RP-HPLC에서 Deoxyribonucleosides를 분리하기 위한 최적 실험조건

소 명 섭, 박 영 광, 노 경 호, 정 성 택
인하대학교, 화학공학과

Optimum Experimental Conditions for Separating Deoxyribonucleosides in RP-HPLC

Myoung Seup So, Young Kwang Park, Kyung Ho Row, Sung Taik Chung
Dept. of Chem. Eng., Inha University

서론

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 분석 화학 분야에서 최근에 가장 편리하게 사용되는 장치이다. RNA와 DNA로 부터의 분해 산물인 modified nucleosides의 정성 및 정량과 관련한 분리에서 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)가 대표적으로 사용되고 있고, 이는 혐수의 핵산 유도체 혼합물(mixture of hydrophobic nucleic acid derivatives)분리에 있어서 매우 유용한 장치로 사용된다[1].

사용한 물질은 deoxyribonucleosides로서 DNA를 구성하는 중요한 성분이고 생존하는 모든 생물에 중요한 역할을 한다. 이들 물질은 강력한 생리학적인 효과를 가지고 있다. 최근에는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 DNA fragments를 정제하거나 분리하는 기술이 상당히 발전하였다[2,3]. 본 논문에서는 deoxyribonucleosides의 혼합물을 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 분리함에 있어서 최적의 조건을 구하는 것이 목적이다.

분리도

Deoxyribonucleosides 분리의 최적 실험조건을 구하기 위해서 이론적으로 여러 결정인자들을 사용하여야 한다. 본 연구에서는 그 중에서 물질이 주어진 조건에서 분리성능의 정도를 분리도(Resolution, R_{ij})로 나타내었으며 이는 다음과 같다.

$$R_{ij}=\frac{2\Delta t}{w_j+w_i}$$

여기서 Δt는 두 시료의 체류시간의 차이며, w_j와 w_i은 기준선에서 측정한 물질 j과 i의 peak widths이다. 단순히 두 물질의 체류시간의 차이가 크다고 높은 분리능을 갖는 것은 아니다. 체류시간의 차이가 크더라도 column efficiency가 낮은 경우는 좋은 분리능을 가질 수 없으며, 따라서 위의 식처럼 peak width와 체류시간으로 나타내는 것이 정확한 분리능을 판단할 수 있다. Table 1에서는 사용된 sample의 기호와 약어를 나타내고 있으며 column에서의 용출순서이다.

Table 1 Samples의 분리도 표현

i or *j*	Sample	Abbreviation
1	2'-Deoxycytidine	dCyd
2	2'-Deoxyuridine	dUrd
3	2'-Deoxyguanosine	dGuo
4	Thymidine	dThd
5	2'-Deoxyadenosine	dAdo

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 각각의 시료를 20ppm씩 만들어 이를 섞어 총100ppm의 혼합용액을 제조하여 사용하였다. 이동상으로 쓰이는 HPLC-grade의 water, methanol (MeOH), acetonitrile (ACN)은 Baker (Phillipsburg NJ, U.S.A)에서 구입하였다.

HPLC는 Waters사의 600E pump (multisolvent delivery system), 486 detector (UV-visible tunable wavelength absorbance), U6K injector (2㎖ sample loop)를 사용하였고 data acqusition system은 CHROMATE (V. 2.1, Interface Eng.)를 PC에 설치하여 사용하였다. 본 실험에서 column은 Waters사의 μ-Bondapak C_{18} (10㎛ particle size 3.9×300㎜)을 사용하였다.

실험에서 유기용매는 methanol과 acetonitrile을 사용했으며 이들을 3, 5, 8, 10%(v/v)에서 실험하였고, methanol과 acetonitrile을 동시에 사용하여 각각의 유기용매가 분리도에 미치는 영향을 살펴보았다. 또한 Potassium phosphate와 sodium borate, TADP(Tetreabutylammonium dihydrogen phosphate, 97%)등의 buffer를 사용하여 실험하였다. 이동상의 모든 용매는 vacuum pump (Division of Millipore, Waters)와 filter (HA-0.45㎛, FH-0.5㎛)를 이용하여 vacuum filtering을 한 후에 사용하였다.

이동상 내에 잔존하는 air를 제거하기 위해 helium을 100psi의 압력으로 탈기하였다. Injection volume은 5㎕이고 이동상의 유량은 0.5~2㎖/min이다. UV detector의 wavelength는 254㎚로 고정하였다. 모든 실험은 상온에서 행하였다.

결과 및 토론

Fig. 1에서와 같이 일정한 유속(1㎖/min)에서 유기용매의 조성이 증가할수록 분리도가 감소하는 경향을 보이고 있다. 특히 acetonitrile이 methanol에 비해 분리도에 더욱 큰 영향을 주고 있다. 물에 비해 상대적으로 column과 친화력이 우수한 유기용매에 의해 solute의 흡착면적의 감소로 인하여 전체적으로 체류시간의 감소를 가져오고 이로 인하여 분리도가 감소함을 알 수 있다. 또한 acetonitrile의 조성을 5% 모든 분리도가 1 이상이어서 최적의 조건이라고 할 수 있다.

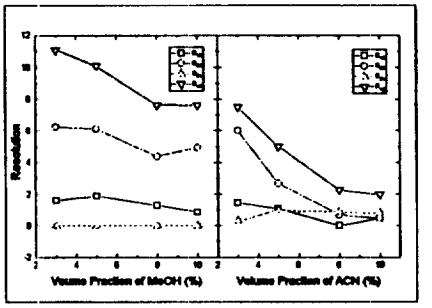

Fig. 1 Effect of volume fraction of organic modifier in mobile phase on resolution

그러나 일정 유기용매의 조성(%MeOH)에 대해 유속을 0.5~2.0㎖/min로 변화시켰을 때 분리도에 영향을 크게 주지 않음을 알 수 있다(Fig. 2). 본 실험에서 설정한 유속은 보통의 분석용 column에서의 유속이고 충분히 희석된 농도로 solute를 주입하기 때문에 모든 solutes가 충분히 고정상과 평형상태에 도달한다. 따라서 유속의 변화에 체류시간과 peak widths가 동시에 변하기 때문에 분리도에 미치는 영향이 매우 작았다.

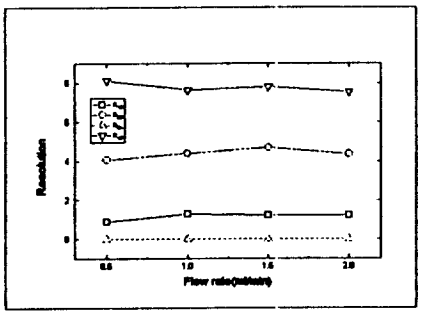

Fig. 2 Effect of flow rate on resolution

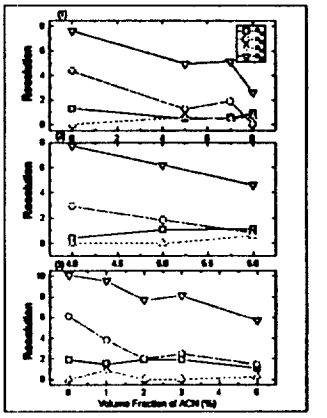

Fig. 3 Changes in resolution with different compositions of two organic modifiers at a constant fraction of water

이동상의 조성에서 물의 조성과 1.0㎖/min 유량을 고정시키고 methanol과 acetonitrile을 동시에 변화시킬 때 acetonitrile의 조성변화에 대한 분리도를 Fig. 3에 나타내었다. Acetonitrile의 조성이 증가하고 methanol의 조성이 감소할 때, R_{23}, R_{45}는 감소하는 경향을 나타내고 R_{12}, R_{34}는 영향을 받지않고 있다. 이는 solutes의 structure와 관계가 있고 QSAR(Quantitative Structure-Activity Relationships)의 측면에서 관심있는 고찰이 필요하다[4].

Buffer를 사용하지 않는 경우에서는 acetonitrile의 부피조성이 5%일때 최적의

분리조건이었고(Fig. 1) 이 조성에서 potassium phosphate, sodium borate 그리고 TADP를 buffer로 사용했는데, sodium borate를 사용했을때 전체적인 분리도가 향상되었다(Fig. 4). 또한 동일한 buffer solution의 부피분율에 대해 농도를 증가시켰을 때 분리도에 큰 영향을 주지않고 있다(Fig. 5).

따라서 20mM sodium borate solution에서 actetonitrile의 부피조성을 5%로 했을 때 최적의 분리조건을 얻을 수 있었다.

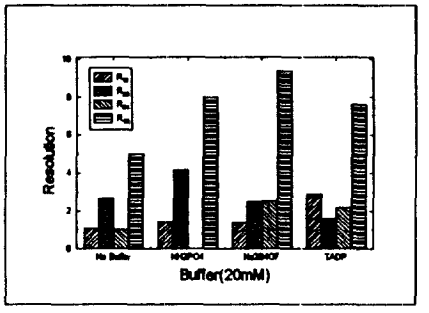

Fig. 4 Changes in resolution without/with types of chemical buffer in mobile phase

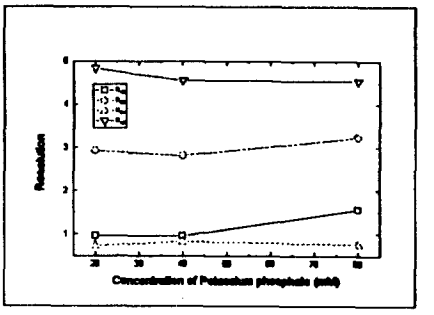

Fig. 5 Effect of concentrations of potassium phosphate on resolution

향후 좀더 많은 영역의 유속변화에 대한 column내에서의 거동과 이를 열역학적인 고찰이 필요하고, QSAR의 측면에서 분리도의 영향과 체류거동을 살펴보는것도 흥미있는 연구가 될 것으로 생각한다. 또한 이동상에서 buffer의 역할이 solute의 structure와의 관계도 중요한 연구과제이다.

감사

본 연구는 학술진흥재단(신진과제)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Ravanat, J. -L., Douki, T., Incardona, M. -F., and Cadet, J., J. Liq. Chromatogr., **16**, 3185 (1993).
2. Lee, Y. W., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A., and Larin, A. V., J. Liq. Chromatogr., **18**, 3077 (1995).
3. Kim, J. D., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A., and Larin, A. V., J. Liq. Chromatogr., **18**, 3091 (1995).
4. Braumann, T., J. Chromatogr., **373**, 191 (1986).