

## 가스크로마토그래피에 의한 아미노산 光學異性體의 분리 II

—(S)-5-isopropyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin의 고정상으로서의 응용—

朴萬基 · 姜鍾聲 · 柳載夏 · 朴政一 · 全東源\*

서울大學校 藥學大學 · \*梨花女子大學校 家政大學

(Received January 15, 1986)

Separation of Amino Acid Enantiomers by Gas Chromatography II

—(S)-5-Isopropyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin as Stationary Phase—

Man Ki Park, Jong Seong Kang, Jae Ha Ryu, Jeong Hill Park and Dong Won Jeon

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea and

\*College of Home Economics, Ewha Woman's University, Seoul 120, Korea

**Abstract**—The enantiomers of five amino acids (alanine, valine, threonine, leucine and phenylalanine) could be separated by gas chromatography with optically active (S)-5-isopropyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoinic stationary phase, which prepared from L-valine and phenylisothiocyanate. Gas chromatographic separations on methylesterificated and N-trifluoroacetylated amino acids have been conducted in isothermal at several column temperatures (180~190, 200, 210°C). The separation factors were 1.29 (alanine, 190°C), 1.35 (valine, 190°C), 1.33 (threonine, 190°C), 1.17 (leucine, 190°C) and 1.05 (phenylalanine, 190°C) and D-isomers eluted prior to L-isomers in every instance. The result of this experiment shows that this stationary phase can be used for the separation of the other amino acids enantiomers.

자연계에서나 합성에 의해 얻어지는 아미노산은 각 광학이성질체의 함유량에 따라 그 효능이 달라질 수도 있으므로 이에 대한 분리분석의 필요성이 증대하게 되었다.<sup>1)</sup> 또한 아미노산 제제의 품질관리면에 있어서도 광학이성질체 분리분석의 중요성이 있다.

가스크로마토그래피에 의한 아미노산 광학이성질체의 분석은 사용되어지는 고정상의 종류에 따라 크게 두가지로 나눌 수 있다.<sup>2)</sup> 하나는 오래전부터 사용되어 지고 있는 방법으로, 광학적으로 비활성(非活性)인 고정상을 사용하는 것인데, 이러한 고정상으로 광학이성질체를 분석하기 위해서는 적당한 광학활성을 갖는 반응물질을 사용한 시료의 전처리과정이 필요하다.<sup>1,3-6)</sup> 즉, enantiomer를 diastereomer로 전환시켜야 한다. 하지만 이 방법은 반응에 필요한 적당한 반

응성을 갖는, 광학적으로 순수한 반응물질을 구하기 힘들 뿐 아니라, 이 반응물질의 각 광학이성질체에 따른 반응성의 차이 때문에 상당한 제약을 받는다. 또 다른 방법은 광학적으로 활성인 고정상을 사용하는 것으로, enantiomer를 diastereomer로 전환시킬 필요가 없기 때문에 전술한 방법보다는 시료의 전처리 과정이 비교적 간편하다.

Gil-Av 등<sup>7)</sup>이 처음으로 광학활성을 갖는 고정상을 사용한 가스크로마토그래피로 아미노산 광학이성질체의 분리분석에 성공한 이후 광학활성을 갖는 여러가지 종류의 고정상에 대한 활발한 연구<sup>8-11)</sup>가 이루어졌지만 대부분의 고정상이 합성과정이 힘들고, 사용성도 특별한 화합물에만 제한되어 있어서 일반적으로 사용되어지기는 어려운 실정이다.

저자들은 L-valine과 phenylisothiocyanate로부터 쉽게 합성되어진 (S)-5-isopropyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin ((S)-IPTH) 을 고정상으로 한 가스크로마토그래피로 아미노산 광학이성질체를 분석하려는 시도를 했으며, 계속적인 연구로<sup>12)</sup> 아미노산 뿐만아니라 다른 화합물의 광학이성질체에 이 고정상의 적용여부를 검토 중이다.

### 실 험 방 법

기기 및 시약—Phenylisothiocyanate(和光, 일본), DL-및 L-alanine, DL-및 L-valine, DL-및 L-phenylalanine, DL-및 L-leucine, DL-및 L-threonine 표준품 (Sigma), trifluoroacetic anhydride(東京化成), 이소프로판올, 메탄올, 클로로포름은 모두 특급품을 사용하였다.

기기로는 flame ionization detector (FID)가 부착된 가스크로마토그래프 (Shimadzu GC-R1A), GC processor (Shimadzu RPR-G1), GC/MS (Hewlett-Packard Model 5985B), NMR (Varian Model FT-80A), IR (Beckmann IR 20A), UV (Unicam SP 1750), 자동기록 스펙트로폴라리메타 (Jasco J-20), 폴라리메타 (Rudolph Autopol-III-589) 및 용점 측정 장치 (Gallenkamp) 등을 사용하였다.

광학활성 고정상의 제조<sup>13)</sup>—L-valine을 10% NaOH용액에 용해시켜 phenylisothiocyanate를 가하고 50°C에서 3시간 동안 환류 시킨 후, 5% HCl로 중화시켜 침전을 얻었다. 이 침전을 묽은 염산으로 잘 세척한 후 물, 메탄올용액에서 재 침전시켰다. IR, NMR, Mass 스펙트럼에 의해 이 물질을 (S)-5-isopropyl-N<sup>3</sup>-phenyl-2-thiohydantoin ((S)-IPTH)임을 동정하였다.

UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm ; 270

IR  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup> ; 1760 (C=O)

NMR(CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  ; 1.10(6H, dd,  $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \rangle \text{C}$ ,

4.30 (1H, d,  $\begin{matrix} \text{H} \\ \text{CH} \end{matrix} \rangle$ )

MS(m/e) ; 234(M<sup>+</sup>)

$[\alpha]_D^{25}$  ; -34° (MeOH)

mp ; 207~208°

충전제(充填劑)—(S)-IPTH를 메탄올에 녹이고 감압하에서 Chromosorb WAW(80~100mesh)에 2%되게 피막(coating) 시켰다. 이 충전 물질을 3.2mm i.d.×2.1m의 코일형 유리제 칼람에 충전시킨 후, 질소가스 유속 10ml/min, 칼람 온도 230°C에서 24시간 전처리하였다.

시료의 전처리<sup>14)</sup>—3N 염산-이소프로판올 용액에 5종의 DL- 및 L- 아미노산 표준품을 각각 녹이고, 80°C에서 2시간 가운 후 질소 가스를 통해 주면서 이소프로판올과 염산을 구축시켜 DL-및 L-aminoacid isopropyl ester를 제조했다. 여기에 trifluoroacetic anhydride를 넣고 실온에서 2시간 방치 후 역시 질소가스를 통해 주면서 과잉의 시약과 용매를 제거하여 N-trifluoroacetyl-DL-및 L-aminoacid isopropyl ester를 제조했다. 이것을 클로로포름에 용해시켜 가스크로마토그래프용 시료로 하였다.

GC 분석 조건—검출기는 FID를 사용하였으며 질소 50ml/min, 수소 0.85kg/cm<sup>2</sup>, 공기 1.05kg/cm<sup>2</sup>의 조건에서 검출기의 온도는 300°C로 하였다. 시료주입기의 온도는 250°C로 하였고, 칼람은 분리계수를 결정하기 위하여 180°C, 190°C, 200°C, 210°C(alanine, valine, threonine의 경우) 190°C, 200°C, 210°C(leucine, phenylalanine의 경우)에서 각각 항온으로 사용되었다.

### 실험결과 및 고찰

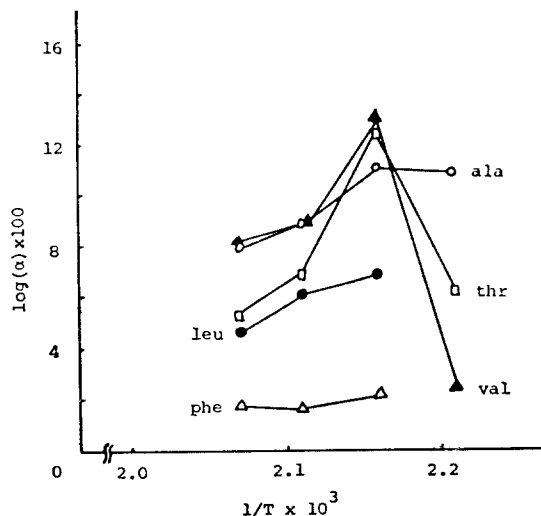
DL- 및 L-아미노산 유도체를 2% (S)-IPTH 칼람으로 분석한 후 칼람온도에 따른 유지시간(維持時間;  $t_R$ )과 D-및 L-체간의 분리계수( $\alpha$ )를 Table I에 표시하였다. 이때 각 enantiomer의 동정은 시료의 전처리 과정에서의 DL-아미노산 표준품과 L-아미노산 표준품의 유도체에 해당하는 피크를 서로 대조하여 행하였다. alanine, valine, threonine의 광학이성질체는 180°C~210°C 사이에서, leucine, phenylalanine의 광학이성질체는 190°C~210°C 사이에서 분리

**Table I**-Retention times and separation factors for the N-TFA-D, L-amino acid isopropyl esters on (S)-IPTH as stationary phase (detector temp.: 300°C, injection port temp.: 250°C, carrier gas N<sub>2</sub>: 50ml/min.).

amino acids	180°C		190°C		200°C		210°C	
	t <sub>R</sub>	α	t <sub>R</sub>	α	t <sub>R</sub>	α	t <sub>R</sub>	α
D-ala	8.02		6.81		3.37		1.68	
L-ala	10.01	1.27	8.60	1.29	4.01	1.23	1.76	1.20
D-val	7.13		6.36		3.32		1.80	
L-val	7.55	1.06	8.40	1.35	3.96	1.23	2.06	1.21
D-thr	7.69		6.61		4.01		1.98	
L-thr	7.79	1.15	8.62	1.33	4.60	1.17	2.12	1.13
D-leu	—		3.09		1.99		1.33	
L-leu	—		3.51	1.17	2.21	1.15	1.42	1.11
D-phe	—		9.48		5.90		3.40	
L-phe	—		9.92	1.05	6.11	1.04	3.51	1.04

가 가능하였다.

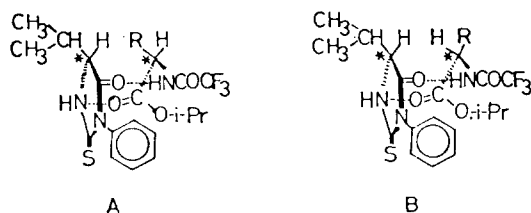
각 절대온도의 역수치에 대한 시료의 분리계수의 대수치를 Fig. 1에 표시하였다. 200°C~210°C사이에서는 alanine과 valine, 190°C 근처에서는 alanine, valine, threonine의 광학이성질체의 분리계수가 leucine, phenylalanine의 광학이성질체의 분리계수에 비해 상대적으로 높게 나타났다. 칼람온도가 낮을수록 분리계수가 다소 증가하나, 180°C 근처에서 threonine, valine



**Fig. 1**-Plot of the logarithm of the separation factor vs. the inverse of the absolute temperature for N-TFA-D, L-amino acid isopropyl esters. ala=alanine, thr=threonine, leu=leucine, val=valine, phe=phenylalanine

광학이성질체의 분리계수는 급격히 감소하였다. phenylalanine 광학이성질체의 분리계수는 190°C~210°C 사이에서 다른 아미노산 광학이성질체의 분리계수보다 상대적으로 낮았으며 양호한 분리를 보이지않았다. 이상으로 미루어 보아 alanine, threonine, leucine, valine, phenylalanine 등의 5종 아미노산 광학이성질체의 분리시에는 분리계수, 칼람의 수명등을 고려하여, 칼람온도를 190°C근처로 하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

Lochmuller등<sup>15)</sup>은 광학활성 고정상에서의 enantiomer의 분리기전을 주로 고정상과 검체 사이의 수소결합에 의한다고 설명하였다. Fig. 2의 A는 고정상 (S)와 검체 (D)의 분리기전을 나타낸 것인데, 고정상과 검체의 서로 다른 두 부분에서 수소결합을 형성하고 있으며, 고정상의 이소프로필기와 검체의 알킬기가 같은 방향으로 향하고 있다. 그러나 B의 고정상 (S)와 검체 (L)의 분리기전에서는 고정상의 이소프로필기와 검체의 알킬기가 서로 반대방향으로 향하고 있어, 고정상 S와 검체 D보다 고정상 S와 검체



**Fig. 2**-Solvent-solute interaction model.

L이 안정한 수소결합을 이룰 수 있을 것이라 예측된다. 그 결과로 D-가 L-체보다 먼저 유출될 것이며 이것은 실험결과와도 잘 일치한다.

### 결 론

1. 2% (S)-IPTH 고정상으로 5종의 아미노산 광학이성질체를 분리분석할 수 있었다. 컬럼 온도 190°C에서 각 아미노산 광학이성질체의 분리계수는 alanine 1.29, valine 1.35, threonine 1.33, leucine 1.17, phenylalanine 1.05였다.

2. 5종 아미노산의 경우 D-체가 L-체보다 먼저 유출되었으며, 이 이유는 구조상으로 L-체가 D-체보다 광학활성 고정상인 (S)-IPTH에 대하여 안정한 수소 결합을 형성하기 때문일 것이라고 예상된다.

### 문 헌

- 1) Iwase, H., and Murai, A.: Resolution of racemic amino acids by gas chromatography: N-TFA-L-propyl derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 8 (1974).
- 2) Liu, R.H., and Ku, W.W.: Chiral stationary phases for the GLC separation of enantiomers. *J. Chromatogr.* **271**, 309 (1983).
- 3) Karger, L., Halpern, E., and Westley, J.W.: Gas liquid chromatographic separation of diastereomeric amides of racemic cyclic amines. *Anal. Chem.* **39**, 228 (1967).
- 4) Bonner, W.A., Van Dort, M.A., and Flores, : Quantitative gas chromatographic analysis of leucine enantiomers. *Anal. Chem.* **46**, 2104 (1974).
- 5) Dabrowiak, I.C., and Cooke, D.W.: Gas liquid chromatography of the optical isomers of threonine and allothreonine. *Anal. Chem.* **43**, 791 (1971).
- 6) Bonner, W.A.: The adaptation of diastereomeric S-poryl dipeptide derivatives to the quantitative estimation of R-and S-leucine enantiomers. *J. Chromatogr. Sci.* **10**, 159 (1972).
- 7) Gil-Av, E., Feibush B., and Charles-Sigler, R.: Separation of enantiomers by gas chromatography with an optically active stationary phase. *Tetrahedron Lett.* **10**, 1009 (1966).
- 8) Frank, H., Nicholson, G.J., and Bayer, E.: Rapid gas chromatographic separation of amino acid enantiomers with novel chiral stationary phases. *J. Chromatogr. Sci.* **15**, 174 (1977).
- 9) Patr, W., Pleterski, J., Yang, C., and Bayer, E.: Resolution of racemic amino acid by gas chromatography on optically active stationary phases. *J. Chromatogr. Sci.* **9**, 141 (1971).
- 10) Oi, N., Horiba, M., Kitahara, H., and Shimada, H.: Gas chromatographic separation of enantiomers of some dipeptides on an optically active stationary phases. *J. Chromatogr.* **202**, 302 (1980).
- 11) Oi, N., Horiba, M., and Kitahara, H.: Gas chromatographic separation of amino acid amide enantiomers on optically active stationary phases. *J. Chromatogr.* **202**, 299 (1980).
- 12) 朴萬基, 柳載夏, 姜鍾聲, 藥學會誌, **29**, 375 (1985).
- 13) Knapp, D.R.: *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, Wiley-Interscience Publication, pp.274, (1979).
- 14) Parr, W., and Howard, P.Y.: Structural effects of selected dipetides as stationary phases for the chromatographic separation of enantiomeric amino acids. *Anal. Chem.* **45**, 711 (1973).
- 15) Lochmuller, C.H., and Souter, R.W.: Chromatographic resolution of enantiomers: Selective review. *J. Chromatogr.* **113**, 283 (1975).