

구리(II) 킬레이트의 첨가에 의한 자유아미노산 광학이성질체의 역상 액체크로마토그래피적 분리

李善行* · 吳尙燮 · 安洪暻 · 朴京淑 · 吳相午†

경북대학교 사범대학 화학교육과

†경북대학교 자연과학대학 화학과

(1992. 5. 27 접수)

Optical Resolution of Free Amino Acids with Addition of Copper(II) Chelates in a Reversed-Phase Liquid Chromatography

Sun Haing Lee*, Tae Sub Oh, Hong Yeup An, Kyung Sug Park, and Sang Oh OH†

*Department of Chemistry, Teachers College, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

†Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,

Taegu 702-701, Korea

(Received May 27, 1992)

요 약. 역상 고성능 액체 크로마토그래피에서 L-proline과 그 유도체들(hydroxy-L-proline, N-benzyl-L-proline, *p*-xylenyl-L-proline, *p*-xylenylhydroxy-L-proline)의 구리(II) 킬레이트를 이동상에 첨가하여 유도체화 안된(자유) 아미노산 광학이성질체를 분리하였다. OPA-postcolumn 검출장치를 이용하여 검출하였고, 자유아미노산에 관한 머무름 거동을 이동상의 pH와 킬레이트 종류 및 농도, 유기용매의 종류 및 조성에 관해 연구하였다. 자유아미노산에서의 머무름 거동은 DNS-아미노산이나 DABS-아미노산과 같은 아미노산 유도체와는 다르게 나타났고, 분리 선택성도 자유아미노산이 아미노산 유도체들 보다 더 좋았다. 사용한 여러가지 리간드 가운데 *p*-xylenyl-L-proline을 사용했을 때 최대의 광학 분리의 선택성을 나타내었다. 아미노산과 구리 착물간의 리간드 교환반응의 입체효과에 따른 정지상과의 소수성 상호작용으로 분리 메커니즘을 설명할 수 있었다.

ABSTRACT. Separation of the optical isomers of free amino acids by a reversed phase high performance liquid chromatography has been studied by adding a copper(II) complex of L-proline or L-proline derivatives (hydroxy-L-proline, N-benzyl-L-proline, *p*-xylenyl-L-proline, *p*-xylenyl-hydroxy-L-proline) in the mobile phase. An OPA postcolumn detection system was used for the detection of amino acids. The chromatographic properties for the free amino acids were discussed in terms of the pH, the kinds and concentration of chelate or organic modifier. The retention behaviors of the free amino acids were considerably different from, those of DNS-amino acids or DABS-amino acids. The enantioselectivity of the free amino acids was better than that of derivatized amino acids. The enantioselectivity between the optical isomers observed by use of the Cu(II)-*p*-xylenyl-L-proline chiral chelate was the best among the several copper(II) chelate. A separation mechanism could be illustrated not only by the hydrophobic interaction of the diastereomer with stationary phase but also by the steric effect of the ligand exchange reaction between the free-amino acids and copper chelate.

서 론

한 인식과 함께 수십년 전부터 관심의 대상이었고 아미노산 광학이성질체의 분리는 그 중요성에 대 많은 발전도 있었다¹⁻⁴. Gil-av와 공동 연구자들에^{5,6}

의해 기체크로마토그래피에 의한 분리가 성공한 이래 크로마토그래피를 이용한 연구가 계속되어 왔으나 아미노산 자체의 비휘발성 때문에 최근에는 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 쪽으로 관심이 집중되고 있다.

HPLC에 의한 광학이성질체 분리는 키랄물질을 이용하여 리간드 교환반응(LEC) 및 소수성 상호작용을 통해 이루어지는데 두 가지 방법으로 나눌 수 있다.

첫째는 고체 지지체에 키랄물질을 흡착 또는 결합시켜서 분리하는 키랄 정지상법(Chiral Stationary Phase Method)으로, 특정 물질을 선택적으로 분리하여 순수하게 회수할 수 있다는 장점이 있으나 정지상의 합성이 어렵고 적용범위가 제한적이며 컬럼용량이 작은 단점이 있다. Davankov와 공동연구자들이^{7,8} L-proline 결합수지를 정지상으로 사용하여 광학이성질체를 분리한 후 많은 연구자들에 의해 연구되었다^{9~13}.

둘째로 이동상에 키랄물질을 첨가해서 분리하는 키랄이동상첨가법인데 용리액으로 사용하는 키랄물질의 소모가 많고 분리된 광학이성질체를 회수하는 문제가 있으나 키랄물질의 변화가 용이하여 다양한 조건에서 실험이 가능하고 컬럼용량이 큰 잇점이 있다. 이 방법에 의한 광학이성질체의 분리는 1979년 Karger 등이 L-2-alkyloctyldiethylenetriamine 금속 킬레이트를 이용하여 광학활성인 DNS-아미노산을 분리한 것이 시초였다^{14,15}. Gil-Av^{16,17}는 proline-Cu(II) 이동상을 이용하여 자유아미노산 광학이성질체를 분리하여쓰며 Grushka, Gilon^{18~20}, Karmen, Lam 등²¹이 역상 액체크로마토그래피를 이용하여 아미노산의 광학이성질체를 분리하였다. 이들 연구의 대부분은 킬레이트 중심 금속으로 Cu(II)를 사용했으며 광학이성질체의 용리순서, 리간드의 작용 등을 연구해왔다.

키랄이동상 첨가법을 사용하여 아미노산의 광학이성질체를 분리할 경우 이동상에 첨가된 키랄 금속 킬레이트 때문에 아미노산의 UV검출이 어렵게 된다. 이러한 방법으로부터 아미노산을 검출하기 위해서 다음의 두 가지 방법이 주로 사용되고 있다. 그 첫 번째는 아미노산을 분리하기 전에 발색단(예: DNA-AA, DABS-AA)으로 반응시켜 그 유도체를 분리하는

방법인데 이 경우에는 발색단 자체가 매우 커서 분리에 큰 영향을 주며 분리선택성을 감소시키는 작용을 하기도 하며 용리시간이 길어서 적절한 용리를 위해서는 많은 양의 유기용매를 이동상에 첨가해야 함으로 또한 광학이성질체의 분리선택성이 감소하게 된다. 두 번째 방법은 자유아미노산을 컬럼(column)에서 분리한 후 흡수시약이나 형광시약과 반응시키는 방법인데 이 방법은 아미노산의 분리에 반응시약이 영향을 주지않으므로 광학이성질체의 분리선택성이 좋아지며 머무름도 짧다. 이때 흔히 반응시간이 빠르고 재현성이 좋은 *o*-phthalaldehyde(OPA)가 반응시약으로 사용된다^{22~26}.

지금까지 본 연구자들은^{27~33} L-proline계 유도제 리간드를 포함한 Cu(II) 킬레이트를 첨가하여 유도체화된 아미노산의 광학이성질체를 분리하고 그 용리거동을 리간드 교환반응의 입체효과로 설명할 수 있었다. 본 연구에서는 N-benzyl-L-proline(BzPro), *p*-xylynyl-L-proline(*p*-XyPro), *p*-xylynyl-phydroxy-L-proline(*p*-XyHyp), hydroxy-L-proline(L-Hyp), L-proline(L-pro) 등의 proline계 아미노산 유도체를 리간드로 사용한 Cu(II) 킬레이트를 이동상에 첨가하여 자유아미노산 광학이성질체의 분리정도를 비교 조사하였다. 선행 연구된 유도체화된 아미노산과 비교하여 금속킬레이트의 농도, 이동상의 유기용매 조성 및 pH에 따른 머무름 정도(k')와 분리선택성(α'), 용리순서 등을 고찰해 보고 분리 메커니즘을 규명하고자 한다.

실험

기기장치. 액체크로마토그래피로는 Varian 5000 Liquid Chromatograph를 사용하였고 시료 주입은 Rheodyne injector, 검출기는 Varian Fluorichrom을 λ_{ex} 는 340 nm, λ_{em} 는 455 nm에 맞추어 사용되었다. 분리 후 OPA 반응검출을 위해서 postcolumn reagent pump(PCR)로 Varian PCR-1B 펌프와 300 cm×0.5 mm 내경 Teflon관을 사용하였다. 역상컬럼으로는 MicroPak MCH-10(C₁₈, 300 mm×4 mm i.d., 10 μ m), MicroPak SP(C₁₈, 150 mm×4 mm i.d., 5 μ m)을 사용하였으며 Varian 4290 적분기로 봉우리를 기록하였다. 이동상의 pH는 Fisher제 pH Me-

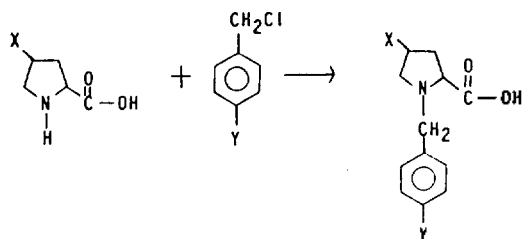


Fig. 1. Syntheses of proline derivatives. BzPro: X=H, Y=H, *p*-XyPro: X=H, Y=CH₃, *p*-XyHyp: X=OH, Y=CH₃

ter(Model 292)로 조정하였다.

시 약. 시약으로 사용한 아미노산은 D,L-threonine(Thr), D,L-methionine(Met), D,L-valine(Val), D,L-phenylalanine(Phe), D,L-leucine(Leu), D,L-arginine(Arg), D,L-lysine(Lys), D,L-aspartic acid(Asp), D,L-tyrosine(Tyr), D,L-serine(Ser), D,L-isoleucine(Ile), D,L-glutamic acid(Glu), D,L-glutamine(Gln), D,L-tryptophan(Trp), D,L-histidine(His), D,L-asparagine(Asn)이며 Sigma(Saint Louis, MO, USA)제품을 사용했다. 리간드로 사용한 L-proline과 hydroxy-L-proline은 Sigma 제품을, N-benzyl-L-proline, *p*-xylenyl-L-proline 및 *p*-xylenyl-hydroxy-L-proline은 합성하여 사용했다. 이동상으로 사용한 용매는 HPLC용 Merck 제품이다.

리간드의 합성. 합성의 원리는 친핵성 치환반응에 의한 아민의 알킬화반응으로 염기성인 물-알코올혼합용액에서 Fig. 1과 같이 합성되었다.

물 40 ml에 NaOH와 L-proline 또는 hydroxyl-L-proline을 각각 1.6 M, 0.5 M 되게 한다. 여기서 benzyl chloride 또는 *p*-bromo-xylene을 60 ml 에탄올용액에 녹여서 0.5 M 되게 한 후 혼합한다. 이것을 80~85°C에서 5~6시간 환류하면서 반응시킨다. 아세트산(CH₃COOH)으로 pH를 6.0으로 조절하고 클로로포름으로 추출한 다음 감압하에서 용매를 날려 보낸 후 얻은 결정을 소량의 에탄올에 녹여 에틸 에테르 혹은 아세톤으로 재결정하였다. 이 합성물질들의 구조는 FT-IR, FT-NMR 등으로 확인하였다.

분리 후 반응기의 검출장치. OPA 용액의 제조는 30 g H₃BO₃를 물에 녹이고, 고형 KOH를 첨가하여 pH를 10.4로 맞춘 후 5g의 EDTA를 첨가하여 완충용액 1l를 만든다. 10 ml의 methanol(MeOH)에

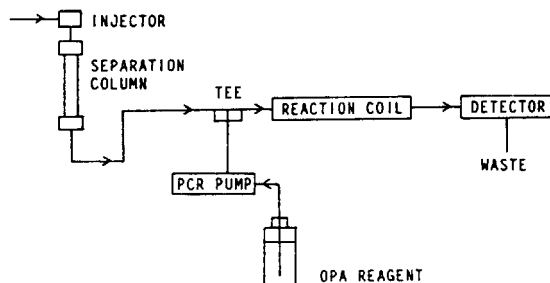


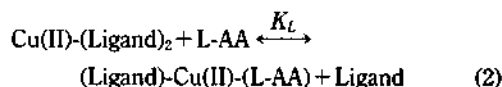
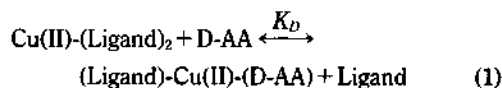
Fig. 2. OPA postcolumn detection system.

0.8 g의 *o*-phthalaldehyde(OPA)을 녹이고 0.2 ml의 2-mercaptoethanol을 첨가한 후 완충용액 1l와 합친다. 분리 후 반응기의 검출장치는 Fig. 2와 같다.

실험과정. 자유아미노산을 H₂O/MeOH(50/50, v/v) 용매에 녹여서 직접 액체크로마토그래피에 주입하였으며 이동상은 적당량의 구리(II)와 리간드를 1:2몰비로 1×10⁻² M H₃BO₃ 용액에 녹이고 pH를 조정후 정확한 양의 유기용매(acetonitrile 또는 methanol)를 첨가하여 사용했다. 이동상은 Milipore제 용매정제기(clarification kit)로 정제 및 탈기시켰으며 HPLC의 흐름속도(flow rate)는 0.9 ml/min~1.5 ml/min, PCR펌프의 흐름속도는 0.6 ml/min으로 하였다.

결과 및 고찰

본 실험에서 이동상으로 사용한 킬레이트 금속은 proline계 리간드와 일정한 착물을 형성하는 Cu(II)를 사용하였는데 그 이유는 킬레이트를 형성하여 리간드 교환반응을 하기에 적당한 배위세기를 가지며 선행연구^{22,34}에서 Cu(II)가 가장 좋은 분리선택성을 보였기 때문이다. Cu(II)는 리간드 및 아미노산과 반응하여 사각평면체의 착물을 형성하며³⁵ 킬레이트에서 시료인 아미노산 광학이성질체와 리간드 교환반응을 하는 것으로 알려져 있다.



위 식 (1)과 (2)에서 평형상수 K_D 와 K_L 은 리간드

Table 1. Capacity ratio (k') and selectivity (α) as a function of concentration of Cu(II)(L-Pro)₂ complex

Free-AA		2.5×10 ⁻³ M		5.0×10 ⁻³ M		10.0×10 ⁻³ M	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	D	0.75	1.09	0.62	1.07	0.54	1.13
	L	0.69		0.58		0.48	
Asn	D	0.84	1.05	0.69	1.05	0.57	1.08
	L	0.80		0.66		0.53	
Thr	D	0.98	1.10	0.82	1.11	0.64	1.07
	L	0.89		0.74		0.69	
Ala	D	1.11	0.98	0.88	0.97	0.70	0.97
	L	1.13		0.91		0.72	
Val	D	2.57	0.80	2.11	0.74	1.54	0.67
	L	3.21		2.86		2.31	
Tyr	D	2.75	0.98	2.68	0.94	2.11	0.89
	L	2.82		2.85		2.36	
Met	D	3.12	0.85	2.69	0.81	2.03	0.78
	L	3.68		3.31		2.62	
Leu	D	4.99	0.82	4.28	0.79	3.20	0.74
	L	6.12		5.45		4.34	
Ile	D	4.77	0.73	4.07	0.67	2.94	0.59
	L	6.56		6.09		4.97	
Phe	D	8.55	0.57	8.22	0.53	6.12	0.53
	L	14.09		15.62		11.46	

The mobile phase is 5% acetonitrile and 95% Cu(II) chelate solution. $\alpha = k'_D/k'_L$. The borate buffer concentration is $1 \times 10^{-2} M$ at pH 7.0. The LC and PCR pump flow rates are 1.0 and 0.6 ml/min, respectively.

교환반응이 일어날 때 아미노산 D형과 L형에 따른 입체선택성에 따라 달라지며 키랄분리에 영향을 미칠 것이다. 이는 선행연구에서²⁷⁻³³ 제안된 *cis-trans* 리간드 교환반응 메커니즘으로 설명하여 왔다. 따라서 광학이성질체의 분리는 생성된 삼성분착물의 양적 관계에 의존하는 열역학적인 관점과 또, 부분 입체이성질체(diastereomer)인 삼성분착물(ternary complex)과 정지상(C₁₈)과의 소수성 상호작용이 다름으로서 생기는 입체 특이성(stereospecificity)으로 설명이 가능하다. 이러한 분리에 영향을 줄 수 있는 변수는 아미노산의 구조, 첨가되는 금속 킬레이트의 종류, 이동상의 pH, 용매의 종류 및 조성, 컬럼의 온도 등이 있다.

이동상에 첨가되는 킬레이트의 농도가 증가하면 삼성분착물의 생성이 증가되므로 광학분리에도 영향을 줄 것으로 생각되어 L-proline과 L-benzylpro-

Table 2. Capacity ratio (k') and selectivity (α) as a function of concentration of Cu(II)(L-BzPro)₂ complex

Free-AA		2.5×10 ⁻³ M		5.0×10 ⁻³ M		10.0×10 ⁻³ M	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	D	0.65	0.96	0.54	0.87	0.42	0.91
	L	0.68		0.62		0.46	
Asn	D	0.55	0.76	0.47	0.77	0.38	0.87
	L	0.72		0.61		0.45	
Thr	D	0.80	0.82	0.67	0.88	0.50	0.96
	L	0.97		0.76		0.52	
Ala	D	1.06	1.29	0.88	1.22	0.60	1.13
	L	0.82		0.72		0.53	
Val	D	4.80	2.39	3.99	2.01	2.42	1.89
	L	2.39		1.99		1.31	
Tyr	D	6.80	1.53	5.64	1.49	4.43	1.46
	L	4.43		3.78		3.04	
Met	D	5.96	1.97	5.09	1.48	3.32	1.47
	L	4.06		3.43		2.26	
Leu	D	11.38	1.84	9.63	1.81	5.76	1.73
	L	6.18		5.31		3.32	
Ile	D	11.67	2.36	9.70	2.34	5.60	2.18
	L	4.95		4.17		2.57	
Phe	D	35.64	2.30	30.04	2.24	19.40	2.20
	L	15.51		13.40		8.82	

The mobile phase is 10% acetonitrile and 90% Cu(II) chelate solution. The borate buffer concentration is $1 \times 10^{-2} M$ at pH 6.0. LC and PCR pump flow rates are 1.0 and 0.6 ml/min, respectively.

line을 리간드로 사용하여 킬레이트 농도 변화에 따른 분리정도를 조사해 보았다. Table 1과 Table 2에서와 같이 킬레이트 농도가 증가함에 따라 머무름(k')은 감소하는데 이러한 현상은 유도체화된 아미노산들(DABS-AA, DNS-AA)²⁶⁻³⁰의 머무름 거동과는 반대의 결과이다. 이는 자유아미노산의 경우 생성된 삼성분착물은 Cu(II)의 이온성으로 인해 자유아미노산 보다도 정지상과의 소수성 작용이 감소하므로 킬레이트 농도의 증가에 따라 머무름값(k')의 감소현상을 보이는 반면, 유도체화된 아미노산의 경우는 부피가 큰 치환체의 영향으로 삼성분착물이 유도체화된 아미노산에 비해 오히려 더 큰 소수성 작용을 함으로써 머무름값이 점점 더 커지는 결과를 나타낸다고 생각된다. Table 1에서 L-proline(L-Pro) 리간드의 킬레이트 농도의 증가에 따라 머무름값은

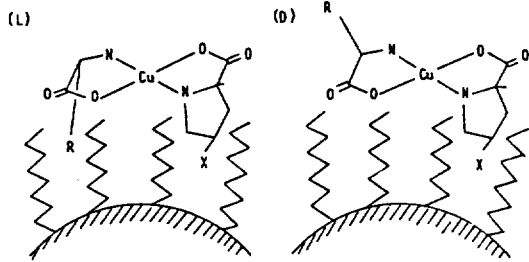


Fig. 3. Interaction of copper(II)-L-proline or copper(II)-L-hydroxyproline complex with C₁₈ column. L-Pro: X=H, L-Hyp: X=OH.

감소하고 분리선택성은 더 좋아진다. 이것은 광학이성질체의 분리가 D형과 L형의 아미노산이 리간드 교환반응을 일으키는 정도와, 생성된 삼성분착물이 정지상과 소수성 상호작용을 하는 정도에 따라 이루어지므로 착물의 농도가 증가하면 삼성분착물이 상대적으로 많이 생성되므로 분리 선택성이 향상된다. 그러나 N-benzyl-L-proline(L-BzPro) 리간드의 경우는 Table 2에서 보는 것처럼 Ala, Val, Tyr, Met, Leu, Ile, Phe 등 곁사슬(side chain)을 가진 아미노산들은 킬레이트농도가 증가하면 큰 곁사슬을 가진 것의 분리선택성(selectivity)이 감소된다. L-BzPro 리간드의 경우는 L-Pro 일 때와는 달리 리간드의 부피가 크므로 리간드 교환반응이 일어날 때 입체적인 영향을 클 것으로 생각된다. 열역학적인 입장에서는 첨가된 금속 킬레이트의 농도가 증가함에 따라 삼성분착물의 생성이 많아지므로 광학분리의 선택성이 증가해야 하지만 반면에 삼성분착물의 머무름의 감소로 인하여 분리선택성이 감소하는 것 같다. Table 1과 Table 2에서 아미노산의 D형과 L형의 용리순서는 리간드가 다르므로 완전히 반대로 나타남을 관찰했다. 이것은 proline의 N-benzyla-tion이 키랄분리의 메카니즘에 중요한 영향을 준다는 것을 의미한다. 여기서 키랄 인식에 영향을 주는 것은 K_D 와 K_L 의 차이에 따른 열역학적인 차이보다는 Fig. 3과 Fig. 4에서 보듯이 정지상(C₁₈)과 부분입체이성질체의 상호작용에 대한 입체특이성 효과가 더 우세한 것 같다. Table 1에서는 열역학적인 K_D 와 K_L 값의 차이가 이 입체특이성효과에 증가효과로 나타나, 저울상선택성(enantioselectivity)이 착물의 농도증가에 따라 증가하는 반면에 N-치환체를 가진

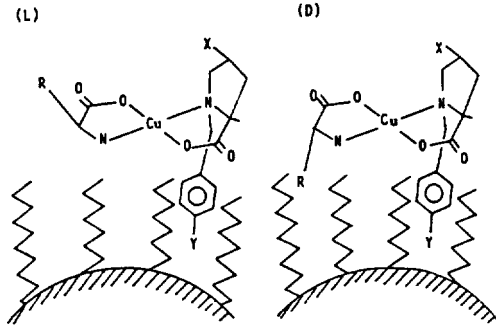


Fig. 4. Interaction of the ternary Cu(II) complex of BzPro, p-XyPro, or p-XyHyp with C₁₈ column. The abbreviations are the same as in Fig. 1.

Table 3. Capacity ratio (k') and selectivity (α) as a function of pH with copper(II)-proline chelate additive

Free-AA		pH 5.0		pH 6.0		pH 7.0	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	D	0.18	1.06	0.36	1.03	0.53	1.06
	L	0.17		0.35		0.50	
Asn	D	0.24	1.04	0.41	1.05	0.56	1.02
	L	0.23		0.39		0.55	
Thr	D	0.26	1.04	0.45	1.07	0.59	1.02
	L	0.25		0.42		0.58	
Tyr	D	0.86	0.93	1.11	0.99	1.50	0.99
	L	0.92		1.12		1.52	
Met	D	0.73	0.86	1.20	0.88	1.96	0.75
	L	0.85		1.36		2.60	
Ala	D	0.22	0.96	0.45	0.96	0.70	0.99
	L	0.23		0.47		0.71	
Val	D	0.52	0.84	0.94	0.84	1.42	0.84
	L	0.62		1.12		1.69	
Leu	D	1.10	0.89	1.76	0.85	2.66	0.86
	L	1.24		2.06		3.11	
Ile	D	1.22	0.98	1.64	0.78	2.48	0.77
	L	1.25		2.09		3.21	
Phe	D	2.52	0.73	3.20	0.69	4.40	0.66
	L	3.46		4.64		6.63	

The mobile phase is 10% acetonitrile and 90% Cu(II) chelate solution containing $5 \times 10^{-3} M$ Cu(II)-(L-proline)₂. The borate buffer concentration was $1.0 \times 10^{-2} M$. Flow rate; LC 1.0 ml/min, PCR 0.6 ml/min.

proline의 착물은 대체로 감소하는 현상을 나타낸다는 것을 짐작할 수 있다.

분리정도를 더 자세히 알아보기 위해 이동상의

Table 4. Capacity ratio (k') and selectivity (α) as a function of pH with copper(II)-(β -XyHyp)₂ additive

Free-AA		pH 4.50		pH 5.00		pH 6.00		pH 6.50		pH 7.00	
		k'	α	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Ser	D	0.81		1.05		1.52		1.58		1.68	
	L	0.87	0.93	1.12	0.94	1.77	0.86	1.81	0.87	2.03	0.83
Asn	D	0.86		1.04		1.37		1.41		1.58	
	L	0.92	0.93	1.20	0.87	1.77	0.77	1.87	0.75	2.08	0.76
Thr	D	0.92		1.20		1.57		1.58		1.68	
	L	0.95	0.97	1.28	0.94	2.03	0.77	2.15	0.73	2.42	0.69
Ala	D	0.77		1.32		2.53		2.75		3.14	
	L	0.71	1.08	1.08	1.22	2.03	1.25	2.35	1.17	2.82	1.11
Val	D	2.83		5.18		8.33		8.26		8.21	
	L	1.34	2.11	1.92	2.70	3.37	2.47	3.83	2.16	4.41	1.86
Tyr	D	3.46		6.76		8.17		7.67		7.25	
	L	1.85	1.87	3.23	2.09	4.37	1.87	4.43	1.73	4.55	1.59
Met	D	2.89		6.11		10.48		10.46		10.63	
	L	1.93	1.50	3.60	1.70	5.85	1.79	5.95	1.76	6.30	1.69
Leu	D	4.33		9.77		16.98		18.06		17.94	
	L	2.15	2.01	4.10	2.38	7.95	2.14	8.15	2.22	9.19	1.95
Ile	D	4.59		10.29		16.98		16.45		15.64	
	L	1.74	2.64	2.77	3.71	5.28	3.22	6.07	2.71	7.04	2.22

10% acetonitrile and 90% Cu(II) chelate solution containing $1.25 \times 10^{-3} M$ Cu(II)-(β -XyHyp)₂. The borate buffer concentration was $1.0 \times 10^{-2} M$. Flow rate; HPLC 1.5 ml/min, PCR 0.6 ml/min.

pH에 따른 용리거동을 조사하여 보았다. Table 3과 Table 4에 의하면 pH가 증가함에 따라 머무름이 증가하는 결과를 보이는데 이는 선행연구들에서²⁷⁻³³ 유도체화된 아미노산(DNS-AA, DABS-AA)은 pH가 증가하면 머무름이 감소하거나 최대값을 갖는³³ 것과는 다른 현상을 나타낸다. 이러한 현상은 pH가 증가하면 아미노산의 카르복시산의 산해리도가 증가하며 이때 상대적으로 리간드 교환반응이 어려워져서 이성분착물의 안정성이 증가하며 삼성분착물의 생성이 어려워지는 것 같다. 그 결과 자유아미노산의 경우는 pH의 증가에 따라 머무름이 증가하고 유도체화된 아미노산은 머무름이 감소한다고 생각된다. L-Pro 리간드의 경우 Phe, Leu, Ile 등의 bulky한 결사슬을 가진 아미노산들은 pH의 증가에 따라 분리선택성이 약간 향상되지만 다른 아미노산들은 pH에 크게 영향이 없었다. L-BzPro과 β -XyHyp 리간드는 pH 5~6에서 분리선택성이 가장 좋았다. 이는 pH 6 이상에서는 삼성분착물의 생성이 감소하여 삼성분착물과 정지상과의 입체선택적인 수소성 상호작용이 약화되므로 분리선택성의 감소현상이 나타난다고

Table 5. Capacity ratio (k') and selectivity (α) as a function of acetonitrile concentration

Free-AA		5% ACN		10% ACN		15% ACN	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	D	2.31		1.55		1.14	
	L	2.36	0.98	1.77	0.88	1.26	0.90
Asn	D	2.20		1.40		1.10	
	L	2.60	0.85	1.84	0.76	1.31	0.84
Thr	D	2.63		1.59		1.18	
	L	3.00	0.88	2.08	0.76	1.46	0.81
Tyr	D	24.52		9.06		3.44	
	L	8.77	2.80	4.78	1.90	2.37	1.45
Met	D	19.99		11.63		4.95	
	L	10.94	10.94	6.28	6.28	3.23	3.23
Val	D	15.57		9.12		4.30	
	L	5.01	3.11	3.49	2.61	2.26	1.90
Leu	D	35.63		20.21		8.16	
	L	12.68	2.81	8.34	2.42	4.32	1.89
Ile	D	35.77		18.74		7.96	
	L	9.14	3.91	5.38	3.48	3.23	2.46
Phe	D	-		56.39		18.79	
	L	23.38	-	12.66	4.45	5.95	3.16

The added chelate solution contains $1.25 \times 10^{-3} M$ Cu(II)-(β -XyHyp)₂. The borate buffer concentration is $1.0 \times 10^{-2} M$ at pH 6.0. Flow rate; HPLC 1.5 ml/min, PCR 0.6 ml/min.

Table 6. Capacity ratio (k') and selectivity (α) as a function of ligand

Free-AA		L-Pro		L-Hyp		BzPro		p-XyPro		p-XyHyp ^a	
		k'	α	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Ala	D	0.52	1.02	0.65	1.05	1.45	1.27	1.71	1.27	1.65	1.49
	L	0.61		0.62		1.14		1.35		1.11	
Val	D	1.20	0.79	1.42	1.22	3.86	1.41	4.56	1.79	4.97	2.63
	L	1.52		1.16		2.73		2.55		1.89	
Leu	D	2.34	0.87	2.68	1.23	10.72	1.95	9.21	2.09	11.92	2.52
	L	2.70		2.18		5.49		4.40		4.73	
Ile	D	2.22	0.79	—	—	9.94	2.15	7.82	2.23	9.47	2.77
	L	2.82		3.85		4.63		3.50		3.42	
Tyr	D	1.51	0.93	1.71	1.40	8.11	2.18	5.29	1.48	5.00	1.88
	L	1.63		1.22		3.72		3.57		2.66	
Phe	D	4.51	0.64	4.84	1.23	29.47	2.37	26.46	2.81	32.60	4.48
	L	7.03		3.95		12.41		9.43		7.20	
Ser	D	0.48	0.92	0.42	0.98	0.92	0.96	1.05	0.96	0.72	0.90
	L	0.52		0.43		0.96		1.09		0.80	
Thr	D	0.61	1.11	0.57	1.21	1.04	0.77	1.10	0.90	0.78	0.77
	L	0.54		0.47		1.35		1.22		1.01	
Met	D	1.49	0.84	1.60	1.10	6.25	1.50	5.25	1.48	5.92	1.84
	L	1.77		1.46		4.18		3.54		3.21	
Arg	D	7.01	1.18	7.10	1.20	6.10	1.07	6.45	1.08	5.25	0.83
	L	5.93		5.90		5.69		5.96		6.29	
His	D	0.99	1.02	0.75	0.99	3.11	0.97	4.46	1.27	5.97	2.06
	L	0.97		0.76		3.21		3.50		2.90	
Asn	D	0.53	1.04	0.50	1.02	1.03	0.86	0.96	0.83	0.65	0.73
	L	0.51		0.49		1.20		1.16		0.98	

The solutions contain 5% acetonitrile and 95% $2.5 \times 10^{-3} M$ Cu(II)-(Ligand). The borate buffer concentration is $1.0 \times 10^{-2} M$ at pH 6.2. Flow rate; HPLC 1.2 ml/min, ^a1.5 ml/min. PCR 0.6 ml/min.

생각된다. 여기서도 첨가되는 착물의 리간드인 proline의 구조가 N-벤질화나 N-크실렌화가 되면 용리 순서가 바뀌는 현상이 나타났다.

이동상의 유기용매 조성이 증가하면 이동상의 소수성이 증가하여 아미노산과 이동상과의 소수성 상호작용으로 인해 머무름(k')이 감소하고 따라서 분리선택성(α)도 감소할 것으로 예상할 수 있으며 Table 5에서 이와 일치하는 결과를 얻었다. 반면에 Ser, Asn 및 Thr과 같이 결사슬이 작든지 친수성을 띤 아미노산은 유기용매의 조성에 큰 영향이 없었다. 그리고 같은 조성의 MeOH와 ACN을 각각 이동상으로 사용했을 때 MeOH의 경우가 머무름이 더 크게 나타난 결과에 의해 ACN이 더 강한용매(strong solvent)라는 것을 알 수 있었고 MeOH을 이용한 경우도 머무름과 거울상선택성은 같은 경향을

나타냈다. 이는 선행연구의 유도체화된 아미노산에서도 같은 결과를 보였다²⁹⁻³¹.

리간드 교환반응과 정지상과의 소수성 작용이 분리에 중요한 원인이 되므로 이동상에 첨가된 킬레이트의 리간드의 종류에 따라 용리거동에 큰 차이가 있을 것으로 생각하고 L-Pro, L-Hyp, BzPro, p-Xy-Pro, p-XyHyp 리간드를 사용하여 같은 조건하에서 실험을 하고 머무름과 거울상이성질체의 분리 선택성을 비교해 보았다(Fig. 6을 보라). L-Pro를 리간드로 사용한 경우는 D형과 L형의 용리순서가 다른 리간드와는 달리 대부분이 반대로 나타났다. Fig. 3에서 보듯이 L형의 삼성분착물에서 proline의 오각링과 알킬사슬이 같은 방향에 있으므로 L형의 소수성 상호작용이 커져 늦게 용리되며 Thr, Asn, His, Arg 등과 같이 친수성기를 가진 아미노산들은 친

Table 7. Capacity ratio (k') and selectivity (α) for amino acids

Free-A	Structural formula	k'_D	k'_L	α
Alanine	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	2.10	1.41	1.49
Valine	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	10.22	2.77	3.69
Leucine	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	22.64	7.04	3.22
Isoleucine	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	21.95	4.15	5.28
Serine	$\text{HOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	1.58	1.41	1.12
Threonine	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	1.91	1.87	1.49
Methionine	$\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	13.55	6.93	1.96
Aspartic acid	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	1.69	1.50	1.13
Glutamic acid	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	3.27	1.72	1.90
Asparagine	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	1.51	1.70	0.89
Glutamine	$\text{H}_2\text{NCO}(\text{CH}_2)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	2.68	2.06	1.30
Arginine	$\text{H}_2\text{NC}(\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	4.06	3.15	1.29
Lysine	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	2.17	2.01	1.08
Phenylalanine	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	88.94	12.54	7.09
Tyrosine	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	19.65	5.16	3.81

10% Methanol and 90% $1.25 \times 10^{-3} M$ $\text{Cu}(\text{II})-(p\text{-XyHyp})_2$. The borate buffer concentration was $1 \times 10^{-2} M$ at pH 5.0. The Flow rate; LC: 1.5 ml/min, PCR: 0.6 ml/min.

수정기가 proline의 오각링과 같은 방향에 있으므로 L형이 빨리 용리된다는 것을 알 수 있다. L-Hyp 리간드에서는 proline의 오각링에 hydroxy기가 붙어 있으므로 L형의 삼성분착물에서 아미노산의 알킬사슬의 소수성을 감소시키므로 D형보다 빨리 용리된다. 그러나 다른 리간드의 경우 Fig. 4에서 볼 수 있듯이 proline의 오각링보다 리간드에 붙어있는 benzyl기 또는 xylenyl기의 소수성이 훨씬 크므로 알킬사슬이 이 작용기들과 같은 쪽에 있는 D형의 삼성분착물이 소수성 상호작용을 강하게 할 수 있으므로 D형이 늦게 용리된다. 이들 리간드에서도 친수성기를 가진 아미노산들은 친수성기의 영향으로 반대의 용리순서로 나타났다. BzPro, *p*-XyPro, *p*-XyHyp 순서로 분리선택성이 크게 증가됨을 알 수 있는데 이는 질소 위치에 치환된 치환기의 입체효과가 광학분리에 크게 영향을 미침을 알 수 있다.

Table 7에서는 최적 분리조건하에서 여러 아미노산들의 분리정도를 조사했다. 결사슬이 큰 Val, Leu, Ile, Tyr, Phe 등은 α 값이 3에서 7정도로 매우 좋은 분리선택성을 보였지만 Ser, Thr, Asn, Gln, Lys, Asp 등과 같이 결사슬이 작거나 친수성기를 가진 아미노산들은 광학 분리의 선택성이 그다지 좋지 않았다. 그리고 대체적으로 자유아미노산이 유도체

화된 아미노산에 비해 머무름값이 작고 광학분리의 선택성도 훨씬 좋음을 알 수 있었다.

결 론

RP-HPLC를 이용하여 아미노산의 광학이성질체를 proline유도체의 구리(II) 착물을 이용한 키랄 이동상 첨가법으로 분리하였으며 머무름정도는 이동상의 조건과 리간드의 종류 및 아미노산의 구조에 따라 크게 달라졌다. 유도체화된 아미노산은 킬레이트의 농도증가에 따라 머무름이 증가하였으나 본 연구의 자유아미노산은 머무름이 감소하였는데 이것은 생성된 삼성분착물의 소수성이 크게 다르기 때문인 것 같다. 유도체화된 아미노산으로 형성된 삼성분착물의 소수성 상호작용이 착물에 관여 안한 유도체화된 아미노산보다 크지만 자유아미노산의 경우에는 삼성분착물에서 구리이온의 영향이 비교적 크므로 자유아미노산이 삼성분착물보다 정지상과 소수성 상호작용을 더 강하게 하기 때문으로 생각된다. 자유아미노산은 유도체화된 아미노산보다 용리시간이 훨씬 짧았으며 결사슬의 입체효과가 크므로 더 큰 분리선택성을 보였다.

그리고 pH가 증가함에 따라 유도체화된 아미노

산은 머무름이 감소하지만 자유아미노산은 머무름이 증가하였다. 이러한 현상은 pH가 증가함에 따라 상성분착물의 생성이 상대적으로 작아져서 자유아미노산의 머무름이 삼성분착물보다 커지므로 머무름이 증가된 것으로 생각된다. 이동상에 첨가된 유기용매의 종류에 따라 용리저동이 달라지는데 acetonitrile의 경우 10% 정도 첨가되었을 때 분리선택성이 가장 좋았다. 그리고 이러한 아미노산의 광학이성질체의 용리저동은 입체선택적인 리간드 교환반응으로 설명이 가능했으며 생성된 부분입체이성질체(diastereomer)의 정지상과 소수성 상호작용이 우세한 분리메카니즘인 것을 알았다.

분리된 아미노산의 검출은 postcolumn 반응기를 이용하여 형광검출기로 했으며 정량적인 분석이 가능했다. 대체적으로 아미노산의 유도체(dansyl이나 dabsyl 유도체)들보다 광학분리가 더 좋았으며 컬레이트로 이용되는 리간드인 proline 유도체들도 입체적 효과가 큰 L-proline, N-benzyl-L-proline 및 N-xilylenyl-L-proline의 순서로 광학분리가 잘 되었다.

본 연구는 1991년 교육부 기초과학 육성연구비의 지원과 과학재단의 연구비 지원으로 수행된 바, 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. B. Grego and M. T. Hearn, *J. Chromatogr.*, **255**, 67 (1983).
2. J. L. Nevmeyer and L. R. Gelber, *J. Chromatogr.*, **257**, 317 (1983).
3. N. B. Levine and V. Nazimov, *J. Chromatogr.*, **286**, 207 (1984).
4. S. M. Birubbaum and J. P. Greenstein, *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 108 (1952).
5. R. Charlex, V. Beittler, B. Feibush, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **112**, 121 (1975).
6. S. Weinstein, B. Feibush, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **126**, 97 (1976).
7. V. A. Davankov and S. V. Roghozhin, *J. Chromatogr.*, **61**, 280 (1971).
8. V. A. Davankov and A. V. Semechkin, *J. Chromatogr.*, **141**, 313 (1977).
9. S. Hare and A. Dobashi, *J. Chromatogr.*, **186**, 543 (1979).
10. K. Sugden, C. Hunter, and G. Lloyd-Jones, *J. Chromatogr.*, **192**, 228 (1980).
11. J. Boue, R. Audebert and Quivoron, *J. Chromatogr.*, **204**, 185 (1982).
12. N. Watanabe, H. Ohzeki and E. Niki, *J. Chromatogr.*, **216**, 406 (1981).
13. V. A. Davankov, A. S. Bochkov and Y. P. Belov, *J. Chromatogr.*, **218**, 547 (1981).
14. J. N. Lepage, W. Lindner, G. Davies, D. E. Seitz, and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **51**, 433 (1979).
15. W. Lindner, J. N. Lepage, G. Davies, D. E. Seitz, and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, **185**, 323 (1979).
16. P. E. Hare and E. Gil-Av, *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 5115 (1980).
17. P. E. Hare and E. Gil-Av, *Science*, **204**, 1226 (1979).
18. C. Gilon, R. Leshem, and E. Grushka, *Anal. Chem.*, **52**, 1206 (1980).
19. E. Grushka, R. Leshem, and C. Gilon, *J. Chromatogr.*, **255**, 41 (1983).
20. C. Gilon, R. Leshem, Y. Tapuhi, and E. Grushka, *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 7612 (1979).
21. S. Lam, F. Chow, and A. Karmen, *J. Chromatogr.*, **199**, 295 (1980).
22. R. Schuster, *Anal. Chem.*, **52**, 617 (1980).
23. A. K. Rappe and W. A. Goodard III, *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 5115 (1980).
24. R. L. Cunico and T. Schlabach, *J. Chromatogr.*, **266**, 461 (1983).
25. M. K. Radjai and R. T. Hatch, *J. Chromatogr.*, **196**, 319 (1980).
26. M. Roth, *Anal. Chem.*, **277**, 222 (1971).
27. S. H. Lee, T. S. Oh, and K. S. Park, *J. Korean Chem. Soc.*, **30**(2), 216 (1986).
28. S. H. Lee, K. S. Park, and J. W. Ryu, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **7**, 1 (1986).
29. S. H. Lee, T. S. Oh, B. E. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **9**(6), 341 (1988).
30. S. H. Lee, T. S. Oh, Y. C. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **11**(5), 411 (1990).
31. S. H. Lee, T. S. Oh, S. H. Bak, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **10**(6), 491 (1989).

32. J. S. Kim, Mater's Thesis, Kyungpook Nat. Univ., (1988).
33. Y. M. Lee, Mater's Thesis, Kyungpook Nat. Univ., (1990).
34. V. A. Davankov, J. D. Navratil, H. F. Walton, "Li-gand Exchange Chromatography", 7, CRC Press, Inc., (1988).
35. M. Itabashi and K. Itoh, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 3131 (1980).