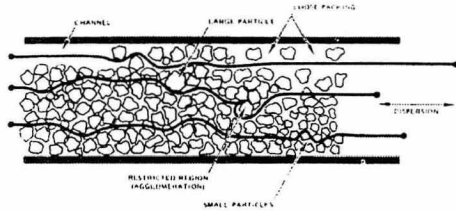




## 2.1 Multiple paths



## 3. 선택도

- column 선택도  $\alpha$

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_2}{K_1}$$

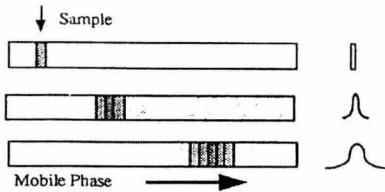
$t_m$ : retention time of unretained components

$t'_{R1}, t'_{R2}$ : adjusted retention time of components 1 and 2

$K = C_s / C_m$

$K'_1, K'_2$ : partition coefficient of components 1 and 2

## 2.2 분자 확산



## 4. 체류인자

- 체류인자 (retention factor) =  $k$

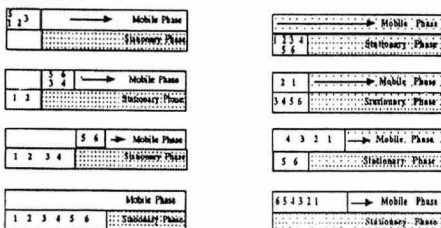
$$k = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{KV_s}{V_m}$$

- 작은  $k$  값: 분리도 좋지 않음

- 큰  $k$  값: 분리도 증가하나 분석시간이 길어지고 peak가 넓어짐

- 최적  $k$ 의 범위는  $1.5 < k < 4$

## 2.3 물질전달



$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k}{k + 1} \right)$$

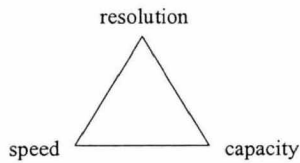
$a$                        $b$                        $c$

$a$ : column efficiency term  
 $b$ : column selectivity term  
 $c$ : retention factor term

$N_{req}$  (number of theoretical plates required)

$$N_{req} = 16R^2 \left( \frac{k+1}{k} \right)^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2$$

## 5. 조업조건 최적화



## 5.2 정지상

- 형태에 의한 분류
  - (1) Porous packing
  - (2) Superficially porous packing
- 재질에 의한 분류
  - (1) 실리카
  - (2) 알루미나
  - (3) Polymeric packing
  - (4) Graphitized carbon
- 입자크기
 

입자의 크기가 작으면 물질전달 속도가 빨라져서 column efficiency 가 좋아진다

## 5.1 이동상

- LC에 적당한 물리적 성질  
(ex : 끓는점, 점도, 혼합성, 독성, 가연성, UV 흡수, 굴절률, 반응성 등)
- 시료를 녹일 수 있을 정도의 순도를 지닌 용매 용매 세기가 적당하여야 함
- 시료분자간의 상호작용  
(분산인력, 쌍극자 결합, 수소 결합, 시료이온과의 유전상호작용)

## Packing Techniques

- (1) 건식법

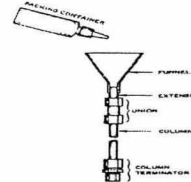
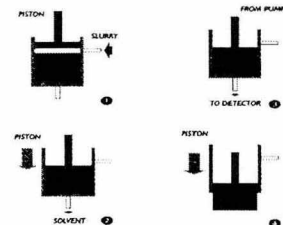


표1. 역상 및 정상용리에서 용매세기와 극성의 비교

항목	정상	역상
정지상의 극성	강함	약함
용매의 극성	약함 (헥산)	강함 (물)
시료의 용리순서	비극성이 먼저	극성이 먼저
용매의 극성증가의 효과	용출시간이 감소됨	용출시간이 증가됨

- (2) 습식법



### 5.3 시료량

- 시료량이 많으면 분리도가 나빠진다.
  - LSC : packing의 양에 비례
  - LLC : 고정상의 부피에 비례
  - IEC : 이온 교환 site에 비례
  - SEC : 세공내의 부피에 비례
  - PLC : 시료량보다 많은 양을 주입

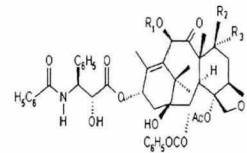
5. column 크기  
(diameter → throughput, length → purity)
6. 분리 가능한 최대 시료량의 결정
7. scale-up  
based on same packing size and superficial velocity

### 5.4 빠른 용출을 위한 방법

- (1) 구배 용매조성 용출법 (gradient elution)  
이동상의 용매 세기를 변화시켜 k값을 조절, 분석시간을 단축
- (2) Flow programming  
이동상의 유량을 조절 중에 증가시키는 실험적 방법으로 간편
- (3) 고정상 programming (coupled columns)  
여러 개 다른 고정상의 column을 병렬로 연결 하여 동일한 방법으로 전개하는 방법

### HPLC 를 이용한 분리 (예)

#### Taxol



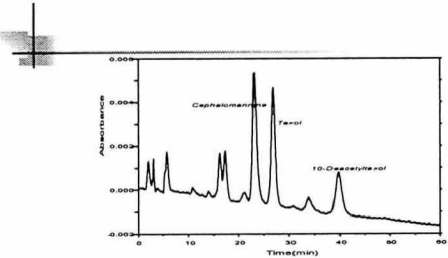
### LC에서 조업조건의 최적화

1. 목적시료
2. 고정상의 선정  
(LSC, LLC, IEC, SEC)
3. 이동상의 결정 - 조성, 조업방법의 최적화  
(실험식 : k(F), 다항식에 의한 분리도)  
(RP, NP에서 이동상의 종류)
4. packing 크기  
(압력차  $\propto \mu L_u / r_p^2$ )

- 용도  
백혈병, 자궁암, 유방암, 후두암 및 불치성 말라리아 등의 치료제
- Taxol의 분리 방법
  1. 주목나무로부터 직접 추출
  2. 생물공학적 생산방법을 통한 세포배양
  3. 전구체를 사용하여 전환

## 1. 실험방법

- (1) 추출(Extraction) 및 분배(Partition) 공정  
건조된 주목나무 분말을 methanol로 추출  
물과 methylene chloride(MC)로 분배
- (2) 전처리(Pretreatment) 공정  
open tubular column을 사용  
이동상 : methylene chloride, acetone을 조합  
column : silica를 충전



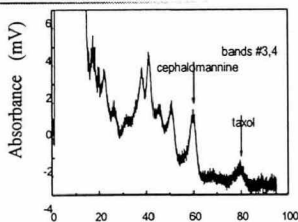
Separation of taxol using Nova-Pak column  
(hexane/1-propanol/MeOH=96/2/2(vol. %), 1ml/min, 0.5μg)

- (3) NP-HPLC에서의 분리  
주목나무 추출액과 NCI에서 제공한 3가지 성분의  
혼합물(cephalomannine, 10-deacetyl taxol, Taxol)  
을 사용
- (4) 분석기기 및 장치  
HPLC : Waters 600E  
616 multi solvent delivery system,  
486 UV-visible tunable wavelength absorbance,  
2486 Dual λ absorbance detector  
Data acquisition system : Chromate(Interface Eng.),  
Millennium32(Waters)

## 3. 결론

- (1) 주목나무 분말을 methanol로 추출한 후 무기물과  
극성물질을 제거하기 위해 물과 chloroform으로 분배
- (2) Open column을 사용한 전처리 공정을 통하여  
불필요한 지방분(chlorophyll, lipid)과 색소(pigment)  
등의 물질을 제거
- (3) 고순도의 Taxol을 분리하기 위한 NP-HPLC의 적용

## 2. 결과



Elution profile of yew extract with MC/Acetone, 75/25 (vol.%)