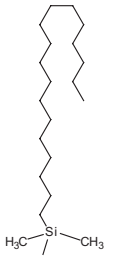
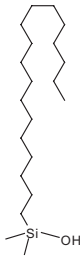
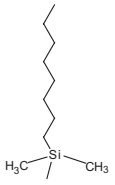
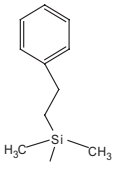
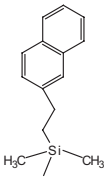
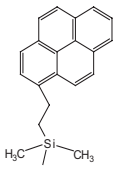
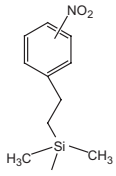
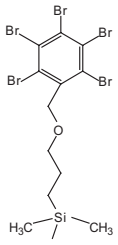
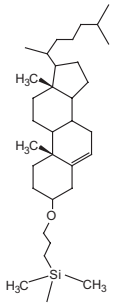
7. 역상 크로마토그라피에서 칼람충진제의 선택

소개

역상 크로마토그라피(ODS, C_{18})는 높은 이론단수, 우수한 분리특성, 재현성, 사용의 용이함 때문에 HPLC에서 가장 공통적으로 널리 사용하는 방법입니다. 그러나 C_{18}칼람에서 친유성 상호작용을 주 분리목적으로 사용할 때는 친유성이 유사한 화합물의 경우 분리가 충분치가 않습니다. 이 시료의 경우 칼람의 온도를 변화시키고, 용매를 바꾸거나 칼람길이를 연장할 경우 어느 정도 분리를 개선할 수가 있습니다. 또한 친유성 상호작용을 2차 작용으로 분리를 목적으로 하는 시료는 충진물 크기가 다른 역상 칼람을 사용할 경우 분리에 효과적입니다.

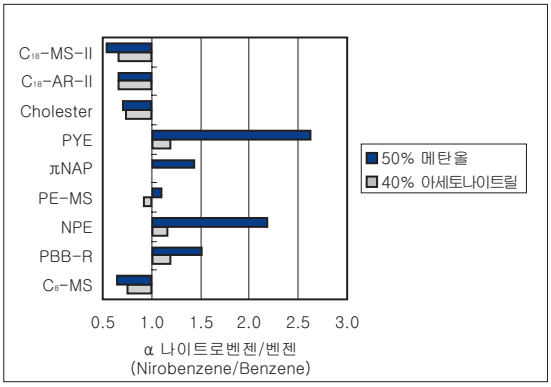
Nacalai Tesque는 여려종류의 COSMOSIL 역상칼람용 충진물을 공급합니다. 표1에는 충진물 종류와 시료가 고정상에 머무는 구조를 나터냅니다. 여려 고정상에 따른 화합물들이 머무는 것은 고정상과 시료의 상호작용의 원리에 의존합니다. 그러므로 여려 상호작용의 원리를 이해하면 적정한 칼람을 선정하는데 유효합니다.

표. 고정상 및 충진물의 상호작용

충진물	C_{18}-MS-II	C_{18}-AR-II	C_8-MS	PE-MS	πNAP	PYE	NPE	PBB-R	Cholester
실리카겔	고순도 다공성 구형실리카								
평균입자크기	5 μm								
평균세공크기	거의 120 Å								
평균 표면적	거의 300 m²/g								
고정상									
	오디에스 그룹	오디에스 그룹	옥틸 그룹	페닐에틸 그룹	나프틸에틸 그룹	피레닐에틸 그룹	나이트로페닐에틸 그룹	펜타브로모베질 그룹	콜레스터릴 그룹
본딩타입	모노머릭	폴리머릭	모노머릭	모노머릭	모노머릭	모노머릭	모노머릭	모노머릭	모노머릭
주 상호작용	친유성 상호작용	친유성 상호작용	친유성 상호작용	친유성 상호작용 π-π 상호작용	친유성 상호작용 π-π 상호작용	친유성 상호작용 π-π 상호작용 분산력 전하 전달 상호작용	친유성 상호작용 π-π 상호작용 쌍극-쌍극 상호작용	친유성 상호작용 분산력	친유성 상호작용 전하 전달 상호작용
엔드캡핑처리	거의 완벽한 처리								
탄소 함유량	거의 16%	거의 17%	거의 10%	거의 10%	거의 11%	거의 18%	거의 9%	거의 8%	거의 20%

1) 분리도 (selectivity, α)

분리도(α)

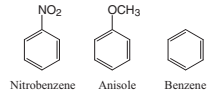


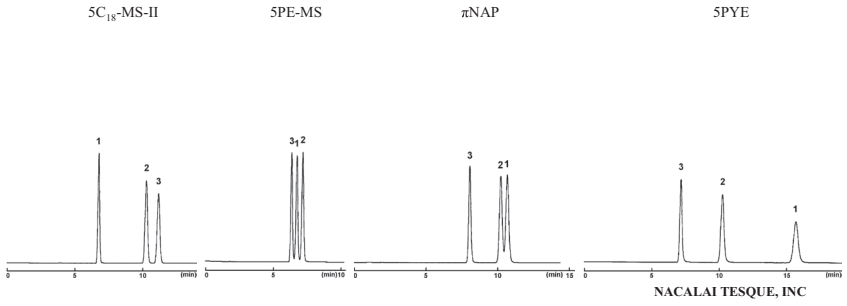
극성기 그룹을 갖는 시료의 분리도는 나이트로, 애니솔, 메톡시(nitro, anisole, methoxy)그룹을 갖는 벤젠, 나이트로벤젠(benzene, nitrobenzene)을 얼마나 잘 분리가 되는가를 기초로 분리도를 평가합니다. 아래 크로마토그램은 세가지 화합물에 대해서 C18-MS-II, PE-MS, πNAP , PYE의 네가지 칼람들을 이용했을 때 분리되는 모습을 보여줍니다. C18칼람에서 시료용출 순서는 나이토로벤젠, 애니솔, 벤젠(nitrobenzene, anisole, benzene) 입니다. 고정상이 아로마틱(aromatic)칼람에서 시료의 용출 순서는 반대로 입니다. C18칼람에서 분리는 단지 친유성 상호작용을 이용하는 것을 기초로 합니다. 다시말하면 세가지 칼람은 아로마틱 링(aromatic ring)을 고정상으로 갖고 있기 때문에 시료와 고정상과 π-π상호작용에 의하여 시료의 용출 순서가 뒤바뀝니다. 아래 그림은 극성기 그룹을 갖는 시료의 분리도를 그래프를 보여줍니다. PYE, NPE칼람을 포함하는 9개의 COSMOSIL칼람들은 극성그룹을 갖는 시료의 분리에 가장 높은 분리도 값을 갖습니다. π-π상호작용을 이용할 때 용매는 아세토나이트릴보다 메탄올이 분리에 효과적입니다.

극성기 그룹을 갖는 시료의 분리도

Column:
Column size: 4.6mmI.D.-150mm
Mobile phase: Methanol / H_2O = 50/50
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Nitrobenzene (0.13μg)
2; Anisole (1.5μg)
3; Benzene (4.0μg)





NACALAI TESQUE, INC

응용 자료

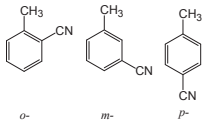
● 위치 이성질체(position isomers) 톨루나이트릴(tolunitrile) 분리

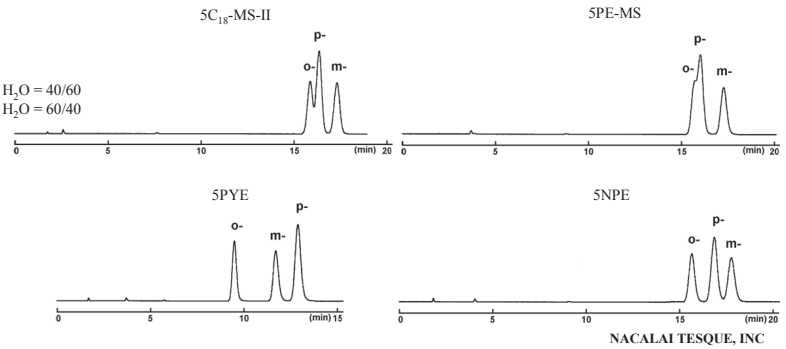
톨루나이트릴(tolunitrile)은 3개의 위치 이성질체를 갖고 있습니다. 기존의 C18 또는 PE-MS칼람을 이용할 경우 π-π 상호작용이 너무 약하기 때문에 ortho 및 para의 이성질체는 분리가 어렵습니다. 그러나 이 이성질체들은 π-π 상호작용이 강한 PYE 또는 NPE칼람으로 분리가 매우 잘 됩니다.

COSMOSIL Application Data

Column:
Column size: 4.6mmI.D.-150mm
Mobile phase: $5C_{18}$-MS-II, 5PE-MS, 5NPE, 5PYE — Methanol/ H_2O = 40/60; Methanol/ H_2O = 60/40
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: *o*-Tolunitrile (2.0 μg)
m-Tolunitrile (2.0 μg)
p-Tolunitrile (1.0 μg)



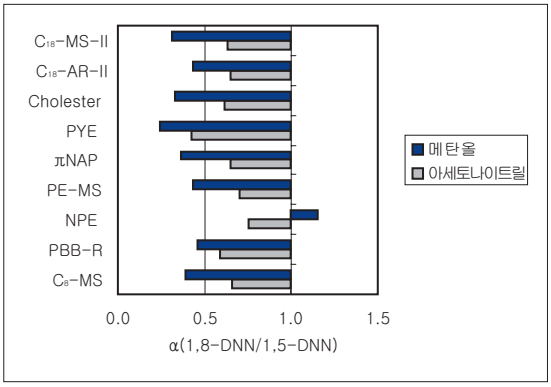


NACALAI TESQUE, INC

2) 쌍극(dipole)구조를 갖는 시료의 분리도

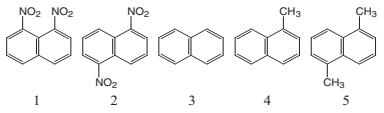
분리도

쌍극(dipole)구조를 갖는 시료의 분리도는 시료 1,5-dinitronaphthalene과 1,8-dinitronaphthalene의분리를 기초로 평가합니다. Dinitronaphthalenes (피크 1 과 2)는 dimethylnaphthalenes과 같이 π-π상호작용이 크므로 PYE 과 NPE 칼람에서 강하게 시료가 머뭅니다. 1,8-dinitronaphthalene (피크 1)는 NPE 칼람에 더 오래 머물고 1,5-dinitronaphthalene (피크 2)는 PYE 칼람에 선택적으로 오래 머물기 때문에 이 두 칼람은 차이가 있습니다. NPE 칼람이 강한 쌍극 쌍극 상호작용(dipole-dipole interaction)을 표시합니다. 1,8-dinitronaphthalene에서 2개의 나이트로 그룹 쌍극은 1,5-dinitronaphthalene 보다 nitrophenyl 그룹으로 본딩한 NPE칼람에서 더 큰 쌍극 결합이 일렬로 이루어집니다.

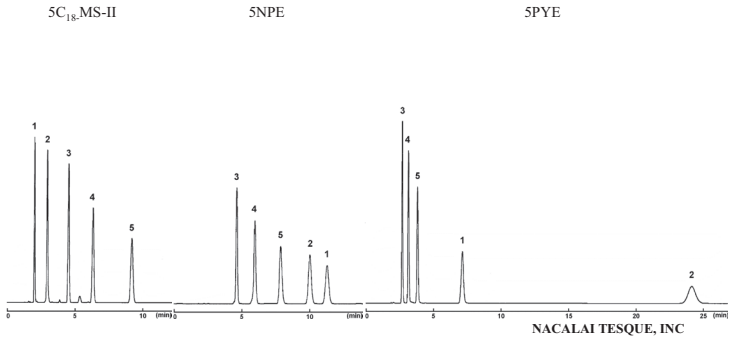


쌍극에 대한 선택도

Column size: 4.6mmI.D.-150mm
Mobile phase: $5C_{18}$-MS-II Methanol / H_2O = 80/20
NPE Methanol / H_2O = 70/30
PYE Methanol / H_2O = 90/10
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm
Sample:
1; *1,8*-Dinitronaphthalene(*1,8*-DNN) (0.21μg)
2; *1,5*-Dinitronaphthalene(*1,5*-DNN) (0.11μg)
3; Naphthalene (0.25μg)
4; *1*-Methylnaphthalene (0.35μg)
5; *1,5*-Dimethylnaphthalene (0.42μg)



1 2 3 4 5



응용 자료

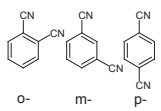
● 프탈로나이트릴(phthalonitrile)위치 이성질체 분리

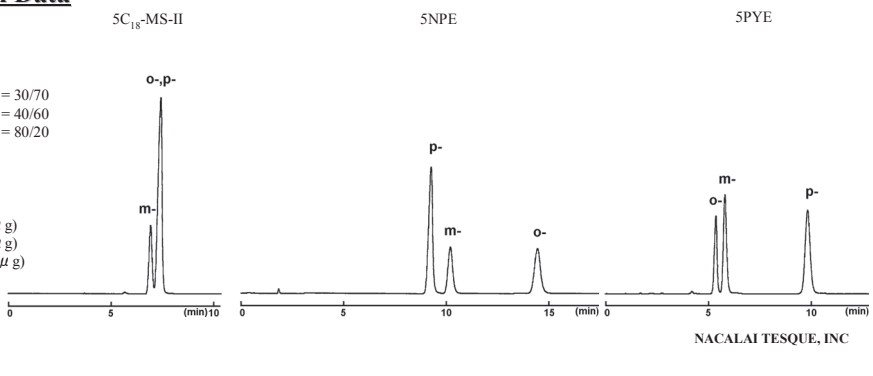
프탈로나이트릴은 3개의 위치 이상질체를 갖습니다. NPE 또는 PYE 칼람은 π-π상호작용으로 3가지 위치 이성질체를 완벽하게 분리 합니다. 더구나 NPE 칼람은 쌍극 쌍극 상호작용(dipole-dipole interaction)에 의해 o-phthalonitrile가 강하게 칼람에 머뭅니다.

COSMOSIL Application Data

Column:
Column size: 4.6mmI.D.-150mm
Mobile phase: $5C_{18}$-MS-II Methanol/ H_2O = 30/70
5NPE Methanol/ H_2O = 40/60
5PYE Methanol/ H_2O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample:
o-; Phthalonitrile (0.3 μ g)
m-; Isophthalonitrile (3.0 μ g)
p-; Terephthalonitrile (0.15 μ g)

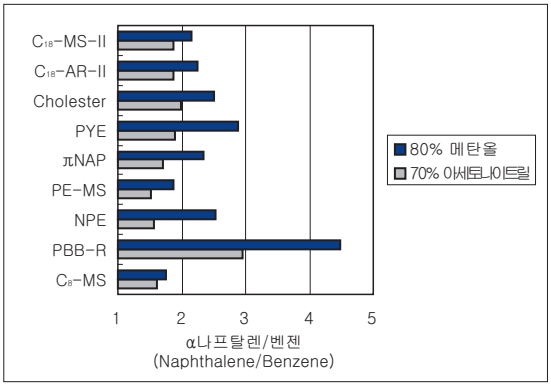




3) 폴리아로마틱(polyaromatic)화합물의 분리도

분리도

폴리아로마틱 화합물의 분리도는 벤젠, 나프탈렌, 안트라센의 분리을 기초로 분리도를 평가합니다. 시료의 용출 순서는 모든 칼람이 같습니다(벤젠-나프탈렌-안트라센). 모든 칼람에서 아로마틱 링의 수의 증가에 따라 시료의 머무는 시간이 결정됩니다. 그러나 PBB-R 및 PYE과 같은 칼람은 분산력 상호작용으로 인해 폴리아로마틱 화합물은 강하게칼람에 머무는 것을 보여줍니다.

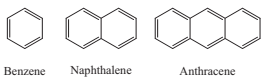


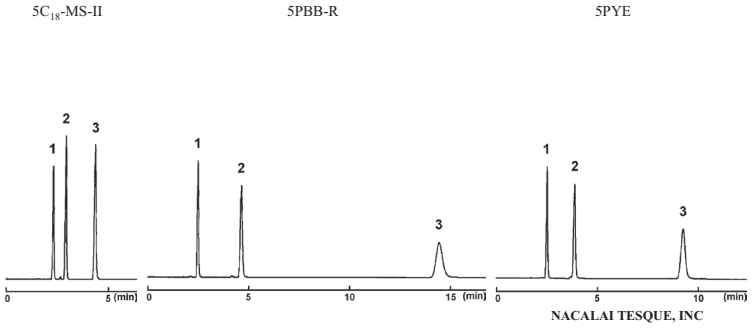
응용 자료

폴리아로마틱 화합물의 분리도

Column:
Column size: 4.6mmI.D.-150mm
Mobile phase: $5C_{18}$-MS-II Methanol/H_2O = 90/10
5PBB-R Methanol/H_2O = 90/10
5PYE Methanol/H_2O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Benzene (1.67μg)
2; Naphthalene (0.11μg)
3; Anthracene (0.0063μg)





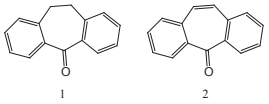
● dibenzosuberone 과 dibenzosuberenone의 분리

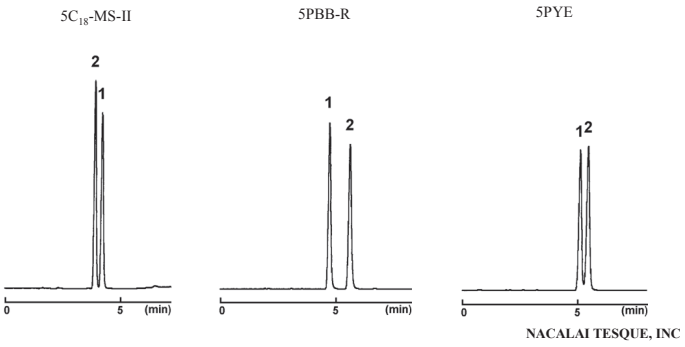
C18은 dibenzosuberenone (피크 2)보다 dibenzosuberone (피크 1)오래 칼람에 머뭅니다. 다시말하면 PBB-R 및 PYE 칼람은 π-전자 시스템을 갖는 dibenzosuberenone (피크 2)이 dibenzosuberone (피크 1)보다 오래 머뭅니다.

COSMOSIL Application Data

Column:
Column size: 4.6mmI.D.-150mm
Mobile phase: $5C_{18}$-MS-II Methanol/H_2O = 80/20
5PBB-R Methanol
5PYE Methanol/H_2O = 90/10
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample: 1; Dibenzosuberone (0.1 μg)
2; Dibenzosuberenone (0.025 μg)

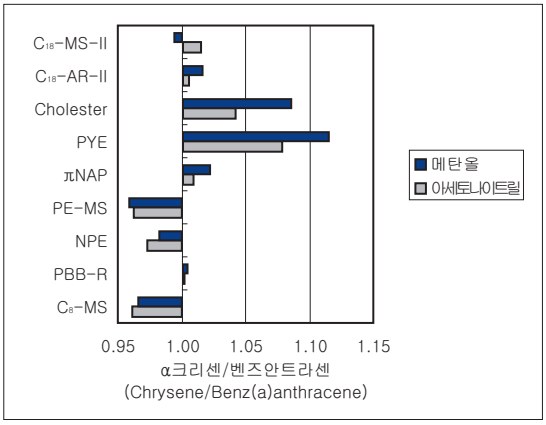


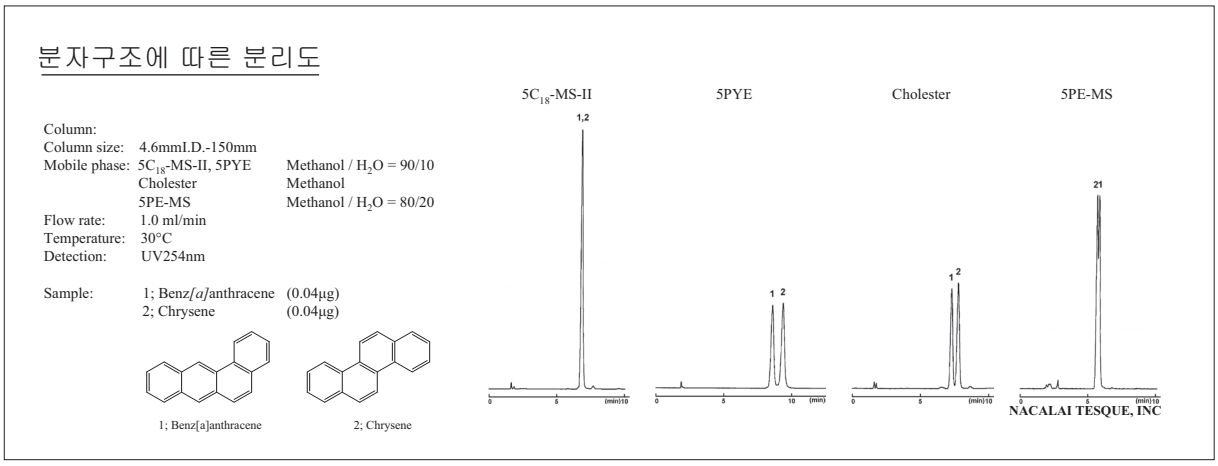


4) 분자 구조에 따른 분리도

분리도

분자구조에 따른 분리도는 chrysene 와 benz[a]anthracene분리를 기초로 평가합니다. 4개의 벤젠 링(benzene rings)의 구조로 된 두개의 폴리아로마틱 하이드로카본(polyaromatic hydrocarbons)의 이성질체는 비슷한 친유성 과 방향족 성질를 갖기 때문에 분리가 어렵습니다. 그러나 PYE 와 Cholester 칼람은 chrysene 과 benz[a]anthracene 같이 특이한 분자 구조의 화합물을 잘 분리할 수 있기 때문에 폴리아로마틱 하이드로카본 이성질체도 잘 분리할 수 있습니다.

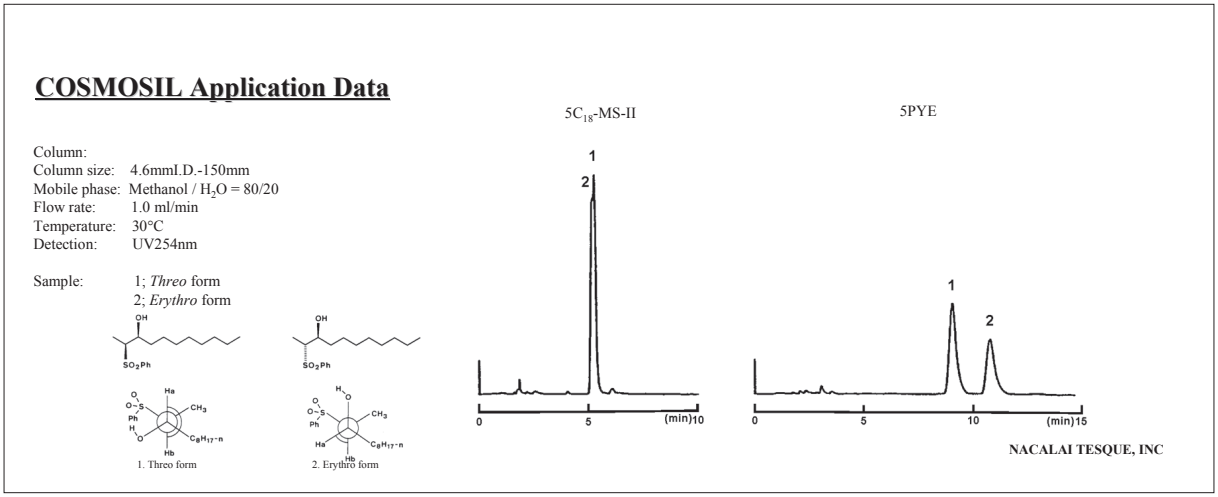




응용 자료

● 부분입체 이성질체(diastereomers)threo와 erythro의 분리

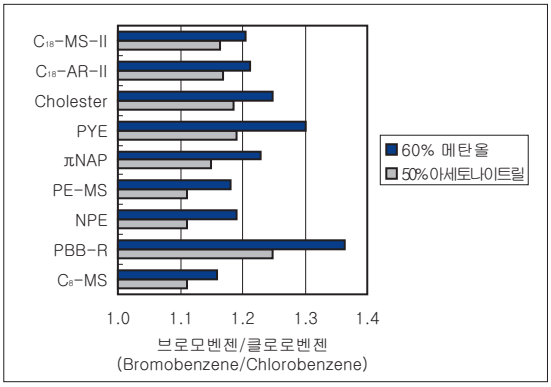
C18 칼람은 threo와 erythro와 같은 부분입체 이성질체는 분리가 어렵습니다. PYE 칼람은 threo구조보다 2차원 구조의 erythro가 칼람에 오래 머뭅니다.



5) 할로겐 화합물의 분리도

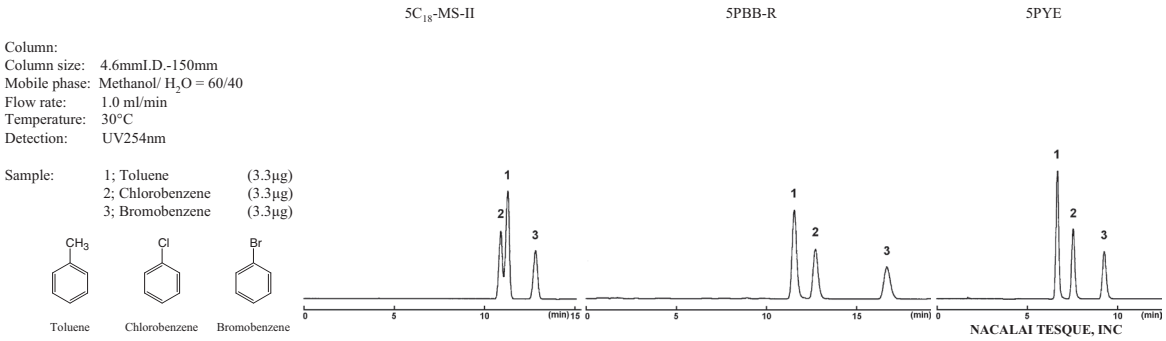
분리도

활로겐 화합물의 분리도는 클로로벤젠(chlorobenzene)과 브로모벤젠(bromobenzene)시료의 분리를 기초로 평가합니다. PBB-R 칼람은 5개의 브로마인(bromine)원자가 분산력 힘에 의한 선택도 지수가 가장 높은 것을 보여줍니다.



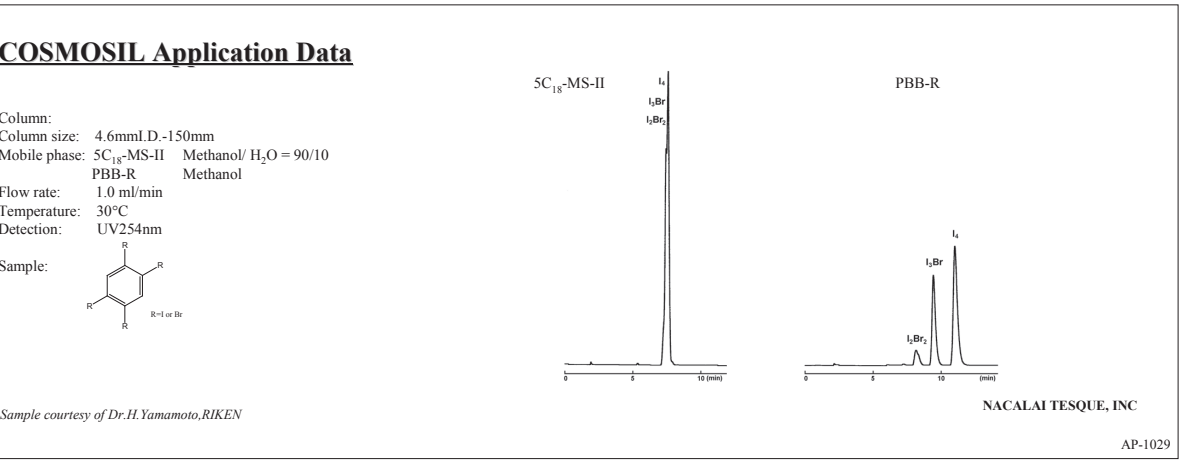
응용 자료

활로겐 화합물의 분리도



● 할로겐 교환 반응 물질(halogen exchange reaction products)의 분리도

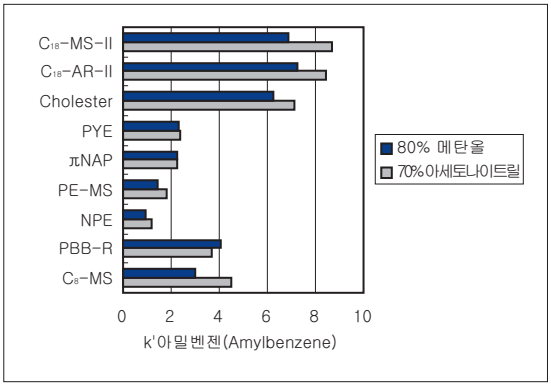
PYE 와 PBB-R 칼람은 브로마인(bromine)원자보다 분산된 요오드원자가 더 길기 때문에 칼람에 머뭅니다. 그래서 PYE 와 PBB-R 칼람은 구조가 복잡한 브로마인 과 요오드화합물를 잘 분리할 수 있지만 C18칼람은 분리를 할 수 없습니다.



6) 친유성 화합물의 분리도

분리도

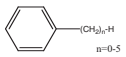
친유성 화합물의 분리도는 알킬벤젠의 분리를 기초로 분리도를 평가합니다. C_{18}과 Cholester 칼람은 친유성 화합물의 분리도가 유사한 것을 보여줍니다. 다른 칼람들은 C_{18}보다 친유성이 높은 화합물의 분리도가 낮은 것을 보여줍니다.

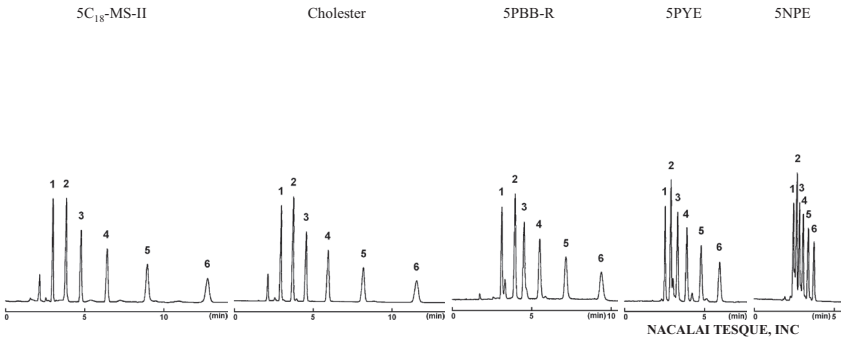


친유성이 높은 화합물의 분리도

Column:
Column size: 4.6mmI.D.-150mm
Mobile phase: Methanol/H_2O = 80/20
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

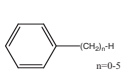
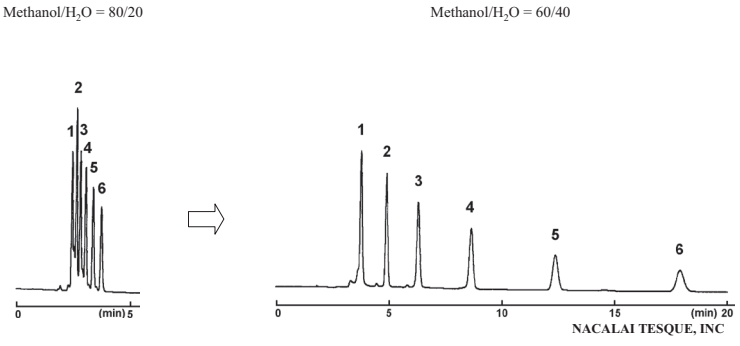
Sample:
1; Benzene (1.67μg)
2; Toluene (1.67μg)
3; Ethylbenzene (1.67μg)
4; Propylbenzene (1.67μg)
5; Butylbenzene (1.67μg)
6; Amylbenzene (1.67μg)





역상 칼람에서 이동상의 유기용매 농도가 낮을수록 시료가 오래 머뭅니다. NPE칼람의 경우 메탄올 농도를 60%로 줄였을 때와 C_{18}칼람에 80%농도로 했을 때 시료의 머무름 시간과 비슷하게 증가합니다.

머무름시간 조정

Column: 5NPE
Column size: 4.6mmI.D.-150mm
Mobile phase:
Flow rate: 1.0 ml/min
Temperature: 30°C
Detection: UV254nm

Sample:
1; Benzene (1.67μg)
2; Toluene (1.67μg)
3; Ethylbenzene (1.67μg)
4; Propylbenzene (1.67μg)
5; Butylbenzene (1.67μg)
6; Amylbenzene (1.67μg)