

아미노산 Phenylthiohydantoin 유도체를 키랄 고정상으로 한 GC에 의한 아미노산 광학 이성질체의 상호분리

박단기 · 양정선 · 고창범 · 이미영

서울대학교 약학대학

(Received June 2, 1988)

Separation of Amino Acid Enantiomers by Gas Chromatography on Phenylthiohydantoin Derivatives as Chiral Stationary Phases

Manki Park, Jeongseen Yang, Changbum Ko and Miyung Lee

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

Abstract—The resolution of five amino acids derivatives by gas chromatography on phenylthiohydantoin derivatives as chiral stationary phase was investigated. (S)-5-isopropyl, isobutyl, (sec)-butyl and benzoyl derivatives of N³-phenyl-2-thiohydantoin were synthesized from L-valine, L-leucine, L-isoleucine and L-phenylalanine, respectively. The phases were employed at several column temperatures (140°C~210°C). The separation factors were compared with each stationary phase with varying R groups. The possible mechanism of chiral recognition was investigated by NMR technique.

저자 등은 이미 L-valine 및 L-leucine을 모체로 하여, 합성 과정이 간단하고 열안정성이 높은 phenylthiohydantoin계 고정상의 하나인 (S)-5-isobutyl-N³-phenyl-2-thiohydantoin의 광학 활성 고정상으로서의 응용을 보고한 바 있다^{1,2)}. 광학 활성 고정상에서의 광학 순도 결정은 그 정확성과 빠르기, 시료의 소요량면에서 특히 우수한 분석 방법이며, 키랄 유도체 시약을 사용하는 간접 분리 방법에 비해 간편한 방법으로 알려져 왔다³⁻⁵⁾. 광학 활성 고정상의 GC에의 응용은 열안정성이 가장 큰 문제로, 대부분의 광학 활성 고정상이 열안정성이 낮아 휘발성이 높은 화합물에 제한되어 사용되어졌다⁶⁻⁸⁾. 저자 등은 L-아미노산 유도체를 모체로 하여 시료와 수소결합을 형성하기 위해 필요한 amide결합을 가지며 열안정성을 높일 수 있는 함유량 amide계열의 phenylthiohydantoin계 유도체들을 합성하여 R group 변화에 따른 아미노산 광학 활성 이성질체의 분리도 α 값의 변화를 조사하였다. 또한 저자 등은 농도변화에 따른 고정상의 thioamide NH수소의 induced shift 정도를 NMR로

측정하고 키랄성 인지의 기전을 조사하였다.

실험 방법

기기 및 시약—Phenylisothiocyanate(Sigma사), 중클로로포름(Sigma사), D,L 및 L-아미노산 표준품(Merk사), trifluoroacetic anhydride(Sigma사), 이소프로판올, 메탄올, 클로로포름 등은 모두 특급품을 사용하였다. Flame ionization detector (FID)가 부착된 가스크로마토그래피(Shimadzu RPR-F1), GC/MS(Hewlett-Packard Model 5985B), NMR(Bruker FT-80MHz), IR(Perkin Elmer FT 1710) 및 용접 측정 장치(Gallen Kamp) 등을 사용하였다.

광학 활성 고정상의 제조—0.1mole L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-phenylalanine으로부터 저자 등이 이미 보고한 바와 같은 방법⁷⁾으로 이들 각 아미노산의 R-group으로 치환된 N³-phenyl-2-thiohydantoin 유도체들을 얻어 IR, NMR, Mass 스펙트럼으로 동정하였다.

(S)-5-isopropyl-N³-phenyl-2-thiohydantoin:

IR(cm^{-1})	; 3180(N-H), 1760(C=O)
NMR(CDCl_3); δ 1.09(d, 6H, $-(\text{CH}_3)_2$) (J=7.12)	
δ 2.35(m, 1H, *C-CH) *C; chiral carbon	
δ 4.17(d, 1H, C-H) (J=3.8)	
MS(m/z)	; 234(M^+)
mp	; 207~208°C
(S)-5-isobutyl- N^3 -phenyl-2-thiohydantoin:	
IR(cm^{-1})	; 3180(N-H), 1765(C=O)
NMR(CDCl_3); δ 1.07(d, 6H, $-(\text{CH}_3)_2$) (J=6.8)	
δ 1.77(q, 2H, *C- CH_2) *C; chiral carbon	
δ 1.89(m, 1H, *C-C-CH)	
δ 4.29(sixtet, 1H, *C-H)	
MS(m/z)	; 248(M^+)
mp	; 154°C
(S)-5-(sec)-butyl- N^3 -phenyl-2-thiohydantoin:	
IR(cm^{-1})	; 3200(N-H), 1760(C=O)
NMR(CDCl_3); δ 0.88(t, 3H, $-\text{CH}_3$)	
δ 1.07(d, 3H, *C-C- CH_3) (J=6.8) *C; chiral carbon	
δ 1.71(m, 2H, *C-C- CH_2)	
δ 2.18(m, 1H, *C-CH)	
δ 4.28(q, 1H, *C-H)	
MS(m/z)	; 248(M^+)
mp	; 167°C
(S)-5-benzoyl- N^3 -phenyl-2-thiohydantoin:	
IR(cm^{-1})	; 3180(N-H), 1760(C=O)
NMR(CDCl_3); δ 3.30(m, 2H, *C- CH_2) *C; chiral carbon	
δ 4.57(q, 1H, *C-CH)	
δ 7.17(m, 5H, $-\phi$)	
MS(m/z)	; 282(M^+)
mp	; 175°C

칼람의 준비: 합성된 고정상을 메탄올에 녹이고 Chromosorb WAW (80~100mesh)에 2%(w/w)되게 피막시켰다. 이 층진 물질을 3.2mm i.d. \times 2.1m의 코일형 유리제 칼람에 충전시킨 후 유속 30ml/min(질소 가스), 칼람 온도 200°C에서

24시간 전처리하였다.

시료의 전처리—3N 염산-이소프로판올 용액에 5종의 D, L- 및 L-아미노산 표준품을 각각 녹이고 60°C에서 3시간 가온후 감압하에서 이소프로판올과 염산을 구축시켜 D, L- 및 L-아미노산 이소프로판올 에스테르를 제조했다. 여기에 trifluoroacetic anhydride를 넣고 실온에서 1시간 방치후 감압하에서 과잉의 시약을 구축시킨 후 클로로포름에 녹여 가스크로마토그래피용 시료로 하였다.

가스크로마토그래피 분석 조건—검출기는 불꽃 이온화 검출기(FID)를 사용하였으며 질소 유속 35ml/min, 시료 주입기의 온도는 250°C의 조건에서, 칼람 온도는 대상 아미노산에 따라 170°C~250°C 범위에서 항온으로 하고 실험하였다.

NMR에 의한 고정상과 시료의 분자간 결합 확인—키랄 고정상의 농도를 증클로로포름 100 mM 용액으로 일정하게 유지하고 N-TFA-L-Ala-isopropyl ester를 첨가하여 각 0, 4, 8, 12, 16, 20mM로 하였다. 각 농도의 시료를 NMR로 측정하여 키랄 고정상의 thioactamide 수소의 induced shift값을 관찰하였다.

실험결과 및 고찰

광학 활성 고정상의 GC에의 적용은 열안정성이 가장 큰 문제로 대두되어 왔다. 최초로 개발된 광학 활성 고정상은 열안정성이 낮아 휘발성 시료에서는 우수한 분리능을 나타내나, 휘발성이 낮은 시료에는 적용이 어려우며 칼람의 수명 및 재현성에 문제점이 있었다^{7,8)}.

저자 등은 키랄성 인지에 필요한 수소 결합 다리를 가지며 열안정성이 높은 함유량 amide 고정상을 L-아미노산을 모체로 합성하였다⁹⁾. 합성 과정은 매우 mild하여 racemization의 가능성이 매우 적었으며, 실험실적으로 쉽게 합성이 가능하였다. 아미노산 광학 이성질체 유도체들은 N-TFA기를 도입하여 열안정성과 휘발성을 증가시켰으며 이소프로필 에스테르화하여 공간 입체성을 부과하였다. 이들 아미노산 광학 이성

Table I—Gas chromatographic separation of N-TFA-D, L-amino acid isopropyl esters on (S)-5-isopropyl-N³-phenyl-2-thiohydantoin as chiral stationary phase.

Amino acid	180°C		190°C		200°C		210°C		
	t_R	α	t_R	α	t_R	α	t_R	α	
Ala	D	8.02	1.27	6.81	1.29	3.37	1.23	1.68	1.20
	L	10.01		8.60		4.01		1.76	
Val	D	7.13	1.06	6.36	1.35	3.32	1.23	1.80	1.21
	L	7.55		8.40		3.96		2.06	
Thr	D	7.69	1.15	6.61	1.33	4.01	1.17	1.98	1.13
	L	7.79		8.62		4.60		2.12	
Leu	D	—		3.09	1.17	1.99	1.15	1.33	1.11
	L			3.51		2.21		1.42	
Phe	D	—		9.48	1.05	5.90	1.04	3.40	1.04
	L			9.92		6.11		3.51	

Table II—Gas chromatographic separation of N-TFA-D, L-amino acid isopropyl esters on (S)-5-isobutyl-N³-phenyl 2-thiohydantoin as chiral stationary phase.

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

Table III—Gas chromatographic separation of N-TFA-D, L-amino acid isopropyl esters on (S)-5(sec)-butyl-N³-phenyl-2-thiohydantoin as chiral stationary phase.

Amino acid	170°C		180°C		190°C		200°C		
	t_R	α	t_R	α	t_R	α	t_R	α	
Ala	D	2.72	1.42	1.63	1.89	0.89	1.37	0.48	1.31
	L	3.87		2.26		1.22		0.63	
Ile	D	6.23	1.40	3.36	1.44	1.86	1.40	0.92	1.40
	L	8.71		4.84		2.61		1.29	
Leu	D	6.20	1.37	3.84	1.35	2.21	1.32	0.91	1.41
	L	8.50		5.18		2.92		1.28	
Val	D	5.66	1.15	3.19	1.13	1.85	1.12	0.70	1.14
	L	6.50		3.60		2.08		0.08	

질체 유도체들을 각 L-아미노산 유도체들을 모체로 한 thiohydantoin계 광학 활성 고정상으로 분리한 후, 칼럼 온도에 따른 retention time(t_R)

과 D- 및 L-체간의 분리계수($\alpha_{D/L}$)를 Table I-IV에 표시하였다. 분리가 가능한 사용 온도 범위는 isopropyl 유도체의 경우 180~210°C, iso-

Table IV—Gas chromatographic separation of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters on (S)-5-benzoyl-N³-phenyl-2-thiohydantoin as chiral stationary phase.

Amino acid	170°C		180°C		190°C		200°C		
	t_R	α	t_R	α	t_R	α	t_R	α	
Ala	D	1.78	1.19	1.16	1.17	0.93	1.22	0.85	1.19
	L	2.11		1.36		1.13		1.01	
Ile	D	3.49	1.12	2.61	1.15	1.66	1.22	1.16	1.23
	L	3.92		3.01		2.02		1.43	
Leu	D	3.80	1.11	2.21	1.09	1.51	1.16	1.27	1.12
	L	4.20		2.44		1.75		1.42	
Val	D	3.16	1.08	2.05	1.09	1.35	1.22	0.88	1.45
	L	3.41		2.24		1.65		1.28	

Table V—Gas chromatographic separation of N-TFA-D,L-amino acid isopropyl esters on some thiohydantoin derivatives as chiral stationary phase.

Temp.	R group*	Separation factor (α)				
		Ala	Ile	Leu	Val	Phe
170°C	Isopropyl	—	—	—	—	—
	Isobutyl	1.33	1.41	1.22	1.14	1.24
	Butyl	1.42	1.40	1.37	1.15	—
	Benzoyl	1.19	1.12	1.11	1.08	—
180°C	Isopropyl	1.27	—	—	1.06	—
	Isobutyl	1.32	1.42	1.24	—	1.20
	Butyl	1.89	1.44	1.35	1.13	—
	Benzoyl	1.17	1.15	1.09	1.09	—
190°C	Isopropyl	1.29	—	1.17	1.35	1.05
	Isobutyl	1.30	1.40	1.36	—	1.19
	Butyl	1.37	1.40	1.32	1.12	—
	Benzoyl	1.22	1.22	1.16	1.22	—
200°C	isopropyl	1.23	—	1.15	1.23	1.04
	Isobutyl	—	—	—	—	1.17
	Butyl	1.31	1.40	1.41	1.14	—
	Benzoyl	1.19	1.23	1.12	1.45	—

* (S)-5-R-N³-phenyl-2-thiohydantoin derivatives synthesized from L-valine, L-leucine, L-isoleucine and L-phenylalanine, respectively.

propyl 유도체의 경우 140~200°C, (sec)-butyl 유도체와 benzoyl 유도체의 경우 170~200°C로 이미 보고된 다른 고정상에 비하여 열안정성이 매우 우수하였다. 또한 비교적 큰 분리계수를 가졌으며, 분석시간이 짧은 장점이 있었다.

각 광학 이성질체의 동정은 시료의 전개 과정에서 D, L-아미노산 표준품과 L-아미노산 표

준품의 유도체에 해당하는 피크를 서로 대조하여 해석하였다. Table V는 각각 L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-phenylalanine을 모체로 하여 합성한 광학 활성 고정상의 R group에 따른 분리도를 나타낸 것이다. 5가지 아미노산에 대한 분리도를 비교하면, R group의 공간 입체성이 증가할수록 분리도가 증가하여 (S)-iso-

Table VI—Effects of the concentrations of N-TFA-L-Ala isopropyl ester on the spectra of some thiohydantoin derivatives NH proton in deuteriochloroform, keeping the concentration of thiohydantoin derivatives constant at 100mM

Conc. of Ala-der. (mM)	Chemical shift of thiohydantoin derivatives* NH proton(ppm)		
	Isopropyl	Isobutyl	Butyl
0	8.01	8.01	8.02
4	8.13	8.15	8.19
8	8.19	8.21	8.19
12	8.20	8.21	8.21
16	8.23	8.26	8.25
20	8.24	8.27	8.25
K _c **	0.172	0.201	0.213

* (S)-5-R-N³-phenyl-2-thiohydantoin derivatives synthesized from L-valine, L-leucine and L-isoleucine, respectively.

** K_c is the association constant calculated from mentioned equation.

propyl기보다는 (S)-isobutyl기가, (S)-isobutyl기보다는 (S)-(sec)-butyl기의 분리도가 증가하였다. 그러나 공간의 ring effect를 부여하기 위해 도입한 (S)-benzoyl 치환체의 경우, 오히려 분리도가 낮아지는 경향을 보였다. 또한 D, L-phenylalanine의 경우 (sec)-butyl 치환체에서는 분리되지 않았으나 (S)-isopropyl, (S)-isobutyl 치환체에서 잘 분리되었다.

키랄성 인지의 기전을 규명하기 위해 Table VI에 광학 활성 고정상의 농도를 100mM로 일정하게 한 뒤 N-TFA-L-alanine isopropyl ester의 농도를 각 0, 4, 8, 12, 16, 20mM로 증가시켜 고정상의 thioamide 수소의 induced shift 값을 조사하였다. 합성된 광학 활성 고정상과 광학 활성 성질체간의 분리는 “three point interaction”의 개념에 의해서 설명이 가능하다¹⁰⁾. 즉, 광학 활성 고정상이 키랄성을 인지하기 위해서는 한쌍의 서로 거울상인 광학 이성질체중 적어도 어느 한 이성질체와 동시에 최소한 세 곳에서 상호 작용이 있어야 한다. 이때 분자간 상호 작용은 수소 결합, 전하 이동 상호 작용, 정전

기적 상호 작용, 쌍극자—쌍극자 상호작용, 입체 장애에 의한 상호 작용, 친수성 혹은 친지질성 상호 작용 등 모든 상호작용이 키랄성 인지에 사용된다.

Table VI에서 L-alanine 유도체의 농도가 증가할수록 8.0ppm 근처의 thioamide NH의 chemical shift가 저자장으로 이동하고 있는 것을 나타냈다. 이는 thioamide NH와 L-alanine 유도체의 carbonyl기가 수소 결합에 참여하고 있음을 의미한다.

W. Hanna 등의 식¹¹⁾에 의하면 2분자간 수소 결합의 결합 정수는 다음 식에 의해 구할 수 있다.

$$\frac{1}{\Delta\delta_{\text{obs}}} = \frac{1}{K_c(\delta_c - \delta_a)} \times \frac{1}{C_b} + \frac{1}{(\delta_c - \delta_a)}$$

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

δ_a ; chemical shift of uncomplexed form

δ_c ; chemical shift of given conc. of analyte

C_b ; concentration of analyte

K_c ; association constant

최소 자승법에 의해 구한 결합 정수는 각각 (S)-isopropyl 유도체의 경우 0.172, (S)-isobutyl 유도체의 경우 0.201, (S)-(sec)-butyl 유도체의 경우 0.213이었다. (S)-benzoyl 유도체의 경우 7.0ppm~8.0ppm 사이의 aromatic proton의 피크에 묻혀 thioamide의 NH 피크를 확인할 수 없었다. 상대적으로 비교적 분리도가 좋은 (S)-(sec)-butyl 유도체의 경우가 (S)-isopropyl 유도체나 (S)-isobutyl 유도체의 경우보다 비교

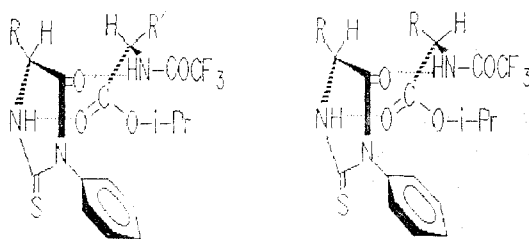


Fig. 1—Interaction model between chiral stationary phases and amino acid enantiomers.

적 큰 결합 정수 값을 보였다.

Fig 1에 광학 활성 고정상과 아미노산 광학 이성질체간의 interaction model을 나타냈다. "Three point interaction"의 개념에 의한 고정상과 시료의 키랄성 인지의 상호 작용은 1) 광학 활성 고정상의 thioamide, NH와 시료의 carbonyl기간의 수소 결합, 2) 광학 활성 고정상의 환내 carbonyl기와 시료의 amide NH간의 수소 결합, 3) 광학 활성 고정상의 bulky alkyl group과 시료의 alkyl group간의 입체장애에 의한 상호 작용으로 나타낼 수 있다.

키랄성 인지는 광학 활성 고정상과 서로 거울 쌍인 한쌍의 광학 이성질체가 상호 작용하여 일시적으로 생기는 부분 입체 이성질 착물의 안정성 차이에 의해 분리가 이루어진다. 광학 활성 고정상과 (L)-isomer의 경우 고정상의 bulky group과 검체의 alkyl기가 서로 같은 방향으로 향하고 있어 공간적으로 입체장애를 받으므로 불안정한 결합을 이루게 된다. 이 경우, (S)-(L)-isomer의 경우가 (S)-(D)-isomer의 경우보다 안정한 부분 입체 착물을 형성하게 되며, 따라서 (D)-isomer가 (L)-isomer보다 먼저 유출될 것이며 이것은 실험결과와도 잘 일치하고 있다.

결 론

L-valine, L-leucine, L-isoleucine, L-phenylalanine을 모체로 열안정성이 높은 phenylthiohydantion계 광학 활성 고정상을 합성하였다. 이들 고정상에 nonpolar group의 아미노산 이성질체들을 적용하여 분리도를 비교하였다. 사용 가능 온도는 140°C~210°C 범위로 열안정성이 매우 우수하였으며, 분리도는 고정상의 R group의 공간 입체성이 큰 (S)-(sec)-butyl>(S)-isobutyl>(S)-isopropyl 유도체의 순이었으며 공간의 ring effect를 부여하기 위해 도입한 (S)-benzoyl 유도체의 경우 오히려 α 값이 감소하였다. 키랄성 인지의 기전은 광학 활성 고정상과 시료의 2군데의 수소 결합과, 입체 장애에 의한 상호 작용이었으며 광학 활성 고정상과 시료와

의 결합 정수는 (S)-(sec)-butyl>(S)-isobutyl>(S)-isopropyl 유도체의 순으로 각각 0.213, 0.201, 0.172였다.

합성된 광학 활성 고정상의 아미노산 외에도 amide결합을 형성할 수 있는 화합물에의 응용이 가능하리라 생각되며 capillary 칼럼에 적용하면 열안정성과 분리도를 더욱 증진시켜 다수의 아미노산 광학 이성질체의 동시 분리의 가능성을 제시하였다.

문 헌

- 1) M.K. Park, J.S. Kang, J.H. Ryu, J.H. Park and D.W. Jeon, Separation of amino acid enantiomers by gas chromatography (II), *Yakhak Hoeji* 30, 47 (1986).
- 2) M.K. Park, J.S. Yang and C.B. Ko, Separation of amino acid enantiomers by gas chromatography (III), *Yakhak Hoeji* 32, 112 (1988).
- 3) R.H. Lie and W.W. Ku, Chiral stationary phases for the GLC separation of enantiomers, *J. Chromatogr.* 271, 309 (1983).
- 4) W.A. Bonner, M.A. Van Dort and Flores, Quantitative gas chromatographic analysis of leucine enantiomers, *Anal. Chem.* 46, 2104 (1974).
- 5) W.A. Bonner, The adaptation of diastereomeric Soporyl dipeptide derivatives to the quantitative estimation of R- and S-leucine enantiomers, *J. Chromatogr. Sci.* 10, 159 (1972).
- 6) N. Oi, M. Horiba and H. Kitahara, Gas chromatographic separation of amino acid amide enantiomers on an optically active stationary phase, *J. Chromatogr.* 202, 299 (1980).
- 7) E.B. Gil-Av and R. Charles, Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase, *Tetrahedron Lett.*, 1099 (1966).
- 8) C.H. Lochmuller and R.W. Souter, Chromatographic resolution of enantiomers: Selective review, *J. Chromatogr.* 113, 283 (1975).
- 9) D.R. Knapp, Handbook of analytical derivatization reactions, A Wiley-Intersci. Pub. New

- York, p. 274 (1979).
- 10) W. Pirkle, M.H. Hyun and B. Bank, A rational approach to the design of highly effective chiral stationary phase, *J. Chromatogr.* **316**, 585 (1984).
- 11) M.W. Hanna and A.L. Ashbaugh, Nuclear magnetic rasonance study of molecular complexes of 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane and aromatic donors, *J. Physical Chem.* **68**, 811 (1964).