

# 역상 액체 크로마토그래피에 의한 금속-1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone 킬레이트의 분리 및 용리거동에 관한 연구

姜 昌 禧\*

Separation and Elution Behavior of Some Metal-1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone Chelates by Reverse Phase Liquid Chromatography.

*Chang-Hee Kang\**

## Summary

1-Phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone was synthesized, which was reacted with Ni(II), Cu(II), Co(III) and Cr(III) to form the chelate compounds. The liquid chromatographic behaviors of these metal-1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone chelates have been studied by the Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography.

These four kinds of chelates were successfully separated on NOVA-PAK C<sub>18</sub> column using methanol/water (63/37) mixture as a mobile phase. It was found that the chelates were eluted properly in an acceptable range of the capacity factor value ( $0 \leq \log k' \leq 1$ ). The dependence of the capacity factor ( $\log k'$ ) on the volume fraction of water in the binary mobile phase as well as on the column temperature and the enthalpy change ( $\Delta H$ ) showed a good linearity. Also, there was a good linear dependence of the capacity factor ( $\log k'$ ) on the liquid-liquid extraction distribution ratio ( $D_c$ ) in methanol-water/n-pentadecane extraction system by the batch method. It suggested that the retention of the chelates in the reverse phase liquid chromatographic system was largely due to the hydrophobic effect.

\* 자연과학대학 화학과 (Dept. of Chemistry, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

## 서 론

HPLC는 주로 유기물질의 분리분석법을 위한 목적으로 이용되어 왔으나 수년전서부터는 금속이온을 분리, 정량하기 위한 무기분석화학 분야로까지 그 활용도가 확대되고 있다. HPLC에 의한 금속이온의 분리 및 정량은  $C_{18}$  분리관을 이용한 역상 용리법이 주로 이용되고 있고, 최근에는 이러한 역상 액체 크로마토그래피에서 금속킬레이트의 분리 메카니즘을 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

역상 분리법에 의한 금속이온의 분리, 정량은 주로 금속이온에 적당한 킬레이트시약을 가하여 안정한 금속킬레이트를 형성시킨 다음  $C_{18}$  분리관에서 금속 킬레이트의 극성, 용해도, 기하학적 구조 등과 같은 물리화학적 성질의 차이에 의하여 분리시키는 방법을 택하고 있다. 이때 사용되는 대표적인 킬레이트시약으로는  $\beta$ -diketone, dithizone, dithiocarbamate, 8-hydroxyquinoline 등이 이용되고 있다. (Ichinoki and Yamazaki, 1985; Irth, *et al.* 1987; King, *et al.* 1987; Lehotay, *et al.* 1979; Shin, *et al.* 1982; Smith, *et al.* 1982; Uden and Bigley, 1977; Uden, *et al.* 1978; Yoza, *et al.* 1984)

역상 액체 크로마토그래피에서 금속킬레이트화합물을 분리하기 위한 용리 거동 및 메카니즘에 대한 연구는 F. Vlácil, Jandera 등에 의해 이미 발표된 적이 있으며 (Vlácil F. and V. Hamplová, 1985), 국내에서는 Lee 등이 몇 가지 금속이온과 diketone, dithiocarbamate류와의 킬레이트화합물에 대해 분리 메카니즘이 소용매성효과(Solvophobic effect)에 기인하는 것으로 발표한 바 있다(Lee, *et al.* 1987).

본 연구에서는 1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone을 합성하고, 이 pyrazolone 유도체를 리간드로 Ni(II), Cu(II), Co(III), Cr(III)의 금속이온과 metal-1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone 킬레이트화합물을 합성한 후 이를 시료로 역상 액체 크로마토그래피로 분리하였다.

역상 액체 크로마토그래피에서 이들 금속킬레이트화합물들에 대한 동시 분리의 가능성 및 머무름 메카니즘을 확인하기 위하여 먼저 분리관의 종류, 용리액의 조성, 흐름 속도 등 최적 분리조건을 조사하였다. 또한 용리액 중 물의 부피분율과 용량인자(capacity factor,  $K'$ ), 용량인자와 분포계수( $D_c$ )와의 상관 관계를 조사하였다. 다시 분리관의 온도를 변화시키면서 각 금속킬레이트들의 엔탈피( $\Delta H$ )를 구하여 용량인자와의 상관 관계를 조사함으로써  $C_{18}$  분리관에서 이들 킬레이트화합물들의 용리 거동 및 분리 메카니즘을 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1) 사용 기기

합성한 1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone 리간드 및 metal-1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone 킬레이트화합물의 구조 확인은 KRATOS ANALYTICAL사의 Mass Spectrometer (Model CONCEPT-S)와 BIO-RAD LAB.사의 Digilab Division에서 제작된 FT-IR Spectrometer (Model FTS-15/80)를 사용하였다. 리간드의 Mass Spectrum은 EI mode를 이용하여 얻어졌으며, 킬레이트의 Mass Spectrum은 FAB mode를 이용하였다.

금속 킬레이트들의 분리에 사용한 HPLC는 Varian사의 Model VISTA 5500 Liquid Chromatograph로 영인과학사의 YOUNGIN Model D520A Integrator와 UV-Visible 검출기가 부착된 것이다. 분리관으로는 Waters사의 NOVA-PAK  $C_{18}$  (3.9mm I.D.  $\times$  15cm L., N=11,600. Particle size = 4 $\mu$ m)을 사용하였으며, 금속 킬레이트들의 분포비 측정은 KONTRON사의 UNIKON 860 UV-Visible Spectrophotometer와 국제이화학상사의 SH-SV형 Shaker를 사용하였다.

또한 모든 실험에서 사용된 물은 Millipore사의 Milli-Q/-RO Reagent Water Purification System으로 정제하여 사용하였다.

## 2) 시 약

1-Pyrenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone 리간드 및 metal-1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone 킬레이트화합물의 합성에 사용한 시약은 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (LONZA Chemical사), 2-amino-4-nitrophenol (Aldrich사, 특급),  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Washiyata사, 특급),  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Kanto사, 특급),  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Washiyata사, 특급),  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Tokyo Kasei Kogyo사, 특급),  $\text{NaNO}_2$  (Junsei사, 특급) 등이며 경제하지 않고 사용하였다.

그 밖의 HPLC 실험에서 용리액 또는 시료의 용매로 사용된 methanol, acetonitrile, methylisobutylketone 등은 Burdick & Jackson Lab. 사의 크로마토그래피용, n-pentadecane은 Aldrich 사의 특급 시약을 Millipore membrane filter (Type FH, Pore size 0.45 $\mu\text{m}$ )로 정제하여 사용하였으며, 실험에 사용된 물은 Water Purification System으로 정제한 후 사용하였다.

리간드 및 킬레이트는 합성 후 재결정을 거쳐 냉각고에 보관하고, 사용시에는 용매에 소량 녹여 5 $\mu\text{m}$  Sep-Pak으로 거른 후 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 리간드의 합성

본 연구에서 사용한 리간드인 1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone (이하 [PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz]라 칭함) 리간드는 문헌의 방법에 따라 다음과 같이 합성하였다 (Mark, *et al.* 1978; Wiley, *et al.* 1964).

0.05 mole의 2-amino-4-nitrophenol에 진한 염산 3.9ml, 5°C이하에서 20% NaNO<sub>2</sub> 용액 5.25ml를 가하여 디아조화 반응시켰다. 다시 이 용액을 0.015 mole 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone의 염기성 용액과 5°C이하에서 짝지움(coupling) 반응시킨 후 dioxane 용매로 재결정하여 최종생성물을 얻어냈다.

### 2) 금속킬레이트의 합성

앞에서 합성한 [PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 2.5 $\times 10^{-4}$  mole을 dioxane에 녹이고, 각각 5.0 $\times 10^{-4}$  mole  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ , 수용액을 혼합하여, pH를 조절한 후 약 5시간 동안 물증탕에서 환류시켰다. 생성된 금속킬레이트는 사염화탄소로 세척 후 시료로 사용하였다.

### 3) 용리액의 흐름속도 선택

용리액의 흐름속도와 킬레이트의 분리도와의 관계를 조사하기 위하여 0.5~1.4ml/min 범위에서 0.2ml/min씩 유속을 변화시키면서 최적 흐름속도를 측정하였다. 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들을 30~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 dioxane에 녹인 혼합용액 3 $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 주입시키고, methanol/water (63/37) 혼합액을 용리액으로 사용하여 크로마토그램을 작성한 후 가장 양호한 흐름속도를 선정하였다.

### 4) 용리액의 조성 및 용량인자( $k'$ ) 측정

용리액의 용매세기에 따른 분리도의 영향을 확인하기 위하여, methanol/water=59/41~68/32의 범위내에서 메탄올과 물의 혼합비율을 변화시키면서 각각의 크로마토그램을 작성한 후 다음 식에 따라 용량인자( $k'$ )를 계산하였다.

$$k' = (t - t_0) / t_0$$

식에서  $t$ 는 시료의 머무른시간(retention time)이고,  $t_0$ 는 불감시간(dead time)이다.

### 5) 배치법에 의한 분포비 측정

n-Pentadecane 10ml를 취하여 분별깔대기에 넣고, 각 금속킬레이트 시료 일정량을 HPLC에서 용리액으로 사용한 메탄올과 물의 혼합액 10ml에 녹인 다음 이를 분별깔대기에 합친 후 Shaker에서 10분간 혼합시켜 시료가 두 상에 충분히 분배되도록 하였다. 두 층을 각각 분리시키고 두 상에 분배된 시료의 농도를 470nm에서 자외-가시선 분광광도계로 측정하였다. 이때 두 층에 분포된 시료의 분포비( $D_c$ )의 계산은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{분포비}(D_c) = C_{M \cdot \text{org}} / C_{M \cdot \text{aq}}$$

식에서  $C_{M.org}$ 는 유기용매층(n-pentadecane)의 시료농도이고,  $C_{M.aq}$ 는 수용매층(methanol/water)의 시료농도이다.

## 결과 및 고찰

### 1. 리간드 및 금속킬레이트의 구조 확인

합성한 리간드 및 금속킬레이트는 적외선 분광법과 질량 분석법에 의해 그 구조를 확인하였다.

Table 1에 요약된 것처럼 적외선 스펙트럼 분석 결과 리간드의 경우  $\nu_{O-H}=3382cm^{-1}$ 에서 강한 흡수띠가 나타나나 킬레이트에서는 이 흡수띠가 나타나지 않으며 이로부터 금속이온이 O-H의 산소원자와 결합이 형성되었음을 확인할 수 있었다. 또 리간드의 경우  $\nu_{C=O}=1644cm^{-1}$ 에서 강한 흡수띠가 나타나며, 이것은 카르보닐기의 탄소에 결합된 아민기의 공명효과에 의해 낮은 에너지 이동(low energy shift)이 일어난 결과이다. 그러나 금속킬레이트의 경우 금속이온과 산소가 결합되면서  $\nu_{C=O}$ 의 흡수띠가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다. 또한  $\nu_{C=N}$ 의 경우 리간드는  $\nu_{C=N}(endo)=1597cm^{-1}$ ,  $\nu_{C=N}(exo)=1581cm^{-1}$ 의 흡수띠를 나타내나 금속킬레이트  $\nu_{C=N}(endo)$ 만이 나타나고,  $\nu_{N=N}$ 에 의한 새로운 흡수띠가 얻어졌다. 이것은 금속킬레이트에서는  $-N=N-$ 의 새로운 결합이 생성된 결과로 보인다.

질량 스펙트럼 분석 결과, 리간드의 경우 EI mode로 측정된 스펙트럼에서  $m/e=294$ 의 비교적 강한 스펙트럼이 나타났다. 이것은 분자이온피크

(M')에 해당하는  $[PM(2-OH)(5-NO_2)PAPz]^+$ 이고, 이론 분자량과 잘 일치하였다.

또 금속킬레이트의 경우 FAB mode로 측정된 질량 스펙트럼에서 분자량이 크기 때문에 조각짐(fragmentation) 현상이 커서 아주 약한 분자이온 피크들이 나타났으며,  $m/e$ 값은 금속킬레이트인 금속- $[PM(2-OH)(5-NO_2)PAPz]$ 의 이론 분자량과 잘 일치함을 확인 할 수 있었다.

### 2. 자외-가시선법에 의한 몰비 측정

금속이온과 리간드가 킬레이트화합물을 형성할 때 그 결합비를 확인하기 위하여 Job법으로 실험하였다(Harris, 1982). 일정량의 리간드용액에 금속

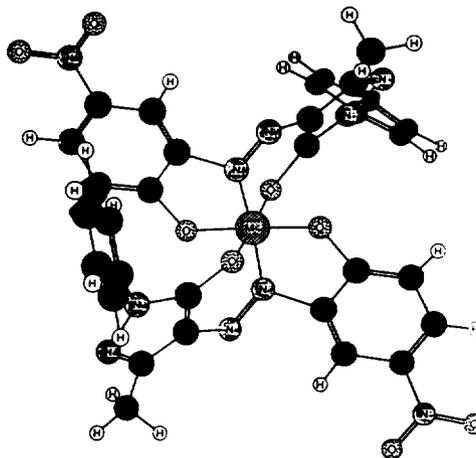


Fig. 1. Schematic representation of metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates.

Table 1. IR Spectra of [PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] ligand and metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates

| Ligand and Chelates                         | Stretching Vibrational Peaks ( $\nu$ , $cm^{-1}$ ) |      |               |              |      |      |
|---|--|------|---------------|--------------|------|------|
|   | O-H  | C=O  | C=N<br>(endo) | C=N<br>(exo) | N=N  | C-O  |
| [PM(2-OH)(5-NO <sub>2</sub> )PAPz]          | 3382   | 1644 | 1597          | 1581         |      | 1227 |
| Ni(II)-[(PM(2-OH)(5-NO <sub>2</sub> )PAPz]  |  |      | 1589          |              | 1562 | 1215 |
| Co(III)-[(PM(2-OH)(5-NO <sub>2</sub> )PAPz] |  |      | 1588          |              | 1557 | 1218 |
| Cr(III)-[(PM(2-OH)(5-NO <sub>2</sub> )PAPz] |  |      | 1592          |              | 1552 | 1213 |
| Cu(II)-[(PM(2-OH)(5-NO <sub>2</sub> )PAPz]  |  |      | 1590          |              | 1548 | 1209 |

이온을 미량씩 첨가하면서 흡광도를 측정한 결과 네 가지 금속이온들과 [PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 리간드 간에는 1:2의 몰비로 결합하며, ML<sub>2</sub>형 착물을 형성함을 확인할 수 있었고, 그 입체 구조는 정팔면체(octahedral)로 Fig. 1과 같다.

### 3. 역상 HPLC의 용리 메커니즘

#### 1) 용리액의 흐름속도 선택

역상 HPLC에서 용리액의 흐름속도를 변화시키면서 킬레이트의 분리도와와의 관계물 조사하고, 최적 분리조건을 찾아내기 위한 실험에서 용리액의 흐름속도는 0.5~1.4 ml/min 범위에서 변화시켰다. 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트 혼합물들은 1.0 ml/min일 때 분리도, 피크너비가 가장 이상적이고, 시료의 전체 용리시간이 적당하며, 반복 실험시 재현성이 좋은 머무름 시간을 나타내었다. 이때 각 금속킬레이트들을 분리시키기 위한 최적 기기 및 용리 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Optimum conditions for HPLC

| Descriptions         | Conditions  |
|----------------------|---|
| Column               | NOVA-PAK C <sub>18</sub> (3.9mm I.D. × 15cm L, N=11,600, Particle Size=4μm) |
| Mobile Phase         | Methanol/Water=63/37  |
| Flow Rate            | 1.0 ml/min  |
| Injection Volume     | 3μl   |
| Detection Wavelength | 470nm   |
| Chart Speed          | 0.5 cm/min  |

#### 2) 용리액의 조성구 용매 세기의 영향

분리도에 영향을 미치는 주요 인자들은 분리인자(α), 분리관의 이론단수(N) 및 용량인자(k') 세 가지이다. 본 실험적에서는 용리액의 세기가 분리도에 미치는 영향을 조사하고, 최적 용리액의 조성비를 구하기 위하여 용리액의 조성 변화에 따른 크로마토그램을 작성하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다. 이때 사용한 용리액은 메탄올과 물의 이성분 혼합용매이며, methanol/water의 비율

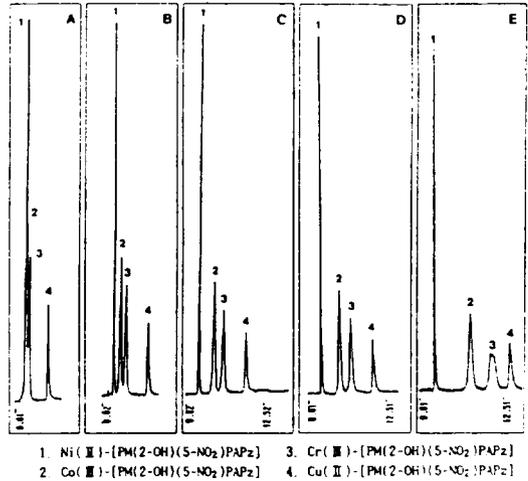


Fig. 2. Chromatograms of metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates by the variation of Mobile phase composition. (Mobile Phase : Methanol/Water = A : 68/32, B : 65/35, C : 63/37, D : 61/39, E : 59/41)

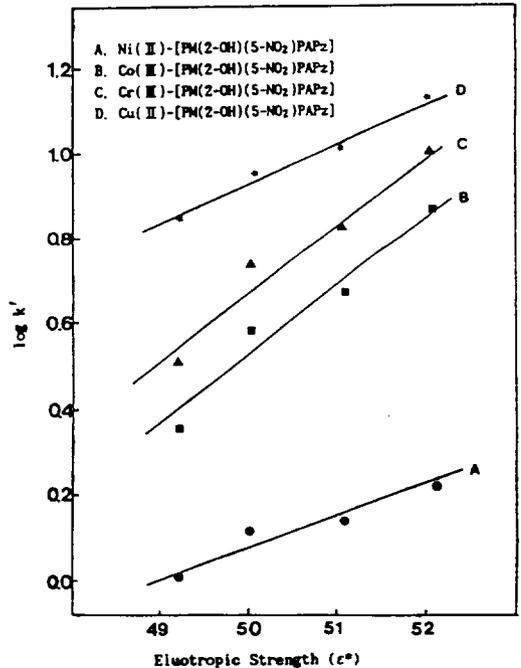


Fig. 3. Relationship between eluotropic strength (ε\*) of mobile-phase and log k' of metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates.

이 63/37일 때 용량인자가 최적 범위인  $0 \leq \log k' \leq 1$ 을 만족시키면서 분리도가 가장 좋고, 봉우리 넓힘(peak broadening) 현상과 꼬리끝기(tailing)가 감소함을 확인할 수 있었다(Glajch, *et al.* 1980; Synder and Kirkland, 1979).

한편 용리액의 조성비에 따른 각 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들의 크로마토그램으로부터 구한  $\log k'$  값과 Snyder 식으로부터 구한 용매의 용리세기(eluotropic strength,  $\epsilon^*$ )의 관계를 Fig. 3에 나타내었다. 이때 용리세기는 각 용매의 유전상수와 부피분율의 곱을 더한 값이다. 그림에서 보는 바와 같이  $\epsilon^*$ 와  $\log k'$ 과의 관계를 보면 직선상을 잘 나타내고 있음을 확인할 수 있다. 이처럼  $\epsilon^*$ 와  $\log k'$ 의 관계가 거의 직선적으로 정비례하는 것으로 보아 이들의 분리 메카니즘이 소수성 효과에 기인할 것으로 예상된다.

3) 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트의 머무름 메카니즘

역상법으로 금속착화합물을 분리함에 있어서 분리관내에서 이들의 머무름 메카니즘은 현재까지 두 방향으로 규명되고 있다. 첫째는 용리액의 용량인자( $k'$ )에 대한 이동상의 조성 또는 분포상수와와의 상관 관계를 고려한 것(Jandera, *et al.* 1982)이고, 둘째는 시료의 머무름을 열역학적 측면에서 고찰한 것(Melander, *et al.* 1978; Sander and Field, 1980)이다. 본 연구에서는 금속킬레이트의 용리 메카니즘을 규명하기 위하여, 용량인자에 미치는 용리액의 조성, 온도 등의 영향을 조사하였다.

3-1) 용량인자( $k'$ )와 용리액 조성과의 관계

실리키겔에 옥타데칸기(C<sub>18</sub>)가 화학적으로 결합된 역상 HPLC 분리관내에서 금속착화합물의 머무름의 두 가지 메카니즘, 즉 소용매성 효과와 친실란올기성 효과에 의해 일어난다고 생각할 수 있다. 본 연구에서 합성한 킬레이트화합물들은 전기적으로 비교적 중성인 시료이기 때문에 역상 액체 크로마토그래피에서 용리 중 거의 소용매성 상호작용에 의해 머무름이 일어날 것으로 예상된다. 만일 금속킬레이트화합물들이 분리관내에서의 머무름이 소용매성 효과에 의한다면 용량인자와 이상

분 용매제에서 물의 부피분율( $\phi_{H_2O}$ )과의 관계식  $\log k' = \log a + b \phi_{H_2O}$ 에 따라  $\log k'$ 과  $\phi_{H_2O}$ 를 도시하면 두 성분은 서로 직선 관계를 나타내게 될 것이다. Fig. 4의 결과에서 보인 바와 같이  $\log k'$ 과  $\phi_{H_2O}$  사이에는 직선성이 비교적 잘 나타나고 있으며 시료로 사용된 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들은 역상 액체 크로마토그래피의 분리관내에서 소용매성 효과, 즉 본 연구의 경우 용매로 물을 사용하였기 때문에 소수성 효과(hydrophobic effect)에 의해 머무름이 나타나고 있음을 확인할 수 있었다.

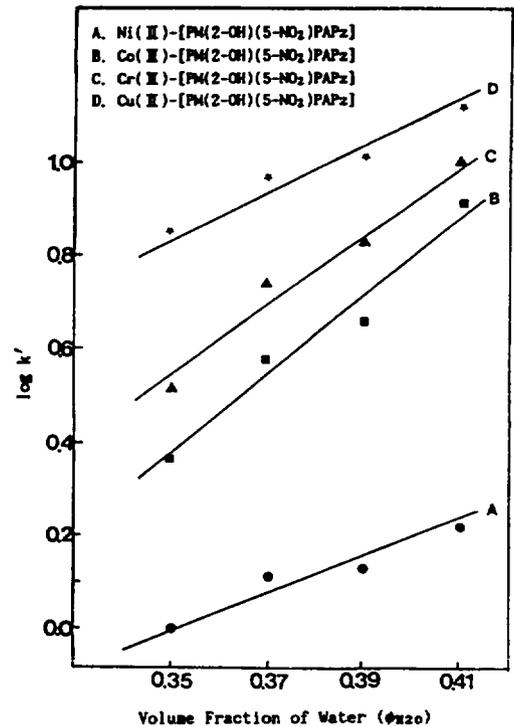


Fig. 4. Dependence of  $\log k'$  of metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates on the volume fraction of water in methanol/water mixture solvent.

3-2) 용량인자( $k'$ )와 분포비(D<sub>c</sub>)와의 관계

앞에서 이미 조사된 바와 같이 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트의 머무름이 실제로 소용매성 효과에 기인한다면 역상 분리관내에서 일어나는 시료의 이동상 및 정지상 사이에서의 상호 작용

은 분리관이 아닌 배치법에서도 분리관에서와 같은 경향을 나타내야 한다. 즉, 이동상 대신 메탄올과 물을 혼합한 극성 용매를 사용하고, C<sub>18</sub> 정지상을 대신하여 옥타데칸 유기용매상에서 시료를 추출하였을 경우에도 금속킬레이트화합물들이 두 상에 분배되는 정도가 분리관내에서 이동상 및 정지상 사이에서의 분포비와 같은 경향을 나타내야 할 것이다.

따라서 역상 액체 크로마토그래피에서 금속킬레이트의 용량인자(*k'*)는 배치법에서 얻어지는 분포상수(*k<sub>D</sub>*) 혹은 분포비(*D<sub>c</sub>*)와 간단한 선형 함수관계를 나타내어야 하며 그 관계식은 다음과 같다 (Vláčil F. and V. Hamplová, 1985).

$$k' = (V_m/V_M - 1) + r'D_c$$

식에서 *V<sub>m</sub>*은 이동상의 부피, *V<sub>M</sub>*은 불감부피 (dead volume)이고, *r'* = *j**r* (*r* = *m<sub>s</sub>*/*V<sub>m</sub>*)이며 *m<sub>s</sub>* = 정지상의 질량, *j* = 상관계수이다. 또 분포비는 *D<sub>c</sub>* = *C<sub>M,Org</sub>*/*C<sub>M,Aq</sub>*이다.

본 연구에서는 분리관의 정지상인 비극성 옥타데칸 모델로서 *n*-pentadecane을 사용하고, HPLC의 실험에서 이동상으로 사용한 용리액과 동일한

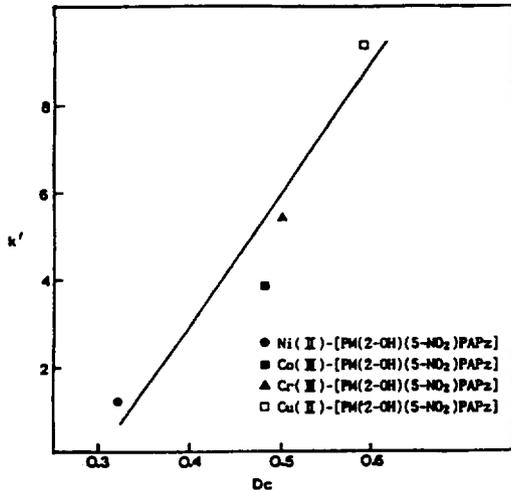


Fig. 5. Relationship between capacity factor (*k'*) and distribution ratio (*D<sub>c</sub>*) by the extraction from aqueous methanol into *n*-pentadecane for metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates.

methanol/water (63/37) 혼합액을 사용하여 배치법으로 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들에 대한 *D<sub>c</sub>* 값을 각각 측정하였으며, *k'*과 *D<sub>c</sub>*를 도시한 관계곡선을 Fig. 5에 나타내었다.

그림에서 보는 바와 같이 *D<sub>c</sub>*와 *k'*과의 관계는 비교적 직선성을 잘 유지하고 있으며 위의 식을 만족시킨다.

이 결과로부터 본 연구에서 사용한 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트의 분리관내에서의 머무름은 앞에서 확인된 바와 같이 소용매성 효과에 기인함을 배치법에 의해 간접적으로 재확인할 수 있었다.

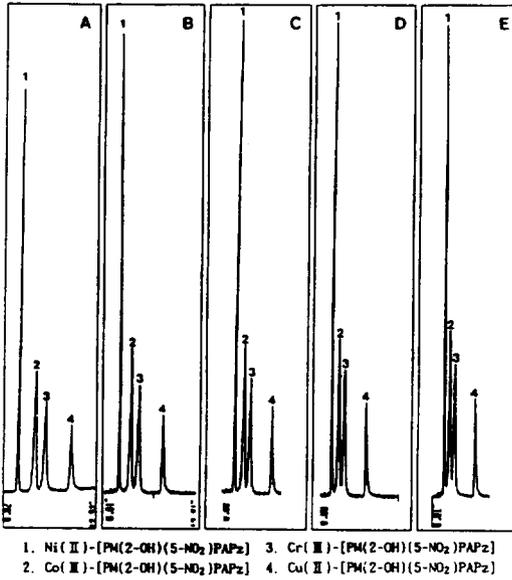
### 3-3) 용량인자와 온도의 관계

일반적으로 기체 크로마토그래피에서는 온도가 용리 거동에 영향을 주는 중요한 인자로 잘 알려져 왔지만 액체 크로마토그래피에서는 시료의 머무름에 미치는 온도의 영향을 크게 고려하지 않았다. 그러나 온도의 증가가 용매의 정도를 감소시켜 컬럼의 효율을 증가시킨다는 사실이 알려지면서 열역학적인 함수와의 관계 등 온도의 영향을 액체 크로마토그래피에서 시료의 용리 거동 해석에 이용하기 위한 연구가 많이 시도되고 있다 (Melander, *et al.*, 1978; Sander and Field, 1980).

Fig. 6은 분리관의 온도를 변화시키면서 각 금속 킬레이트의 크로마토그램을 얻어낸 것이다. 크로마토그램에서 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들에 대한 *ln k'*과  $\Delta H^\circ$  값의 크기를 상대적으로 비교하여 보면 일반적으로 *ln k'* 값이 감소할수록  $\Delta H^\circ$  값이 증가하는 결과를 보였다.

크로마토그래피에서 용량인자(*k'*)는 용질이 정지상과 상호 작용할 때의 열역학적 평형상수 (*K*)와 *k' = φK*의 관계를 갖는다. 여기서 φ는 상비율 (phase ratio) 즉 이동상의 부피에 대한 정지상의 부피이며, NOVA-PAK C<sub>18</sub> 분리관의 경우 약 1/2.6 정도이다. 또 평형상수 *K*와  $\Delta G^\circ$  (Gibbs free energy)와의 관계는  $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ 이며, 열역학 제2법칙에서  $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ 이므로 세 식을 종합하면 용량인자는 다음과 같이 표준엔탈피와 표준엔트로피의 관계식으로 나타낼 수 있다.

$$\ln k' = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R + \ln \phi$$



1. Ni(II)-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 2. Co(III)-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz]  
 3. Cr(III)-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 4. Cu(II)-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz]  
 Fig. 6. Chromatograms of metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates by the variation of column temperature.  
 (Column Temp. = A : 22, B : 27, C : 32, D : 37, E : 42°C)

본 연구에서는 이 식에 의해 용량인자와 온도의 관계를 도식한 van't Hoff plot의 기울기(-ΔH°/R)로부터 용질이 이동상에서 정지상으로 전이될 때의 표준이엔탈피를 구하고, 절편(ΔS°/R+lnφ)로부터 표준이엔트로피를 계산하여 Table 3에 수록하였고, ln k'과 ΔH°와의 상관 관계를 Fig. 7에 나타내었다.

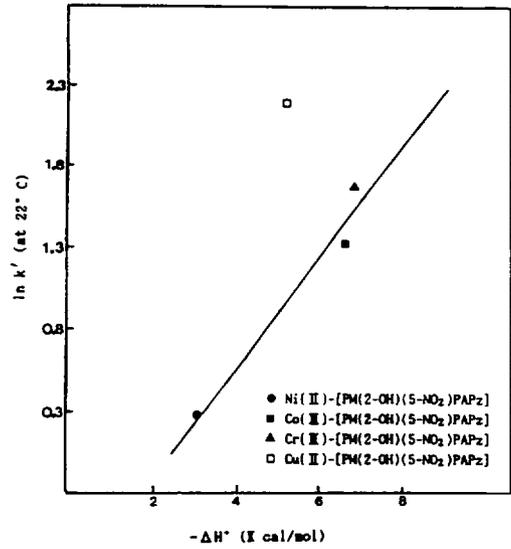


Fig. 7. Plots of ln k' vs. -ΔH° for metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates.

또 일정 온도 T에서 용량인자(k<sub>T</sub>')는 다음의 관계식으로 나타낼 수 있다.

$$\ln k_T' = -\Delta H^\circ / R (1/T - 1/\beta) - \Delta G_\beta^\circ / R\beta + \ln \phi$$

식에서 β는 보상온도로 화학반응에 관련된 속도나 평형상수의 변화량이 0이 되는 온도이며, 이것을 isokinetic 또는 isoequilibrium 온도라 한다. ΔG<sub>β</sub><sup>o</sup>는 온도 β에서의 Gibbs 자유에너지이다. 보상 온도 β는 식에서 직선의 기울기 1/R(1/T-1/β)로부터 구할 수 있고, 이 값이 일정하다면 시료의 머무

Table 3. Effect of temperature on the ln k' for metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates.

| Chelates               | ln k' at Temperature (°C) |      |      |       |       | -ΔH° | ΔS°                   | r     |
|------------------------|---------------------------|------|------|-------|-------|------|-----------------------|-------|
|                        | 22                        | 27   | 32   | 37    | 42    |      |                       |       |
| Ni(II)-L <sub>1</sub>  | 0.23                      | 0.09 | 0.03 | -0.05 | -0.13 | 3.17 | -8.4×10 <sup>-3</sup> | 0.989 |
| Co(III)-L <sub>1</sub> | 1.32                      | 1.05 | 0.92 | 0.75  | 0.57  | 6.65 | -1.8×10 <sup>-2</sup> | 0.994 |
| Cr(III)-L <sub>1</sub> | 1.70                      | 1.41 | 1.30 | 1.11  | 0.92  | 6.87 | -1.8×10 <sup>-2</sup> | 0.992 |
| Cu(II)-L <sub>1</sub>  | 2.24                      | 2.06 | 1.96 | 1.79  | 1.75  | 4.23 | -9.4×10 <sup>-3</sup> | 0.986 |

L : Ligand [PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz]

Mobile Phase : Methanol/Water (63/67)

Units of ΔH° and ΔS° : Kcal/mol

Flow Rate : 1.0 ml/min

r : Correlation Coefficient

를 메카니즘은 동일하게 된다.

금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들의 경우 Cu(II)-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트가 도시된 직선에서 많이 벗어나기 때문에 이를 제외한 나머지 킬레이트들만을 고려해 얻은 값은  $\ln k'_T = 0.3614(-\Delta H^\circ) - 0.9217$ 이다. 이때 상관계수는  $r = 0.980$ 이며, 여기서 구한  $\beta$ 값은 374.3K이다. Melander 등에 의하면  $\beta$ 가 약 400~900K이면 시료의 분리가 소용매성 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있으며, 본 연구에서 사용된 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz]도 이 범위를 약간 벗어나지만 소용매성 효과를 나타내는 것으로 보인다.

#### 4. 금속이온의 동시 분리 및 정량

금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들의 용리 거동에 대한 실험을 기초로 리간드 [PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz]을 이용하여 역상 HPLC로 Ni(II), Co(III), Cr(III), Cu(II) 금속이온을 동시에 분리, 정량분석할 수 있는지 그 가능성을 검토하였다.

금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들을 일정 농도로 메탄올에 녹여 앞에서 조사된 최적 기 및 용리 조건으로 실험해서 크로마토그램을 얻

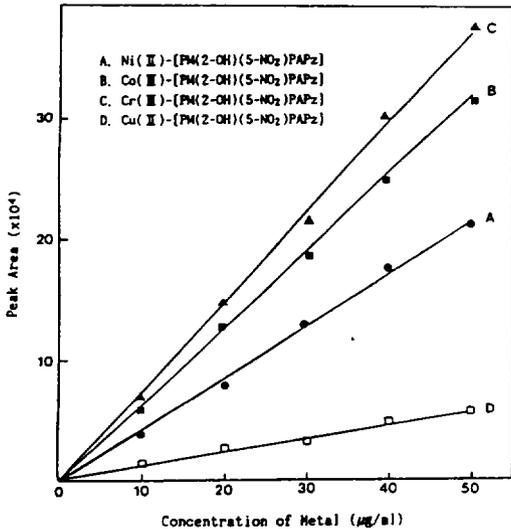


Fig. 8. Calibration curves for metal-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] chelates.

어내고, 피크면적과 포함된 금속이온의 양을 도시하여 작성한 검정곡선은 Fig. 8과 같다.

Ni(II), Co(III), Cr(III), Cu(II) 이온 모두가 0~50 μg/ml의 범위에서 좋은 직선성을 나타내고 있으며, 이러한 이온들은 [PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 리간드를 사용하면 역상 HPLC로 동시분리 및 정량이 가능함을 확인할 수 있었다.

### 적 요

1-Phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone 리간드를 합성하고, Ni(II), Cu(II), Co(III), Cr(III) 금속이온과 반응시킨 네 종의 금속-1-phenyl-3-methyl-4-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)-5-pyrazolone 킬레이트화합물들의 구조를 확인하였다. 또 역상 크로마토그래피에서 이 킬레이트화합물들을 동시 분리하기 위한 HPLC의 최적 조건 및 이들의 분리관내에서의 용리 메카니즘을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 합성한 [PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 리간드와 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들을 적외선 분광법, 질량 분석법으로 그 구조를 확인하였으며, 금속과 리간드는 물비가 1:2인 ML<sub>2</sub>형 착물을 형성한다.

2. 역상 액체 크로마토그래피에서 킬레이트들을 분리하기 위한 최적 조건은 다음과 같다.

1) 분리관은 NOVA-PAK C<sub>18</sub>(3.9mm I.D. × 15cm L.)이 적합하였다.

2) 용리액의 조성은 Methanol/Water=63/37일 때 분리도가 가장 좋았다.

3) 흐름속도는 1.0ml/min, 흡수 파장은 470nm일 때가 가장 적합하였다.

3. 용리액의 조성에 따른 log k'값은 Methanol/Water=63/37일 때 0.11~0.97 범위로 최적 분리조건인 0 ≤ log k' ≤ 1을 만족하는 결과를 나타내었다.

4. 각 킬레이트화합물들의 log k'값을 이성분 용매계 중 물의 부피분율에 대하여 도시한 결과 직선 관계를 나타내었다. 또한 뱃치법으로 측정된 분포비(D<sub>c</sub>)와 k'값의 크기를 도시한 결과 직선 관계가

성립됨을 확인하였다. 이상과 같은 결과로 금속-[PM(2-OH)(5-NO<sub>2</sub>)PAPz] 킬레이트들의 용리 메카니즘은 소용매성 효과 즉 소수성 효과에 크게 기인한다는 것을 알 수 있었다.

5. 분리관의 온도 변화에 따른 용량인자의 값을 도시하여 각 금속킬레이트들의 엔탈피를 구하고, 엔탈피와 용량인자의 크기를 도시한 결과 좋은 직

선성을 나타내었다. 직선의 기울기로부터 구한 보 상온도의 값으로부터 역상 PHLC의 분리 메카니즘이 소수성 효과에 기인함을 재확인하였다.

6. 시료의 점정곡선을 작성한 결과 0~50μg/ml 범위에서 직선성을 나타냄으로써 금속이온들의 동시분리 및 정량이 가능함을 확인할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

- Glajch J. L., J. J. Kirkland, K. M. Squire and J. M. Minor, 1980, Optimization of Solvent Strength and Selectivity for Reversed-Phase Liquid Chromatography using an Interactive Mixture-Design Statistical Technique, *J. Chromatogr.*, 199, 57~79.
- Harris D. C., 1982, "Quantitative Chemical Analysis: Typical Analytical Procedure", 2nd. Ed., W. H. Freeman and Co., New York, 519~521.
- Ichinoki S. and M. Yamazaki, 1985, Simultaneous Determination of Nickel, Lead, Zinc and Copper in Citrus Leaves and Rice Flour by Liquid Chromatography with Hexamethylenedithiocarbamate Extraction, *Anal. Chem.*, 57, 2219~2222.
- Irth H., G. J. De Jong, U. A. Th. Brinkman and R. W. Frei, 1987, Trace Enrichment and Separation of Metal Ions as Dithiocarbamate Complexes by Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 59, 98~101.
- Jandera P., H. Colin and G. guiochon, 1982, Interaction Indexes for Prediction of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 54, 435~441.
- King J. N. and J. S. Fritz, 1987, Determination of Cobalt, Copper, Mercury and Nickel as Bis(2-hydroxyl)dithiocarbamate Complexes by High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 59, 703~708.
- Lee W., D. W. Lee, Y. J. Kim and H. C. Kim, 1988, Studies on the Elution Behavior and Simultaneous Analysis of Some Metal-Dithiocarbamate Chelates by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, *J. Korean Chem. Soc.*, 32, 211~226.
- Lehotay J., O. Liska and E. Brandsteterova, 1979, High-Performance Liquid Chromatography of Bisdialkyldithiocarbamate Complexes of Copper(II), Cobalt(II), Zinc(II) and Lead(II), *J. Chromatogr.*, 172, 379~383.
- Mark H. F., D. F. Othmer, C. G. Overberger and G. T. Seaborg, 1978, "Encyclopedia of Chemical Technology: Azo Dyes", 3rd. Ed., Vol. 3, John Wiley and Sons, New York, 387~433.
- Melander W., D. E. Campbell and C. Horváth, 1978, Enthalpy-Entropy Compensation in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 158, 215~225.
- Sander L. C. and L. R. Field, 1980, Effect of Eluent Composition on Thermodynamic Properties in High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 52, 2009~2013.
- Shin Y. T. and P. W. Carr, 1982, Determination of Metals at Trace Levels via Pre-Column Derivatization and Nonpolar Stationary Phase High-Performance Liquid Chromatography with n-Butyl-2-naphthyl-methyldithiocarbamate Complexes, *Anal. Chim. Acta*, 142, 55~62.
- Smith R. M. and L. E. Yankey, 1982,

- Determination of Metal Ions by Liquid Chromatography Incorporating Dithiocarbamates in the Eluent, *Analyst.*, 107, 744~748.
- Snyder L. R. and J. J. Kirkland, 1979, "Introduction to Modern Liquid Chromatography: Controlling Resolution", 2nd. Ed., Wiley, New York, 49~56.
- Uden P. C. and I. E. Bigley, 1977, High-Pressure Liquid Chromatography of Metal Diethyldithiocarbamates with U. V. and D. C. Argon-Plasma Emission Spectroscopic Detection, *Analytica. Chimica. Acta.*, 94, 29~34.
- Uden P. C., B. D. Quimby, R. M. Barnes and W. G. Elliott, 1978, Interfaced D. C. Argon-Plasma Emission Spectroscopic Detection for High-Pressure Liquid Chromatography of Metal Compounds, *Analytica. Chimica. Acta.*, 101, 99~109.
- Vláčil F. and V. Hamplová, 1985, A Contribution to the Description of the Retention Mechanism of Metal Chelates during Their Reversed-Phase Chromatography, *Col. Czecho. Chem. Commun.*, 50, 2221~2227.
- Wiley M. H. and P. Wiley, 1964, *Pyrazolones, Pyrazolidones and Derivatives: Pyrazolin-5-ones*, John Wiley & Sons, New York, 13~110.
- Yoza N., T. Miyaji and S. Ohashi, 1984, Determination of Complexing Abilities of Ligands for Metal Ions by Flow Injection Analysis and High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, 283, 89~98.