

pH 및 염화칼륨 첨가가 고속역류크로마토그래피의 용매시스템에 미치는 영향

이창호 · 이부용 · 이현유 · 이철호*

한국식품개발연구원, *고려대학교 생명공학원

Effects of pH and Potassium Chloride in Solvent System of High-Speed Countercurrent Chromatography

Chang-Ho Lee, Boo-Yong Lee, Hyun-Yu Lee, and Cherl-Ho Lee*

Korea Food Research Institute,

*Graduate School of Biotechnology, Korea University

Abstract

Effects of the physical properties of solvent system such as pH and polarity change by salt addition in solvent system were investigated by using high speed countercurrent chromatography apparatus (Model CCC-1000, Pharm-Tech Research Corp. USA). The changes of pH and interfacial tension in solvent system of high speed countercurrent chromatography did not significantly affect on retention of stationary phase, but induced remarkable changes in the partition coefficient of ginkgo flavonoids, kaempferol, quercetin and isorhamnetin. The partition coefficients of ginkgo flavonoid standard increase with an increased pH of solvent system and quercetin sharply increased at pH 10.0. Retention of stationary phase decreases with an increased concentration of KCl in butanol of solvent system. Interfacial tension between two phase in solvent system of hexane increases with an increased concentration of KCl. The polarity of solvent system significantly changes the partition coefficients of ginkgo flavonoid.

Key words: Countercurrent chromatography, kaempferol, quercetin, isorhamnetin, partition coefficients

서 론

역류크로마토그래피(Countercurrent chromatography)는 고체 지지체를 필요로 하지 않는 분리 방법으로 서로 섞이지 않는 용매를 혼합하여 층분리된 2개의 층층한 층을 이동상으로, 다른 층을 고정상으로 물질을 분리 정제할 수 있는 기법이다⁽¹⁻⁴⁾.

특별한 고가의 장치설비 없이 용매만을 이용하여 물질을 높은 순도로 분리해 낼 수 있는 역류크로마토그래피를 수행함에 있어 가장 먼저 부딪히는 문제는 최적의 분획계수를 나타내는 용매를 선정하는 일이다. 실제 역류크로마토그래피를 수행함에 있어서 적절한 분획계수 값의 범위는 0.2~5범위이다. 분획계수 값이 너무 크면 물질들이 충분히 분리되지 않고 이동상과 함께 달려나오며 너무 작을 경우에는 체류 시간

이 길어져 피크의 폭이 넓어져 분리 효율이 떨어진다. 본 실험에서는 컬럼을 고속으로 회전시켜 물질의 분리효율을 극대화시킨 고속역류크로마토그래피(High-speed countercurrent chromatography, HSCCC)기법을 이용하여 천연물로부터 생리활성을 가지는 유용성분을 분리하기 위한 시도로써 용매시스템의 pH나 염류의 첨가가 용매시스템에 미치는 영향을 알아보고 이에 따른 용매시스템의 변화가 고속역류크로마토그래피의 분리효율에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

용매시스템의 물리화학적 특성에 따른 분획계수 변화를 알아보기 위한 은행잎 flavonoid 표준품은 각각 kaempferol, quercetin, isorhamnetin으로 Carl Roth (Germany)로부터 구입하여 사용하였으며 CHCl₃, CH₃OH, H₂O 등의 용매는 모두 HPLC 등급을 사용하였다.

Corresponding author: Chang-Ho Lee, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Boondang-gu, Seongnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea

은행잎 flavonoids의 분획계수 측정

H₂O, CHCl₃, CH₃OH의 세 가지 용매로 구성된 용매 시스템에서 CHCl₃ 함량을 40%로 고정하고 나머지 60% water-CH₃OH 분획을 100으로 할 때 CH₃OH의 함량을 10%에서 70%까지 달리하여 은행잎 flavonoids의 분획 계수(partition coefficient)를 측정하였다. 분획계수는 365 nm에서의 흡광도를 측정하여 식 (1)과 같이 상층부와 하층부의 흡광도 비로 계산하였다.

$$\text{Partition coefficient (K)} = \frac{C_U}{C_L} \quad (1)$$

C_U: Solute concentration of upper phase

C_L: Solute concentration of lower phase

컬럼내 체류되는 고정상(stationary phase) 부피 측정

HSCCC 운용 시 컬럼내에 유지되는 고정상의 부피는 정지된 상태에서 펌프를 이용하여 고정상 용매를 컬럼내에 전부 채운 후 정해진 회전속도로 컬럼을 회전시키면서 이동상(mobile phase)을 일정 유속으로 주입한다. 주입초기에 이동상에 의해 고정상이 밀려나 오다가 어느 순간 더 이상 고정상이 밀려나오지 않고 이동상만이 흘러나오기 시작한다. 컬럼내 유지되는 고정상의 부피는 이동상을 주입하기 시작하는 시점부터 컬럼내에 이동상과 고정상 사이에 평형이 이루어져 고정상이 더 이상 밀려나오지 않고 이동상만이 흘러나오기 시작할 때 까지 코일 출구에서 메스실린더로 받은 고정상의 부피로부터 계산한다. 즉 컬럼내 유지되는 고정상의 부피는 컬럼의 전체 부피로부터 이동상에 의해 밀려나온 고정상의 부피를 뺀 것으로 한다. 컬럼내 유지되는 고정상의 비율은 본 실험에 사용한 HSCCC 장치의 컬럼 부피 325 mL에 대한 컬럼내 유지되는 고정상 부피의 비율로써 나타낸다.

2상계 용매시스템의 계면장력 측정

수용성 CH₃OH 중의 CH₃OH 함량에 따른 2상계 용매시스템의 계면장력(interfacial tension)은 Surface tensiometer (Fisher, Model 20, U.S.A.)를 이용하여 ring method⁷⁾로 측정하였다.

HSCCC

실험에 사용한 고속역류크로마토그래프는 semipreparative용(CCC-1000, Pharma-Tech Research Co.)으로 내경이 0.8 mm인 polytetra fluoroethylene (PTFE) 튜브로 감겨져 있는 컬럼 3개가 홀더에 연결되어 있어 기어 동력이 전달되는 방식이다. 컬럼 3개의 총부피는

Table 1. Operation conditions of HSCCC

HSCCC
Apparatus: CCC-1000(Pharma-Tech Research Co. USA)
Column: ID 0.8 mm PTFE tube
Column volume: 325 mL
Solvent system: CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O
Injection: 100 μL
Detection: UV detector 365 nm

325 mL이며 컬럼을 교환함으로써 용량을 늘릴 수 있다. 본 실험에 사용한 HSCCC의 작동조건은 Table 1과 같다. HSCCC 수행중 연속적인 UV 검출기의 monitoring시 검출기로 연결되는 튜브를 50°C로 가온하여 혼탁에 의한 검출기 노이즈 현상을 제거하였다⁸⁾.

용매시스템의 pH 조절

HSCCC 운용 시 컬럼내에 유지되는 고정상의 부피, 2상계 용매시스템의 상하층부 사이의 계면장력 및 은행잎 flavonoid 표준품의 분획계수에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 각 용매시스템의 구성 중에서 water 부분을 pH가 각각 2.0, 5.0, 8.0, 10.0으로 제조된 buffer를 대신 첨가하여 용매시스템을 제조하였다. 이때 사용한 buffer system은 universal buffer를 이용하였으며 0.2 M boric acid와 0.05 M citric acid solution과 0.1 M trisodium phosphate를 혼합하여 pH를 조정하였다⁹⁾.

KCl 첨가

HSCCC 운용시 컬럼내 유지되는 고정상의 양, 용매시스템의 계면장력 및 은행잎 flavonoid 표준품의 분획계수에 미치는 KCl의 영향을 알아보기 위하여 각 용매시스템의 구성 중에서 water 부분에 KCl을 각각 50 mM, 250 mM, 500 mM로 제조한 염용액을 대신 첨가하여 용매시스템을 제조하였다.

용매시스템의 polarity 조절

용매시스템의 polarity에 따른 HSCCC 운용시 컬럼내 유지되는 고정상의 부피, 2상계용매시스템의 계면장력 및 은행잎 flavonoid 표준품의 분획계수 변화를 알아보기 위하여 각 용매시스템의 극성을 조절하였다. 용매시스템의 구성은 극성이 강한 용매와 비극성이 강한 용매, 그리고 양쪽 용매 모두에 섞일수 있어 blending solvent로써 작용할 수 있는 용매가 사용된다. 본 실험에서는 각각 CHCl₃/CH₃OH/H₂O를 기본 용매시스템으로 하여 CHCl₃의 부분을 40%로 고정시키고 나머지 60%를 차지하는 CH₃OH, H₂O를 100으로

하여 CH₃OH 부분을 10%에서 70%까지 조정하였다.

결과 및 고찰

pH에 의한 영향

HSCCC 운용 시 용매시스템의 pH가 컬럼내 고정상의 유지율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 용매시스템을 구성하는 용매중에서 H₂O 부분을 pH가 각각 2.0, 5.0, 8.0, 10.0으로 조절된 buffer로 대체하여 용매시스템을 구성하였다. 각 용매시스템의 pH에 따른 컬럼내 고정상 용매의 유지율 변화를 나타낸 결과는 Fig. 1과 같다. 용매시스템의 pH가 2.0, 5.0, 8.0, 10.0으로 증가함에 따라서 컬럼내 고정상 유지율은 각각 73.8%, 70.5%, 64.6%, 68.9%로 큰 변화를 나타내지 않아 pH가 용매시스템의 물리적 특성에 영향을 미치지 않는 것으로 알 수 있다.

Fig. 2는 용매시스템의 pH에 따른 2상계 사이의 계면장력을 나타낸 것이다. 용매시스템의 pH가 2.0, 5.0, 8.0, 10.0으로 증가함에 따라서 2상계의 계면장력은 각각 5.1, 5.3, 6.0, 5.0 dynes/cm의 값을 나타내었다. 일반적으로 두 용매층 사이의 계면장력이 크면 용매의 혼합 후 층분리가 이루어지는 시간(settling time)이 짧아지며 반대로 작으면 층분리 시간이 길어져 컬럼내에서 용매가 완전히 층분리가 이루어지기 전에 혼합되어 버리기 때문에 고정상이 이동상에 떨어져나와 컬럼내 체류되는 고정상의 양이 줄어들게 되어 결과적으로 분리 효율이 떨어진다.

Fig. 3은 solute의 분획계수에 미치는 용매시스템의 pH 영향을 알아보기 위하여 각각 pH별로 제조된 용매시스템에 대하여 은행잎 flavonoid aglycone인 iso-

rhamnetin, quercetin, kaempferol을 사용하여 시험관에서 분획계수를 측정하여 비교하였다.

용매시스템의 pH는 컬럼내에서의 두층의 분포에는 영향을 크게 미치지 않는다. 일반적으로 용매시스템의 pH, salts첨가, 계면장력 등은 용매의 층분포에 영향을 주기 보다는 solute, 특히 이온화 될 수 있는 물질의 분획계수에 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁽¹⁰⁾. 이 등⁽¹¹⁾의 연구보고에 의하면 역류분배를 이용한 모델단백질의 분리 정제 시 용매시스템의 pH 변화가 모델단백질의 분획계수 값을 크게 변화시켜 분리 효율을 증대시킬 수 있음을 보여주었다. 본 실험에서도 용매시스템의 pH가 고정상의 컬럼내 유지율에 크게 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으나 은행잎 flavonod 표준품의 분획계수값을 크게 변화시키는 것을 알 수 있었다. Kaempferol의 경우 pH 2.0~10.0 범위에서 분획계수 값의 변화를 거의 보이지 않았으나 quercetin의 경우 pH에서 급격히 분획계수 값이 증가하였다. 따라서 물질분리에 적합한 분획계수 값의 차

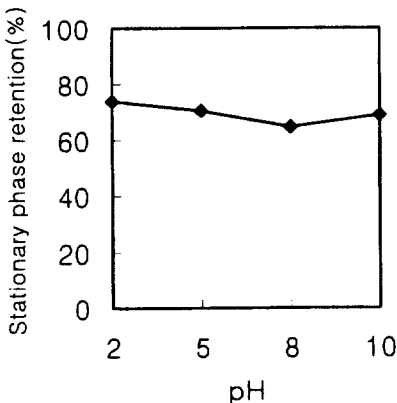


Fig. 1. Stationary phase retention in column of solvent system with various pHs.

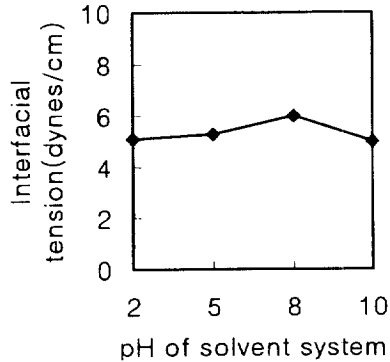


Fig. 2. Interfacial tensions of two phase system with various pHs.

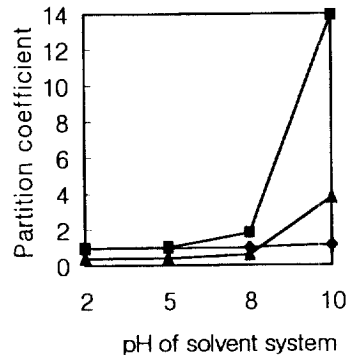


Fig. 3. Partition coefficients of ginkgo flavonoid aglycone in solvent system with various pHs.

이를 나타내는 pH 8.0~pH 10 사이의 조건이 은행잎 flavonoids를 분리할 수 있는 조건임을 판단할 수 있다.

KCl 첨가의 영향

HSCCC 운용 시 KCl 첨가가 컬럼내 고정상의 유지율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 용매시스템을 구성하는 용매중에서 H₂O에 KCl을 각각 50, 250, 500 mM 농도로 첨가하여 용매시스템을 구성하였다. KCl 농도에 따른 컬럼내 고정상 용매의 유지율 변화를 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. KCl 농도가 0, 50, 250, 500 mM으로 증가함에 따라서 75.7%에서 72.9%로 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

KCl 첨가에 따른 2상계 용매시스템의 계면장력 변화는 Fig. 5와 같다. KCl 농도가 증가함에 따라서 계면장력은 4.1 dynes/cm에서 5.0 dynes/cm 값의 범위를 나타내었으며 염농도에 따른 경향을 나타내지는 않았다.

전체적으로 용매시스템에 대한 KCl 첨가는 역류크로마토그래프 작동시 컬럼내 고정상의 유지율에 대한

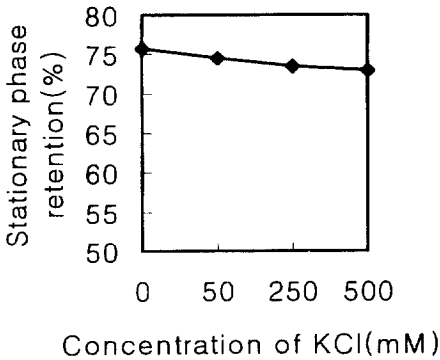


Fig. 4. Stationary phase retention in column of solvent system with various concentrations of KCl.

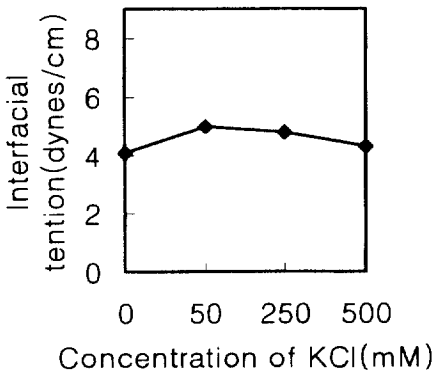


Fig. 5. Interfacial tensions of two phase solvent systems with various concentrations of KCl.

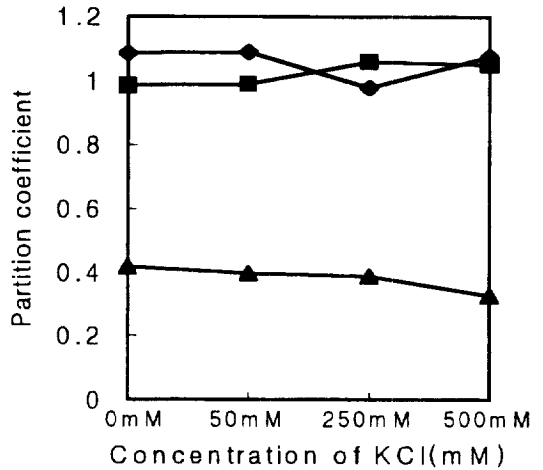


Fig. 6. Partition coefficients of ginkgo flavonoid aglycones in chloroform solvent systems with various concentrations of KCl.

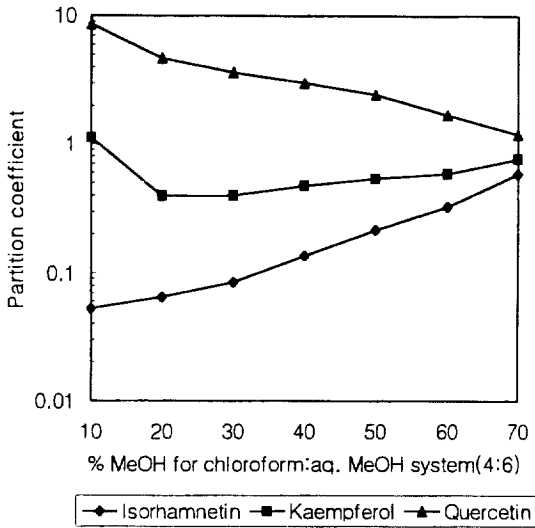
영향은 거의 없는 것을 알 수 있었다.

Fig. 6은 KCl의 농도에 따른 세가지 ginkgo flavonoid aglycones의 분획계수 값의 변화를 나타낸 것이다. Kaempferol과 quercetin의 경우 KCl의 농도에 따라 0.98에서 1.09의 범위내에서 변화하였으며 Isorhamnetin의 경우 KCl의 농도가 0에서 500 mM로 증가함에 따라서 분획계수 값이 0.418에서 0.327로 감소하는 경향을 나타내었다. 이 등⁽¹²⁾의 연구보고에 의하면 역류분배를 이용한 모델단백질의 분리 정제 시 KCl을 첨가함에 따라서 모델단백질의 분획계수 값이 변화함을 보고하였으며 따라서 염류를 첨가함으로써 용매시스템의 이온강도를 조절하여 분리하고자 하는 물질의 분리 효율을 증대시킬 수 있음을 알 수 있다.

Solvent system의 polarity의 영향

Fig. 7은 용매시스템의 극성에 따라서 세가지 ginkgo flavonoid aglycones의 분획계수 값의 변화를 나타낸 것이다. 일반적으로 CH₃OH과 같은 blending solvent용매들은 극성용매와 비극성용매 모두에 섞일 수 있어 두 층 사이의 극성 차를 줄여준다. 용매시스템의 극성은 CHCl₃/CH₃OH/H₂O 용매 시스템을 기본으로 CHCl₃를 40%로 고정시킨 후 나머지 60%의 CH₃OH과 H₂O를 100으로 하여 CH₃OH의 함량을 10%에서 70% 범위로 조절하여 용매시스템의 극성을 조절하였다.

Isorhamnetin의 경우 용매시스템의 물-CH₃OH 중에서도 CH₃OH 함량이 10%로 유기용매층의 극성이 낮은 경우 분획계수 값이 0.0527이었으나 CH₃OH의 함량이 증가하여 70%에서는 0.590으로 증가하였다. Kaempfer-



% CH ₃ OH	10	20	30	40	50	60	70
CHCl ₃	40	40	40	40	40	40	40
CH ₃ OH	6	12	18	24	30	36	42
H ₂ O	54	48	42	36	30	24	18

Fig. 7. Partition coefficients of ginkgo flavonoid aglycones in solvent systems with various polarities.

rol의 경우도 CH₃OH의 농도가 증가함에 따라 0.396에서 0.770으로 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 quercetin의 경우 CH₃OH 함량 10%일 경우 8.523의 분획계수 값을 나타내었으나 CH₃OH의 함량이 증가함에 따라 점차 감소하여 70%에서는 1.193의 분획계수 값을 나타내었다. 물질의 분획계수는 물질 자체의 표면성질에 의해 결정되는 것으로 HSCCC를 이용한 물질의 분리 정제 시 용매시스템을 결정하는 매우 중요한 요소가 된다. 일반적으로 분리하고자 하는 물질의 분획계수 값은 1을 중심으로 하여 일정한 간격을 두고 1에 근접하도록 하는 것이 이상적이다. 분획계수 값이 너무 크거나 작을 경우 물질들이 분리되지 않고 이동상 용매와 함께 흘러나와 버리거나 컬럼내 체류 시간이 길어져 피크가 넓어지는 문제점이 있다. 따라서 본 CHCl₃/CH₃OH/H₂O 용매 시스템에서는 가능한 CH₃OH의 함량을 높여 organic phase의 극성을 증가시키는 용매시스템이 효과적인 분리 용매시스템임을 판단할 수 있다.

요 약

본 연구는 기존의 HPLC방법과는 달리 고정상과 이동상이 모두 액상으로 구성되어 분리하고자 하는 물질의 활성을 상실하지 않고 비교적 높은 순도로 분리,

정제할 수 있는 HSCCC 방법을 이용하여 인체에 유효한 약리작용을 나타내는 생리활성 물질을 분리하기 위한 기초 연구로써 수행 하였다.

HSCCC의 운용변수에 따른 분리 효율을 알아보기 위하여 용매시스템의 물리화학적 특성이 생리활성 물질의 분리에 미치는 영향을 알아보기 위하여 용매시스템의 pH, KCl의 농도 및 극성에 따라 분리효율에 미치는 영향을 알아보았다. 용매시스템의 pH가 2.0에서 10.0으로 증가할수록 컬럼내 고정상의 유지율은 각각 73.8%에서 68.9%로 감소하는 경향을 나타내었다. 용매시스템의 상하층부 사이의 계면장력은 계속증가하여 pH 8.0에서 최대로 증가한 후에 pH 10.0에서 감소하였다. 용매시스템의 pH에 따른 ginkgo flavonoid 표준품의 분획계수는 pH가 증가함에 따라 증가하였으며 특히 quercetin의 경우 pH 10.0에서 크게 증가하여 용매시스템의 pH를 적절히 조절하여 분리하고자 하는 물질의 분획계수를 쉽게 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

용매시스템의 염농도가 HSCCC의 분리효율에 미치는 영향을 알아본 결과 KCl의 농도에 따른 컬럼내 고정상 유지율 변화 및 용매시스템의 계면장력에는 크게 영향을 미치지 않았다. 은행잎 flavonoid 표준품에 대한 분획계수는 KCl의 농도가 변화함에 따라서 약간의 변화를 나타내었다. 용매시스템의 극성에 따른 분획계수의 변화는 blending solvent인 methanol 함량의 증가로 인하여 용매시스템의 극성 차이가 감소함에 따라 상하층부에 대한 물질의 친화성 차이가 감소하여 분획계수 값이 1에 근접하는 경향을 나타내었다.

문 헌

- Ito, Y., Weinstein, M., Aoki, I., Harada, R., Kimura, E. and Nunogaki, K.: The coil planet centrifuge. *Nature*, **212**, December, 3, 985 (1966)
- Ito, Y., Aoki, I. and Kimura, E., Nunogaki, K. and Nunogaki, Y.: New micro liquid-liquid partition techniques with the coil planet centrifuge. *Anal. Chem.*, **41**(12), October, 1579 (1969)
- Ito, Y. and Bowmam, R.L.: Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support, *J. Chromatographic science*, **8**(6), 315 (1970)
- Ito, Y. and Bowmam, R.L.: Countercurrent chromatography: Liquid-liquid partition chromatography without solid support, *Science*, **167**(916), 281 (1970)
- Takenori, T., Pisano, J.J., Ito, Y. and Bowmam, R.L.: Droplet countercurrent chromatography, *Science*, **169**(940), 54 (1970)
- Ito, Y., Hurst, R.E., Bowman, R. L. and Achter, E.K.: Countercurrent chromatography, *Separation and Purification Methods*, **3**(1), 133 (1974)

7. Barrow, G. M.: Physical chemistry, McGraw-Hill Book Company, New York, 1973
 8. Oka, H., and Ito, Y.: Improved method for continuous UV monitoring in high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.*, **475**, 229 (1989)
 9. Perrin, D.D. and Dempsey, B.: Buffers for pH and metal ion control, Science Paperbacks, 156 (1974)
 10. Berthod, A.: Practical approach to high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatogr.*, **550**, 667 (1991)
 11. 이부용, 이창호, 이철호: 역류분배를 이용한 모델단백질의 분리 정제시 pH의 영향에 관한 연구, 한국식품과학회지, **22**(1), 56 (1990)
 12. 이창호, 이부용, 이철호: 역류분배를 이용한 모델단백질의 분리 정제시 염화칼륨의 영향에 관한 연구, 한국식품과학회지, **22**(2), 177 (1990)
-
- (1997년 9월 10일 접수)