

HCI 프로그램을 이용한 HPLC의 최적화 조건

김춘화 · 이주원 · 노경호[†]

인하대학교 화학공학과
402-751 인천광역시 남구 용현동 253
인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터
402-751 인천광역시 남구 용현동 253
(2006년 6월 30일 접수, 2006년 8월 30일 채택)

Optimum Condition of HPLC by HCI Program

Chun Hua Jin, Ju Weon Lee and Kyung Ho Row[†]

Center for Advanced Bioseparation Technology and
Department of Chemical Engineering, Inha University, 253, Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea
(Received 30 June 2006; accepted 30 August 2006)

요 약

최근 액체크로마토그래피는 의학상이나 천연물질 분리에 많이 사용되고 있다. 특히 혼합물에서 유용성분을 분취하기 위해서는 우선 분석용 크로마토그래피의 조업조건이 결정되어야 한다. 때문에 정확한 수학적 모델링과 시뮬레이션은 크로마토그래피의 발전과 디자인 과정에서 필요한 부분이다. 인하대학교 고순도분리연구실에서는 크로마토그래피의 최적화를 목적으로 HCI 프로그램을 개발하였다. 이 과정에서 최소한의 실험으로 보다 정확하고 빠른 최적 조업조건을 HCI 프로그램을 이용하여 구할 수 있다. 즉 이론단수를 이용하여 체류인자를 예측하는 세가지 모델식으로부터 용출곡선을 계산할 수 있으며 분리도와 분리시간을 기준으로 최적 이동상의 조건을 계산할 수 있다.

Abstract – Recently, liquid chromatography (LC) has been used more frequently to separate drugs and natural substances. Especially, to selection of the solutes from the products, the operation condition of analytical chromatography should be necessarily determined. So accurate computer modeling and simulation of chromatographic performances has become a necessary part of the development and design of processes. High-Purity Separation Lab. Inha University developed the resulting HCI software for the purpose of the optimization of chromatographic performances. The HCI program was utilized to find the optimum operating condition more accurately and rapidly, reducing the number of many possible experiments. The elution profiles were calculated by the plate theory based on the three retention mechanism of capacity factor.

Key words: Plate Theory, Retention Mechanism, Capacity Factor, HCI Program

1. 서 론

최근에 건강식품에 대한 사람들의 날로 늘어나는 욕구와 수요를 만족하기 위하여 천연물에 포함된 유용성분을 분석하거나 정제하는 방법으로 크로마토그래피를 많이 사용한다. 물질의 휘발성, 분자량 등 많은 요인이 있기 때문에 물질의 분리 및 분석에는 주로 액체 크로마토그래피가 사용되며 그 중에서도 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 널리 사용되고 있다. 따라서 분리기술뿐만 아니라 생산을 위한 제조용 공정에도 많이 사용되고 있다[1]. 분리능력이 우수하고 작은 양의 시료로도 정밀한 정성, 정량분석을 할 수 있어서 대표적인 분석기기로 사용될 뿐만 아니라, 초고순도 제품을 생

산하기 위한 공정까지 상용화가 활발하게 진행되고 있다. 크로마토그래피는 예전부터 석유, 정밀화학에서, 최근 생명공학에 이르기까지 가장 우수한 분리기술로 이용되고 있다[2-5]. 분석용 및 분취용 고성능 액체 크로마토그래피(preparative HPLC)의 사용이 급증함에 따라 생산성을 극대화 시킬 목적으로 인하대학교 화학공학과 고순도 분리 연구실에서는 HCI 프로그램을 개발하였다[6]. 이 프로그램은 크로마토그래피 분리의 수학적 도구로서 제안되어지고 만들어진 소프트웨어이다. 특정 고부가가치 물질을 정제하여 고순도로 얻기 위한 preparative HPLC의 이용은 의학 산업을 위한 생물학적인 분리연구에 그 사용이 증가하고 있으며 이를 위한 많은 실험이 요구된다. 분석 및 분리조건을 신속하고 경제적으로 최적화하기 위하여 개발된 이 프로그램은 최소한의 실험 데이터를 이용하여 분석조건 최적화에서부터 제조용 공정의 기본 설계 및 경제

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

성 분석에 이르기까지 초보자도 일반 PC에서 쉽게 사용할 수 있도록 고안되었다. 일반적으로, 액체 크로마토그래피는 역상과 정상방법으로 사용되며 이동상에는 일정한 조성을 갖는 일정용매조성법과 시간에 따라 이동상의 조성을 변화시키는 구배용매조성법이 있다. 이 프로그램의 특징은 정상, 역상 칼럼에서 사용이 가능하고 일정용매조성법과 구배용매조성법에 사용이 가능하며 이동상의 조성 과 물질의 체류인자와의 상관관계를 이용하여 물질의 체류시간을 예측할 수 있으며, 주어진 이동상조성에서 단 이론을 이용한 시료의 용출곡선과 최적의 분리조건을 얻을 수 있다[7-15]. 계산된 결과를 모니터와 PC에 보여줄 수 있으며 텍스트 파일로 변환이 쉽다. 즉 최소한 실험으로 분리하고자 하는 물질의 용출곡선을 예측하고 최적 분리조건을 계산할 수 있는 소프트웨어의 개발을 통하여 보다 정확하고 최적화된 분석 및 분리조건을 결정할 수 있다.

2. HCI 프로그램 개요

본 프로그램은 시료의 양이 적은 분석용(analytical) HPLC에 대하여 역상 및 정상 방법에 모두 적용할 수 있고 이동상의 조성을 일정하게 유지하는 일정용매조성법(isocratic mode)과 이동상의 조성을 시간에 따라 변화시키는 구배용매조성법(gradient mode)에서 이동상의 조성 과 물질의 체류인자의 상관 관계를 이용하여 물질의 체류시간을 예측할 수 있다[16-23]. 또한 plate theory를 이용하여 임의의 조업조건에서 용출곡선을 예측할 수 있으며 이동상의 조성 과 operating mode(isocratic and gradient mode)에 대하여 최적화를 수행하여 분리도와 분리시간이 고려된 최적 조업조건을 계산할 수 있다[24-26].

2-1. Plate Theory

Plate theory는 크로마토그래피용 column은 column의 길이를 이론단수로 나눈 단을 가지고 있는 plate column과 수학적으로 동일하다는 이론으로, 이동상이 단과 단을 연속적으로 통과할 때 각 단 내에서 흡착평형 상태에 있으며(local equilibrium), 각 단에서의 이동상의 부피(v_m)와 고정상의 부피(v_s)는 일정하다. 이러한 가정에서 각 단과 단 사이의 물질 수지식으로부터 다음과 같은 결과식을 얻을 수 있다.

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

c_N 은 N단에서 물질의 농도이고 c_0 는 주입한 물질의 농도이며, r 은 주입된 물질이 차지하게 되는 단의 수이다. a 는 평형상수를 포함하는 상수로 다음과 같다.

$$a = \frac{1}{v_m - K v_s} \tag{2}$$

을 고정상의 부피에 대한 이동상의 부피의 비율로 나타내면 평형상수와 체류인자는 다음과 같은 관계를 가진다.

$$K = \beta k = \frac{v_m k}{v_s} \tag{3}$$

체류인자로부터 계산된 평형상수와 이론단수를 plate theory식에 대입하여 크로마토그래피 column 출구에서 물질의 용출 곡선을 예측

할 수 있다.

2-2. 체류인자

이동상 내의 유기용매의 조성 과 체류인자와의 상관관계는 그 동안 많은 연구가 이루어졌다. 다음의 세가지 관계식이 가장 많이 사용되는 체류인자와 유기용매의 조성 과의 관계식이다.

$$\log k = \log k_w - SF \tag{4}$$

$$k = A - \frac{B}{F} \tag{5}$$

$$\log k = L + MF + NF^2 \tag{6}$$

k_w 는 이동상이 순수한 물질 때에 물질의 체류인자이다. F 는 이동상 내에 포함된 유기용매의 부피비율이다. (4)-(6)식은 역상 크로마토그래피에서 이동상이 물과 단일 유기용매의 이성분계로 이루어져 있을 때에만 사용할 수 있다.

2-3. Gradient elution

구배용매조성법에서 물질의 체류시간을 예측하기 위해서는 column 내에서의 물질의 이동은 일정한 이동상의 조성 하에서는 일정한 속도를 가지고 이동한다고 가정한다. Fig. 1에서와 같이 Y축은 column의 길이로서 물질이 이동하는 구간을 나타내며, X축은 column을 통과하여 지나가는 이동상의 부피를 나타낸다[27]. 일정한 유속에서는 이동상의 부피를 시간으로 나타낼 수 있다. 구배용매조성법에서 체류인자를 계산하기 위해서 다음과 같은 가정을 하였다. (1) column을 지나가는 물질은 고정상과 평형상태를 유지하면 이동한다. (2) 각각 다른 조성의 이동상은 column 내에서 서로 섞이지 않고 이동한다. (3) 이동상의 조성이 변하면서 나중 이동상은 column 내에 평형을 유지하며 이동한다. 계단함수형 구배용매조성법(step-wise gradient mode)에서는 물질이 일정한 조성의 이동상에서 column을 통과할 때에 물질의 이동은 직선으로 나타낸다. 즉, 첫 번째 이동상의 조성에서는 Y_1 , 두 번째 이동상의 조성에서는 Y_2 이다(Fig. 1)[27]. 구배용매조성법에서의 물질의 체류부피(V_{Rg})는

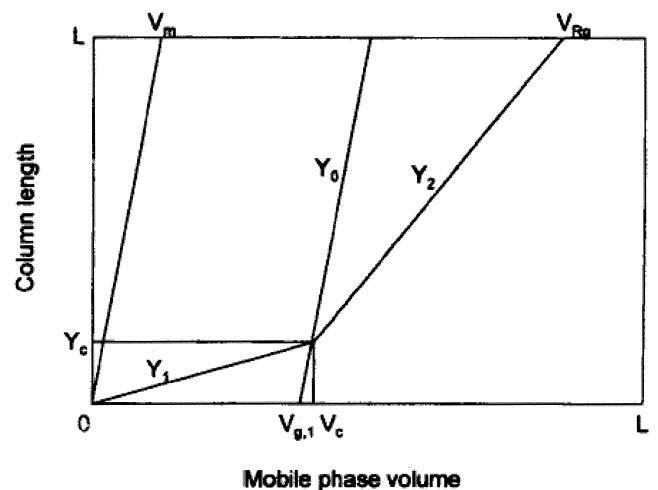


Fig. 1. Solute migration in step-wise gradient mode.

다음과 같이 계산할 수 있다.

$$V_{Rg} = V_m(1 + k_2) + V_{g,1} \left(\frac{k_1 - k_2}{k_1} \right) \quad (7)$$

V_m 은 column의 dead volume이고, k_1 과 k_2 는 각각 첫 번째 이동상과 두 번째 이동상에서의 물질의 체류인자이며, $V_{g,1}$ 은 첫 번째 이동상이 column에 들어간 부피이다. (7)식을 이용하여 선형 구배용매조성법에서의 물질의 체류부피를 계산 할 수 있다.

3. HCI 프로그램의 응용

HCI 프로그램의 상용화를 위하여 인하대학교 고순도분리연구실에서는 Deoxyribonucleosides[27, 28], Phospholipids[29], Aromatic Compounds[30], Peptides[31], Isoflavones[32], Catechine[33], Purine compounds[34] 등 부동한 종류의 물질들의 분리에 본 프로그램을 적용하였다.

3-1. Deoxyribonucleosides 분리

분석시간 등을 기준으로 일정용매조성법에서는 많은 제한성이 존재하기에 물질 분석에서 구배용매조성법을 많이 사용하고 있다. 일정용매조성법에서는 각 물질의 용량인자와 이동상에서 유기용매의 조성의 관계는 Snyder식으로 주로 표시된다[1, 3]. 그러나 구배용매조성법에서는 시간에 따라 이동상의 조성이 변하기 때문에 용량인자도 변하게 된다. 그러므로 구배용매조성법에서 물질의 용량인자를 예측하기 위해서는 용량인자를 시간에 따른 함수로 표시하는 새로운 모델식을 결정해야 한다[16, 18]. 이를 위하여 역상 액체크로마토그래피를 이용하여 다섯 가지 데옥시리보뉴클레오사이드 2-deoxycytidine(dCyd), 2-deoxyuridine(dUrd), 2-deoxyguanosine(dGuo), thymidine(dThd), 2-deoxyadenosine(dAdo)를 분리하기 위한 최적의 이동상 조건을 계산에 의해서 구한 후 이의 유용성을 실험 data와 비교하였다. 이 다섯 가지 물질들을 분리하기 위하여 물/아세트나이트릴, 물/메탄올 이성분계 이동상을 사용하였으며 각 물질의 용량인자를 이성분계의 이동상의 조성의 함수로 나타내기 위해서 각각 메탄올과 아세트나이트릴의 유기용매에 대해서 (4)-(6)식과 회귀식을 계산하였다. 사용한 용량인자의 모델식에 따라서 각 물질간의 분리도의 차이가 있다. 그러나 유기용매의 양이 적게 첨가되는 이동상의 경우의 역상 액체 크로마토그래피에서는 (5), (6)식이 Snyder의 (4)식 보다 더 잘 일치 하였고[9], (4)식의 상관계수가 (5), (6)식보다 좋지 않았고 계산된 농도 분포곡선은 실험값과 차이가 있게 된다. 때문에 단 이론에서는 선형 평형흡착 식을 가정하여 비교적 주입량이 작은 경우에 잘 일치하지만 용량인자는 이동상의 조성에 의하여 크게 변하기 때문에 정확한 함수관계를 제시하여야 이동상의 조성에 대한 최적화가 가능하며 (6)식은 이러한 목적에 부합된다. 따라서 유기 용매인 메탄올의 조성과 구배용매조성법에서의 구배시간에 대해서 최적화한 결과는 첫 번째 이동상의 조성은 순수한 물을 사용하고 구배 시간이 7분 후에 두 번째 이동상의 조성은 19% 메탄올이 포함되고 계단함수로 변하게 하는 것이다. 이 경우 Fig. 2에서 보여주다시피 계산과 실험에 의한 용출곡선이 잘 맞음을 확인할 수 있었다[28]. 물질을 분리하기 위한 최적 이동상의 조성구배시간을 실험적으로 구하기 위해서는 많은 실험을 시행 오차적으로 수행해야 되지만 이동상의 조성에 따른 체

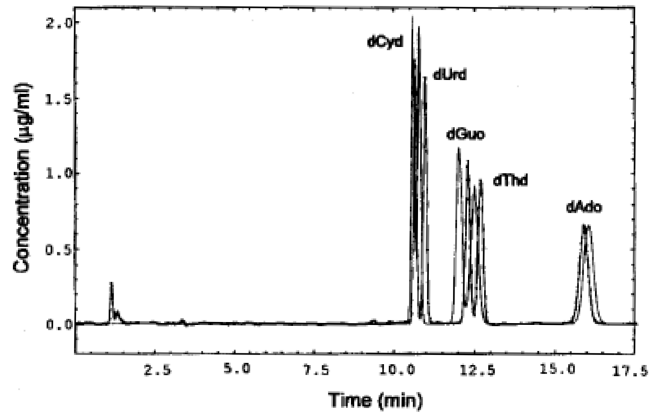


Fig. 2. Separation of deoxyribonucleosides by RP-HPLC(solid line: calculated, dotted line : experimental).

류인자를 (6)식에 의한 이동상 조성의 함수로 나타내고 계단함수인 경우 단 이론에 의하여 용출곡선을 예측할수 있다. 즉 실험횟수를 크게 줄일 수 있기 때문에 신속히 최적 분리조건을 얻을 수 있었다.

3-2. Phospholipids 분리

분석조건 최적화는 분리도와 분석시간을 사용자가 정한 범위 내에서 HCI 프로그램이 반복적으로 계산하여 최적화된 결과를 얻게 된다. 인지질은 세포막을 구성하는 물질로 생체 세포 내에서 물질의 전달에 관여하기 때문에 생 의학, 약학 등의 분야에서 중요하게 연구가 진행되고, 그 중 유용 성분으로 대두되는 것이 phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylinositol(PI), phosphatidylcholine(PC)으로 이 물질들은 대두에 많이 존재하며 식물성 기름의 제조에서 부산물로 쉽게 얻을 수 있다. 이 세가지 인지질을 분리하기 위하여 정상 액체크로마토그래피를 사용하였다. 이동상으로는 헥산(hexane), 이소프로페놀(isopropanol), 메탄올(methanol) 삼성분계를 사용하였고, 이동상의 극성을 변화 시키기 위해서 극성이 큰 메탄올의 양을 변화 시켰으며 헥산과 메탄올이 서로 극성 차이가 크기 때문에 이소프로페놀을 첨가하여 균일한 조성을 갖는 삼성분계 이동상을 사용하였다. 일정용매 조성법에서 분리한 인지질인 PE, PI, PC의 극성은 각각 큰 차이를 보이고 있기 때문에 이들을 분리하기 위해서는 구배용매조성용출법을 이용하였다. 일정용매조성용출법과 구배용매조성용출법의 실험 data를 이용하여 식 $\log k = A + BF + CF^2 + DG + EG^2$ 에서 쓰이는 상수 A, B, C, D, E를 PE, PI, PC에 대하여 구하였고 단 이론으로부터 용출곡선을 계산하였다. 우선 계산에 의한 일정용매조성법(hexane/isopropanol/methanol = 90/5/5vol%)으로 Nneutral lipids(PI와 PC)와 PE를 분리하고 PI와 PC를 분리하기 위해서는 10분의 구배시간과 두 번째 이동상을 hexane/isopropanol/methanol = 50/20/30(vol%)으로 계단함수의 구배용매조성법을 사용하는 것이다. 계산된 최적 분리조건을 실험 데이터와 비교한 결과 잘 일치하였고 이 제시된 방법은 구배용매조성법에서 최적 분리조건을 구하는데 이용될 수 있었다.

3-3. Aromatic Compounds 분리

일곱 가지의 방향족 화합물 benzene(BZ), chlorobenzene(CB), toluene(TO), styrene(ST), o-dichlorobenzene(o-DCB), p-dichlorobenzene

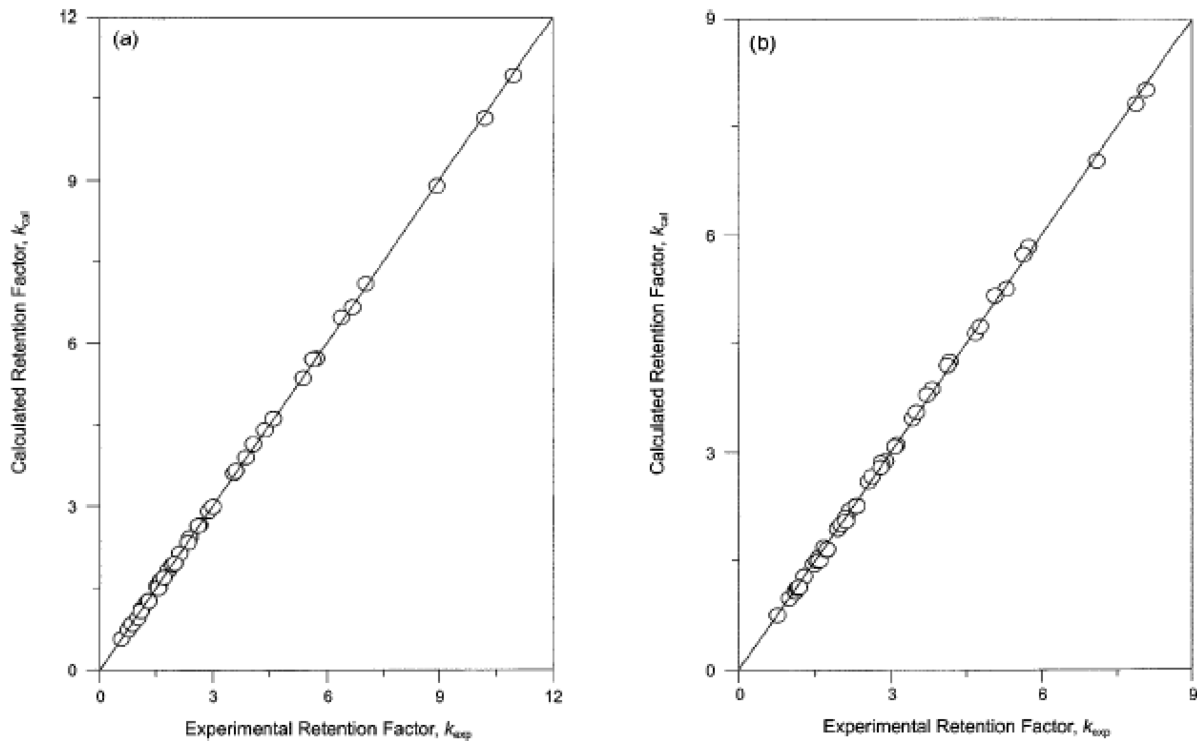


Fig. 3. Comparison of the calculated and experimental retention factors under isocratic elution(a : ethanol, b : acetonitrile, straight line : y = x).

(*p*-DCB), and *m*-xylene(*m*-XY)을 역상 액체크로마토그래피로 물에 에탄올과 아세토나이트릴을 각각 첨가하는 이성분계 이동상을 사용하여 최소한의 실험으로 부동한 이동상에서의 최적조건을 HCl 프로그램을 통하여 계산하였다. 체류 모델식(5)을 이용하여 매개변수와 상관계수를 계산한 결과 두 가지 이동상에서 각 물질에 대한 상관계수는 1에 접근하였으며 체류인자 k에 대해서 실험값과 계산값을 비교하여 보았다. Fig. 3에서 보여주다시피 계산값과 실험값이 잘 맞음을 확인할 수가 있었다[30]. 따라서 HCl 프로그램으로 두 가지 이동상에서 최적분석 조건을 찾았고 실험에 적용하여 계산된 용출 곡선과 비교를 하였으며, HCl 프로그램은 이동상이 시간에 따라 변하는 구배용매조성법의 용출곡선도 잘 예측하고 있음을 알 수 있었다.

3-4. peptide분리

분석기기용으로 널리 이용되는 크로마토그래피가 생명공학에 의한 제품들에 대한 분리, 정제의 방법으로서 연구 및 산업화가 급속히 진행중이다. 따라서 연구자들은 실제 수요에 만족시키기 위한 목적으로 생화학상 중요한 4가지 펩타이드(peptide) Angiotensin II

(Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), [Val⁴]-Angiotensin III(Arg-Val-Try-Val-His-Pro-Phe), Bradykinin(Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), [d-Ala²]-Leucine encephalin(Tyr-d-Ala-Gly-Phe-Leu)을 역상 액체크로마토그래피로 분리하는 실험을 하였다. 본 실험에서는 이동상으로 물과 아세토나이트릴에 각각 0.1%의 trifluoroacetic acid(TFA) 완충액을 첨가하여 사용하였다. 용출곡선은 이론단수와 일차 선형식 $lnk = A + BF$, 이차방정식 $lnk = A + BF + CF^2$ 를 기초로 하여 각각 계산하였다. Table 1에서는 두 가지 방정식을 이용하여 계산한 실험상수와 상관계수를 보여주고 있고, 이차방정식의 상관계수가 선형식의 상관계수보다 1에 더 접근함을 알 수 있으며, 따라서 이차방정식이 체류인자를 더 잘 예측할 수 있다는 것을 알 수 있었다 [31]. 두 가지 부동한 체류 모델식에 대하여 각각 일정용매조성법과 구배용매조성법에서의 최적조건을 계산하였고 실험에 적용시켜 그 맞음 정도를 확인하였다. 결과 완충액을 사용한 이동상 조건에서도 실험 데이터와 계산 데이터가 잘 맞는다는 것을 확인할 수 있었다.

3-5. Isoflavones 분리

이 뿐만 아니라 8가지의 이소플라본(isoflavones) daidzin, glycitin,

Table 1. Empirical constants and regression coefficients of peptides by a linear and a quadratic relationship

Material	Lnk = A + BF		Regression coefficient	Lnk = A + BF + CF ²			Regression coefficient
	A	B		A	B	C	
Angiotensin III	3.974	-0.137	0.9855	5.829	-0.279	0.0025	0.9994
Leucine encephalin	3.840	-0.119	0.9842	5.522	-0.248	0.0023	0.9993
Bradykinin	4.955	-0.164	0.9829	7.342	-0.348	0.0032	0.9987
Angiotensin II	5.091	-0.161	0.9772	7.840	-0.372	0.0037	0.9989

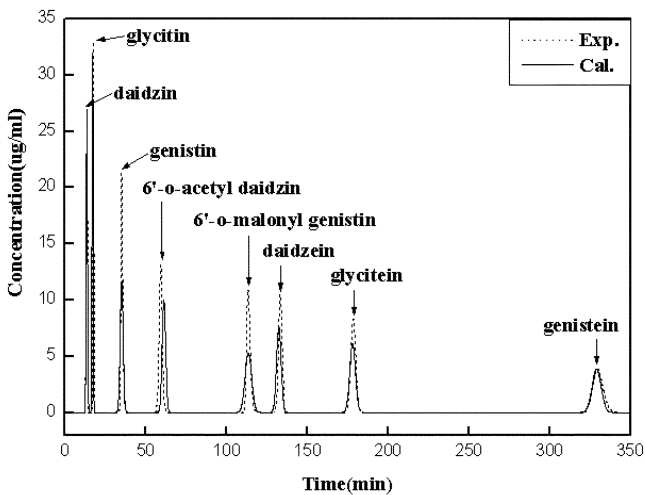


Fig. 4. Comparison of the experimental and calculated profiles in isocratic condition(F: 15%).

genistin, 6'-o-acetyl daidzin, 6'-o-malonyl genistin, daidzein, glycitein and genistein도 HCI 프로그램을 이용하여 일정용매조성법에서 최적분리 조건을 찾는 데 성공하였다. 역상 액체크로마토그래피로 물과 아세토나이트릴에 각각 0.1% 초산을 첨가하는 이동상을 사용하였으며 이 여덟 가지 물질의 분리도와 체류시간을 기준으로 최적 조건을 결정하였다. 용출곡선을 제일 잘 예측할 수 있는 체류모델(6)식 $lnk = A + BF + CF^2$ 와 단 이론을 이용하여 HCI 프로그램에 의하여 최적조건을 계산하였다. Fig. 4에서 보여주다시피 일정용매조성법에서 각각 0.1% 초산을 첨가한 이동상 물/아세토나이트릴 85/15(vol%)로 하였을 때 여덟 가지 물질들이 전부 분리가 되지만 용출시간이 매우 길었다[32]. 때문에 분리시간의 단축을 위하여 비교적 늦게 용출되는 6'-o-malonyl genistin, daidzein, glycitein, genistein 네 가지 물질을 같은 이동상에서 유기용매의 함량을 15%에서 27%로 변화시켜 보다 빠른 시간내에 용출될 수 있게 하였다. 일정용매조성법의 제한성을 극복하고 여덟 가지 물질을 분리도가 1.5이상이고 보다 짧은 분리시간에 용출하기 위하여 구배용매조성법으로 최적화 조건을 계산하였다. 즉 첫번째 이동상의 조성은 0.1% 초산을

포함한 물/아세토나이트릴 88/12을 사용하고 구배시간이 9분 후에 두번째 이동상의 조성을 유기용매함량이 15%로 계단함수로 변하게 하며, 19분 때 27%로 계단함수로 변하게 하며 30분 때 65/35(vol%)로 계단함수로 변하게 한다. Table 2에서 보여주다시피 위의 세가지 부동한 이동상 조성에서 계산된 분리도와 같은 조건에서의 실험에 의한 분리도는 잘 맞음을 확인할 수가 있었다[32].

3-6. Catechin 분리

건강과 보건품에 대한 요구가 날로 증가함에 따라 우리는 녹차에 많은 항암성, 항산화 작용의 물질들이 들어 있다는 것을 알았다. 차에 함유되어 있는 다섯 가지 카테킨 화합물 Epicatechin(EC), Gallate(EGCG), Epigallocatechin(EGC), Epicatechin gallate(ECG), Catechin(+C)은 십이지장, 피부, 심장 등에 대하여 생리학적 작용이 있다. 때문에 이 유용 성분들을 녹차에서 분리하기 위하여 이동상으로 물/아세토나이트릴, 물/메탄올에 각각 초산을 첨가하는 방법으로 역상 액체크로마토그래피를 사용하였다. 용출곡선은 단 이론으로부터 $lnk = lnk_w + SF$, $lnk = L + MF + NF^2$, $k = A + B/F$ 를 이용하여 각각 계산하였다. 그 중에서 용출곡선을 제일 잘 예측하는 2차 방정식 $lnk = L + MF + NF^2$ 를 이용하여 일정용매조성법과 구배용

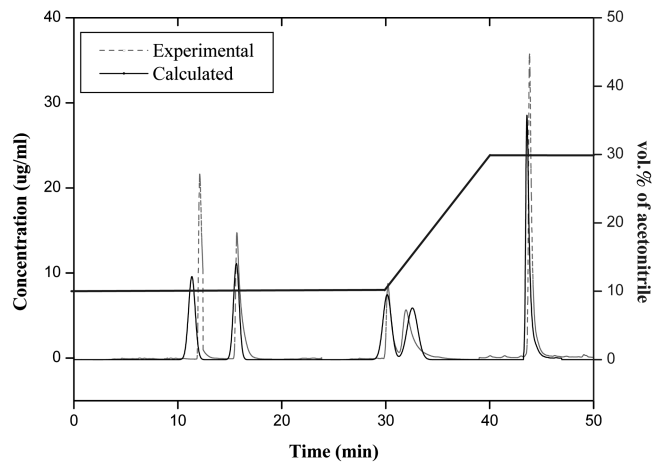


Fig. 5. Compare the experiment and calculated chromatogram of the catechin compounds in acetonitrile modifier.

Table 2. Comparison of retention times between experimental data and calculated values.

Resolution ^a	Lnk=A+BF+CF ²								
	Isocratic (case 1)			Isocratic (case 2)			Gradient (case 3)		
	Experimental	Calculated	Error (%)	Experimental	Calculated	Error (%)	Experimental	Calculated	Error (%)
R ₁₁	13.25	13.42	1.3	-	-	-	23.83	19.64	17.6
R ₁₂	17.23	16.95	1.6	-	-	-	26.10	24.74	5.2
R ₁₃	34.88	34.97	0.2	-	-	-	29.00	28.11	3.1
R ₁₄	59.13	61.10	3.3	-	-	-	30.98	30.19	2.6
R ₁₅	113.18	113.40	0.2	8.13	8.07	0.7	31.52	31.27	0.8
R ₁₆	133.17	132.28	0.7	15.53	15.33	1.3	37.53	37.36	0.5
R ₁₇	178.38	177.92	0.3	16.73	16.70	0.2	38.38	38.01	1.0
R ₁₈	329.45	329.02	0.1	35.08	34.43	1.9	44.62	45.19	1.3

Case 1: separation of eight isoflavones on isocratic mode.

Case 2: separation of aglycones (daidzein, glycitein, genistein) on isocratic mode.

Case 3: separation of eight isoflavones on gradient mode.

R₁₁ : daidzin, R₁₂ : glycitin, R₁₃ : genistin, R₁₄ : 6'-o-acetyl daidzin, R₁₅ : 6'-o-malonyl genistin, R₁₆ : daidzein, R₁₇ : glycitein, R₁₈ : genistein

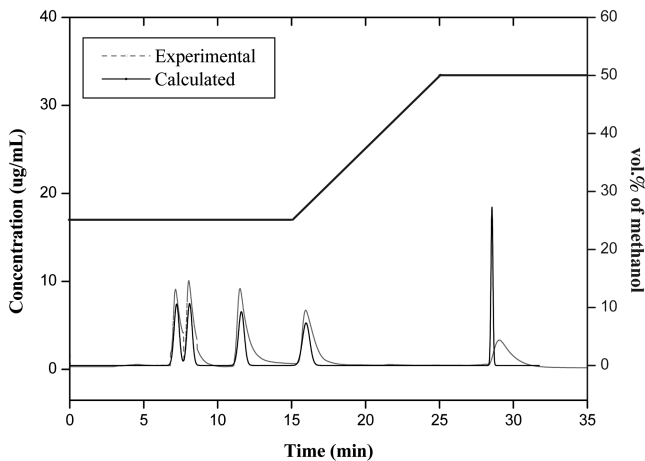


Fig. 6. Compare the experiment and calculated chromatogram of the catechin compounds in methanol modifier.

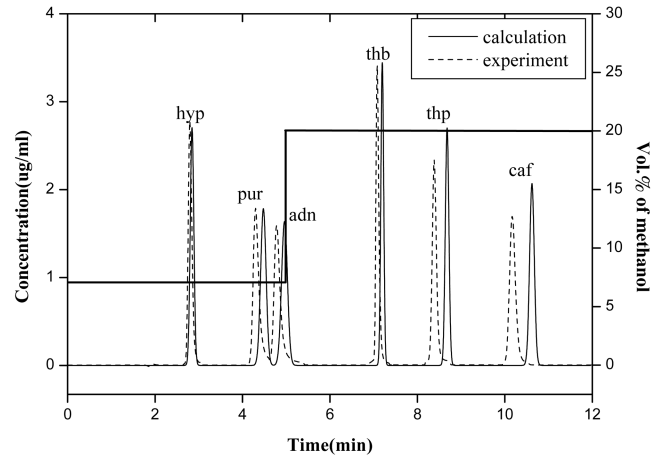


Fig. 7. Comparison of the experiment and calculated chromatogram in step-gradient mode (1st mobile phase : water/methanol = 93/7 (v/v), gradient time : 5 min, 2nd mobile phase : water/methanol = 75/25 (v/v)).

매조성법에 대해서 최적조건을 계산하였으며 분리도와 분리시간을 기준으로 두 가지 부동한 이동상 조건에서의 최적분리조건을 계산한 결과 구배용매용 조성의 조건으로 이 다섯 가지 물질을 분리할 수 있었다. 따라서 같은 조건하에 실험을 진행하여 계산에 의한 용출곡선과 비교를 하였다. 그 결과 Fig. 5와 Fig. 6에서 보여주다시피 이 두 부동한 이동상에서 계산을 통한 용출곡선과 실험을 통한 용출곡선이 잘 맞음을 확인할 수 있었다[33].

3-7. 퓨린유도체 분리

물질 분석에서 기초로 사용되고 있는 것이 일정용매조성법이다. 연구자들은 세가지 체류 모델식 Snyder, Langmuir, Binary polynomial 을 사용하여 가장 적합한 모델식을 결정하고, 단 이론(plate theory)을 사용하여 생화학상 여섯 가지 중용한 퓨린 유도체(adenine, hypoxanthine, purine, theobromine, theophylline, caffeine)를 분리하기 위한 최적 이동상 조건과 용출곡선을 HCl 프로그램으로 계산하고 같은 조건에서 얻은 실험결과와 예측한 용출곡선이 잘 일치하는지를 검증하였다. 체류모델로는 snyder, langmuir, binary polynomial 중에서 체류인자를 가장 잘 예측한 binary polynomial 를 사용하였고 분리하기 어려운 purine과 adenine의 분리도를 기준

으로 일정용매조성에서 최적분리 조건은 물과 메탄올의 조성비가 93/7(v/v)일 때 두 물질의 분리도가 1.5이상으로 나타났었다. 이 조건을 실험에 적용시켰고 실험과 계산에 의한 체류시간은 그 오차가 9% 이내로 나타남을 보여주고 purine과 adenine의 분리도가 1.5 이상으로 나타내었다(Table 3)[34]. 하지만 일정용매조성법은 분석 시간이 긴 등의 제한성이 존재한다. 퓨린 유도체에 대해서도 일정용매조성법의 제한성을 극복하기 위하여 구배용매조성법을 사용하였다. 분리하기 어려운 purine과 adenine의 분리도와 제일 늦게 용출되는 카페인인 체류시간을 기준으로 계산한 결과 이동상의 조성을 물/메탄올 93/7(v/v)에서 5분 후에 75/25(v/v)로 변경하는 것이다. 위의 조건에서 실험을 수행하여 계산 용출곡선과 실험값을 비교하였으며, 두 용출곡선이 매우 잘 일치함을 알 수 있었고 일정용매조성법에서의 오차보다 작은 5%로 나타났다(Fig. 7)[34].

4. 결 론

현재는 다양한 종류의 분리기술이 개발되어 각기 고유한 특성을 가지고 있다. 합성에 의한 생성물, 생명공학에서 파생되는 생리활성물질, 천연물에 포함된 많은 성분은 혼합물로 구성되어있고 이

Table 3. Comparison of resolution and retention time between experimental data and calculated values

Material	Hyp	Pur	Adn	Thb	Thp	Caf	
1)Isocratic I	³⁾ RS _{cal}	6.78	1.60	15.58	13.20	18.74	
	⁴⁾ RS _{exp}	7.53	1.96	20.41	16.47	20.20	
	⁵⁾ t _{R,cal} (min)	2.845	4.477	4.960	12.726	24.363	56.354
	⁶⁾ t _{R,exp} (min)	2.933	4.629	5.160	13.676	26.36	61.600
	⁷⁾ Err. of t _R (%)	2.97	3.28	3.87	6.94	7.58	8.52
2)Step-gradient II	³⁾ RS _{cal}	6.78	1.60	9.60	8.69	8.80	
	⁴⁾ RS _{exp}	6.61	1.68	10.66	7.22	7.27	
	⁵⁾ t _{R,cal} (min)	2.846	4.477	4.960	7.190	8.679	10.619
	⁶⁾ t _{R,exp} (min)	2.790	4.293	4.775	7.074	8.378	10.163
	⁷⁾ Err. of t _R (%)	2.00	4.29	3.87	1.64	3.59	4.49

¹⁾Water/methanol = 93/7(v/v), ²⁾1st mobile phase : water/methanol = 93/7(v/v), gradient time : 5min, 2nd mobile phase : water/methanol = 75/25 (v/v), ³⁾Calculated resolution, ⁴⁾Experimental resolution, ⁵⁾Calculated retention time, ⁶⁾Experimental retention time, ⁷⁾Percentage error of retention time

중에서 원하는 목적물질을 고순도로 얻기 위한 기술이 절실하게 요구되고 있다. 그 중에서 빠른 분석시간과 우수한 분리도를 가진 분석기기로서 크로마토그래피가 날로 각광 받고 있으나 수율에 미치는 변수가 서로 복잡하게 연관되어 있기 때문에 조업조건 최적화는 많은 경험과 실험이 요구된다. 또한 많은 상관된 실험 변수들이 있고 분리하고자 하는 물질의 종류가 다양하기 때문에 수학적 모델을 적용하여 시료가 관내에서 거동(behavior)을 예측하는 것이 쉽지 않다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 인하대학교 고순도분리 연구실에서 개발된 HCl 프로그램은 최소한의 실험으로 분리하고자 하는 물질의 최적분리조건을 예측할 수 있음으로 시간상 단축과 에너지 절약 등등 면에서 유리하다. 따라서 LC에만 국한된 것이 아니라 GC, SFC(supercritical fluid chromatography) 뿐만 아니라 연속식 시스템인 SMB(simulated moving bed)까지 확장될 예정이다.

참고문헌

- Row, K. H., Principle and application of Liquid chromatography, Inha University(1999).
- Barth, T., Høiland, S., Fotland, P., Askvik, K. M., Pedersen, B. S. and Borgund, A. E., "Acidic Compounds in Biodegraded Petroleum," *Organic Geochemistry*, **35**(11-12), 1513-1525(2004).
- Bennett, B., Lager, A., Russell, C. A., Love, G. D. and Larter, S. R., "Hydropyrolysis of Algae, Bacteria, Archaea and Lake Sediments; Insights into the Origin of Nitrogen Compounds in Petroleum," *Organic Geochemistry*, **35**(11-12), 1427-1439(2004).
- Kang, D. H. and Row, K. H., "Fractionation of Soybean Phospholipids by Preparative High-performance Liquid Chromatography with Sorbents of Various Particle Size," *J. Chromatogr. A*, **949**, 217-223(2002).
- Park, Y. K., Row, K. H. and Chung, S. T., "Adsorption Characteristics and Separation of Taxol from Yew Tree by NP-HPLC," *Separation Purification Technology*, **19**(1-2), 27-37(2000).
- Chung, K. K., Park, Y. K., Row, K. H. and Chung, S. T., "Pre-treatment step for Taxol Separation Process," *Chemical Industrial Science Technology*, **16**(11), 46-50(1998).
- Lee, Y. W., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V., "Reversed-Phase HPLC Retention of Deoxyribonucleosides as a Function of Mobile Phase Composition," *J. Liquid Chromatogr.*, **18**(15), 3077-3089(1995).
- Kim, J. D., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V., "Chromatographic Behaviour of Deoxyribonucleosides with respect to Organic Modifier Content in the Mobile Phase," *J. Liquid Chromatogr.*, **18**(15), 3091-3104(1995).
- Lee, Y. W., So, M. S., Lee, J. W., Chung, S. T. and Row, K. H., "Retention Models of Capacity Factor with Different Compositions of Organic Modifier in RP-HPLC," *Korean J. Chem. Eng.*, **13**(6), 578-584(1996).
- Polunina, I. A., Choi, D. K., Row, K. H. and Larin, A. V., "Adsorption Isotherm of Deoxyadenosine under the Conditions of a Reverse Phase Liquid Chromatography," *Colloid J.*, **58**(6), 805-807(1996).
- Larin, A. V. and Row, K. H., "Novel Relationship between the Capacity Factor and the Fraction of Organic Modifier in the Mobile Phase," *Russian J. of Anal. Chem.*, **52**(10), 1064-1066(1997).
- Row, K. H., "Comparison of Retention Models for the Dependence of Retention Factors on Mobile-Phase Composition in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography," *J. Chromatogr.*, **797**(1-2), 23-31(1998).
- Row, K. H. and Larin, A. V., "A Chromatographic Theory based on the Concept of a Layer of Equilibrium Adsorption," *Korean J. Chem. Eng.*, **12**(4), 442-447(1995).
- Lee, Y. W., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V., "Reversed-Phase HPLC Retention of Deoxyribonucleosides as a Function of Mobile Phase Composition," *J. Liquid Chromatogr.*, **18**(15), 3077-3089(1995).
- Kim, J. D., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V., "Chromatographic Behaviour of Deoxyribonucleosides with respect to Organic Modifier Content in the Mobile Phase," *J. Liquid Chromatogr.*, **18**(15), 3091-3104(1995).
- Jung, Y. A., Jung, S. T. and Row, K. H., "Resolution of Taxol in Terms of Mobile Phase Compositions in RP-HPLC," *HWAHAK KONGHAK*, **35**(5), 712(1997).
- Snyder, L. R. and Quarry, M. A., "Computer Simulation in HPLC Method Development. Reducing the Error of Predicted Retention Times," *J. Liq. Chrom.*, **10**(8-9), 1789(1987).
- Lee, Y. W., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V., "Reversed-Phase HPLC Retention of Deoxyribonucleosides as a Function of Mobile Phase Composition," *J. Liquid Chromatogr.*, **18**(15), 3077-3089(1995).
- Kim, J. D., Row, K. H., So, M. S., Polunina, I. A. and Larin, A. V., "Chromatographic Behaviour of Deoxyribonucleosides with respect to Organic Modifier Content in the Mobile Phase," *J. Liquid Chromatogr.*, **18**(15), 3091-3104(1995).
- Lee, Y. W., So, M. S., Lee, J. W., Chung, S. T. and Row, K. H., "Retention Models of Capacity Factor with Different Compositions of Organic Modifier in RP-HPLC," *Korean J. Chem. Eng.*, **13**(6), 578-584(1996).
- Polunina, I. A., Choi, D. K., Row, K. H. and Larin, A. V., "Adsorption Isotherm of Deoxyadenosine under the Conditions of a Reverse Phase Liquid Chromatography," *Colloid J.*, **58**(6), 805-807(1996).
- Larin, A. V. and Row, K. H., "New Relationship Between the Capacity Factor and the Fraction of Organic Modifier in the Mobile Phase," *Russian J. of Anal. Chem.*, **52**(10), 966-968(1997).
- Row, K. H., "Comparison of Retention Models for the Dependence of Retention Factors on Mobile-Phase Composition in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography," *J. Chromatogr.*, **797**, 23-31(1998).
- Row, K. H. and Larin, A. V., "Experimental Study of Influence of Slight Deviation from Adsorption Isotherm Linearity on Elution Peak Profiles," *J. Chem. Eng. Japan*, **28**(6), 851-853(1995).
- Row, K. H. and Larin, A. V., "A Chromatographic Theory based on the Concept of a Layer of Equilibrium Adsorption," *Korean J. Chem. Eng.*, **12**(4), 442-447(1995).
- Row, K. H. and Larin, A. V., "Computational Algorithm to Predict Peak Profiles in Preparative High-Performance Chromatography," *Korean J. Chem. Eng.*, **12**(5), 512-515(1995).
- Lee, J. W. and Row, K. H., "Optimum of Solvent Selectivity and Gradient Mode for Deoxyribonucleoside in RP-HPLC," *HWAHAK KONGHAK*, **35**(5), 769-775(1997).
- Lee, J. W. and Row, K. H., "Optimum condition for Resolution of Deoxyribonucleosides," *HWAHAK KONGHAK*, **36**(2), 343-

- 346(1998).
29. Lee, J. W. and Row, K. H., "Separation of phospholipids in Step-Gradient Mode," *HWAHAK KONGHAK.*, **8**(4), 694(1997).
30. Lee, J. W. and Row, K. H., "Determination of Retention Factors of Aromatic Compounds by Gradient-Elution Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography," *Korean J. Chem.*, **19**(6), (2002).
31. Lee, S. K. and Row, K. H., "Optimum Separation Condition of Peptides in Reversed-phase Liquid Chromatography," *Journar of Chromatography B.*, **800**(1-2), 115-120(2004).
32. Zheng, J. Z. and Row, K. H., "Optimum Mobile Phase Condition for Resolving Isoflavones in RP-HPLC," In preparation.
33. Jin, Y. Z. and Row, K. H., "Separation Condition for Catechin Compounds by Retention Theory in RP-HPLC," In preparation.
34. Jin, C. H., Lee, J. W. and Row, K. H., "Optimum Condition of Mobile Phase Composition for Purine Compounds by HCl Program," *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **17**(3), 317-320(2006).