(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 10 월 20 일 (20.10.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/167379 A2

(51) 국제특허분류:
C07H 1/06 (2006.01) *B01D 53/04* (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/003669

(22) 국제출원일: 2015 년 4 월 13 일 (13.04.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(71) 출원인: 인하대학교 산학협력단 (INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE) [KR/KR]; 402-751 인천시 남구 인하로 100, Incheon (KR).

(72) 발명자: 정원조 (CHEONG, Won Jo); 137-812 서울시 서초구 신반포로 45 반포아파트 102 동 202 호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

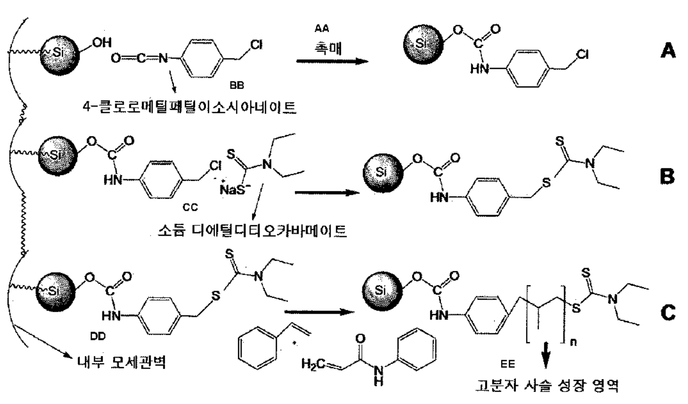
규칙 4.17 에 의한 선언서:
— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:
— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: POLYMER-ATTACHED SILICA CAPILLARY FOR SEPARATING OLIGOSACCHARIDES OR PEPTIDES AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME

(54) 발명의 명칭 : 올리고당류 또는 펩티드류 분리용 고분자 부착 실리카 모세관 및 이의 제조방법

【도 1】



AA ... Catalyst
BB ... 4-Chloromethylphenylisocyanate
CC ... Sodium diethyldithiocarbamate
DD ... Inner capillary wall
EE ... Polymer chain growth region

(57) Abstract: The present invention relates to a polymer-attached silica capillary for separating oligosaccharides or peptides and a method for manufacturing the same. The polymer-attached silica capillary manufactured by the method according to the present invention can be favorably used in the separation and analysis of oligosaccharides, such as glucose or maltotriose, and many peptides in hydrolysates of proteins, such as cytochrome C, since a polymer film *per se* is formed to have excellent affinity and thus is attached to the inside of the capillary in the form of a long and uniform polymer chain; the polymer film shows the shape of a rigid film in a dried state but widely spreads on a mobile phase having a high content of acetonitrile; and the polymer film has an effect of acting in a direction of narrowing the peak band width in both aspects of analyte retention and mass transfer.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/167379 A2

본 발명은 올리고당류 또는 펩티드류 분리용 고분자 부착 실리카 모세관 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 제조방법으로 인하여 제조되는 고분자 부착 실리카 모세관은 고분자 피막 자체 친화성이 우수하게 제조되어 길고 균일한 고분자 사슬 형태로 모세관 내부에 붙게 되고, 마른 상태에서는 견고한 피막의 형상을 띄지만, 아세토니트릴의 함량이 높은 이동상에서 활짝 펼쳐지며 분석물의 머무름과 물질전달 양면에서 봉우리 띠나비를 좁히는 방향으로 작용하는 효과가 있으므로, 글루코오스나 말토트리오스 등의 올리고당류 또는 시토크롬 C(Cytochrome C) 등 단백질의 가수분해 산물 내 많은 펩티드류 분리분석에 유용하게 사용할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

올리고당류 또는 펩티드류 분리용 고분자 부착 실리카 모세관 및 이의 제조방법

【기술분야】

본 발명은 올리고당류 또는 펩티드류 분리용 고분자 부착 실리카 모세관 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

【배경기술】

무기구조물의 표면에 중합개시제를 부착시킨 후, 고분자 막을 중합반응으로 결합시키는 방법은 종래에 잘 알려져 있는 기술이다.

상기와 같은 기술로 제조되는 무기-유기 혼성물질은 크로마토그래피의 정지상으로도 활용될 수 있다. 크로마토그래피용 유기-무기 혼성 정지상을 제조하기 위하여 원자전달 라디칼 중합(Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP) 방법이 주로 사용되고 있으며, 가역 부가-파편화 사슬전달(Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT) 중합 방법도 부분적으로 사용되고 있다.

원자전달 라디칼중합(ATRP)에서는, 일가 구리의 할로겐화물, 이가 구리의 할로겐화물, 그리고 아민 염기로 이루어진 촉매혼합물을 사용하여 말단 할로겐을 포함한 중합개시제가 부착된 실리카 표면에 중합반응을 유도한다. 상기 원자전달 라디칼중합(ATRP)에서는 큰 분자량과 낮은 분산도를 갖는 브러시 형태의 고분자 사슬이 형성된다고 알려져 있다. 일부 원자전달 라디칼중합(ATRP) 연구에서는 생성된 정지상이 기존의 C18 정지상과 비교하여 우수한 선택도(selectivity)를 갖는 사실을 보고하고 있다. 그러나 원자전달

라디칼중합(ATRP) 정지상의 분리효율(이론단수)은 종래의 C18 정지상에 비하여 상당히 열등한 것으로 보고되고 있다.

가역 부가-파편화 사슬전달(RAFT) 중합에서는 말단 할로겐을 갖는 리간드를 먼저 실리카 표면에 결합시키고(도 1 의 A 참조), 다시 디티오카바메이트 염 유도체와 반응시킴으로써 중합개시제 부착 실리카를 만들며(도 1 의 B 참조), 여기에 표면 중합이 진행된다(도 1 의 C 참조). 가역 부가-파편화 사슬전달(RAFT) 중합 메커니즘에 따르면, 표면에 부착하는 1 차 리간드와 2 차 리간드(diethyldithio carbamate) 사이의 CS 결합 내부에 고분자 사슬이 삽입되고 성장한다고 알려져 있다. 필요한 초기 라디칼은 모노머의 열적 자체 초기화에 의하여 발생하며, 추가적인 촉매는 필요하지 않다. 하지만, 가역 부가-파편화 사슬전달(RAFT) 중합으로 얻은 정지상의 크로마토그래피 분리효율은 기존의 C18 정지상에 비하여 상당히 열등한 것으로 알려져 있다.

이에, 본 발명자들은 다공성 실리카 분말에 4-클로로메틸 페닐이소시아네이트와 소듐 디에틸 디티오카바메이트를 차례로 반응시켜 개시제 (S1 형) 부착 실리카를 제조하고, 여기에 스티렌을 중합시켜서 폴리스티렌 부가 실리카 정지상을 만들어 보고한 바 있는데(*Bull. Korean Chem. Soc.* 2009, Vol. 30, No. 3), 상기 정지상은 C18 보다 우수한 분리효율을 줄 수 있는 반면, 현저히 짧아진 머무름시간을 주어 용질 봉우리들이 밀집되는 결과를 얻었다. 또, 이렇게 얻은 정지상의 폴리스티렌층은 실리카 표면 위에 일정한 두께로 형성되지 못하고 커다란 폴리스티렌 덩어리들이 불규칙하게 생성되는 양상을 보였으며, 접근 가능한 동공의 부피와 표면을 감소시키는 효과를 보여 분석 용질의 머무름 시간이 감소하는 문제가 있었다.

상기 문제는 매우 안정한 재개시 라디칼의 생성으로 인하여 빠르고 제어되지 않은 중합반응이 진행된 결과인 것으로 판단된다. 안정한 재개시 라디칼은, 사슬전달이나 종결반응이 일어나기 전에 고분자 사슬이 과도하게 성장하게 함으로써 큰 분자량과 넓은 분산도를 지닌 고분자의 생성, 즉 비 균질 고분자 성장을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 상기 수행한 연구에서 폴리스티렌 덩어리가 생성되는 이유로, 매우 안정한 중합 중간체 라디칼의 형성과 이로 인하여 절제되지 못한 고분자 사슬의 성장으로 보고, 고분자 성장 속도를 다소 조절할 수 있는 새로운 개시제 (S2 형) 부착 실리카를 제조하고, 가역 부가-파편화 사슬전달(RAFT) 중합을 진행함으로써 얇고 고른 고분자 막이 부착된 새로운 액체크로마토그래피 정지상을 개발하여 이에 대한 특허를 출원 등록한 바 있다(한국 등록특허 10-1116566).

본 발명자들은 S1 형태의 개시제 부가 실리카라고 하더라도 그 개시제 리간드의 부착 밀도가 충분히 높아서 각 개시제 리간드에서 동시다발적이고 균일한 고분자 사슬의 성장이 이루어지고 그 사슬들이 서로 밀집되는 시점에서 중합이 종료되도록 제어된다면 더욱 좋은 물성의 고분자 막이 부착된 정지상을 만들어 그 분리효율을 더 개선할 수 있다고 생각하였다.

이에, 본 발명자들은 말단 할로겐 원자를 지닌 이소시아네이트를 이소시아네이트-히드록시실리카 반응으로 입자에 부착시키는 과정에서 그 분산 용매에 잘 녹는 촉매를 사용함으로써, 그 반응산물을 디티오카바메이트염 유도체와 반응시켜 중합개시제 부착 실리카를 제조하는 새로운 방법을 개발하여, 그 중합 개시제 부착 실리카 위에 가역 부가-파편화 사슬전달(RAFT) 중합을 진행하여 높은 분리 효율의 액체 크로마토그래피 정지상용 새로운 고분자 부착 실리카 분말을 얻을 수 있음을 확인하고 이에 대한 특허를 출원한 바 있다.

한편, 특정 당이 다양한 질병의 바이오마커로 알려지면서, 당류 분석이 많은 관심을 모으고 있다. 당의 다양성과 구조적 복잡성으로 인하여 완전한 올리고당의 구조분석이라는 분야는 매우 도전적인 과제이다. 모세관 전기영동법(Capillary Electrophoresis, CE)은 생체 물질들의 분석에 있어 그 분리효율이 매우 뛰어난 방법이다. 질량분석법과 모세관 전기영동법(Capillary Electrophoresis, CE)을 연계시킨 분석법으로 인하여, 생 의약 연구분야에서 효과적인 당을 선별하는 과정을 극적으로 가속화시키는 방법 개발이 가능하게 되었다.

실리카 모세관 내부에 정지상을 충전하거나 부착시켜 사용하면, 이것을 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC)이라고 하는데, 단순 실리카 모세관을 쓰는 CE보다 그 분리 선택성이 크게 향상된다. 즉, CEC는 CE와 HPLC(High-Performance Liquid Chromatography)의 장점을 모두 취한 방법이다.

최근에, 모세관 내벽에 얇은 고분자 막을 부착시켜 사용하는 열린 구조형 모세관 전기크로마토그래피법(Open Tubular Capillary Electrochromatography, OT-CEC)이 그 제조 편이성으로 인하여 많은 관심을 모으고 있다. OT-CEC는 단백질, 펩티드, 당단백질 등과 같은 다양한 종류의 생체 물질의 분리분석에 유용하게 쓰이고 있는 방법이다.

당의 구조이성체 분석에 효과적이라고 알려져 있는 정지상으로는 다공성 흑연탄소(Porous Graphite Carbon, PGC)와 HILIC(Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) 정지상 등이 있다. HILIC 정지상이란 극성이 상당히 큰 정지상인데, 이동상도 극성의 수용성 용매를 쓸 경우 이를 HILIC라고 한다. 당의 구조이성체 분석에 있어서 PGC

정지상은 C18 정지상에 비하여 크로마토그래피 분리능은 더 좋지만 분리효율은 열등하다고 알려져 있으며, 그에 반해 HILIC 정지상은 정지상의 높은 극성으로 인하여 당의 머무름 시간이 상당히 증가하는 것으로 알려져 있다.

본 발명자들은 다공성 흑연탄소(Porous Graphite Carbon, PGC) 정지상 및 HILIC(Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) 정지상의 특징을 모두 갖는 열린 구조형 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC) 모세관 컬럼을 제조하기 위하여, sp_2 구조의 스티렌과 큰 극성을 갖는 아크릴아미드를 가역 부가-파편화 사슬전달(RAFT) 중합으로 공중합 시켜, 모세관 내벽에 형성시키는 전략으로 새로운 열린 구조형 모세관 전기크로마토그래피법(Open Tubular Capillary Electrochromatography, OT-CEC) 컬럼을 제조하여 흡광 크로모포로 유도체화한 D-글루코스의 두 아노머(anomer)와 올리고당(oligosaccharide)의 여러 구조 이성체를 높은 컬럼 분리효율로(이론단수 300,000/m) 분리하는 결과를 발표한 바 있다(Bulletin of the Korean Chemical Society, 2014, 35, 539). 하지만, 상기 연구에서는 스티렌과 아크릴아미드의 높은 극성도 차이에 따른 반응 용매의 선정과, 공중합고분자의 자체 친화성에 어려움이 있어서 컬럼 제조 재현성과 컬럼 분리효율 제고의 한계 등 문제점이 드러났다.

이에, 본 발명자들은 상기 문제점이 개선된 모세관을 제조하기 위하여 연구를 진행하던 중, 반응 모노머의 선정에 새로운 개념을 도입하고 반응 용매에도 변화를 주어, 생성되는 공중합고분자의 자체 친화도를 높이고 컬럼 제조의 재현성을 제고할뿐만 아니라, 컬럼 분리효율도 현저히 개선된 고분자 부착 실리카 모세관 및 이의 제조방법을 개발하고 본 발명을 완성하였다.

【선행기술문헌】

【특허문헌】

(특허문헌 1) 한국 등록특허 10-1116566

【비특허문헌】

(비특허문헌 1) *Bull. Korean Chem. Soc.* 2009, Vol. 30, No. 3

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 글루코오스나 말토트리오스 등의 올리고당류 또는 시토크롬 C(Cytochrome C) 등 단백질의 가수분해 산물 내 많은 펩티드류 분리용 고분자 부착 실리카 모세관의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 인하여 제조되는 고분자 부착 실리카 모세관을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 고분자 부착 실리카 모세관을 사용한 올리고당류의 분리방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 고분자 부착 실리카 모세관을 사용한 펩티드류의 분리방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여,

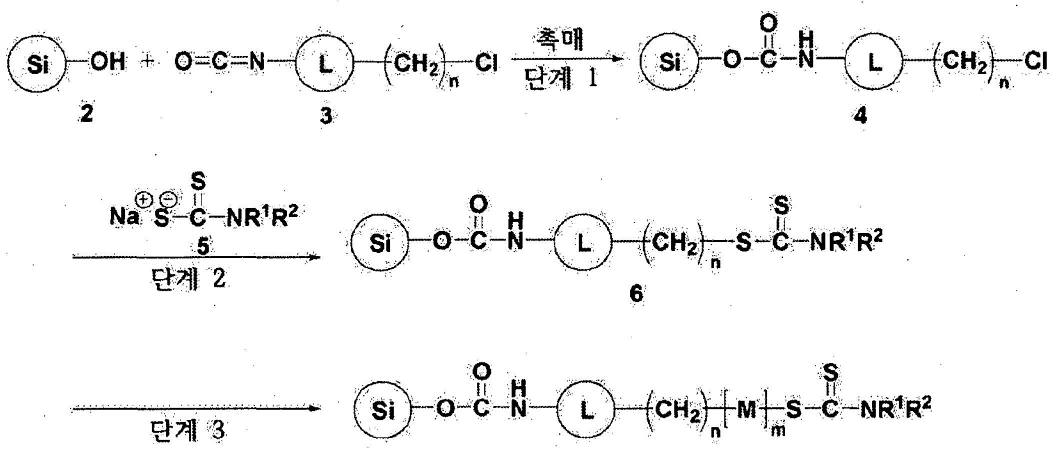
본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 촉매 존재하에 화학식 2로 표시되는 실리카 모세관 내부 표면에 존재하는 하이드록시기와 화학식 3으로 표시되는 리간드를 반응시켜, 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관을 화학식 5로 표시되는 중합 개시제와 반응시켜 화학식 6

으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 2); 및

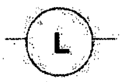
상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 내부에 모노머를 용매에 녹여 채우고, 가역 부가-파편화 사슬전달(Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT) 중합 반응을 수행하여 화학식 1로 표시되는 공중합 고분자 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 3);를 포함하는 실리카 모세관의 제조방법을 제공한다.

[반응식 1]



상기 반응식 1에서,

는 실리카 모세관 내부 표면에 위치한 실리카이고;

는 C_{6-10}의 방향족 고리이고;

R^1 및 R^2는 독립적으로 수소 또는 C_{1-4}의 알킬이고;

M은 상기 단계 3에서 형성되는 공중합 고분자 사슬을 구성하는 모노머이고;

n은 1-10의 정수이고;

m은 1-1000의 정수이다.

또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조되는 것을 특징으로 하

는 올리고당류 또는 펩티드류 분리용 실리카 모세관을 제공한다.

나아가, 본 발명은 올리고당류를 유도체화 시약과 반응시켜, 올리고당류의 구조 이성질체를 준비하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 준비한 올리고당류의 구조 이성질체를, 상기 실리카 모세관을 통해 분리하는 단계(단계 2);를 포함하는 올리고당류의 분리방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 단백질을 가수분해하여, 펩티드류를 준비하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 준비한 펩티드류를, 상기 실리카 모세관을 통해 분리하는 단계(단계 2);를 포함하는 펩티드류의 분리방법을 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명에 따른 제조방법으로 인하여 제조되는 고분자 부착 실리카 모세관은 고분자 피막 자체 친화성이 우수하게 제조되어 길고 균일한 고분자 사슬 형태로 모세관 내부에 붙게 되고, 마른 상태에서는 견고한 피막의 형상을 띄지만, 아세토니트릴의 함량이 높은 이동상에서 활짝 펼쳐지며 분석물의 머무름과 물질전달 양면에서 봉우리 띠나비를 좁히는 방향으로 작용하는 효과가 있으므로, 글루코오스나 말토트리오스 등의 올리고당류 또는 시토크롬 C(Cytochrome C) 등 단백질의 가수분해 산물 내 많은 펩티드류 분리분석에 유용하게 사용할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 실시예 1 및 2에 기술된 리간드 부착 실리카 모세관, 중합개시제 부착 실리카 모세관 및 고분자 부착 실리카 모세관의 제조를 단계별로 나타난 도식도이다.

도 2는 실리카 분말과 본 발명에 따라 제조된 고분자 부착 실리

카 모세관에 대한 전자현미경의 넓은 범위(스케일 바 10 um, A) 및 좁은 범위 사진(스케일 바 2um, B)이다.

도 3은 본 발명에 따라 제조된 고분자 부착 실리카 모세관으로 말토트리오스 이성체들(A,B,C)과, D-글루코오스 아노머들(W,X,Y)에 대한 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC) 용리에서, 용리액의 아세토니트릴 조성에 대한 최적화 과정을 보여주는 이미지이다(아세토니트릴 함량은 A와 W에 대하여 95%, B와 X에 대하여 90%, C와 Y에 대하여 80%이며, CE 전압은 30kV, 시료용액 주입은 12 kV, 5초의 조건으로 시행되었으며, 최적화 조건은 B와 X를 얻은 90/10 아세토니트릴/30 mM 소듐 아세테이트 pH 6.6이었고, D와 Z는 최적화조건에서 얻은 아세톤의 전기크로마토그램고, B_1과 X_1은 각각 B와 X의 확대 전기크로마토그램이다).

도 4는 본 발명에 따라 제조된 고분자 부착 실리카 모세관으로 말토트리오스 이성체들(A,B,C)과, D-글루코오스 아노머들(W,X,Y)에 대한 CEC 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC) 용리에서, 용리액의 pH에 대한 최적화 과정을 보여주는 이미지이다(pH는 A와 W에 대하여 5.5, B와 X에 대하여 6.6, C와 Y에 대하여 7.3이며, CE 전압은 30kV, 시료용액 주입은 8 kV, 5초의 조건으로 시행되었으며, 최적화 조건은 B와 X를 얻은 90/10 아세토니트릴/30 mM 소듐 아세테이트 pH 6.6이었고, D와 Z는 최적화조건에서 얻은 아세톤의 전기크로마토그램이다).

도 5는 실시예 2에서 제조한 고분자 부착 실리카 모세관으로 프로테오믹 가수분해 시료에 대하여 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC) 분리분석을 수행한 전기크로마토그램이다(용리조건은 30 kV의 전압을 걸고 78/22 아세토니트릴/12.5 mM 소듐 포스페이트 pH 6.8 이동상에서 10분 용리하고, 그 다음 65/35 아세토니트릴/12.5 mM 소듐 포스페이트 pH 6.8 이동상으로 용리하는 조건으로 하였고, 도 5의 상부는 프로테오믹 시료에 대한 분리 전기크로마토그램이고,

하부는 전기삼투흐름 마커인 아세톤의 전기크로마토그램이다).

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

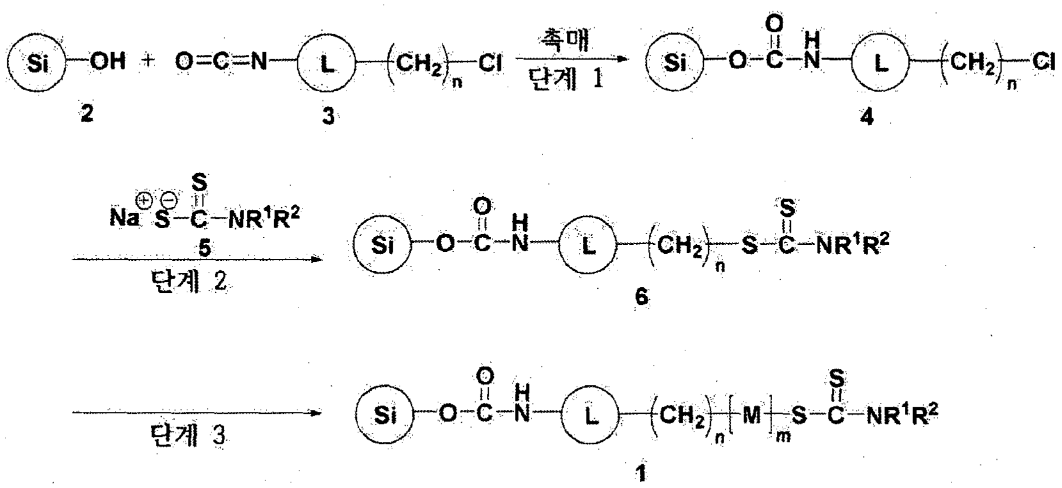
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 촉매 존재하에 화학식 2로 표시되는 실리카 모세관 내부 표면에 존재하는 하이드록시기와 화학식 3으로 표시되는 리간드를 반응시켜, 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 1);

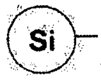
상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관을 화학식 5로 표시되는 중합 개시제와 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 2); 및

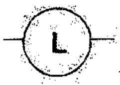
상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 내부에 모노머를 용매에 녹여 채우고, 가역 부가-파편화 사슬전달(Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT) 중합 반응을 수행하여 화학식 1로 표시되는 공중합 고분자 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 3);를 포함하는 실리카 모세관의 제조방법을 제공한다.

[반응식 1]



상기 반응식 1에서,

 는 실리카 모세관 내부 표면에 위치한 실리카이고;

 는 C_{6-10}의 방향족 고리이고;

R^1 및 R^2는 독립적으로 수소 또는 C_{1-4}의 알킬이고;

M은 상기 단계 3에서 형성되는 공중합 고분자 사슬을 구성하는 모노머이고;

n은 1-10의 정수이고;

m은 1-1000의 정수이다.

이하, 본 발명에 따른 고분자 부착 실리카 모세관의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

본 발명에 따른 고분자 부착 실리카 모세관의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 촉매 존재하에 화학식 2로 표시되는 실리카 모세관 내부 표면에 존재하는 하이드록시기와 화학식 3으로 표시되는 리간드를 반응시켜, 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계이다. 여기서 먼저, 공지의 방법(Bulletin of the Korean Chemical Society, 2014, 35, 542)에 따라 실리카 모세관을 NaOH 용액으로 전처리하여 모세관 내벽의 실란올 기를 활성화 하는 과정을 거친다. 일례로, 길이 1 m의 실리카 모세관에 대하여 5-40 mg의 화학식 3으로 표시되는 리간드, 5-35 mg의 촉매 및 1-5 mL의 무수 용매를 섞은 용액을 60-150℃로 6-48시간 흘려 반응시키고, 무수 용매로 세척하고 질소 기류에서 건조하는 것이 바람직하다.

상기 화학식 3으로 표시되는 리간드가 1.0 m 실리카 모세관에 대하여 5 mg 미만을 사용하는 경우 리간드 부착이 낮아지는 문제가 있고, 40 mg을 초과하여 사용하는 경우 재료 낭비의 문제가 있다.

또한, 상기 촉매가 1.0 m 실리카 모세관에 대하여 5 mg 미만으

로 사용하는 경우 촉매 효과가 나타나지 않아 반응이 진행되지 못하는 문제가 있고, 35 mg을 초과하면 처리 경비가 많아지는 문제가 있다.

나아가, 상기 반응 무수 용매가 1.0 m 실리카 모세관에 대하여 1 mL 미만으로 사용하는 경우 비균질 반응이 발생할 수 있는 문제가 있고, 5 mL를 초과하여 사용하는 경우 물질 희석에 의한 반응속도 감소의 문제가 있다.

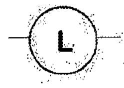
또한, 상기 반응온도가 60℃ 미만인 경우 반응속도가 느려 반응이 용이하게 진행되지 못하는 문제가 있고, 150℃ 초과인 경우 부 반응의 문제가 있다.

나아가, 상기 반응시간이 6시간 미만인 경우 불완전한 반응완결의 문제가 있고, 48시간을 초과하는 경우 시간 낭비 및 부 반응 발생의 문제가 있다.

상기 촉매는 비극성 무수 반응 용매에 녹을 수 있고, 이소시아네이트-히드록시 반응에 촉매효과가 있는 유기금속 화합물이면 모두 사용할 수 있다. 특히, 유기 치환기를 지닌 전이금속의 화합물이 촉매효과와 용매에 대한 용해도면에서 바람직하다. 구체적으로는, 이염화이부틸주석(dibutyltindichloride), 디부틸틴디아세테이트(dibutyltindiacetate), 디부틸틴디라우레이트(dibutyltindilaurate), 트리페닐틴아세테이트(triphenyltinacetate), 트리부틸틴아세테이트(tributyltinacetate), 아연 아세트산(zinc diacetate), 티타늄 테트라아세테이트(titanium tetra-acetate), 코발트 트리스(2-에틸헥사노에이트)(cobalt tris(2-ethylhexanoate)), 비스무트 트리스(2-에틸헥사노에이트)(bismuth tris(2-ethylhexanoate)), 아연 디(2-에틸헥사노에이트)(zinc di(2-ethylhexanoate)), 코발트 트리스(2,4-펜타디오네이트)(cobalt tris(2,4-pentadionate)), 티타늄 테트라(2,4-펜타디오네이트)(titanium tetra (2,4-pentadionate)), 망간 디(2,4-펜타디오네이트)(manganese di(2,4-pentadionate)), 니켈 디(2,4-펜타디오네이트)(nickel di(2,4-pentadionate), 지르코늄 테트라(2,4-펜타디오네이

트)(zirconium tetra(2,4-pentadionate)) 등을 사용할 수 있으며, 이염화이부틸주석(dibutyltindichloride)을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

상기 실리카 모세관은 통상적으로 외벽에 고분자 코팅이 되어 있고, 내경이 25-200 μm이고, 길이는 0.5-5.0 m인 상업용 실리카 모세관을 사용할 수 있다. 여기서, 상기 모세관의 내경이 25 μm 미만이면 컬럼이 쉽게 막히는 문제가 있고, 200 μm 초과이면 최종 컬럼의 분리효율이 저하되는 문제가 있다. 또한, 상기 모세관의 길이가 0.5 m 미만이면 컬럼 분리효율이 감소하는 문제가 있고, 5.0 m 초과이면 컬럼의 압력이 높아지는 문제가 있다.

상기 화학식 3에서  인 C_{6-10}의 방향족 고리는 페닐렌 또는 나프탈렌이 될 수 있고, 페닐렌인 것이 가장 바람직하다. 또한, 화학식 3으로 표시되는 리간드는 4-클로로메틸 페닐이소시아네이트, 3-클로로메틸 페닐이소시아네이트, 2-클로로메틸 페닐이소시아네이트 등을 사용할 수 있다.

상기 무수 용매는 무수 비극성 용매면 어느 것이나 사용할 수 있으나, 끓는점이 60℃ 이상인 것이 반응온도를 60℃ 이상으로 하기 위해서 바람직하다. 구체적으로, 무수 톨루엔, 무수 자일렌, 무수 메틸이소부틸케톤, 무수 메틸이소프로필케톤, 싸이클로펜탄온, 부티로락톤 등을 사용할 수 있다. 세척 과정에서의 무수 용매는 무수 톨루엔, 아세톤, 테트라하이드로퓨란, 아세토니트릴 등을 사용할 수 있다.

본 발명에 따른 고분자 부착 실리카 모세관의 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관을 화학식 5로 표시되는 중합 개시제와 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관을 제조하

는 단계이다. 일례로, 상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대하여, 10-200 mg의 화학식 5로 표시되는 중합 개시제 및 0.5-10.0 mL의 무수 용매를 섞은 용액을 25-80℃로 4-24시간 흘려주어 반응시키고, 무수 용매로 세척한 후, 질소 기류 하에서 건조하는 것이 바람직하다.

여기서, 상기 화학식 5로 표시되는 중합 개시제가 상기 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대하여 10 mg 미만으로 사용하는 경우 불완전 반응완결의 문제가 있고, 200 mg을 초과하는 경우에는 낭비 및 부 반응 발생의 문제가 있다.

또한, 상기 무수 용매가 상기 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대하여 0.5 mg 미만으로 사용하는 경우 불완전 반응완결의 문제가 있고, 10.0 mL를 초과하는 경우 물질 희석에 따른 반응속도 감소의 문제가 있다.

나아가, 상기 반응온도가 25℃ 미만인 경우에는 반응속도가 너무 느린 문제가 있고, 80℃를 초과하는 경우에는 화합물의 열분해가 발생할 수 있는 문제가 있다.

또한, 상기 반응시간이 4시간 미만인 경우 불완전 반응완결의 문제가 있고, 24시간 초과인 경우 부반응 발생의 문제가 있다.

상기 화학식 5로 표시되는 중합 개시제는 디티오카바메이트 그룹이 있으면 어느 것이나 사용할 수 있고, 구체적으로는 나트륨 디에틸디티오카바메이트, 나트륨 디프로필디티오카바메이트, 나트륨 디부틸디티오카바메이트, 나트륨 디메틸디티오카바메이트 등을 사용할 수 있으며, 상업적으로 용이하게 구할 수 있는 나트륨 디에틸디티오카바메이트를 사용하는 것이 바람직하다.

상기 반응 무수 용매는 상기 화학식 5로 표시되는 중합 개시제를 용해시킬 수 있을 정도의 극성이 있고, 하이드록시기, 아미노기 또

는 카르복시기를 갖고 있지 않은 용매는 어느 것이나 사용할 수 있다. 이 중, 에테르기, 케톤기 또는 에스테르기를 갖고 끓는점이 50℃ 이상인 용매를 선택하는 것이 반응온도를 어느 이상 유지하고 부 반응을 방지하기 위하여 바람직하다. 구체적으로는, 무수 테트라하이드로퓨란, 디에틸케톤, 에틸아세테이트 등을 사용할 수 있다.

상기 세척 용매는 테트라하이드로퓨란, 아세톤, 메탄올/물 혼합 용매, 아세토니트릴 등을 사용할 수 있다.

본 발명에 따른 고분자 부착 실리카 모세관의 제조방법에 있어서, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 내부에 모노머를 용매에 녹여 채우고, 가역 부가-파편화 사슬전달(Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT) 중합 반응을 수행하여 화학식 1로 표시되는 고분자 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계이다.

여기서, 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대하여, 비극성 모노머 0.2-1.5 mL, 전기삼투흐름 유발 모노머 30-150 mg, 극성 모노머 30-250 mg, 비극성용매 0.5-5.5 mL 및 극성 용매 0.3-2.5 mL로 이루어진 반응용액을 70-150℃로 6-36시간 흘려주어 RAFT 중합반응을 진행시키고, 비극성 및 극성 용매로 세척하고 아세톤으로 세척한 후, 질소 기류에서 건조하는 것이 바람직하다.

여기서, 상기 비극성 모노머를 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대하여 0.2 mL 미만으로 사용하는 경우 불완전 반응완결의 문제가 있고, 1.5 mL를 초과하여 사용하는 경우 중합통제 불가의 문제가 있다.

또한, 상기 전기삼투흐름유발 모노머를 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대

하여 30 mg 미만으로 사용하는 경우 제조된 CEC 컬럼의 전기삼투흐름이 너무 약한 문제가 있고, 150 mg 초과하여 사용하면 물질 낭비의 문제가 있다.

나아가, 상기 극성 모노머가 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대하여 30 mg 미만으로 사용하는 경우 극성 분석물의 머무름 시간이 충분하지 못한 문제가 있고, 250 mg 초과로 사용하는 경우 극성 분석물의 띠나비가 너무 넓어지는 문제가 있다.

또한, 비극성 반응용매가 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대하여 0.5 mL 미만으로 사용하는 경우 불균질 반응의 문제가 있고, 5.5 mL를 초과하여 사용하는 경우 물질희석에 의한 반응속도 감소의 문제가 있다.

나아가, 극성 반응용매가 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 1.0 m에 대하여 0.3 mL 미만으로 사용하는 경우 극성 모노머의 용해에 문제가 있을 뿐만 아니라, 생성정지상의 자체 친화성이 제한될 수 있고, 2.5 mL를 초과하여 사용하는 경우 물질희석에 의한 반응속도 감소의 문제가 있다.

또한, 상기 반응온도가 70℃ 미만인 경우 불완전 반응의 문제가 있고, 150℃ 초과인 경우 반응통제 불가의 문제가 있다.

나아가, 상기 반응시간이 6시간 미만인 경우 불완전 반응의 문제가 있고, 36시간을 초과하는 경우 시간낭비 및 부반응 발생의 문제가 있다.

상기 비극성 모노머는 벤젠 고리를 가지고 있고 1 이상의 이중결합을 갖는 화합물이면 제한 없이 사용할 수 있으나, 분자량이 500 이하인 것이 바람직하다. 구체적으로는, 스티렌, 4-메틸스티렌, 2-클로로스티렌, 3-클로로스티렌, 4-클로로스티렌, 4-브로모스티렌, 4-비닐벤질클로라이드, 4-비닐나프탈렌 등을 사용할 수 있으며, 저렴하고, 분리효율이 우수한 정지상을 얻을 수 있다는 점에서 스티렌을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

상기 극성 모노머는 벤젠 고리를 가지고 있고 극성반응기를 가지고 있으며 1이상의 이중결합을 지닌 화합물이면 제한 없이 사용할 수 있으나, 분자량이 500 이하인 것이 바람직하다. 구체적으로는, N-페닐아크릴아미드, 4-아미노스티렌, 4-{N-(메틸아미노에틸)아미노메틸}스티렌, 4-비닐벤조산, 3,4-디메톡시스티렌 등을 사용할 수 있다.

상기 전기삼투흐름 유발 모노머는 카르복실기나 아미노기를 가지고 있고, 1 이상의 이중결합을 지닌 화합물이면 제한 없이 사용할 수 있으나, 분자량이 500 이하인 것이 바람직하다. 구체적으로는, 아크릴산, 메타크릴산, 메틸메타크릴산, 이타코닌산, 알릴아민, 4-아미노스티렌, 4-비닐피리딘, 2-비닐피리딘 등을 사용할 수 있다.

상기 비극성 반응용매는 모노머를 잘 용해할 수 있으면 어느 것이나 사용할 수 있으나 벤젠고리를 갖고 있는 것이 바람직하다. 구체적으로는, 톨루엔, 자일렌, 에틸벤젠 등을 사용할 수 있다.

상기 극성 반응용매는 극성 모노머를 잘 용해할 수 있고, 히드록시기, 아미노기, 카르복시기를 갖고 있지 않으면 어느 것이나 사용할 수 있으나, 끓는점이 80℃ 이상인 것이 바람직하다. 구체적으로는, 싸이클로펜탄온, 사이클로헥산온, 메틸이소부틸케톤, 4-메틸-2-펜탄온 등을 사용할 수 있다.

상기 세척시 용매는 톨루엔, 2-프로판올, 아세토니트릴, 아세톤 등을 사용할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 올리고당류 또는 펩티드류 분리용 실리카 모세관을 제공한다. 여기서, 상기 실리카 모세관의 내경은 25-200 μm이고; 길이는 0.5-5 m이고; 생성되는 고분자막의 두께는 건조한 상태에서 1-10 μm인 것이 바

람직하다.

나아가, 본 발명은 올리고당류를 유도체화 시약과 반응시켜, 올리고당류의 구조 이성질체를 준비하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 준비한 올리고당류의 구조 이성질체를, 상기 실리카 모세관을 통해 분리하는 단계(단계 2);를 포함하는 올리고당류의 분리방법을 제공한다.

이하, 본 발명에 따른 올리고당류의 분리방법을 단계별로 상세히 설명한다.

본 발명에 따른 올리고당류의 분리방법에 있어서, 상기 단계 1은 올리고당류를 유도체화 시약과 반응시켜, 올리고당류의 구조 이성질체를 준비하는 단계이다.

이때, 상기 올리고당류는 글루코오스 또는 말토트리오스인 것이 바람직하지만, 이에 제한하지 않는다.

또한, 상기 유도체화 시약은 파라-아미노벤조익 에틸 에스테르(*p*-aminobenzoic ethyl ester)를 사용하는 것이 바람직하다.

여기서, 상기 분리방법은 상기 단계 2를 수행하기 이전에, 상기 단계 1에서 준비한 올리고당류의 구조 이성질체를 수소환원시약과 반응시켜, 2차아민을 포함하는 올리고당류의 구조 이성질체를 준비하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 상기 수소환원시약은 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride, $NaBH_3CN$)를 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명에 따른 올리고당류의 분리방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 준비한 올리고당류의 구조 이성질체를, 상기 실리카 모세관을 통해 분리하는 단계이다. 상기 올리고당류의 분리를 수행

한 후, 분리결과는 전기크로마토그램을 통해 확인할 수 있다.

나아가, 본 발명은 단백질을 가수분해하여, 펩티드류를 준비하는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1에서 준비한 펩티드류를, 상기 실리카 모세관을 통해 분리하는 단계(단계 2);를 포함하는 펩티드류의 분리방법을 제공한다.

이하, 본 발명에 따른 올리고당류의 분리방법을 단계별로 상세히 설명한다.

본 발명에 따른 올리고당류의 분리방법에 있어서, 상기 단계 1은 단백질을 가수분해하여, 펩티드류를 준비하는 단계이다.

이때, 상기 단백질은 시토크롬 C(Cytochrome C)인 것이 바람직하지만, 이에 제한하지 않는다.

또한, 상기 단백질의 가수분해는 트립신(Trypsin)을 사용하는 것이 바람직하지만, 이에 제한하지 않는다.

본 발명에 따른 올리고당류의 분리방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 준비한 펩티드류를, 상기 실리카 모세관을 통해 분리하는 단계이다. 상기 올리고당류의 분리를 수행한 후, 분리결과는 전기크로마토그램을 통해 확인할 수 있다.

본 발명에 따른 고분자 부착 실리카 모세관은 일상적인 CEC 이동상 특히 유기용매(아세토니트릴)의 함량이 높은 용매에서, 정지상을 이루고 있는 고른 길이의 고분자 사슬이 활짝 펼쳐지면서 물질전달속도가 가속화되면서 분석물의 봉우리 띠나비가 감소되고 분리효율이 증대되는 효과가 있다.

이에, 실시예 1에서 제조한 고분자 부착 실리카 모세관을 사용한 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC)을 통해 이동상 중 아세토니트릴 함량에 따라, 말토트리오스 구조이성체 및 D-글루코오스 아노머의 분리가능 여부를 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 아세토니트릴의 부피 함량이 90%일 때, 말토트리오스 (도 3의 B)와 D-글루코오스 (도 3의 X) 모두 최적의 분리를 나타내는 것을 확인하였다(실험예 1의 도 3 참조).

또한, 실시예 1에서 제조한 고분자 부착 실리카 모세관을 사용한 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC)을 통해 이동상의 pH에 따라, 말토트리오스 구조이성체 및 D-글루코오스 아노머의 분리가능 여부를 평가하기 위하여 실험을 수행한 결과, 이동상 버퍼의 pH 값이 6.6일 때 말토트리오스와 (도 4의 B), D-글루코오스 (도 4의 X) 모두 최적의 분리를 나타내는 것을 확인하였다(실험예 2의 도 4 참조).

나아가, 실시예 2에서 제조한 고분자 부착 실리카 모세관을 사용하여 프로테오믹 시료를 분리분석하기 위하여 실험을 수행한 결과, 프로테오믹 시료에 대하여 20개 이상의 봉우리(펩티드)가 분리되었으며 각 봉우리의 이론단수는 수십만에서 백만에 이르는 좋은 결과를 나타내는 것을 확인하였다(실험예 3의 도 5 참조).

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 더욱 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 의하여 제한되는 것은 아니다.

<실시예 1> 고분자 부착 실리카 모세관의 제조 1

단계 1 : 촉매화된 이소시아네이트-히드록시 반응에 의한 중합개시제 부착 실리카모세관의 제조

4-클로로메틸 페닐이소시아네이트 25 mg과 이염화 이부틸주석(dibutyltin dichloride) 20 mg을 무수 톨루엔 2.5 mL에 용해시킨 용액을 제조하고, 이를 내경 50 μm, 길이 584 mm인 실리카 모세관에 85℃로 20시간에 걸쳐 흘려주었다(도 1의 A 과정). 이후, 모세관을 상온에서 톨루엔으로 10시간 동안 세척하고, 아세톤으로 하루 동안 세척한 후, 질소 환경하에 건조시켰다. 건조한 모세관에는, 소듐 디에틸 디티오카바메이트 100 mg을 무수 테트라히드로퓨란 3.0mL에 녹인 용액을 55℃에서 12시간 동안 흘려주었다(도 1의 B 과정). 반응 후, 모세관은 즉시 상온에서 테트라하이드로퓨란을 6시간, 이어서 메탄올을 2시간 흘려서 세척하였다. 마지막으로, 아세톤으로 2시간 세척하고, 질소 환경 하 30분 동안 건조하여 중합개시제 부착 실리카모세관을 제조하였다.

단계 2 : 중합개시제 부착 실리카 모세관을 이용하여 RAFT 중합을 거쳐 고분자 부착 실리카모세관의 제조

상기 단계 1에서 제조한 중합개시제 부착 실리카 모세관에, 0.6 mL 스티렌, 50 uL 메타크릴산, 80 mg N-페닐아크릴아미드를, 2 mL 무수 톨루엔과 0.8 mL 4-메틸-2-펜탄온으로 이루어진 혼합용매에 용해시킨 용액을 100℃에서 15시간 동안 흘려주었다(도 1의 C 과정). 반응 용액은 초음파 진동과 질소 퍼지를 각 10분간 거치고, 0.2 μm 동공의 시린지 필터로 걸러서 사용하였다. 반응 후, 즉시 다음의 세척과정을 수행하였다. 구체적으로, 톨루엔으로 상온에서 5시간, 50℃에서 5시간 흘려주고, 다시 상온에서 4-메틸-2-펜탄온으로 5시간, 마지막으로 아세톤으로 2시간 흘려주었다. 이후, 질소 환경 하 건조하여 고분자 부착 실리카모세관을 제조하였다.

실리카 모세관의 한 쪽 끝으로부터 84 mm 지점에 자외선 흡광창을 제조하기 위하여 불꽃으로 지져 모세관 외피 고분자를 태워 없앴다. 따라서, 상기 실리카 모세관 컬럼의 유효길이는 500 mm가 된다.

도 2에는 고분자부착 실리카 모세관 단면의 한 부분에 대하여 전자현미경의 넓은 범위(A) 및 좁은 범위(B) 사진을 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 실리카 모세관 내벽에 견고한 고분자 피막이 형성된 것을 알 수 있다. 상기 피막은 긴 고분자 사슬들로 구성되어 있어 유기 용매(아세토니트릴)를 많이 함유한 이동상과 접할 경우, 사슬들이 활짝 펼쳐질 것으로 예상된다.

<실시예 2> 고분자 부착 실리카 모세관의 제조 2

<u>단계 1 : 촉매화된 이소시아네이트-히드록시 반응에 의한 중합개시제 부착 실리카모세관의 제조</u>

4-클로로메틸 페닐이소시아네이트 30 mg과 이염화 이부틸주석(dibutyltin dichloride) 40 mg을 무수 톨루엔 2.5 mL에 녹인 용액을 만들고, 이를 내경 50 μm, 길이 800 mm인 실리카 모세관에 85℃로 6시간에 걸쳐 흘려주었다. 다음 모세관을 상온에서 톨루엔으로 하루 동안 세척하고, 아세톤으로 한 시간 세척한 후, 질소 환경하에서 건조시켰다. 상기 건조한 모세관에는, 소듐 디에틸 디티오카바메이트 100 mg을 무수 테트라히드로퓨란 3.0 mL에 용해 시킨 용액을 55℃에서 6.5 시간 동안 흘려주었다. 반응 후 모세관은 즉시 상온에서 테트라히드로퓨란으로 하루 동안 흘려주고, 이어서 메탄올로 5시간 흘려서 세척해준 후, 마지막으로 아세톤으로 2시간 세척하고, 질소 환경하에서 30분 동안 건조시켜 중합개시제 부착 실리카모세관을 제조하였다.

<u>단계 2 : 중합개시제 부착 실리카 모세관을 이용하여 RAFT 중합을 거쳐 고분자 부착 실리카모세관의 제조</u>

상기 단계 1에서 제조한 중합개시제 부착 실리카 모세관에, 0.6

mL 스티렌, 70 μL 메타크릴산, 70 mg N-페닐아크릴아미드를, 2 mL 무수 톨루엔과 0.7 mL 4-메틸-2-펜탄온으로 이루어진 혼합용매에 용해시킨 용액을 100℃에서 14시간 동안 흘려주었다. 이후, 상온에서 톨루엔으로 15시간, 2-프로판올로 5시간, 50/50 (부피비) 2-프로판올/물 혼합용매로 5시간, 마지막으로 아세톤으로 1시간 흘려주었다. 다음 질소 환경하에서 건조하여 고분자 부착 실리카 모세관을 제조하였다. 실리카 모세관의 한쪽 끝으로부터 84 mm 지점에 자외선 흡광창을 만들기 위하여 불꽃으로 지져 모세관 외피 고분자를 태워 없앴다. 따라서, 상기 제조한 실리카 모세관 컬럼의 유효길이는 716 mm가 된다.

<실험예 1> 말토트리오스 구조이성체 및 D-글루코오스 아노머의 분리능력 평가(이동상 중 아세토니트릴 함량의 효과)

상기 실시예 1에서 제조한 고분자 부착 실리카 모세관을 사용한 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC)을 통해 이동상 중 아세토니트릴 함량에 따라, 말토트리오스 구조이성체 및 D-글루코오스 아노머의 분리가능 여부를 평가하기 위하여 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

이때, 당 시료는 자외선 흡광검출기로 검출하기 위하여 유도체화 하였다. 유도체화 시약은 파라-아미노벤조산 에틸에스터를 사용하여 아민화 (amination) 반응을 시켰다. 이 반응은 올리고당의 한쪽 끝에 있는 말단 당의 알데히드 그룹하고 반응하여 시프 염기(Schiff base)를 이루고, 이것을 수소 환원시키면 2차 아민이 된다. 수소 환원까지 시키면 이것을 환원 아민화(reductive amination)라고 한다. 수소 환원 시약으로는 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride, $NaBH_3CN$)를 사용하였다. D-글루코오스는 아민화하면 2개의 아노머가 관찰되고, 환원 아민화하면 1개의 물질만이 관찰된다. 따라서 D-글루코오스는 아민화 하였고, 말토트리오스는 환원 아민화하였다. 여기서, 말토트리오스는 D-글루코오스가 3단위로 연결된

당이다.

도 3은 본 발명에 따라 제조된 고분자 부착 실리카 모세관으로 말토트리오스 이성체들(A,B,C)과, D-글루코오스 아노머들(W,X,Y)에 대한 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC) 용리에서, 용리액의 아세토니트릴 조성에 대한 최적화 과정을 보여주는 이미지이다(아세토니트릴 함량은 A와 W에 대하여 95%, B와 X에 대하여 90%, C와 Y에 대하여 80%이며, CE 전압은 30kV, 시료용액 주입은 12 kV, 5초의 조건으로 시행되었으며, 최적화 조건은 B와 X를 얻은 90/10 아세토니트릴/30 mM 소듐 아세테이트 pH 6.6이었고, D와 Z는 최적화조건에서 얻은 아세톤의 전기크로마토그램고, B_1과 X_1은 각각 B와 X의 확대 전기크로마토그램이다).

도 3에 나타난 바와 같이, 아세토니트릴의 부피 함량이 90%일 때, 말토트리오스 (도 3의 B)와 D-글루코오스 (도 3의 X) 모두 최적의 분리를 나타내는 것을 확인하였다.

<실험예 2> 말토트리오스 구조이성체 및 D-글루코오스 아노머의 분리능력 평가(이동상의 pH 효과)

상기 실시예 1에서 제조한 고분자 부착 실리카 모세관을 사용한 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC)을 통해 이동상의 pH에 따라, 말토트리오스 구조이성체 및 D-글루코오스 아노머의 분리가능 여부를 평가하기 위하여 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

이때, 이동상에서 아세토니트릴 부피 함량을 90%로 고정하였고, 여러 pH에서의 이동상을 사용하는 것을 제외하고, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

도 4는 본 발명에 따라 제조된 고분자 부착 실리카 모세관으로 말토트리오스 이성체들(A,B,C)과, D-글루코오스 아노머들(W,X,Y)에 대한 CEC 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC) 용리에서, 용리액의 pH에 대한 최적화 과정을 보여주는 이미지이다(pH는 A와 W에 대하여 5.5, B와 X에 대하여 6.6, C와 Y에 대하여 7.3이며, CE 전압은 30kV, 시료용액 주입은 8 kV, 5초의 조건으로 시행되었으며, 최적화 조건은 B와 X를 얻은 90/10 아세토니트릴/30 mM 소듐 아세테이트 pH 6.6이었고, D와 Z는 최적화조건에서 얻은 아세톤의 전기크로마토그램이다).

도 4에 나타난 바와 같이, 이동상 버퍼의 pH 값이 6.6일 때 말토트리오스와 (도 4의 B), D-글루코오스 (도 4의 X) 모두 최적의 분리를 나타내는 것을 확인하였다.

따라서, 말토트리오스 구조이성체 및 D-글루코오스 아노머를 분리하기 위한 최적의 이동상은 90/10 (부피비) 아세토니트릴/30mM 소듐 아세테이트 pH 6.6이다. 최적 조건에서의 컬럼 성능과 재현성을 하기 표 1에 나타내었다(구체적으로, 하기 표 1은 최적 이동상에서 관찰한 컬럼분리효율 및 머무름 시간의 컬럼 대 컬럼 및 날 대 날 자료 및 재현성[a]을 나타내는 표이다).

a. 컬럼 대 컬럼 재현성 조사를 위하여 3 배치의 모세관 컬럼이 제조되었고, 날 대 날 재현성 조사를 위하여 그 중 1개의 컬럼으로 3일 연속 측정하였다.

【표 1】

물질		컬럼 대 컬럼		날 대 날	
말토	이성	이론단수 /미터	머무름시간 (분)	이론단수 /미터	머무름시간 (분)

트리	체	평균	% RSD	평균	% RSD	평균	% RSD	평균	% RSD
오스	M_1	1,364,000	4.6%	15.11	2.3%	1,337,000	1.4%	15.02	1.1%
	M_2	1,473,000	4.9%	15.40	2.4%	1,490,000	1.7%	15.39	1.2%
	M_3	1,358,000	4.5%	15.80	2.5%	1,381,000	1.1%	15.77	0.8%
	M_4	1,280,000	3.8%	16.20	2.6%	1,305,000	1.5%	16.13	0.5%
	M_5	1,264,000	4.0%	16.5	2.8%	1,240,000	0.9%	16.44	0.9%
D-글루코오스	G_1	1,008,000	3.9%	12.85	1.6%	1,023,000	1.0%	12.93	1.2%
	G_2	976,000	4.3%	13.13	1.7%	965,000	1.2%	13.19	0.8%

상기 표 1에서,

%RSD는 % 단위로 표기된 상대표준편차(relative standard deviation)이다.

상기 표 1에 나타난 바와 같이, 컬럼 이론단수가 미터 당 백만을 넘고 있고, 컬럼의 재현성도 매우 우수함을 알 수 있다. D-글루코오스의 두 아노머가 완전하게 분리되었고, 말토트리오스에 대해서는 무려 5개의 이성체가 관찰되었다. 컬럼 분리효율이 우수하고 봉우리

띠나비가 좁은 만큼, 인접 두 봉우리 간 크로마토그래피 분리능도 우수하여, 하기 표 2에 나타난 바와 같이 그 값이 6.2-7.5 정도의 높은 수치를 보여준다.

【표 2】

	말토트리오스					D-글루코오스
인접봉우리 쌍	M_1-M_2	M_2-M_3	M_3-M_4	M_4-M_5	평균	G_1-G_2
분리능	6.75	7.08	7.44	6.17	6.86	6.28

상기 결과는 종래 문헌에 보고된 어떠한 당의 이성체 분리결과보다도 현저히 우수한 결과이다. 본 발명에 따른 열린 구조형 고분자 부착 실리카 모세관 컬럼의 우수한 점으로는 본 발명의 제조 조건에 형성되는 고분자 피막이 자체 친화성이 우수하게 제조되어, 길고 균일한 고분자 사슬 형태로 모세관 내부에 붙게 되고, 마른 상태에서는 견고한 피막의 형상을 띄지만, 아세토니트릴의 함량이 높은 이동상에서 활짝 펼쳐지며 분석물의 머무름과 물질전달 양면에서 봉우리 띠나비를 좁히는 방향으로 작용한다는 것이다.

<실험예 3> 프로테오믹 시료의 분리분석 평가

상기 실시예 2에서 제조한 고분자 부착 실리카 모세관을 사용하여 프로테오믹 시료를 분리분석하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

먼저, 프로테오믹 시료는 씨토크롬 씨(Cytochrome C)를 트립신으로 가수분해한 산물로서 다음과 같이 준비했다. 씨토크롬 씨 5 mg, 트립신 4 mg, 4 M 요소수용액 2 mL, 0.2 M 암모늄 비카보네이트(ammonium bicarbonate) 2 mL를 함께 용기에 넣고 격렬하게 흔들어주어 용액으로 만들고, 37℃ 온도의 수조에 넣어 48시간 동안 가수분

해 시켰다. 이후, 0.2 μm의 시린지 필터를 이용하여 거른 후, 4℃의 냉장고에 보관하였다.

상기 준비한 프로테오믹 시료를, 실시예 2에서 제조한 고분자부착 실리카모세관으로 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC) 분리분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 용리 조건은 30 kV의 전압을 걸고 78/22 (부피비) 아세토니트릴/12.5 mM 소듐 포스페이트 (pH 6.8) 이동상에서 10분 용리하고, 그 다음 65/35 (부피비) 아세토니트릴/12.5 mM 소듐 포스페이트 (pH 6.8) 이동상으로 용리하는 조건으로 하였다. 시료 주입은 8 mbar의 압력으로 5초 동안 주입하였다.

도 5는 실시예 2에서 제조한 고분자 부착 실리카 모세관으로 프로테오믹 가수분해 시료를 모세관 전기크로마토그래피법(Capillary Electrochromatography, CEC) 분리분석을 수행한 전기크로마토그램이다(용리조건은 30 kV의 전압을 걸고 78/22 아세토니트릴/12.5 mM 소듐 포스페이트 pH 6.8 이동상에서 10분 용리하고, 그 다음 65/35 아세토니트릴/12.5 mM 소듐 포스페이트 pH 6.8 이동상으로 용리하는 조건으로 하였고, 도 5의 상부는 프로테오믹 시료에 대한 분리 전기크로마토그램고, 하부는 전기삼투흐름 마커인 아세톤의 전기크로마토그램이다).

도 5에 나타난 바와 같이, 프로테오믹 시료에 대하여 20개 이상의 봉우리(펩티드)가 분리되었으며 각 봉우리의 이론단수는 수십만에서 백만에 이르는 좋은 결과를 나타내는 것을 확인하였다.

따라서, 본 발명에 따른 제조방법으로 인하여 제조되는 고분자 부착 실리카 모세관은 고분자 피막 자체 친화성이 우수하게 제조되어 길고 균일한 고분자 사슬 형태로 모세관 내부에 붙게 되고, 마른 상태

에서는 견고한 피막의 형상을 띄지만, 아세토니트릴의 함량이 높은 이동상에서 활짝 펼쳐지며 분석물의 머무름과 물질전달 양면에서 봉우리 띠나비를 좁히는 방향으로 작용하는 효과가 있으므로, 다양한 종류의 당 이성체 분리에 유용하게 사용할 수 있다.

【산업상 이용가능성】

본 발명에 따른 제조방법으로 인하여 제조되는 고분자 부착 실리카 모세관은 고분자 피막 자체 친화성이 우수하게 제조되어 길고 균일한 고분자 사슬 형태로 모세관 내부에 붙게 되고, 마른 상태에서는 견고한 피막의 형상을 띄지만, 아세토니트릴의 함량이 높은 이동상에서 활짝 펼쳐지며 분석물의 머무름과 물질전달 양면에서 봉우리 띠나비를 좁히는 방향으로 작용하는 효과가 있으므로, 글루코오스나 말토트리오스 등의 올리고당류 또는 시토크롬 C(Cytochrome C) 등 단백질의 가수분해 산물 내 많은 펩티드류 분리분석에 유용할 수 있다.

【청구의 범위】

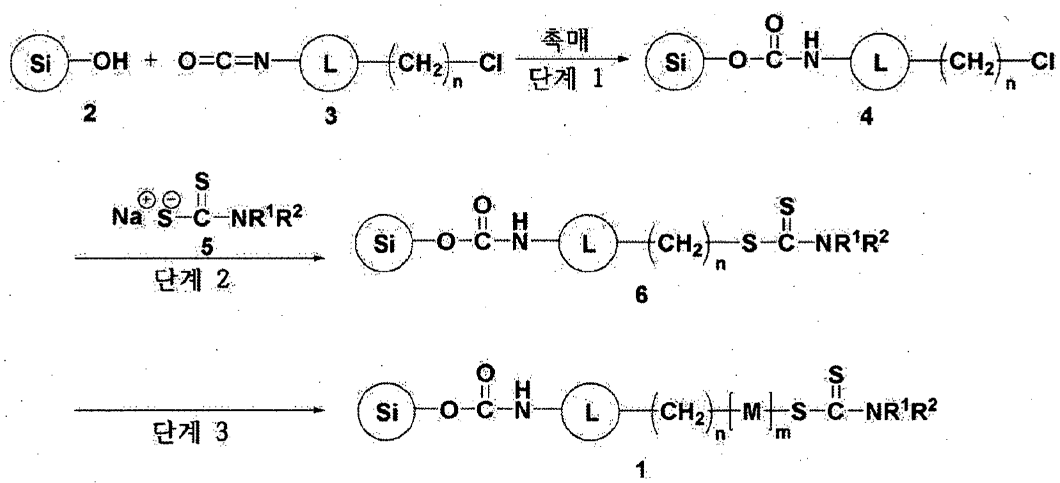
【청구항 1】

하기 반응식 1에 나타난 바와 같이, 촉매 존재하에 화학식 2로 표시되는 실리카 모세관 내부 표면에 존재하는 하이드록시기와 화학식 3으로 표시되는 리간드를 반응시켜, 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 1);

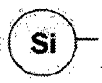
상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 리간드 부착 실리카 모세관을 화학식 5로 표시되는 중합 개시제와 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 2); 및

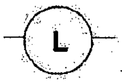
상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 중합 개시제 부착 실리카 모세관 내부에 모노머를 용매에 녹여 채우고, 가역 부가-파편화 사슬전달(Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer, RAFT) 중합 반응을 수행하여 화학식 1로 표시되는 공중합 고분자 부착 실리카 모세관을 제조하는 단계(단계 3);를 포함하는 실리카 모세관의 제조방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

는 실리카 모세관 내부 표면에 위치한 실리카이고;

 는 C_{6-10}의 방향족 고리이고;

R^1 및 R^2는 독립적으로 수소 또는 C_{1-4}의 알킬이고;

M은 상기 단계 3에서 형성되는 공중합 고분자 사슬을 구성하는 모노머이고;

n은 1-10의 정수이고;

m은 1-1000의 정수이다).

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 단계 1의 촉매는 끓는점이 60℃ 이상인 비극성 무수 용매에 용해되고, 전이금속을 포함하며, 유기 치환기를 갖는 유기금속 화합물인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서,

상기 무수 용매는 무수 톨루엔, 무수 자일렌, 무수 메틸이소부틸케톤, 무수 메틸이소프로필케톤, 싸이클로펜탄온 및 부티로락톤으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 단계 1의 촉매는 이염화이부틸주석(dibutyltindichloride), 디부틸틴디아세테이트(dibutyltindiacetate), 디부틸틴디라우레이트(di-butyltindilaurate), 트리페닐틴아세테이트(triphenyltinacetate), 트리부틸틴아세테이트(tributyltinacetate), 아연 아세트산(zinc diacetate), 티타늄 테트라 아세테이트(titanium tetra-acetate), 코발트 트리스(2-에틸헥사노에이트)(cobalt tris(2-ethylhexanoate)), 비스무트 트리스

(2-에틸헥사노에이트)(bismuth tris(2-ethylhexanoate)), 아연 디(2-에틸헥사노에이트)(zinc di(2-ethylhexanoate)), 코발트 트리스(2,4-펜타디오네이트)(cobalt tris(2,4-pentadionate)), 티타늄 테트라(2,4-펜타디오네이트)(titanium tetra (2,4-pentadionate)), 망간 디(2,4-펜타디오네이트)(manganese di(2,4-pentadionate)), 니켈 디(2,4-펜타디오네이트)(nickel di(2,4-pentadionate) 및 지르코늄 테트라(2,4-펜타디오네이트)(zirconium tetra(2,4-pentadionate))로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 단계 3의 모노머는 비극성 모노머, 전기삼투흐름 유발 모노머 및 극성 모노머를 모두 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 6】

제5항에 있어서,

상기 비극성 모노머는 스티렌, 4-메틸스티렌, 2-클로로스티렌, 3-클로로스티렌, 4-클로로스티렌, 4-브로모스티렌, 4-비닐벤질클로라이드 및 4-비닐나프탈렌으로 이루어지는, 벤젠 고리와 이중결합을 갖는 화합물 군으로부터 선택되는 1종 이상이고;

상기 전기삼투흐름 유발 모노머는 아크릴산, 메타크릴산, 메틸메타크릴산, 이타코닌산, 알릴아민, 4-아미노스티렌, 4-비닐피리딘 및 2-비닐피리딘으로 이루어지는, 카르복시나 아미노 작용기 및 이중결합을 갖는 화합물 군으로부터 선택되는 1종 이상이고; 및

상기 극성 모노머는 N-페닐아크릴아미드, 4-아미노스티렌, 4-{N-(메틸아미노에틸)아미노메틸}스티렌, 4-비닐벤조산 및 3,4-디메톡시스티렌으로 이루어지는, 벤젠 고리와 극성 작용기 및 이중결합을 갖는 화합물 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을

특징으로 하는 제조방법.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

상기 단계 3의 용매는 극성 용매 및 비극성 용매로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서,

상기 극성 용매는 싸이클로펜탄온, 싸이클로헥산온, 메틸이소부틸케톤 및 4-메틸-2-펜탄온으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상이고; 및

상기 비극성 용매는 톨루엔, 자일렌 및 에틸벤젠으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 9】

제1항의 제조방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 올리고당류 또는 펩티드류 분리용 실리카 모세관.

【청구항 10】

올리고당류를 유도체화 시약과 반응시켜, 올리고당류의 구조 이성질체를 준비하는 단계(단계 1); 및

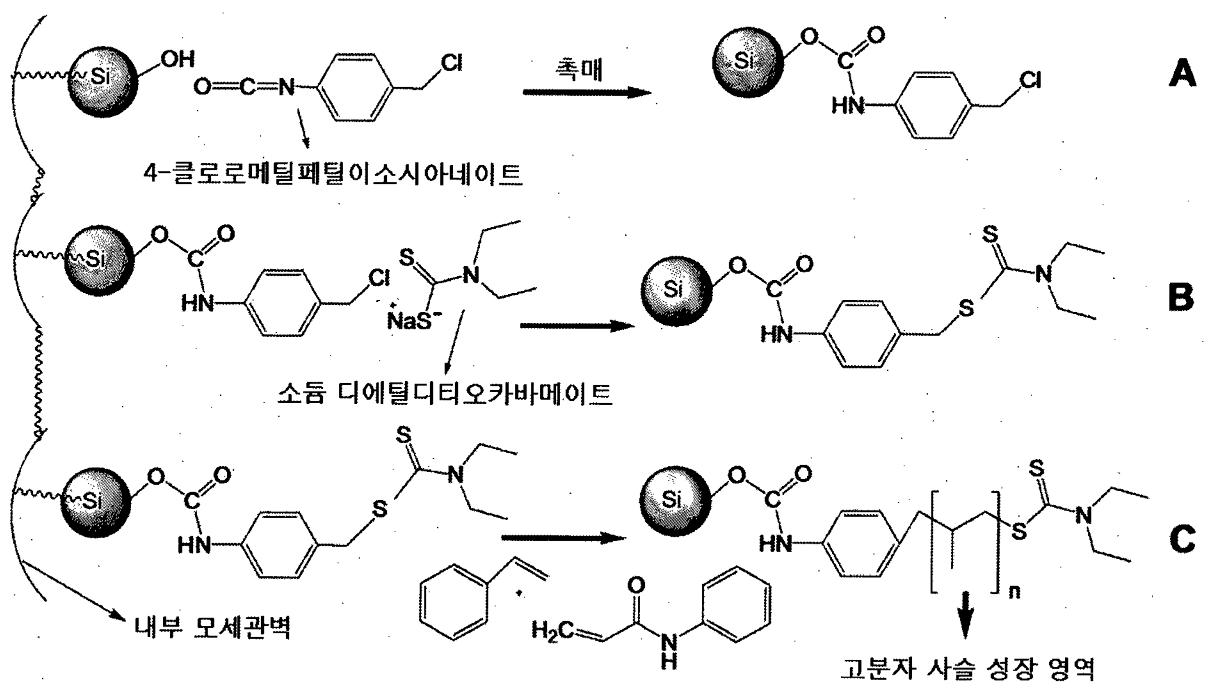
상기 단계 1에서 준비한 올리고당류의 구조 이성질체를, 제9항의 실리카 모세관을 통해 분리하는 단계(단계 2);를 포함하는 올리고당류의 분리방법.

【청구항 11】

단백질을 가수분해하여, 펩티드류를 준비하는 단계(단계 1); 및

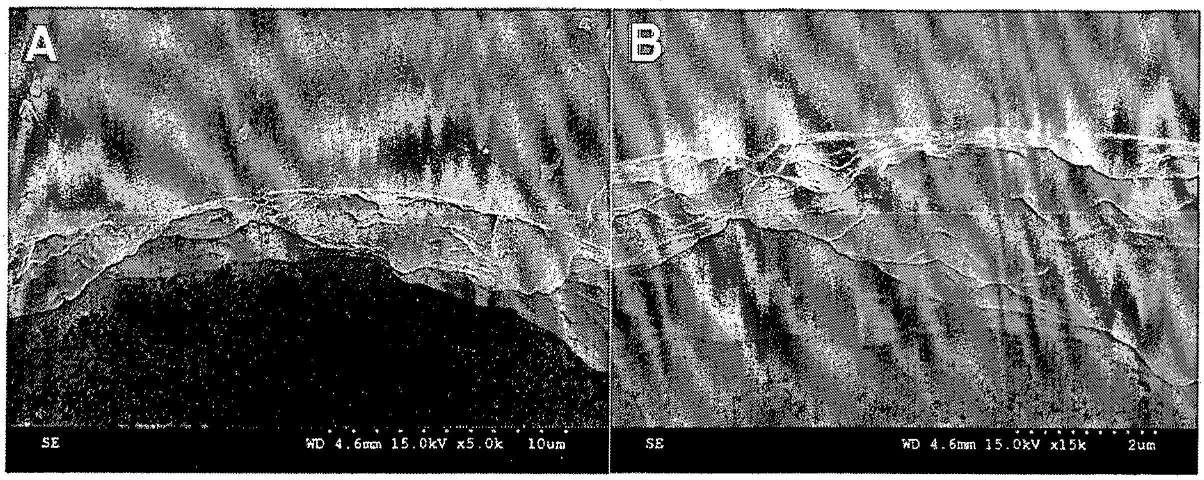
상기 단계 1에서 준비한 펩티드류를, 제9항의 실리카 모세관을 통해 분리하는 단계(단계 2);를 포함하는 펩티드류의 분리방법.

【도 1】

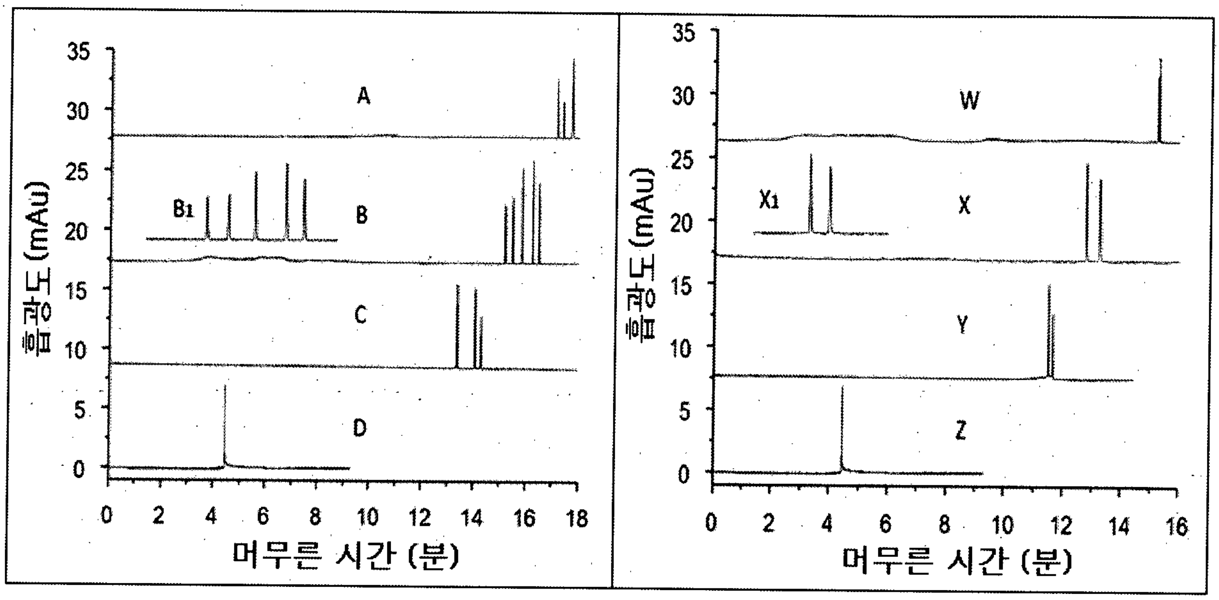


Si
OH
O=C=N
Cl
촉매
O
C
O
HN
A
4-클로로메틸페틸이소시아네이트
S
N
NaS⁻
B
소듐 디에틸디티오카바메이트
C
n
H₂C
N
H
내부 모세관벽
고분자 사슬 성장 영역

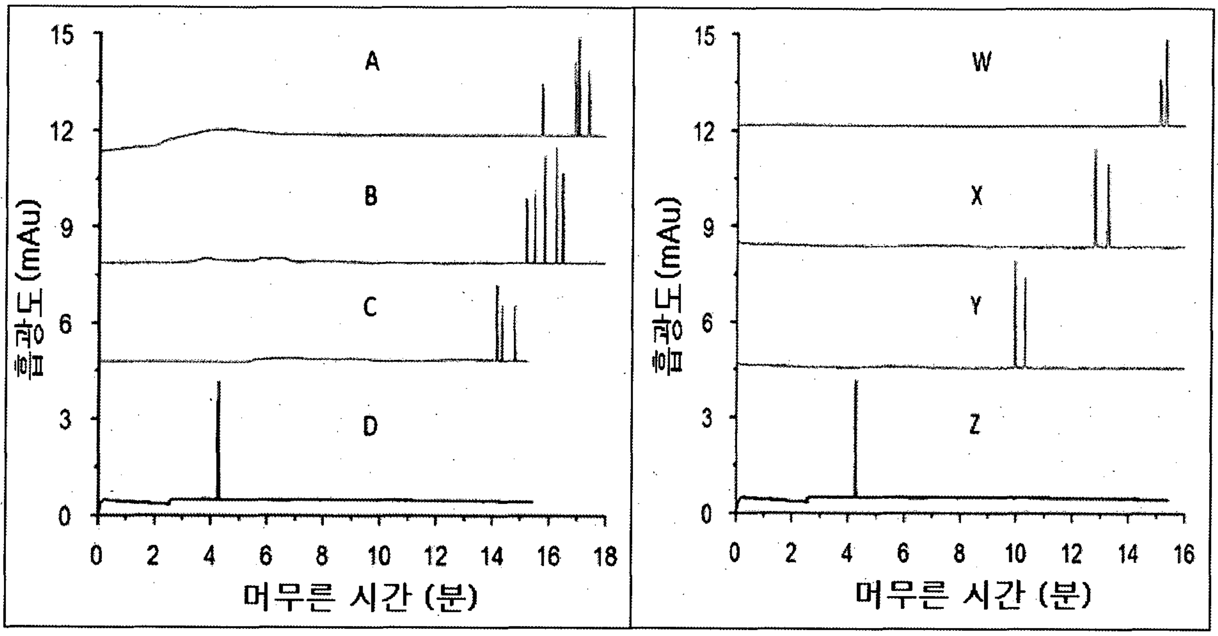
【도 2】



【도 3】


35
30
25
20
15
10
5
0
흡광도 (mAu)
A
B1
B
C
D
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
머무른 시간 (분)
W
X1
X
Y
Z
0 2 4 6 8 10 12 14 16
머무른 시간 (분)

【도 4】


15
12
9
6
3
0
흡광도 (mAu)
A
B
C
D
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
머무른 시간 (분)
W
X
Y
Z
0 2 4 6 8 10 12 14 16
머무른 시간 (분)

【도 5】