

아미노산 광학이성질체 분리를 위한 가스크로마토그래피용 키랄 고정상의 개발

새로운 diamide 계 키랄 고정상의 응용

박만기·양정선·이미영
서울대학교 약학대학

(Received February 21, 1989)

Development of Chiral Stationary Phases for the Gas Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers New diamide chiral stationary phase

Man Ki Park, Jeong Sun Yang and Mi Yung Lee

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

Abstract—New diamide chiral stationary phases of four systematically substituted optically active N-(N-benzoyl-L-amino acid)-anilide synthesized from L-valine, L-leucine, L-isoleucine, and L-phenylalanine were described. The behaviors of these diamides as optically active stationary phases for the separation of N-trifluoroacetyl-D,L-amino acids were examined with respect to separation factors(α) and thermodynamic properties of interaction. The separation of twelve N-trifluoroacetyl-D,L-amino acid isopropyl esters were improved by the order of N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide > N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide > N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide > N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide. Eight amino acid derivatives with non-polar R-group and threonine, serine, aspartic acid, and glutamic acid enantiomers were separated on N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide as chiral stationary phase with good separation factor between 1.07-1.25. The separation factors decreased with respect to increasing column temperature. Possible working temperature of diamide phase was between 130-190 °C for N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide and 130-180 °C for other three diamide phases. The differential Gibb's free energy ($\Delta\Delta G$) of enantiomers was in the range of -100~-180 cal/mol for ten amino acids and -40~-60 cal/mol for alanine and aspartic acid.

Keywords □ N-(N-Benzoyl-L-amino acid)-anilide, chiral stationary phase, gas chromatography, amino acid enantiomer, separation factor.

가스 크로마토그래피용 키랄 고정상의 개발은 1966년 Gil-Av 등¹⁾이 처음으로 N-trifluoroacetyl-L-isoleucine lauryl ester를 키랄 고정상으로 사용하여 alanine, valine, leucine의 3종류 아미노산 광학이성체의 N-trifluoroacetyl-2-butyl ester를 분리하는데 성공한 이후 그와 유사한 종류의 키랄 고정상들이 아미노산 광학이성체를 분리하는데 적용되었다. 그러나 최초로 개발된 키랄 고정상들은 그 자체의 휘발성 때문에 칼럼온도를 100°C

이상 올릴 수 없어 휘발성이 낮은 물질에 대해서는 사용할 수 없었다.

W. A. König 등²⁾은 L-phenylalanine을 모체로 dipeptide ester계 고정상을 사용하여 110-140°C 사이에서 valine 등 몇몇 비극성 아미노산 광학이성질체의 N-trifluoroacetyl-2-butyl ester를 분리하였다. Dipeptide ester계 고정상이 종래의 N-trifluoroacetyl ester계 고정상에 비하여서는 분리능과 열안정성이 개선되었으나 여전히 휘발

성이 낮은 극성기를 갖는 아미노산에는 적용이 어려우며 사용온도 범위내에서도 tailing 이 생기는 등 문제점이 있었다. Dipeptide 계 고정상을 수정한 tripeptide, 함유량 dipeptide 계 고정상이 개발되었으나 dipeptide 계 고정상과 비교할 때 분리능이 거의 비슷하거나 오히려 떨어지는 경향을 보였으며 함유량 dipeptide 계 고정상의 경우는 열안정성이 약간 증가되는 경향을 보였다.³⁾

저자는 L-leucine, L-isoleucine, L-phenylalanine, L-valine 의 4가지 L-아미노산을 모체로 diamide 계 키랄 고정상을 제조하였다. 이들은 모두 시료인 아미노산 유도체와 "three point interaction"을 만족시킬 수 있는 구조로 설계되었다. 이들을 가스크로마토그래피용 키랄 고정상으로 응용하기 위해 융점 및 bleeding 이 일어나는 온도를 측정하여 사용 가능한 온도 범위를 조사하였다. 이들의 제조에 사용된 아미노산의 R group 의 변화에 따른 12가지 아미노산에 대한 분리도와 retention time 을 비교하였으며, 온도와 분리도와 상관관계를 검토하여 열역학적 parameter 들을 구하였다.

실험방법

시약 및 기기—특별한 언급이 없는 한 모든 시약은 시판 특급을 사용하였다. Diethylphosphorocyanidate(Sigma, 특급), 중클로로포름(Sigma, 특급), trifluoroacetic anhydride(Pierce Chem., GC 분석용)을 사용하였으며 N, N-dimethylformamide 는 감압 증류하여 무수상태로 하여 사용하였다. 각종 D, L- 및 L-아미노산 표준품은 Sigma 사로부터 구입하였다.

기기는 가스크로마토그래프(Shimadzu RPR-G1), NMR(Bruker FT-80 MHz), IR(Perkin Elmer FT1713), Mass(Hewlett-Packard 5985 B), 플라리미터(Jasco, DIP-360), 융점측정장치(Gallenkamp) 등을 사용하였다.

N-trifluoroacetyl-D, L-amino acid ester 의 제조⁴⁾—D, L- 및 L-아미노산 5mg 을 3N-HCl/isopropanol 용액 5ml 에 녹인 후 60°C에서 3시간 환류시킨 후 질소가스로 용매를 날려보냈다. 잔류물을 dichloromethane 1ml 로 녹이고 trifluor-

oacetic anhydride(TFAA) 1ml 를 가한 후 상온에서 2시간 방치하고 질소가스로 과잉의 시약을 제거했다. 잔류물을 클로로포름 1ml 에 녹여 가스크로마토그래피용 시료로 하였다.

Diamide 계 키랄 고정상의 제조—L-valine, L-isoleucine, L-leucine, L-phenylalanine 의 4종의 아미노산에 대하여 Yamada 등⁵⁾의 방법에 의하여 다음과 같은 과정으로 각각 N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide 를 제조하였다.

다음은 L-Valine 으로부터 N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide 를 제조하는 과정이다. L-valine 5.85g(0.05 mol)을 5N-NaOH 용액 17ml 에 녹인 후 이 용액에 benzoyl chloride 5ml 를 1방울씩 천천히 적가하고 상온에서 계속 1시간 반응을 진행시킨 후 2N HCl 을 가하여 산성으로 하였다. 생성된 침전(N-benzoyl-L-valine)을 여과하여 소량의 물로 세척했다(2.1g, yield 45%). N-benzoyl-L-valine 1g 을 무수 DMF 8ml 에 녹이고 질소 기류하에 ice-bath 에서 aniline 용액 8ml(0.5g/8ml 무수 DMF), diethylphosphorocyanidate(DEPC) 용액 6ml(0.7g/6ml 무수 DMF) 및 triethylamine 용액 6ml(0.4g/6ml 무수 DMF)를 차례로 적가하고 ice-bath 에서 2시간, 상온에서 48시간 계속 반응을 진행하였다. 반응액에 과량의 물을 가한 후 분액 깔대기에 옮겨 에틸아세테이트로 추출하고 유기용매층을 2% HCl 용액 20ml 로 3회 세척후 감압농축하였다(0.42g, yield 42%, overall yield 19%). 이것을 메탄올로 재결정하였다. 같은 방법으로 N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide(yield 20%), N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide(Yield 18%), N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide(yield 12%)를 제조하였다. 이들 화합물의 물리적 성질 및 각종 spectroscopic data 는 다음과 같다.

1) N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide :

IR(cm^{-1}) ; 3200(N-H), 1670(C=O)

NMR(CDCl_3) ; δ 8.59(1H, s, ϕ -NH)

δ 4.70(1H, dd, C_α -H, J=7.2)

δ 2.30(1H, q, C_β -H, J=6.8)

δ 1.04 (6H, d, -2CH_3 , $J=6.8$)

Mass(m/z) ; 296(M⁺)

$[\alpha]_D^{20}$; -34° (c=0.4%, MeOH)

mp ; 106-108°C

2) N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide :

IR(cm^{-1}) ; 3210(N-H), 1650(C=O)

NMR(CDCl_3) ; δ 8.46(1H, s, ϕ -NH)

δ 4.85(1H, dd, C_α -H, $J=4.8$)

δ 2.10(1H, m, C_β -H)

δ 1.48(2H, m, C_γ -H)

δ 1.19(3H, d, $-\text{CH}_3$, $J=6.4$)

Mass(m/z) ; 310(M⁺)

$[\alpha]_D^{20}$; -35° (c=0.4%, MeOH)

mp ; 108-109°C

3) N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide :

IR(cm^{-1}) ; 3200(N-H), 1630(C=O)

NMR(CDCl_3) ; δ 8.60(1H, s, ϕ -NH)

δ 4.95(1H, t, C_α -H, $J=7.0$)

δ 2.10(1H, m, C_γ -H)

δ 1.04(2H, m, C_β -H)

Mass(m/z) ; 310(M⁺)

$[\alpha]_D^{20}$; -35° (c=0.4%, MeOH)

mp ; 111-113°C

4) N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide :

IR(cm^{-1}) ; 3200(N-H), 1650(C=O)

NMR(CDCl_3) ; δ 5.03(1H, q, C_α -H, $J=6.4$)

δ 3.21(2H, m, C_β -H)

Mass(m/z) ; 398(M⁺)

$[\alpha]_D^{20}$; -33° (c=0.4%, MeOH)

mp ; 113-115°C

가스크로마토그래피용 칼럼 충전 및 시료분석-위

에서 제조한 고정상 140mg을 메탄올 30ml에 녹여 250ml 둥근 바닥 플라스크에 넣고 Chromosorb WAW(80-100mesh) 7g을 서서히 가하여 잘 섞은 후 약간 가열하면서 rotary evaporator에서 용매를 서서히 제거하였다.

코일형 유리제 칼럼(3.2mm i.d. \times 2.1m)을 물, 메탄올, 아세톤 순으로 세척하고 건조시킨 다음, 위에서 조제한 충전물을 충전하였다. 충전된 고정상은 200°C에서 24시간 conditioning 한 후 분석에 사용하였다. 실제 시료의 분석은 다음과 같은 조건에서 실

시하였다.

Detector ; FID(flame ionization detector)

Injector temperature ; 250°C

Detector temperature ; 250°C

Column temperature ; 130-160°C

Carrier gas flow rate ; 50ml/min

결과 및 고찰

1975년 Lochmüller 등⁶⁾은 dipeptide계 고정상에서 D-valine이 L-valine보다 먼저 용출되는 것을 고정상과 시료의 수소결합의 안정도 차이에 인한 것으로 설명하였다.

저자는 dipeptide계 고정상에서 시료와 상호작용할 것으로 생각되는 $-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}^*\text{H}(\text{R})-\text{NH}-\text{CO}-$ 기를 기본 골격으로 하여 두개의 amide 결합주위에 phenyl기를 도입한 $\text{Ar}-\text{NH}-\text{CO}-\text{C}^*\text{H}(\text{R})-\text{NH}-\text{CO}-\text{Ar}$ 의 diamide계 고정상을 제조하였다 (Fig. 1).

L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-phenylalanine으로부터 제조된 4가지 diamide계 고정상의 용점은 106-115°C 범위로, 이들은 가스크로마토그래피 측정온도인 130-160°C 사이에서 액상으로 존재했다. 이들 4가지 유도체를 Chromosorb WAW/DMCS(100-120mesh)에 2%로 피막하여 사용했다.

Diamide계 고정상의 사용가능 범위는 각 고정상

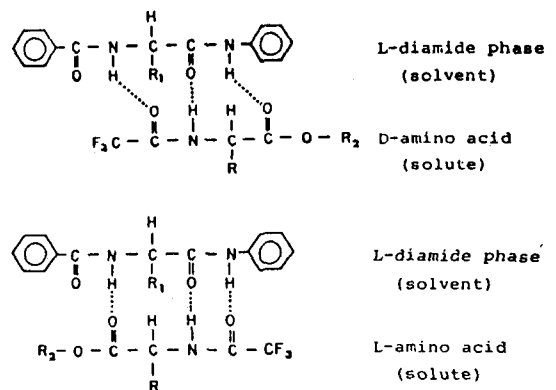


Fig. 1—Model of interaction of N-(N-benzoyl-L-amino acid)-anilide (solvent) with N-TFA ester of D- and L-amino acid (solute).

의 용점으로부터 bleeding 이 일어나기 전까지의 온도도 Table I 과 같다.

Table II-V 에 각각 L-valine, L-isoleucine, L-leucine, L-phenylalanine 으로부터 제조한 N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide 의 N-trifluoroacetyl-D, L-amino acid isopropyl ester 에 대한 각 온도에서의 retention time 및 분리도 α 를 나타냈다.

N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide 및 N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide 의 경우 retention time 은 alanine < valine < isoleucine < norleucine < leucine < threonine < serine < meth-

Table I—Melting point and bleeding temperatures of diamide phases.

diamide phase	melting point	bleeding temp.
N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide	106-108 °C	180 °C
N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide	108-109 °C	180 °C
N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide	111-113 °C	180 °C
N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide	113-115 °C	190 °C

ionine < phenylalanine < aspartic acid < glutamic acid 의 순이었으며 N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)

Table II—Gas chromatographic separation of N-TFA-D, L-amino acid isopropyl esters on N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide as chiral stationary phase.

Amino acid		130 °C		140 °C		150 °C		160 °C	
		t_R	α^*	t_R	α^*	t_R	α^*	t_R	α^*
Ala	D	2.04	1.16	1.31	1.05	1.08	1.04		
	L	2.37		1.38		1.12			—
Val	D	2.23	1.16	1.85	1.15	1.21	1.13	1.09	1.12
	L	2.59		2.13		1.37		1.22	
Norval	D	3.71	1.11	1.92	1.10	1.30	1.10	1.18	1.09
	L	4.12		2.11		1.43		1.27	
Ile	D	3.68	1.12	1.90	1.11	1.29	1.11	1.11	1.10
	L	4.12		2.11		1.44		1.22	
Leu	D	5.80	1.08	2.70	1.06	1.87	1.06	1.56	1.05
	L	6.26		2.86		1.98		1.64	
Norleu	D	5.82	1.07	2.74	1.06	1.90	1.05	1.63	1.04
	L	6.23		2.90		2.00		1.70	
Thr	D	7.42	1.13	3.21	1.12	2.49	1.12	1.87	1.11
	L	8.38		3.60		2.79		2.08	
Ser	D			5.80	1.12	3.10	1.11	2.56	1.09
	L	—		6.51		3.44		2.79	
Met	D			9.80	1.17	5.09	1.15	3.98	1.13
	L	—		11.47		5.85		4.50	
Phe	D			10.50	1.22	5.43	1.17	4.24	1.14
	L	—		12.81		6.35		4.83	
Asp	D					20.01	1.06	11.67	1.05
	L	—		—		21.21		12.25	
Glu	D							17.57	1.04
	L	—		—		—		18.27	

* α : Separation factor, $\alpha = t_L/t_D$

Table III—Gas chromatographic separation of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters on N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide as chiral stationary phase.

Amino acid		130 °C		140 °C		150 °C		160 °C	
		t _R	α	t _R	α	t _R	α	t _R	α
Ala	D	2.61	1.07	1.42	1.06	1.19	1.06		
	L	2.79		1.51		1.26			
Val	D	2.94	1.17	1.89	1.16	1.36	1.15	1.09	1.14
	L	3.44		2.19		1.56		1.24	
Norval	D	3.01	1.13	1.92	1.12	1.45	1.12	1.11	1.11
	L	3.40		2.15		1.62		1.23	
Ile	D	4.29	1.15	2.27	1.14	1.56	1.13	1.21	1.11
	L	4.93		2.57		1.76		1.34	
Leu	D	5.70	1.11	2.75	1.10	1.58	1.09	1.22	1.09
	L	6.33		3.02		1.73		1.33	
Norleu	D	6.78	1.06	2.94	1.05	1.90	1.05	1.30	1.04
	L	7.19		3.09		2.00		1.35	
Thr	D	8.12	1.12	3.54	1.11	2.80	1.10	2.21	1.10
	L	9.09		3.93		3.08		2.43	
Ser	D			6.01	1.12	3.24	1.11	1.92	1.09
	L	—		6.73		3.60		2.09	
Met	D			12.34	1.15	6.01	1.12	3.01	1.10
	L	—		14.19		6.73		3.31	
Phe	D			13.01	1.20	8.21	1.16	4.98	1.13
	L	—		15.61		9.52		5.63	
Asp	D					23.21	1.06	14.32	1.05
	L	—		—		24.60		15.04	
Glu	D							20.14	1.04
	L	—		—		—		20.94	

-anilide, N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide의 경우는 norleucine>isoleucine의 순으로 용출순서가 바뀌었다.

각각의 고정상의 종류에 따른 시료의 용출순서는 N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide>N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide>N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide>N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide의 순으로 시료의 retention time들이 증가되었다. 이것은 NMR에 의한 고정상과 시료의 상호작용 조사에서 구한 회합상수의 크기순과도 일치하였다.

회합성이 비교적 높은 비극성기를 갖는 아미노산들은 alanine>valine>isoleucine>norvaline>leucine>norleucine>threonine>serine>meth-

ionine>phenylalanine의 순으로 130-140°C 사이에서 15분 이내에 용출되었으며, 비교적 회합성이 낮은 극성기를 갖는 aspartic acid, glutamic acid는 각각 150°C와 160°C에서 20분대에 용출되었다. 그러나 tyrosine, lysine 등은 160°C에서 40분대에 용출되지 않았다. N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide 고정상의 경우 거의 전 아미노산들의 용출시간들이 단축되었는데 이것은 고정상의 benzyl기가 시료의 접근을 방해하는 입체 장애요인으로 작용했기 때문으로 생각된다.

시료에 대한 분리도는 N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide>N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide>N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide>N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide의 순으로 증가하는

Table IV—Gas chromatographic separation of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters on N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide as chiral stationary phase.

Amino acid		130°C		140°C		150°C		160°C	
		t_R	α	t_R	α	t_R	α	t_R	α
Ala	D	2.54	1.07	1.34	1.06	1.09	1.05		
	L	2.71		1.42		1.14			
Val	D	2.93	1.19	1.66	1.17	1.14	1.16		
	L	3.47		1.94		1.32			
Norval	D	4.18	1.16	2.21	1.13	1.40	1.12		
	L	4.88		2.49		1.57			
Ile	D	4.10	1.20	2.05	1.19	1.39	1.18		
	L	4.92		2.44		1.66			
Leu	D	5.60	1.14	2.63	1.13	1.63	1.11	1.11	1.10
	L	6.38		2.97		1.81		1.22	
Norleu	D	6.63	1.09	2.85	1.08	1.85	1.07	1.25	1.07
	L	7.25		3.09		1.99		1.34	
Thr	D	7.54	1.15	3.24	1.14	2.51	1.13	1.92	1.13
	L	8.67		3.69		2.84		2.17	
Ser	D			5.43	1.15	3.65	1.14	1.72	1.13
	L			6.24		4.17		1.94	
Met	D			10.17	1.16	6.40	1.12	2.63	1.09
	L			11.78		7.17		2.87	
Phe	D			10.89	1.25	6.60	1.21	4.11	1.18
	L			13.65		8.01		4.85	
Asp	D					22.01	1.07	12.30	1.06
	L					23.55		13.04	
Glu	D							19.23	1.05
	L							20.19	

경향을 보였다.

N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide 고정상에서 valine, norvaline, isoleucine, leucine, threonine, serine, methionine, phenylalanine 등 대부분의 시료들이 130-140°C에서 1.1-1.2의 우수한 분리도를 나타냈다. 그러나 alanine, norleucine, aspartic acid, glutamic acid 등은 1.1 이하의 비교적 낮은 분리도를 나타냈다(Table IV). 이러한 경향은 다른 고정상들에서도 유사하게 나타났으며 N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide 고정상의 경우 시료들의 retention time은 N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide 고정상에 비하여 길어지는 경향을 보였으나 분리도는 오히려 감소하는 경향을 나타냈다(Table III). N-(N-benzoyl-L-

phenylalanyl)-anilide 고정상은 거의 대부분의 시료들의 retention time이 단축되었으나 분리도가 비교적 낮았다(Table V).

키랄 고정상의 표면은 키랄 환경을 제공하여 한쌍의 광학이성체와 상호작용을 하게 되는데 이때 일시적으로 생기는 부분 입체 이성질 착물의 안정성 차이에 의해 분리가 이루어지게 된다. 이때 분리되는 정도는 분리도 α 로 나타내는데 이 값은 사용하는 크로마토그래피 시스템의 기계적 성질과는 관계없이 고정상과 분리되는 용질이 상호작용할 때의 자유에너지차($\Delta\Delta G$)에 의해 결정된다.

CSP(Chiral stationary phase)와 L체 또는 D체의 용질 A가 상호작용하여 CSP*(L)-A 또는 CSP*(D)-A가 될 때의 식은 다음과 같이 쓸 수

Table V—Gas chromatographic separation of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters on N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide as chiral stationary phase.

Amino acid		130°C		140°C		150°C		160°C	
		t_R	α	t_R	α	t_R	α	t_R	α
Ala	D	1.87	1.05	1.08	1.04				
	L	1.96		1.12		—		—	
Val	D	2.31	1.08	1.62	1.07	1.45	1.07	1.25	1.06
	L	2.51		1.73		1.55		1.33	
Norval	D	3.33	1.07	1.82	1.06	1.54	1.05	1.32	1.05
	L	3.56		1.93		1.62		1.39	
Ile	D	3.54	1.09	2.21	1.08	1.84	1.07	1.40	1.07
	L	3.86		2.39		1.97		1.50	
Leu	D	3.80	1.06	2.50	1.05	1.99	1.05		
	L	4.03		2.63		2.09		—	
Norleu	D	3.92	1.04	2.72	1.04				
	L	4.07		2.83		—		—	
Thr	D	5.32	1.11	3.02	1.10	2.23	1.09	1.67	1.08
	L	5.89		3.32		2.43		1.80	
Ser	D	5.94	1.10	4.32	1.09	2.98	1.08	2.32	1.07
	L	6.53		4.71		3.22		2.48	
Met	D	11.32	1.14	8.23	1.12	4.48	1.11	3.56	1.10
	L	12.90		9.22		4.97		3.92	
Phe	D			9.20	1.18	6.87	1.15	4.01	1.14
	L	—		10.85		7.90		4.57	
Asp	D					15.17	1.04	10.07	1.03
	L	—		—		15.73		10.37	
Glu	D					24.08	1.02	13.24	1.02
	L	—		—		24.56		13.55	

있다.⁷⁾

$$\begin{aligned}
 \text{CSP}^+(L) - A &\rightleftharpoons \text{CSP}^*(L) - A \\
 \Delta G &= -RT \ln(K_L) \\
 \text{CSP}^+(D) - A &\rightleftharpoons \text{CSP}^*(D) - A \\
 \Delta G &= -RT \ln(K_D) \\
 \Delta \Delta G &= |\Delta G_L - \Delta G_D| = -RT \ln(K_L/K_D) \\
 &= -RT \ln(\alpha) \tag{1}
 \end{aligned}$$

이때 K_L/K_D 는 같은 용매 시스템에서 용질의 상대적 용해도와 같으므로 분리도(α)로 나타낼 수 있으며 α 는 t_L/t_D (adjusted relative retention time of L- and D-isomer)로 실험적으로 구할 수 있다. 또 Gibbs 방정식에서 용액의 differential free

enthalpy 차($\Delta \Delta H$)는

$$\Delta \Delta H = \Delta \Delta G + T \Delta \Delta S \tag{2}$$

($\Delta \Delta S$; differential free entropy of solution)로 나타난다.

절대온도의 역수($1/T$)와 $\log \alpha$ 와의 plotting은 직선성을 나타내는데 이때의 기울기 M 은

$$M = \frac{-\Delta \Delta H}{2.303R} \tag{3}$$

로 나타내며 이로부터 differential free enthalpy 차($\Delta \Delta H$)를 구할 수 있다. 이 값을 식 (2)에 대입하면 differential free entropy 차($\Delta \Delta S$)를 구할 수 있다. 최근 Pirkle 등⁸⁾은 이론적으로 고도의 발

달된 크로마토그래피 시스템내에서 한쌍의 용질분자가 고정상에 흡착될 때 그 안정성의 차이($\Delta\Delta G$)가 10cal/mol($\alpha \approx 0.02$) 정도까지도 분석이 가능하다고 밝힌 바 있다. Lochmüller 등⁶⁾은 충전칼럼에

서 만족할만한 $\Delta\Delta G$ 값은 100cal/mol 정도이며 preparative scale에서 300cal/mol 이상이 바람직하다고 보고했다. 또한 $\Delta\Delta G$ 값이 100cal/mol 이하로 충전칼럼에서 불완전한 분리를 보일 경우

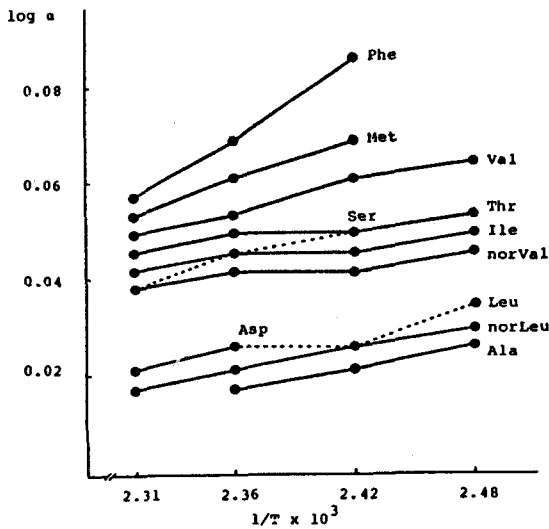


Fig. 2—Plot of the logarithm of the separation factor, α , versus the inverse of the absolute temperature for N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters as solutes on N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide as the chiral stationary phase.

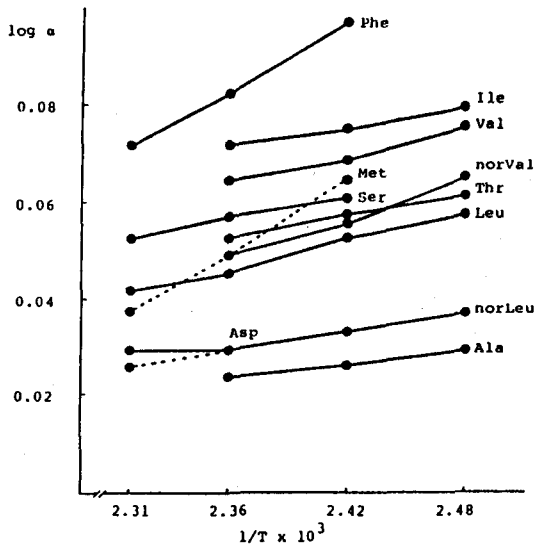


Fig. 4—Plot of the logarithm of the separation factor, α , versus the inverse of the absolute temperature for N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters as solutes on N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide as the chiral stationary phase.

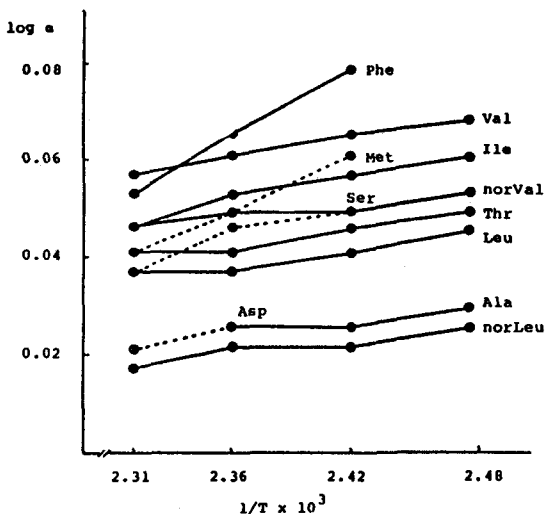


Fig. 3—Plot of the logarithm of the separation factor, α , versus the inverse of the absolute temperature for N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters as solutes on N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide as the chiral stationary phase.

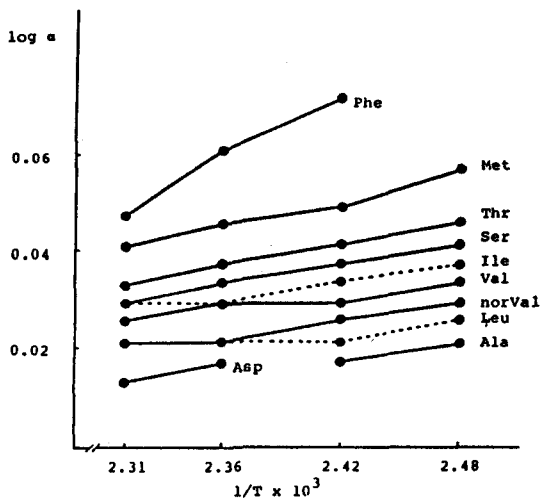


Fig. 5—Plot of the logarithm of the separation factor, α , versus the inverse of the absolute temperature for N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters as solutes on N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide as the chiral stationary phase.

capillary 칼럼을 사용하여 칼럼의 길이를 길게 하면 불완전한 분리를 개선할 수 있다고 보고하였다.

Fig. 2-5는 각 고정상에서 $1/T$ 과 $\log \alpha$ 와의 관계를 plotting 한 그래프이다. 절대온도의 역수에 대한 $\log \alpha$ 의 관계는 직선성을 나타냈으며 직선의 기울기로부터 식 (3)에 의하여 엔탈피차 $\Delta\Delta H$ 를 구했다. 또 식 (1)에서 구한 $\Delta\Delta G$ 값을 식 (2)에 대입하여 엔트로피차 $\Delta\Delta S$ 를 구할 수 있다. Table VI-IX 는 각 고정상에서의 11개의 아미노산 isopropyl 에스테르화물에 대한 열역학적 parameter 이다.

N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide 의 경우 (Table VI) valine, methionine, phenylalanine 은 $\Delta\Delta G$ 값이 -100cal/mol 이상의 값을 나타내나 alanine, aspartic acid 등은 -50cal/mol 이하의 $\Delta\Delta G$ 값을 나타내고 있으므로 이들의 완전한 분리를 위해서는 capillary column 을 사용하여 칼럼의 길이를 더 길게 하는 등의 크로마토그래피 시스템의 개선이 필요할 것으로 생각된다. N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide 의 경우 (Table VII), N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide 에 비하여 $\Delta\Delta G$ 값이 약간 증진되었으며 N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide 의 경우 (Table VIII) alanine, aspartic acid 를 제외한 대부분의 시료들의 $\Delta\Delta G$ 값이 -100cal/mol 이상의 값을 나타내었고 이들은 실제

충전칼럼에서도 잘 분리되었다. N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide 의 경우 (Table IX) phenylalanine 을 제외한 대부분의 시료들이 -100cal/mol 이하의 $\Delta\Delta G$ 값을 나타내며 효과적인 시료의 분리를 위해서는 capillary 칼럼을 사용해야 할 것으로 생각된다.

Table VI—Thermodynamic properties of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl ester on N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide as chiral stationary phase.

Amino acid	slope, M	r	T (°K)	$\Delta\Delta H$ (cal/mol)	$\Delta\Delta G$ (cal/mol)	$\Delta\Delta S$ (e.u)*
Ala	69.0	0.999	403	-365.1	-46.9	-0.79
Val	93.9	0.992	403	-496.8	-119.0	-0.94
Norval	41.2	0.942	403	-218.0	-83.5	-0.33
Ile	40.7	0.942	403	-215.3	-90.7	-0.31
Leu	64.3	0.927	403	-343.9	-61.6	-0.70
Norleu	72.3	0.999	403	-382.5	-54.2	-0.81
Thr	40.7	0.942	403	-215.3	-97.9	-0.29
Ser	105.9	0.967	413	-560.3	-93.0	-1.13
Met	136.9	0.998	413	-724.3	-128.9	-1.44
Phe	268.4	0.997	413	-1314.3	-163.1	-2.79
Asp	82.0	—	423	-433.9	-49.0	-0.91

*1 e.u.(cal/deg/mol) = 4.184 JK⁻¹mol

Table VII—Thermodynamic properties of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl ester on N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide as chiral stationary phase.

Amino acid	slope, M	r	T (°K)	$\Delta\Delta H$ (cal/mol)	$\Delta\Delta G$ (cal/mol)	$\Delta\Delta S$ (e.u)
Ala	34.2	0.866	403	-181.0	-54.2	-0.31
Val	66.0	0.999	403	-349.2	-125.7	-0.55
Norval	40.7	0.942	403	-215.3	-97.9	-0.29
Ile	86.8	0.972	403	-459.3	-111.9	-0.86
Leu	49.2	0.958	403	-260.3	-83.5	-0.44
Norleu	43.1	0.930	403	-228.0	-46.7	-0.45
Thr	48.5	0.957	403	-256.6	-90.7	-0.41
Ser	105.9	0.970	413	-560.3	-93.0	-1.13
Met	176.0	0.998	413	-931.2	-114.7	-2.03
Phe	237.5	0.999	413	-1256.6	-149.7	-2.68
Asp	82.0	1.000*	423	-433.9	-49.0	-0.91

*With only two temperatures, the result was naturally a straight line.

Table VIII—Thermodynamic properties of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl ester on N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide as chiral stationary phase.

Amino acid	slope, M	r	T (°K)	$\Delta\Delta H$ (cal/mol)	$\Delta\Delta G$ (cal/mol)	$\Delta\Delta S$ (e.u)
Ala	74.3	0.999	403	-393.1	-54.2	-0.84
Val	101.6	0.991	403	-537.6	-139.3	-0.99
Norval	140.8	0.975	403	-745.0	-118.8	-1.55
Ile	65.3	0.999	403	-345.5	-146.0	-0.50
Leu	104.1	0.969	403	-550.3	-104.9	-1.11
Norleu	72.5	0.999	403	-383.6	-69.0	-0.78
Thr	47.3	0.952	403	-250.3	-111.9	-0.34
Ser	68.9	0.999	413	-364.6	-114.7	-0.62
Met	246.6	0.999	413	-1304.8	-121.8	-2.86
Phe	227.5	0.999	413	-1203.7	-183.1	-2.47
Asp	82.0	1.000*	423	-433.9	-56.9	-0.89

*With only two temperatures, the result was naturally a straight line.

Table IX—Thermodynamic properties of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl ester on N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide as chiral stationary phase.

Amino acid	slope, M	r	T (°K)	$\Delta\Delta H$ (cal/mol)	$\Delta\Delta G$ (cal/mol)	$\Delta\Delta S$ (e.u)
Ala	70.0	1.000*	403	-370.4	-39.1	-0.82
Val	42.3	0.942	403	-223.8	-61.6	-0.40
Norval	51.0	0.957	403	-269.8	-54.2	-0.54
Ile	49.8	0.957	403	-263.5	-69.0	-0.48
Leu	34.2	0.866	403	-180.9	-46.7	-0.33
Thr	69.5	0.999	403	-367.7	-83.6	-0.70
Ser	70.0	0.999	413	-370.0	-70.7	-0.72
Met	88.7	0.988	413	-469.3	-93.0	-0.91
Phe	236.5	0.991	413	-1251.3	-135.8	-2.70
Asp	84.0	1.000*	423	-444.4	-33.0	-0.97

*With only two temperatures, the result was naturally a straight line.

칼럼의 온도변화에 따른 분리도의 변화는 $\Delta\Delta H$ 값에서 민감하게 나타나는데 4개의 고정상에서 phenylalanine, methionine, serine 이 비교적 큰 $\Delta\Delta H$ 값을 나타냈으며 이들은 온도를 낮출수록 분리도가 증가하나 retention time 도 함께 길어지므로 고정상의 용점 이상의 온도 범위내에서 적절하게 조절해야 하며, 실제로 phenylalanine 은 140°C에서, methionine 과 serine 은 130°C에서 각각 15분 이내에 1.10-1.18의 분리도로 분리되었다. $\Delta\Delta H$ 값이 비교적 작은 alanine, isoleucine, norleucine, leucine 등은 온도를 낮추어도 분리도의 증가가 거의 없었다.

이상 고정상의 R group 에 따른 retention time 및 분리도의 검토결과 4가지 diamide 계 고정상중 N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide 고정상이 12가지 아미노산 광학이성질체에 대해 1.07-1.25의 분리도를 나타내 가장 우수한 것으로 나타났다.

결 론

L-Valine, L-isoleucine, L-leucine, L-phenylalanine 으로부터 N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-isoleucyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide, N-(N-benzoyl-L-phenylalanyl)-anilide 를 제조했다.

1. 12개의 N-trifluoroacetyl-D, L-amino acid isopropyl ester 에 대한 분리도는 N-(N-benzoyl-L-leucyl)-anilide 가 4가지 고정상중 8개의 비극성 R group 의 아미노산과 threonine, serine, aspartic acid, glutamic acid 에 대해 1.07-1.25 로 가장 우수한 분리능을 보였다.

2. 각 고정상에서 bleeding 이 일어나는 온도는 180-190°C였다. 고정상의 용점 이상의 온도에서는 온도를 낮출수록 분리도는 증가하였으며 이러한 경향은 phenylalanine, methionine, serine 에서 두드러졌으며 alanine, norvaline, norleucine 의 경우는 큰 변화가 없었는데, 전자가 후자보다 큰 $\Delta\Delta H$ 값을 갖는 것으로 나타났다.

3. 고정상에서 D 체와 L 체가 상호작용할 때의 자유에너지차($\Delta\Delta H$)는 4가지 고정상에서 isopropyl 에스테르화물에 대해 phenylalanine 등은 -100cal/mol 이상으로 충전칼럼에서 만족할 만한 분리를 기대할 수 있는 값을 가졌으나 alanine, aspartic acid 의 경우 -40-60cal/mol 로 이들의 완전한 분리를 위해서는 크로마토그래피 시스템의 개선이 필요한 것으로 나타났다.

문 헌

- 1) Gil-Av, E., Feibush, B. and Sigler, R.C.: Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase, *Tetrahedron Letters* **10**, 1009 (1966).
- 2) Konig, W.A. and Nicholson, G.J.: Glass Capillaries for Fast Gas Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers, *Anal. Chem.* **47**, 951 (1975).
- 3) Liu, R.H. and Ku, W.W.: Chiral stationary phases for the gas-liquid chromatographic separation of enantiomers, *J. of Chromatography* **271**, 309 (1983).
- 4) Knapp, D.R., Handbook of Analytical Derivatization Reactions, Wiley-Intersci. Pub., p. 254 (1979).
- 5) Yamada, S.I., Kasai, Y. and Shioiri, T.: Diethylphosphoryl cyanide, a new reagent for the synthesis of amide, *Tetrahedron Lett.* **18**, 1595 (1973).
- 6) Pirkle, W.H. and Pochapsky, T.C.: Preparation of N-(2-Naphthyl)-2-amino Acids and Esters of High Enantiomeric Purity, *J. Org. Chem.* **51**, 102 (1986).
- 7) Lochmüller, C.H. and Souter, R.W.: Chromatographic

- resolution of enantiomers; selective review, *J. Chromatogr.* **113**, 283 (1975).
- 8) Parr, W. and Howord, P.Y.: Structural effects of selected dipeptides as stationary phases for the chromatographic separation of enantiomeric amino acids, *Anal. Chem.* **45**, 711 (1973).