

RP-HPLC에서 Buffer와 메탄올의 조성에 의한 Mononucleotides 체류인자의 조절

강 덕 희 · 이 주 원 · 노 경 호
화학공학과, 인하대학교
(접수 : 2000. 7. 28., 게재승인 : 2000. 9. 18.)

Modification of Retention Factor of Mononucleotides by Compositions of Buffers and Methanol in RP-HPLC

Duk Hui Kang, Ju Weon Lee, Kyung Ho Row†
Department of Chemical Engineering., Inha University.
(Received : 2000. 7. 28., Accepted : 2000. 9. 18.)

Due to the advantage of RP-HPLC with a variety of compositions of mobile phases, experiments on water-soluble charged species were examined. The samples were mononucleotides (5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-AMP), and the buffers used were sodium phosphate monobasic and acetic acid. The concentrations of buffers ranged from 0.01 to 10 mM, while that of the methanol, an additive to the mobile phase was 5 to 20 vol.%. To predict the retention factor of a sample in terms of its methanol composition (M , vol.%) and buffer(C_B , mM), the following nonlinear equation is suggested,

$$k = \frac{a + b C_B}{(1 + c C_B) M^d}$$

where a , b , c , and d were experimentally determined constants. The regression coefficients were above 0.96, and the agreement between experimental and calculated retention factors were relatively good.

Key Words : mononucleotide, buffer, organic modifier, retention factor, RP-HPLC

서 론

Nucleotides는 생명체의 유전 물질인 DNA의 구성물질로 핵산염기, D-ribose, 인산 3종류의 분자가 결합한 핵산을 구성하는 기본 단위이다. 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 phosphodiester형으로 결합한 adenosine-3', 5'-monophosphate (cyclic AMP, cAMP)는 대사 조절에 중요한 작용을 한다. 이외에 중요한 보조효소인 NAD, NADP, FAD, Coenzyme A, vitamine B12 등도 nucleotide의

유도체이다(1).

역상 액체 크로마토그래피 (reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)는 액상 혼합물의 분리 및 분석에 있어서 대표적인 기기이다(2, 3). 거의 모든 액상시료의 분리 및 분석이 가능한 역상 액체 크로마토그래피는 이동상으로는 물 (water), 메탄올 (methanol) 그리고 아세토나이트릴 (acetonitrile)을 사용한다(4). 정지상으로는 실리카 표면에 C_{18} 이나 C_8 을 결합시킨 비극성 물질을 사용한다(5). 시료의 극성이 낮거나 이온화 되지 않는 경우 위의 정지상과 이동상을 사용하여 적절한 분리 조건을 설정 할 수 있다(3, 4). 이온성 혹은 극성이 큰 시료가 이동상에 용해되었을 때 시료는 체류하지 않고 그대로 용출되기 때문에 분리 및 분석에 어려운 점이 있다(6). 비극성 정지상에 이온성 물질 혹은 극성 물질이 체류하기 위해서는 이동상에 적절한 완충용액이나 염을 첨가하여서 극성인 시료를 비극성화 하여야 한다. 비극성화된 시료는 비극성 정지상에 체류함으로써 분리할 수 있다(6, 7). pH를 조절하여 이온성 혹은 극성시료를 분리 및 분석한 많은 연구결과가 있다(6-9). 하지만 각각의 실험에서 pH의 조절이 어렵고 그 pH를 유지하기가 어렵기 때문에 이번 연구에서는 pH의 조절 대신 완충용액을 사용하여 이온성 시료

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

의 분리 및 분석을 수행하였다.

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 salt (5'-AMP)의 체류거동을 물-메탄올의 이성분계 이동상에 buffer (sodium phosphate monobasic 또는 acetic acid)를 첨가하여 농도에 따른 체류거동과 메탄올의 양에 따른 체류거동을 예측하기 위한 모델식을 구하는 것이다. 완충용액의 농도를 조절함으로써 이온성 시료의 체류시간이 바뀔 수 있었다. 농도를 높이면 mononucleotides의 체류시간이 뒤로 나온다. 또한 메탄올의 첨가로 시료를 좀더 빨리 용출되게 함으로써 용매의 절약할 수 있다. 실험데이터를 바탕으로 이온성 시료의 비극성 정지상내에서의 거동을 예측하였다.

이론

고정상의 표면이 C₁₈인 역상인 경우 비극성의 성질을 가지고 있으므로 이동상내에서 이온으로 용해되어 있는 물질은 고정상에 거의 체류하지 않게 된다. 용해되어 음이온으로 존재하는 시료의 비극성 고정상에 대한 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 가정한다. 평형상태의 이온과 비이온 농도의 비를 이온화상수 K_S 로 하면, 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 시료에서 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 주입하면, 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 선형으로 가정하였다.

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

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

$$k = \frac{\frac{k_0 K}{K_S} C_B + k_-}{1 + \frac{K}{K_S} C_B} \quad (7)$$

위의 식 (7)은 이동상 내에서 buffer의 농도에 따른 체류인자의 변화를 나타내는 반 실험식(semi-empirical equation)으로 본연구의 결과로서 제안하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용된 mononucleotide는 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 메탄올은 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 메탄올의 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. 시료는 150ppm의 수용액을 만들어 20 μl를 주입하였다. 모든 실험은 상온에서 행하였다.

결과 및 고찰

RP-HPLC에서 이동상에 buffer가 첨가되어 pH가 변하면 이전의 연구자들은 이동상의 pH에 따른 체류인자의 변화를 예측하였다(6-9). 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. 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC)는 이동상으로는 극성인 물

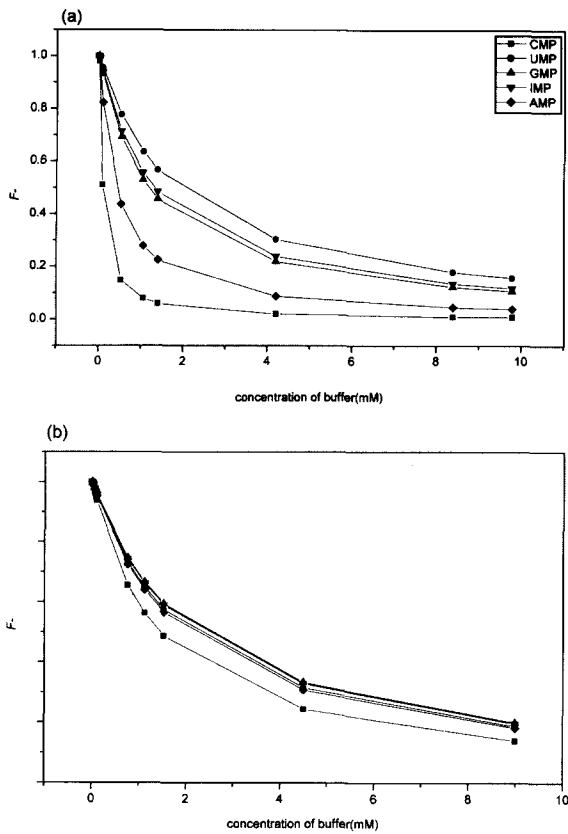


Figure 1. Mole fraction of ionized sample of mobile phase on methanol 10 vol. % (a = acetic acid, b = sodium phosphate)

을 기본으로 사용하고, 고정상으로는 실리카 표면에 C₁₈을 코팅하여 사용한다(5). 이동상내에서 시료가 이온성 혹은 극성인 경우 시료는 비극성 고정상인 C₁₈표면에 체류하지 않고 바로 용출되기 때문에 시료를 분리 할 수 없다. 이온성 시료를 분리 및 분석하기 위해서 이동상에 시료의 극성과 반대되는 buffer를 첨가하여 사용한다(6, 7). 이온성 시료는 buffer와 결합하여 비극성화를 이루고 C₁₈고정상에 체류하며, 분리가

가능하게 된다(11-15).

Buffer 농도의 영향

Mononucleotide는 이동상내에서 완전히 이온화된다고 가정하면, 각각의 mononucleotide에 대해서 이동상중의 buffer의 농도가 증가함에 따라서 이온화 되는 정도가 작아지며, 결국에는 거의 일정한 값을 갖는다 (Figure 1). Buffer의 농도가 커지면 용매속의 양이온의 양이 많아지며, 시료의 전부가 양이온과 결합하여 비극성이 된다. Buffer의 농도가 어느 정도 이상이 되면, 각각의 물질은 buffer의 양에 관계없이 이온화가 된다는 것을 알 수 있다. 비극성화된 시료는 비극성 고정상에 체류함으로써 mononucleotide의 분리 및 분석이 가능하게 된다. Buffer로서 acetic acid와 sodium phosphate monobasic을 사용했을 때 각각의 mononucleotides에 대한 이온화되는 정도가 다른 이유는 acetic acid에서의 나온 H⁺이온과 sodium phosphate에서의 Na⁺이온의 다른 결합하는 강도가 다르며, H⁺이온이 시료와 결합하여 상대적으로 안정한 비극성화를 이루었다. H⁺이온이 Na⁺이온에 비해서 크기가 작음으로 각각의 mononucleotide와 결합할 때 더욱 안정화를 이룬다. Buffer의 종류에 따라서 mononucleotides의 이온화되는 정도가 다르며, 체류인자도 변화함을 알 수 있다.

메탄올 함량의 영향

역상 액체 크로마토그래피에서는 극성이 큰 물과 이보다 극성이 작은 유기용매를 사용한다(2-4). 메탄올, 아세토나이트릴과 같은 유기용매를 첨가하여 비이온 시료들간의 체류인자를 조절하게 된다. 이온으로 존재하는 시료에서 메탄올 유기용매의 함량에 따른 체류인자에 미치는 영향을 고찰하였다. 식(7)에서 포함된 세 가지 매개변수 k₀, k, K/K_S는 비선형 회귀분석법 중에서 Levenberg-Marquardt 최적화에 의하여 구하였으며 신뢰도와 허용오차는 각각 0.95, 0.05였다. 상관계수 (r²)를 거의 1에 근사한 값을 얻었다 (Table 1 and 2). 메탄올

Table 1. Parameters of Eq. (7) in acetic acid

Material	Methanol (vol. %)	Acetic acid			
		k ₀	k	K/K _S	r ²
5'-CMP	5	2.336	0.632	11.876	0.99236
	10	1.815	0.598	10.990	0.98247
	15	1.595	0.587	9.876	0.98593
	20	1.476	0.588	8.966	0.98426
5'-UMP	5	1.447	0.464	0.375	0.98965
	10	1.159	0.432	0.546	0.98877
	15	1.038	0.409	0.810	0.95243
	20	0.980	0.396	0.951	0.93610
5'-GMP	5	2.692	0.491	0.609	0.99320
	10	1.744	0.424	0.851	0.99910
	15	1.368	0.392	1.136	0.98833
	20	1.195	0.382	1.273	0.97728
5'-IMP	5	2.150	0.489	0.507	0.99061
	10	1.470	0.433	0.759	0.99593
	15	1.206	0.405	1.073	0.96873
	20	1.081	0.392	1.161	0.95424
5'-AMP	5	4.009	0.723	2.384	0.99243
	10	2.568	0.568	2.468	0.99715
	15	1.975	0.503	2.519	0.99085
	20	1.693	0.478	2.121	0.98685

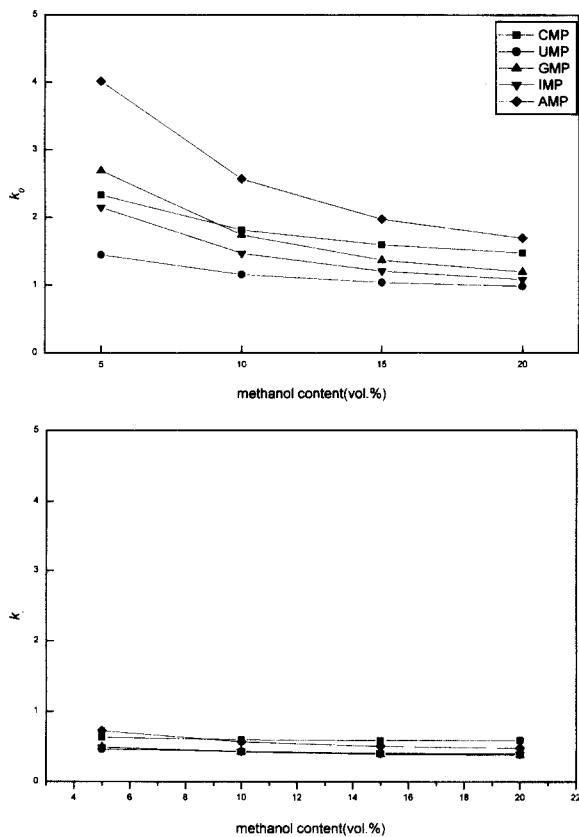


Figure 2. Change of k_0 and k with methanol content in mobile phase with acetic acid

의 양이 증가할수록 체류인자가 감소하는 것을 알 수 있다. 비이온으로 존재하는 부분의 체류인자 (k_0)는 메탄올의 양이 증가함에 따라서 각각의 시료는 감소하는 것을 알 수 있다 (Figure. 2 and 3). 이러한 경향을 보이는 이유는 물보다 메탄올이 상대적으로 비극성으로 메탄올의 양이 증가하여 이동상이 극성에서 비극성이 된다. 비극성 고정상에 이동상이 흡착하여 비극성화된 시료가 고정상에 흡착될 자리 (site)가 상대적

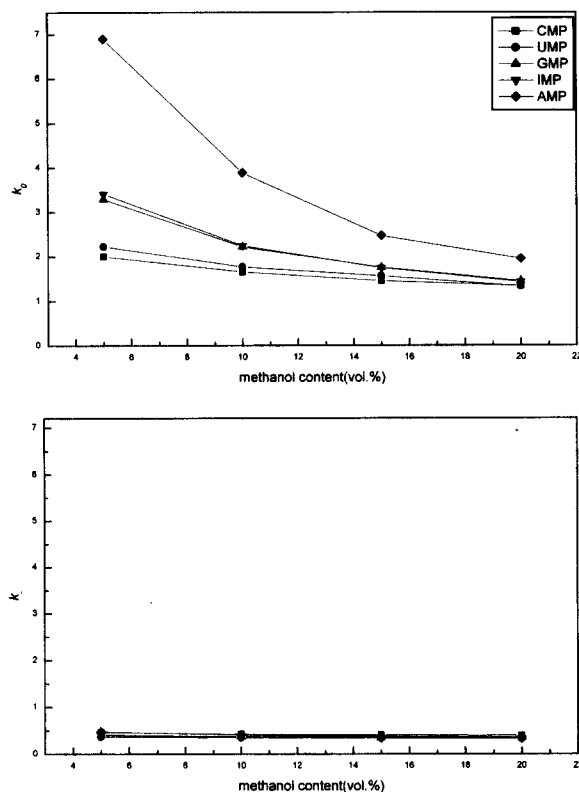


Figure 3. Change of k_0 and k with methanol content in mobile phase with sodium phosphate

으로 줄어들기 때문에 비이온으로 존재하는 부분의 체류인자 (k_0)는 메탄올의 양에 따라서 감소한다. 이러한 경향은 이동상 내에 modifier의 양이 증가할수록 시료의 체류인자가 감소하는 일반적인 경향과 일치하고 있다(2, 4). Buffer로 acetic acid와 sodium phosphate monobasic을 사용하였을 때 체류인자가 감소하는 경향은 같지만 감소하는 범위는 각각의 mononucleotides에 대해서 차이가 남을 알 수 있다 (Figure 2 and 3). 반면 이온으로 존재할 때의 체류인자 (k)는 메탄올의

Table 2. Parameters of Eq. (7) in sodium phosphate

Material	Methanol (vol. %)	Sodium phosphate monobasic			
		k_0	k	K/K_S	r^2
5'-CMP	5	2.001	0.469	0.742	0.98773
	10	1.654	0.425	0.688	0.99382
	15	1.454	0.408	0.647	0.99160
	20	1.340	0.395	0.665	0.99556
5'-UMP	5	2.225	0.371	0.461	0.98940
	10	1.765	0.354	0.482	0.99036
	15	1.559	0.342	0.482	0.99210
	20	1.331	0.333	0.590	0.98802
5'-GMP	5	3.290	0.411	0.424	0.99163
	10	2.216	0.373	0.445	0.99403
	15	1.750	0.357	0.456	0.99424
	20	1.447	0.348	0.528	0.99123
5'-IMP	5	3.413	0.406	0.427	0.98928
	10	2.241	0.366	0.454	0.99158
	15	1.744	0.347	0.477	0.99130
	20	1.429	0.334	0.577	0.98672
5'-AMP	5	6.896	0.479	0.492	0.99146
	10	3.887	0.411	0.500	0.99359
	15	2.646	0.378	0.500	0.99410
	20	1.946	0.355	0.500	0.99048

Table 3. Results of regression analysis for Eq.(8) with acetic acid and sodium phosphate

		5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-AMP
Acetic acid	r^2	0.98686	0.96411	0.97891	0.96902	0.99166
	a	1.135	0.596	1.188	0.956	1.884
	b	47.093	0.976	4.096	2.450	28.311
	c	11.955	0.604	0.796	0.726	2.677
	d	0.331	0.143	0.456	0.348	0.613
Sodium phosphate	r^2	0.98766	0.98573	0.98381	0.98202	0.98819
	a	0.774	0.634	1.049	1.085	2.190
	b	2.069	1.515	2.839	3.142	11.785
	c	0.687	0.470	0.430	0.441	0.488
	d	0.261	0.255	0.461	0.488	0.789

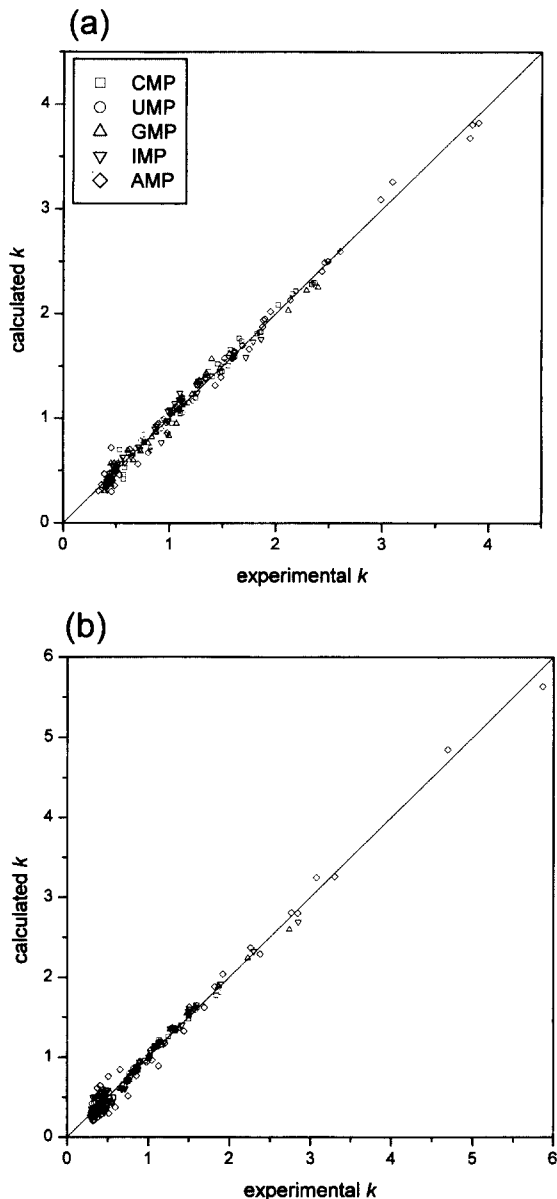


Figure 4. Comparison of experimental data and calculated value of k (a = acetic acid, b = sodium phosphate)

양에 따라서 거의 일정하였다 (Figure 2 and 3). k 는 메탄올의 양과는 거의 무관하였다. 이온으로 존재하는 부분의 체류 인자는 비극성 고정상인 C_{18} 표면에 체류하지 않고 바로 용출 되기 때문에 메탄올에 대한 영향이 없다. 또한 메탄올의 양

이 증가하여도 극성인 음이온의 체류에 영향을 미치지 않는다. 그러므로 음이온의 시료는 비극성의 고정상에 거의 체류 하지 않고 용출됨을 알 수 있다.

실험식

체류인자는 메탄올의 양과 buffer의 농도에 의해서 크게 변 한다. 메탄올의 양이 증가하면 체류인자가 감소하고, buffer의 농도가 증가하면 체류인자가 증가한다(11). 이러한 정성적인 특성을 실험식으로 예측하였다.

$$k = \frac{a + b C_B}{(1 + c C_B) M^d} \tag{8}$$

여기서 a, b, c, d 는 실험상수이며, C_B 는 buffer의 농도 (mM), 그리고 M 은 메탄올의 양 ($vol. \%$)이다. 위의 식은 buffer의 농도와 메탄올의 양에 따른 영향을 나타내는 실험식 이다. a 는 buffer의 농도와 무관하며, b 와 c 는 buffer의 농도에 관련되는 항이다. b 는 buffer 농도에 비례하는 항이며, c 는 buffer농도에 반비례한다. d 는 메탄올 양의 지수항이다. 메탄 올의 양과 체류인자는 반비례하고, buffer의 농도와는 비례하 지만 buffer의 양이 많아지면 체류인자는 일정한 값을 실험에 서 알 수 있었다. 메탄올의 양을 고정하였을 때 buffer의 농 도가 많아지면 체류인자는 b/c 의 값을 갖는다. 또한 buffer의 농도가 1보다 작은 경우 체류인자는 buffer농도의 1차에 비례 한다. 이러한 특성은 위에서의 실험결과와 잘 일치함을 알 수 있다. Buffer의 종류에 따라서 각각의 mononucleotides의 체류인자는 다른 값을 갖는다. Buffer의 종류와 메탄올의 양 을 결정한다면 mononucleotide의 체류인자를 실험을 수행하 지 않고 구할 수 있다. Acetic acid와 sodium phosphate monobasic을 buffer로 사용했을 때 각각의 mononucleotide (5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-AMP)의 실험 상수 (a, b, c, d)를 Table 3에 나열하였다. 실험식으로 계산된 체 류인자와 실험결과로부터 얻은 체류인자를 비교하였다 (Figure 4). x축으로는 실험결과, 그리고 y축으로는 실험식을 plot 함으로 써 실험식이 실험결과와 잘 일치함을 확인할 수 있다.

요 약

Buffer의 특성에 맞는 체류인자에 관한 모델식을 얻기 위 해서는 buffer와 양이온의 농도에 관한 관련식을 실험으로 결 정해야 한다. 또한 model 식에서 비이온과 음이온의 체류인

자를 나타내는 k_0 와 k 의 값이 일정한 경향을 나타내고 있기 때문에 buffer의 농도와 modifier의 농도를 동시에 고려한 model 식이 가능하게 된다. 본 연구에서 제안한 모델식 (식 (7))을 이용하여 임의의 buffer의 농도에 따른 시료의 체류시간을 예측할 수 있다. 이러한 모델식을 이용하여 buffer를 이용한 RP-HPLC의 분석 및 분리조건을 예측할 수 있고 시행 오차적인 방법보다 빠른 시간 내에 최적의 분석 및 분리조건을 얻을 수 있다.

감 사

본 연구는 초정밀 생물분리기술 연구센터 (Center of Advanced Bioseparation Technology)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

사 용 기 호

a : empirical constant
 b : empirical constant
 c : empirical constant
 C_B : concentration of buffer in mobile phase [mM]
 d : empirical constant
 F : mole fraction of ionized solute
 k : retention factor
 k_0 : retention factor of non-ionized solute
 k : retention factor of ionized solute
 K : empirical constant
 K_S : equilibrium constant of solute
 M : methanol content [vol.%]
 r^2 : regression coefficient

REFERENCES

- Shuler, M.L. and F. Kargi (1992), Bioprocess Engineering, Prentice Hall, London.
- Lee, Y.W., M. S. So, J. W. Lee, S. T. Chung and K. H. Row (1996), Retention models of capacity factor with different compositions of organic modifier in RP-HPLC, *Korean J. Chem. Eng.*, **13**, 578-584.
- Row, K.H. and J. W. Lee (1997), Preparative separation of phospholipids from soybean by NP-HPLC, *Korean J. Chem. Eng.*, **14**, 412-415.
- Row, K.H. and J. W. Lee (2000), Predicted separation of phospholipids from soybean by chromatography on silica with changes in solvent composition, *Separation Science and Technology*, **35**, 271-286.
- Kanji, M., and S. Motoyuki (1992), Chromatography of liquid-phase adsorption on octadecylsilyl-silica gel, *AIChE*, **38**, 901-910.
- Row, K.H. (1999), Principles and Applications of Liquid Chromatography, Inha Univ.
- Bosch, E., P. Bou, H. Allemann and M. Roses (1996), Retention of ionizable compounds on HPLC pH scale in methanol-water and the pK and pH values of buffers, *Anal. Chem.*, **68**, 3651-3657.
- Roses, M., I. Canals, H. Allemann, K. Silgur and E. Bosch (1996), Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. effect of pH, ionic strength, and mobile phase composition on the retention of weak acids, *Anal. Chem.*, **68**, 4094-4100.
- Kaltenbrunner, O. and A. Jungbauer (1997), Simple model for blending aqueous salt buffers application to preparative chromatography, *J. of Chrom. A*, **769**, 37-48.
- Kaliszan, R. (1998), Effect of separation conditions on chromatographic determination of hydrophobicity of acidic xenobiotics, *J. of Chrom. B*, **717**, 125-134.
- Hajnos, M.W.(1998), Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids, *J. of Chrom. B*, **717**, 93-118.
- Erwin, W., V. D. Walter, L. E. Eddy, and O. Van (1997), Ion-pair liquid chromatography electrospray mass spectrometry for the analysis of cyclic nucleotides, *J. of Chrom. B*, **694**, 55-63.
- Takashi, U., S. Kazumi, U. Yoshihiro, I. Yoji and M. Kimimori (1997), Ion-pair reversed-phased high performance liquid chromatography of adenine nucleotide and nucleoside using triethylamine as a counterion, *J. of Chrom. B*, **703**, 63-74.
- George, D.M., L. B. Cindy and S. H. Celine (1999), Acid-base catalysis in the chemical mechanism of Inosine monophosphate dehydrogenase, *Biochemistry*, **38**, 4433-4440.
- Boughtflower, R.J., T. Underwood and C. J. Paterson (1995), Capillary electrochromatography some important considerations in the preparation of packed capillaries and the choice of mobile phase buffers, *Chromatographia*, **40**, 329-335.