Korean Chem. Eng. Res., Vol. 44, No. 5, October, 2006, pp. 453-459

D-tryptophan과 N-CBZ-D-phenylalanine의 분리에서 이온성 액체의 영향

김은철 · 정금주 · **Yulia Polyakova** · 구윤모 · 노경호†

인하대학교 생명화학공학부, 초정밀생물분리기술연구센터
402-751 인천시 남구 용현동 253
(2006년 1월 18일 접수, 2006년 6월 16일 채택)

Influence of Ionic Liquid for Separation of D-tryptophan and N-CBZ-D-phenylalanine

Yinzhe Jin, Jinzhu Zheng, Yulia Polyakova, Yoon Mo Koo and Kyung Ho Row†

Center for Advanced Bioseparation Technology, Chemical Engineering & Biotechnology, Inha University, 253, Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea
(Received 18 January 2006; accepted 16 June 2006)

요 약

두 개의 D-아미노산 물질을 분리함에 있어서 이온성 액체의 영향을 고찰하였다. 아미노산 물질로서 D-tryptophan과 N-CBZ-D-phenylalanine을 사용하였으며, 이온성 액체로서 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate($[BMIm]^+[BF_4]^-$)을 사용하였고, 역상 액체 크로마토그래피로 분석하였다. 이동상은 각각 65%, 70%, 80% 메탄올을 주성분으로 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0과 15.0 mmol/L의 농도의 이온성 액체를 첨가하였고, 칼럼(3.9 × 300 mm)에 15 μm의 입자 크기를 가진 C_{18} 실리카 겔을 충진하여 사용하였다. 이온성 액체를 첨가함으로써 D-tryptophan의 체류인자는 거의 변화가 없었지만, N-CBZ- D-phenylalanine의 체류인자는 감소하였다. 두 물질의 분리도는 메탄올의 함량과 이온성 액체의 농도에 따라 변화하였다. 메탄올의 함량이 낮을수록, 이온성 액체의 농도의 증가에 따라서 분리도는 증가하는 경향을 나타내었다.

Abstract – D-tryptophan and N-CBZ-D-phenylalanine were separated using ionic liquid as additives for the mobile phase in high performance liquid chromatography (HPLC). The ionic liquid of 1-butyl-3- methylimidazolium tetrafluoroborate ($[BMIm]^+[BF_4]^-$) was used. Mobile phases were 65%, 70%, and 80% methanol in water with addition of different concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, and 15.0 mmol/L) of the ionic liquid. The experiments were performed on stainless steel column, 3.9×300 mm i.d., packed with 15 μm octadecyl-bonded silica gel at laboratory. The retention factor of D-tryptophan was not negligibly changed while that of N-CBZ-D-phenylalanine was decreased. The resolution between the two components were affected by the contents of methanol and ionic liquid in the mobile phase. With the small content of methanol and the high concentration of ionic liquid, the resolution was improved.

Key words: D-tryptophan, N-CBZ-D-phenylalanine, Ionic Liquid, Retention Factor, Resolution

1. 서 론

이온성 액체는 유기 양이온과 각종 음이온을 결합한 염으로써 상온에서 액체 상태로 존재하며, 100℃ 이하의 녹는점을 가지고 있다[1]. 상온에서 액체로 존재하는 이온성 액체를 상온 이온성 액체(room temperature ionic liquid, RTIL)라 하며, 양이온으로서는 dialkylimidazolium, alkylpyridinium, tetraalkylammonium, 1-alkyl-3-methylimidazolium, N-alkylpyridinium, 1-butyl-3-methylimidazolium, 1-hexyl-3-methylimidazolium, 1-methyl-3-hexylimidazolium, 1-ethyl-3-methylimidazolium, 1-hexyl-3-heptyloxymethylimidazolium, N-alkyl-N- methylmorpholinium 등이 있으며, 음이온으로는 BF_4^-, CH_3COO^-, NO_3^-, $S_bF_6^-$, $F_6O_4S_6^-$, PF_6^-, COO^-, CN^-, $CH_3SO_4^-$, $PhSO_3^-$, $(CF_3SO_2)_2N^-$, $Al_2Cl_7^-$, $AlCl_4^-$, $CH_3CH(OH)CO_2^-OH^-$, $CF_3SO_4^-$, $CF_3SO_3^-$, $CF_3CO_2^-$ 등이 있다. 이온성 액체는 비휘발성, 높은 이온 전도성, 비가연성, 높은 열 안정성과 높은 극성을 가지고 있고, 낮은 증기압, 넓은 액체 범위와 좋은 전기적 특성을 가지고 있으며, 쉽게 재생한다. 이러한 특성을 가진 이온성 액체는 촉매, 초임계 유체, 전기영동, 고체상 추출, 액체 크로마토그래피, 기체 크로마토그래피 등 방면에 널리 사용된다[2-9]. $[BMIm]^+[BF_4]^-$는 일반적으로 역상 액체 크로마토그래피에 사용되는 이온성 액체로서 분자식은 $C_8H_{15}BF_4N_2$이고, 분자량은 226.0이며, 녹는점은 −75 °C, 물과 알콜에 잘 용해되며, 상온에서의 밀도는 1.17 g/cm^{3}로써 물과 메탄올의

† To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

밀도보다 높다.

분자 중에 아미노기(-NH_2)와 카르복실기(-COOH)를 가지는 화합물을 아미노산이라 하며 천연에 존재하는 대부분의 단백질은 20여 종류의 아미노산으로 구성되어 있다. Phenylalanine과 tryptophan은 필수아미노산인 동시에 방향족아미노산이며, 중성아미노산이다[10]. Phenylalanine은 일반적으로 콩과 식물의 종자나 어린 눈 속에서 유리상태로 존재하며, 방향족 α-아미노산이다. L-phenylalanine은 모든 알에 5.4%, 탈지유에 5.1% 함유되어 있으며, 생체 내에서 비가역적으로 히드록실화되여 티로신이 된다. D-phenylalanine은 폴리펩타이드성 항생물질인 그라미시딘S, 티로시딘, 바시트라신 등의 구성성분으로써 단백질 중에는 존재하지 않는다. N-CBZ-D-phenylalanine은 이러한 phenylalanine의 유도체이고, 분자식은 $C_{17}H_{17}O_4N$이며 분자량은 299.3 g/mol이다. Tryptophan은 대부분의 단백질이 가수분해 되면 얻어지는 소량의(2% 이하) 아미노산으로서 결핍 시 사람에게 펠라그라를 유발시키는 비타민인 니아신(니코틴산)의 생합성에 매우 중요하다. 폴리페놀(polyphenol)과 아미노산의 일종인 트립토판(tryptophan)은 알레르겐의 장내 흡수 억제 효과가 있으며, 세균의 성장에 필수적이고, tryptophan을 함유하는 모든 단백질을 합성하는데 필요하므로 tryptophan의 공급이 부족하면 세포는 이것을 합성해야 한다. Tryptophan 생합성은 합성과정을 촉매하는 효소의 합성과 효소의 활성 양쪽에 모두 영향을 주는 기구에 의해 조절된다. D-tryptophan의 분자식은 $C_{11}H_{12}N_2O_2$이며 분자량은 204.2 g/mol이다.

생체 내에서 D-아미노산은 미생물의 세포벽이나 생리활성물질 등의 구성성분으로 존재하며, 고부가가치 의약품 합성 중간물질로 사용되고 있는 방향족 D-아미노산의 용도도 다양하다. 이러한 D-아미노산을 제조 및 합성함에 있어서 순수한 약효를 위하여 개개의 아미노산에 대하여 분리 및 정제가 필요하다. Armstrong 등은 주로 키랄 고정상 칼럼을 사용하여 여러 가지 아미노산의 분리에 대하여 많은 연구를 수행하여 왔다[11-13]. 또한, 많은 연구자들이 이온성 액체가 분리 메커니즘에서의 작용에 대하여 연구하여 왔다[6, 8, 14].

본 연구에서는 역상 크로마토그래피의 C_{18} 칼럼을 사용하여 tryptophan과 N-CBZ-D-phenylalanine을 분리함에 있어서 이온성 액체인 $[BMIm]^+[BF_4]^-$를 사용하여 이동상 중에서 일어나는 이온성 액체의 작용을 조사하였다. 액체 크로마토그래피의 이동상 중에 메탄올 함량의 증가와 이온성 액체인 $[BMIm]^+[BF_4]^-$의 농도가 다름에 따라 나타내는 칼럼의 압력, 이론단수 및 D-아미노산의 체류 인자, 선택성, 분리도 등 분리특성을 고찰하며, 적합한 농도의 이온성 액체를 사용함으로써 최적의 분리조건을 찾는 것이 본 연구의 목적이다.

2. 실 험

2-1. 시 약

본 연구에 사용된 이온성 액체인 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ($[BMIm]^+[BF_4]^-$)는 99.99%의 순도를 가지며, C-tri (Namyang, Korea)에서 구입하였다. N-CBZ(carbobenzyloxy)-D-phenylalanine과 D-tryptophan은 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였으며, 모든 시료들은 HPLC에 주입하기 전에 막여과지(0.2 μm, Waters Co.)를 이용하여 여과를 하였다. Potassium nitrate (KNO_3)는 Kanto 화학(Japan)에서, Hydrochloric acid(HCl)는 Junsei 화학(Japan)에서 구입하여 사용하였다. 메탄올은 HPLC용 용매로 덕산화학(Ansan, Korea)에서 구입하였고, 이동상에 사용된 물은 2차 증류수로서 감압펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(HA-0.45 μm, Division of Millipore, Waters)를 이용하여 여과한 후 헬륨가스를 이용하여 용존산소를 탈기 후 사용하였다.

2-2. 기 기

분석용 HPLC 장치는 Waters 515 multi-solvent delivery system, 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector (20 μl sample loop)를 포함한 Waters model 600S liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, U. S. A.)를 사용했다. HPLC에서 얻은 chromatography는 데이터 수집 장치(Chromate Ver. 3.0, Interface Eng. Korea)를 통해서 얻었다.

2-3. HPLC 분석

분석용 HPLC 칼럼(3.9 × 300 mm)을 사용하였으며, 15 μm의 C_{18} 실리카 겔을 충진하여 사용하였다. 주입부피는 10 μl로 하였고, 유속은 1.0 ml/min로 고정하였다. UV 검출기의 파장은 254 nm로 고정하였다. 이동상은 70%의 메탄올 이동상에 0.5~15 mmol/L의 서로 다른 농도의 $[BMIm]^+[BF_4]^-$를 첨가하여 측정하였다. 칼럼 온도는 칼럼 오븐을 사용하여 약 22 ºC로 고정하였으며, 이동상의 pH는 HCl를 사용하여 약 3.0으로 고정하였다. C_{18}을 고정상으로 한 액체크로마토그래피 시스템에서 이 두 D-아미노산의 체류인자는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$k = (t - t_0)/t_0 \quad (1)$$

여기서, t는 화합물의 체류시간을 표시하고, t_0는 칼럼에 체류되지 않는 물질의 체류시간이다. 선택도 혹은 선택성은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\alpha = k_1/k_2 \quad (2)$$

여기서 k_1과 k_2는 각기 두 아미노산의 체류인자를 나타낸다. 칼럼의 고정상에 대한 머무름 시간을 측정하기 위하여 0.1% KNO_3용액을 공극표시물(void marker)로 하여 측정하였다. 측정한 결과, 칼럼의 고정상에 대한 머무름 시간은 약 t_0=1.55분이었다. 일반적으로 칼럼의 효율은 이론단수(N)에 의하여 표시된다.

$$N = 16 \times (t_R/W)^2 \quad (3)$$

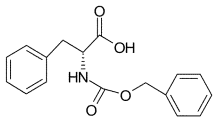
여기서 t_R은 체류시간을 나타내고 W는 피크의 너비이다. 분리도는 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$R = 2 \times (t_{R2} - t_{R1})/(w_1 + w_2) \quad (4)$$

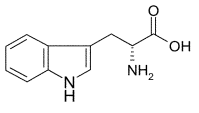
여기서 t_{R1}과 t_{R2}는 각각 두 화합물의 체류시간을 표시하고 w_1과 w_2는 각각 피크의 너비를 나타낸다.

3. 결과 및 고찰

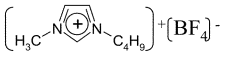
D-아미노산을 분리함에 있어서 이동상 중에 첨가된 이온성 액체가 분리특성에 미치는 영향을 고찰하였다. 0.5~15 mmol/L인 여러 농도의 이온성 액체를 65%, 70%, 80% 메탄올을 주성분으로 하는 이동상 중에 첨가하고 HCl로 pH를 3.0으로 고정하였다. 두 가지 목



N-CBZ-D-phenylalanine
($C_{17}H_{17}O_4N$, MW=299.3)



D-tryptophan
($C_{11}H_{12}O_2N_2$, MW=204.2)



$[BMIm]^+[BF_4]^-$
($C_8H_{15}BF_4N_2$, MW=226.0)

Fig. 1. Chemical structures of N-CBZ-D-phenylalanine, D-tryptophan and $[BMIm]^+[BF_4]^-$.

적물질인 아미노산 및 아미노산의 유도체의 구조식을 Fig. 1로 나타내었으며, 본 연구에 사용된 이온성 액체인 $[BMIm]^+[BF_4]^-$의 구조식도 함께 나타내었다. 각 물질에 대한 분자식 및 분자량은 서론 부분에서 언급하였다.

Fig. 2에서는 65% 메탄올이 주성분인 이동상 중에서 이온성 액체의 여러 농도에 따른 크로마토그램을 나타내었다. 65% 메탄올을 이동상으로 하였을 때에 D-tryptophan과 N-CBZ-D-phenylalanine은 전혀 분리가 되지 않았지만, 소량의 농도인 0.5 mmol/L의 $[BMIm]^+[BF_4]^-$가 첨가됨으로 하여 분리가 되기 시작하며, 1 mmol/L 이상으로부터는 완전한 분리가 된다는 것을 알 수 있다. 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 D-tryptophan과 N-CBZ-D-phenylalanine의 분리도는 증가하는 경향을 나타내었고, 2.0 mmol/L 이상의 이온성 액체가 첨가됨에 따라 분리도는 거의 1.5 이상으로 비슷하게 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 이온성 액체는 두 가지 D-아미노산의 분리도를 증가시켜주는 영향을 준다는 것을 알 수 있다. 또한, 이온성 액체는 극성이 크므로 쉽게 대상물질의 극성 그룹과 결합을 하며 피크의 tailing과 피크의 broadening을 감소시키고 칼럼의 이론 단수를 증가시킬 수 있다.

Fig. 3에서는 70% 메탄올이 주성분이 이동상 중에서 이온성 액체의 여러 농도에 따른 크로마토그램을 나타내었다. 전혀 분리가 되지 않던 두 D-아미노산이 이온성 액체의 첨가로 하여 역시 분리가 되었으며 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 분리도가 증가 되는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 칼럼은 여러 차례의 실험을 통하여

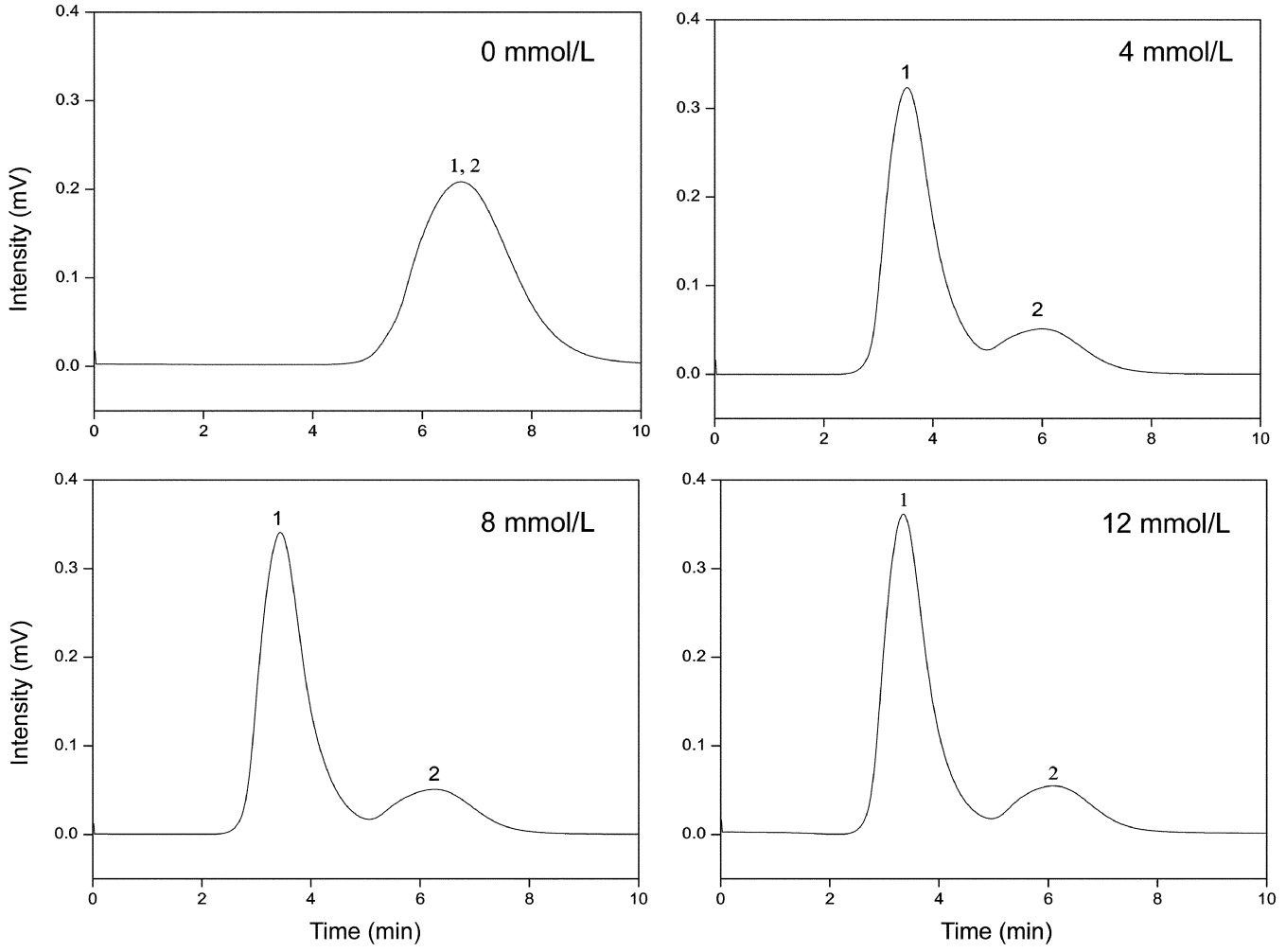


Fig. 2. Chromatograms of N-CBZ-D-phenylalanine and D-tryptophan with a mobile phase containing different concentration of $[BMIm]^+[BF_4]^-$ at pH=3.0. 1:D-tryptophan; 2:N-CBZ-D-phenylalanine ($MeOH/H_2O$=65/35 vol.% with different concentrations of ionic liquid, 1 ml/min, 10 μl injection volume, 254 nm).

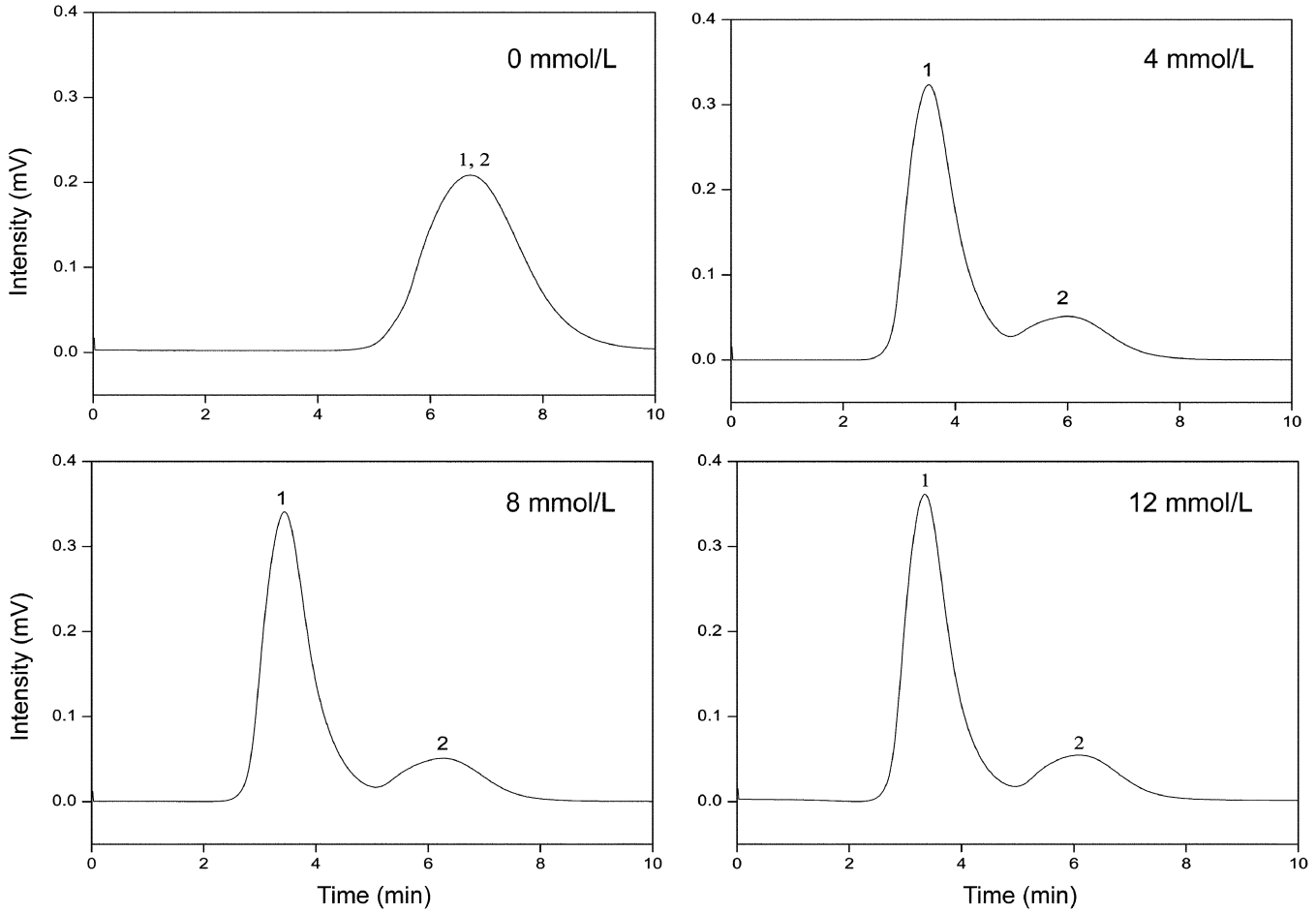


Fig. 3. Chromatograms of N-CBZ-D-phenylalanine and D-tryptophan with a mobile phase containing different concentration of $[BMIm]^+$ $[BF_4]^-$ at pH=3.0. 1:D-tryptophan; 2:N-CBZ-D-phenylalanine ($MeOH/H_2O$=70/30 vol.% with different concentrations of ionic liquid, 1ml/min, 10 μl injection volume, 254 nm).

불순물이 증가하면서 압력이 증가하기 마련이다. 70% 메탄올이 주요한 이동상일 때, 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 압력은 1,700 psi에서 1,600 psi로 감소하는 경향을 나타내었다. 이동상 중의 메탄올과 물보다 밀도와 점도가 큰 이온성 액체가 증가함에 따라 쉽게 고정상과 이온결합을 형성하여 메탄올과 물의 체류시간을 감소시킨다. 이온성 액체의 농도가 상대적으로 작기 때문에 총체적인 체류시간을 감소시키고 압력을 감소시킨다. 이는 이온성 액체가 이동상에 머물러 있으면서 이온성 액체의 양이온이 역상 실리카 겔과 흡착함으로써 실라놀 그룹의 손상을 보호해줄 것이라고 생각되어진다[15].

Fig. 4에서는 80% 메탄올이 주성분이 이동상 중에서 이온성 액체의 여러 농도에 따른 크로마토그램을 나타내었다. 80% 메탄올을 이동상으로 하였을 때, N-CBZ-D-phenylalanine과 D-tryptophan은 약간의 분리경향을 나타내었다. 2.0 mmol/L부터 8.0 mmol/L 농도의 이온성 액체를 첨가함으로써 N-CBZ-D- phenylalanine과 D-tryptophan은 전혀 분리가 되지 않았다. 이것은 메탄올의 함량이 너무 많아 N-CBZ-D-phenylalanine의 체류시간을 감소시킴으로써 두 가지 D-아미노산이 너무 일찍 용출되어 분리가 되지 않기 때문이다. 10.0 mmol/L 이상의 이온성 액체가 첨가됨에 따라 N-CBZ-D-phenylalanine과 D-tryptophan의 분리도는 증가하는 경향을 나타내었다. 이온성 액체의 농도가 10.0 mmol/L 이상이 되면서 극성이 낮은 메탄올의 작용을 점차 대체하면서 분리도를 증가시키기 때문이다. 15.0 mmol/L 농도의 이온성 액체를 첨가한 80% 메탄올 이동상에서 두 가지 D-아미노산의 분리도는 0.91이었지만 분리도가 65%, 70% 메탄올을 주성분으로 한 이동상보다 낮았기에 더 큰 농도의 이온성 액체를 첨가한 실험을 수행하지 않았다.

극성 기능성 그룹을 가진 산성 물질은 크로마토그래피에서 낮은 칼럼 이론단수를 가진다[15]. 65% 메탄올의 이동상에 0.5 mmol/L 부터 15.0 mmol/L 농도의 이온성 액체를 첨가함으로써 D-tryptophan의 이론단수는 감소하였지만, N-CBZ-D- phenylalanine의 이론단수는 증가하는 경향을 나타내었다. 65% 메탄올의 이동상 중에 여러 농도의 이온성 액체를 첨가함으로써 이론단수는 31에서 86사이였으며 농도가 증가함에 따라 두 가지 아미노산 이론단수의 차이는 증가하는 경향을 나타내었다. 70% 메탄올의 이동상 중에 이온성 액체를 첨가함으로써 D-tryptophan의 이론단수는 크게 변화하지 않았으며, 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 이론단수는 44에서 57 사이에 존재하였으며 크게 변화되지 않았다. 반면에, 이동상 중에 2 mmol/L의 이온성 액체를 첨가함으로써 N-CBZ-D-phenylalanine의 이론단수는 45에서 51로 증가하였으며, 농도가 증가함에 따라 이론단수도 증가하였다. 70%의 메탄올을 이동상으로 사용하여 상

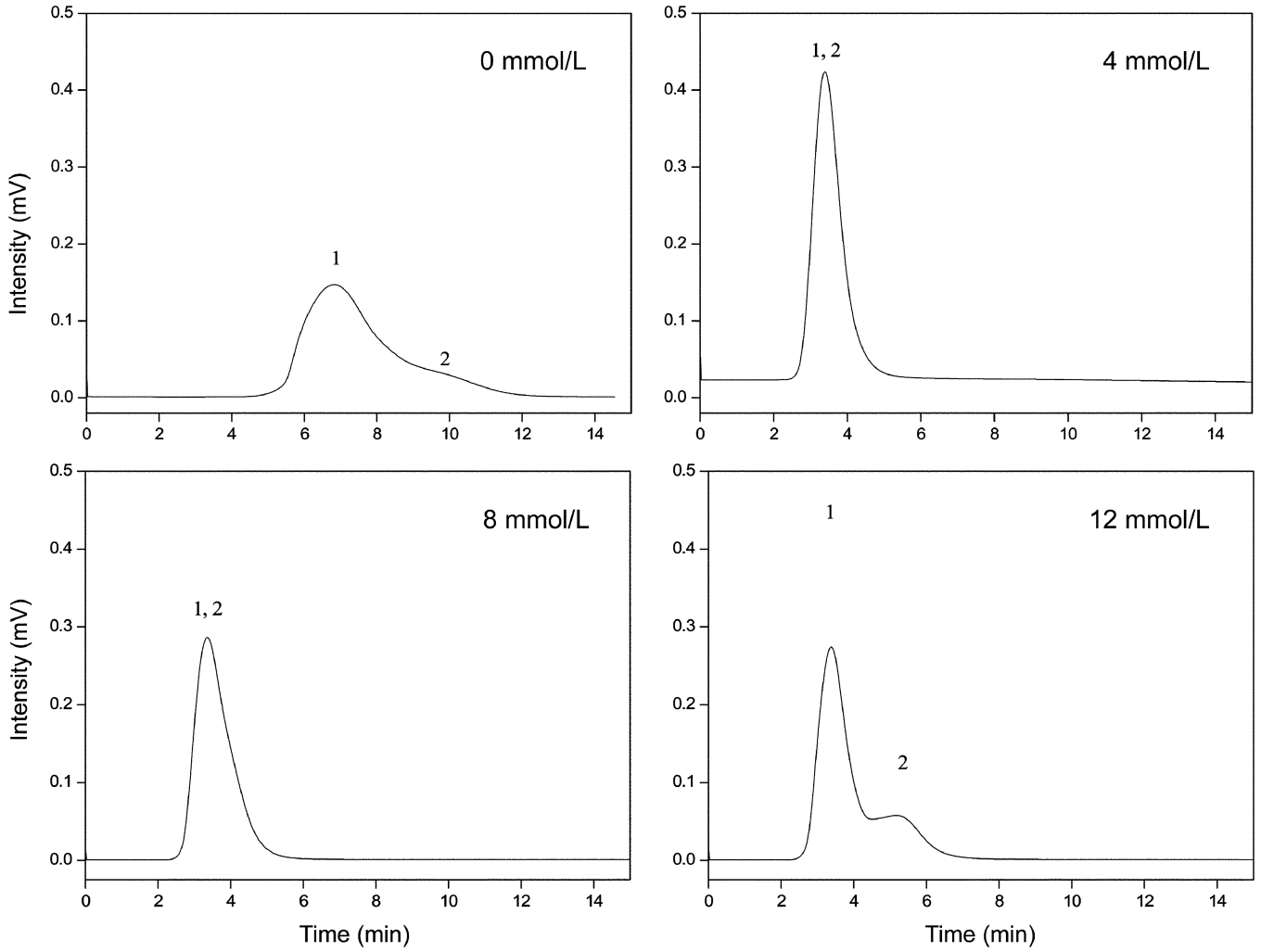


Fig. 4. Chromatograms of N-CBZ-D-phenylalanine and D-tryptophan with a mobile phase containing different concentration of $[BMIm]^+[BF_4]^-$ at pH=3.0. 1:D-tryptophan; 2:N-CBZ-D-phenylalanine ($MeOH/H_2O$=80/20 vol.% with different concentrations of ionic liquid, 1ml/min, 10 μl injection volume, 254 nm).

술한 두 가지 D-아미노산을 분리하는데 있어서 아주 낮은 이론단수를 가졌다. 이온성 액체의 농도를 증가함에 따라 이론단수를 증가할 수 있으며, 이론 단수가 증가한다는 것은 피크의 tailing과 broadening을 감소하고 칼럼의 효율을 증가시킬 수 있다는 것을 설명한다. 80%의 메탄올을 이동상으로 하여 이온성 액체를 첨가하였을 때, N-CBZ-D-phenylalanine과 D-tryptophan의 이론단수는 증가하는 경향을 나타내었으며, 23에서 61사이의 낮은 분리도를 나타내었다. N-CBZ-D-phenylalanine과 D-tryptophan의 이론단수는 거의 비슷한 값을 가졌으며, 이온성 액체의 농도의 증가와 함께 증가하는 경향을 나타내었다.

Fig. 5에서는 이온성 액체의 농도에 따른 체류인자의 변화를 나타내었다. 65% 메탄올이 주성분인 이동상 중에 이온성 액체를 첨가함으로써 N-CBZ-D- phenylalanine의 체류인자는 4.1에서 4.4사이의 일정한 값을 가졌다. 반면에, D-tryptophan의 체류인자는 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 급격히 감소하였다. 0.5 mmol/L의 이온성 액체를 첨가함으로써 D-tryptophan의 체류인자는 4.1에서 2.1로 감소하였으며, 15.0 mmol/L의 이온성 액체를 첨가하였을 때

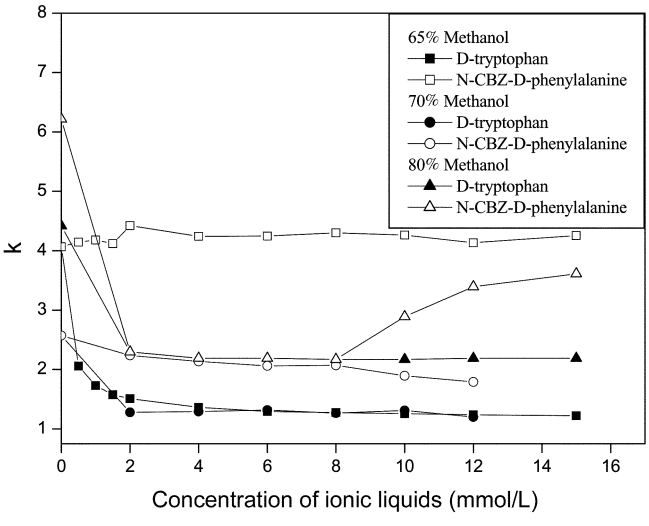


Fig. 5. Effect of concentration of ionic liquids on retention factor.

에는 1.2로 감소하였다. N-CBZ-D- phenylalanine과 D-tryptophan의 선택성도 1.0에서부터 3.5로 증가하였다. 70%의 메탄올이 주성분인 이동상 중에서도 마찬가지로 이온성 액체를 첨가하면 D-tryptophan의 체류인자는 3.3에서 1.4로 급격히 감소하였지만, N-CBZ-D-phenylalanine의 체류인자는 2.9에서 3.0 사이로서 거의 변화가 없었다. 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 D-tryptophan의 체류인자는 1.4에서 1.1로 차츰 감소하는 경향을 나타내었다. 반면에 N-CBZ-D-phenylalanine의 체류인자는 거의 변화가 없었다. 이온성 액체는 D-tryptophan의 체류인자를 감소함으로써 D-tryptophan과 N- CBZ-D-phenylalanine사이의 체류시간의 차이를 내여 분리도를 증가할 수 있었다. 이동상 중에 이온성 액체 2.0 mmol/L을 첨가함으로써 D-아미노산의 선택성은 0.9로부터 2.1로 급격히 증가하였으며, 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 이온성 액체의 농도가 12.0 mmol/L일 때, D-아미노산의 선택성은 2.6으로써 가장 높았다. 80%의 메탄올을 이동상으로 하였을 때, 2.0 mmol/L부터 8.0 mmol/L의 이온성 액체를 첨가함으로서 두 가지 D-아미노산의 체류인자는 감소하는 경향을 나타내었으며, 10.0 mmol/L 농도 이상의 이온성 액체를 첨가함에 따라 N-CBZ-D-phenylalanine의 체류인자가 증가하였다.

상대적으로 낮은 극성을 가진 메탄올의 높은 함량으로 하여 두 가지 아미노산의 체류시간이 단축되었다. 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라, 더욱이 10.0 mmol/L 농도 이상에서부터 큰 극성을 가지는 이온성 액체의 작용으로 인하여 다시금 N-CBZ-D-phenylalanine의 체류인자를 증가시켰다. 이온성 액체의 양이온 부분과 분석물질의 극성을 가진 부분이 역상 실리카 겔과의 경쟁흡착으로 극성 화합물이 비극성 화합물에 비해 이온성 액체와 상호작용을 더 많이 함을 알 수 있다.

선택성도 체류인자의 변화와 마찬가지로 10.0 mmol/L 농도 이상에서부터 증가하는 경향을 나타내었다. 80% 메탄올에 15.0 mmol/L의 이온성 액체를 첨가하였을 때, 이 두 가지 D-아미노산에 대한 선택성은 1.6이었다. 기존의 고성능 액체 크로마토그래피에서는 칼럼에 충진된 흡착제와 이동상간의 확산 혹은 입자와 입자사이의 흡착과 탈착의 메커니즘으로 분리가 되는데, 상용되는 흡착제의 대부분은 다공성 입자이다. 큰 흡착능력, 큰 표면적이 흡·탈착에 유리하기 때문에 결과적으로 미세한 구멍이 많이 필요하다. 흡착질 분자는 흡착제 입자 밖에서 들어오고, 입자 안쪽으로 확산되어 사용할 수 있는 흡착자리를 가득 채운다. 흡착제 구조에 의존하는 확산메커니즘의 몇몇 다른 형태가 지배적이 되고 때때로 둘 또는 세 가지가 경쟁적으로 흡착한다. 그러한 지배적 메커니즘은 또한 흡착제와 흡착질의 조합과 온도, 농도 범위 같은 흡착조건에 의존한다[16, 17].

이온성 액체를 첨가함으로써 양이온과 고정상 중의 실라놀 그룹, C_{18}과 상호 작용력을 형성하며 이동상 중에 용해된 물질의 에너지를 감소시킨다. 그러한 경쟁성 흡착력으로 하여 물질의 서로 다른 체류인자를 가져 올 수 있다. 음이온과 양이온으로 구성된 이온성 액체는 이동상 중에서 높은 극성의 세기를 나타내며, 서로 다른 구조를 가진 D-tryptophan과 N-CBZ-D-phenylalanine과의 작용력이 서로 다를 것이다. 큰 기능성 그룹을 가진 N-CBZ-D-phenylalanine과의 작용은 거의 없었고, 상대적으로 구조가 작은 D-tryptophan은 이온성 액체의 영향을 많이 받았다. 하나의 카르복실기를 가지는 N-CBZ-D-phenylalanine은 아미노기에 큰 carbobenzyloxy 그룹이 붙어서 이온성 액체의 양이온과 작용하는데 저해하고 있기 때문으로 판단된다. 반면에 D-tryptophan은 하나의 카르복실기에 또 벤젠 고리 외의 아미노기에 붙은 기능성 그룹이 없기 때문에 이온성 액체의 양이온과 작용하는데 도움을 주고 있다. 또한, 벤젠 고리 안의 아미노기도 이러한 작용력의 크기를 증가시킬 수 있다. 이러한 원인으로 D-tryptophan의 체류인자는 N-CBZ-D-phenylalanine보다 이온성 액체의 농도의 영향을 많이 받는다.

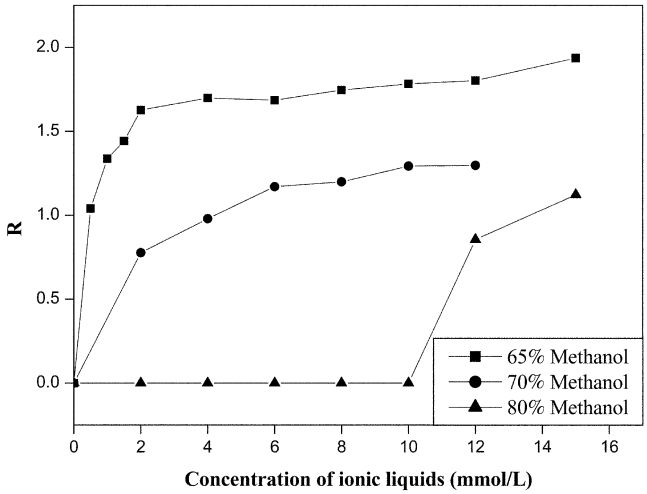


Fig. 6. Effect of concentration of ionic liquids on resolution.

Fig. 6에서는 이온성 액체의 농도에 따른 분리도의 변화를 나타내었다. 65%의 메탄올 중에 이온성 액체를 첨가함으로써 가장 높은 분리도를 가졌다. 메탄올의 함량이 높아짐에 따라 극성이 상대적으로 낮은 메탄올의 작용으로 인하여 분리도는 상대적으로 낮았다. 65%의 메탄올 중에 이온성 액체를 첨가함으로써 분리도는 증가하였으며, 농도가 증가함에 따라 분리도는 증가하였다. 65% 메탄올에 15.0 mmol/L 농도의 이온성 액체를 첨가하였을 때에, 두 가지 D-아미노산의 분리도는1.9로써 가장 높았다. 2.0 mmol/L 이상의 농도의 이온성 액체를 첨가함으로써 분리도는 1.6 이상으로써 65%의 메탄올 중에 2.0 mmol/L의 이온성 액체를 첨가하는 것이 가장 적절하다고 생각한다. 이온성 액체가 가장 적게 첨가되었고, 분리도가 1.5 이상이기에 경제적이면서도 분리의 목적에 도달할 수 있기 때문이다. 70% 메탄올 중에 2.0 mmo/L의 이온성 액체를 첨가함에 따라 분리도는 0.0에서부터 0.8로 급격히 증가하였다. 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 분리도는 증가하였으며, 6.0 mmol/L의 농도를 초과함에 따라 D-아미노산의 분리도가 1.1 이상을 나타내었고, 분리도는 증가하는 폭이 작았다. 이온성 액체의 농도가 12.0 mmol/L일 때, D-아미노산의 분리도는 가장 높았으며, 1.3이었다. 80% 메탄올 중에 첨가한 이온성 액체의 농도가 각각 10.0, 12.0, 15.0 mmol/L일 때, 두 가지 D-아미노산의 분리도는 각각 0.3, 0.8, 0.9로써 증가하였지만, 65%와 70% 메탄올이 주성분일 때보다 분리도가 낮았으며, 이온성 액체의 영향보다 메탄올 조성의 영향을 많이 받았을 것으로 판단된다.

4. 결 론

역상 액체 크로마토그래피의 이동상 중에 첨가된 이온성 액체의 농도가 증가함에 따라 D-아미노산의 분리도가 증가하였으며, 체류

시간을 감소시켰다. 높은 극성을 가지고 있는 이온성 액체를 이동상 중에 첨가함으로써 전혀 분리가 되지 않았던 두 가지 D-아미노산의 분리가 가능하게 되었다. 65%, 70%, 80%의 메탄올 중에서 65%의 메탄올 중에 이온성 액체를 첨가함으로써 우수한 분리도를 가졌다. 65% 메탄올 중에 0.5 mmol/L의 이온성 액체를 첨가함으로써 분리도는 1.0이었으며 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 70% 메탄올 중에 첨가된 이온성 액체의 농도가 6 mmol/L를 초과함에 따라 D-아미노산의 분리가 가능하였으며, 분리도가 증가하는 폭이 작았다. 상온에서 pH가 3.0인 65%의 메탄올 중에 2 mmol/L의 이온성 액체를 첨가하여 사용하는 것이 이 두 가지 D-아미노산을 분리함에 있어서 최적의 이동상 조건이었다. 이온성 액체는 피크의 broadening과 tailing을 감소시키며, D-아미노산의 분리도를 증가시킨다. 이온성 액체를 크로마토그래피의 이동상 중에 첨가함으로써 천연물에서부터 유용성분의 분리에도 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Liu, J., Jonsson, J. A. and Jiang, G., "Application of Ionic Liquids in Analytical Chemistry," *Trends Anal. Chem.*, **24**(1), 20-27 (2005).
2. Gordon, C. M., "New Developments in Catalysis Using Ionic Liquids," *Appl. Catal.*, *A*, **222**(1-2), 101-117(2001).
3. Jiang, T. F., Gu, Y. L., Liang, B., Li, J. B., Shi, Y. P. and Ou, Q. Y., "Dynamically Coating the Capillary with 1-alkyl-3-methylimidazolium-based Ionic Liquids for Separation of Basic Proteins by Capillary Electrophoresis," *Anal. Chim. Acta.*, **479**(2), 249-254 (2003).
4. Xiao, X., Zhao, L., Liu, X. and Jiang, S., "Ionic Liquids as Additives in High Performance Liquid Chromatography Analysis of Amines and the Interaction Mechanism of Ionic Liquids," *Anal. Chim. Acta.*, **519**(2), 207-211(2004).
5. Liu, J., Chi, Y., Jiang, G., Tai, C., Peng, J. and Hu, J., "Ionic Liquid-based Liquid-phase Microextraction, A New Sample Enrichment Procedure for Liquid Chromatography," *J. Chromatogr. A*, **1026**(1-2), 143-147(2004).
6. Tian, K., Qi, S., Cheng, Y., Chen, X. and Hu, Z., "Separation and Determination of Lignans from Seeds of Schisandra Species by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Using Ionic Liquid as Modifier," *J. Chromatogr. A*, **1078**(1-2), 181-187(2005).
7. Liu, J., Li, N., Jiang, G., Liu, J., Jonsson, J. A. and Wen, M., "DisPosable Ionic Liquid Coating for Headspace Solid-phase Microextraction of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes in Paints Followed by Gas Chromatography-flame Ionization Detection," *J. Chromatogr. A*, **1066**(1-2), 27-32(2005).
8. Peng, J., Liu, J., Jiang, G., Tai, C. and Huang, M., "Ionic Liquid for High Temperature Headspace Liquid-phase Microextraction of Chlorinated Anilines in Environmental Water Samples," *J. Chromatogr. A*, **1072**(1), 3-6(2005).
9. Qi, S., Cui, S., Chen, X. and Hu, Z., "Rapid and Sensitive Determination of Anthraquinones in Chinese Herb Using 1-butyl-3-Methylimidazolium-based Ionic Liquid with-cyclodextrin as Modifier in Capillary Zone Electrophoresis," *J. Chromatogr. A.*, **1059**(1-2), 191-198(2004).
10. The Oncology Website : http://home.kmu.ac.kr/~food/resources/amino%20acid.htm [5 January 2006].
11. Peter, A., Torok, G., Armstrong, D. W., Toth, G. and Tourwe, D., "High-performance Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers of Synthetic Amino Acids on a Ristocetin A Chiral Stationary Phase," *J. Chromatogr. A*, **904**(1), 1-15(2000).
12. Hui, F., Ekborg-Ott, K.H. and Armstrong D. W., "High-perforMance Liquid Chromatographic and Capillary Electrophoretic Enantioseparation of Plant Growth Regulators and Related Indole Compounds Using Macrocyclic Antibiotics as Chiral Selectors," *J. Chromatogr. A*, **906**(1-2), 91-103(2001).
13. Peter, A., Vekes, E. and Armstrong, D. W., "Effects of Temperature on Retention of Chiral Compounds on A Ristocetin A Chiral Stationary Phase," *J. Chromatogr. A*, **958**(1-2), 89-107(2002).
14. Yaher, M., Koel, M. and Kaljurand, M., "Application of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based Ionic Liquids in Non-aqueous Capillary Electrophoresis," *J. Chromatogr. A*, **979**(1-2), 27-32(2002).
15. He, L., Zhang, W., Zhao, L., Liu, X. and Jiang, S., "Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based Ionic Liquids as the Eluent on the Separation of Ephedrines by Liquid Chromatography," *J. Chromatogr. A*, **1007**(1-2), 39-45(2003).
16. Koo, Y. M. and Row, K. H., "Separation Technology of Biopolymers by High-Performance Membrane Chromatography," *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **11**(8), 807-815(2000).
17. Jin, Y., Han, S. K. and Row K. H., "Extraction and Purification of Eupatilin from Artemisia Princeps PAMPAN," *J. Korean Chem. Soc.*, **49**(2), 196-200(2005).