

TLC 이용한 젖산 분리와 정량분석 개발을 위한 연구

조갑수, 최미화¹, 류화원^{2,3}, 김근아¹, 유선균⁴, 김도만^{2,3,5}

전남대학교, 분자생물공학협동과정, 물질·생물화학공학과¹, 화학공학부²

생물산업기술연구소³, 중부대학교⁴, 공업기술연구소⁵

전화 (062)530-0874, Fax (062)530-1849

Abstract

TLC(Thin Layer Chromatography)는 제약산업이나 생화학 연구 그리고 여러 산업 현장에서 널리 이용되는 화학 분석 방법이다. 본 연구에서는 적은 비용으로도 많은 양의 시료를 신속하게 분리할 수 있는 TLC를 이용하여 유기산인 젖산(Lactic acid)을 분리하는 전개방법을 개발하였다. 전개용매는 2가지 용매 (1) nitroethane : nitromethane : ethanol : water : 1-propanol = 1 : 2 : 3 : 4 : 5 (v/v/v/v/v), (2) diisopropyl ether : formic acid : water = 90 : 7 : 3 (v/v/v)를 사용하였다. 발색시약은 A : bromocresol purple reagent I, B : bromocresol purple reagent II, C : bromocresol green-bromophenol blue-potassium permanganate reagent를 사용하여 분석하는 방법을 개발하였다⁶⁾. 젖산의 분리는 silica gel TLC plate를 이용하는 경우, 용매 (1)에 발색시약 B를 사용했을 때, 분리 확인이 가장 좋았다.

Intorduction

일반적으로 화학 분석에 쓰이는 방법은 시료에 대한 선택성이 있어야 한다. 따라서 중요한 방해물로부터 분석물을 분리하는 것은 많은 분석과정에서 중요한 단계가 된다. 분석 방법중 가장 널리 쓰이는 방법은 크로마토그래피법이고 모든 과학 분야에서 널리 이용되고 있다¹⁻³⁾. 크로마토그래피는 보통 이동상과 정지상의 상태에 따라 분류한다. 이동상이 기체일 때에는 기체 크로마토그래피(Gas Chromatography)라고 하며, 액체인 경우에는 액체 크로마토그래피(Liquid Chromatography)라 한다. 박막과 관 액체 크로마토그래피는 이런 정지상과 이동상의 종류 및 그 응용면에서 대단히 비슷하다. 실제로 박막 크로마토그래피는 관 액체 크로마토그래피의 분리 작업의 최적 조건을 얻는데 도움을 준다. 이 방법이 주는 이점은 예비적 실험을 빠른 속도로 할 수 있고 비용이 적게 든다는 점이다. 사실, 여러 크로마토그래피 연구자들은 항상 분리관 크로마토그래피에 앞서 박막 크로마토그래피 실험을 선행해야 한다고 믿고 있다. 그리고 관 크로마토그래피의 개발에 이용하는 것 외에도, 박막 크로마토그래피는 제약산업에서 생산품의 순도를 판별하는 가장 중요한 역할을 하고

있다. 그것은 또한 임상 실험실에서도 널리 쓰이고 있으며, 여러 생화학 및 생물체 연구에서도 중추적인 역할을 하고 있다. 그리고, 산업현장의 실험실에서도 널리 쓰이고 있다¹⁻³⁾. 최근에는 박막 크로마토그래피(TLC) 대신 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 많이 사용되는 경향이 있다. 그러나 HPLC의 컬럼과 용매의 가격이 비싸고 기기의 사용이 복잡하며, HPLC에서의 분리는 시료, 충전제, 용매 3자간의 물리·화학적 상호작용을 고려해야 하기 때문에 분리 전개가 매우 복잡하다. 따라서 TLC는 HPLC의 한계와 결함을 극복할 수 있는 가장 좋은 대체방법이다⁵⁾. 최초의 TLC densitometer 사용은 폴루라나아제에 의한 폴루란의 가수분해에서 형성된 올리고당의 정량 분석이었다고 한다. 최근에는 컴퓨터화된 TLC densitometer의 개발로 더욱더 정확하고 용이한 분석방법을 제공하고 있다⁶⁾.

본 연구에서는 유기산인 젖산(Lactic acid)의 분리와 정량분석을 위하여 간편하고 정확한 분석방법을 개발하고자 TLC방법의 조건을 연구하였다.

Materials and Methods

Slica gel TLC plate는 MERCK(Germany)사, 발색시약들은 Aldrich(U.S.A)사에서 구입하였고, 그 외 시약들은 일반 등급 시약을 사용하였다. 미량 피펫을 이용하여 plate의 끝에서 15mm 되는 위치에 시료용액 1 μ l를 점적하였다. 점적의 직경은 되도록 최소가 되게 하며, 각 시료용액 간의 간격은 10mm이상을 유지하였다. TLC plate를 용매 증기로 포화된 밀폐된 용기 속의 용매를 이용하여 전개시켰다. 전개가 끝난 TLC plate는 건조시킨 후, 준비된 발색 시약에 발색시켜 120 $^{\circ}$ C의 오븐에서 15분 정도 건조시켰다. 발색시약A는 bromocresol purple를 50% 에탄올 100ml에 녹인 후, 6M NaOH를 이용하여 pH를 10으로 맞추어 준비하고, B는 Bromocresol purple를 에탄올 100ml에 녹인 후, 색깔이 변할 때까지 10%의 암모니아용액을 떨어뜨려서 준비하고, C는 bromocresol green과 Bromophenol blue를 에탄올 100ml에 녹인 것과 과망간산칼륨과 탄산나트륨을 물 100ml에 녹인 것을 9:1로 혼합시켜 준비하였다. 완전히 건조한 TLC plate는 NIH analyser를 이용하여 발색되어 나타난 젖산의 면적에 따른 밀도를 분석하였다.

Results

(1)용매에 A시약에서는 오렌지색 바탕에 밝은 오렌지색으로 젖산이 확인되었으며, B시약에서는 진한 노란색 바탕에 밝은 노란색으로 젖산이 확인되었고, C시약에서는 짙은 파란색 바탕에 연한 파란색으로 젖산이 확인되었다(Fig. 1). (2)용매의 경우는 A시약에서는 분리정도를 알아볼 수가 없었고, B시약에서는 밝은 노란색 바탕에 밝

은 노란색으로 젖산이 확인되었고, C시약에서는 녹색 바탕에 노란색으로 젖산이 확인되었다(Fig. 2). 젖산의 분리 용매로는 diisopropylether : formic acid : water = 90 : 7 : 3(v/v/v)이 알려져 있고, 본 연구자는 이 용매로 확인하였으나 분리능이 좋지 않았다. 본 연구 결과 전개용매로는 nitroethane : nitromethane : ethanol : water : 1-propanol = 1 : 2 : 3 : 4 : 5 (v/v/v/v/v)에 bromocresol purple reagent II를 발색시약으로 사용한 경우 분리능이 가장 좋았다.

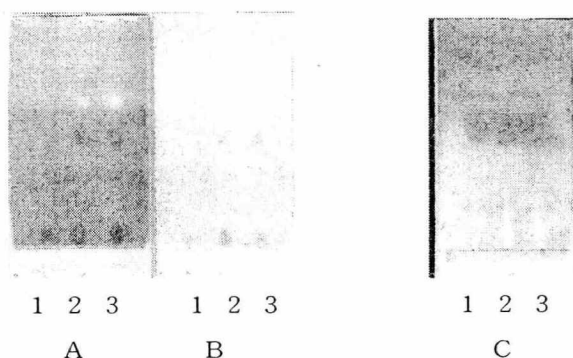


Fig. 1. TLC separation of lactic acid using twice ascents with (1) solvent system and three kinds of dipping solutions. solvent system ; nitroethane : nitromethane : ethanol : water : 1-propanol = 1 : 2 : 3 : 4 : 5 (v/v/v/v/v)

A ; bromocresol purple reagent I, B ; bromocresol purple reagent II, C ; bromocresol green-bromophenol blue-potassium permanganate reagent
lane 1-3 : lactic acids (0.5, 1.0 and 1.5%, respectively; v/v)

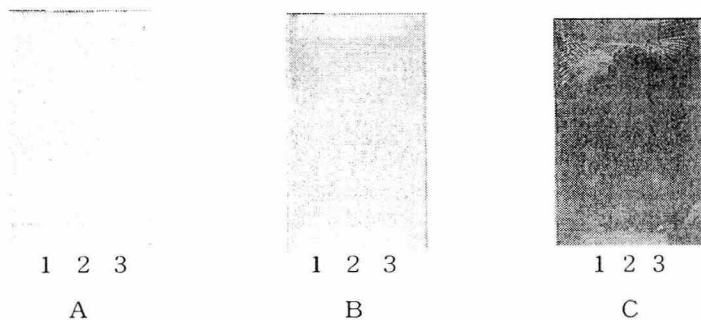
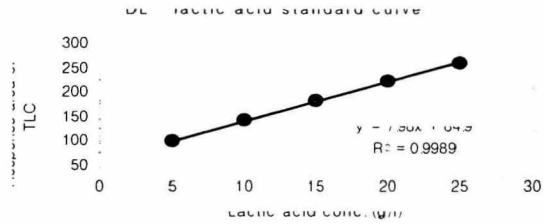


Fig. 2. TLC separation of lactic acid using once ascent with (2) solvent system and three kinds of dipping solution. solvent system ; diisopropyl ether : formic acid : water = 90 : 7 : 3 (v/v/v)

A ; bromocresol purple reagent I, B ; bromocresol purple reagent II, C ; bromocresol green-bromophenol blue-potassium permanganate reagent

lane 1-3 : lactic acid (0.5, 1.0 and 1.5%, respectively; v/v)



1 2 3 4 5

Fig. 3. TLC separation of lactic acid solution using twice ascents with (1) solvent system and B dipping solution. solvent system ; nitroethane : nitromethane : ethanol : water : 1-propanol = 1 : 2 : 3 : 4 : 5 (v/v/v/v/v), dipping solution ; bromocresol purple reagent II

lane 1-5 : L-lactic acid (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5%, respectively; v/v)

Fig. 3.은 가장 분리능이 좋은 전개용매와 발색시약으로 standard solution을 TLC한 결과이다.

Reference

1. 권수한 , 권영수, 김영상, 박기채, 윤영자, 차기원, 최희선, "기기 분석의 원리" (1999), 자유아카데미, pp.789-893.
2. 최재성, "기기분석총론" (1994), 신광문화사, pp. 282-375.
3. 박창일, 이치호, "HPLC의 이론과 실제" (1993), 자유아카데미, pp. 1~7.
4. Gorden. M. H., R. Macrae, "Instrumental Analysis in the Biological science" (1992), 교보문고, pp. 35~74.
5. Robyt. J. F., Rupendra Mukerjea, "Separation and Quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrines and isomaltodextrins by Thin Layer Chromatography"(1994), Carbohydrate Research, vol(251), 187~202.
6. Hellmut Jork, Werner Funk, Walter Fischer, Hans Wimmer, "Thin-Layer Chromatography(Reagents and Detection Methods)" (1990), VCH, pp. 229-233