

RP-HPLC에서 완충용액의 농도에 따른 Nucleotides의 체류인자의 예측

이주원 · 노경호[†]

인하대학교 화학공학과
(2000년 2월 1일 접수, 2000년 4월 1일 채택)

Estimation of Retention Factors of Nucleotides by Buffer Concentrations in RP-HPLC

Ju Weon Lee and Kyung Ho Row[†]

Dept. of Chem. Eng., Inha Univ.
(Received 1 February 2000; accepted 1 April 2000)

요 약

이동상 내에 있는 buffer의 농도에 따라서 이온성 시료의 체류거동을 예측하기 위하여 RP-HPLC를 이용하여 실험하였다. 사용된 시료는 다섯 가지 nucleotides(5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-AMP), buffer로서는 sodium phosphate monobasic과 acetic acid를 사용하였고 농도는 0.01-10 mM까지 변화시켰다. Buffer의 농도와 체류인자에 관한 두 가지 비선형 모델식을 제안하였고 sodium phosphate monobasic과 acetic acid의 농도에 따라서 상관계수는 0.99이상으로 계산 값과 실험 값과 잘 일치하였다.

Abstract – To estimate the retention behavior of ionized solute by the buffer concentration in mobile phase, the experiments were carried out by RP-HPLC(Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography). Five nucleotides(5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-AMP) were used as solutes. Buffers(0.01-10 mM) were sodium phosphate monobasic and acetic acid. We proposed the two nonlinear model equations in terms of buffer concentration to predict the retention factors. It showed the regression coefficients for the concentration of sodium phosphate monobasic and acetic acid were above 0.99, so the calculated by the model equations and experimental value were in good agreements.

Key words: Nucleotides, Retention Factor, Buffer, Semi-Empirical Equation, RP-HPLC

1. 서 론

Nucleotides는 생명체의 유전 물질인 DNA의 구성물질로 핵산염기, D-ribose, 인산 3종류의 분자가 결합한 핵산을 구성하는 기본단위이다. Nucleotides는 nucleosides의 3' 또는 5'에 인산이 에스테르 결합으로 연결된 구조를 가지고 있다. Nucleotide의 유도체중 특히 adenosine-5'-triphosphate(ATP)는 생화학반응에서 중요한 작용을 한다. ATP가 ADP와 무기인산으로 가수분해될 때 다량의 이용 가능한 에너지를 방출하므로 생물체내에서 에너지 흐름의 주된 담체가 되며 많은 에너지를 필요로 하는 생체 내 반응에 관여한다. 그리고 adenosine의 3'과 5'에 인산이 환상의 phosphodiester 형으로 결합한 adenosine-3', 5'-monophosphate(cyclic AMP, cAMP)는 대사조절에 중요한 작용을 한다. 이외에 중요한 보조효소인 NAD, NADP, FAD, Coenzyme A, vitamine B₁₂ 등도 nucleotide의 유도체이다[1].

Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography(RP-HPLC)는 용액 상태의 혼합물을 분석하는 대표적인 분석기기로 많은 활용범위가 연구되고 있다[2-4]. RP-HPLC에서 이동상은 물과 물보다 낮은 극

성을 가지는 메탄올, 아세토나이트릴이 주로 사용된다. 이러한 이동상에 용해되는 물질은 주로 극성을 띄거나 용해되어 이온으로 존재한다. 고정상으로 쓰이는 물질은 비극성을 띄는 C₁₈이나 C₈을 사용한다. 용해되어 이온으로 존재하는 물질은 매우 큰 극성을 보이기 때문에 비극성인 고정상에 체류하지 않고 바로 용출되어 분석을 어렵게 한다. 이동상에 염을 첨가하여 완충용액을 만들어 분석하고자 하는 물질의 이온화를 방해하여 비극성의 고정상에 체류하게 함으로써 분석을 용이하게 한다[5]. 이동상의 pH에 따른 시료의 체류거동에 따른 연구는 많은 연구자에 의해서 발표되었다[6-8]. 그러나 이동상의 pH를 측정하는 것이 매우 어렵고 매 실험마다 동일한 pH를 얻기가 어렵다. 또한 buffer의 종류에 따른 체류거동의 변화를 알 수 없다. 이러한 어려움을 해결하기 위하여 본 연구에서는 이동상의 pH의 변화를 대신하여 이동상내의 buffer의 농도의 변화에 따른 시료의 체류거동을 예측함으로써 buffer의 농도가 이온성 시료의 체류에 미치는 영향을 연구하여 buffer의 농도에 따른 시료의 체류거동을 규명하는 것이다[9, 10].

본 연구의 목적은 다섯 가지 nucleotides, cytidine-5'-monophosphate disodium salt(5'-CMP), uridine-5'-monophosphate disodium salt(5'-UMP), guanosine-5'-monophosphate disodium salt(5'-GMP), inosine-5'-monophosphate disodium salt(5'-IMP), adenosine-5'-monophosphate disodium

[†]E-mail: rowkho@inha.ac.kr

salt(5'-AMP)의 체류거동을 몰페탄올의 이성분계 이동상에 sodium phosphate monobasic 또는 acetic acid를 첨가하여 buffer의 농도에 따른 체류거동을 예측하기 위한 모델을 구하는 것이다.

2. 이 론

고정상이 C_{18} 인 비극성의 성질을 가지고 있으므로 이온으로 용해되어 있는 물질은 고정상에 거의 체류하지 않는다. 용해되어 음이온으로 존재하는 시료가 비극성 고정상에서의 체류인자(k)는 다음과 같이 이온으로 존재할 때의 체류인자(k_-)와 비이온으로 존재할 때의 체류인자(k_0)의 합으로 나타낼 수 있다.

$$k = k_0(1 - F_-) + k_- F_- \quad (1)$$

여기서 F_- 는 이동상 내에서 이온으로 존재하는 시료의 몰분율이다. 모든 시료가 이동상에 용해되어 +1가의 양이온을 내보내고 -1가의 음이온으로 존재한다고 가정하면 F_- 는 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$K_S = \frac{[S^-][C^+]}{[SC]} \quad (2)$$

$$F_- = \frac{1}{1 + [C^+]/K_S} \quad (3)$$

여기서 K_S 는 시료의 이온화 상수이고 SC 는 이온화되기 이전의 시료의 구조식을 나타내고 이 중에서 S^- 는 음이온의 구조식, C^+ 는 양이온의 구조식을 대표한다.

식 (1)에 식 (3)을 대입하면 아래와 같은 식을 얻을 수 있다[10].

$$k = \frac{k_0[C^+]/K_S + k_-}{1 + [C^+]/K_S} \quad (4)$$

미량의 시료를 주입했을 경우에 이동상에 있는 양이온 C^+ 는 buffer에 의해서만 제공된다고 가정할 수 있다. +1가의 양이온을 제공하는 buffer의 이온화 상수 K_B 는 다음과 같다.

$$K_B = \frac{[C^+][B^-]}{[BC]} \quad (5)$$

여기서 BC 는 buffer의 구조식을 대표하며 B^- 는 buffer에서 나오는 -1가 이온을 대표한다. C^+ 의 농도를 이동상 내의 buffer의 농도에 대한 함수로 다음과 같이 선형과 제곱근의 비선형으로 가정하였다.

$$[C^+] = K_1 C_B \quad (6)$$

$$[C^+] = K_2 \sqrt{C_B} \quad (7)$$

식 (6)과 식 (7)에서 C_B 는 이동상 내에서의 buffer의 농도이고 K_1, K_2 는 실험 상수이다. 식 (6)과 식 (7)을 식 (4)에 대입하면 buffer의 농도에 따른 체류인자의 함수 식을 얻을 수 있으며 다음과 같다.

$$k = \frac{\frac{k_0 K_1 C_B + k_-}{K_S}}{1 + \frac{K_1 C_B}{K_S}} \quad (8)$$

$$k = \frac{\frac{k_0 K_2 \sqrt{C_B} + k_-}{K_S}}{1 + \frac{K_2 \sqrt{C_B}}{K_S}} \quad (9)$$

위의 식 (8)과 식 (9)는 이동상 내에서 buffer의 농도에 따른 체류인자의 변화를 나타내는 반 실험식(semi-empirical equation)을 제안하였다.

윗식에서 포함된 네 가지 매개변수 $k_0, k_-, K_1/K_S, K_2/K_S$ 는 비선형 회귀 분석법 중에서 Levenberg-Marquardt 최적화에 의하여 구하였으며 신뢰도와 허용오차는 각각 0.95, 0.05였다.

3. 실 험

본 실험에서 사용된 nucleotide는 cytidine-5'-monophosphate disodium salt(5'-CMP), uridine-5'-monophosphate disodium salt(5'-UMP), guanosine-5'-monophosphate disodium salt(5'-GMP), inosine-5'-monophosphate disodium salt(5'-IMP), adenosine-5'-monophosphate disodium salt(5'-AMP)로 Fluka에서 구입하였으며 이동상으로 쓰인 물은 증류장치로 증류하여 ULTRA-PURE WATER SYSTEM Milli-Q50(Millipore)를 이용하여 18 MΩcm의 초순수를 만들어 사용하였으며 페탄올은 HPLC-grade를 J. T. Baker에서 구입하여 사용하였다. 이동상의 pH를 조절하기 위해서 사용된 두 가지 buffer는 acetic acid, sodium phosphate monobasic이다. HPLC column은 0.39 × 30 cm의 empty column에 Lichrospher 100 RP-18(15 μm, MERCK) packing을 충전하여 사용하였다.

HPLC는 Waters사의 616 pump와 600S controller, 2487 detector를 사용하였다. 유속은 1 ml/min으로 고정하였고, 이동상내의 페탄올의 조성은 5, 10, 15, 20 vol%로 변화시켰다. 이동상 내에 buffer의 농도는 acetic acid의 경우 0.08734에서 9.78251 mM로 변화하여 실험하였고, sodium phosphate monobasic은 0.0099에서 8.992 mM로 변화하며 실험하였다. Sample은 150 ppm의 수용액을 만들어 20 μl를 주입하였다. 모든 실험은 상온에서 행하였다.

4. 결과 및 고찰

식 (8)과 식 (9)는 이동상 내의 buffer의 농도에 따른 시료의 체류인자를 결정하는 model 식으로 다섯 가지의 5'-nucleotides에 대해서 acetic acid를 buffer로 사용하였을 때에 두 가지 비선형 모델식, 식 (8)과 (9)의 parameter를 Table 1에 나타내었다. Table 2는 buffer로 sodium phosphate monobasic을 사용하였을 때의 식 (8)과 (9)의 parameter를 보이고 있다. Buffer로 acetic acid를 사용하였을 경우에 식 (8)에 대한 상관계수(regression coefficient)는 0.999-0.936이고 식 (9)에 대한 상관계수는 0.998-0.890로 식 (9)보다는 식 (8)이 잘 일치하고 있다. 이외는 대조적으로 buffer로 sodium phosphate monobasic을 사용하였을 경우의 상관계수는 식 (8)의 경우 0.996-0.988이고 식 (9)의 경우에는 0.996-0.989로 식 (8)보다 식 (9)가 근소하지만 비교적 잘 일치하고 있음을 보이고 있다. 식 (8)과 (9)의 차이점은 양이온의 농도를 결정하는 방법에 있다. 식 (8)은 이동상 내의 양이온은 이동상 내의 buffer의 농도(C_B)의 1차에 비례하는 식 (6)을 사용하였고 식 (9)는 이동상 내의 양이온은 이동상 내의 buffer의 농도(C_B)의 제곱근에 비례하는 식 (7)을 사용하였다. 이와 같은 차이점을 고려해 볼 때에 acetic acid에서 나오는 양이온 H^+ 의 농도는 acetic acid의 농도의 1차에 비례하는 식 (6)에 의해서 설명할 수 있으며 sodium phosphate monobasic에서 나오는 양이온 Na^+ 의 농도는 sodium phosphate monobasic의 농도의 제곱근에 비례하는 식 (7)에 의해서 설명할 수 있다. 따라서 사용된 buffer의 종류에 따라서 buffer의 농도에 비례하는 정도가 달라짐을 알 수 있다.

Fig. 1과 2는 buffer로 acetic acid를 사용하였을 때의 실험 값과 식 (8)과 (9)에 의해 계산된 계산 값을 나타낸 것으로 data point는 실험 값이고 실선으로 나타낸 것은 계산 값을 나타낸다. Fig. 1과 2에서 볼 수 있듯이 acetic acid의 농도가 4 mM이상의 경우에는 각 물질에 대한 체류인자가 일정한 값을 보이고 있음을 실험 값으로 알 수 있다. 이러한 특성을 식 (8)은 Fig. 1에서와 acetic acid가 4 mM 이상의 구간에서 수렴하는 값을 잘 나타내고 있지만 식 (9)에 의해서 계산된 값은

Table 1. Parameters of Eqs. (8) and (9) by acetic acid

Material	Methanol (vol%)	Eq. (8)				Eq. (9)			
		k_0	k_-	K_1/K_S	R^2	k_0	k_-	K_2/K_S	R^2
5'-CMP	5	2.336	0.632	11.876	0.99236	2.566	0.615	3.397	0.99803
	10	1.815	0.598	10.990	0.98247	2.001	0.584	3.050	0.99803
	15	1.595	0.587	9.876	0.98593	1.753	0.572	2.897	0.99811
	20	1.476	0.588	8.966	0.98426	1.623	0.572	2.701	0.99749
5'-UMP	5	1.447	0.464	0.375	0.98965	3.679	0.424	0.109	0.97210
	10	1.159	0.432	0.546	0.98877	2.046	0.403	0.213	0.96313
	15	1.038	0.409	0.810	0.95243	1.486	0.384	0.376	0.91243
	20	0.980	0.396	0.951	0.93610	1.330	0.374	0.454	0.88967
5'-GMP	5	2.692	0.491	0.609	0.99320	4.921	0.385	0.262	0.98870
	10	1.744	0.424	0.851	0.99910	2.665	0.363	0.397	0.98398
	15	1.368	0.392	1.136	0.98833	1.874	0.350	0.550	0.96032
	20	1.195	0.382	1.273	0.97728	1.572	0.348	0.621	0.94149
5'-IMP	5	2.150	0.489	0.507	0.99061	4.292	0.414	0.200	0.97705
	10	1.470	0.433	0.759	0.99593	2.280	0.387	0.347	0.97498
	15	1.206	0.405	1.073	0.96873	1.632	0.372	0.525	0.93133
	20	1.081	0.392	1.161	0.95424	1.418	0.364	0.574	0.91107
5'-AMP	5	4.009	0.723	2.384	0.99243	4.976	0.548	1.129	0.98833
	10	2.568	0.568	2.468	0.99715	3.136	0.469	1.163	0.98202
	15	1.975	0.503	2.519	0.99085	2.375	0.432	1.202	0.96679
	20	1.693	0.478	2.121	0.98685	2.054	0.415	1.059	0.96513

Table 2. Parameters of Eqs. (8) and (9) by sodium phosphate monobasic

Material	Methanol (vol%)	Eq. (8)				Eq. (9)			
		k_0	k_-	K_1/K_S	R^2	k_0	k_-	K_2/K_S	R^2
5'-CMP	5	2.001	0.469	0.742	0.98773	3.339	0.350	0.338	0.98893
	10	1.654	0.425	0.688	0.99382	2.815	0.342	0.305	0.99231
	15	1.454	0.408	0.647	0.99160	2.593	0.342	0.265	0.99418
	20	1.340	0.395	0.665	0.99556	3.741	0.345	0.139	0.99116
5'-UMP	5	2.225	0.371	0.461	0.98940	5.256	0.268	0.164	0.99495
	10	1.765	0.354	0.482	0.99036	3.867	0.273	0.181	0.99458
	15	1.559	0.342	0.482	0.99210	3.376	0.272	0.180	0.99525
	20	1.331	0.333	0.590	0.98802	4.152	0.280	0.121	0.99495
5'-GMP	5	3.290	0.411	0.424	0.99163	9.389	0.267	0.126	0.99313
	10	2.216	0.373	0.445	0.99403	5.596	0.276	0.146	0.99512
	15	1.750	0.357	0.456	0.99424	4.155	0.282	0.155	0.99573
	20	1.447	0.348	0.528	0.99123	6.323	0.295	0.076	0.99449
5'-IMP	5	3.413	0.406	0.427	0.98982	9.363	0.250	0.135	0.99514
	10	2.241	0.366	0.454	0.99158	5.380	0.263	0.159	0.99577
	15	1.744	0.347	0.477	0.99130	3.876	0.267	0.176	0.99620
	20	1.429	0.334	0.577	0.98672	4.605	0.275	0.117	0.99573
5'-AMP	5	6.896	0.479	0.492	0.99146	17.272	0.132	0.169	0.99347
	10	3.887	0.411	0.500	0.99359	9.149	0.218	0.180	0.99369
	15	2.646	0.378	0.500	0.99410	6.019	0.251	0.183	0.99455
	20	1.946	0.355	0.560	0.99048	7.832	0.276	0.092	0.99393

Fig. 2에서와 같이 acetic acid의 농도가 4 mM이상인 구간에서 일정한 값으로 수렴하는 경향이 아닌 서서히 증가하는 경향을 나타내고 있다. Fig. 1과 2에서 보이는 바에 의해서도 acetic acid의 경우 식 (8)의 계산 값이 식 (9)의 계산 값 보다 잘 일치하고 acetic acid의 농도의 변화에 따른 체류인자의 변화도 잘 표현하고 있음을 알 수 있다.

Fig. 3과 4는 이동상 내에 sodium phosphate monobasic이 buffer로 들어가 있을 경우에 sodium phosphate monobasic의 변화에 따른 체류인자를 실험 값과 계산 값에 대하여 표시한 것으로 data point는 실험 값을 실선은 계산 값을 나타내며 Fig. 3은 식 (8)에 대한 계산 값을

Fig. 4는 식 (9)에 대한 계산 값을 나타내었다. Acetic acid의 경우와는 대조적으로 이 경우에는 sodium phosphate monobasic의 농도가 증가 하여도 체류인자는 일정한 값으로 수렴하는 경향이 아닌 계속 증가하는 경향을 보이고 있다. 식 (8)과 (9)의 상관계수는 아주 근소한 값으로 식 (9)가 높은 값을 보이고 있다. 또한 Fig. 3에서와 같이 식 (8)은 sodium phosphate monobasic의 농도가 증가할수록 체류인자가 증가하는 경향을 잘 나타내지 못하고 sodium phosphate monobasic의 농도가 증가할수록 실험 값보다 낮은 계산 값을 보이고 있으나, Fig. 4에서 식 (9)는 monobasic의 농도가 증가할수록 증가하는 실험 값을

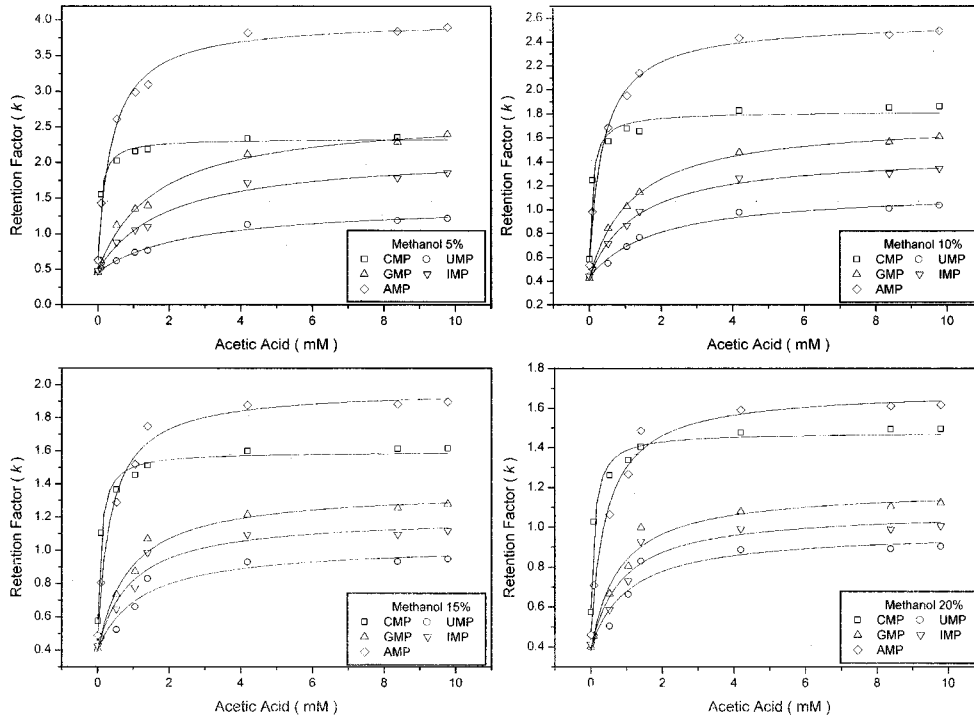


Fig. 1. Comparison of calculated and experimental retention factor[Eq. (8), acetic acid].

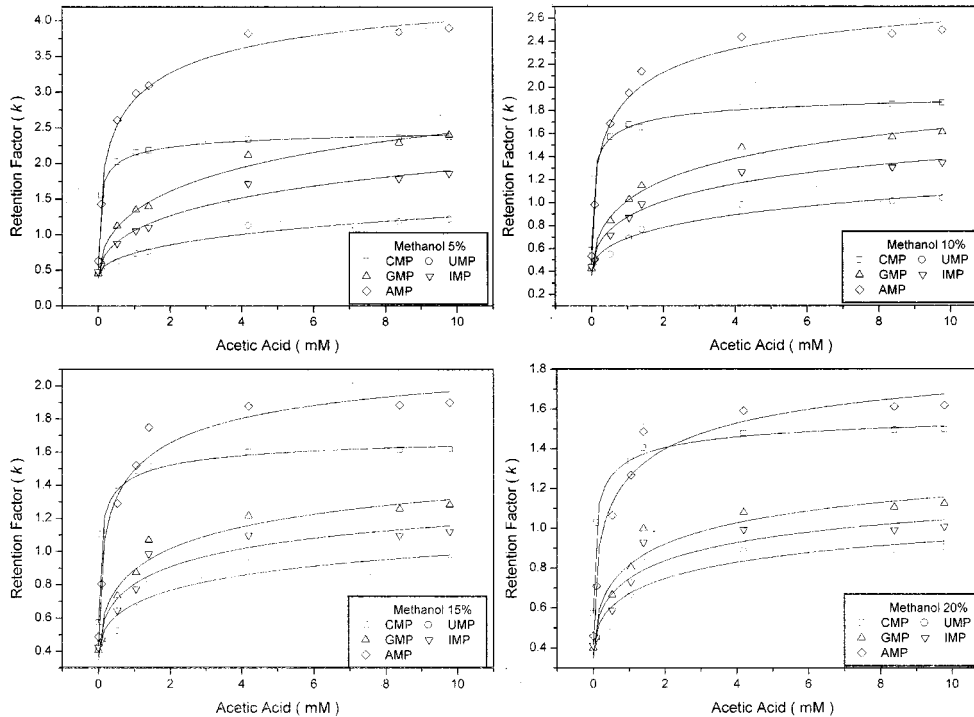


Fig. 2. Comparison of calculated and experimental retention factor[Eq. (9), acetic acid].

식 (8)보다는 잘 표현하고 있다.

Fig. 5와 6은 acetic acid의 경우 식 (8)을 sodium phosphate monobasic의 경우 식 (9)를 적용하였을 때에 식 (8)과 (9)에서 시료의 비이온에 대한 체류인자를 나타내는 parameter인 k_0 의 값을 이동상 내에 메탄올의 양의 변화에 대하여 도기한 것이다. Fig. 5와 6을 비교할 경우 같은 물질에 대한 체류인자가 acetic acid와 sodium phosphate monobasic

의 각각의 경우에 대해서 매우 큰 차이를 보이고 있다. 그 이유로는 acetic acid의 경우 H^+ 의 양이온이 Na^+ 이온보다 이동상 내에 매우 많이 존재하기 때문에 시료의 Na가 H로 치환되어 disodium salt 형태가 아닌 5'-nucleotide의 형태로 비이온의 시료가 존재하기 때문에 5'-nucleotide의 체류인자를 나타내며 sodium phosphate monobasic의 경우에는 Na^+ 이온이 많이 존재하기 때문에 시료의 Na가 H로 치환되지 않은 disodium

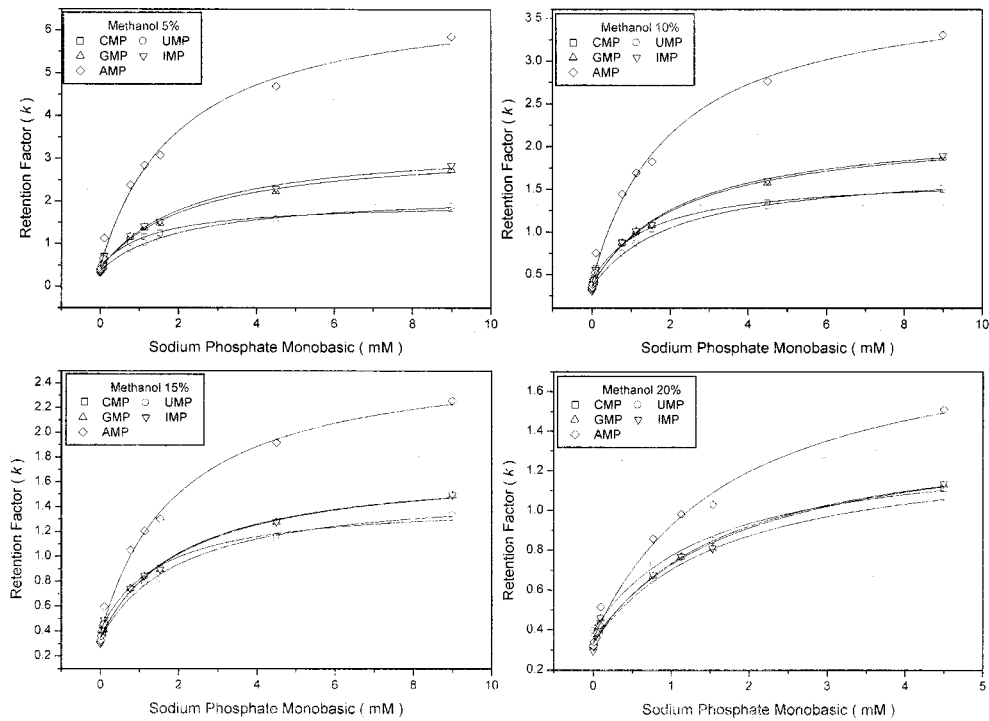


Fig. 3. Comparison of calculated and experimental retention factor[Eq. (8), sodium phosphate monobasic].

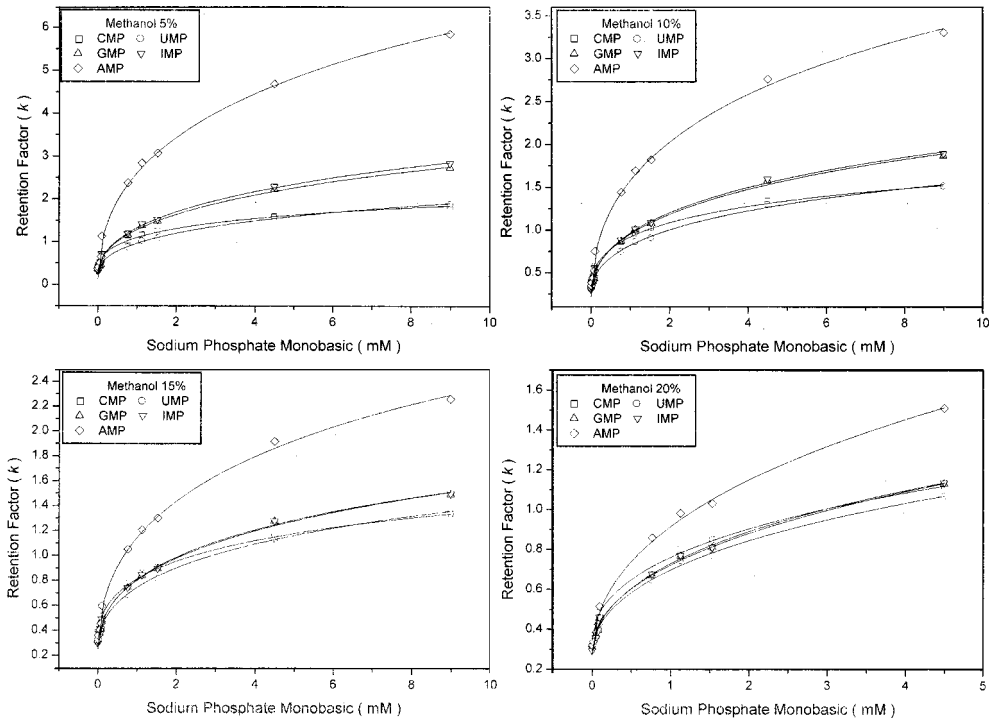


Fig. 4. Comparison of calculated and experimental retention factor[Eq. (9), sodium phosphate monobasic].

salt의 형태인 5'-nucleotides disodium salt의 체류인자를 나타낸다. 이와 같이 비이온의 형태가 각각 5'-nucleotide와 5'-nucleotide disodium salt로 다르게 나타나기 때문에 buffer의 종류에 따라 같은 시료의 체류인자가 크게 차이나는 것으로 보인다. 그리고 메탄올의 양이 증가할수록 체류인자가 감소하는 것을 알 수 있다. 이러한 경향은 이동상 내에 modifier의 양이 증가할수록 시료의 체류인자가 감소하는 일반적인 경

향과 일치하고 있다[2, 4].

Fig. 7과 8은 식 (8)과 (9)에서 시료가 음이온으로 존재할 때의 체류인자를 나타내는 parameter인 k' 값을 acetic acid와 sodium phosphate monobasic에 대하여 메탄올의 증가에 따른 k' 값의 경향을 도식한 것으로 메탄올의 양이 증가하여도 거의 변화하지 않으며 매우 낮은 값으로 일정하게 유지되는 것을 볼 수 있다. 이러한 이유로는 시료가 음이온

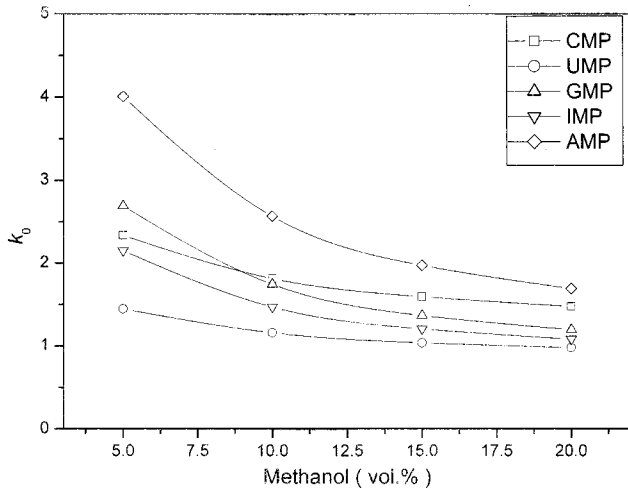


Fig. 5. Changes of k_0 with methanol contents in mobile phase [Eq. (8), acetic acid].

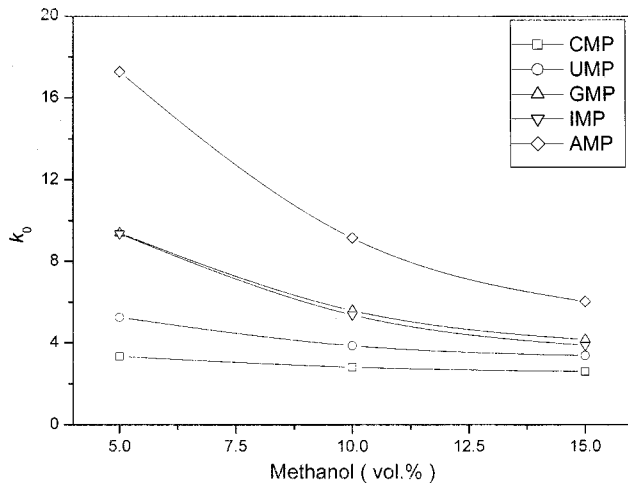


Fig. 6. Changes of k_0 with methanol contents in mobile phase [Eq. (9), sodium phosphate monobasic].

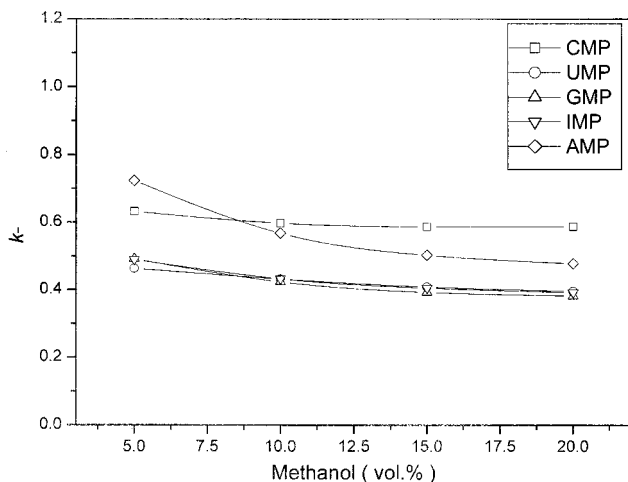


Fig. 7. Changes of k_1 with methanol contents in mobile phase [Eq. (8), acetic acid].

의 형태로 있을 경우에는 매우 큰 극성을 가지게 되며 이 매우 큰 극성의 물질은 비극성의 고정상에 머무르지 않고 용출된다. 또한 메탄올

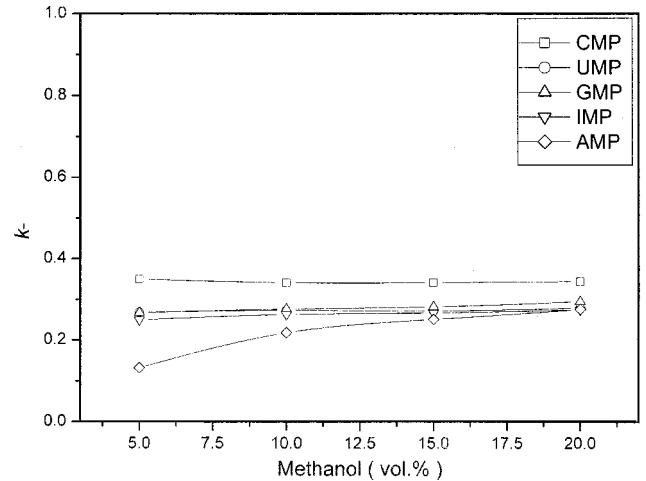


Fig. 8. Changes of k_1 with methanol contents in mobile phase [Eq. (9), sodium phosphate monobasic].

의 양이 증가하여도 극성인 음이온의 체류에 영향을 미치지 않는다. 그러므로 음이온의 시료는 비극성의 고정상에 거의 체류하지 않고 용출됨을 알 수 있다.

5. 결 론

RP-HPLC에서 이동상에 buffer가 첨가되어 pH가 변하면 이전의 연구자들은 이동상의 pH에 따른 체류인자의 변화를 예측하였다. 그러나 다양한 buffer의 종류에 대해서는 이와 같은 연구가 진행되지 않았다. 본 연구에서는 buffer의 종류에 따라서 다른 모델식을 적용함으로써 pH에서 고려되지 않은 buffer의 종류에 따른 특성을 고려하였다. 실험 결과에 의하면 acetic acid의 경우에는 식 (6)의 관계식이 적용된 식 (8) 이, sodium phosphate monobasic의 경우에는 식 (7)의 관계식이 적용된 식 (9)가 잘 일치하고 있다. Buffer의 특성에 맞는 체류인자에 관한 모델식을 얻기 위해서는 buffer와 양이온의 농도에 관한 관련식을 실험으로 결정해야 한다. 또한 model 식에서 비이온과 음이온의 체류인자를 나타내는 k_0 와 k_1 의 값이 일정한 경향을 나타내고 있기 때문에 buffer의 농도와 modifier의 농도를 동시에 고려한 model 식이 가능하게 된다. 본 연구에서 제안한 모델식 [식 (8), (9)]을 이용하여 임의의 buffer의 농도에 따른 시료의 체류시간을 예측할 수 있다. 이러한 모델식을 이용하여 buffer를 이용한 RP-HPLC의 분석 및 분리조건을 예측할 수 있고 시행오차적인 방법보다 빠른 시간 내에 최적의 분석 및 분리조건을 얻을 수 있다.

감 사

본 연구는 인하대학교 교수연구진흥비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

사용기호

- k : retention factor
- k_0 : retention factor of non-ionized solute
- k_1 : retention factor of ionized solute
- F_- : mole fraction of ionized solute
- K_S : equilibrium constant of solute
- K_B : equilibrium constant of buffer

K_1, K_2 : empirical constants

C_B : concentration of buffer in mobile phase [mM]

참고문헌

1. Shuler, M. L. and Kargi, F.: "Bioprocess Engineering," Prentice Hall, London(1992).
2. Lee, Y. W., So, M. S., Lee, J. W., Chung, S. T. and Row, K. H.: *Korean J. Chem. Eng.*, **13**, 578(1996).
3. Row, K. H. and Lee, J. W.: *Korean J. Chem. Eng.*, **14**, 412(1997).
4. Row, K. H. and Lee, J. W.: *Separation Science and Technology*, **35**, 271(2000).
5. Row, K. H.: "Principles and Applications of Liquid Chromatography," Inha Univ.(1999).
6. Bosch, E., Bou, P., Allemann, H. and Roses, M.: *Anal. Chem.*, **68**, 3651(1996).
7. Roses, M., Canals, I., Allemann, H., Silgur, K. and Bosch, E.: *Anal. Chem.*, **68**, 4094(1996).
8. Kaltenbrunner, O. and Jungbauer, A.: *J. Chromatogr. A*, **769**, 37(1997).
9. Kaliszan, R.: *J. Chromatogr. B*, **717**, 125(1998).
10. Hajnos, M. W.: *J. Chromatogr. B*, **717**, 93(1998).