

크로마토그래피용 O-Diethylaminoethyl Chitosan의 합성; I. 단백질의 분리

박 창 규 · 이 영 무 · 김 진 홍* · 정 창 남**

한양대학교 공과대학 공업화학과
*동성화학 공업주식회사 중앙연구소
**순천대학교 공과대학 고분자공학과
(1993년 7월 1일 접수, 1993년 7월 13일 채택)

Synthesis of O-Diethylaminoethyl Chitosan for Chromatography; I. Separation of Protein

Chang Gu Park, Young-Moo Lee, Jin-Hong Kim*, and Chang-Nam Jeong**

Dept. of Ind. Chem., College of Eng. Hanyang Univ.,
Seungdong Gu, Seoul 133-791, Korea

*Dong Sung Chemical Ind. Co., Ltd Central Research Institute

**Dept. of Polymer Science and Eng., College of Eng., Suncheon Univ.,
Suncheon Cheonnam, 540-742, Korea

(Received July 1, 1993, Accepted July 13, 1993)

요 약 : 키토산 유도체 중 약한 음이온 교환기를 갖는 O-Diethylaminoethyl 키토산을 제조하여, 이를 크로마토그래피의 고정상으로 이용하여 생체단백질의 하나이며 등전점이 서로 다른 알부민과 라이소자임의 분리에 응용하였다. 우선 산성 염료와 염기성 염료를 이용하여 고정상으로서의 응용 가능성을 검토하였고 용매에 의한 극성효과도 검토하였다. 이것을 토대로 하여 크로마토그래피의 분리에 미치는 제반인자를 구하였다. 용매로써는 물과 메탄올 공용매를 사용하였고 이 경우 극성값이 증가할수록 분리능이 증가하였으며 가장 좋은 분리능은 치환도가 0.23인 경우 분리도가 1.42였다.

Abstract: O-Diethylaminoethyl chitosan containing weak cation exchange group had been synthesized. It was used to separate albumin and lysozyme as stationary phase in liquid chromatography column. The separation of acidic and basic dyes were preliminarily conducted to investigate the effect of polarity parameter of solvents. Based on this result, we investigated various factors on the separation efficiency of chromatography in column. In the case of using water-methanol as cosolvent, the resolution factor depended on the polarity parameter. The best resolution factor was 1.42 for DEAE-chitosan with the degree of substitution of 0.23.

1. 서 론

화학반응을 통한 키토산 유도체들의 합성에 대해서

는 많은 연구가 보고되고 있으며 특히 키토산은 천연계에 널리 존재하고 풍부한 자원량을 가지고 있으므로 이를 다양한 분야에 이용하려는 연구가 활발히 진

행되고 있다[1, 2]. 또한 키토산은 셀룰로오스에 비해서 반응성이 풍부한 아미노기를 가지고 있으므로 많은 유도체들이 합성되었으나 C₆ 위치의 수산기만을 선택적으로 반응시키는 연구는 이루어지지 않고 있다.

O-디에틸아미노에틸(이하 DEAE로 약칭) 키토산을 이용한 연구로써 약물방출조절시스템에 관한 연구를 행하여 보고된 바 있다[3]. 이것은 키토산의 C₂ 위치에 있는 아미노기는 알데히드기와 반응하여 Schiff's base를 형성하며, Schiff's base는 묽은 염산 용액에서 처리하면 선택적으로 제거된다는 점을 이용하여 DEAE-키토산을 합성하고 이의 pH sensitivity를 검토한 것이다. DEAE 키토산이 키토산보다 pH에 더 민감한 것은 DEAE기가 약한 양이온성을 띠기 때문이며 이러한 이온성 작용기는 크로마토그래피의 고정상으로 이용될 수 있다. 즉 이온교환수지와 같은 강한 이온기를 가지면 이동상중의 용출물이 완전히 고정상에 흡착되지만 약한 이온성 물질은 가역적인 흡착을 하기 때문에 크로마토그래피에 응용할 수 있다. Sober 등은 셀룰로오스 유도체의 하나인 DEAE-셀룰로오스를 단백질의 분리에 사용하였으며[4] 실제로 실리카에 DEAE를 그래프트시킨 컬럼도 상업화되어 있다. 그러나 DEAE-키토산의 경우는 셀룰로오스나 실리카에 비해 아민기를 더 가지고 있음으로써 더 염기성이 강하여 산성 및 염기성 단백질의 분리에 더 효율적일 것으로 생각되어 본 연구를 행하였다.

본 연구에서는 DEAE-키토산을 합성하고 먼저 산성 염료인 메틸오렌지와 염기성 염료인 크리스탈 바이올렛을 사용하여 크로마토그래피에의 응용 가능성을 검토하였으며, 이러한 결과를 바탕으로 알부민과 라이소자임의 분리용 크로마토그래피에 응용함에 있어서의 제반 인자, 즉, 메탄올과 물 공용매 조성에 의한 극성 정도의 변화에 따른 지연시간 및 분리도 등의 변화를 고찰하였다.

2. 실험방법

2.1. 시약 및 기기

키토산은 Tokyo Kasei사 제품을 사용하였으며, 탈아세틸화도는 중화적정법에 의해서 76%임을 확인하였다. 키토산에 Schiff's base를 형성하는데 사용된 벤즈알데히드는 Kokusan Chemical사 제품을 감압중

류하여 사용하였으며 N,N-디에틸아미노에틸 클로라이드(DEAE·HCl)은 Aldrich사 제품을 사용하였다.

단백질을 분리하기 전에 그의 가능성을 알아보기 위해 사용한 염료는 염기성 염료인 크리스탈바이올렛과 산성염료인 메틸오렌지 모두 Junsei Chemical사의 제품을 사용하였다.

분리에 사용한 알부민은 Sigma사의 bovine 알부민(Fraction 98~99%)을 사용하였으며 라이소자임도 역시 Sigma사의 Chicken Egg White 라이소자임(58, 100units/mg solid)을 사용하였다. 메탄올은 일본의 Junsei Chemical사의 제품을 사용하였다.

합성된 키토산 유도체를 분석하기 위하여 infrared spectrometer (FT-IR, Nicolet Model 5-DX), X-ray diffractometer (Rikagu Denki Model RAD-C)를 이용하였다. ¹³C-NMR은 IBM사의 NB-100을 사용하여 분석하였다.

DEAE기의 치환율을 알아보기 위하여 중화적정법을 사용하였다. 먼저 0.3N HCl용액에 DEAE-chitosan을 일정량 녹인 후 1N NaOH수용액으로 중화점을 알아내고 이로부터 치환율을 구하였다.

2.2. O-디에틸아미노에틸 키토산 (DEAE-키토산)의 제조

Fig. 1에 DEAE-키토산 제조를 도시하였다. 키토산 3g을 10wt% 초산수용액 120ml에 균일하게 녹인 후 300ml의 메탄올로 희석시켜 주었다. 얻어진 키토산용액에 벤즈알데히드 15.81g을 30분에 걸쳐서 서서히 적하시킨 후 60°C 오븐에서 24시간 동안 반응시켜 투명한 겔을 얻었다. 얻어진 겔을 잘게 부수고 미반응 벤즈알데히드를 제거하기 위하여 과량의 메탄올로 충분히 세척하여 24시간 동안 동결건조기에서 완전히 건조시켰다. 얻어진 B-키토산은 투명한 겔형태였으며 얻어진 겔은 200°C에서 10분간 가열하여도 용융되지 않았으며 대부분의 유기용매에 녹지 않았다. 이 N-벤질리덴키토산 (B-키토산) 1g을 60°C 항온조에서 피리딘/클로로포름 혼합용매를 이용하여 24시간 동안 팽윤시킨 후 일정량의 N,N-디에틸아미노에틸 클로라이드 (DEAE.HCl)를 첨가하고 50°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응을 통해서 얻어진 키토산을 아세톤에 침적시키고 미반응물을 제거하기 위하여 메탄올 용액으로 충분히 세척하고 110°C 오븐에서 건조하였다. DEAE-B-키토산은 얇은 갈색을 띠고 일반적인 유기용매에는 녹지 않았으며 초산수용

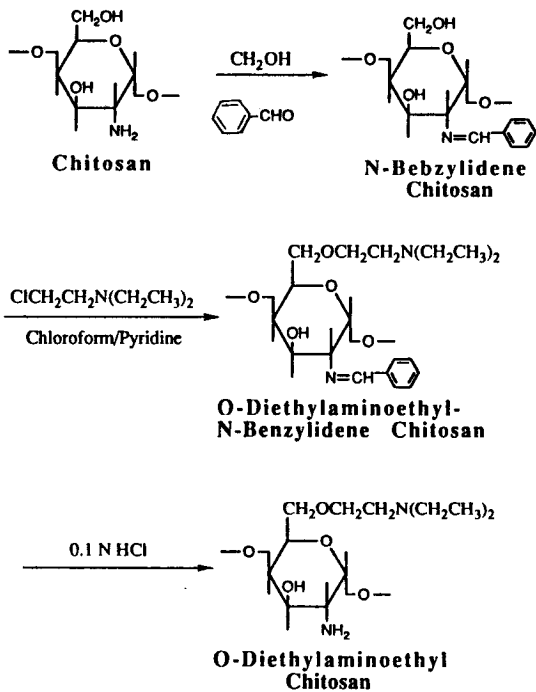


Fig. 1. Synthetic scheme of O-diethylaminoethyl chitosan.

액에는 팽윤되었다. 얻어진 O-디에틸아미노에틸-N-벤질리덴키토산 (DEAE-B-키토산) 3g을 0.25N 염산에탄올용액에서 24시간 동안 분산 처리하고 상온에서 1N 수산화나트륨으로 처리하여 110℃ 오븐에서 건조시켜 DEAE-키토산을 합성하였다. DEAE-키토산은 초산수용액 등의 산성수용액에서 팽윤되었고 치환도가 약 28% 이상의 경우에는 녹았다.

2.3. 컬럼의 제작 및 분리실험

본 실험에 사용한 시료는 분쇄하고 sieve로 걸러 50μm 이하의 입자를 사용하였으며, 분리에 사용한 컬럼은 내경 4.6mm, 길이 250mm stainless steel tube에 시료를 충전하고 양끝은 Swagelock을 사용하여 HPLC와 연결하였다. 이때 이동상의 압력에 의해 시료가 유출되는 것을 방지하기 위하여 그 사이에 porous metal을 끼워서 제작하였다. 모든 시료의 충전량은 약 2.0±0.1g 정도였다. HPLC는 영인과학의 Model 910 Solvent Delivery Module과 M 720 UV absorbance Detector, 그리고 D520B Computing Integrator를 사용하여 분리능을 측정하였다.

이동상은 물과 메탄올 공용매를 사용하였으며 유출 속도는 0.5cc/min이었고 UV absorbance는 254nm 였다.

2.4. 흡수를 측정

치환도를 달리해 가면서 제조한 DEAE-chitosan을 각각 다른 pH의 buffer용액에 침지시키고 3일간 팽윤시켜 평형에 도달한 후 표면의 물기를 제거하고 습윤상태의 무게를 측정하였다. 이 막을 다시 감압건조기에서 일정한 무게에 이를 때까지 건조시키고 건조상태의 무게를 측정하여 식 (1)로부터 흡수율을 구하였다.

$$\text{흡수율}(\%) = (W_s - W_d) / W_d \times 100 \quad (1)$$

여기서 W_s 는 습윤상태에서, W_d 는 건조상태에서의 시료의 무게이다.

3. 결과 및 고찰

3.1. IR 및 NMR 분석

본 실험에 사용한 시료와 중화적정법을 통해서 구한 DEAE의 치환도를 Table 1에 나타내었다.

Fig. 2의 IR 스펙트럼에 나타냈듯이 키토산 유도체 사이에는 큰 변화는 나타나지 않았으나 B-키토산의 경우에는 벤질리덴기의 방향족 C-H의 out-of-plane deformation에 기인하는 특성피크가 760cm⁻¹와 720cm⁻¹ 부근에서 확인됨으로써 키토산과 벤즈알데히드간에 용이하게 반응이 일어난 것을 확인하였다. 또한 피리딘/클로로포름 혼합용매에서 반응하여 얻어진 DEAE-B-키토산의 경우에도 벤질리덴기에 해당하는 피크가 소멸되지 않고 남아 있는 것으로부터 유기혼합용매에서도 Schiff's base가 제거되지 않고 남아 있으며 키토산의 C₂ 위치의 아미노기를 보호하고 있는 것으로 생각된다. 묽은 염산용액하에서 처리하여 Schiff's base를 아미노기로 환원시킨 DEAE-키토산에서는 벤질기에 해당하는 특성피크를 확인할 수 없었다. 따라서 묽은 염산용액하에서 용이하게 Schiff's base가 제거되고 아미노기가 환원된 것으로 생각되며 키토산에 비해서 메틸사슬의 C-H 신축진동에 해당하는 2850~2900cm⁻¹이 특성피크의 크기가 증가한 것으로 미루어 지방족아실화키토산이 합성된 것을 확인하였다.

Fig. 3의 ¹³C-NMR의 특성피크를 검토하여 본 결

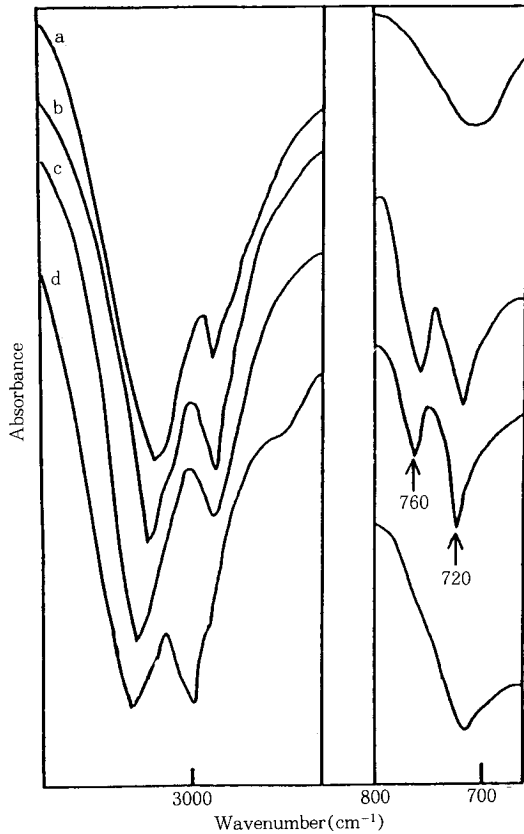


Fig. 2. IR spectra of a) chitosan, b) N-benzylidene chitosan, c) O-diethylaminoethyl-N-benzylidene chitosan, and d) O-diethylaminoethyl chitosan.

과 B-키토산과 DEAE-B-키토산의 경우 129ppm 부근에서 벤질리덴기의 방향족의 피크를 확인하였고 DEAE-키토산의 경우 이 피크가 사라지고 23ppm 부근에서의 메틸 및 메틸렌의 피크가 증가하는 것으로 DEAE기가 치환된 것을 확인하였다.

3.2. X-ray 분석

키토산의 WAXD pattern(Fig. 4)은 (001)과 (100)면을 나타내는 $2\theta=10^\circ$ 부근의 특성피크와 (101)과 (002)면을 나타내는 $2\theta=20^\circ$ 부근의 특성피크를 나타내었다. 반면에 B-키토산에서는 $2\theta=10^\circ$ 부근의 특성피크는 소멸되었으며 $2\theta=20^\circ$ 부근의 특성피크는 감소하는 것을 확인하였다. 또한 DEAE-B-

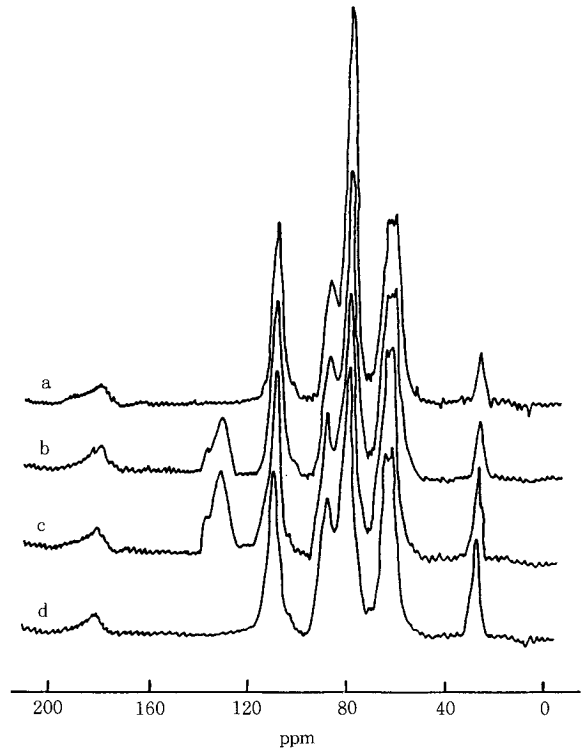


Fig. 3. ¹³C-NMR spectra of a) chitosan, b) N-benzylidene-chitosan, c) O-diethylaminoethyl-N-benzylidene chitosan, and d) O-diethylaminoethyl chitosan.

키토산에서는 $2\theta=10^\circ$ 부근의 특성피크 및 $2\theta=20^\circ$ 부근의 특성피크도 크게 감소하였다. 이와 같이 키토산 유도체의 결정성의 감소는 키토산 분자 내에서 강한 수소결합을 형성하고 있는 수산기 및 아미노기가 벤질리덴기와 DEAE기로 치환됨에 따른 분자 내 수소결합력의 감소에 따른 결과라고 생각되어진다. 반면에 Schiff's base를 아미노기로 환원시킨 DEAE-키토산에서는 $2\theta=20^\circ$ 부근의 특성피크가 다시 증가되는 것을 확인하였다. 따라서 키토산의 C₂ 위치의 아미노기가 Schiff's base로부터 아미노기로 다시 환원됨에 따라 분자 내 수소결합력의 증가에 따라 결정성이 증가한 것이라 생각된다.

3.3. 팽윤도

치환도를 조절하여 얻어진 DEAE-키토산의 산성 수용액에서의 팽윤 정도를 Table 1에 나타내었고, 물

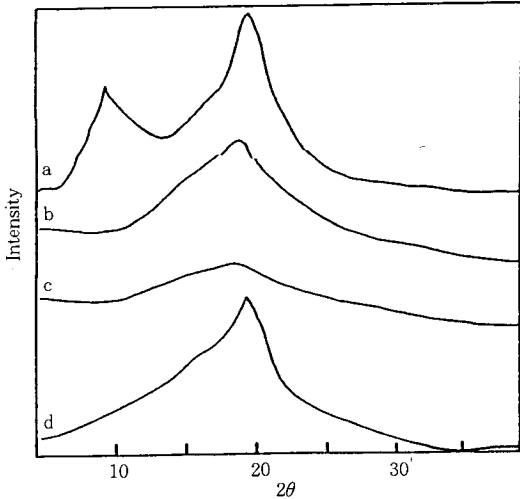


Fig. 4. X-ray diffraction patterns of a) chitosan, b) N-benzylidene-chitosan, c) O-diethylaminoethyl-N-benzylidene chitosan, and d) O-diethylaminoethyl chitosan.

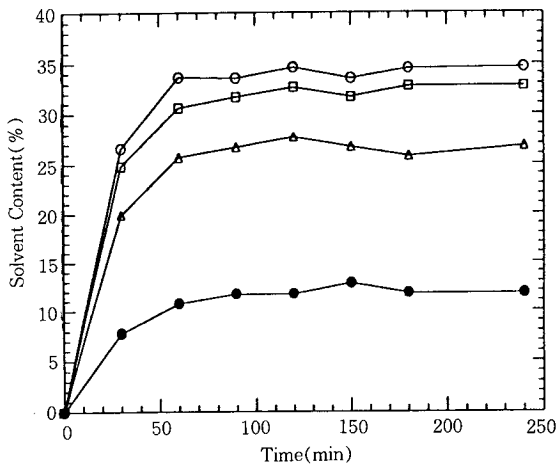


Fig. 5. Swelling kinetics of DEAE-chitosan in dry state at different pH. (degree of substitution; 23%), pH 4; O-, pH 5; -□-, pH 6; -△-, pH 7; -●-

에 녹지 않으면서 가장 팽윤이 많이된 DEAE-3의 pH에 따른 팽윤도 실험 결과를 Fig. 5에 나타내었다. pH가 감소할수록 팽윤도가 커지는데 이는 산성이 커지면서 키토산 분자 내 C₂ 위치의 아미노기와 C₆ 위치에 치환된 DEAE기가 양전하를 띠게 되며 따라서 정전기적 반발력에 의해서 분자간의 거리는 증

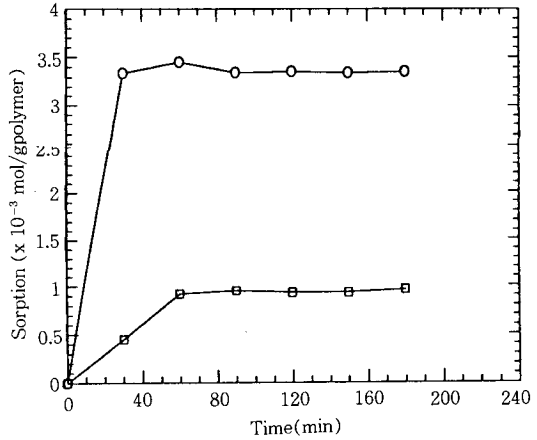


Fig. 6. Sorption kinetics of methyl orange and crystal violet. (conc.=0.0015 mol/100cc H₂O at pH4), Methyl Orange; O-, Crystal Violet; -□-

Table 1. Preparation of DEAE-Chitosan

Sample	Benzaldehyde ^{a)}	DEAE.HCL ^{b)}	D.S ^{c)}	W.S ^{d)}
DEAE-1	8	2.5	8	△
DEAE-2	8	4	15	△
DEAE-3	8	8	23	○
DEAE-4	8	16	28	*

a), b) : mol/pyranose unit

c) : Degree of Substitution (%)

d) : Water Solubility (△; Swellable, ○; Very Swellable, *; Soluble)

가되고 물분자들은 이들 빈공간을 채워줌으로써 막내의 함수율은 증가하게 된다. 특히 DEAE 키토산의 함수율은 완충용액의 pH가 7에서 6으로 감소함에 따라 함수율은 14% 정도 증가하였다. 또한 전 pH영역에서 평형은 약 60분 정도에서 이루어졌다.

3.4. 염료의 흡착실험

본 연구에서는 염기쪽의 등전점을 갖는 라이소자임과 산성쪽의 등전점을 갖는 알부민을 분리하는데 있어서 모델테스트로써 산성염료인 메틸오렌지와 염기성염료인 크리스탈바이올렛을 이용하여 흡착실험을 행하였다. 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 산성염료인 메틸오렌지와 염기성염료인 크리스탈바이올렛을 각각

0.0015mol/100cc H₂O로 녹여 실험한 결과 흡착량과 평형 도달시간에서 상당한 차이를 나타냄을 알 수 있다. 이는 DEAE-키토산의 DEAE기가 물중에서 양성 자이온을 흡착하고 여기에 이온화되어 음전하를 띠는 메탄올과 같은 극성 용매를 첨성시키기 때문이라고 생각되며 크리스탈바이올렛의 경우에는 양전하를 띠며 이온화되어 반발력이 일어나기 때문이라고 생각된다.

이 실험으로부터 DEAE-키토산이 산성 및 염기성 물질을 선택적으로 흡착할 수 있다는 것을 알 수 있었으며 따라서 단백질의 분리실험을 행하였다.

3. 5. 단백질의 분리용출시험

염료 흡착 실험을 근거로 하여 알부민과 라이소자임의 분리실험을 행하였다. DEAE의 치환도가 28%인 DEAE-4의 경우는 거의 수용성이 되어 충전물로서 강도를 유지하지 못하였고 모든 시료가 물에서 팽윤되어 컬럼을 제작하여 용출실험을 행하였을 경우 용출경로를 막아 용출이 불가능하였다. 그 이유가 물의 극성이 매우 커서 일어나는 현상으로 생각되어 메탄올을 공용매로 사용하여 용출실험을 행하였다. 공용매로써 메탄올을 사용한 이유는 메탄올이 DEAE-

키토산의 난용매이며 또한 극성이 너무 낮은 용매를 사용할 경우 DEAE기의 흡착효과가 줄어들게 되기 때문에 사용하였다. 그러나 물의 부피함량이 20%를 넘을 경우 모든 시료에 있어서 팽윤이 되어 용출경로를 막아 본 실험에 사용한 HPLC의 용출압력의 범위를 넘어 서기 때문에 사용할 수 없었고 따라서 이동상의 주용매로 메탄올을 사용하였다.

우선 Fig. 7에 DEAE-키토산의 치환도에 따른 capacity factor를 나타내었다. 치환도가 23%의 경우 물의 함량이 15% 이상, 치환도 15%의 경우 물의 함량 17.5% 이상의 용매조성에서는 실험할 수 없었다. capacity factor(k')는 (1)식을 사용하여 구하였다.

$$k' = (1/R) - 1 \tag{1}$$

$$R = t_M / (t_M + t_S) \tag{2}$$

여기서 R은 retention ratio로써 이동상(t_M)과 고정상(t_S)의 retention time의 합과 이동상만의 retention time과의 비를 나타낸다. 예상대로 치환도가 증가할수록 capacity factor가 증가하는데 특히 알부민의 경우가 라이소자임보다 급격히 증가하는 것을 볼 수 있다. 이것은 두 가지 단백질의 등전점의 차이때문으로 볼 수 있다. 즉 알부민의 경우 등전점이 약 4.5~6 정도이고, 라이소자임의 경우는 약 10.5~11 정도이다. 즉, 알부민은 약산성을 띠어 염기성인 DEAE 및 아민기와 복합체를 형성하지만 염기성인 라이소자임은 오히려 반발력이 작용하게 되어 위와 같은 결과가 나온다고 생각되어진다.

Fig. 8에 위의 결과로부터 계산한 선택도를 나타내었다. 선택도는 식 (3)과 같이 두 가지 단백질의 capacity factor의 비로써 나타낼 수 있다.

$$\alpha = k'_A / k'_L \tag{3}$$

여기에서 k'_A 및 k'_L는 각각 알부민과 라이소자임의 capacity factor를 나타낸다. DEAE-키토산의 치환도에 따라 알부민의 capacity factor의 값이 급격하게 상승하게 되고 이에 따라 선택도 역시 상승함을 나타내고 있다.

Fig. 9에는 HPLC에서 이동상, 즉, 용매의 강도를 나타내는 극성값의 변화에 따른 알부민의 capacity factor와 선택도의 변화를 나타내었다. 극성값(P')은 식 (4)와 같은 식을 이용하여 구하였다.

$$P' = \phi_W P_W + \phi_M P_M \tag{4}$$

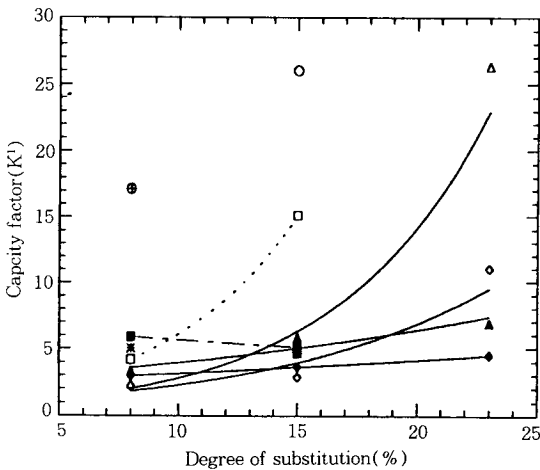


Fig. 7. Effect of degree of substitution of DEAE group in chitosan on the capacity factor, k', at different cosolvent system. MeOH : H₂O = 80 : 20 ; ⊕-(Albumin) - *-(Lysozyme), 82.5 : 17.5 ; ○-(Albumin) - ●-(Lysozyme), 85 : 15 ; □-(Albumin) - ■-(Lysozyme), 90 : 10 ; △-(Albumin) - ▲-(Lysozyme), 95 : 15 ; ◇-(Albumin) - ◆-(Lysozyme),

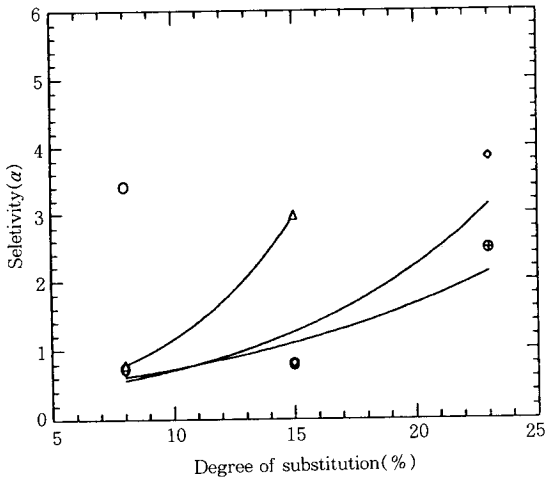


Fig. 8. Effect of degree of substitution of DEAE group in chitosan on the selectivity, α , at different cosolvent system. MeOH : H₂O = 80 : 20; -○-, 82.5:17.5; -□-, 85:15; -△-, 90:10; -◇-, 95:15; -⊕-

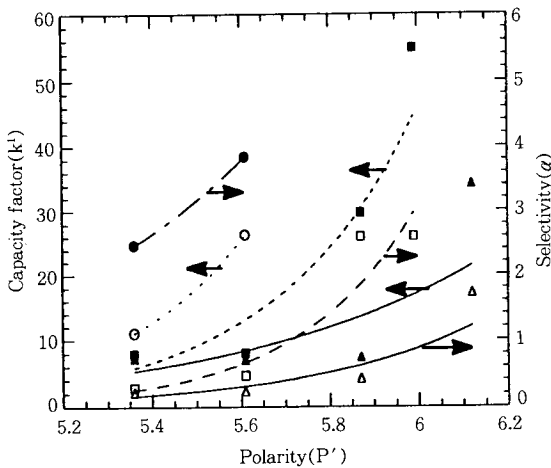


Fig. 9. Effect of polarity of mobile phase on the capacity factor of albumin, K_A' , and selectivity, α , for three DEAE-chitosans. DEAE-1; -△-(α), -▲-(k_A'), DEAE-2; -□-(α), -■-(k_A'), DEAE-3; -○-(α), -●-(k_A')

여기서 ϕ_w , ϕ_M 은 각각 물과 메탄올의 부피분율이고 P_w 와 P_M 은 각각 순수 물(10.2)과 메탄올(5.1)의 극성값이다.[5] 이렇게 계산한 극성값은 물의 부피함

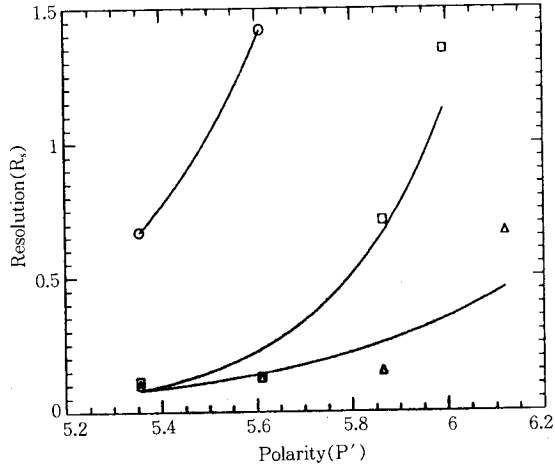


Fig. 10. Effect of polarity of mobile phase on the resolution, R_s , for three DEAE-chitosans. DEAE-1; -○-, DEAE-2; -□-, DEAE-3; -△-

량을 0~20%로 하였을 경우 5.1에서 6.2 정도의 값을 가졌으며 극성값이 커질수록 capacity factor와 선택도가 증가함을 볼 수 있다. 이것은 두 가지로 해석이 가능한데 그중 하나는 물의 함량이 커질수록 극성의 정도가 강해지기 때문에 복합체가 더 강하게 결합되기 때문이며, 다른 하나는 컬럼 내의 충전제가 팽윤되면서 용출경로를 제한하기 때문이라고 생각되어진다. 그러나 치환도가 8%인 DEAE-1은 선택도를 계속 유지하다가 극성값이 5.825 이상에서는 약간 감소하는 경향을 나타내는데 이는 충전물이 효과적으로 팽윤되어서 컬럼 내의 빈공간을 모두 채워주어 용출경로에서 채널링효과를 제한하여야 하는데 DEAE-1은 그렇지 못한 것으로 생각된다.

마지막으로 Fig. 10에 극성값의 변화에 따른 분리도의 변화를 나타내었다. 본 실험에서 사용한 분리도(R_s)는 선택성과는 다른 값으로 아래와 같은 (5)식을 사용하여 구하였다.

$$R_s = 2\Delta t / (W_A + W_B) \quad (5)$$

여기서 $\Delta t = t_A - t_B$ 이고 W_A 와 W_B 는 각각 알부민과 라이소자임의 피크의 폭이다. 이 값은 크로마토그래피에 있어서 실제적으로 피크의 분리가 어느 정도의 해상도를 가지고 이루어지는가를 나타내는 값으로 예를 들면 R_s 가 1.25 정도이면 두 개의 피크가 약 2% 정도 겹치게 된다.

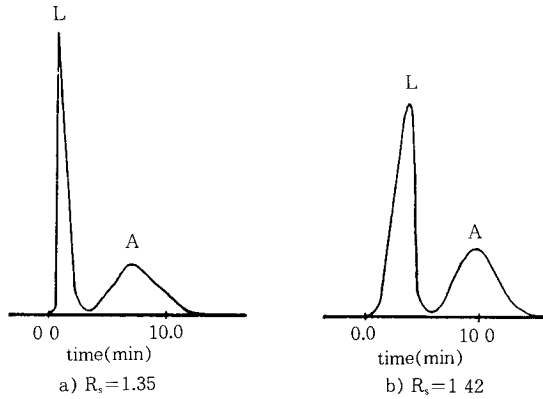


Fig. 11. Typical chromatogram of a) DEAE-2 (cosolvent; MeOH:H₂O=82.5:17.5, flow rate;0.5cc/min), and b) DEAE-3(cosolvent;MeOH:H₂O=90:10, flow rate;0.5cc/min).

Fig. 10에서 극성값이 증가하면 분리도도 증가함을 보여주고 있다. 특히 DEAE-2와 DEAE-3의 경우는 분리도가 급격히 증가하는데 이는 DEAE-2의 경우 물의 함량이 15%에서 팽윤이 급격해지고 20% 정도 이면 경로가 막혀 용출이 거의 되지 않는다. 따라서 DEAE-키토산의 경우 극성값뿐만 아니라 시료의 팽윤정도도 분리에 영향을 미침을 알 수 있다.

각 시료의 분리도는 0.1~1.4 정도의 값을 나타냈으며 Fig. 11에 이 중 가장 전형적인 크로마토그램을 나타내었다.

4. 결 론

키토산의 C₂ 위치의 아미노기와 반응하지 않고 C₆ 위치의 수산기에만 선택적으로 DEAE기를 도입시키기 위하여 알데히드와 키토산의 반응을 통해서 C₂ 위치의 아미노기를 Schiff's base를 이용하여 보호하였다. 이후 혼합용매에서 DEAE기를 반응시킨 후 묶은 염산용액으로 처리하여 키토산의 C₂위치의 Schiff's base를 아미노기로 환원시켰다. 이렇게 제조한 DEAE-키토산을 HPLC용 컬럼의 충전제로 이용하여 알부민과 라이소자임의 분리에 이용한 결과 치환도는 15~23%가 적당하고, 유동상중 메탄올/물 공용매에서 물의 함량은 10~17.5 vol%가 적당함을 확인하였다.

감 사

본 연구는 순천대 교내연구비의 지원으로 이루어졌기에 감사드립니다.

참고문헌

1. R. R. A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon press (1977).
2. R. Gross, E. Konrad, and H. Mager, "Proceedings of the 2nd International Conference on Chitin and Chitosan", Hirano & S. Tokura, Sapporo, (1982).
3. J. H. Kim and Y. M. Lee, 한국약제학회지, **22**, 23 (1992).
4. Sober et al., *J. of Am. Chem. Soc.*, **78**, 751 (1956).
5. 인성과학 교역상사, "혼합물의 분리정량과 Modern 크로마토그래피", P. 44 (1992).