

## RP-HPLC에서 Deoxyribonucleosides를 분리하기 위한 이동상의 선택도와 구배용매조성법의 최적화

이주원 · 노경호<sup>†</sup>

인하대학교 화학공학과  
(1997년 5월 7일 접수, 1997년 7월 16일 채택)

## Optimization of Solvent Selectivity and Gradient Mode for Deoxyribonucleosides in RP-HPLC

Ju Weon Lee and Kyung Ho Row<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Inha University  
(Received 7 May 1997; accepted 16 July 1997)

### 요 약

RP-HPLC를 이용하여 데옥시리보뉴클레오사이드를 분리하기 위한 최적의 분리조건을 결정하기 위해서 물질의 용량 인자와 이동상의 조성에 관한 관계를 이용한 최적화 방법을 사용하였다. 이동상의 조성을 변화시키는 구배용매조성법에서 각 단계에서의 이동상의 조성과 gradient time을 이용한 관계식으로부터 정하였다. 본 연구에서는 이동상으로 물/메탄올, 물/아세트로나이트릴의 이성분계를 사용하였다. 세 가지 체류모델식에서 용량인자를 이용하여 단 이론으로부터 농도분포곡선을 예측하였다. 계산결과에 의하면 최적의 분리조건은 물/아세트로나이트릴로 된 이성분계의 이동상의 조성을 93/7(v/v)에서 5분 동안 유지시키고 이후 5분 동안 91/9로 선형적으로 변화시키는 것이다.

**Abstract**—To determine the separation condition for deoxyribonucleosides in RP-HPLC(Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography), the optimization method used was from the relationship of capacity factor and mobile phase composition. In gradient-elution mode by changing mobile phase compositions, the composition and gradient time were determined in stepwise and linear-gradient mode from the relationship. In this work, the binary systems of mobile phase(water/methanol, water/acetonitrile) were utilized. The elution profiles were calculated by the plate theory based on the three retention mechanism of capacity factor. The calculated results showed that in the optimum separation condition, the mobile phase of water/acetonitrile was maintained for 5 min as 93/7(v/v), then the composition was linearly changed to 91/9 for 5 min.

**Key words:** Solvent Selectivity, Gradient Mode, Optimization, Plate Theory, Deoxyribonucleosides

### 1. 서 론

크로마토그래피는 분리와 분석기술에서 가장 널리 사용되는 기술이다. 기체 크로마토그래피는 물질의 휘발성, 분자량, 처리량 등 많은 제약조건이 있기 때문에 물질의 분리 및 분석에서는 주로 액체 크로마토그래피가 사용된다. 액체크로마토그래피의 단점인 낮은 column 효율, 낮은 이동상의 유속으로 인한 긴 분석시간을 향상시키기 위하여 이동상을 높은 압력으로 밀어주는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)가 현재 널리 사용되고 있다. HPLC는 물질을 고순도로 분리할 수 있는 장점으로 taxol, phospholipid 등과 같은 의약품의 분리정제에 필수적으로 이용되고 있다.

크로마토그래피에서는 column내에서 이동상과 고정상에서의 체류시간이 물질마다 차이가 있기 때문에 분리가 가능하다. 이 체류시간은 통상적으로 column의 dead time을 고려하여 용량인자(capac-

ity factor)로 표시한다. 액체 크로마토그래피를 이용하여 복잡한 물질을 분리하는 경우 일정한 조성을 갖는 이동상에서 일정용매조성법(isocratic mode)으로 분리하는 것은 한계가 있다. 이에 대한 해결 방법으로 시간에 따라 이동상의 조성을 변화시키는 구배용매조성법(gradient mode)을 사용할 수 있다. 구배용매조성법의 효과는 고정상에 오래 체류하는 물질의 체류시간을 줄이는 것이다. 구배용매조성법의 장점은 다음과 같다. (1) 분석시간을 줄일 수 있다. (2) 각 물질의 분리도(resolution)를 향상시킬 수 있다. (3) 피크의 tailing을 줄여 피크의 모양이 향상된다. 그러나 구배용매조성법에서는 baseline이 일정하지 않기 때문에 정량분석을 하기 어렵다. 이전까지의 구배용매조성법을 이용한 분석에서는 시행착오로 최적의 분석 조건을 결정하였다. 일정용매조성법에서는 각 물질의 용량인자와 이동상에서 유기용매의 조성의 관계는 Snyder식으로 주로 표시된다[1, 2]. 그러나 구배용매조성법에서는 시간에 따라 이동상의 조성이 변하기 때

문에 용량인자도 변하게 된다. 그러므로 구배용매조성법에서 물질의 용량인자를 예측하기 위해서는 용량인자를 시간에 따른 함수로 표시하는 새로운 모델식을 결정해야 한다[3, 4]. Column내에서 물질이 일정한 이동상의 조성 즉 일정한 용량인자에서는 선형적으로 이동된다. 시간의 함수로 표시되는 용량인자를 적용함으로써 gradient mode에서 물질의 체류시간을 예측할 수 있다.

크로마토그래피에서 plate theory는 종류와 향류식 추출의 유사성을 기초로 두고 있다[5, 6]. 물질의 용량인자와 이론단수를 이용하여 각 물질에 대한 농도 분포곡선을 이 plate theory에 의해서 예측할 수 있다. Plate theory를 이용하여 계산된 농도분포곡선은 피크의 모양, 분리도의 계산, 분리의 범위, 그리고 분리된 피크에서 불순물의 양을 예측하는 것을 가능하게 한다.

크로마토그래피를 이용하여 물질을 분리하는 경우에는 우선 packing의 종류를 선정하고 분리도를 최대로 하기 위해서 관의 효율을 최소화하거나[7], 이동상의 조성을 최적화하는 것이다[8, 9]. 본 연구에서는 데옥시리보뉴클레오사이드를 분리하기 위한 최적분리조건을 얻기 위하여 구배용매조성법을 사용하였다. 이를 위해 각 물질의 용량인자를 유기용매의 함수로 구하여 구배용매조성법에서 선형 및 계단함수의 체류부피를 구하고 단 이론을 이용하여 예측된 농도분포곡선으로부터 최적의 분리조건을 제시하였다.

## 2. 이 론

### 2-1. 용량인자

이동상내의 단일 유기용매의 조성과 용량인자의 상관관계는 그동안 많은 연구가 이루어졌다[10]. 다음 세 가지의 관계식을 사용하여 일정용매조성법에서 용량인자를 이동상의 조성에 대해 예측할 수 있다.

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

$$k' = A - \frac{B}{F} \quad (2)$$

$$\log k' = C \cdot F^2 + D \cdot F + E \quad (3)$$

$k'$ 은 용량인자를 나타내며  $k'_w$ 는 이동상이 순수한 물일 때 물질의 용량인자이다.  $F$ 는 이동상내에 포함된 유기용매의 부피분율이다. 식 (1)-(3)은 역상 액체 크로마토그래피에서 이동상이 물과 단일 유기용매의 이성분계로 이루어져 있을 때에만 사용할 수 있다.

### 2-2. 구배용매조성법

구배용매조성법은 이동상의 조성을 선형적으로 변하게 하는 방법(linear-gradient mode)과 계단 함수로 급격하게 변하게 하는 방법(stepwise-gradient mode)이 주로 사용된다. 구배용매조성법에서 체류시간을 예측하기 위해 column내에서의 물질은 일정한 이동상의 조성 하에서는 일정한 속도를 가지고 이동한다고 가정한다. Fig. 1과 2에서와 같이 Y축은 column의 길이로서 물질이 이동하는 구간을 나타내며, X축은 column을 통과하여 지나가는 이동상의 부피를 나타낸다. 일정한 유속에서는 이동상의 부피를 시간으로 나타낼 수 있다. 구배용매조성법에서 용량인자를 구하기 위해서 다음과 같은 가정을 하였다. (1) column을 지나가는 물질은 순간적으로 평형상태로 유지된다. (2) 각각 다른 조성의 이동상은 column내에서 서로 섞이지 않고 이동한다. (3) 이동상의 조성이 변하면서 나중 이동상은 column내의 고정상과 순간적으로 평형에 도달한다.

Stepwise-gradient mode에서는 물질이 일정한 조성의 이동상에서 column을 통과할 때에 물질의 이동은 직선으로 나타내며, 즉 첫 번째 이동상의 조성에서는  $Y_1$ , 두 번째 이동상의 조성에서는  $Y_2$ 이다

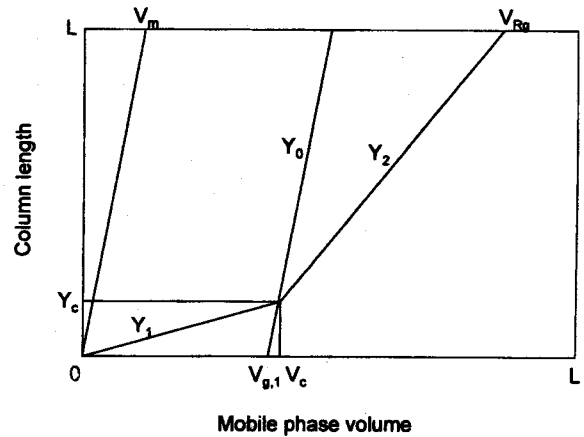


Fig. 1. Solute migration in stepwise-gradient mode.

(Fig. 1 참조). 이동 속도는 기울기로 다음과 같이  $a_1$ 으로 나타낸다.

$$a_1 = \frac{L}{V_m(1+k'_1)} V \quad (4)$$

$L$ 은 column의 길이이며  $V_m$ 는 dead volume,  $k'_1$ 은 첫 번째 이동상

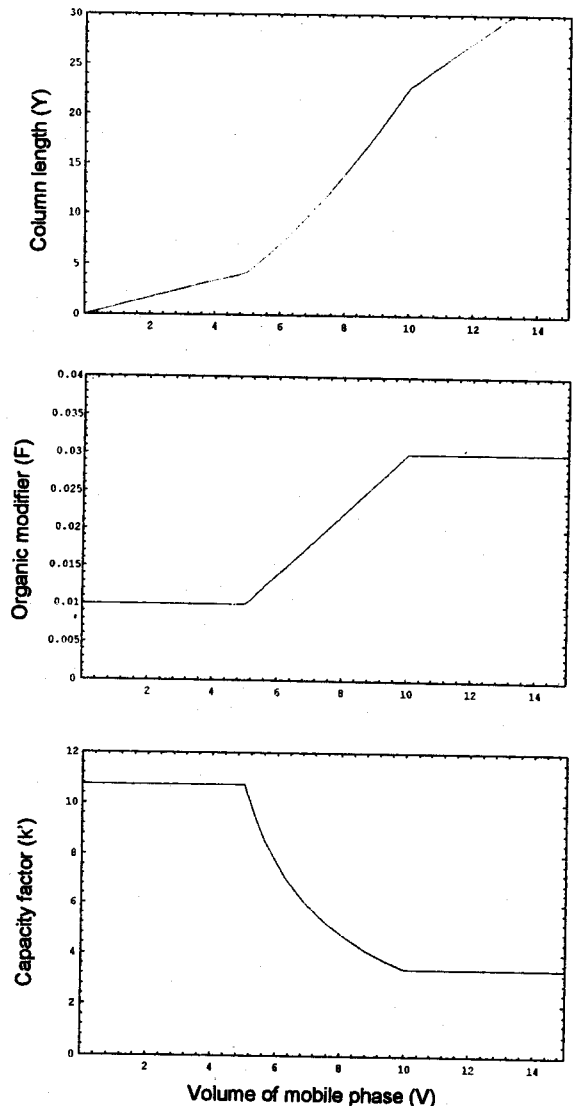


Fig. 2. Solute migration in linear-gradient mode using Eq. (2).

서의 물질의 용량인자이다. 첫 번째 이동상에서의 물질의 이동 거리에 관한 함수는 다음과 같이 나타낸다.

$$Y_1 = \frac{L}{V_m(1+k_1')} V \quad (5)$$

$V$ 는 column을 통과한 이동상의 부피이다. 두 번째 이동상이 stepwise로 변화하면 이동상의 이동 거리에 관한 함수는 다음과 같이 나타낸다.

$$Y_0 = \frac{L}{V_m} (V - V_{g,1}) \quad (6)$$

$V_{g,1}$ 는 두 번째 이동상이 column에 들어가기 시작할 때까지 첫 번째 이동상이 column을 통과한 부피이다. 식 (5)와 (6)의 교점에서 두 번째 이동상과 물질이 만나게 된다. 그러므로 물질의 용량인자가 바뀌므로 다른 기울기 즉 다른 속도로 column을 통과하게 된다. 이동상이 바뀌는 좌표의  $V_c$ 와  $Y_c$ 는 다음과 같다.

$$V_c = \frac{V_{g,1}(1+k_1')}{k_1'} \quad (7)$$

$$Y_c = \frac{V_{g,1}L}{V_m k_1'} \quad (8)$$

두 번째 이동상의 영역에서의 물질의 이동 거리를 표시한 함수  $Y_2$ 는 다음과 같이 나타낸다.

$$Y_2 = \frac{L}{V_m(1+k_2')} V + \frac{V_{g,1}L}{V_m k_1'} \left( \frac{k_2' - k_1'}{1+k_2'} \right) \quad (9)$$

$k_2'$ 는 두 번째 이동상에서의 물질의 용량인자이다. 두 개의 이동상을 사용하여 구배용매조성법을 행하였을 때, 물질의 체류부피는 식 (9)에서  $Y_2$ 값이 column의 길이일 때의  $V$ 의 값이고 다음과 같이 표시된다.

$$V_{Rg} = V_m(1+k_2') + V_{g,1} \left( \frac{k_1' - k_2'}{k_1'} \right) \quad (10)$$

$V_{Rg}$ 는 구배용매조성법에서 물질의 체류부피이다. 구배용매조성법에 대한 각각의 이동상에 대한 물질의 용량인자를 실험적으로 구하면 식 (10)을 이용하여 구배용매조성법에서의 물질의 체류부피를 알 수 있다.

Stepwise-gradient mode에서는 이동상의 조성이 비연속적으로 변하나 linear-gradient mode에서는 이동상의 조성이 연속적으로 변한다. Column내에서 조성이 서로 다른 이동상은 섞이지 않고 지나간다고 가정한다. 이동상에서 유기용매의 부피분율(F)을 column을 통과한 이동상의 부피에 대한 함수로 표시할 수 있으며 선형적이기 때문에 다음과 같이 표시할 수 있다[4].

$$F = \frac{F_2 - F_1}{V_{g,1} - V_{g,0}} (V - V_{g,0}) + F_1 \quad (11)$$

$F_1$ 과  $F_2$ 는 linear-gradient mode에서 시작과 끝에서의 이동상내의 유기용매의 부피분율이고  $V_{g,0}$ 와  $V_{g,1}$ 는 linear-gradient mode의 시작과 끝에서 column을 통과한 이동상의 부피이다. 위의 식은  $V_{g,0}$ 와  $V_{g,1}$  사이의 선형적 변화를 나타내고 있으며 0부터  $V_{g,0}$ 와  $V_{g,1}$ 이후의 조성은 각각  $F_1$ 과  $F_2$ 로 일정하다.

Linear-gradient mode에서는 일정 시간 동안 이동상이 선형적으로 변한다. 그러므로 column내에서 물질의 이동이 Fig. 2와 같이 step-

wise-gradient mode와는 다른 거동을 보인다. 이 그림은  $k'$ 가 식 (2)를 사용한 경우이다. 그러므로 용량인자와 유기용매의 부피분율(F)에 관한 식과 식 (11)을 이용하면 용량인자를 이동상의 부피(V)에 대한 함수로 나타낼 수 있다. 따라서 column내의 이동 거리에 대한 함수( $Y$ )를 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$Y_i = \frac{L}{V_m[1+k'(V)]} V \quad (12)$$

$Y_i$ 이 column의 길이(L)일 때  $V$ 에 대한 방정식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\frac{V}{V_m[1+k'(V)]} - 1 = 0 \quad (13)$$

다음 비선형 방정식의 해가 linear-gradient mode에서 물질의 체류부피( $V_{Rg}$ )가 된다.

### 2.3. Plate theory

Plate theory에 따르면 크로마토그래피용 column은 column의 길이를 이론단수로 나눈 단을 가지고 있는 plate column과 수학적으로 동일하다[11, 12]. 이동상이 단과 단을 연속적으로 통과할 때에는 평형상태가 유지된다는 가정을 사용한다. 각 단은 이론단(theoretical plate) 또는 평형단(equilibrium stage)으로서 동일한 이동상의 부피( $v_m$ )와 고정상의 부피( $v_s$ )를 포함하고 있다. 각 단과 단 사이의 물질 수지식으로부터 다음과 같은 결과식을 얻을 수 있다.

$$c_N = c_0 \sum_{i=N-r}^{N-1} \frac{(aV)^i}{i!} e^{-aV} \quad (14)$$

$c_N$ 은 N단에서 물질의 농도이고  $c_0$ 은 주입한 물질의 농도이다.  $a$ 는 평형상수(equilibrium constant, K)를 포함하는 상수로 다음과 같다.

$$a = \frac{1}{v_m + Kv_s} \quad (15)$$

$b$ 를 고정상의 부피( $v_s$ )에 대한 이동상의 부피( $v_m$ )의 비율로 나타내면 평형상수와 용량인자의 관계식은 다음과 같다.

$$k' = Kb \quad (16)$$

식 (11)과 (13)에서 구한 구배용매조성법에서 체류부피( $V_{Rg}$ )를 이용하여 용량인자를 다음 식에 의하여 구할 수 있다.

$$k' = \frac{V_{Rg} - V_m}{V_m} \quad (17)$$

평형상수와 이론단수를 식 (14)에 대입하여 구배용매조성법에서 물질의 농도분포곡선을 예측할 수 있다.

## 3. 실험

HPLC는 Waters사의 600E pump(multisolute delivery system), 486 UV absorbance detector, U6K injector(2 ml sample loop) data acquisition system은 CHROMATE(Ver. 2.1, Interface Eng)를 사용하였다. Chromatographic column은  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>(Waters, 10  $\mu$ m particle size, 3.9 mm  $\times$  300 mm)이다.

본 실험에서 사용된 다섯 가지의 물질은 deoxyribonucleosides로서 2-deoxycytidine(dCyd), 2-deoxyuridine(dUrd), 2-deoxyguanosine(dGuo), thymidine(dThd), 2-deoxyadenosine(dAdo)이고 모든 시료는 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, HPLC-grade의 물

을 사용하여 1000 ppm의 저장 용액을 만들고 50 ppm으로 희석하여 주입하였다. 이동상의 모든 용매는 vacuum filtering한 후 사용하였다. 이동상내에 잔존하는 공기를 제거하기 위해 헬륨을 이동상 저장 용기에서 100 ml/min으로 탈기하였다. 주입 부피는 5  $\mu$ l, 이동상의 유량은 1 ml/min, 그리고 검지기의 wavelength는 254 nm로 고정하였다. 모든 실험은 상온에서 행하였다. 용량인자를 이동상 조성의 함수로 나타내기 위해서 물을 기본으로 하고 유기용매인 메탄올은 일정용매조성법으로 5%에서 30%로, 아세토나이트릴은 5%에서 12%로 변화시키면서 용량인자를 계산하였다.

#### 4. 결과 및 고찰

각 물질의 용량인자를 이성분계의 이동상의 조성의 함수로 나타내기 위해서 각기 메탄올과 아세토나이트릴의 유기용매에 대해서 식 (1)-(3)과 회귀식을 이용하여 계산한 결과가 Table 1에 나타나 있다. Snyder가 제안한 식 (1), Langmuir 흡착식을 기본으로 Row 등이 제안한 식[13, 14], quadratic equation의 식 (3)에 대해서 실험적으로 측정된 용량인자와 매우 잘 일치하였다. 본 실험에서 사용한 대옥시리보뉴클레오사이드의 물질과 광범위한 유기용매의 조성에 대해서 모델식에 대해서는 참고문헌[10]에 언급하였다.

구배용매조성법을 사용하여 일정용매조성법보다 분리도와 분리시간을 향상시키기 위해서 Table 1에 있는 관계식을 사용하였고 stepwise-gradient mode와 linear-gradient mode에 대해서 각기 계산을 하였다. 분리도가 각기 물질에 대해서 2.0이상이고 이 중에서 가장 작은 분리시간을 갖는 구배용매조성법에서 이동상의 조성과 시간을 최적의 분리조건으로 정하였다. 단 구배용매조성법에서는 1번의 용매조성의 변화를 갖는 경우로 제한하였다. 분리도는 다음 식으로부터 계산하였다.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \frac{k'}{1 + k'} \quad (18)$$

N은 이론단수이고  $\alpha$ 는 선택도로서 두 물질의 용량인자의 비율로서 1보다 큰 값이다.

위의 분리조건을 만족하는 이성분계의 이동상의 조성과 시간에 대해서 계산된 결과가 Table 2, 3에서 볼 수 있다. Table 2는 stepwise-gradient mode에서 각기 모델식[식 (1)-(3)]에 대한 최적의 이동상의

Table 1. Empirical constants and regression coefficients in Eqs. (1)-(3)

| Organic modifier | Eq. | Material | Relationship                         | Regression coefficient |
|------------------|-----|----------|--------------------------------------|------------------------|
| MeOH             | (1) | dCyd     | $\log k' = 0.53 - 5.64F$             | 0.9977                 |
|                  |     | dUrd     | $\log k' = 0.67 - 5.27F$             | 0.9933                 |
|                  |     | dGuo     | $\log k' = 1.08 - 5.84F$             | 0.9977                 |
|                  |     | dThd     | $\log k' = 1.08 - 5.29F$             | 0.9902                 |
|                  |     | dAdo     | $\log k' = 1.51 - 5.74F$             | 0.9963                 |
|                  | (2) | dCyd     | $k' = -0.27 + 0.11/F$                | 0.9965                 |
|                  |     | dUrd     | $k' = -0.42 + 0.17/F$                | 0.9999                 |
|                  |     | dGuo     | $k' = -1.06 + 0.39/F$                | 0.9992                 |
|                  |     | dThd     | $k' = -1.17 + 0.44/F$                | 0.9999                 |
|                  |     | dAdo     | $k' = -2.96 + 1.07/F$                | 0.9997                 |
|                  | (3) | dCyd     | $\log k' = 1.39F^2 - 6.13F + 0.57$   | 0.9981                 |
|                  |     | dUrd     | $\log k' = 4.39F^2 - 6.83F + 0.77$   | 0.9976                 |
|                  |     | dGuo     | $\log k' = 2.54F^2 - 6.73F + 1.14$   | 0.9989                 |
|                  |     | dThd     | $\log k' = 6.13F^2 - 7.46F + 1.22$   | 0.9984                 |
|                  |     | dAdo     | $\log k' = 3.25F^2 - 6.89F + 1.59$   | 0.9983                 |
| ACN              | (1) | dCyd     | $\log k' = 0.48 - 14.62F$            | 0.9870                 |
|                  |     | dUrd     | $\log k' = 0.48 - 11.14F$            | 0.9875                 |
|                  |     | dGuo     | $\log k' = 0.86 - 13.45F$            | 0.9848                 |
|                  |     | dThd     | $\log k' = 0.88 - 11.48F$            | 0.9940                 |
|                  |     | dAdo     | $\log k' = 1.32 - 13.66F$            | 0.9916                 |
|                  | (2) | dCyd     | $k' = -0.28 + 0.04/F$                | 0.9932                 |
|                  |     | dUrd     | $k' = -0.37 + 0.06/F$                | 0.9952                 |
|                  |     | dGuo     | $k' = -0.98 + 0.13/F$                | 0.9878                 |
|                  |     | dThd     | $k' = -1.02 + 0.16/F$                | 0.9962                 |
|                  |     | dAdo     | $k' = -2.67 + 0.36/F$                | 0.9894                 |
|                  | (3) | dCyd     | $\log k' = -57.82F^2 - 4.87F + 0.10$ | 0.9949                 |
|                  |     | dUrd     | $\log k' = -4.17F^2 - 10.44F + 0.45$ | 0.9880                 |
|                  |     | dGuo     | $\log k' = 72.56F^2 - 25.69F + 1.33$ | 0.9975                 |
|                  |     | dThd     | $\log k' = 40.37F^2 - 18.30F + 1.14$ | 0.9996                 |
|                  |     | dAdo     | $\log k' = 56.61F^2 - 23.21F + 1.68$ | 0.9995                 |

조성과 분리도를 나타낸 것이다. 각 경우의 크로마토그램은 Fig. 3, 4 (a), (b), (c)에 나타나 있다. 용출 순서는 dCyd, dUrd, dGuo, dThd, dAdo 순서이며  $R_{12}$ 는 dCyd와 dUrd의 분리도,  $R_{45}$ 는 dThd와 dAdo의 분리도를 나타낸다. 메탄올과 아세토나이트릴의 유기용매에 대해서 극성이 작은 메탄올의 양이 보다 적게 사용되었다. 또한 첫 번째 이동상의 조성에서 stepwise gradient으로 6-7분이 경과한 후에 1-3%

Table 2. Optimum conditions and resolution in stepwise-gradient mode

| Fig. no.   | Eq. | Organic modifier | 1 <sup>st</sup> mobile phase(vol%) | Gradient time(min) | 2 <sup>nd</sup> mobile phase(vol%) | $R_{12}$ | $R_{23}$ | $R_{34}$ | $R_{45}$ |
|------------|-----|------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Fig. 3 (a) | (1) | MeOH             | 85/15                              | 7                  | 87/13                              | 5.10     | 8.05     | 2.87     | 9.90     |
| Fig. 3 (b) | (2) |                  | 86/14                              | 7.5                | 88/12                              | 4.42     | 8.38     | 2.00     | 10.11    |
| Fig. 3 (c) | (3) |                  | 86/14                              | 7                  | 89/11                              | 6.18     | 10.52    | 2.07     | 11.30    |
| Fig. 4 (a) | (1) | ACN              | 95/5                               | 6.5                | 96/4                               | 2.10     | 6.55     | 3.83     | 9.01     |
| Fig. 4 (b) | (2) |                  | 95/5                               | 6                  | 94/6                               | 2.17     | 3.93     | 2.26     | 6.21     |
| Fig. 4 (c) | (3) |                  | 95/5                               | 6.5                | 96/4                               | 5.43     | 7.04     | 3.75     | 9.57     |

Table 3. Optimum conditions and resolution in linear-gradient mode

| Fig. no.   | Eq. | Organic modifier | 1 <sup>st</sup> mobile phase(vol%) | Gradient time(min) | 2 <sup>nd</sup> mobile phase(vol%) | $R_{12}$ | $R_{23}$ | $R_{34}$ | $R_{45}$ |
|------------|-----|------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Fig. 5 (a) | (1) | MeOH             | 81/19                              | 15                 | 80/20                              | 2.11     | 4.34     | 2.01     | 6.85     |
| Fig. 5 (b) | (2) |                  | 81/19                              | 10                 | 87/13                              | 2.26     | 6.73     | 3.10     | 3.91     |
| Fig. 5 (c) | (3) |                  | 82/18                              | 10                 | 87/13                              | 2.15     | 7.05     | 3.33     | 2.45     |
| Fig. 6 (a) | (1) | ACN              | 93/7                               | 10                 | 91/9                               | 2.13     | 2.84     | 2.19     | 3.76     |
| Fig. 6 (b) | (2) |                  | 94/6                               | 16                 | 89/11                              | 2.21     | 3.41     | 2.11     | 3.80     |
| Fig. 6 (c) | (3) |                  | 94/6                               | 14                 | 91/9                               | 2.00     | 3.03     | 2.17     | 3.98     |

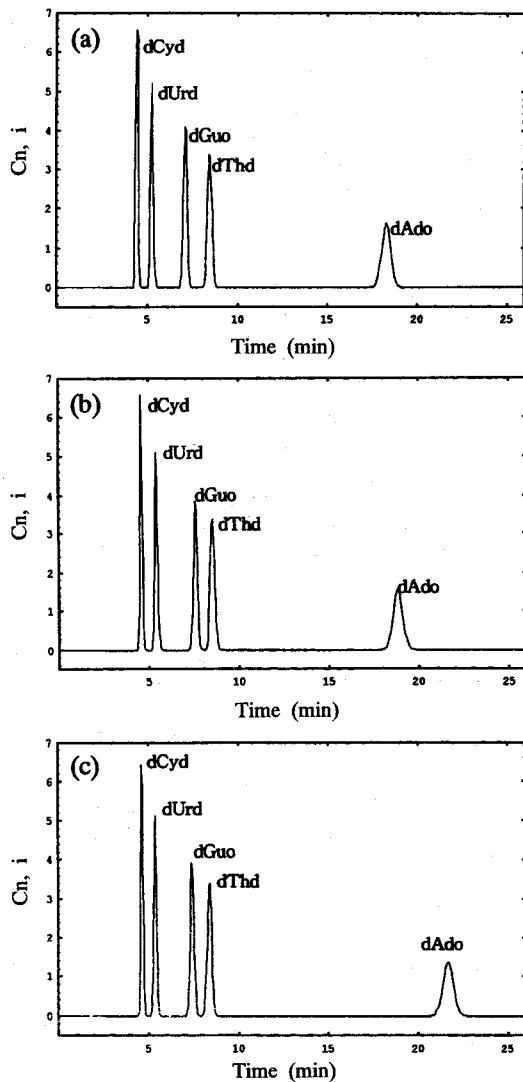


Fig. 3. Elution profiles of deoxyribonucleosides in stepwise-gradient mode.  
(organic modifier : methanol)

의 유기용매의 양을 조절하는 경우 최적조건을 얻게 되었다. 사용한 용량인자의 모델식에 따라서 각 물질간의 분리도의 차이가 있다. 그러나 유기용매의 양이 적게 첨가되는 이동상의 경우의 역상 액체 크로마토그래피에서는 식 (2), (3)이 Snyder의 식 (1)보다 더 잘 일치하였고[10], Table 1에서는 식 (1)의 regression coefficient가 식 (2), (3)보다 좋지 않았고 계산된 농도 분포곡선은 실험값과 차이가 있게 된다. Fig. 3(a), (b), (c)에서는 stepwise-gradient mode에서 유기용매로 메탄올을 사용한 경우에 대해 세 가지 모델식을 이용하여 구한 데옥시리보뉴클레오사이드의 농도 분포 곡선이다. 일정용매조성법에 의해서는 dGuo와 dThd가 서로 비슷한 체류거동으로 인하여 분리가 되지 않았고[2, 13], dGuo가 나오는 부근에서 2번째 이동상의 조성으로 stepwise-gradient mode를 사용하면 Fig. 3에서 보는 바와 같이 충분히 분리가 되었다. 유기용매로서 아세토나이트릴을 사용하고 stepwise-gradient mode에서 세 가지 모델식을 이용하여 구한 농도 분포 곡선이 Fig. 4(a), (b), (c)에서 보여주고 있다. 메탄올을 첨가한 경우와 비슷한 분리조건을 보여주고 있지만 식 (2)를 이용하여 구한 최적 분리조건은 다른 두 식의 경우와 달리 아세토나이트릴의 양이 두 번째 이동상에서 1%가 증가하였고 첫 번째와 두 번째의 조성의 차이가 1%인 것은 아세토나이트릴인 경우 메탄올을 사용한 경우보다

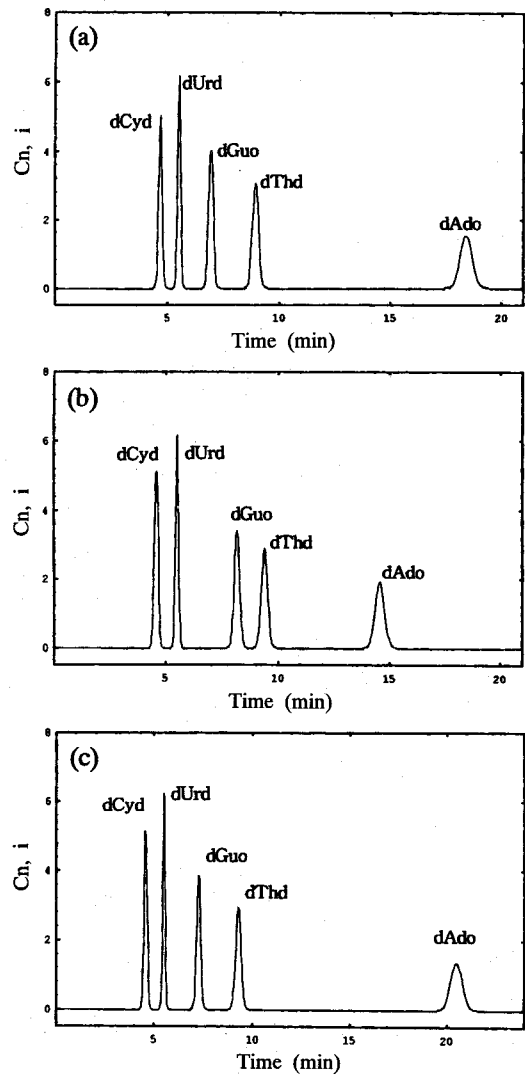


Fig. 4. Elution profiles of deoxyribonucleosides in stepwise-gradient mode.  
(organic modifier : acetonitrile)

구배용매조성법의 필요성이 줄어들어 일정용매조성법과 큰 차이가 없게 된다.

Linear-gradient mode에 대한 최적의 이동상의 조성의 분리도는 Table 3에서 보여주고 있다.  $V_{80}$ 는 5ml로 실험적으로 측정하였고  $V_{80}$ 과 시작과 끝의 조성을 선형적으로 변화시키면서 최적의 조건을 결정하였다. 유기용매의 조성의 범위는 Table 2에서의 stepwise-gradient mode와 유사한 경향을 보이고 있지만 이동상의 조성이 선형적으로 변화함에 따라서 분리시간은 Table 2에서 보다 10분정도 빨리 용출이 되었고 따라서 분리도가 감소하였다. Linear-gradient mode에서는 첫 번째 이동상의 조성으로 5분 동안 유지한 후에 gradient time내에 두 번째 이동상의 조성으로 선형적으로 변화시켰다. 일정한 시간동안 첫 번째 이동상의 조성으로 유지시킨 이유는 dGuo와 dThd를 분리시키기 위한 것이고 두 번째 조성에서 유기용매의 양을 증가시킨 것은 dAdo는 dThd와는 분리도는 좋고 빨리 용출시키기 위한 것이다. Stepwise-gradient mode에서 보다 gradient time이 증가하여 서서히 이동상의 조성을 변화시키면서 각 물질의 분리도를 증가시키는 것이 linear-gradient mode의 장점이다. 유기용매가 아세토나이트릴인 경우 각기의 체류모델에 따라서 이동상의 조성이 차이가 있지만 구배용매조성법에서 단위시간당 이동상의 조성은 식 (1),

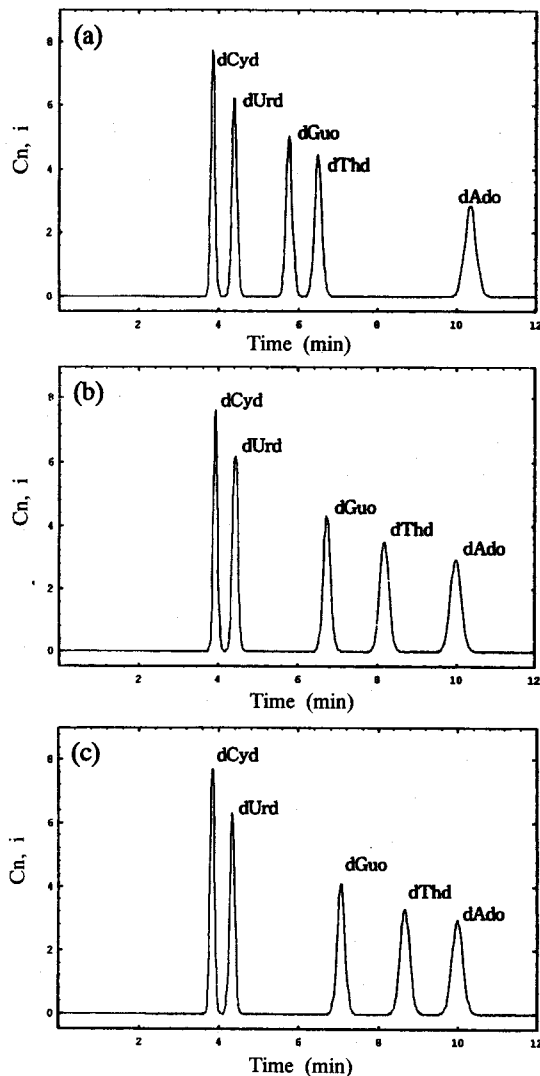


Fig. 5. Elution profiles of deoxyribonucleosides in linear-gradient mode. (organic modifier: methanol)

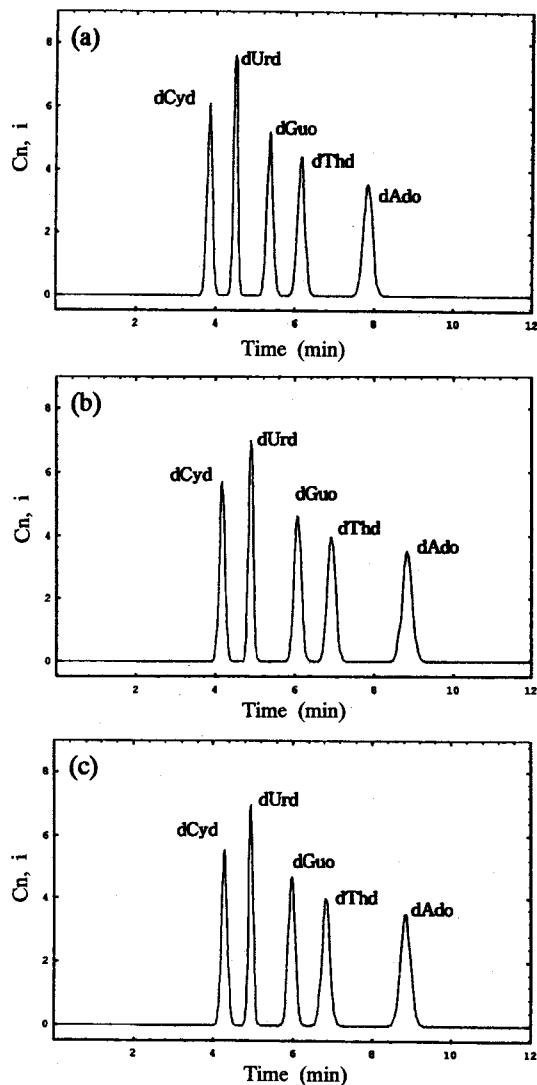


Fig. 6. Elution profiles of deoxyribonucleosides in linear-gradient mode. (organic modifier: acetonitrile)

(2), (3)에 따라서 각기 0.4, 0.45, 0.33으로 비슷한 조건을 보이고 있다. Fig. 5, 6에서는 linear-gradient mode에서 이동상내의 유기용매로서 각기 메탄올과 아세토나이트릴을 사용한 경우, 세 가지 용량인자의 모델식에 의한 각 물질의 농도 분포 곡선을 계산한 결과이다.

## 5. 결 론

세 가지 체류모델식을 이용하여 용량인자를 예측할 때에 식 (1)에 비해서 식 (2), (3)은 낮은 양의 유기용매의 영역에서 잘 일치하고 있다. 본 실험에 사용된 데옥시리보뉴클레오사이드와 같이 낮은 양의 유기용매를 사용하는 경우 구배용매조성법을 이용하여 물질의 체류시간과 용량인자를 수식적으로 표시하기 위해서는 Snyder 식 (1)이 적당하지 않았다.

역상 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 데옥시리보뉴클레오사이드를 분리하기 위한 최적의 실험조건은 물/아세토나이트릴의 이성분계 이동상에서 linear-gradient mode를 이용하여 이동상을 93/7(물/아세토나이트릴, v/v)로 5분동안 유지시키고 이후 5분 동안 91/9로 변화시킨 조건이었다. 구배용매조성법에서 각 물질의 이론단수는 일정용매조성법에서 구한 이론단수를 사용하였기 때문에 분리도

에 대한 정확한 예측을 위해서는 구배용매조성법에서 이론단수를 결정하기 위한 모델링의 연구가 필요하다.

## 사용기호

- A, B : empirical constants used in Eq. (2)
- a : empirical constant used in Eq. (14)
- $a_i$  : slope of function  $Y_i$
- b : the ratio between the volume of the stationary phase and that of the mobile phase
- C, D, E : empirical constants used in Eq. (3)
- $c_0$  : concentration of injected solute [ $\mu\text{g/ml}$ ]
- $c_N$  : concentration of solute in Nth plate [ $\mu\text{g/ml}$ ]
- F : volume fraction of organic modifier in mobile phase
- K : equilibrium constant
- $k'$  : capacity factor
- $k'_w$  : capacity factor for pure water as mobile phase
- L : column length [cm]
- N : number of theoretical plate

- $r$  : number of theoretical plate filled with solute at injection  
 $R_s$  : resolution of adjacent peak  
 $S$  : empirical constant used in Eq. (1)  
 $V$  : volume of mobile phase through the column [ml]  
 $V_0, Y_0$  : cross point of function  $Y_0$  and  $Y_1$   
 $V_m$  : dead volume [ml]  
 $V_R$  : retention volume [ml]  
 $v_m$  : volume of the mobile phase in one phase [ml]  
 $v_s$  : volume of the stationary phase in one phase [ml]  
 $Y$  : function of solute migration

#### 그리스 문자

- $\alpha$  : selectivity

#### 하첨자

- 1 : 1st mobile phase  
 2 : 2nd mobile phase  
 g : gradient mode  
 l : linear gradient mode

## 감 사

본 논문은 과학재단(Grant No. 971-1107-048-2)의 지원에 의한 연구 결과입니다.

## 참고문헌

1. Snyder, L. R. and Quarry, M. A.: *J. Liq. Chrom.*, **10**, 1789(1987).
2. Kim, J. D., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V.: *J. Liq. Chrom.*, **18**, 3091(1995).
3. Row, K. H. and Lee, J. W.: *Korean J. Chem. Eng.*, **14**, 382(1997).
4. Markowski, W. and Gotkiewicz, W.: *Chromatographia*, **25**(4), 339 (1988).
5. Row, K. H. and Larin A. V.: *Korean J. Chem. Eng.*, **12**, 442(1995).
6. Row, K. H. and Larin A. V.: *Korean J. Chem. Eng.*, **12**, 512(1995).
7. 최두찬, 최대기, 노경호: 공업화학, **7**, 985(1996).
8. 정용안, 정성택, 노경호: 화학공학, **35**, 712(1997).
9. 장경곤, 노경호, 정성택: 공업화학, **8**, 286(1997).
10. Lee, Y. W., So, M. S., Lee, J. W., Chung, S. T. and Row, K. H.: *Korean J. Chem. Eng.*, **13**, 578(1996).
11. Row, K. H. and Larin, A. V.: *J. Chem. Eng. Japan*, **28**, 851(1995).
12. 이주원, 노경호: 공업화학, **8**, 403(1997).
13. Lee, Y. W., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V.: *J. Liq. Chrom.*, **18**, 3077(1995).
14. Polunina, I. A., Choi, D. K., Row, K. H. and Larin, A. V.: *Colloid J.*, **58**, 805(1996).