

RP-HPLC에서 메탄올의 농도에 따른 물질의 용량계수

소명섭, 이주원, 정용안, 노경호
 인하대학교 화학공학과,

Capacity Factors of Samples
 with Methanol Concentrations in RP-HPLC

Myoung Seup So, Ju Weon Lee, Yong An Jung, Kyung Ho Row
 Dept. of Chem. Eng., Inha University

서론

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에서 용질에 대한 정확한 mechanism은 그동안 많은 연구가 이루어졌다[1-2]. 이러한 mechanism을 이해함으로써 역상 액체 크로마토그래피에서 용질의 관내 체류시간과 hydrophobic character를 예상할 수 있다. 액체 크로마토그래피에서 이동상의 조성은 시료의 관내 체류의 관계에 대해서 가장 중요한 영향을 미치기 때문에 이동상 혼합물의 극성에 대한 연구는 매우 가치가 있으며, 이는 chromatographic strength를 측정하는데 유용하다.

그러나 현재까지 역상 고성능 액체 크로마토그래피의 조건에서 용질에 대한 크로마토그래피 관내에서의 체류에 관한 정확한 이론은 아직 이루어지지 않았다. 현재까지 주로 용질의 크로마토그래피 관내에서의 거동에 대한 정성적인 예측에 국한하였다. 게다가 제안된 여러 관계식들은 물리적인 중요성뿐만 아니라 실제적인 응용의 범위가 매우 협소하다. 본 논문에서는 기존에 널리 사용하고 있는 두 개의 관계식과 본 연구에서 제안한 두 개의 관계식을 비교할 것이다.

사용한 물질은 deoxyribonucleosides로서 DNA를 구성하는 중요한 성분이고 생존하는 모든 생물에 중요한 역할을 한다. 이들 물질은 강력한 생리화학적 효과를 가지고 있다. 최근에는 HPLC를 이용하여 DNA fragments를 정제하거나 분리하는 기술이 상당히 발전하였다. Capacity factor와 이동상의 조성간의 보다 정확한 관계를 규명하는 것이 본 논문의 목적이다.

방법

RP-HPLC에서 retention에 대한 기존의 관계식은 아래와 같다[3].

$$\log k' = \log k'_w - S \cdot F \quad (1)$$

여기서 k' 은 용질의 capacity factor이고 k'_w 는 100% water를 이동상으로 사용했을 때 capacity factor로 외삽법에 의해 구해지며 F 는 이동상에서 유기용매의 부피조성(%)이고 S 는 주어진 용질과 이동상에서의 상수이다. 여러 논문에서 식 (1)에 대한 타당성을 밝혔으며 실험적 오차도 크지 않음을 보여주고 있다[3-4].

식 (1)에서 slope와 intercept value는 용질의 hydrophobic character의 정도로 간주할 수 있다. 100% water를 이동상으로 사용했을때의 capacity factor(k'_w)가 chromatographic retention을 측정하는데 가장 유용하며, 생물학적 system에서 용질의 hydrophobicity에 대한 좋은 지표가 된다고 한다[1].

그러나 일부에서 HPLC에서 deoxyuridine과 nucleoside 유도체의 거동과 메탄올 농도에 따른 $\log k'$ 의 의존성이 연구되어져 왔으나[5], 이전의 연구는 식 (1)에

의한 외삽법으로 k'_w 를 구했고, 유기용매의 조성이 10% 이상이었다. 따라서, 용질의 hydrophobic properties를 결정하는데 중요한 $\log k'_w$ 는 deoxynucleosides에 대하여 정확하지 않을 수 있다. 따라서 보다 넓은 범위에서 적용되는 관계식이 필요하며 아래와 같은 4 가지의 관계식을 이용하여 용질의 관내 거동을 관찰하였다.

- ① $\log k' = \log k'_w - S \cdot F$
- ② $\log k' = H + K \cdot \log(1/F)$
- ③ $k' = A + B(1/F)$
- ④ $k' = CF^2 + DF + E$

실험

본 실험에서 사용되는 5가지의 시료는 thymidine($C_{10}H_{14}N_2O_5$, dThd), 2'-deoxyuridine($C_9H_{12}N_2O_5$, dUrd), 2'-deoxyadenosine($C_{10}H_{13}N_5O_3$, dAdo), 2'-deoxycytidine($C_9H_{13}N_3O_4$, dCyd), 2'-deoxyguanosine($C_{10}H_{13}N_5O_4$, dGuo)이고 모든 시료는 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, HPLC-grade의 물을 사용하여 1000ppm의 저장 용액을 만들고 50ppm으로 희석시켜 사용하였다. 이동상으로 쓰이는 HPLC-grade의 water, methanol은 Baker(Phillipsburg NJ, U.S.A.)에서 구입하였다.

HPLC는 Waters사의 600E pump(multisolvent delivery system), 486 detector(UV-visible tunable wavelength absorbance), U6K injector(2ml sample loop)를 사용하였고 data acquisition system은 CHROMATE(V. 2.1, Interface Eng.)를 PC에 설치하여 사용하였다. 본 실험에서 column은 Waters사의 μ -Bondapak C_{18} (10 μ m particle size)을 사용하였다.

실험에 사용된 유기용매는 methanol이고 0~30%(v/v)이다. 이동상의 모든 용매는 vacuum pump (Division of Millipore, Waters)와 filter(HA-0.45 μ m, FH-0.5 μ m)를 이용하여 vacuum filtering을 한 후에 사용하였다.

이동상 내에 잔존하는 air를 제거하기 위해 helium을 100psi의 압력으로 degassing하였다. Injection volume은 5 μ l이고 이동상의 유량은 1ml/min이다. UV detector의 wavelength는 254nm로 고정하였다. 모든 실험은 상온에서 행하였다.

Capacity factor(k')는

$$k' = \frac{t_i - t_0}{t_0} \tag{2}$$

여기서 dead volume(t_0)는 methanol 20 μ l를 주입하여 실험적으로 구하였으며 3.0ml로 하였다.

결과 및 토론

임의의 크로마토그래피 관내에서 이동상의 조성은 용질의 체류시간을 결정한다. 일반적으로 RP-HPLC에서 $\log k'$ 와 이동상내의 유기용매에 대한 부피분율(F)과의 관계는 선형적으로 가정한다[2]. 용질의 크로마토그래피 체류에 대한 표현식은 매우 중요하며 실험 data를 체계화하는데 유용하다. 이동상 내에서 capacity factor와 유기용매의 양은 생물학적, 환경 및 식품관련 용질에 대한 소수성의 척도로 간주될 수 있다. 더우기 gradient에 대한 최적 조건들은 이러한 용질들이 크로마토그래피 관내에서 이동에 관한 정확한 capacity factor에 의해서 얻어질 수 있다.

Nucleoside의 retention은 semi-logarithmic relationship에서 유기용매(methanol,

acetonitrile, IPA 등)의 증가에 따라 감소한다. 유기용매의 농도는 nucleoside의 partition distribution을 변화시킨다. 즉, C18 phase에서 nucleoside의 hydrophobic interaction과 이동상에서 nucleoside의 용해작용을 변화시킨다.

흡착 또는 탈착공정에서 열역학적 및 속도론적인 면에서 nucleoside에 대해서 chromatographic column 내에서의 거동을 완전히 구체적으로 적용할 수 있는 model의 개발이 아직 미제로 남아있다. 이러한 이유 때문에 ①, ②, ③, ④의 식을 사용하여 $\log k'$ 와 이동상 조성에 대한 관계식을 실험적으로 근사화 하였다.

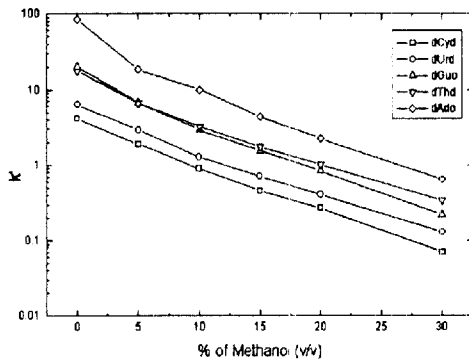


Fig. 1. Effect of different compositions of methanol on k'

(Injection volume: $5\mu l$,
Concentration: $50\mu g/ml$,
Flow rate : 1ml/min)

Fig. 1에서는 5 개의 deoxyribonucleosides의 capacity factor와 이동상내의 methanol 함량에 따른 실험적인 관계를 보여주고 있다. Methanol의 함량이 많아짐에 따라서 각 물질의 체류시간이 감소하였다.

Table 1에서는 5 가지 시료에 대한 유기용매인 methanol의 농도(0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%)가 위의 4 개의 관계식에 얼마나 잘 적용되는가를 r^2 의 항으로 나타내었다. r^2 의 정의는 다음과 같다.

$$r^2 = \frac{[\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{[\sum (x_i - \bar{x})^2] [\sum (y_i - \bar{y})^2]}$$

Table 1. r^2 of Samples with different models

Samples	Models	r^2			
		①	②	③	④
dCyd		0.99770	0.93787	0.99653	0.97884
dUrd		0.99331	0.95947	0.99994	0.96624
dGuo		0.99773	0.94528	0.99922	0.97323
dThd		0.99017	0.96834	0.99990	0.96581
dAdo		0.99628	0.94969	0.99970	0.96686

Table 1에서 보는 바와 같이 ③식의 r^2 가 1에 가장 근접함을 알 수 있다. ③의 식은 ①, ②, ④식과는 달리 관내에서 이동상과 용질이 고정상과의 친화력에 따라 체류시간이 결정되기 때문에 Langmuir 흡착식이 적용된 형태이다.

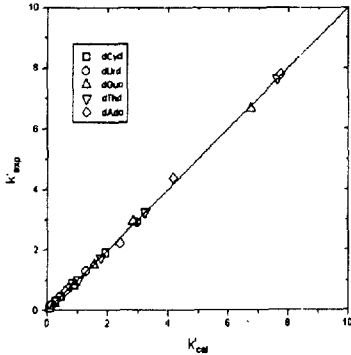


Fig. 2 Comparison of k'_{exp} and k'_{cal} from Eq. ③ with 5 deoxyribonucleosides

Fig. 2에서는 k_{exp} 와 ③식에 의한 k_{cal} 의 값을 비교한 것으로 매우 잘 일치하고 있음을 보여주고 있다.

참고문헌

1. Dorsey, J. G. and Khaledi, M. G. : J. Chromatogr., **656**, 485 (1993).
2. Johnson, B. P., Khaledi, M. G. and Dorsey, J. G. : Anal. Chem., **58**, 2354 (1986).
3. Melander, W. R. and Horvath, Cs. : "High-Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives(Vol. 2)", Horvath, Cs., ed., Academic Press, New York, p.113 (1980).
4. Quarry, M. A., Grob, R. L. and Snyder, L. R. : J. Chromatogr., **285**, 19 (1984).
5. Valko, K., Fellegvari, I., Sagi, J. and Szemzo, A. : J. Liquid Chromatogr., **12**, 2103 (1989).