

## 매크로 다공성 Poly (Methacrylic Acid-co-Ethylene Glycol Dimethacrylate) 막대에서 Caffeine과 Tryptophan의 체류 메카니즘

김 룡 매 · 염 홍 원 · 정 금 주 · † 노 경 호  
인하대학교 화학공학과, 초정밀생물분리기술연구소  
(접수 : 2006. 1. 10., 게재승인 : 2006. 9. 2.)

## Retention Mechanism of Caffeine and Tryptophan in Macroporous Poly(Methacrylic acid-co-Ethylene Glycol Dimethacrylate) Rods

Longmei Jin, Hongyuan Yan, Jinzhu Zheng, and Kyung Ho Row†  
Center for Advanced Bioseparation Technology and Department of Chemical Engineering,  
Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea  
(Received : 2006. 1. 10., Accepted : 2006. 9. 2.)

Macroporous Poly (Methacrylic acid-co-Ethylene Glycol Dimethacrylate) Rods were in situ thermal initialized within a empty column (3.9 x 150 mm) by free radical polymerization. The polymerization mixture was consisted of monomer, cross-linking monomer, porogenic solvent, initiator and control the ratio of these materials, column efficiency could be developed. Caffeine and tryptophan as separation substances and the retention mechanism of this kind of monolithic column was mainly hydrogen bond function.

**Key Words** : Retention mechanism, macroporous monolithic column, polymerization

### 서 론

최근에 들어서 일체형 컬럼 재료는 고성능 액체 크로마토그래피나 모세혈관 전기영동 크로마토그래피에서의 아주 유명한 고정상으로 쓰이고 있다(1). 상용화된 입자컬럼은 충전과정이 복잡한 반면에 일체형 컬럼은 간단한 제조 과정을 통하여 만들어질 수 있다. 일체형 컬럼이 상용화된 컬럼과 대응하여 사용할 수 있다는 것은 일체형 컬럼의 새로운 특성, 예를 들어 높은 유속 하에서의 낮은 압력과 빠른 물질분리특성이 있다. 또한 이러한 장점은 일체형 컬럼이 연속된 다공성의 구조와 구조화학특성 때문이다(2-5).

일체형 고정상은 대체로 실리카 일체형과 고분자 일체형 컬럼 두 가지로 나눌 수 있다(6). 일체형 컬럼은 아주 간단한 구조 과정에 의해 만들어진다(7). 지금까지 아크릴 아마이드, 스타이렌 등 다양한 단량체를 이용하여 다른 표

면화학구조를 갖고 있는 고정상의 응용이 이루어졌다(8-14). 일체형 막대는 중합반응물질을 하나의 주형 내에서 만들어지며 필요할 경우 다른 용기 내로 쉽게 이동될 수 있다. 최근에 대부분의 일체형 고정상은 가열이나 자외선 조사에 의한 중합반응의 개시로 만들어진다. 일체형 고정상은 한 단계의 중합반응과정에 의해 이루어지며 반응물질로는 기능성 단량체, 가교제 역할의 단량체, 기공생성역할의 용매, 그리고 개시제로 구성된다.

Svec와 Frechet은 경직된 매크로 다공성의 일체형 컬럼을 도입하였으며 독특한 일체형 컬럼의 제조과정을 제공하였다. 그들의 다공성 구조성질의 조절에 대한 연구에 의하여 다양한 새로운 고분자 일체형 컬럼이 단백질과 핵산 등 생체고분자의 크로마토그래피 및 전기영동 분리에 사용되었다(15-18). 그 후 상용화 가능한 실리카 일체형 컬럼이 Minakuchi 등에 의해 만들어졌다(19). 하지만 이러한 실리카 일체형 컬럼은 작은 분자량 물질의 분리에 효율적이었으며 알칼리성의 이동상을 사용할 수가 없었다. 반면에 고분자 일체형 컬럼은 넓은 pH 범위 내에서 사용할 수가 있지만 팽창과 수축 등의 원인으로 사용 가능한 유기용매가 제한되어 있다는 단점도 있으며 고분자 구조표면에 존재하는 마이크로기공도 아주 중요한 단점이다(20).

유기 고분자 일체형 컬럼은 실리카 일체형 컬럼에 비해

† Corresponding Author : Center for Advanced Bioseparation Technology and Department of Chemical Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959  
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

넓은 PH 안정성, 생체분자에 대한 비활발성과 간단한 제조 및 변형의 장점이 있으며 또한 유독한 실라놀 효과가 없다. 특히 알칼리성 용매 하에서의 컬럼의 안정성은 이동상 및 세척 용액을 알칼리성 용매로 자주 사용하는 생리활성 물질의 분석에 아주 유용하다. 약학이나 생체화학 등 넓은 범위에서의 유기 고분자 일체형 컬럼의 사용은 다른 화학 및 물리적 성질을 필요로 하는 다양한 일체형 컬럼의 개발이 필수적이다(21, 22). 본 연구에서는 caffeine과 tryptophan이 제조된 고정상에서의 체류 메커니즘에 대해 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

단량체 methacrylic acid (MMA)는 Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서, 가교제인 ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)는 Fluka (Buchs, Switzerland)에서 구입하였다. 개시제인  $\alpha, \alpha'$ -Azobis(isobutyronitrile) (AIBN)은 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서, 포로젠인 dodecyl alcohol과 cyclohexanol은 각기 Ducksan Pharmaceutical (Kyungki-Do, Korea), Kanto Chemical (Kyungki-Do, Korea)에서 구입하였다. 아세토니트릴과 메탄올은 모두 Ducksan Pure Chemical (Kyungki-Do, Korea)에서 구입하였고 L-tryptophan과 caffeine은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 물은 2차 증류수를 감압 펌프 (Division of Millipore, Waters)와 여과지 (FH-0.45  $\mu\text{m}$ )로 여과하여 사용하였다. 본 연구에서 사용된 HPLC 장치로는 Waters 600s Multisolvant Delivery system을 사용하였으며 이는 Waters 616 펌프 (Waters, Milford, MA, USA), Waters 2487 Dual Absorbance UV detector (Waters, Milford, MA, USA), 그리고 20l 샘플 루프를 연결한 Rheodyne 주입 밸브로 구성되었으며 데이터 출력장치로는 Millennium 32 software (Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였다.

### 실험방법

아세토니트릴을 이동상으로 사용하였으며 시료 역시 아세토니트릴에 녹여 사용하였다. 이동상 저장용기 안에 헬륨가스를 넣어 탈기처리를 진행하였다. UV 검출기의 파장은 270 nm로 고정하였고 HPLC 실험은 상온에서 진행하였다.

### 중합체 일체형 컬럼의 준비

경직된 매크로 다공성 유기 중합체 일체형 컬럼은 주형인  $150 \times 3.9 \text{ mm}$  크기의 빈 스테인레스 스틸 크로마토그래피 컬럼 내에서 만들어진다. 적당량의 중합반응 혼합물질을 초음파처리 및 헬륨가스로 진공처리를 한 후 한쪽 끝을 밀봉한 빈 컬럼에 주입하고 반대 쪽 끝도 함께 밀봉한다. 다음  $60^\circ\text{C}$  항온수조에 넣어서 24시간 방치하여 중합반응을 유도한다. 반응이 끝난 후 밀봉처리를 제거하고 펌프에 연결하여 메탄올로 2시간 정도 세척하여 컬럼 내에 존재하는 포로젠과 기타 가용성 물질을 제거한다. 본 실험

에 사용한 중합반응 물질은 Table 1에서와 같이 사용하였다. 여기서 중합혼합반응물의 조성으로 MAA는 단량체이고, EGDMA는 가교제이며 Dodecyl alcohol (Dodecanol)과 cyclohexanol은 porogenic solvent이고 AIBN은 개시제이다.

Table 1. Conditions for preparing the polymerization mixture

No.	MMA (ml)	EGDMA (ml)	Dodecanol (ml)	Cyclohexanol (ml)	AIBN (g)
1	0.426	0.940	2.900	1.000	0.023
2	0.400	1.000	2.000	1.000	0.045
3	0.085	0.945	1.680	0.600	0.023

\*Polymerization temperature:  $60^\circ\text{C}$ , polymerization time: 24 hr.

## 결과 및 고찰

### 고정상의 표면화학

Fig. 1과 같이 단량체 MAA와 가교제인 EGDMA가 중합반응을 거친 후 일체형 컬럼의 구조표면은 카르복실기 (-COOH)를 갖고 있는 친수성의 화학성질을 갖게 된다. 따라서 이 기능기는 다른 물질과 쉽게 수소결합반응을 할 수 있다. 카페인과 트립토판의 구조(Fig. 2)로부터 볼 때 트립토판의 아마이드 그룹에 있는 수소가 쉽게 고정상과 수소결합반응을 할 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한 이동상으로서 비극성의 아세토니트릴을 사용함으로써 극성의 시료와 고정상 간의 체류를 더욱 강화시킬 수 있다. 또한 카페인과 트립토판은 구조상 모두 비극성의 방향족 고리를 갖고 있어 역시 이동상과도 비극성 상호작용을 하게 되며 결국 시료가 컬럼 밖으로 용출된다. 만약 극성의 이동상을 사용하거나, 이동상에 초산 등 극성의 유기첨가제를 사용한다면 시료가 고정상에 체류하는 시간이 짧아지게 될 것이며 두 가지 물질간의 분리도도 역시 떨어질 것이다.

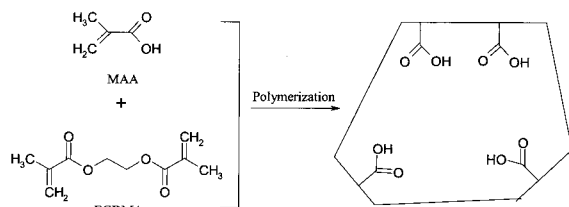


Figure 1. Polymerization scheme of monolithic column.

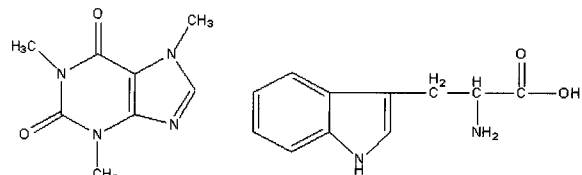


Figure 2. Chemical structures of caffeine (1) and tryptophan (2).

### 물질 체류 메커니즘

본 실험에서 두 가지 시료의 분리도는 아주 낮았다. 이는 만들어진 일체형 컬럼의 제조과정 중의 여러 가지 원

인에 의거한다. 우선 중합반응 온도조건을 놓고 볼 때 이전의 실험결과에 의하면 중합반응의 온도가 높을수록 물질의 분리도가 낮아진다는 것을 알 수 있다. 또한 중합반응 물질의 조성에도 아주 큰 영향을 받고 있는데, 예를 들어 단량체의 양이 상대적으로 적을 때 컬럼 내부 표면에 있는 친수성의 표면구조성질이 상대적으로 약하게 되어 극성시료의 체류가 짧아지게 될 것이다. 또한 porogen의 역할도 무시할 수 없다. Porogen의 양이 상대적으로 적을 때 컬럼은 높은 비율의 단량체 및 가교제에 의해 압력이 증가할 것이며 유체가 흐를 수 있는 통로가 제한되어 있어서 역시 물질분리가 어려울 것이다. 반대로 porogen이 양이 많으면 컬럼에 걸리는 압력이 작아지는 반면 단량체의 양이 적음으로 인하여 시료가 작용할 수 있는 구조표면의 면적이 줄어든다. Porogen의 질 또한 아주 중요하다. 다른 porogen을 단독 혹은 혼합하여 사용할 때 질이 다르므로 인해 역시 만들어지는 컬럼에 큰 영향을 미친다. 또한 가교제를 놓고 볼 때 가교제의 양이 상대적으로 크면 역시 컬럼에 높은 압력이 걸릴 것이며 반대로 양이 상대적으로 적다면 가교제의 역할을 하고 있기 때문에 단량체를 가교시키는데 영향을 미칠 것이다. Fig. 3에 있는 SEM 사진은 만들어진 일체형 컬럼의 단면 구조표면이다. 그림과 같이 유체가 흐를 수 있는 통로는 대개 몇 마이크로미터이며 중합체 골격구조를 이루고 있는 작은 구형모양은 대략 몇 십 나노미터이다. 이는 기타 논문에 이미 보고된 바 있다.

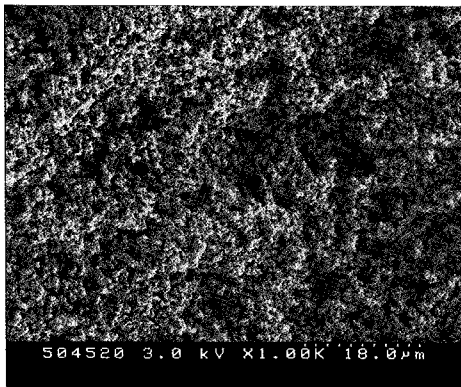


Figure 3. The SEM of the monolithic column.

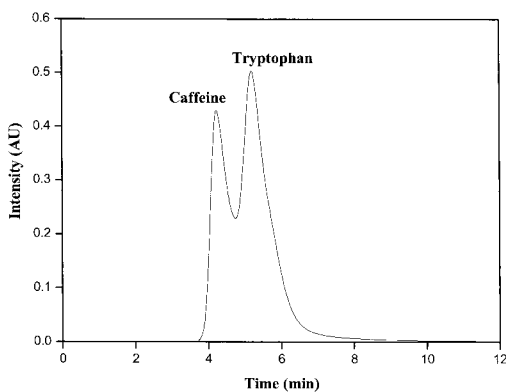


Figure 4. Chromatogram of caffeine and tryptophan.

Fig. 4는 카페인과 트립토판의 분리 크로마토그램이다. 그림에서 볼 수 있듯이 두 가지 물질의 분리도는 아주 낮았으며 체류인자 역시 0.59 및 1.06이었다. 일체형 컬럼의 제조과정은 단순하면서도 여러 가지 요인에 의해 결정되기 때문에 보다 이상적인 분리도를 얻기 위해서는 아직도 많은 실험이 필요할 것이다. 중합반응물질의 양의 조절과 중합반응조건을 최적화하는데 노력이 필요할 것이다.

### 요 약

MAA와 EGDMA를 단량체 및 가교제로 한 일체형 컬럼은 친수성의 구조표면을 하고 있어 쉽게 시료와 수소결합 등 강한 상호작용을 할 수 있다. 본 실험에서는 카페인과 트립토판을 분리물질로 선택하였으나 완전한 분리도를 얻을 수가 없었다. 이는 일체형 컬럼의 제조 시 여러 요인에 기인한다. 중합혼합반응물질의 양의 조성 및 반응조건이 적절하지 못하는 등의 원인으로 생각된다. 따라서 일체형 컬럼의 분리도를 향상시키기 위한 많은 실험이 요구된다.

### 감 사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 인하대학교와 초정밀생물분리기술연구센터의 지원에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Hilder, E. F., Svec, F., and J. M. J. Fréchet (2004), Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* **1044**, 3-22.
- Le Gac, S., Carlier, J., Camart, C., Cren-Olivé, C., and C. Rolando (2004), Monoliths for microfluidic devices in proteomics, *J. Chromatogr. B* **808**, 3-14.
- Sugrue, E., Nesterenko, P. N., and B. Paull (2005), Fast ion chromatography of inorganic anions and cations on a lysine bonded porous silica monolith, *J. Chromatogr. A* **1075**, 167-175.
- Xie, S., Allington, R. W., Svec, F., and J. M. J. Fréchet (1999), Rapid reversed-phase separation of proteins and peptides using optimized 'moulded' monolithic poly(styrene-co-divinylbenzene) columns, *J. Chromatogr. A* **865**, 169-174.
- Lee, D., Svec, F., and J. M. J. Fréchet (2004), Photopolymerized monolithic capillary columns for rapid micro high-performance liquid chromatographic separation of proteins, *J. Chromatogr. A* **1051**, 53-60.
- F. Švec (2004), Preparation and HPLC Applications of Rigid Macroporous Organic Polymer Monoliths, *J. Sep. Sci.* **27**, 747-766.
- Svec, F. and J. M. J. Fréchet (1992), Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media, *Anal. Chem.* **64**, 820-822.
- Palm, A. and M. Novotny (1997), Macroporous Polyacrylamide/Poly(ethylene glycol) Matrixes as Stationary Phases in Capillary Electrochromatography, *Anal. Chem.* **69**, 4499-4507.
- Hoegger, D. and R. Freitag (2001), Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* **914**, 211-222.

10. Lämmerhofer, M., Svec, F., Fréchet, J. M. J., and W. Lindner (2001), Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases, *Chromatogr. A*, **925**, 265-277.
11. Peters, E. C., Petro, M., Svec, F., and J. M. J. Fréchet (1997), Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography, *Anal. Chem.* **69**, 3646-3649.
12. Oberacher, H., Premstaller, A., and C. G. Huber (2004), Characterization of some physical and chromatographic properties of monolithic poly (styrene-co-divinylbenzene) columns, *J. Chromatogr. A* **1030**, 201-208.
13. Mayr, B., Tessadri, R., Post, E., and M. R. Buchmeiser (2001), Metathesis-Based Monoliths: Influence of Polymerization Conditions on the Separation of Biomolecules, *Anal. Chem.* **73**, 4071-4078.
14. Mayr, B. and M. R. Buchmeiser (2001), Influences of surface chemistry on the separation behavior of stationary phases for reversed-phase and ion-exchange chromatography: a comparison of coated and grafted supports prepared by ring-opening metathesis polymerization, *J. Chromatogr. A* **907**, 73-80.
15. Ericson, C. Hjertén (1999), Reversed-Phase Electrochromatography of Proteins on Modified Continuous Beds Using Normal-Flow and Counterflow Gradients. Theoretical and Practical Considerations, *Anal. Chem.* **71**, 1621-1627.
16. Hilder, E. F., Svec, F., and J. M. J. Fréchet (2004), Shielded Stationary Phases Based on Porous Polymer Monoliths for the Capillary Electrochromatography of Highly Basic Biomolecules, *Anal. Chem.* **76**, 3887-3892.
17. Hlözl, G., Oberacher, H., Pitsch, S., Stutz, A., and Huber, C. G. (2005), Analysis of Biological and Synthetic Ribonucleic Acids by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Using Monolithic Capillary Columns, *Anal. Chem.* **77**, 673-680.
18. Zhang, S., Huang, X., Zhang, J., and C. Horváth (2000), Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith, *J. Chromatogr. A* **887**, 465-477.
19. Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., and N. Tanaka (1996), Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* **68**, 3498-3505.
20. Coufal, P., Cihák, M., Suchánková, J., Tesařová, E., Bosáková, Z., and K. Štulík (2002), Methacrylate monolithic columns of 320 mm I.D. for capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **946**, 99-106.
21. Walcher, W., Oberacher, H., Troiani, S., Hlözl, G., Oefner, P., Zolla, L., and C. G. Huber (2002), Monolithic capillary columns for liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry in proteomic and genomic research, *J. Chromatogr. B* **782**, 111-125.
22. Premstaller, A., Oberacher, H., Walcher, W., Timperio, A. M., Zolla, L., Chervet, J.-P., Cavusoglu, N., Van Dorsselaer, A., and C. G. Huber (2001), High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using Monolithic Capillary Columns for Proteomic Studies, *Anal. Chem.* **73**, 2390-2396.