

## 데옥시리보뉴클레오사이드를 분리하기 위한 최적 조건

노경호<sup>†</sup> · 이주원

인하대학교 화학공학과

(1997년 7월 25일 접수, 1997년 12월 8일 채택)

## Optimum Condition for Resolution of Deoxyribonucleosides

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

Department of Chemical Engineering, Inha University

(Received 25 July 1997; accepted 8 December 1997)

### 요 약

역상 고성능 액체크로마토그래피를 이용하여 다섯 가지 데옥시리보뉴클레오사이드를 분리하였다. 본 연구에서는 최적분리조건을 얻기 위해서 계단함수조건에서 새로운 이동상으로 바뀌는 경우 이동상의 소요부피를 새로이 설정하고 체류인자와 이동상의 조성의 관계식을 사용하였다. 이동상의 조성을 변화시키는 구배용매조성법에서는 계단함수를 적용하여 조성과 구배시간을 결정하였다. 물을 기본으로 유기용매인 methanol을 첨가하는 이성분계 이동상을 사용하였다. 용출곡선은 이차선형식인  $\ln k' = AF^2 + BF + C$ 를 사용하여 단이론으로부터 계산하였다. F는 이동상에서 유기용매의 부피분율이고, A, B, C는 실험상수이다. 최적이동상은 다섯 가지 성분간의 분리도와 가장 늦게 용출되는 성분, dAdo,의 체류시간으로부터 정하였다. 계산된 최적 분리조건은 초기조성에서 순수한 물을 사용하고 7분 후에 조성을 methanol을 19%로 계단함수로 첨가하는 경우이고 실험값과 이론값은 잘 일치하였다.

**Abstract**—The separation condition for five deoxyribonucleosides(dCyd, dUrd, dGuo, dThd, and dAdo) was determined by the optimization developed in this work with RP-HPLC(Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography). The method utilized the newly defined parameter,  $V_{m,1}$  and the relationship of retention factor and mobile phase composition. In a gradient-elution mode by changing mobile phase compositions, the composition and gradient time were determined in the stepwise-gradient mode. In this work, the binary systems of mobile phase(water/methanol) were applied. The elution profiles were calculated by the plate theory based on the quadratic equation of retention factor,  $\ln k' = AF^2 + BF + C$ . F denotes the volume fraction of organic modifier in the mobile phase, while A, B, and C the empirical constants. The optimal mobile phase was obtained by comparing the calculated results of the resolutions of the five components and the retention times of last-eluting component(dAdo). The final result showed that the initial mobile phase was pure water, then after 7 min the second composition of water/methanol, 81/19(v/v,%), was step-changed. In this case, the agreement between the experimental data and the calculated values was good.

Key words: Retention Factor, Optimization, HPLC, Deoxyribonucleosides, Mobile Phase, Plate Theory

### 1. 서 론

물질을 분리하는데 액체크로마토그래피가 성공적으로 사용되기 위해서는 최적 조업조건하에서 운영하는 것이다. 이 조건들은 우선 분리하고자 하는 물질이 결정된 경우, 충전제의 종류와 형태, 이동상의 조성, 이동상의 유속, column의 크기, 시료의 양과 농도 등이다 [1]. 주로 연구가 진행되는 방향은 작은 규모에서 이동상의 조건이 정해진 후에 제조용 규모에서 column에 대한 길이와 내경, 주입량 등이 결정되어서 분리과정으로 확장되게 된다. 역상(reversed-phase) 액체크로마토그래피를 사용하여 분리할 수 있는 물질은 방향족 탄

화수소, 지방산 에스테르에서 아미노산, 펩타이드 등의 이온성 화합물까지 다양하다. 소수성 선택도(hydrophobic selectivity)에 의하여 물질의 분자에서 작은 소수성 부분간의 차이나 극성이 다른 기능성 그룹을 가진 물질간에 분리가 된다[2]. 본 실험에서 사용한 데옥시리보뉴클레오사이드는 DNA를 구성하는 성분으로 강력한 생리화학적 효과를 가지고 있다. 최근에는 HPLC를 이용하여 DNA fragments를 정제하거나 분리하는 기술이 상당히 발전하였다[3].

액체크로마토그래피의 우수한 성능으로 인해서 응용이 점차 많이 됨에 따라서 분리에서의 최적화를 이루는 실질적인 문제에 대해서 관심의 초점이 모아지고 있다. 최적화의 대상은 물질의 분리도, 분리시간, 최대 분리가 가능한 양이다. 물질의 분리도는 두 인접 peak간의 체류시간의 차이와 기준선에서 peak의 평균 폭에 의해서 정의

<sup>†</sup>E-mail: rowkho@munhak.inha.ac.kr

된다. 분리도를 크게 하기 위해서는 column내에서의 체류시간의 차이가 분명히 존재하여야 한다. 분리도는 가장 우선 다루어져야 하고 이를 위해서 이동상의 종류와 조성에 대한 최적화가 이루어져야 한다. 체류시간 대신에 dead time을 고려한 체류인자(retention factor)를 사용하여 분리도를 표시한다. 물질간의 체류인자의 비는 분리인자(separation factor)의 값의 변화를 크게 하는 것이 가장 중요하며 이는 이동상에 첨가되는 유기용매에 의해서 변하게 된다. 역상인 경우, 물을 기본으로 하고 유기용매로서 methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran(THF) 등이 사용된다. 이동상이 이성분계인 water-methanol, water-acetonitrile 등은 삼성분계인 water-methanol-acetonitrile에서의 체류거동과 차이가 있게된다. 이동상의 최적화는 실험에 의하여 결정하거나 체류시간에 대한 수학적 모델식에 의하여 이루어지게 된다. 전자는 최소한의 실험으로부터 이동상의 조성을 얻기 위하여 통계적인 방법[4], 다양한 함수(주로 다항식)의 형태로 표시하는 방법[5]이 사용된다. 후자는 체류인자와 이동상에 대한 체류 mechanism에 대한 모델식을 이용하는 방법[6, 7]이다. 문헌[6]에서는 deoxyribonucleosides, 문헌[7]에서는 phospholipid를 분리하기 위하여 세 가지 체류모델식(Snyder Eq., Langmuir Eq., quadratic eq.)을 사용하여 분리도를 기준으로 최적 이동상의 조성을 제시하였다. 이동상의 조성에 대한 최적화뿐만 아니라 쉽게 적용할 수 있는 방법으로서 이동상의 조성을 변화시키는 구배용매조성법(gradient mode)을 병행하였다. 일정용매조성법(isocratic mode)에 비해서 짧은 분리시간, 보다 향상된 분리도, tailing이 작은 피크 등의 장점이 있다.

본 연구에서는 계단함수의 구배용매조성법에서 체류부피를 예측하기 위해서 기존의 방법과는 달리 새로운  $V_{m,1}$ 을 실험적으로 구하여 단이론에 적용하였다. 실험값의 체류인자를 가장 잘 예측하는 quadratic equation을 사용하여 체류인자와 이동상 조성의 관계식과 단이론으로부터 용출곡선을 계산하였고 분리도와 분리시간을 기준으로 최적 이동상의 조건을 계산하였고 이 조건에서 실험값과 잘 일치하는지를 확인하는 것이 본 논문의 목적이다.

## 2. 이 론

다섯 개의 deoxyribonucleosides를 분리하기 위한 이동상의 조성은 water-methanol의 이성분계로서 각 성분에 대한 체류인자와 이동상의 조성은 Table 1에 나타나 있다. 물질의 체류인자는 다음식에 의하여 정의된다.

$$k' = \frac{V_R - V_m}{V_m} \quad (1)$$

$k'$ 은 체류인자이며  $V_R$ 은 물질의 체류부피이고  $V_m$ 은 dead volume이다.

물질이 고정상과 이동상내에서의 체류에 관한 모델은 Snyder의 log관계식[2]을 시작으로 최근에는 Langmuir 흡착으로부터 얻은 식

Table 1. Retention factors of deoxyribonucleosides in binary mobile phases

| Mobile phase(vol%) |          | Retention factors( $k'$ ) |      |       |       |       |
|--------------------|----------|---------------------------|------|-------|-------|-------|
| Water              | Methanol | dCyd                      | dUrd | dGuo  | dThd  | dAdo  |
| 75                 | 25       | 0.33                      | 0.33 | 0.51  | 0.67  | 1.26  |
| 80                 | 20       | 0.48                      | 0.53 | 0.92  | 1.10  | 2.36  |
| 85                 | 15       | 0.69                      | 0.78 | 1.54  | 1.77  | 4.05  |
| 90                 | 10       | 1.17                      | 1.43 | 3.22  | 3.43  | 8.78  |
| 95                 | 5        | 1.94                      | 2.35 | 5.83  | 5.83  | 16.27 |
| 97                 | 3        | 3.02                      | 3.93 | 10.46 | 10.46 | 30.41 |

Table 2. Empirical constants and regression coefficients of deoxyribonucleosides

| Material | $\ln k' = A + BF + CF^2$ |       |        | Regression coefficient |
|----------|--------------------------|-------|--------|------------------------|
|          | A                        | B     | C      |                        |
| dCyd     | 1.47                     | -0.15 | 0.0021 | 0.9951                 |
| dUrd     | 1.73                     | -0.16 | 0.0018 | 0.9927                 |
| dGuo     | 2.77                     | -0.18 | 0.0019 | 0.9942                 |
| dThd     | 2.73                     | -0.17 | 0.0019 | 0.9924                 |
| dAdo     | 3.85                     | -0.19 | 0.014  | 0.9937                 |

[8-10]이 있으며 이 중에서 가장 실험식과 잘 일치하는 다음과 같은 quadratic equation을 사용하였다.

$$\ln k' = A + BF + CF^2 \quad (2)$$

A, B, C는 실험상수이고 F는 이동상내에 포함된 유기용매의 분율이다. 식 (2)는 역상뿐만 아니라 정상 액체크로마토그래피에서도 적용되었고 이동상의 조성이 삼성분계인 경우에서도 두 개의 실험상수를 추가하여 사용할 수 있다[7]. Table 1에서 이성분계 조성에 따른 체류인자의 값으로부터 각 물질에 대한 체류인자를 식 (2)에 의하여 회귀분석한 결과가 Table 2에 표시하였으며 상관계수도 1에 근사하였다.

본 최적화 방법은 이동상의 조성구배용매조성법에 의한 것으로 후자는 계단함수(step function)로서 이동상의 조성을 변하게 하였다. 이 경우 체류부피,  $V_{Rg}$ 는

$$V_{Rg} = V_m(1 + k'_2) + \frac{V_m V_{g,1}}{V_{m,1} - V_m(1 + k'_1)}(k'_2 - k'_1) \quad (3)$$

$k'_1, k'_2$ 는 각기 첫 번째와 두 번째 이동상에서의 체류인자이고 식 (2)에 의해 계산된 값을 사용하였다.  $V_{g,1}$ 은 두 번째 이동상이 column에 들어가기 시작할 때까지 이동상이 column을 통과한 부피이다[11]. 따라서 계단함수인 경우, 용량인자는 식 (1)에 의해서 계산할 수 있다.

고정상의 부피( $v_s$ )에 대한 이동상의 부피( $v_m$ )의 비율을 b로 나타내면 평형상수와 체류인자의 관계식은 다음과 같다.

$$k' = Kb \quad (4)$$

상용화된 analytical column에서는 공간율이 0.75이기 때문에 b는 3으로 하였다.

단이론에 의하면 각 단과 단 사이의 물질수지식으로부터 결과식은 다음과 같다[9].

$$c_N = c_0 \sum_{i=N-r}^{N-1} \frac{(aV)^i}{i!} e^{-aV} \quad (5)$$

$c_N$ 은 N단에서 물질의 농도이고  $c_0$ 는 주입한 물질의 농도이다[12]. 위의 식에서 a는 다음과 같다.

$$a = \frac{1}{v_m + Kv_s} \quad (6)$$

이론단수는 일정용매법과 구배용매조성법의 실험에 의하여 체류시간( $t_R$ )과 기준에서의 peak의 폭(w)을 측정하고 다음식에 의해서 계산하였다.

$$N = 16(t_R/w)^2 \quad (7)$$

식 (5)를 사용하여 임의의 이동상의 조성구배용매조성의 조건

에서 각 물질에 대한 농도분포곡선을 예측할 수 있다. 물질(1, 2)간의 분리도는 다음과 같이 정의된다.

$$R_{12} = 2(t_{R1} - t_{R2}) / (w_1 + w_2) \quad (8)$$

이성분계 이동상의 조건에서 체류시간은 식 (2)에 의해서, 혹은 식 (7)에 의해서 구하여 각 물질간에 가장 좋은 분리도를 얻었다. 첫 번째와 두 번째 이동상의 조성은 1%씩, 구배시간은 1분씩 증가시키면서 분리도와 가장 늦게 용출되는 dAdo의 분리시간을 구하였다. 계산과정은 Mathematica(Ver. 2.2)를 PC에서 수행하였다. 예를 들어, 약 15,000정도의 반복계산에서 약 5분 이내에 최적 이동상의 조성구배시간을 얻었다.

### 3. 실험

HPLC는 Waters사의 600E pump(multisolute delivery system), 486 UV absorbance detector, U6K injector(2ml 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 물을 사용하여 1,000 ppm의 저장 용액을 만들고 50 ppm으로 희석하여 주입하였다. 이동상의 모든 용매는 감압여과한 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 파장은 254 nm로 고정하였다. 모든 실험은 상온에서 행하였다. 체류인자를 이동상 조성의 함수로 나타내기 위해서 물을 기본으로 하고 유기용매인 메탄올은 일정용매조성법으로 체류인자를 계산하였다. Dead volume( $V_m$ )은 methanol 2 cm<sup>3</sup>를 과량 주입하여 체류시간과 유량을 고려하여 2.7 cm<sup>3</sup>이었다.  $V_{m1}$ 을 실험적으로 측정하기 위해서 두 번의 실험을 하였다. 우선 column을 제거하고 UV 검지기에 직접 연결하여 순수한 물을 5분 동안 흘려주고 이후 계단함수적으로 메탄올을 25 vol% 첨가한 이동상을 흘려주었다. 두 번째 실험에서는 column을 장착하고 위와 같은 과정을 반복하였다.

### 4. 결과 및 고찰

식 (3)에서 사용된  $V_{m1}$ 은 이동상의 조성이 계단함수로 변화함에 따라서 첫 번째 이동상이 새로운 이동상으로 바뀌는 소요되는 부피로서, 즉 평형에 도달할 때까지의 이동상 부피이다. 이 값은 사용된 column과 이동상에 따라서 다르며 실험적으로 결정해야 하는 값이다. 참고문헌[11]에 의한 구배용매조성법에서의 체류부피는 식 (3)에서  $V_{m1} = V_m$ 으로 가정하여 단순화된 식을 사용하였지만 본 연구에서는 각기 구하는 방법을 다음과 같이 제시하였다. Fig. 1에서는 실험적으로 mixer의 부피와  $V_{m1}$ 을 구하는 방법을 보여주고 있다. 이동상의 조성은 물과 메탄올로 이루어져 있기 때문에 두 개의 용매저장조에서 pump에 의하여 column으로 주입되기 전에 HPLC장치에 mixer를 설치하여 이동상의 조성이 일정하게 유지하도록 하는 부분이며 HPLC 기기마다 고유한 값을 가지기 때문에 이를 실험적으로 구하였다. 두 개의 선 중 상단부의 선은 column을 설치한 경우에서  $V_{m1}$ 을 구하는데 이용되고 하단부의 선은 column을 제거하고 얻은 detector signal로서 mixer의 부피를 구하는데 이용된다. 우선 column을 제거하고 methanol의 농도를 5%에서 주입후 5분 경과 후에 25%로

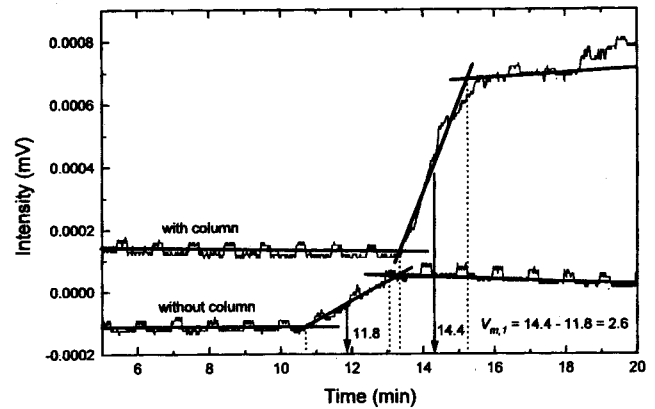


Fig. 1. Experimental determination of  $V_{m1}$ .

증가함에 따라서 detector signal의 변화가 존재하는 기울기의 중간 점을 mixer의 부피로 정하면 6.8(=11.8-5)cm<sup>3</sup>이 된다. 마찬가지로 방법으로  $V_{m1}$ 은 2.6(=14.4-11.8)cm<sup>3</sup>이 된다. 한편, acetonitrile의  $V_{m1}$ 은 3.2 cm<sup>3</sup>이고 methanol보다 극성이 작기 때문에 C<sub>18</sub>에 오래 체류하고 이에 따라  $V_{m1}$ 은 크게 된다.

크로마토그래피는 각 물질이 고정상과 이동상에서의 농도비(평형상수)가 다르기 때문에 분리가 된다. 즉 평형상수는 가장 중요한 매개변수이고 체류인자와는 식 (4)에서 보는 바와 같이 두 상에서의 부피비를 곱하여 표시되며 이 값은 충전물의 직경이 10  $\mu$ m 이하의 분석용 column에서는 일정한 값을 갖는다[13]. 선형 흡착평형식을 가정한 단이론에서는 비교적 주입량이 작은 경우 계산된 농도분포곡선과 실험값이 잘 일치하지만 체류인자는 이동상의 조성에 의하여 크게 변하기 때문에 정확한 함수관계를 제시하여야 이동상의 조성에 대한 최적화가 가능하게 된다. 식 (2)는 이러한 목적에 부합하며 [9], 식 (3)에 의하여 계단함수의 구배용매조성법으로 체류부피까지 사용하는 것이 본 연구의 최적화 방법이다. 이동상의 조성에 따른 각 물질의 체류인자를 Table 1에 나열하였고 이들의 관계를 식 (2)로 회귀분석한 결과가 Table 2에 나타나 있다. Fig. 2에서는 식 (2)를 사용한 경우 Table 1의 조건에서 실험적으로 측정한 체류인자와 Table

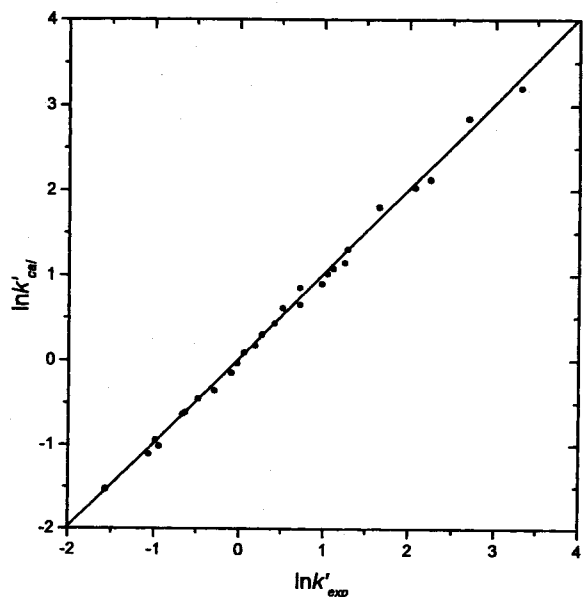


Fig. 2. Comparison of the experimental and calculated retention factors.

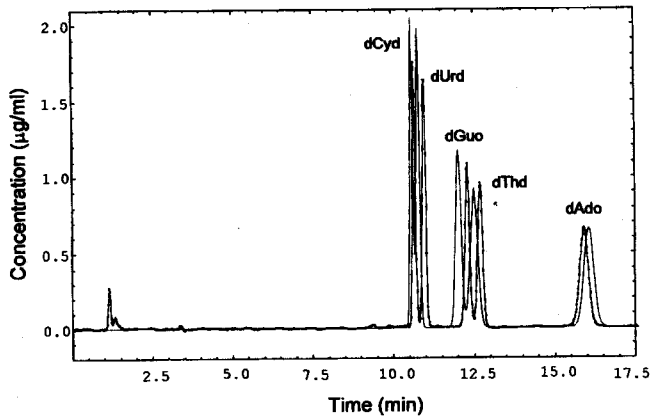


Fig. 3. Separation of deoxyribonucleosides by RP-HPLC.  
(solid line : calculated, dotted line : experimental)

2에서 구한 계산값을 다섯 개의 deoxyribonucleosides에 대해 비교한 것으로 서로 잘 일치하고 있다. 따라서 식 (2)에 의한 체류인자를 사용하여 단이론에 의한 식 (5)를 사용하여 정확한 용출곡선을 예측할 수 있게 되었다.

유기용매인 methanol의 조성과 구배용매조성법에서의 구배시간에 대해서 최적화된 결과는 첫 번째 이동상의 조성은 순수한 물을 사용하고 구배시간인 7분 후에 두 번째 이동상의 조성은 19% methanol이 포함되고 계단함수로 변하게 되는 조건이다. 이 경우에서의 chromatogram이 Fig. 3에서 보여지고 있다. 각 물질의 분리도는 dCyd와 dUrd는 1.40, dUrd와 dGuo는 5.11, dGuo와 dThd는 1.33, dThd와 dAdo는 7.25이고 분리시간은 16.5분 이내에 분리가 되었다. 이에 비해서 methanol이 15%인 일정용매조성법에서는 분리시간은 서로 비슷하였지만 분리도는 위와 같은 순서대로 하면 각기 0.73, 4.85, 1.27, 8.77이었다[8]. 특히 dCyd와 dUrd, dGuo와 dThd의 분리도가 증가되었다.

## 5. 결 론

본 최적화 방법에서는 기존 방법에서 사용되었던  $V_m$ 대신에  $V_{m,1}$ 을 새로이 설정하고 실험적으로 구하는 방법을 제시하였다. 다른 유기용매를 사용하면 위와 같이 실험적으로 간단히 측정하여 얻을 수 있다.  $V_m$ 대신에  $V_{m,1}$ 을 사용함으로써 유기용매에 따른 물질의 체류부피를 정확하게 예측할 수 있는 장점이 있다. 이 방법을 사용하여 이동상 조성 및 구배시간을 계산할 수 있기 때문에 분석용뿐만 아니라 분리용 크로마토그래피 공정에 이용될 수 있다. 이동상의 조성에 따른 체류인자의 data를 실험적으로 최소한 3개를 얻어 식 (2)의 실험상수를 구할 수 있고 구배용매조성법과 단이론을 적용할 수 있는 것이 본 최적화 방법의 특징이다. 물질을 분리하기 위한 최적 이동상의 조성 및 구배시간을 실험적으로 구하기 위해서는 많은 실험을 시행오차적으로 수행하여야 된다. 그러나 이동상의 조성에 따른 체류인자를 식 (2)에 의한 이동상 조성의 함수로 나타내고 계단함수인 경우 단이론에 의하여 용출곡선을 예측할 수 있다. 따라서 실험횟수를 크게 줄일 수 있기 때문에 신속하게 최적 분리조건을 얻을 수 있다.

## 사용기호

A, B, C : empirical constants used in Eq. (1)

- a : empirical constant used in Eq. (4)
- b : the ratio between the volume of the stationary phase and that of the mobile phase
- $c_0$  : concentration of injected solute [mg/ml]
- $c_N$  : concentration of solute in Nth plate [mg/ml]
- F : volume fraction of organic modifier in mobile phase
- K : equilibrium constant
- $k'$  : retention factor
- N : number of theoretical plate
- r : number of theoretical plate filled with solute at injection
- $R_{ij}$  : resolution of adjacent peak
- V : volume of mobile phase through the column [ml]
- $V_m$  : dead volume [ml]
- $V_{m,1}$  : corrected volume of mobile phase with changes of mobile phase in step condition [ml]
- $V_R$  : retention volume [ml]
- $v_m$  : volume of mobile phase in one plate [ml]
- $v_s$  : volume of the stationary phase in one plate [ml]

## 감 사

본 논문은 과학재단(Grant No. 975-1100-001-2)의 지원에 의한 연구 결과입니다. Dr. Larin, A.V.(Russian Academy of Science, RAS)와의 discussion은 이 논문을 작성하는데 유익하였음을 알려드립니다.

## 참고문헌

1. Snyder, L. R. and Kirkland, J. J. : "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York (1979).
2. Snyder, L. R. and Quarry, M. A. : *J. Liq. Chrom.*, **10**, 1789(1987).
3. Kim, J. D., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V. : *J. Liq. Chrom.*, **18**, 3091(1995).
4. Guillaume, Y. and Guinchard, C. : *J. Chromatogr. Sci.*, **33**, 204(1995).
5. Jung, Y. A., Chung, S. T. and Row, K. H. : *HWAHAK KONGHAK*, **35**, 712(1997).
6. Lee, J. W. and Row, K. H. : *HWAHAK KONGHAK*, **35**, 769(1997).
7. Lee, J. W. and Row, K. H. : *J. of The Korean Ind. & Eng. Chemistry*, **8**, 694(1997).
8. Lee, Y. W., So, M. S., Lee, J. W., Chung, S. T. and Row, K. H. : *Korean J. Chem. Eng.*, **13**, 578(1996).
9. Lee, Y. W., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V. : *J. Liq. Chrom.*, **18**, 3077(1995).
10. Polunina, I. A., Choi, D. K., Row, K. H. and Larin, A. V. : *Colloid J.*, **58**, 805(1996).
11. Markowski, W. and Gotkiewicz, W. : *Chromatographia*, **25**(4), 339 (1988).
12. Row, K. H. and Larin, A. V. : *Korean J. Chem. Eng.*, **12**, 442(1995).
13. Row, K. H., Choi, D. K. and Lee, Y. Y. : *Korean J. Chem. Eng.*, **7**, 151(1990).