

# Enantiomer의 분리에 이용될 수 있는 Chelate Resin의 개발(제 3보) Copper(II) L-Proline Chelate Resin의 제조 및 Enantiomer 분리

김길수<sup>†</sup>·전동원\*

이화여자대학교 약학대학·가정대학\*

(1989년 9월 5일 접수)

## Development of Optically Active Chelate Resin for Direct Resolution of Enantiomers (III) Synthesis of Copper (II) L-Proline Chelate Resin and Resolution of Enantiomers

Kil Soo Kim<sup>†</sup> and Dong Won Jeon\*

College of Pharmacy and College of Home Economics\*, Ewha Womans University

(Received September 5, 1989)

A metal complex, copper (II) L-proline was chemically bound to ethylene glycol dimethacrylate and divinylbenzene crosslinked chloromethylated polystyrene and they were used as chiral chelate resin matrix for column chromatography to resolve enantiomers of DL-amine acids. The L-enantiomers eluted first and the degree of resolution on the polymer crosslinked with ethylene glycol dimethacrylate was superior to the polymer crosslinked with divinylbenzene.

**Keywords**—copper (II) L-proline chelate resin, resolution, enantiomers, column chromatography

enantiomer의 분리에 관한 연구는 광학활성을 지니는 분자간의 상호작용과 그 mechanism을 연구하는 분야로서 화학 및 생물학 등은 물론 특히 약학에서는 광학적 활성과 약효와의 관계 등으로 관심이 큰 분야이며 따라서 분석학적 견지에서 중요한 의의를 지닌다.

처음에는 enantiomer 중 *d*체 및 *l*체의 물리적 성질의 차이로 분리를 시도하였으나 그 후 diastereoisomer로 만들어 그 이화학적 성질의 차이를 크게 하여 분리를 더 용이하게 하였다.

1960년대 중엽부터 크로마토그래피를 이용한 분리방법이 연구되어 왔으며 초기에는 diastereoisomer를 제조하여 분리하였으나 1970년도부터는 diastereoisomer를 이용하지 않고 직접

enantiomer를 분리하는 direct chromatographic resolution법이 연구되어 왔다.<sup>1)</sup>

직접분리법은 three point rule<sup>2)</sup>의 이론에 기초를 두고 액체크로마토그래피를 위한 칼럼충전물질로서 여러가지 chiral resin이 개발되어 왔으며 그 중 대표적인 것은 디비닐벤젠 가교 polystyrene resin에 클로로메틸기를 도입한 다음 광학활성물질로서 N-carboxymethyl-L-valine을 도입하여 copper(II) chelate를 만들어 분리를 시도하였으며<sup>3)</sup> 광학활성물질로서 L-hydroxyproline을 도입하여 copper(II) chiral chelate resin을 개발하여 분리를 연구하였다.<sup>4)</sup>

본 연구에서는 가교제로서 입체구조 및 그 극성을 고려하여 ethylene glycol dimethacrylate를

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

사용하여 광학활성물질로서 L-proline 을 도입하여 copper(II) chelate resin 을 만들어 칼람충전제로 하여 수종의 아미노산의 분리를 시도하여 가교제에 따른 분리능 등을 비교하였다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

클로로메칠스티렌, 디비닐벤젠과 ethylene glycol dimethacrylate 등 중합금지제를 함유하고 있는 시약은 5% 수산화나트륨수용액과 증류수로 세척하여 중합금지제를 제거한 다음 감압증류하여 0°C 이하에서 보관하면서 사용하였다. 2,2'-azobisbutylonitrile 은 메탄올로 2회 재결정하여 사용하였다. 아미노산은 proline(BDH), alanine(Junsei) 및 phenylalanine(Sigma)을 사용하였으며 기타 시약은 1급 시약을 사용하였다.

사용기기는 적외선분광광도계(Beckman Acculab 10), 시차열분석기(Dupont 900), 선광계(Perkin Elmer, model 243), 흡광도측정기(Beckman, model 25) 및 원자흡광광도계(Perkin Elmer, model 306)를 사용하였다.

### 가교 폴리클로로메칠스티렌의 제조

gel type 가교 폴리클로로메칠스티렌법으로 제조하였으며<sup>5)</sup> 중합과정에서 가교도는 단량체에 대한 가교제의 양으로 하고 가교제로는 디비닐벤젠과 ethylene glycol dimethacrylate 를 각각 2% 및 5%가 되도록 제조하였다.

클로로메칠기의 도입량을 알기 위하여 산소플라스크연소법에 따라 폴리클로로메칠스티렌 중의 염소함량을 측정하였다.<sup>6)</sup>

### L-Proline 의 도입

다음의 두 가지 방법으로 폴리클로로메칠스티렌에 L-proline 을 도입하였다.

폴리클로로메칠스티렌 1g, L-proline 12.8g, 피리딘 50ml, 물 15ml 및 벤젠 30ml 를 혼합하여 여기에 phase transfer catalyst(Adegen 264) 0.13g 을 넣고 40°C에서 72시간 환류시키고 여과한 다음 filter cake 를 아세톤으로 세척하고 건조하였다. 또 다른 방법으로는 폴리클로로메칠

스티렌 1g, L-proline 3.76g, 디메틸포름아미드 20ml 및 요오드화칼륨 0.5g 을 혼합하여 40°C에서 24시간 반응시킨 후 여과하여 아세톤으로 세척하고 건조하였다.

proline 을 도입한 다음 도입되었는지의 여부는 IR 스펙트럼, DSC thermogram 으로 확인하였으며 도입된 양을 알기 위하여 질소정량법<sup>7)</sup>에 따라 질소함량을 구하였다.

### Enantiomer 의 분리

L-proline 을 도입한 폴리클로로메칠스티렌의 입자도 50~100 mesh 의 것 2g 을 취하여 4% 황산용액 50ml 에 침적하여 평형에 도달시킨 후 여과하여 건조시켜 polymer resin 에 Cu<sup>++</sup>를 도입하여 칼람의 충전제로 사용하였다.

칼람 충전은 위와 같이 제조한 칼람 충전제를 내경 0.5cm 의 유리 칼람에 충전하여 충전제 층을 약 20cm 로 하여 이동상을 유출시킬 때 유출속도가 0.2ml/min 로 조정하였다.

enantiomer 로는 아미노산 층에서 DL-proline, DL-alanine 및 DL-phenylalanine 을 선택하였다.

각 아미노산 60mg 을 물 3ml 에 용해시키고 1N 수산화나트륨액을 적가하여 pH 11.0으로 하여 검액으로 하고 이 검액을 위에서 만든 칼람에 도입한 다음 물 2ml 로 유출시켰다.

이동상으로는 0.5M 암모니아수용액으로 하여 유출시키면서 유출액을 3ml 씩 분획하여 각 분획 중의 총아미노산은 닌히드린발색법으로 정량하였다. 이 때 분획 중의 Cu<sup>++</sup> 및 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 이온을 제거하기 위하여 나트륨형의 이온교환수지층을 통과시킨다.

L-형의 아미노산의 양은 선광계로 선광도를 240~245nm 에서 측정하여 정량하였다.

## 실험결과 및 고찰

폴리클로로메칠스티렌의 제조에 대한 방법 및 용해효과는 제 1보 및 제 2보에서 이미 발표하였다.<sup>5,6)</sup>

본 연구에서는 기제로 디비닐벤젠 2% 및 5% 그리고 ethylene glycol dimethacrylate 2%,

5%에 대하여 클로로메틸기의 도입된 양을 알기 위하여 염소함량을 측정하였다.

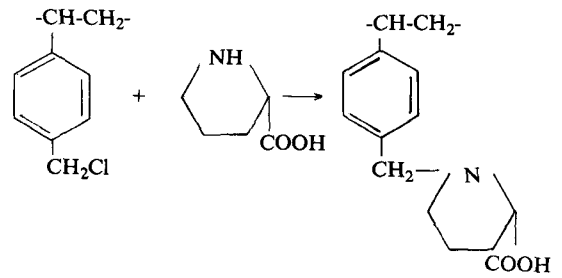
클로로메틸스티렌은 중합 도중 자동가교에 의하여 염소함량이 이론치보다 낮을 것으로 예상되었지만 실제 실험한 결과 이론치와 실험치가 잘 일치하고 있어서 중합 도중에 자동가교는 거의 수반되지 않는 것으로 사료된다.

지금까지 enantiomer 분리에 사용된 액체크로마토그래피용 resin matrix 는 디비닐벤젠 가교 폴리스티렌에 광학적 활성물질을 도입하여 사용하였으며 광학적 활성물질로는 N-carboxymethyl-L-valine,<sup>3)</sup> L-hydroxyproline<sup>4)</sup>을 도입하여 enantiomer 분리이론인 three point rule<sup>1,2)</sup>을 충족시키는 chiral chelate resin matrix 를 제조하기 위하여 copper (II) chelate 를 만들어 분리실험을 시도하였다.

본 연구에서는 아직까지 시도된 바 없는 ethylene glycol dimethacrylate 를 가교제로 하여 폴리클로로메틸폴리스티렌을 합성하고 여기에 광학 활성물질로서 L-proline 을 도입하고 copper (II) chelate resin 을 만들어 분리실험을 하였다.

L-proline 의 도입시 물 또는 유기용매에 불용성인 가교 폴리클로로메틸스티렌과 L-proline 은 불균일 반응계가 이루어질 수 밖에 없으며 이러한 불균일계에서는 반응의 수율이 저하되므로 고분자 합성화학적 관점에서 연구대상이 되어 왔다. 1970년대 후반기에 phase transfer catalyst 를 이용한 3상 반응계가 도입되어 불균일 반응계에서 유발되는 고분자화합물의 반응성 저하의 극복을 시도하였다.<sup>8)</sup> 본 연구에서는 실험방법에서 언급한 바와 같이 phase transfer catalyst 를 이용한 3상 반응계와 요오드화칼륨을 이용한 2상 반응계에 의하여 L-proline 의 도입을 시도하였다.

L-proline 을 도입한 다음 브롬화칼륨정제법에 의한 IR 스펙트럼의 변화를 보면 도입 전의 폴리클로로메틸스티렌에서는  $1270\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta_{\text{CH}_2-\text{Cl}}$ ) 및  $710\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C}-\text{Cl}}$ )의 흡수대가 관찰되지만 L-proline 을 도입한 후에는 위의 두 흡수대가 없어졌으며 그 대신  $1160\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{N}-\text{C}}$ )의 흡수대가 관찰되는 점으로 보아 Scheme 1의 반응으로 L-proline 이 도입된다는 것을 확인할 수 있었다.



Scheme 1

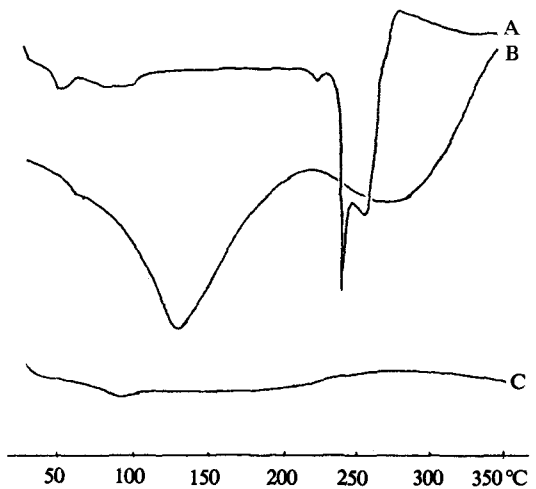


Figure 1—DSC thermograms of L-proline(A), L-proline polymethyl styrene(B) and polychloromethyl styrene(C).

Fig. 1에서는 L-proline, L-proline 도입 전 및 도입 후의 폴리클로로메틸스티렌의 DSC thermogram 을 비교하고 있으며 L-proline 도입 후의 thermogram 에서 L-proline 및 L-proline 도입 전의 폴리클로로메틸스티렌의 열적변화를 전혀 볼 수 없어 새로운 물질이 만들어졌다는 것을 간접적으로 확인할 수 있다.

도입된 양을 알기 위한 질소분석 결과는 가교제로 ethylene glycol dimethacrylate 5%에서 3상 반응계에서 질소함량이 2.96%, 2상 반응계에서 3.60%로 2상 반응계에서의 반응이 더 바람직하다는 것을 알 수 있다. copper (II)에 의한 chelate 형성은 실험법에서와 같이 황산동수용액에서 평형을 이룬 후 여과한 여액에 대하여 원자흡광광도법으로  $\text{Cu}^{++}$ 를 정량하여 그 차이로 polymer resin 1g에 흡수된  $\text{Cu}^{++}$ 의 양을 계산하였다. 계산결과

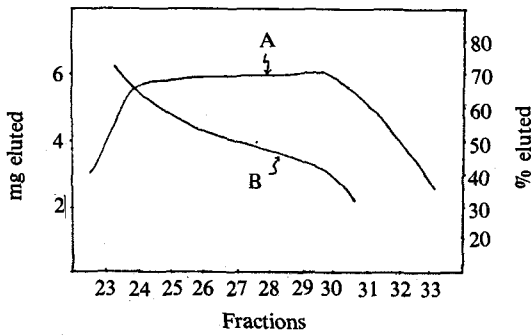


Figure 2—Resolution of DL-proline on copper(II) L-proline resin.

Key: A, milligrams of proline eluted; B, percentage of L-proline eluted

는 3상 반응계에서는  $Cu^{++}$ 의 흡수를 전혀 관찰할 수 없었으며 2상 반응계에서는 polymer resin 1g 에  $Cu^{++}$  0.877 mmole 이 반응되었음을 알 수 있었다. 이것으로 미루어 볼 때 3상계 반응은 enantiomer 분리용 칼럼 충전제로서 부적당한 것으로 생각되며 그 원인은 반응생성물의 입체적 방해에 의한 것으로 추정되며 앞으로 계속 규명되어야 할 것으로 생각된다.

enantiomer의 분리효율에 미치는 이동상의 영향은 암모니아수의 농도가 낮을수록 저류시간이 길어지며 농도가 높으면 저류시간은 짧으나 분리능이 나빠지므로 일반적으로 문헌에는<sup>4)</sup> 0.1~1.0 M의 범위가 적당한 것으로 보고되고 있으며 본 연구에서는 0.5 M  $NH_4OH$  용액을 사용하였다.

Fig. 2는 DL-proline에 대하여 ethylene glycol dimethacrylate 가교 폴리클로로메칠스티렌에 L-proline을 도입한 후 copper(II) chelate resin matrix로 하여 분리 실험한 결과이며 분획 23에서부터 34번까지 아미노산이 분리되었으며 이 중 L-proline의 비는 분획 24에서 70%이며 분획 31에서 32%로 변화되었으며 칼럼의 길이, 유출속도 등을 조절함으로써 분리될 수 있음을 보여 주었다.

아미노산의 종류에 따른 차이는 proline, alanine, phenylalanine의 순서로 저류시간은 짧았으나 분리효율은 떨어지는 것을 알 수 있다. Table I은 proline, alanine 및 phenylalanine에 대하여 정량 가능 아미노산이 유출될 때의 분획

Table I—Percentage of L-Amino Acids in Fractions Obtained by Chromatography on Copper(II) L-Proline Resin.

Amino acid	% L-Amino acid in each group							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Proline	70	60	55	53	50	46	42	32
Alanine	65	51	50	46	43	40	38	35
Phenylalanine	62	57	55	53	50	48	45	40

Table II—Percentage of L-proline in Fractions Obtained by Chromatography on Copper(II) L-Proline Resin According to Crosslinking Agent.

Crosslinking agent	% L-Proline in Each Group							
	1	2	3	4	5	6	7	8
2% DVB	60	57	55	51	48	45	40	38
2% EGD	70	60	55	53	50	46	42	32

DVB; divinylbenzene. EGD: ethylene glycol dimethacrylate

을 1로 했을 때의 각 분획에서의 아미노산 중의 L-형의 백분율로서 분리효율은 proline, alanine, phenylalanine의 순으로 줄어들었다.

Table II는 이미 연구된 디비닐벤젠 가교 copper(II) L-proline chelate resin과 ethylene glycol dimethacrylate 가교 copper(II) L-proline chelate resin의 분리능을 비교한 것으로 저류시간은 디비닐벤젠 가교보다 ethylene glycol dimethacrylate 가교의 경우<sup>5)</sup> 길지만 Table II에서 보는 바와 같이 분리능은 초기 L-형의 비율로 비교하면 오히려 더 우수한 것을 알 수 있다. 이에 대한 이유는 입체구조적 특성 및 가교제의 극성 등에 의한 것으로 추정할 수 있으나 앞으로 더욱 연구되어야 할 것이다.

가교제의 양, 즉 2%, 5% ethylene glycol dimethacrylate에 따른 분리능은 거의 비슷한 수준이며 디비닐벤젠 가교의 경우 가교제의 양이 많으면 저류시간이 길어진다는 보고<sup>6)</sup>와는 다른 결과를 얻었다.

## 결 론

ethylene glycol dimethacrylate 가교 폴리클로로메칠스티렌에 L-proline 을 도입하여 copper (II) L-proline chelate chiral resin matrix 를 만들어 칼럼 충전제로 하여 enantiomer 를 분리 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 폴리클로로메칠스티렌에의 L-proline 도입은 폴리클로로메칠스티렌과 L-proline 을 dimethylformamide 에 현탁시켜 오오드화칼륨으로 반응시키는 2상 반응계가 chelate chiral resin matrix 용으로는 3상 반응계보다 더욱 적당하였다.

2. enantiomer 분리에서 ethylene glycol dimethacrylate 가교가 종래의 디비닐벤젠 가교보다 저류시간은 길었으나 분리효율은 더욱 우수하였으며 가교도의 농도의 영향은 거의 없었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1987년도 한국학술진흥재단의 연구비 보조에 의한 것을 밝히며 이에 감사드리는 바이다.

## 문 헌

1) R. Audebert, Direct resolution of enantiomers

- in column liquid chromatography, *J. Liquid Chromatography*, **2**(8), 1063-1095 (1979)
- 2) D.R. Buss and V. Theodore, Optical isomer separation, *Ind. Eng. Chem.*, **60**(8), 12-28 (1968)
- 3) R.V. Snyder, R.J. Angelici and R.B. Meek, Partial resolution of amino acids by column chromatography a polystyrene resin containing an optically active copper (II) complex, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**(8), 19 (1972)
- 4) V.A. Davankov, Chiral chelate resins in chromatography of optical isomers, *Pure & Appl. Chem.*, **54**(11), 2159-2168 (1982)
- 5) K.S. Kim, D.W. Jeon and K.H. Park, Development of optically active chelate resin for direct resolution of enantiomers(I), *J. Kor. Pharm. Sci.*, **18**(2), 69-81 (1988)
- 6) K.S. Kim, D.W. Jeon, and K.H. Park, Development of optically active chelate resin for direct resolution of enantiomers (II), *J. Kor. Pharm. Sci.*, **18**(2), 83-88 (1988)
- 7) 대한약전 제 5개정 제 1, 2부 해설, 문성사, 1987, p. 1286
- 8) M.J.F. Jean, D.S. Marc and J.M. Farrall, Application of phase-transfer catalysis to the chemical modification of crosslinked polystyrene resins, *J. Org. Chem.*, **44**(11), 1774-1779 (1979)