

High-Speed Counter-Current Chromatography를 이용한 식품에서의 유용한 성분 분리·정제 및 구조 분석

유미영

식품분석센터

Preparative Separation and Purification of Active Compounds from Foods by High-Speed Counter-Current Chromatography

Mi-Young Yoo

Food Analysis Center

기술소개

High-speed counter current chromatography (HSCCC)는 liquid-liquid 분배 chromatography로부터 발전한 새로운 분리방법으로 기존의 HPLC와는 달리 고체 지지체를 필요로 하지 않는 신 개념의 분리 기술이다. 1940년대 초 Lyman C. Craig에 의해 처음으로 분별 깔때기를 기초로 하여 counter current distribution (CCD)개념에서 발명되어졌다. CCD는 용매를 자동적으로 섞은 후 중력에 의해서 상평형이 이루어진 다음 분리단계가 이루어지는 원리이다. 그러나 상평형이 단순히 중력에 의해서만 이루어지고 이동상의 속도가 빠르지 않아 화합물을 분리하는 시간이 하루에서 수주까지 걸리는 단점을 가지고 있기 때문에 장치의 지속적인 개선을 통하여 counter current chromatography (CCC)로 발전하였다. CCC의 전체적인 구성은

pump, injector, counter current chromatography 본체, detector, recorder, fraction collector로 구성되어 있어 HPLC와 유사하나, 물질의 분리 정제가 이루어지고 있는 컬럼 부분이 크게 다르다. CCC는 두 액체를 서로 반대방향으로 흘리면서 접촉하여 서로 섞이지 않게 혼합한 후 2개의 층으로 분리되는 용매 시스템으로, 분리된 2개의 층중에서 상층부는 고정상으로, 하층부는 이동상으로 하여 물질을 분리 정제할 수 있는 기술이다. 이때 2개의 용매에 대한 농도의 비, 즉 분배상수는 그 물질과 두 용매에 의해 결정되는 고유한 값으로 서로 다른 분자구조를 가지는 물질들의 혼합물은 분배상수의 차이가 상당히 크므로 CCC를 이용하여 적절한 용매를 한번 내지 두 번 통과시켜 분리할 수 있는 장점을 가지고 있다.

현재 가장 많이 활용되고 있는 high-speed counter current chromatography(HSCCC)는 1980

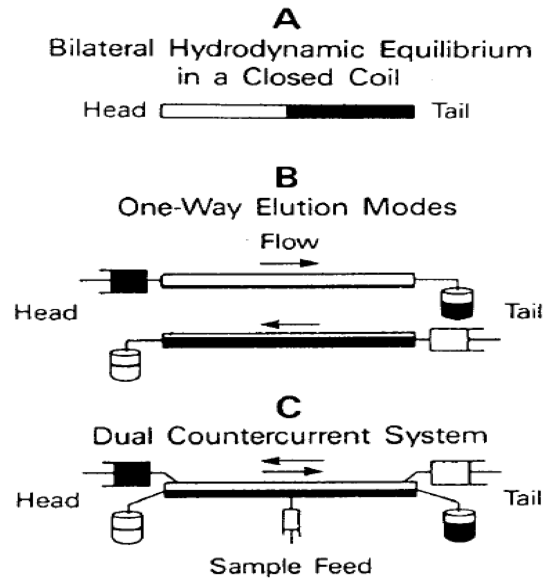


Fig. 1. Mechanism of HSCCC

년대 초에 Dr. Yoichiro Ito에 의해 개발된 liquid-liquid 분배 chromatography이다. 수 년간의 CCC의 개선을 통해서 분리능 향상, 분리시간 단축, 주입(loading)량 증가 등의 발전을 거듭하여 지금의 새로운 HSCCC로 발전시킬 수 있었다. 이 장치는 더 이상의 고체 지지체(컬럼)를 필요로 하지 않으며, 고체 충전제에 흡착되는 시료의 손실이 없을 뿐 아니라 시료의 변형을 일으키지 않는 장점을 가지고 있다. HSCCC는 CCC의 한 형태로서, 합성품이나 천연물로부터 단일 화합물을 분리·정제하기 위해서 지금 가장 널리 이용되고 있는 효율적인 분리크로마토그래피이다. HSCCC를 이용하기 위해서는 간단하고 특별한 기술적 지식을 필요로 하고 있는데, 왜냐하면 일반적인 chromatography 방법과 비교해서 실험조건의 선택 및 실제 분리되는 과정이 매우 다르기 때문이다. HSCCC의 화합물을 분리하는 기본적인 원리는 Fig. 1에 도식으로 나타났다.

Fig. 1A에서와 같이 양쪽이 막힌 coil에 같은 용매를 상층부와 하층부에 채워놓고 B와 같이 한쪽 방향에서 한 가지 용매만 흘려보내는 용출방식을 C와 같이 head와 tail 양쪽에서 한 가지 용매씩 서로 주입하면 상층부 용매와 하층부 용매는 서로에 대하여 역류로 흐르는 dual counter current system이 되는 것이다. 이때 C와 같이 양쪽방향으로 용매를 흘려보내면 B처럼 한쪽 방향으로만 용매를 흘려보내는 것보다 더 빠르게 물질을 분리할 수 있으므로 HSCCC라 하는 것이다. HSCCC의 컬럼 형태인 coil의 운동양식은 Fig. 2에서 보듯이 synchronous, J type으로 물레에 실을 감는 것처럼 원통이 회전하는 방향과 같은 방향으로 여러 층의 다층 구조로 teflon 튜브를 감은 multilayer 컬럼을 사용하여 행성 운동을 하는 방식이다.

행성 운동은 planetary 톱니바퀴를 돌면서 시작이 되고 이때, planetary 톱니바퀴는 컬럼 holder 축에서 원심틀에 고정된 sun 톱니바퀴로

Type-J Synchronous Planetary Motion

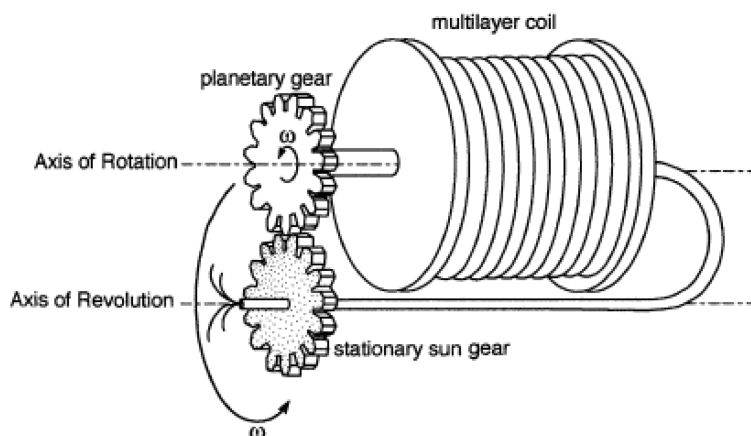


Fig. 2. Type-planetary motion of a multilayer coil separation column. The column holder rotates about its own axis and revolves around the centrifuge axis at the same angular velocity(ω) in the same direction. This planetary motion prevents twisting the bundle of flow tubes allowing continuous elution through a rotating column without risk of leakage and contamination

올라가면서 행성 운동을 할 수 있게 되는 것이다. 행성 운동은 CCC 분리를 위한 2가지 기능을 가지고 있는데, 첫 번째는 rotary-seal-free 용리 시스템으로 튜브가 감겨져 있는 컬럼을 회전 및 공전시키므로 이동상을 컬럼을 통해 지속적으로 용리시킬 수 있는 시스템이며, 두 번째 중요한 기능으로 회전 multilayer 컬럼에서 Archimedean screw effect에 의한 두 용매의 유체역학 운동이란 매우 독특한 현상이 만들어진다. 이런 두 가지 기능으로 인하여 CCC를 사용하여 화합물을 분리하는데 매우 효율적으로 이용할 수 있게 되었다.

내용 요약

고속역류크로마토그래피(HSCCC)는 지금 급속히 사용되고 있는 새로운 분리크로마토그래피 기술로서 고정상 없이 liquid-liquid 분배 원

리를 이용하여 혼합물을 분리 및 정제할 수 있는 신기술 분리 방법이다. HSCCC는 천연물의 분리 정제에 가장 광범위하게 이용되고 있으며, 고정상으로 인한 시료의 손실을 막을 수 있고, 시료의 화학적 성질을 파괴하지 않는 장점을 가지고 있다. 또한, HSCCC는 액체를 고정상으로 사용하기 때문에 HPLC와 같이 복잡한 샘플 전처리 없이 추출물 상태로 바로 주입해도 높은 분리 효과를 얻을 수 있다. 영국 웨일즈 대학의 연구팀은 angiotensin-converting enzyme (ACE)의 억제제인 lisinopril의 부분입체이성질체 3종류를 HSCCC를 이용하여 효율적으로 분리하였으며, 이러한 분리는 지금까지 HPLC를 이용한 epimer를 분리하기 위한 복잡한 시료의 전처리 없이 HSCCC를 이용하여 쉽게 부분입체이성질체를 대량으로 분리할 수 있는 기술이다. 또한, 중국의 창등은 HSCCC에 MS를 장착한 HSCCC-ESI-MS장치를 이용하여 *Oroxylum indicum*의 종자로부터 4종의 flavonoids, baicalein,

chrysin, biochanin A 및 baicalein-7-O-glucoside를 분리하였다. 이는 HPLC-MS와 비교해 볼 때, 분리능에서 HPLC의 경쟁 상대가 되지 못하는 못하나, HSCCC는 한번에 많은 양의 시료를 주입할 수 있어 효율성이 높으며, scale-up 하기 쉽고, 광범위하게 사용할 수 있다. 최근, HSCCC는 천연물에서 새로운 화합물을 분리하기 위한 앞선 기술로서 두각을 나타내고 있다. 그래서 본 연구에서는 HSCCC를 이용하여 식품에서의 유용한 화합물을 분리하는 연구에 대해 조사해보고자 한다.

이용분야

1. 참깨에서 분리된 sesame, sesamol의 분리 · 정제 및 구조분석

참깨(*Sesamum indicum* L.)는 전 세계적으로 재배되고 있는 주요 종자유로서 높은 영양가를 가지고 있는 식물이다. 참깨는 설탕과자 조성물 및 그를 이용한 상품 등을 굽는데 사용할 뿐만 아니라, 식용유지로서 아주 좋은 급원이다. 또한, 아시아지역에서는 건강에 아주 유익한 식품으로 알려져 있다. 참기름은 lignan 화합물, sesamin, sesamol 및 소량의 sesamol 등과 같은 아주 유용한 화합물을 가지고 있다. 참기름에 대한 지금까지의 연구결과는 혈중지질 저하

효과, 혈중아라키돈산 저하효과, 항산화능 및 감마 토코페롤 생체이용률증가, 면역증진작용 및 에스트로제닉 활성을 증진하는 등의 다양한 활성이 보고되고 있다.

참깨로부터 조추출물을 얻기 위한 방법은 Liu 등의 방법에 따라 추출하였다. 먼저, 생참깨(1,100g)을 분쇄기에서 분쇄하여 분말로 사용하였으며, 속실킷을 이용하여 lignan 화합물을 12 시간동안 추출하였다. 이때 용매는 *n*-hexane(2.5L)을 이용하여 추출하였다. 진공회전농축기를 이용하여 *n*-hexane을 제거한 후, 참기름 489.5g을 얻을 수 있었다. 또한, ethanol(500 mL × 3)을 이용하여 재추출하였으며, 이때 수율은 10.3g이었다. 그리고 ethanol 추출물을 HSCCC를 이용한 분석시료로 사용하였다. 참깨에서 lignan 화합물을 분리하기 위한 용매 조건으로는 petroleum ether, ethyl acetate, methanol, 그리고 water(1 : 0.4 : 1 : 0.5, v/v)으로 구성되어졌으며, 분액깔때기를 이용하여 신속하게 층 분리를 시켰다. 2개의 층으로 분리되어진 용매 시스템에서 하층부는 이동상으로, 상층부는 고정상으로 사용하였다.

HSCCC를 이용한 성공적인 분리는 목표 시료의 2상계 시스템 분배 상수(K)가 최적으로 구해졌을 때 가능한 일이다. 분배 상수(K)값이 너무 낮으면 peak의 분리능이 떨어지는 반면 높은 K 값은 피크의 폭이 넓어지는 경향을 나타내었다. Sesame lignan의 물리적 성질을 토대로

Table 1. Partition Coefficients(K) of Sesamin and Sesamol

Solvent Systems ^a	Sesamin K_1	Sesamol K_2
1 : 1 : 1 : 1	7.1	11.2
1 : 0.5 : 1 : 0.5	1.2	3.2
1 : 0.4 : 1 : 0.5	1.0	2.5

^a Ratio of petroleum ether(60~90°C), ethyl acetate, methanol, and water

하여, HSCCC 실험을 진행하기 위해서 적당한 2상계 시스템 분배 상수의 변화를 알아보기 위하여 Table 1과 같은 조건으로 측정하였다. 분배 상수 측정을 위한 실험방법은 먼저, 평형을 이루고 있는 고정상과 이동상 2mL씩 테스트 튜브에 취한 후 1mg의 참깨조추출물을 첨가하여 고정상과 이동상이 완전히 평형을 이루도록 하기 위하여 1분 동안 빠르게 진탕하였다. 분배 상수(K)를 구하기 위하여 참깨조추출물을 첨가한 고정상과 이동상에서 동량을 취하여 HPLC로 분석을 하였으며, 목표 화합물의 상층부(고정상)와 하층부(이동상)의 면적비로 계산하였다.

Petroleum ether: ethyl acetate: methanol: water = 1 : 1 : 1 : 1(v/v)의 비율일 때, 분배 상수 값이 너무 커서 sample의 peak가 넓을 뿐 아니라 긴 용리시간을 필요로 해서 분리 효율이 떨어졌다. Petroleum ether: ethyl acetate: methanol: water = 1 : 0.5 : 1 : 0.5(v/v), 1 : 0.4 : 1 : 0.5(v/v)의 비율일 때, 분배 상수가 최적치를 나타냈으며 목표 화합물(sesamin, sesamol)이 다른 화합물들에 비해 분리 효율이 높게 나타났다.

참깨조추출물(220mg)은 HSCCC를 이용하여 분리·정제하였다. HSCCC 분획은 HPLC를 이

용하여 분석하였으며, sesamin, sesamol은 이동상이 용리되면서 분리되어져 sesamin 62.0mg, sesamol 5.0mg을 얻었다(Fig. 3). 참깨조추출물로부터 분리되어진 sesamin과 sesamol의 함량은 각각 29.2% 및 3.5%로 나타났다.

이상의 결과에서 참깨 조추출물로부터 sesamin, sesamol을 분리·정제하기 위한 HSCCC 방법으로 인하여 2상계 용매 시스템을 더욱 더 발전시킬 수 있는 계기가 되었다. 본 연구에서 분리되어진 sesamin, sesamol은 앞으로 물리적 특성에 대한 연구뿐만 아니라, HPLC용 표준품으로 아주 유용하게 쓰일 수 있게 되었다. 본 연구의 결과는 천연물로부터 생리활성물질을 분리하고 정제하는데 HSCCC는 아주 강력한 분리 방법임을 확인시켜 주었다.

2. 울금으로부터 분리된 germacrone, curdione의 분리·정제 및 구조 분석

울금(*Curcuma wenyujin*)은 예부터 한방 및 민간에서 약재 혹은 식용으로 널리 사용되어져 왔다. 울금 근경의 주성분은 정유성분이며, 정유성분의 주요 화합물은 germacrone로서 항암

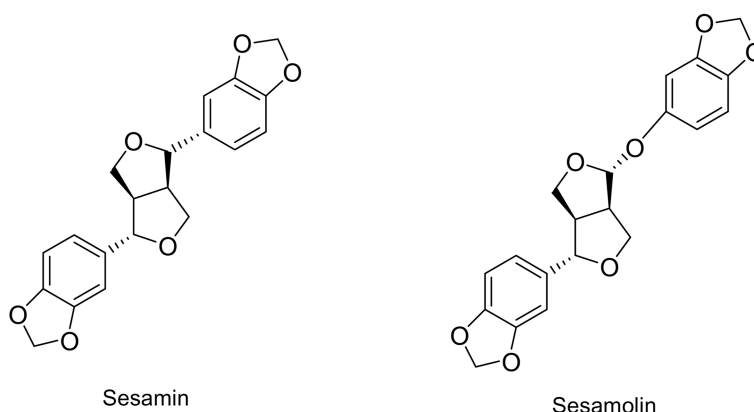


Fig. 3. Chemical structure of sesamin and sesamol

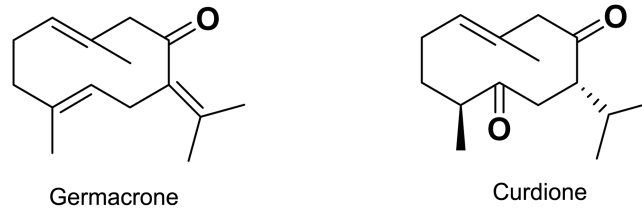


Fig. 4. Chemical structures of germacrone and curdione

효과 및 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 지금까지 HSCCC를 이용하여 울금으로부터 terpene 화합물인 germacrone, curdione을 분리한 연구보고는 없는 실정이다. 그래서 효율적인 방법인 HSCCC를 이용하여 울금으로부터 germacrone, curdione의 두가지 화합물을 대량으로 분리해보고자 한다.

HSCCC를 이용하여 울금에서 terpenes을 분리하기 위해서, 용매 조건으로는 petroleum ether, ethanol, diethyl ether 그리고 water (6:4:0:1, 5:4:0:1, 5:4:0.75:1, 5:4:0.5:15, v/v)의 4가지 조건으로 실험한 결과 5:4:0.5:15의 분리조건이 가장 좋은 분리능을 나타내었다. HSCCC를 이용하여 울금의 정유성분으로부터 terpenes을 분리한 결과 germacrone 62.0mg, curdione 93mg을 얻었다(Fig. 4).

이상의 결과로부터, HSCCC를 이용하여 울금의 정유성분 658mg으로부터 한번의 분리 단계를 거친 다음, 순도 95% 이상의 germacrone, curdione을 대량으로 분리하였다. 이상의 결과에서 알수 있듯이 HSCCC는 울금의 정유성분에서 terpenes을 분리·정제하는데 매우 빠르고 효율적인 기술임을 증명해주고 있다.

3. 감초로부터 분리된 licochalcone, inflacoumarin A의 분리·정제 및 구조 분석

감초는 2000년 동안 중국에서 민간요법으로

사용되어져 왔으며, 감초의 약리활성에 연구로는 결핵, 접촉성간염, 기관지염 및 학질 등의 치료에 효과가 있음이 보고되어져 왔다. 감초는 대량의 플라본 화합물을 함유하고 있으며 그 중에서 가장 대표적인 화합물이 licochalcone, inflacoumarin 이다. licochalcone, inflacoumarin의 많은 생리활성에 대한 연구가 보고 되고 있으며 또한, licochalcone, inflacoumarin 및 그 유사체들의 생화학적 가능성을 더욱 더 이해하고 앞으로 더 많은 연구가 필요하다. 그래서 licochalcone, inflacoumarin의 임상적 적용을 위해 발전한 HSCCC를 사용하여 대량으로 감초의 플라본을 분리 정제해보고자 한다.

HSCCC를 이용하여 감초에서 플라본을 분리하기 위해서, 용매 조건으로는 n-hexane: chloroform: methanol: water = 1.5:6:3:2(v/v)의 분리조건이 가장 좋은 분리능을 나타내었다. HSCCC를 이용하여 감초로부터 플라본을 분리한 결과 70mg의 감초에탄올 추출물로부터 licochalcone 6mg, inflacoumarin A 8mg을 얻었다(Fig. 5).

HSCCC를 응용하여 감초의 에탄올 조추출물에서 licochalcone, inflacoumarin A를 분리하는데 성공적인 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 감초에서 유용한 성분을 분리하는데 semi 분취 크로마토그래피가 아주 유용한 결과임을 알 수 있다. 지금까지의 전형적인 분리방법에서는 95% 이상의 순도를 가지는 수 mg의 생리활성을 분

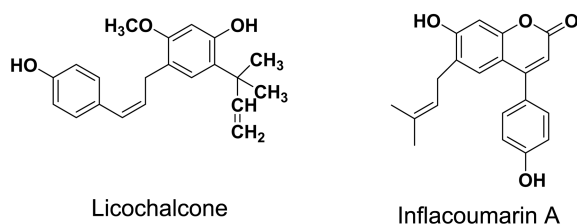


Fig. 5. Chemical structures of licochalcone and inflacoumarin A

리하기 위해서는 최소 g단위 이상의 시료조출물을 가지고 있어야한다. 그러나 HSCCC를 이용한 분리에서는 mg의 시료 조출물을 이용해서 mg 단위의 생리활성 물질을 분리할 수 있다.

현재까지의 HSCCC는 주로 천연물 분리, 정제 연구가 주를 이루어 왔으며, 최근 몇 년 동안은 펩타이드 분리 정제에서 역상 HPLC를 대체할 정도로 성공적으로 사용되고 있다.

참고문헌

1. Chen LJ, Song H, Games DE, Sutherland IA, HSCCC-MS study of flavonoids in extracts from the seeds of *Oroxylum indicum*, J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL, **28**(12), 1993-2003, 2005
2. Crag LC, Post O, Apparatus for countercurrent distribution, Anal. Chem, **21**(4), 500-504, 1949
3. Craig LC, Hausman W, Ahrens EH, Harfenist EJ, Automatic countercurrent distribution equipment, Anal. Chem, **23**(9), 1236-1244, 1951
4. Wang QE, Lee FS, Wang X, Isolation and purification of inflacoumarin A and licorice by high-speed counter-current chromatography, J Chromatogr A, **1048**(1), 51-57, 2004
5. Wang X, Lin Y, Geng Y, Li F, Wang D, Preparative separation and purification of sesamin and sesamolin from sesame seeds by high-speed counter-current chromatography, Cereal Chem, **86**(1), 23-25, 2009
6. Whiteside RG, Games DE, Strawson AS, Brown L, Application of high speed CCC for the purification of lisinopril diketopiperazine diastereomers, J. LIQ. CHROM. & REL. TECHNOL, **24**(11&12), 1801-1810, 2001
7. Yan J, Chen G, Tong S, Yeping F, Sheng L, Lou J, Preparative isolation and purification of germacrone and curdione from the essential oil the rhizomes of curcuma wenyujin by high-speed counter-current chromatography, J Chromatogr A, **1070**(1-2), 207-210, 2005

유미영 공학박사

- 소속 한국식품연구원 식품분석센터
- 전문분야 공학박사, 식품공학(천연물화학, 천연물에서 유용한 성분 분리 정제 및 구조분석 연구)
- E-mail myyoo@kfri.re.kr
- TEL 031-780-9342