

## 간접 분광 검출법에 의한 음이온의 분석(I)

박만기 · 김박광 · 박정일 · 김경호\* · 이미영 · 정재은

서울대학교 약학대학, \*강원대학교 약학대학

(Received May 20, 1990)

### Analysis of Anions by Indirect Photometric Detection (I)

Man Ki Park, Bak-Kwang Kim, Jeong Hill Park, Kyoung Ho Kim,\*  
Mi Yung Lee and Jae Eun Jung

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

\*College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract**—An ion chromatographic method based on indirect photometric detection of UV transparent anions was developed. Separation of anion was accomplished on strong anion exchange column (Waters SAX) using UV detector at 254 nm. Among examined UV-active additives (Dns-H, Dns-glu, Dns-ser, Dns-val), Dns-glu showed the highest sensitivity. Studies on the effects of the pH and ionic strength of eluent revealed that the increase of pH and ionic strength of the eluent decreased capacity factor. The best eluent for the separation of acetate, fluoride, chloride, nitrate and bromide was  $1 \times 10^{-4}$ M Dns-glu in 5 mM phosphate buffer (pH 6.30). The detection limit of chloride ion was 2.1 ng in this condition.

**Keywords** □ Ion chromatography, Analysis of anions, Indirect photometric detection, Dns-amino acid.

음이온의 분석은 주로 이온 크로마토그래피에서 분리된 음이온을 전기전도도 검출기를 이용하여 검출하는 방법이 이용되어 왔다. 그러나 이 방법은 이동상 자체의 전기전도도를 낮추기 위하여 사용하는 suppressor 컬럼으로 인한 dead volume의 증가로 peak broadening, 재현성의 감소가 일어나며, suppressor column을 정기적으로 재생시켜 주어야 하는 등의 단점이 있다.

이러한 단점을 개선하기 위해 1982년 Small<sup>1)</sup> 등은 단일컬럼을 사용하고 간접 분광 검출법에 의해 UV 흡수가 없는 음이온을 UV 검출기로 검출하는 방법을 보고하였다. 이에 따르면, 이온교환수지 컬럼에서 이동상에 첨가한 전해질  $\text{Na}^+\text{E}^-$ 가 전기적으로 중성을 이루며 일정한 농도를 유지하는데 (Fig. 1A), 여기에 시료 전해질  $\text{Na}^+\text{S}^-$ 를 주입하면 시료의 음이온 S<sup>-</sup>는 이동상과 고정상 사이에서 E<sup>-</sup>와 상호교환되면서 평형을 이루게 되고, 특정 시간에 컬

럼으로부터 용출하게 된다. 이 때 이동상은 전기적으로 중성을 이루어야 하고  $[\text{Na}^+]$ 는 일정하므로 음이온 S<sup>-</sup>와 E<sup>-</sup>의 농도의 합은  $[\text{Na}^+]$ 와 같고, 그 값은 일정해야 한다. 따라서  $[\text{S}^-]$ 가 증가한 만큼  $[\text{E}^-]$ 는 감소한다 (Fig. 1B). 이 원리에 의해 이동상에 첨가하는 전해질  $\text{Na}^+\text{E}^-$ 로 UV 흡수가 있는 물질을 첨가하면 UV 검출기에서 S<sup>-</sup>의 농도의 함수로 흡광도가 감소하여 음의 피크가 관찰된다. 그러므로 E<sup>-</sup>의 흡광도 변화를 검출함으로써 UV 검출기에 의해 UV 흡수가 없는 S<sup>-</sup>의 농도를 간접적으로 결정할 수 있게 된다.

이 방법을 이용하여 Larson<sup>2)</sup> 등은 유기 음이온 뿐만 아니라 유기 양이온을 분석하였고, Betz<sup>3)</sup> 등은 음료수, 주류 중의 에탄올을 분석하였다. 한편, 국내에서는 최근들어 강<sup>4)</sup> 등이 유기 지방족 화합물을 간접 분광 검출법에 의하여 분석한 예를 보고한 바 있다.

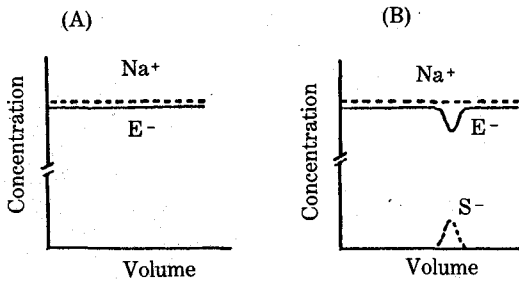


Fig. 1—Principle of indirect photometric detection.

지금까지 음이온 분석을 위해 간접 분광 검출법에서 사용된 이동상의 첨가제는 phthalate, trimesate 등 benzene carboxylate 유도체,<sup>1,5-7)</sup> iron (II) 1,10-phenanthroline<sup>8)</sup> 또는 iodide 이온<sup>1)</sup> 등이며, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup> 등의 음이온이 분리 검출되었다.

본 연구에서는 종래에 사용된 이동상의 첨가제보다 분자흡광계수가 훨씬 큰 Dns-아미노산 유도체를 첨가한 이동상으로 여러 음이온을 분리 검출하여 가장 분해능이 좋은 첨가제를 조사하고, 이동상의 이온 강도와 pH 변화에 따른 음이온의 capacity factor의 변화를 조사함으로써, 강염기성 음이온 교환수지 컬럼과 간접 분광 검출법에 의한 음이온의 분석에 가장 좋은 조건을 검토하였다.

### 실험방법

기기 및 시약—5-Dimethylamino-1-naphthalene-sulfonic acid hydrate(Dns-H), Dansyl-L-glutamic acid(Dns-glu), Dansyl-L-serine(Dns-ser), Dansyl-L-valine(Dns-val)을 Sigma 사로부터 구입하였고 기타 시약은 모두 특급을 사용하였다.

HPLC 컬럼으로는 강염기성 음이온 교환수지(Waters SAX radial cartridge)를 사용하였고, 기기는 Bio-Rad HPLC Pump Model 1330, Rheodyne injection valve, Waters Model 440 Absorbance Detector, signal recorder로 JJ Instruments(CR 650A) 또는 PM 8221 Pen Recorder(Philips), PYE UNICAM PU 8800 UV/VIS Spectrometer와 pH Meter(DIGITAL pH/mV METER, Model : PMS-500, phoenix)를

사용하였다.

**이동상과 시료 제조**—첨가제로써 Dns-아미노산 유도체류(Dns-H, Dns-glu, Dns-ser, Dns-val)를 pH 4.5~6.5 범위의 0.5~10mM phosphate buffer에 녹여  $1 \times 10^{-4}$  M의 Dns-아미노산 유도체 용액을 만든 후 0.45  $\mu$ m membrane filter(Millipore; type HA)에 여과하였다.

Sodium acetate, sodium formate, potassium iodate, sodium fluoride, potassium nitrite, potassium chloride, potassium nitrate, sodium azide, potassium bromide를 각각 10mg을 정확히 취해 20ml 용량 플라스크에 넣고 탈이온수로 녹여 표선을 맞춘 다음, 0.45  $\mu$ m membrane filter를 통과시켜 여과한 액을 HPLC 분석용 음이온 표준액으로 사용하였다.

**시료의 분석**—HPLC 컬럼이 이동상으로 포화되어 평형상태에 도달할 때까지 이동상을 통과시킨 후 시료를 주입하였다.

Dns-아미노산 유도체류(Dns-H, Dns-glu, Dns-ser, Dns-val)가 첨가된 이동상을 사용하여 9종의 음이온과 혼합용액을 주입한 후, 그 retention time을 측정하고 capacity factor, selectivity factor 및 검출한계를 계산하였다. 검출한계는 noise의 3배의 피크를 나타내는 음이온의 양으로 하였다.

Dns-glu가 첨가된 이동상에서 phosphate buffer의 이온강도를 0.5, 1, 5, 10 mM로 변화시키고 9종의 음이온의 혼합액을 주입하여 이온강도 변화에 따른 capacity factor, selectivity factor의 변화를 관찰하였으며, phosphate buffer의 농도를 5 mM로 하고 pH를 4.45~6.34로 변화시켜, pH 변화에 따른 capacity factor 및 selectivity factor의 변화를 관찰하였다.

**검량선의 작성**—Chloride 용액을 3.61~181 mM 농도범위에서 20  $\mu$ l씩 주입하여 크로마토그램을 얻고, 각 피크의 면적을 측정하여 농도와 면적 사이의 상관계수를 구하였다.

### 결과 및 고찰

4종의 이동상의 첨가제에 대해, 각 음이온의

**Table I**—Analysis of Anions by IC/Indirect Photometric Detection (I)-Effect of additive

Additive Analyte	Dns-H <sup>a</sup>		Dns-glu <sup>b</sup>		Dns-ser <sup>c</sup>		Dns-val <sup>d</sup>	
	k	$\alpha$	k	$\alpha$	k	$\alpha$	k	$\alpha$
Acetate	0.97		0.50		0.63		0.56	
Formate	0.99	1.02	0.52	1.04	0.95	1.50	0.59	1.05
Iodate	0.97	1.02	0.52	1.00	0.88	1.09	0.69	1.18
Fluoride	1.57	1.62	0.83	1.58	1.27	1.44	0.95	1.37
Nitrite	1.53	1.03	0.96	1.16	2.10	1.65	1.48	1.56
Chloride	1.53	1.00	1.00	1.05	2.22	1.06	1.51	1.02
Nitrate	2.00	1.31	1.35	1.35	2.05	1.09	2.12	1.40
Azide	1.97	1.01	1.30	1.03	-	-	2.14	1.01
Bromide	2.47	1.25	1.70	1.30	-	-	2.66	1.25

(k: capacity factor,  $\alpha$ : selectivity factor)<sup>a</sup>  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-H in 5 mM phosphate buffer, pH 5.92<sup>b</sup>  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-glu in 5 mM phosphate buffer, pH 6.30<sup>c</sup>  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-ser in 5 mM phosphate buffer, pH 6.25<sup>d</sup>  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-val in 5 mM phosphate buffer, pH 6.30**Table II**—Analysis of Anions by IC/Indirect Photometric Detection (II)-Effect of ionic strength of eluent

Phosphate conc. Analyte	0.5 mM		5 mM		10 mM	
	k	$\alpha$	k	$\alpha$	k	$\alpha$
Acetate	1.04		0.61		0.20	
Formate	1.22	1.17	0.71	1.15	0.20	1.00
Iodate	1.13	1.08	0.66	1.08	0.20	1.00
Fluoride	1.65	1.46	0.98	1.49	0.40	2.00
Nitrite	2.65	1.61	1.53	1.56	0.50	1.25
Chloride	2.61	1.02	1.49	1.03	0.50	1.00
Nitrate	4.04	1.55	2.32	1.56	0.55	1.10
Azide	4.00	1.01	-	-	0.55	1.00
Bromide	4.74	1.18	2.92	-	1.00	1.82

(k: capacity factor,  $\alpha$ : selectivity factor) $1 \times 10^{-4}$  M Dns-glu in 5 mM phosphate buffer (pH 6.28 ~ 6.31)

capacity factor 및 selectivity factor 를 조사한 결과, 모든 음이온은 이동상의 유속이 1.2 ml/min 에서 25분 이내에 용출되었고, Dns-glu, Dns-val 을 첨가한 이동상에서 음이온의 분리가 양호하였다 (Table I).

UV 활성첨가제 중 Dns-glu 에 대해 각각 pH 6.30~6.36 범위에서 phosphate 이온강도 변화에 따

**Table III**—Analysis of Anions by IC/Indirect Photometric Detection (IV)-Effect of pH of the eluent

Analyte	pH 4.45		5.50		6.34	
	k	$\alpha$	k	$\alpha$	k	$\alpha$
Acetate	-		1.29		0.20	
Formate	2.03	-	1.71	1.32	0.20	1.00
Iodate	2.53	1.25	0.94	1.82	0.20	1.00
Fluoride	-	-	1.35	1.44	0.40	1.25
Nitrite	2.59	-	1.71	1.26	0.50	1.25
Chloride	2.59	1.00	1.35	1.27	0.50	1.00
Nitrate	2.88	1.11	1.71	1.26	0.55	1.10
Azide	1.31	2.17	-	-	0.55	1.00
Bromide	3.25	2.48	2.06	-	1.00	1.82

(k: capacity factor,  $\alpha$ : selectivity factor) $1 \times 10^{-4}$  M Dns-glu in 1-10 mM phosphate buffer in the range of pH 4.45~6.34**Table IV**—Detection limit of analytes using Dns-H, Dns-glu, Dns-ser, Dns-val as additive of eluent (ng)

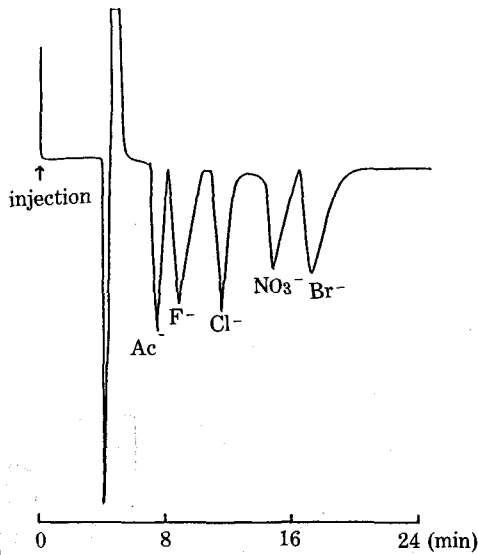
Additive Analyte	Dns-H <sup>a</sup>	Dns-glu <sup>b</sup>	Dns-ser <sup>c</sup>	Dns-val <sup>d</sup>
Acetate	298.8	4.5	11.3	52.5
Formate	101.1	2.4	17.3	170.4
Iodate	232.5	8.4	34.2	126.6
Fluoride	172.5	4.2	-	43.5
Nitrite	152.7	3.0	1.8	31.5
Chloride	102.0	2.1	2.2	25.5
Nitrate	304.5	4.2	-	11.4
Azide	1775.1	3.6	-	11.7
Bromide	273.6	16.8	-	-

<sup>a</sup>  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-H in 5 mM phosphate buffer, pH 5.92<sup>b</sup>  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-glu in 5 mM phosphate buffer, pH 6.30<sup>c</sup>  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-ser in 5 mM phosphate buffer, pH 6.25<sup>d</sup>  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-val in 5 mM phosphate buffer, pH 6.30

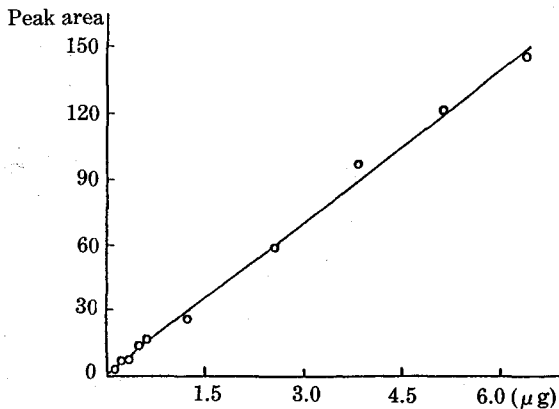
른 capacity factor 의 변화를 조사한 결과, 이온강도가 증가함에 따라 음이온의 capacity factor 가 감소함을 관찰하였다 (Table II).

한편, 이동상의 pH 변화에 따른 각 음이온의 capacity factor 의 변화를 관찰한 결과, pH 4.0 ~ 6.5 범위에서 이동상의 pH 가 증가함에 따라 음이온의 capacity factor 가 감소하였다 (Table III).

4종의 Dns-아미노산 유도체류를 첨가한 이동상



**Fig. 2**—Chromatogram of anion mixture.  
 Eluent:  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-glu in 5 mM phosphate buffer (pH = 6.30).  
 Flow rate: 1.2 ml/min  
 Detector: UV-254 nm



**Fig. 3**—Calibration curve of chloride ion ( $R = 0.998$ ).  
 Eluent:  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-glu in 5 mM phosphate buffer (pH = 6.30).  
 Flow rate: 1.2 ml/min  
 Detector: UV-254 nm

에서 각 음이온의 검출한계를 구한 결과 Dns-glu를 첨가한 이동상에서 음이온의 검출한계가 가장 낮았다 (Table IV).

이상의 결과에서,  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-glu를 첨가한 5 mM phosphate buffer (pH 6.3)이 음이온 분석에

가장 적합한 것으로 나타났다. Fig. 2는 이 조건에서 acetate, fluoride, chloride, nitrate, bromide의 혼합용액을 분리검출한 크로마토그램이다. 또한 같은 조건에서 chloride 이온에 대해 3.62~181 mM에서 검량선을 작성한 결과, 상관계수  $r = 0.998$ 로 좋은 직선성을 보였고 이 때의 chloride 이온의 검출한계는 2.1 ng이었다 (Fig. 3).

## 결 론

강염기성 음이온 교환수지 컬럼을 사용하여 여러 가지 음이온을 분리한 후 간접 분광 검출법에 의해 음이온을 UV-검출기를 이용하여 검출하는 방법을 검토하였다. 그 결과,

1.  $1 \times 10^{-4}$  M Dns-glu를 첨가한 5 mM phosphate buffer (pH 6.3)가 음이온의 분리, 검출에 최적의 이동상을 확인하였다.
2. 이동상의 이온강도가 증가함에 따라 음이온에 대한 capacity factor가 감소하였다.
3. 이동상의 pH가 증가함에 따라 음이온에 대한 capacity factor가 감소하였다.
4. 검량선은 상관계수  $r = 0.998$ 로 좋은 직선성을 보였으며, 검출한계는 chloride 이온의 경우 2.1 ng이었다.

## 문 헌

- 1) Small, H. and Miller, T.E.: *Anal. Chem.*, **54**, 462 (1982).
- 2) Larson, J.R. and Pfeiffer, C.D.: *J. Chromatogr.*, **259**, 519 (1983).
- 3) Betz, J.M. and Nikelly, J.G.: *J. Chromatogr. Sci.*, **25**, 391 (1987).
- 4) 강삼우, 강혜택: *대한화학회지*, **29**, 406 (1989)
- 5) Hern, J.A., Rutherford, G.K. and Vanloon, G.W.: *Talanta*, **30**, 677 (1983).
- 6) Jenke, D.R.: *Anal. Chem.*, **56**, 2468 (1984).
- 7) Rigas, P.G. and Pietrzyk, D.J.: *Anal. Chem.*, **60**, 454 (1988).
- 8) Cochrane, R.A. and Hillman, D.E.: *J. Chromatogr.*, **241**, 392 (1982).