

분자 각인 고분자를 흡착체로 한 2,4-dinitrophenol의 선택적인 고체상 추출법 연구

김기동^{1*} · 조진숙² · 백대진³ · 팽기정^{2*}

¹상지대학교 화학과, ²연세대학교 화학과, ³한서대학교 화학과

The Selective Solid Phase Extraction Studies on 2,4-Nitrophenol with the Adsorbent Based on Molecular Imprinting Polymer

영문이름

¹소속영문

²소속영문

³소속영문

1. 서 론

고체상 추출법 (solid phase extraction: SPE)은 낮은 농도로 존재하는 특정 물질들을 선택적으로 농축 혹은 복잡한 매트릭스에서 방해물질을 제거, 정제하는 분석에 유용하게 응용되는 방법이다. 또한 중요물질의 보관 및 운반에도 사용된다. 이 고체상 추출법은 임상시료 분석에도 폭 넓게 응용되고 있는데, 예를들면 혈액등의 생체 시료로부터 주요 생체물질을 추출해내는데 많이 사용된다. 이때 주로 사용되는 흡착제가 면역항체를 이용하는 immnuosorbent이다.¹⁾ 그러나 이 면역흡착제는 값이 비싸고, 취급이 어려운 단점이 있다 이를 보완하기 위해 최근에는 추적물질을 template로 이용하여 만든 분자 각인 고분자 (molecular imprinting polymer: MIP)를 항체대신에 응용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또 이렇게 개발된 MIP들은 생체분자 뿐만 아니라 다양한 화학물질, 특히 이성질체의 분리, 정제, 농축 등에 적용되고 있다.^{2,4)}

연구에 사용한 대상 시료인 페놀류는 독성이 매우 강한 발암성 물질이며 인체 내에 생물학적으로 축적된다. 페놀류 중 염화 페놀류와 나이트로 페놀류는 발암 물질이며 내분비 교란 물질로 인식되고 있으며,⁵⁾ 특히 2,4-dinitrophenol은 그 독성이 가장 강력한 것으로 알려져 있으며, 이런 페놀류들을 연소시키면 다이옥신 (dioxin)이 생성되기도 한다.⁶⁾

이와 같은 유해성을 고려할 때, 2,4-dinitrophenol을 효과적으로 제거, 회수할 수 있는 흡착제 및 전처리 방법을 개발하는 것이 중요하다고 할 수 있다. Masque들⁷⁻⁹⁾은 고분자 흡착제에 여러 가지 작용기들을 도입함으로써 새로운 흡착제를 합성하고 페놀류 및 살충제 등에 대해 회수율을 비교하였다. 또한 Masque등은 MIP를 적용해서 4-nitrophenol의 선택적인 고체상 추출법을 성공적으로 수행하였다고 보고하였다.¹⁰⁾

본 연구에서는 또한 본 실험에서는 흡착제로서 고분자 흡착제인 Aldrich사의 XAD-4와 실험실에서 합성된 MIP를 사용하였으며 두 흡착제의 입자 크기는 100-140 mesh로 동일하였다. 합성된 시료는 컬럼에 충전하여 흡착 성능을 점검하였으며, 시료의 분석은 HPLC를 이용하였다. 결과적으로 새로 합성된 MIP들은 template에 대하여 다른 분석물보다 높은 머무름 성질을 보였으며, template 없이 합성된 고분자나 XAD 수지보다도 template에 대한 추출 선택성이 매우 높은 것으로 확인되었다. 앞으로 더 선택성과 재현성을 높이는 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

2. 실험

2.1. 흡착제의 정제 및 MIP의 합성

본 실험에서는 흡착제로서 고분자 흡착제인 Aldrich사의 XAD-4와 실험실에서 합성된 MIP를 사용하였으

*To whom correspondence should be addressed.

며 두 흡착제의 입자 크기는 100-140 mesh로 동일하였다. MIP합성에는 template(2,4-dinitrophenol)로 대상 시료와 같은 화합물 2 mmol을 사용하고, functional monomer로 Aldrich사의 4-vinylpyridine(4VP)(95%) 8 mmol과 methacrylic acid(MAA) 8 mmol을, 각각 합성에 사용하였고 cross-linking reagent로 Aldrich사의 ethylene glycol dimethacrylate(EGDMA)(98%) 40 mmol을, initiator로 Aldrich사의 2,2'-azobisisobutyronitrile(AIBN)(99%), 그리고 porogen으로 J.T.Baker사의 HPLC-grade acetonitrile 10mL과 Toluene을 각각 사용하였다.

합성과정은 다음과 같다.

1) Vial에 porogen 12 mL에 template(2,4-DNP : 0.380 g)와 monomer(4-VP : 0.685 mL)를 넣고 충분히 용해시킨다.

2) 위 Vial에 cross-linking reagent(EGDMA : 7.698 mL)와 initiator(AIBN : 0.149 g)를 넣은 후 초음파 진동기로 10분간 분쇄한다.

3) Vial내의 O₂를 제거하기 위하여 10분 동안 N₂ bubbling시켜준다.

4) 위 vial을 60°C에서 18시간동안 라디칼 반응 진행한다.

합성 후 Sieve shaker에서 100-140 mesh로 입자크기를 선별하고 methanol과 acetic acid의 비율이 9:1 (v/v)인 용액 안에 24시간 이상 보관하여 template를 제거시킨다. 이 과정은 template가 검출이 되지 않을 때까지 반복한다. 그 후 Acetone과 methanol을 사용하여 Soxhlet장치로 24시간 2번 정제한다.

같은 방법으로 monomer와 porogen을 각각 MAA와 Toluene으로 변경하여 합성한다. 각각의 MIP의 조성에 대해서 Table 1에 정리하였다.

2.1. 흡착제의 충전

XAD-4는 Acetone을 사용하여 Soxhlet장치로 24시간 정제하고 Methanol을 사용하여 24시간씩 2번 정제하였다. XAD-4 및 MIP를 Sieve shaker에서 100-140 mesh입자만 선별하여 건조 한 후, 흡착제의 손실을 막기 위해 컬럼의 양 끝을 titanium flit으로 막아 고정시

켜 충전한 뒤 100% Methanol로 흘려주어 팽윤시킨 후 사용하였다.

2.2. 흡착 실험

본 실험에서 시료로는 Aldrich에서 구입한 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4-dimethylphenol 그리고 2,4,6 trichlorophenol을 사용하였으며, 정제 과정 없이 소량의 HPLC용 메탄올에 녹인 후 6M HCl으로 조절된 pH 2.5 water에 일정 농도로 제조하였다. 또한 본 실험에서는 흡착제로서 고분자 흡착제인 Aldrich사의 XAD-4와 실험실에서 합성된 MIP를 사용하였으며 두 흡착제의 입자 크기는 100-140mesh로 동일하였다. 합성된 시료는 컬럼에 충전하여 흡착 성능을 점검하였으며, 시료의 분석은 HPLC를 이용하였다. 페놀류의 분석 과정은 과거에 보고되었던 논문의 실험 과정을 그대로 응용하였다.¹¹⁻¹³⁾

2.3. 측정 기기

본 실험에서는 HPLC system으로 BIO RAD사의 Model 2800 HPLC Pump와 Varian사의 Prostar-320 UV-검출기를 사용하였다. 시료 주입장치는 Rheodyne 7125i Injector (20 µL loop)를 사용하였으며, 적분 기록계로는 영린기기의 Autochro Data Module (software : Autochro-2000)을 사용하였다.

분석용 column으로는 Phenomenex 250 × 4.60 mm (4 µ Hydro-RP, 80A)을 사용하였고, 이동상의 degassing을 위해 Everseiko사의 Gastorr 152 series on-line degassor를 사용하였다.

용매 거름 장치는 Millipore사의 제품을, 초음파 진동기는 Cole-Parmer사의 Model 08893-21을 사용하였다. SPE column으로 2 × 50 mm PEEK (poly ether ether ketone)를 사용하였고 흡착제의 손실을 막기 위해 column 양쪽 끝을 Upchurch scientific사의 titanium frit(2 µm pore size)으로 막아 흡착제를 고정시켰다. HPLC Pump와 UV-Detector사이에 직접 연결하였다. 또한 흡착제의 크기를 선별하기 위해 다양한 mesh의 U.S.A. standard testing sieve를 장착한 W. S. Tyler사의 RX-86 sieve shaker를 사용하였다.

Tabl 1. The composition of polymer used in this experiment.

| Polymers | Template | Monomer | Porogen | Cross-linking | Initiator |
|----------|----------|---------|---------|---------------|-----------|
| MIP 1 | 2,4-DNP | MAA | ACN | EGDMA | AIBN |
| MIP 2 | 2,4-DNP | 4-VP | Toluene | EGDMA | AIBN |

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 functional monomer로 4-vinylpyridine(4VP) 혹은 methacrylic acid(MAA)을 사용하는 2 가지 방법으로 MIP를 합성하여 사용하였고, XAD-4를 비교 흡착제로 사용하였다. Phenol류의 경우 극성이 크고 물에 대한 용해도가 커서 농축과정에서 시료가 손실되는 경우가 발생하므로 이를 방지하고 회수율을 증가시키는데 그 목적을 두었다. 또한 2,4-dinitrophenol을 template로 사용한 MIP와 template 없이 만든 고분자 간의 선택성차이 그리고 MIP1,2간의 차이 마지막으로 일반 XAD수지와 2,4 dinitro phenol에 대한 회수율 및 선택성의 차이를 확인하였다.

MIP와 XAD-4에 대한 페놀류의 흡착은 전형적이 물리적 흡착이 있으므로 페놀류의 이온화를 막기 위해 시료를 이동상을 산성 조건으로 조절해 주어야 한다. 시료의 pH는 HCl을 사용하여 pH 2.5으로 조절하였다. 페놀류 mixture 시료 용액을 MIPs와 XAD-4 column에 0.5 mL/min의 유속으로 흘려주어 농축시켰다. 실험을 통하여 최적 조건에서 Kd 값을 구하였으며 그 결과는 Table 2 (MIPs), 3 (XAD)에 나타내었다. 실험결과 합성된 두 고분자간에는 template의 흡착 능력에 거의 차이가 확인되지 않았다. 그러나 예상했던 대로 template인 2,4 dinitrophenyl에 대해서는 흡착능력에서 다른 phenol류에 비해 높은 값을 보여 선택적인 분리 및 농축의 가능성을 보여 주었다. 또한 XAD 수지나 template 없이 합성된 고분자에 비해서도 고르게 높은 흡착 능력을 보였지만, 특히 2,4 dinitrophenyl에 대해서 차이가 있음을 보여준다. 예를 들면 모든 고분자가 2,4,6 trichlorophenol에 대해서 가장 높은 흡착성을 보여 주었는데, MIP의 경우만 template에 대해서 높은 흡착성을 보여, MIP의 사용 가능성에 주목하였다.

탈착은 100% methanol을 사용하였으며 농축의 역방향으로 흘려주어 탈착시켰다. 이 때 유속은 0.3 mL/min로 하였다. 고체상 추출법에서 탈착 과정을 효과적

으로 수행하기 위한 용매의 선택은 매우 중요하다. 즉 시료에 대해서 높은 선택성을 지녀야 하고 물과 잘 혼합될 수 있어야 하기 때문이다. 또한 우리가 검출 광원으로 사용하는 자외선 영역(280 nm)에서 탈착 용매의 자외선 흡수가 일어나지 않아야 한다. 이러한 조건에 따라 본 연구에서는 Methanol과 Acetonitrile을 선택하여 분포계수를 측정하였고, 전체적으로 실험을 수행하였을 때 시료에 대한 선택성이 우수한 Methanol을 탈착 용매로 결정하였다. 탈착 용매는 MIP-1, MIP-2의 컬럼에 대해 수행 되었다. 2,4-dinitrophenol, 농도를 20 mg L⁻¹으로 하여 2가지 컬럼에 용리시킨 후 탈착 용매를 3 mL 받았다. 이 때 완충용액에 spike한 표준 시료의 회수율과 반복 실험에 대한 재현성을 조사하여 역시 Table 2, 3에 정리하였다. 표에서 확인한바와 같이 회수율은 반대로 MIP에서 template에 대한 경우가 가장 낮았다. 즉, template, 2,4 nitrophenol을 고분자에서 분리시킬 수 있는 탈착기법에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각되었다. 그러나 회수율은 낮았으나 다른 phenol류와 template 간에는 재현성의 차이는 거의 발견되지 않았다. 따라서 정량분석에 MIP를 이용한 정제와 농축 과정을 동비하여도 분석의 정확도에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다.

흡착제에 대한 시료 적용 가능성을 알아보기 위해 페놀류 mixture를 각각 20 mg L⁻¹으로 하여 흡착제가 채워진 컬럼을 이용하여 고체상 추출법에 적용하였다. 그 때 얻어진 크로마토그램을 Fig. 1에 도시 하였다.

Table 3. Kd values, recoveries and reproducibilities of XAD resin toward phenols.

| Concentration (20 mg/L) | Kd | Recovery (%) | %RSD |
|-------------------------|------|--------------|------|
| 4-NP | 3.98 | 89.34 | 2.28 |
| 2,4-DNP | 3.84 | 89.66 | 4.36 |
| 2,4-DCP | 2.60 | 92.75 | 6.36 |
| 2,4-DMP | 5.56 | 85.70 | 4.82 |
| 2,4,6-TCP | 8.28 | 80.10 | 3.54 |

Table 2. Kd values, recoveries and reproducibilities of molecular imprinted polymers toward phenols.

| concentration (20 mg/L) | MIP1 | | | MIP2 | | |
|-------------------------|-------|--------------|------|-------|--------------|------|
| | Kd | Recovery (%) | %RSD | Kd | Recovery (%) | %RSD |
| 4-NP | 6.63 | 83.40 | 4.08 | 7.25 | 82.13 | 6.08 |
| 2,4-DNP | 10.72 | 75.67 | 4.55 | 11.13 | 74.97 | 4.32 |
| 2,4-DCP | 5.29 | 86.28 | 7.02 | 6.70 | 83.26 | 7.97 |
| 2,4-DMP | 6.15 | 84.41 | 3.01 | 7.10 | 82.45 | 4.04 |
| 2,4,6-TCP | 8.13 | 80.39 | 8.30 | 8.84 | 79.04 | 3.53 |

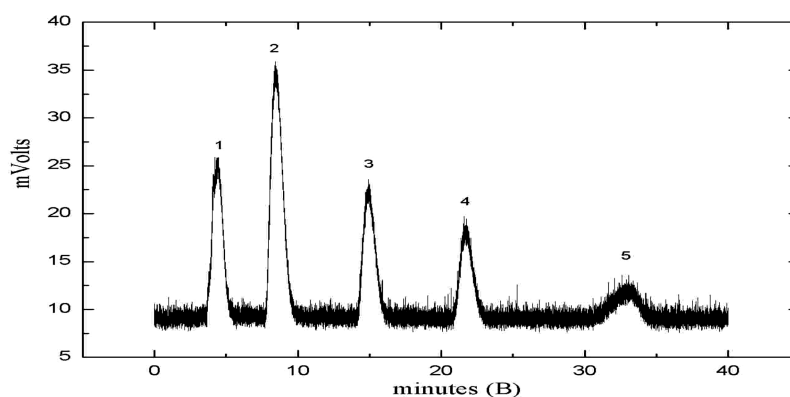


Fig. 1. Chromatogram of spiked phenolic compounds (20 mg L^{-1}) after solid phase extraction with MIP1. Mobile phase : methanol / water = 60 : 40, Detection : 280nm. Peak ID : 1: 4-nitrophenol 2: 2,4-dinitrophenol 3: 2,4-dimethylphenol, 4: 2,4-dichlorophenol, 5: 2,4,6-trichlorophenol.

Methanol은 모든 polymers에서 뛰어난 탈착 효과를 보였음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 일부 2003년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.

참고문헌

1. V. Pichon, M. Bouzige, C. Mie'ge, M.-C. Hennion, *Trends Anal. Chem.* **1999**, 18, 219.
2. J. Steinke, D. C. Sherrington, I. R. Dunkin, *Adv.*

Polym. Sci. **1995**, 123, 81.

3. G. Wulff, *EXS* **1997**, 80,13-26.
4. Sellergren, B. *Trends Anal. Chem.* **1999**, 18, 164.
5. H. G. J. Mol, S. Sunarto, O. M. Steijger, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 879, 97.
6. C. Rappe, "In *The Handbook of Environmental Chemistry: Anthropogenic Compounds*" O. Hutzinger, Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1980, Vol. 3, Part A.
7. N. Masque, M. Galia, R. M. Marce, F. Borrull, *Analyst* **1997**, 122, 425.
8. N. Masque, M. Galia, R. M. Marce, F. Borrull, *Chromatographia* **1999**, 50, 21.
9. N. Masque, M. Galia, R. M. Marce, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* **1998**, 803, 147.
10. N. Masque, R. M. Marce, F. Borrull, P. A. G. Cormack, D. C. Sherrington, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 4122.