

## Tetramethylammonium Bromide를 이용한 방향족 술폰산들의 액체크로마토그래피

吳 海 範

전주우석대학교 화학과

(1992. 12. 1 접수)

### Liquid Chromatography of Aromatic Sulfonic Acids by Tetramethylammonium Bromide

Hae-Beom Oh

Department of Chemistry, Chonju Woosuk University, Wanju 565-800, Korea

(Received December 1, 1992)

**요약.**  $C_{18}$  칼럼을 정지상으로 사용한 역상 액체크로마토그래피에서 수소성이 약한 tetramethylammonium bromide(TMAB)를 반대이온으로 사용하여 방향족 술폰산들의 머무름기구를 조사해 본 결과, 이온-쌍모델이 우세하였다. 분석물질들의 용량인자는 반대이온의 종류와 농도, 메탄올과 co-anion의 농도, 분석물질속에 있는 작용기의 종류와 위치 및 이동상의 pH 등의 영향을 받았다. 또한, 최적 조건하에서 분석물질들의 혼합물을 효과적으로 분리할 수 있었다.

**ABSTRACT.** Ion-pair model was predominated over ion-interaction model in the retention mechanism of analytes when tetramethylammonium bromide (TMAB) was used as a counter-ion in the investigation of aromatic sulfonic acids on the reversed-phase liquid chromatography by  $C_{18}$  column as a stationary phase. The capacity factors of analytes were influenced by the type and concentration of counter-ions concentrations of methanol and co-anion, types and position of functional group, and the pH mobile phase. Components of analyte mixture could be separated under the optimum conditons by this method.

### 서 론

이온-교환크로마토그래피(IEC)법이 이온성 물질을 분리하는데 HPLC에서도 많이 이용되고 있다. 그런데, 이 방법은 이미 여러 가지 단점이 밝혀졌기 때문에<sup>1</sup> 중성 지지체에 시료와 반대 전하를 띤 이온성 물질을 정지상으로 사용하여 시료 이온과 이온-쌍을 형성토록하여 분리하는 이온-쌍크로마토그래피(IPC)법이 새로운 방법으로 개발되었다<sup>2~4</sup>. 이 방법을 이용할 경우, 시료의 종류에 따라 이온-쌍을 형성할 수 있는 반대이온(counter-ion)을 다양하게 선택하여 칼럼의 효율을 증가시킬 수 있고 이동상을 용이하게 변화시킬 수 있으며, 칼럼의 충진물질을 바꾸지 않아도 이온성 물질을 분리할 수 있기 때문에 효과적으로 활용할 수 있다.

IPC을 이용한 분리방법 중에도 정상 크로마토그래피는 정지상으로 사용하는 반대이온을 분리판의 충진물질에 입혀준 후 실험이 완료되면 다시 분리해야 하는 등 조작이 불편하고 충진물질이 불안정해지기 쉬우므로 널리 이용되지 못하고 있다. 따라서 소수성 물질을 정지상으로 하고 극성이 큰 수용성이 이동상에 반대이온을 첨가하여 시료를 분리하는 역상크로마토그래피법이 많이 이용되고 있다. Santi 등<sup>5</sup>이 silanized silica 칼럼을 정지상으로 하고 피크린산을 클로로포름-이염화메틸렌용액을 첨가하여 몇 가지 알칼로이드를 분리한 아래 많은 연구결과가 발표되었다<sup>6~15</sup>. 최근에는 이 방법의 활용도를 넓혀서 전기적으로 중성인 알코올류와 단당류, 케톤류 및 에스터 등을 분리하여 내었다<sup>9~11</sup>. 더 나아가서는

분광광도검출기로는 검출할 수 없었던 시료들도 자외선이나 가시광선에 대한 물 흡광계수가 큰 시약을 반대이온겸 검출시약으로 사용하여 분리 검출할 수 있는 간접분광광도법(indirect photometric method)까지 개발되었다.

이러한 장점을 이용하여 본 연구에서도 역상크로마토그래피법으로 방향족 슬픈산들을 분리해 보고자 하였다. Rotsch와 Pietrzyk<sup>7</sup>은 XAD-2 수지를 충진 물질로 사용하여 4종의 슬픈산을 분리하였으나 용량인자에 영향을 미치는 요인을 밝히지 않았으며, XAD-2 수지는 HPLC용으로 상품화되어 있지 않고 입자가 균일하지 않아서 조작의 어려움이 있다. Kang 등<sup>12</sup>이 dodecyltrimethylammonium bromide(DTAB)를 반대이온으로 사용하여 C<sub>18</sub> 칼럼으로 분리하였고 머무름기구도 규명하였다. 그런데 DTAB는 소수성이 커서 분리시간이 너무 길었고 머무름기구는 이온-상호작용 모델이었다.

따라서 본 연구에서는 실리카 표면에 알킬기로 처리된 bonded-phase 칼럼의 일종인 C<sub>18</sub>을 이용한 역상계에서 tetramethylammonium bromide(TMAB)를 반대이온으로 사용해서 머무름기구를 규명하고, 방향족 슬픈산들의 용량인자에 영향을 미칠 것으로 생각되는 여러 가지 요인을 알아보려고 하였다. 그리고 이 결과를 기초로 하여 시료 혼합물을 분리해 냄으로써 방향족 슬픈산들의 분석 방법을 개선하고자 하였다.

## 실험

**시약.** 본 실험에 사용된 모든 시약들은 Tokyo Kasei, B.D.H., Aldrich 및 Junsei Chemicals 등의 회사에서 구입한 특급내지 G.R. 등급을 정제하지 않고 사용하였다. 메탄올은 E. Merck 회사의 HPLC 용을 사용하였으며 중류수는 이차중류하여 이온교환수지에 통과시킨 탈이온수를 사용하였다.

**측정기기 및 칼럼.** 본 실험에서 사용한 HPLC 장치는 Pye-Unicam 회사 제품으로 펌프는 PU4010 이중펌프, 검출기는 PU4023 RI 검출기로 바탕선의 안정도를 조사하였으며 PU4020 분광광도 검출기로 시료를 분석하였다. 그리고 칼럼에 시료를 주입하기 위한 주입기는 20 μl rotary valve injector를 사용

하였으며, 기록기는 PM8251 기록기를 사용하였다. 한편, 칼럼은 실리카 표면에 옥타데실기로 처리한 10 μm 직경의 입자를 내경이 4.6 mm, 길이가 25 cm인 관에 고압으로 충진시킨 Partisil C<sub>18</sub>을 사용하였다.

**용리액의 조제.** 메탄올, 반대이온 및 NaCl 등을 실험조건에 알맞도록 중류수에 용해시켜 일정한 농도로 만든 다음, ultrasonic bath에서 용액속에 녹아있는 공기를 제거하고 0.45 μm millipore 여과지로 흡인여과하여 사용하였다. 또한 완충용액은 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 등을 각각 1.0 mM 농도로 만들어 필요한 pH에 알맞도록 혼합하여 이동상으로 사용하였다.

**시료의 검출 및 분석.** 칼럼에 시료를 주입하기 전에 이동상을 오랫동안 통과시켜 이동상과 칼럼 사이에 평형이 되도록 하였다. 평형이 이루어졌을 때는 RI 검출기에 의한 감응도가 같아서, 바탕선이 일정하게 안정되었다. 이동상의 유속은 1.0 ml/min 으로 고정시켰으며, 시료는 물흡광계수에 따라 0.01 mM에서 1.0 mM의 농도로 만들어 20 μl씩 주입하였다. 모든 시료의 검출은 상온하에서 수행하였고, 자외선 분광광도 검출기로 254 nm의 파장에서 측정하였다. 시료의 머무름은 용량인자(*k'*)로 표시하였으며 칼럼의 틈새부피는 질산이온을 주입하여 측정하였다. 그리고 혼합시료들은 앞에서 얻은 실험 결과를 기초로 하여 알맞은 조건을 선택하고, 몇 가지 가능한 시료들의 분리를 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 시료의 머무름기구

역상계의 크로마토그래피에서 이동상에 첨가한 반대이온과 시료이온, 그리고 칼럼 사이에 일어나는 머무름기구(retention mechanism)는 이온-쌍 모델과 이온-상호작용 모델이 있다. 이온-상호작용 모델은 소수성이 칼럼에 반대이온이 먼저 흡착되고 시료이온이 co-anion과 이온교환이 일어나서 전기적 이중층을 형성함으로써 머무름이 일어난다는 이론이다. 반면에 이온-쌍모델은 반대이온과 시료이온이 이온-쌍을 형성하여 전기적 중성이 된 후 칼럼에 배향하여 머무름이 일어난다는 이론으로, 이를 설명하는 관

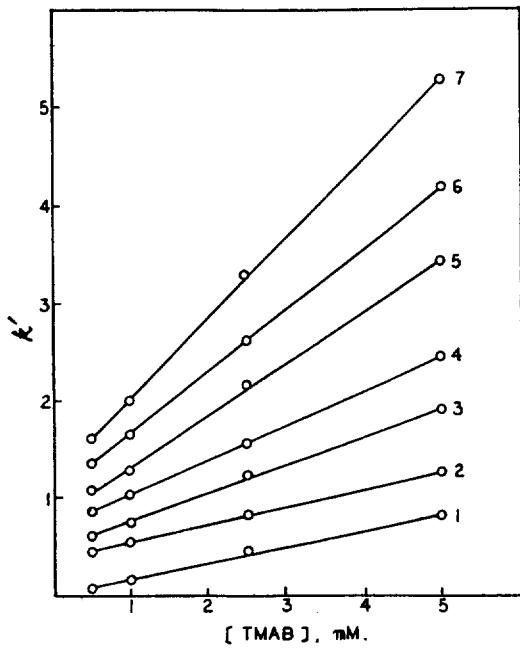


Fig. 1. The effect of TMAB concentration on the capacity factors of aromatic sulfonic acids in 20% MeOH at pH 6.9. 1: N-1,5-DSA, 2: BSA, 3: *m*-NO<sub>2</sub> BSA, 4: 1-NOH-4-SA, 5: 2-NH<sub>2</sub>-1-NSA, 6: *p*-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> BSA, 7: 1-NSA.

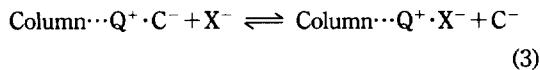
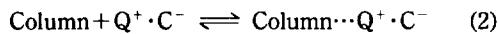
계식을 Wahlund 등<sup>14,15</sup>이 유도해 냈다.

$$k' = \frac{V_s}{V_m} \cdot E_{QX} \cdot [Q^{+}_{\text{aq}}] \quad (1)$$

여기서  $V_s$ 와  $V_m$ 은 정지상과 이동상의 부피이고  $E_{QX}$ 는 추출상수이므로 결국 시료의 용량인자는  $Q^{+}_{\text{aq}}$ 로 표시되는 반대이온의 농도에 비례한다는 것이다.

따라서 본 연구에서도 이러한 관계를 알아보기 위하여 TMAB의 농도와 용량인자 사이의 관계를 조사하여 Fig. 1에 나타내었다. 이들 사이에는 정비례 관계가 성립함을 알 수 있다. 또한 TMAB의 알킬기가 메틸기이므로 다른 알킬기에 비하여 소수성이 약하기 때문에 이온-상호작용 모델이론과 같은 소수성인 칼럼에 쉽게 흡착되지 않는다고 볼 수 있다. 그러므로 TMAB를 반대이온으로 사용하였을 때는 이온-쌍 모델이 우세하게 진행된다고 볼 수 있다.

이온-상호작용 모델은 칼럼과 분석물질 사이에 다음과 같은 식으로 표시할 수 있다.



$Q^{+}$ 는 counter ion이고  $C^{-}$ 는 co-anion이며  $X^{-}$ 는 analyte ion이다.

즉 반대이온이 칼럼에 먼저 흡착된 다음 분석이온이 co-anion과 이온교환이 일어나서 전기적 이중 층을 형성하여 머무름이 일어난다는 것이다. 따라서 이온-상호작용 모델이 우세하다면 (2)의 식에서 평형에 도달하기 위해 이동상을 장시간 동안 통과시켜 주어야 할 것으로 생각된다. 실험결과 TMAB를 반대이온으로 때는 이동상을 통과시킨지 30분이내에 평형이 유지되어 바탕선이 안정되었다. 그러나, 소수성이 큰 DTAB를 사용하였을 때에는 30시간 이상 통과시켜 주어야 평형이 유지되어 바탕선이 안정되었다. TMAB를 반대이온으로 사용했을 경우에 짧은 시간내에 도달한 원인의 하나로 (2)의 반응이 일어나지 않고 분석물질이 반대이온과 먼저 이온-쌍을 형성한 후 칼럼에 배향한다는 이온-쌍 모델이 우세하게 진행한다고 생각된다.

이상과 같은 조사결과를 종합해 볼 때 TMAB를 반대이온으로 사용할 경우에는 이온-쌍 모델이 우세하게 진행한다고 생각되어진다.

#### 용량인자에 영향을 주는 요인

역상계에서 IPC법은 먼저 시료와 이온-쌍을 형성할 반대 이온을 이동상에 녹여서 칼럼에 통과시킨다. 평형이 이루어지면 시료를 주입하여 정지상과 이동상 사이에 분배가 일어나는 과정으로 분리된다. 그러므로 여러 가지 조건을 변화시켜 시료를 다양하게 선택하여 분리할 수 있다. 따라서 적절한 분리를 하기 위해서는 여러 가지 실험조건하에서 용량인자를 측정하여 비교해야 한다. 용량인자에 영향을 미칠 것으로 생각되는 반대이온의 종류와 농도, 유기용매와 전해질의 종류 및 농도, 시료에 치환된 작용기의 종류와 위치, 그리고 pH 등의 인자들에 대하여 살펴보았다.

**반대이온의 종류.** 반대이온의 종류에 따라서 알킬기의 탄소수가 다르기 때문에 소수성의 차이가 나서 용량인자값이 다를 것으로 생각되었다. 그래서 TMAB, tetra-butylammonium bromide(TBAB) 및

Table 1. Capacity factors of aromatic sulfonic acids on the C<sub>18</sub> column as a function of type of counter ion at pH 6.9

Compound	Type of counter ion			
	Absence	TMAB	TBAB	DTAB
BSA	0.00	0.36	1.09	5.36
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA	0.00	0.45	1.18	6.73
<i>m</i> -CH <sub>3</sub> BSA	0.00	0.59	1.27	7.09
<i>m</i> -Cl BSA	0.00	0.77	1.82	11.27
<i>m</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> BSA	0.00	0.82	2.09	12.09
Sultosalicycic	0.00	0.23	1.18	37.27
1-NSA	0.00	0.82	2.18	14.91
1-NOH-4-SA	0.00	0.59	1.45	8.27
1-NOH-5-SA	0.00	0.45	1.27	6.64
1-NOH-8-SA	0.00	1.14	3.27	26.27
2-NH <sub>2</sub> -1-NSA	0.00	0.68	1.45	12.09
N-1,5-DSA	0.00	0.18	1.09	34.64
N-2,7-DSA	0.00	0.22	1.18	31.00

Mobile phase: 40% MeOH-60% H<sub>2</sub>O (v/v) containing 1.0 mM counter ion, BSA: benzenesulfonic acid, NSA: naphthalenesulfonic acid, NOH-SA: naphtholsulfonic acid, N-DSA: naphthalene disulfonic acid.

DTAB 등의 반대이온을 각각 40% 메탄올용액에 용해시킨 다음에 용량인자를 측정해 본 결과 Table 1과 같이 나타났다. 반대이온을 첨가하지 않았을 때의 용량인자는 모두 0.00으로 나타났다. 그 원인은 술폰산들이 강한 유산기이므로 이온화된 상태로 있기 때문에 소수성을 띤 ODS 칼럼에 배향되지 못하고 용출된다고 생각된다. 반대이온을 이동상에 첨가하였을 경우에는 모든 분석물질의 용량인자가 반대이온의 종류에 따라서 TMAB<TBAB<DTAB의 순으로 증가되었다. 즉 반대이온의 소수성이 커질수록 용량인자가 증가되었다. 이것은 소수성이 커질수록 분석이온과 형성된 이온-쌍 역시 소수성인 칼럼에 배향하려는 힘이 강해지기 때문이다. 이런 이유로 인하여 소수성이 강한 DTAB를 반대이온으로 사용했을 경우에 용량인자가 현저히 증가되었음을 확인할 수 있었다.

**TMAB의 농도.** 본 실험에서 주로 사용한 TMAB의 농도와 분석물질의 용량인자 사이의 관계를 알아보기 위하여 20% 메탄올의 이동상에서 TMAB의 농도에 따라 분석물질의 용량인자를 측정한 결과가 Table 2에 나타나 있다. TMAB의 농도가 증

Table 2. Capacity factors of aromatic sulfonic acids on the C<sub>18</sub> column as a function of the concentration of TMAB in 20% MeOH at pH 6.5

Compound	Concentration of TMAB, mM					
	0.00	0.50	1.00	2.50	5.00	7.50
BSA	0.00	0.45	0.54	0.82	1.27	1.27
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA	0.00	0.59	0.73	1.27	1.91	2.00
<i>m</i> -CH <sub>3</sub> BSA	0.00	0.77	0.91	1.36	2.09	2.27
<i>m</i> -Cl BSA	0.00	1.09	1.18	1.82	2.91	3.14
<i>m</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> BSA	0.00	1.36	1.64	2.60	4.18	4.41
Sultosalicycic	0.00	0.18	0.27	0.64	1.18	1.41
1-NSA	0.00	1.60	2.00	3.27	5.27	5.27
1-NOH-4-SA	0.00	0.86	1.05	1.55	2.45	2.55
1-NOH-5-SA	0.00	0.68	0.82	1.36	2.00	2.09
1-NOH-8-SA	0.00	3.91	4.73	8.27	12.64	12.91
2-NH <sub>2</sub> -1-NSA	0.00	1.09	1.27	2.18	3.45	3.59
N-1,5-DSA	0.00	0.09	0.18	0.45	0.82	0.82
N-2,7-DSA	0.00	0.18	0.23	0.55	0.95	1.23

Mobile phase: 20% MeOH-80% H<sub>2</sub>O (v/v) containing TMAB at different concentration.

Table 3. Capacity factors of aromatic sulfonic acids on the C<sub>18</sub> column as a function of the concentration of methanol in 1.0 mM TMAB at pH 6.5

Compound	MeOH, %	
	20	40
BSA	0.54	0.36
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA	0.73	0.45
<i>m</i> -CH <sub>3</sub> BSA	0.91	0.59
<i>m</i> -Cl BSA	1.18	0.77
<i>m</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> BSA	1.64	0.82
Sultosalicycic	0.27	0.48
1-NSA	2.00	0.82
1-NOH-4-SA	1.05	0.59
1-NOH-5-SA	0.82	0.45
1-NOH-8-SA	4.73	1.14
N-1,5-DSA	0.18	0.18
N-2,7-DSA	0.23	0.18

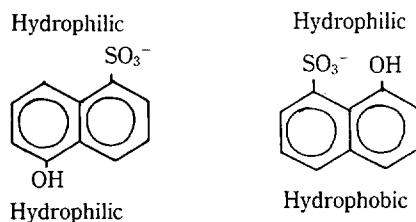
가할수록 용량인자도 증가되었음을 알 수 있다. 그 원인은 TMAB의 농도가 증가되면, 분석이온이 TMA<sup>+</sup> 이온과의 평형관계에서 TMA<sup>+</sup>...X<sup>-</sup>의 이온-쌍을 형성할 수 있는 자리수가 많아지므로 소수성인 칼럼에 머무르는 시간이 증가하기 때문이다.

**메탄올의 농도.** 1.0 mM TMAB 용액하에서 이

동상에 첨가한 메탄올의 농도에 다른 용량인자가 *Table 3*에 나타나 있다. 메탄올의 농도가 증가하면 모든 분석물질의 용량인자는 감소한 것을 알 수 있는데, 이 원인은 메탄올의 농도가 증가하면 용매의 강도(solvent strength)가 증가하므로 이온-쌍을 형성한 분석물질들이 정지상에 배향하려는 성질이 약해지기 때문이다.

**치환기의 종류 및 위치.** 분석이온과 반대이온과 이온-쌍을 형성하여 칼럼에 배향될 때, 소수성이 차이에 따라 칼럼에 대한 배향력이 달라질 것으로 생각되었다. 따라서 본식물질속에 치환된 작용기의 종류가 분자의 소수성에 영향을 미치므로 이에 따른 용량인자를 비교해 보아써다. 20% MeOH, 7.5 mM TMAB 용액하에서 측정한 술폰산들의 용량인자를 살펴보면, 벤젠술폰산들은 BSA(1.27)<*p*-CH<sub>3</sub> BSA (2.27)<*p*-Cl BSA(3.14)<*p*-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> BSA(4.41)와 같은 순서로 증가되었으며 나프탈렌계는 *N*-1,5-DSA(0.82)<1-NOH-5-SA(2.09)<1-NSA(5.27)의 순으로 증가되었음을 *Table 2*에서 알 수가 있다. 일반적으로 작용기의 소수성이 증가할수록 용량인자도 큰 값을 가지는데, 그 원인은 TMA<sup>+</sup> 이온과 분석이온이 이온-쌍을 형성하면 소수성이 더욱 커져서 이동상과의 친화력이 감소하고, 작용기의 친수성이 증가할수록 이온-쌍의 친수성이 증가하여 이동상과의 친화력이 증가하기 때문이다.

그러나 같은 작용기를 가진 술폰산들이라도 작용기의 위치에 따라서 소수성의 정도가 달라지기 때문에 용량인자가 다르게 나타난다. 친수성 작용기를 포함하고 있는 나프톨술폰산들의 용량인자를 같은 조건에서 비교해 보면 1-NOH-5-SA(2.09)<1-NOH-4-SA(2.55)<1-NOH-8-SA(12.91)의 순으로 증가되었다. 이것은 수산기가 술폰산기와 멀리 떨어질수록 술폰산기는 술폰산이온으로 이온화되어 TMA<sup>+</sup> 이온과 이온-쌍을 형성하는데 반하여, 수산기는 극성인



이동상에 친화력으로 작용하기 때문에 시료의 머무름을 방해하는 역할을 해서 용량인자가 감소하는 것으로 여겨진다.

그리고 수산기가 술폰산기와 인접해 있는 1-NOH-8-SA의 용량인자가 많이 증가되었는데, 그 원인은 수산이온이 술폰산이온과 함께 이온쌍을 형성하는 힘을 강하게 해주는 반면에 반대 부분은 소수성이 강하여 극성인 이동상과의 친화력이 약해져서 칼럼에 머무르는 시간이 증가한다고 볼 수 있다.

그러나 반대이온과 같은 전하를 띠 수 있는 친수성 치환기가 인접해 있으면 오히려 감소되는 현상을 볼 수 있다. 대표적인 예로 2-NH<sub>2</sub>-1-NSA(3.59)가 1-NSA(5.27)보다 작은 값을 가지고 있다. 이것은 수소이온이 아미노기와 결합하여 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 이온이 되므로 TMA<sup>+</sup> 이온과 같은 전하를 띠어 이온-쌍 형성에 방해작용을 하므로 용량인자가 감소하였다고 생각된다.

**이온의 세기.** 이온-쌍 형성시약으로 사용한 TMA<sup>+</sup> 이온과 시료인 음이온 사이에 정전기적 인력이 작용하게 되는데, 이동상에 다른 음이온을 넣어주면 용량인자에 영향을 미친다. 이온의 세기가 술폰산들의 머무름에 미치는 영향을 알아보기 위하여 이동상에 NaCl을 첨가하여 용량인자를 측정한 결과가 *Table 4*와 같이 나타났다. NaCl의 농도가 0.25 mM 이하의 묽은 용액에서는 용량인자가 NaCl이 없을 때보다 증가되었고, 진한 용액하에서는 감소하는 현상을 보였다. 묽은 용액하에서는 전해질에

*Table 4.* Capacity factors of aromatic sulfonic acids on the C<sub>18</sub> column as a function of the concentration of sodium chloride at pH 6.5

Compound	Concentration of NaCl, mM				
	0.0	1.0	2.5	5.0	10
BSA	0.82	1.15	1.15	0.75	0.72
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA	1.27	1.75	1.73	1.00	1.05
<i>p</i> -CH <sub>3</sub> BSA	1.36	1.95	2.00	1.10	1.10
<i>p</i> -Cl BSA	1.88	2.64	2.64	1.50	1.45
<i>p</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> BSA	2.60	3.73	3.55	2.00	1.86
Sultosalicylic	0.64	1.20	1.11	0.50	0.50
1-NSA	3.27	4.91	4.36	2.27	2.18
1-NOH-8-SA	8.27	10.91	9.91	4.55	4.09

Mobile phase: 20% MeOH containing 2.5 mM TMBA.

Table 5. Capacity factors of aromatic sulfonic acids on the C<sub>18</sub> column as a function of pH

Compound	pH			
	3.0	4.0	5.0	6.0
BSA	1.36	1.35	0.91	0.91
<i>m</i> -NO <sub>2</sub> BSA	2.19	2.05	1.36	1.36
<i>p</i> -CH <sub>3</sub> BSA	2.47	2.32	1.55	1.55
<i>p</i> -Cl BSA	3.55	3.27	2.14	2.09
<i>p</i> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> BSA	4.80	4.61	3.09	3.00
Sultosalicylic	1.48	1.18	0.55	0.55
1-NSA	6.72	6.36	3.86	3.72
1-NOH-4-SA	2.91	2.55	1.82	1.77
1-NOH-5-SA	2.29	2.14	1.45	1.45
2-NH <sub>2</sub> -1-NSA	3.64	3.82	2.50	2.45
N-1,5-DSA	0.91	0.82	0.45	0.45

Mobile phase: 20% MeOH containing 1.0 mM NaCl and 2.5 mM TMAB.

의해 이온의 세기가 증가할수록 전리된 술폰산이온이 증가하므로 이온-쌍을 형성하여 칼럼에 배향하기 때문이라고 생각된다. 그러나 NaCl의 농도가 진해지면, 분석물질의 음이온과 염화이온이 이동상에 있는 TMA<sup>+</sup> 이온과 경쟁적으로 이온-쌍을 형성하려는 경쟁효과(competitive effect)가 더 강하게 작용하므로 분석물질이 칼럼에 머무르는 시간이 상대적으로 짧아진다고 볼 수 있다. 그리고 이온의 세기가 증가하면 이온-쌍을 형성하지 않고 술폰산이온 상태로 존재하려는 성질이 강하게 되므로 칼럼에 배향이 잘되지 않기 때문에 용량인자가 감소된다고 생각된다.

**pH.** 분석물질로 사용한 술폰산들은 유기산이므로 pH의 변화에 따라 많은 영향을 받는다. 따라서 pH를 3.0에서 6.0까지 변화시키면서 측정한 용량인자를 Table 5에 나타내었다. 모든 분석물질들은 pH가 증가할수록 상대적으로 감소하고 있음을 알 수 있다. pH가 작을 때는 일부 분석이온이 반대이온과 이온-쌍을 형성하여 칼럼에 배향하고 있으나, 아무래도 해리하지 않은 상태로 존재하는 분석물질들이 증가할 것이며 따라서 칼럼에 직접 배향하려는 성질이 커지기 때문이라고 생각된다. 반면에 pH가 커지면 분석물질이 전리된 형태로 존재하므로, 일부는 이온-쌍을 형성하여 칼럼에 배향하고 있으나, 극성인 이동상에 배향하려는 성질이 증가하기 때문

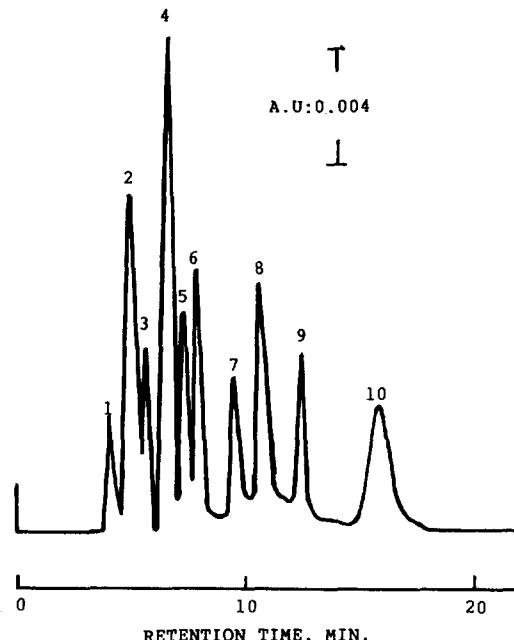


Fig. 2. Separation of aromatic sulfonic acids at pH 4.00. Mobile phase: 20% MeOH containing 10 mM NaCl and 2.5 mM TMAB, 1: N-1,5-DSA (0.3 µg), 2: Sulfosalicylic (3.2 µg), 3: BSA (1.4 µg), 4: *m*-NO<sub>2</sub> BSA (0.4 µg), 5: *p*-CH<sub>3</sub> BSA (3.4 µg), 6: 1-NOH-5-SA (2.0 µg), 7: *p*-Cl BSA (3.7 µg), 8: 2-NH<sub>2</sub>-1-NSA (0.2 µg), 9: *p*-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> BSA (1.9 µg), 10: 1-NSA (1.3 µg).

에 용량인자가 감소되는 것으로 생각된다.

#### 시료 혼합물의 분리

이상과 같은 실험결과를 기초로 해서 방향족 술폰산들의 혼합물을 효과적으로 분리할 수 있는 최적조건을 조사해 본 결과 10 mM NaCl, 2.5 mM TMAB가 녹아있는 20% MeOH 용액하에서 pH를 4.0으로 완충시킨 이동상을 사용할 때였다. 이 조건 하에서 혼합시료에 분리한 크로마토그램이 Fig. 2에 나타나 있다. DTAB를 사용하여 분리했을 때보다<sup>12</sup> 분석시간이 4분의 1 정도로 단축되었으며 tailing 현상도 줄어들었고, 분리할 수 있는 시료수도 10종으로 더 많기 때문에 훨씬 효과적인 방법이라고 할 수 있다.

#### 결 론

C<sub>18</sub> 칼럼을 정지상으로 한 역상크로마토그래피에서 소수성이 약한 TMAB를 반대 이온으로 사용하여

방향족 술폰산들의 머무름기구를 조사해 본 결과, 이온-쌍 모델이 우세하였다. 그리고 분석물질의 용량인자에 영향을 주는 요인들을 조사해 보았으며, 또한 최적조건하에서 혼합시료를 분리하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 반대이온의 소수성이 강할수록 술폰산들의 용량인자는 증가되었다.
2. TMAB의 농도가 증가될수록 용량인자는 증가되었다.
3. 이동상 중에 메탄올의 농도가 커지면 용량인자는 감소되었다.
4. co-anion으로 사용한 염소이온의 농도가 아주 높을 때는 용량인자가 증가되었으나, 농도가 진해지면 오히려 감소되었다.
5. pH가 커질수록 용량인자는 감소되었다.
6. 분석물질에 치환된 작용기의 종류와 위치에 따라 용량인자에 많은 영향을 주었다.
7. 혼합시료를 분리할 수 있는 최적조건은 10 mM NaCl, 2.5 mM TMAB가 녹아있는 20% 메탄올 용액하에서 pH를 4.0으로 완충시킨 이동상을 사용할 때였다.

### 인 용 문 헌

1. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, "Introduction to modern Liquid Chromatograph", 2nd Ed., P. 45,

- Wiley, New York, 1979.
2. S. Eksborg, P. O. Lagerstrom, R. Modin, and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **83**, 99 (1973).
3. S. Eksborg and G. Schill, *Anal. Chem.*, **54**, 2092 (1973).
4. B. A. Perrson and B. L. Karger, *J. Chromatogr. Sci.*, **12**, 521 (1974).
5. W. Santi, J. M. Huen, and R. W. Frei, *J. Chromatogr.*, **115**, 423 (1975).
6. B. A. Bidlingmeyer and F. V. Warren Jr., *Anal. Chem.*, **54**, 2351 (1982).
7. T. D. Rotsch and D. J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **52**, 1323 (1980).
8. H. B. Oh, S. W. Kang, and S. S. Leet, *J. Kor. Chem. Soc.*, **30**, 312 (1986).
9. J. H. Knox and R. A. Hartwick, *J. Chromatogr.*, **204**, 3 (1981).
10. T. Gnanasambandan and H. Freiser, *Anal. Chem.*, **54**, 1282 (1982).
11. 강삼우, 한남대학 논문집(자연과학편), **15**, 51 (1985).
12. S. W. Kang, H. B. Oh, and S. S. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, **30**, 224 (1986).
13. S. W. Kang, H. B. Oh, and Y. J. Moon, *ibid.*, **31**, 184 (1987).
14. B. Fransson, K. G. Wahlund, I. M. Johansson, and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **125**, 327 (1976).
15. I. M. Johansson, K. G. Wahlund, and G. Schill, *ibid.*, **149**, 281 (1978).