

RP-HPLC에서 이동상의 조성에 따른 Deoxyribonucleosides의 거동 특성

소명섭, I. A. Polunina*, A. V. Larin*, 노경호

인하대학교 화학공학과,

Institute of Physical Chemistry, Russian Academy of Science*

Chromatographic Behavior of Deoxyribonucleosides
on Different Compositions of Mobile Phase in RP-HPLC

Myoung Seup So, I. A. Polunina*, A. V. Larin*, Kyung Ho Row

Dept. of Chem. Eng., INHA University,

Institute of Physical Chemistry, Russian Academy of Science*

서론

High Performance Liquid Chromatography(HPLC)에서 용질에 대한 정확한 mechanism은 그 동안 많은 연구가 이루어졌다[1-2]. 이러한 mechanism을 이해함으로써 Reversed-Phase HPLC에서 용질의 retention과 hydrophobic character를 예상할 수 있다. Liquid chromatography에서 이동상의 조성은 시료와 retention의 관계에 대해서 가장 중요한 영향을 미치기 때문에, 이동상 혼합물의 극성에 대한 연구는 매우 가치가 있으며, 이는 chromatographic strength를 측정하는데 유용하다.

Deoxyribonucleosides는 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.

RP-HPLC에서 retention은 일반적으로 아래와 같은 관계를 가진다[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].

그 동안 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 정확지 않을 수 있다.

따라서, 본 논문의 목적은 이동상의 두 가지 유기용매(methanol과 acetonitrile) 조성에 따른 5가지 deoxyribonucleosides의 시료에 대해서 column내에서의 거동을 column efficiency와 capacity factor로서 조사하고, 이들에 대하여 hydrophobic parameters인 S 와 k'_w 를 보다 정확히 결정하는 것이다.

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, methanol, acetonitrile은 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 methanol과 acetonitrile이고 각기 0~30%(v/v), 0~12%(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. Chromatographic column의 efficiency는 number of theoretical plates(N)으로 나타내고 다음 식으로 계산하였다.

$$N = 5.54 \left(\frac{t_i}{w_{i, \frac{1}{2}}} \right)^2 \quad (2)$$

여기서 t_i 는 i component의 retention time, $w_{i, \frac{1}{2}}$ 은 peak height의 $\frac{1}{2}$ 지점에서 peak width이다. 또한 capacity factor(k')는

$$k' = \frac{t_i - t_0}{t_0} \quad (3)$$

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

결과 및 토론

Nucleoside의 retention은 semi-logarithmic relationship에서 두 유기용매의 증가에 따라 감소하였다. 유기용매의 농도는 nucleoside의 partition distribution을 변화시킨다. 즉, C_{18} phase에서 nucleoside의 hydrophobic interaction과 이동상에서 nucleoside의 용해작용을 변화시킨다.

Table 1에서는 5 가지 시료에 대한 유기용매인 methanol의 농도(0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%)가 column efficiency에 미치는 영향을 표시하였다. Methanol의 농도가 5% 이상에서는 농도의 변화에 따라 column efficiency의 변화가 실제적으로 없다. Methanol이 첨가되지 않은 100% water를 사용하는 경우에서 column efficiency가 낮은 것은 매우 긴 retention time과 broader peak width를 가지고 또한 chromatogram의 형태가 double peak이기 때문이다.

Table 1. Effect of Mobile Phase Composition on Number of Theoretical Plates (N)

Sample	Mobile Phase Composition(%)		N
	Water	Methanol	
dCyd dUrd dGuo dTld dAdo	100	0	1049 1336 1326 1485 1413
dCyd dUrd dGuo dTld dAdo	95	5	6027 5291 4042 4867 5656
dCyd dUrd dGuo dTld dAdo	90	10	5286 4142 6083 6274 4072
dCyd dUrd dGuo dTld dAdo	85	15	5575 5531 5792 4633 5637
dCyd dUrd dGuo dTld dAdo	80	20	5515 3968 4556 5142 6093
dCyd dUrd dGuo dTld dAdo	70	30	5801 4967 6118 4934 5713

100% water를 사용하는 것에서 부터 methanol 또는 acetonitrile의 유기용매를 첨가하여 용매의 조성이 변하게 되면 Figs. 1, 2에서 보는 바와 같이 유기용매의 증가에 따라 $\log k'$ 값이 선형적으로 감소하였다. 열역학적으로 이상적인 binary solvents mixture에 대해서 식 (1)은 실제적으로 적용이 된다. 그러나 methanol/water와 acetonitrile/water는 이상적인 용액이 아니기 때문에 실험적으로 측정되는 $\log k'$ 값들이 약간의 비선형성을 가질 수 있게 된다.

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 linear 와 quadratic equation을 사용하여 $\log k'$ 와 이동상 조성에 대한 관계식을 실험적으로 근사화 하였다.

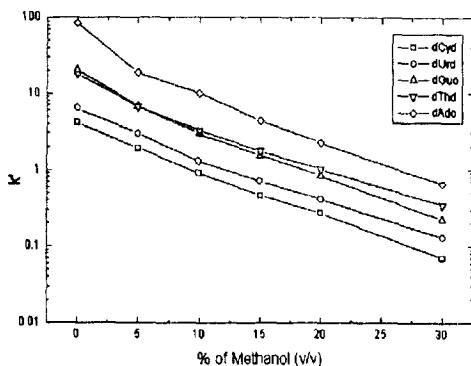


Fig. 1. Effect of different compositions of methanol on k'

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

임의의 deoxyribonucleoside에 대해서 $\log k'$ 와 유기용매에 대한 기울기는 methanol/water system에서 보다 acetonitrile/water에서 더 컸다(참조 Figs. 1, 2). 이는 methanol과는 달리 acetonitrile은 매우 약한 수소결합을 가진 용매이고 polarity는 methanol보다 작기 때문이다. $\log k'$ 와 유기용매 농도의 plot에서 기울기가 두 개의 유기용매에 대해서 서로 다르기 때문에 분리공정에서 고정상의 선정은 중요하다. 고정상이 실제로 "inert"하다면 각 기울기들은 같아야만 한다. 그러나 acetonitrile/water system에서 기울기가 더 큰 것은 이동상의 polarity가 작기 때문이다.

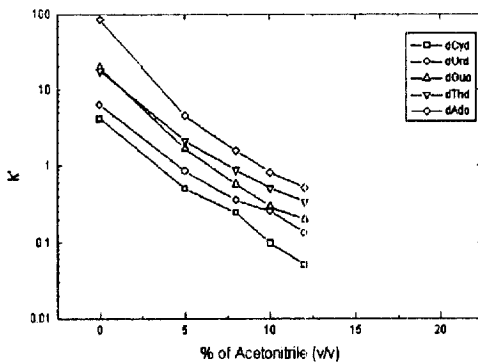


Fig. 2. Effect of different compositions of acetonitrile on k'

(same conditions as in Fig. 1)

알림

본 연구는 과학재단에서 지원하는 외국 과학자 초청 프로그램에 의하여 두 명의 러시아 과학자(I. A. Polunina와 A. V. Larin)와의 공동연구한 결과입니다.

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).