

제 2 차 년 도
연 차 보 고 서



특수물질의 분리, 분석 및 해석기법 연구

A Study on the Separation, Analysis or Interpretation of Valuable Material

광학이성질체의 분리에 관한 연구

A Study on the Separation of Optical Isomer

연구기관
한국과학기술연구원

寄贈
一九九二年一月三日
과학기술원
寄贈本

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “특정물질의 분리, 분석 및 해석기법”의 세부과제인 “광학이성질체의 분리에 관한 연구” 사업의 연차보고서로 제출합니다.

1991. 7.

주관연구기관명: 한국과학기술연구원

연구부서명: 정밀화학연구부

총괄연구책임자: 김택제(정밀화학연구부 책임연구원)

연구책임자: 이재성(정밀화학연구부 선임연구원)

연구원: 김택제(정밀화학연구부 책임연구원)

어연우(정밀화학연구부 책임기사)

홍종기(정밀화학연구부 연구원)

이경미(정밀화학연구부 연구원)

한상돈(정밀화학연구부 연구원)

여 백

요 약 문

I. 제 목

광학이성질체의 분리에 관한 연구(2차)

II. 연구의 목적 및 중요성

광학이성질체는 의약합성중 상호존재하고 천연시료 중 아미노산은 자연적으로 이성화하여 체내노화에 중요한 역할을 한다. 따라서 의약의 정확한 효능을 연구하거나 광학이성질체의 생화학적 반응을 연구하기 위하여 이것의 분리가 중요성을 가진다. 이미 선진국에서 규제가 시작되고 있는 이성질체 의약의 함량분석법에 대처하고 제조과정에 도움이 되고자 본 연구를 추진하였다.

단백질에서 아미노산의 분리과정 중 이성화되는 요소에 대해 검토해 보고 또 GC에 의한 분리과정중 겹치는 몇개의 아미노산을 GC/MS의 새로운 기법으로 분석하려 시도하였다. LC를 이용한 분리과정 중 제일 좋은 편이성을 지닌 cyclodextrin bonded phase를 사용하여 아미노산 이성질체를 분리하려는 것이 본 연구의 목표이다.

III. 연구의 내용 및 범위

이미 전년에 분석한 38종의 아미노산중 alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine을

대상으로 열처리, 산처리, UV 광선조사, trypsin 영향을 살펴보고 6N HCl로 105°C를 가했을 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 시도하였고 cyclodextrin과 d, l-form의 아미노산간의 inclusion complex 형성도를 비교해서 분리되는 과정을 추적하려 시도하였다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. 열처리(105°C), 산처리(6N HCl), UV 조사, enzyme 첨가에 의한 l-form amino acid인 alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine의 d-form으로 racemization되는 정도를 측정하여 본 결과, 오직 열처리에서만 aspartic acid와 glutamic acid가 극소량 이성화하여 2일뒤에 0.31%, 0.90% 이성화 비율을 얻었다. 그러나 그외의 조건하에서는 몇일간 이내에서 이성화 현상을 측정할 수 없었다.
2. 4일간 105°C 열처리와 6N HCl을 가열하였을 때 alanine은 1.5%, isoleucine은 1.2%, aspartic acid는 2.5%, glutamic acid는 3.0% tyrosine은 1.6% 정도 racemization이 되어 정량적인 분석일 때는 가수분해시간을 정확히 조절하는 것이 오차를 줄이는 중요한 과정이었다.

3. TFA-19A 유도체를 만들 때 chirasil val column을 사용하면 d-threonine, d-valine ; l-isoleucine, d-serine ; d-leucine, l-serine ; d, l-proline이 분리가 되지 않았는데 d, l-proline을 제외한 나머지는 Mass spectrometer를 이용하여 구별이 가능하였다.
4. 아미노산의 TFA-19A 유도체중 특이의 mass fragment는 alanine (140, 168, 72, 92), threonine (153, 152, 84, 266), valine (168, 153, 55, 114), glycine (126, 154, 78, 58), isoleucine (182, 153, 171, 213), serine (139, 138, 280, 252), leucine (182, 140, 153, 168), norleucine (182, 126, 140, 153), proline (166, 96, 253, 211), cystein (140, 268, 170, 216), aspartic acid (184, 139, 212, 229), hydroxy proline (164, 279, 94), methionine (61, 171, 75, 287), glutamic acid (198, 180, 226, 152), phenyl alanine (91, 190, 148, 103), tyrosine (260, 203, 302, 328), ornithine (166, 306, 279, 211), lysine (180, 294, 321, 67), histidine (278, 206, 81, 153), tryptophan (226, 325, 438, 283) 이었다.
5. α , β -cyclodextrin과 benzaldehyde, aniline의 inclusion complex는 NMR과 IR의 peak shift로 확인되었다.
6. d, l-phenyl alanine과 o, m, p-nitroaniline을 대상으로 실험하여 본 결과 C-18 column 보다 β -cyclodextrin bonded phase가 이성질체 분리에 우수한 효능이 있음이 증명되었다.
7. Bulky한 몇 종류의 광학이성질체의 약품분리는 cyclodextrin column도 별로 좋은 분리능을 보여주지 못하였다.

8. Dansyl amino acid의 이성질체분리는 β -cyclodextrin을 사용하였을 경우 leucine, novaline, methionine, glutamic acid, valine, α -amino-n-butyricacid, norleucine, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid가 분리가 되었다.
9. Inclusion complex의 정도를 Dansyl-amino acid로 비교하여 본 결과 d-formol α, β -cyclodextrin과 elution 되었고 GC에서 chirasil-val column에서의 다른 방향이었다.

V. 계획과 실적의 대비표

----- 당초계획
 —— 진도

연구내용	수 분												진도 (율)
	'90 7	8	9	10	11	12	'91 1	2	3	4	5	6	
1. 자료수집정리	----->												10
2. 시약구입정제	----->												20
3. 이성화 조건 연구	----->												20
4. Mass fragmentation 에 대한 연구	----->												20
5. HPLC를 이용한 분석방법	----->												20
6. LC에서의 분리 과정 연구	----->												5
7. 보고서 작성	----->												5
총 진도 율	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10	5	5	100

SUMMARY

I. Title

"A Study on the Separation of Optical Isomer"

(The Second Report)

II. The Purpose and Importance of the Project

Enantiomers in synthetic drugs are contained together. Especially natural products such as amino acid is racemized spontaneously generating the degradation of biological body. Therefore its importance of separation comes from demands on study for exact effect of synthetic drugs and the reactivity of enantiomer in biological system. In order to prepare restrictions of advanced country on enantiomeric drugs and to provide information on manufacturing process, the process of hydrolysis of protein into amino acid. We attempt to separate several amino acids with GC/MS, which are overlapped each other on single GC separation. At the same time our study is bound for the separation of amino acid enantiomers with convenient cyclodextrin bonded phase by HPLC.

III. Contents of the Research

The rate on racemization was measured due to heat, acid, UV-

light, trypsin (enzyme) and combined effect by 6N HCl at 105°C on alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine among 38 amino acids analyzed during first period. The method for the identification of overlapped amino acids on GC chromatogram was developed from the close study of fragmentation pattern with mass spectrometry. Under the help of the cyclodextrin bonded phase with HPLC, the separation of dansyl amino acid was performed and the mechanism on the separation due to d, l-form amino acid and cyclodextrin inclusion complex was investigated.

IV. Results and Suggestions

1. Among the conditions by heat treatment (105°C), acid treatment, UV-light, addition of enzyme on alanine, threonine, isoleucine, leucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine, the racemization phenomenon on aspartic acid and glutamic acid is seen a little, 0.31% 0.9% after two days passage respectively only due to heat treatment. But by other conditions, racemization did not happen for several days.
2. Under the treatment of heat (105°C) and 6N HCl for four days, racemization rate was 1.5% on alanine, 1.2% on isoleucine, 2.5% on glutamic acid, 1.6% on tyrosine. Therefore time control during hydrolysis procedure is critical for accurate quantitative

analysis.

3. With TFA-IPA derivatization on chirasil-val column, d-threonine, d-valine ; l-isoleucine, d-serine ; d-leucine, l-serine ; d, l-proline could not be separated, but introduction of mass spectrometer provides identification of amino acid each other simultaneously.
4. The specific ion fragment of amino acid on TFA-IPA derivatives are listed in braket ; alanine (140, 168, 72, 92), threonine (153, 152, 84, 266), valine (168, 153, 55, 114), glycine (126, 154, 78, 58), isoleucine (182, 153, 171, 213), serine (139, 138, 280, 252), leucine (182, 140, 153, 168), norleucine (182, 126, 140, 153), proline (166, 96, 252, 211), cystein (140, 268, 170, 216), aspartic acid (184, 139, 212, 227), hydroxy proline (164, 279, 944), methionine (61, 260, 203, 328), ornithine (166, 306, 279, 211), lysine (180, 294, 321, 67), histidine (278, 206, 81, 153), tryptophan (226, 325, 438, 283).
5. The inclusion complex between α , β -cyclodextrin and benzaldehyde or aniline were confirmed with peak shift on NMR or IR.
6. On the separation of enantiomeric compound, β -cyclodextrin bonded phase has shown superiority over C-18 column for d, l-phenyl alanine and o, m, p-nitroaniline.
7. It was not satisfactory even on cyclodextrin column for several bulky enantiomer synthetic drug.
8. For the separation of dansyl amino acid with β -CD column,

following enantiomers were separated ; leucine, novaline, methionine, glutamic acid, valine, α -amino-n-butyric acid, norleucine, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid.

9. The strength of inclusion complex between d-form dansyl amino acid and α, β -CD was superior to l-form amino acid making elution order reversed with GLC, chirasil-val column.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Experimental Material and Method.....	21
1. Standard Materials and Reagents	21
2. Analytical Instrument and Apparatus.....	21
3. Experimental Method	22
(1) The condition of GLC	22
(2) The detection parameter of GC/MS	23
(3) The analytical condition of LC	24
(4) Choice of amino acids on isomerization	25
(5) Preparation of stock solution for amino acids and its derivatization	25
(6) Preparation of complex between cyclodextrin and organic compound	26
(7) Comparison on the effect of cyclodextrin column	26
(8) Separation of organic isomer	27
(9) Separation of amino acids derivatized.....	27
(10) Selectivity of α , β -cyclodextrin on d, l-AA derivatized	28
Chapter 3. Results and Observation	30

1. Isomerization of l-amino acids at various conditions.....	30
2. Derivatization and chromatographic properties of amino acid	30
3. Interpretation on the fragmentation of TFA-IPA derivatives...	40
4. Formation of inclusion complex with α , β -cyclodextrin	50
5. The effect on column of β -cyclodextrin bonded phase.....	76
6. Separation on enantiomers of drug.....	79
7. Separation of amino acids derivatized	80
8. Selectivity of α , β -cyclodextrin on enantiomeric amino acids ...	87
 Chapter 4. Conclusion	 92
 References	 95

목 차

제1장 서론	15
제2장 실험재료 및 방법	21
제1절 표준물질 및 시약	21
제2절 분석기기 및 장치	21
제3절 실험방법	22
1. GLC의 검출조건	22
2. GC/MS의 검출조건	23
3. LC에서의 분석조건	24
4. 이성화 현상에 대한 아미노산의 선택	25
5. 아미노산의 stock solution 제제 및 유도체화 과정	25
6. Cyclodextrin과 유기물의 complex 조제	26
7. Cyclodextrin column의 효과 비교	26
8. 유기이성질체의 분리	27
9. 아미노산 유도체들의 분리	27
10. d, l-아미노산 유도체들에 대한 α, β -CD의 선택성	28
제3장 결과 및 고찰	30
1. 여러변화에 따른 l-form 아미노산의 이성화	30
2. Derivatization and chromatographic properties of amino acid...	36

3. TFA-IPA 유도체의 Mass fragmentation에 대한 해석	40
4. α, β -cyclodextrin과 inclusion complex의 형성	50
5. β -cyclodextrin bonded phase인 column의 효능	76
6. 의약품 이성질체의 분리	79
7. 아미노산 유도체들의 분리	80
8. α, β -cyclodextrin과 광학이성질체 아미노산과의 선택성	87
제4장 결 론	92
참 고 문 헌	95

제 1 장 서 론

Enantiomer는 물리적, 화학적 성질이 동일하여 구별하기 어렵고 다만 다른 광학이성질체와의 구조적 상호작용과 편광의 회전각도가 다르게 된다. 아울러 효소의 작용이나 kinetic 연구, X-ray crystallography에 대한 연구에서도 입체적인 배치상태가 서로 다른 역할을 함이 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. 즉, 대부분 의약의 효능은 거울상 이성질체의 혼합물의 특성(흡착, 분배, 생리현상, 배설작용)으로서 평가하지만, 많은 경우에 거울상 이성질체가 서로 다른 의약적 활성을 지니고 있음이 판명되었다. 이런 결정적인 예가 1960년대 미국에서 수면제로 널리 쓰였던 thalidomide로서 수면작용을 주는 것은 R-(+)-enantiomer이나 S(-)-enantiomer은 임신초기에 산모가 복용할 경우 기형아가 나올 확율이 높은 반면 수면작용은 없음이 1979년에 밝혀졌다. 반면에 R-form은 기형아 형성에 관여하지 않았다. 따라서 신의약을 합성하여 정확한 약리효과 및 생리효과를 연구하는데 본 연구의 중요성이 있으며, 부작용을 유발하는 한쪽 광학이성질체를 분리 후 제거할 수 있는 기술을 축적함으로써 제약산업에도 보탬이 되도록 하는 것이 본 연구의 목표이다.

생리적인 면에서 보면 광학이성질체의 선택성이 더욱 뚜렷해

진다. catecholamine은 신체내 생성된 물질로서 tyrosine의 생합성에 의해서 생성되며 혈압조절과 기타 몸의 조절작용에 영향을 주고 있는 중요한 조절성 호르몬이다. catecholamine의 생합성 바로 직전의 물질은 L-dopa (3-hydroxy-L-tyrosine)로서 카르복실기가 떨어져 dopamine이 형성한다. parkinson병의 치료는 일반적으로 환자의 L-form의 dopamine을 증가시킴으로 수행될 수 있다. 합성의약의 stereochemistry의 중요성은 R-(−)-epinephrine이나 R-(−)-isopropyl norepinephrine이 20배 내지 80배 반대 이성질체보다 효능이 더 좋다는데 찾아볼 수 있다.

광학이성질체를 분리하는데 있어서 최초로 공헌한 사람은 1948년 파스퇴르로서 (+), (−)-tartaric acid의 결정을 현미경과 편광을 이용하여 분리하였다. 이것은 역사적인 입장에서 중요한 mechanical separation이지만 응용면에서는 대단히 한정되어 있다. sodium ammonium tartrate 경우에도 27°C 이상에서는 이 방법을 사용할 수 없다¹⁾. 광학이성질체 분리의 다른 방법중 하나로 chiral reagent와 두 이성질체간 반응속도 차이를 이용한 kinetic 방법인데 한 이성질체의 천이 상태의 에너지가 서로 다름을 이용한 것이다. allene의 racemate가 optically active한 borane과 반응할 때 덜 반응성이 있는 allene이 농축되어 분리되었다^{2, 3)}.

효소도 여러종류의 생리적 천이에 촉매작용을 하며 한쪽 광학 이성질체와 선택적으로 반응함으로 racemate를 분리할 수 있다.

초기의 크로마토그래피법은 그들의 일부 성공적인 면에도 불구하고 지루하고 일반적으로 응용하기에 적합하지 못하였다^{4, 5)}. 따라

서 크로마토그래피를 이용한 enantiomer의 분리는 많은 어려운 점도 뒤따랐다. 그러나 장점으로는 resolving agent나 이성질체의 순도 등 조건이 까다롭지 않고 시료의 손실이 적으며 일반 시료에 적용할 때처럼 열역학적이거나 이론적인 지표들을 얻어낼 수 있다는 점이다⁶⁾. 고전적 거울상 이성질체 분리법과 다른 방법의 하나로서 크로마토그래피는 이성질체의 고정상이나 첨가물의 매개체와 분석물질의 상호작용을 이용한 최신의 분리방법이다. 즉, 짧은 시간동안 거울상 이성질체를 부분입체 이성질체로 형성하여 분리를 가능하게 하는 법으로서 안정한 착물을 형성할수록 더 분리가 잘 되어지고 있다.

광학이성질체를 분리할 수 있는 기기로 대별한다면 GC와 LC가 있고, chiral compound의 위상의 입장에서 보면 이성질체를 이동상에 첨가하는 경우와 이성질체를 고정상에 immobilize시켜서 이용하는 방법으로 대별할 수 있다. 서로 작용하는 분리메카니즘별로 살펴보면 삼차원적 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. 기타 많은 생리활성 유기물질도 이 방법을 사용하여 분리가 가능할 것이나 GC를 사용한 방법은 몇가지 어려운 점이 있다, 첫째 분리하려는 시료가 잘 기화하여야 되고, 높은 컬럼온도에서도 부분입체 이성질체 흡착물질의 무질서도(entropy)가

어느정도 차이가 있어야 한다. 또 컬럼자체의 높은 온도로 chiral 정지상이 racemate로 되어서 시간이 지남에 따라서 이성질체의 선택성이 없어져 버리고 말뿐더러 많은 양의 시료를 분취하기가 어렵다. 아울러 분석시료 자체의 racemization 반응이 일어날 우려도 있다. 이러한 이유로 LC에 의한 거울상 이성질체의 분리가 시도되어 많은 진전을 보게 되었다.

LC에 의한 방법은 GC에 의한 방법보다 resolution면이나 경제적인 취약성에도 불구하고 70~80% 유기 racemate를 분리하는데 사용될 수 있다. Three point interaction을 기초로 한 Pirkle type 정지상은 reverse phase에 불안정한 단점을 지닌다. 이것보다는 현재 덜 사용하고 있는 cyclodextrin을 기초로 한 column이 주요 생리활성물질에 대해서 좋은 결과를 보여주고 있고 앞으로의 연구에 많은 기대가 모아지고 있다.

Ligand exchange 방법을 사용한 것으로 주로 reverse phase 컬럼을 사용하였고 금속으로는 Cu^{2+} , Ni^{2+} 등을 사용하였다. Nimura⁷⁾ 등은 picomole의 AA를 N-(p-toluenesulfonyl)-L-phenylalanine을 넣어서 분리하였고 Lindner⁸⁾ 등은 (R,R)-tartaric acid mono-n-octylamide를 Kuniwa⁹⁾ 등을 N,N-dioctyl-L-alanine을 C_{18} 에 입혀서 hydrophobic한 AA를 분리하였고 Armani¹⁰⁾ 등은 L-aminoacylamide를 집어 넣어서 Dansyl AA를 Feibush¹¹⁾ 등은 N-w-(dimethylsiloxy)-undecanoyl-L-valine을 Lepage¹²⁾ 등은 diethylene-triamine을 넣어서 Takeuchi¹³⁾ 등은 β -cyclodextrin을 집어 넣어서 Gilson¹⁴⁾ 등은 L-aspartylcyclohexylamide를 첨가해서 Lam¹⁵⁾은 L-proline과 구리를 첨가하여 광학이성질체 아미

노산을 분리하였다. 이동상에 광학이성질 첨가물을 넣는 방법 이외에도 three point interaction을 하는 Pirkle 형태의 정지상을 이용할 수 있는데 Pirkle¹⁶⁾ 등은 합성한 정지상으로 광학이성질체의 다양한 분석방법을 시도하였고 Hyun¹⁷⁾은 *II*-acidic과 *II*-basic 부분을 갖는 정지상을 개발하여 사용하였고 Hara¹⁸⁾ 등은 이성질체 아마이드를 immobilized한 정지상을 Bank¹⁹⁾ 등은 pirkle의 전통적 정지상을 Pochapsky²⁰⁾ 등은 *n*-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -amino 산 유도체를 Yamashita²¹⁾ 등은 binaphthalene 유도체를 정지상에 Salvadori²²⁾ 등은 L-lactic acid를 정지상으로 하여 유도체된 AA를 Finn²³⁾ 등은 pirkle 형 정지상으로 arylalkyl carbinol을 분리하였다. Cyclodextrin을 정지상에 고정시키는 법도 최근에 도입하였는데^{24~36)} 내포착물을 형성함으로써 Guest-Host 분자의 상호작용으로 정지상이 안정하면서 분리능이 우수한 반면 적용범위가 pirkle type보다 광범위하지 못한 단점이 있다. 다른 정지상으로 단백질³⁷⁾ 이라든지 triacetyl cellulose³⁸⁾, Riboflavin 등도 사용하고 있다. SFC^{39, 40)}도 이용되는 경우도 있고 Mass도 동원이 된 경우도 있다^{41, 42)}. GC는 오래전부터 광학이성질체를 분리하는데 이용되어 왔고^{43~54)} 주로 유도체를 만들어 시료의 휘발성을 높인 다음에 사용하였다. 주로 유도체화 반응에서는 아민기와 알콜, 초산기 등 작용기를 이용하여 polar group을 masking하게 되는데 주로 acylation과 esterification을 하게 된다. GC에서 acylation 반응을 이용하는 것은 2-chloroisovaleryl chloride^{58~61)}, (s)-2-methoxy-2-trifluoro methyl phenyl acetyl chloride^{62, 63)} (-)methyl chloroformate⁶⁴⁾ 등의 시약을 사용하였고 esterification의 반응을 이용한

것은 2-phenyl propionyl chloride⁶⁵⁾, 2-phenyl butyryl chloride⁶⁶⁾, o-acetyl lactic chloride^{67, 68)} 할 때의 acylation은 N-carboxy-anhydride^{71~73)}, N-TFA-propyl chloride⁷⁴⁾, (-)-1-methoxy-1-methyl-1-(2-naphthyl)acetic acid⁷⁵⁾ 를 사용하였다. LC에서 esterification 반응은 MTPA-Cl^{76, 77)}, 1-(4-nitrophenyl)ethyl amine⁷⁸⁾, methyl phenyl alaninate⁷⁹⁾ 등이 보고되었다.

본 실험에서는 광학이성질체분리의 제2차년도로서 이성질체의 상호변환 조건과 GLC에서 서로 겹치는 아미노산의 측정을 위하여 Mass spectrometry의 도입 또 이성질체를 HPLC로 분리하기 위하여 bonded β -cyclodextrin의 효용성을 실험하고 analyte와 inclusion complex의 정도를 비교 실험하여 보았다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 표준물질 및 시약

표준아미노산은 Sigma Chem. Co.(U.S.A.)제로 약 5.0~10.0mg을 정확히 취한다음 0.1N HCl에 녹여 volumetric flask에 옮겨 100mL 되게 채운다. 이 용액을 5.0mL 피펫하여 사용하였으며 Dansyl amino acid도 동일한 방법으로 묽혀 실험하였다. α , β -cyclodextrin 은 ASTEC(Whippany, NJ, U.S.A.) 제품을 사용하였고 bonded phase 인 column도 ASTEC 제품으로 5 μ m, 25cm \times 4.6mm제원을 사용하였다. Methanol과 99.9% 초산은 HPLC용으로서 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, U.S.A.)제품을 aniline은 독일의 Marck사, benzaldehyde는 일본의 Kataya Chemical Co.의 1급시약을 사용하였다.

제 2 절 분석기기 및 장치

GLC는 Varian Vista 6000(U.S.A.)로 검출기는 flame ionization detector(FID)를 이용하였고 Vista 402 chromatograph data system을 사용하여 분석자료 및 chromatogram을 얻었다. 광학이성질체의 amino acid를 분리하기 위하여 GC column은 길이 20m 내경 0.53mm chirasil-val(Alltech associate inc., U.S.A.) column을 사용하였다.

GC/MS용으로 사용한 GC는 Hewlett Packard 5890A를 사용하

였으며 Mass spectrometer로 Hewlet Packard 5970A를 direct inter-phase를 사용해 이용하였다. 70eV의 electron impact energy를 가하였고 quadrupole type의 analyzer를 사용하였다. HPLC에 사용한 LC는 varian vista 5500형을 사용하였고 Astec α , β -cyclodextrin column과 waters의 C-18 bonda pack column을 사용하여 이성질체를 분리하려 하였다.

제 3 절 실험 방법

1. GLC의 검출 조건

GLC의 검출기는 FID이며 chirasil-val capillary column을 사용하였고 carrier gas(He)는 분당 3mL/min, make-up gas(He)는 분당 30mL씩 흘렸고 fuel gas로 수소 30mL/min, 공기 300mL/min로 조절하여 사용하였다. oven온도는 70°C에서 4분 유지하고 210°C까지 분당 3°C 승온하여 25분간 유지시켰다. 이상의 조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Gas Chromatographic Condition for the Determination of Amino Acid after Derivatization.

Gas Chromatograph	:	Varian vista 6000 Data system vista 402
Column	:	Capillary column 20m x 0.53mm Chirasil val
Oven temperature	:	<p style="margin-left: 100px;"> 70°C ——— 4min ——— $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ——— 210°C ——— 25min </p>
Detector	:	Flame Ionization Detector(FID) Temperature ; 270°C
Injector	:	Direct injector Temperature ; 230°C
Gas flow rate	:	Carrier gas He ; 3ml/min make-up gas 30ml/min H_2 30ml/min Air 300ml/min

2. GL/MS의 검출조건

GC/MS에서는 carrier gas를 분당 0.89mL/min로 고정한 다음 10:1로 split시켜 Mass에 도달하도록 하였고 기타 조건은 앞의 GC와 비슷하였다. 시료주입기의 온도는 230°C , interface의 온도는 225°C , ion source의 온도는 200°C 로 놓고 실험하였고 이의 조건은 Table 2에 기술되어 있다.

Table 2. Gas Chromatographic and Mass Spectrometric Condition for Analysis of Amino Acid after Derivatization.

Gas Chromatograph	:	Hewlett Packard 5890A
Column	:	Chirasil-val 50 m x 0.25 mm Temp. initial 70 °C for 4 min, rate 5 °C/min, final 210 °C for 25 min
Injector	:	Temp. 230 °C
Carrier Gas	:	He 0.89 mL/min Split ratio 10 : 1
Mass Spectrometer	:	Hewlett Packard 5970A
Interface	:	Direct interface , 225°C
Ion Source	:	200°C
Ionization Mode	:	Electron Impact (EI) , 70 eV
Analyzer	:	Quadrupole

3. LC에서의 분석조건

기기로서는 Varian vista 5500이나 Waters제품 HPLC를 사용하였으며 이동상으로 물, 메탄올, 초산을 이용하여 이성질체를 분리하려 시도하였다. 그러나 조성은 상태에 따라서 그 비율이 다소 변화하였다. 감지기로서 variable wavelength형의 UV-VIS을 사용하였고 229~280nm에서 시료를 측정하였다. 이동상은 isocratic mode로 0.5~1.0mL/min 흘려 분석하였다.

4. 이성화 현상에 대한 아미노산의 선택

Racemization 현상을 보여주고 있는 alanine, aspartic acid, glutamic acid를 대상으로 하여 시료를 정하였으며 phenyl alanine은 glutamic acid와 분리가 만족스럽지 못하였기 때문에(Chirasil-val column) 제외하였다. 작용기에 따라서 aliphatic group을 가진 isoleucine과 leucine을 선택하였고 sulfuric amino acid인 methionine, hydroxy group을 가진 threonine, phenyl group을 가진 tyrosine을 선택하여 여러 조건하에서 racemization되는 정도를 측정하였다.

5. 아미노산의 stock solution제제 및 유도체화 과정

l-form 아미노산 5~10mg을 무게를 달아 0.1N HCl용액 100mL에 녹이고 stock solution을 만든다음 5.0mL씩 취하여 여러 조건하에서 racemization되는 정도를 실험하였다. 열처리에 의한 효과는 5mL씩 2개의 시험관에 넣고 1, 2일 105°C oven속에 넣어둔 후 실험하였고 6N HCl용액은 stock solution 5mL에 conc. HCl 5mL를 서로 섞음으로 조제하였다. UV에 대한 영향은 stock용액을 1, 2일 상온에서 UV-lamp를 조사함으로 실험하였고 Trypsin용액은 25mg을 50mL의 증류수에 푼 다음 1mL를 취하여 5mL의 stock용액과 섞어 상온에서(25°C) 1, 2일 정도 놓아주어 실험하였다.

유도체화하는 과정은 시료의 반응조건을 맞추어 준 다음 시료를 1mL 정도로 농축하고(IPA:Acethyl Chloride=8:2)용액 0.5mL를 넣고 1시간동안 105°C를 유지함으로 해서 esterification을 하고 TFA 0.2mL, methylene chloride 0.3mL를 집어넣어 30분간 상온에서

반응시켜 acylation을 시킨 다음 evaporation하여 농축하고 ethyl acetate 0.2mL로 묽혀 1.0mL씩 GC에 주입하여 분석하였다. GC/MS에서는 동일한 방법으로 유도체화하여 시료를 분석하였다.

6. Cyclodextrin과 유기물의 complex 조제

β -cyclodextrin(β -CD)과 aniline과의 complex, β -CD와 benzaldehyde의 inclusion complex를 만들기 위해 β -CD 2.702g을 증류수 25mL에 녹여 aniline과 benzaldehyde를 각각 0.3mL씩 넣어 상온에서 12시간 저어주었다. 이때 2차증류수는 CO₂와 O₂를 제거하기 위하여 끓인 후 얼음에서 80°C까지 내린 후 사용하였다.

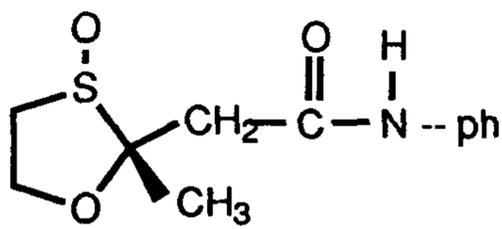
α -CD와 aniline, α -CD와 benzaldehyde complex도 동일한 방법으로 섞어주었는데 α -CD 2.16g을 7mL의 증류수에 녹이고 aniline과 benzaldehyde 0.3mL씩 집어넣어 12시간 저어주었다. 상기의 네종류의 용액을 거르고 건조시킨 후 NMR과 IR로 확인하였다.

7. cyclodextrin column의 효과비교

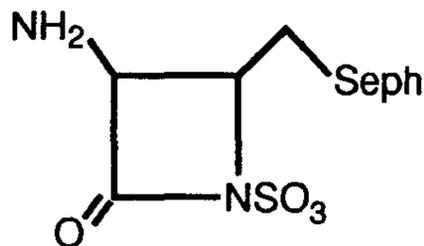
이성질체 분리능을 살펴보기 위해 ortho, meta, para의 nitroaniline을 혼합하여 HPLC chromatogram을 얻었다. Reverse phase인 C-18 column과 β -CD column을 사용하여 이성질체의 분리를 비교하였다. 또한 amino acid의 유도체인 Dansyl -d, l- phenyl alanine도 두 column의 분리능을 비교하였는데 이동상으로 methanol, water, acetic acid를 사용하였다.

8. 유기 이성질체의 분리

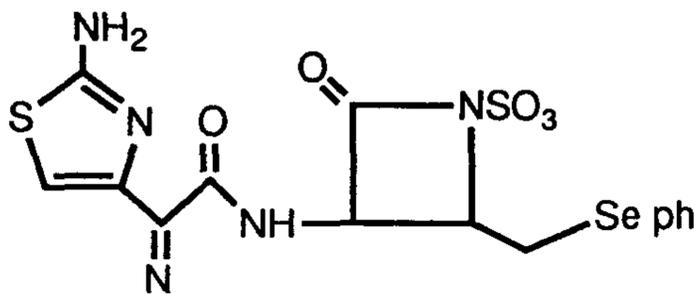
β -CD를 사용한 유기 이성질체 분리의 가능성을 살펴보기 위해 의약합성시료인 아래의 A, B, C를 택하여 용해도문제 때문에 MeOH/water/AcOH=78:20:2를 이동상으로 하고 229nm과 280nm에서 감지하였다.



(A) 1,3-oxathiolane-s-oxide



(B) (+) cis-3-amino-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid



(C) (+) cis-3-[(2-amino-diazole-4-yl)-2(methoxyimino) acetoamido]-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid triethylamine salt

9. 아미노산 유도체들의 분리

β -CD를 정자상으로 하여 Dansyl amino acid 유도체들의 표준물을 대상으로 그 분리능을 실험하였다.

대상으로 Dansyl- α -amino-N-butyric acid, Dansyl- α -amino-N-butyric 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-narvaline, Dansyl-d, l-methionine, N-Dansyl-d, l-serine, N-Dansyl-d, l-threonine, Dansyl-d, l-phenyl alanine, N, α -Dansyl-d, l-tryptophan, Dansyl-sarcosine으로 15종이다. 이 15종을 각각 MeOH/H₂O/CH₃COOH를 78:20:2로 만든 이동상과 같은 용액에 0.1~0.3%로 만들어 10 μ l씩 주입하였다.

10. d, l-아미노산 유도체들에 대한 α , β -CD의 선택성

β -CD가 d-form과 l-form에 대한 선택성을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. Dansyl- α -amino-n-butyric 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 β -CD가 1mg, 2mg, 5mg씩 들어있는 vial에 넣었다. α -CD도 동일한 방법으로 혼합물을 조제하였다. 이 6개의 vial을 water bath에서 1시간동안 sonification시킨 뒤에 여과하여서 HPLC에 10 μ l씩 주입하여 α , β -CD와 Dansyl amino acid간의 inclusion complex의 정도를 측정하였다. 또한 β -cyclodextrin과 α -cyclodextrin의 양은 2mg으로 동일하게 하고 표준물질 3종이 혼합되어 있는 용액의 농도를 0.01%, 0.02%, 0.04%로 변화시켜 각각 3개씩 6개의 시료를 준비하였다. 이 6개의 vial을 water bath에서 1시간동안 sonification한 뒤 filter하여 10 μ l씩 2번 injection하였다. 각각의 HPLC 크로마토그램에서

모든 peak area를 가지고 free d, l-amino acid의 양을 비교하였고
순수표준물질과의 비율을 고려하여 inclusion complex되는 경향을 조
사하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. 여러 변화에 따른 l-form 아미노산의 이성화

Figure 1은 standard l-form amino acid인 alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine 1~2 μ g이 분리된 표준물질이고 d-form 아미노산은 거의 정량할 수 없을 정도로 감지되지 못하였다. 그때의 retention time과 selectivity coefficient가 Table 3에 기술되었다. Figure 2에서 보는 바와 같이 4일뒤 6N HCl과 105 $^{\circ}$ C로 처리하였을 때 d-formal racemization하여 생성됨이 확인되었고 그 값이 Table 4에 표시하였다. 그러나 산, UV, Trypsin을 가했을 경우 변화를 발견할 수 없었고 열을 가할 경우에만 미량이 racemization되는 현상을 측정할 수 있었으나 그것도 0.1N HCl용액에 시료를 용해하였기 때문에 산 촉매하에서의 복합적인 영향인 것 같다.

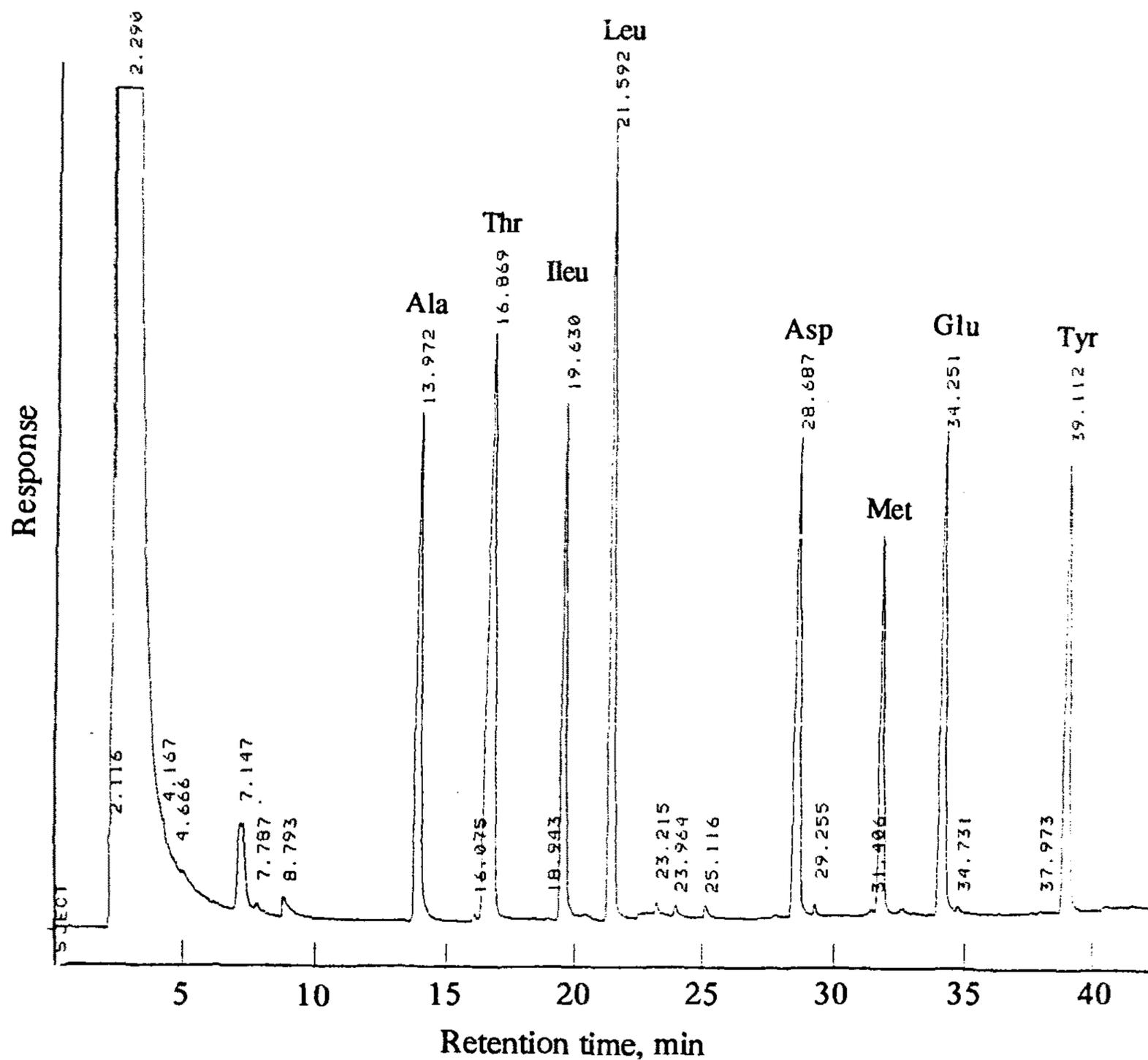


Figure 1. GC Chromatogram of l-form standard amino acids for IPA-TFA derivatives containing alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionin, glutamic acid, tyrosine. Alanine, aspartic acid, glutamic acid, were added for accurate measurement of d-form in natural products other amino acids are aimed for the study or racemization process.

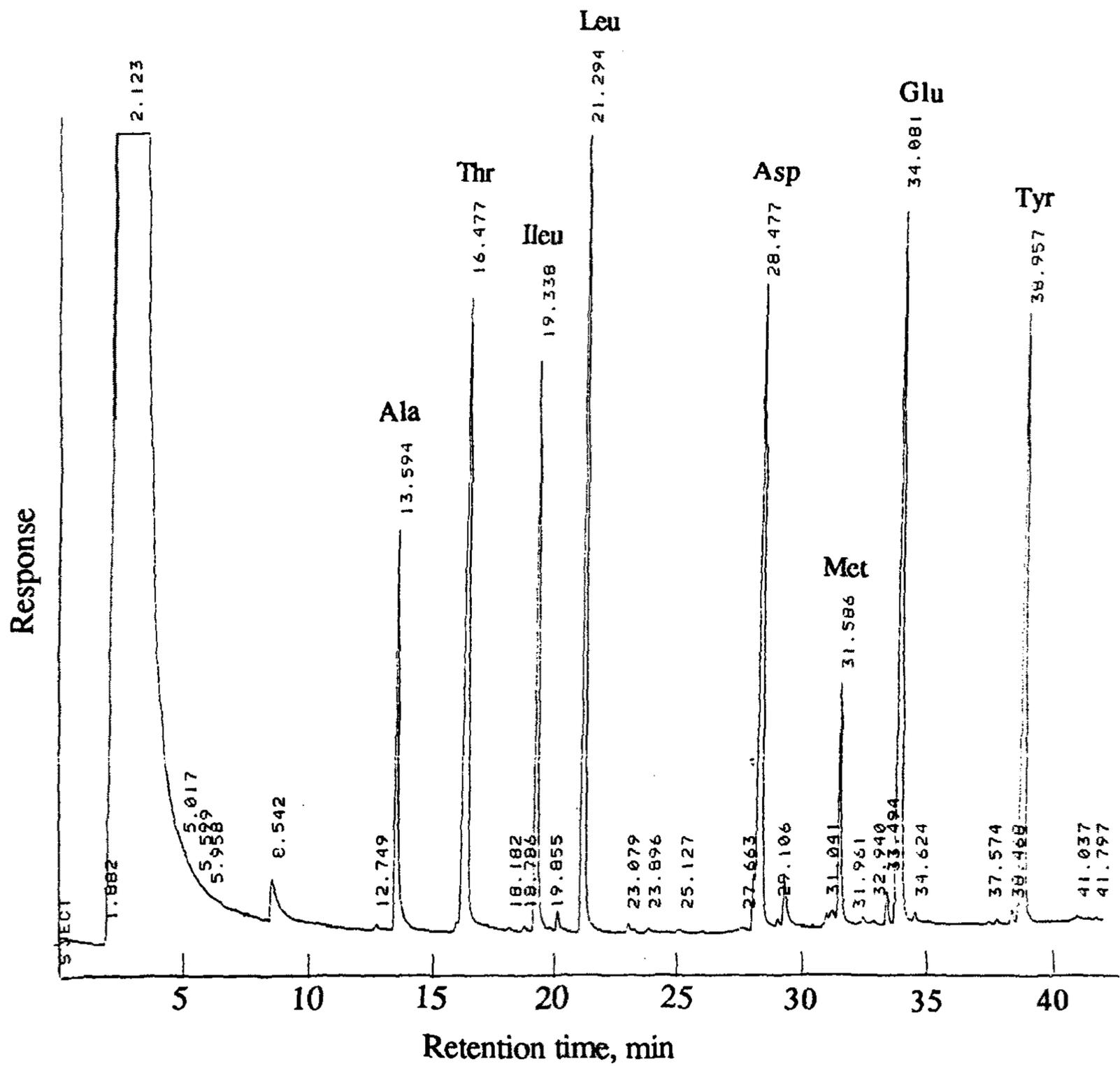


Figure 2. GC Chromatogram of l-form amino acids after in 6N HCL at 105°C for four day containing alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine. Methionine tends to be destroyed during the heating process showing decrease of peak significantly after four days treatment.

Table 3. Retention time of standard l-form amino acids by GLC with Chirasil-val column .

Name of A.A	Retention time (min)		$t_R-1.88$		α	κ'
	d	l	d	l		
1. Alanine	12.75	13.59	10.87	11.71	0.93	6.23
2. Threonine	15.54	16.48	13.66	14.60	0.94	7.77
3. Isoleucine	18.79	19.34	16.91	17.46	0.97	9.29
4. Leucine	20.02	21.29	18.14	19.41	0.93	10.32
5. Aspartic acid	28.15	28.48	26.27	26.60	0.99	14.15
6. Methionine	30.85	31.59	28.97	29.71	0.98	15.80
7. Glutamic acid	33.49	34.08	31.61	32.20	0.98	17.13
8. Tyrosine	38.47	38.96	36.59	37.08	0.99	19.72

Figure 3은 figure 1, 2중 racemization되는 d-form amino acid를 확대한 것으로 6N HCL, 105°C 상태하에서 이성화되는 현상이 완전함이 나타났다. 그러나 d, l-form 분리를 위해 단백질을 가수분해한 후 유도체를 시킨 24시간 가수분해과정은 많은 오차를 내기에는 짧은시간이지만 광학이성질체 중 아미노산의 분석에 있어서는 특히 신경을 써야 할 부분임이 본 실험의 결과로서 밝혀졌다. Methionine은 시간이 지나면서 파괴되는 양이 많아져서 racemization 되는 양을 측정할 수 없었다.

Table 4. Racemization of l-form amino acids under heat (105°C), acid(6N HCL) , UV light and enzyme as time passed.

Amino acid	Treat-ment Day	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 x 100

6N HCL + Heat 만 4 일까지 나머지 2 일

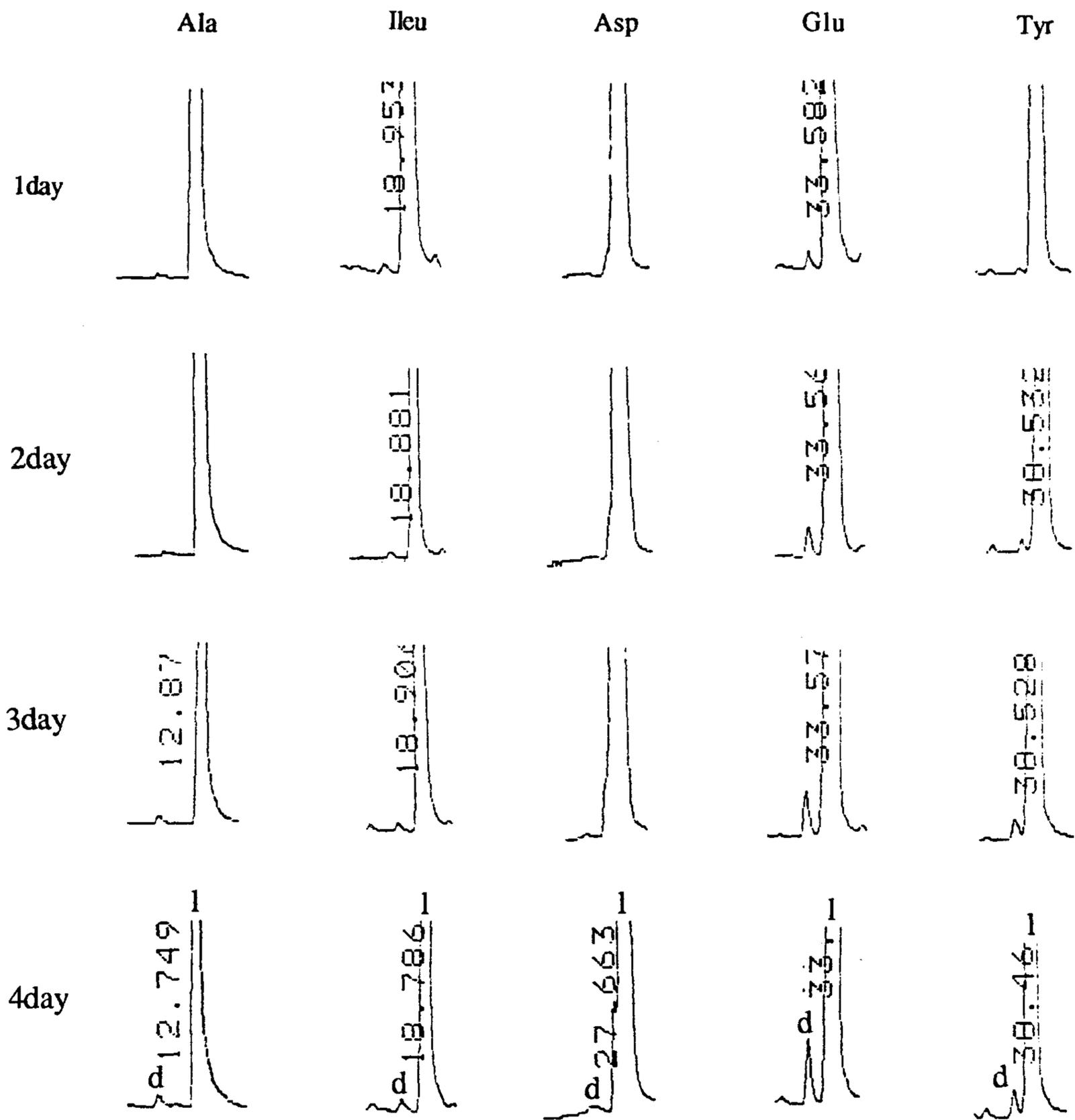


Figure 3. GC Chromatogram of l-form alanine, isoleucine, aspartic acid, glutamic acid, tyrosine according to time scale at 105°C with 6N HCL. Chrasil-val column was used after IPA-TFA derivatives with FID detector. Conditions are described in text. The ratio of racemization is increasing as time passed gradually.

2. Derivatization and Chromatographic properties of amino acids

일반적으로 amino acid들은 carboxyl, sulfur, hydroxy 및 amino group을 가지고 있으므로 hydrogen bond로 인하여 low volatility을 가지고 있다. 그러므로 amino acid을 GC/MS로 분석하기 위하여서는 functional group의 polarity를 줄여야하기 때문에 reagent을 선택하여 유도체를 만들어 분석하여야 한다. Amino acid에 대한 일반적인 유도체반응 scheme은 two step이다. Carboxyl group에 대하여 esterification과 다른 group 예를 들어 amino group에 대해 perfluoro acylation시키는 방법이 매우 유용하다. 물론 esterification 반응으로만 충분히 volatile하지만 trifunctional group을 가진 amino acid에 대해서는 involatile하다. 따라서 모든 polar한 group은 GC분석을 위하여 유도체와 반응을 시키는 것이 바람직하다.

그런데 trifunctional amino acid들 중 amide group을 가진 asparagine과 glutamine은 acidic condition하에서 dicarboxylic acid를 형성하는 문제를 야기시킨다. 즉 acid-catalyzed esterification과정 중 glutamine은 glutamic acid로 변하게 된다. 또한 primary 또는 secondary aliphatic hydroxyl group을 가진 serine과 threonine, 그리고 phenolic hydroxy group을 가진 tyrosine을 esterification과 trifluoroacylation을 시킨 유도체는 미량의 수분에 의해서 가수분해가 되고, GC분석 중 degradation이 일어나는 화학적으로 불안정성을 가지고 있다. imidazole ring을 가진 histidine의 경우 imidazole ring에 있는 질소에 trifluoroacyl group이 있으면 매우 불안정하고

imidazole ring에 유도체라 되지 않을때 peak tailing이 생기므로 three step derivatization과정이 필요하다. 본 실험에서도 esterification과 trifluoroacylation한 후 chloroethyl carbamate을 사용하여 imidazole ring에 안정한 N-ethoxycarbonyl histidine을 만들어 분석하였다. 그러나 이 반응의 첨가로 인해 methionine이 부분적으로 degrade되는 현상이 나타난다. Column으로서는 d, l-enantiomer를 분리하기 위해서 chirasil-val을 사용하였다.

Chirasil-val column은 polydimethylsiloxane에 안정한 amide linkage로 공유결합되어 있는 구조를 가지고 있다. 이 column은 210°C에서도 안정하고 짧은시간동안에는 250°C까지 열을 가할 수 있다. arginine, histidine 및 tryptophan을 포함하는 모든 amino acid enantiomer들의 분리를 반시간내에 분리할 수 있다. Chirasil-val은 amino acid의 enantiomer의 분리뿐만 아니라 hydroxy acid, amino alcohol, glycols, amines, carbohydrates 및 sulfoxide 등의 chiral 화합물의 분리에 매우 유용하다.

또한 Chirasil-val column은 자연 시료에서 amino-acid의 정량적인 determination에 대한 새로운 방법을 제공하였다. Figure 4는 17종의 D,L-enantiomer amino acid의 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 proline의 경우는 overlap되는 현상이 나타나지만 다른 amino acid들은 완전히 분리가 되어졌다. 이들 overlap되는 peak들 중 d-, l-proline과 d-, l-hydroxyproline을 제외한

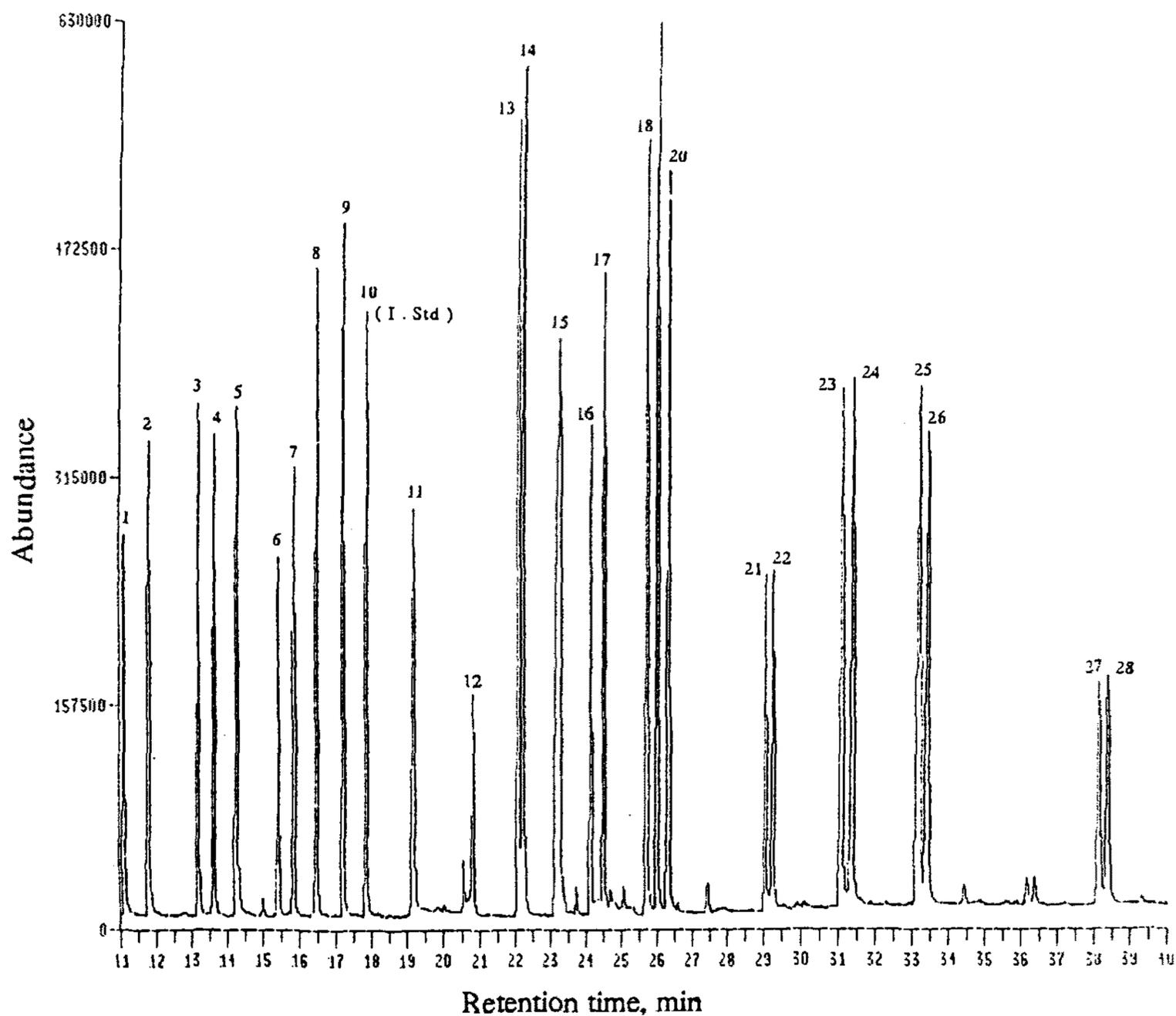


Figure 4. Total Ion Chromatogram of Amino Acid-N(O, S)-TFA, isopropyl ester derivative of standard mixture.

Peak identity ; 1. d-alanine, 2.l-alanine, 3.d-valine, 4.l-valine, 5.glycine, 6.d-isoleucin, 7.l-isoleucine, 8.d-leucine, 9.l-leucine, 10.l-norleucine(internal standard), 11.d-proline, 12.d-cystein, 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-lycine, 27.d-tryptophan, 28.l-tryptophan.

Table 5. GC retention time(RT) and Mass Spectral data for Amino Acid-N(O.S) - TFA isopropyl ester derivative

Compound	MW	RT	α	RN	Characteristic Ions(m/e)						
1 Alanine	227	11.205	0.626	3.56	140	168	72	92	170		
		11.883	0.664		(100)	(8)	(6)	(3)	(1)		
2 Threonine	355	13.120	0.733	2.25	153	152	84	266	294	198	
		13.625	0.762		(100)	(78)	(14)	(8)	(8)	(6)	
3 Valine	255	13.244	0.740	2.75	168	155	55	114	171	196	
		13.681	0.765		(100)	(38)	(77)	(16)	(11)	(6)	
4 Glycine	215	14.327	0.801	-	126	154	78	58	102		
					(100)	(29)	(13)	(13)	(6)		
5 Isoleucine	269	15.438	0.863	2.44	182	153	171	213	126	114	
		15.899	0.889		(100)	(74)	(48)	(16)	(16)	(19)	
6 Serine	339	16.259	0.909	2.38	139	138	280	252	184	170	
		16.448	0.919		(100)	(89)	(14)	(12)	(8)	(7)	
7 Leucine	269	16.511	0.923	3.11	182	140	153	168	171	166	210
		17.253	0.964		(100)	(98)	(29)	(25)	(22)	(17)	(12)
8 Norleucine (IS)	269	17.890	1.000	-	182	126	140	153	114	171	210
					(100)	(73)	(35)	(26)	(60)	(13)	(13)
9 Proline	253	19.214	1.074	N.M	166	96	253	211	71	194	
		19.214	1.074		(100)	(7)	(6)	(4)	(4)	(2)	
10 Cystein	355	20.161	1.127	1.65	140	268	170	216	250	313	296
		20.914	1.169		(100)	(87)	(30)	(17)	(17)	(11)	(10)
11 Aspartic acid	313	22.161	1.239	0.85	184	139	212	227	166	254	
		22.311	1.247		(100)	(46)	(84)	(31)	(26)	(12)	
12 Hydroxy- proline	365	23.342	1.305	N.M	164	279	94	306	94	67	
		23.342	1.305		(100)	(52)	(12)	(4)	(12)	(12)	
13 Methionine	287	24.169	1.351	2.47	61	171	75	287	213	200	131
		24.563	1.373		(100)	(32)	(59)	(26)	(24)	(12)	(8)
14 Glutamic acid	327	25.762	1.440	1.85	198	180	226	152	85	240	268
		26.089	1.458		(100)	(80)	(64)	(56)	(32)	(22)	(14)
15 Phenylalanine	303	26.074	1.457	1.75	91	190	148	103	303	216	198
		26.381	1.475		(100)	(70)	(65)	(22)	(12)	(33)	(12)
16 Tyrosine	415	29.067	1.625	1.50	260	203	302	328	415	216	175
		29.314	1.639		(100)	(94)	(98)	(32)	(4)	(20)	(11)
17 Ornithine	366	31.209	1.744	1.72	166	306	211	126	279	153	
		31.503	1.761		(100)	(9)	(8)	(7)	(9)	(4)	
18 Lysine	380	33.314	1.862	1.21	180	294	321	67	181	126	
		33.563	1.876		(100)	(18)	(8)	(16)	(14)	(11)	
19 Histidine	365	37.311	2.086	0.66	278	206	81	153	166	365	
		37.472	2.095		(100)	(46)	(43)	(12)	(12)	(9)	
20 Tryptophan	438	38.212	2.136	0.84	226	325	438	129	283	129	
		38.484	2.151		(100)	(21)	(9)	(9)	(32)	(9)	

overlap되는 peak들은 GC에서 분간할 수 없지만 이들의 mass spectra에서는 서로 다른 spectrum을 나타내므로 분간이 가능하다.

Table 5은 17종의 d, l-enantiomeric amino acid의 retention time 과 characteristic ion을 실었다.

3. TFA-1PA 유도체의 Mass fragmentation에 대한 해석

3-1. Aliphatic Amino Acids

Glycine, alanine, valine, leucine 및 iso-leucine의 유도체에 대한 mass fragment pathway는 Figure. 5에 실었다. aliphatic amino acid의 경우 inductive cleavage에 의해서 생성된 $(M-COOC_3H_7)^+$ 과 α -cleavage에 의해 생성된 $(M-OC_3H_7)^+$ 이온이 나타나며 $(H-COOC_3H_7)^+$ ion이 모두 base peak로 나타난다.

Leucine, isoleucine와 norleucine들은 isomer로서 존재하나 이들의 mass spectra에서 서로 다른 ion을 가지고 있으므로 구분이 가능하다. 이들의 2번째로 강한 intense를 가진 ion을 비교하면 쉽게 구별된다. Figure. 6에서 보듯이 alkyl chain에 구조에 따라 다른 ion이 생성된다는 것을 알 수 있다.

또한 aliphatic amino acid의 경우 alkyl chain이 2개 이상인 경우 m/e 213이 항상 나타난다. 이 ion은 Mchafferty rearrangement에 의해서 생성된 ion이다. 이 ion의 relative abundance는 chain의 구조에 영향을 받는다.

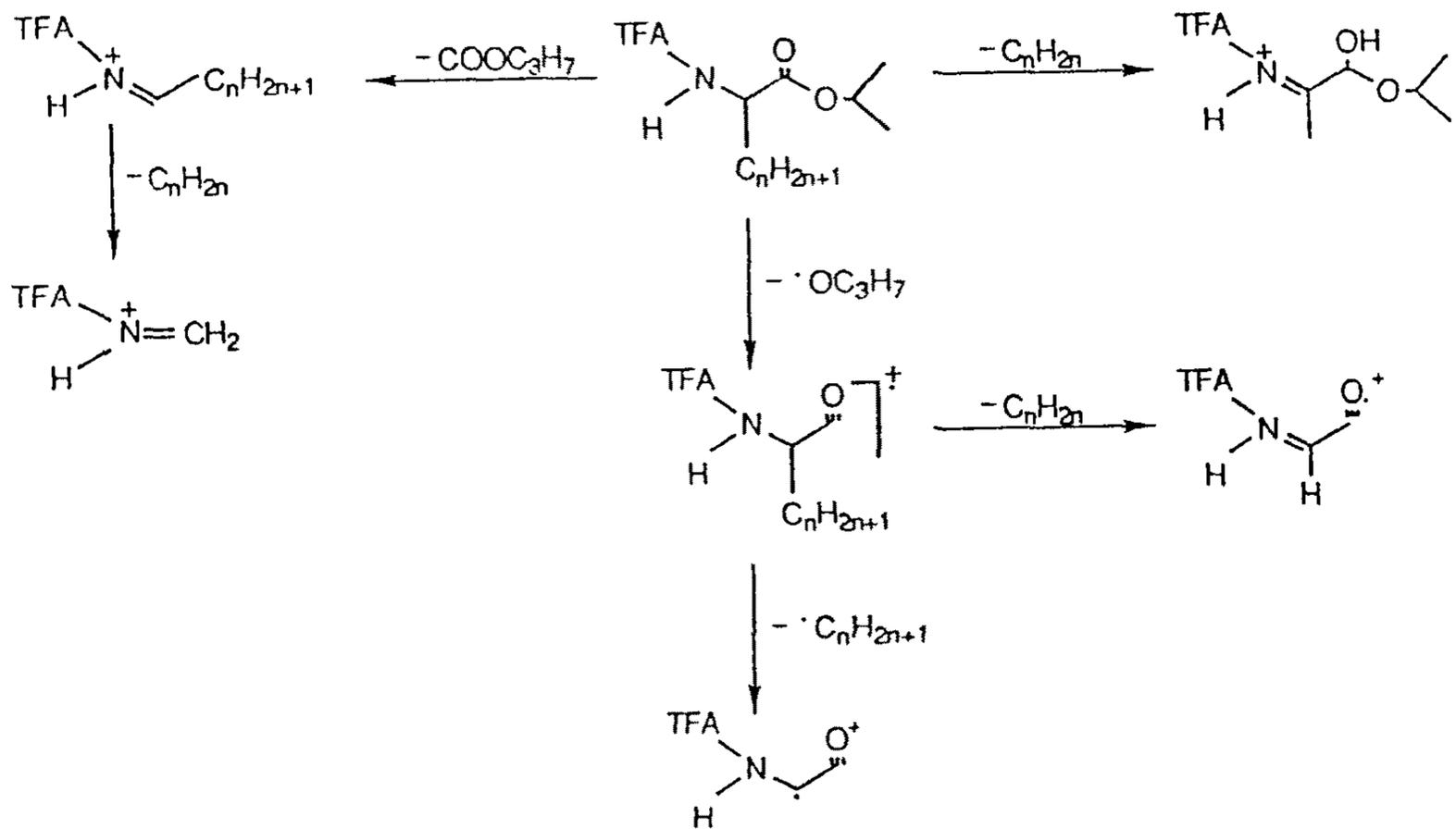


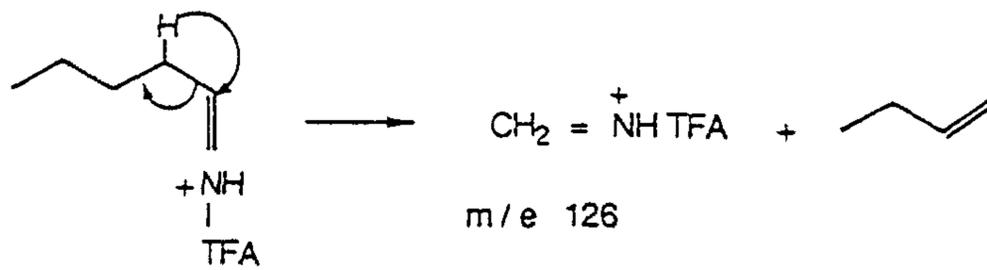
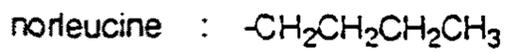
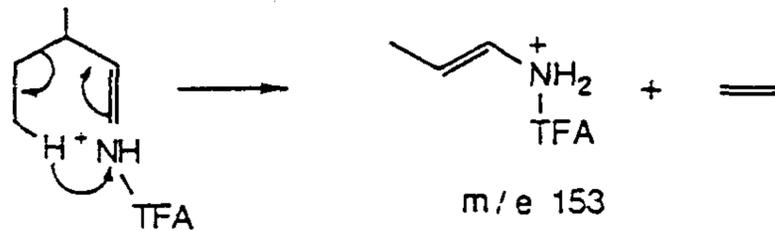
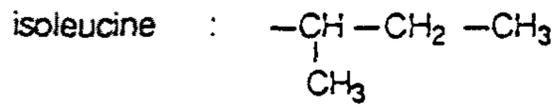
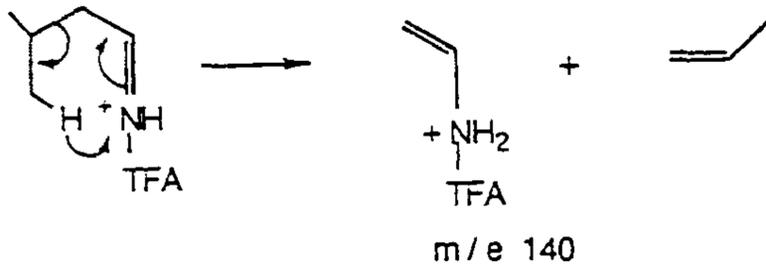
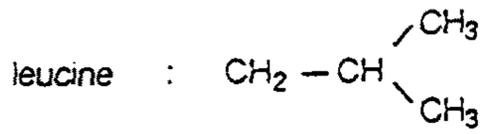
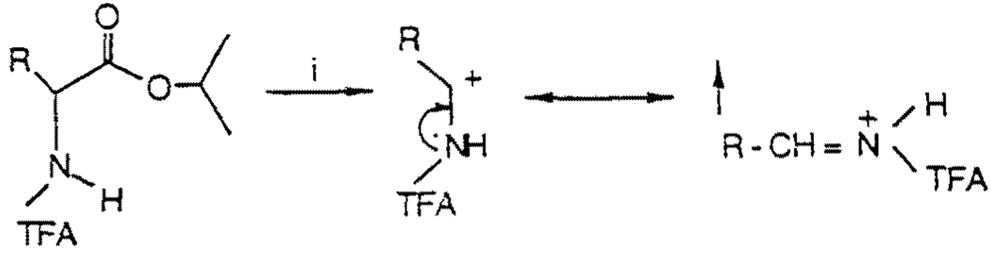
Figure 5. Aliphatic Amino acid Fragmentation Scheme.

3-2. Hydroxy Amino Acids

Hydroxy amino acid 경우 N, O-bis-TFA 유도체가 생성되며 이 유도체는 aliphatic amino acid와 달리 $(M-\text{COOC}_3\text{H}_7)^+$ ion은 적은 양으로 나타나고 $(M-200)^+$ ion이 base peak로 나타난다. 이 ion의 형성과정은 Figure. 7에 실었다.

Hydroxy amino acid의 다른 characteristic ion으로는 $(M-\text{CF}_3\text{COO}-\text{C}_4\text{H}_8)$ ion도 나타난다. Hydroxy group은 dehydration이라든지 dealdehyde 등으로 깨지기 쉬워서 Molecular ion peak가 잘 나타나

R : C₄H₉



m/e 213

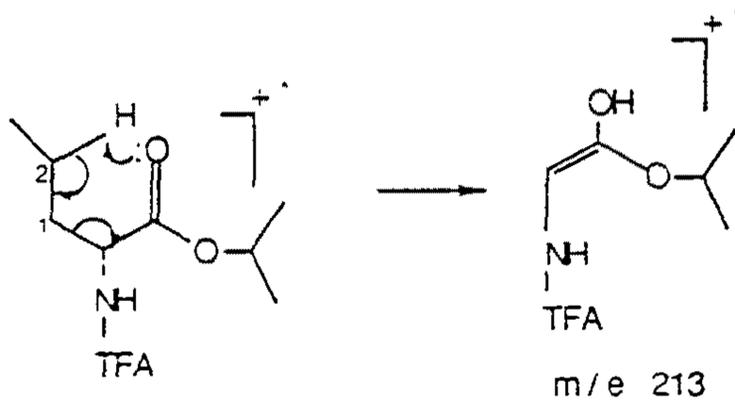


Figure 6. Mass Fragmentation pathways of Leucine, Isoleucine and Norleucine

지 않는 단점이 있다.

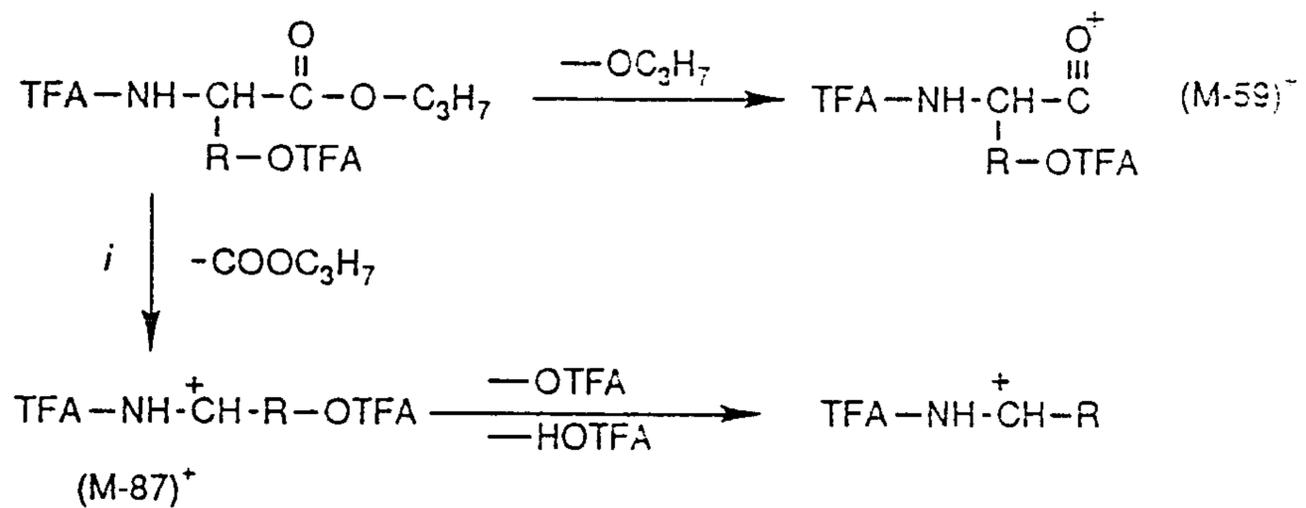


Figure 7. Fragmentation pattern of Hydroxy Amino acids ; Threonine , Serine.

3-3. Acidic Amino Acids

Aspartic acid와 glutamic acid의 유도체에 대한 mass fragmentation pathway을 Figure. 8에 실었다.

Acidic amino acid는 많은 strong intensity을 갖는 ion들이 다른 amino acid들 보다 많이 나타나는 것이 특징이며 glutamic acid는 1% 정도의 molecular ion(M⁺)이 검출되었다. Characteristic ion으로서 (M-COOC₃H₇)⁺, (M-COOC₃H₇-C₃H₇)⁺, (M-COOC₃H₇-C₃H₆)⁺, (M-COOC₃H₇-C₃H₆-H₂O), (M-COOC₃H₇-HOC₃H₇), (M-COOC₃H₇-HOC₃H₇-CO)⁺, (M-COOC₃H₇-HOC₃H₇)⁺ 및 (M-COOC₃H₇-CO₂)⁺ ion이 strong intensity을 갖는 이온들이다.

3-4. Basic Aliphatic Amino Acids :

Lysine과 ornithine 유도체는 mass spectra 상에서 그들의

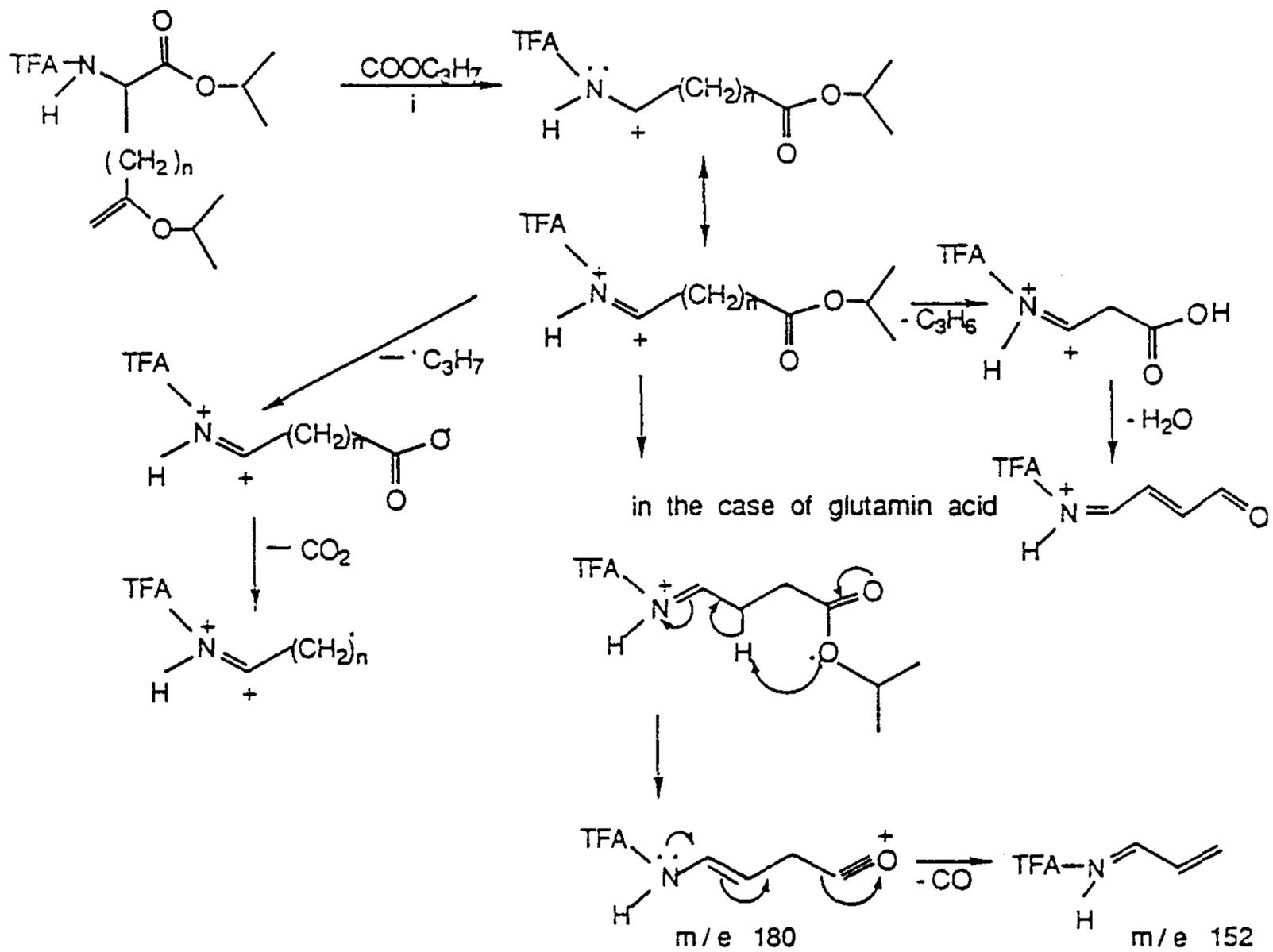


Figure 8. Mass Fragmentation pathways of Acidic Amino acids ; Aspartic acid, Glutamic acid.

base peak만이 strong하게 나타나며, 다른 ion들은 weak intensity을 갖는 특성을 가진다. 이들의 characterist ion으로서 $(M-HOC_3H_7)^+$, $(M-COOC_3H_7)^+$, $(M-COOC_3H_7-TFA-NH_2)^+$, $TFA^+ NH=CH_2$ 등등이 나타난다. Lieimer가 제안한 fragment ion들과 비교적 잘 일치한다. 그러나 이들의 molecular ion은 검출되지 않았다. Figure. 9는 characteristic ion들의 mass frugment pathway을 도시하였다.

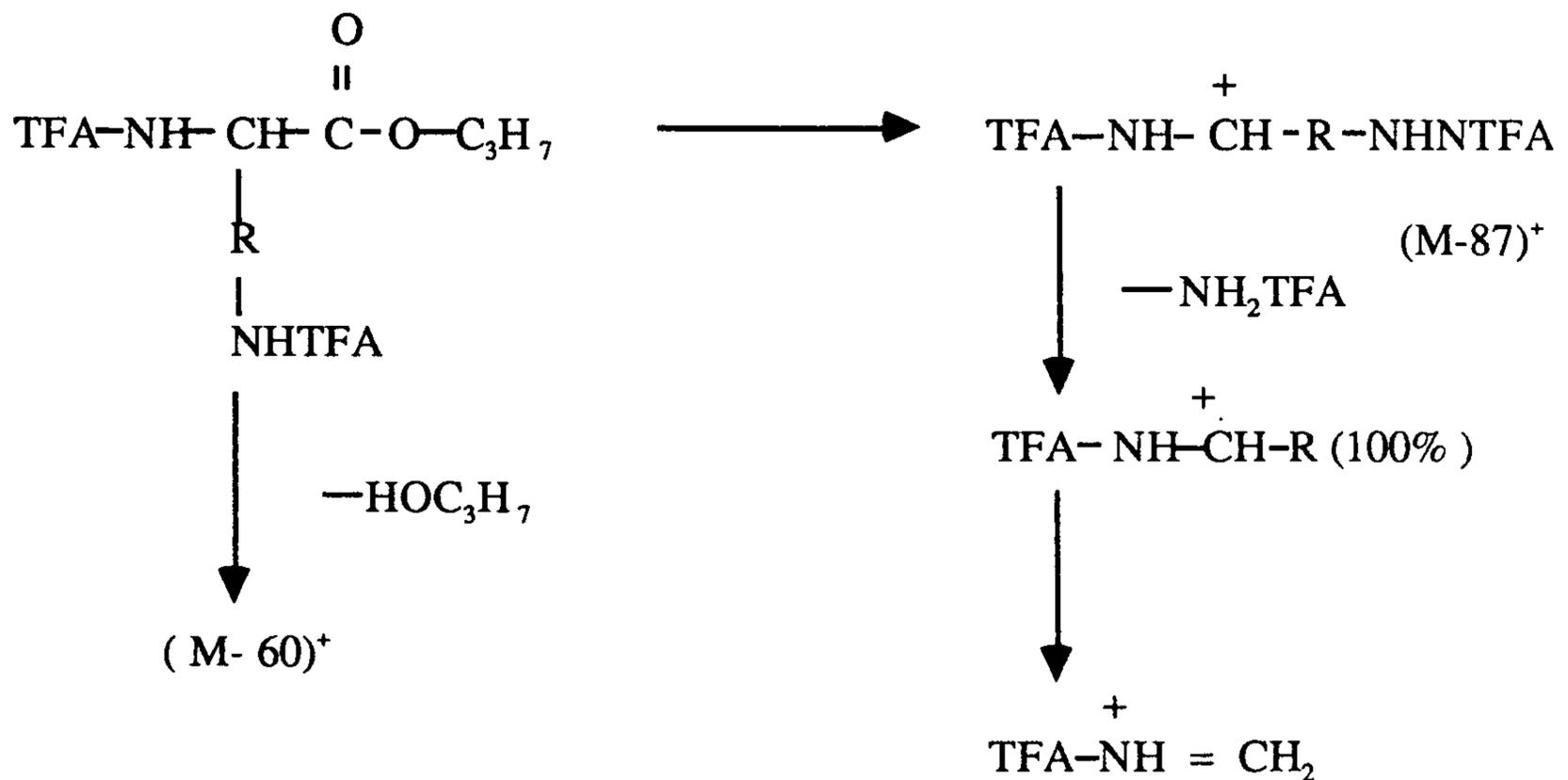


Figure 9. Fragmentation pathway of Basic Aliphatic Amino acids ;
Lysine, Ornithine.

3-5. Sulfur Amino Acid

Sulfur amino acid중 methionine은 앞서 설명하였던 compound들과 다르게 fragmentation이 thioether group이 strong intensity로

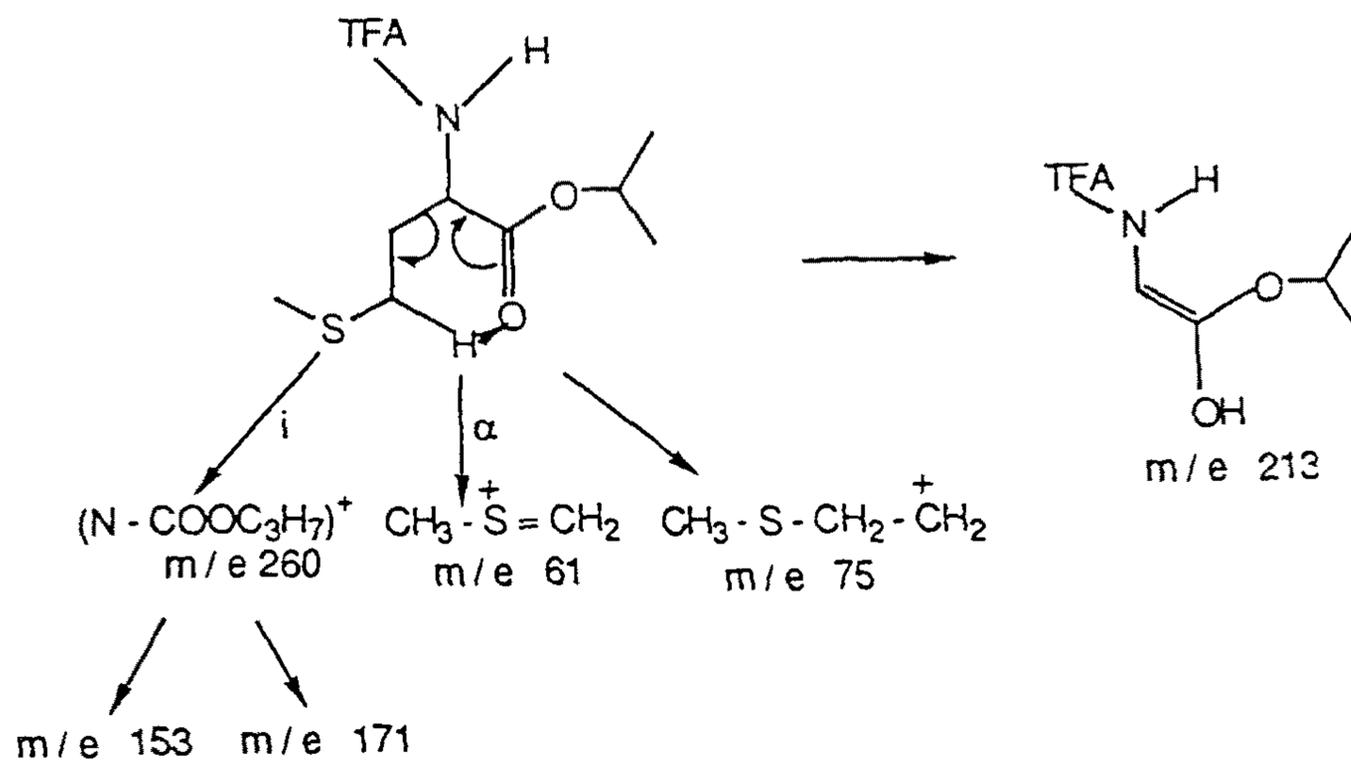
나타나는 현상이 나타난다. 즉 m/e 61($\text{CH}_3\text{-S}^+=\text{CH}_2$)과 m/e 75 ($\text{CH}_3\text{-O-CH}_2\text{-}^+\text{CH}_2$) ion이 나타나면 molecular ion도 역시 strong intensity을 갖는다. m/e 153, 171 이온들은 aliphatic amino acid에서 설명한 pattern을 가지고 이외에도 m/s 2/3은 MC hafferty rearrangerotent에 의해 H-migration이 일어나서 생긴 이온인 ($\text{M-CH}_2=\text{S-CH}_3$)⁺과 ($\text{M-CH}_3\text{-S-CH}=\text{CH}_2$)⁺ ion도 생성된다. 그밖에 ($\text{M-COOC}_3\text{H}_7$)⁺인 TFA-iminium ion은 low relative abundance을 갖는다.

Cysteine은 N, S-di-TFA 유도체화 되는 화합물로 methionine과는 완전히 다른 fragment ion들을 갖는다. ($\text{M-COOC}_3\text{H}_7$)⁺ ion으로 더이상 중요한 fragmentation이 일어나지 않으며 base peak인 m/e 140은 isopropyl group에서 H가 TFA group의 carbonyl group으로 migration이 일어나면서 ($\text{M-C}_3\text{H}_6\text{-CO}_2\text{-SCOCF}_3$)⁺ ion이 형성되는 과정이다. Methionine과 cysteine의 mass fragment putaway는 Figure. 10에 실었다.

3-6. Aromatic Amino Acids

Aromatic 및 heterocyclic amino acid인 phenylalanine, tyrosine, tryptophan과 histidine 유도체에 대한 mass spectra에서 그들의 cyclic moieties에 의해서 많은 영향을 받는다. Aromatic ring의 stabilizing 영향은 이들 분자 ion을 spectrum 상에서 나타나게 해주고, 아울러서 ring moiety를 가진 ion들은 high relative abundance을 나타나게 된다. Phenylalanine의 경우 m/e 91(Ar^+CH_2)은 diagnostic

methionine



cysteine

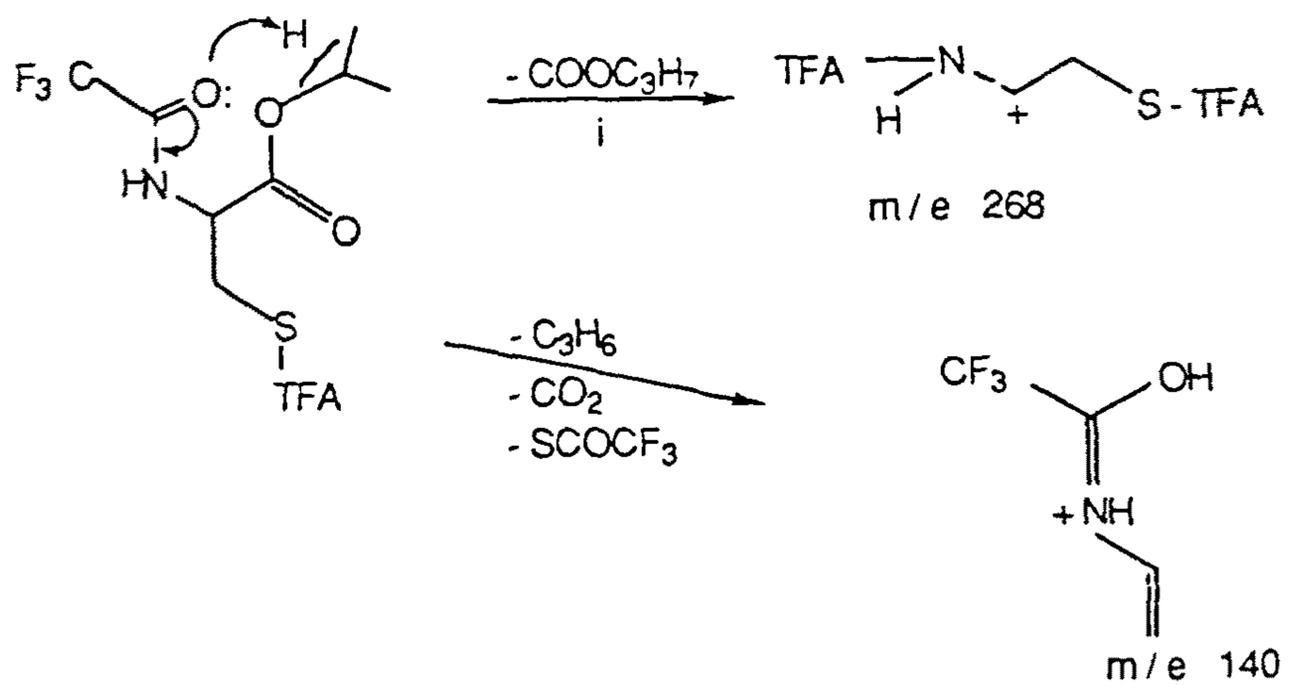


Figure 10. Mass Fragmentation pathways of Sulfur Amino acids.

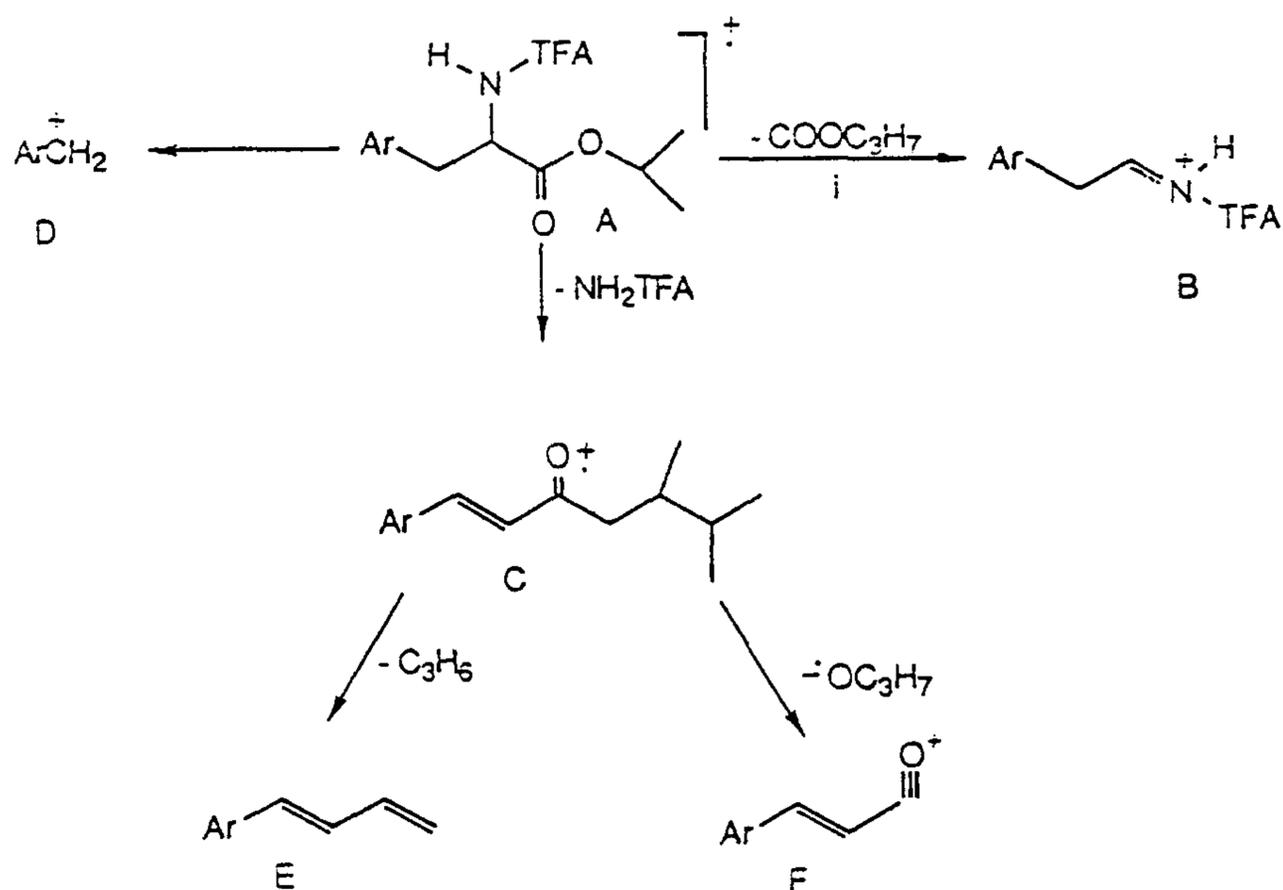
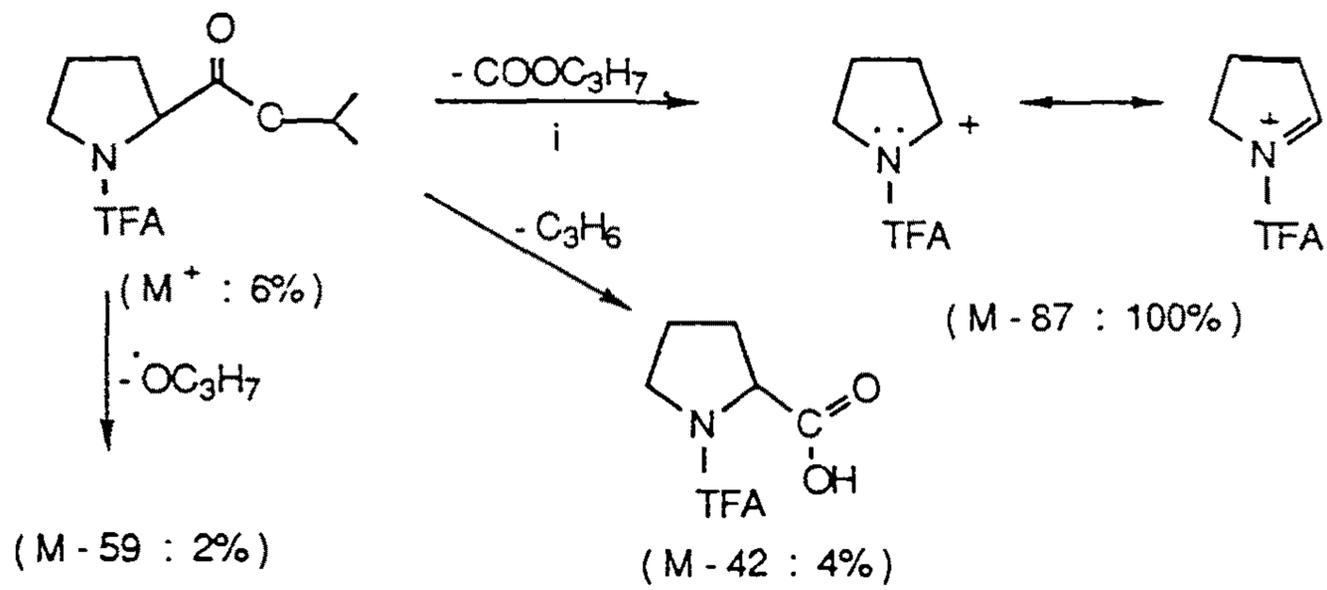


Figure 11. Fragmentation pathways of Aromatic Amino acid.

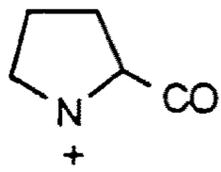
Table 6. Characteristic fragments of common Aromatic Amino acids.

Amino acids	Ion Types					
	A(%)	B(%)	C(%)	D(%)	E(%)	F(%)
Phenylalanine	303 (12)	216 (33)	190 (70)	91 (100)	148 (63)	131 -
Tyrosine	145 (4)	328 (32)	302 (98)	203 (94)	260 (100)	243 -
Histidine						
Tryptophan	438 (9)	351 (7)	325 (25)	226 (100)	283 (32)	266 -

proline



m/e 96 :



hydroxy - proline

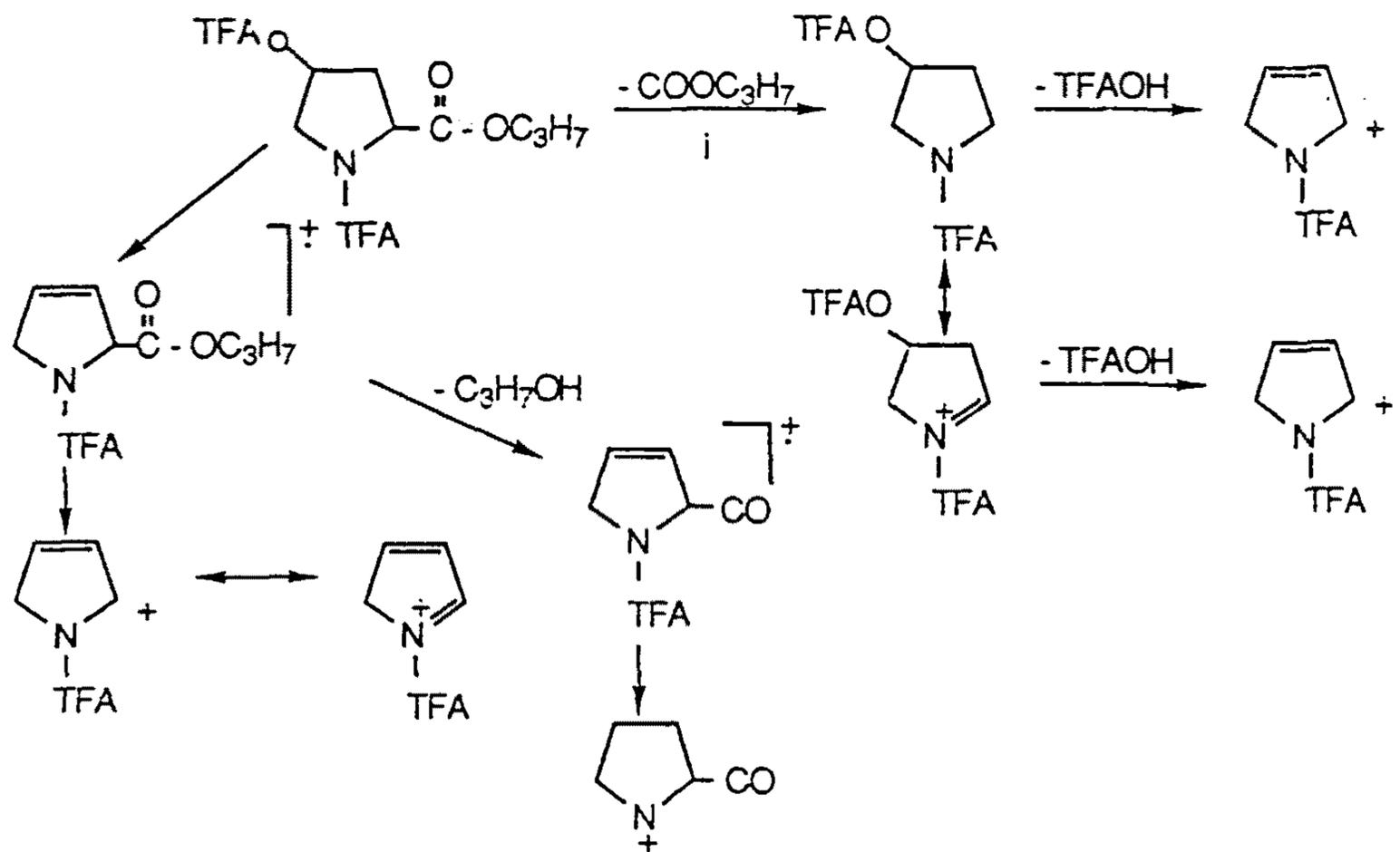


Figure 12. Mass Fragmentation pathways of Proline and Hydroxy -proline.

value가 되고 histidine의 경우 m/e 81, tyrosine의 경우 m/e 260, 203 및 320가 characteristic ion이며 tryptophan의 경우 m/e 226, 283, 325가 characteristics ion이다. 이들의 fragment pathway는 Figure. 11에 실었다. Table 6은 aromatic ring을 가진 amino acid들의 ion type을 정리한 것이다.

3-7. Proline and Hydroxy proline

Proline 유도체는 carboxylic ester group이 떨어져 나감으로 인해 생긴 cyclic iminium 이온이 mass spectrum에서 high relative abundance을 갖는다.

Hydroxy-proline의 경우는 여기에 trifluoroacetic acid가 떨어져 나감으로서 stable ion(allylic cation)이 생성된다. proline type의 유도체 경우, low intensity을 가진 작은 fragment ion이 특성적으로 나타난다.

즉 proline의 경우 m/e 96, hydroxy proline의 m/e 94인데, 이 ion은 Cyclic Ketene ion 구조를 형성하게 된다. 이들의 fragment mechanism Figure. 12에 실었다.

4. α , β -cyclodextrin과 inclusion complex의 형성

β -CD와 aniline, β -CD와 benzaldehyde, α -CD와 aniline, α -CD와 benzaldehyde inclusion complex를 실험과정에서 기술한바대로 조제하여 IR과 NMR의 spectrogram을 비교하였다.

먼저 각각시료의 IR과 NMR을 Figure. 13~20에 수록하였고

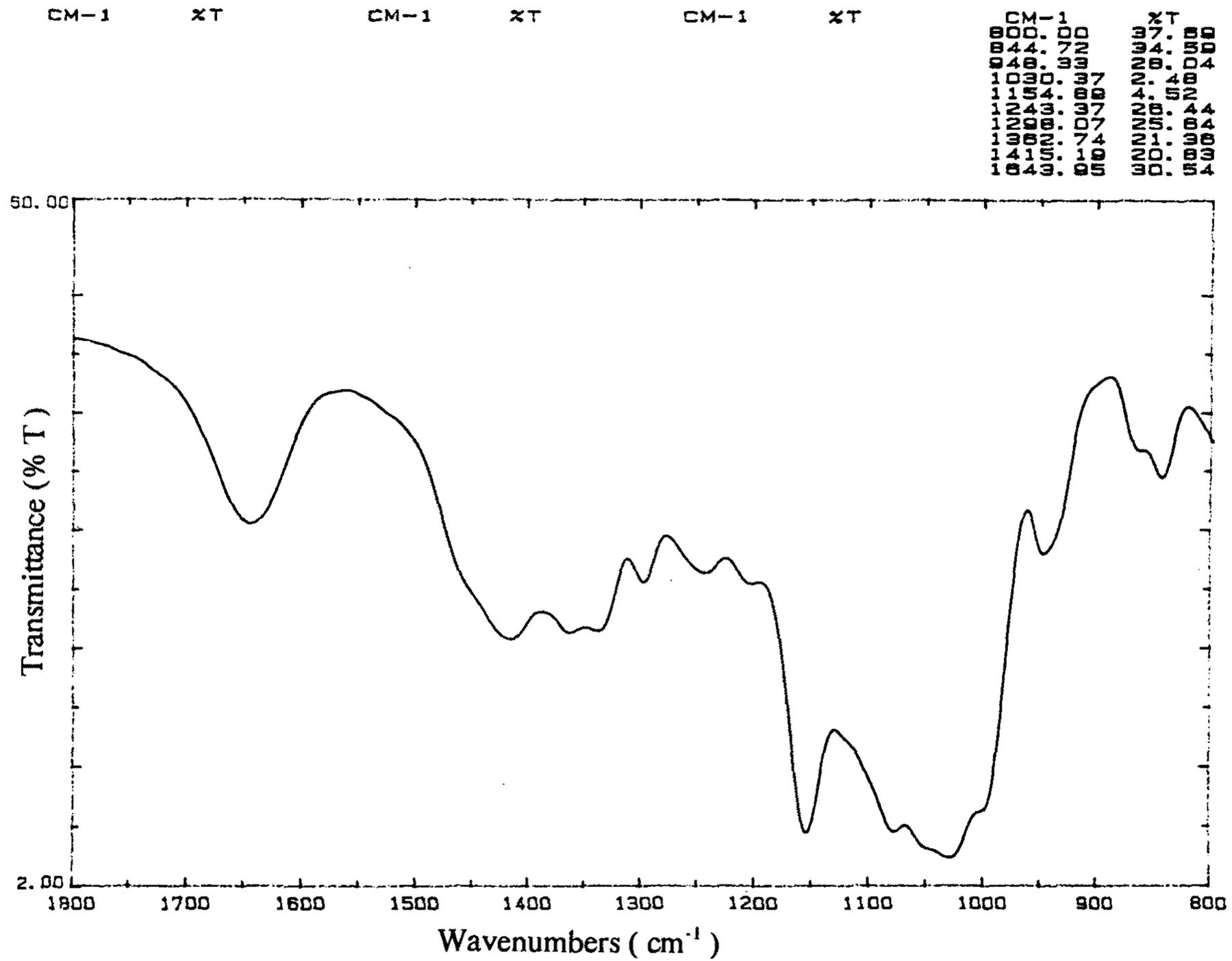


Figure 13. IR spectrum of α -cyclodextrin.

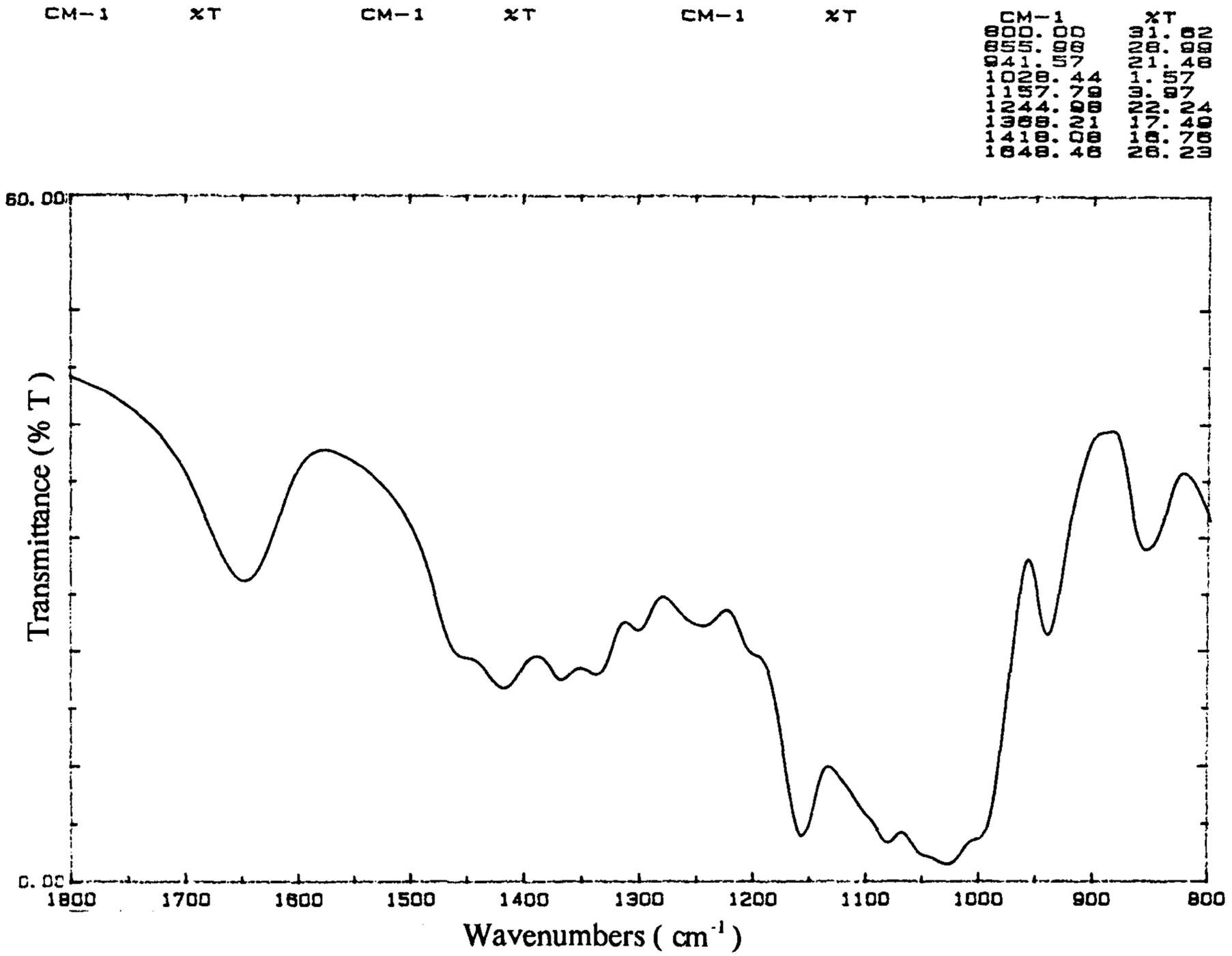


Figure 14. IR spectrum of β -cyclodextrin.

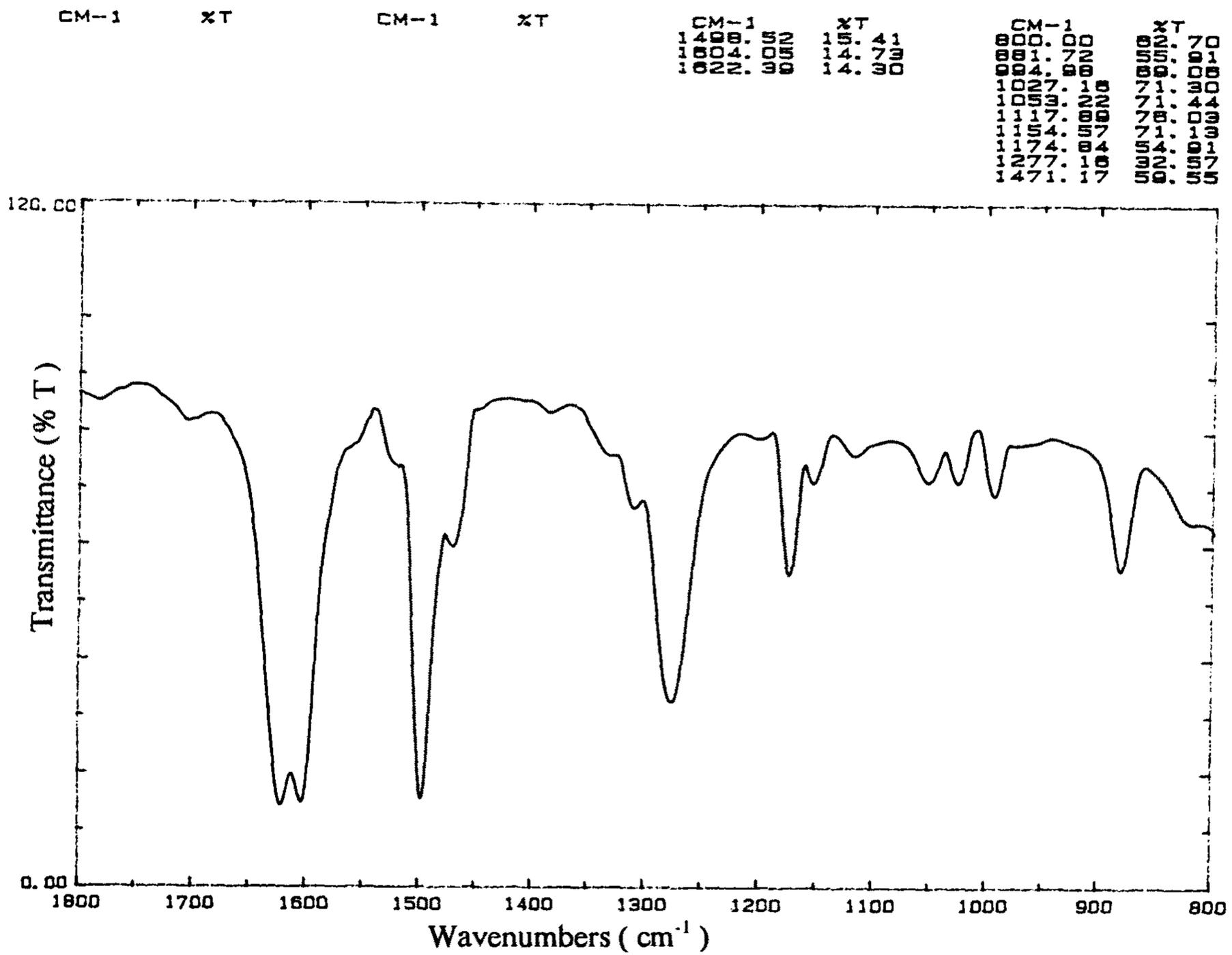


Figure 15. IR spectrum of Aniline.

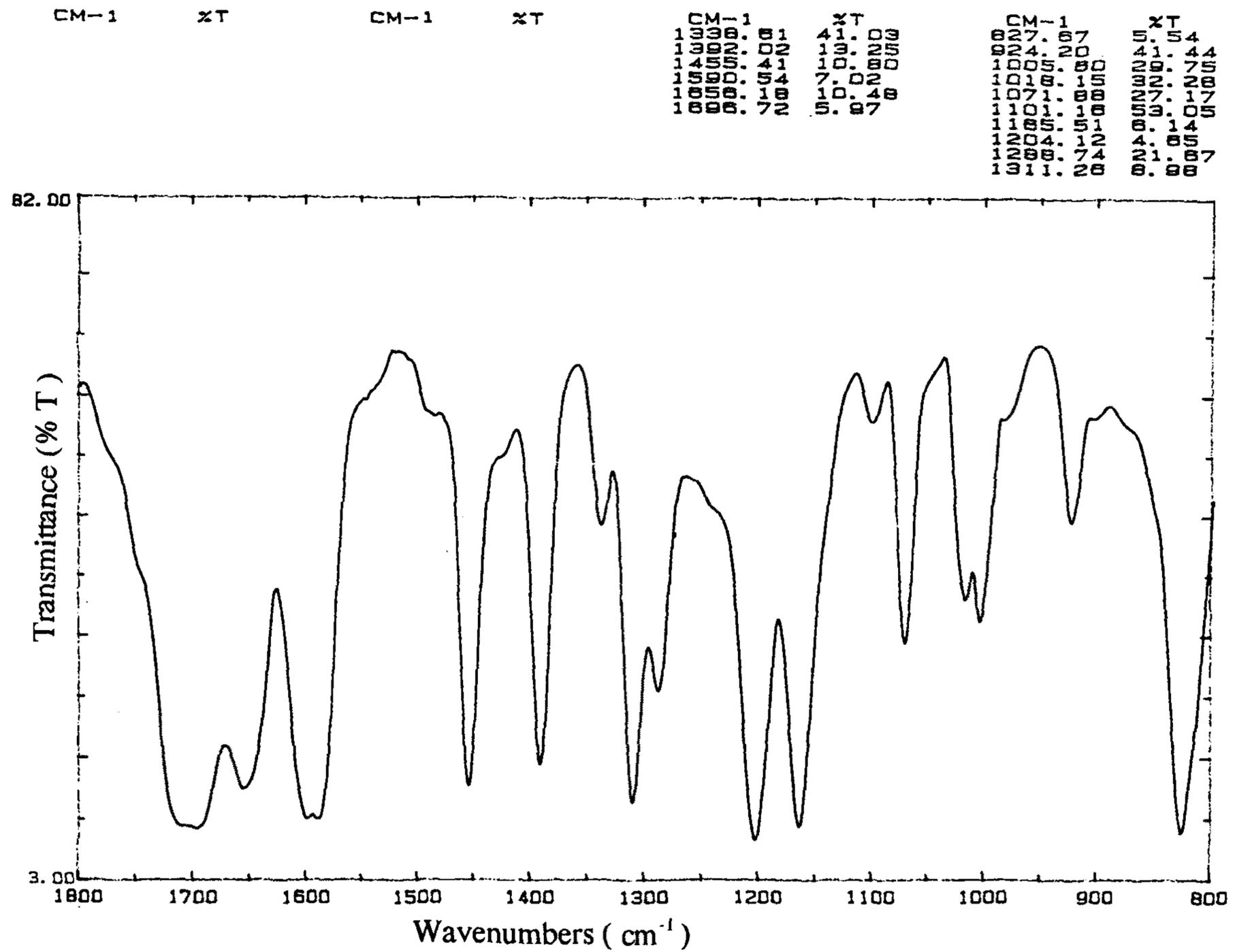


Figure 16. IR spectrum of Benzaldehyde.

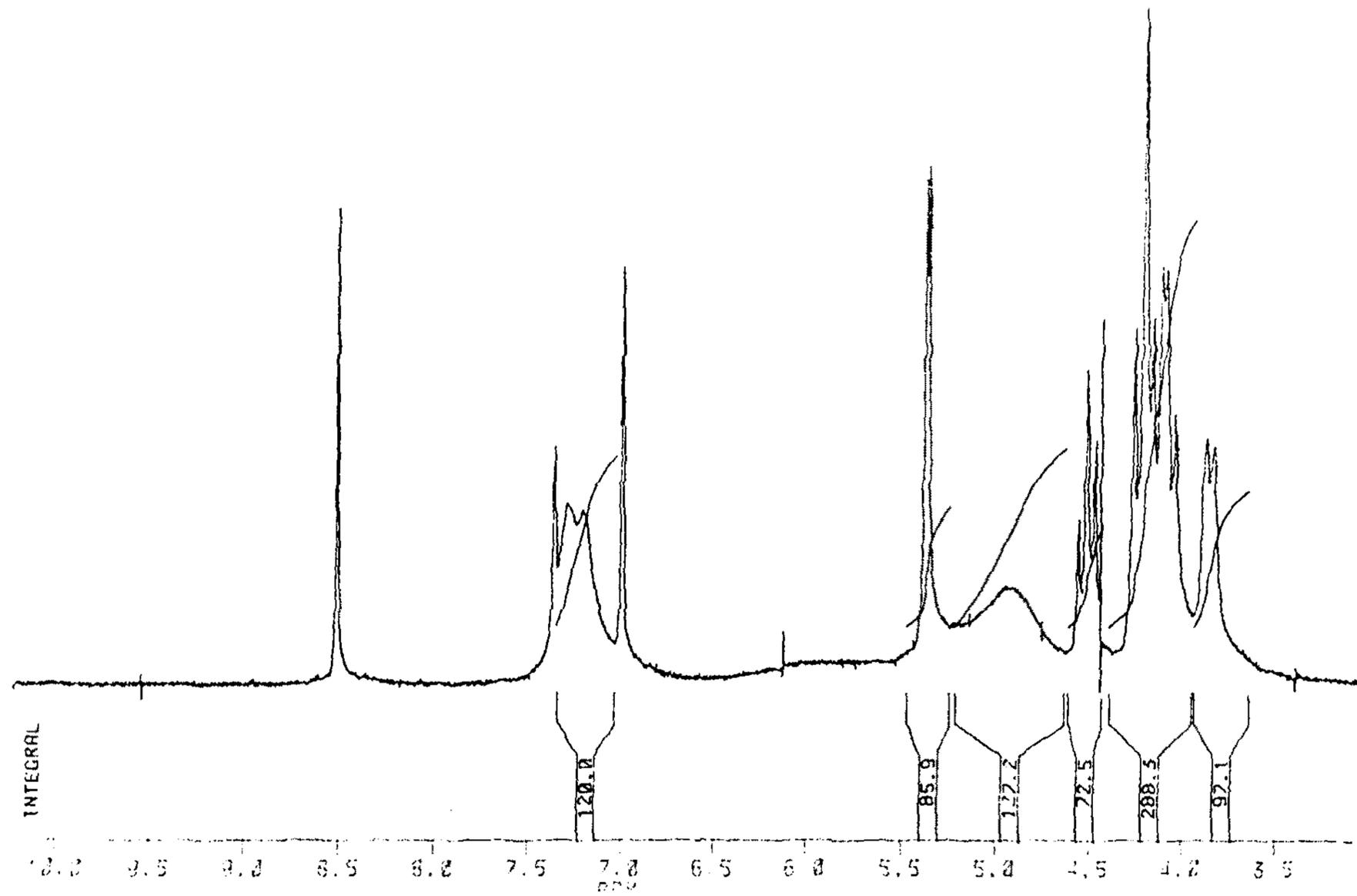


Figure 17. 200 MHz ¹H NMR spectrum of α-cyclodextrin.

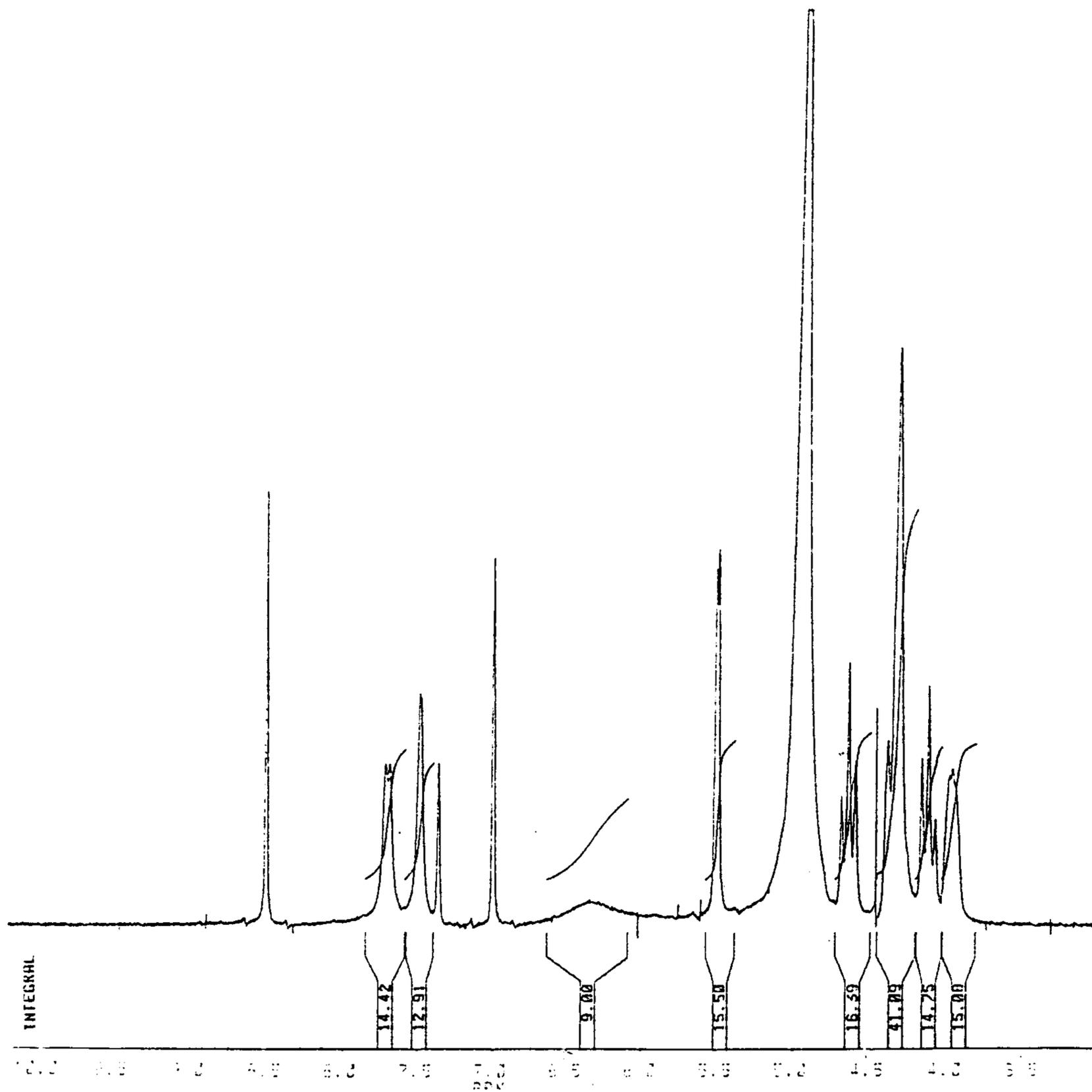


Figure 18. 200 MHz ¹H NMR spectrum of β-cyclodextrin.

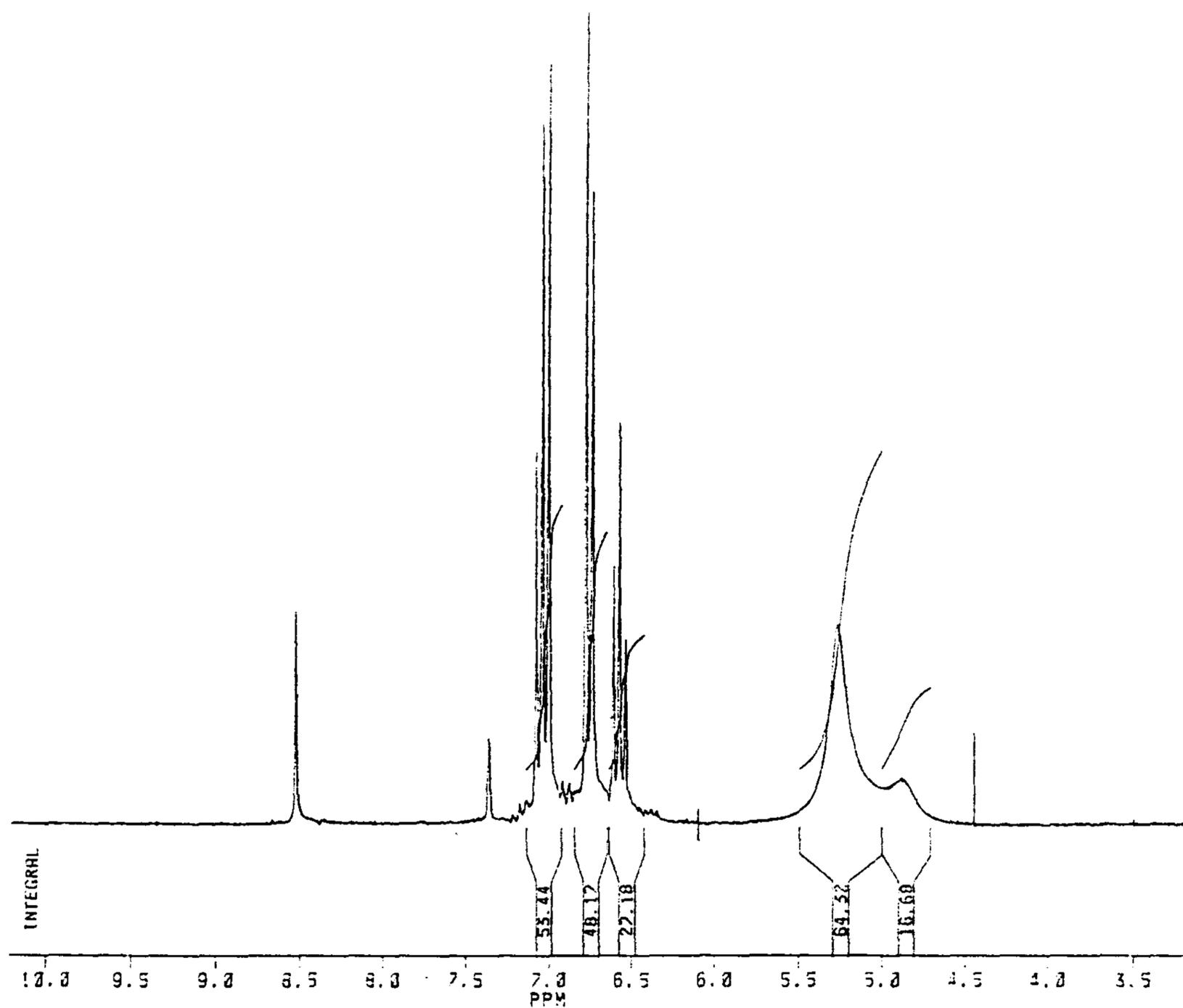


Figure 19. 200 MHz ¹H NMR spectrum of Aniline.

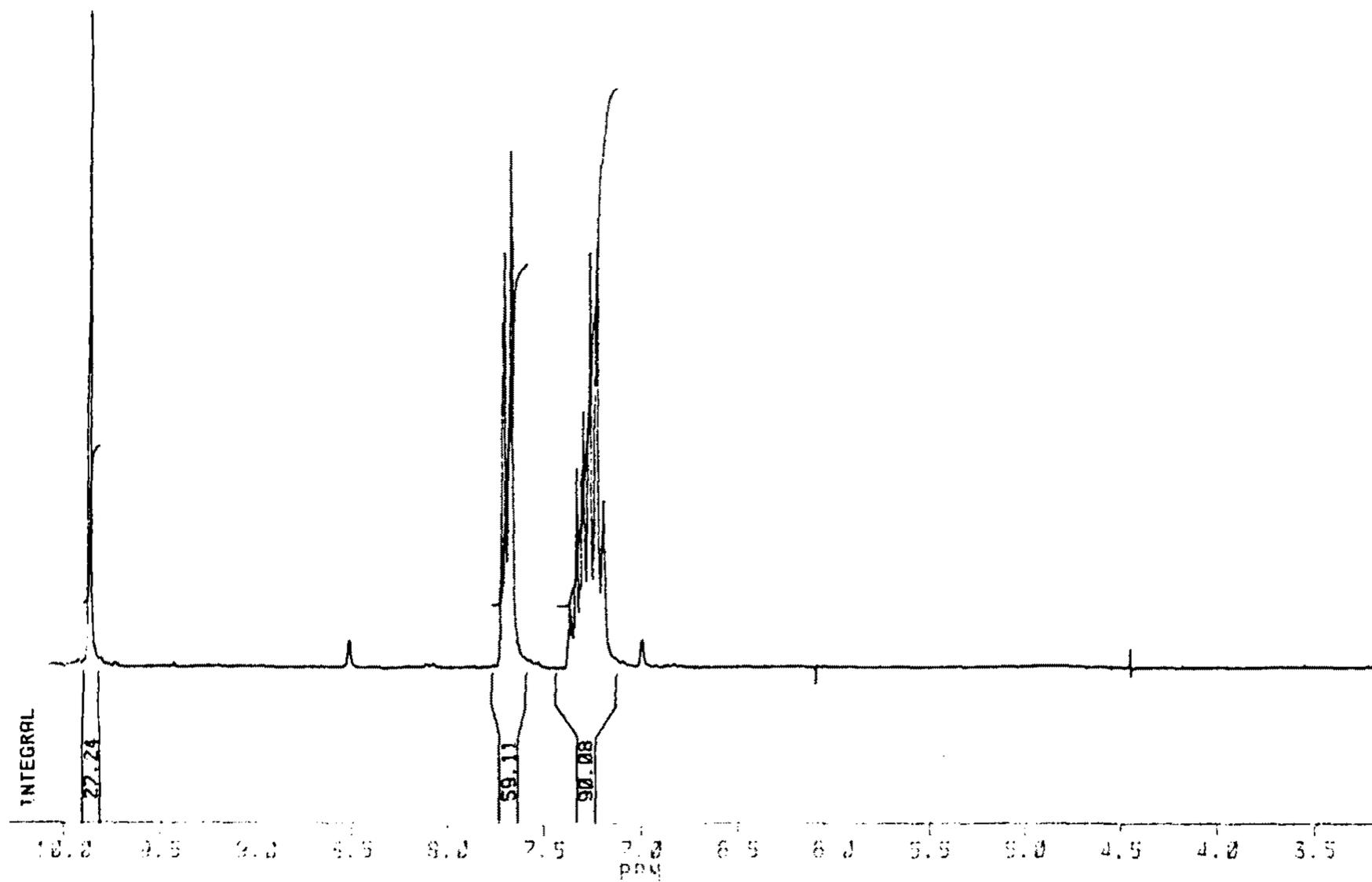


Figure 20. 200 MHz ^1H NMR spectrum of Benzaldehyde.

inclusion complex가 되었을 때의 IR과 NMR은 Figure. 21~28에 나타내었다. IR은 wave number 800에서 1800cm^{-1} 까지 비교하였다.

세밀한 IR spectrum의 조사에 의하면 inclusion complex가 형성됨을 알 수 있는데 aniline과 benzaldehyde는 α , β -CD와 inclusion을 형성함으로써 steric pressure를 받게되고 따라서 stretching이나 bending의 운동이 자유스럽지 못하게 된다. 따라서 vibration energy가 상승하게 되어 wave number가 증가하고 있다. 그러나 cyclodextrin은 guest molecule과 불안정한 steric repulsion도 하지만 일부 H-bonding 등으로 해서 안정화되는 부위가 형성되는 관계로 해서 진동 energy의 변화가 일률적으로 되지 못하고 batho, hypsochromic shift를 동시에 보여주고 있다. 이에 대한 peak position의 위치변화는 table 6~9에 기술하였다. Table 10~13도 α , β -CD와 aniline, benzaldehyde와의 inclusion complex가 형성되었을 때에 NMR의 chemical shift의 변화를 도식하였다. Steric hindrance의 영향으로 NMR 결과도 IR에서와 같이 inclusion complex 형성할 때 upfield shift함을 알 수 있었다.

α -CD와 aniline과의 complex에서는 특히 3, 4, 5 위치의 proton보다 2, 6의 위치에서 많은 upfield shift($\sim 3.5\text{Hz}$)를 한 것으로 보아서 α -cyclodextrin의 primary-OH기가 있는 바닥에서보다는 secondary-OH기가 있는 입구쪽에서 aniline이 더 많이 영향을 받음을 알 수 있었다. α -CD와 benzaldehyde도 동일한 방향으로 chemical shift가 변하였으나 3, 5 위치에서도 상호작용이 더 많이 형성되어 peak가 splitting되었다. β -CD와 aniline은 β -CD의 capacity

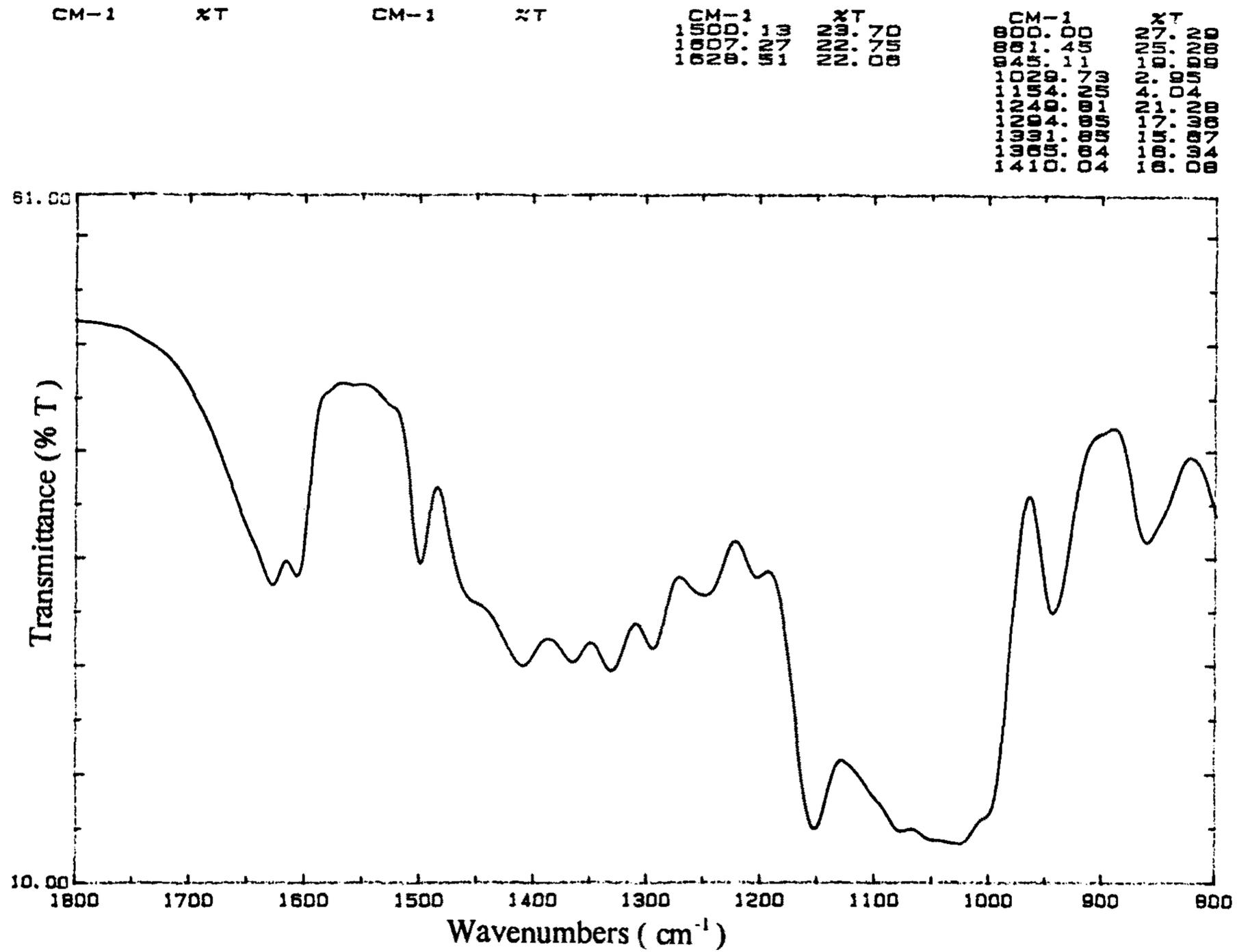


Figure 21. IR spectrum of α -cyclodextrin - Aniline complex.

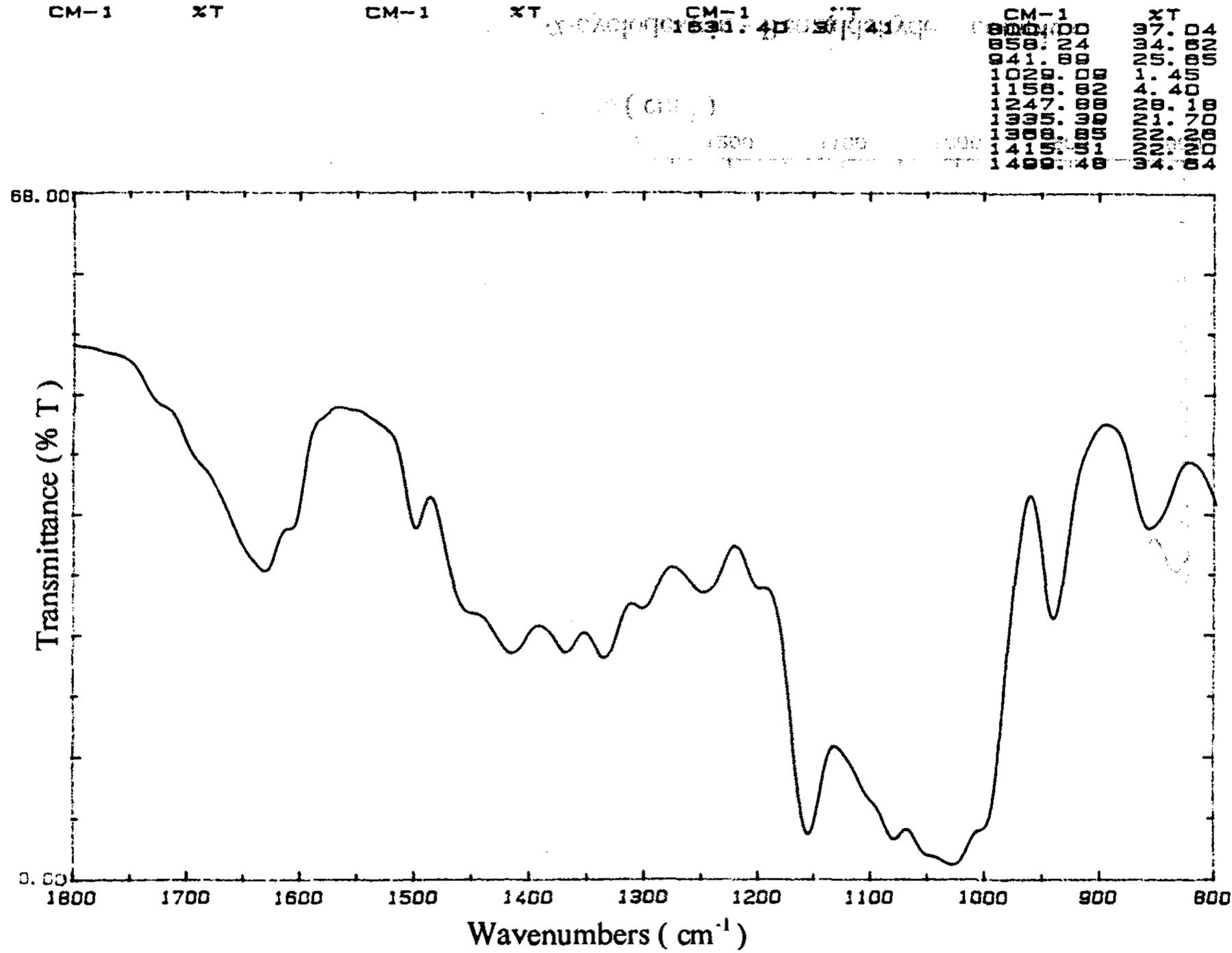


Figure 23. IR spectrum of β -cyclodextrin - Aniline complex.

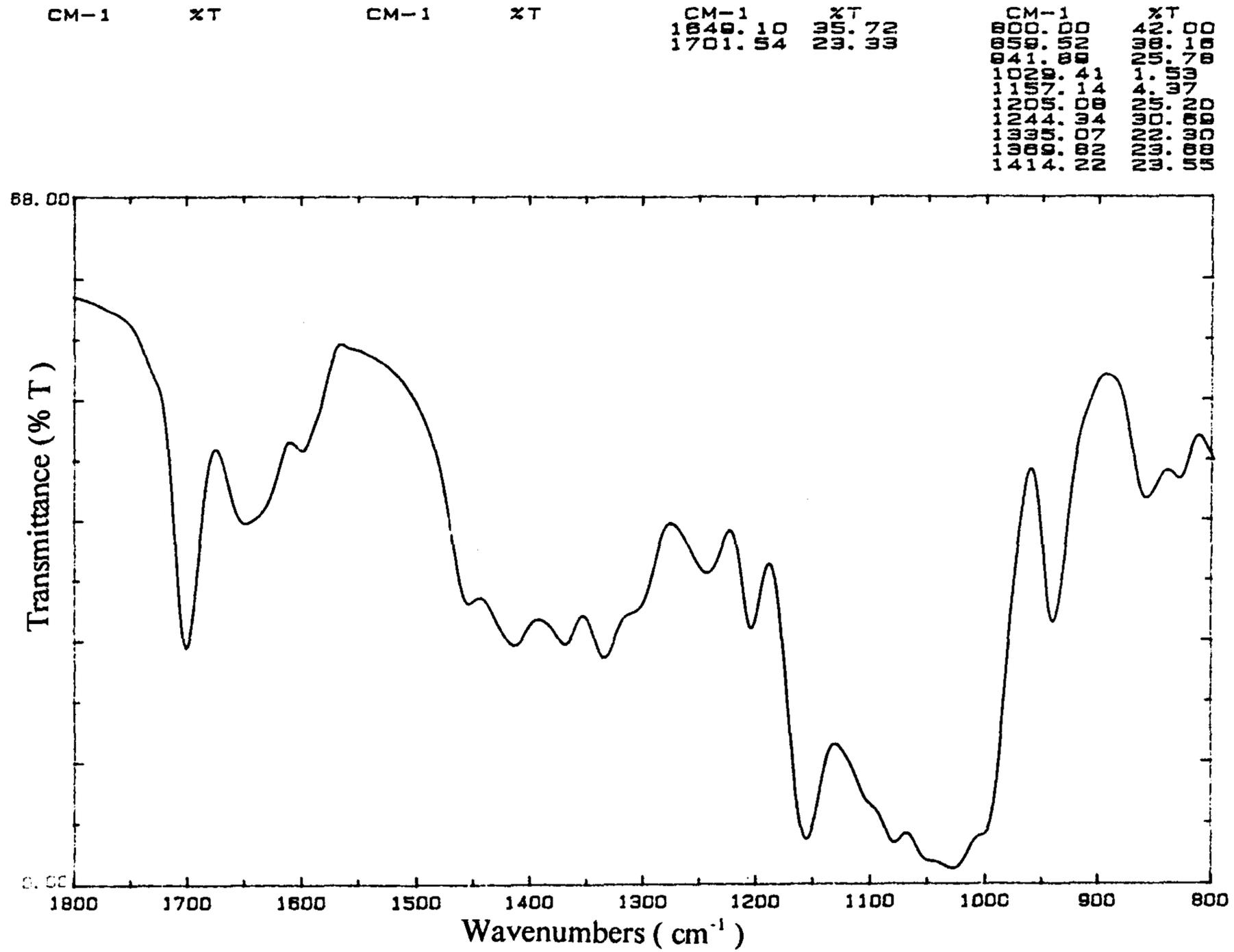


Figure 24. IR spectrum of β -cyclodextrin - Benzaldehyde complex.

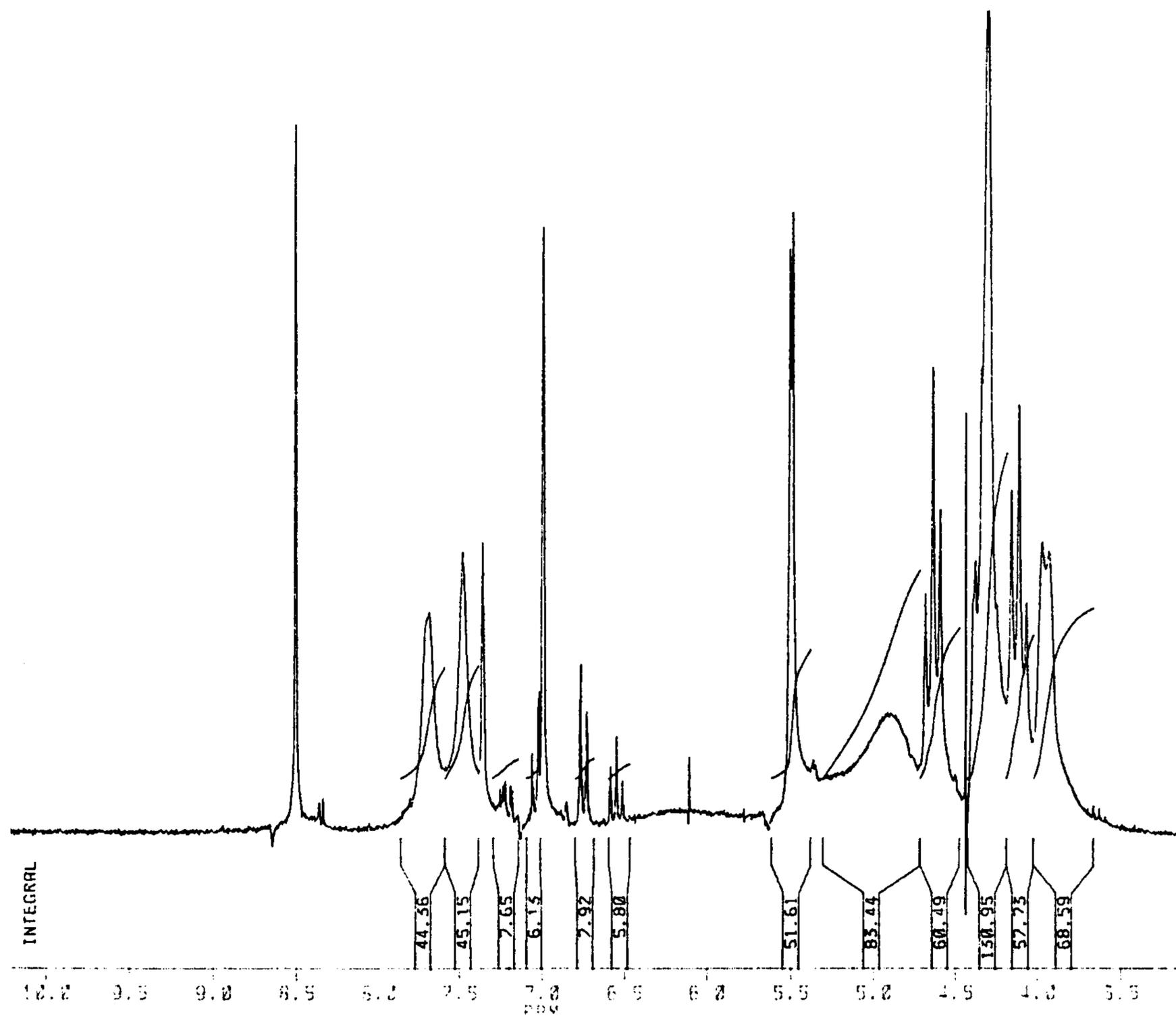


Figure 25. 200 MHz ^1H NMR spectrum of α -cyclodextrin - Aniline complex.

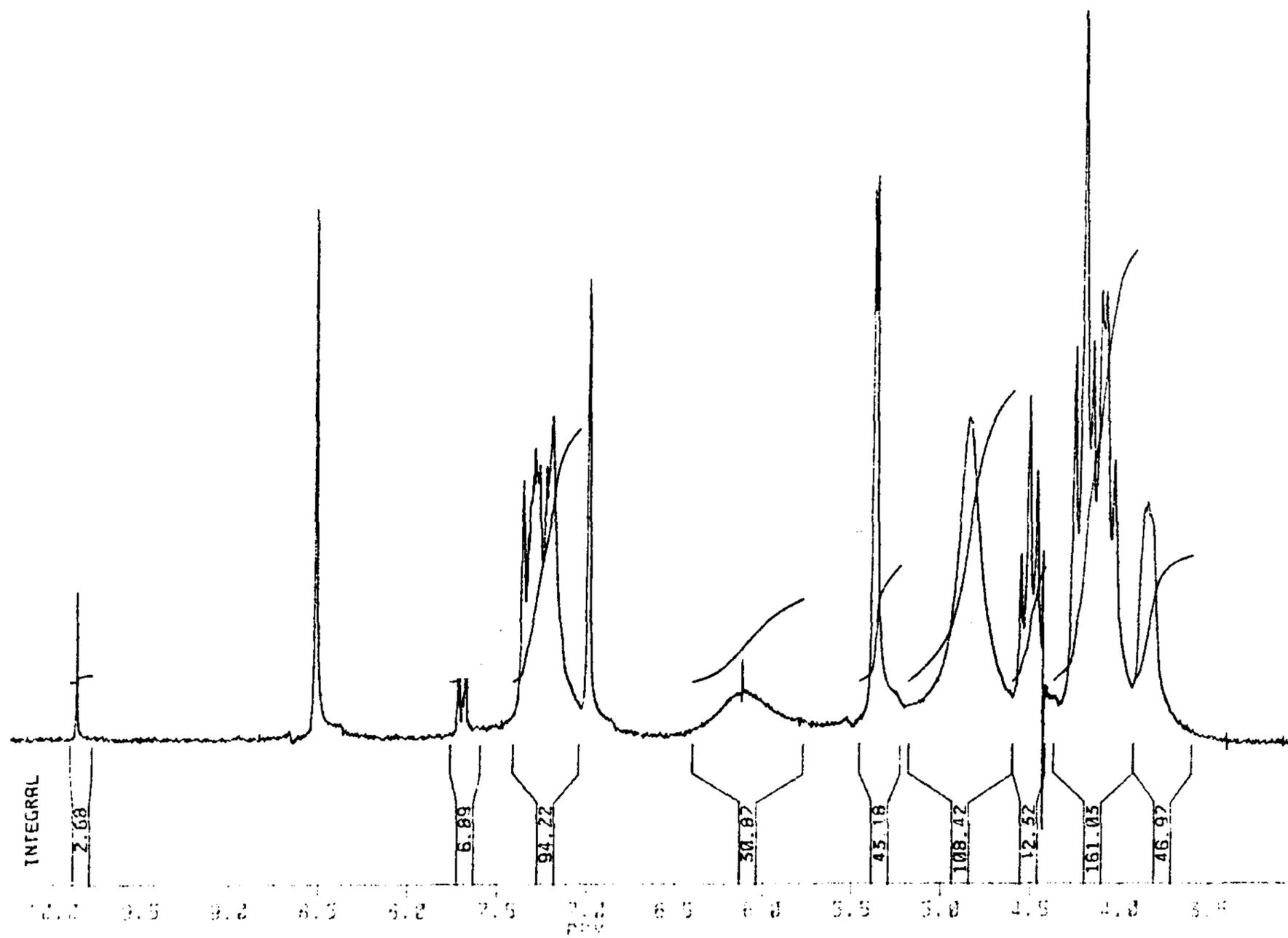


Figure 26. 200 MHz ¹H NMR spectrum of α-cyclodextrin - Benzaldehyde complex.

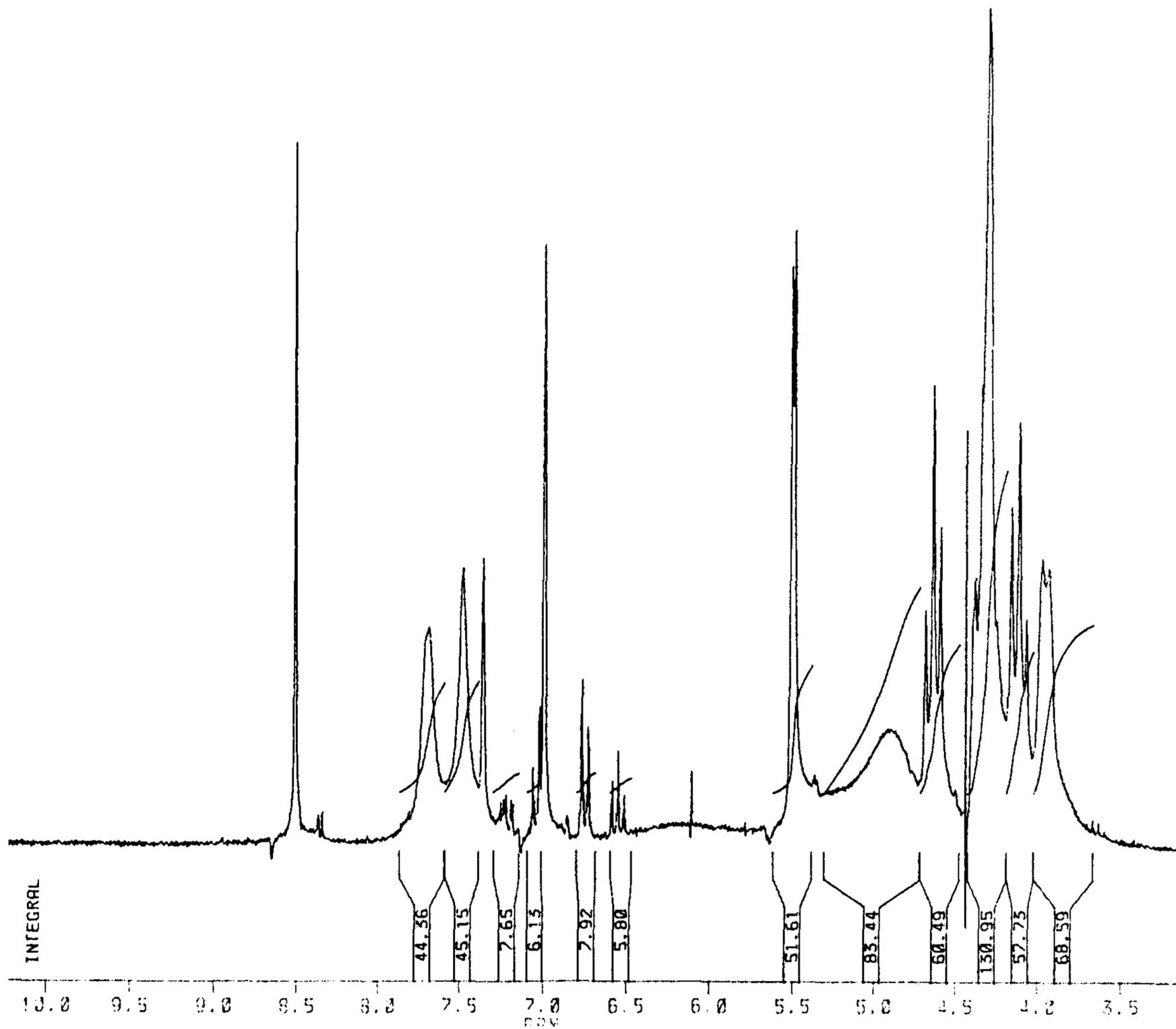


Figure 27. 200 MHz ¹H NMR spectrum of β-cyclodextrin - Aniline complex.

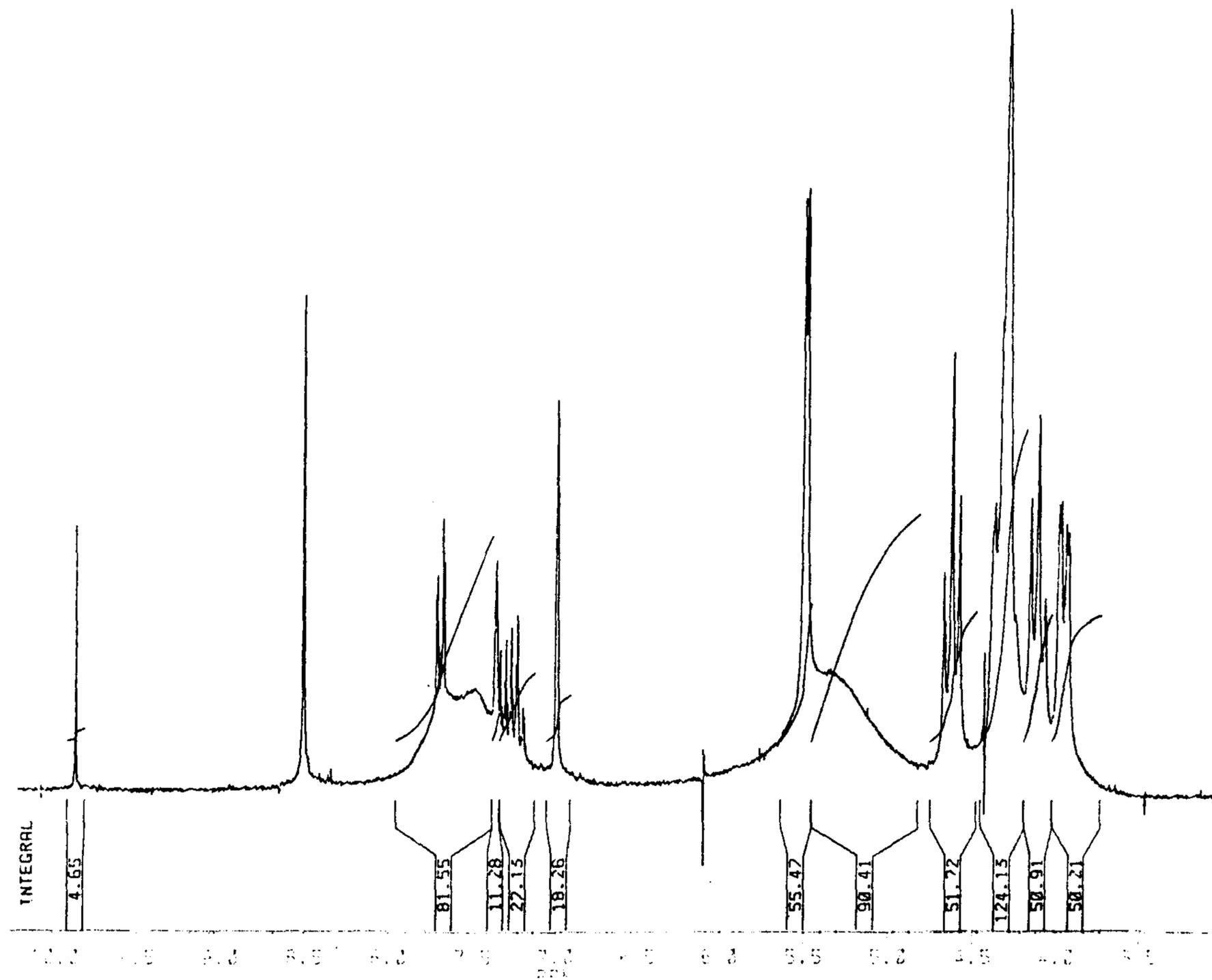


Figure 28. 200 MHz ¹H NMR spectrum of β-cyclodextrin - Benzaldehyde complex.

Table 7. Comparison of IR spectrum on α -CD and Aniline inclusion complex with α -CD or Aniline alone.

Aniline	Cf.	α -CD-Aniline complex	Cf.	α -CD
1622.4	+	1628.5		
1604.0	+	1607.3		
1498.5	+	1500.1		
		1410.0	-	1415.2
		1365.6	+	1362.7
		1331.9		
		1294.9	-	1298.1
		1249.8	+	1243.4

+, - ; represents for peak shift on inclusion complex compared to separate analytes.

Table 8. Comparison of IR spectrum on α -CD and Benzaldehyde inclusion complex with α -CD or Benzaldehyde alone.

Benzaldehyde	Cf.	α -CD-Benzaldehyde complex	Cf.	α -CD
1695.7	+	1697.7		
1595.0(*)	+	1600.0		
1455.4	+	1460.0(*)		
1204.1	+	1206.7		
		1411.9	-	1415.2
		1367.6	+	1362.7
		1335.5	-	1335.0(*)
		1244.9	+	1243.4

* ; not exactly printed by plotter, manual calculation for approximation.

+, - ; represents for peak shift on inclusion complex compared to separate analytes.

Table 9. Comparison of IR spectrum on β -CD and Aniline inclusion complex with β -CD or Aniline alone.

Aniline	Cf.	β -CD-Aniline complex	Cf.	β -CD
1622.4	+	1631.4		
1604.0	+	1612.0(*)		
1498.5	+	1499.5		
		1455.0(*)	-	1458.0(*)
		1415.5	-	1418.1
		1368.9		1368.2
		1335.4	-	1338.0(*)
		1299.0(*)	-	1301.0(*)
		1247.9	+	1245.0
		1156.8	-	1157.8
		941.9		941.6
		858.2	+	856.0

* ; not exactly printed by plotter, manual calculation for approximation.

+, - ; represents for peak shift on inclusion complex compared to each chemicals.

Table 10. Comparison of IR spectrum on β -CD and Benzaldehyde inclusion complex with β -CD or Benzaldehyde alone.

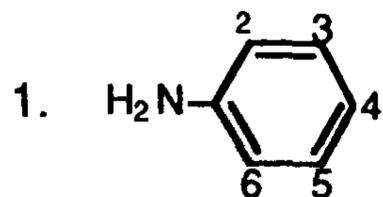
Benzaldehyde	Cf.	β -CD-Benzaldehyde complex	Cf.	β -CD
1701.0(*)	+	1701.5		
1595.0(*)	+	1600.0(*)		
1204.1	+	1205.1(*)		
		1414.2	-	1418.1
		1369.8	+	1368.2
		1335.1	+	1332.0(*)
		1157.1	-	1157.8
		941.9	+	941.6
		859.5	+	856.0

* ; not exactly determined by instrument, manual calculation for approximation.

+, - ; represents for peak shift on inclusion complex compared to separate analytes.

Table 11. Chemical shift of α -CD and Aniline inclusion complex with 200 MHz FT-NMR compared to free Aniline.

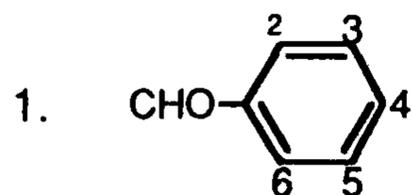
Aniline (ppm)	α -CD and Aniline complex(ppm)	position	Δ Hz
6.51102	6.49296	2, 6	3.63
6.54707	6.52924		3.57
6.58315	6.57094		2.44
6.67142	6.71197	4	-8.11
6.75108	6.74884		0.45
6.97772	6.97734	3, 5	0.08
7.01884	6.99697		4.38
7.05618	7.04816		1.51



2. Deuterated pyridine was used for solvent.

Table 12. Chemical shift of α -CD and Benzaldehyde inclusion complex with 200 MHz FT-NMR compared to free Benzaldehyde.

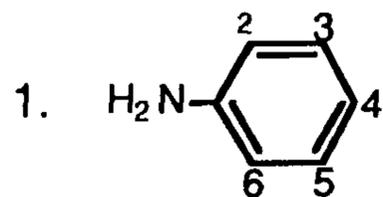
Benzaldehyde (ppm)	α -CD and Benzaldehyde complex(ppm)	position	Δ Hz
7.19343	7.18080	4	2.53
7.22751	7.21356		2.79
7.26447	7.25168	3, 5	
7.29693	7.27301		
7.33127	7.28174		
	7.28956		
	7.31621		
7.67319	7.66565	2, 6	1.51
7.70666	7.69843		1.65
9.85937	9.85298	CHO	1.28



2. Deuterated pyridine was used for solvent.

Table 13. Chemical shift of β -CD and Aniline inclusion complex with 200 MHz FT-NMR compared to free Aniline.

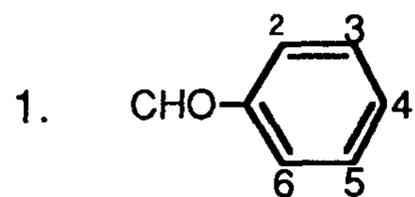
Aniline (ppm)	β -CD and Aniline complex(ppm)	position	Δ Hz
6.51102	6.49862	2, 6	2.48
6.54707	6.53508		2.40
6.58315	6.57684		1.26
6.71415	6.72288	4	-1.75
6.75108	6.75056		0.10
6.97772	6.97700	3, 5	0.14
7.01884	7.00315		3.14
7.05618	7.04536		2.17



2. Deuterated pyridine was used for solvent.

Table 14. Chemical shift of β -CD and Benzaldehyde inclusion complex with 200 MHz FT-NMR compared to free Benzaldehyde.

Benzaldehyde (ppm)	β -CD and Benzaldehyde complex(ppm)	position	Δ Hz
7.19343	7.22505	3,4,5	-6.32
7.22751	7.24717		-3.93
7.26447	7.28568		-4.24
7.29693	7.32070		-4.75
7.33127	7.34613		-2.18
7.67319	7.66732	2, 6	1.17
7.70666	7.70014		1.30
9.85937	9.85520	CHO	0.83



2. Deuterated pyridine was used for solvent.

가 커짐으로 α -CD보다는 upfield한 양은 적었으나 경향은 동일하였다. β -CD와 benzaldehyde에서는 분위기가 변하는데 CHO에서와 입구의 secondary-OH기들이 서로 H-bonding으로 생긴 down field shift가 아닌지 생각된다.

5. β -cyclodextrin bonded phase인 column의 효능

C-18 column과 β -CD bonded column의 효능을 비교해보기 위해 o, m, p-nitroaniline과 Dansyl-d, l-phenyl alanine을 사용하였다.

Nitroaniline은 0.005M의 농도를 갖게 섞은 다음 10 μ l씩 HPLC에 주입하였다. 이동상은 MeOH/Water 50:50을 사용하였고 용리되는 순서로서는 C-18에서 para, meta, ortho순으로 되었고 β -CD에서는 meta, ortho, para순으로 분리가 되었다. β -CD와 para form nitroaniline이 제일 센 inclusion complex가 형성되었고 meta form보다는 ortho complex가 steric effect에 의해서 더 잘 CD와 결합하였다. 이들의 retention parameter가 table 15에 요약되어 있다.

Table 15. Comparison of retention index C-18 and β -CD column for the separation of o, m, p-nitroaniline with HPLC.

Column	Compound	Retention time (min)	Resolution	α	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
β -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

Dansyl amino acid중 d, l-phenyl alanine을 선택하여 β -CD column과 C-18 column으로 분리를 시도하였다. 이동상으로 MeOH/Water/AcOH를 78:20:2로 만들어 사용하였고 시료는 0.1%되게 하여 10 μ l씩 HPLC에 주입하였다. Figure 29에서와 같이 d, l-form이 분리되는 것을 볼 수 있었으며 분리능은 0.67을 보였다. 역상크로마토그래피를 같은 조건에서 실험하여 본 결과 전혀 분리가 되지 않았고 peak가 한개로 나타내졌다.

β -CD가 이동상에서의 영향을 살펴보기 위하여 이동상인 MeOH/Water/AcOH=100:100:1에 β -CD를 포화시켜 β -CD가 이동

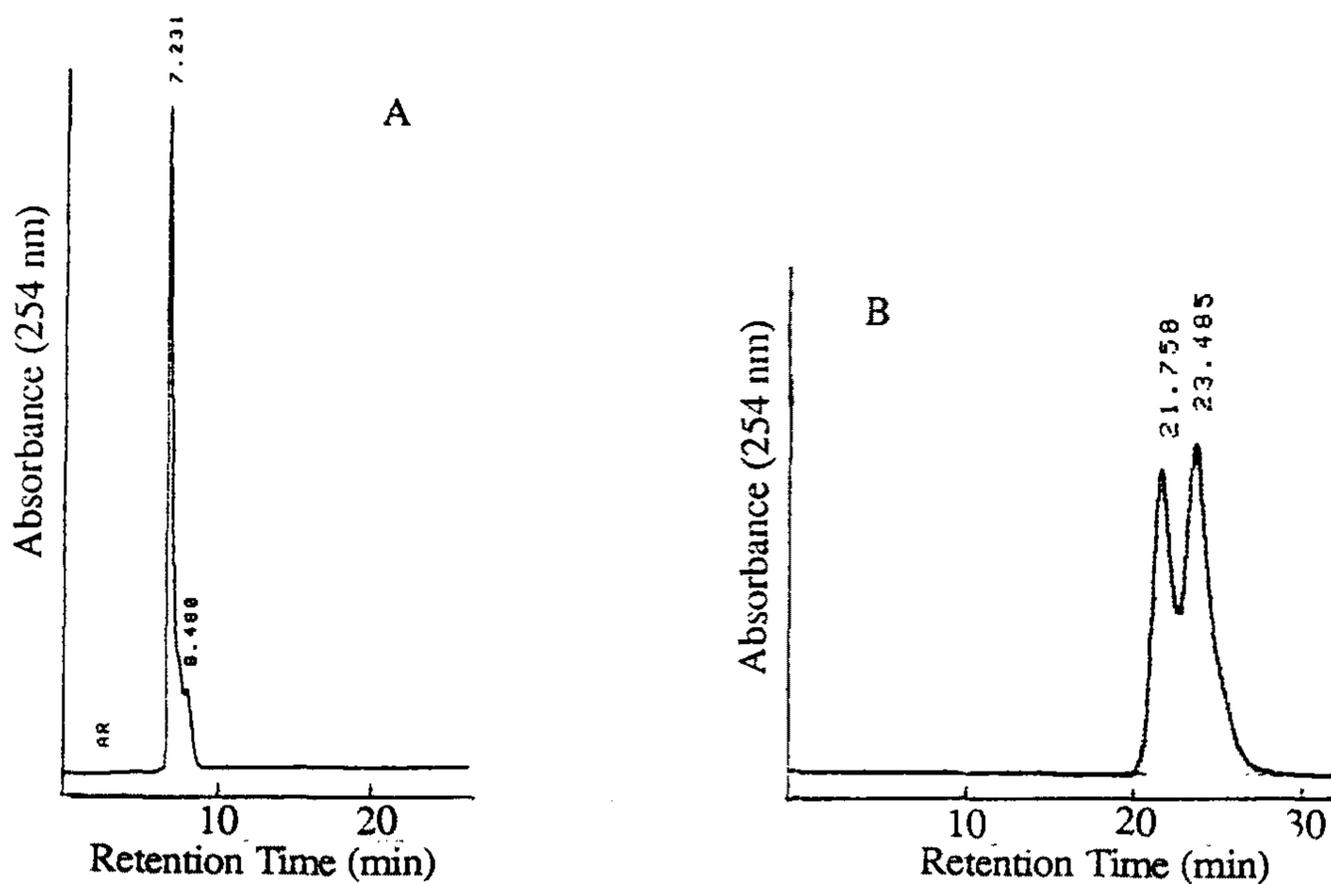


Figure 29. HPLC chromatogram of Dansyl-d, l-phenyl alanine with C-18 column (A) and β -CD column using MeOH/Water/AcOH(78/20/2) mobile phase.

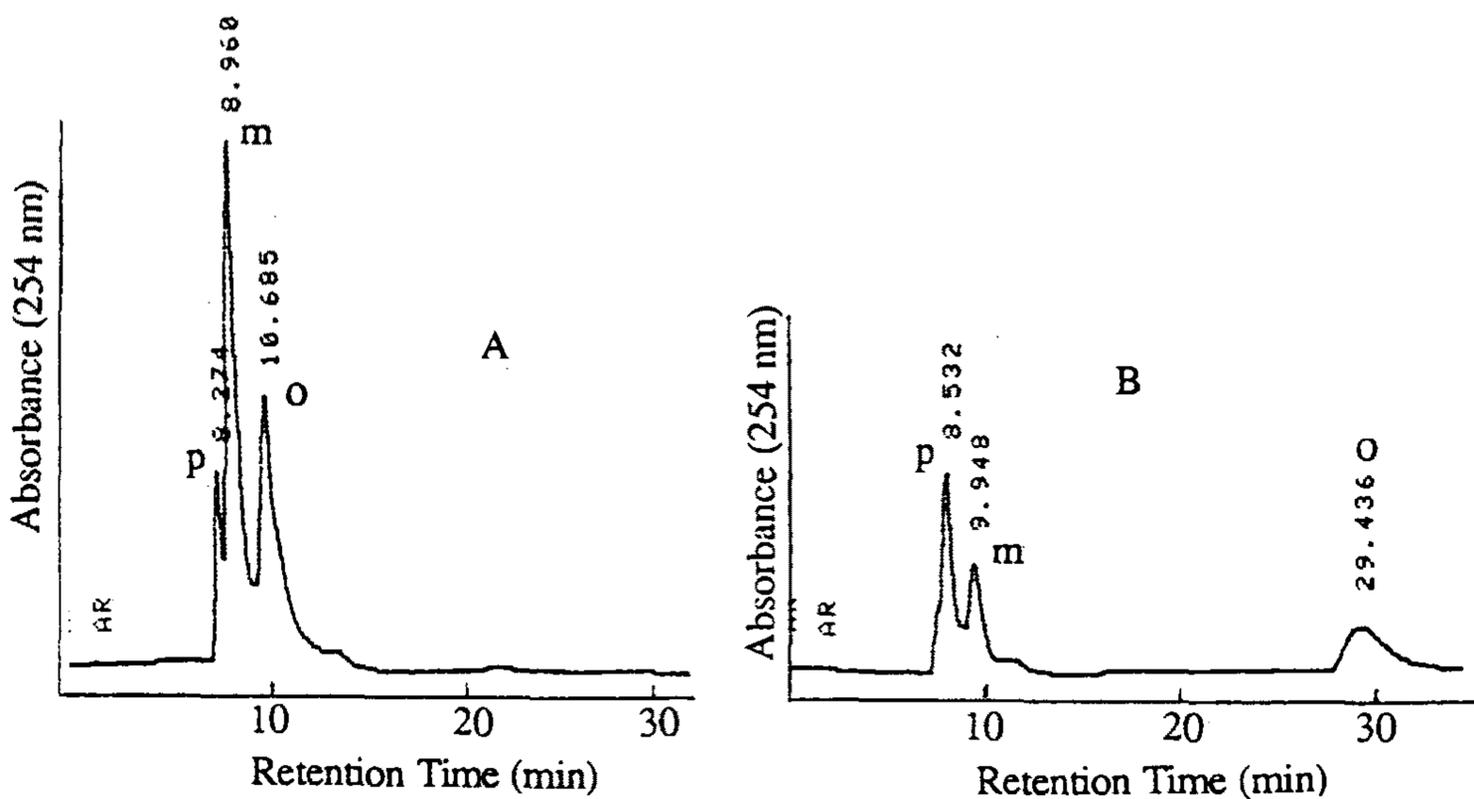


Figure 30. HPLC chromatogram of o, m, p-nitroaniline on C-18 column composed of two mobile phase system A and B; A. MeOH/Water/AcOH/ β -CD=100/100/1/1, B. MeOH/Water/AcOH=100/100/1.

상에 없을 때와 비교하여 보았다. 이때의 대상으로는 o, m, p-nitroaniline을 사용하였다. 이동상에 β -CD를 포화시켰을 때는 para, meta, ortho의 retention time이 8.27, 8.96, 0.69이었고 β -CD를 첨가하지 않는 이동상에 C-18 column에 의해 분리된 p, m, o-nitroaniline의 retention time은 8.53, 9.95, 29.44로 증가하여 β -CD가 nitroaniline과 inclusion complex를 형성함이 증명되었다(Figure 30).

6. 의약품 이성질체의 분리

β -CD column을 이용한 의약품 이성질체의 분리가능성을 살펴보기 위해 KIST 의약합성팀에서 합성한 antibacterial drug의 일종인 1,3-oxathiolane s-oxide(A), (\pm)-cis-3-amino-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid(B), (\pm)-cis-3-[(2-amino-diazole-4-yl)-2-(methoxyimino)acetoamido]-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid triethylamine salt(C)를 분리하여 보았다. 각각의 compound가 2개의 Chiral center를 가지기 때문에 4종류의 이성질체를 가진다. 이동상으로 MeOH/Water/AcOH=78:20:2의 비율로 조성하여 0.1% 시료 10 μ l씩 주입하였다. Compound C는 분리능 0.7 이상으로 4개가 분리되었고 B는 3개의 peak로 분리되었으나 A는 다만 2종류로만 분리되어 결과는 만족스럽지 못하였다. 그러나 이동상의 조건을 바꿈으로 이성질체 각자의 분리능이 1이상이 되게 할 수 있는 가능성이 보여 실제 시료분석에도 β -CD column이 효율적임이 밝혀졌다.

7. 아미노산 유도체들의 분리

아미노산 유도체들 중 Dansyl amino acid 표준물질 15종을 분리대상으로 하였다. 이동상의 조성은 MeOH/Water/AcOH를 78:20:2로 하여 isocratic mode로 0.5mL/min로 조정하여 254 nm에서 측정하였다.

Leucine, norvaline, methionine, glutamic acid, valine α -amino-n-butyric acid, norleucine, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid 등 11개의 Dansyl AA가 d, l-form이 분리되었다. 이들의 분리형태의 LC chromatogram이 figure 31~33에 나타내었고 retention parameter가 table 16에 정리되어 있다. 위에 기술한 AA는 분리능이 0.4~1.1정도 보여주어 실제 분리에 응용할 수 있었으나 γ -amino-n-butyric acid, tryptophan, sarcosine은 이성질체를 분리할 수 없었다. 동일한 조건하에서 C-18 column으로 바꾸어 AA의 분리를 시도하여 보았으나 이 조건에서는 전혀 분리가 되지 못하였다. 표준물질의 분리시간에 따라 leucine과 norvaline, methionine, glutamic acid 4종을 한 묶음으로 하여 group I이라 하고 valine, α -amino-n-butyric acid, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid 6종을 group II라 하여 서로 분리하였다. 이때에 얻은 chromatogram이 figure 34, 35에 도식하였다. 그러나 broad한 tailing으로 group I에서 leucine과 norvaline의 d, l-form이 서로 겹치고 group II에서 phenyl alanine과 threonine이 서로 겹쳐서 분리는 만족스럽지 못하였으나 그외 표준아미노산은 이성질체 분리가 되었다.

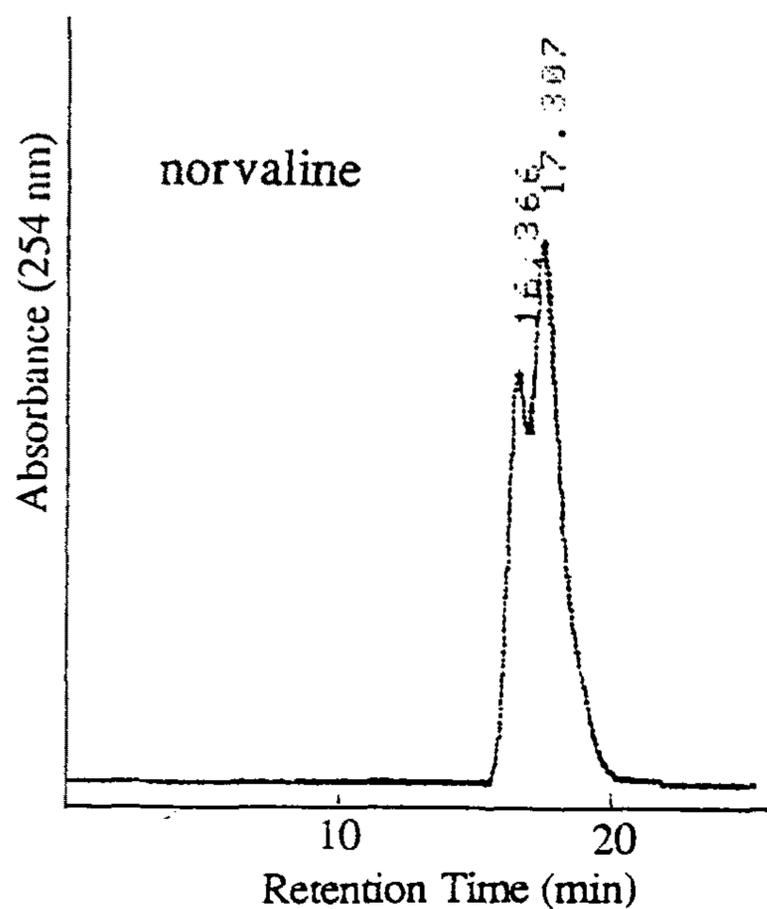
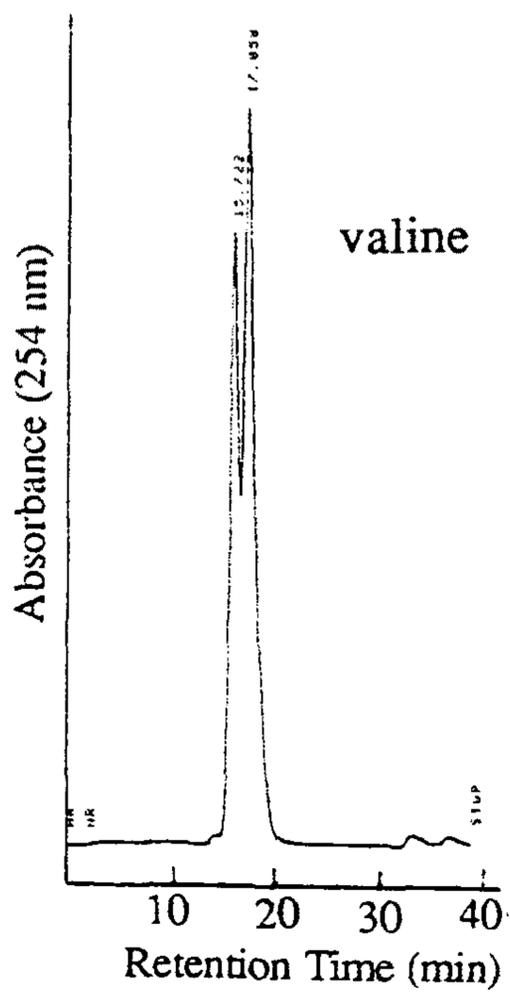
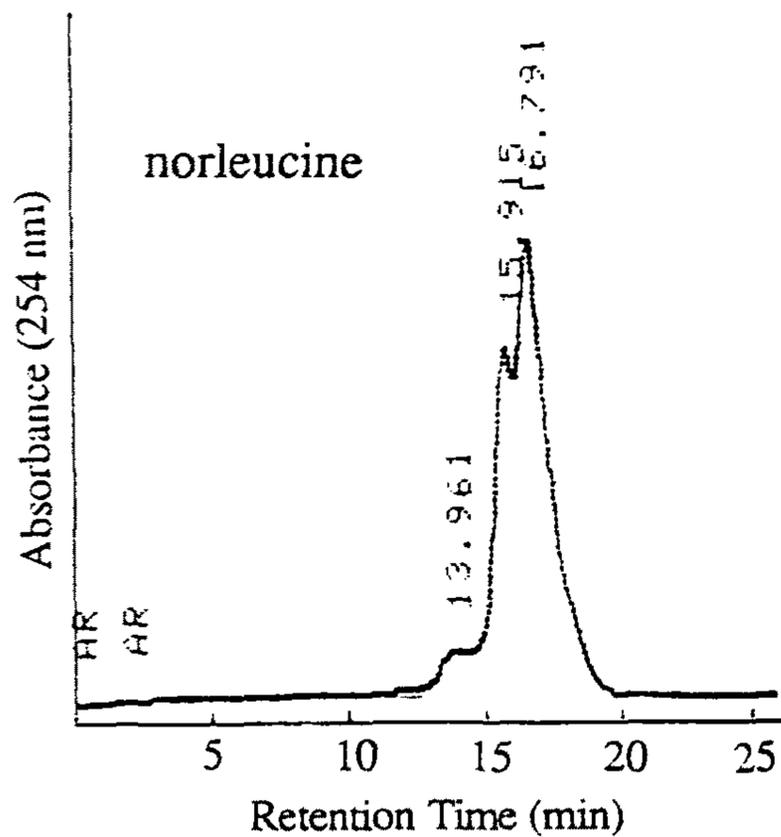
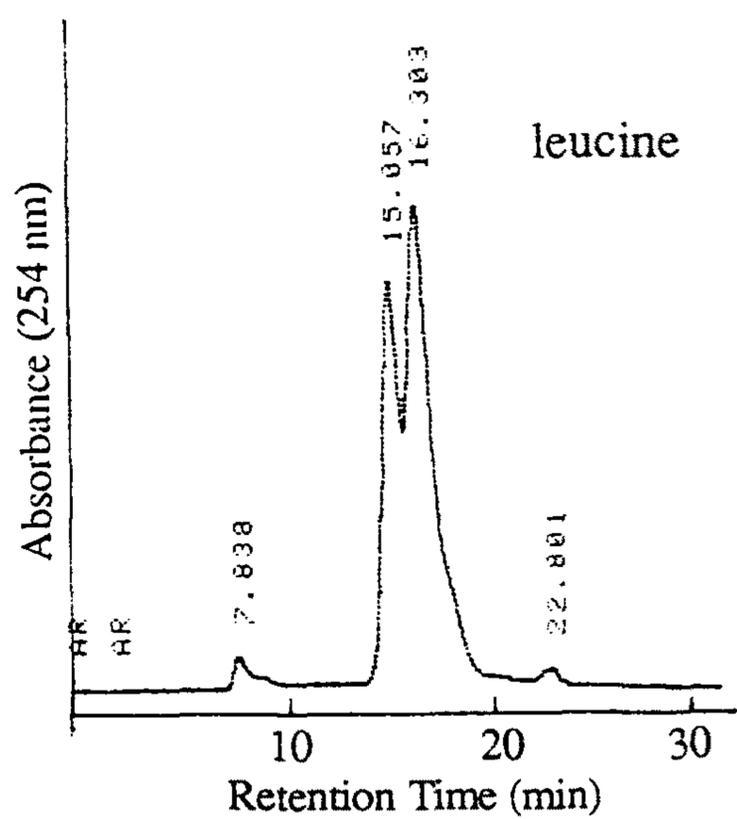


Figure 31. HPLC chromatogram of Dansyl-amino acids on β -CD column. For details, see text.

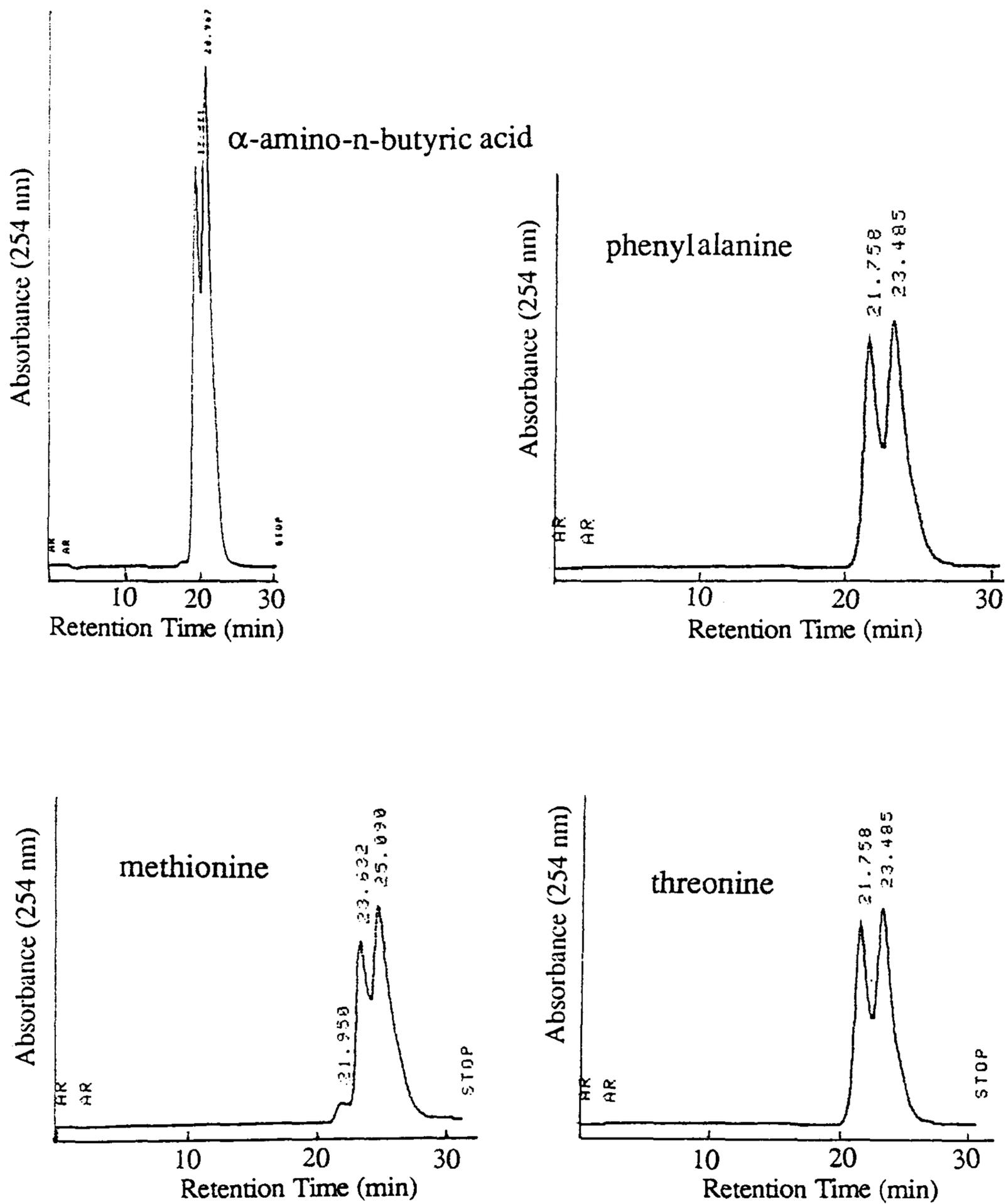


Figure 32. HPLC chromatogram of Dansyl-amino acids on β -CD column. For details, see text.

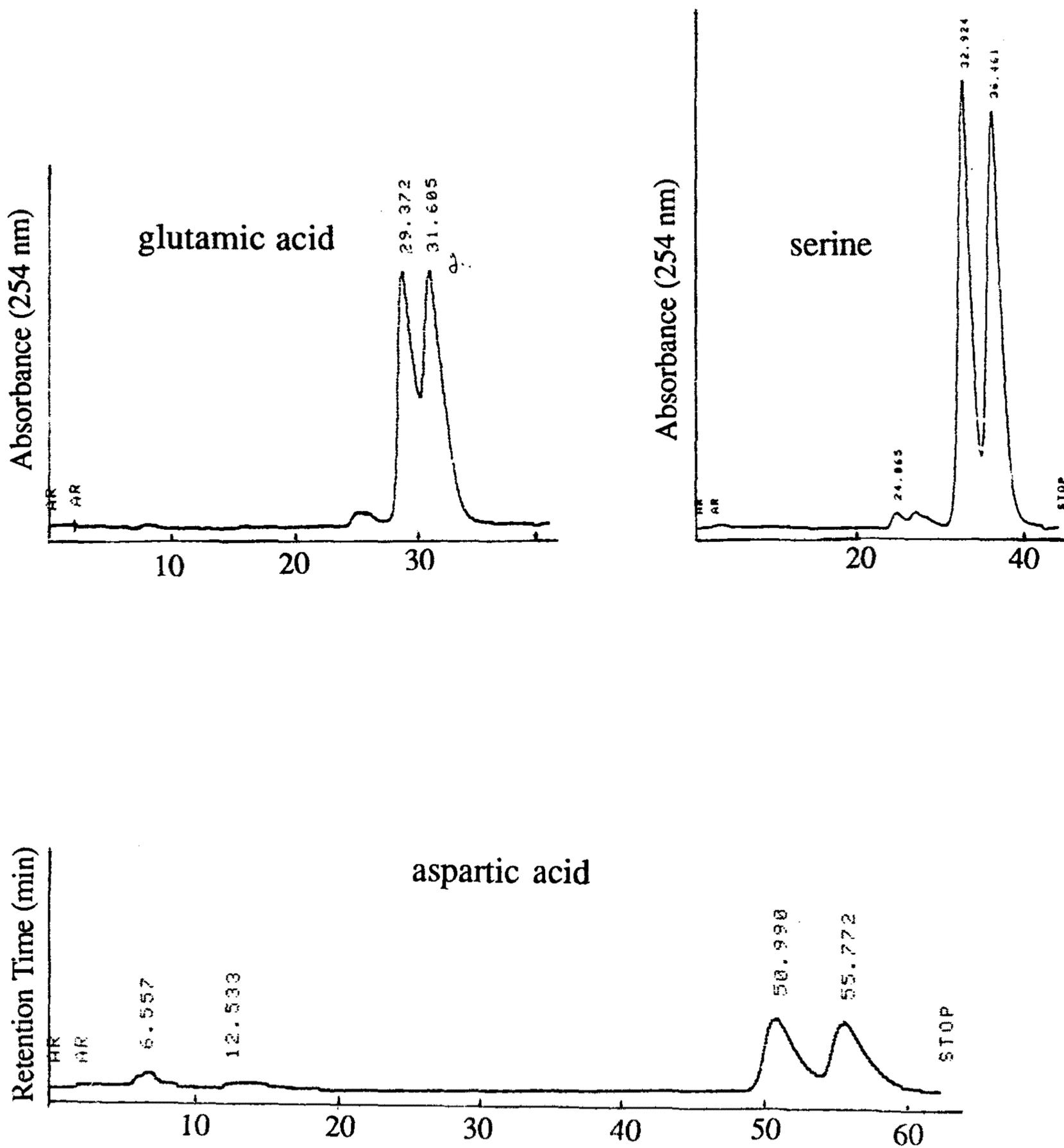


Figure 33. HPLC chromatogram of Dansyl-amino acids on β -CD column. For details, see text.

Table 16. Retention index of dansyl-d, l-amino acids on β -CD column, retention time, selectivity coefficient, capacity factor.

Dansyl-amino acid	Retention time	k'	Resolution	α
leucine	15.057	5.0	0.53	1.100
	16.304	5.5		
norvaline	16.374	5.6	0.44	1.071
	17.316	6.0		
methionine	23.632	8.4	0.64	1.071
	25.090	9.0		
glutamic acid	29.372	10.7	1.06	1.084
	31.605	11.6		
valine	15.722	5.2	0.67	1.096
	17.058	5.7		
α -amino-n-butyric acid	18.451	6.8	0.48	1.082
	19.719	7.4		
norleucine	15.915	5.3	0.36	1.076
	16.791	5.7		
phenylalanine	21.758	8.4	0.67	1.036
	23.485	8.7		
threonine	25.180	9.1	0.92	1.176
	29.203	10.7		
serine	32.924	12.2	1.00	1.115
	36.461	13.6		
aspartic acid	50.990	19.4	1.03	1.098
	55.772	21.3		

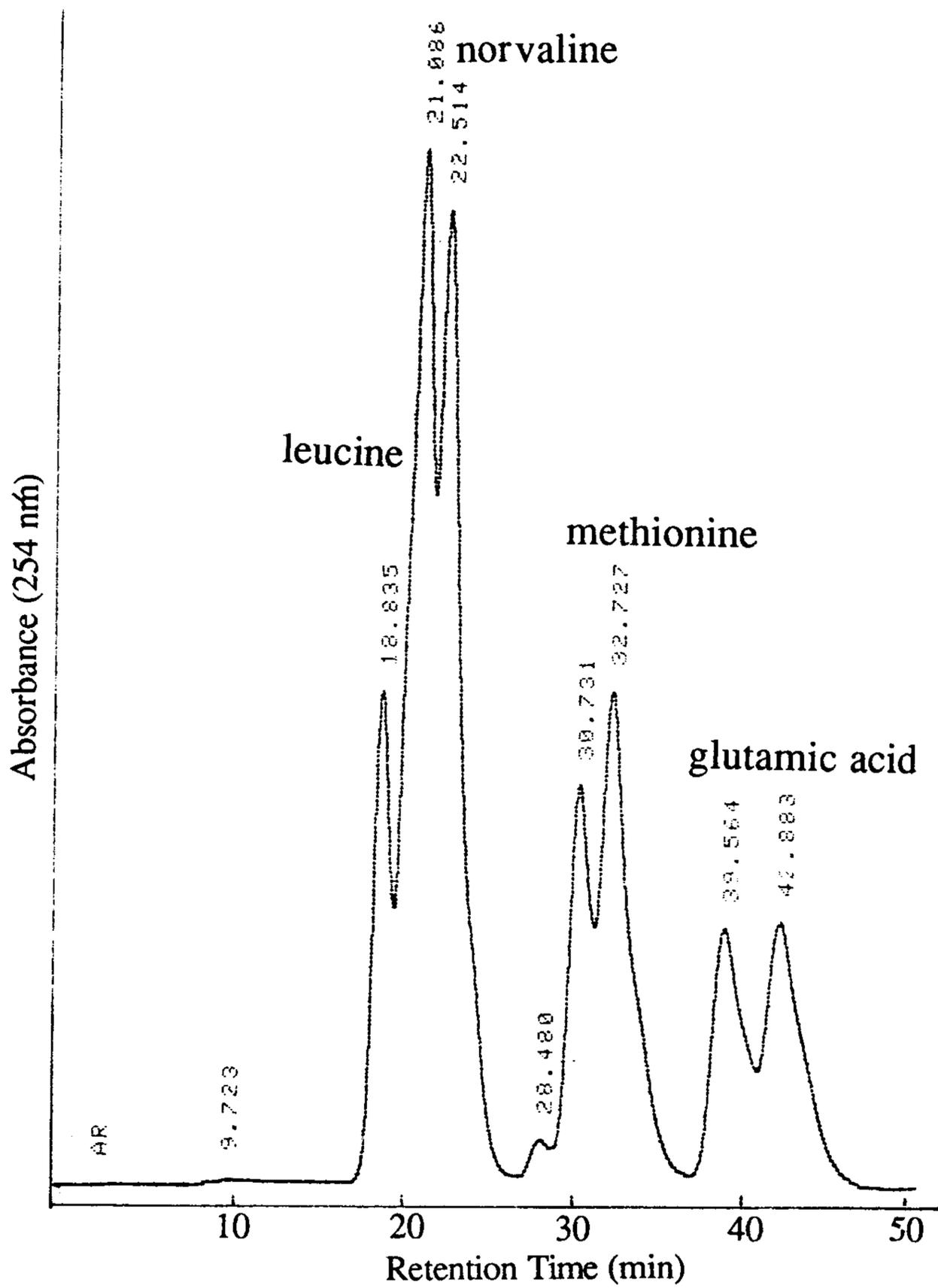


Figure 34. HPLC chromatogram of group I containing d, l-form of dansyl-leucine, norvaline, methionine, glutamic acid. Mobile phase composed of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) as isocratic mode on β -CD column.

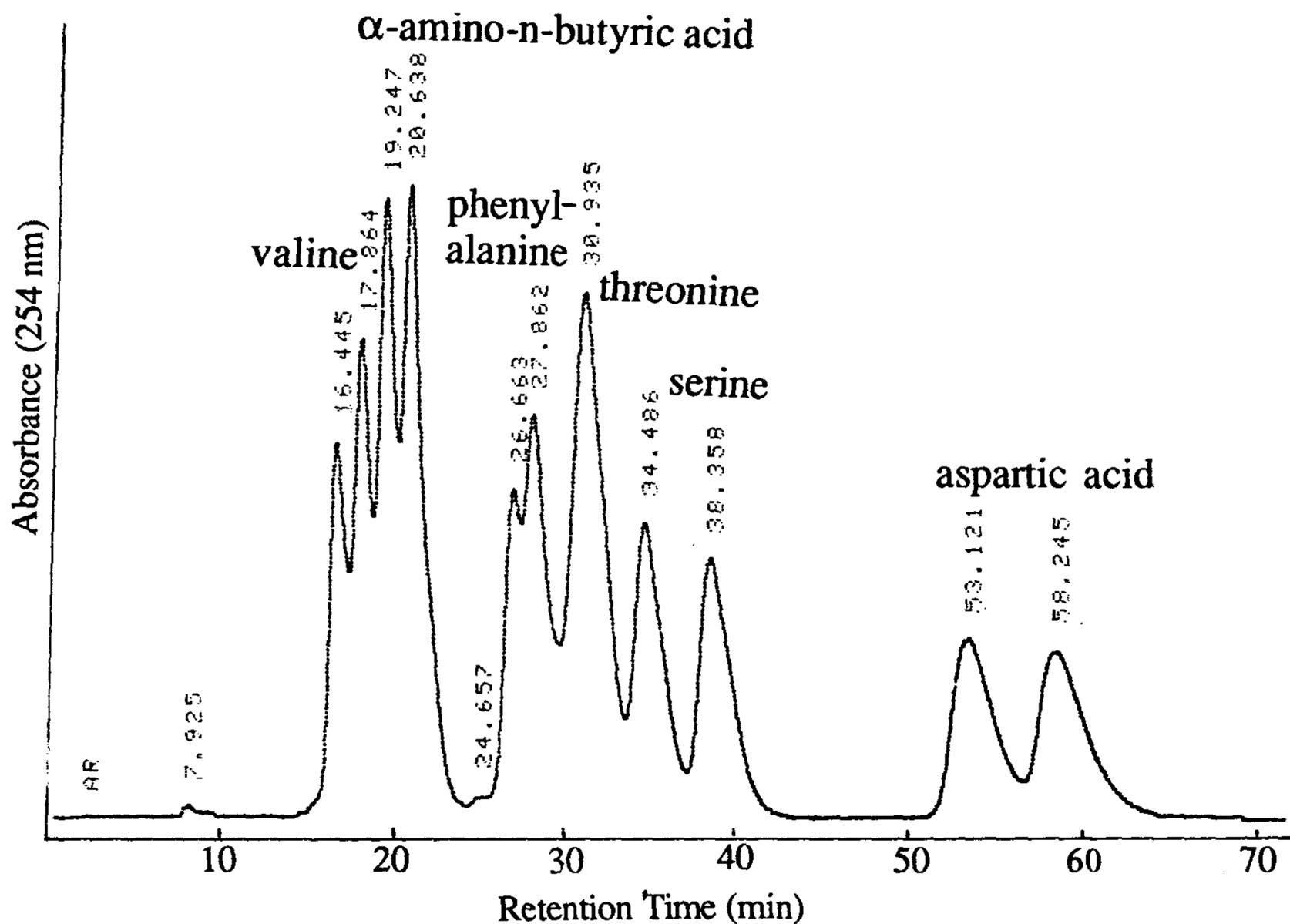


Figure 35. HPLC chromatogram of group II containing d, l-form of dansyl-valine, α -amino-n-butyric acid, phenylalanine, threonine, serine, aspartic acid. Mobile phase composed of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) as isocratic mode on β -CD column.

8. α , β -cyclodextrin과 광학이성질체 아미노산과의 선택성

α , β -CD와 Dansyl amino acid 즉 α -amino-n-butyric acid, serine, aspartic acid의 inclusion complex의 정도를 비교하였다. 이들의 d, l-form의 chromatogram이 figure 36에 나타나있고 d, l-form complex의 정도를 측정하기 위하여 free AA의 정량에 이용하였다. 0.01% 표준물질 1mL씩 α -CD나 β -CD가 각각 1mg, 2mg, 5mg 들어있는 vial에 넣고 sonification한뒤 여과하여 10 μ L씩 β -CD column에 주입하여 정량하였다. Table 17, 18은 α -CD나 β -CD를 0, 1, 2, 5mg 집어넣어 0.01% Dansyl amino acid와 inclusion complex를 되는 정도로 비교하여 본 것이고 table 19는 α , β -CD는 2mg으로 고정하고 analyte 농도를 0.005, 0.01, 0.02%로 변화하여 inclusion complex 형성됨을 비교한 것이다. 두 실험의 결과로 d-form이 cyclodextrin과 더 complex를 잘 이루었고 stability constant는 이 방법을 이용하여 구해볼만 하나 현재의 연구진행상 다음해로 그 결과를 연기하였다.

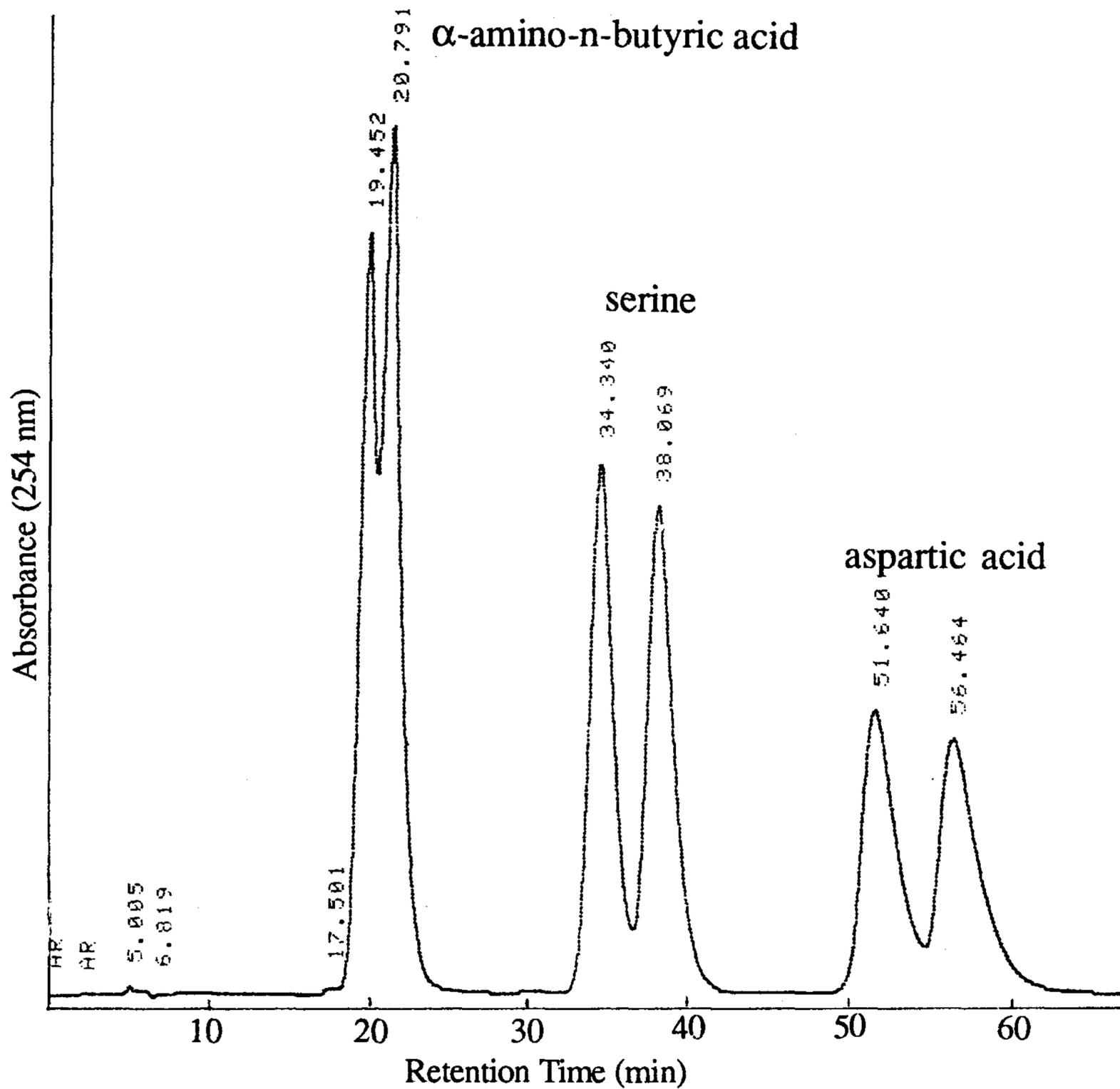


Figure 36. HPLC chromatogram of d, l-form of dansyl amino acid containing α -amino-n-butyric acid, serine, aspartic acid.

Table 17. Test of selectivity between dansyl-d, l-amino acid and various amount of α -CD mixture. Concentration of analyte was set up at 0.01% all through the experiment.

Dansyl AA	Amount of α -CD with 0.01 % AA in 1 mL				
		0 mg	1 mg	2 mg	5 mg
α -amino-n-butyric acid	Retention Time	(min)			
	l-form	18.917	18.272	18.489	18.748
	d-form	20.155	19.799	19.657	19.760
	Peak Area				
	l-form(Al)	15.029	14.618	15.185	15.311
d-form(Ad)	23.637	25.471	25.761	27.689	
	Ratio(Al/Ad)	0.6358	0.5739	0.5895	0.5530
serine	Retention Time	(min)			
	l-form	33.428	33.250	32.719	33.315
	d-form	37.110	36.978	36.234	37.040
	Peak Area				
	l-form(Al)	18.282	16.894	17.930	19.934
d-form(Ad)	18.540	17.076	18.354	20.585	
	Ratio(Al/Ad)	0.9861	0.9895	0.9769	0.9684
aspartic acid	Retention Time	(min)			
	l-form	50.439	49.930	49.375	49.945
	d-form	55.355	55.067	53.970	55.079
	Peak Area				
	l-form(Al)	12.082	12.778	10.724	7.585
d-form(Ad)	12.429	13.164	11.149	8.122	
	Ratio(Al/Ad)	0.9721	0.9707	0.9619	0.9339

1. Separation was performed through β -CD colume with mobile phase of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) isocratic system.

Table 18. Test of selectivity between dansyl-d, l-amino acid and various amount of β -CD mixture. Concentration of analyte was set up at 0.01% all through the experiment.

Dansyl AA	Amount of β -CD with 0.01 % AA in 1 mL				
		0 mg	1 mg	2 mg	5 mg
α -amino-n-butyric acid	Retention Time (min)				
	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 β -CD colume with mobile phase of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) isocratic system.

Table 19. Test of selectivity between dansyl-d,l-amino acid and various amount of anayte 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
α -amino-n-butyric 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 % α -cyclodextrin, others with 0.2 % β -cyclodextrin.

1. Numbers represents for the ratio between two enantiomers.

제 4 장 결론

1. 열처리 (105°C), 산처리 (6N Hcl), UV조사, enzyme 첨가에 의한 l-form amino acid인 alanine, threonine, isoleucine, leucine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine의 d-form으로 racemization되는 정도를 측정하여 본 결과, 오직 열처리에서만 aspartic acid와 glutamic acid가 극소량 이성화하여 2일뒤에 0.31%, 0.9% 이성화 비율을 얻었다. 그러나 그외의 조건하에서는 몇일간이내에서 이성화 현상을 측정할 수 없었다.

2. 4일간 105°C 열처리와 6N Hcl을 가열하였을 때 alanine은 1.5%, isoleucine은 1.2%, aspartic acid는 2.5%, glutamic acid는 3.0% tyrosine은 1.6% 정도 racemization이 되어 정량적인 분석일 때는 가수분해시간을 정확히 조절하는 것이 오차를 줄이는 중요한 과정이었다.

3. TFA-1PA 유도체를 만들때 Chirasil val column을 사용하면 d-serine, d-leucine, l-serine, d,l-proline이 분리가 되지 않았는데 d,l-proline을 제외한 나머지는 Mass spectrometer를 이용하여 구별이 가능하였다.

4. 아미노산의 TFA-1PA 유도체중 특이의 mass fragment는

alanine (140,168,72,92), threonine (153,152,84,266), valine(168,155,55,114), glycine (126,154,78,58), isoleucine (182,153,171,213), serine (139,138, 280,252), leucine (182,1540,153,168,), norleucine (182,126,140,153), proline (166,96,253,211), cystein (140,268,170,216), aspartic acid (184, 139,212,229), hydroxy proline (164,279,94), methionine (61,171,75, 2987), glutamic acid (198,180,226,152), phenylalanine (91,190,148,103), tyrosine (260,203,302,328), ornithine(166,306,279,211), lysine (180,294, 321,67), histidine (278,206,81,153), tryptophan(226,325,438,238)이었다.

5. α,β -cyclodextein과 benzaldehyde, aniline의 inclusion complex는 NMR과 IR의 peak shift로 확인되었다.

6. d,l-phenyl alanine과 o,m,p-nitroaniline을 대상으로 실험하여 본 결과 c-18 column보다 β -cyclodextrin bonded phase가 이성질체 분리에 우수한 효능이 있음이 증명되었다.

7. Bulky한 몇 종류의 광학이성질체의 약품분리는 cyclodextrin column도 별로 좋은 분리능을 보여주지 못하였다.

8. Danayl amino acid의 이성질체 분리는 β -cyclodextrin을 사용하였을 경우 leucine, norvaline, methionine, glutamic acid, valine, α -amino-n-butyrac acid, norleucine, phenylalanine, threonine, serine, aspartic acid가 분리되었다.

9. Inclusion complex의 정도를 Dansyl-amino acid로 비교하여 본 결과 d-form이 α, β -Cyclodextrin과 더 세게 complex를 형성하여 대개 l-form이 먼저 elution되었고, GC에서 chirasil-val calum에서와 다른 방향이었다.

참 고 문 헌

- (1) Stig G. Allen mark, "Chromatographic Enantioseparation," 1st ed. John Wiley & Sons, 1988.
- (2) A. Holt ; A.W. Javie ; G.J. Jerris, Tetrahedron Letters, 1968, 4087.
- (3) S. Mitsui ; Y. Kudo, Tetrahedron, 1967, 23, 4271.
- (4) G.Blaschke, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1980,13.
- (5) C.H. Lochmuller ; R.W. Souter, J. Chromatogr., 1975, 113, 283.
- (6) G. M. Janini ; D.E. Martire ; J.Chem. Soc. Faraday II, 1974, 70, 837.
- (7) N. Nimura ; T. Suzuki ; Y. Kasahara ; T. Kinoshita, Anal. Chem., 1981, 53, 1380-1383.
- (8) W., F. Lindner ; I.Hirschbock, J. of Liq. Chromatogr., 1986, 9(243), 551-571.
- (9) H. kiniwa ; Y. Baba ; T. Ishida ; H. Katoh, J. of Chromatogra., 1989, 461,397-405.
- (10) E. Armani ; L. Barazzoni ; A. Dossena ; R. Marchelli, J. of Chromatogr., 1988, 441, 287-298.
- (11). B. feibush ; M. J. Karger ; J.of Chromator., 1983, 282, 3-26.
- (12) W. Lindner ; J. N. Lepage ; g. Davies ; d. E. Seitz ; B. E. Seitz ; B.L. Karger, J. of Chromatogr., 1979, 185, 323-344.

- (13) T. Takeuch ; H. Asai ; D. Ishii, J. of Chromatogr., 1986, 357, 409–415.
- (14) C. Gilson ; R. Leshem ; E. Grushem ; E. Grushka, Anal. Chem., 1980, 52, 1206–1209.
- (15) S. Lim, J. of Chromatogr., 1986, 355, 157–164.
- (16) W. H. Pirkle ; D.W. House ; J.M. Finn, J. of Chromatogr., 1980, 192, 143–158.
- (17) Myung Ho Hyun, J. of Chromato., graphy, 1987, 393, 357–365.
- (18) Shoji Hara ; Akira Dobashi, J. of Chromatography, 1979, 186, 543–552.
- (19) W.H. Pirkle ; M.H. Hyun ; Bernadine Bank, J. of Chromatography, 1984, 361, 585–604.
- (20) W.H. Pirkle ; T.C. Pochaphy ; Bernadine Bank, J. of Chromatography, 1984, 361, 585–604.
- (21) J. Yama-shita ; T.Numakura ; H.Kite ; T. Suziki ; S. Miyano ; H. Hashimoto, J. of Chromatography, 1987, 103, 275–279.
- (22) P. Salva-dori ; D. Pini ; C. Rosini ; G. Uccello–Barre-tta ; C. Bertucci, J.of Chromatography, 1988, 450, 163–168.
- (23) W.H. Pirkle ; J.M. Finn, J.Org. Chem, 1981, 46, 2935–2938.
- (24) Heinz Berndt ; Gotz Kruger, J. of Chromatography, 1985, 348, 275–279.

- (25) J. Debowski ; Danuta Sybilska, J,of Chromatography, 1982, 237, 303–306.
- (26) E. Smolkova–Keulemansova, J. of Chromatography, 1982, 251, 17–34.
- (27) Daniel W. Arms-trong, J.of Chromatography, 1984, 7(S–2), 353–376.
- (28) A.Alak ; E. Heilweil ; W.L. Heilweil ; W.L. Hinze ; D.W. Arms-trong, J. of Liquid Chromatography, 1984, (7), 1273–1288.
- (29) T.J. Ward ; D.W. Aarms-trong, J.of Liquid Chromatography, 1986, 9(2&3), 407–423.
- (30) D.W. Arms-trong ; W. Demond, J. of Chronatographic Science, 1984, 22.
- (31) C.D. Tran ; J.H. Fendler, J. Phys. Chem, 1984, 88, 2167–2173.
- (32) Prof. dr–Ing ; W.Saenger, Angew. Chem. Engl, 1980, 19, 344–362.
- (33) Daniel W. Arms-trong ; Tims-trong ; Tims-trong ; Timothy J. Ward ; R.D.Arms-trong ; T.E. Beesley, 232.
- (34) R.P Rodinguez ; E.M. Eyrng ; J.F. Wojcik, The Journal of Physucal Chemistry, 1977, 81.
- (35) Marian Mikolajczyk ; Jozef Drabowicz, J. of the American Chemical Society, 1978, 100, 8.
- (36) Yoshio Inoue ; T.Okude ; Y. Miyata, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 7393–7394.

- (37) S. Allenmark ; B. Bomgren, J. Chromatogr., 1982, 252, 297.
- (38) K.R. Lindner, J. Chromatogr., 1980, 193, 308–310.
- (39) S. Hara ; A. Dobashi ; K. Kinoshita, J. Chromatogr., 1986, 371, 153–158.
- (40) A. dobashi ; Y. Dobashi ; Y. Dobashi ; Tamami Oho ; Shoji Hara, J. Chro matogr., 1989, 461, 121–127.
- (41). K.R. Leimer ; R.H. Rice ; C.W. Gehrke, J. Chromatogr., 1977, 141, 355.
- (42) F.W. McLafferty ; E.R. Lory ; J.Chromatogr., 1981, 203, 109.
- (43) N. Oi ; M. horiba ; H. Kitahara, J. of Chromatogr., 1980, 202, 299–301.
- (44) I. Abe ; K. Izumi ; S. Kuramota, ; S. Mrsha, J. of HRC &Cc, 1981, 4, 549–553.
- (45) N.E. Blair ; W.A. Bonner, J. of Chromatogr., 1980, 198, 185–187.
- (46) H. Frank ; A. Retternmeier ; H. Weiker ; G. J. Nicholson ; E. Bayer, Angel. chem., 1982, 54, 715–719.
- (47) B. Grego ; M.T. W. Hearn, J. Chromatogr., 1983, 255, 67.
- (48) B.R. Larsen ; F.G. West, J. Chromatogr. Sci., 1981, 19, 257.
- (49) H. Umagat ; P. Kucera ; L.F. Wen, J. Chromatogr., 1982, 239, 463.
- (50) R.L. Heinrickson ; S.C. Meredith, Angel. Biochem., 1984, 136, 65.
- (51) J.R. Soies, Anal. Chem., 1967, 39, 1412

- (52) F.E. Kaiser ; C.W. Gehrke ; R.W.Zumwalt ; K.C. Kuo, J. Chromatography, 1974, 94, 113.
- (53) D. Lahadarios ; I.M. Moodie ; G.S. Shepard, J. Chromatogr., 1984, 310, 223.
- (54) M. Makrta ; s. Yamamoto ; S. Kiyama, J. Chromatogr., 1982, 37, 279.
- (55) S. Lahadarios ; R.A. Landowne, Tetrahedron, 1966, 34.
- (56) B. Halpern ; J.W. Westly, Chem. Commun., 1966, 34.
- (57) C.J.W. Brooks ; M.T.Gilberrt ; J. Gilbert, Anal. chem., 1973, 45, 896.
- (58) B. Halpern., ; J.W. Westley, Biochem. Biophys. Reo. Commun., 1965, 19, 361.
- (59) J.W. Westly ; B. Halpern, Anal. Chem., 1986, 40, 2046.
- (60) R.W. Soutdr, J. Chromatogr., 1975, 108, 265.
- (61) B.L. Karger ; R.L. Stern ; W. Keane, Anal. Chem., 1967, 39, 228.
- (62) J.A. Dale ; D.L. Dull ; H.s. Mosher, J. Org. Chem., 1969, 34, 2543.
- (63) J. Gal ; M.M. Ames, Anal. Biochem., 1977, 83, 266.
- (64) J.W. Westley ; B.Halpern, J. Org. Chem., 1968, 33, 3978.
- (65) S. Hammarstrom ; M. Hanberg, Angel. Biochem., 1973, 52, 169.
- (66) J.D. Gilbert ; C.J.W. Brooks, Angel. Leyy., 1973, 6, 639.

- (67) E. Gil—Ar. ; R. Charles ; G. Fisher, J. Chromatogr., 1965, 17, 408.
- (68) S. Julie ; J.M. Sans, J. Chromatography Sci., 1979, 17, 651.
- (69) J.P. Kamerling ; M. duran, J. Chromatogr., 1981, 222, 276.
- (70) B. Halpern ; L.F. Chew ; J.W. Westly, Anal. Chem., 1967, 39, 399.
- (71) A.R. Mitchell ; S.B.H. Kent ; I.C. Dhu ; R.B. Merrifield, Anal. Chem., 1978, 50, 637.
- (72) E.P. Kroeff ; D.J. Pietrzyk, Anal. Chem., 1978, 50, 1053.
- (73) E. Lundanes ; T. Geibrkk, J. Chomatogr., 1980, 221, 109.
- (75) J. Goto ; M. Hasegawa ; S. Nakamura ; K. Shimada ; T. Nambara, J. Chromatogr., 1978, 152, 413.
- (76) P.Loew ; W.S. Johnson, JACS, 1971, 93, 3765.
- (77) M. Koreeda ; G. Weiss ; S. Nakanishi, JACS, 1973, 95, 239.
- (78) C.G. Scott ; M.J. Petrin ; T. Mccorcle, J. Chromatogr., 1976, 125, 157.
- (79) B.J. Bergot ; R.J. Anderson ; D.A. Schooley ; C.A. Henrick., J. Chroamatogr., 1978, 155, 97.