

가스크로마토그래피에 의한 아미노산 光學異性體의 分離 I 光學活性 N-Benzoyl-L-Valine 유도체의 固定相으로의 응용

朴 萬 基 · 柳 載 夏 · 姜 鍾 聲

서울대학교 藥學大學

(Received October 22, 1985)

Separation of Amino Acid Enantiomers by Gas Chromatography I With Optically Active N-Benzoyl-L-Valine Derivative as Stationary Phase

Man Ki Park, Jae Ha Ryu and Jong Seong Kang
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—The gas chromatographic behavior of optically active N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide used as stationary phase is described. N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide has been synthesized with good yield under mild condition via Schotten-Bauman process and coated on the Chromosorb W AW (80~100mesh) for the purpose of enantiomer separation. The behavior of this compound as optically active stationary phase for the separation of the enantiomers of N-TFA-D, L-amino acid isopropyl esters has been examined with respect to the correlation between the separation factors and column temperatures. All amino acid enantiomers examined were eluted within one hour and the elution pattern showed retention times increasing in the order of alanine, valine, leucine, threonine, proline and methionine.

최근 GC를 이용한 enantiomer(특히 아미노산)의 분리법이 많이 연구되고 있는데 이들 방법은 크게 두 가지로 나뉘지며, 그 중 하나는 광학활성물질을 이용하여 diastereomer 형태의 유도체를 합성한 후 일반 칼럼에서 분리하는 방법이며^{1~6)} 다른 하나는 광학적 불활성물질로 유도체를 합성하여 광학활성인 칼럼에서 분리하는 방법이다.^{7~10)}

두번째 방법은 Gil-Av^{8,9,11)} 등에 의해 처음으로 시도되었고 N-trifluoroacetyl (N-TFA)-L-isoleucine lauryl ester 등의 고정상이 합성되어 이용되었다. 최근 Rogers¹²⁾, Gromann 등¹³⁾에 의해 고정상의 amide부분이 시료와 수소결합을 하여 D,L enantiomer 각각이 서로 다른 안정도의 결합체를 형성함으로써 분리됨이 보고되었다. 시료의 에스테르화에 사용되는 알콜의 영향에 대해서는 Gil-Av⁹⁾ 등에 의해 연구되었으며 1급, 2급, 3급으로 변함에 따라 분리도가 양호해지고 TFA-amino acid isopropyl ester가 가장 많이 사용된다.

이 실험에서는 광학활성 고정상으로, 아미노산 enantiomer 유도체와 수소결합을 형성하기 위해 필요한 amide 결합을 두개 가진 N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide를 합성하여 80~100mesh Chromosorb W AW에 被膜한 후 3.2mm I.D. × 2.1m 유리제 칼럼에 充填하여 아미노산 enantiomer 분리에 사용하였다.

실 험 방 법

시료 및 시약—Benzoyl chloride, dimethyl formamide, aniline, triethylamine, isopropanol 등은 시판 특급을 사용하였다. Diethyl phosphorocyanidate는 Yamada등의 방법에 따라¹⁴⁾ 합성하여 사용하였으며 trifluoroacetic anhydride는 Pierce Chemical 사의 GC 분석용을 사용하였다. 아미노산 (alanine, valine, leucine, threonine, proline, methionine) enantiomer는 Sigma제 특급을 사용하였다.

N-(N-Benzoyl-L-Valyl)-Anilide 고정상의 조제—L-Valine 약 5g을 5N-NaOH 용액 17ml에 녹인 후 이 용액에 benzoyl chloride 약 5ml를 천천히 적가하고 상온에서 계속 1시간 정도 반응을 진행시킨 후 2N-HCl 용액을 가하여 생성된 침전 (N-benzoyl-L-valine)을 여과하였다.

반응계를 질소가스로 充塡하고 N-benzoyl-L-valine용액(약 1g/8ml DMF)을 ice-bath에서 냉각한 후 aniline용액(약 0.5g/8ml DME), diethyl phosphorocyanidate(DEPC)용액(약 0.7g/6ml DMF) 및 triethylamine용액(약 0.4g/6ml DMF)을 차례로 적가하고 ice-bath에서 2시간, 상온에서 48시간 계속 반응을 진행하였다. 반응을 종결한 후 반응용액을 분액깔때기에 옮기고 에칠 아세테이트 450ml를 가한 후 10분간 강하게 진탕하고 20% HCl용액 20ml로 10회, 물 25ml로 10회, 포화 NaCl용액 25ml로 2회, 포화 sod. bicarbonate용액 2ml로 10회, 물 2ml로 5회, 포화 NaCl용액 25ml로 5회 각각 씻었다. 남은 용액을 감압하에서 증발농축시킨 후 메탄올과 물로 재결정하였다. 이 생성물에 대해 NMR, IR, MS를 이용하여 동정하였다.

MMR(10% soln. in $CDCl_3$) δ : 9.34(1H, s, HN-C₆H₅), 7.48(10H, m, arom.), 1.05(6H, d, J=6.6Hz, 2·CH₃)

IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹; 3300(N-H), 1640(C=O), 760(=CH arom.)

MS(m/e); 296(M⁺), 176(M⁺-CONHC₆H₅), 105(C⁺OC₆H₅) 43(+CH(CH₃)₂)

N-TFA-D,L-amino acid의 이소프로필 에스테르의 조제—D,L-아미노산 약 5mg을 3N-HCl 이소프로판올 용액 5ml에 녹인 후 테프론 튜브에 密封하여 80°C로 2시간 반응시킨 후 질소가스를 이용하여 완전농축시켰다. 잔류물을 메칠렌 클로라이드 1ml로 녹이고 trifluoroacetic anhydride (TFAA) 1ml를 가한 후 상온에서 2시간 방치하고 질소가스로 완전 농축시킨 후 남은 oil像의 잔류물을 클로로포름 1ml에 녹여 이를 GC에 적용하였다.

가스크로마토그래피—고정상 140mg을 메탄올 30ml에 녹여 250ml 등근바닥 플라스크에 넣고 Chromosorb W AW (80~100mesh) 7g을 서서히 가했다. 약간 가열하면서 rotary evaporator에서 용매를 완전히 제거하고, 100°C 수욕상에서 1시간 계속 방치하였다.

코일형 유리제 칼럼(3.2mm I.D.×2.1m)을 물, 메탄올, 아세톤順으로 세척하고 건조시킨 다음 위에서 조제한 充塡物을 充塡하고 150°C에서 24시간 conditioning한 후 분석에 사용하였다.

칼럼 온도는 80°C~140°C였고 주입부 및 flame ionization detector 검출부의 온도는 250°C로 하였다. 기체의 유량은 N₂ 50ml/min., H₂ 0.85kg/cm², Air 1.05kg/cm²로 하였으며 시료 주입량은 5 μ l였다.

장치—기기는 flame ionization detector가 부착된 gas chromatograph(Shimadzu GC-R1A), mass spectrometer(Hewlett-Packard Model 59858), NMR(Varian Model FT-80A), IR(Beckmann IR 20A), UV(Unicam SP 1750) 등을 사용하였다.

실험 결과 및 고찰

이 실험에서 합성하여 사용한 고정상은 합성과정에서 mild하여 racemization의 가능성이 적었으며, 지금까지 사용되어 온 enantiomer 분리용 고정상은 주로 N-TFA peptide ester로서 적정상의 가치를 가지고 있으므로 낮은 온도에서도 conformation을 변화시켜 enantiomer분리에 필요한 diastereomeric association complex를 쉽게 형성한다고 보고하였으나, 이 실험에서 사용한 고정상은 부피가 큰 N-benzoyl基를 가지고 있으므로 공유결합 주위로 자유회전이 제한되어 적절한 diastereomeric association을 이루기 위해서는 이미 보고된 다른 고정상에 비하여 좀더 높은 온도가 필요하였으며, 150°C까지 bleeding 없이 분석이 가능하였다. 일반적으로 diamide 고정상은 두 개의 아미노산을 결합하여 조제하였으나 이 실험의 anilide고정상은 L-valine의 N-말단과 C-말단에 각각 amide 결합을 도입하였다.

특히 비교적 큰 separation factor(α)와 분석 시간이 짧은(대개 1시간 이하) 利點이 있고 아미노산 enantiomer의 유도체가 N-TFA基를 가짐으로 인해 열안정성과 휘발성을 증가시켰다.

Anilide고정상을 이용하여 아미노산을 분석한 결과 칼럼에서의 유출순서는 alanine, valine, leucine, threonine, proline, methionine 및 phenylalanine의 順이었으며 tyrosine, serine, cysteine과 tryptophan의 enantiomer는 분리되지 않았다. 대부분 아미노산의 경우 칼럼 온도가 낮아질수록 α 값이 커지나 leucine의 경우는 100°C~120°C의 온도범위에서 변화가 거의 없었고 threonine의 경우는 110°C 보다 120°C일 때, proline은 100°C 보다 110°C일 때가 더 큰 α 값을 나타내었다. Alanine은 80°C에서 가장 작은 α 값을 나타내었다(Table I). 칼럼 온도와 α 값과의 관계는 Fig. 2에 나타내었다. Alanine은 높은 온도에서도 완전한 피이크 분리를 나타내었고 threonine은 낮은 온도 범위에서 양호한 분리도를 나타내었다. α 값은 leucine, valine, alanine, proline, threonine 順으로 커지고 칼럼 유출 순서는 지금까지 보고된 다른 고정상의 경우와 동일하였다.

더 긴 칼럼 또는 capillary 칼럼을 이용하면 여러 아미노산 enantiomer의 동시분리가 가능할 것으로 예상된다.

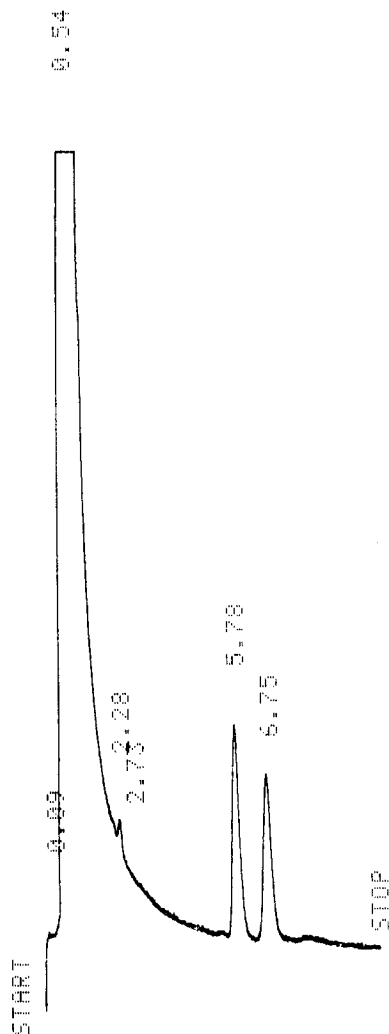


Fig. 1-Gas chromatogram of N-TFA-D, L-alanine isopropyl ester on 2% N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide(column temperature; 100°C).

Table I—Corrected retention times and separation factors for N-TFA-D, L-amino acid isopropyl esters.

amino acids	80°C		90°C		100°C		110°C		120°C		130°C		140°C	
	t_R^*	α	t_R^*	α	t_R^*	α	t_R^*	α	t_R^*	α	t_R^*	α	t_R^*	α
D-ala	23.03		11.20		5.24		2.25		1.31					
L-ala	25.74	1.118	13.32	1.189	6.21	1.185	2.96	1.161	1.49	1.137	—	—	—	—
D-val	32.59		15.04		7.39		3.60		1.85					
L-val	38.17	1.117	17.36	1.154	8.48	1.147	4.07	1.137	2.08	1.124	—	—	—	—
D-leu			24.62		11.92		5.80		2.70					
L-leu	—	—	27.56	1.120	12.72	1.064	6.17	1.064	2.87	1.063	—	—	—	—
D-thr					14.62		7.44		3.38		2.03			
L-thr	—	—	—	—	29.84	2.041	13.07	1.757	6.11	1.803	3.08	1.517	—	—
D-pro					47.67		21.64		10.50		5.09			
L-pro	—	—	—	—	61.57	1.292	28.30	1.308	13.10	1.248	6.22	1.222	—	—
D-met							48.43		23.03		10.67		5.37	
L-met	—	—	—	—	—	—	54.86	1.133	25.74	1.118	11.97	1.122	6.02	1.121

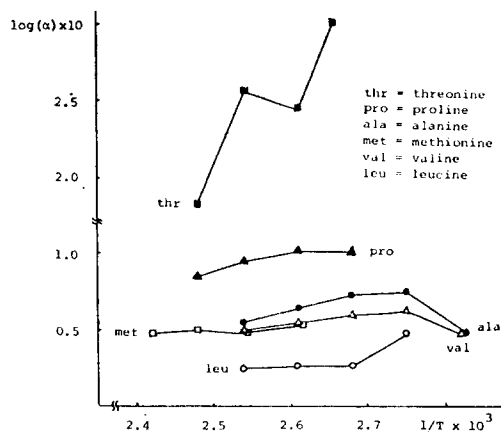


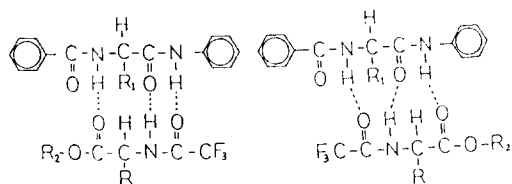
Fig. 2—Plot of the logarithm of the separation factors (α) vs. the inverse of the absolute temperature for N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters as solutes on 2% N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide as the stationary phase.

적용하였으나 방향환에 적당한 관능기를 결합하고 이를 실리카에 도입하여 HPLC에의 응용이 가능하리라 예상하고 이에 대한 연구를 계속 진행할 것이다.

결 론

1. L-Valine, benzoyl chloride 및 aniline을 이용하여 N-(N-benzoyl-L-valyl)-anilide를 높은 수율로 합성하였다.

2. 1.에서 합성한 물질을 Chromosorb W AW(80~100mesh) 담체에 被膜하여 FID를 이용한



$R_1, R_2 = -CH(CH_3)_2$

Fig. 3—Solvent-solute interaction.

광학활성 고정상에서의 enantiomer의 분리 기전은 Fig. 3에서 나타낸 것 같이 주로 고정상과 검체 사이의 수소결합에 의해 설명된다.^{15,16)} 즉, D-enantiomer와 L-enantiomer가 서로 다른 안정도를 가지고 고정상과 작용하며, t_R 과 분리도는 아미노산의 R-基, 아미노산과 고정상의 에스테르 종류 및 칼람온도에 따라 달라진다.

이 실험에서는 합성된 고정상을 80~100 mesh Chromosorb W AW에 被膜하여 GC에

가스크로마토그래피를 행한 결과 N-TFA-D,L-아미노산(alanine, valine, leucine, threonine, proline, methionine)의 이소프로필 에스테르 형태의 enantiomer를 분리할 수 있었다.

3. 아미노산 외에도 amide결합을 형성할 수 있는 화합물에서의 응용이 가능하리라 懸料된다.

4. capillary 관람을 이용하여 다수의 아미노산 enantiomer에 대한 동시분리의 가능성을 제시하였다.

문 헌

1. E. Gil-Av, R. Charles and G. Fischer, Resolution of amino acids by gas chromatography, *J. Gas Chromatogr.* **17**, 408 (1965).
2. B. Halpern and J.W. Westley, High sensitivity optical resolution of DL-amino acids by gas chromatography, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **19**, 361 (1965).
3. G.E. Pollock, H.I. Oyama and R.J. Johnson, Resolution of racemic amino acids by gas chromatography, *J. Gas Chromatogr.* **3**, 174 (1965).
4. B. Halpern and J.W. Westley, High sensitivity optical resolution of DL-amino acids by gas chromatography, *Chem. Comm.* **12**, 246 (1965).
5. J.R. Steven, V.L. Alfons, A. Robert and I.K. Robert, Gas chromatography and GC-MS analysis of diastereomeric acyclic isoprenoid esters using fused-silica capillary columns, *J. Chromatogr.* **312**, 395 (1984).
6. D. Miral and G.S. Michael, Separation of dipeptide diastereomers by high resolution GC, *J. Chromatogr.* **244**, 293 (1982).
7. N. Oi, M. Horiba and H. Kitahara, Gas chromatographic separation of amino acid amide enantiomers on optically active stationary phases, *J. Chromatogr.* **202**, 299 (1980).
8. H. Su and K. Bernauer, Quantitation of the enantiomers of hydroxy amino acids by gas chromatographic resolution on an optically active packed column, *J. Chromatogr.* **301**, 461 (1984).
9. S. Nakaparksin, P. Birrell, J. Oro and E. Gil-Av, Gas chromatography with optically active stationary phases: resolution of amino acids, *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 177 (1970).
10. W. Koenig, W. Parr, H. Lichtenstein, E. Bayer and J. Oro, Gas chromatographic separation of amino acids and their enantiomers: non polar stationary phases and a new optically active phase, *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 183 (1970).
11. E. Gil-Av, B. Feibush and R.Charles, Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase, *Tetrahedron Lett.* 1099 (1966).
12. J.A. Corbin, J.E. Rhoad and L.B. Rogers, Effects of structure of peptide stationary phases on gas chromatographic separations of amino acid enantiomers, *Anal. Chem.* **43**, 327 (1971).
13. K. Gromann and W. Parr, Solid-phase peptide synthesis on an inorganic matrix having organic groups on the surface, *Chromatographia.* **5**, 18 (1972).
14. S. Yamada, Y. Kasai and T. Shioiri, Diethyl phosphoryl cyanide. New reagent for synthesis of amides, *Tetrahedron Lett.* 1595 (1973).
15. C.H. Lochmuller and R.W. Souter, Chromatographic resolution of enantiomers: Selective review, *J. Chromatogr.* **113**, 283 (1975).
16. S.C. Chang, R. Charles and E. Gil-Av, Chiral recognition in GC by diamide-diamide solute solvent interaction, *J. Chromatogr.* **202**, 247 (1980).