

Xylenyl-L-proline 구리(II) 착물을 이용한 단실아미노산의 광학분리

李善行[†]·吳岱燮·朴粉子*

경북대학교 사범대학 화학교육과

*오양정밀화학

(1989. 8. 12 접수)

Optical Resolution of Dansyl Amino acids by Xylenyl-L-proline Copper (II) Complex

Sun Haing Lee[†], Tae Sub Oh, and Bun Ja Park*

Department of Chemistry, Teachers College, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

*Oyang Fine Chemical Coporation

(Received August 12, 1989)

요 약. 키랄이동상 첨가법으로 단실아미노산의 광학이성질체들을 분리했다. 두 가지의 xylenyl-L-proline 이성질체를 합성하고 이것을 구리(II) 킬레이트로 만들어 이동상에 첨가하여 단실아미노산의 광학이성질체를 분리했다. 이 아미노산에 대한 용리거동은 benzyl-L-proline의 구리착물을 사용했을 때와 유사했다. 이동상에서 유기용매의 조성, 완충용액의 농도 및 pH에 대한 효과도 조사 검토했다. 분리메카니즘은 리간드 교환반응의 시스-트랜스 효과의 삼성분착물과 정지상간의 소수성 상호작용으로 설명할 수 있었다.

ABSTRACT. Optical isomers of dansyl amino acids were separated by a chiral mobile phase addition method. Two metha and para isomers of xylenyl-L-proline were prepared and used as the ligands of copper (II) chelate to resolve the dansyl amino acids. Their elution behaviors were similar to those obtained from the addition of copper (II) benzyl-L-proline chelate. The matrix effect of the mobile phase such as pH, concentration of buffer and compositions of organic solvent acetonitrile affected the optical resolution. The separation mechanism could be explained by a *cis-trans* effect of the ligand exchange reaction and hydrophobic interaction between the ternary complex and the stationary phase.

서 론

모든 생물체의 구성성분 중 단백질의 기본요소인 아미노산은 생체에서 중요한 역할을 하며 아미노산의 광학이성질체 분리는 펩타이드 합성이나 구조결정에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다.

아미노산의 광학이성질체는 물리화학적 성질이 유사하므로 분리나 동정이 어려운데 초기에는 이러한 광학이성질체의 분리를 기체크로마토그래피로 Gil-av, Feibush 및 Bayer 등²⁻⁵에 의해서 D

와 L형의 분리가 이루어졌지만 기체크로마토그래피는 비휘발성인 아미노산을 휘발성 물질로 유도체화시켜야 하는 것과 컬럼의 용량이 작은 단점이 있으므로 해서 최근에는 고성능 액체크로마토그래피를 이용한 방법들이 많이 쓰이게 되었다. 일반적인 아미노산의 분리는 LC에서 리간드 교환반응을 이용하는데, 첫째로 정지상인 수지에 아미노산 금속킬레이트 착물을 정지상에 결합시켜서 입체선택적인 작용을 일으키게 하므로써 광학이성질체를

분리하는 방법⁶⁻¹⁵과 두번째로 이동상에 키랄성 킬레이트를 첨가하여 광학활성 물질을 분리하는 리간드 교환반응에 의한 분리법¹⁶⁻²⁸의 두 가지 경우가 있다. 그러나 첫번째 방법은 정지상에 키랄성인 물질을 결합시키는 합성방법이 용이하지 못하고 분리의 적용범위와 칼럼의 용량이 적은 단점이 있으므로 해서 최근에는 두번째 방법의 연구가 더 활발히 진행되고 있다. 이는 분리방법이 간단하고 용량이 크며 적용범위가 넓은데 그 이점이 있다. 그러나 분리에 대한 용리순서가 이동상에 넣어준 리간드의 종류에 따라 일정하지 않으며 분리에 대한 용리순서, 리간드의 작용이 광학이성질체의 분리에 미치는 영향에 대한 분리메카니즘이 규명되어 있지 않다.

이러한 분리메카니즘을 규명하기 위해서 본 연구자들은 이동상에 키랄금속킬레이트를 첨가해서 이성질체의 분리선택성(α), 용리순서, 머무름(k') 등을 고찰해 왔다²⁹⁻³¹.

이동상의 키랄금속킬레이트로 Cu-(Pro)₂과 Cu-(hydroxy-L-Proline)₂ [Cu-(Hyp)₂]의 α , k' 용리순서를 비롯하여 N-benzyl-L-Proline³⁰과 N-benzyl hydroxy-L-proline³¹을 리간드로 사용한 Cu(II) 킬레이트를 이동상에 첨가하여 리간드 교환반응을 통하여 광학이성질체의 α , k' 용리순서의 변화를 알아보았다.

이러한 분리현상을 입체특이성으로 설명해 왔고 또한 그 메카니즘의 규명을 더 명확히 하고자 본 실험에서는 Proline에 N-Xylenylation을 시킨 N-P-Xylenyl-L-Proline (*p*-XyPro) 과 N-m-Xylenyl-L-Proline (*m*-XyPro)을 리간드로 한 Cu(II) 킬레이트를 이용해서 완충액의 농도변화, pH 변화, 금속킬레이트의 농도변화, acetonitrile의 조성에 따른 머무름, 분리선택성을 고찰하고 본 실험의 결과가 선행 연구^{30,31}에서 행한 S_N2형 *cis-trans* 형의 분리메카니즘에 대한 타당성을 규명하고자 한다.

실험

기기장치. 본 실험에서 사용한 HPLC는 Waters Associates 회사(Milford Massachusetts, U. S. A) 제품을 사용하였고, 고압펌프

로는 Model 6000 A 용매 이동계를, 시료주입기는 Model U6K LC 주입기를 사용했으며 검출기로는 Model 420 형광검출기를 사용해서 들뜸필터의 파장은 365 nm, 방출필터는 495 nm를 선택했다. 기록기는 Model 730 Data Module을 이용했고 역상칼럼으로는 μ -Bondapack C₁₈(300×3.9 mm, id=10 μ m)을 사용했다. 이동상의 pH 조절은 Fisher 제 pH Meter Model 292를 사용했다.

시 약. 시료로 사용한 아미노산은 D, L-serine(Ser), D, L-threonine(Thr), D, L-valine(Val), D, L-methionine(Met), D, L-leucine(Leu), D, L-phenylalanine(Phe), D, L-tyrosine(Tyr)였으며, 합성에 사용한 시약인 *p*-xylenylbromide or *m*-xylenylbromide은 Aldrich Chemical Company(U. S. A)에서 구입하였다.

N-Xylenyl-L-Proline의 형성. *p*-Xylenyl-L-Proline(*p*-XyPro)의 합성은 다음과 같이 하였다. 16 ml 물에 2.24 g proline과 2.4 g NaOH를 녹여 여기에 *p*-xylenyl bromide 3.85 g을 24 ml 에탄올 용액에 녹여서 첨가한다. 이것을 3~4 시간 환류시켜서 반응시킨 후 CH₃COOH으로 pH를 6.0으로 고정시킨다. 다시 클로로포름으로 추출하여 건조제 Na₂SO₄를 적당량 넣어서 12시간 가량 방치한 후 필터하여 용매를 날려보낸다. 과량의 CH₃COOH을 제거하기 위하여 톨루엔을 소량씩 가하면서 날려 보내기를 3회 정도 한 다음 ethylacetate로 2~3번 정도 날려보내서 톨루엔을 제거한다.

m-Xylenyl-L-proline은 *p*-XyPro과 같이 합성하며 이 때 차이점은 반응온도를 60~70°C 정도로 해서 환류시키고 반응시간은 2~3시간으로 한다. 생성된 흰색고체는 ethylacetate로 세척한 것을 에탄올에 다시 녹여서 ethylether로 재결정한다.

이렇게 해서 얻어진 *p*-XyPro은 수득률이 45%이고 *m*-XyPro은 약 35%가 된다.

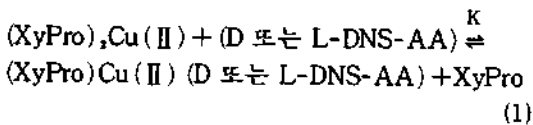
이 합성물의 동정은 IR Spectrum에서 1450 cm⁻¹와 1600 cm⁻¹의 방향족 고리의 C=C 결합의 피이크가 나타났으며, 산의 C=O 결합피이크는

1620 cm^{-1} 에서, 3050 cm^{-1} 에서는 방향족 C=H 결합의 피이크가, 그리고 3600 cm^{-1} 에서 OH 피이크가 나타났다. H-NMR spectrum에서, 7.4 ppm에서 벤젠고리의 특성피이크가, 2.5 ppm에서 xylynyl에 있는 CH_3 피이크가 나타났고, 다른 피이크들은 proline과 동일한 피이크를 얻으므로 해서 이 물질이 합성되었음을 확인하였다.

실험과정. 시료인 dansylated amino acid (DNS-AA)는 아미노산 1.5mg을 1ml의 0.1 M NaHCO_3 용액에 녹인 후 DNS-Cl를 녹인 아세톤용액(3mg/1ml) 1ml 첨가하고 40°C에서 노란색이 사라질 때까지 약 12시간 동안 반응시켜 합성한다. 이렇게 만든 DNS-AA를 직접 액체 크로마토그래피에 주입시켰다. 이동상은 CuSO_4 와 합성한 리간드를 1:2의 농도비로 2.5×10^{-2} M NH_4OAc 원충액에 녹이고 pH를 적합하게 조정 한 후 acetonitrile(ACN)의 조성을 맞추었다. 이 이동상은 사용 전에 가스를 제거하였으며 흐름속도는 2ml/min으로 사용했다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 킬레이트의 금속은 선행연구에서 행하여져 온 Cu(II)를 사용하였다. 합성한 리간드인 XyPro는 질소원자와 카르복시기의 산소원자가 금속에 배위결합하는 두 자리 리간드로 두 분자의 리간드가 금속에 결합해서 사각평면체의 착물을 형성하는 것으로 알려져 있다. 광학이성질체의 분리가 일어나기 위해서는 이성분 착물인 $(\text{XyPro})_2\text{-Cu(II)}$ 와 시료 DNA-AA 이 리간드 교환되어 삼성분착물인 $(\text{XyPro})\text{-Cu(II)}\text{-}(DNS-AA)$ 가 형성된다. 이 리간드 교환반응은 다음과 같은 식으로 표시할 수 있다.



이러한 과정에서 아미노산의 D형과 L형은 거울상 이성질 현상의 선택성이 다르기 때문에 평형상수 K 값이 다르게 나타난다. 이 K 값을 변화시키는 변수로는 아미노산의 종류와 금속과 이동상에 넣어준 리간드의 종류가 있으며 이에따라 분리거

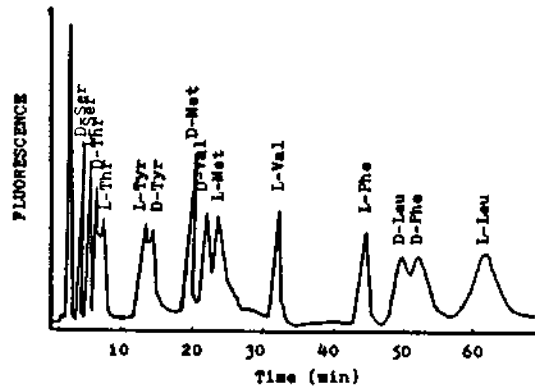


Fig. 1. Typical chromatogram of DNS amino acids with the chiral mobile phase addition method. Mobile phase contains 25% acetonitrile and 75% 5×10^{-3} M chelate solution containing 2.5×10^{-2} M NH_4Ac buffer at 6.5. The chelate is Cu(II) $(\rho\text{-XyPro})_2$.

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

DNS AA	20%		22.5%		25%		30%	
	k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Ser	L	8.60	3.00	1.84	2.25	0.44	1.42	
	D	4.60	1.87	1.63	1.31	1.72	0.31	
Thr	L	9.60	1.20	3.13	1.14	2.31	0.63	1.00
	D	8.00		2.75	2.06	1.12	0.63	
Tyr	L	15.40	0.91	4.13	0.70	3.81	0.88	1.00
	D	16.90		5.89	4.50	0.85	0.88	
Met	L	28.59	1.07	9.63	1.13	8.06	1.19	1.18
	D	26.78		8.50	6.75	1.19	1.06	
Val	L	30.00	1.45	12.60	1.44	10.50	1.69	1.35
	D	26.90		8.75	7.38	1.42	1.25	
Phe	L	—	—	19.88	0.83	14.81	0.79	2.19
	D	—	—	23.85	18.69	0.79	2.00	0.91
Leu	L	—	—	26.30	21.69	21.69	2.80	
	D	—	—	21.11	1.25	17.31	1.15	2.25

The added chelate solution contains 5×10^{-3} M Cu(II) $(\rho\text{-XyPro})_2$. The ammonium acetate buffer concentration was 1×10^{-2} M at pH 7.0. Flow rate; 2.0 ml/min.

동이 다를 것으로 생각된다. 아미노산 자체보다도 삼성분착물의 소수성이 커서 역상칼럼에 머무름이 클 것이다. 역상크로마토그래피에 XyPro을 리간드로 한 키랄금속킬레이트를 이동상에 첨가하여 아미노산 광학이성질체를 분리하여 얻은 크로마토그램은 Fig. 1과 같다.

분리된 아미노산 각각의 용리순서는 알킬사슬의 소수성이 클수록 머무름이 크며 알킬기내에 친수

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

DNS	AA	$2.5 \times 10^{-3} M$		$5.0 \times 10^{-3} M$		$10.0 \times 10^{-3} M$	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	L	1.71	1.27	2.00	1.45	3.38	1.93
	D	1.35		1.38		1.75	
Thr	L	1.99	1.00	2.38	1.00	3.38	1.00
	D	1.99		2.38		3.38	
Tyr	L	2.75	1.00	4.40	1.00	5.38	1.00
	D	2.75		4.40		5.38	
Met	L	6.44	1.12	8.35	1.15	11.50	1.17
	D	5.75		7.26		9.80	
Val	L	9.44	1.14	11.86	1.30	14.20	1.21
	D	8.25		9.09		11.80	
Phe	L	15.67	0.87	18.60	0.86	25.19	0.86
	D	18.07		21.53		29.00	
Leu	L	15.43	1.06	23.49	1.12	28.12	1.17
	D	14.50		22.60		24.00	

25% Acetonitrile and 75% Cu(II) chelate solution containing *p*-XyPro ligand were used. The ammonium acetate buffer concentration was $1.0 \times 10^{-2} M$ at pH 6.5. Flow rate; 2.0 ml/min.

성기가 있을 때는 머무름이 작음을 알 수 있다. 이는 Tyr의 경우에 분자가 bulky 함에도 빨리 용리됨을 볼 수 있고 소수성기를 갖는 아미노산의 Met, Val 및 Leu의 경우에 D형보다 L형이 더 오래 머무르며 벤젠고리가 있는 아미노산인 Tyr와 Phe는 D형보다 L형이 더 빨리 용리된다. 사용한 리간드 *p*-XyPro과 *m*-XyPro 각각을 사용했을 때 나타난 용리저동을 다음에 설명하고자 한다.

먼저 Table 1에서 4까지는 *p*-XyPro을 리간드로 사용했을 때의 결과치고 Table 5에서 8까지는 *m*-XyPro을 리간드로 사용했을 경우이다. 여기서 선택성(α)는 k'_L/k'_D 를 나타낸다.

Table 1은 용매강도를 증가시킬 때 아미노산의 머무름은 감소할 것이라는 예상하에 용매강도를 20~30%까지 변화시켰다. 이 때 나타난 것처럼 머무름은 ACN의 조성비가 커질수록 k' 이 감소하는데 이는 용매강도가 증가하면서 역상크로마토그래피의 용매와 용질의 소수성 상호작용이 커져서 상대적으로 정지상과의 작용이 작아지기 때문이다. 광학이성질체간의 α 값이 감소하는 것은 머무름의 메커니즘에 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

Table 3. Capacity ratio(k') and selectivity(α) as a function of pH

DNS	AA	pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 7.5	
		k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Ser	L	4.40	1.42	5.00	1.67	3.06	1.65	4.19	2.31
	D	3.10		3.00		1.85		1.81	
Thr	L	5.63	1.13	6.06	1.21	3.56	1.14	3.65	1.10
	D	5.00		5.00		3.13		3.33	
Tyr	L	10.25	0.94	6.90	0.94	5.63	0.90	6.65	0.73
	D	10.88		7.31		6.25		9.00	
Met	L	16.79	1.15	13.56	1.15	10.65	1.20	10.38	1.10
	D	14.63		11.78		8.88		9.50	
Val	L	25.43	1.28	19.56	1.34	14.50	1.42	11.64	1.44
	D	19.90		14.63		10.31		8.11	
Phe	L	39.26	0.87	26.00	0.79	19.63	0.82	21.88	0.76
	D	45.31		32.81		24.00		28.91	
Leu	L	53.89	1.19	39.88	1.23	29.99	1.28	27.69	1.17
	D	45.28		32.50		23.38		23.58	

25% Acetonitrile and 75% Cu(II) chelate solution containing *p*-XyPro ligand were used. The ammonium acetate buffer concentration was $2.5 \times 10^{-2} M$. Flow rate; 2.0 ml/min.

Table 2에서는 착물농도 증가에 따른 k' 값과 α 값의 변화를 본 것이다. 여기에서는 농도가 증가할수록 머무름이 증가하고 α 값도 커짐을 보인다. 이는 농도가 증가할수록 리간드 교환반응이 일어날 확률이 많아지므로 삼성분착물이 형성될 가능성이 높고 때문에 칼럼에 오래 머물게 된다. 따라서 α 값 또한 증가하게 된다. 이는 선행연구^{30,31}에서 나타난 분리선택성과 머무름의 경향이 일치하였다.

Table 3에서는 pH의 변화에 따른 k' 과 α 값의 변화를 나타내었다. 아미노산은 양쪽성 이온으로써 pH에 따른 변화가 크게 작용하므로 이성분착물의 안정도가 pH에 영향을 많이 받으리라 기대된다.

본 실험에서 나타난 pH 증가에 따른 머무름값의 감소와 분리선택성의 증가는 선행연구^{30,31}의 결과와 일치하고 있으며 pH의 증가는 이성분착물을 더 안정하게 만들므로 해서 리간드 교환이 어려워진다. 그러므로 pH가 증가할수록 머무름은 감소하지만 분리선택성이 증가하는 이유는 S_N2 성 리간드 교환반응이 일어날 때 입체적 특이성으로 인해 교환반응의 강도가 D형과 L형의 현격한 차이로 인해서 분리선택성은 증가한다.

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

DNS	AA	$5.0 \times 10^{-3} M$		$1.0 \times 10^{-3} M$		$2.5 \times 10^{-3} M$	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	L	2.60	1.60	2.60	1.60	3.06	1.65
	D	1.85	1.60	1.85	1.60	1.85	1.65
Thr	L	2.19	1.14	2.31	1.13	3.56	1.14
	D	1.94	1.14	2.06	1.13	3.14	1.14
Tyr	L	3.31	0.90	4.20	0.89	5.63	0.90
	D	3.69	0.90	4.70	0.89	6.25	0.90
Met	L	7.63	1.17	8.06	1.19	10.65	1.20
	D	6.50	1.17	6.75	1.19	8.88	1.20
Val	L	9.75	1.16	11.26	1.39	14.50	1.41
	D	8.38	1.16	8.07	1.39	10.31	1.41
Phe	L	14.75	0.74	14.81	0.79	19.64	0.81
	D	19.94	0.74	18.69	0.79	24.00	0.81
Leu	L	21.69	1.25	21.69	1.25	29.99	1.28
	D	17.31	1.25	17.31	1.25	23.38	1.28

25% Acetonitrile and 75% Cu(II) chelate solution containing *p*-XyPro ligand at pH 6.5 were used. Flow rate; 2.0 ml/min.

Table 5. Capacity ratio(k') and selectivity(α) as a function of acetonitrile concentration

DNS	AA	20.0%		22.5%		25.0%		27.5%	
		k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Ser	L	5.08	1.45	4.50	1.60	1.94	1.35	1.58	1.42
	D	3.50	1.45	2.81	1.60	1.44	1.35	1.11	1.42
Thr	L	5.38	1.00	4.36	1.00	2.28	1.00	2.20	1.00
	D	5.38	1.00	4.36	1.00	2.28	1.00	2.20	1.00
Tyr	L	11.63	0.89	7.40	0.82	3.81	1.00	3.50	1.00
	D	13.00	0.89	9.05	0.82	3.81	1.00	3.50	1.00
Met	L	22.86	1.13	14.25	1.13	5.50	1.08	5.26	1.10
	D	20.28	1.13	12.63	1.13	5.19	1.08	5.26	1.10
Val	L	28.00	1.37	18.98	1.32	6.38	1.16	6.00	1.20
	D	20.38	1.37	14.38	1.32	5.50	1.16	4.99	1.20
Phe	L	35.00	0.78	30.86	0.78	11.03	0.79	10.75	0.77
	D	44.89	0.78	39.75	0.78	14.00	0.79	14.00	0.77
Leu	L	46.86	1.20	40.24	1.20	14.25	1.17	12.40	1.05
	D	38.89	1.20	33.51	1.20	12.20	1.17	11.78	1.05

The added chelate solution contains $5 \times 10^{-3} M$ Cu(II) (*m*-XyPro)₂. The ammonium acetate buffer concentration was $1 \times 10^{-2} M$ at pH 7.0. Flow rate; 2.0 ml/min.

Table 4에서는 DNS-AA의 분리에 대한 완충 용액의 농도 효과를 본 것이다. 완충용액의 농도가 증가할수록 k' 이 증가하고 α 는 대체로 변하지 않았다. 이는 완충용액의 완충제는 리간드 교환반응에 전혀 영향을 미치지 않으며 역상용매의 이온

Table 6. Capacity ratio(k') and selectivity(α) as a function of complex concentration

DNS	AA	$2.5 \times 10^{-3} M$		$5.0 \times 10^{-3} M$		$10.0 \times 10^{-3} M$	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	L	1.71	1.27	2.00	1.27	3.38	1.45
	D	1.35	1.27	1.38	1.27	1.75	1.45
Thr	L	1.99	1.00	2.38	1.00	3.38	1.00
	D	1.99	1.00	2.38	1.00	3.38	1.00
Tyr	L	2.75	1.00	4.40	1.00	5.38	1.00
	D	2.75	1.00	4.40	1.00	5.38	1.00
Met	L	6.44	1.12	8.35	1.15	11.50	1.17
	D	5.75	1.12	7.26	1.15	9.80	1.17
Val	L	9.44	1.14	11.86	1.30	14.20	1.21
	D	8.25	1.14	9.09	1.30	11.80	1.21
Phe	L	15.67	0.87	18.60	0.86	25.19	0.86
	D	18.07	0.87	21.53	0.86	29.00	0.86
Leu	L	15.43	1.06	23.49	1.12	28.12	1.17
	D	14.50	1.06	22.60	1.12	24.00	1.17

25% Acetonitrile and 75% Cu(II) chelate solution containing *m*-XyPro ligand were used. The ammonium acetate buffer concentration was $1.0 \times 10^{-2} M$ at pH 6.5. Flow rate; 2.0 ml/min.

성을 높여주어 삼성분착물과 정지상의 소수성 상호작용이 더 커진다는 것을 알 수 있다.

Table 5에서 *m*-XyPro를 리간드로 사용했을 때 앞에서와 같은 방법으로 결과를 얻었다. 먼저 용매의 조성비에 따른 변화는 Table 1에서와 같이 머무름값과 선택성에 대한 변화가 동일하며 리간드의 사용이 다름에 따라 아미노산의 광학분리 정도는 다른 경향을 보인다. Thr의 경우에 *p*-XyPro의 리간드를 사용한 경우는 분리가 일어났으나 *m*-XyPro를 리간드로 사용할 때는 분리가 일어나지 않았다. 그러므로 *p*-XyPro과 *m*-XyPro의 리간드를 비교해 보면 대체적으로 *m*-XyPro를 리간드로 사용할 때 광학이성질체의 분리가 감소되었다. 이는 파라메틸기가 소수성 작용이 더 큼을 알 수 있다.

Table 6에서는 착물의 농도에 따른 용리거동의 변화이다. *m*-XyPro를 리간드로 사용했을 때에도 농도가 진해질수록 리간드 교환반응이 크게 되므로 k' 값과 α 값이 증가함을 나타낸다.

Table 7에서는 *m*-XyPro를 리간드로 사용했을 때에 pH의 효과를 측정 한 결과이다. *p*-XyPro를 리간드로 사용한 Table 3의 경우에는

Table 7. Capacity ratio(k') and selectivity(α) as a function of pH

DNS AA		pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 7.5	
		k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Ser	L	3.75	1.43	3.38	1.93	3.13	1.40	1.88	1.36
	D	2.63	1.43	1.75	1.93	2.23	1.40	1.38	1.36
Thr	L	5.06	1.00	3.56	1.00	2.28	1.00	1.83	1.00
	D	5.06	1.00	3.56	1.00	2.28	1.00	1.83	1.00
Tyr	L	8.94	0.93	5.38	1.00	3.81	1.00	3.54	1.00
	D	9.60	0.93	5.38	1.00	3.81	1.00	3.54	1.00
Met	L	16.31	1.15	11.50	1.17	5.50	1.06	6.06	1.00
	D	14.13	1.15	9.80	1.17	5.19	1.06	6.06	1.00
Val	L	30.56	1.08	14.20	1.21	7.15	1.39	6.13	1.44
	D	28.22	1.08	11.80	1.21	5.13	1.39	4.25	1.44
Phe	L	38.87	0.94	25.00	0.86	11.03	0.79	10.10	0.66
	D	43.25	0.94	29.10	0.86	14.00	0.79	15.38	0.66
Leu	L	54.41	1.25	28.10	1.17	14.25	1.17	12.36	1.05
	D	43.63	1.25	24.00	1.17	12.20	1.17	11.81	1.05

25% Acetonitrile and 75% Cu(II) chelate solution containing $5 \times 10^{-3}M$ Cu(II) (*m*-XyPro)₂ were used. The ammonium acetate buffer concentration was $1.0 \times 10^{-2}M$. Flow rate; 2.0 ml/min.

Table 8. Capacity ratio(k') and selectivity(α) as a function of NH₄Ac concentration

DNS AA		$5.0 \times 10^{-3}M$		$10.0 \times 10^{-3}M$		$25.0 \times 10^{-3}M$	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	L	2.25	1.29	3.38	1.93	2.90	1.58
	D	1.75	1.29	1.75	1.93	1.84	1.58
Thr	L	2.78	1.00	3.38	1.00	3.45	1.00
	D	2.78	1.00	3.38	1.00	3.45	1.00
Tyr	L	4.48	1.00	5.38	1.00	5.38	0.87
	D	4.48	1.00	5.38	1.00	6.15	0.87
Met	L	9.66	1.16	11.50	1.17	11.50	1.17
	D	8.30	1.16	9.80	1.17	9.80	1.17
Val	L	14.00	1.25	14.26	1.21	14.26	1.28
	D	11.24	1.25	11.80	1.21	11.11	1.28
Phe	L	19.00	0.88	25.00	0.86	20.73	0.81
	D	24.00	0.88	29.10	0.86	25.86	0.81
Leu	L	36.30	1.17	28.60	1.17	28.50	1.22
	D	31.00	1.17	24.00	1.17	23.44	1.22

25% Acetonitrile and 75% Cu(II) chelate solution containing *m*-XyPro ligand at pH 6.5 were used. Flow rate; 2.0 ml/min.

아미노산들이 전반적으로 pH가 증가함에 따라 k' 이 감소하고 α 값이 증가하는 경향을 보였으나 *m*-XyPro를 리간드로 사용했을 때 몇 개 아미노산의 경우는 *p*-XyPro의 경향과 일치하지만 몇몇의 경우에는 반대현상으로 α 값이 감소하는 경향

Table 9. Capacity ratio(k') and selectivity(α) of several dansyl amino acids on copper(II) ligands such as BzPro, *m*-XyPro and *p*-XyPro

DNS AA		BzPro*		<i>m</i> -XyPro		<i>p</i> -XyPro	
		k'	α	k'	α	k'	α
Ser	D	1.65	1.56	1.84	1.58	1.85	1.65
	L	2.57	1.56	2.90	1.58	3.06	1.65
Thr	D	2.52	1.07	3.45	1.00	3.14	1.14
	L	2.70	1.07	3.45	1.00	3.56	1.14
Tyr	D	—	—	6.15	0.87	6.25	0.90
	L	—	—	5.38	0.87	5.63	0.90
Val	D	7.40	1.60	11.11	1.28	10.31	1.41
	L	11.85	1.60	14.26	1.28	14.50	1.41
Met	D	5.52	1.27	9.80	1.17	8.88	1.20
	L	7.01	1.27	11.50	1.17	10.65	1.20
Phe	D	17.52	0.88	25.86	0.81	24.00	0.81
	L	15.35	0.88	20.73	0.81	19.65	0.81
Leu	D	20.13	1.23	23.44	1.22	23.38	1.28
	L	24.72	1.23	28.50	1.22	29.99	1.28

*The data come from reference 30.

을 나타낸다. 그러나 이 때에도 k' 은 동일하게 감소한다. 이러한 α 값에서의 반대현상은 xylenyl의 para와 meta 메틸기의 위치가 다름에 의한 그 유도효과의 차이에 의한 것으로 생각된다.

다음은 완충용액의 농도에 대한 변화이다. Table 4에서와 같이 Table 8에서도 k' 와 α 의 값이 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보인다. 이는 앞에서 설명했듯이 리간드 교환반응에 영향이 없고 소수성 상호작용의 차이에 기인됨을 증명한다.

여기에 사용한 두 종류의 리간드와 선행연구^{32,33}에서 사용한 benzyl-L-proline(BzPro) 리간드의 결과를 비교한 것이 Table 9에 나타나 있다.

Table 9에서 볼 수 있듯이 BzPro를 리간드로 사용했을 때 Tyr은 분리가 가능치 못했지만 *m*-XyPro를 사용할 때는 Tyr은 분리가 되었고 Thr의 분리가 가능치 못하므로 두 리간드의 분리 양상은 비슷하다. 그 외의 아미노산에 대해서 두 리간드는 거의 유사한 α 값을 보이나 *p*-XyPro은 Tyr과 Thr의 분리가 모두 가능하며 그 외의 분리에 있어서도 α 값이 커짐을 보인다. 이로써 선행연구에서 사용한 리간드 보다는 이 XyPro가 광학분리에 더 좋은 것을 알 수 있고 본 실험의 결과를 종합하면 아미노산의 D형과 L형의 용리순

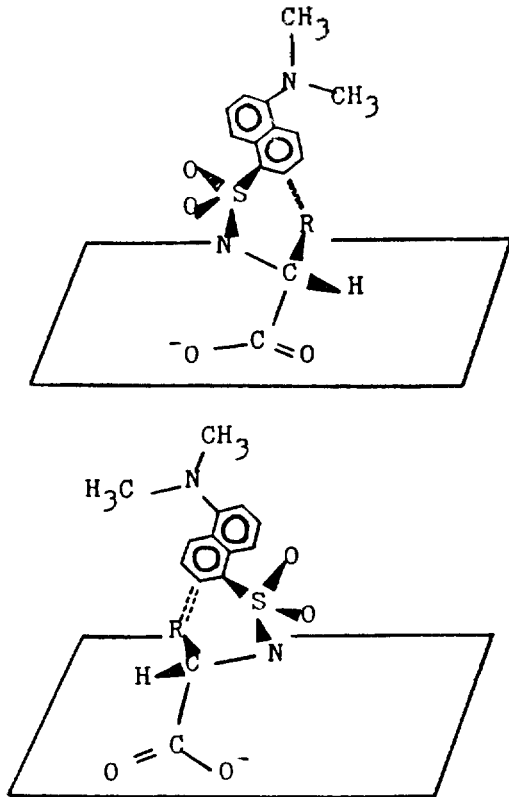


Fig. 2. Prevailing structure of the D,L DNS amino acids containing hydrophobic alkyl chain.

서는 일관성 있게 나타나며 실험조건에 따라 용리 거동이 달리 나타난다.

용리거동을 설명하기 위해 분리메카니즘을 알아 보면 선행연구^{30,31}의 이론에 따라 DNS-AA의 공간적 배향을 결정하고 이 이성질체 아미노산이 삼 성분착물을 만들 때 이성분착물과 리간드 교환반응에서 받는 입체적 효과로 인하여 삼 성분착물의 생성이 다르게 나타날 것이다.

분자내 소수성 인력을 고려하는 것으로 광학활성인 아미노산의 알킬기와 DNS의 배향을 고려하여야 한다. 아미노산의 알킬기가 소수성이거나 부분친수성을 가진 작은 알킬기일 경우에는 Fig. 2와 같이 존재할 것이라 생각하나 부분극성을 갖는 큰 알킬기일 때에는 Dansyl기와 알킬기가 서로 멀어지는 공간적 배향을 함이 입체적으로 더 안정하리라 생각된다.

다음은 이성분착물의 공간적 배향이 Fig. 3과

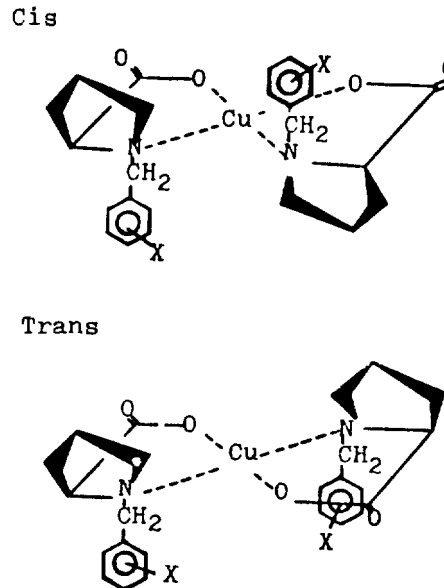


Fig. 3. The visible configuration of *cis* and *trans* Cu(II) (*p*-XyPro)₂. X = CH₃.

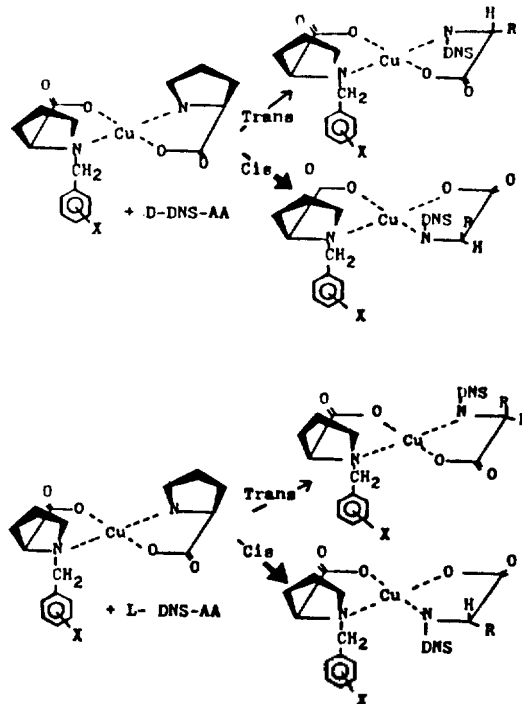


Fig. 4. A proposed mechanism for the system containing the complex of Cu(II) (*p*-XyPro)₂ in the mobile phase. X = CH₃.

같이 두 가지의 형태가 가능하리라 생각된다. 이러한 두 가지 형태의 이성분착물에서 키랄선택성이 큰 *trans* 형의 착물이 *cis* 형 보다 더 광학분리에 작용할 것이다. 그래서 Fig. 4에서처럼 *trans* 형의 이성분착물이 DNS-AA와 교환반응으로 일킬 때 이 반응의 생성물인 *trans*와 *cis* 형의 삼성분착물이 가능할 것이다. 입체효과적인 면에서 보면 L형의 아미노산은 *cis* 형과 *trans* 형의 삼성분착물이 둘다 가능하지만 D형의 DNS-AA은 *trans* 형의 삼성분착물 생성이 용이하지 못하므로 해서 주로 *cis* 형이 존재할 것이다. 그러므로 두 형태가 다 가능한 L형은 교환반응의 평형상수 k 값이 크고, 따라서 늦게 용리되며 반면에 D형은 빨리 용리된다. 또 phenylalanine과 tyrosine 경우에는 삼성분착물의 xylenyl의 벤젠고리와 그들이 가진 벤젠고리의 상호작용이 크게 작용함으로써 D-Phe이 늦게 용리된 것으로 설명할 수 있다. 이와 같은 현상은 선행연구^{30,31}에서 행한 메카니즘 이론과 일치하며 BzPro를 리간드로 사용했을 때 보다 분리선택성에는 본 실험에서 사용한 소수성이 큰 리간드가 더 좋았다.

결 론

합성한 *p*-XyPro과 *m*-XyPro을 각각 사용하여 구리착물을 만들어 이동상에 첨가하여 단실아미노산을 분리했다. 분리는 페닐기가 있는 아미노산을 제외하고는 D형이 L형보다 먼저 용리되었으며 페닐기가 있는 아미노산은 그 반대의 현상이 나타났다. 두 킬레이트를 각각 비교해 볼 때 *p*-XyPro 착물의 첨가로 사용한 아미노산을 모두 분리할 수 있었고 *m*-XyPro 분리가 더 잘되었다. BzPro 구리 킬레이트 보다는 *m*-XyPro의 킬레이트가 tyrosine의 분리를 더 좋게했고 일반적으로 BzPro 킬레이트를 사용할 때 보다는 더 분리가 좋았다. *p*-XyPro은 pH가 증가할수록 분리도가 좋아졌으나 *m*-XyPro은 α 값이 감소하는 경향을 보였다. 또 킬레이트의 농도와 완충액의 농도변화를 조사해 본 결과 용리거동의 메카니즘이 두 가지의 리간드를 사용한 경우 각각 SN2성 *cis* 및 *trans*의 형태로 설명할 수 있었다.

감 사

이 연구에 사용한 HPLC를 빌려주신 공과대학 화학공업과에 감사드립니다. 이 연구는 한국과학재단의 지원에 의하여 이루어졌음을 밝히고 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. N. B. Levine and V. Nazinov, *J. Chromatogr.*, **286**, 207 (1984).
2. U. Beitter and B. Feibush, *J. Chromatogr.*, **123**, 149 (1979).
3. S. Weinstein, B. Feibush, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **126**, 97 (1976).
4. H. Frank, G. J. Nicholson, and E. Bayer, *J. Chromatogr.*, **167**, 187 (1979).
5. R. Charlex, V. Beittler, B. Feibush, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **122**, 121 (1975).
6. S. V. Rogozhin and V. A. Davankov, *Ger. Pat.*, No.1 **932**, 190 (1969); *Fr. Pat.*, No.2 **012**, 102 (1970); *C. A.*, **72**, 90875C (1970).
7. V. A. Davankov and A. V. Semeckin, *J. Chromatogr.*, **141**, 313 (1977).
8. B. Lefevre, R. Audebert, and C. Ouivoron, *J. Liq. Chromatogr.*, **1**, 761 (1978).
9. V. A. Davankov, S. V. Rogozhin, A. V. Semeckin, V. A. Baranov, and G. S. Sannikova, *J. Chromatogr.*, **93**, 468 (1974).
10. V. A. Davankov, S. V. Rogozhin, and A. V. Semeckin, *J. Chromatogr.*, **82**, 359 (1973).
11. V. A. Davankov, S. V. Rogozhin, and A. V. Semeckin, *J. Chromatogr.*, **91**, 493 (1974).
12. V. A. Davankov, S. V. Rogozhin, and A. V. Semeckin, *J. Chromatogr.*, **131**, 65 (1977).
13. R. V. Snyder and R. J. Angelici, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **35**, 5326 (1973).
14. D. G. Dotseti, J. Sogah, and D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3038 (1976).
15. S. Hara and A. Dobashi, *Proc. 4th Int. Symp. Column Liq. Chromatogr.*, 4th (1979) (May 7-10, 1979).
16. J. N. Lepage, W. Lindner, G. Davies, D. E. Seitz, and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **51**, 433 (1979).
17. S. Lam, F. Chow, and A. Karmen, *J. Chromatogr.*,

- 199, 295 (1980).
18. C. Gilon, R. Leshem, Y. Tapuhi, and E. Grushika, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7612 (1979).
19. C. Gilon, R. Leshem, and E. Grushika, *J. Chromatogr.*, **203**, 365 (1981).
20. P. E. Hara and E. Gil-Av, *Science*, **204**, 1226 (1979).
21. E. Gil-Av, A. Tishbee, and P. E. Hara, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5115 (1980).
22. C. Gilon, R. Leshem, and E. Grushika, *Anal. Chem.*, **52**, 1206 (1980).
23. C. Gilson, R. Leshem, and E. Grushika, *J. Chromatogr.*, **203**, 365 (1981).
24. A. A. Karganov and V. A. Davankov, *J. Chromatogr.*, **218**, 559 (1981).
25. Noriyoki Nimura, Atsuko Toyama, and Toshio Kimoshita, *J. Chromatogr.*, **316**, 547 (1984).
26. Boris Greo and Milton J. W. Hearn, *J. Chromatogr.*, **255**, 67 (1983).
27. C. Gilon, R. Leshem, and Eli Grushika, *J. Chromatogr.*, **255**, 41 (1983).
28. C. Gilon, S. Levin, and E. Grushika, *J. Chromatogr.*, **235**, 401 (1982).
29. S. H. Lee, K. S. Park, and J. W. Ryu, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **7**, 45 (1986).
30. S. H. Lee, D. S. Oh, and B. E. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **9**, 341 (1988).
31. S. H. Lee, T. S. Oh, and S. H. Park, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **10**, 491 (1989)