

Step-Gradient Mode를 이용한 인지질의 분리

이 주 원 · 노 경 호

인하대학교 화학공학과

(1997년 5월 21일 접수, 1997년 6월 11일 채택)

Separation of Phospholipids in Step-Gradient Mode

Ju Weon Lee and Kyung Ho Row

Dept. of Chem. Eng., Inha Univ., Incheon 402-751, Korea

(Received May 21, 1997, Accepted June 11, 1997)

요 약 : 대두에 포함된 유용 인지질 PE, PI, PC를 분리하기 위해서 정상 HPLC를 이용하였다. 이동상으로 hexane, isopropanol, methanol을 사용하였고 일정용매조성법으로는 세 물질을 분리할 수 없었기 때문에 구배용매조성법을 적용하였다. 최적 분리조건을 구하기 위해서 단 이론과 step-gradient mode에서의 용량인자를 계산하는 식으로부터 농도분포곡선을 계산하였다. 계산 결과에 의하면 PE는 일정용매조성법(hexane/isopropanol/methanol = 90/5/5 vol.%)에서 분리하고 PI와 PC를 분리하기 위해서는 10분의 구배시간과 두번째 이동상을 hexane/isopropanol/methanol = 50/20/30 (vol.%)으로 계단함수의 구배용매조성법을 사용하는 것이다. 계산된 최적 분리조건을 실험 data와 비교한 결과 잘 일치하였고 이 제시된 방법은 구배용매조성법에서 최적 분리조건을 구하는데 이용될 수 있었다.

Abstract : Normal-phase HPLC was used to separate the useful phospholipids, PE, PI and PC in soybean lecithin. The mobile phase used in this experiments were hexane, isopropanol and methanol, the gradient mode was applied as the three components could not be separated by the isocratic mode. To find the optimum separation condition, the concentration profiles of effluents were calculated from the plate theory and the capacity factor in step-gradient mode. From the calculated results, PE was separated with hexane/isopropanol/methanol = 90/5/5 vol.% in isocratic mode and PI and PC were resolved in the conditions of 10min gradient time and the second mobile phase of hexane/isopropanol/methanol = 50/20/30 vol.% in step-gradient mode. The agreement between the calculated concentration profile and experimental data was good, so the methodology developed in this work can be used to obtain the optimum separation condition in gradient mode.

1. 서 론

인지질(lecithin, phospholipids)은 세포막을 구성하는 물질로 생체 세포 내에서 물질의 전달에 관여하기 때문에 생의학, 약학 등의 분야에서 중요하게 연구가 진행되고 있다. 그 중 유용 성분으로 대두되는 것이 phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylinositol(PI), phosphatidylcholine(PC)로 이 물질들은 대두(soybean)에 상당량이 존재하며 식물성 기름의 제조에서 부산물로 쉽게 얻을 수 있다. 이러한 유용 인지질을 액체 크로마토그래피를 이용하여 고순도로 분리하는 공정에 대한 연구가 최근에 활발하게 연구되고 있다[1, 2].

HPLC(High-Performance Liquid Chromatography) column은 일반적으로 silica 또는 bonded phase로 채워져 있다. 본 연구에서는 인지질을 분리하기 위해서 이동상으로 hexane을 기본으로 하는 silica로 채워진 정상(normal phase) column을 사용

하였다. Silica column을 이용한 물질의 분리에서 물질은 각각의 극성도(polarity)의 차이에 의해서 분리된다. 또한 이동상으로 주로 휘발성 유기용매를 사용하기 때문에 분리 후에 정제를 하는 데 역상(reversed-phase)인 경우보다 유리하다[3].

이동상은 일정용매조성법(isocratic mode)과 구배용매조성법(gradient mode)의 두 가지 방법을 사용할 수 있다. 일정용매조성법은 이동상의 조성을 변화시키지 않고 일정하게 유지하는 것으로 분석이 간단하며 column이 안정한 상태에서 분리가 가능하다. 그러나 복잡한 물질이나 극성의 차이가 큰 물질을 분리하기 위해서 구배용매조성법을 사용하며, 이동상의 조성을 시간에 따라 변화시키는 방법으로 일정용매조성법의 단점을 보완시킬 수 있다 [4]. 그러나 분리공정의 시작과 끝에서 이동상의 조성이 다르기 때문에 분리 후에 column을 첫 번째 이동상으로 안정화시키는 과정이 필요하다. 이동상의 극성을 변화시킴으로써 물질의 체류 시간을 조절할 수 있기 때문에 HPLC

를 이용하여 혼합물을 분리하는 최적의 조건을 결정하기 위해서 사용하는 가장 보편적인 방법은 이동상의 조성을 변화시키는 것이다[5, 6].

본 실험에서 인지질을 분리하기 위한 이동상은 hexane, isopropanol, methanol을 사용하였다. 이동상의 극성을 변화시키기 위해서 극성이 가장 큰 methanol의 양을 변화시켰으며 hexane과 methanol이 서로 극성 차이가 크기 때문에 isopropanol을 첨가하여 균일한 조성을 갖는 이동상을 제조하였다. PE, PI, PC의 극성은 각각 큰 차이를 보이고 있기 때문에 이 물질들을 고순도로 분리하기 위해서 구배용매조성법을 이용하였으며 그 중 간단한 계단함수의 형태로 조성을 바뀌게 하는 step-gradient mode를 고려하였다.

용량인자(capacity factor)와 이동상의 조성과의 관계식을 이용하여 임의의 이동상의 조성으로 이루어진 step-gradient mode에서 각 물질의 체류부피(retention volume)를 예측하기 위한 연구는 많이 이루어 졌다[7]. 이 체류부피를 이용하여 각 물질의 농도분포곡선의 예측을 위하여 이론단수와 용량인자를 결정함으로써 얻을 수 있는 단 이론을 사용하였다[8-10]. 본 연구의 목적은 용량인자와 이동상의 조성과의 관계식을 결정하기 위한 최소한의 실험을 통해 인지질을 분리하기 위한 최적의 이동상 조건을 계산에 의해서 구한 후 이의 유용성을 실험 data와 비교하는 것이다.

2. 이 론

Chromatographic column내에서 이동상의 극성의 변화에 따라 물질의 체류부피가 변하게 된다. 이 체류부피(V_R)는 column내의 이동상의 부피인 dead volume(V_m)에 의해서 다음과 같이 물질의 용량인자(k')로 표시할 수 있다.

$$k' = \frac{V_R - V_m}{V_m} \quad (1)$$

이동상의 극성은 이동상 내에 있는 isopropanol과 methanol의 양에 의해 결정되며 이동상의 조성이 변함에 따라서 극성도 달라지게 된다. 이 삼성분계 이동상의 조성을 methanol과 isopropanol의 부피분율로 나타낼 수 있으며 이 부피분율과 물질의 용량인자는 다음과 같은 새로운 형태의 관계식으로 나타낼 수 있다.

$$\ln k' = A + BF + CF^2 + DG + EG^2 \quad (2)$$

A, B, C, D, E 는 상수이고 F 와 G 는 이동상 내에서 isopropanol과 methanol의 부피분율이다.

Step-gradient mode를 한번 적용하는 경우 물질의 체류부피(V_{Rg})는 구배용매조성법에 사용된 각 이동상의 조성에 대한 용량인자를 이용하여 다음과 같이 예측할 수 있다[11].

$$V_{Rg} = V_m(1 + k'_2) + V_{s,1} \frac{k'_1 - k'_2}{k'_1} \quad (3)$$

k'_1 과 k'_2 는 step-gradient mode에 쓰인 첫 번째와 두 번째 이

동상의 조성에서의 물질의 용량인자이고 $V_{s,1}$ 은 첫 번째 이동상의 부피로 step-gradient mode를 적용하기 직전까지 column을 통과한 이동상의 부피(gradient volume)가 된다.

각기의 이동상의 조성에서 실험적으로 구한 물질의 체류부피를 식 (1)을 이용하여 용량인자로 나타낼 수 있으며 이 용량인자와 이동상의 조성을 이용하여 각 물질에 대한 식 (2)의 상수 A, B, C, D, E 를 실험적으로 결정할 수 있다. 각 물질에 대한 식 (2)와 (3)을 이용하여 step-gradient mode에서 임의의 gradient volume과 이동상의 조성에서 각 물질의 체류부피를 구할 수 있다.

단 이론은 물질의 용량인자와 이론단수를 결정하면 그 물질에 대한 농도분포곡선을 구할 수 있고 그 결과식은 다음과 같다[8-10].

$$c_N = c_0 \sum_{i=N-r}^{N-1} \frac{(aV)^i}{i!} e^{-aV} \quad (4)$$

c_N 은 N 단에서 물질의 농도이고 c_0 는 주입한 물질의 농도이다. V 는 이동상의 부피이고, a 는 평형상수(equilibrium constant, K)를 포함하는 상수로 다음과 같다.

$$a = \frac{1}{v_m + Kv_s} \quad (5)$$

β 를 고정상의 부피(v_s)에 대한 이동상의 부피(v_m)의 비율로 나타내면 평형상수와 용량인자는 정의에 의해서 다음과 같은 관계로 나타낼 수 있다.

$$k' = \beta K \quad (6)$$

용량인자는 식 (2)와 (3)을 이용하여 구한 step-gradient mode에서의 체류부피를 식 (1)을 이용하여 구하였고 이론단수는 각 물질에 대해서 일정한 값을 가지고 있다는 가정 하에서 식 (7)을 이용하여 실험 data에서 구한 값의 평균값을 사용하였다.

$$N = 16 \left(\frac{x}{y} \right)^2 \quad (7)$$

x 는 체류부피이고 y 는 부피 단위로 기준에서 peak의 폭이다.

분리도(resolution)의 계산은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$Rs = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \frac{k'}{1 + k'} \quad (8)$$

3. 실 험

3.1. HPLC system

Pump는 Waters사의 600E pump(multisolute delivery system), injector는 U6K injector(2 ml sample loop, Waters)를 사용하였으며 detector는 Waters사의 486 UV tunable detector를 사용하였고 data acquisition system은 CHROMATE(Ver. 3.0, Interface Eng.)를 PC에 설치하여 사용하였다. Column은 Nova-Pak silica (150mm × 3.9mm, 4μm, Waters)이고, 이동상으로 쓰이는 HPLC-grade의 hexane, isopropanol, methanol은 J.T. Baker

(Phillipsburg NJ, U.S.A.)에서 구입하였다.

3.2. Materials

본 실험에서 사용된 인지질은 두산기술원에서 제공받은 neutral lipids, phosphatidylethanolamine(PE), phosphatidylinositol(PI), phosphatidylcholine(PC)가 혼합된 food-grade의 soybean lecithin이고 HPLC-grade의 chloroform에 녹여 10,000 ppm의 용액을 만들어서 column에 주입하였다.

3.3. 실험조건

이동상의 모든 용매는 vacuum filtering을 한 후 사용하였고 이동상 내에 잔존하는 공기를 제거하기 위해 이동상 용기 내에서 헬륨을 100 ml/min 으로 탈기하였다. 주입부피는 20 µl, 이동상의 유량은 1.5 ml/min이다. UV detector의 wavelength는 208 nm로 고정하였다.

4. 결과 및 고찰

인지질 중에서 유용 성분인 PE, PI, PC의 용량인자는 서로 큰 차이가 있기 때문에 이들을 분리하기 위해서는 구배용매조성법이 반드시 필요하게 된다. 각각의 일정용매조성법과 구배용매조성법의 실험 data를 이용하여 식 (2)에서 쓰이는 상수 A, B, C, D, E를 PE, PI, PC에 대하여 구하였고 Table 1에 나타내었다 [7]. 두 가지의 용매로 이루어진 binary system에서 log k'을 용매의 부피분율에 대해서 단순한 quadratic form으로 나타내었고 실험결과와 잘 일치하였다[6]. 이동상의 조성이 삼성분인 ternary system인 경우 확장하여 각 이동상의 조성에 대해서 quadratic form을 적용하였다. Normal-phase에서 고정상이 극성이기 때문에 이동상의 조성이 극성을 나타낼수록 이동상과 고정상과의 interaction이 강해짐으로 인해서 용량인자에 영향을 주고 있다. Hexane의 polarity index는 0.1로 비극성 용매이기 때문에 극성의 고정상과 interaction을 무시할 수 있고 isopropanol과 methanol의 부피분율이 결정되면 hexane의 부피분율이 결정되기 때문에 식 (2)에서 hexane의 부피분율에 대한 항이 포함되지 않았다. 각 물질의 용량인자를 이동상의 조성의 함수로 표시하면 출구 농도분포곡선을 예측할 수 있게 된다.

일정용매조성법을 이용하여 인지질 중의 PE, PI, PC를 분리하기 위해서 일정한 조성의 이동상에서 출구 농도분포곡선을 Figs. 1과 2에 나타냈다. Fig. 1에서는 이동상 내에 isopropanol과 methanol이 많이 첨가되었을 때에 PE와 PI의 분리가 이루어지지 않는 것을 보이고 있다. 또한 인지질을 UV cutoff값이 큰 chloroform에 용해시켜 사용하였기 때문에 UV detector를

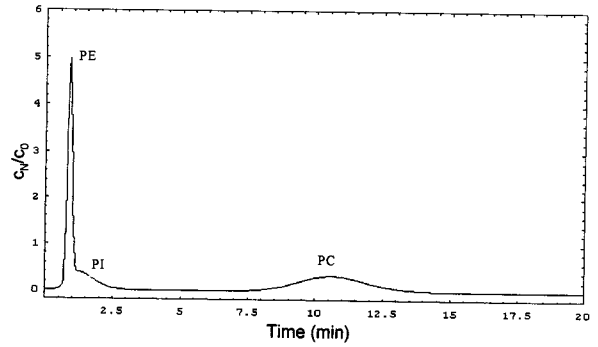


Fig. 1. Calculated elution profile of phospholipids in isocratic mode.(hexane / isopropanol / methanol = 50 / 30 / 20 vol.%)

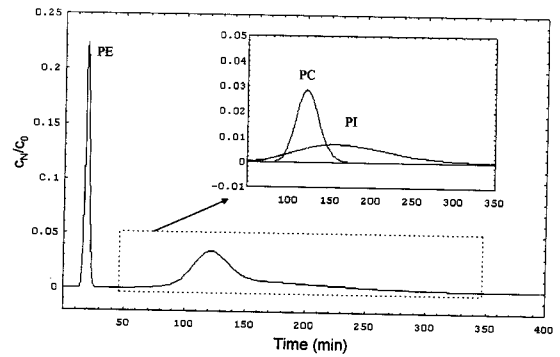


Fig. 2. Calculated elution profile of phospholipids in isocratic mode.(hexane / isopropanol / methanol = 92 / 5 / 3 vol.%)

이용하였을 경우 주입 후 약 5분 동안은 chloroform peak와 동시에 용출되기 때문에 검지(detection)를 할 수 없다. 한편 Fig. 2에서와 같이 이동상 내에 isopropanol과 methanol이 적게 첨가되었을 때에는 neutral lipids와 PE는 나머지 인지질과 분리가 되지만 PI와 PC가 분리되지 않으면서 낮은 column efficiency로 인해 오랜 시간 동안 혼합되어서 용출된다. 낮은 극성의 이동상에서는 PE만이 분리되며 높은 극성의 이동상에서는 PC가 분리되기 때문에 이동상을 낮은 극성에서 높은 극성으로 변화시키는 step-gradient mode를 이용하여야 분리가 가능하게 된다는 중요한 결론에 도달하였다. 최적의 분리조건은 물질간에 큰 분리도와 짧은 분리시간(separation time)을 결정하는 것이다. 본 실험에서는 이 분리도와 분리시간을 결정하는 인자로 이동상의 조성구배시간(gradient time)을 고려하였다. PE는 두 번째 이동상으로 변하기 전에 용출이 되므로 첫 번째 이동상은 PE가 분리되는 조건의 이동상 조성으로 정할 수 있으며 조성은 hexane / isopropanol / methanol = 90 / 5 / 5(vol.%)이다.

인지질에 포함된 PE, PI, PC중에서 PE를 일정용매조성법에 의한 이동상의 조성을 구하였기 때문에 PI와 PC를 분리하기 위한 구배용매조성법에서 두 번째 이동상의 조성구배시간을 정하였다. 우선 PI와 PC의 분리도에 미치는 영향을 고찰하기 위해서 methanol과 isopropanol의 양과 구배시간의 변화를 Figs. 3-5에 나타냈다. Fig. 3에서는 두 번째 이동상 중에서 methanol의 양의 변화에 따른 PI와 PC의 분리도의 변화를 보

Table 1. Empirical Coefficients of PE, PI and PC used in Eq. (2)

material	A	B	C	D	E
PE	0.41	1.36	-9.39×10^{-2}	-7.07×10^{-1}	2.90×10^{-2}
PI	5.50	-1.00×10^{-2}	-1.00×10^{-4}	-2.00×10^{-2}	-1.30×10^{-2}
PC	5.46	2.55×10^{-2}	-3.67×10^{-4}	-2.28×10^{-1}	2.67×10^{-3}

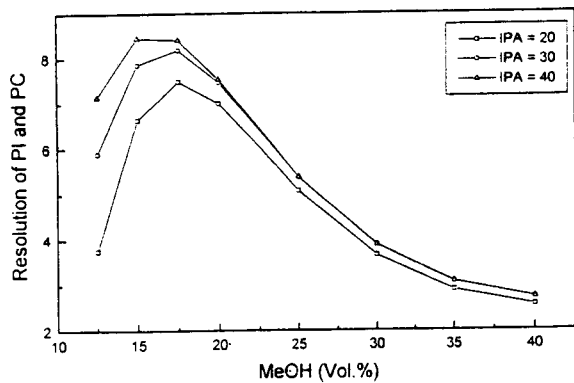


Fig. 3. Changes of resolution in methanol content of 2nd mobile phase. (gradient time : 15 min)

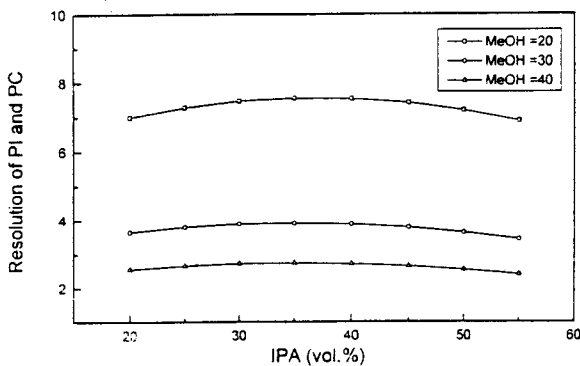


Fig. 4. Changes of resolution in isopropanol content of 2nd mobile phase. (gradient time : 15 min)

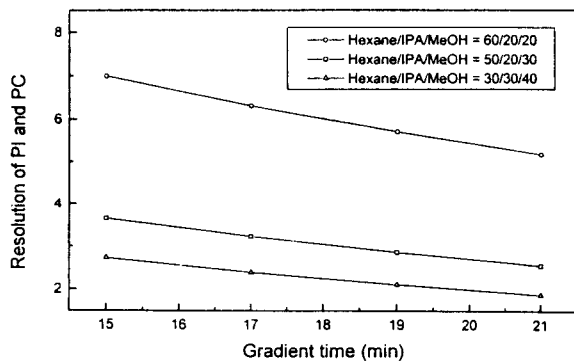


Fig. 5. Changes of resolution in gradient time and 2nd mobile phase.

여주고 있다. Methanol의 양이 10-40 vol.%의 전 영역에서는 구배용매조성법에 의한 column efficiency의 상승으로 인하여 분리도가 2이상의 값을 가지지만 methanol의 양이 증가할수록 20%이상인 경우 PI와 PC의 peak가 서로 근접하여 분리도가 감소하게 되었다. 또한 methanol의 양이 비교적 적은 영역에서는 첫 번째 이동상과 두 번째 이동상의 조성이 크게 변하지 않고 있기 때문에 구배용매조성법에 의한 column efficiency의 영향이 작게되고 분리도가 급격하게 감소하였다. Isopropanol

이 40%인 경우보다 20%인 경우에서 더욱 더 급격하게 감소하였다. 이는 PI가 hexane과 isopropanol에서는 용해되지 않고 methanol에만 용해되기 때문에 methanol이 이동상에 적게 첨가되면 PI의 용량인자가 급격하게 감소하기 때문이다. 두 번째 이동상 중에서 isopropanol의 양의 변화에 따른 PI와 PC의 분리도의 변화를 나타낸 것이 Fig. 4에 나타나 있다. Isopropanol이 약 35%에서 분리도는 최대를 가지며 methanol의 양이 증가할수록 분리도가 증가하였다. Fig. 5에서는 구배시간의 변화에 따라 PI와 PC의 분리도의 변화를 나타낸 것이다. Figs. 3과 4에서의 methanol과 isopropanol의 조성을 근거로 각기 20-40, 20-30 vol.%의 범위에서 구배시간의 영향을 고찰하였다. 구배시간이 증가할수록 분리도는 선형적인 감소를 보이고 있다. 이는 구배시간이 증가할수록 column을 통과하는 첫 번째 이동상의 많아지게 되고 이 영향이 각각 PI와 PC의 용량인자에 미치게되어 분리도가 감소하게 된다.

분리시간은 PC의 peak가 끝나는 시간으로 정하였다. 최적조건에서는 분리도 뿐만 아니라 분리시간에 대한 영향을 위에서와 마찬가지로 methanol과 isopropanol의 부피분율, 구배시간에 대해서 고찰하였다. 분리시간은 PC의 체류시간에 의해서 결정된다. Fig. 6에서는 두 번째 이동상 중에서 methanol의 양에 대한 분리시간의 변화를 나타내고 있다. Methanol의 양이 증가할수록 분리시간은 급격히 감소하다가 감소율이 줄어드는 경향을 보이고 있다. 두 번째 이동상 내에 isopropanol의 양의 변화에 따른 분리시간의 변화를 나타낸 것이 Fig. 7에 나타나 있다. Isopropanol이 약 35%일 때에 분리시간이 가장 길었고 이보다 높거나 낮은 양의 isopropanol에서는 분리시간이 감소하였다. 그러나 isopropanol이 PC의 체류시간에 큰 영향을 주지 못하기 때문에 isopropanol의 양의 변화에 따라 분리시간이 크게 변하지 않았다. Fig. 8은 구배시간의 변화에 대한 분리시간의 변화를 나타낸 것으로 분리시간이 구배시간에 대해서 선형적으로 변하고 있다. 각기의 이동상의 조성에 대해서 기울기가 서로 같은 것은 첫 번째 이동상(hexane/isopropanol/methanol = 95/5/5 vol.%)의 극성이 두 번째 이동상의 극성에 비해 상대적으로 상당히 낮기 때문에 구배시간이 PC의 체류시간에 영향을 미치지 못하기 때문으로 보인다.

Neural lipid와 PE를 분리하기 위하여 첫 번째 이동상에서 isopropanol과 methanol의 양을 각각 5%로 하였으며 PI가

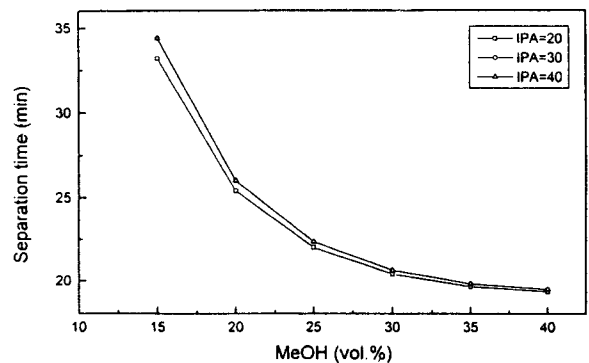


Fig. 6. Changes of separation time in methanol content of 2nd mobile phase. (gradient time : 15 min)

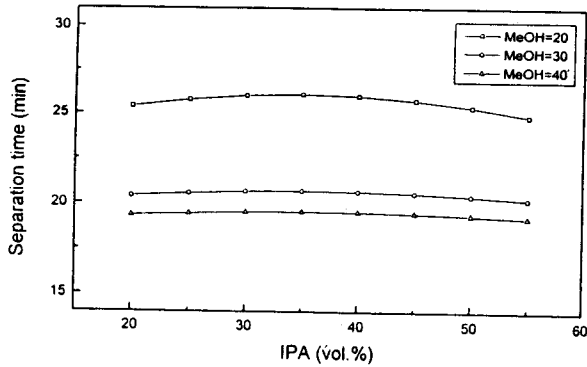


Fig. 7. Changes of separation time in isopropanol content of 2nd mobile phase. (gradient time : 15 min)

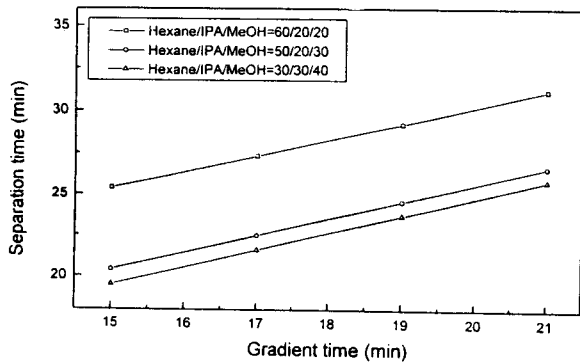


Fig. 8. Changes of separation time in gradient time and 2nd mobile phase.

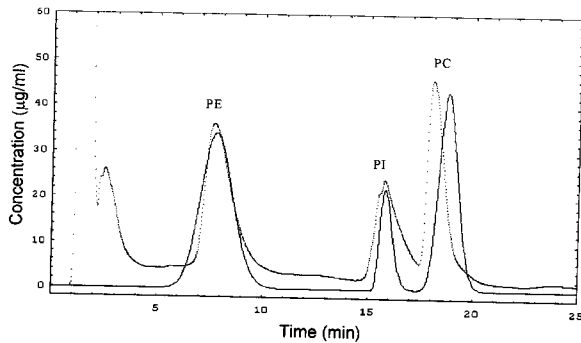


Fig. 9. Comparison of experimental and calculated elution profile. (1st mobile phase : hexane / isopropanol / methanol = 90 / 5 / 5 vol.%, gradient time : 15 min, 2nd mobile phase : hexane / isopropanol / methanol = 50 / 20 / 30 vol.%)

methanol에 대해서만 용해도를 가지고 있기 때문에 methanol의 양을 증가시켰다. PI와 PC의 분리도와 전체 분리시간을 기준으로 최적조건을 단 이론과 step-gradient mode에서는 두 번째 이동상의 조성이 hexane / isopropanol / methanol = 50 / 20 / 30 (vol.%) 구배시간은 10분이었다. 이 최적조건에서 용출농도분포곡선을 계산값과 실험 data를 비교한 것이 Fig. 9이고 비교적 잘 일치하였다. 인지질에 포함된 neutral lipids와 다른

성분을 고려하지 않고 PE, PI, PC의 세 성분의 용량인자로부터 step-gradient mode에서 이 세 물질을 분리할 수 있었다.

5. 결 론

단 이론을 이용하여 구한 농도분포곡선은 대칭성인 Gaussian형태로 나타난다. 시료의 양이 적은 분석용 column에서 PE, PI, PC는 fronting과 tailing이 없는 대칭성 peak로 용량인자와 이론단수를 실험적으로 측정하고 간단한 단 이론을 이용하여 PE, PI, PC의 농도분포곡선을 예측할 수 있다.

일정용매조성법으로 neutral lipids와 PE를 분리하고 구배용매조성법을 이용하여 PI와 PC를 분리하였다. 두 번째 이동상에서의 methanol과 isopropanol의 조성과 구배시간의 변화에 따른 PI와 PC의 분리도와 분리시간을 비교하여 PI와 PC의 최적 분리조건을 결정하였다. 구배시간이 감소함에 따라서 분리도가 감소하고 분리시간이 증가하여서 이동상 간의 혼합기 부피 7.5ml를 고려한 15분으로 정하였다. 두 번째 이동상에서의 methanol이 15-20 vol.%일 때 분리도가 가장 우수하였지만 분리시간은 methanol의 양이 증가할수록 감소하였다. 한편 isopropanol은 35 vol.%일 때에 최고의 분리도와 가장 긴 분리시간을 보였다. 그러나 최종 정제단계에서 isopropanol의 끓는점이 83℃로 높기 때문에 isopropanol은 적은 양인 20%로 하였고 methanol은 분리도와 분리시간을 고려하여 30%로 하였다.

사 용 기 호

- A, B, C, D, E : empirical constants
- a : empirical constant
- c₀ : concentration of injected solute
- c_N : concentration of solute in Nth plate
- F, G : volume fraction of isopropanol and methanol in the mobile phase
- k' : capacity factor
- N : number of theoretical plate, column efficiency
- r : number of sample-loading plates
- Rs : resolution
- V_{g,l} : gradient volume
- V_m : dead volume
- V_R : retention volume
- v_m, v_s : volume of mobile phase and stationary phase in one plate
- x : retention volume
- y : peak width

하첨자

- 1 : first mobile phase zone
- 2 : second mobile phase zone
- g : gradient mode

그리이스 문자

- α : selectivity
- β : ratio of mobile phase to stationary phase

감 사

본 연구는 1997년 인하대학교 교내연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. P. E. Balazs, P. L. Schmit and B. F. Szuhaj, *JAACS*, **73**, 193(1996).
2. B. D. Meulenaer, P. V. Meeren, J. Vanderdeelen and L. Baert, *JAACS*, **72**, 1073(1995).
3. R. J. Hamilton and P. A. Sewell, "Introduction to high performance liquid chromatography", *Chapman and Hall* (1982).
4. 이주원, 노경호, 화학공학, 채택가(1997).
5. 장경근, 노경호, 정성택, 공업화학, **8**, 286(1997).
6. Y. W. Lee, M. S. So, J. W. Lee, S. T. Chung and K. H. Row, *Korean J. Chem. Eng.*, **13**, 578(1996).
7. K. H. Row and J. H. Lee, *Sep. Sci. and Technol.*, 제출중 (1997).
8. 이주원, 노경호, 공업화학, **8**, 403(1997).
9. K. H. Row and A. V. Larin, *Korean J. Chem. Eng.*, **12**, 442(1995).
10. K. H. Row and A. V. Larin, *Korean J. Chem. Eng.*, **12**, 512(1995).
11. W. Markowski and W. Gotkiewicz, *Chromatographia*, **25**, 4, 339(1988).