

정적 방법에 의한 2-deoxyuridine(dUrd)과 2-deoxycytidine(dCyd)의 흡착 평형식

이광진^{1,*} · 이상훈² · 노경호³ · 엄병헌¹

¹한국과학기술연구원 KIST강릉분원 천연물소재연구센터, ²(재)테라급 나노소자 개발사업단, ³인하대학교 화학공학과

Adsorption Isotherms of 2-deoxyuridine (dUrd) and 2-deoxycytidine (dCyd) by Static Method

Kwang Jin Lee^{1,*}, Sang Hoon Lee², Kyung Ho Row³, and Byung Hun Um¹

¹Natural Products Research Center, KIST Gangneung

²National Program for Tera-level Nanodevices

³Department of Chemical Engineering, Inha University

Abstract Adsorption isotherm with the most fundamental information related to chromatography process is obtained experimentally. The adsorption isotherm of 2-deoxyuridine (dUrd) and 2-deoxycytidine (dCyd) with μ -Bondapak C₁₈, static method was adopted in RP-HPLC. The concentrations of mobile and stationary phases were measured with different initial concentrations of dUrd and dCyd, 1, 3, 5, 7, 10 mg/mL, respectively. The adsorption isotherm data were applied by Freundlich, Langmuir, Sips, and Radke-Prausnitz model equations. As a result of the regression analysis, standard error between adsorption isotherm of dUrd and Radke-Prausnitz equation was very low, and adsorption isotherm of dCyd was in an agreement with Sips equation very well.

Key words: static method, adsorption isotherm, 2-deoxyuridine (dUrd), 2-deoxycytidine (dCyd), HPLC

서 론

흡착은 물질을 분리하고 환경 오염물질을 제거하는 방법의 하나이다. 특히 생물분리정제 산업은 유전공학 제품의 출현과 함께 급속히 성장하고 있으며, 생물공학 제품의 다양성과 특이성으로 인해 고순도 및 고효율의 분리정제 기술이 제약 및 기능성원료 개발에 절실히 요구되고 있다(1-3). 고순도 분리정제 기술 중 가장 광범위하게 이용되고 있는 것이 흡착공정이며 이론보다는 응용이 앞섰고, 흡착공정을 설계하거나 분석하는데 매우 중요한 역할을 하는 것이 흡착 평형식이다. 흡착 평형식은 크로마토그래피 공정에서 물질의 체류 및 흡착량을 연구하는데 필수적이다. 크게 정적인 방법(static method)와 동적인 방법(dynamic method)으로 나눌 수 있는데(4), 오래 전부터 흡착 평형식을 구하기 위한 방법으로 정적방법(static method)(5,6)이 주로 사용되어 왔다.

이 방법은 한 시료와 흡착제간의 흡착관계를 알아내기 위한 가장 단순한 방법으로 이미 알고 있는 농도의 용액을 측정된 양의 흡착체에 담고 평형에 도달할 때까지 충분한 시간이 경과한 후 용액의 농도를 측정하는 방법이다(7,8). 따라서 최소한의 실험 data로부터 다양한 조건하에서 요구되는 흡착 data를 얻을 수 있으며, 물질의 분리 및 정제에 중요한 자료로 사용될 것이다(9,10).

이러한 2-deoxyuridine(dUrd)과 2-deoxycytidine(dCyd)은 데옥시

리보뉴클레오사이드(deoxyribonucleosides)로서 생물공학 산업의 중요한 성분이고 생존하는 모든 생물에서 강력한 생리학적 역할을 한다. DNA와 RNA를 구성하는 염기를 분석하는 방법에는 ultra-violet absorption, thin layer chromatographic method, gas chromatography, cation-exchange chromatography, RP-HPLC, GC-MS 등이 개발되었다. 이러한 방법들 중에서 크로마토그래피 공정을 (RP-HPLC) 이용한 방법은 높은 민감도, 정확도, 분석을 위한 시료제조의 온화한 전처리 과정 등의 장점으로 다른 분석방법들 보다 비교우위에 있다(11,12). 하지만, HPLC법에 의한 이들 염기의 분석시에 만나는 어려움중의 하나는 Cyd, dCyd, Urd, dUrd의 검출시간대가 매우 유사하여 분리가 어렵다는 것이다(13). 본 연구에서는 데옥시리보뉴클레오사이드(deoxyribonucleosides)의 혼합물을 크로마토그래피 공정을 사용하여 분리함에 있어 최적의 조건을 구하기 위하여 μ -Bondapak C₁₈에 대한 dUrd과 dCyd의 흡착 평형식을 구하여 서로 비교하여 보았다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에 사용된 표준 시료인 dUrd 및 dCyd은 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 이동상에 사용한 메탄올은 석산화학에서 구입하였고 물은 감압 펌프(Waters Co., Milford, MA, USA)와 필터(Membrane filter HA-0.5 mm, Waters Co.)를 이용하여 여과한 3차 증류수를 사용하였다. Fig. 1에는 dUrd 및 dCyd의 구조식을 나타내었다.

실험기기

실험에 사용된 분석용 column은 입자 크기가 15 mm인 물질이

*Corresponding author: Kwang Jin Lee, Natural Products Research Center, KIST Gangneung, 290 Daejeon-dong, Gangneung 210-340, Korea
Tel: 82-33-650-7270
Fax: 82-33-650-7299
E-mail: cfu0079@empas.com
Received September 20, 2007; accepted November 27, 2007

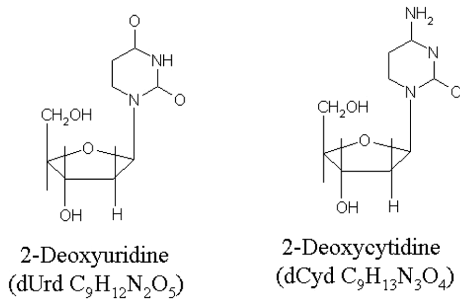


Fig. 1. Structures of nucleosides dUrd and dCyd.

충진된 μ -Bondapak(3.9×300 mm)이고, 분석용 HPLC 장치로서 Waters 515 multi-solvent delivery system, 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector(50 mL sample loop)를 포함한 Waters model 600S liquid chromatography(Waters Co.)를 사용했다. 데이터 수집은 Chromate Ver. 3.0(Interface Eng., Seoul, Korea)를 통해서 이루어졌다.

실험방법

깨끗한 삼각플라스크와 vial을 준비한 후 dUrd과 dCyd를 물/메탄올(90/10, v/v)을 이용하여 1, 3, 5, 7, 10 mg/mL의 농도로 25 mL를 만든 후 각각 20 mL는 삼각플라스크에 담았고 5 mL는 vial에 담아 표준 농도로 보관해 두었다. 플라스크에 정확히 무게를 잰 3g의 HPLC column의 충전물인 C₁₈을 넣고 이동상이 증발하지 않도록 입구를 봉한 후 계속적으로 흔들여 준다. 평형에 도달한 후(shaking time; 4 day), 분석용 HPLC에서 주입부피 20 mL 검출과장 254 nm에서 분석하였다.

각각의 시료는 농도가 매우 크기 때문에 이를 바로 HPLC로 분석했을 경우 피크가 비선형 형태를 나타내고 이 경우 피크의 면적은 시료의 양과 선형적으로 비례하지 않으므로 정확한 정량에 오차를 가져오게 된다. 그러므로, 먼저 각각의 농도를 20배 정도 같은 이동상으로 희석을 하였다. 희석된 각각의 시료와 희석된 표준 시료의 피크 면적의 차이를 계산하여 흡착제에 흡착된 양을 정확히 계산할 수 있었다. 흡착 등온선의 대표적인 물질 수 지식은 식 (1)에 의하여 표현될 수 있다.

$$M_{in} - M_{out} = M_{acc} \quad (1)$$

M_{in} 은 컬럼 입구에 들어간 용질의 양으로 컬럼을 통과하지 않은 파괴곡선의 면적이고, M_{out} 은 컬럼에서 나온 용질의 양으로 컬럼을 통과한 파괴곡선의 면적이며, M_{acc} 은 컬럼에 축적된 용질의 양이다. 또한 흡착 양은 아래의 식 (2)와 같이 표현될 수 있다.

$$M_{ads} = M_{acc} - C_0 V_0 \epsilon \quad (2)$$

M_{ads} 는 충전물에 흡착된 양이며, C_0 는 주입된 용질의 농도, V_0 는 유속, ϵ 는 이동상이 차지하는 부피 분율이다. 각 농도에 대한 흡착 농도를 실험 결과로부터 계산하며, 이를 위해 각각의 농도에서 흡착된 시료의 양을 계산하기 위해서는 표준 용액과 흡착된 용액 피크의 면적 비교가 필요하다. 한 농도에서 C_m 값(이동상 농도)은 이동상의 농도로서 그 시료의 농도에 흡착된 용액의 피크 면적과 표준용액의 비를 곱해줌으로써 구할 수 있다. 즉 식 (4)와 같이 나타낼 수 있다. 여기서 식 (3)의 환산인자(conversion factor)는 같은 농도의 시료에서의 흡착된 용매와 흡착되기 전의 농도를 같은 양의 주입을 통해 면적을 비교함으로써 얼마나 많은 양의 시료가 고정상에 흡착되었는지를 알 수 있는 지표가 된

다. C_s 값(고정상 농도)의 계산은 식 (5)와 같다. 초기 이동상(20 mL) 속에 들어있는 시료의 양은 시료의 농도에 이동상의 부피를 곱함으로써 구할 수 있다. 흡착 후의 이동상에 존재하는 시료의 양은 초기 이동상에 들어있는 시료의 양에 환산인자를 곱함으로써 구할 수 있고, 이 두 시료량의 차이가 고정상에 흡착된 시료의 양이 된다. 이 시료의 양을 고정상의 부피(1.35 mL)로 나누면 C_s 값을 구할 수 있다. 즉, 식 (5)와 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{Conversion factor} = \frac{\text{흡착된 용액의 peak 면적}}{\text{표준용액 peak 면적}} \quad (3)$$

$$C_m = \text{시료의 초기농도(mg/mL)} \times \text{Conversion factor} \quad (4)$$

$$C_s = \text{시료의 농도(mg/mL)} \times \frac{\text{이동상의 부피(mL)}}{\text{고정상의 부피(mL)}} \times (1 - \text{Conversion factor}) \quad (5)$$

이런 방법으로 C_s 와 C_m 를 구하여 여러 가지의 기본 흡착 평형식, 식 (6), (8), (10) 및 (11)에 회귀분석하여 각 매개변수 a값과 b값 그리고 필요에 따라 n값을 구하였다.

결과 및 고찰

실험으로부터 구한 dUrd과 dCyd의 C_s 와 C_m 의 관계를 Fig. 2에 표시하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, 이동상의 농도가 증가함에 따라서 고정상의 농도가 증가하지만 증가율은 이동상의 고농도에서는 완만하였다. 일정한 이동상의 농도에서 dUrd과 dCyd의 고정상의 농도를 비교하면 dCyd의 농도가 크다. 이는 dCyd이 C₁₈의 고정상에 오래 머물러 있어서 결과적으로 체류시간이 dUrd보다 커짐을 의미한다. 이 실험 data를 흡착 평형식으로 표시하기 위해서 아래의 식들에 대해서 회귀분석을 하였다.

$$C_s = a C_m^{1/n} \quad (6)$$

$$\log C_s = \log C_m + \log a \quad (7)$$

$$C_s = \frac{aC_m}{1 + bC_m} \quad (8)$$

$$1/C_s = 1/a C_m + b/a \quad (9)$$

$$C_s = \frac{aC_m^n}{1 + bC_m^n} \quad (10)$$

$$C_s = \frac{aC_m}{1 + bC_m} \quad (11)$$

식 (6)과 (7)은 Freundlich 흡착 평형식, 식 (8)과 (9)는 Langmuir 흡착 평형식, 식 (10)과 (11)은 각각 Sips와 Radke-Prausnitz의 흡착 평형식이다. 식 (7)에서는 a와 n값, 식 (9)에서는 a와 b 값을 각각 선형 회귀분석하여 구하였으며, 식 (10)과 (11)의 a, b, n의 값은 Fortran으로 작성한 프로그램을 사용하여 구하였다. dUrd과 dCyd에 대한 각각의 흡착 평형식에서의 매개변수 값과 표준편차를 Table 1에 나타내었다. Freundlich 흡착 평형식을 적용한 경우 dUrd과 dCyd 모두 n값이 1보다 커지는 값을 나타내었으며 Fig. 2에서 보는 바와 같이 dCyd의 경우 고농도의 이동상에서는 계산값과 실험값이 잘 일치하지 않았다. Langmuir 흡착 평형식을 적용한 경우 표준편차가 약 10%로 dUrd과 dCyd의 흡착 평형식을 Langmuir식으로 나타내기는 곤란하였다. 이에 비해서 dUrd의 경우 Freundlich, Sips 및 Radke-Prausnitz식을 적용하였을 때 계산

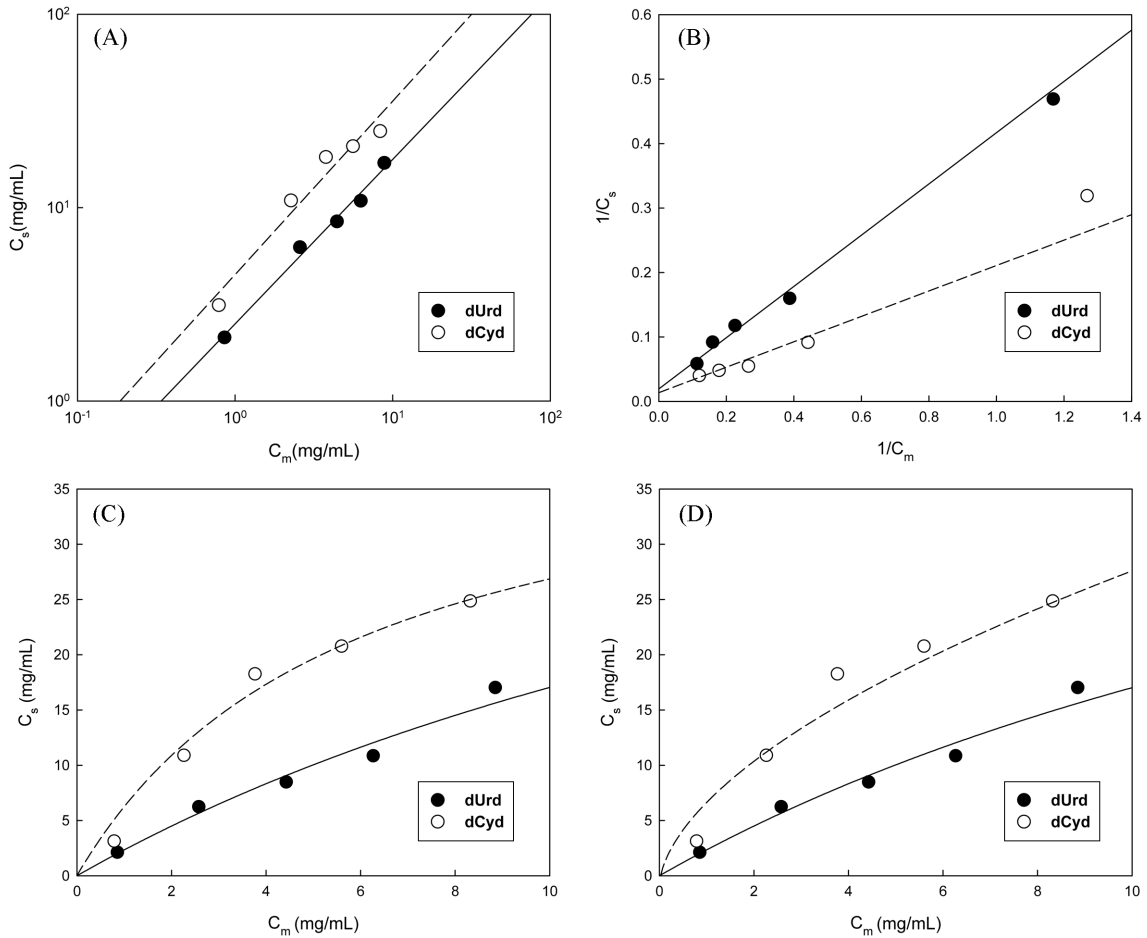


Fig. 2. Plot of C_m and C_s for Freundlich isotherm (A), Langmuir isotherm (B), Sips isotherm (C), and Radke-Prausnitz isotherm (D).

값과 실험값이 비교적 잘 일치하였으며 이 중에서 Radke-Prausnitz 식이 표준편차가 가장 작았다. dCyd의 경우에는 Freundlich, Langmuir 및 Radke-Prausnitz식을 적용하였을 때보다 Sips식을 적용하였을 때 계산값과 실험값이 가장 잘 일치하였다. 본 연구에서 사용한 HPLC에 의한 DNA와 RNA 염기의 분석법은 검출 한계치가 0.2 nmol, 신뢰농도구간은 50-2,500 pmol 수준으로 매우 정확한 분석법이다(11). 하지만, 식품이나 세포에서 핵산의 분리, 변성, 효소적 분해(DNase, nuclease P1, bacterial alkaline phosphatase) 공정에서 필연적으로 생성되는 DNA와 RNA 염기들이 함께 공존한다(11,12). 이러한 복잡한 염기로 인해 분석시간이 길어지고, 특히나 Urd, dUrd, Cyd, dCyd의 분석에 어려움을 야기한다. 최근에는 식품분야에서도 미생물의 분리와 동정, 식품의 효능 연구 등에 DNA와 RNA에 대한 활발히 진행되고 있으므로

(14-15), 본 연구결과는 이들 분야에 기여할 것으로 기대한다.

요 약

데옥시리보뉴클레오사이드(deoxyribonucleosides)의 혼합물을 크로마토그래피 공정을 사용하여 분리함에 있어 최적의 조건을 구하기 위하여 dUrd과 dCyd의 흡착 평형식을 구하여 서로 비교하여 보았다. 이동상과 고정상의 농도를 가장 적합한 흡착 평형식으로 표시하기 위하여 네 가지 모델의 평형식을 선정하고 회귀 분석에 의해 각각의 매개변수 값과 실험치와의 표준편차를 구하였다. dUrd의 경우 Radke-Prausnitz 식을 적용하였을 때 표준편차가 가장 작았으며, dCyd의 경우에는 Sips식을 적용하였을 때 계산값과 실험값이 가장 잘 일치하였다.

Table 1. Parameters and average errors of adsorption isotherms

Adsorption isotherms	2-deoxyuridine (dUrd)				2-deoxycytidine (dCyd)			
	a ¹⁾	b ¹⁾	n ¹⁾	errors ²⁾	a ¹⁾	b ¹⁾	n ¹⁾	errors ²⁾
Freundlich	2.51	-	1.18	6.83	4.51	-	1.12	14.53
Langmuir	2.51	0.48	-	7.71	5.07	0.69	-	11.24
Sips	2.52	0.28	0.93	6.66	5.01	0.17	1.56	2.63
Radke-Prausnitz	2.87	0.17	0.60	6.57	4.28	0.42	0.82	9.16

¹⁾Parameters of adsorption isotherms

²⁾Average errors of adsorption isotherms

감사의 글

본 연구는 인하대학교 화학공학과 고순도분리연구실에서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lisec O, Hugo P, Seidel-Morgenstern A. Frontal analysis method to determine competitive adsorption isotherms. *J. Chromatogr. A* 908: 19-34 (2001)
2. Choi YS, Lee JW, Row KH. Comparison of frontal analysis and pulsed input method for determining adsorption isotherm. *Hwahak Konghak* 38: 474-478 (2000)
3. Huang J, Zhou Y, Huang K, Liu S, Luo Q, Xu M. Adsorption behavior, thermodynamics, and mechanism of phenol on polymeric adsorbents with amide group in cyclohexane. *J. Colloid Interf. Sci.* 316: 10-18 (2007)
4. Kim BU, Koo HS. Determination of adsorption isotherms of gaseous ternary system by concentration-pulse technique. *Hwahak Konghak* 34: 165-170 (1996)
5. Guiochon G, Golshan-Shirazi S, Katti AM. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. Academic Press, Boston, MA, USA. pp.127-128 (1995)
6. Guiochon G, Golshan-Shirazi S, Katti AM. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. 2nd ed., Academic Press, Boston, MA, USA. pp.147-148 (2006)
7. Hong SP, Choi DY, Row KH. Determination of adsorption isotherm of caffeine by using molecular imprinted polymer. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 15: 478-481 (2004)
8. Choi YS, Row KH. Adsorption isotherms of phenol and o-cresol by static method. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 11: 344-346 (2000)
9. Kalies G, Bräuer P, Messow U, Kärger J. Calculation of separation diagrams from ternary liquid adsorption on activated carbons. *Separ. Purif. Technol.* 20: 41-48 (2000)
10. Kalies G, Bräuer P, Rouquerol F. Prediction of ternary liquid adsorption on solids from binary data. *J. Colloid Interf. Sci.* 229: 407-417 (2000)
11. Kuo KC, McCune RA, Gehrke CW. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleotides in DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4763-4776 (1980)
12. Gehrke CW, McCune RA, Kuo KC. Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatography of major and modified nucleotides in DNA. *J. Chromatogr.* 301: 199-219 (1984)
13. Jang KH, Chambers PJ, Britz ML. Analysis of nucleotide methylation in DNA from *Corynebacterium glutamicum* and related species. *FEMS Microbiol. Lett.* 136: 309-315 (1996)
14. Choi JG, Shim WB, Je JH, Kim JY, Lee KH, Kim MG, Ha SD, Kim KS, Kim KY, Kim CH, Chung DH. Development of immunochromatography for the rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 299-303 (2007)
15. Lee SY, Jang KI, Woo GJ, Kwak HS, Kim KY. Development of protocol for the effective detection of feline calicivirus as norovirus surrogate in oyster and lettuce. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 71-76 (2007)