

단 신

센 산성 이동상을 이용한 자유 아미노산의 역상 액체크로마토그래피 분리

金仁煥* · 張明德[†] · 朴正學^{††}

대구대학교 화학교육과

[†]안동정보대학 환경공업과

^{††}영남대학교 화학과

(1998. 9. 3 접수)

Separation of Free Amino Acids by Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Strongly Acidic Mobile Phases

In-Whan Kim*, Myung Duk Jang[†], and Jung Hag Park^{††}

Department of Chemistry Education, Taegu University, Kyongsan 712-714, Korea

[†]Department of Environmental Engineering, Andong Info Tech, Andong 760-830, Korea

^{††}Department of Chemistry, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

(Received September 3, 1998)

폴리펩티드나 단백질의 아미노산 조성에 대한 정보는 폴리펩티드나 단백질을 확인하고 그 성질을 이해하고 순도와 농도를 알아내는데 있어서 아주 중요하다. 자유 아미노산은 Moore와 Stein이 이온교환 크로마토그래피로 처음 분리한 후,¹ 컬럼후 유도체화 반응을 사용하는 자동아미노산 분석기가 개발되어 최근까지 널리 사용되고 있다.² 그러나 결합형 정지상이 보급된 이후로는³ 이들 정지상을 사용하여 역상, 이온쌍, 리간드 교환 크로마토그래피 방식으로 자유 아미노산을 분리하는 방법이 광범위하게 사용되고 있다.⁴ 비극성 정지상을 사용한 역상 액체크로마토그래피는 다른 방식의 크로마토그래피에 비해 간편하고 재현성 있는 결과를 얻을 수 있다. Molnar 등은 옥타데실 실리카 정지상에서 pH 0.2 및 2.1의 완충 수용액을 이동상으로 사용하여 등용매 용리 방식으로 여러 가지 자유 아미노산을 분리하였는데,⁵ 아미노산의 카르복시 기의 산해리상수 값은 대부분 2와 3사이에 있으므로(Table 1) 이 pH의 완충용액 속에서 카르복시 기는 거의 해리하지 않게 되므로 머무름이 크게 증가하여 분리 선택성이 크게 향상되었으며 낮은 pH에서 머무름이 더 크게 나타났다. 이는 pH를 조절하면 아미노산의 머무름을 조절할 수

있으며 센 산성 pH영역에서 pH기울기 용리를 사용하면 분리가 어려운 유사한 극성의 자유 아미노산을 더 잘 분리하는데 활용할 수 있음을 보여주는 것이나, 이렇게 낮은 pH에서는 가수분해에 의해 정지상의 바탕 물질인 실리카의 용해도가 커져 정지상의 수명이 크게 단축되는 문제점이 있어 전혀 활용되지 못하였다. 그러나 단위체형 알킬 결합 실리카보다는 pH안정성이 높은 중합체형 알킬 결합 실리카나 폴리(스타이렌-디미닐벤젠) 또는 플루오르중합체 같은 완전 중합체 정지상 또는 바탕 실리카를 입체적으로 보호할 수 있는 겔사슬을 가진 안정한 알킬 결합 실리카 정지상을 사용하면⁶ 센 산성 pH(<2)와 센 염기성(>12)에서도 정지상의 손실에 따른 분리능의 손실이 거의 없이 알킬 결합 실리카 정지상을 사용할 수 있다. 본 연구에서는 센 산성 영역 pH기울기 용리에 의한 아미노산의 분리 가능성 조사를 위한 자료를 얻기 위하여 pH변화가 아미노산의 머무름에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다.

실 험

본 실험에 사용한 아미노산(glutamine, methionine,

Table 1. Properties of amino acids

Name	pK ₁ ^a	pK ₂ ^b	pI ^c	Σf ^d
Glutamine(Gln)	2.17	9.13	5.65	-0.07
Methionine(Met)	2.28	9.25	5.75	1.08
Leucine(Leu)	2.36	9.60	5.98	1.99
Tyrosine(Tyr)	2.20	9.11	5.65	1.70
Phenylalanine(Phe)	1.83	9.13	5.98	2.24
Tryptophan(Trp)	2.38	9.39	5.88	2.31

^a 1st ionization constant.^b 2nd ionization constant.^c Isoelectric point.^d Relative hydrophobicity values for the side chains according to Rekker.⁷

leucine, tyrosine, phenylalanine 및 tryptophan), 과염소산, 황산 및 아세트산은 Aldrich제(Milwaukee, USA) 최고 순도 시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 머무름 측정에 사용한 액체크로마토그래프는 SPD-10A UV검출기(파장 210 nm), LC-10AD 펌프 및 20-μL 시료루우프를 갖춘 Rheodyne주입기로 구성된 Shimadzu 모델 LC-10AD를 사용하였으며 C-R 6A 적분기록계로 머무름시간을 기록하였다. 칼럼은 Zorbax-Rx C18(5 μm, 25 cm×4.6 mm)(Mac-Mod Analytical, Chadds Ford, PA, USA)을 사용하였고, 이동상은 HPLC급 메탄올과 물을 3:97(v/v)로 혼합하고 Table 2에 수록한대로 센 산을 첨가하여 사용하였으며, 흐름속도는 1.0 mL/min으로 하였고 D₂O를 주입하여 컬럼 불감시간을 측정하였다. 측정할 여섯

가지 아미노산의 머무름인자(*k'*)를 Table 2에 수록하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 세가지 다른 산을 포함하는 이동상을 사용하여 측정된 아미노산의 머무름 인자(*k'*)를 pH에 대하여 도시한 것이다. 과염소산을 첨가한 이동상의 경우를 보면 pH가 대략 3에서 2로 변할 때 Gln을 제외한 나머지 아미노산의 머무름인자가 증가하는 것을 볼 수 있다. 또한 pH에 따라 머무름이 증가하는 정도는 아미노산 잔기의 소수성이 클수록 더 커진다 (Table 1). 황산을 첨가한 이동상에서도 산 첨가량을 증가시켜 pH를 낮게 할수록 머무름인자가 증가하지만 그 정도는 과염소산을 첨가한 경우보다는 약간 작다. 약한 산인 아세트산을 첨가한 경우는 pH를 크게 낮추지 않으므로 머무름 증가 효과가 크지 않다. 이는 센 산을 첨가하여 pH가 낮아질수록 이동상의 극성이 증가하고 이로 인한 이동상 내에서의 아미노산의 소수성 증가가 비극성 정지상으로서의 본배를 증가시켜 머무름이 커짐을 보여주는 것이다.

이동상의 pH가 낮아질수록 인접하여 용리되는 아미노산 사이의 분리도가 크게 증가한다(Fig. 1) 이는 pH기울기 용리를 하면 머무름 시간을 단축시키면서 선택성 높게 아미노산을 분리할 수 있음을 가리키는 것이다. 서론에서 언급한 바와 같이, pH 안정성이 높

Table 2. Retention factors of amino acids in aqueous methanol mobile phases containing varying amount of different acids

Acid	M(x10 ⁻³)	PH	Retention factor(<i>k'</i>)					
			Gln	Met	Leu	Tyr	Phe	Trp
	0.0	6.65	0.30	1.26	1.73	2.14	5.98	15.30
HClO ₄	1.0	3.00	0.32	1.36	2.09	2.40	6.21	18.12
	3.0	2.52	0.33	1.37	3.17	3.89	8.62	29.51
	5.0	2.30	0.33	1.51	3.72	4.62	9.94	33.24
	7.0	2.15	0.38	1.64	4.15	5.30	10.99	37.18
H ₂ SO ₄	1.0	2.72	0.32	1.23	2.23	2.84	6.76	21.51
	3.0	2.22	0.36	1.27	2.62	3.67	7.68	23.99
	5.0	2.00	0.39	1.28	2.90	4.15	8.30	25.82
	7.0	1.85	0.44	1.29	3.16	4.58	8.94	27.63
CH ₃ CO ₂ H	1.0	3.90	0.44	1.08	1.76	2.88	7.70	18.77
	3.0	3.64	0.42	1.08	1.77	2.72	7.58	19.29
	5.0	3.53	0.41	1.07	1.78	2.64	8.23	19.38
	7.0	3.46	0.41	1.07	1.79	2.62	8.75	19.53

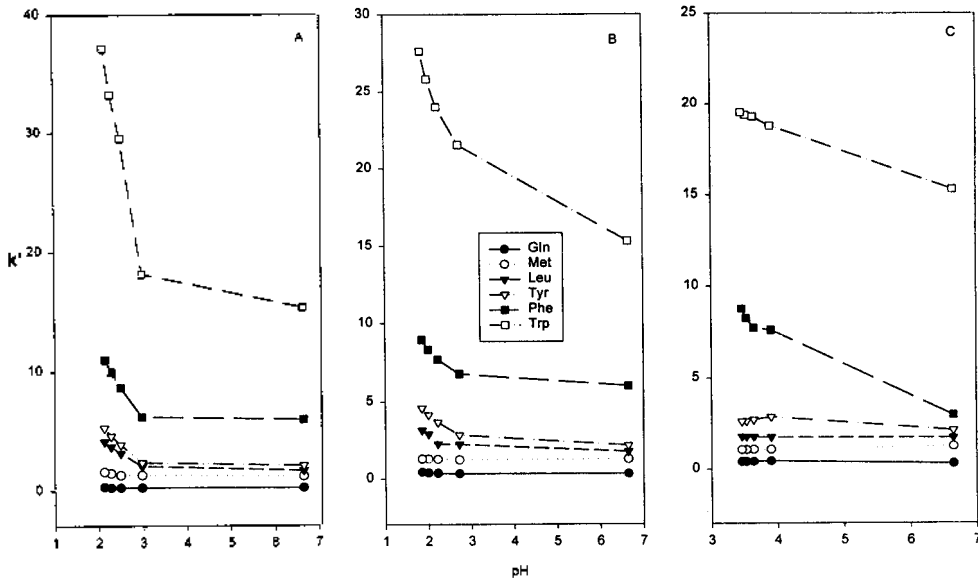


Fig. 1. Plot of retention factors for amino acids vs. pH of mobile phases. The pH value was adjusted by adding appropriate amounts of (A) perchloric acid, (B) sulfuric acid and (C) acetic acid to the mobile phase.

은 중합체형 알킬 결합 실리카나 폴리(스타이렌-디비닐벤젠) 또는 플루오르중합체 같은 완전 중합체 정지상 또는 바탕 실리카를 입체적으로 보호할 수 있는 결사슬을 가진 안정한 알킬 결합 실리카 정지상을 사용하면 센 산성 pH에서도 정지상의 손실에 따른 분리능의 손실 없이 선택성 높게 아미노산을 분리할 수 있을 것이다.

역상 액체크로마토그래피에서 아미노산의 유도체를 만들어 분리하는 이유 중의 하나가, 순수한 물 또는 물 함량이 높은 유기 이동상을 사용하는 역상 LC분리에서 자유 아미노산은 머무름이 너무 작기 때문에, 유도체로 만들어 감도를 향상시키면서 소수성을 증가시켜 머무름을 크게 하여 효율 높은 분리를 얻는 것이라는 점을 생각할 때, 안정한 알킬 결합 정지상 또는 중합체 정지상과 함께 센 산성 이동상을 사용하는 것은, 유도체를 만드는 번거로움을 줄이면서 아미노산 혼합물을 신속하고 선택성 높게 분리할 수 있게 해준다는 점에서 활용할 가치가 있다

고 생각된다.

본 연구는 1998년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

인 용 문 헌

1. Moore, S.; Stein, W. H. *J. Biol. Chem.* **1951**, *192*, 663.
2. Spackman, D. H.; Moore, S.; Stein, W. H. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 1190.
3. Molnar, I.; Horvath, C. *Clin. Chem.* **1976**, *22*, 1497.
4. Henschen, A.; Hupe, K.-P.; Lottspeich, F.; Voelter, W. *High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry*; VCH: Weinheim, 1985.
5. Molnar, I.; Horvath, C. *J. Chromatogr.* **1977**, *142*, 623.
6. Glajch, J. L.; Kirkland, J. J. *J. LC · GC* **1990**, *8*, 140.
7. Rekker, R. F. *The Hydrophobic Fragmental Constant*; Elsevier: Amsterdam, 1977; p 301.