

## 아미노산의 광학이성화 및 GC, GC/MS, HPLC에 의한 광학이성질체의 분리에 관한 연구

이재성<sup>†</sup> · 홍종기<sup>‡</sup> · 어연우 · 김택재\*

한국과학기술연구원 특성분석센터

\* 대덕 표준과학연구원 기초과학지원센터

\* 경기대학교 화학과

(1994. 1. 21. 접수)

### A Study on the Racemization of Amino acids and its Separation with GC, GC/MS and HPLC

Jae-Seong Rhee<sup>†</sup>, Jong-Ki Hong<sup>‡</sup>, Yun-Woo Eo, Taek-Jae Kim\*

Advanced Analysis Center, Korea Institute of Science and Technology

#Basic Science Supporting Center, Korea Research Institute of Standards and Science

\*Department of Chemistry, Kyung Ki University

(Received Jan. 21, 1994)

---

**요약 :** 아미노산 중 alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine을 대상으로 열처리, 산처리, UV 광선 조사, 효소(trypsin)의 영향을 살펴보고 6N-HCl, 105°C로 가열했을 때 이성화하는 정도를 측정하였다. 또한 Mass Spectrometer를 이용할 때 각 아미노산의 fragment되는 과정을 조사하여 GC에서 서로 겹칠 때 분석하는 법을 개발하였다. HPLC에서 cyclodextrin bonded phase를 이용해서 dansyl amino acid의 분리를 시도하였다.

**Abstract :** The importance of separation comes from demands on study for exact effect of synthetic drugs and the reactivity of enantiomer in biological system. Racemization rate was measured under the influence of heat, acid, UV-light, enzyme(trypsin) and 6N-HCl at 105°C on alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine.

The method for the identification of overlapped amino acids with GC was developed from the close study of fragmentation pattern with mass spectrometry. With cyclodextrin bonded phase by HPLC, the separation of dansyl amino acid was tested for comparison.

**Key words :** Amino acids, enantiomer, Mass spectrometry, HPLC, cyclodextrin.

---

#### 1. 서 론

Enantiomer는 물리적 · 화학적 성질이 동일하여 구

별하기 어렵고, 다만 다른 광학이성질체와의 구조적 상호작용과 편광의 회전각도가 다르게 된다. 아울러 효소의 작용이나 kinetic 연구, X-ray crystallogra-

phy에 대한 연구에서도 입체적인 배치상태에 따라 서로 다른 역할을 합이 밝혀졌다. 1980년에 출간한 미국 의약대사전을 보면 거울상 이성질체는 합성의약품 중 약 85%가 racemate로 판매되고 있으나 대부분 거울상 이성질체 의약품 중 오직 한쪽만이 의약적 효능이 있다고 보고되었다. 부작용을 유발하는 한쪽 광학이성질체를 분리 후 제거할 수 있는 기술을 축적함으로써 제약산업에도 보탬이 되도록 하는 것이 본 연구의 목표이다.

광학이성질체를 분리하는 데 있어서 최초로 공헌한 사람은 1948년 파스퇴르로서, (+), (-)-tartaric acid의 결정을 현미경과 펀셋을 이용해 분리하였다. 이것은 역사적 입장에서는 중요한 mechanical separation이지만 응용면에서는 대단히 한정되어 있다. 광학이성질체를 분리할 수 있는 기기로 대변한다면 GC와 LC가 있고, chiral compound의 위상에서 보면 이성질체를 고정상에 immobilize시켜서 이용하는 방법으로 대변할 수 있다. 서로 작용하는 분리 메카니즘별로 살펴보면 3차원적 착화합물을 이용한 분리법, inclusion complex를 이용한 분리방법, 또 Hydrophobic interaction과 Hydrogen bonding 등 molecular interaction에 의한 분리방법으로 나뉘어질 수 있다.

GC의 아미노산 분석법은 polar한 아민기와 초산기를 masking하기 위해서 acylation과 esterification을 한 다음 capillary column을 사용하여 분리할 수 있다.

LC에 의한 방법은 GC에 의한 방법보다 resolution 면이나 경제적 취약성에도 불구하고 70~80% 유기 racemate를 분리하는 데 사용될 수 있다. Three point interaction을 기조로 한 Pirkle<sup>1</sup> type 정지상은 reverse phase에 불안정한 단점을 지닌다. Cyclodextrin을 정지상에 고정시키는 법도 최근에 도입하였는데<sup>2~4</sup>, 내포착물을 형성함으로써 Guest-Host 분자의 상호작용으로 정지상이 안정하면서 분리능이 우수한 반면 적용 범위가 Pirkle type보다 광범위하지 못한 단점이 있다. 다른 정지상으로 단백질<sup>5</sup>이라든지 triacetyl cellulose<sup>6</sup>, Riboflavin 등도 사용하고 있다. SFC<sup>7, 8</sup>도 이용되는 경우가 있고 Mass도 동원이 되고 있다.<sup>9, 10</sup>

본 실험에서는 이성질체의 상호변환 조건과 GLC에서 서로 겹치는 아미노산의 측정을 위하여 Mass spectrometry를 도입하였고 이성질체를 HPLC로 분리하기 위하여 bonded  $\beta$ -cyclodextrin의 효용성을 알아보-

았다.

## 2. 실험

### 2. 1. 표준물질 및 시약

표준 아미노산은 Sigma Chem. Co.제로, 약 5.0~10.0mg을 정확히 취한 다음 0.1N-HCl에 녹여 volumetric flask에 옮겨 100mL 되게 채운다. 이 용액을 5.0mL 사용하였으며 Dansyl amino acid도 동일한 방법으로 묶여 사용하였다.  $\alpha$ ,  $\beta$ -cyclodextrin은 ASTEC (Whippany, USA) 제품을 사용하였고 bonded phase인 column도 ASTEC 제품으로 5 $\mu$ m, 25cm  $\times$  4.6mm 세원을 사용하였다. Methanol과 99.9% 초산은 HPLC 용으로서 J. T. Baker 제품을, aniline은 독일의 Merck 사, benzaldehyde는 일본의 Kataya Chemical Co.의 1급 시약을 사용하였다.

### 2. 2. 분석기기 및 장치

GLC는 Varian Vista 6000(USA), 검출기는 flame ionization detector(FID)를 이용하였고 amino acid의 광학이성질체를 분리하기 위하여 GC column은 길이 20m, 내경 0.53mm chirasil-val(Alltech associate inc., USA) column을 사용하였다.

GC/MS용으로 사용한 GC는 Hewlett Packard 5890A로 direct interface에 quadrupole type의 analyzer를 사용하였다. HPLC에 사용한 LC는 varian vista 5500형을 사용하였고, ASTEC  $\alpha$ ,  $\beta$ -cyclodextrin column과 Waters의 C<sub>18</sub> bondapak column을 사용하여 이성질체를 분리하려 하였다.

GLC에서 carrier gas(He)는 분당 3mL/min, make-up gas(He)는 분당 30mL씩 흘렸고 fuel gas로 수소 30mL/min, 공기 300mL/min으로 조절하여 사용하였다. oven 온도는 70°C에서 4분 유지하고 210°C 까지 분당 3°C씩 승온하여 25분간 유지시켰다.

GC/MS에서는 carrier gas(He)를 분당 0.89mL/min로 고정한 다음 10:1로 split시켜 Mass에 도달하도록 하였고, 기타 조건은 앞의 GC 조건과 같다. 시료 주입기의 온도는 230°C, interface의 온도는 225°C, ion source의 온도는 200°C로 하였다.

LC는 Varian Vista 5500이나 Waters 제품 HPLC를 사용하였으며, 감지기로서 variable wavelength형

의 UV / VIS를 229~280nm에서 측정하였다. 이동상은 isocratic mode로 0.5~1.0mL/min로 흘려 분석하였다.

### 2. 3. 실험방법

#### 2. 3. 1. 아미노산의 이성화 실험 및 유도체화 과정

*l*-form 아미노산 5~10mg을 달아 0.1N-HCl 용액 100mL에 녹여 stock solution을 만든 다음 5.0mL씩 취하여 여러 조건하에서 racemization되는 정도를 실험하였다. 열처리에 의한 효과는 5mL씩 2개의 시험관에 넣고 1, 2일 105°C에서 실험하였고, 6N-HCl 용액은 stock solution 5mL에 c-HCl 5mL를 서로 섞어 조제하였다. UV에 대한 영향은 stock 용액을 1, 2일 상온에서 UV lamp를 조사하였고 Trypsin 용액은 25mg을 50mL의 증류수에 묽혀 다음 1mL를 취하여 5mL의 stock 용액과 섞어 상온에서(25°C) 1, 2일 정도 방치하였다.

GC 분석을 위한 유도체화 과정은 시료의 반응조건을 맞추어 준 다음 시료를 1mL 정도로 농축하고 (IPA : Acetyl chloride = 8:2) 용액 0.5mL를 넣고 1시간 동안 105°C로 유지하여 esterification을 한다. TFA(Trifluoroacetic anhydride) 0.2mL, methylene chloride 3mL를 넣어 30분간 상온에서 반응시켜 acylation을 시킨다. evaporation하여 농축하고 ethyl acetate 0.2mL로 묽혀 1.0 $\mu$ L씩 GC에 주입하여 분석하였다. GC / MS에서도 동일한 방법으로 유도체화하여 시료를 분석하였다.

#### 2. 3. 2. cyclodextrin column의 효능 비교

HPLC에서의 이성질체 분리능을 살펴보기 위해 ortho, meta, paranitroaniline을 혼합하여 chromatogram을 얻었다. Reverse phase인 C<sub>18</sub> column과  $\beta$ -CD column을 사용하여 이성질체의 분리를 비교하였다. 또한 amino acid의 유도체인 Dansyl-d, *l*-phenyl alanine으로 두 column의 분리능을 비교하였는데, 이동상으로 methanol, water, acetic acid를 사용하였다.

#### 2. 3. 3. 아미노산 유도체들의 분리

$\beta$ -CD를 정지상으로 하여 dansyl amino acid 유도체들의 표준물을 대상으로 LC에서의 분리능을 실험하였다.

대상으로 dansyl- $\alpha$ -amino-N-butyrlic acid, dansyl- $\gamma$ -amino-N-butyrlic acid, dansyl-d, *l*-aspartic

acid, dansyl-d, *l*-glutamic acid, dansyl-glycine, dansyl-d, *l*-leucine, dansyl-d, *l*-norleucine, dansyl-d, *l*-valine, dansyl-d, *l*-norvaline, dansyl-d, *l*-methionine, N-dansyl-d, *l*-serine, N-dansyl-d, *l*-threonine, dansyl-d-*l*-phenyl alanine, N-dansyl-d, *l*-tryptophan, dansyl-sarcosine이다. 이 15종을 각각 MeOH / H<sub>2</sub>O / CH<sub>3</sub>COOH를 78:20:2로 만든 이동상과 같은 용액에 0.1~0.3%로 만들어 10 $\mu$ L씩 주입하였다.

#### 2. 3. 4. d, *l*-아미노산 유도체들에 대한 $\alpha$ , $\beta$ -CD의 선택성

d, *l*-아미노산 유도체들에 대한 선택성을 알아보기 위하여 dansyl- $\alpha$ -amino-N-butyrlic acid와 dansyl-d, *l*-serine, dansyl-d, *l*-aspartic acid 3종을 이동상과 같은 용액에 0.1%로 만들었다. 이것을 다시 10배로 희석한 뒤 1mL씩 취하여  $\beta$ -CD가 1mg, 2mg, 5mg씩 들어 있는 vial에 넣었다.  $\alpha$ -CD도 동일한 방법으로 혼합물을 조제하였다. sonification시킨 뒤에 여과하여 HPLC에 10 $\mu$ L씩 주입하여 측정하였다. 또한  $\beta$ -CD와  $\alpha$ -CD의 양은 2mg으로 동일하게 하고 표준물질 3종이 혼합되어 있는 용액의 농도를 0.01%, 0.02%, 0.04%로 변화시켜 sonification한 뒤 여과하여 10 $\mu$ L씩 2번 injection하였다. 각각의 HPLC 크로마토그램에서 얻은 peak area를 가지고 free d, *l*-amino acid의 양을 비교하였고 순수 표준물질과의 비율을 고려하여 inclusion complex되는 경향을 조사하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3. 1. 여러 변화에 따른 *l*-form 아미노산의 이성화

산, UV, Trypsin을 가했을 경우 변화를 발견할 수 없었고, 열을 가할 경우에만 미량이 racemization되는 현상을 관측할 수 있었으나 산 촉매하에서의 복합적인 영향인 것으로 생각된다.

6N-HCl, 105°C에서 이성화 현상이 뚜렷이 나타났다(Table 1). 그러나 d, *l*-form 분리를 위해 단백질을 가수분해한 후 유도체화하고 24시간 가수분해하는 과정은 많은 오차를 내기에는 짧은 시간이지만 아미노산의 광학이성질체 분석에 있어서는 특히 신경을 써야 할 부분으로 보인다. Methionine은 시간이 지나면서 파괴되는 양이 많아져서 racemization되는 양을 측정할 수 없었다.

Table 1. Racemization of L-form amino acids under heat(105°C), acid(6N HCl), UV light and enzyme as time passed.

Amino acid	Day	Treat- ment	Heat(105°C)	6N HCl	UV	Enzyme (Trypsin)	6N HCl Heat(105°C)
Alanine	1		-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	1.59
	4		-	-	-	-	1.43
Threonine	1		-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	-
	4		-	-	-	-	-
Isoleucine	1		-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	1.05
	4		-	-	-	-	1.16
Leucine	1		-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	-
	4		-	-	-	-	-
Aspartic acid	1		-	-	-	-	0.91
	2		0.31	-	-	-	1.84
	3		-	-	-	-	2.20
	4		-	-	-	-	2.46
Methionin	1		-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-
	3		-	-	-	-	-
	4		-	-	-	-	-
Glutamic acid	1		-	-	-	-	-
	2		0.90	-	-	-	2.13
	3		-	-	-	-	3.02
	4		-	-	-	-	3.03
Tyrosine	1		-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	0.82
	3		-	-	-	-	1.64
	4		-	-	-	-	1.59

Unit : D/L × 100      6N HCl + Heat 4일까지, 나머지 2일

**3. 2. GC 및 GC/MS에 의한 아미노산 유도체의 분별**  
 d, l-enantiomer를 분리하기 위해서 chirasil-val column을 사용하였다. Chirasil-val은 polydimethylsiloxane에 안정한 amide linkage로 공유결합되어 있는 구조를 가지고 있다. 이 column은 210°C에서 도 안정하고 짧은 시간 동안에는 250°C까지 열을 가할 수 있다. arginine, histidine 및 tryptophan을 포함하는 모든 amino acid enantiomer들의 분리를 반 시간 내에 할 수 있다. chirasil-val은 amino acid enantiom-

er의 분리 뿐만 아니라 hydroxy acid, amino alcohol, glycols, amines, carbohydrates 및 sulfoxide 등의 chiral 화합물의 분리에 매우 유용하다. 또한 Chirasil-val column은 자연시료에서 amino acid의 정량적인 determination에 대한 새로운 방법을 제공하였다. Fig. 1은 17종의 d, l-amino acid mixture의 total ion chromatogram(TIC)를 나타내었다.

d-threonine과 d-valine, l-isoleucine과 d-serine, d-leucine과 l-serine, d, l-proline, d, l-hydroxy pro-

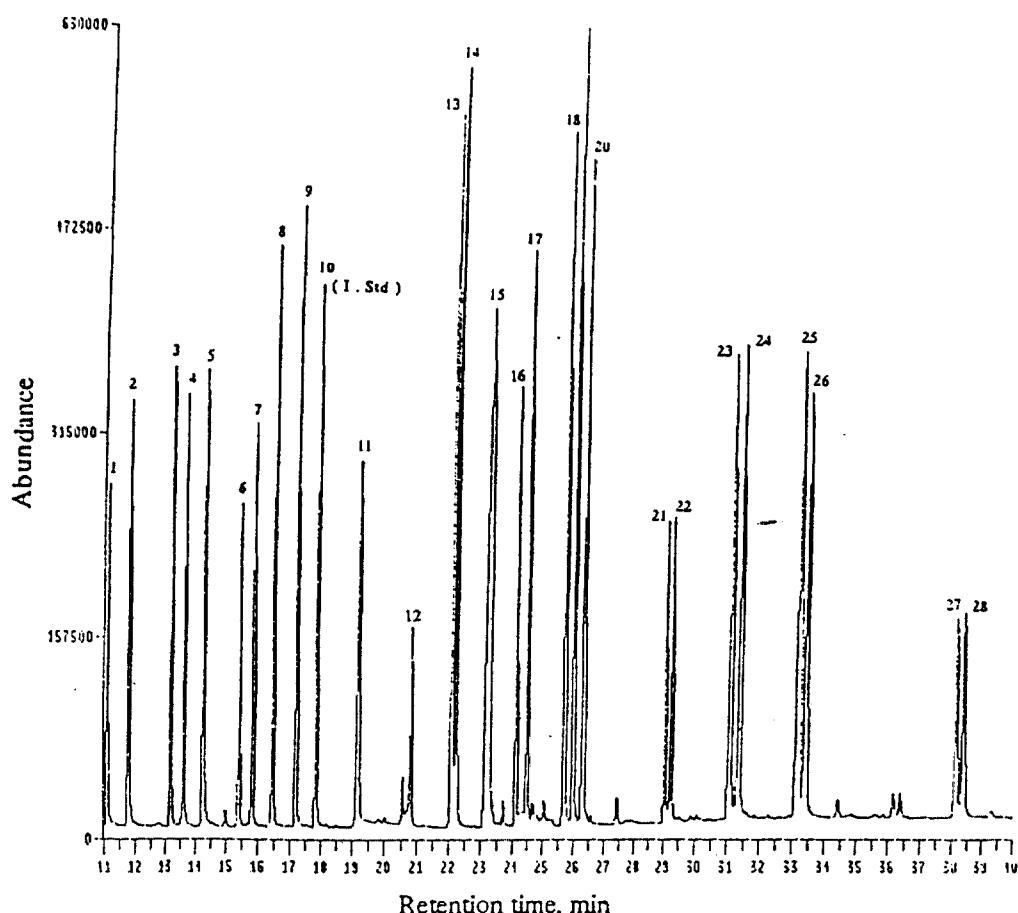


Figure 1. Total Ion Chromatogram of Amino Acid-N(O, S)-TFA, isopropyl ester derivative of standard mixture.

Peak identity : 1. d-alanine, 2. l-alanine, 3. d-valine, 4. l-valine, 5. glycine, 6. d-isoleucine, 7. l-isoleucine, 8. d-leucine, 9. l-leucine, 10. l-norleucine(internal standard), 11. d-proline, 12. d-cysteine, 13. l-cysteine, 14. d-aspartic acid, 15. d-hydroxy proline, 16. l-hydroxy proline, 17. d-methionine, 18. l-methionine, 19. d-glutamic acid, 20. l-glutamic acid, 21. l-phenylalanine, 22. d-tyrosine, 23. l-tyrosine, 24. d-ornithine, 25. l-orthinine, 26. l-lysine, 27. d-tryptophan, 28. l-tryptophan.

line의 경우는 overlap되는 현상이 나타나지만 다른 amino acid들은 완전히 분리가 되었다. 이를 overlap되는 peak들 중 d, l-proline과 d, l-hydroxyproline을 제외한 overlap되는 peak들은 GC에서 분별할 수 없지만 이들의 mass spectra에서는 서로 다른 spectrum을 나타내므로 분별이 가능하다.

### 3. 3. TFA-IPA 유도체의 Mass fragmentation에 대한 해석

Aliphatic amino acid(Glycine, alanine, valine, leucine 및 isoleucine) 유도체의 경우 inductive cleavage에 의해서 생성된  $(M - COOC_3H_1)^+$  이온이 모두 base peak로 나타난다.

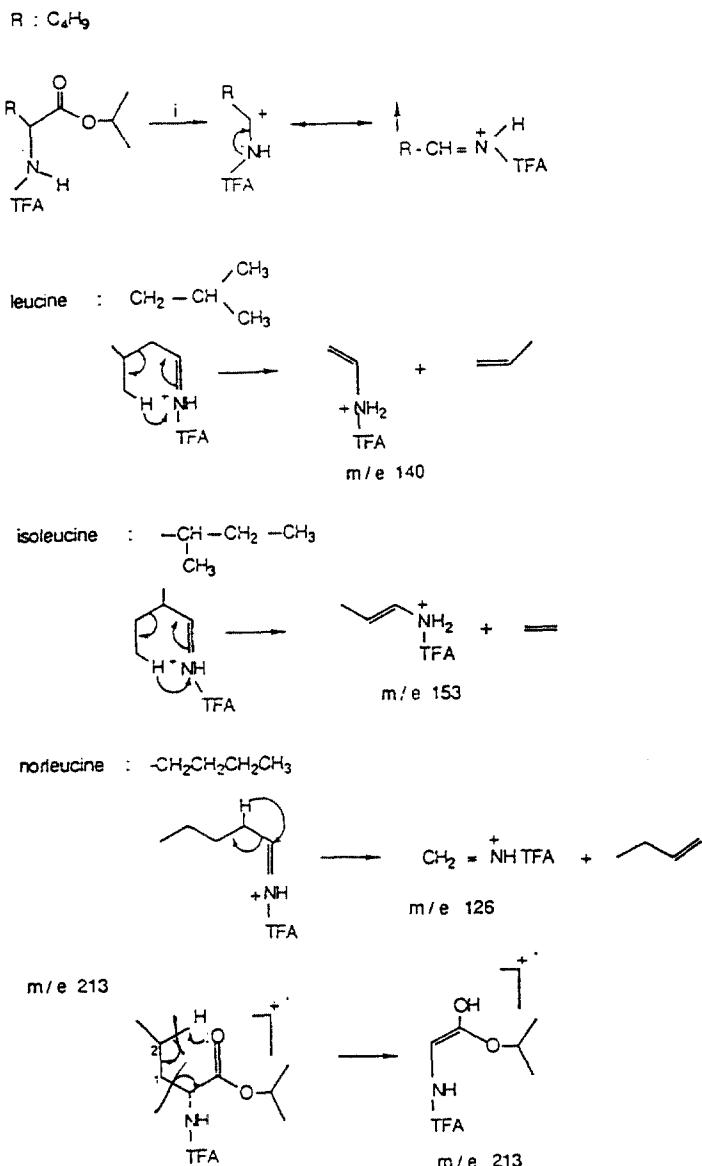


Figure 2. Mass Fragmentation pathways of Leucine, Isoleucine and Norleucine.

Table 2. GC Retention Time(RT) &amp; Mass Spectral data for Amino Acid-TFA-isopropyl ester derivatives.

Compound	M.W	RT	$\alpha$	RN	Characteristic Ions(m/e)					
1. Alanine	227	11.205	0.626		140	168	72	92	170	
		11.883	0.664	3.56	(100)	(8)	(6)	(3)	(1)	
2. Threonine	353	13.120	0.733		153	152	84	266	294	198
		13.625	0.762	2.25	(100)	(78)	(14)	(8)	(8)	(6)
3. Valine	255	13.244	0.740		168	153	55	114	171	196
		13.681	0.765	2.75	(100)	(38)	(77)	(16)	(11)	(6)
4. Glycine	213	14.327	0.801		126	154	78	58	102	
		—			(100)	(29)	(13)	(13)	(6)	
5. Isoleucine	269	15.438	0.863		182	153	171	213	126	114
		15.899	0.889	2.44	(100)	(74)	(48)	(16)	(16)	(19)
6. Serine	339	16.259	0.909		139	138	280	252	184	170
		16.448	0.919	2.38	(100)	(89)	(14)	(12)	(8)	(7)
7. Leucine	269	16.511	0.923		182	140	153	168	171	166
		17.253	0.964	3.11	(100)	(98)	(29)	(25)	(22)	(17)
8. Norleucine (IS)	269	17.890	1.000	—	182	126	140	153	114	171
		—			(100)	(73)	(35)	(26)	(60)	(13)
9. Proline	253	19.214	1.074		166	96	253	211	71	194
		19.214	1.074	NM	(100)	(7)	(6)	(4)	(4)	(2)
10. Cystein	355	20.161	1.127		140	268	170	216	250	313
		20.914	1.169	1.65	(100)	(87)	(30)	(17)	(17)	(10)
11. Aspartic acid	313	22.161	1.239		184	139	212	227	166	254
		22.311	1.247	0.85	(100)	(46)	(84)	(31)	(26)	(12)
12. Hydroxyproline	365	23.342	1.305		164	279	94	306	94	67
		23.342	1.305	NM	(100)	(52)	(12)	(4)	(12)	(12)
13. Methionine	287	24.169	1.351		61	171	75	287	213	200
		24.563	1.373	2.47	(100)	(32)	(59)	(26)	(24)	(12)
14. Glutamic acid	327	25.762	1.440		198	180	226	152	85	240
		26.089	1.458	1.85	(100)	(80)	(64)	(56)	(32)	(22)
15. Phenylalanine	303	26.074	1.457		91	190	148	103	303	216
		26.381	1.475	1.75	(100)	(70)	(63)	(22)	(12)	(33)
16. Tyrosine	415	29.067	1.625		260	203	302	328	415	216
		29.314	1.639	1.50	(100)	(94)	(98)	(32)	(4)	(20)
17. Ornithine	366	31.209	1.744		166	306	211	126	279	153
		31.503	1.761	1.72	(100)	(9)	(8)	(7)	(9)	(4)
18. Lysine	380	33.314	1.862		180	294	321	67	181	126
		33.563	1.876	1.21	(100)	(18)	(8)	(16)	(14)	(11)
19. Histidine	365	37.311	2.086		278	206	81	153	166	365
		37.472	2.095	0.66	(100)	(45)	(43)	(12)	(12)	(9)
20. Tryptophan	438	38.212	2.136		226	325	438	129	283	129
		38.484	2.151	0.84	(100)	(21)	(9)	(9)	(32)	(9)

Leucine, isoleucine과 norleucine들은 isomer로서 존재하나 이들의 mass spectra에서 서로 다른 이온을 가지고 있으므로 구분이 가능하다. 이들의 두번째로 강한 세기를 가진 이온을 비교하면 쉽게 구별된다. 또한 aliphatic amino acid의 경우 alkyl chain<sup>o</sup> 2개 이상인 경우 m/e 213<sup>o</sup> 항상 나타난다(Table 2, Fig. 2). 이 이온은 McLafferty rearrangement에 의해서 생성된 이온이다. 이 이온의 relative abundance는 chain의 구조에 영향을 받는다.

Hydroxy amino acid(threonine, serine)의 경우 N, O-bis-TFA 유도체가 생성되며, 이 유도체는 aliphatic amino acid와 달리 (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup> 이온은 적은 양으로 나타나고 (M-200)<sup>+</sup> 이온이 base peak로 나타난다. Hydroxy amino acid의 다른 characteristic ion으로는 (M-CF<sub>3</sub>COOC<sub>3</sub>H<sub>8</sub>)<sup>+</sup> 이온도 나타난다. Hydroxy group은 dehydration<sup>o</sup>나 dealdehyde 등으로 깨지기 쉬워서 분자이온이 잘 나타나지 않는 단점이 있다.

Acidic amino acid(Aspartic acid, glutamic acid)는 많은 strong intensity를 갖는 이온들이 다른 amino acid들보다 많이 나타나는 것이 특징이며, glutamic acid는 1% 정도의 분자이온(M<sup>+</sup>)이 검출되었다. characteristic ion으로서 (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-H<sub>2</sub>O)<sup>+</sup>, (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-HOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>), (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-HOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-CO)<sup>+</sup>, (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-HOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, 및 (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-CO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> 이온이 강한 intensity를 갖는 이온들이다.

Lysine과 Ornithine 유도체는 mass spectra상에서 그들의 base peak만이 강하게 나타나며, 다른 이온들은 약한 세기를 갖는 특성을 가진다. 이들의 characteristic ion으로서 (M-HOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>, (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-TFA NH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, TFA<sup>+</sup>NH=CH<sub>2</sub> 등이 나타난다. Leimer<sup>9</sup>가 제안한 fragment ion들과 비교적 잘 일치한다(Fig. 3). 그러나 이들의 분자 이온은 검출되지 않았다.

Sulfur amino acid 중 methionine은 thioether group<sup>o</sup> 강한 intensity로 나타나는 현상이 나타난다. 즉 m/e 61(CH<sub>3</sub>-S<sup>+</sup>=CH<sub>2</sub>)과 m/e 75(CH<sub>3</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>+</sup>) 이온이 나타나면 분자이온도 역시 강한 intensity를 갖는다. m/e 153, 171 이온들은 aliphatic amino

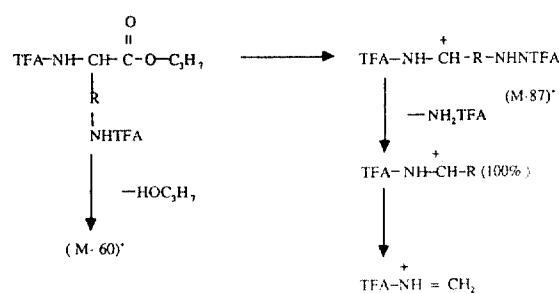


Figure 3. Fragmentation pathway of Basic Aliphatic Amino acids : Lysine, Ornithine.

acid에서 설명한 패턴을 가지고 이외에도 McLafferty rearrangement에 의해 H-migration<sup>o</sup> 일어나서 생긴 이온인 (M-CH<sub>2</sub>S-CH=CH)<sup>+</sup> 이온도 생성된다. 그밖에 (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup>인 TFA-iminium ion은 low relative abundance를 갖는다.

Cysteine은 N, S-di-TFA 유도체화되는 화합물로 methionine과는 완전히 다른 fragment ion을 갖는다. (M-COOCH<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sup>+</sup> 이온으로 더 이상 중요한 fragmentation<sup>o</sup> 일어나지 않으며 base peak인 m/e 140은 isopropyl group에서 H가 TFA group의 carbonyl group으로 migration<sup>o</sup> 일어나면서 (M-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-CO<sub>2</sub>-SCOCF<sub>3</sub>)<sup>+</sup> 이온이 형성된다.

Aromatic 및 heterocyclic amino acid인 phenylalanine, tyrosine, tryptophan과 histidine 유도체는 cyclic moiety에 의해서 많은 영향을 받는다. Aromatic ring의 stabilizing 영향은 이들 분자 ion을 spectrum상에서 나타나게 해주고, ring moiety를 가진 이온들은 high relative abundance를 나타나게 된다. Phenylalanine의 경우 m/e 91(Ar<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>)은 diagnostic value가 되고 histidine의 경우 m/e 81, tyrosine의 경우 m/e 260, 203 및 320<sup>o</sup> characteristic ion<sup>o</sup>며 tryptophan의 경우 m/e 226, 283, 325<sup>o</sup> characteristic ion<sup>o</sup>이다.

Proline 유도체는 carboxylic ester group<sup>o</sup> 떨어져 나감으로써 생긴 cyclic iminium 이온<sup>o</sup> mass spectrum에서 high relative abundance를 갖는다.

Hydroxy-proline의 경우는 여기에 trifluoro acetic acid가 떨어져 나감으로써 stable ion(allylic cation)이 생성된다. proline type의 유도체의 경우, low in-

tensity를 가진 작은 fragment ion이 특성적으로 나타난다. 즉 proline의 경우 m/e 96, hydroxy proline의 경우 m/e 94인데, 이 이온은 Cyclic Ketene ion 구조를 형성하게 된다.

### 3. 4. $\beta$ -cyclodextrin bonded phase column의 효능

$C_{18}$  column과  $\beta$ -cyclodextrin bonded column의 효능을 비교해 보기 위해 o, m, p-nitroaniline과 dansyl-d, l-phenyl alanine을 사용하였다. nitroaniline은 0.005M의 농도를 갖게 섞은 다음 10 $\mu$ l 씩 HPLC에 주입

하였다. 이동상은 MeOH / Water 50:50을 사용하였고 용리되는 순서로는  $C_{18}$ 에서 para, meta, ortho 순이었고  $\beta$ -CD에서는 meta, ortho, para순으로 분리가 되었다.  $\beta$ -cyclodextrin bonded column과 para-nitroaniline이 제일 센 inclusion complex가 형성되었고 meta보다는 ortho가 steric effect에 의해서 더 잘  $\beta$ -cyclodextrin bonded column과 결합하였다. 이들의 retention parameter가 Table 3에 요약되어 있다.

Dansyl amino acid 중 d, l-phenyl alanine을 선택하여  $\beta$ -cyclodextrin bonded column과  $C_{18}$  column으

Table 3. Comparison of retention index  $C_{18}$  and  $\beta$ -CD column for the separation of o, m, p-nitroaniline with HPLC.

Column	Compound	Retention time (min)	Resolution	$\alpha$	$k'$
$C_{18}$	p-nitroaniline	4.80	1.4	1.1724	1.45
	m-nitroaniline	5.22			1.70
	o-nitroaniline	6.40	2.2	1.3235	2.25
$\beta$ -CD	m-nitroaniline	14.27	0.7	1.1045	3.35
	o-nitroaniline	15.25			3.70
	p-nitroaniline	48.60	11.2	3.5405	13.10

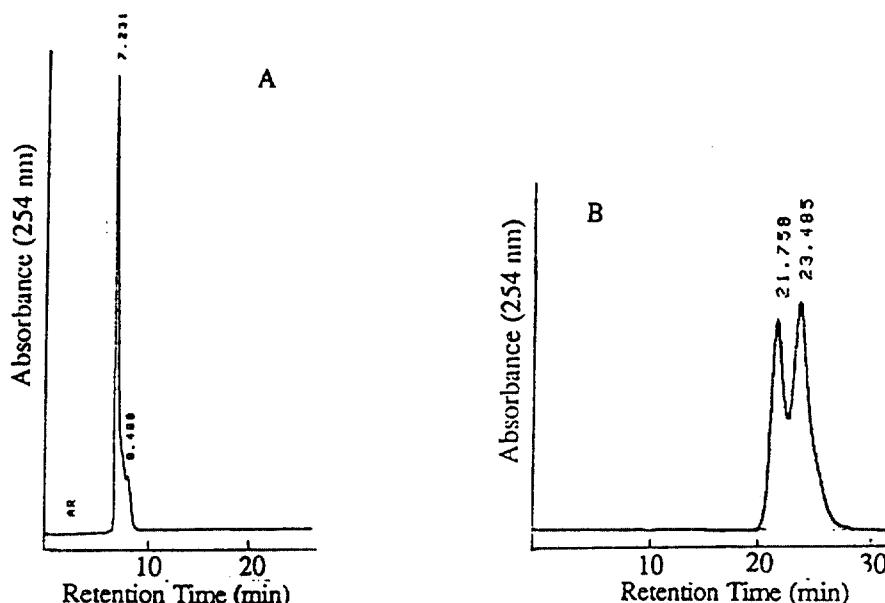


Figure 4. HPLC chromatogram of Dansyl-d, l-phenyl alanine with  $C_{18}$  column (A) and  $\beta$ -CD column using MeOH / Water / AcOH(78/20/2) mobile phase.

로 분리를 시도하였다. 이동상으로 MeOH / Water / AcOH를 78:20:2로 만들어 사용하였고 시료는 0.1% 되게 하여 10 $\mu$ l 씩 HPLC에 주입하였다. Fig. 4에서와 같이 d, l-form이 분리되는 것을 볼 수 있었으며 분리 능은 0.67을 보였다. 역상크로마토그래피를 같은 조건에서 실험하여 본 결과 전혀 분리가 되지 않았다.

$\beta$ -cyclodextrin bonded column의 이동상 영향을 살펴보기 위하여 이동상인 MeOH / Water / AcOH = 100:100:1에  $\beta$ -cyclodextrin을 포함시켜  $\beta$ -cyclodextrin<sup>o</sup> 이동상에 없을 때와 비교하여 보았다. 이때의 대상으로는 o, m, p-nitroaniline을 사용하였다. 이동상에  $\beta$ -cyclodextrin을 포함시켰을 때는 p, m, o-nitroaniline의 retention time<sup>o</sup> 8.27, 8.96, 10.69였고,  $\beta$ -cyclodextrin을 첨가하지 않는 이동상에 C<sub>18</sub> column에 의해 분리된 p, m, o-nitroaniline의 retention time

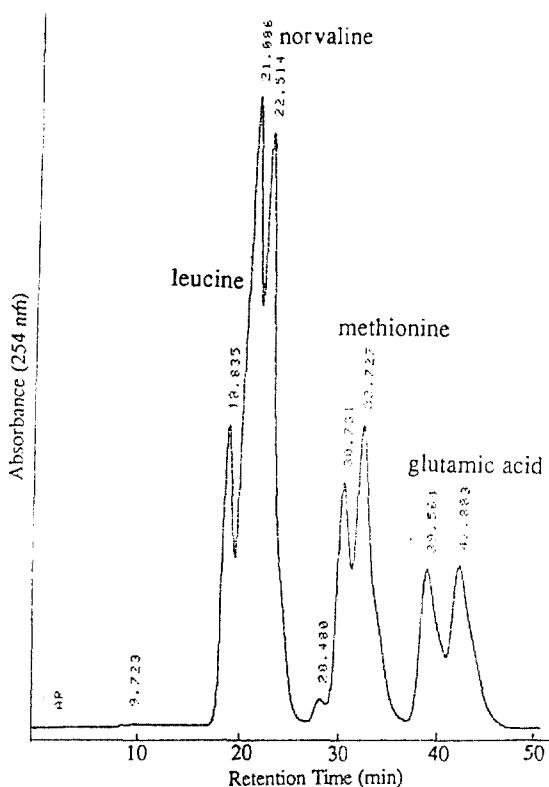


Figure 5. HPLC chromatogram of group I containing d, l-form of dansyl-leucine, norvaline, methionine, glutamic acid. Mobile phase composed of MeOH / Water / AcOH(78/20/2) as isocratic mode on  $\beta$ -CD column.

은 8.53, 9.95, 29.44로 증가하여  $\beta$ -cyclodextrin<sup>o</sup> nitroaniline과 inclusion complex를 형성함이 증명되었다.

### 3. 5. LC에 의한 아미노산 유도체의 분리

표준물질의 분리 시간에 따라 leucine과 norvaline, glutamic acid 4종을 group I<sup>o</sup>라 하고, valine,  $\alpha$ -amino- butyric acid, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid 6종을 group II<sup>o</sup>라 하여 서로 분리하였다. 이때에 얻은 chromatogram<sup>o</sup> Fig. 5, 6에 나와 있다. broad한 tailing으로 group I에서 leucine과 norvaline의 d, l-form<sup>o</sup> 서로 겹치고 group II에서 phenyl alanine과 threonine<sup>o</sup> 서로 겹쳐서 분리는 만족스럽지 못했으나 그 외의 표준 아미노산은 이성질체가 분리되었다.

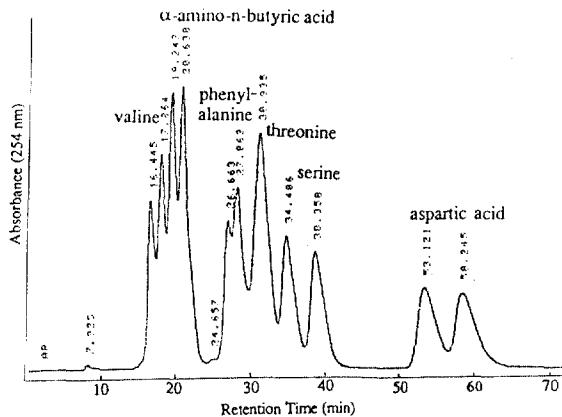


Figure 6. HPLC chromatogram of group II containing d, l-form of dansyl-valine,  $\alpha$ -amino-n-butyric acid, phenylalanine, threonine, serine, aspartic acid. Mobile phase composed of MeOH / Water / AcOH (78/20/2) as isocratic mode on  $\beta$ -CD column.

### 3. 6. $\alpha$ , $\beta$ -cyclodextrin과 광학이성질체 아미노산과의 선택성

Table 4는  $\beta$ -cyclodextrin 0, 1, 2, 5mg과 0.01% dansyl amino acid와의 inclusion complex 형성 정도를 비교하여 본 것이고 Table 5는  $\alpha$ ,  $\beta$ -CD 2mg에 analyte 농도를 0.005, 0.01, 0.02%로 변화하여 inclusion complex 형성됨을 비교한 것이다. 두 실험의 결과로 d-form의 아미노산이 cyclodextrin과 더 세게 complex를 형성하여 GC의 chiral val column에서와는 달리 l-form<sup>o</sup> 먼저 elution됨을 알 수 있었다.

Table 4. Test of selectivity between dansyl-d, l-amino acid and various amount of  $\beta$ -CD mixture. Concentration of analyte was set up at 0.01% all through the experiment.

Dansyl AA	Amount of $\beta$ -CD with 0.01% AA in 1 mL				
	0mg	1 mg	2mg	5 mg	
$\alpha$ -amino-n-butyrinic acid	Retention Time l-form	18.917	18.510	18.465	19.051
	d-form	20.155	19.592	19.597	20.224
	Peak Area l-form(Al)	15.029	13.037	15.630	15.403
	d-form(Ad)	23.637	23.721	28.288	28.811
	Ratio(Al/Ad)	0.6358	0.5496	0.5525	0.5346
serine	Retention Time l-form	33.428	32.923	32.988	34.036
	d-form	37.110	36.588	36.621	38.010
	Peak Area l-form(Al)	18.282	17.819	20.286	18.339
	d-form(Ad)	18.540	18.919	20.953	18.282
	Ratio(Al/Ad)	0.9861	0.9419	0.9682	1.003
aspartic acid	Retention Time l-form	50.439	49.800	49.520	51.588
	d-form	55.355	54.823	54.415	56.800
	Peak Area l-form(Al)	12.082	11.053	5.251	9.071
	d-form(Ad)	12.429	11.753	5.581	8.897
	Ratio(Al/Ad)	0.9721	0.9401	0.9409	1.020

1. Separation was performed through  $\beta$ -CD column with mobile phase of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) isocratic system.

## 1. 결론

4일간 105°C 열처리와 6N-HCl을 가하였을 때 alanine은 1.5%, isoleucine은 1.2%, aspartic acid는 2.5%, glutamic acid는 0.3%, tyrosine은 1.6% 정도 racemization이 되어 정량적인 분석일 때는 가수분해 시간을 정확히 조절하는 것이 오차를 줄이는 중요한 과정이었다.

TFA-IPA 유도체를 만들어 chirasil val column을 사용하면 d-serine, d-leucine, l-serine, d, l-proline이 분리가 되지 않았는데, d, l-proline을 제외한 나머지는 Mass spectrum을 이용하여 구별이 가능하였다.

*o, m, p*-nitroaniline을 HPLC로 분석한 결과 C<sub>18</sub> column보다  $\beta$ -cyclodextrin bonded column이 이성질체 분리에 우수한 효능이 있음을 알 수 있었다. Dansyl

Table. 5. Test of selectivity between dansyl-d, l-amino acid and various amount of analyte mixture. The concentration of cyclodextrin was fixed at 0.2% all through the experiment.

Dansyl AA	Concentration of Analyte (Wt %)		
	0.005	0.01	0.02
$\alpha$ -amino-n-butryic acid	0.885	0.9398	1.1117
serine*	1.0282	1.0058	0.9953
aspartic acid	1.0552	1.0425	1.0148

\* serine is mixed with 0.2%  $\alpha$ -cyclodextrin, others with 0.2%  $\beta$ -cyclodextrin.

1. Numbers represents for the ratio between two enantiomers. (D/L)

amino acid의 이성질체 분리는  $\beta$ -cyclodextrin을 사용할 경우 leucine, norvaline, methionine, glutamic acid, valine,  $\alpha$ -amino-n-butyric acid, norleucine, phenylalanine, threonine, serine, aspartic acid가 분리되었다.

Inclusion complex의 정도를 Dansyl-amino acid로 비교하여 본 결과 d-form의  $\alpha$ ,  $\beta$ -cyclodextrin과 더 세게 complex를 형성하여 대개 l-form의 먼저 elution되었다.

## 5. Reference

1. W. H. Pirkle : D. W. House : J. M. Finn, *J. of Chromatogr.*, **192**, 143~158(1980).
2. R. P. Rodinguez : E. M. Eyring : J. F. Wojcik, *The Journal of Physical Chemistry*, **81**(1977).
3. Marian Mikolajczyk : Jozef Drabowicz, *J. of the American Chemical Society*, **100**, 8(1978).
4. Yoshio Inoue : T. Okude : Y. Miyata, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7393~7394(1981).
5. S. Allenmark : B. Bomgren, *J. Chromatogr.*, **252**, 297(1982).
6. K. R. Lindner, *J. Chromatogr.*, **193**, 308~310(1980).
7. S. Hara : A. Dobashi : K. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **371**, 153~158(1986).
8. A. Dobashi : Y. Dobashi : Tamami Oho : Shoji Hara, *J. Chromatogr.*, **461**, 121~127(1989).
9. K. R. Leimer : R. H. Rice : C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.*, **141**, 355(1977).
10. F. W. McLafferty : E. R. Lory : *J. Chromatogr.*, **203**, 109(1981).