

양이온 교환 크로마토그래피와 HPLC에서의 L-arabinose와 D-ribose의 분리 및 등온 흡착곡선 결정

전 영 주 · † 김 인 호

충남대학교 화학공학과

(접수 : 2007. 8. 2., 게재승인 : 2007. 12. 31.)

Determination of Adsorption Isotherms and Separation of L-arabinose and D-ribose in Cation Exchange Chromatography and HPLC

Young Ju Jeon and In Ho Kim†

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

(Received : 2007. 8. 2., Accepted : 2007. 12. 31.)

The use of L-carbohydrates and their corresponding nucleosides in medicinal application has greatly increased. For example L-ribose has been much in demand as the starting material for curing hepatitis B. High performance liquid chromatography (HPLC) method was studied for the analysis of ribose and arabinose fractions from ion exchange chromatography (IEC). Dowex Monosphere 99 Ca/320 resin was packed in IEC to separate ribose and arabinose under various operating conditions. NH₂ and sugar HPLC columns were then used to analyze the fractions from the IEC column. Pulse input method (PIM) was also used to measure adsorption isotherms of ribose and arabinose in the Dowex column and HPLC columns. Experimental results and simulations by ASPEN chromatography were compared with fair agreement.

Key Words : L-ribose, Dowex Monosphere 99 Ca/320 resin, PIM

서 론

최근 L-carbohydrates와 그들의 유사 nucleosides는 빠른 속도로 의약산업에 이용되고 있다. 특히 L-ribose는 매년 높은 증가율을 보이는 B형 간염 치료제 중 핵산 유사체의 원료물질로써 사용되고 있다(1). 하지만 실제로 ribose는 자연계에 D형만 존재하고 L형은 존재하지 않는다. 따라서 L-ribose의 합성방법이 연구 되고 있고 대표적으로 enzyme반응과 epimer반응을 통해 얻을 수 있다. Enzyme반응은 L-ribose, L-arabinose isomerase와 *Acetobactor aceti* IFO 3281를 이용한 ribitol의 산화반응으로 얻을 수 있다(2). Epimer반응은 Bilik reaction 이라 불리는 L-arabinose와 MoO₃와의 간단한 반응을 통해 얻을 수 있다(3). 여기서 epimer반응을 통해 얻어

진 생성물에는 출발물질인 L-arabinose와 MoO₃를 포함한 여러 불순물이 존재하기 때문에 순수한 L-ribose 얻기 위한 분리특성 연구가 필요하다. Fig. 1(A)와 같은 L-ribose는 Fig. 1(B)인 L-arabinose와 분자식은 같지만 2번 탄소에 OH기의 위치가 다른구조를 갖는 이성질체고 이 두 성분은 IEC (Ion Exchange Chromatography)를 이용하면 분리, 확인할 수 있다(4).

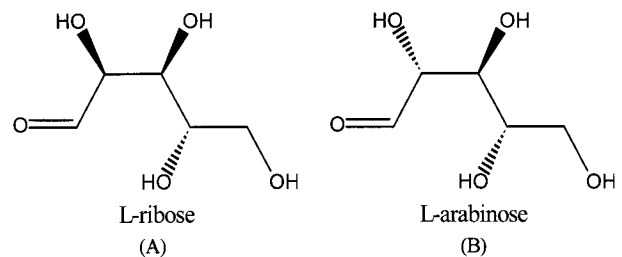


Figure 1. Chemical structure of L-ribose(A) and L-arabinose(B).

IEC는 이온교환 수지를 이용하여 이온들을 분리하는 방법이다. 음이온 또는 양이온 혼합물들이 음이온 또는 양이온 수지로 충전된 HPLC관에서 쉽게 분리된다는 것이 밝혀졌다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea.

Tel : +82-42-821-5685, Fax : +82-42-822-8995

E-mail : ihkim@cnu.ac.kr

특히, xylose와 glucose와 같은 5와 6탄당들의 분리에 양이온 교환수지를 많이 이용하고 있다. 이온 교환수지에 붙어 있는 양이온과 당의 OH그룹들이 서로 donor-acceptor형태로 상호작용 기작을 통해 당의 분리가 일어난다(5).

흡착 분리 공정을 개발하는데 있어서 중요한 단계의 하나는 화합물이 분리되는 흡착평형을 결정하는 것이다. 흡착평형 연구는 고정상과 이동상의 물질 사이의 상관관계 규명을 통해 액체 크로마토그래피를 분리정제 공정으로 설계함이 그 목적이다(6). 등온흡착식을 결정하는 방법의 하나로 Pulse Input Method (PIM)이 있다. PIM은 주입부피와 농도에 따른 용리피의 변화를 이용하여 체류인자와 평형상수를 구하여 등온흡착식의 매개변수를 추산하는 방법으로서 컬럼의 phase ratio (β)와 각 용리피의 체류시간 (t_R)과 dead time (t_0)으로 평형상수를 계산할 수 있다. 농도 변화에 따른 용리피가 이동상의 농도 (C_M)와 선형 관계로 선형 등온흡착식을 따른다면 고정상에 흡착된 시료의 양 (C_S)은 Eq. (1)와 같이 표현된다.

$$C_S = H_i \cdot C_M \quad (1)$$

그리고, t_R 과 H 와의 관계는 Eq. (2)와 같이 정의된다.

$$t_R = t_0 \cdot \left(1 + \frac{(1-\epsilon)}{\epsilon} \cdot H_i\right) \quad (2)$$

여기에서 H 는 흡착평형상수로 Henry 상수로 불리운다. t_R 과 t_0 는 실험에 의해 구할 수 있으며, Eq. (2)에 의해서 H 를 구하여 Eq. (1)에 대입하여 고정상에 흡착된 농도 (C_S)를 구할 수 있다(7).

본 연구는 출발물질인 L-arabinose로부터 MoO_3 를 이용하여 L-ribose의 생산을 위한 epimer반응의 기초연구이다. Dowex Monosphere 99 Ca/320 수지를 이용하여 L-arabinose와 D-ribose의 분리를 연구하기 위해, 온도, 이온 교환수지의 양과 유속을 변화시켜 두 성분의 분리도를 비교하였다. 그리고 NH_2 와 sugar HPLC 컬럼을 이용하여 IEC 분획을 분석하였다. 또한 IEC와 sugar 컬럼에서의 PIM을 통한 등온흡착곡선을 구한 후 실험을 통해 얻어진 흡착매개변수를 이용하여 Aspen chromatography 전산모사를 수행하고 실험과 비교하였다.

실 험

재료

분리에 사용된 물질은 L-(+)-Arabinose (Sigma-aldrich)와 D-(-)-Ribose (Fluka)이고 특급 시약이었다. 각 시료들은 멤브레인 필터 (0.22 μ m GVPP, Millipore)를 통한 여과 과정을 거친 후 사용하였다.

분리 실험

분리 실험에 사용된 이온 교환수지는 Dowex Monosphere 99 Ca/320이었다. 이는 polystyene divinylbenzene을 기본 골격으로하여 Ca^+ 이온이 관능기로 달려있다. 이를 AP-1컬럼 (Waters, 250 \times 10 mm)에 30 ml와 XK16 (Amersham Biosciences,

350 \times 20 mm)컬럼에 50와 70 ml 충전하였다. 이동상으로는 증류수를 사용하였다. 검출기로는 156 refractive index detector (Beckman)와 757 absorbance detector (Applied Biosystems)를 사용하였다. 펌프는 P-500 (Pharmacia)이며, 온도는 AP-1컬럼은 HPLC column heater (Bio-rad)를, XK16컬럼에는 항온조 (Polystst[®])로 20, 50 $^{\circ}C$ 로 조절하였다. 유량에 따른 분리도를 비교하기 위하여 유속을 0.5, 1, 2 mL/min로 변화시켰다. 농도는 10~200 g/L로 변화시켰고 시료의 주입량은 1 mL로 하였다. 데이터 수집은 Autochro-2000 (Young-lin)을 이용하였다.

분석실험

분석용 HPLC 컬럼으로 Luna NH_2 (Phenomenex, 250 \times 4.6 mm)와 Shodex SC1011 (Showa Denko, 300 \times 6.0 mm)으로 선정하였다. 이동상은 NH_2 컬럼의 경우 acetonitrile (ACN, J.T.Baker)과 증류수를 80:20으로 섞었고 ACN은 0.22 μ m의 멤브레인 필터로 감압여과 하였다. 이동상에 존재하는 공기를 제거하기 위해 sonicator (Brason)로 20분간 탈기하였다. Sugar 컬럼에는 증류수를 사용하였다. 사용된 검출기로는 분리 실험과 마찬가지로 굴절률검출기와 자외선검출기를 사용하였다. 자외선검출기의 파장은 197nm 이었다(8). HPLC 펌프 model 700 (Young-lin)을 사용하였고 유량은 1 mL/min이었다. 온도는 HPLC column heater (Bio-rad)로 70 $^{\circ}C$ 로 조절하였다. NH_2 컬럼의 주입량은 100 μ L이었고, sugar 컬럼에서는 10 μ L로 감소 시켰다.

PIM을 이용한 등온흡착곡선과 시뮬레이션

L-arabinose와 D-ribose의 흡착등온식을 얻기 위하여 이온 교환수지컬럼에서와 sugar HPLC 컬럼에서 주입시료농도를 변화하여 머무름 시간을 측정하였다. PIM을 통해 두 성분의 t_0 , t_R 값을 구하고 그 결과로 Eq. (1-2)를 이용하여 흡착매개변수(H)를 계산하였다. 두 성분의 H값을 이용하여 두 가지의 컬럼에서의 흡착곡선을 그리고 H값을 대입하여 Aspen Chromatography simulator로 Table 1 전산모사조건으로 계산 후 실험과 비교하였다.

Table 1. Conditions for Aspen Chromatography simulation

Name	Description	Values for Dowex resin column	Values for sugar column
Flowrate	Constant eluent feed rate	1 mL/min	1 mL/min
Inject volume	Volume of material injected	1 mL	10 μ L
H_b	Height of adsorbent layer	25 cm	30 cm
D_b	Internal diameter of adsorbent layer	2 cm	0.8 cm
PDE	Discretization method	MIXED	MIXED
Isotherm	Adsorption model	Linear	Linear
IP1	Isotherm parameter	L-arabinose 0.32	L-arabinose 0.558
		D-ribose 0.65	D-ribose 1.14

결과 및 고찰

분리실험

AP-1 컬럼에 이온교환수지를 30 mL 충전하여 두 성분의

체류시간을 굴절률검출기로 측정한 결과 Fig. 2(A)와 Fig. 2(B)로 L-arabinose 12분, D-ribose 18분으로 확인하였다. 두 성분을 분리하기 위하여 비슷한 높이의 피크를 가지는 두 성분을 혼합하여 측정한 결과 크로마토그램이 Fig. 3(A)로 예상하였지만 분리가 되지 않아 Fig. 3(B)로 관찰되었다. AP-1 유리 컬럼에 충전된 30 mL 이온교환수지로는 두 당이 잘 분리되지 않았으리라 사료된다. 당 분리 설계에서 온도는 시료의 등은 흡착식, 점도, 분리능, 이동상의 소비량에 큰 영향을 미치기 때문에 온도는 중요한 변수이다(9). 이러한 이유로 자켓이 달린 컬럼에 이온 교환수지를 충전하기 위해 XK16 컬럼을 이용했다. 온도를 50°C로 하고 이온교환수지의 양도 50 mL로 증가하였으며 주입양도 1 mL로 늘렸다. 그리고 굴절률검출기보다 감도가 좋은 자외선검출기로 측정한 결과 Fig. 4와 같이 두 성분의 분리가 개선되었다. 온도를 20°C와 50°C로 변화하여 비교한 결과 (Fig. 5) 50°C에서 더 좋은 분리도를 얻었다. 유량을 0.5, 1, 2 mL/min로 변화시켜 분리한 결과(Fig. 6A) 0.5 mL/min에서 이온교환수지에 흡착되는 시간이 길어져 1, 2 mL/min보다 더 좋은 분리도를 얻었다. 이온 교환수지의 양이 70 mL일 경우(Fig. 6B) 1 mL/min에서 가장 좋은 분리도를 얻을 수 있었다(Table 2). 분리도는 Eq. (3)에 의해 계산되었고 W_1, W_2 가 크게 감소하여 분리도가 70 mL, 1 mL/min에서 가장 좋았다.

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_2 + W_1)/2} = \frac{2\Delta t}{W_2 + W_1} \quad (3)$$

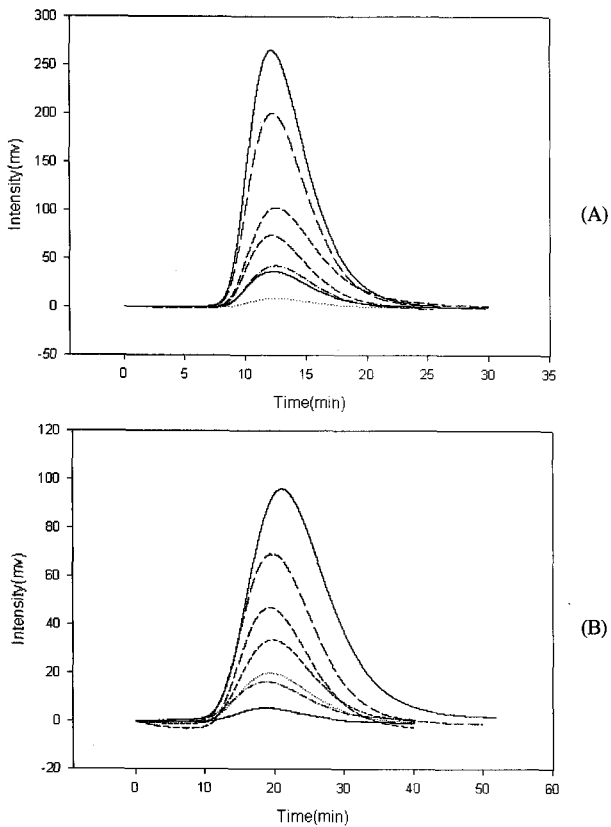


Figure 2. Chromatograms of L-arabinose(A) and D-ribose(B) with increase of concentration in Dowex Ca resin column (temperature: 5 0°C, bed volume: 30 mL, concentration range: 10~200 g/L, flow rate: 1 mL/min, detector: RI, sample loading: 100 µL).

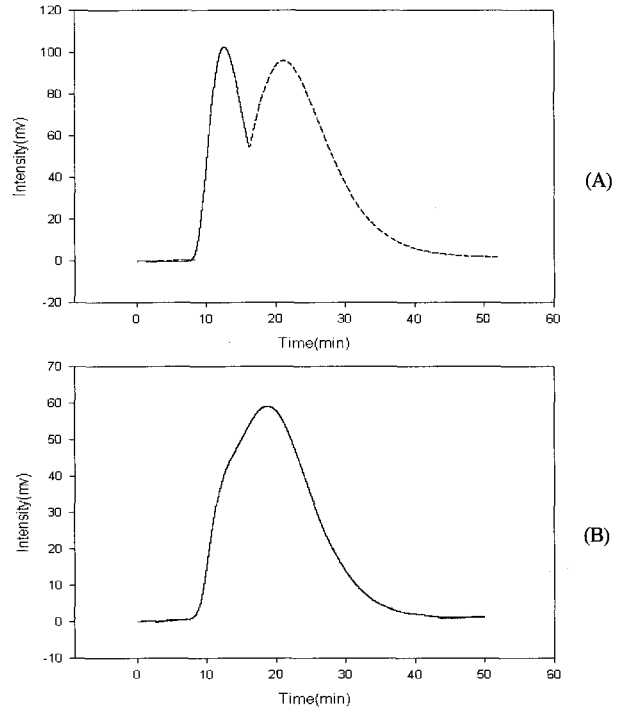


Figure 3. Predicted(A) and experimental(B) chromatogram of L-arabinose and D-ribose (temperature: 50°C, bed volume: 30 mL, concentration: 100 g/L L-arabinose and 200 g/L D-ribose, flow rate: 1 mL/min, detector: RI, sample loading: 100 µL).

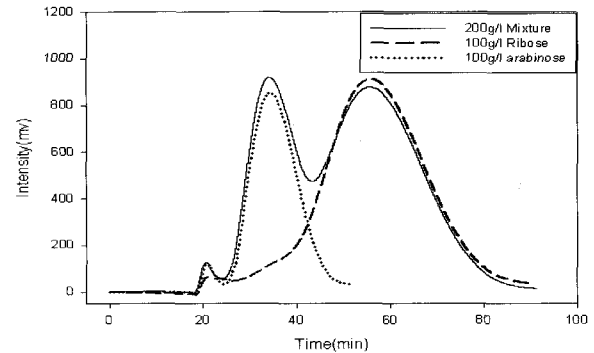


Figure 4. Overlapped chromatogram of L-arabinose, D-ribose and mixture in Dowex Ca resin column of 50 mL bed volume (temperature: 50°C, bed volume: 50 mL, concentration: 100 g/L L-arabinose and 100 g/L D-ribose, flowrate: 1 mL/min, detector: UV, sample loading: 1 mL).

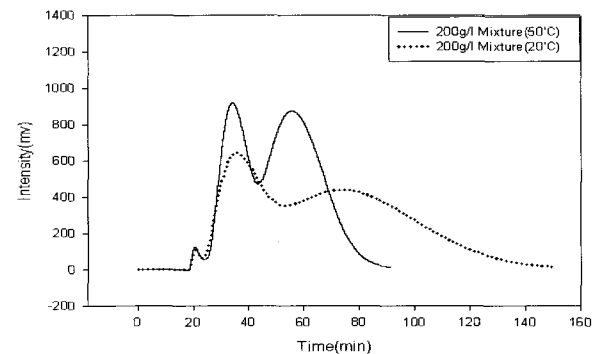


Figure 5. Comparison of chromatograms obtained under the condition of 20°C and 50°C in Dowex Ca resin column (temperature: 20, 50°C, bed volume: 50 mL, concentration: 100 g/L L-arabinose and 100 g/L D-ribose, flow rate: 1mL/min, detector: UV, sample loading: 1 mL).

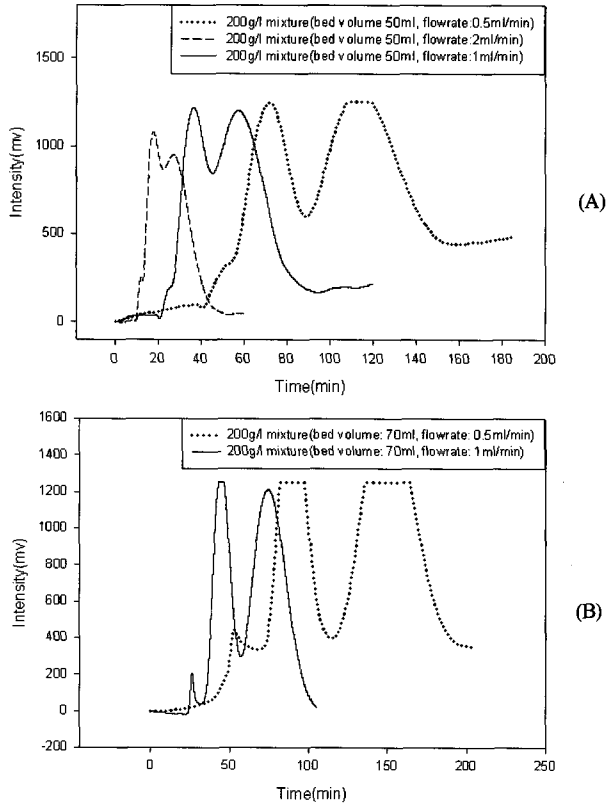


Figure 6. Chromatograms of L-arabinose and D-ribose with change of flow rate and Dowex resin bed volume; A: bed volume= 50 mL, flow rate= 0.5, 1, 2 mL/min, B: bed volume= 70 mL, flow rate= 0.5, 1 mL/min.

Table 2. Effect of flow rate and bed volume on resolution

Dowex Ca resin volume(mL)	Flow rate(mL/min)	Resolution(R _s)
50	0.5	0.67
	1	0.53
	2	0.31
70	0.5	0.79
	1	0.84

분석실험

Ribose와 arabinose의 분석을 위해 NH₂ 컬럼을 이용하여 굴절률검출기(Fig. 7.A)와 자외선검출기(Fig. 7.B)로 분석하였다. 굴절률 검출기로 분석한 결과 두 성분의 검출이 이루어졌지만 두 피크의 체류시간이 너무 가까웠다. 또한 높은 시료농도를 필요하고 검출기 자체가 온도에 매우 민감하기 때문에 실험하기 전에 준비시간이 긴 단점이 있다. 자외선검출기는 검출기가 온도 영향을 받지 않는 장점이 있었고, 두 피크의 체류시간도 D-ribose (7분)과 L-arabinose (9분)으로 차이가 컸다. NH₂ 컬럼에서는 이온교환컬럼과 반대로 두 성분이 용출되었다. 다른 당 분석 HPLC 컬럼을 사용하여 분석효율을 비교하기 위해 sugar 컬럼을 사용하였다(Fig. 8). NH₂ 컬럼과 달리 두 성분의 용출 순서가 바뀌어 나왔다. Sugar 컬럼의 장점은 이동상을 물로 사용할 수 있으며 물 피크 (3분)가 크게 나왔던 NH₂ 컬럼과 달리

4분대에 물 피크가 작게 나왔다. 시료부피를 10 μL로 작게 주입하여도 두 성분이 잘 분리되어, NH₂ 컬럼과 비교하면 체류시간이 L-arabinose 9분과 D-ribose 16분으로 체류시간 차이가 7분으로 분리도가 더 좋았다. NH₂ 컬럼을 이용하여 분리 실험에서 겹쳐진 Fig. 4의 30분-60분 분획을 분석하였다. 1분씩 시료 채취된 시료를 NH₂ 컬럼으로 분석하여 Fig. 9의 크로마토그램을 얻었다. Fig. 9의 결과로 겹쳐진 부분의 크로마토그램은 각각 단일 성분의 크로마토그램을 단순히 더함으로 얻어짐을 발견하였다.

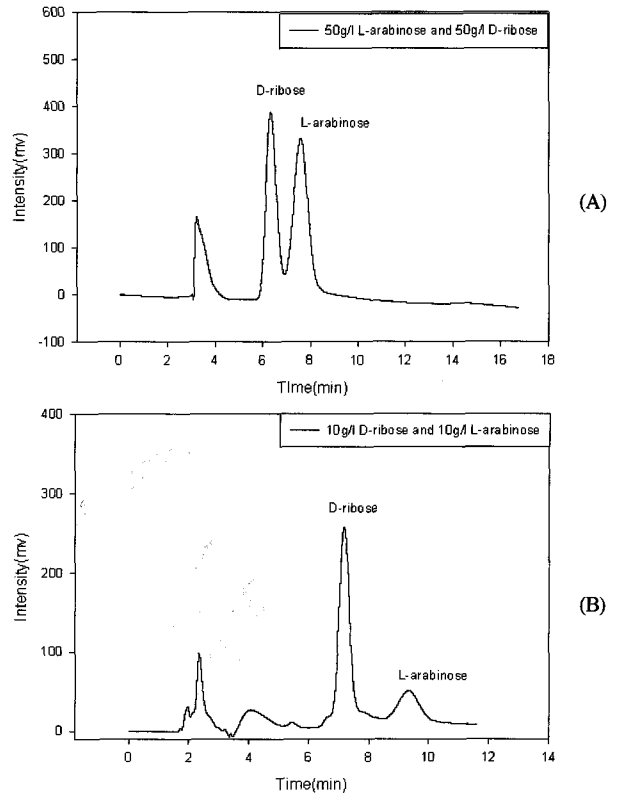


Figure 7. Chromatograms of L-arabinose and D-ribose from RI (A) and UV detector (B) in NH₂ column (temperature: 70 °C, sample concentration: 100 g/L(A), 20 g/L(B), flow rate: 1 mL/min, sample loading: 100 μL).

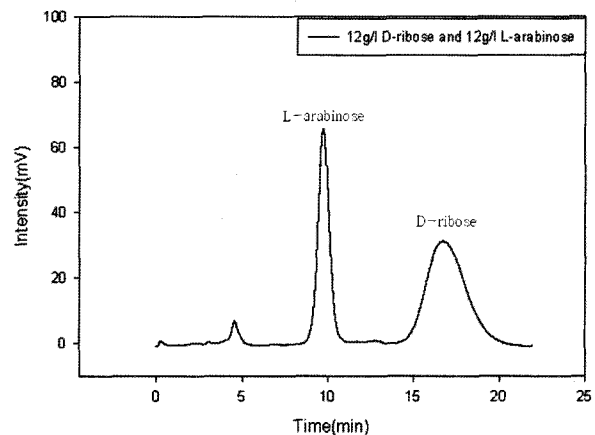


Figure 8. Chromatogram of L-arabinose & D-ribose by sugar column (temperature: 70 °C, concentration: 12 g/L L-arabinose and 12 g/L D-ribose, flowrate: 1 mL/min, detector: UV, sample loading: 10 μL).

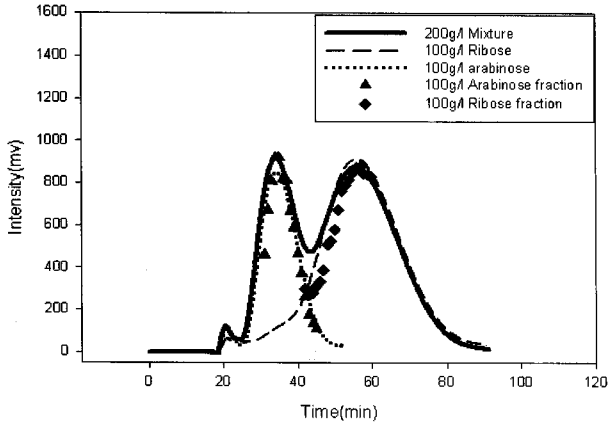


Figure 9. Chromatogram of L-arabinose & D-ribose in Dowex Ca resin column and fractional analysis by NH₂ column (temperature: 70 °C, flow rate: 1 mL/min, detector: UV, sample loading: 1 mL).

PIM을 이용한 등온흡착곡선 및 시뮬레이션

이온교환수지컬럼에서 농도변화에 따른 두 성분의 체류시간 변화를 측정 한 결과(Fig. 10) 체류시간변화가 거의 없었다.

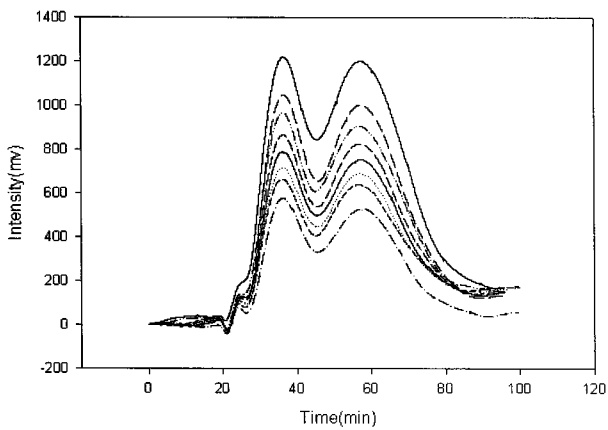


Figure 10. Chromatograms of L-arabinose & D-ribose in Ca⁺ resin column (temperature: 50 °C, bed volume: 50 mL, concentration range: 40 ~200g /L, flow rate: 1 mL/min, detector: UV, sample loading: 1 mL).

Fig. 10으로부터 구한 체류시간 (t_R)과 dead time (t_0)을 이용하여 Eq. (2)의 Henry 상수 H를 계산한 결과 arabinose는 0.32, ribose는 0.65이였으며 Eq. (1)을 이용하여 이동상의 농도 (C_M)에 따른 고정상에 흡착된 양 (C_S)를 계산한 결과 두 시료는 선형흡착등온식을 보인다(Fig. 11). 이 흡착매개변수를 이용 Aspen Chromatography simulator에서 얻은 결과와 실험을 비교하여 Fig. 12와 같이 둘 사이에 유사성을 발견하였다. 실험에서 ribose피크의 끌림현상이 전산모사에서 예측되지 않았다. 그리고 sugar 컬럼에서의 농도변화에 따른 두 성분의 체류 시간을 측정 한 결과 Fig. 13와 같았다. Sugar 컬럼에서도 Eq. (2)를 이용하여 H를 구한 결과 arabinose는 0.558, ribose는 1.14이였으며 Eq. (1)을 이용하여 이동상의 농도(C_M)에 따른 고정상에 흡착된 양 (C_S)를 계산한 결과 두 성분은 선형흡착등온식을 보였으며(Fig. 14) Aspen Chromatography simulator에서 얻은 결과와 실험을 비교하여 Fig. 15와 같이 둘 사이에 유사성을 발견하였다. 즉 Table 1의 자료를 사용하여 Aspen chromatography simulation을 수행하여 실험과 전산

모사 사이에 근접된 크로마토그램을 얻을 수 있었다. IEC로서 Dowex Ca 충전컬럼과 sugar HPLC 컬럼사이에 ribose와 arabinose 등은흡착식을 비교하면 두 컬럼사이에 유사성을 발견할 수 있다. Arabinose, ribose 순으로 용출되고 용리액도 증류수로 같다. 즉 sugar HPLC 컬럼에는 HPLC용 양이온 교환 입자가 충전됨을 알 수 있다. 분리 효율면에서는 물론 HPLC가 우월하다. 이는 Fig. 11과 Fig. 14을 비교하면 관찰할 수 있는데 HPLC의 H값이 크고 sugar HPLC의 분리 효율이 좋다.

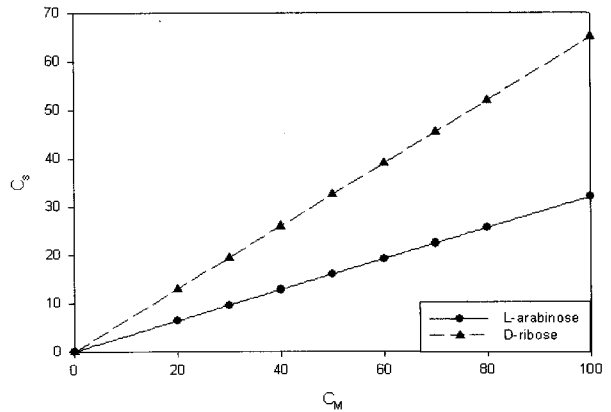


Figure 11. Adsorption isotherm of D-ribose and L-arabinose calculated by PIM equations in Ca⁺ resin column.

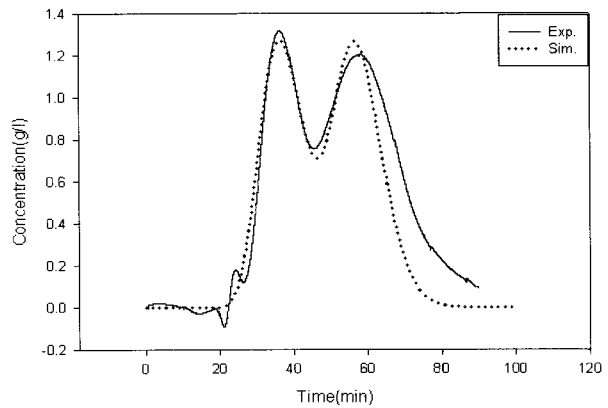


Figure 12. Comparison of the chromatograms between experiment and simulation.

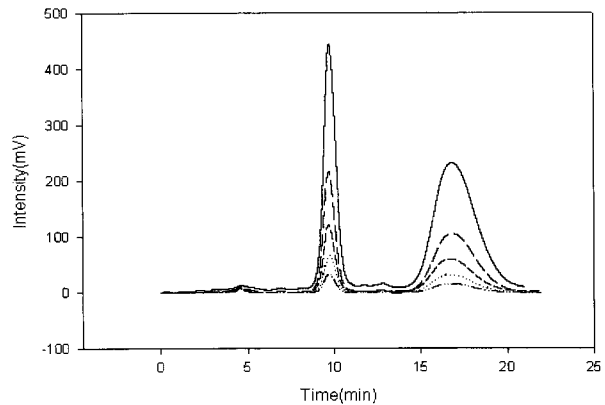


Figure 13. Chromatograms of D-ribose and L-arabinose in sugar column (temperature: 70 °C, concentration range: 12.5 ~200 g/L, flow rate: 1 mL/min, detector: UV, sample loading: 10 µL).

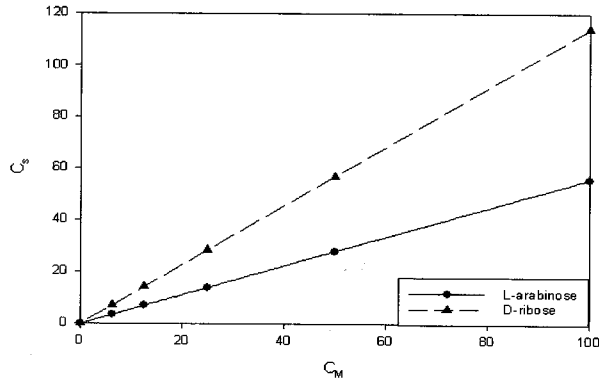


Figure 14. Adsorption isotherm of D-ribose and L-arabinose calculated by PIM equations in sugar column.

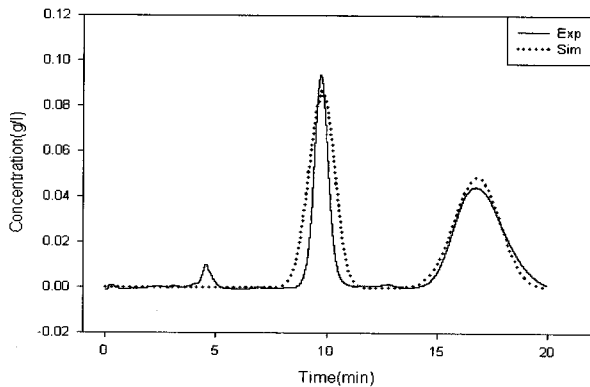


Figure 15. Comparison of chromatograms between experiment and simulation.

결 론

L-arabinose와 D-Ribose 오탄당을 양이온교환수지 컬럼에서 분리 할 수 있었다. 컬럼의 온도가 50℃에서 좋은 분리도를 보였고 수지의 양이 70 mL이고 1 mL/min의 유량에서 가장 좋은 분리도를 얻었다. 분석용으로 HPLC 컬럼을 사용했고 NH₂ 컬럼에서 D-ribose 7분과 L-arabinose 9분의 체류시간으로 용출되었고, sugar 컬럼에서 L-arabinose 9분, D-ribose 16분으로 분리도가 더 좋았다.

PIM을 이용한 흡착등온식을 구한 결과 양이온교환수지 컬럼과 sugar 컬럼에서 전형적인 선형식을 보였다. 계산한 선형식의 기울기로부터 Henry상수를 얻고 Aspen chromatography simulation한 후 비교하여, 실험과 전산모사한 결과가 좋은 일치율을 보임을 발견하였다.

감 사

본 연구는 에너지관리공단의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- De Muynck, C., Beauprez, J., Soetaert, W., and Erick, J. V. (2006), Boric Acid as a Mobile Phase Additive for High Performance Liquid Chromatography Separation of Ribose, Arabinose and Ribulose, *J. Chromatogr. A*, **1101**, 115-121.
- Zakaria, A., Tsuyoshi S., Shakhawat H., Masaru, U., Goro, T., and Ken I. (1999), Biochemical Preparation of L-Ribose and L-Arabinose from Ribitol : A New Approach, *J. Biosci. Bioeng.*, **88**(4), 444-448.
- Stephen, J. A. (2005), L-ribose : An Easily Prepared Rare Sugar, *Aust. J. Chem.*, **58**, 58-59.
- <http://www.dow.com/liquidseps/prod/chromato.htm>
- Caruel, H., Rigal, H., and Gaset, A. (1991), Carbohydrate Separation by Ligand Exchange Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.*, **588**, 84-104.
- Kim, S. Y., Song, T., Lee, J. K., Suh, S. S., and Choi, M. H. (2002), Adsorptive Correlations of Chromatography for Ibuprofen Enantiomers, *HWAHAK KONGHAK*, **40**(3), 324-329.
- Lee, E., Park, J. S., and Kim I. H. (2006), Determination of Loxoprofen Adsorption Isotherms by Frontal Analysis and Pulse Input Method, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**(5), 371-375.
- Lambert A. T. V. and Jacques M. H. D. (1978), Ion Exchange Chromatography of Sugars, Sugar Alcohols, and Sugar Acids Using U.V. Spectrometry for Direct Detection, *Carbohydr. Res.*, **62**, 197-202.
- Kim, J. I., Lee, C. H., and Koo, Y. M. (2005), Temperature Effect on the Retention Behavior of Sugar in Ion Exchange Chromatography, *Korean Chem. Eng. Res.*, **43**(6), 722-727.