[UCI]I804:24011-200000232695

*2006*年 *2*月

碩士學位論文

*HPLC*를 이용한 라세미 *N*-벤질옥시카르보닐 α-아미노산과 그 에틸에스터 유도체의 광학분할

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

藥 學 科

裵 秀 暻

*HPLC*를 이용한 라세미 *N*-벤질옥시카르보닐 α-아미노산과 그들의 에틸에스터 유도체의 광학분할

Enantiomer Resolution of N-Benzyloxycarbonyl α-Amino Acids and Their Ethyl Esters by HPLC

2006 年 *2* 月 日

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

裵 秀 暻

*HPLC*를 이용한 라세미 *N*-벤질옥시카르보닐 α-아미노산과 그들의 에틸에스터 유도체의 광학분할

指導敎授　李　元　宰

이 論文을 藥學 碩士學位申請 論文으로 提出함.

2005 年　*10* 月　　日

朝鮮大學校 大學院

藥 學 科

裵　秀　暻

裵秀暻의 碩士學位論文을 認准함

委員長　　朝鮮大學校 敎　授　　白 采 善　　印

委　員　　朝鮮大學校 敎　授　　洪 俊 憙　　印

委　員　　朝鮮大學校 敎　授　　李 元 宰　　印

2005 年　*11* 月　　日

朝鮮大學校 大學院

目　　次

Abstract

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 실험방법 ····· 8

1. 시료 및 시약 ····· 8

2. 실험기기 ····· 8

3. N-벤질옥시카르보닐 α－아미노산의 합성 ····· 9

4. N-벤질옥시카르보닐 α- 아미노 에틸에스터의 합성 ····· 10

Ⅲ. 실험결과 및 고찰 ····· 12

Ⅳ. 결론 ····· 32

Ⅴ. 참고 문헌 ····· 33

LIST OF TABLES

Table 1. Effect of Mobile Phase on the enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids on Chiralpak IA ····· 13

Table 2. Effect of Mobile Phase on the enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids on Chiralpak IB ····· 16

Table 3. Effect of Mobile Phase on the enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids Ethyl Ester on Chiralpak IA ····· 19

Table 4. Effect of Mobile Phase on the enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids Ethyl Ester on Chiralpak IB ····· 23

Table 5. Comparison of direct enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids on Chiralpak AD and Chiralpak IA ····· 27

Table 6. Comparison of direct enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids Ethyl Ester on Chiralpak AD and Chiralpak IA ····· 28

Table 7. Comparison of direct enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids on Chiralcel OD and Chiralpak IB ····· 29

Table 8. Comparison of direct enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids Ethyl Ester on Chiralcel OD and Chiralpak IB ····· 30

LIST OF FIGURES

Figure 1 Structures of α-amino acids ····· 6

Figure 2 Structures of Chiralpak IA, Chiralpak AD, Chiralpak IB and Chiralcel OD ····· 7

Figure 3 Chromatograms of enantiomer separation of N-CBZ-α-amino acids on Chiralpak IA ····· 14

Figure 4 Chromatograms of enantiomer separation of N-CBZ-α-amino acids on Chiralpak IB ····· 17

Figure 5 Chromatograms of enantiomer separation of N-CBZ-α-amino acids Ethyl Ester on Chiralpak IA ····· 21

Figure 6 Chromatograms of enantiomer separation of N-CBZ-α-amino acids Ethyl Ester on Chiralpak IB ····· 25

ABSTRACT

Enantiomer Resolution of N-Benzyloxycarbonyl α-Amino Acids and Their Ethyl Esters by HPLC

Bae, Su Kyoung

Advisor : Prof. Wonjae Lee, Ph. D.

Department of Pharmacy,

Graduate School of Chosun University

The N-Benzyloxycarbonyl(CBZ) group is one of the most commonly used protecting groups for amino acids. The liquid chromatographic enantiomer separation of N-CBZ protected α-amino acids and α-amino acids ethyl esters on four polysaccharide-derived chiral stationary phases(CSPs), such as Chiralcel OD, Chiralpak AD, Chiralpak IA and Chiralpak IB was performed. Chiralpak IB showed performance superior to Chiralpak IA for resolution of N-CBZ-α-amino acids and their ethyl esters. In general, Chiralpak IA, Chiralpak IB were well seperated more than N-CBZ protected the corresponding ethyl esters. Especially, the coated Chiralcel OD, Chiralpak AD showed higher enantioselectivities than the covalently bonded Chiralpak IA, Chiralpak IB for enantiomer separation of N-CBZ-α-amino acids and their ethyl esters.

Ⅰ. 서 론

세계적으로 시판되는 의약품 중 키랄 의약품은 50%이상을 차지하며,거울상 이성질체를 분리하여 광학적으로 순수한 하나의 거울상 이성질체 형태로 판매되는 의약품은 그 중에서도 50%이하이다. 특히 합성의 방법으로 얻어진 키랄 의약품은 10%이하만 광학적으로 순수한 형태로 판매되고 있으며, 나머지 대부분의 의약품은 두 거울상 이성질체가 반반씩 혼합되어 있는 광학이성질체 혼합물(racemate)상태로 판매되고 있다.

전체 의약품 중 50%이상을 차지하고 있는 키랄 의약품은 생체 내에서 흡수 및 대사, 수용체와의 상호작용 등에 있어 서로 다른 성질을 나타낸다. 종종 한쌍의 광학이성질체 중 단지 하나의 광학 이성질체만이 약리활성을 나타내며 다른 광학이성질체는 아무런 약리활성을 나타내지 않거나 혹은 독성을 갖고 있는 경우가 많이 보고되어 있다. 임상결과 안정한 것으로 생각되었으나 이성질체로 인해 수십년 후 그 독성이 밝혀진 사례로 Thalidomide, Dopa, Ketamin, Penicillamine, Ethambutol 등이 있으며, 이와 같은 부작용을 미연에 방지하기 위해 1992년부터 미국 FDA에서는 새로운 키랄 의약품을 판매하기 위해서는 반드시 각각의 거울상 이성질체에 대한 생리활성을 확인한 후 인체에 독성이 없는 하나의 거울상 이성질체로 구성된 의약품이거나 또는 혼합된 상태로 사용되어도 안전하다는 충분한 근거가 있는 의약품만 판매가 허가되도록 하는 새로운 지침을 발표하였다. 그리고 1997년에는 FDA에서 기존에 시판되는 racemic 의약품을 single enantiomer로 재개발하도록 하는 racemic switch 열풍을 불게 하였다.[1-5] Racemic drug의 chiral switch의 대표적인 사례로 1969년부터 소염진통제로 사용된 Ibuprofen을 들 수 있다. Racemic drug과 chiral drug의 숱한 논쟁 후에 1994년 오스트리아에서 (S)-(+)-Ibuprofen(Dexibuprofen)이 Gebro Broschek에 의해 Seractil 라는 이름으로

개발되었고, 또한 1997년 말에 스위스에서 Spirig AG에 의해 DexOptifen라는 이름으로 개발되었다. 이외에도 세계의 우수한 제약회사에서 이미 시판되고 있는 많은 racemic drug들을 single enantiomer로 전환하고자 하는 많은 실례가 보고되고 있다.[2-5]

따라서 오늘날 거울상 이성질체를 분리하는 기술의 개발은 의약품 산업에서 매우 주목 받고 있다. 그러나 한 쌍의 거울상 이성질체는 일반적인 환경에서 물리적, 화학적 성질이 동일하기 때문에 분리할 수 없으며, 단지 키랄 환경에서만 분리할 수 있으므로 분리 기술이 쉽게 개발되지 못하였다.

고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)을 통한 광학이성질체의 분리 방법에는 키랄 환경에 따라 키랄이동상(chiral mobile phase, CMP)법, 키랄이동상첨가제(chiral mobile phase additive, CMPA)법, 키랄고정상(chiral stationary phase, CSP)법으로 나눌 수 있다. 이러한 세가지 방법 중에서 여러 가지 장점을 갖고 있는 키랄고정상(CSP)법에 의한 광학분할의 연구는 1980년대 이후 가히 폭발적으로 이루어져 왔다. 그 결과 많은 종류의 HPLC용 chiral column들이 개발되었으며 상품화되어 있는 chiral column들은 여러 연구 분야에서 편리하게 활용되고 있다. 이들 chiral column은 키랄선택자(chiral selector)를 합성하여 만든 chiral column과 자연계에 존재하는 천연물질(고분자나 protein 등)이나 합성고분자를 키랄선택자로 하여 만든 chiral column으로 크게 구분할 수 있다.

키랄 약품의 분석과 함께 최근에는 아미노산 분자구성과 광학적 순도를 결정해야 할 필요성이 생화학분야 뿐만 아니라 의학, 약화학분야에서도 자주 대두되고 있고 이러한 결정을 위한 수많은 방법들이 발전해오고 있다.[6,7] 이 분야의 대부분의 연구에서 크로마토그래피를 사용하고 있고 크로마토그래피에 앞서 아미노산의 아미노그룹을 치환하는 일이 요구되며 동시에 펩티드합성에 대한 관심이 커지고 있다. 광학적으로 활성이 있는 N-protected α-아미노산은 펩티드 합성에 널리 이용되고 있다.[8,9]따라서 N-protected α-아미노산에

서 광학이성질체의 순도 결정 및 그의 불순물의 함량 검출 방법이 빈번히 요구되어 왔다.

α-아미노산의 보호그룹으로는 N-t-BOC(tert-butoxycarbonyl), N-CBZ(benzyloxycarbonyl), N-FMOC(9-fluorenylmethyloxycarbonyl), N-PHT(phthaloyl)등이 사용되고 있다. 그 중에 FMOC그룹은 형광검출기에 아주 민감한 장점을 갖고 있고 PHT그룹은 일반적으로 잘 사용하지 않지만 경제적 이유에서나 대용량 합성의 경우에 사용되기도 하며 CBZ그룹은 아미노산의 보호그룹에서 가장 보편적으로 사용된다.

본 연구에서는 CBZ그룹을 몇가지의 α-아미노산(그림 1)의 보호그룹으로 사용하였다. CBZ그룹 역시 카바메이트계열의 아미노산 보호그룹의 하나로 펩타이드 합성에 있어 라세믹화를 최소화 시킬 수 있고 촉매적 수소분해(hydrogenolysis)에 의해 절단되어진다.

N-protected α－아미노산의 광학이성질체의 분석에 관한 여러 가지 기법을 비교해보면, 키랄고정상에서 광학이성질체의 크로마토그래피분리는 가장 정확하고 편리한 방법으로 알려져 있다.[10-12] 실제로 여러 가지 키랄고정상은 N-protected α－아미노산의 분석에 성공적으로 응용되고 있다.[13-17]

여러 키랄고정상에서 비수용성 이동상(normal phase)을 사용하여 N-protected α-아미노산의 광학이성질체를 분리한 실례는 단 몇 가지 경우만 보고되어 왔다.[16,22,25,30]

본 연구에서는 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산과 그들의 에스터유도체의 광학분할을 위해 키랄 고정상으로는 Chiralcel OD, Chiralpak AD, Chiralpak IA, Chiralpak IB컬럼을 사용하였다. 상기 컬럼중 OD와 AD컬럼은 각종 셀룰로오스(Cellulose)와 아밀로오스(Amylose) 유도체를 실리카겔의 지지 상에 코팅한 것이다. 그리고 Chiralpak IA, Chiralpak IB컬럼은 각각 AD와 OD의 공유결합형 컬럼이다.[31,32](그림 2) 다당(polysacharide)타입의 컬럼은 다양한 종류의 라세미 화합물을 광학 분할하는데 매우 유용하며 특히 방향족 고리를

가지고 있는 화합물인 경우, 더욱 효과적이다. 또한 카르보닐기, 히드록실기, 아미노기 등을 가지는 화합물의 분리에도 사용되고 있다. 그러나 셀룰로오스와 아밀로오스 유도체를 실리카겔의 지지 상에 코팅하였기 때문에 이동상으로 헥산과 알코올(주로 2-프로판올)만을 사용해야 하고 다른 용매를 사용 시, 컬럼이 손상되는 단점이 있다. 또한 천연 고분자물질이기 때문에 elution order를 원하는 대로 바꾸지 못하는 근본적인 단점과 키랄성 인지의 메커니즘을 구체적으로 밝히기 매우 어려운 단점이 있다.

이런 결점에 입각해서 고안된 차세대 키랄컬럼인 Chiralpak IA, Chiralpak IB은 기존의 Chiralpak AD와 Chiralcel OD컬럼이 가진 용매의 한계성과 컬럼 손상의 단점이 극복된 개선된 column으로 개발되었기 때문에 본 연구에 적극 활용하여 실험해 보았다. Chiralpak IB는 Chiralpak IA와 마찬가지로 코팅타입의 CSP 컬럼에서 사용하는 전형적인 이동상에 비해 사용가능한 용매로 Chloroform, Ethyl acetate, tetrahydrofuran, methyl tert-butyl ether, toluene 등 다양하게 있다. 보통 HPLC 용매중에서 Chiralpak IB에서 가장 높은 enantioselectivity의 잠재력을 가진 용매는 alkane(예;hexane)과 혼합된 Chloroform, Ethyl acetate, THF, MtBE, alcohols 용매가 있다. 만약 이상의 용매로 만족스러운 분리의 결과를 얻을 수 없을 때는 dichloromethane, toluene, acetonitrile, aceton, dioxane 등을 사용해 볼 가치가 있다. 이렇듯 혼합용매를 사용하는데 제약이 적고 손상위험도 적어서 보다 다양한 normal 이동상에서 분리능을 시험하는데 공유결합형 CSP컬럼은 그 유용도가 클 것이다.[31-33]

셀룰로오스 또는 아밀로오스 유도체 키랄고정상이 라세미 광학분할 할 때 적용되는 키랄성 인지의 메커니즘은 고정상과 라세미 화합물간의 단순한 상호작용으로 이루어진 것이 아니라 아직 확실히 밝혀지지는 않았지만 키랄고정상으로 작용하는 셀룰로오스 또는 아밀로오스유도체와 라세미 화합물 사이에 수소결합이나[38-41] π-π상호작용 및 쌍극자-쌍극자 겹침 상호작용이[33] 중요한 역할을 하여 광학분할이 일어나고 있다는 몇 가지의 실험적 사실이 발표

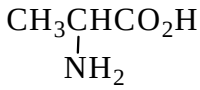
된 적이 있다.

라세미 카르복실산을 광학분할 할 때에는 이동상에 소량의 유기산을 가함으로써 α값에 큰 영향을 줄 수 있을 뿐만 아니라 머무름 시간에도 영향을 미친다. 일반적으로 가하여 주는 유기산이 센 산일수록 광학분할이 더욱 효과적이며 분리인자(separation factor, α)와 분해인자(resolution factor, Rs) 값이 증가함을 확인할 수 있다.

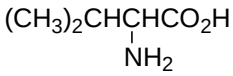
본 연구에서는 액체크로파토그래피를 이용한 키랄고정상 Chiralcel OD, Chiralpak AD와 Chiralpak IA ,Chiralpak IB에서의 몇가지의 N-벤질옥실카르보닐 α-아미노산유도체와 그들의 에틸에스터 유도체의 광학이성질체의 분리를 보이고 용매에 따른 효과를 비교 기술하려 한다.

N-벤질옥실카르보닐 α-아미노산 자체의 분리 연구는 많이 보고되고 있지만 N-벤질옥실카르보닐 α-아미노산 에틸에스터 유도체의 광학이성질체 분리의 시도는 아직 보고된 바 없으며 아직 많은 연구가 진행되지 않은 차세대 키랄 컬럼(IA 와 IB)의 용매에 따른 효능을 밝히는데 그 의의를 둘 수 있다. 특히 Chiralpak IB에 관한 분리실험은 전 세계적으로 아직 연구 보고 된 적이 한번도 없어 앞으로 관련분야 연구에서 큰 지침이 될 것으로 사료된다.

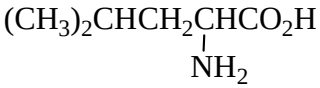
Alanine



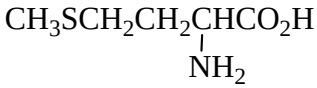
valine



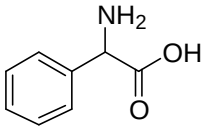
Leucine



Methionine



Phenylglycine



Phenylalanine

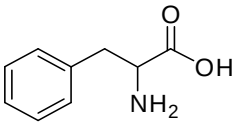
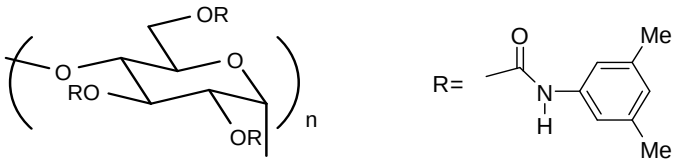


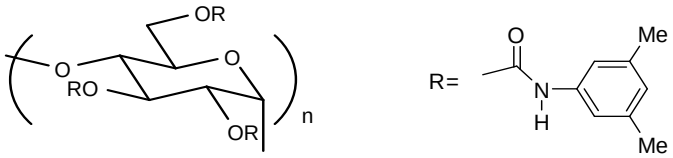
Figure 1. Structures of α-amino acids

Chiralpak IA:



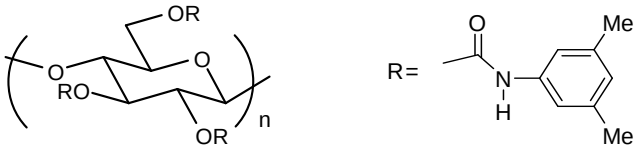
Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) derivative
immobilized on silica gel

Chiralpak AD:



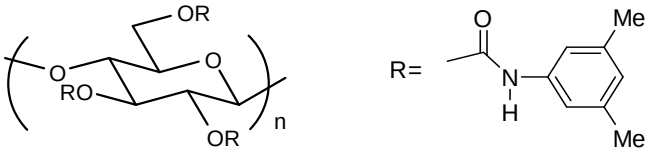
Amylose derivative
coated on silica gel

Chiralpak IB:



Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)derivative
immobilized on silica gel

Chiralcel OD:



Cellulose derivative
coated on silica gel

Figure 2. Structures of Chiralpak IA, Chiralpak AD, Chiralpak IB, Chiralcel OD

Ⅱ. 실험방법

1. 시료 및 시약

사용된 모든 용매는 HPLC급을 그 외에 모든 시약은 시약 급을 사용하였다.

1)아미노산

(***Sigma):*** Rac-Methionine, N-CBZ-DL-leucine, N-CBZ-L-leucine, N-CBZ-D-Phenylalanine

(***Junsei Chemical***): DL-α-Alanine, L-valine

(***Aldrich***): Rac-Phenylglycine, L-Methionine

(***ACROS***): DL-phenylalanine

(***KATAYAMA Chemical***): L-Alanine

2)기타 시약들

(***ACROS***): Benzyl Chloroformate, EEDQ, Trifluoroacetic acid

(***J.T.Baker***): Tetrahydrofuran, Hexane, Ethyl Acetate, Chloroform

(***Fisher scientific***): 2 -propanol, Ethanol

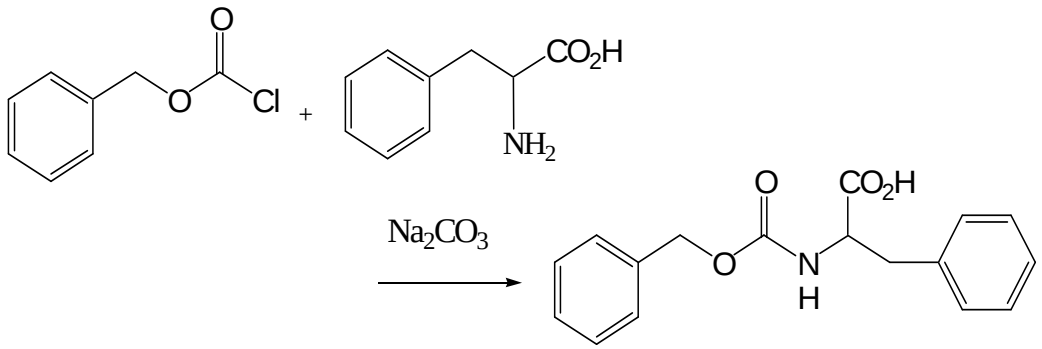
(***OSAKA Chemical***): Sodium Carbonate

2. 실험기기

액체크로마토그래피 실험은 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 상온에서 수행하였다. HPLC 구성 기기로 HP 1100 Series를 사용하였다. HPLC용 column으로는 Daicel Chemical Company (250×4.6㎜ I.D., Tokyo,Japan)에서 구입한 Chiralpak AD, Chiralcel OD, ChiralpakIA, Chiralpak IB를 사용하였다.

3. *N*-벤질옥시카르보닐 α-아미노산의 합성

N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산은 다음의 방법으로 합성하였다. DL-phenylalanine을 예로 들어 설명한다.

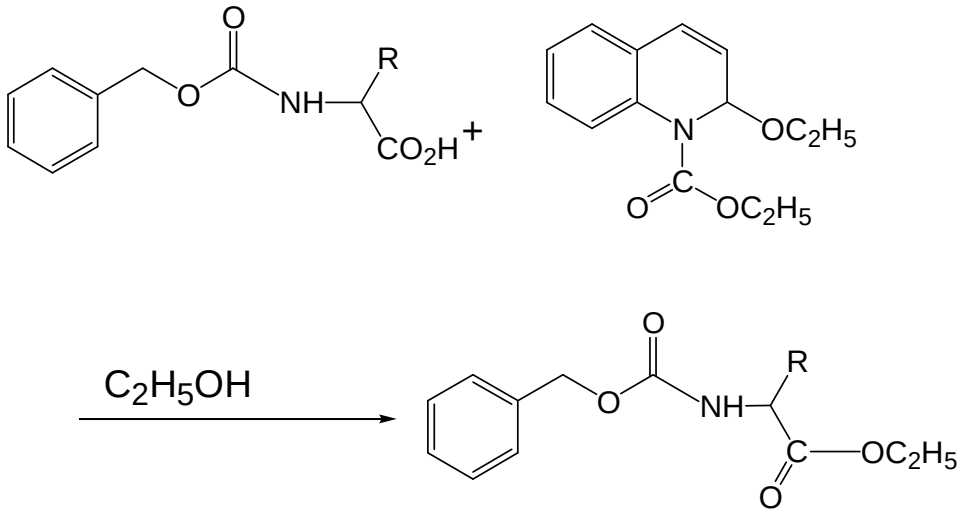


위의 식에서와 같이 DL-phenylalanine 1g(6mmol)을 건조시킨 플라스크에 넣고 Na_2CO_3포화수용액에 용해시킨 후 Benzyl Chloroformate 1.03ml (7.2mmol)을 4회 분량으로 나눠 5분마다 첨가한 후 상온에서 15시간 교반한다. 반응혼합물에 6% NaOH 60ml을 넣고 Diethyl ether로 추출한다. 추출물은 ice-bath에서 진한 염산 용액으로 pH을 2로 맞춘 후 염화메틸렌으로 추출한 다음 소금물로 씻어내고 황산나트륨으로 탈수시킨 후 여과한다. 그 후 감압 하에서 용매를 날려 보낸 후 진공 건조하여 N-Benzyloxycarbonyl-DL-phenylalanine 최종산물을 얻는다. 수득율은 77.8%였다.

4. *N*-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 에틸에스터 유도체의 합성

N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 에틸에스터 유도체는 다음과 같은 두가지 방법으로 합성하였다. 방법 1과 방법 2는 각각 N-CBZ-DL-Leucine과 N-CBZ-L-Leucine을 예로 들어 설명한다.

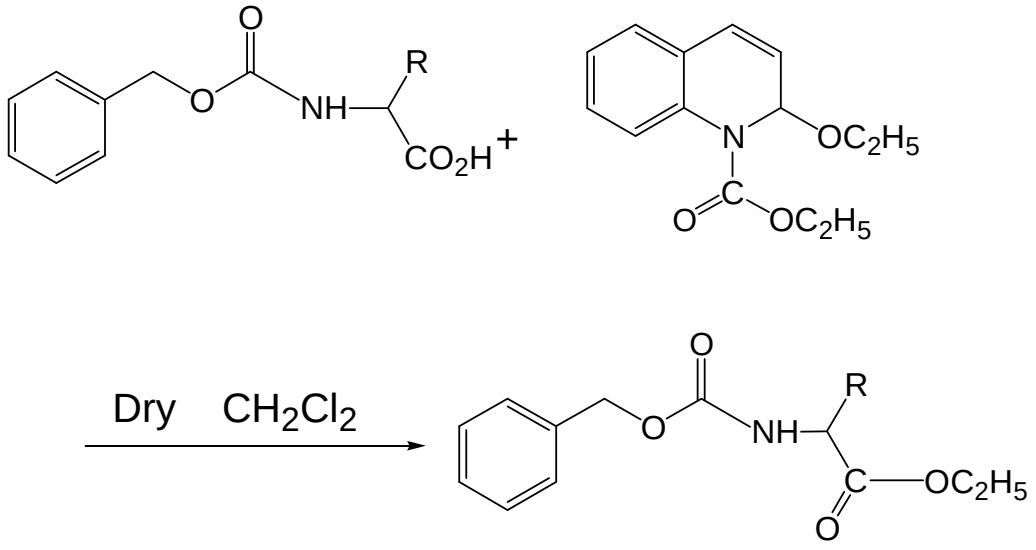
1)방법 1.



위의 식에서와 같이 N-CBZ-DL-Leucine 1g을 건조시킨 플라스크에 넣고 Ethanol 5ml에 완전히 녹인 후 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydro -quinoline 1.2g(4.5mmol)을 넣고 24시간 교반한다.

반응혼합물을 감압 하에서 용매를 날려 보낸 후 염화메틸렌 30ml에 녹인 후 5% 수산화나트륨 용액으로 씻은 후 3% 염산으로 추출한다. 다음 소금물로 씻어내고 황산나트륨으로 탈수 후 여과한다. 다음 감압 하에서 용매를 날려보낸 후 진공건조한 후 N-Benzylcarbonyl-DL-Leucine Ethyl Ester 최종산물을 얻는다. 수득율은 98.2%였다.

2)방법 2.



N-CBZ-L-Leucine 50mg을 건조시킨 플라스크에 넣고 수분이 제거된 염화메틸렌 5ml에 녹인 후 EEDQ 53.4mg(0.2mmol)넣고 34시간 교반한다. 반응혼합물에 염화메틸렌 30ml 넣고 5%염산으로 추출한다. 다음 포화 탄산나트륨 용액으로 씻어주고 소금물로 한번 더 씻어준 후 황산나트륨으로 탈수 후 여과한다. 다음 감압 하 에서 용매를 날려 보낸 후 진공 건조하여 N-Benzyl-carbonyl-L-Leucine Ethyl Ester 최종산물을 얻는다. 수득률은 37.2%였다.

Ⅲ. 실험결과 및 고찰

6가지 아미노산, 즉, alanine(Ala), valine(Val), Leucine(Leu), Phenylglycine (PG), Phenylalanine(Phe), Methionine(Met)로부터 합성하여 N-CBZ-Amino Acids를 얻고 다시 반응시켜 N-CBZ-Amino Acids Ethyl Ester를 얻어 모두 12가지 분석체의 광학이성질체에 관한 분리실험을 실시하였다.

Table 1~Table 2은 각각 Chiralpak IA와 Chiralpak IB에서의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체의 광학이성질체의 분리의 다양한 이동상에 따른 크로마토그래피 분석결과이다. 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid를 포함한 10%와 5% 2-propanol/hexane(v/v)를 비롯하여 20%와 10% Tetrahydrofuran/ Hexane(v/v), 25%와 20% Ethyl acetate/Hexane(v/v)를 사용하였다. 0.1% trifluoroacetic acid는 유기강산으로서 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체의 분리인자를 크게 한다. 적절한 용출시간과 분리도를 보이는 조성을 택하여 실험을 진행하였다.

Table 3~Table 4는 각각 Chiralpak IA와 Chiralpak IB에서의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 에틸에스터유도체의 광학이성질체의 분리의 다양한 이동상에 따른 크로마토그래피 연구결과이다. 이동상으로는 5% 2-propanol/ hexane(v/v), 10% THF/hexane(v/v), 10% Ethyl acetate/hexane(v/v), 20% Chloroform/hexane 의 4가지를 사용하여 광학이성질체 분리를 시도하였다.

용리 속도가 늦은 분석물질은 각 용매의 퍼센트를 높이는 방향으로 연구하였다. 왜냐하면 순상 크로마토그래피(normal phase chromatography)에서 이동상의 극성이 강할수록 고정상에서의 분석물질의 용출속도가 빨라지며, 상대적으로 분리도는(Resolution) 떨어진다.

머무름 시간은 일반적으로 알코올농도가 높아질수록 짧아진다. 또한 극성유기용매를 이동상으로 사용시에 머무름 시간은 매우 짧아진다.

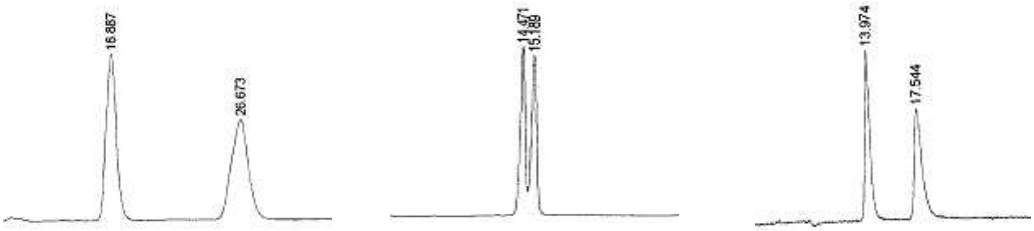
Table 1 Effect of Mobile Phase on the enantiomer separation of some N-CBZ protected α-amino acids on Chiralpak IA

Analyte	α	k'_1	k'_2	Rs	Retained[a]	Mobile phase
Ala	1.60	3.38	5.35	7.03	D	
Val	2.96	3.25	9.81	6.26	D	
Leu	1.62	2.94	4.80	7.75	D	10% 2-propanol/Hxn
PG	1.71	7.50	8.43	9.22	D	with 0.1% TFA
Phe	1.17	3.98	4.76	1.06	L	
Met	1.28	4.70	6.21	4.17	D	
Ala	1.04	3.31	3.45	0.55	D	
Val	1.07	2.13	2.27	0.67	D	
Leu	1.03	2.84	2.92	1.30	L	20% THF/Hxn with
PG	1.06	4.06	4.31	0.77	D	0.1% TFA
Phe	1.11	3.78	4.18	1.34	L	
Met	1.00	4.67	4.67	-	-	
Ala	1.00	3.48	3.48	-	-	
Val	1.00	2.65	2.65	-	-	
Leu	1.07	2.75	2.94	1.00	D	25%Ethyl acetate/Hxn
PG	1.32	3.89	5.15	3.74	L	with 0.1% TFA*
Phe	1.00	4.11	4.11	-	-	
Met	1.05	4.57	4.81	0.64	L	

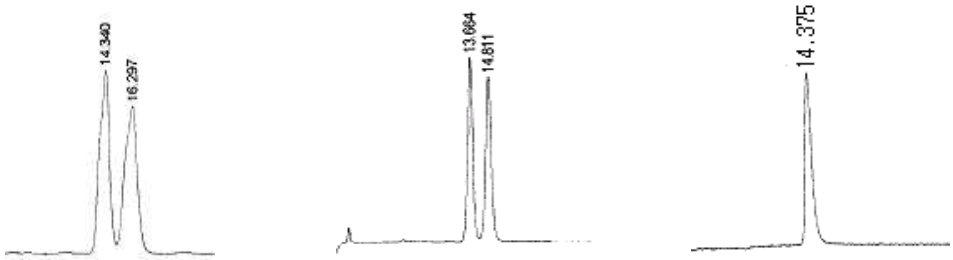
Mobile Phase ; Hexane(Hxn), Tetrahydrofuran(THF); Trifluoroacetic acid(TFA) ; flow rate=1㎖/min ; UV=220nm ; * UV=254㎚ ; [a]indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

10% IPA/Hxn with 0.1% TFA | 20% THF/Hxn with 0.1% TFA | 25% EtOAc/Hxn with 0.1% TFA

(a) N-CBZ-Leucine



(b)N-CBZ-Phenylglycine



(c)N-CBZ-Phenylalanine

Figure 3. Chromatograms of enantiomer separation of some N-CBZ-α-amino acids on Chiralpak IA.
2-propanol(IPA);Tetrahydrofuran(THF);Ethyl acetate(EtOAc)
flow rate=1㎖/min; UV=220㎚;
injection amount: 10-20㎍.

Table 1은 Chiralpak IA에서의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체의 광학이성질체의 다양한 이동상에 대한 크로마토그래피 분석결과이다. 이동상으로 0.1% trifluoroacetic acid를 포함한 10% 2-propanol/hexane(v/v)을 비롯하여 20% THF/hexane, 25% Ethyl acetate/hexane를 사용하였다.
Chiralpak IA에서 전반적으로 N-CBZ-α-아미노산유도체는 0.1% TFA을 포함한 10% 2-propanol/hexane(v/v) 조건에서 최적의 분리를 보였다.
모두 base line 분리를 보였고 피크는 샤프했다. 단, 용출된 순서는 규칙적이지 못했다.

그림 3에서는 대표적으로 몇 개의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체의 Chiralpak IA고정상에서의 크로마토그래피를 보여 주고 있다. 그림에서 보여주는 것처럼 N-CBZ-Leucine와 N-CBZ-Phenylglycin경우엔 0.1% triflu-oroacetic acid을 포함한 10% IPA in hexane에서 가장 잘 분리되었고 그 다음으로 25% EtOAc in hexane (v/v)에서 훨씬 분리도가 떨어졌고 20% THF in hexane (v/v)에서는 분석체가 분리되지 못했다. 분리된 분석체는 모두 base line을 유지하면서 피크도 샤프하였다. 용출 순서는 위에서 언급했듯이 규칙적이지 못했다. N-CBZ-Phenylalanine경우에는 0.1% trifluoroacetic acid을 포함한 10% IPA/hexane(v/v)에서 가장 잘 분리되었고 위 두 분석체와는 달리 20% THF/hexane (v/v)용매에서 분리되는 모습을 보였다. 그리고 25% EtOAc/hexane (v/v)에서는 분리되지 않았다.

Table 2 Effect of Mobile Phase on the enantiomer separation of some N-CBZ protected α-amino acids on Chiralpak IB

Analyte	α	k'_1	k'_2	Rs	Retained[a)]	Mobile phase
Ala	1.93	3.81	7.35	10.37	D	5% 2-propanol/Hxn with 0.1% TFA
Val	2.79	2.16	6.03	12.21	D	
Leu	1.67	2.86	4.77	7.96	D	
PG	1.39	6.23	8.63	5.44	D	
Phe	1.10	5.34	5.85	1.47	L	
Met	1.32	5.70	7.52	2.23	D	
Ala	1.23	8.97	11.03	2.21	D	10% THF/Hxn with 0.1% TFA
Val	1.31	4.65	6.10	2.93	D	
Leu	1.13	5.62	7.49	1.76	D	
PG	1.04	11.94	12.39	0.46	L	
Phe	1.11	11.17	12.39	1.56	L	
Met	1.05	13.65	14.39	0.82	D	
Ala	1.11	6.50	7.24	1.45	D	20% Ethyl acetate /Hxn with 0.1% TFA*
Val	1.13	3.60	4.05	1.51	D	
Leu	1.00	4.47	4.47	-	-	
PG	1.08	6.52	7.02	1.25	L	
Phe	1.00	6.96	6.96	-	-	
Met	1.00	8.19	8.16	-	-	

Mobile Phase ; Hexane(Hxn), Tetrahydrofuran(THF); Trifluoroacetic acid(TFA) ; flow rate=1㎖/min ; UV=220nm ; * UV=254㎚ ; [a]indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

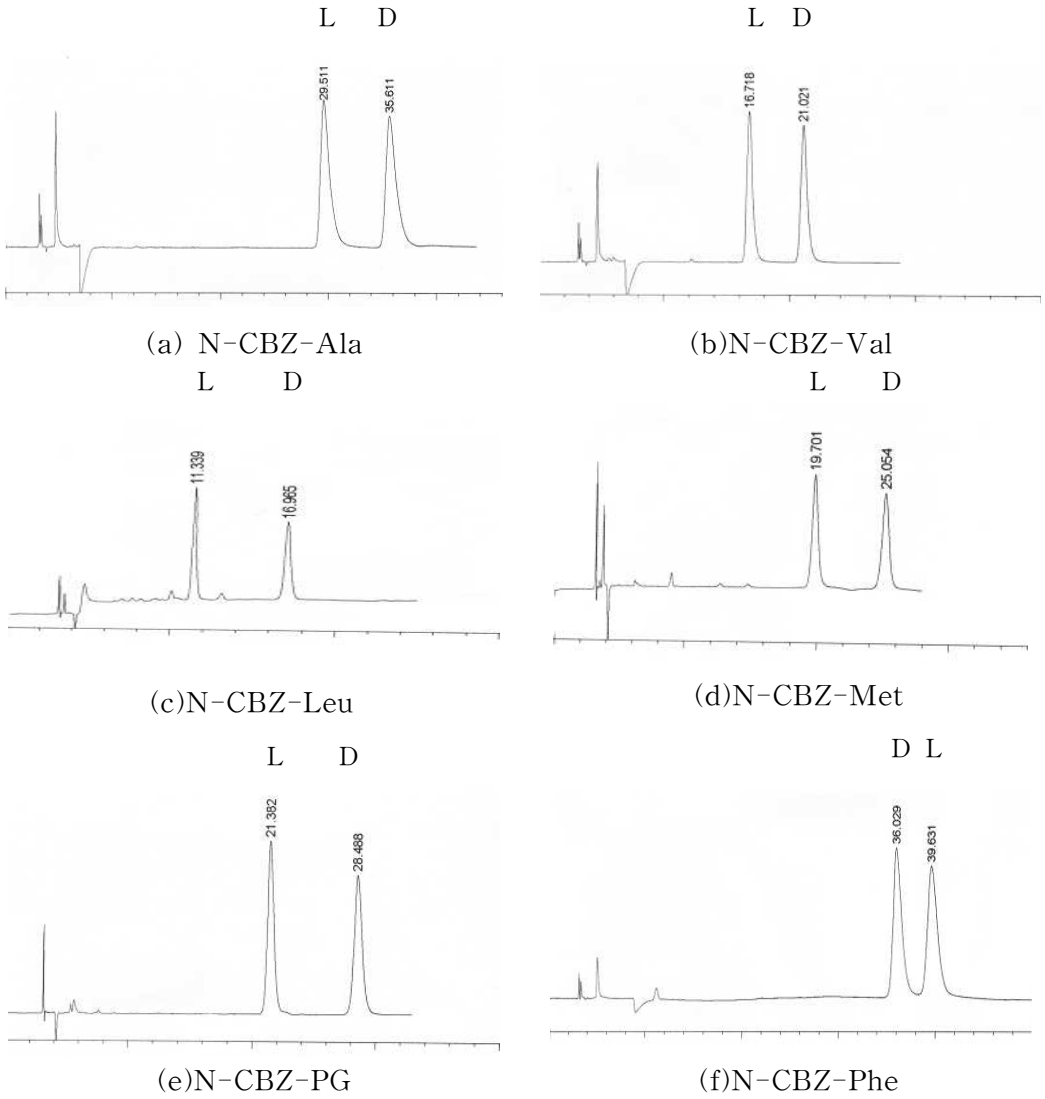


Figure 4. Chromatograms of enantiomer separation of some N-CBZ-α-amino acids on Chiralpak IB.

Mobile phase: (c),(d),(e); 5% 2-propanol in hexane(v/v) containing 0.1% trifluoroacetic acid ; (a),(b),(f); 10% THF in hexane(v/v) containing 0.1% trifluoroacetic acid ; flow rate=1㎖/min; UV=220㎚ ; injection amount: 10-20㎍.

Table 2는 Chiralpak IB에서의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체의 광학이성질체의 다양한 이동상에 대한 크로마토그래피 분석결과이다. 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid를 포함한 5% 2-propanol/hexane(v/v),10% THF/Hxn, 20% Ethyl acetate/Hxn를 사용하였다.

분석결과를 살펴보면 Chiralpak IB에서 N-CBZ-Aimo acids의 광학이성질체 분리는 5% 2-propanol/hexane(v/v)에서 분리인자(α)와 분해인자(Rs)가 가장 좋게 나타났다. 또한 Chiralpak IA에서는 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체의 광학이성질체의 용리순서가 불규칙적인 것으로 나타났다.

나머지 2가지 용매에서의 분리결과를 보면 5% 2-propanol/hexane 에서보다 더 나은 분리조건을 나타내는 이동상은 없었다.

그림 4에서는 몇 개의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체의 Chiralpak IB고정상에서의 크로마토그래피를 보여주고 있다. 사용한 3가지 용매중에서 0.1% trifluoroacetic acid 을 포함한 5% 2-propanol/hexane(v/v)과 10% THF /hexane(v/v)에서의 6가지 분석체의 가장 좋은 크로마토그램은 위와 같고 보다시피 base line을 유지하면서 피크도 샤프하다.

용리순서는 (f)N-CBZ-Phenylalanine을 제외하고는 모두 D-enantiomer가 나중에 용출되어 나왔다. 단, 10% THF/Hxn 용매사용의 경우 용출시간이 길어서 THF용매비율을 더 높일 필요성이 있는 것으로 보인다.

Table 3 Effect of Mobile Phase on the enantiomer separation of some N-CBZ protected α-amino acids ethyl esters on Chiralpak IA

Analyte	α	k'_1	k'_2	Rs	Retained[a)]	Mobile phase
Ala	1.00	4.20	4.20	-	-	5% 2-propanol/Hxn
Val	1.11	3.19	3.55	0.77	D	
Leu	1.11	4.48	4.97	1.13	L	
PG	1.11	6.24	6.86	0.89	D	
Phe	1.00	5.98	5.98	-	-	
Met	1.00	7.85	7.85	-	-	
Ala	1.00	4.85	4.85	-	-	10% THF/Hxn
Val	1.11	2.82	3.12	1.22	L	
Leu	1.13	4.81	5.43	1.15	L	
PG	1.08	6.77	7.28	0.89	D	
Phe	1.06	8.03	8.49	0.76	L	
Met	1.11	9.26	10.25	1.03	L	
Ala	1.00	6.65	6.65	-	-	10% Ethyl acetate/Hxn*
Val	1.29	3.41	4.39	2.45	D	
Leu	1.11	4.86	5.37	0.77	D	
PG	1.12	7.24	8.12	1.48	D	
Phe	1.10	6.22	6.85	1.53	L	
Met	1.04	10.37	10.77	0.41	D	
Ala	1.42	1.92	2.72	2.33	D	50% MtBE/Hxn
Val	1.42	1.91	2.72	2.13	D	
Leu	1.31	2.25	2.95	2.74	D	
PG	1.67	3.68	6.13	4.82	D	
Phe	1.05	4.52	4.74	0.34	D	
Met	1.11	5.26	5.82	0.88	D	

Mobile Phase ; Hexane(Hxn), Tetrahydrofuran(THF), Methyl tert-butyl ether(MtBE) ; flow rate=1㎖/min ; UV=220nm ; * UV=254㎚ ; [a]indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

Table 3은 Chiralpak IA에서의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 에틸 에스터유도체의 광학이성질체의 4가지 이동상에 대한 크로마토그래피 분석결과이다. 5% 2-propanol/hexane(이하 1번용매)와 10% THF/hexane(이하 2번 용매), 50% MtBE/hexane(이하 3번용매)에서 분리시 최적 파장은 220nm였고 10% Ethyl acetate/hexane(이하 4번용매)에서는 254nm였다. 특히 4번용매조건은 잡음(noise)이 너무 심하였고 평형을 잡는데 시간이 너무 오래 걸리는 관계로 잡음이 최소이면서 흡광률도 높고 Base line이 좋은 파장을 조사하여 254nm에서 분리를 시도한 것이다. 거울상이성질체 분리도와 머무름 시간은 이동상의 특성에 따라 큰 영향을 받는 것을 보여주고 있다.

결국 분리인자(α)와 분해인자(Rs) 수치상에서 물론 Base line 분리를 보이는 크로마토그램을 나타낸 10% Ethyl acetate/Hxn가 Chiralpak IA에서의 N-CBZ-Amino Acids Ethyl Ester의 좋은 분리조건을 나타냈다.

반면 5% 2-propanol/Hxn에서는 가장 낮은 거울상이성질체선택성을 보였다. 이는 N-CBZ-Amino Acid가 Chiralpak IA에서 10% 2-propanol/hexane에서 최적의 분리를 보인 것과는 상이한 결과였다. 한편, 50% MtBE/Hxn 의 분리결과는 용출속도가 너무 빨라 나머지 3가지 용매와 동등하게 비교하기는 힘들지만 상대적으로 평가해 보면 Ethyl acetate/Hxn 조건에서의 결과보다도 base line이 고르고 피크도 더 샤프하고 안정적으로 나와 광학이성체 분리에 조건에 있어 시도할 만한 가치가 있었다. 또한 N-벤질옥시카르보닐 아미노산 에틸 에스터는 Chiralpak IA에서 50% MtBE/hexane를 제외하고는 용리순서가 모두 불규칙적인 것으로 나타났다.

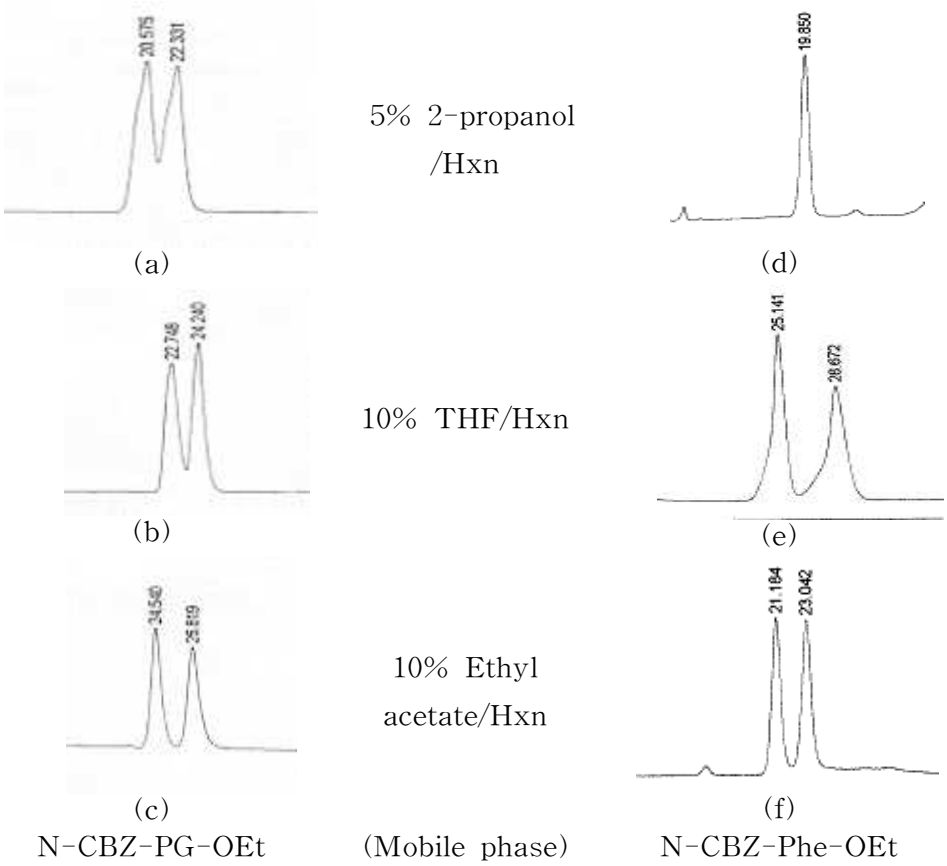


Figure 5. Chromatograms of enantiomer separation of some N-CBZ-Amino Acids Ethyl Ester on Chiralpak IA.

flow rate=1㎖/min; UV=220㎚ ;injection amount: 10-20㎍

;THF(Tetrahydrofuran);Hxn(Hexane)

;(a,b,c);N-CBZ-Phenylglycine ethyl ester(N-CBZ-PG-OEt)

;(d,e,f);N-CBZ-Phenylalanine ethyl ester(N-CBZ-Phe-OEt)

그림 5에서는 N-벤질옥시카르보닐 페닐글라이신 에틸에스터 유도체와 N-벤질옥시카르보닐 페닐알라닌 에틸에스터 유도체의 Chiralpak IA고정상에서의 크로마토그래피를 보여주고 있다.

N-CBZ-PG-OEt경우에는 5% 2-propanol/hexane와 비교하여 10% Ethyl acetate/hexane에서 분리인자(α)는 큰 변화가 없었으나 분해인자(Rs)는 0.89에서 1.48로 더 나은 결과를 보였다. 한편 N-CBZ-Phe-OEt경우에는 5% 2-propanol/hexane에서는 분리되지 않았으나 나머지 용매를 사용하면서 분리인자(α)와 분해인자(Rs)가 점점 나아지는 결과를 보였다. (순서대로 α=1.06, 1.10, 1.18; Rs=0.76, 1.53, 1.44)

Table 4 Effect of Mobile Phase on the enantiomer separation of some N-CBZ protected α-amino acids ethyl esters on Chiralpak IB

Analyte	α	K'_1	K'_2	Rs	Retained[a)]	Mobile phase
Ala	1.68	2.29	3.85	7.63	D	5% 2-propanol/Hxn
Val	2.29	1.29	2.95	8.51	D	
Leu	1.32	1.79	2.35	3.19	D	
PG	1.03	4.11	4.22	0.33	D	
Phe	1.23	3.11	3.84	3.00	D	
Met	1.21	3.59	4.36	3.13	D	
Ala	1.50	3.10	4.66	2.29	D	10% THF/Hxn
Val	1.79	1.58	2.82	3.64	D	
Leu	1.17	2.08	2.32	1.85	D	
PG	1.05	4.01	4.22	0.60	D	
Phe	1.11	4.05	4.51	1.29	D	
Met	1.11	4.53	5.03	1.37	D	
Ala	1.58	3.60	5.71	6.72	D	10% Ethyl acetate/Hxn*
Val	1.48	1.89	2.79	3.91	D	
Leu	1.11	2.77	3.08	1.49	D	
PG	1.06	4.91	5.19	0.41	L	
Phe	1.11	4.89	5.44	0.74	D	
Met	1.09	5.71	6.24	1.24	D	
Ala	1.33	4.59	6.11	2.50	D	35% MtBE/Hxn
Val	2.40	2.00	4.81	8.50	D	
Leu	1.23	3.07	3.79	1.38	D	
PG	1.06	5.90	6.23	0.64	L	
Phe	1.08	6.73	7.28	0.82	D	
Met	1.08	7.00	7.60	1.01	D	

Mobile Phase ; Hexane(Hxn), Tetrahydrofuran(THF),Methyl tert-butyl ether(MtBE); flow rate=1㎖/min ; UV=220nm ; * UV=254㎚ ; [a]indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

Table 4는 Chiralpak IB에서의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 에틸 에스터유도체의 광학이성질체의 4가지 이동상에 대한 크로마토그래피 분석결과이다. Chiralpak IA에서와 같은 4가지 용매조건(1)5% 2-propanol/Hxn 2)10% THF/Hxn 3)10% Ethyl acetate/Hxn 4)35% MtBE/Hxn; 이하 서술시에는 용매 번호로 대신하겠음)에서 실험하였다.

분석결과를 보면 3번 용매에서 N-CBZ-phenylglycine-OEt(α=1.06), N-CBZ-phenylalanine(α=1.11)와 4번 용매에서 N-CBZ -alanine-OEt(α=1.21), N-CBZ-Leucine-OEt(α=1.21), N-CBZ -phenylglycine-OEt(α=1.02), N-CBZ-phenylalanine(α=1.00)은 Chiralpak IA 고정상에서보다 분리인자가 작지만 기타 분석물질은 모두 분리인자가 큰 것으로 나타났다.

또한 Chiralpak IB에서는 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 에틸 에스터 유도체의 광학이성질체의 용리순서가 IA에 비해서 대체적으로 규칙적으로 나타났다. 3번용매에서 N-CBZ-phenylglycine-OEt유도체만 D-enantiomer가 먼저 용리되어 나왔고 나머지 경우에서는 모두 L-enantiomer가 먼저 용리된다. 다시말해 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 에틸에스터 유도체와 Chiralpak IB 고정상과의 상호작용 메커니즘이 일관성을 가지고 있다고 예측할 수 있다.

알라닌 에틸에스터 유도체는 5% IPA/Hxn에서 분리인자가 가장 컸으며 (α= 1.68) 나머지 3가지 용매에서는 적절한 분리인자 수치를 보였다.(순서대로 α= 1.50 ,1.58, 1.21) 페닐글라이신 에틸에스터 유도체는 Chiralpak IA에 비해 분리인자가 좋지 못하고(α= 1.02-0.06) 분해인자(0.33-0.60) 또한 좋지 못했다. 그리고 3번용매(10% EtOAc/Hxn)에서는 용리순서가 뒤집혔다.

Chiralpak IA 비해 분리되지 않은 경우는 적었고 적절한 분리계수(1.2<α<1.5)범주에 해당하는 결과는 IA에 비해 IB에서 더 많았다.

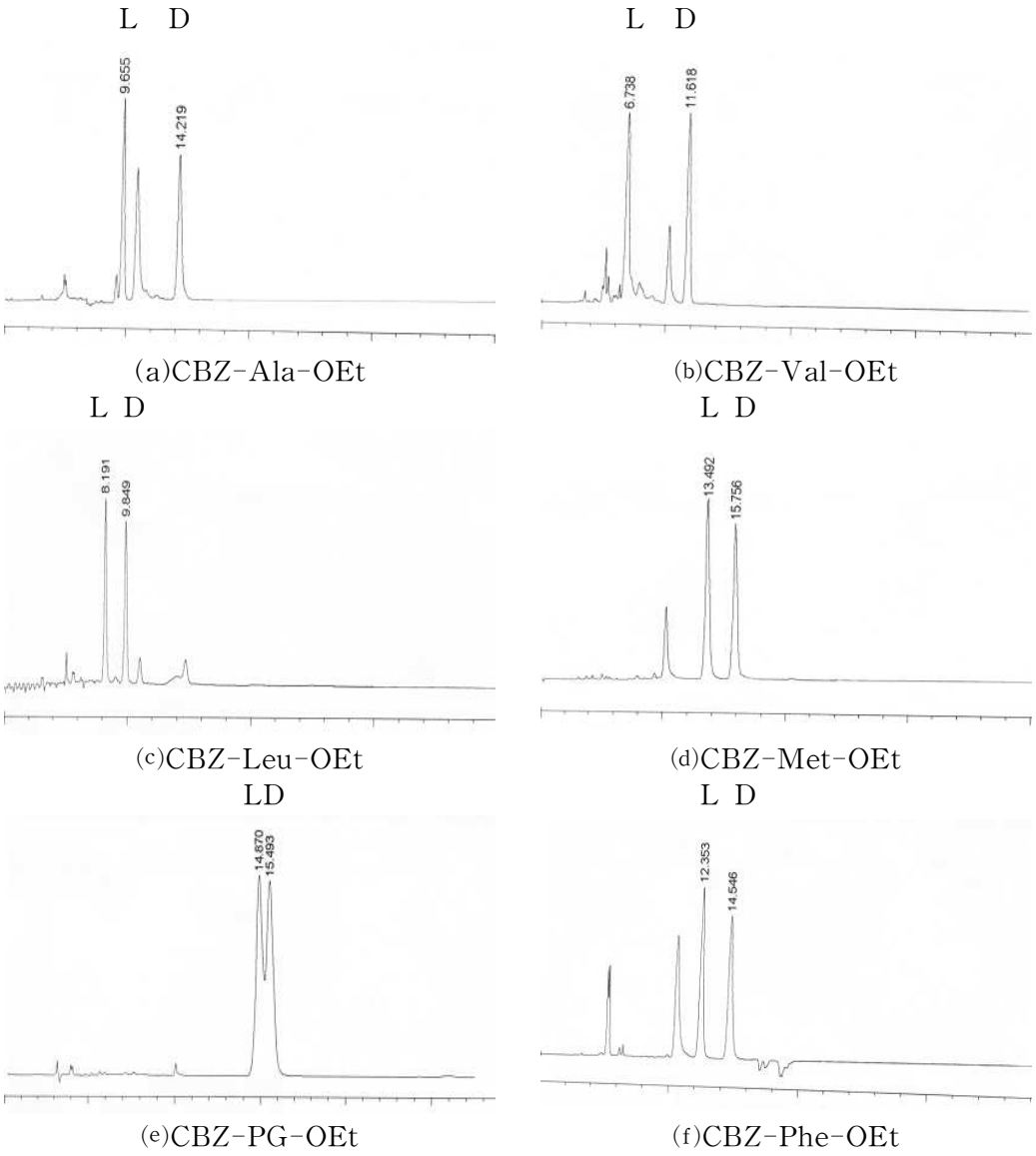


Figure 6. Chromatograms of enantiomer separation of some N-CBZ-α-amino acids Ethyl Ester on Chiralpak IB.

Mobile phase: (a)(b)(c)(d)(f); 5% 2-propanol in hexane(v/v) ; (e);10% THF in hexane(v/v); flow rate=1㎖/min; UV=220㎚; injection amount: 10-20㎍.

그림 6에서는 몇 개의 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 에틸 에스터 유도체의 Chiralpak IB고정상에서의 크로마토그래피를 보여주고 있다. 사용한 4가지 용매중에서 5% 2-propanol/hexane(v/v)과 10% THF /hexane(v/v)에서의 6가지 분석체의 가장 좋은 크로마토그램은 위와 같고 보다시피 base line을 유지하면서 피크도 샤프하다. Phenylglycine Ethyl ester 유도체만 Base line 분리를 보이지 않았다.

Chiralpak IA고정상에서의 크로마토그램보다 더 피크가 샤프하고 용출시간도 단축되었다. 위의 결과 균일하게 모두 D-enantiomer가 나중에 용출되어 나왔다.

Table 5. Comparison of Direct enantiomer separation of several N-CBZ protected α-amino acids on Chiralpak AD and Chiralpak IA

	Analyte	Ala	Val	Leu	PG	Phe	Met
AD	α	1.99	5.17	2.19	2.11	1.20	1.64
	k'_1	3.08	3.68	3.75	6.60	5.22	5.80
	Rs	7.91	17.81	8.70	9.78	1.98	6.70
	Retained*	D	D	D	D	L	D
IA	α	1.60	2.96	1.62	1.71	1.17	1.28
	k'_1	3.38	3.25	2.94	7.50	3.98	4.70
	Rs	7.03	20.4	7.75	8.43	1.06	4.17
	Retained*	D	D	D	D	L	D

Mobile phase: 10% 2-propanol/hexane(v/v) containing 0.1% TFA
; flow rate=1㎖/min ; UV=220㎚ ;
*indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

Table 5는 이동상으로 0.1% TFA을 포함한 5% 2-propanol/hexane(v/v)을 사용하여 N-벤질옥시카르보닐 α-amino acids의 Chiralpak AD 와 Chiralpak IA에서의 비교 자료이다. 일반적으로 Chiralpak IA는 Chiralpak AD에 비해 더 나은 광학이성질체 분리를 보여주지는 못했다. 한편, 용출순서는 둘 다 같은 결과를 보여주었다.

Table 6 Comparison of Direct enantiomer separation of several N-CBZ protected α-amino acids ethyl esters on Chiralpak AD and Chiralpak IA

Column	Analyte	Ala	Val	Leu	PG	Phe	Met
AD	α	1.00	1.14	1.19	1.00	1.05	1.06
	k'_1	3.97	3.90	4.75	7.38	6.61	7.97
	k'_2	3.97	3.42	5.67	7.38	6.95	8.41
	Rs	-	1.16	1.72	-	0.47	0.62
	Retained*	-	D	L	-	D	L
IA	α	1.00	1.11	1.11	1.11	1.00	1.00
	k'_1	4.20	3.19	4.48	6.24	5.98	7.85
	k'_2	4.20	3.55	4.97	6.86	5.98	7.85
	Rs	-	0.77	1.13	0.89	-	-
	Retained*	-	D	L	D	-	-

Mobile phase: 5% 2-propanol/hexane(v/v) ; flow rate=1㎖/min; UV=220㎚; *indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

Table 6는 이동상으로 5% 2-propanol/hexane(v/v)을 사용하여 N-벤질옥시카르보닐 α-amino acids Ethyl ester의 Chiralpak AD 와 Chiralpak IA에서의 비교 자료이다. 에틸에스터의 경우에도 Chiralpak IA는 Chiralpak AD에 비해 더 나은 광학이성질체 분리를 보여주지는 못했다. 그러나 페닐글라이신 에틸에스터 유도체의 경우에는 IA컬럼에서 분리되는 모습을 보여주었다.

Table 7. Comparison of Direct enantiomer separation of several N-CBZ protected α-amino acids on Chiralcel OD and Chiralpak IB

Column	Analyte	Ala	Val	Leu	PG	Phe	Met
OD[a)]	α	3.04	6.23	2.63	1.94	1.04	1.81
	k'_1	2.11	1.40	1.77	6.40	4.28	3.63
	Rs	8.71	14.12	6.34	6.87	0.15	5.75
	Retained*	D	D	D	D	L	D
IB[b)]	α	1.93	2.79	1.67	1.39	1.10	1.32
	k'_1	3.81	2.16	2.86	6.23	5.34	5.70
	Rs	10.37	12.21	7.96	5.44	1.47	2.23
	Retained*	D	D	D	D	L	D

Mobile phase: a)10% 2-propanol/hexane(v/v) containing 0.1% TFA; b)5% 2-propanol/hexane(v/v) containing 0.1% TFA ; flow rate=1㎖/min ; UV=220㎚; *indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

Table 7은 이동상으로 10%와 5% 2-propanol/hexane(v/v)을 사용하여 N-벤질옥시카르보닐 α-amino acids 의 Chiralcel OD 와 Chiralpak IB에서의 비교 자료이다. OD컬럼에 비해 IB컬럼에서의 분리가 월등히 나은 결과는 보여주지 못했으나 용출순서는 동일했으며 특히 IB컬럼에서 페닐알라닌 유도체의 경우에는 Base line resolution을 보여주었다.(Rs=1.47)

Table 8. Comparison of Direct enantiomer separation of several N-CBZ protected α-amino acids ethyl esters on Chiralcel OD and Chiralpak IB

	Analyte	Ala	Val	Leu	PG	Phe	Met
OD[a)]	α	2.12	3.44	1.61	1.06	1.22	1.40
	k'_1	2.24	1.24	1.65	4.99	3.34	3.31
	k'_2	4.74	4.27	2.65	5.30	4.07	4.65
	Rs	7.19	9.41	3.29	0.64	2.33	3.53
	Retained*	D	D	D	D	D	D
IB[b)]	α	1.68	2.29	1.32	1.03	1.23	1.21
	k'_1	2.29	1.29	1.79	4.11	3.11	3.59
	k'_2	3.85	2.95	2.35	4.22	3.84	4.36
	Rs	7.63	8.51	3.19	0.33	3.00	3.13
	Retained*	D	D	D	D	D	D

Mobile phase: a)10% 2-propanol/hexane(v/v) ;b) 5% 2-propanol/ hexane (v/v); flow rate=1㎖/min;UV=220㎚ ;*indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

Table 8은 이동상으로 10%와 5% 2-propanol/hexane(v/v)을 사용하여 N-벤질옥시카르보닐 α-amino acids Ethyl ester의 Chiralcel OD 와 Chiralpak IB에서의 비교 자료이다. 전반적으로 Chiralcel OD에서의 에틸에스터의 분리도가 좋았다. 특이적으로 Chiralpak IB에서 alanine 과 Phenylalanine의 유도체의 분해인자(Rs) 수치가 더 높아 분리도의 상승을 보였다. 분석결과 Chiralcel OD 와 Chiralpak IB 두 경우 모두 일관된 용출 순서를 보였다.

총괄적으로 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체들과 그들의 에틸 에스터유도체은 다당류유도체로 제조된 키랄 고정상인 Chiralcel OD, Chiralpak AD, Chiralpak IA, Chiralpak IB column에서 광학이성질체의 분할 목적에 도달할 수 있었다.

일단 각 컬럼의 효능측면에서 고찰에 보면 Chiralpak IB 컬럼에서는 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산유도체들과 그들의 에틸 에스터유도체의 광학이성체 분리는 상대적으로 Chiralpak IA에서 분리인자나 분해인자가 보다 좋은 수치를 나타냈다. 특히 그 에틸 에스터 유도체에서는 한 가지 경우를 제외하고는 D-enantiomer가 균일하게 나중에 용출되어 나왔다. IB컬럼과 IA컬럼에서 결과는 전반적으로 N-CBZ-α-Amino Acid 경우보다 그 에틸 에스터의 분리가 더 잘 이루어진 것으로 나타났다.

한편 각 컬럼에서 용매에 대한 효과를 살펴보면 Chiralpak IB에서 아미노산과 그 에틸에스터 유도체 모두 가장 좋은 광학이성질체 분리조건은 5% 2-propanol/Hxn을 포함한 경우였고 특히 에틸 에스터유도체의 경우는 아미노산유도체에 비해 나머지 3가지 용매에서도 어느 정도 분리는 되었고 균일한 용출순서를 보여 다양한 용매에서 광범위하게 사용할 수 있는 가능성을 보였다. Chiralpak IA에서는 에틸 에스터 유도체경우는 10%Ethyl acetate/Hxn에서, 아미노산유도체경우는 0.1% trifluoroacetic acid을 포함한 10% 2-propanol /Hxn에서 가장 이상적인 분리를 보였다. 그리고 MtBE/Hxn 조건에서의 에틸 에스터 유도체의 분리도 시도해 볼 만한 가치는 있었다. 용매비율을 잘 조정하여 최적의 조성율을 찾아내어 적용한다면 좋은 분리를 보일 수 있을 것으로 기대된다.

그리고 공유결합형 CSP컬럼(Chiralpak IA,Chiralpak IB)과 코팅형 CSP컬럼(Chiralpak AD, Chiralcel OD)을 비교하면 일반적으로 코팅형 CSP가 공유결합형 CSP보다 더 나은 분리도를 보여주고 있다. IPA/hexane 용매가 아닌 THF/hexane, EtAOc/hexane 용매를 사용할 경우 공유결합형 CSP에서 분리되지 않았던 일부의 분석체가 코팅형 CSP에서 분리되는 모습을 보였다.

Ⅳ. 결　론

6가지 아미노산으로부터 일련의 합성과정을 통하여 원하는 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산을 획득할 수 있었으며 획득한 분석물질을 HPLC 기기 상에서 키랄 고정상(CSPs)을 사용하여 광학분할을 시도하였다.

다당류유도체로 제조된 키랄 고정상 Chiralcel OD, Chiralpak AD, Chiralpak IA ,Chiralpak IB Column은 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산 광학이성질체의 분리에 있어서 각각 어떠한 효과가 있으며 각 분석체의 용매에 따른 효과 또한 비교해 보았다.

일단 N-벤질옥시카르보닐 아미노산 및 그 에틸 에스터는 Chiralpak IA 보다 Chiralpak IB에서 더 좋은 광학이성체 분리를 보였다. 즉, 피크가 더 샤프하고 분해인자(Rs)값이 더 크게 나왔다. Chiralpak IB에서 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산과 그 에틸에스터 모두 2-propanol/Hexane용매조건에서 최적의 분리를 보였다. 특히 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산의 에틸 에스터 유도체의 경우에 용매에 광범위하게 분리되는 결과를 보여 Chiralpak IB는 다른 비극성 유도체의 분리에도 더욱 유용할 것이라 기대된다. Chiralpak IA에서는 N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산는 여러 이동상 가운데 10% 2-propanol/Hexane에서 좋은 분리를 보였고 그 에틸 에스터 유도체는 10% Ethyl acetate/Hexane이 가장 좋은 분리조건이다. N-벤질옥시카르보닐 α-아미노산의 분리 실험시 그 에틸 에스터 경우보다 용이하게 다양한 용매에서 더 잘 분리 분석되는 양상을 보였다.

결론적으로 코팅형 CSP(Chiralpak AD, Chiralcel OD)가 공유결합형 CSP (Chiralpak IA, Chiralpak IB)보다 더 나은 분리도를 보여주고 있으며 한편, IPA/hexane 용매가 아닌 THF/hexane, EtAOc/hexane 용매를 사용할 경우 공유결합형 CSP에서 분리되지 않았던 일부의 분석체가 코팅형 CSP에서 분리되는 모습을 보여주고 있어 두가지 타입의 CSP컬럼을 상호보완적으로 사용하므로써 다양한 아미노산유도체의 광학분할에 더욱 효과적인 분리조건을 연구하는데 그 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

1. Hutt, A. J.; Tan, S. C. Drugs, 52, Supp. 5 1, 1996
2. Stinson, S.C. Chem. *Eng. News*, , Oct. 23, 2000.P. 55
3. Stinson, S.C. Chem. *Eng. News*, , Oct. 11, 1999.P. 101
4. Stinson, S.C. Chem. *Eng. News*,, Sep. 21, 1998. P. 83
5. Stinson, S.C. Chem. *Eng. News*, , Oct. 20, 1997.P. 38
6. Ajuja, S. Ed., *Chiral Separation by Liquid Chromatography;* ACS Symposium Series, No. 471, American Chemical Society, Washington DC, 1991.
7. Krstulovic, A. M. Ed., *Chiral Separations by HPLC;* Ellis Horwood, Chichester, 1989.
8. Bodansky, M.; Bondansky, A. *The practice of Peptide Synthesis;* springer; New York, 1984.
9. Atherton, E.; Sheppard, R. C. *Solid phase peptide synthesis: a practical Approach;* IRL Press: Oxford, 1989.
10. Subramanian, G., Ed. ;*A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*; VCH: Weinheim, 1994.
11. Beesley, T.E.; Scott, R. P. W. *Chiral Chromatography;* Wiley; Chichester, 1998.
12. Ahuja, S. *Chiral Separations by Chromatography;* American Chemical Society: Washington, D.C., Oxford University Press: Oxford, 2000.
13. Allenmark, S.; Andersson, S. *Chirality* 1992, 4, 24.
14. Zukowski, J.; Pawlowska, M.; Armstrong, D.W. *J. Chromatogr.* 1992, 623, 33.
15. Oi, N.; Kitahara, H.; Aoki, F.; Kisu, N. *J. Chromatogr.* A 1995, 689,

195.

16. Kim, B.-H.; Lee, W. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1998, 19, 289.
17. Pirkle, W.H.; Lee, W. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1998, 19. 1277.
18. Bomgren, B.; Allenmark, S. *J. Liq. Chromatogr.* 1986, 9, 667.
19. Andersson, S.; Allenmark, S. *J. Liq. Chromatogr.* 1989, 12, 345.
20. Allenmark, S.; Andersson, S. *chromatographia* 1991, 31, 429.
21. Allenmark, S.; Andersson, S. *Chirality* 1992, 4, 24.
22. Okamoto, Y.; Aburatani, R.; Kaida, Y.; Hatada, K. *Chem. Lett,* 1988, 1125.
23. Ishikawa, A.; Shibata, T. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 859.
24. Lee, W.; Kim, B.-H. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* in press.
25. Zukowski, J.; Pawlowska, M.; Armstrong, D. W. *J. Chromatogr.* 1992, 623, 33.
26. Amstrong, D. W.; Tang, Y.; Chen, S.; Zhou, Y.; Bagwill, C.; Chen, J-R. *Anal, Chem.* 1994, 66, 1473.
27. Armstrong, D. W.; Liu, Y.; Ekborgott, K. H. *Chirality* 1995, 7, 474.
28. Petterson, C.; Gioeli, C. *J. Chromatogr.* 1987, 398, 247.
29. Yuki, Y.; Saigo, K.; Kimoto, H.; Tachibana, K.; Hascgawa, M. *J. Chromatogr.* 1987, 400, 65.
30. Oi, H.; Kitahara, H.; Aoki, F.; Kisu, N. *J. chromatogr. A* 1995, 689, 195.
31. Yashima E. , Fukaya H. ,Okamoto Y. , *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 11-19.
32. Method Development with Chiralpak IA: The New Daicel Column with Broad Solvent Versatility, Chiral Technologies Europe, April 2004.
33. Ashraf Ghanem ,Hubert Hoenen ,Hassan Y. Aboul-Enein; *Talanta*

;April 2005

34. Boissonnas R. A. , *Advan. Org. Chem.* 1963, 3, 159, and references cited therein.

35. Sheehan J. C. and Frank V. S. , *J. Am. Chem. Soc.* 1949, 71, 1856.

36. Schumann I. and Boissonnas R. A. , *Helv. Chim. Acta* 1952, 35, 2235.

37. Colin R. McArthur, Paul M. Worster, and Augustine U. *Okon Synthetic Communication,* 1983, 13(4), 311-318.

38. Okamoto Y., Kawashima M. and Hatada K. , *J. Chromatogr.,* 1986, 363, 173.

39. Okamoto Y., Kaida Y., Aburatani R. and Hatada K., *J. Chromatogr,* 1989, 477, 367.

40. Okamoto Y., Aburatani R. and Hatada K. , *J. Chromatogr.,* 1987, 389, 95.

41. Wainer I. W. , and Alembik M. C. , *J. Chromatogr.,* 1986, 358, 85.

42. Yin Hua Li ; Jing Yu Jin ; Wonjae Lee ; *Bull. Korean Chem. Soc.* 2005, Vol.26 , No.7