고 광안정제 2종도 검출되었다. MSD는 화학종의 특성에 크게 구애 받지 않고 모든 화합물을 검출할 수 있는 장점이 있다.

MSD를 검출기로 사용한 경우, 크로마토그램에 나타난 개개의 피크에는 이온의 종류와 세기에 대한 정보, 즉 질량 스펙트럼이 담겨있다. 분리된 성분의 질량 스펙트럼을 해석함으로써 미지 시료의 성분을 확인할 수 있다. LC/MS로 분석한 경우, 보통 LC/MS 크로마토그램은 검출된 모든 이온의 세기가 담겨진 total ion chromatogram (TIC)이다. 개개의 봉우리에 검출된 모든 이온의 정보가 담겨진 질량 스펙트럼이 있으므로 특정 이온 성분만을 추출하여 별도의 크로마토그램으로 나타낼 수 있는데, 이를 extracted ion chromatogram (EIC)라고 한다. 그림 28에 자외선 흡수제 3종과 광안정제 2종의 혼합물의 TIC 크로마토그램과 개별 성분의 특징적 이온에 대한 EIC 크로마토그램을 함께 실었다. EIC 크로마토그램을 이용하면, 분석물에서 관심 있는 성분이 있는지를 쉽게 확인할 수 있다.

LC/MS에서 LC 컬럼을 사용하여 분리하지 않고 바로

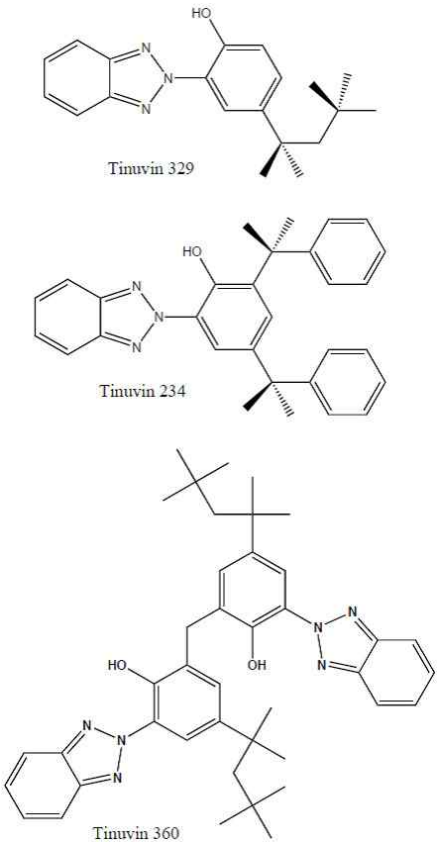


그림 24. 자외선 흡수제(UV absorber) Tinuvin 329, Tinuvin 234, Tinuvin 360의 화학 구조.

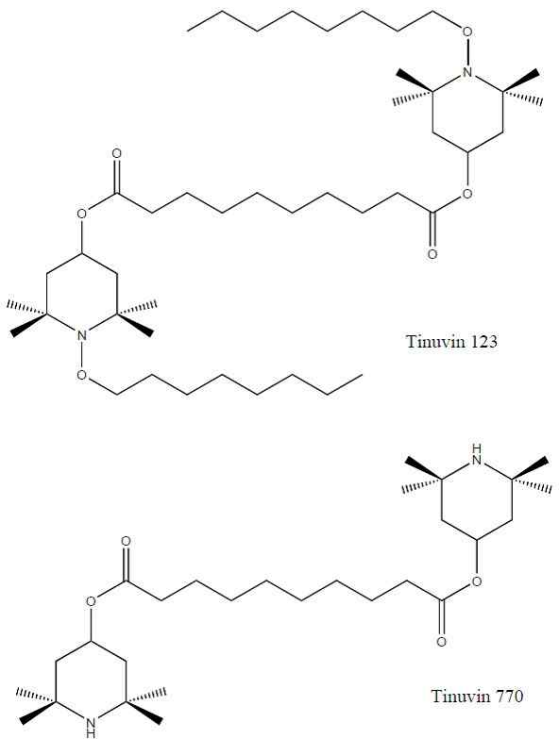


그림 25. 광안정제(light stabilizer) Tinuvin 123, Tinuvin 770의 화학 구조.

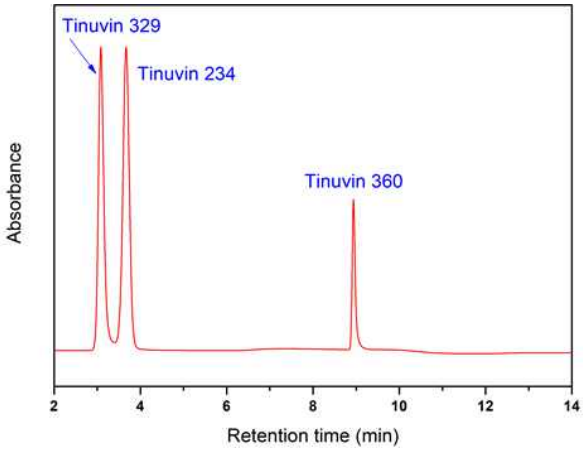


그림 26. 자외선 흡수제 3종(Tinuvin 329, Tinuvin 234, Tinuvin 360)과 광안정제 2종(Tinuvin 123, Tinuvin 770) 혼합물의 HPLC_UVD (검출 파장 340 nm) 크로마토그램.

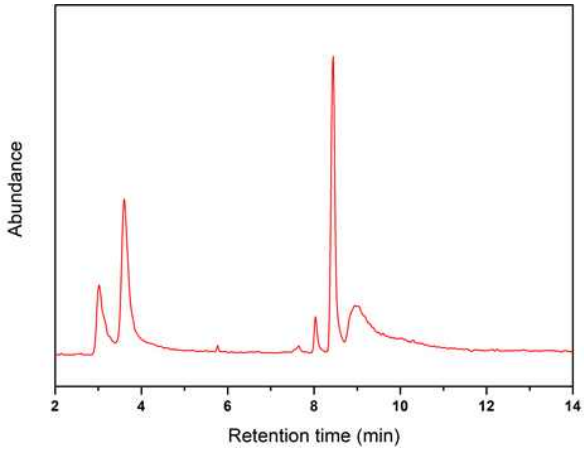


그림 27. 자외선 흡수제 3종(Tinuvin 329, Tinuvin 234, Tinuvin 360)과 광안정제 2종(Tinuvin 123, Tinuvin 770) 혼합물의 LC/APCI-MS 크로마토그램.

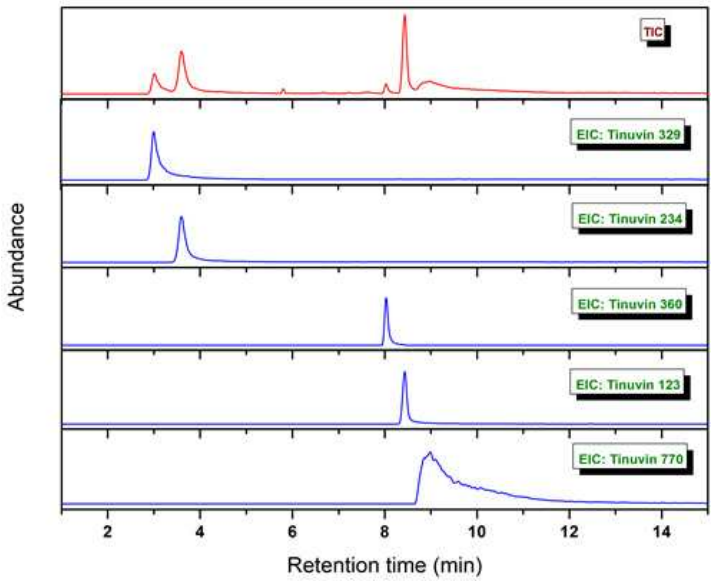


그림 28. 자외선 흡수제 3종(Tinuvin 329, Tinuvin 234, Tinuvin 360)과 광안정제 2종(Tinuvin 123, Tinuvin 770) 혼합물의 LC/APCI-MS TIC 크로마토그램과 EIC 크로마토그램.

질량분석법으로 분석하여 매우 복잡한 성분을 분리할 수 있다. LC에서 MSD로 사용하는 이온화 방법인 API는 에너지가 적은 연이온화(soft ionization) 방법으로 조각 이온들이 거의 생성되지 않는다. 따라서 분석 조건을 적절하게 조정하면 API 질량 스펙트럼에 나타난 이온들은 각각 한 가지 화학종이라고 할 수 있다. 고무배합물 제조에는 다양한 페놀계 레진을 사용하고 있는데, 이들 레진계 화합물은 미반응 단량체부터 올리고머까지 분자량 분포가 넓고 유사한 구조의 화합물이 다수 존재하여 크로마토그래피로 성공적으로 분리하기는 곤란하다. 그림 29는 가교제로 사용하는 레졸 레진의 APCI-MS 음이온 질량 스펙트럼으로, 미반응 단량체부터 알킬페놀이 6개 연결된 헥사머(hexamer)까지 넓은 영역의 분자량 분포를 갖는 것을 알 수 있다. 레졸 레진은 말단기가 메틸올(CH_2OH)로 되어 있어야 가교 결합이 가능하지만, 실제 사용하는 레졸 원재료에는 다양한 말단기가 존재하고 있으며 알킬 페놀을 연결하는 부위도 메틸렌(CH_2)과 이써(CH_2OCH_2) 2 가지가 존재한다. 그림 30에 레졸 레진 트리머(trimer)의 가능한 구조를 제시하였다. 그림 31은 그림 29의 질량 스펙트럼 중 트리머에 해당하

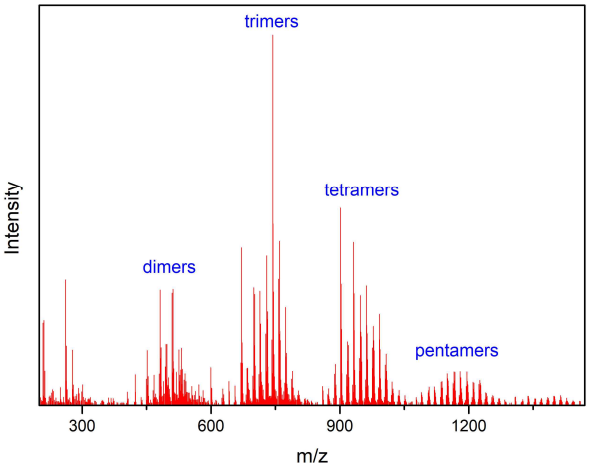


그림 29. 컬럼을 사용하지 않고 바로 분석한 레졸 레진의 APCI-MS 음이온 질량 스펙트럼.

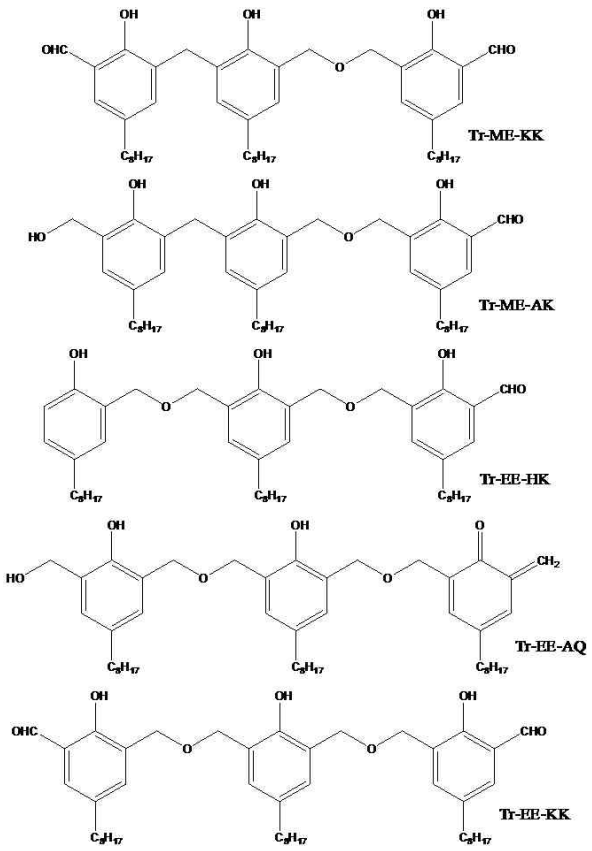


그림 30. 레졸 레진 트리머의 다양한 화학 구조. 첫 두 글자(Tr)는 trimer를 뜻하는 것이고, 가운데 두 글자는 연결 부위로 M은 methylene이고 E는 ether를 의미하며, 마지막 두 글자는 말단기 표기로 A는 alcohol, H는 hydrogen, K는 ketone (aldehyde), Q는 quinone을 의미한다.

는 부분을 확대하여 나타낸 것으로 개개의 화학종이 잘 분리되어 나타난 것을 볼 수 있다.

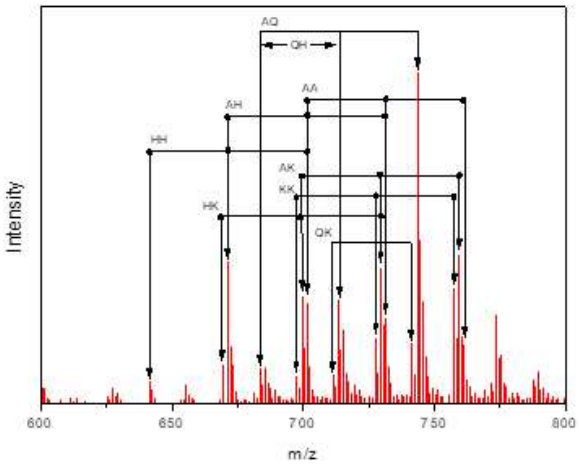


그림 31. 컬럼을 사용하지 않고 바로 분석한 레졸 레진의 APCI-MS 음이온 질량 스펙트럼 중 트리머 확대 부분 질량 스펙트럼. 표기한 영문 두 글자는 말단기 표기로 A는 alcohol, H는 hydrogen, K는 ketone (aldehyde), Q는 quinone을 의미한다.

7. 참고문헌

1. D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, “Principles of Instrumental Analysis”, 6th Ed., Thomson, USA, 2007.
2. D. C. Harris, “Quantitative Chemical Analysis”, 7th Ed., Freeman, USA, 2007.
3. 최성신, “기체 크로마토그래피(GC)를 이용한 고무 첨가제와 추출물의 분리”, *고무기술지*, **21**, 68 (2020).
4. E. Chae and S.-S. Choi, “Extraction methods of organic components from rubber composites and analysis of the extract using gas chromatography/mass spectrometry", *Elast. Compos.*, **54**, 188 (2019).
5. 최성신, “질량분석법(MS)을 이용한 고무 소재의 원재료 분석 기법”, *고무기술지*, **21**, 11 (2020).
6. A. T. Blades, M. G. Ikonomou, and P. Kebarle, “Mechanism of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell”, *Anal. Chem.*, **63**, 2109 (1991).
7. I. Dzidic, D. I. Carroll, R. N. Stillwell, E. C. Horning, “Comparison of positive ions formed in nickel-63 and corona discharge ion sources using nitrogen, argon, isobutane, ammonia and nitric oxide as reagents in atmospheric pressure ionization mass spectrometry”, *Anal. Chem.*, **48**, 1763 (1976).
8. A. Raffaelli and A. Saba, “Atmospheric pressure pho-

toionization mass spectrometry", *Mass Spectrom. Rev.*, **22**, 318 (2003).
9. K. Das, R. N. Datta, and D. K. Basu, "Retarding and antioxidant activity of 1-cyclohexylthio-2-mercaptobenzimidazole in the vulcanization of NR accelerated by thiocarbamyl sulfenamide", *J. Appl. Polym. Sci.*, **34**, 1977 (1987).
10. A. B. Sullivan, C. J. Hann, and G. H. Kuhls, "Vulcanization chemistry. Sulfur, N-*t*-butyl-2-benzothiazole sulfenamide formulations studied by high performance liquid chromatography", *Rubber Chem. Technol.*, **65**, 488 (1992).