

## 가스 크로마토그래피에 의한 아미노산 광학 이성질체의 분리(Ⅲ)

(S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin의 광학 활성 고정상으로서의 응용

박 만 기 · 양 정 선 · 고 창 범

서울대학교 약학대학

(Received February 16, 1988)

### Separation of Amino Acid Enantiomers by Gas Chromatography(Ⅲ)

(S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin as chiral stationary phase

Manki Park, Jeongseon Yang and Changbum Ko

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**—The resolution of N-trifluoroacetyl (N-TFA) *ter*-isopropylesters of Ala, Ile, Leu, Val and Phe by gas chromatography on the (S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin as stationary phase was investigated. The phase was employed at several column temperatures (140°C~200°C) and the separation factors were 1.18~1.45 range for five amino acid enantiomers. The possible mechanism of chiral recognition was investigated by NMR technique and the association constant( $K_c$ ) was calculated as 201.3( $r=0.98$ ) for alanyl derivative.

크로마토그래피를 이용하여 광학이성질체를 분리하는 방법은 광학순도와 광학 이성질체의 절대 배열을 결정하는데 가장 값싸고 빠르며 단순한 수단으로 알려져 있다. 특히 광학 활성 고정상에서의 광학 순도결정은 그 정확성과 빠르기, 시료의 소요량면에서 특히 우수한 분석방법이며 키랄 유도체 시약을 사용하는데 있어서의 제약점들을 극복할 수 있으므로 활발한 연구가 진행되고 있다.<sup>1)</sup> Gil-Au등이<sup>2)</sup> 가스 크로마토그래피로 아미노산 광학 이성질체의 분리 분석에 성공한 이후 광학 활성을 갖는 여러가지 종류의 고정상에 대한 활발한 연구가 이루어졌지만 대부분의 고정상이 합성 과정이 복잡하고 열 안정성이 낮아 사용성도 특별한 화합물에 제한되어 있어서 일반적으로 사용되기는 어렵다. 저자는 아미노산 유도체와 수소결합을 형성하기 위해 필요한 amide 결합을 가지며 열 안정성을 높일 수 있는 함 유황 amide 계열의 (S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin을 합성하여 chromosorb WAW(80~100 mesh)에 2%로 coating하여 전처

리한 column에 N-trifluoroacetyl-D,L 및 L-아미노산 isopropyl ester를 적용하여 분리도 및 사용가능온도 범위를 검토하였다. 또한 합성된 고정상과 시료의 분리기전을 NMR(nuclear magnetic resonance spectroscopy)로 조사하였다. Lochmuller등이<sup>3)</sup> 광학 활성 고정상에서의 광학 이성질체의 분리 기전은 주로 고정상과 검체의 수소결합에 의한다고 가정하고 interaction model을 제시한 바 있다. 저자는 농도 변화에 따른 NMR의 induced shift값으로부터 합성된 광학 활성 고정상과 시료의 interaction mechanism을 증명하고 association constant를 구하였다.

### 실험 방법

기기 및 시약—Phenylisothiocyanate(Sigma), 증크로로포름(Sigma), D, L-및 L-amino acid 표준품(Merk), trifluoroacetic anhydride(Sigma), 이소부트로판올, 메탄올, 크로로포름은 모두 특급품을 사용하였다. 또한 flame ionization detector

(FID)가 부착된 가스 크로마토그래피(Shimadzu RPR-G1), GC/MS (Hewlett-Packard Model 5985B), NMR(Bruker FT-80MHz), IR(Perkin Elmer FT 1710), 자동기록 스펙트로플라리메타(Jasco J-20) 및 용점측정장치(Gallenkamp)등을 사용하였다.

**광학 활성 고정상의 제조**—0.1mole(13.1g) L-leucine을 10% NaOH용액 40ml에 용해시켜 0.1 mole phenylthiohydantoin을 가하고 50°C에서 3 시간동안 reflux 시켰다. 5% HCl로 산성화하여 침전을 얻은 후 이 침전을 메탄올로 재침전시켰다. (Yield; 32%) IR, NMR, Mass 스펙트럼에 의해 이 물질이 (S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin임을 동정하였다.

UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm : 267

IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> : 3180(N-H), 1750(C=O)

NMR(CDCl<sub>3</sub>) : 1.07(6H, d, CH<sub>3</sub>—C  
 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$

1.60(1H, m, —CH)

1.80(2H, dd, —CH<sub>2</sub>—)

4.29(1H, m, —CH)

MS(m/z) : 248(M<sup>+</sup>)

$[\alpha]_D^{25}$  : -34°(MeOH)

mp : 154°C

**칼람의 준비**—합성된 고정상을 메탄올에 녹이고 감압하에서 chromosorb WAW(80~100 mesh)에 2%되게 피막시켰다. 이 충전 물질을 3.2mm i.d.×2.1m의 코일형 유리제 칼람에 충전시킨 후 질소가스 유속 30ml/min, 칼람 온도 200°C에서 24시간 전처리하였다.

**시료의 전처리**—3N 염산-이소부르판을 용액에 5종의 D,L- 및 L-아미노산 표준품을 각각 녹이고 60°C에서 3시간 가온후 감압하에서 이소부르판과 염산을 구축시켜 D,L- 및 L-아미노산 이소부르판 에스테르를 제조했다. 여기에 trifluoroacetic anhydride를 넣고 실온에서 1시간 방치후 감압하에서 파잉의 시약을 구축시킨 후 클로로포름에 녹여 가스 크로마토그래피용 시료로 하였다.

**가스 크로마토그래피 분석 조건**—검출기는 불

꽃이온화 검출기(FID)를 사용하였으며 질소 35ml/min의 조건에서 검출기 온도는 300°C로 하였다. 시료 주입기의 온도는 250°C로 하였고 칼람 온도는 대상 아미노산에 따라 140°C~200°C 범위에서 항온으로 사용하였다.

**N-TFA-L-Ala-메틸 에스테르 합성**—L-Ala 0.1mole을 무수 메탄올 10ml에 녹인 후 건조 염화 수소 가스를 70°C에서 30분간 통해주었다. 감압하에서 용매를 구축시킨 후 1ml TFAA를 가하고 실온에서 1시간 방치 후 감압하에서 파잉의 시약을 구축시켜 N-TFA-L-Ala-메틸 에스테르를 얻었다(Yield; 60%, NMR; 1.2, 3H,d/2.1, 3H,s/4.5, 1H, m).

**분자 간 interaction mechanism** 규명을 위한 **NMR실험**—(S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin을 중클로로포름 100mM 용액으로 일정하게 유지하고 N-TFA-Ala-메틸 에스테르를 첨가하여 각 0, 4, 8, 12, 16, 20mM로 하였다. 각 농도의 시료를 NMR로 측정하여 (S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin의 thioamide 수소의 induced shift 값을 관찰하였다.

### 실험결과 및 고찰

최초로 개발된 광학활성 고정상들은 열안정성이 낮아 휘발성이 높은 시료에서는 우수한 분리능을 나타내나 휘발성이 낮은 시료에는 적용이 어려우며 칼람의 수명 및 재현성에 문제점이 있었다.<sup>4)</sup> 이에 저자는 키랄성 인지에 필요한 수소 결합 다리를 가지며 열안정성에 높은 함 유황 amide계 고정상을 L-leucine을 모체로 합성하였다. 합성 과정은 매우 mild하여 racemization의 가능성이 적었으며 실험실적으로 쉽게 합성이 가능하였다. 칼람의 bleeding이 없이 분석이 가능한 온도는 230°C로 이미 보고된 다른 고정상에 비하여 열안정성이 매우 우수하였다. 또한 비교적 큰 분리계수를 가졌으며 분석시간이 짧은(10분 이내) 이점이 있었다. 아미노산 광학 이성질체들은 N-TFA기를 도입하여 열안정성과 휘발성을 증가시켰으며 이소부르필 에스테르화하여 공간 입체성을 부여했다. 이들 아미노산

**Table I**—Gas chromatographic separation of some amino acid enantiomers

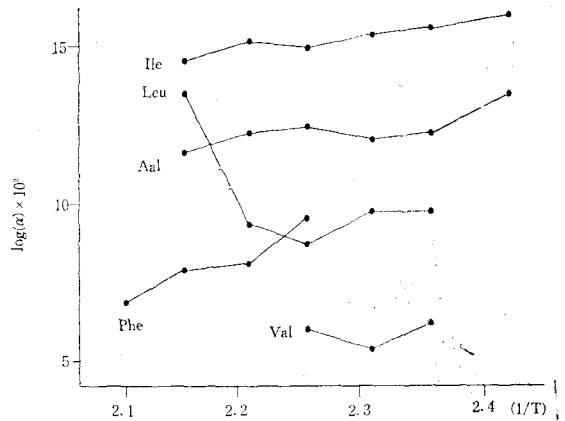
Amino acid	Temperature (°C)	D	t* <sub>R</sub> L	α <sub>D/L</sub>
Ala	190	0.28	0.36	1.30
	180	0.33	0.43	1.32
	170	0.60	0.80	1.33
	160	0.94	1.24	1.32
	150	1.52	2.06	1.36
	140	2.58	3.52	1.36
Ile	190	0.53	0.74	1.40
	180	0.78	1.11	1.42
	170	1.22	1.72	1.41
	160	1.96	2.80	1.43
	150	3.30	4.77	1.45
	140	5.68	8.26	1.45
Leu	190	0.55	0.75	1.36
	180	0.91	1.13	1.24
	170	1.41	1.72	1.22
	160	2.28	2.86	1.25
	150	3.85	4.82	1.25
	140	5.68	8.26	1.45
Val	170	1.09	1.24	1.14
	160	1.80	2.03	1.12
	150	3.00	3.45	1.15
Phe	200	2.30	2.69	1.17
	190	4.19	5.00	1.19
	180	6.54	7.82	1.20
	170	10.40	12.94	1.24

t\*<sub>R</sub>; corrected retention time, min.

(t<sub>R,sample</sub> - t<sub>R,solvent</sub>)

α<sub>D/L</sub>; separation factor (t\*<sub>R,D</sub>/t\*<sub>R,L</sub>)

광학 이성질체 유도체들을 2%(S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin 광학 활성 고정상으로 분석한 후, 칼럼 온도에 따른 유지시간(tr)과 D- 및 L-체 간의 분리계수를 Table 1에 표시하였다. 이때 각 광학이성질체의 동정은 시료의 전처리 과정에서 D,L-아미노산 표준품과 L-아미노산 표준품의 유도체에 해당하는 피크를 서로 대조하여 해석하였다. Alanine, isoleucine 광학 이성질체는 140°C~190°C 사이에서, leucine 광학 이성질체는 150°C~190°C 사이에서, valine 광학 이성질체는 150°C~170°C 사이에서, 그리고 phenylalanine 광학 이성질체는 170°C~200°C 사이에서



**Fig. 1**—Plot of the logarithm of the separation factor (α) vs. the inverse of the absolute temperature for N-TFA-D,L-amino acid ester as solutes on Leu-PTH as the stationary phase.

분리 가능하였다. 각 절대온도의 역수치에 대한 시료의 분리계수의 대수치를 Fig. 1에 표시하였다.

일반적으로 온도가 낮을수록 분리계수는 커지나 leucine, valine의 경우 각각 190°C, 170°C에서 가장 높게 나타났다. Isoleucine과 alanine의 분리계수가 다소 높았고 phenylalanine과 valine의 분리계수가 상대적으로 낮았다.

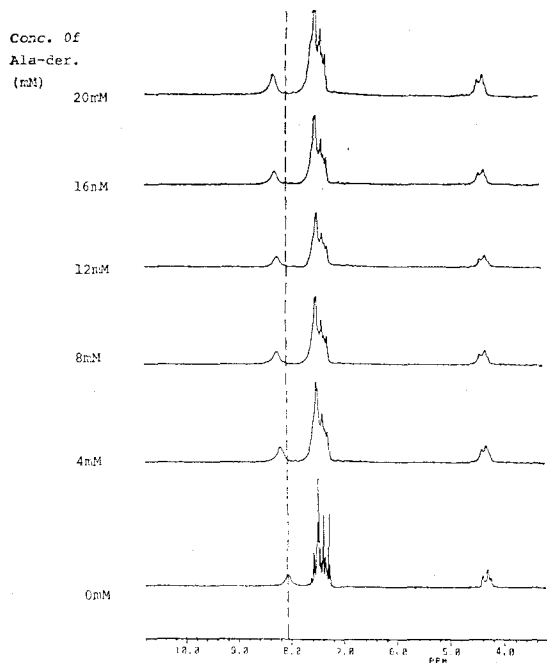
Lochmuller등은<sup>3)</sup> 광학 활성 고정상에서 키랄성 인지의 mechanism은 주로 고정상과 검체사이의 수소결합에 의한다고 설명하였다. Fig. 2는 광학 활성 고정상의 농도를 100mM로 일정하게 하고 N-TFA-L-Ala-메틸에스테르의 농도를 증가시켰을 때 8.0ppm 근처의 thioamide NH의 chemical shift가 저자장으로 이동하는 것을 나타내고 있다. 이는 thioamide NH와 alanine 유도체의 carbonyl가 수소결합에 참여하고 있음을 의미한다. Fig. 3은 thio-amide NH의 chemical shift의 이동 정도를 표시하였다.

Hanna등의<sup>5)</sup> 식에 의하면 2분자간 수소결합의 association constant는 다음 식에 의해 구할 수 있다.

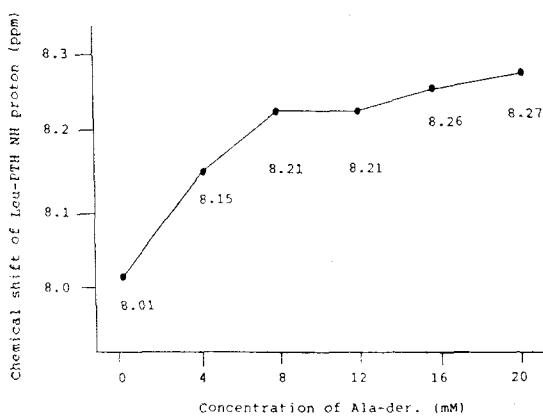
$$\frac{1}{\Delta\delta_{obs}} = \frac{1}{K_c(\delta_c - \delta_a)} \cdot \frac{1}{c_b} + \frac{1}{(\delta_c - \delta_a)}$$

$$\Delta\delta_{obs} = \delta_{obs} - \delta_a$$

δ<sub>a</sub>; chemical shift of uncomplexed form



**Fig. 2**—Effects of the concentrations of N-TFA-L-Ala-methyl ester on the spectra of Leu-PTH NH proton in deuterio chloroform, keeping the concentration of Leu-PTH constant at 100mM.

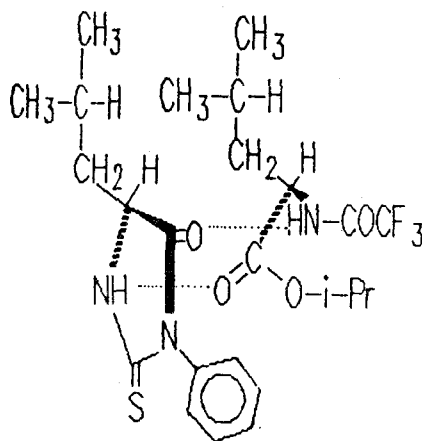


**Fig. 3**—Effects of the concentrations of N-TFA-L-Ala-methyl ester on the spectra of Leu-PTH NH proton in deuteriochloroform, keeping the concentration of Leu-PTH constant at 100mM.

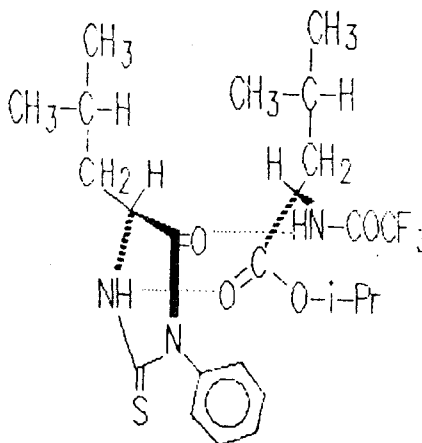
$\delta_c$ ; chemical shift of given conc. of Ala-der.

$c_b$ ; conc. of Ala-der.

$$K_c = 201.3 (r = 0.98)$$



(S)-(D) Interaction model



(S)-(L) Interaction model

**Fig. 4**—Possible interaction model of solvent and solutes.

Least square method에 의해 구한 association constant  $K=201.3 (r=0.98)$ 으로 비교적 강한 회합을 보였다.

합성된 CSP(Chiral stationary phase)에 의한 광학이성질체의 분리는 “Three Point Interaction”의 개념에 의해서 설명이 가능하다.<sup>6)</sup> 즉 CSP가 키랄성을 인지하기 위해서는 CSP와 한쌍의 서로 거울상인 광학이성질체중 적어도 어느 한 이성질체와 동시에 최소한 세 자리에서 상호작용이 있어야 한다. 이때 분자간 상호 작용은 수소 결

합, 전자 이동 상호 작용, 정전기적 상호 작용, 쌍극자-쌍극자 상호 작용, 입체 장애에 의한 상호 작용, 친수성 혹은 친지질성 상호 작용 등 모든 상호 작용이 키랄성을 인지하는데 사용된다. (S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin의 경우 두군데의 수소 결합과 입체 장애에 의한 상호 작용이 키랄성인지에 사용되었다.

Fig. 4는 광학 활성 고정상과 시료의 interaction model을 나타냈다. 고정상의 thioamide NH와 carbonyl기가 수소결합에 참여하고 있으며 D체의 경우 고정상의 이소프로필기와 시료의 알킬기가 같은 방향으로 향하고 있다. 그러나 L체의 경우 고정상의 이소프로필기와 검체의 알킬기가 서로 반대 방향으로 향하고 있어 D체보다 안정한 수소결합을 이룬다. 그 결과 D체가 L체보다 먼저 유출될 것이며 이것은 실험결과와도 잘 일치하고 있다.

## 결 론

합성된 (S)-5-isobutyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin을 chromosorb WAW(80~100 mesh)에 2%로 피막한 칼럼에서 5가지 아미노산 광학 이성질체를 1.143~1.45의 분리계수로 분리하였다. 분리 온도 범위는 140°C~200°C이고 bleeding이 일어나지 않고 사용 가능한 최고 온도는 230°C로서 열안정성이 매우 우수하였다. 키랄성 인지의 mechanism은 두군데의 광학 활성 고정상과 아미노산 유도체간의 수소결합 및 입체장애에 의한 상호 작용에 의하며 alanine 유도체와의 결합정수는 201.3이었다. 합성된 광학 활성 고정

상은 아미노산 외에도 amide 결합을 형성할 수 있는 화합물에의 응용이 가능하리라 생각되며 capillary 칼럼에 적용하여 다수의 아미노산 광학 이성질체에 대한 동시 분리의 가능성을 제시하였다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1987년도 보건장학회 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다. 이에 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

- 1) Pirkle, W.H., Finn, J.M. and Morrison J.D. (Ed.): *Asymmetric Synthesis*. vol. 1, Academic Press, New York(1983).
- 2) Gil-Av, E., Charles, R. and Fischer, G.: Resolution of amino acids by gas chromatography, *J. Gas Chromatogr.* 17, 408 (1965).
- 3) Lochmuller, C.H. and Souter, R.W.: Chromatographic resolution of enantiomers; selective review, *J. Chromatogr.* 113, 283 (1975).
- 4) Liu, R.H. and Ku, W.W.: Chiral stationary phases for the GLC separation of enantiomers, *J. Chromatogr.* 271, 309 (1983).
- 5) Hanna, M.W. and Ashbaugh, A.L.: NMR study of molecular complexes of 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane and aromatic donors, *J. Phys. Chem.* 68, 811 (1964).
- 6) Pirkle, W., Hyunand, M.H. and Bank, B.: A rational approach to the design of highly-effective chiral stationary phases, *J. Chromatogr.* 316, 585 (1984).