

8. C₁₈ 칼람에서 이동상 조건 개발 법

소개

역상 칼람에서 ODS(octadecyl)그룹을 실리카에 본딩한 칼람(C₁₈, ODS)는 가장 널리 사용하는 방법입니다. C₁₈ 칼람용으로 가장 적당한 이동상으로는 자신의 경험과 제조사에서 제공하는 응용자료나 시험 조건 인쇄물을 참조하여 제조할 수 있습니다. 이 부분은 전통적인 이동상 조건 개발 법을 보여 줍니다. 다음은 일반적으로 사용하는 칼람의 예입니다.

총진물: COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, COSMOSIL 5C₁₈-AR-II
 칼람 크기(내경, I.D x 길이): 4.6 x 150mm

이동상 조건 개발 법

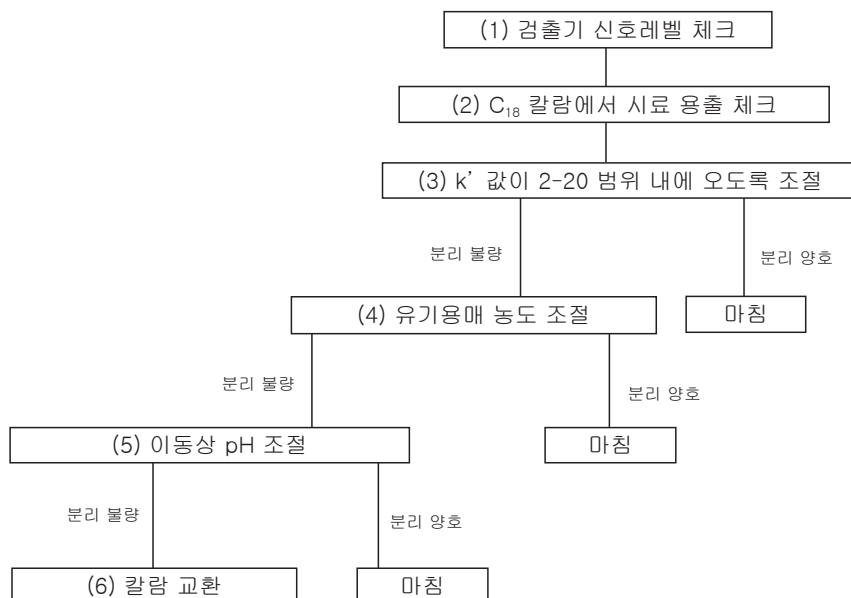
등 용매 법(Isocratic method)에서 이동상은 분석 중에 용매구성비가 변하지 않고 일정합니다. 구배 법(Gradient method)은 시간에 따라 용매 구성비가 변합니다. 이 두 가지 방법은 양호한 시료 분리를 위해서 칼람의 온도 조절 및 엄격한 이동상 준비가 필요합니다.

● 등 용매 법(Isocratic method)

일반적으로 이동상 조건 개발을 하기 위해서 다음과 같이 진행합니다. 먼저 시료가 검출기에 검출이 되는지 확인하고 강한 용매 조건으로 시료를 용출시킵니다. 그래서 이동상 조건을 변화시키면서 시료의 분리 조건을 조절합니다.

시료의 머무름 시간을 짧게 하려면 강한 용출 효과를 갖는 용매조건의 농도로 하고 시료의 머무름 시간을 길게 하려면 그 농도를 감소시킵니다. 만약 시료가 산이나 아민 그룹같이 이온화하기 쉬운 물질이라면 버퍼와 함께 pH조절이 필요합니다. 이온화 조절방법 또는 이온-페어(ion-pair) 크로마마토그래피 방법은 공통적으로 이온화된 시료의 머무름을 증가시키기 위하여 사용합니다. 이 방법은 이온-페어 시약(예., 염기성 화합물용은 alkyl benzene sulfonate, 산성 화합물용은 quaternaty ammonium)을 이동상 첨가하여 시료가 이온 쌍이 형성이 되도록 하기 위해서 사용합니다.

(예..) 기초 조건 셋팅 순서



1. 빨리 용출되는 용매에서 검출되는 시료를 체크. 이 단계에서 칼럼 없이 직접 검출기에 연결하여 시료의 검출 체크.
2. 메탄올과 물이 혼합된 이동상을 이용하여 C₁₈에서 시료의 용출을 체크하고 시료의 탄소 수 및 그와 관련 된 참고자료 참고.
3. 이동상의 메탄올 양을 변화시키면서 k' 값을 2-20 범위 내에 오도록 조절.
4. 만약 분리가 불량하면 메탄올을 아세토나이트릴로 바꾸거나 THF를 첨가하여 α값(분리계수)을 변화시킵니다.
5. 테일링 피크가 염기성 화합물에서 발생하면 버퍼 이동상의 pH를 조절합니다.
6. 5단계에서 분리가 만족스럽지 않으면 다른 C₁₈ 칼럼으로 바꾸거나 고정상 재질이 알킬 베이스(alkyl based), 아로마틱 베이스(aromatic based) 또는 기타 재질의 다른 고정상으로 바꾸어서 실행합니다.

● 구배 법(Gradient Method)

구배 법은 이동상에서 연속적으로 유기용매의 농도를 변화시킵니다. 이 방법은 유기용매의 농도를 약간 변화시키면서 시료의 머무름 시간을 크게 변화시킬 수 있는 방법으로서 특히 용출 시간이 긴 광범위한 소수성(hydrophobicity) 분자 시료의 짧은 분리 시간에 유용합니다. 또한 이 방법은 펩타이드와 같은 화합물의 큰 분자량 시료에 유용합니다. 굴절율(RI) 검출기는 구배 법 방법에 의한 이동상 개발에 적당치 않습니다.

쉬운 이동상 조건 만드는 법

순상 크로마토그래피는 박층(Thin layer) 크로마토그래피를 이용하여 쉽게 용매 조건을 찾을 수 있지만 역상 크로마토그래피는 이동상 조건을 쉽게 만들기가 어렵습니다. 그래서 이동상의 혼합비(유기용매의 농도)는 종종 반복된 실험을 통하여 결과를 얻습니다. 만약 용질(시료)의 화학적 구조를 안다면 여기에 적당한 이동상 유기용매 농도를 설명하였습니다.

기본 화학적 구조의 적절한 유기용매 농도 + 치환 기(substituents)의 효과 = 가장 좋은 유기용매농도

● 조건 셋팅

그림 1의 기본 화학적 구조의 머무름 시간을 근거로 조건을 선택하고 헤테로 원자(hetero atom)와 치환 기의 효과로 조절합니다.

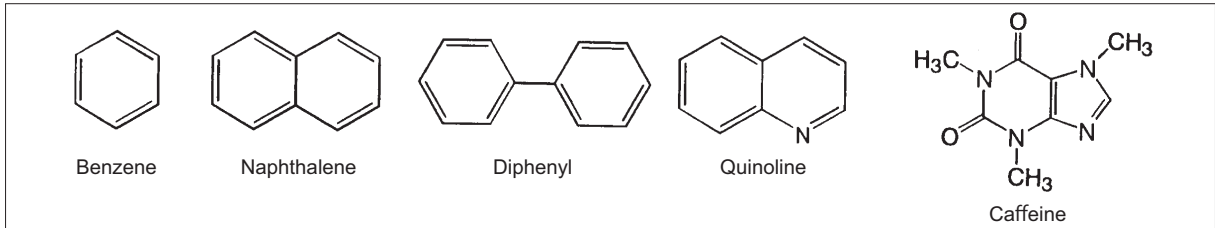
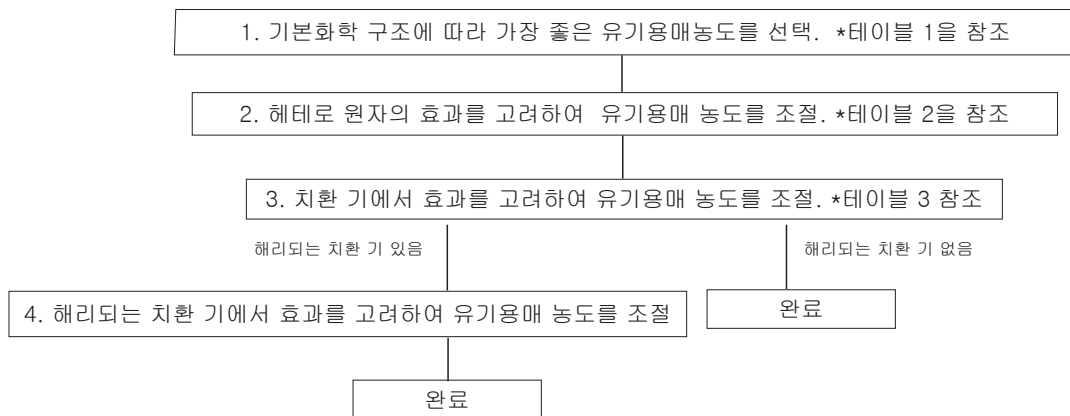


그림 1. 기본 화학적 구조



1. 그림 1에서 목표 시료와 유사한 기본화학 구조를 선택. 가장 좋은 유기용매 농도를 선택.

테이블 1. 기본화학 구조의 머무름 시간.

기본 구조	칼럼	다른 메탄올 농도에서의 머무름 시간(분)						
		80%	70%	60%	50%	40%	30%	20%
Benzene	5C ₁₈ -MS-II	-	4	7	11	20	-	-
	5C ₁₈ -AR-II	-	4	7	13	23	-	-
Naphthalene	5C ₁₈ -MS-II	5	8	18	-	-	-	-
	5C ₁₈ -AR-II	5	10	22	-	-	-	-
Diphenyl	5C ₁₈ -MS-II	8	13	-	-	-	-	-
	5C ₁₈ -AR-II	7	15	-	-	-	-	-
Quinoline	5C ₁₈ -MS-II	-	-	-	-	6	11	-
	5C ₁₈ -AR-II	-	-	-	-	8	17	-
Caffeine	5C ₁₈ -MS-II	-	-	-	-	-	4	9
	5C ₁₈ -AR-II	-	-	-	-	-	4	9

칼럼: COSMOSIL 4.6 mm I.D. × 150 mm 유속: 1.0 ml/min 검출 파장: UV 254 nm

2. 테이블 2에서 헤테로 원자에서 효과를 고려하여 유기용매 농도를 조절.

테이블 2. 헤테로 링(hetero rings)또는 폴리싸이클릭 아로마틱(polycyclic aromatics)을 참조로 유기용매 농도 조절

헤테로 링, 폴리싸이클릭 아로마틱	시료	5C ₁₈ -MS-II	5C ₁₈ -AR-II
1개의 켈레링 (Conjugate Ring)	Benzene	+10%	+10%
헤테로 싸이클릭 헤테로 원자	1 of S Thiophene	±0%	±0%
	1 of O Furane	-5%	-5%
	1 of N Pyridine	-20%	-10%
1개의 카보닐 그룹(carbonyl)	Quinone	-5%	-5%
1개의 이중결합	-	-5%	-5%

3. 테이블 3에서 치환 기에서 효과를 고려하여 유기용매 농도를 조절.

테이블 3. 치환 기에서 유기용매 농도 조절

치환 기	메탄올 농도		치환 기	메탄올 농도
	5C ₁₈ -MS-II	5C ₁₈ -AR-II		
-F	0	0	-CH ₂ - (알칼-체인) 기본구조에서 MeOH 농도	100-90% +10% (4 of -CH ₂ -) 90-80% +10% (3 of -CH ₂ -) 80-60% +10% (2 of -CH ₂ -) < 60% +10% (1 of -CH ₂ -)
-Cl	+10%	+10%		
-Br	+10%	+10%		
-I	+20%	+15%		
-CONH ₂	-40%	-40%		
-COCH ₃	-10%	-10%	-Phenyl 기본구조에서 MeOH 농도	100-90% +5% (1 of - Phenyl) 90-60% +10% (1 of - Phenyl) < 60% +20% (1 of - Phenyl)
-COOCH ₃	0	0		
-OCH ₃	0	0		
-CHCH ₂ O	-10%	-10%		
-CH ₂ OH	-30%	-30%		
-OH	-30%	-30%		
-NO ₂	-10%	-5%		
-CN	-20%	-15%		
-NH ₂	-40%	-30%		
-SCH ₃	+10%	+10%		

칼럼: COSMOSIL 4.6 mm I.D. x 150 mm
유속: 1.0ml / min 검출 파장: UV 254 nm

* 치환 기의 위치에 따라 효과는 이동합니다.

4. 해리 치환 화합물은 pH의 민감한 변화에 지극히 예민합니다. 재현 성 있는 데이터를 얻기 위해서 일정한 이동상 pH를 유지시켜야 합니다. 테이블 4는 치환 기들이 산(pH2)이나 중성(pH)에 머무름 시간이 영향을 받는 것을 나타냅니다.

테이블 4. 해리 치환 화합물의 유기용매의 효과

해리 치환 화합물	메탄올농도(pH 2)의 조절	메탄올농도(pH 7)의 조절
-COOH	-10~-20%	-30~-40%
-SO ₃ H	-20~-40%	-30~-40%
-PO ₄ H ₂	-20%	-50%
-BO ₂ H ₂	-20%	-20%
-NH ₂ (molecular 타입)	-60%	-10%
-NH ₂ (cyclic amine)	-50~-60%	-10~-20%
-NH ₂ (ionic 타입)	-	-40~-50%

칼럼 :COSMOSIL 5C₁₈-MS-II, 4.6 mm I.D. x 150 mm
Buffer pH2 :20mmol/l H₃PO₄
pH7 :20mmol/l H₃PO₄/Na₂HPO₄=2/3
유속 :1.0 ml/min
검출 파장 :UV 254 nm

기술 정보

● 조건 셋팅의 예

칼럼: COSMOSIL 5C18-MS-II 4.6 mm I.D. × 150 mm

(1) 5-Benzyloxyindole

<계산> 기본 구조 Naphthalene + (hetero ring N)
=70%+ (-20%)
=50%

치환 기 (phenyl) + (-OCH₂-는 -OCH₃ 와 같음)
=(+10%) + (+0%)

기본 구조 + 치환 기 = 50% + (+10%) = 60%

<결과> 60%메탄올(메탄올:물=60:40)
머무름 시간 = 13.7분

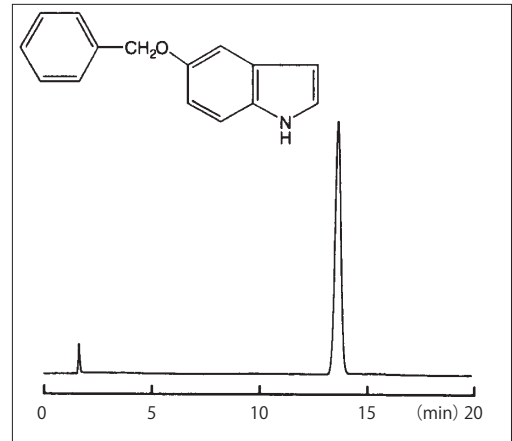


그림2. 5-Benzyloxyindole의 분석

(2) Homovanillic Acid

<계산> 기본 구조 Benzene=60%

비 해리 치환 기 (-OH) + (-OCH₃) + (-CH₂)
=(-30%) + (0%) + (+10%)
= -20%

비 해리 치환 기 -COOH = -10~-20% (pH2)
-30~-40% (pH7)

기본 구조 + 치환 기 = 메탄올 농도는
산(acid)범위(pH2) 30-20%
중성 범위 (pH7) 10-0%

< 결과> (pH2) 30%메탄올 : 머무름 시간 = 5.7분
20%메탄올 : 머무름 시간 = 4.0분
(pH7) 10%메탄올 : 머무름 시간 = 4.0분
0%메탄올 : 머무름 시간 = 12.분

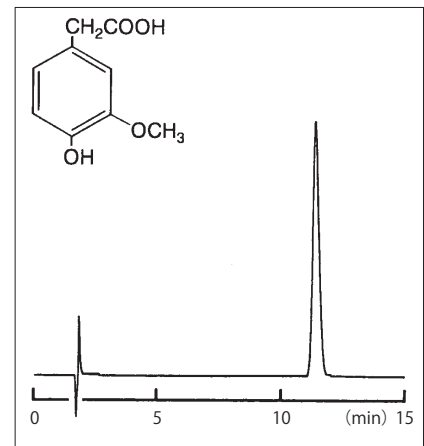


그림3. 20%메탄올(pH 2)의 분석

*실제 머무름 시간 예측 결과는 유기용매 농도 계산의 오차에 의하여 결과는 ±10% 범위에 있을 수 있습니다.