

Chirobiotic® T HPLC 컬럼을 이용한 Tryptophan 이성질체 분리

송성문 · 랑문정* · 김인호†

충남대학교 화학공학과
305-764 대전시 유성구 궁동 220

*배재대학교 분자과학과
302-735 대전시 서구 연자 1길 14
(2010년 1월 13일 접수, 2010년 6월 22일 채택)

Separation of Tryptophan Enantiomers by using Chirobiotic® T HPLC Column

Sung-Moon Song, Moon Jung Rang* and In Ho Kim†

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

*Department of Molecular Science, Paichai University, 14 Yeonja 1 gil, Seo-gu, Daejeon 302-735, Korea

(Received 13 January 2010; accepted 22 June 2010)

요 약

Chirobiotic® T HPLC 컬럼을 이용하여 D, L-트립토판을 분리하였다. 이동상으로 메탄올과 증류수를 각각 70/30, 80/20, 90/10의 비율로 사용하고 체류시간을 비교하기 위해 온도를 25, 40, 55 °C로 변화시켰다. 이동상 조성비를 변화시켜 D-트립토판과 L-트립토판의 체류시간 차이를 조사하였다. 선택도와 분리도, 컬럼의 효율성을 체류시간 관점에서 계산하여 최적의 분리 조건을 찾는 실험을 하였다. 이동상에서 메탄올의 양이 감소함에 따라 트립토판 체류시간이 짧아지고, 컬럼의 온도가 증가함에 따라 체류시간도 감소한다. 메탄올과 증류수의 비가 70/30일 때와 온도가 25 °C일 때 가장 좋은 선택도와 분리도를 얻었다.

Abstract – D,L-tryptophans were separated by using Chirobiotic® T HPLC column. Mobile phases were the mixture of methanol and water(70:30, 80:20, 90:10, v/v). Experimental temperatures were adjusted as 25, 40 and 55 °C in order to compare retention times. Difference in D,L-tryptophan retention times was studied in terms of the interaction between stationary phase and tryptophans. Selectivity, resolution and efficiency of column were utilized to find an optimum separation condition. Retention times were shortened by increasing the amount of methanol in mobile phase and the temperature of column. The best selectivity and resolution was obtained with the temperature(25 °C) and the ratio of mobilephase(70/30 v/v%).

Key words: Chirobiotic, HPLC, Tryptophan

1. 서 론

아미노산은 영양제, 피부미용제, 동물사료제 및 각종 의약품 원료로 사용된다. 아미노산이 의약품 원료로 중요하게 취급되는 이유는 키랄성 때문이고 현재 시판되고 있는 의약품의 70% 가까이가 키랄성을 갖고 있다. 키랄성 의약품의 경우 거울상을 따로 분리하여 각각에 대해 약효 검사를 하고 의약으로 사용하여야 한다. 아미노산은 자체 키랄성 때문에 분리되고 부가가치가 높아지며 아미노산을 L형과 D형으로 순수하게 분리할 때에 키랄의약품 원료로 사용될 수 있다. 생명체에서 만들어지는 아미노산은 모두 L형이므로 천연아미노산의 L형은 천연에서 직접 추출하거나 발효법으로 대량으로 얻을 수 있다. 그러나 D형 아미노산과 비천연 아미노산은 쉽게 얻을

수가 없다. 합성 방법으로 아미노산을 합성하면 L형과 D형이 50:50 혼합물로 얻어지고 분리가 필요하다. D형 및 비천연 아미노산을 순수하게 얻기 위한 분리 연구들이 다양하게 시도되고 있다.

광학이성질체는 서로 거울상의 관계를 가지며, 동일한 물성, 화학적 설정을 가지고 있어서 보통의 혼합물을 분리하는 방법으로는 분리가 불가능하다. 또한 광학이성질체 중 하나는 인체에서 원하는 생리 활성을 나타내지만 다른 거울상 이성질체는 아무런 생리활성을 나타내지 않거나 인체의 부작용을 일으킬 수 있다고 알려져 왔다[1]. 광학이성질체 분리의 필요성은 약학뿐만 아니라 의학, 식품 과학, 농학, 유기화학, 분석 화학 등 많은 분야에 있어서 아주 크다. 광학 이성질체의 분리는 융점, 비점, 용해도 등의 물성이 동일하기 때문에, 증류법, 추출법 등 종래의 방법으로는 분리가 불가능하다[2].

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)중 Chirobiotic 칼럼을 이용한 아미노산의 거울상 이성체의 분리가 근래 활발히 이루어지고 있

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

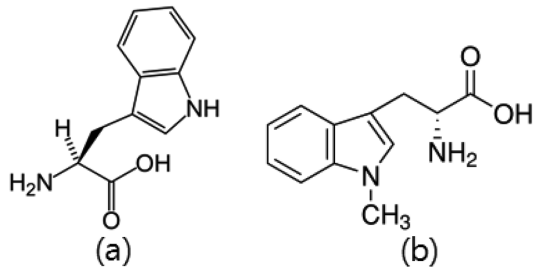


Fig. 1. Molecular structure : (a) L-tryptophan (b) D-tryptophan.

다. Chirobiotic 칼럼을 이용한 방법은 고체 지지체에 당펩티드와 같은 키랄성을 띤 물질을 흡착 또는 결합시킨 키랄성 정지상을 이용하여 아미노산 광학 이성질체를 순수하게 분리할 수 있어 제조용으로 이용할 수 있다. Chirobiotic 칼럼은 이동상으로 역상용매를 이용할 수 있고, 높은 재현성을 가지고 있다. 또한 Chirobiotic 컬럼은 메탄올과 같은 극성용매로 상온에서 분리가 주로 이루어져 열에 민감한 의약품이나 생약제 등의 분리에 적합하다[3]. 생물체에서 오직 L-tryptophan만이 생성되지만, 때때로 D-tryptophan이 해양생물의 독성 펩티드인 콘트립판과 같은 자연물질로 발견된다. Fig. 1은 L-tryptophan과 D-tryptophan의 구조를 나타낸 그림이다.

본 연구에서는 광학 이성질체 D,L-tryptophan을 메탄올에 녹여 Chirobiotic T 칼럼에서 체류시간을 측정하였다. 온도와 이동상 조성비를 변화시켜 D-tryptophan과 L-tryptophan을 분리하고 키토산이나 소혈청 단백질(BSA)을 막이나 실리카에 고정화하여 분리한 연구[4,5]와 비교하였다. 크로마토그램의 분리특성인 선택도(selectivity), 분리도(resolution)와 이론단수(the number of plate) 그리고 용량인자 k' 와 엔탈피 변화인 H 의 관계를 구하기 위해 아래와 같은 식들을 사용하였다[6].

선택도는 다음과 같다.

$$\text{선택도}(\alpha) = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (1)$$

$k' = \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right)$ 는 용량인자(capacity factor)이고 t_{R2} , t_{R1} 은 각 성분의 체류시간을 나타내며 각각의 피크의 최대높이가 나타날 때의 시간이다. t_0 은 시료가 고정상과 상호작용이 없고 검출기에 도달하는 시간을 표시한다. 칼럼의 불감시간(dead time)이라고도 부른다.

분리도는 아래와 같이 정의된다.

$$\text{분리도}(R) = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_2 + w_1)/2} = \frac{2\Delta t}{w_1 + w_2} \quad (2)$$

Fig. 2를 보면 w_1 과 w_2 는 피크의 폭을 나타내고 시간단위로 표시된다.

칼럼효율성은 이론단수로 표현된다.

$$\text{이론 단수}(N) = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (3)$$

그리고 vant Hoff식은 용량인자 k' , 선택도 α 로 다음식과 같이 표시된다.

$$\ln k' = \left(-\frac{\Delta H}{R} \right) \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \phi \quad (4)$$

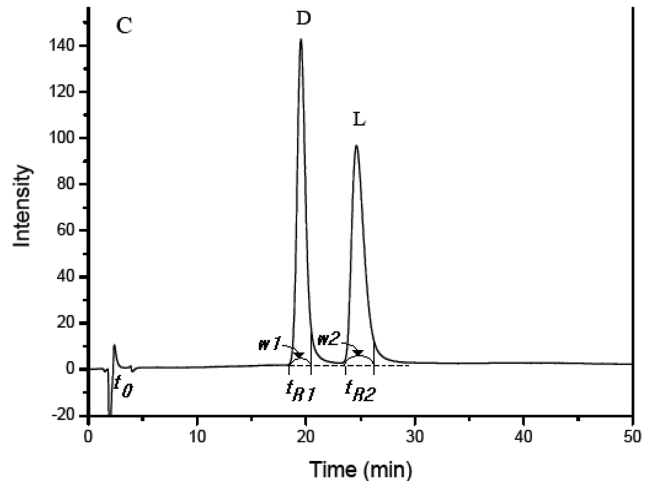


Fig. 2. The parameters in chromatograms.

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta \Delta H}{RT} + \frac{\Delta \Delta S}{R} \quad (5)$$

여기서 R 은 기체상수, T 는 절대온도, ΔH 는 엔탈피 변화, ϕ 는 Methanol에 대한 증류수의 비, k' 는 용량인자, α 는 선택도를 나타낸다[6].

2. 실험

2-1. 실험재료 및 시약

시료로 D,L-Tryptophan(Aldrich, Japan)을 이용하였고 이동상으로 Methanol(100%, J. T. Baker, U.S.A)과 증류수를 사용하였다.

2-2. 기기 및 장치

HPLC pump(Beckman 110B Solvent Delivery Module, U.S.A), UV-detector(783A, Applied Biosystem, U.S.A), 데이터 수집 장치(540-0247W, Young Lin, Korea), Astec Chirobiotic® T HPLC Column(4.6 mm×250 mm, Supelco, USA)을 사용하였다. 그리고 20 μ l의 sample loop를 부착하였고 이동상의 탈기를 위해 초음파 세척기(3210, Bransonic, USA) 사용하였다. Column heater(M-1330, Bio-Rad, USA)를 이용하여 온도를 조절하였다.

2-3. 실험 방법

D,L-Tryptophan 1.0 mg을 methanol 1.0 ml에 녹이고, 멤브레인 필터(0.45 μ m GVPP, Millipore, USA)를 통한 여과 과정을 거친 후 시료로 사용하였다. 이동상은 메탄올과 증류수를 각각 70/30, 80/20, 90/10의 비율로 사용하였다. 이동상도 시료와 같은 방법으로 불순물을 제거하였다.

이동상 유속은 0.5 ml/min으로 고정하였고 UV검출장치의 파장은 280 nm이었다. 컬럼은 실험 시작 전 기준선이 영점에 이를 때까지 충분한 시간동안 이동상으로 세척하였다.

기본 이동상으로 methanol과 증류수의 조성비를 70/30, 80/20, 90/10(%v/v)로 변화를 주면서 적절한 이동상의 조성비를 찾고자 하였다. 각 이동상의 조성마다 컬럼의 온도를 column heater를 사용하여 25, 40, 55 $^{\circ}$ C로 변화를 주었다.

3. 결과 및 고찰

온도를 25 °C로 유지하고, methanol과 증류수의 비를 다양하게 변화시켜 분리한 결과를 Fig. 3에 보였다. D-tryptophan의 피크가 L-tryptophan의 피크보다 먼저 용출되었다. 이는 다른 문헌에 보고된 바와 같이 D-트립토판이 L-트립토판 보다 고정상에 고정된 키랄 분자와 상호작용이 작아 먼저 나오기 때문이다[7]. 그리고 methanol의 조성이 늘어날수록 체류시간이 증가하였다. 이동상 조성이 70/30일 때가 체류시간이 가장 짧았다. 아세트니트릴과 증류수를 사용하여 Chirobiotic T 컬럼에서 antagonist를 분리한 경우 증류수의 양이 늘수록 용량인자가 작아져 체류시간이 짧아지는 결과와 유사하다[8].

Fig. 4는 용매 조성을 methanol과 증류수의 비를 70/30으로 일정하게 유지하고, 온도를 25, 40, 55 °C로 변화를 주어서 실험을 한 결과이다. 온도가 높아질수록 체류시간이 앞당겨지고, 피크의 높이도 증가한다. 특히 25 °C에서 피크의 높이가 40 °C나 55 °C에 비해 매우 낮다. 그리고 55 °C일 때는 분리가 불완전하였다. 낮은 온도에서

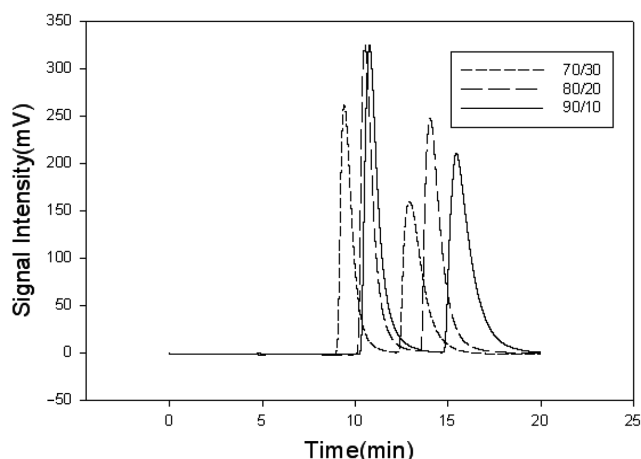


Fig. 3. Retention time variation of tryptophan in accordance with the change of mobile phase composition of methanol/water, temperature=25 °C, sample loop=20 μ l, sample concentration=1.0 mg/ml, wavelength=280 nm.

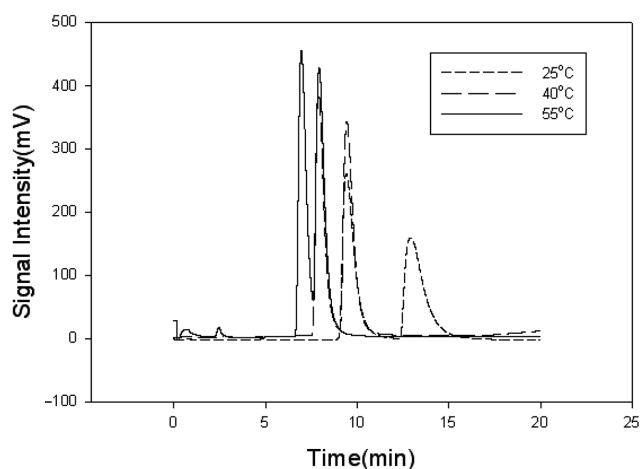


Fig. 4. Retention time variation of tryptophan in accordance with the change of temperature, mobile phase composition of methanol/water=70/30(%v/v), sample loop=20 μ l, concentrate=1.0 mg/ml, wavelength=280 nm.

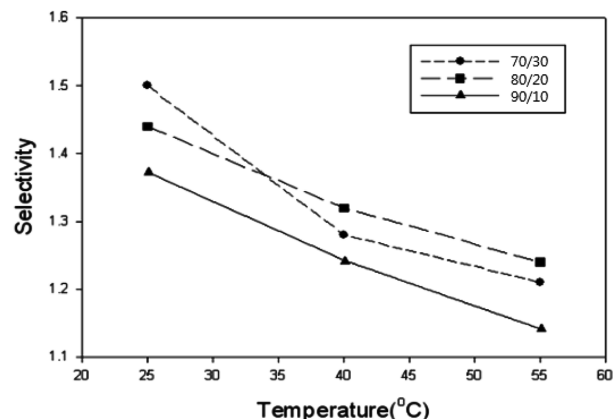


Fig. 5. Selectivity of tryptophan in accordance with the change of temperature and mobile phase.

분리가 잘 되는 이유는 키랄정지상과 키랄분자 사이의 상호 작용이 활발하여 D-와 L-아미노산 사이의 상호작용의 차이가 크기 때문이다.

이동상의 조성 and 온도 변환에 따른 선택도를 계산하였다. 용매인 methanol의 체류시간(t_R)을 2.5 min로 정하고 식 (1)을 이용하여 계산하였다. Fig. 5는 그식을 이용하여 온도와 용매 조성에 따라 선택도 변화를 나타낸 그래프이다. 온도가 증가함에 따라 선택도는 감소한다. 그리고 용매 조성의 영향을 보면 25 °C에서 methanol이 감소함에 따라 선택도가 증가하는 것을 알 수 있다. 메탄올 농도의 증가는 용매 극성을 증가시키며 아미노산 분자의 분자운동을 저해하고 따라서 키랄고정상과의 상호 작용을 감소시키므로 분리도가 감소하는 것으로 사료된다. 온도가 25 °C, 용매 조성이 70/30일 때가 가장 좋은 선택도를 나타낸다.

분리도는 두 피크 용출시간의 차이인 Δt 와 두 피크의 평균 폭을 이용한 식 (2)를 이용하여 계산하였다. Fig. 6는 식 (2)를 이용하여 온도와 용매 조성에 따른 분리도를 보여준다. 선택도와 유사하게 온도가 증가하면서 분리도가 감소하여, 가장 좋은 분리도를 나타낸 것은 용매 조성이 70/30일 때이다. 70/30 경우 온도가 증가함에 따라 다른 용매 조성에 비해 상대적으로 급격하게 분리도가 감소하는 것을 볼 수 있다.

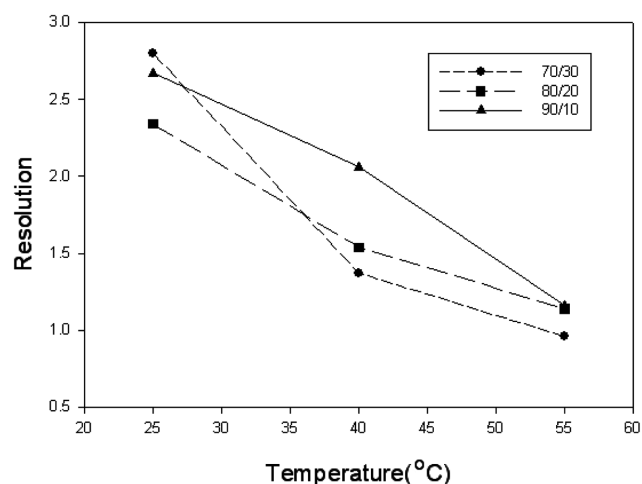
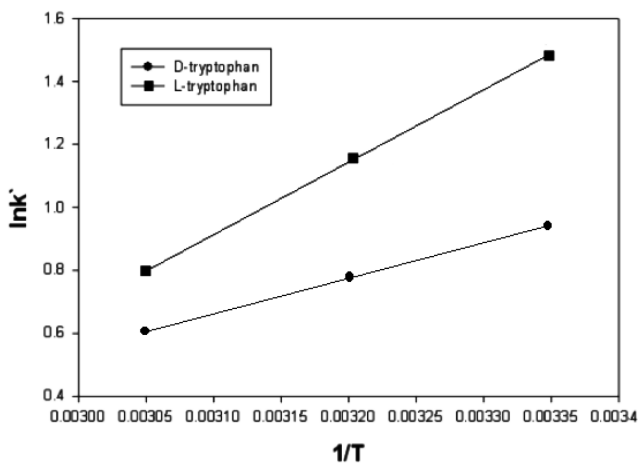


Fig. 6. Resolution of tryptophan in accordance with the change of temperature and mobile phase.

Table 1. Number of the plates of D,L-tryptophan in accordance with the change of temperature and mobile phase

	25 °C	40 °C	55 °C
70/30	1413, 1183	996, 910	772, 1001
80/20	1135, 1029	816, 868	811, 1091
90/10	824, 954	735, 954	775, 1005

Flow rate=0.5 ml/min, wavelength=280 nm, sample loop=20 µl, mobile phase=methanol/water.

**Fig. 7. Vant Hoff polt of D,L-tryptophan in accordance with the change of temperature, mobile phase composition of methanol/water=70/30 (%v/v).**

이동상의 조성비와 온도를 변화시켜 컬럼의 효율성을 계산하였다. 컬럼의 효율성은 이론단수 N 으로 표현되며, 식 (3)을 이용하여 계산하였다. Table 1은 D-, L- tryptophan의 이론단수 계산 결과이다. 표에서 보듯이 온도가 증가하면 컬럼의 효율성이 줄어든다. 또 D-tryptophan 경우 이동상 조성이 70/30이 컬럼의 효율성이 가장 높게 나타났다. L-tryptophan의 이론 단수는 D-tryptophan에 비해 변화가 작고, 25 °C에서 가장 높은 효율성과, 40 °C에서 가장 낮은 효율성이 나타난다. 따라서 L-tryptophan에서도 효율성은 25 °C 일 때와 70/30일 경우가 가장 높았다. 키랄 막에서 트립토판 유사체를 분리한 연구[9]에 의하면 BSA는 L-enantiomer와 결합력이 크므로 D-아미노산이 L-아미노산보다 막을 통하여 잘 빠져나오며 농도가 여과액에서 높다. 따라서 HPLC 키랄 정지상에서 오래 결합되었다 나오는 L-트립토판의 피크가 넓으며 분리 효율성도 감소한다.

반응속도와 온도상이의 상관식인 아레니우스식 $\ln k = \ln A - \left(\frac{E_a}{R}\right)\frac{1}{T}$ 에 해당하는 식이 HPLC의 용량인자 k' 와 ΔH 의 상관 관계식인 vant Hoff식 $\ln k' = \left(\frac{\Delta H}{R}\right)\frac{1}{T} + \text{상수}$ 이다[6]. Fig. 7은 이동상 조성 70/30에서 D-tryptophan과 L-tryptophan의 vant Hoff 식을 그림으로 표현한 것이다. 온도가 낮아질수록 즉 $1/T$ 의 값이 커질수록 $\ln k'$ 값이 점점 더 커진다. L-tryptophan의 기울기가 D-tryptophan의 기울기보다 크다. 이동상 조성비 70/30에서 계산한 D-tryptophan과 L-tryptophan의 ΔH 가 -1,167과 -2,333로 각각 계산되었다. ΔH 의 절대 값으로 고정상과의 친화도를 표현한다. 용매 조성이 70/30일 때 L-tryptophan의 ΔH 절대값이 크며 L-tryptophan과 고정상 사이의 친화도가 클 수 있다.

4. 결 론

필수 아미노산 중 tryptophan의 D-form, L-form의 이성질체를 분리하는 실험을 하였다. D-form과 L-form tryptophan을 효과적으로 분리함에 있어 온도와 용매의 조성이 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 먼저 온도를 일정하게 하고 이동상 중에 메탄올의 양이 증가함에 따라 체류시간이 감소했다. 조성을 고정하고 컬럼의 온도 변화를 줄 때, 컬럼의 온도가 증가함에 따라 D, L-tryptophan의 체류시간이 앞당겨지는 것을 알 수 있다. 메탄올과 증류수의 비가 70/30 일 때 가장 좋은 선택도를 나타내고 분리도에서 마찬가지로 25 °C, 용매 조성비가 70/30일 때, 좋은 분리도를 나타냈다.

용량인자 k' 와 절대온도 $1/T$ 를 이용하여 이동상의 조성과 온도에 따른 $\ln k'$ 의 수치변화를 나타낸 그래프는 $1/T$ 의 값이 클수록 $\ln k'$ 의 수치는 높아졌다. 반트호프 식에서 기울기인 열역학적 변수 ΔH (J/mol)를 비교하여 L-tryptophan이 D-tryptophan보다 고정상과의 친화도가 크므로 D-tryptophan이 먼저 용출되었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 기초연구과제(2009) 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Hyun, M. H., "Separation of Optical Isomers by LC," Minumsa, Seoul(1996).
- Nakamura, H., "Chiral Separations by HPLC," Hirokawa Publishing Co., Tokyo, Japan(1997).
- HPLC columns, Sigma-Aldrich, www.sigmaldrich.com.
- Jegal, J., Kim, J. H., Kim, J. H., Lee, K. H. and Lee, Y. T., "Enantioselective Membrane Based on Chitosan for the Separation of D- and L-Tryptophan," *Kor. Mem. J.*, **5**, 25-30(2003).
- Kim, K. I., "Study on Chiral Separation of Tryptophan by Preparative Liquid Chromatography with BSA-Silica Stationary Phase," MS thesis, Myungji University(2001).
- Park, M. B. and Kim, I. H., "Effect of Temperature and Eluent Composition on the Separation of Ketoprofen and Ibuprofen Racemates in Kromasil HPLC Column," *Korean Chem. Eng. Res.*, **47**, 54-58(2009).
- Kenji, H., Reiko, N., Akiko, M., Ryuichi, K. and Kiyoshi, Z., "Sensitive High-performance Liquid Chromatographic Assay for d-Amino-acid Oxidase Activity in Mammalian Tissues using a Fluorescent Non-natural Substrate, 5-Fluoro-d-Tryptophan," *J. Chromatogr. A*, **1106**, 159-164(2003).
- Guisbert, A. L., Sharp, S., Petersen, J. A. and Risley, D. S., "Enantiomeric Separation of an AMPA antagonist using a Chirobiotic T column with HPLC and Evaporative Light-Scattering Detection," *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, **23**(7), 1019-1028(2000).
- Randon, J., Garnier, F., Rocca, J. L. and Maisterrena, B., "Optimization of the Enantiomeric Separation of Tryptophan Analogs by Membrane Processes," *J. Mem. Sci.*, **175**, 111-117(2000).