DAEHAN HWAHAK HWOEJEE
(*Journal of the Korean Chemical Society*)
Vol. 30, No. 2, 1986
Printed in the Republic of Korea

고성능 액체크로마토 그래피에 의한 Dansyl-아미노산 광학이성질체의 분리

李善行† · 吳岱燮 · 朴京淑
경북대학교 사범대학 화학교육과
(1985. 10. 15 접수)

Separation of Optical Isomers of DNS-Amino Acids in High-Performance Liquid Chromatography

Sun Haing Lee, Tae Sub O, and **Kyung Sug Park**
Department of Chemical Education, Kyungpook National University, Taegu 635, *Korea*
(Received October 15, 1985)

요 약. Dansyl 유도화된 아미노산의 광학이성질체를 분리하기 위해 광학활성인 *L*-arginine과 몇가지 금속(구리, 아연, 카드뮴, 니켈)의 킬레이트를 이동상에 첨가하여 역상 칼럼내에서 분리를 시도했다. 구리 킬레이트 이외의 것은 광학이성질체의 분리가 안되었다. 아미노산의 광학이성질체의 분리 거동은 이동상의 pH 및 유기용매조성, 완충용액의 종류와 농도, 금속의 종류와 킬레이트 농도에 의해 영향을 받음을 알 수 있었다. Valine, metionine, leucine, phenylalanine은 *D*형이 먼저 용리되고 serine과 alanine은 *L*형이 먼저 용리되었으며 threonine은 *D*형과 *L*형의 분리현상이 나타나지 않았다. 이러한 분리거동은 리간드 교환반응에 의한 (*D*, *L*-DNS-AA) (M) (*L*-Arg) 3종 착물이 형성될때의 입체 특이성효과로써 설명할 수 있다.

ABSTRACT. Separation of optical isomers of DNS derivatized amino acids by a reversed-phase high-performance liquid chromatography has been studied by adding a complex of an optically active amino acid (*L*-arginine) with the metal ion (Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ni(II)) to the mobile phase. The separations are affected by the concentrations of acetonitrile, chelate and buffer. They are also affected by the pH and the kinds of metal and buffer. A separation mechanism, which is based on steric effect of the ligand exchange reaction for the formation of ternary complexes by the *D*, *L*-DNS-amino acids and the chiral additive associated with the stationary phase, is proposed to interpret the elution behaviors of *D*, *L*-dansyl-amino acids.

서 론

아미노산의 분리와 분석에 관한 연구는 초기에는 주로 기체 크로마토그래피에[1~4] 의해 행해졌으나 최근 액체크로마토그래피(LC)가 발달함에 따라 비휘발성을 띠는 아미노산의(AA)의 특성으로 인해 LC를 이용한 연구가 더 활발히 진행되고 있으며, 특히 아미노산의 광학이성질체의 분리에 관심이 집중되고 있다.

고성능 액체크로마토그래피(HPLC)로써 아미노산의 광학이성질체를 분리하기 위해서는 리간드교환크로마토그래피(LEC)방법을 이용하는데 일반적으로 두가지의 접근방법이 있다. 첫째 방법은 고체지지체에 광학활성인 리간드를 결합시키는 방법이고[5~9], 둘째 방법은 이동상에 광학활성인 킬레이트를 첨가시키는 방법이다[13~23]. 그

러나, 광학활성인 리간드가 결합된 정지상은 합성이 복잡하고 합성혼합물에서 광학활성인 리간드를 분리하기 어려울뿐 아니라 이러한 정지상의 사용은 몇가지 종류의 아미노산쌍을 분리하는 데에만 한정되기 때문에 많이 이용되지 않고 두번째 방법이 더 간편하고 활용이 다양하여 많이 이용되고 있다.

이들 연구의 대부분은 아미노산의 아미노기를 Dansylation 시킨 것이나 아니면 Free 아미노산 자체를 분리하며 분리제로 킬레이트를 사용하며 주로 Cu(II)를 킬레이트의 중심 금속으로 사용해 왔다. 용리순서는 *D*와 *L* 아미노산의 경우 일정하지 않으며 그 순서에 대한 메카니즘도 알려져 있지 않다. 예를들면 *L*-Proline-Cu(II)를 이동상으로 사용하여 HPLC로 dansylated amino acid (DNS-AA)를 분리할 경우는 *L*형 아미노산이 먼저 용리되지만[13] 같은 용리액을 사용하여 free-AA을 분리할 경우는 그 반대로 *D*형의 아미노산이 먼저 용리된다[16]. 또 같은 종류의 용리액을 사용하고 free-AA을 이온교환수지로 분리할 경우는 *L*형의 아미노산이 먼저 용리된다[12]. 이와같은 용리거동을 설명할 수 있는 분리 메카니즘은 연구할만한 가치가 있다고 생각된다.

본 연구에서는 아미노산을 dansyl chloride로 아미노산 유도체를 만들어서 C_{18} 칼럼을 이용한 역상 액체 크로마토그래피(RPLC)상에서 LEC에 의한 유도체의 광학이성질체 분리현상을 조사하였다. 이동상으로는 *L*-arginine을 리간드로 하여 여러 금속 이온들과 각각의 킬레이트를 생성시켜 사용하였으며 분리에 영향을 주는 요소인 금속 킬레이트의 종류와 농도, 용매의 조성, pH, 이동상의 흐름속도, 완충용액의 종류 및 농도에 대한 영향을 조사하였다. 이것을 토대로 이 분리계에서 나타난 *D*형과 *L*형의 용리순서를 설명할 수 있는 입체 특이성이 우세한 분리메카니즘을 규명하고자 한다.

실 험

1. 기기장치. 액체 크로마토그래프(Liquid Chromatograph)는 Waters Associates 회사(Milford Massachusetts, U.S.A.)제품을 사용하였는데, 고압펌프는 Model 6000A solvent delivery system, 시료 주입은 Model U6K Universal LC Injector를 사용했다. 검출기는 Model 420 Fluorescence Detector를 사용하여 들뜸 필터의 파장은 365nm, 방출 필터의 파장은 495nm를 선택했다. 기록기는 Model 730 Data Module을 사용했으며, 역상칼럼은 μ-BONDAPAK C_{18} (300×3.9mm i.d., 10μm)을 사용했다. 이동상의 pH 조정은 Fisher제 pH Meter Model 292를 사용했다.

2. 시약. 분리에 이용되는 아미노산은 *D*, *L*-serine(Ser), *D*, *L*-threonine(Thr), *D*, *L*-alanine (Ala), *D*, *L*-valine(Val), *D*, *L*-metionine(Met), *D*, *L*-leucine(Leu) 및 *D*, *L*-phenylalanine(Phe)이며, *L*-arginine(*L*-Arg)을 이동상에 있는 킬레이트의 기준 나사선형 리간드로 사용했으며, 유도체 시약으로는 dansyl chloride(DNS-Cl)를 사용했다.

위에 사용한 시약 serine, valine, arginine 및 DNS-Cl은 Sigma제(Saint Louis, Mo, U.S.A.)이고 threonine, alanine, metionine, leucine 및 phenylalanine은 Yoneyama제(오오사카, 일본)이었다. 그 외에 사용한 용매와 시약은 1급 혹은 특급을 더 이상 정제하지 않고 사용했다.

3. 실험과정. DNS-AA는 참고문헌[21]에 의해 다음과 같은 방법으로 만들었다. 아미노산 약 1.5mg를 1m*l*의 0.1M 중탄산소오다 용액에 녹인다음 DNS-Cl 아세톤 용액(3mg/m*l*)을 첨가한다. 37~50°C에서 15~60분 동안 DNS-Cl의 노란색이 사라질 때까지 반응시킨다. 위 방법으로 만든 DNS-AA를 직접 액체 크로마토그래프에 주입시킨다. 이동상은 금속(Cu^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+} 및 Zn^{2+})과 리간드인 *L*-arginine을 1 : 2의 몰비로 2.5×10^{-2}M의 암모늄아세테이트 수용액에 녹이고 pH를 조정한 후 아세토니트릴의 조성을 맞추었다. 이 이동상은 Millipore 제품인 용매 정제기를 사용하여 정제 및 탈기시킨후 사용했다. LC 펌프의 압력은 주로 1000 psi이었으며 용매의 조성에 따라 조금씩 차이를 보였다. 이동상의 흐름속도는 보통 2.0m*l*/min으로 고정하여 사용했다.

결과 및 고찰

본 연구에서 이동상으로 사용하는 킬레이트의 조성은 금속과 리간드(*L*-arginine)의 농도비가 1 : 2로 되게 했는데 이는 여기서 적용되는 금속과 아미노산은 1 : 2착물을 형성한다고 알려져 있기 때문이다[22,23]. 아미노산의 광학이성질체 분리에 관계하는 중요한 리간드 교환 반응은 다음과 같이 일어날 것으로 예상된다.

$$\text{⧖-}C_{18}\cdots\cdots(L\text{-Arg})\text{-M(II)-}(L\text{-Arg}) + (\text{DNS-AA}) \overset{K}{\rightleftharpoons} \text{⧖-}C_{18}\cdots\cdots(L\text{-Arg})\text{-M(II)-}(\text{DNS-AA}) + (L\text{-Arg}). \quad (1)$$

여기서 ⧖-C_{18}은 octadecyl silane이 silica에 결합된 칼럼 충전제를 의미한다.

이들 아미노산 유도체의 분리는 정지상과의 직접적인 상호작용에 의한 분배차이에도 기인하지만 식(1)에서 보는 것처럼 아미노산 킬레이트 교환 반응의 정도에 지대한 영향을 받을 것이다. 평형상수 K는 아미노산의 종류에 따라 다를 것이 예상되며 생성된 킬레이트는 C_{18}칼럼과 입체적인 상호작용이 다르므로 아미노산의 종류에 따라 다양한 분리 선택성이 기대된다. 아미노산의 광학이성질체인 경우는 리간드교환 반응이 일어날 때의 입체효과로 인하여 *D*형과 *L*형의 평형상수 K가 다를 것이므로 아미노산 광학이성질체의 선택적인 분리가 기대된다. 또 평형상수 K는 금속의 종류에 따라 차이가 있을 것이 예상된다[13,14]. 따라서 본 연구에서는 금속이온의 종류와 그 킬레이트의 농도, 용매의 조성, pH영향, 이동상의 흐름속도, 완충용액의 종류 및 농도 효과에 대한 LEC의 분리행동과의 상호연관성을 알아본다.

Fig. 1은 Cu(II)와 *L*-Arg의 킬레이트를 사용했을 때의 *D* 및 *L*-DNS-아미노산의 분리정도를 나타내는 대표적인 크로마토그램이다. 각각의 아미노산이 서로 분리되었으며 알킬사슬이 길수록 정지상과의 소수성상호작용이 증가하여 머무름이 증가하는 경향을 보여준다. threonine을 제외한 다른 아미노산은 *D*와 *L*형의 분리가 가능함을 나타낸다. 특히 머무름값이 적은 serine과 alanine은 *L*형이 먼저 용리되는데 비해 머무름값이 대체적으로 큰 valine과 metionine, leucine, phenylalanine은 *D*형이 먼저 용리된다. 이는 이들 아미노산의 알킬사슬의 구조가 *D*와 *L*형의 분리선택성에 영향을 준다는 것을 의미한다.

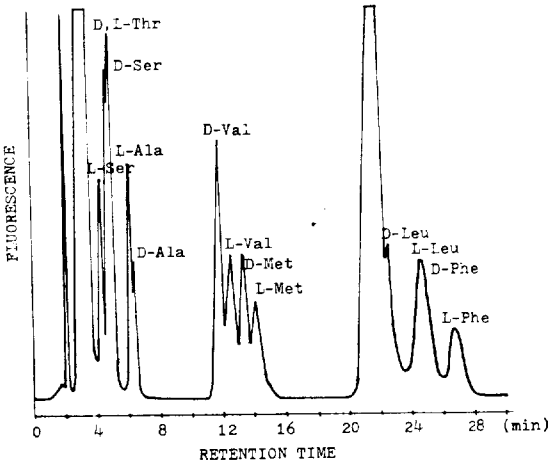

Fig. 1. A typical chromatogram of optical isomers of amino acids. The mobile phase consists of 20% acetonitrile and 80% Cu(II)-*L*-arginine chelate solution containing 5×10^{-3}M copper ion with 2.5×10^{-2} M NH_4-Ac at pH 7.0. The flow rate is 2.0 m*l*/min.

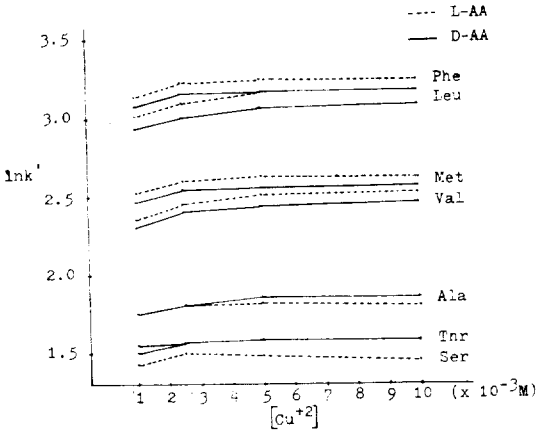

Fig. 2. Effects of the concentration of copper(II) in the chelate on the retention. The mobile phase consists of 20% acetonitrile and 80% metal chelate solution containing 2.5×10^{-2}M NH_4Ac at pH7.0. The flow rate is 2.0m*l*/min.

이동상으로 이용되는 금속 킬레이트의 농도가 이성질체의 분리에 영향을 미칠것이 예상된다. *Fig.* 2에서 나타난 바와같이 금속 킬레이트 농

Table 1. Capacity ratio(k') and selectivity(α) as a function of acetonitrile concentration

DNS-AA	15%		20%		25%		30%	
	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Ser *L*	5.47	0.91	2.07	0.86	0.75	0.85	0.18	1.00
D	5.99		2.42		0.88		0.18	
Thr *L*	6.58	1.00	2.57	0.99	0.89	0.99	0.43	1.00
D	6.58		2.59		0.90		0.43	
Ala *L*	8.62	0.94	3.29	0.95	1.26	0.95	0.62	1.00
D	9.18		3.48		1.33		0.62	
Val *L*	21.79	1.10	7.75	1.08	2.75	1.06	1.26	1.00
D	19.83		7.19		2.59		1.26	
Met *L*	31.69	1.30	8.87	1.08	3.03	1.06	1.33	1.00
D	24.33		8.25		2.87		1.33	
Leu *L*	50.03	1.13	16.39	1.13	5.21	1.09	2.23	1.11
D	44.22		14.51		4.77		2.01	
Phe *L*	59.53	1.11	17.98	1.08	5.38	1.06	2.29	1.03
D	53.77		16.59		5.06		2.23	

The aqueons solution in the mobile phase is the 5×10^{-3}M copper(II)-*L*-arginine chelate containing 2.5×10^{-2}M NH_4Ac at pH 7.45. Flow rate: 2.0ml/min.

Table 2. Capacity ratio (k') and selectivity (α) as a function of pH

DNS-AA	pH 5.0		pH 6.0		pH 7.0	
	k'	α	k'	α	k'	α
Ser *L*	3.45	0.93	1.93	0.87	1.92	0.85
D	3.70		2.23		2.25	
Thr *L*	5.18	1.00	2.61	1.00	2.39	0.99
D	5.18		2.61		2.41	
Ala *L*	7.10	0.96	3.53	0.94	3.15	0.93
D	7.37		3.62		3.37	
Val *L*	18.74	1.00	7.99	1.00	7.44	1.07
D	18.74		7.99		6.96	
Met *L*	21.14	1.00	8.63	1.00	8.50	1.07
D	21.14		8.63		7.98	
Leu *L*	43.38	1.00	16.03	1.02	15.39	1.11
D	43.38		15.73		13.83	
Phe *L*	44.77	1.00	17.63	1.00	16.87	1.10
D	44.77		17.63		15.39	

The mobile phase consists of 20% acetonitrile and 80% metal chelate soluton containing 5×10^{-3}M copper ion and 1.0×10^{-2}M arginine with 2.5×10^{-2}M NH_4 Ac. The flow rate is 2.0 ml/min.

도가 증가함에 따라 머무름값과 분리선택성이 증가하는데 이러한 현상은 식(1)에서 예상하듯이 금속 킬레이트 농도가 증가하면 정지상에서 리간드 교환된 형태의 아미노산 킬레이트가 많이 생성되기 때문이다[13]. 이는 DNS-아미노산 유도체들이 리간드교환 거동에 의하여 분리되며 입체특이성적인 분리메카니즘을 따른다는 것을 의미한다.

이동상의 유기용매 조성에 따라 광학활성인 아미노산의 분리현상이 영향을 받는다. *Table* 1에서 나타난 바와같이 아세토니트릴의 농도가 15%에서 30%로 증가함에 따라 머무름값이 직선적으로 감소하는데 이는 Karger와 공동연구자[25]들이 발표한 역상 크로마토그래피에서 아세토니트릴의 조성에 따른 머무름의 연구결과와 일치한다.

이동상의 pH변화에 따른 DNS-AA의 머무름 현상은 *Table* 2에서 처럼 pH가 증가할수록 머무름은 감소하며, 광학활성인 *D*형과 *L*형 아미노산의 분리선택성은 pH증가에 따라 증가한다. 이러한 현상은 pH가 증가함에 따라 아미노산의 카르복시산의 해리가 더 커져서 리간드 교환이 활발해지고 따라서 머무름이 증가할 것으로 예상한 것과는[11,26] 반대 결과였다. 이는 Lam과 그

Table 3. Capacity ratio(k') and selectivity(α) according to the various buffer solutions

DNS-AA	CH_3COONH_4		$(CH_2COOH)_2$		$HO\cdot C(CH_2CO\cdot COOH)_2$	
	k'	α	k'	α	k'	α
Ser *L*	1.92	0.85	2.06	0.90	2.51	1.00
D	2.25		2.30		2.51	
Thr *L*	2.39	0.99	2.57	1.00	3.02	1.00
D	2.41		2.57		3.02	
Ala *L*	3.15	0.93	3.33	1.00	3.97	1.00
D	3.37		3.33		3.97	
Val *L*	7.44	1.07	7.04	1.00	7.75	1.00
D	6.96		7.04		7.75	
Met *L*	8.50	1.07	8.56	1.00	10.06	1.00
D	7.98		8.56		10.06	
Leu *L*	15.39	1.11	13.69	1.00	14.99	1.00
D	13.83		13.69		14.99	
Phe *L*	16.87	1.10	17.61	1.00	21.83	1.00
D	15.39		17.61		21.83	

The mobile phase consists of 20% acetonitrile and 80% metal chelate solution containing 5×10^{-3}M copper ion and 1.0×10^{-2}M arginine at pH 7.0. The flow rate is 2.0m*l*/min.

공동연구자들[13]의 연구결과와 같이 아미노산 유도체의 분리인 경우는 dansyl 치환기 효과로 인하여 pH가 증가함에 따라 DNS-AA의 산해리 정도가 리간드인 arginine 자체의 것보다 상대적으로 더 작기 때문임을 알 수 있다.

이동상의 pH 변화에 의해 분리 현상이 다르게 나타나므로 완충용액의 종류에 따라 분리에 영향이 있을 것으로 생각된다. *Table* 3에 나타난 것처럼 암모늄 아세테이트를 완충용액으로 사용했을 경우는 광학이성질체의 분리가 가능하고 머무름값도 적으나 완충용액을 숙신산과 구연산으로 바꾸었을 때는 광학이성질체의 분리현상은 거의 나타나지 않고 머무름값도 커지고 있다. 이러한 현상은 이들 완충용액으로 사용된 카르복시산 자체가 리간드로 작용함을 의미하며 세개의 카르복시기를 가진 구연산의 경우는 Cu(II)-구연산 착물이 상대적으로 많이 생성될 뿐만 아니라 아미노산의 리간드 교환 반응이 Cu(II)-*L*-Arg 착물인 경우보다 쉽게 일어나므로 머무름값이 커지고 대신에 분리선택성은 줄어들게 된다. *Table* 4는 암모늄아세테이트 농도를 변화시켰을 때의 분리현상을 나타낸다. 농도가 증가

Table 4. Capacity ratio (k') and selectivity(α) as a function of NH_4Ac concentration in the buffer

DNS-AA	5.0×10^{-3}M		1.0×10^{-2}M		2.5×10^{-2}M		5.0×10^{-2}M	
	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Ser *L*	1.87	0.85	1.92	0.86	1.92	0.85	1.99	0.85
D	2.21		2.23		2.25		2.33	
Thr *L*	2.21	1.00	2.22	1.00	2.41	1.00	2.57	1.00
D	2.21		2.22		2.41		2.57	
Ala *L*	3.00	1.00	3.05	0.97	3.15	0.93	3.32	0.94
D	3.00		3.14		3.37		3.53	
Val *L*	6.66	1.10	6.80	1.09	7.44	1.07	7.72	1.05
D	6.05		6.23		6.96		7.39	
Met *L*	7.98	1.11	8.08	1.10	8.50	1.07	8.64	1.03
D	7.18		7.35		7.98		8.37	
Leu *L*	14.05	1.14	14.27	1.13	15.39	1.11	15.53	1.07
D	12.33		12.61		13.87		14.55	
Phe *L*	15.47	1.10	15.76	1.10	16.87	1.10	17.50	1.05
D	14.05		14.27		15.39		16.70	

The mobile phase consists of 20% acetonitrile and 80% metal chelate solution containing 5×10^{-3}M coppernion and 1.0×10^{-2}M arginine at pH 7.0. The flow rate is 2.0m*l*/min.

함에 따라 머무름값이 증가하고 분리선택성은 감소하는 경향을 보이는데 이는 완충제인 유기산도 arginine과 마찬가지로 리간드로 작용함을 의미한다. 유기산과 arginine이 경쟁적인 리간드교환 반응을 하기 때문에 완충용액의 농도가 증가함에 따라 arginine과의 리간드교환이 감소된다는 것을 알 수 있다. 이동상의 흐름속도가 DNS-AA의 분리에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실험 조건으로 흔히 사용하는 범위내에서 흐름속도를 변화시켜본 결과 이동상의 흐름속도를 용량인자와 분리선택성에 영향을 주지 않는다는 것을 알아내었다. 이는 칼럼내에서 리간드 교환반응이 이동상의 흐름속도보다 충분히 빠르다는 것을 의미한다.

이동상에 구리이온 대신에 다른 금속이온을 첨가하여 DNS-AA의 분리거동을 조사한 결과는 *Table* 5에서 보는 것처럼 머무름이 Cu(II), Cd(II), Ni(II), Zn(II)의 순서로 증가한다. 그러나 구리킬레이트용액을 제외하고는 광학활성인 *D* 및 *L* 아미노산을 같은 조건하에서 선택성 있게 분리하지 못했다. 이러한 현상은 카드뮴, 니켈, 아연이온들도 아르기닌과 킬레이트를 생성하여 LEC를 통하여 아미노산의 분리에 영향을 주지만 구리용액과는 달리 리간드교환 메카니즘이 서로 다르므로 *D* 및 *L* 아미노산 유도체를 선택적으로 분리하지 못한다는 것을 의미한다.

DNS-아미노산 유도체의 위와 같은 입체선택적인 분리현상은 아미노산 유도체의 종류와 나사선형 성질을 띠는 금속 킬레이트의 종류 및 그 리간드의 구조에 의존하므로 이를 설명할 수 있는 분리메카니즘은 다음과 같은 모형으로 설명할 수 있을 것이다.

첫째는 DNS-AA의 경우 질소 원자에 결합된 단실기는 여러가지 conformation이 가능한데 수용성 용액에서는 나프틸기를 통하여 광학활성인 탄소에 붙어있는 알킬사슬과의 소수성작용이 우세하게 일어나서 (*Fig.* 3 참조) *D*-DNS-AA와 *L*-DNS-AA는 bulky한 소수성기를 만들게 된다.

둘째는 구리이온과 *L*-arginine은 다른 금속이온에 비해 상대적으로 안정한 킬레이트를 생성

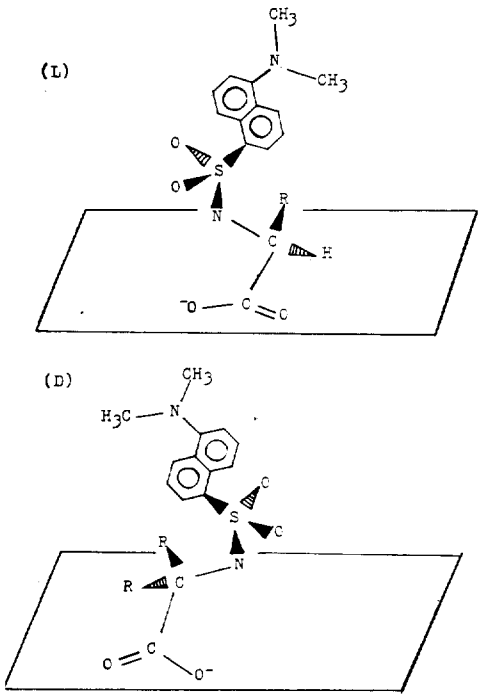

Fig. 3. Prevailing structures of the *D*, *L*-DNS-amino acids containing the hydrophobic alkyl chain in the mobile phase.

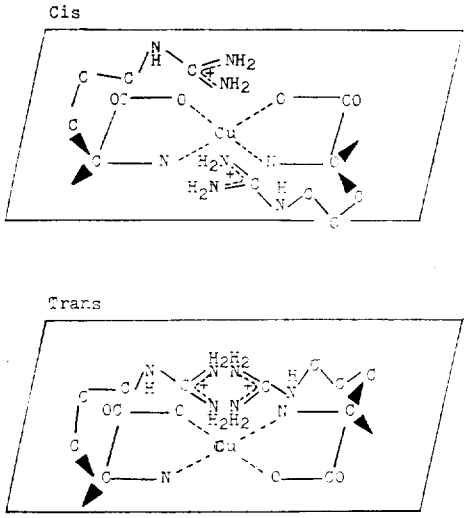

Fig. 4. Structures of Cu(II)-(*L*-Arg)$_2$ complexes.

하며, 그 킬레이트는 평면형을 이루고 4자리 배위수를 가진다[23,27]. 구리와 리간드는 1 : 2의 몰비로 *cis*와 *trans*형 두 가지가 가능하다. (*Fig.* 4 참조) 그러나 C_{18} 칼럼의 소수성기와 상호작

Table 5. Capacity ratio(k') of *L*-DNS-amino acids according to the various metal chelate eluents

	Cu-(*L*-Arg)$_2$	Cd-(*L*-Arg)$_2$	Ni-(*L*-Arg)$_2$	Zn-(*L*-Arg)$_2$
Ser	1.92	2.27	2.33	2.71
Thr	2.39	2.88	2.90	3.59
Ala	3.15	3.64	3.71	4.39
Val	7.44	7.49	7.47	9.41
Met	8.50	9.01	9.17	10.50
Leu	15.39	14.28	14.25	17.53
Phe	16.87	19.61	19.90	23.05

The mobile phase consists of 20% acetonitrile and 80% metal chelate solution containing 5×10^{-3}M metal ion and 1.0×10^{-2}M arginine with 2.5×10^{-2}M NH_4Ac at pH7.0. The flow rate is 2.0m*l*/min.

용이 잘 이루어지는 것은 아르기닌의 bulky한 group이 서로 같은 방향에 있는 *trans*형일 것이다.

셋째는 이 DNS-아미노산들은 아르기닌 킬레이트와 SN-2 메카니즘을 통하여 치환될 것이다. 이런 가정은 다음과 같은 사실에서 알 수 있다. Cd(II), Ni(II), Zn(II)과 같은 금속이온을 이용할때는 광학활성인 DNS-아미노산 분리가 이루어지지 않기 때문이다. 그러나 *Table* 5를 보면 알 수 있듯이 리간드 교환 크로마토그래피 행동이 일어난다는 것을 알 수 있다. 용리액의 첨가물인 Cu, Cd, Ni, Zn중에서 구리용액에서 머무름값이 가장 작은 것은 이 용액에서 리간드교환이 가장 약하게 일어난다는 것을 나타내며 이것은 구리-아르기닌 킬레이트가 다른 금속-아르기닌 킬레이트 보다 더 안정하여 치환이 약하게 일어난다는 것을 의미한다. 따라서 구리외의 다른 금속은 리간드교환 반응이 잘 일어나므로 *L*-DNS-AA와 *D*-DNS-AA가 모두 킬레이트와 쉽게 리간드 교환을 이루지만 *D*와 *L*아미노산 분리가 전혀 일어나지 않으므로 이 반응을 SN-1성으로 짐작할 수 있으며 *cis*형과 *trans*형 킬레이트 모두 똑같이 생성 가능하다. 그래서 구리외의 다른 금속을 사용할 때는 *D*및 *L*아미노산 분리가 전혀 일어나지 않는 것으로 여겨진다.

그러나 구리-아르기닌 킬레이트는 안정하며 DNS-AA와 SN-2 반응을 통하여 리간드 교환이 일어난다고 생각된다. 광학활성인 탄소에 붙어있는 알킬체인이 소수성을 띠어 단실기의 나프틸기와 소수성작용을 하여 bulky한 소수성기를 이루는 경우는 *L*-DNS-AA는 *trans*형 아르기닌 킬레이트에 *cis*와 *trans* 공격이 모두 가능하여 *cis*형과 *trans*형의 킬레이트를 형성할 수 있을 것이다. 그러나 *D*-DNS-AA는 bulky한 나프틸기가 아르기닌과의 입체장애 때문에 *trans*형 아르기닌 킬레이트에 *cis*공격은 불가능하고 *trans* 공격만이 가능하다. 따라서 *Fig*. 1에서 보는 것처럼 Val, Met, Leu, Phe은 *D*-DNS-AA가 먼저 용리되고 *L*-DNS-AA가 늦게 용리된다. Ser은 알킬기가-CH_2OH로서 짧고 극성을 띠며, Ala는 -CH_3으로서 짧기 때문에 *Fig*. 3의 구조로 되기 어렵고 오히려 단실기가 알킬기에서 멀리 떨어진 구조를 띨 것이므로 이때는 *L*형의 *cis*공격이 불가능하여 *L*-DNS-AA가 먼저 용리되고 *D*-DNS-AA는 늦게 용리된다. Thr은 알킬사슬에 히드록시기와 terminal-CH_3를 갖고 있어 위 두 가지형의 특색을 모두 나타내므로 *D*와 *L*형의 선택적 분리가 일어나지 않는다.

이분리 메카니즘에 의하면 이동상에 소수성이 큰 아세토니트릴의 농도가 증가하면 나프틸기와 알킬기 사이의 소수성 작용이 상대적으로 감소하여 *Fig*. 3 같은 우세한 구조생성이 어려워지므로 거울상 이성질체간의 분리선택성이 감소하게 된다. (*Table* 1참조)

Table 2에서 보듯이 pH가 감소하면 머무름은 증가하나 *D* 및 *L*유도체의 분리선택성은 감소한다. 이것은 이동상의 pH가 감소하면 아르기닌의 구리이온과의 킬레이트 생성 배위결합력이 약해져서 DNS-AA와의 리간드교환 반응이 SN-1성을 띠게 된다. 그래서 분리선택성은 감소하며, 리간드교환 반응은 쉽게 이루어질 것이므로 아미노산의 머무름은 상대적으로 증가한다는 것을 알 수 있다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 연구비로 수행한 것인바 재단에 감사하는 바이다.

인 용 문 헌

1. S. Weinstein, B. Feibush, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **126**, 97 (1976).
2. U. Beittler and B. Feibush, *J. Chromatogr.*, **123**, 149 (1976).
3. H. Frank, G. J. Nicholson, and E. Bayer, *J. Chromatogr.*, **167**, 187 (1979).
4. R. Charles, U. Beittler, B. Feibush, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **112**, 121 (1975).
5. V. A. Davankov and S. V. Rogozhin, *J. Chromatogr.*, **60**, 280(1971).
6. V. A. Davankov, S. V. Rogozhin, A. V. Semechkin, and T. P. Sachkova, *J. Chromatogr.*, **82**, 359 (1973).
7. G. Dotsevi, Y. Sogah and D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1259 (1975).
8. W. H. Pirkle and D. W. House, *J. Org. Chem.*, **44**, 12 (1979).
9. S. Hara and A. Dobashi, *J. Chromatogr.*, **186**, 543 (1979).
10. J. N. LePage, W. Lindner, G. Davies, D. E. Seitz, and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **51**, 433 (1979).
11. W. Lindner, J. N. LePage, G. Davies, D. E. Seitz, and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, **185**, 323 (1979).
12. P. E. Hara and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **204**, 1226 (1979).
13. S. Lam, F. Chow and A. Karmen, *J. Chromatogr.*, **199**, 295 (1980).
14. C. Gilon, R. Leshem, Y. Tapuhi, and E. Grushka, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7612 (1979).
15. Y. Tapuhi, N. Miller, and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, **205**, 325-337 (1981).
16. E. Gil-Av, A. Tishbee, and P. E. Hare, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5115 (1980).
17. C. Gilon, R. Leshem, and E. Grushka, *Anal. Chem.*, **52**, 1206 (1980).
18. I. D. Hay, T. M. Annesley, N. S. Jiang, and C. A. Gorman, *J. Chromatogr.*, **203**, 365 (1981).
19. C. Gilon, R. Leshem, and E. Grushka, *J. Chromatogr.*, **203**, 365 (1981).
20. A. A. Kurganov and V. A. Davankov, *J. Chromatogr.*, **218**, 559 (1981).
21. J. F. Lawrence and R. W. Frei, "Chemical Derivatization in Liquid chromatography", Elsevier Scientific Pub, Co. New York., 1976.
22. Z. Horvath and G. Nagydios, *J. Inorg, Nuclei, Chem.*, **37**, 767 (1975).
23. V. A. Davankov and P. R. Mitchell, *J. C. S. Dalton*, 1012 (1972).
24. G. Brookes and L. D. Pettit, *J. C. S. Dalton*, 1224-1227 (1971).
25. B. L. Karger, J. R. Gant, A. Hartkoft and P. H. Weiner, *J. Chromatogr.*, **128**, 65 (1976).
26. N. Watanabe, H. Obzeki and E. Niki, *J. Chromatogr.*, **216**, 406 (1981).
27. O. Yamauchi, T. Sakurai and A. Nakahara, *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **50**, 1776 (1977).