

Cu(II)-tiron 킬레이트를 이용한 EDTA 분광형광법 정량

최 희 선*

수원대학교 화학과

(2011. 4. 4. 접수, 2011. 5. 12. 승인)

Spectrofluorimetric determination of EDTA with Cu(II)-tiron chelate

Hee-Seon Choi*

Department of Chemistry, The University of Suwon, San 2-2, Wau-ri, Bongdam-eup,

Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 445-743, Korea

(Received April 4, 2011; Accepted May 12, 2011)

Abstract : A spectrofluorimetric method for the determination of EDTA in real samples such as mayonnaise, powder detergent and cleansing cream with tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid) as a fluorimetric reporter was developed. When tiron is chelated with Cu(II), the fluorescent intensity is decreased by a quenching effect. However, when Cu(II)-tiron chelate reacts with EDTA, fluorescent intensity is increased as tiron is released. Several experimental conditions such as pH of the sample solution, the amount of Cu(II), the amount of tiron, heating temperature and heating time were optimized. Fe(III) interfered more seriously than any other ions, interference of Fe(III) could be disregarded, because Fe(III) was scarcely contained in selected real samples. The linear range of EDTA was from 8.0×10^{-8} M to 2.0×10^{-6} M. With this proposed method, the detection limit of Fe(III) was 5.2×10^{-8} M. Recovery yields of 92.7~99.3% were obtained. Based on experimental results, it is proposed that this technique can be applied to the practical determination of EDTA.

Key words: EDTA determination, tiron, Cu(II), spectrofluorimetry

1. 서 론

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 많은 산업에서 이용되고 있는 잘 알려진 킬레이트제이다. 화장품 산업에서는 크림, 로션, 샴푸, 콘디셔너, 선크림 등과 같은 상품들이 부패되는 것을 방지하고 또는 안정화시키기 위한 방부제 또는 안정제로서 사용되며,¹ 그

리고 의약품, 화학제품, 식료품 및 농산물 등에도 널리 사용되고 있다.² 실제로 분석 연구에 사용된 시료에는 화장품,¹ 의약품,² 제제,³ 식료품,⁴ 물 시료,⁵ 제지 폐수,⁶ 그리고 비알코올성 음료⁷ 등이 있으며, 이러한 시료에 들어있는 EDTA의 정량법으로 모세관전기이동,¹ 이온크로마토그래피,² 분광광도법,³ 형광법,⁴ 역상 분배크로마토그래피,⁵ GC,⁶ AAS,⁸ 폴라로그래피,⁹

★ Corresponding author

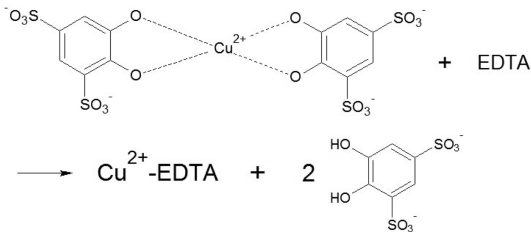
Phone : +82-(0)31-220-2152 Fax : +82-(0)31-220-2520

E-mail : choihs@suwon.ac.kr

www.kci.go.kr

흡착 벗김법,¹⁰ 그리고 네모파 전압전류법¹¹ 등이 있다. 하지만 이 분석법들은 어떤 특정한 시료에만 이용할 수 있거나, 더 정교하거나 값비싼 기기를 이용하여야 하거나 또는 감도가 낮다는 등의 단점이 있다.

본 실험에서는 식품인 마요네즈, 세제인 가루비누, 그리고 화장품인 클렌징 크림 등의 시료들에 들어있는 EDTA를 간단하고 감도높게 정량할 수 있는 분광형광법에 대해 연구하였다. Tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid)은 형광을 잘 발하는 형광체이지만 Cu(II)와 착물을 형성하게 되면 정적 소광현상에 의해 형광의 세기가 감소하는 특성이 있다.¹² 그리고 tiron과 그의 Cu(II) 착물은 많은 다른 형광체와 달리 물에 잘 용해되어 수용액 시료나 수용액으로 만들 수 있는 시료에 매우 편리하게 응용할 수 있다는 장점이 있다. 여기에 EDTA를 첨가하면 EDTA가 Cu(II)와 결합하면서 tiron을 유리상태로 만들므로 EDTA 농도가 증가함에 따라 형광의 세기도 증가한다($\log K_f(\text{Cu(II)-EDTA}) = 18.7$,¹³ $\log K_f(\text{Cu(II)-tiron}) = 14.0$ ¹⁴).



2. 실험

2.1. 시약과 용액

본 실험에서 사용한 $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich co., USA) 등과 같은 모든 시약들은 분석용급이었다. EDTA, tiron 및 Cu(II) 표준용액은 1.0×10^{-3} M 저장용액을 이용하여 만들었으며, 실험 중에 사용된 탈이온수는 Barnstead cartridge 이온화 시스템(Barnstead 사, USA)을 이용하여 만들었다. pH 8.0 완충용액은 0.025 M borax와 0.1 M HCl을 적절한 양을 혼합한 후 pH 미터를 이용하여 제조하였다.

2.2. 기기

분광형광계는 Perkin Elmer사의 LS-50을 사용하였으며 들뜸 스펙트럼과 형광 스펙트럼의 유효파나비는 모두 3.0 nm로 하였고, 들뜸 파장과 형광 파장은 각각 296 nm와 350 nm로 고정시켜 놓고 형광의 세기를 측정하였다. 실험과정중 pH를 조절하는데 Bantex 모

델 300A 디지털 pH 미터를 사용하였다. 초음파 분쇄기로는 Branson 사 (USA)의 3510E-DTH 모델을 사용하였다. 원심분리기는 한일과학(주)(Korea)사의 HA-12 모델을 사용하였다.

2.3. 실험시료 만들기

마요네즈 2.0 g을 250 mL 비이커에 정확히 취하고, 탈이온수 70 mL를 가한 후 초음파 분쇄기를 이용하여 균질화시켰다. 이 용액을 100 mL 부피 플라스크에 조심스럽게 정량적으로 모두 옮기고 표선까지 탈이온수로 묽혔다. 이 용액 5.0 mL를 뚜껑있는 원심분리관에 정확히 취하고 여기에 5.0 mL의 CH_2Cl_2 를 넣고, 20분 동안 격렬하게 흔들어 주었다. 그 다음 2000 rpm의 원심분리기에서 2분 동안 원심분리시킨 후 수용액층의 시료를 실제시료의 실험시료로 사용하였다. 가루 세제와 클렌징 크림도 마요네즈와 같은 방법으로 실험시료를 만들었으며, 단지 균질화시키는 동안 생기는 거품은 최소량의 메탄올을 가하여 없앴다.

2.4. EDTA 검정곡선

여러 개의 10 mL 부피플라스크에 5.0×10^{-4} M tiron을 1.0 mL, 3.0×10^{-5} M Cu(II)를 1.0 mL를 취하였다. EDTA는 농도범위가 8.0×10^{-8} M ~ 2.0×10^{-6} M가 되도록 넣어주고 pH 8.0 완충용액을 3.0 mL 넣어준 후 탈이온수로 표선까지 맞추었다. 80 °C의 물중탕에서 30분 동안 가열하고 실온까지 식힌 후 tiron의 형광세기를 측정하였다. 이 때 EDTA가 들어있지 않은 바탕용액을 이용하여 바탕 형광세기를 측정하여 시료의 형광세기를 보정하였다.

2.5. 실제시료내의 EDTA 정량

2.4. EDTA 검정곡선의 실험과정 중 EDTA 표준용액을 취하는 과정 대신 5개의 10 mL 부피 플라스크에 2.3. 실험시료 만들기의 과정으로 만든 시료 1.0 mL를 취하고 그 다음의 모든 과정은 2.4. EDTA 검정곡선의 실험 과정으로 실험하였다.

2.6. 표준물 첨가법을 이용한 실제시료내의 EDTA 정량

2.3. 실험시료 만들기의 실험과정 중 시료 2.0 g에 증류수 70 mL를 가하는 과정 대신에 8.0×10^{-6} M EDTA 용액 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL 및 50 mL를 가하고 증류수로 70 mL 되게 조절한 후 초음파 분

쇄기를 이용하여 균질화시켰다. 이 다음의 모든 과정은 2.3. 실험시료 만들기의 실험과정과 2.5의 실제시료내 EDTA 정량의 실험과정에 따라 실험하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 최적조건

pH를 조절하기 위해 사용되는 완충용액의 종류와 양에 따라 들뜸 파장과 형광 파장이 변화되어 형광의 세기가 달라질 수도 있고, 무엇보다도 Cu(II)-tiron과 Cu(II)-EDTA 착물이 형성되는 정도가 pH에 따라 달라지므로 형광세기에 영향을 주리라고 예상되어 pH의 영향을 조사해 보았다. Tiron의 농도는 5.0×10^{-5} M 그리고 Cu(II)의 농도는 3.0×10^{-6} M 되게 고정시키고 일정한 EDTA 농도범위(1.0×10^{-7} M~ 1.0×10^{-6} M)에서 pH를 완충용액으로 변화시키면서 tiron의 형광세기를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. pH 8.0일 때 감도가 가장 좋았다. 이 보다 낮은 pH에서는 EDTA의 배위자리에 있는 질소 또는 산소 원자에 양성자가 더 잘 결합하게 되어 리간드로서의 역할을 제대로 할 수 없게 하고, 이보다 높은 pH에서는 Cu(II)의 수산화물 침전과 tiron 또는 EDTA와의 착물 형성과정과 경쟁을 하기 때문에 감도가 낮아진다고 볼 수 있다.

Cu(II)의 농도를 3.0×10^{-6} M로 고정시키고 일정한 EDTA 농도 범위(1.0×10^{-7} M~ 1.0×10^{-6} M)에서 tiron의 농도를 1.0×10^{-5} M~ 1.0×10^{-3} M로 변화시켰을 때 EDTA 농도에 따른 검정감도는 tiron의 농도가 5.0×10^{-5} M일 때 가장 크게 나타났다.

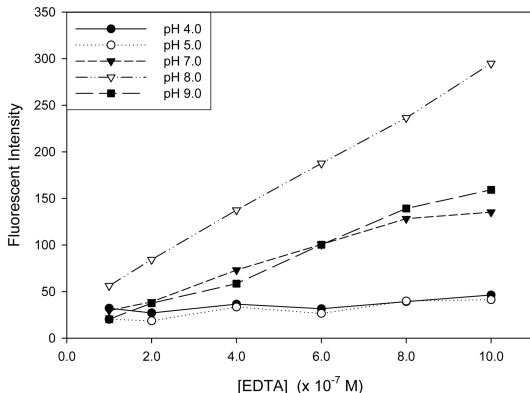


Fig. 1. Effect of the pH on the standard curves of EDTA at [tiron] = 5.0×10^{-5} M and [Cu(II)] = 3.0×10^{-6} M.

Tiron 농도를 5.0×10^{-5} M로 고정시키고 일정한 EDTA 농도 범위(1.0×10^{-7} M~ 1.0×10^{-6} M)내에서 Cu(II) 농도를 6.0×10^{-5} M~ 6.0×10^{-7} M로 변화시키며 EDTA 검정곡선을 얻어보았는데 Cu(II)의 농도가 3.0×10^{-6} M 일 때 감도가 가장 크게 나타났다.

Cu(II)-tiron 착물과 EDTA가 반응해서 Cu(II)-EDTA를 안정하고 정량적으로 그리고 빠르게 형성시키기 위한 온도와 가열 시간에 대해 조사해 보았다. 20 °C~80 °C 범위의 여러 온도에서 30분간 물증탕하여 형광세기의 감도를 조사하였더니 80 °C에서 가장 감도가 좋은 것으로 나타났다. 그리고 80 °C에서 여러 시간 동안(10분~90분) 가열하였더니 30분 이상의 거의 모든 시간에서 감도가 크게 나타났으며 이들의 차이는 별로 없었다.

미셀 용액내에서는 점도 증가로 인해 tiron의 소광 효과가 줄어들리라고 예상하지만, 미셀 용액내에서 더 안정한 착물을 형성하기 때문에 정적 소광이 증가하리라고도 예상된다. 음이온성으로는 sodium dodecylsulfate, 양이온성으로는 cetyltrimethylammonium bromide, 그리고 비이온성으로서 tween 80, tiron X-100의 미셀 매질에서 감도가 어떻게 되는 지를 알아보고, 계면활성제를 넣지 않은 것과 비교해 보았다. 계면활성제가 들어있을 때나 들어있지 않을 때에도 감도의 차이가 거의 없는 것으로 나타나 계면활성제를 넣지 않고 실험하였다.

시료 용액에 들어있는 산소의 영향도 조사하여 보았는데 산소를 제거하기 위해 N₂기체를 주입하였을 때와 주입하지 않았을 때의 형광 세기의 감도 차이가 거의 없었다. 따라서 형광을 측정하기 전에 시료에 질소 기체를 주입하지 않았다.

Table 1. Tolerance limits of interfering species for the determination of EDTA (6.0×10^{-7} M) in 3.0×10^{-6} M Cu(II) and 5.0×10^{-5} M tiron solution

| Molar ratio ^b | Interfering species |
|--------------------------|---|
| 500 | Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , F ⁻ , NO ₃ ⁻ , HCO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , SO ₄ ²⁻ |
| 200 | Mg ²⁺ , oxalate |
| 100 | Co ²⁺ , tartrate, citrate |
| 50 | HPO ₄ ²⁻ |
| 30 | Pb ²⁺ |
| 10 | Al ³⁺ |
| 3 | Fe ³⁺ |

^aTolerance limit is the maximum concentration in which there is less than 3% effect on fluorescent intensity.

^bMolar ratio of interfering species to EDTA.

Table 2. Characteristics of calibration curve of EDTA

| | |
|-----------------------------|--|
| Linear range (M) | 8.0×10^{-8} – 2.0×10^{-6} |
| Regression equation | $2.71 (\pm 0.06) \times 10^8 x + 26.49 (\pm 1.53)$ |
| Correlation coefficient (r) | 0.9965 |
| Detection limit | 5.2×10^{-8} M (= 19.3 ng EDTA/mL) |

3.2. 방해효과

EDTA 또는 tiron과 착물을 잘 형성하는 금속이온들 그리고 Cu(II) 착물을 이루는 이온들 그리고 실제 시료에 많이 존재하리라고 예상되는 여러 이온들에 의한 방해효과를 조사하여 이를 Table 1에 나타내었다. 방해이온 효과를 알아보기 위해 tiron의 농도가 5.0×10^{-5} M, Cu(II)의 농도가 3.0×10^{-6} M 그리고 EDTA의 농도가 6.0×10^{-7} M인 용액에 여러 화학종들을 EDTA의 몰수에 비해 1, 3, 5, 10, 30, 50, 100, 200 및 500배로 넣어 주고 tiron의 형광 세기를 측정하였다. Fe(III)가 가장 방해가 심했는데 이는 EDTA가 Cu(II)-tiron의 Cu(II)와 반응하여 tiron을 유리시켜야 하는데 EDTA가 Fe(III)와 더 먼저 결합하기 때문인 것으로 예상된다. 그러나 실제시료로 사용하는 마요네즈, 가루세제 및 클렌징 크림에는 Fe(III)를 비롯한 금속 양이온이 거의 들어있지 않으므로 이런 시료를 분석할 때는 이 방해효과는 나타나지 않으리라고 예상된다. 실제로 검정곡선법으로 얻은 결과나 표준물 첨가법으로 얻은 결과가 95% 신뢰수준에서 차이가 없으므로(Table 3) 방해효과가 없다고 할 수 있다.

3.3. 실제시료에의 응용

최적 조건에서 EDTA의 검정곡선을 그렸으며 그의 성능계수를 Table 2에 적어 놓았다. 검출한계와 직선성이 매우 좋은 것으로 나타났다. 본 분석방법을 이용하여 실제시료인 마요네즈, 가루세제 및 클렌징 크림에 들어있는 EDTA 농도를 검정곡선법으로 측정하였고, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 또한 이 시료들에 들어있는 EDTA의 양을 표준물 첨가법을 이용하여 얻은 측정값과 비교하였다. 표준물 첨가법으로 얻은 결과와 본 분석방법에 의한 결과가 약 4%이내의 상대오차를 보였지만 이들 모두 Student's t 시험법¹⁵에 적용한 결과 95% 신뢰수준에서 $t_{계산}$ 가 Student's t 표에 있는 값(2.571)보다 작았기 때문에 차이가 없다고 할 수 있었다. 또한 여러 시료에서 회수율은 약 93% 이상이였으며, 상대표준편차는 4.5% 이내의 비교적 재현성있는 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 본 연구에서의 분석방법은 실제 시료에 들어있는 ng/mL 수준의 EDTA를 정량하는데 이용할 수 있을 것으로 예상되었다.

4. 결 론

EDTA가 들어있는 시료에 tiron과 Cu(II)를 가하여 분광형광법으로 EDTA를 정량할 수 있는 방법을 개발하였다. 본 실험을 이용하여 실제시료인 마요네즈, 가루비누 및 클렌징 크림에 들어 있는 EDTA를 ng/mL 까지도 정량할 수 있었다.

Table 3. Determination and recovery yields of EDTA in real samples

| Samples | Spiked ($\mu\text{g/g}$) | Found ($\mu\text{g/g}$) ($\bar{x} \pm s$) | | Recovery (%) |
|------------------|----------------------------|---|---------------------------------------|--------------|
| | | This method ^a | Standard addition method ^b | |
| Mayonnaise | 0 | 102.4 (± 4.6) | | |
| | 30.0 | 130.3 (± 5.2) | 106.5 (± 5.1) | 93.0 |
| | 60.0 | 158.0 (± 4.9) | | 92.7 |
| Powder detergent | 0 | 249.4 (± 8.4) | | |
| | 30.0 | 279.2 (± 8.2) | 243.6 (± 6.4) | 99.3 |
| | 60.0 | 305.2 (± 9.9) | | 93.0 |
| Cleansing cream | 0 | 172.2 (± 5.4) | | |
| | 30.0 | 201.0 (± 6.1) | 168.4 (± 7.1) | 96.0 |
| | 60.0 | 229.0 (± 6.3) | | 96.2 |

^aThe mean values were obtained from five replicate samples.

^bThe mean values were obtained from three determinations.

참고문헌

1. L. Katata, V. Nagaraju and A. M. Crouch, *Anal. Chim. Acta*, **579**, 177-184 (2006).
2. A. A. Krokidis, M. C. Megoulas and M. A. Koupparis, *Anal. Chim. Acta*, **535**, 57-63 (2005).
3. R. Parkash, R. Bansal, S. K. Rehani and S. Dixit, *Talanta*, **46**, 1573-1576 (1998).
4. A. M. G. Campaa, F. A. Barrero and M. R. Ceba, *Anal. Chim. Acta*, **329**, 319-325 (1996).
5. J. B. Quintana and T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A*, **1145**, 110-117 (2007).
6. H. Lee, T. E. Peart and K. L. E. Kaiser, *J. Chromatogr. A*, **738**, 91-99 (1996).
7. C. E. Cagnasso, L. B. Lopez, V. G. Todriguez and M. E. Valencia, *J. Food. Compos. Anal.*, **20**, 248-251 (2007).
8. K. Gl, M. Hugl, S. Demirci-eki and R. Apak, *Talanta*, **53**, 213-222 (2000).
9. F. Belal, F. A. Aly, M. I. Walash and A. O. Mesbah, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**, 1249-1256 (1998).
10. M. Grabarezyk, *Electrochim. Acta*, **51**, 2333-2337 (2006).
11. C. Zhao, Y. Pan, Y. Su, Z. Zhang, Z. Guo and L. Sun, *Water Res.*, **37**, 4270-4274 (2003).
12. H. Kim and H. Choi, *Talanta*, **55**, 163-169 (2001).
13. J. A. Dean, "Lange's Handbook of Chemistry", 15th Ed., 8.93 McGraw-Hill, U.S.A., 1999.
14. T. I. Tikhomirova, S. S. Kubyshev, A. V. Ivanov and P. N. Nesterenko, *Russ. J. Phys. Chem. A*, **83**, 1208-1211 (2009).
15. D. C. Harris, "Quantitative Chemical Analysis", 7th Ed., 60, W. H. Freeman, U.S.A., 2007.