

RP-HPLC (*Reverse phase-high performance
liquid chromatography*)



Introduction

- # 역상 크로마토그래피 : 비극성의 고정상과 극성의 이동상을 사용하는 HPLC 모드의 총칭.
- # 장점 : 사용하기 쉽고 효율, 칼럼의 안정성이 높고 정확도와 정밀도, 분리의 재현성이 높음.
- # 비극성 내지는 약한 극성의 화합물 분리에 적합.
- # 생화학, 의화학분야에서 널리 응용.

Mobile phase

- # 역상 HPLC에서 가장 중요한 인자.
- # 이동상이 화합물의 체류시간에 영향을 주므로 적절한 선택이 필요.
- # 이동상은 시료를 칼럼 속으로 통과하도록 해준다 (HPLC용은 순도가 높아야 함).
- # 가격, 비점, 점도 등을 고려.
- # 일반적으로 아세토나이트릴, 메탄올, 물이 사용됨.



Fig. 1. Mobile phase used in reverse phase HPLC.

Table 1. Properties of solvent in reverse phase HPLC

	분자량	비점 (°C)	n_D^{25}	UV ^{b)} (nm)	$\rho^{c)}$ (gcm ⁻³)	$\eta^{d)}$ (cP)	$\epsilon^{e)}$	$\mu^f)$ (Debye)	$\gamma^g)$ (dyn cm ⁻¹)	$E^h)$
acetone ^{d)}	58.1	56	1.357	330	0.791	0.332	20.7	2.72	23	0.56
acetonitrile	41.0	82	1.342	190	0.787	0.358	38.8	3.37	29	0.65
dioxane	88.1	101	1.420	215	1.034	1.26	2.21	0.45	33	0.56
ethanol	46.1	78	1.359	205	0.789	1.19	24.5	1.68	22	0.88
methanol	32.0	65	1.326	205	0.792	0.584	32.7	1.66	22	0.95
isopropanol	60.1	82	1.375	205	0.785	2.39	19.9	1.68	21	0.32
n-propanol	60.1	97	1.383	205	0.804	2.20	20.3	1.65	23	0.82
tetrahydrofuran	72.1	66	1.404	210	0.889	0.51	7.58	1.70	27.6	0.45
물	18.0	100	1.333	170	0.998	1.00	78.5	1.84	73	

a) 25°C에 있어서 굴절률.

b) UV 컷오프 (cut off) : 1cm 두께의 순수한 시료의 광학밀도가 공기에 대하여 측정된 시기, 일정하게 되는 파장.

c) 20°C에 있어서의 밀도.

d) 20°C에 있어서의 점도.

e) 유전율.

f) 쌍극자 모멘트.

g) 표면장력.

h) Snyder⁴⁵⁾에 의해 얻어진 알루미나 (alumina)에서의 용리특성치.

i) UV 검출기를 사용하는 것에는 부적당.

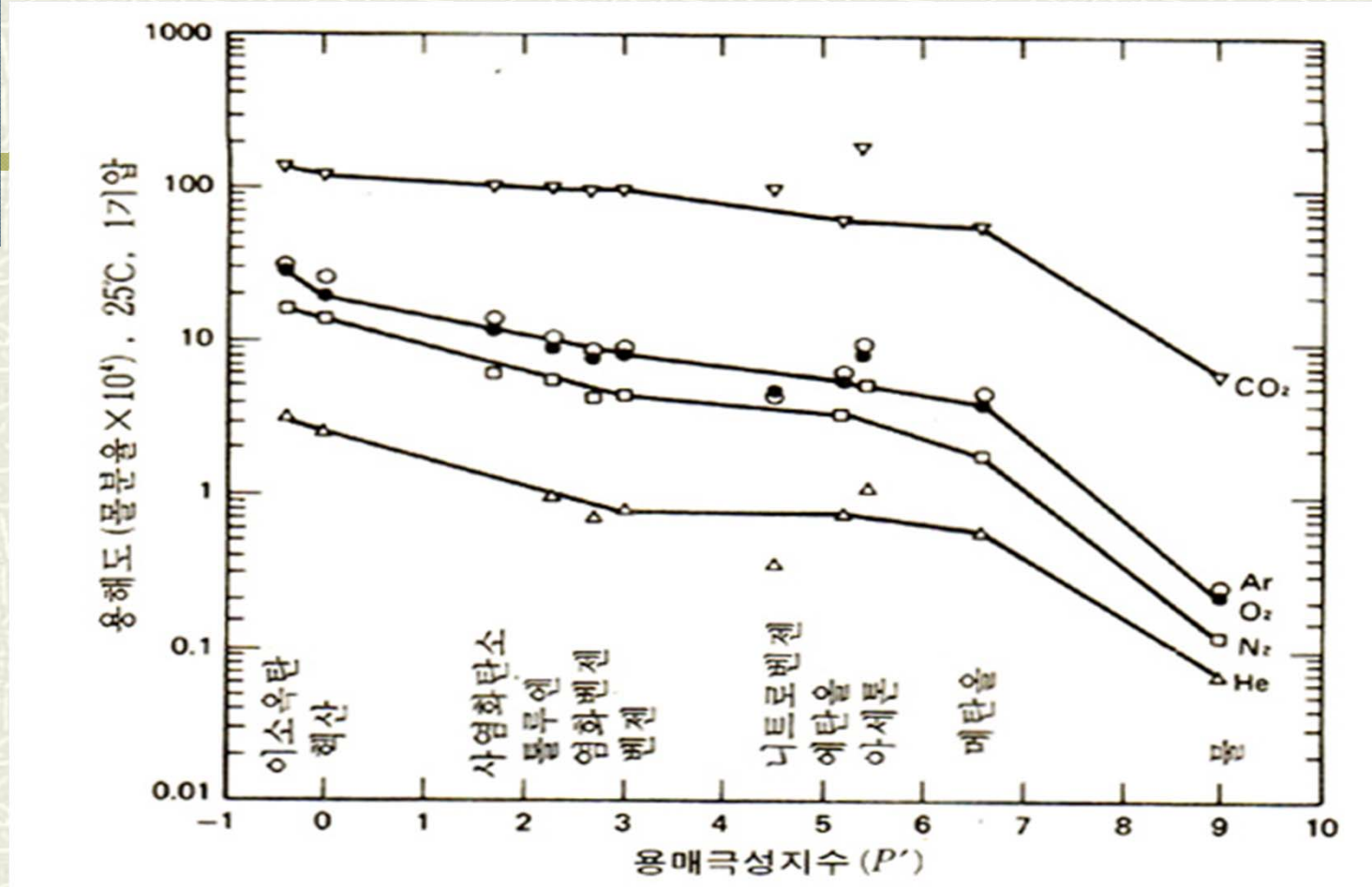


Fig. 2. Solubility of gas at different polarity index. (at 25°C, 1atm)

Equipment

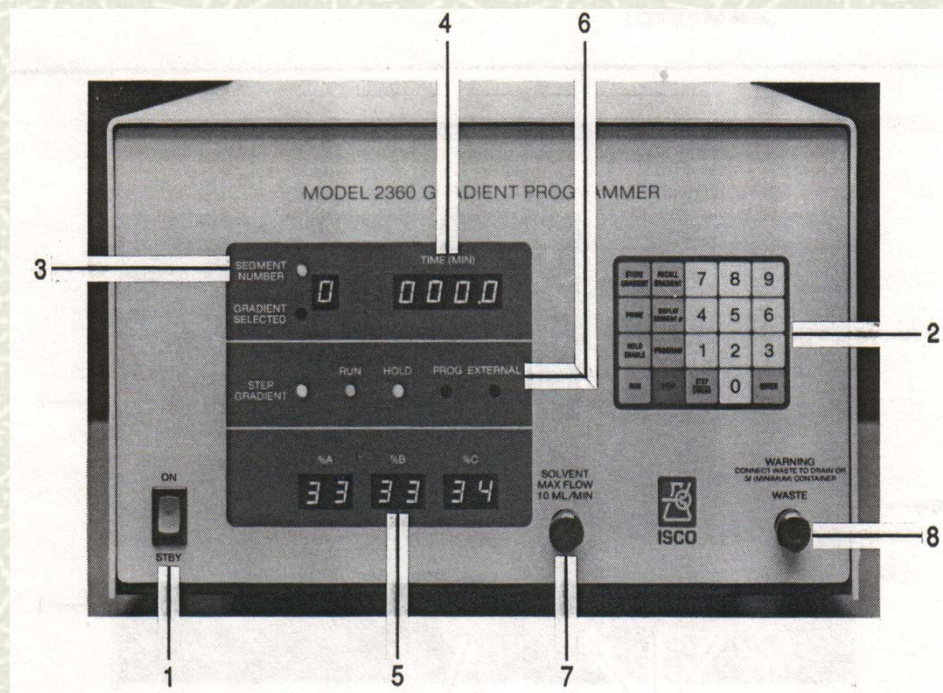
1. Column (칼럼)

- ✦ 보통 Octadecyl 관능기 부착된 실리카 고정상이 채워져 있으며 분리 용도에 따라 다양한 길이와 직경을 갖는다. 보통 길이가 10~30cm, 직경이 5 mm 정도임.
- ✓ 고압에서 사용하도록 스테인레스 재질임.
- ✓ 보통 물과 유기 용매를 혼합한 용액에 시료를 용해하여 칼럼에 주입함.

2. Pump (펌프)

- ✓ 칼럼 속으로 용매를 고압으로 밀어줌.
- ✓ 광범위한 시료를 분석하므로 화학적으로 불활성이어야 하고 Pulse가 없어야 함.
- ✓ 압력 범위 : 1~5000psi
- ✓ 분석칼럼의 유속은 분당 0.5~2ml 범위가 적당함.

3. Gradient programmer



1. On/Off
2. Numbers
3. Section
4. Time(minute)
5. Gradient(%)

Fig. 3. Front panel of gradient former.

4. Injector (시료 주입기)

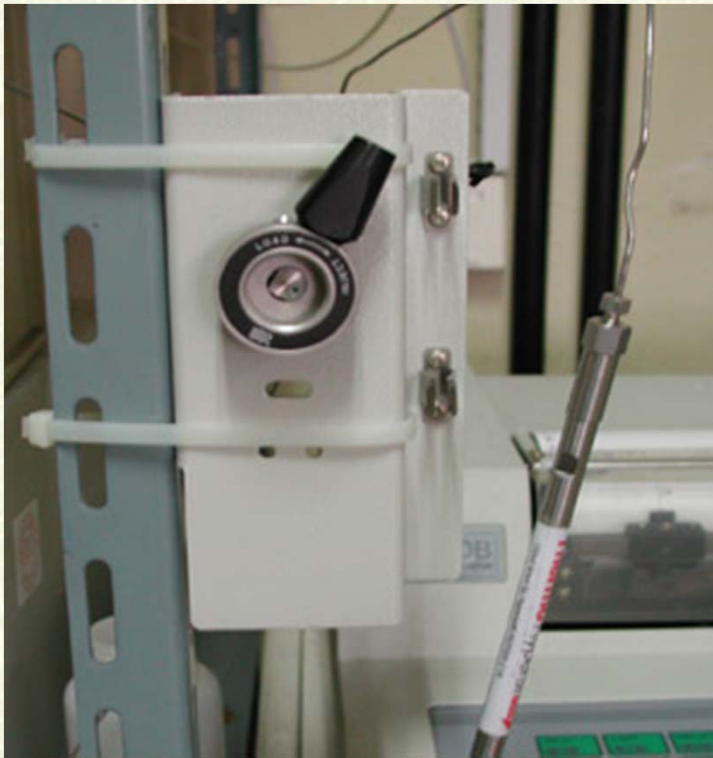


Fig. 4. Sample injector.

5. Detector (검출기)



Fig. 5. Front of the detector.

6. Recorder (기록계)



Fig. 6. Shape of recorder.

Experimental

- # 필요한 시료와 사용할 이동상을 준비한다.
(실험할 때마다 새로 준비하여 사용)
- # 유속을 조절하고 시료를 주입하기 전 약 15분 정도 이동상을 흘려 보내주어 안정화를 시킨다.
- # 안정화 후 검출기의 흡광도 값이 일정하게 유지 되면 auto zero로 0점을 맞춘다.
- # 시료를 주입한 후 peak가 나타나면 기록계로 기록하고 출력한 데이터를 해석한다.



Fig.7. Membrane filtration device.

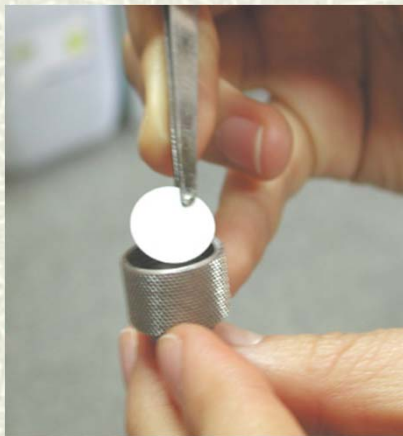


Fig. 8. filter assembly.



Fig. 9. Sample filtering.

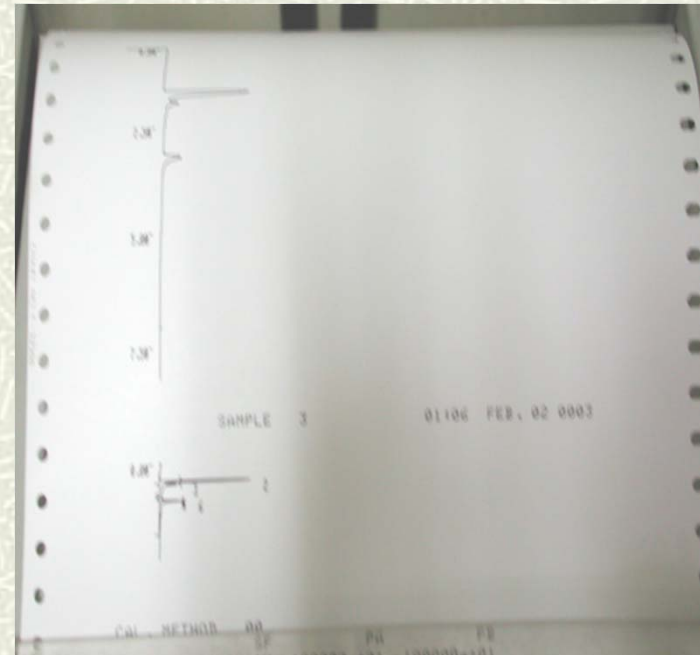


Fig. 10. Sample injection and recorded peaks.

HPLC Data Analysis

- ⌘ 주입한 단백질의 용출 시간을 통해서 단백질의 정성적인 분석을 할 수 있다.

정성적 분석: 표준단백질의 체류시간과 비교하여 동일성 확인

- ⌘ Peak의 면적을 비교하여 정량 분석가능.
- ⌘ 정량분석은 표준품의 단백질 농도를 미리 확인하여 실험