ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
(Journal of the Korean Society of Analytical Sciences)
Vol. 6. No. 4. 1993
Printed in the Republic of Korea

Van der Waals Volume을 이용한 역상 컬럼에서의 유기화합물들의 용출거동

박운규 · 이용문† · 문동철 · 강종성*.
충북대학교 약학대학
*충남대학교 약학대학
(1993. 12. 2. 접수)

Retention Behavior of Organic Compounds on Reversed-Phase Column expected by Van der Waals Volume

Wun-Kyu Park, Yong-Moon Lee†, Dong-Cheul Moon, and Jong-Seong Kang*
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Chongju 360-763
**College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea*
(Received Dec. 2, 1993)

요약 : 지방족 카르복실산류, 방향족화합물류 및 알킬벤젠류에 대하여 역상 HPLC에서의 용출예측 방법을 검토하였다. 용출 파라미터로서 분자 크기를 나타내는 Van der Waasls 부피와 log k'와의 상관성을 검토한 결과, 양호한 직선성을 얻을 수 있었다. 용리액의 조성을 변화시키면서 또는 분리컬럼 온도를 변화시키면서 지방족 카르복실산류, 방향족화합물류 및 알킬벤젠류에 대하여 검토한 결과, acetonitrile이 log k'와 Van der Waals 부피와의 상관성이 가장 좋았다. 본 방법을 이용하여 역상 HPLC system에서 Van der Waals 부피가 40~250 사이의 유기화합물들의 용출을 예측할 수 있었다. 각 용매의 용출력 세기는 methanol<acetonitrile<tetrahydrofuran의 순이었다.

Abstract : Retention behaviors of aliphatic and aromatic compounds were investigated with Van der Waals volume which represented the molecular size. The organic solvents, methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran, were mixed with water at various ratio, respectively. The selectivity of organic solvents were tested by change of column temperature. The capacity factor was increased linearly according to the enlargement of molecular size. Therefore, Van der Waals volume was useful to predict the elution of organic molecules in reversed-phase column. The order of elution capacity of solvents was methanol<acetonitrile<tetrahydrofuran in small molecules.

Key words : Van der Waals volume, fatty acids, alkylbenzenes, capacity factor, high-performance liquid chromatography.

1. 서 론

역상 액체크로마토그래피(Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, HPLC)에서 용질분자의 용출특성을 미리 예측한다는 일은 목적 물질에 대한 분리조건의 최적화 및 분석시간을 단축할 수 있다. 이러한 목적을 위하여 많은 연구자들은 용리 용액의 조성[1,2], 분리컬럼의 특성[3~7], 용질분자의 특성[8~14], 그리고 측정온도의 영향에 대하여 검토하여 왔다.[3,15,16]

역상 HPLC에 적용되는 유기화합물류는 주로 극성이 큰 화합물에 속하며, 지방족화합물류를 비롯하여 방향족화합물류, 그리고 관능기의 특성에 따라 alcohol류, phenol류, carboxylic acid류, amine류 등을 들 수 있다. 또한 이들 관능기를 2개 이상 갖는 복합화합물도 체내성분 중에서 다수 존재한다. 이들 화합물들에 대하여 역상 HPLC에서 용출거동을 하나의 수식으로 통일하는 일은 거의 불가능에 가깝다고 말할 수 있다. 왜냐하면 각각의 group간의 머무름 거동의 차이를 어떻게 수식화하는가는 사용된 parameter에 따라 달라지게 되기 때문이다. 그러나 이들 화합물의 구조상 특성에 근거하여 역상 HPLC에서의 용출특성을 검토하여 보면, 몇 개의 parameter에 의하여 수식화가 가능함을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 용질의 역상 HPLC에서의 머무름은 비극성인 octadecylsilyl (ODS) 고정상과의 주로 소수성 상호작용에 의한 것임에 착안하여, 용질의 분자 크기를 기준으로 여러 가지 용질들의 분자 크기를 이론적으로 계산한 Van der Waals volume (VWV)을 용출 parameter로 하였다.

이 VWV parameter를 이용한다면 역상 HPLC에서의 각각의 서로 다른 용질에 대하여 분자 크기에 관한 이론치와 머무름을 실제 비교할 수 있으며 용질의 종류에 따른 고정상과간의 소수성 상호작용을 이해하는 데 좋은 자료가 될 것이다. 또한 그 결과를 이용하여 다른 생체성분이나, 유기화합물들의 역상 HPLC 분리가 필요할 경우, 미리 목적물의 용출특성을 이론적으로 이해하여 분석법의 최적화 및 신속화에 기여할 수 있을 것이다.

본 실험은 역상 HPLC에서 지방족화합물류, 방향족화합물류 및 alkylbenzene류에 대하여 VWV를 이용하여 사용된 용매에서의 용출예측 범위, 용매효과 및 온도의 영향을 검토하여 역상 HPLC에 의한 유기화합물의 용출예측법을 확립하였다.

2. 실험방법

2. 1. 측정기기

역상 mode에 사용한 HPLC system은 L-6200 intelligent pump, LC-organizer, 655A-52 column oven, L-4200 UV-VIS detector로 구성하였고 그 결과를 D-2500 chromato-integrator에 기록하였다. 역상분리 column은 Cosmosil 5C 18(4.6mm i.d.×150mm, Nakalai Tesque)을 사용하고, column 온도는 외부의 영향을 배제하기 위하여 30~50℃ 사이로 고정하였다.

이동상 용매는 methanol (MeOH), acetonitrile (CH_3CN), tetrahydrofuran (THF)을 사용하였으며, 물과의 혼합용매는 사용 전 반드시 ultrasonicator에서 5분 이상 탈기한 후 사용하였다.

2. 2. 유기화합물의 VWV의 계산

A. Bondi는 유기화합물의 원자간 결합거리, 결합각, 접촉거리, 그리고 형태에 대한 data를 참고로 하여, Van der Waals 반경을 각 원자 주위의 전자밀도로 설명하였다. 따라서 각 원자의 Van der Waals 반경을 근거로 하여 각 화합물의 기본 골격에 대한 VWV의 이론치를 계산할 수 있다.[17]

본 실험에서는 Bondi의 방법으로 지방족유기산류, 방향족화합물류 및 alkylbenzene류에 대한 VWV의 이론치를 구하고(*Table* 1), 역상 HPLC에서의 실험적 머무름 거동과 VWV의 계산치와의 상관성을 검토하였다.

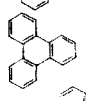
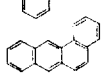
2. 3. 이동상의 선택성 검토

이동상으로 사용되는 MeOH, CH_3CN 및 THF를 물과 일정한 비율로 혼합하고, 그 혼합비율을 변화시켜 가면서 각각의 유기화합물의 실험치 log k'와 이론치 VWV와의 상관성을 검토하였다. 이때 각 용매간의 용출력의 세기는 Hildebrand의 solubility parameter (δ)를 기준으로 하였고[18], 일정한 값은 각각의 용매의 혼합비율을 달리하여 조정하였다.

2. 4. 온도의 영향

각 화합물의 역상 컬럼에서의 용출은 분리 컬럼의 온

Table 1. Van der Waals volumes and structures of the test compounds.

No.	Test compounds	Structure	VWV[a]
1	n-Capric acid	$CH_3(CH_2)_8COOH$	288.82
2	Lauic acid	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	309.28
3	Myristic acid	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	329.74
4	n-Pentadecanoic acid	$CH_3(CH_2)_{13}COOH$	339.97
5	Palmitic acid	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	350.20
6	Margaric acid	$CH_3(CH_2)_{15}COOH$	360.43
7	Stearic acid	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	370.66
8	Nonadecanoic acid	$CH_3(CH_2)_{17}COOH$	380.89
9	Arachidic acid	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	391.12
10	Toluene	$CH_3C_6H_5$	59.51
11	Ethylbenzene	$CH_3(CH_2)C_6H_5$	69.74
12	Isopropylbenzene	$(CH_3)_2CHC_6H_5$	77.02
13	n-Propylbenzene	$CH_3(CH_2)_2C_6H_5$	79.97
14	n-Butylbenzene	$CH_3(CH_2)_3C_6H_5$	90.20
15	n-Hexylbenzene	$CH_3(CH_2)_5C_6H_5$	110.66
16	n-Heptylbenzene	$CH_3(CH_2)_6C_6H_5$	120.89
17	n-Octylbenzene	$CH_3(CH_2)_7C_6H_5$	131.12
18	n-Nonylbenzene	$CH_3(CH_2)_8C_6H_5$	141.35
19	n-Decylbenzene	$CH_3(CH_2)_9C_6H_5$	151.58
20	Benzene		43.86
21	Naphthalene		73.96
22	Acenaphthylene		–
23	Acenaphthene		–
24	Fluorene		93.22
25	Phenanthrene		99.56
26	Anthracene		99.56
27	Fluoranthene		–
28	Pyrene		109.04
29	Triphenylene		–
30	Benz(a)anthracene		125.16

[a]Van der Waals volume (cm^3/mol) was calculated from the tables in reference 17.

도가 상승할수록 빨라지는 경향이 있었다. 따라서 각 화합물들의 상대적 용출거동을 온도 변화에 의하여 관찰하여 컬럼온도가 용출거동에 미치는 영향을 검토하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 카르복실산류의 용출거동

Caprilic acid ($C_{10:0}$, VWV 115.03)를 비롯한 8종의 포화 카르복실산류에 대하여 VWV와 capacity factor (log k')에 대한 각 용매에서의 상관계수(r)의 평균값은 MeOH, CH_3CN 및 THF에 대하여 각각 0.9984, 0.9994 및 0.9995 (n=9)의 범위로 신뢰성 있는 직선관계를 나타내었다(*Fig.* 1 (A, B and C). 이는 카르복실산류의 용출거동이 VWV의 이론치로부터 예상되는 용출경향과 부합되며, 따라서 측정한 VWV의 값 110~220의 범위에서 카르복실산류의 용출거동을 예측할 수 있음을 시사하고 있다.

유기용매의 조성비율을 일정하게 증가시킴에 따라 카르복실산류의 log k'에 대한 기울기는 낮아지고 있다. 이는 전체 용매의 용출력의 증가에 기인하며, MeOH에서 가장 큰 변화폭을 나타내었다.

한편, CH_3CN이나 THF에서 용매조성비율의 변화에 따른 카르복실산류의 log k'의 변화가 적게 나타나는 현상은 용매강도의 변화가 MeOH보다 적기 때문으로 해석된다.

미지 카르복실산류의 용출거동은 최소한 두 개 이상의 표준카르복실산의 log k'의 직선으로부터 예측할 수 있으므로 본 실험결과 카르복실산류의 용출거동의 예측은 log k'의 변화폭이 가장 적은 CH_3CN이 유용하였다.

용매의 용출력의 크기는 THF>CH_3CN>MeOH의 순으로 Hildebrand solubility parameter의 크기의 순서와 일치하였다. 따라서 용매의 조성비율을 동일하게 할 경우 THF 사용시 화합물의 용출이 가장 빠르게 용출하였다.

3. 2. 방향족화합물들의 용출거동

Benzene(VWV 43.86) 이외의 4종류의 방향족화합물들에 대하여 각각의 용매에서의 VWV와 log k'와의 관계를 검토한 결과 r의 평균값은 MeOH의 경우 0.9811(n=5), CH_3CN의 경우 0.9924(n=5), 그리고

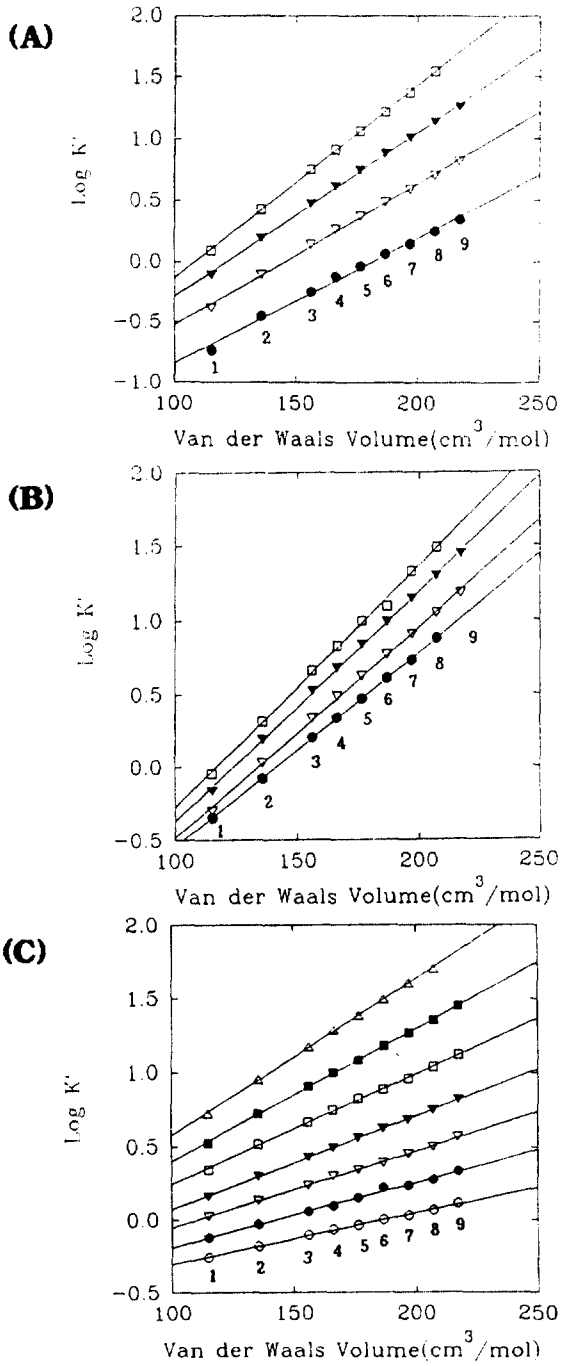


Fig. 1. Solvent selectivities for carboxylic acids.
(A) MeOH-H_2O system: ●, 100; ▽, 95; ▼, 90; □, 85.
(B) CH_3CN-H_2O system: ●, 95; ▽, 90; ▼, 85; □, 80
(C) THF-H_2O system: ○, 75; ●, 70; ▽, 65; ▼, 60; □, 55; ■, 50; △, 45.
The tested carboxylic acids were listed *Table* 1.

THF의 경우 0.9332(n=5)로 나타났다(*Fig.* 2(A, B and C)). 따라서 카르복실산류의 r값에 비하여 상관성이 저하되었으며 VWV에 의한 방향족화합물류의 용출을 예측할 수 있는 범위가 현저히 감소하였다.

Methanol 및 CH_3CN을 사용한 경우, VWV 100을 중심으로 하여 두 개의 서로 다른 기울기의 직선으로 구성된 완만한 오목곡선으로 나타낼 수 있었다.

방향족화합물이 갖는 불포화도의 정도는 파이결합 에너지로 표현하고 있으며 일반적으로 용출시간을 단축시킨다. 방향족화합물이 갖는 불포화도의 정도가 분자 크기를 나타내는 VWV에 의한 이론적 용출거동에 변수로 작용하고 있음을 시사하고 있다. 따라서 오목곡선의 형태로 보아 방향족화합물들의 VWV가 큰 방향족화합물일수록 불포화기가 용출에 미치는 영향이 점차로 증가함을 알수 있었다. 따라서 방향족화합물들의 용출예측은 검토한 범위내에서는 가능하였으며, CH_3CN에서 가장 좋은 결과를 나타내었다.

한편, THF의 경우 VWV가 93 이상에서 오히려 log k'의 감소를 보이는 것으로 보아 화합물의 용출거동이 VWV 이외의 인자에 의하여도 영향을 받는 것으로 생각된다. 따라서 방향족화합물들을 VWV에 의하여 용출예측하기에 THF는 용매로서 부적합하였다.

각 용매의 용출력의 세기는 카르복실산류의 경우와 동일한 결과를 나타내었다.

3. 3. Alkyl benzenes의 용출거동

방향족화합물들과 카르복실산류의 중간 정도의 특징을 갖는 alkylbenzenes의 용매 변화에 의한 VWV과 용출거동의 상관성을 *Fig.* 3(A, B and C)에 나타내었다. VWV의 범위가 방향족화합물들과 카르복실산류의 범위에 걸쳐 있는 toluene(VWV, 59.51)으로부터 n-decylbenzenes(VWV, 151.58)까지 검토한 결과, 각 용매의 r값은 MeOH의 경우 0.9999 (n=10), CH_3CN의 경우 0.9999 (n=10), 그리고 THF의 경우 0.9973 (n=10)로 높은 상관성을 나타내었다. 이 중 CH_3CN은 가장 좋은 상관성을 보였고, MeOH, THF에 비하여 용매조성비율의 변화에 의한 기울기의 변화가 적어 alkylbenzenes의 용출예측에 적합하였다.

Alkylbenzenes의 VWV와 log k' 사이에 좋은 상관성이 성립되는 것으로 보아 alkylbenzenes의 용출 경향은 aliphatic chain의 길이의 증가에 비례하여 log k'가 증가한다고 생각할 수 있다.

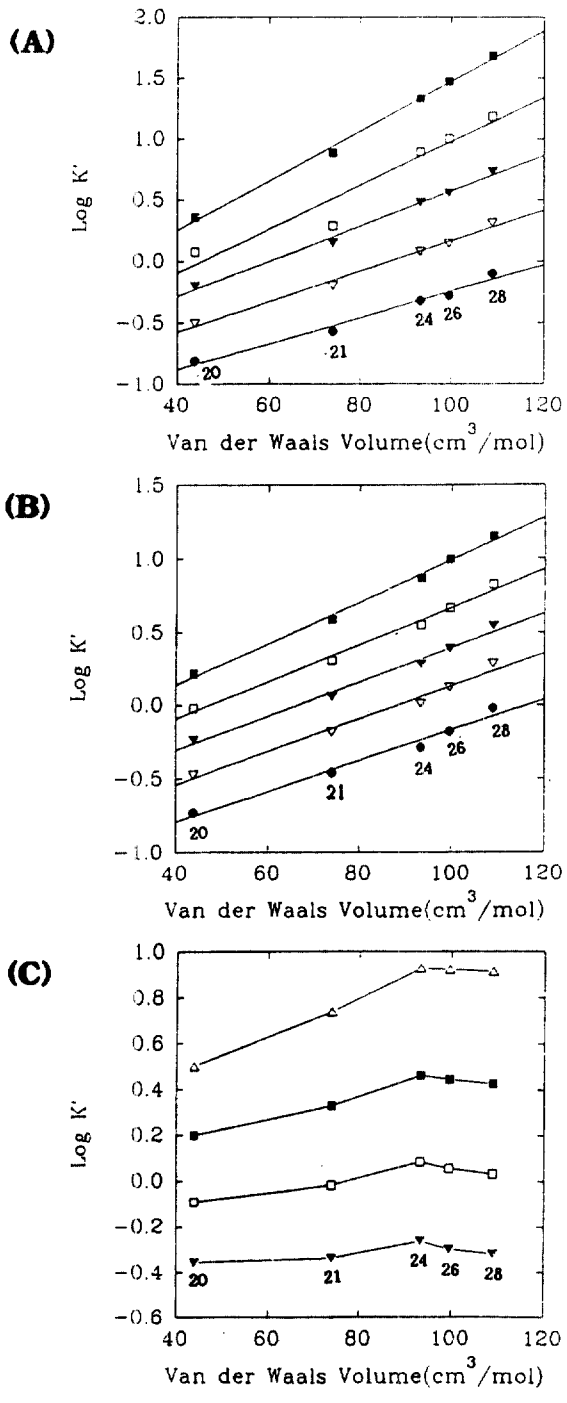


Fig. 2. Solvent selectivities for aromatic compounds.
(A) MeOH-H_2O system: ●, 100: ▽, 90: ▼, 80: □, 70: ■, 60.
(B) CH_3CN-H_2O system: ●, 95: ▽, 85: ▼, 75: □, 65.
(C) THF-H_2O system: ▼, 70: □, 60: ■, 50: △, 40.
The tested aromatic compounds were listed *Table* 1.

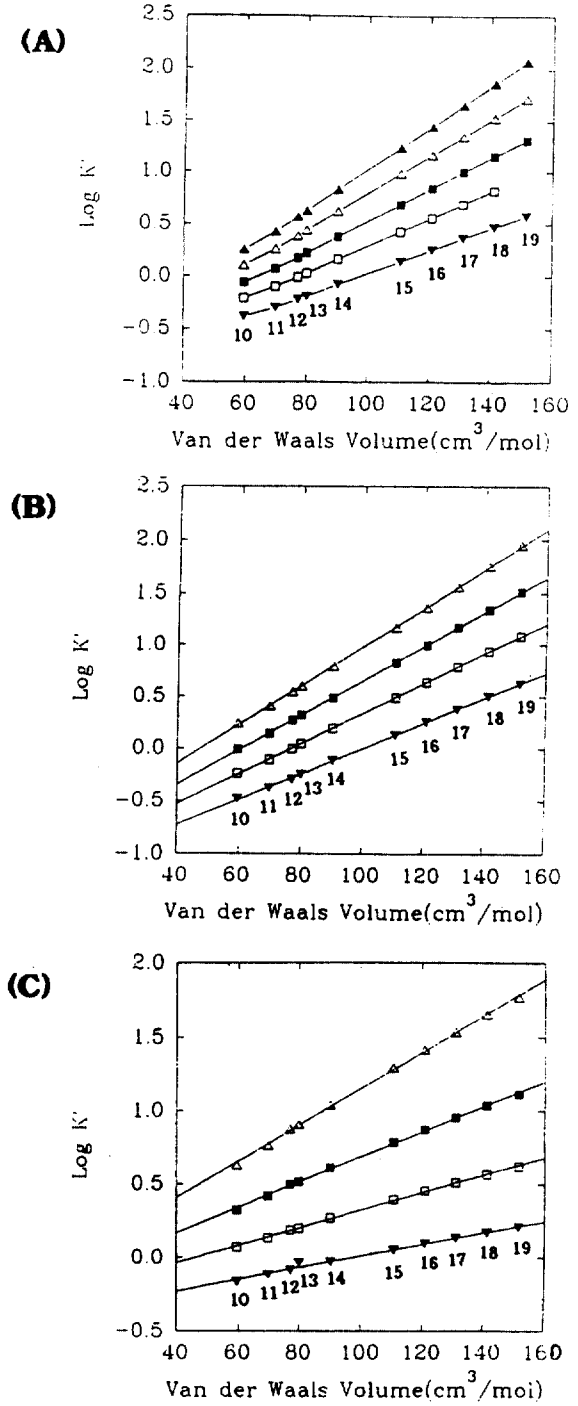


Fig. 3. Solvent selectivities for alkylbenzenes.
(A) MeOH-H_2O system: ▼, 95: □, 90: ■, 85: △, 80: ▲, 75.
(B) CH_3CN-H_2O system: ▼, 95: □, 85: ■, 75: △, 65.
(C) THF-H_2O system: ▼, 75: □, 65: ■, 55: △, 45.
The tested alkylbenzenes were listed *Table* 1.

본 실험의 결과 CH_3CN은 MeOH, THF에 비하여 유기화합물들의 용출 예측에 최적 용매임을 알 수 있었다. 특히 방향족화합물보다는 지방족화합물은 VWV에 의하여 그 용출위치의 설정이 가능하였고, 따라서 미지 물질의 용출위치를 VWV 이론적 계산에 의하여 그 분자종과 분자 크기를 추론할 수 있다.

3. 4. 온도 변화에 의한 용출거동

온도 변화가 화합물들의 상대적 용출에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MeOH, CH_3CN에 대하여 온도 범위 30~50℃ 사이에서 용출거동을 검토하였다. 카르복실산류, 방향족화합물들 및 alkylbenzenes류의 상대적 log k'값을 각각 palmitic acid, phenanthrene 및 n-butylbenzene의 log k'값을 기준으로 하여 나타내었다.

Fig. 4 (A, B and C)는 온도 변화에 따른 MeOH에서의 log k'의 변화를 Vant Hoff식으로 나타낸 것이다.

Fig. 4(A)은 palmitic acid의 log k'를 기준으로 하여 카르복실산류의 상대적 log k'값을 나타낸 것이다. Van der Waals volume이 작은 capric acid (No. 1), lauric acid (No. 2)의 경우는 상대적 용출시간이 온도의 증가에 의하여 감소하나, VWV가 큰 nonadecanoic acid (No. 8), arachidic acid (No. 9)의 경우, 온도의 증가에 의하여 상대적인 용출시간이 증가하는 경향을 보였다. 반면 방향족화합물들의 상대적 log k'값은 온도 변화에 따른 영향을 거의 받지 않고 일정한 log k'를 유지하였다(*Fig.* 4(B)). 온도 변화에 따른 상대적 log k'의 변화는 주로 지방족화합물에서만 볼 수 있는 특이한 pattern으로, 따라서 방향족화합물을 온도 변화에 의한 용출 pattern을 보고 미지 화합물이 지방족인가 방향족인가를 구별할 수 있을 것이다.

이 현상을 좀더 세밀하게 검토하기 위하여 alkylbenzenes에 대하여도 같은 방법으로 검토하였다. alkylbenzenes의 상대적 log k'값은 카르복실산류의 log k' pattern과 유사하였다(*Fig.* 4(C)). 이는 alkylbenzenes의 용출거동이 alkyl chain에 의하여 많은 영향을 받기 때문으로 생각된다.

Acentonitrile을 용매로 하여 온도 변화에 의한 지방족화합물, 방향족화합물, 그리고 alkylbenzenes에서의 상대적 log k'를 구한 결과를 각각 *Fig.* 5(A, B and C)에 나타내었다. 상대적 log k'의 변화는 MeOH를 사용하였을 경우에 비하여 용출거동의 변화폭이 적게 나타났다. 방향족화합물들(*Fig.* 5(B))과 alkylbenzenes

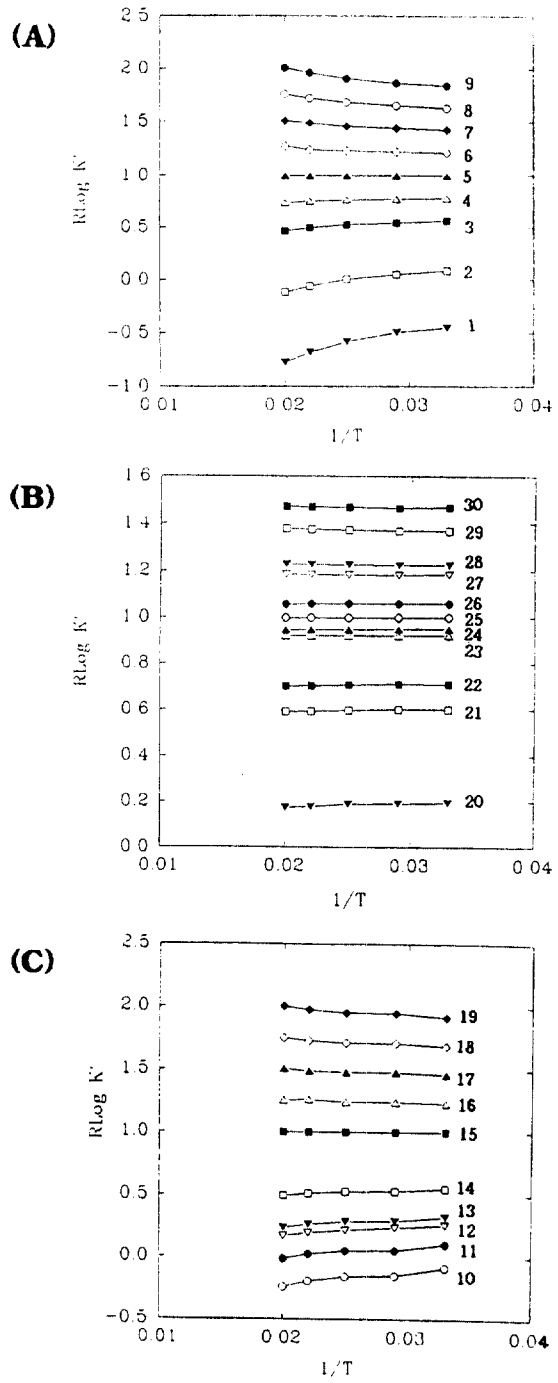


Fig. 4 Temperature effects on capacity factor of organic compounds in MeOH-H_2O system.
Solvent systems: (A) 90% MeOH (B) 65% MeOH (C) 85% MeOH

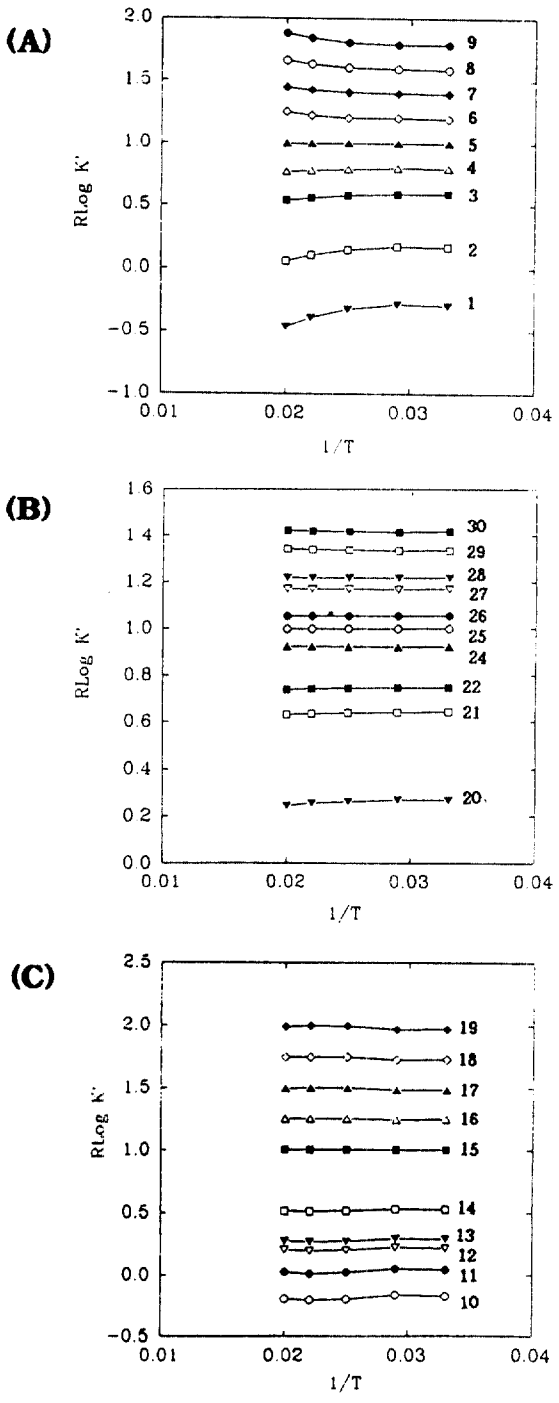


Fig. 5 Temperature effects on capacity factor of organic compounds in CH_3CN-H_2O system.
Solvent system: (A) 85% CH_3CN (B) 55% CH_3CN (C) 80% CH_3CN

(*Fig.* 5(C))의 경우, 온도의 변화에 의한 용출거동의 상대적인 변화폭이 거의 없었다.

이상의 결과, 포화화합물인 지방산류는 MeOH, CH_3CN에서 상대적 log k'의 커다란 변화를 보이나 불포화화합물인 방향족화합물들과 alkylbenzenes의 경우 변화폭이 적게 나타났다. 따라서 CH_3CN을 이용하면 차후 포화화합물과 불포화화합물의 구별에 VWV를 이용하여 liquid chromatography에 의한 미지 화합물의 구별을 할 수 있을 것이다. Acetonitrile은 MeOH와 비교할 때 온도의 변화에 대하여 상대적 log k'의 변화폭이 적었다. 또한 불포화기 함유 화합물의 분리 예측에는 CH_3CN이 MeOH보다 유용하다고 할 수 있었다.

결과적으로 VWV의 개념을 이용하여 유기화합물들의 용출거동을 예측하여 본 결과, 검토에 사용한 지방족화합물류, 방향족화합물류, 그리고 alkylbenzene류에서 CH_3CN과 같은 최적 용매를 선택하여 이론적 분자 크기인 VWV와 liquid chromatography에서의 log k'와는 직선관계를 얻을 수 있었으며, VWV값이 40에서 250 사이의 범위에서 용출 예측이 가능함을 알 수 있었다.

Acetonitrile은 온도 변화에 의한 상대적 log k' 변화가 적어 VWV에 의한 log k'값의 예측에 MeOH, THF보다 적용범위가 넓었다. 특히 상대적으로 비극성저분자의 용출예측에는 가장 적합한 용매라고 할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음. 방향족화합물류의 표준품을 제공하여 주신 한국표준과학연구원 유기분석실의 허귀석 실장님께 감사드립니다.

참고문헌

1. P. Lu, H. Zou and Y. Zhang, *J. Chromatogr.*, **509**, 171(1990).
2. A. Siwek and J. Sliwick, *J. Chromatogr.*, **506**, 109 (1990).
3. A. Robat, Jr. and T-Y. Liu, *J. Chromatogr.*, **513**, 117(1990).
4. K. Jinno and T. Ibuky, *J. Chromatogr.*, **416**, 207

(1989).
5. L. C. Sander and S. A. Wise, *Anal. Chem.*, **59**, 2309 (1987).
6. K. B. Sentell and J. G. Dorsey, *Anal. Chem.*, **61**, 930(1989).
7. T. Hanai and J. Hubert, *J. Chromatogr.*, **291**, 81 (1984).
8. K. B. Sentell and J. G. Dorsey, *J. Chromatogr.*, **461**, 193(1989).
9. N. Tanaka, K. Sakagami and M. Araki, *J. Chromatogr.*, **199**, 327(1980).
10. T. Hanai and A. Jukurogi and J. Hubert, *Chromatographia*, **19**, 266(1984).
11. T. Hanai, *J. Chromatogr.*, **332**, 189(1985).
12. T. Hanai and J. Hubert, *J. Chromatogr.*, **197**, 197 (1984).
13. W. Melander, D. E. Campbell and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, **158**, 215(1978).
14. T. Hanai and Hubert, *J. Chromatogr.*, **302**, 89 (1984).
15. F. V. Warren Jr. and B. A. Bidingmeyer, *Anal. Chem.*, **60**, 2824(1988).
16. H. Colin, J. C. Diez-Masa, G. Guiochon, T. Czajkowska and I. Miedziak, *J. Chromatogr.*, **167**, 41 (1978).
17. A. Bondi, *Phys. Chem.*, **68**, 441(1964).
18. J. J. Kirkland, "*Modern practice of liquid chromatography.*" John Wiley, New York, p. 259(1971).