2007年 2月

博士學位論文

UV-VIS 분광기기 밸리데이션 및 아미노산유도체 이성질체의 광학분할 연구

朝鮮大學校大學院食品醫藥學科姜映水

UV-VIS 분광기기 밸리데이션 및 아미노산유도체 이성질체의 광학분할 연구

The investigation of instrument validation of UV-VIS spectrophotometer and enantiomer separation of amino acids derivatives

2007年 2月 23日

朝鮮大學校 大學院

食品醫藥學科

姜 映 求

UV-VIS 분광기기 밸리데이션 및 아미노산유도체 이성질체의 광학분할 연구

指導教授 白 采 善

이 論文을 藥學 博士學位申請 論文으로 提出함.

2006年 10月 日

朝鮮大學校 大學院 食品醫藥學科 姜 映 求

姜映求의 博士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 高玉鉉 印委 員 朝鮮大學校 教授 白采善 印委 員 朝鮮大學校 教授 李明烈 印委 員 朝鮮大學校 教授 李範揆 印委 員 朝鮮大學校 教授 李元宰 印

2006年 12月 日

朝鮮大學校 大學院

目 次

ABSTRACT

제	1장 UV-VIS 분광기기 밸리데이션의 연구
1.	서론2
2.	실험기기 및 방법
	2.1. 실험 기기
	2.2. 실험 방법
	2.2.1. UV-VIS 분광기기 Validation 가이드라인 시행 순서3
	2.2.1.1. Wavelength accuracy 점검4
	2.2.1.2. Wavelength repeatability 점검4
	2.2.1.3. Photometric accuracy 점검5
	2.2.1.4. Photometric repeatability 점검5
	2.2.1.5. Baseline flatness 점검 ······6
3.	실험결과 및 고찰6
	3.1. 주요나라 약전에 명시된 UV-VIS분광기기의 validation항목 …6
	3.2. UV-VIS분광기기의 주요기기회사에서 규정한 주요 validation
	항목8
	3.3. 본 연구에서 제정한 UV-VIS분광기기의 validation항목과 허용
	한도9
	3.4. 제정한 UV-VIS분광기기의 validation 가이드라인의 적용 … 10
1	결론 ·······11
5.	참고문헌34

제 2장 HPLC를 이용한 아미노산유도체 이성질체의 광학분할 연구

1.	서론	••••••	•••••	·····37
2.	실험기기	및 방	컬	······38
3.	실험결과	및 고	할	······38
4.	결론	•••••	•••••	······42
5.	참고문헌	•••••	•••••	55

LIST OF TABLES

제1장

Table 1. 주요나라의 약전에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항독
12
Table 2.미국 약전에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항목괴
Validation 방법과 허용한도
Table 3. 영국, 유럽 약전에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항목괴
Validation 방법과 허용한도
Table 4. 일본 약국방에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항목괴
Validation 방법과 허용한도
Table 5. Shimadzu회사 UV/ VIS 분광학적 기기의 validation 항목과 허용한도 16
Table 6. Hewlett Packard회사 UV/VIS 분광학적 기기의 validation 항목과 허용
한도17
Table 7. Thermo회사 UV/ VIS 분광학적 기기의 validation 항목과 허용한도18
Table 8. 제안한 UV/ VIS 분광학적 기기의 validation 항목과 허용한도 19
Table 9. UV2401 (Shimadzu) (S/N A10833500586 S5)의 validation 결과20
Table 10. UV1601 (Shimadzu) (S/N A10753480100 SA)의 validation 결과 ····· 21
Table 11. UV1601 (Shimadzu) (S/N A10753480095 SM)의 validation 결과 22
Table 12. UV1601 (Shimadzu) (S/N A10753401256 S2)의 validation 결과23
Table 13. UV1700 (Shimadzu) (S/N A11024101174 LP)의 validation 결과 ··· 24
Table 14. Opron 3000 (Hanson Tech.)의 validation 결과25
Table 15. TU 1800 (P. General Inst. Corporation)의 validation 결과 26
Table 16. Optizen UV 2120 (Mecasys)의 validation 결과27

제 2장

Table 1. Chiralcel OD-H에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리 4
Table 2. Chiralcel OD에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리 4
Table 3. Chiralpak AD-RH에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리 4
Table 4. Chiralpak AD에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리4
Table 5. Chiralpak IA 에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리4
Table 6. Chiralpak IB에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리4
Table 7. Chiralcel OJ-H에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리4
Table 8. Chiralpak AS에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리5
Table 9. Chiralcel OF에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리5
Table 10. Chiralpak IA에서 몇 가지 N-FMOC-α-아미노산의 광학이성질체 분리
영향을 주는 여러 이동상에서의 광학분할5
Table 11. Chiralpak IB에서 몇 가지 N-FMOC-α-아미노산의 광학이성질체 분리
영향을 주는 여러 이동상에서의 광학분할5
Table 12. Chiralpak IB에서 몇 가지 N-FMOC-α-아미노산의 광학이성질체 분리
영향을 주는 여러 이동상에서의 광학분할

LIST OF FIGURES

제 1장

그림	1	대표	적인	UV	1601(Shimadzu)	Wa	avelength	accuracy	(486.0	nm)점	검을	위힌
		실험	결과	•••••	•••••		••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	·· 28
그림	2	대표	적인	UV	1601(Shimadzu)	Wa	avelength	accuracy	(656.1	nm)점	검을	위힌
		실험	결과	•••••	•••••	••••••	••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	29
그림	3	대표	적인	UV	1601(Shimadzu))	Baseline	flatness	점검을	위한	실험	결고
		•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	30
그림	4	UV 2	2401(8	Shim	adzu)	Waveleng	ıth	accuracy	(486.0nm)점검을	위한	실험	결괴
		•••••	•••••	•••••	•••••	••••••	••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	••••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	·· 31
그림	5	UV 2	2401(8	Shim	adzu)	Waveleng	ıth	accuracy	(656.1nm)점검을	위한	실험	결괴
		•••••	•••••	•••••	•••••		••••	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	•••••	•••••	·· 32
그림	6	UV 2	401(S	hima	adzu)	Baseline	e f	latness 점	l검을 위험	한 실험결	[과 ·	•••••	33

ABSTRACT

The investigation of instrument validation of UV-VIS spectrophotometer and enantiomer separation of amino acids derivatives

Youngku Kang

Advisor : Prof.Chae-Sun Beak, Ph.D.

Department of Food and Drug,

Graduate School of Chosun University

For the increasing demand for the validation of analytical results, one of the important concerns of the analyst is to be that the instrumentation is working to qualified assured conditions. In this study, several validation guidelines of the performance verification of UV-VIS spectrophotometer used in pharmacopoeias of major countries and UV-VIS instrument analytical companies were investigated and compared. And the validation auidelines practically useful of UV-VIS spectrophotometer were proposed. Based on our proposed validation auidelines of UV-VIS spectrophotometer, several UV-VIS spectrophotometers used in drug manufacturing laboratories were validated for their performances.

The liquid chromatographic enantiomer separation of N-fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) protected α -amino acids was

performed on nine polysaccharide-derived chiral stationary phases (CSPs). Among all CSPs, in general, the cellulose derived coated CSPs. Chiralcel OD-H and Chiralcel OD showed the greatest performance for resolution of N-FMOC α -amino acids and, therefore, all analytes enantiomers were base-line separated on Chiralcel OD-H or Chiralcel OD. It was observed that the coated type CSPs (Chiralpak AD and Chiralcel OD-H or Chiralcel OD) show generally higher enantioseparation for these analytes than the covalently bonded type CSPs (Chiralpak IA and Chiralpak IB) with the same chiral selector, respectively. Also it was shown that covalently bonded CSP, Chiralpak IB has the advantage of the use of a broad range of solvents over the coated type CSPs.

제 1 장

UV-VIS 분광기기 밸리데이션의 연구

1. 서론

Ultraviolet-Visible (UV-VIS) 분광기기는 사용하기에 매우 용이하고 빠른 분석속도의 장점을 가지고 있기 때문에 의약품 및 생명공학의 연구분야에서 가장많이 사용되고 있는 분석용 기기중 하나이다 [1]. 이 분석기기는 많은 의약품 제약회사와 산업체에서 생산품이나 반응과정에 대한 화학적 정보를 얻는데 매우 유용하게 사용되는데 특히 의약품제조공정이나 실험실에서 의약품 생산품이나 중간체물질의 정성분석, 정량분석, 순도분석, 반응속도를 통한 반응진행 정도분석 등매우 다양한 용도로 광범위하게 응용되어진다. UV-VIS 분광기기를 이용한 실험은일반적으로 매우 간단하지만 분석자들이 신뢰할만한 결과를 위해서 필요로 하는적절한 성능규격을 때때로 중요하게 여기지 아니하였다. 하지만 특히 의약품품질관리에서 약품분석을 위한 규제요건을 충족시키기 위해 UV-VIS 분석기기의 시행규격에 맞는 적절한 Validation이 필요한 상황에 직면해 있다 [2-4].

현재 국내에는 의약품품질관리와 품질보증체계가 의약품분석과 관련되어 약전내에 의약품 분석장비로서의 UV-VIS 분광기기의 Validation 가이드라인이 제시되어 있지 않는 실정이다. 의약품품질관리를 위해 매우 유용하게 사용되어지는 UV-VIS 분광기기의 성능검증의 가이드라인을 제공할 목적으로 먼저 본 연구에서현재 미국, 유럽, 일본 등의 약전에서 최근까지 제시하고 있는 의약품 분석장비로서의 UV-VIS 분광기기의 validation자료를 조사하고 또한 시판되고 있는 여러UV-VIS 분광기기 회사에서 사용되고 있는 validation에 관련된 여러 자료를 수집하여비교 분석하고자한다. 그리고 앞에서 수집한 여러 자료를 기초로 하여국내 의약품 제조공정과정이나 의약품 분석실험실에서 사용되는 UV-VIS 분광기기를위한 실제적인 UV-VIS 분석기기 validation 가이드라인을 제정하고자한다. 그리고 본 연구에서 제정한 기기validation 가이드라인을 제정하고자한다. 그리고 본 연구에서 제정한 기기validation 가이드라인을 이용하여 의약품분석장비의 성능을 바로 유지하고 나아가 신뢰할 만한 분석실험결과를 제공하여 의약품분석을위한 규제요건이 충족되는데 필요한 정보를 제공하고자한다.

2. 실험기기 및 방법

2.1. 실험기기

파장 점검시험의 경우 D2 lamp를 사용하여 방출파장인 486.0, 656.1 nm 파장의 정확도 또는 정밀도실험을 수행하였다. D2 lamp를 사용하여 파장 점검실험을 할수 없을 경우에는 Hellma secondary spectroscopic calibration standards인 (Hellma GmbH & Co. Germany) Hellma filter 666-F1을 사용하여 파장의 정확도실험을 279.20, 360.90, 453.65, 536.35, 637.75nm에서 수행하였으며 파장의 정밀도실험은 279.20, 360.90nm에서 수행하였다. 흡광도 정확도 점검시험의 경우 Hellma secondary spectroscopic calibration standard인 (Hellma GmbH & Co. Germany) 30% ND (Neutral density)의 표준품인 666-F3 filter와 10% ND 의 표준품인 666-F4 filter를 사용하여 440.0, 465.0, 546.1, 590.0, 635.0 nm에서, 흡광도 정밀도점검시험의 경우 635.0 nm에서 수행하였다.본 연구에서 실험대상으로한 UV-VIS 기기는 광주와 전남에 소재하고 있는 의약품관련회사 및 약품연구소에서 사용하고 있는 총 8대의 UV-VIS 분광분석기기로(4개 기기회사의 6기종: [TU 1800 (P. General Inst. Corporation), Opron 3000 (Hanson Tech.), Optizen UV 2120 (Mecasys), UV2401, UV1700, UV1601-A, B, C (Shimadzu)] 이 기기들을 대상으로 validation 시험을 수행하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. UV-VIS 분광기기 Validation 가이드라인 시행 순서

아래는 본 연구에서 제정한 UV-VIS 기기 Validation 가이드라인을 순서대로 작성하였다. UV-VIS 기기 validation은 필요에 따라 할 수 있으나 6개월을 주기로 기기 validation하도록 한다. 모든 Validation 시험과정은 UV-VIS기기의 전원을 켜서 자동초기화 시킨 후 1시간정도 그대로 두어 UV-VIS 기기를 안정화시킨 후 기기 validation을 하도록 한다. 각 파장에서 absorbance를 측정할 때는 항상 auto zero기능을 사용한 후 absorbance를 측정하도록 한다.

2.2.1.1. Wavelength accuracy 점검

- 1) 먼저 spectrum mode를 선택한 후 측정 mode를 "E"(Energy)로 조정한다.
- 2) scan 범위를 660-650nm로 조정하고 기록 범위를 0~150 E로 조정한다.
- 3) scan 속도를 "Slow"로 조정한다.
- 4) 광원선택을 D2 lamp로 한다.
- 5) 660-650 nm에서 Wavelength accuracy를 측정한다.
- 6) 나타난 spectrum의 Peak detection을 하여 λmax 파장과 E를 기록한다.
- 7) λ_{max} 파장을 656.1 nm와 비교하여 허용한도가 < \pm 0.3 nm 인지를 판별한다.
- 8) 다시 scan 범위를 490-480 nm로 조정하고 기록 범위를 0~30 E로 조정한다.
- 9) 3,4순서와 동일하게 한 후 490-480 nm에서 Wavelength accuracy를 측정한다.
- 10) 나타난 spectrum의 Peak detection을 하여 λ_{max} 파장과 E를 기록한다.
- 11) λ_{max} 파장을 486.0 nm과 비교하여 허용한도가 < \pm 0.3 nm 인지를 판별한다.
- 12) 앞에서와 같이 D2 lamp 를 사용하여 방출파장의(486.0, 656.1 nm) 정확도를 점검할 수 없을 경우에는 Hellma filter 666-F1를(Hellma GmbH & Co. Germany) 사용하여 279, 361, 453, 536, 638 nm에서 파장검사를 하여 정확도의 허용한도가 각각 ± 0.5 nm 이내가 되도록 한다.

2.2.1.2. Wavelength repeatability 점검

- 1) 앞에서의 방법대로 D2 lamp의 λ_{max} 파장을 486.0 nm 가 나오는지 Wavelength를 3번 측정하여 그 결과를 기록한다. 3번 측정한 파장의 평균값을 계산한다.
- 2) 같은 방법으로 D2 lamp의 λ_{max} 파장을 656.1 nm 가 나오는지 Wavelength를 3 번 측정하여 그 결과를 기록한다. 3번 측정한 파장의 평균값을 계산한다.

- 3) 앞에서 얻은 3번 측정의 각각 평균값을 486.0 nm, 656.1 nm와 비교하여 허용한도가 < ± 0.2 nm 인지를 판별한다.
- 4) 앞에서와 같이 D2 lamp 를 사용하여 방출파장의(486.0, 656.1 nm) 정밀도를 점검할 수 없을 경우에는 Hellma filter 666-F1를(Hellma GmbH & Co. Germany) 사용하여 279, 361, 453, 536, 638nm에서 파장검사를 하여 정밀도의 허용한도가 각각 ± 0.3 nm 이내가 되도록 한다.

2.2.1.3. Photometric accuracy 점검

Hellma Secondary spectroscopic calibration standards 30% ND (Neutral density)의 표준규격품인 666-F3 filter와 10% ND 의 표준품인 666-F4 filter를 (Hellma GmbH & Co. Germany) 사용하여 Photometric Accuracy를 점검한다.

- 1) 666-F4 filter를 사용하여 440.0, 465.0, 546.1, 590.0, 635.0 nm 파장에서의 Absorbance를 측정하여 기준값과 비교하여 그 편차를 계산한다. 각 파장에서의 측정값의 각각의 편차가 허용한도가 < ± 0.01 Abs 범위인지를 판별한다.
- 2) 666-F3 filter를 사용하여 440.0, 465.0, 546.1, 590.0, 635.0 nm 파장에서의 Absorbance를 측정하여 기준값과 비교하여 그 편차를 계산한다. 각 파장에서의 측정값의 각각의 편차가 허용한도가 < ± 0.01 Abs 범위인지를 판별한다.
- 3) 흡광도 정확도 점검 시 Hellma filter 666-F3 (30% ND)와 666-F4 (10% ND)가 없을 경우: 130℃에서 건조시킨 중크롬산칼륨의 무게를 60.06 mg달아 0.005M 황산용액에 녹여 1L용액을 만든다. 위의 시료를 파장 235 nm(극소), 257nm(극대), 313 nm(극대)에서 흡광도를 측정하여 E_{1cm}를 계산한다. 계산한 E_{1cm}이 다음 허용한도에 들어오는지를 판별한다. 235 nm : 122.9-128.2(124.5 기준), 257 nm : 142.4-145.7(144.0 기준), 313 nm : 47.0-50.3(48.6 기준), 350 nm : 104.9-108.2(106.6 기준)

2.2.1.4. Photometric repeatability 점검

- 1) 666-F4 filter를 사용하여 635.0nm 파장에서의 Absorbance를 3번 측정하여 그 결과를 기록한다. 3번 측정한 파장의 평균값과 최대편차를 계산한다. 앞에서 얻은 3번 측정의 평균값의 허용한도가 < ± 0.004 Abs 인지를 판별한다.
- 2) 666-F3 filter를 사용하여 635.0nm 파장에서의 Absorbance를 3번 측정하여 그 결과를 기록한다. 3번 측정한 파장의 평균값과 최대편차를 계산한다. 앞에서 얻은 3번 측정의 평균값의 허용한도가 < ± 0.002Abs 인지를 판별한다.

2.2.1.5. Baseline flatness 점검

- 1) 먼저 spectrum mode를 선택한 후 측정 mode를 "ABS"(Absorbance)로 조정한 다
- 2) Scan 범위를 900-190 nm로 조정한다.
- 3) Photometric 범위를 -0.01~0.01 Abs.로 조정한다.
- 4) Scan 속도를 "Slow"로 조정한다.
- 5) Baseline correction 작업을 수행한 후 Baseline flatness를 측정한다.
- 6) Baseline flatness를 측정한 spectrum에서 shock noise를 제외하고 Baseline 최대값과 최소값을 기록한 후 그 최대값과 최소값이 < ± 0.002 Abs 인지를 판별한다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1.주요나라 약전에 명시된 UV-VIS분광기기의 validation항목

미국, 영국, 유럽, 일본의 약전에서 최근까지 제시하고 있는 의약품 분석장비로서의 UV-VIS 분광기기 validation에 있어서 필요로 하는 여러 항목과 허용한도등 관련된 내용을 조사하였다 [5-8]. Table 1에서 보는 바와 같이 약품분석을 위한 규제요건을 위한 UV-VIS 분광학적 기기의 주요나라의 약전에서의 성능시험항목이 나타나 있다. 국가마다 약전들의 성능시험항목이 동일하게 나타나 있지 않

지만 대체적으로 필수성능시험에는 파장 정확도 (wavelength accuracy), 흡광도 정확도 (absorbance accuracy), stray light, resolution 등의 항목들이 들어있고 잡음(noise), 바탕선 편평도(baseline flatness), 안정도 (stability) 등 UV-VIS 분광학적 기기의 성능에 영향을 주는 항목들이 들어있다. 특히 spectrophotometer의 대표적 기기로 사용되는 UV-VIS 분광기기의 경우에는 파장 (wavelength)과 흡광도 (absorbance) 검정이 가장 중요하기 때문에 GLP, ISO9000 그리고 ISO/IEC Standard 17025같은 국제적으로 인정된 품질시스템에 따라서 확인된 물질을 사용하여 검정하여 validation하도록 하게 되어있다 [4, 9-13].

Table 1은 미국약전, 유럽약전, 영국약전, 일본 약국방에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항목과 validation 방법과 허용한도를 보여주고 있다. Table 2의 미국약전의 경우 UV-VIS 분석기기에서 파장과 흡광도 항목으로 기기성능을 검증할 것을 기술하고 있다 [5]. 파장 정확도시험을 위해서 Quartz-mercury arc를 사용하여 253.7, 302.25, 313.16, 334.15, 365.48, 404.66, 435.83nm에서, Glass-mercury arc를 사용하여 302.25, 313.16, 334.15, 365.48, 404.66, 435.83nm에서, H2 discharge lamp를 사용하여 486.13, 656.28nm에서 방출되는 파장으로 검증할 수 있는 것으로 기술하고 있다. 또한 Standard Didymium (praseodymium & neodymium 혼합물) glass filter나 Holium glass filter, Holium oxide 용액을 사용할 수 있음을 제시하였고 인증된 Holium oxide 용액으로 NIST 표준인증물질 SRM 2034이 이용 가능함을 기술하고 있다 [14,15]. 흡광도또는 투광도 정확도 시험을 위해서는 potassium chromate 또는 potassium dichromate의 알려진 투광도의 표준용액이나 NIST 표준인증물질인 SRM 931, SRM 930의 무기(inorganic) glass filter를 사용할 수 있음을 기술하고 있다 [16,17].

Table 3의 유럽약전과 영국약전의 경우 파장 정확도, 흡광도 정확도, stray light 한계, resolution, slit 넓이, cell에 대해 기술하고 있다 [6,7]. 파장의 경우 Holmium perchlorate 용액의 흡수최대파장 측정하여 241.15, 287.15, 361.5, 536.3nm, H2 또는 D2 방출램프를 사용하여 각각 486.1 (Ηβ), 486.0nm

(Dβ), Hg lamp를 이용하여 253.7, 302.25, 313.16, 334.15, 365.48, 404.66, 435.83, 546.07, 576.96, 579.07 nm 검증할 것을 기술하여 허용한도는 UV 영역은 ± 1nm, visible 영역은 ± 3 nm이내가 될 것을 규정하고 있다. 흡광도의 경우 Neutral density glass filter 또는 적절한 표준인증물질을 사용하여 정확도를 측정하도록 하고 허용한도는 흡광도 ± 0.01 이내로 규정하였다. Potassium dichromate 용액을 사용하여 흡광도의 정확도를 측정할 경우 비흡광도 $A^{1\%}_{1cm}$ 의 최대허용한도를 235 nm에서 122.9-126.2, 257 nm에서 142.8-146.2, 313nm에서 47.0-50.3, 350 nm에서 105.6-109.0로 규정하였다 [17]. Stray light은 적절한 filter나 용액으로 측정하는데 한 예로 12g/L KCI용액을 사용하여 1cm cell에서 UV 198 nm-202 nm의 흡광도 값이 2.0이상이 되도록 규정하였다. Resolution 항목을 위해서는 0.02%(v/v) toluene/hexane용액을 이용하여 269 nm근처의 최대흡광도와 266 nm근처의 최소흡광도의 최소비가 1.5가 되도록 규정하였다.

Table 4의 일본약국방의 경우 저압 Hg lamp를 사용하여 253.65 nm 365.02 nm, 435.84 nm, 546.07 nm, D2 lamp사용 시 486.00 nm와 656.10 nm에서의 파장의 정확도 (허용한도는 ± 0.3 nm이내)와 3회 측정시 정밀도 (허용한도는 ± 0.2 nm이내)를 규정하고 있다 [8]. 광학 filter를 사용할 경우 파장 정확도의 허용한도는 ± 0.5 nm이내로 3회 측정 시 정밀도의 허용한도는 ± 0.2 nm이내로 규정하고 있다. 투과도의 경우 광학 filter의 검정정확도를 ± 1% 이내로 하여 허용치를 ± 2% 이내로 규정한다. 예를 들어 투과율 30%의 경우(흡광도 0.523) 규정한 허용치가 ± 2%이므로 29.40-30.60%범위를 가지게 되어 흡광도 범위를 0.523 ± 0.008라 할수 있다. 또한 투과율 10%의 경우(흡광도 1.000) 규정한 허용치가 ± 2%이므로 9.80-10.20%범위를 가지게 되어 흡광도 범위를 1.000 ± 0.008라 할수 있다. 그러므로 흡광도로 환산한 정확도는 ± 0.008 Abs 이내로 설정할수 있다. 또한 3회측정 시 흡광도의 정밀도 (10% ND 사용 시 ± 0.004 Abs 이내, 30% ND 사용 시 ± 0.002 Abs 이내)를 규정하고 있다.

3.2. UV-VIS분광기기의 주요기기회사에서 규정한 주요 validation항목

또한 Table 5-7에서 UV-VIS 분석기기를 취급하는 Shimadzu, HP, Thermo 회사에 서 사용하는 validation 자료를 수집하여 조사하였다 [18-20]. UV-VIS 기기회사 에서 사용하는 validation 경우에는 각국 약전에서 언급한 항목뿐만 아니라 기기 회사에 따라 기능에 따른 여러 종류의 validation 항목이 있지만 주요 각국 약전 들의 시행규격항목의 공통적인 validation 항목을 중심으로 자료를 정리하였다. 그래서 주요 각국 약전의 validation항목에서 일반적으로 공통적인 파장 정확도, 흡광도 정확도, stray light 등의 항목에 바탕선 편평도(baseline flatness), 안 정도 (stability), 잡음(noise) 등의 항목이 추가되어 있음을 볼 수 있다. 기기 의 validation 항목을 시험하는 방법도 각국 약전의 경우와 대체적으로 유사함을 발견할 수 있다. 예를 들어, 파장 시험항목의 경우 D2 lamp, holium filter, didymium filter 등을 사용하고 흡광도 시험항목의 경우에도 potassium dichromate용액이나 검증된 neural density glass filter 등을 사용하도록 되어 있고 그 허용한도도 기기회사에 관계없이 전체적으로 유사함을 볼 수 있다. 그 외 UV stray light, resolution, stability, noise 항목도 그 시험방법이나 허용 한도에서 기기회사에 따라 큰 차이가 없음을 알 수 있다.

3.3. 본 연구에서 제정한 UV-VIS분광기기의 validation항목과 허용한도

미국, 유럽, 일본 등의 주요 각국 약전들에 나타난 UV-VIS 분광기기의 성능시험항목과 여러 회사에서 사용하고 있는 UV-VIS 분광기기의 validation 항목과 그들의 허용한도를 비교 검토하여 국내 약전에 적용할 수 있는 validation 가이드라인을 Table 8에서 보는 바와 같이 제정하여 제안하였다. 파장시험의 경우 D2 lamp나 검증된 holium filter등 표준물질을 이용하여 시험하도록 하였고 앞에서의 자료를 참조하여 파장 정확도와 정밀도 허용한도를 D2 lamp 사용 시각각 ±0.3 nm, ±0.2 nm이내, 검증된 holium filter등 표준물질 사용 시각각 ±0.5 nm, ±0.3 nm 이내로 제정하였다. 흡광도시험의 경우 10%, 30%투과율을 보이는인증표준filter를 이용하여 시험하는데 흡광도 정확도 허용한도를 440.0, 465.0, 546.1, 590.0, 635.0 nm에서 ±0.01이내의 흡광도로 제정하였으며 흡광도 정밀도 점검시험의 경우 허용한도를 635.0 nm에서 10% 투과 filter사용 시 ±0.004 이내

의 흡광도, 30% 투과 filter사용 시 \pm 0.002 이내의 흡광도로 제정하였다. 또한 바탕선 편평도(baseline flatness)는 190 nm - 900 nm에서 측정하여 허용한도를 \pm 0.002 이내의 흡광도로 제정하였다.

3.4 제정한 UV-VIS분광기기의 validation 가이드라인의 적용

Table 8에서 제정한 UV-VIS 기기 validation 가이드라인을 적용하여 현재 의약 품제조회사나 약품연구소에서 사용되고 있는 총 8대의 UV-VIS 분광기기를 「4개 기기회사. 6기종 UV-VIS 분광분석기기; TU 1800 (P. General Corporation), Opron 3000 (Hanson Tech.), Optizen UV 2120 (Mecasys), UV2401, UV1700, UV1601-A, B, C (Shimadzu)] 대상으로 validation 시험을 수행하였고 그 결과를 Table 9-16에서 보여주고 있고 대표적인 실험결과를 그림 1,2에서 보여주 고 있다. 그 결과 Table 14를 제외한 3개 기기회사 5기종 7개의 UV-VIS 분광기기 [TU 1800 (P. General Inst. Corporation), Optizen UV 2120 (Mecasys), UV2401. UV1700, UV1601-A, B, C (Shimadzu)]는 Table 8에서 제정한 validation 가이드라 인의 허용범위를 통과하였지만 Table 14의 Opron 3000 (Hanson Tech.)의 1개의 UV-VIS분광기기는 validation 가이드라인의 허용범위를 통과하지 못하였다. 제정 한 validation 가이드라인의 허용범위를 통과한 7개의 UV-VIS 분광기기의 경우, Table 9-13, Table 15,16에서 보는 바와 유사하게 모든 validation 항목에서 허 용한도 이내의 결과를 보여주고 있다. Table 14의 Opron 3000 UV-VIS 분광기기의 경우, 파장 정확도와 흡광도 정확도 항목에서 허용한도를 벗어나 있음을 보여주 고 있다. 파장 정확도 시험의 경우 holmium filter의 표준인증물질을 사용하였는 데 5개 검사 파장 중 4개의 파장에서 허용한도 0.5 nm를 초과한 결과를 보여주고 있다. 또한 흡광도 정확도시험의 경우. 10% ND filter사용 시 546.1. 590.0 nm에 서 흡광도 허용한도인 0.01을 초과한 결과를 보여주고 있어 이 기기는 의약품품 질관리를 위한 분석기기로 적합하지 않아 기기자체를 보정 수리해야 할 것이 요 청된다.

4. 결 론

UV-VIS 분광분석기기를 사용하여 신뢰할만한 분석실험결과를 가지도록 하는 것은 특히 의약품분석을 위해서는 필수적인 상황이지만 현재 국내의 의약품품질관리 관련규정에는 의약품분석을 위한 의약품 분석 장비로서의 UV-VIS분광기기의 validation 가이드라인이 명시되어 있지 않는 상황이다. 본 연구에서 주요국가의약전에서 제시하고 있는 의약품 분석 장비로서의 UV-VIS 분광학적 기기의 validation자료를 조사하였고 또한 시판되고 있는 여러 기기회사의 기기 validation에 관련된 자료를 분석하였다. 이러한 자료들을 바탕으로 본 연구에서 UV-VIS 분광기기의 validation 가이드라인을 제정하여 제안하였고 이를 이용하여의약품 제조업소에서 사용하고 있는 의약품 분석 장비의 UV-VIS 분광기기의 validation 시험검사를 시행하였다. 본 연구에서 제정한 UV-VIS 분광기기의 validation 가이드라인을 기초 자료로 삼아 적절하고 실제적인 UV-VIS 분석기기의 validation과 관련된 시행규칙을 제도화하여 의약품분석의 신뢰할 만한 결과를 줄 수 있도록 하고 이를 통해 의약품 품질관리 수준의 향상할 수 있으리라 기대한다.

Table 1. 주요나라의 약전에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항목

	Validation items	USP 28 (2005)[5]	BP (2001)[6]	EP 5th (2005)[7]	JP 14th (2001)[8]
1	Wavelength accuracy	0	0	0	0
2	Wavelength reproducibility				0
3	Photometric accuracy	0	0	0	0
4	Photometric reproducibility				0
5	Resolution		0	0	
6	Stray light		0	0	
7	Baseline flatness Noise Stability				

Table 2. 미국 약전에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항목과 Validation 방법과 허용한도[5]

항목	Validation 방법과 허용한도
Wavelength accuracy	-Quartz-mercury arc 사용하여 253.7, 302.25, 313.16, 334.15, 365.48, 404.66, 435.83nm 점검 - Glass-mercury arc 사용하여 302.25, 313.16, 334.15, 365.48, 404.66, 435.83nm 점검 - H2 discharge lamp 사용하여 486.13, 656.28nm 점검 - Standard Didymium (praseodymium & neodymium 혼합물) glass filter 사용가능 - Holium glass filter, Holium oxide 용액 사용가능 (인증된 Holium oxide 용액:NIST SRM #2034 이용하여 240-650nm 점검)
Photometric accuracy	- Inorganic glass filter, Neutral density glass filter 사용 - Potassium chromate or Potassium dichromate 표준 용액

Table 3. 영국, 유럽 약전에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항목과 Validation 방법과 허용한도[6,7]

항목	Validation 방법과 허용한도
Control of Wavelength	- Holmium perchlorate 용액 흡수최대파장 측정
Control of Absorbance	- Glass filter 사용 - Potassium dichromate 용액 사용하여 Absorbance 허용한도 < ± 0.01 파장에 따른 A ^{1%} _{1cm} 최대허용한도: (235nm, 122.9-126.2; 257nm, 142.8-146.2; 313nm, 47.0-50.3; 350nm, 105.6-109.0)
Limit of stray light	- 주어진 파장에서 적절한 filter나 용액을 사용하여 stray light 검출 * 1cm cell에서 1.2%(w/v) KCI용액 Abs. > 2 (220nm-200nm)
Resolution	0.02% toluene/ hexane (V/V) 스펙트럼: 269nm에서의 최대흡광도와 266nm에서의 최소흡광도의 최소비
Spectral slit width & Cells	- Spectral slit width 로 인한 오차를 줄이도록 - Cell의 투과길이 허용한도 <± 0.005cm

Table 4. 일본 약국방에서 UV-VIS 분광기기에서 요구하는 validation 항목과 Validation 방법과 허용한도[8]

항목	Validation 방법과 허용한도
Wavelength accuracy & precision	* Wavelength 정확도측정 < ± 0.3 nm - low pressure Hg lamp: 253.65nm 365.02nm, 435.84nm, 546.07nm 점검 - D2 lamp: discharge lamp 사용하여 486.00nm와 656.10nm 점검 * Wavelength 3번 반복하여 정밀도측정 < ± 0.2 nm
Absorbance accuracy & precision	* 투과도의 경우: optical filter를 사용, 허용치 < ± 2% Absorbance로 환산시: 정확도 <± 0.008Abs * Absorbance 3번 반복하여 정밀도 점검 Abs. > 0.5 경우 허용한도 <± 0.004Abs, Abs. < 0.5 경우 허용한도 <± 0.002Abs

Table 5. Shimadzu회사 UV/ VIS 분광학적 기기의 validation 항목과 허용한도 [18]

	Validation 항목	설명	허용한도
1	Wavelength accuracy	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의 (486.0, 656.1 nm) 정확도 점검	± 0.3 nm 이내
2	Wavelength repeatability	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의 (486.0, 656.1 nm) 정밀도 점검	± 0.1 nm 이내
3	Photometric Accuracy	10%, 30% ND (Neutral density) filter를 사용하여 흡광도의 정확도 점검	10% ND filter 사용 시 ± 0.004Abs 이내 30% ND filter 사용 시 ± 0.002Abs 이내
4	Photometric Repeatability	10%, 30% ND (Neutral density) filter를 사용하여 흡광도의 정밀도 점검	10% ND 사용 시 ± 0.002Abs 이내 30% ND 사용 시 ± 0.001Abs 이내
5	Baseline flatness	190 nm - 900 nm에서 바탕선의 편평도 측정	± 0.001Abs 이내

Table 6. Hewlett Packard회사 UV/ VIS 분광학적 기기의 validation 항목과 허용 한도[19]

	Validation 항목	설명	허용한도
1	Wavelength accuracy	표준 Holium 산화물 용액 (NIST SRM # 2034) 사용하여 측정	± 0.5 nm 이내
2	Photometric Accuracy	Neutral density glass filter (10% 투과하는 NIST SRM 930e)를 사용측정 또는 6% (w/v) potassium dichromate 녹인 0.01N 황산용액 (NIST SRM 935a)를 사용하여 측정	± 0.005Abs 이내 (NIST SRM 930e) ± 0.01Abs 이내 (NIST SRM 935a)
3	Baseline flatness	바탕선의 편평도측정	< 0.001Abs
4	UV Stray light	Hoya 056 filter또는 적절한 용액 220-340 nm에서 사용하여 측정	50g/L NaNO ₂ 사용 시 0.05%이내 (340 nm) 10g/L Nal 사용 시 0.07%이내 (220 nm) 1.2% KCI 사용 시 1%이내 (200 nm)
5	Resolution	0.02%(v/v) toluene/hexane사용하여 269 nm와 266 nm의 흡광도 비	> 1.5
6	Stability	온도를 높인 후 1시간 이상 매 5초간 340 nm에서 측정	< 0.001Abs/hr
7	Noise	500 nm에서 진공상태의 샘플로 측정	< 0.0002Abs

Table 7. Thermo회사 UV/ VIS 분광학적 기기의 validation 항목과 허용한도[20]

	Validation 항목	설명	허용한도
1	Wavelength accuracy	Holmium 또는 Didymium filters 사용 (241-807 nm)	± 0.3 nm 이내 (684, 740, 807nm의 경우 ± 0.5 nm 이내)
2	Wavelength repeatability	Holmium 또는 Didymium filters 사용 (241-807 nm)	± 0.1 nm 이내
3	Photometric Accuracy	Neutral density glass filter사용	파장과 filter종류에 따라 ± 0.004-0.012Abs 이내
4	Photometric Neutral density glass Repeatability filter사용		파장과 filter종류에 따라 ± 0.002-0.008Abs 이내
5	Baseline flatness	200 to 800 nm	±0.001Abs 이내
6	UV Stray light	1.2% KCI (200 nm cut-off)용액 또는 1% NaI (260 nm cut-off)	KCI solution (200 nm): >2.0Abs Nal solution (220 nm): <0.02%T
7	Stability	340 nm에서 측정	< 0.0005 Abs/hr

Table 8. 제안한 UV/ VIS 분광학적 기기의 validation 항목과 허용한도

	Validation 항목	설명	허용한도
		D2 lamp 를 사용하여 방출파장의	< ± 0.3 nm
	Wavelength	(486.0, 656.1 nm) 정확도 점검	(D2 lamp)
1	accuracy 점검	또는 여러 파장에서 Holmium filter를	< ± 0.5 nm
		사용하여 점검	(Holmium filter)
	Wavelength	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의	< ± 0.2 nm
2	_	(486.0, 656.1 nm) 정밀도 점검	(D2 lamp)
-	repeatability	또는 여러 파장에서 Holmium filter를	< ± 0.3 nm
	점검	사용하여 점검	(Holmium filter)
	Photometric Accuracy 점검	10%ND (Neutral density) (666-F4 filter)	각각 파장의 흡광도
3		30% ND (666-F3 filter) 를 사용하여	편차
		각각 파장에서 흡광도의 정확도 점검	< ± 0.01 Abs
	Dhotomotrio	100/ND (Noutral dansity) (GGC E4 filter)	10% ND 사용 시
	Photometric 10%ND (Neutral density) (666-F4 filter)		< ± 0.004Abs
4	Repeatability	30% ND (666-F3 filter) 를 사용하여	30% ND 사용 시
	점검	635.0nm에서 흡광도의 정밀도 점검	< ± 0.002 Abs
	Dagalina	100 pm 000 pm0 U U El H 0	Baseline max. &
5	Baseline		
	flatness	편평도 측정	< ±0.002 Abs

Table 9. UV2401 (Shimadzu) (S/N A10833500586 S5)의 validation 결과

	Validation 항목	방법 및 Reference	결과	결과편차	허용한도	Validation
		D2 lamp 방출파장				결과
1	Wavelength accuracy 점검	486.0 nm 656.1 nm	485.7 nm 655.9 nm	0.3 nm 0.2 nm	± 0.3 nm 이내	pass
2	Wavelength repeatability 점검	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의 (486.0, 656.1 nm) 3회 측정 정밀도 점검	485.7 485.7 485.7 nm 655.9 655.9 655.9 nm	평균 485.7 nm 최대편차 0.0 nm 평균 655.9 nm 최대편차 0.0 nm	± 0.2 nm 이내	pass
3	Photometric Accuracy 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 흡광도의 정확도 점검 (각각 파장에서 표준 흡광도 다름)	666-F3사용 각각 파장에서 Abs 0.449-0.496 666-F4사용 각각 파장에서 Abs 0.939-1.014	666-F3 사용 시 Abs 0.002-0.003 666-F4 사용 시 Abs 0.002-0.007	± 0.008Abs 이내	pass
4	Photometric Repeatability 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 635.0 nm에서 흡광도의 3회 측정 정밀도 점검	666-F3 Abs 0.491 0.491, 0.491 666-F4 Abs 0.992 0.991, 0.991	666-F3사용 시 평균 Abs 0.491 최대편차 Abs 0.000 666-F4사용 시 평균 Abs 0.991 최대편차 Abs 0.001	666-F3사용 시 ± 0.002Abs 이내 666-F4사용 시 ± 0.004 Abs	pass
5	Baseline flatness	190 nm - 900 nm에서 바탕선의 편평도 측정	max0.0017 Abs min: -0.0011 Abs		Baseline max. & min. ±0.002 Abs이	pass

Table 10. UV1601 (Shimadzu) (S/N A10753480100 SA)의 validation 결과

	V	HI HI BI O (74.71	24 21 24 21	-10-15	Validation
	Validation 항목	방법 및 Reference	결과	결과편차	허용한도	결과
1	Wavelength	D2 lamp 방출파장 486.0 nm	485.7 nm	0.3 nm	± 0.3 nm	pass
	accuracy 점검	656.1 nm	656.0 nm	0.1 nm	이내	
		D2 lamp 를 사용하여	485.8 485.7 485.7 nm	평균 485.7 nm		
2	Wavelength	방출파장의		최대편차 0.1 nm	± 0.2 nm	pass
	repeatability 점검	(486.0, 656.1 nm) 3회	656.0 656.0	평균 656.0 nm	이내	
		측정 정밀도 점검	656.0 nm	최대편차 0.0 nm		
		Hellma filter 666-F3	666-F3 사용 각각 파장에서	666-F3 사용 시		
	0	(30%ND)와 666-F4	Abs 0.450-0.490	Abs 0.002-0.004		
3	Photometric Accuracy 점검	(10%ND)를 사용하여	666-F4 사용		± 0.008Abs 이내	pass
		흡광도의 정확도 점검 (각각	각각 파장에서	666-F4 사용 시		
		파장에서 표준 흡광도 다름)	Abs 0.938-1.016	Abs 0.003-0.005		
				666-F3사용 시		
		Hellma filter 666-F3	666-F3	평균 Abs 0.491	666-F3사용 시 ±	
		(30%ND)와 666-F4	Abs 0.491	최대편차	0.002Abs	
4	Photometric	(10%ND)를 사용하여	0.491, 0.491	Abs 0.000	이내	pass
	Repeatability 점검	635.0nm에서 흡광도의 3회	666-F4	666-F4사용 시	666-F4사용	
		측정 정밀도 점검	Abs 0.991	평균 Abs 0.491	Л ±	
			0.991, 0.991	최대편차 Abs 0.000	0.004Abs	
				AN9 0.000	이내 Baseline	
		190 nm - 900 nm에서	max.+0.0010 Abs		max. & min.	
5	Baseline flatness	바탕선의 편평도 측정	min: -0.0003 Abs		±0.002 Abs	pass
					이내	

Table 11. UV1601 (Shimadzu) (S/N A10753480095 SM)의 validation 결과

	Validation 항목	방법 및 Reference	결과	결 과편 차	허용한도	Validation
	validation 8 =	O E & Deletelice	들 씨	필 파 진 사	시요되고	결과
1	Wavelength accuracy 점검	D2 lamp 방출파장 486.0 nm 656.1 nm	486.0 nm 655.9 nm	0.0 nm 0.2 nm	± 0.3 nm 이내	pass
2	Wavelength repeatability 점검	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의 (486.0, 656.1 nm) 3회 측정 정밀도 점검	486.0 486.0 486.0 nm 656.0 655.9 655.9 nm	평균 486.0 nm 최대편차 0.0 nm 평균 655.9 nm 최대편차 0.1 nm	± 0.2 nm 이내	pass
3	Photometric Accuracy 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 흡광도의 정확도 점검 (각각 파장에서 표준 흡광도 다름)	666-F3 사용 각각 파장에서 Abs 0.449-0.496 666-F4 사용 각각 파장에서 Abs 0.938-1.017	666-F3 사용 시 Abs 0.003-0.007 666-F4 사용 시 Abs 0.004-0.005	± 0.008Abs 이내	pass
4	Photometric Repeatability 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 635.0nm에서 흡광도의 3회 측정 정밀도 점검	666-F3 Abs 0.491 0.491, 0.491 666-F4 Abs 0.992 0.992, 0.992	666-F3사용 시 평균 Abs 0.491 최대편차 Abs 0.000 666-F4사용 시 평균 Abs 0.992 최대편차 Abs 0.000	666-F3사용 시 ± 0.002Abs 이내 666-F4사용 시 ± 0.004Abs 이내	pass
5	Baseline flatness	190 nm - 900 nm에서 바탕선의 편평도 측정	max.+0.0004 Abs min: -0.0004 Abs		Baseline max. & min. ±0.002 Abs이	pass

Table 12. UV1601 (Shimadzu) (S/N A10753401256 S2)의 validation 결과

	Validation 항목	방법 및 Reference	결과	결과편차	허용한도	Validation
1	Wavelength accuracy 점검	D2 lamp 방출파장 486.0 nm 656.1 nm	485.8 nm 656.3 nm	0.2 nm 0.2 nm	± 0.3 nm 이내	결과 pass
2	Wavelength repeatability 점검	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의 (486.0, 656.1 nm) 3회 측정 정밀도 점검	485.8 485.8 485.8 nm 656.2 656.3 656.3 nm	평균 485.8 nm 최대편차 0.0 nm 평균 656.3 nm 최대편차 0.1 nm	± 0.2 nm 이내	pass
3	Photometric Accuracy 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 흡광도의 정확도 점검 (각각 파장에서 표준 흡광도 다름)	666-F3 사용 각각 파장에서 Abs 0.449-0.497 666-F4 사용 각각 파장에서 Abs 0.938-1.011	666-F3 사용 시 Abs 0.002-0.003 666-F4 사용 시 Abs 0.002-0.005	± 0.008 Abs 이내	pass
4	Photometric Repeatability 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 635.0nm에서 흡광도의 3회 측정 정밀도 점검	666-F3 Abs 0.491 0.491, 0.491 666-F4 Abs 0.984 0.984, 0.984	666-F3사용 시 평균 Abs 0.491 최대편차 Abs 0.000 666-F4사용 시 평균 Abs 0.984 최대편차 Abs 0.000	666-F3사용 시 ± 0.002Abs 이내 666-F4사용 시 ± 0.004Abs	pass
5	Baseline flatness	190 nm - 900 nm에서 바탕선의 편평도 측정	max.+0.0004 Abs min: -0.0003 Abs		Baseline max. & min. ±0.002 Abs0l	pass

Table 13. UV1700 (Shimadzu) (S/N A11024101174 LP)의 validation 결과

	Validation 항목	방법 및 Reference	결과	결과편차	허용한도	Validation
	validation 5 ¬			250	0,00	결과
1	Wavelength accuracy 점검	D2 lamp 방출파장 486.0 nm 656.1 nm	485.8 nm 655.9 nm	0.2 nm 0.2 nm	± 0.3 nm 이내	pass
2	Wavelength repeatability 점검	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의 (486.0, 656.1 nm) 3회 측정 정밀도 점검	485.8 485.8 485.8 nm 655.9 655.9 655.9 nm	평균 485.8 nm 최대편차 0.0 nm 평균 655.9 nm 최대편차 0.0 nm	± 0.2 nm 이내	pass
3	Photometric Accuracy 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 흡광도의 정확도 점검 (각각 파장에서 표준 흡광도다름)	666-F3 사용 각각 파장에서 Abs 0.449-0.497 666-F4 사용 각각 파장에서 Abs 0.939-1.017	666-F3 사용 시 Abs 0.002-0.003 666-F4 사용 시 Abs 0.003-0.006	± 0.008Abs 이내	pass
4	Photometric Repeatability 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 635.0nm에서 흡광도의 3회 측정 정밀도 점검	666-F3 Abs 0.491 0.491, 0.491 666-F4 Abs 0.993 0.993, 0.993	666-F3사용 시 평균 Abs 0.491 최대편차 Abs 0.000 666-F4사용 시 평균 Abs 0.993 최대편차 Abs 0.000	666-F3사용 시 ± 0.002Abs 이내 666-F4사용 시 ± 0.004Abs	pass
5	Baseline flatness	190 nm - 900 nm에서 바탕선의 편평도 측정	max.+0.0006Abs min: -0.0004Abs		Baseline max. & min. ±0.002Abs이	pass

Table 14. Opron 3000 (Hanson Tech.)의 validation 결과

	Validation	H-H-OL Deference	결과	경기편된	허용한도	Validation
	항목	방법 및 Reference		결과편차	여용단도	결과
			278.0 nm	<u>-1.20 nm</u>	± 0.5 nm 이내	
	Wavelength	uracy filter를 이용하여 정밀도	360.0 nm	<u>-0.90 nm</u>		
1	accuracy		453.0 nm	<u>-0.65 nm</u>		fail
	점검		536.0 nm	-0.35 nm		iuii
	0 0		637.0 nm	<u>-0.75 nm</u>		
			(Holmium filter)			
	Wavelength	여러 파장에서 Holmium	278.0, 278.0, 278.0nm	0.0 nm		
2	repeatability	filter를 이용하여 정밀도			± 0.3 nm 이내	pass
	점검	점 검	360.0, 360.0, 360.0 nm	0.0 nm		
			666-F3 사용	666-F3 사용 시		
	Hellma f		각각 파장에서	Abs 0.001-0.005		
	Photometric		Abs 0.454-0.501		± 0.008Abs	fail
3	Accuracy					
	점검		666-F4 사용	666-F4 사용 시	이내	
			각각 파장에서	Abs 0.007 <u>0.009 0.014</u>		
			Abs 0.942-1.022	0.012 0.009		
				666-F3사용 시		
	Hellma filter 666-F3	666-F3	평균 Abs 0.493	666-F3사용 시		
		Abs 0.493	최대편차	± 0.002Abs		
	Photometric		0.493, 0.493	Abs 0.000	이내	
4	Repeatability		666-F4	666-F4사용 시	666-F4사용 시	pass
	점검		Abs 0.997	평균 Abs 0.997	± 0.004Abs	
			0.997, 0.997	최대편차	이내	
				Abs 0.000		
	Poolin-	100 pm = 000 pm 0111			Baseline	
5	Baseline 190 nm - 900 nm에서 flatness 바탕선의 편평도 측정			max. & min.		
				±0.002Abs이내		

Table 15. TU 1800 (P. General Inst. Corporation)의 validation 결과

	Validation 항목	방법 및 Reference	결과	결과편차	허용한도	Validation
		001 11577				결과
1	Wavelength accuracy 점검	D2 lamp 방출파장 486.0 nm 656.1 nm	485.7 nm 655.8 nm	0.3 nm 0.3 nm	± 0.3 nm 이내	pass
2	Wavelength repeatability 점검	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의 (486.0, 656.1 nm) 3회 측정 정밀도 점검	485.7 485.7 485.7 nm 655.8 655.8 655.8 nm	평균 485.7 nm 최대편차 0.0 nm 평균 655.8 nm 최대편차 0.0 nm	± 0.2 nm 이내	pass
3	Photometric Accuracy 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 흡광도의 정확도 점검 (각각 파장에서 표준 흡광도 다름)	666-F3 사용 각각 파장에서 Abs 0.449-0.497 666-F4 사용 각각 파장에서 Abs 0.939-1.019	666-F3 사용시 Abs 0.002-0.003 666-F4 사용시 Abs 0.004-0.008	± 0.008 Abs 이내	pass
4	Photometric Repeatability 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 635.0nm에서 흡광도의 3회 측정 정밀도 점검	666-F3 Abs 0.492 0.492, 0.492 666-F4 Abs 0.996 0.996, 0.996	666-F3 사용 시 평균 Abs 0.492 최대편차 Abs 0.000 666-F4사용 시 평균 Abs 0.996 최대편차 Abs 0.000	666-F3사용 시 ± 0.002Abs 이내 666-F4사용 시 ± 0.004Abs	pass
5	Baseline flatness	190 nm - 900 nm 에서 바탕선의 편평도 측정	max.+0.001 Abs min: 0.000 Abs		Baseline max. & min. ±0.002 Abs01	pass

Table 16. Optizen UV 2120 (Mecasys)의 validation 결과

	Validation 항목	방법 및 Reference	결과	결과편차	허용한도	Validation
1	Wavelength accuracy 점검	D2 lamp 방출파장 486.0 nm 656.1 nm	486.3 nm 655.8 nm	0.3 nm 0.3 nm	± 0.3 nm 이내	결과 pass
2	Wavelength repeatability 점검	D2 lamp 를 사용하여 방출파장의 (486.0, 656.1 nm) 3회 측정 정밀도 점검	486.3 486.3 486.2 nm 655.8 655.8 655.9 nm	평균 486.3 nm 최대편차 0.1 nm 평균 655.8 nm 최대편차 0.1 nm	± 0.2 nm 이내	pass
3	Photometric Accuracy 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 흡광도의 정확도 점검 (각각 파장에서 표준 흡광도 다름)	666-F3 사용 각각 파장에서 Abs 0.447-0.494 666-F4 사용 각각 파장에서 Abs 0.935-1.022	666-F3 사용 시 Abs 0.005-0.006 666-F4 사용 시 Abs 0.000-0.002	± 0.008 Abs 이내	pass
4	Photometric Repeatability 점검	Hellma filter 666-F3 (30%ND)와 666-F4 (10%ND)를 사용하여 635.0nm에서 흡광도의 3회 측정 정밀도 점검	666-F3 Abs 0.488 0.488, 0.488 666-F4 Abs 0.990 0.990, 0.990	666-F3사용 시 평균 Abs 0.488 최대편차 Abs 0.000 666-F4사용 시 평균 Abs 0.990 최대편차 Abs 0.000	666-F3사용 시 ± 0.002Abs 이내 666-F4사용 시 ± 0.004Abs	pass
5	Baseline flatness	190 nm - 900 nm에서 바탕선의 편평도 측정	max.+0.001 Abs min: 0.000 Abs		Baseline max. & min. ±0.002Abs0l 내	pass

그림 1 대표적인 UV 1601(Shimadzu) Wavelength accuracy (486.0nm)점검을 위한 실험결과

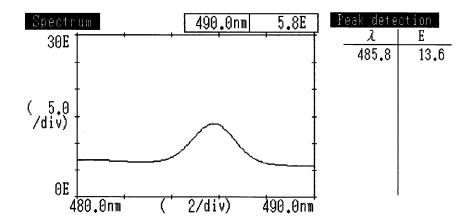
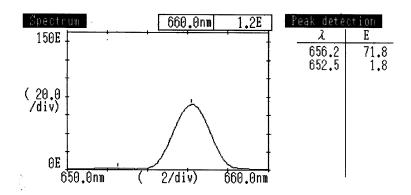


그림 2 대표적인 UV 1601(Shimadzu) Wavelength accuracy (656.1nm)점검을 위한 실험결과



Wavelength accuracy

	656.1nm		486.0nm	
1	655.9	0.2	485.8	0.2
2	655.9	0.2	485.7	0.3
3	656.0	0.1	485.8	0.2
Repeat	ability	0.1		0.1

of wavelength setting

Resolution: 1.8

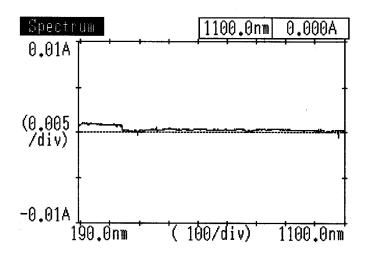


그림 4 UV 2401(Shimadzu) Wavelength accuracy (486.0nm)점검을 위한 실험결과

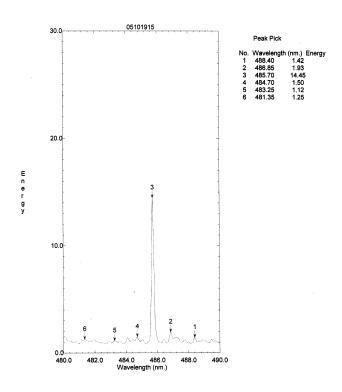


그림 5 UV 2401(Shimadzu) Wavelength accuracy (656.1nm)점검을 위한 실험결과

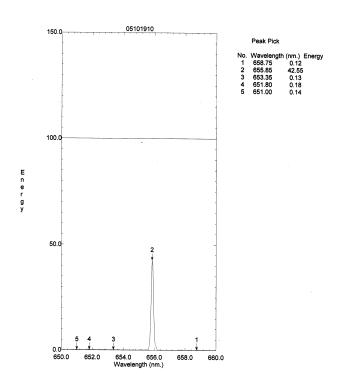
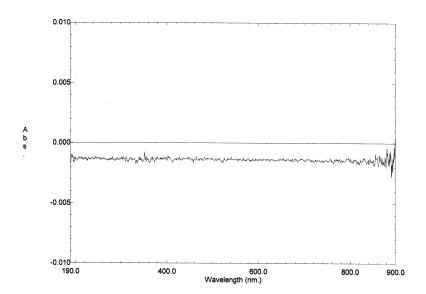


그림 6 UV 2401(Shimadzu) Baseline flatness 점검을 위한 실험결과



5. 참 고 문 헌

- 1 Lambert, J. B., Shurvell, H. F., Verbit, L., Cooks, R. G. and Stout, G. H.: Organic Structural Analysis, Collier Macmillan Publishers, New York, p.
- 315 (1976).
- 2 Chan, C. C.: Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification, John Wiley & Sons, New York, p. 153 (2004).
- 3 Owen, T.: Qualification of UV-VIS spectrophotometers: practical implementation, *Biopharm*. 62 (1999).
- 4 Richardson, A. C. and Messman, J. D.: Calibration and validation of UV-VIS absorption spectrophotometers *Biopharm*, 7 (1997).
- 5 The United States pharmacopoeia, 28th ed, p. 2495 (2005).
- 6 The British Pharmacopoeia, Appendix II B, A133 (2001).
- 7 The European Pharmacopoeia, 5th ed, Vol 1, p. 38 (2005).
- 8 The Japanese Pharmacopoeia (English Edition), 14th ed, p. 103 (2001).
- 9 Travis, J. C., Duewer, D. L. and Salit, M. L.: Intrinsic Standards for UV-VIS Spectrophotometry *Am. Lab.* **36**, p. 34 (2004).
- 10 Shultz, A. L., McLain, K. and Messman, J. D.: A full-service UV-VIS measurement science program *Am. Lab.* **31**, p. 36 (1999).
- 11 Shultz, A., Campbell, D. and Messman, J.: Reference material standardization guidlines for quality control and validation of UV/VIS absorption spectrophotometers *Cal. Lab.* p. 27 (1998).
- 12 Messman, J. D. and Smith, M. V.: Optical transmittance standard reference materials for ultraviolet and visible molecular absorption spectrometry *Spectrochimica Acta Part B*, **46**, p. 1653 (1991).
- 13 Refer to web sites for NIST standard reference materials and references documents.:http://ts.nist.gov/ts/htdocs/230/232/232.htm and http://ts.nist.gov/ts/htdocs/230/232/SP_PUBLICATIONS/PUBLICATIONS.HTM
- 14 Weidner, V. R., Mavrodineau, R., Mielenz, K. D., Velapoldi, R. A.,

- Eck-erle, K. L. and Adams, B.: Standard Reference Materials: Holmium Oxide Solution Wavelength Standard from 240 650 nm, SRM 2034, *N/ST Spec.Publ.* 260-102 (1986).
- 15 R. Weidner, R. Mavrodineanu, K. D. Mielenz, R. A. Velapolidi, K. L. Eckerle, and B. Adams,: Spectral transmittance characteristics of holmium oxide in perchloric acid solution *J. Res. National Bur. Standards*, **90**, p. 115 (1985).
- 16 Mavrodineanu, R., Burke, R. W., Baldwin, J. R., Smith, M. V., Messman, J. D., Travis, J. C. and Colbert, J. C.: Standard reference materials: glass filters as a standard reference material for spectrophotometry selection, preparation, certification and use of SRM 930 and SRM 1930, *N/ST Spec.Publ. 260-116* (1994).
- 17 Burke, R. W. and Mavrodineanu, R.: Standard reference materials: certification and use of acidic potassium dichromate solutions as an ultraviolet absorbance standard SRM 935. *N/ST Spec.Publ.* 260-54 (1977).
- 18 Standard operating procedures for performance validation of Shimadzu UV-Vis spectroscopy, Shimadzu Ltd, Analytical division, Singapore (1997).
- 19 Owen, A. J.: *Good laboratory practice with a UV-Visible spectroscopy system Application note*, Hewlett-Packard Publication number 12-5963-5615E (1995).
- 20 Thermo Electron Corporation Standards for UV-Vis spectroscopy, Thermo Electron Corporation Application Note 01147, Thermo Electron Corporation (2002).

제 2 장

HPLC를 이용한 아미노산유도체 이성질체의 광학분할 연구

1. 서론

α-아미노산은 키랄 작용기와 함께 상당한 중요성을 갖고 있으며 아미노관능기가 보호된 α-아미노산은 펩티드와 단백질의 합성에 널리 이용되고 있다 [1]. 따라서 아미노기가 보호된 아미노산의 광학이성질체 순도를 검출하는 분석방법도 매우 필요한 것으로 요청되어왔다 [2]. 몇 가지의 아미노산의 보호그룹 중에서 fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) 그룹은 가장 많이 사용되는 보호그룹으로써[3]특히 조합화학에서 (combinatorial chemistry) 여러 합성에 응용되는 고체상 (solid phase) 합성의 경우에 있어서 아민보호기로 널리 적용되고 있다 [4]. 또한 N-FMOC 보호그룹은 다른 α-아미노산의 보호그룹에 비하여 형광검출에 있어서 아주 민감한 장점을 갖고 있다 [5].

그러므로 액체크로마토그래피를 이용한 N-FMOC-α-아미노산의 광학이성질체 분 리는 cyclodextrin에서 유도된 키랄고정상과[6-8] 아미노산의 소분자, quinine, cinchona 등에서 유도된 brush-type 키랄고정상에서의 연구가 보고된 바가 있다 [9-14]. 그 중 예를 들면 몇 개의 N-FMOC-α-아미노산의 광학분할은 Armstrong 연구실에서의 macrocyclic antibiotic ristocetin A 와 Lindner 연구실의 cinchona-calixarene 혼합타입에서 유도된 키랄고정상과 [9,14] Pirkle연구실의 Pirkle-type 키랄고정상에서는 좋은 분리 결과를 얻었다 [12]. 그러나 대부분의 N-FMOC-α-아미노산의 광학이성질체들은 Armstrong 연구실에서의 cyclodextrin (α = 1.03-1.05) [7] 과 연구실에서의 아미노산에서 유도된 키랄고정상을 사용 했을 때 (α = 1.07-1.20) [10] 좋은 분리 결과를 나타내지 못했다. 또한 Lindner 연구실의 quinine, quinidine, cinchona alkaloids 에서만 유도된 brush-type 키랄고정상에서는 단지 N-FMOC-phenylalanine과 N-FMOC-alanine분석 물질의 광학분할만이 가능한 것으로 보고되었다 [11,13]. 다당류유도체를 기본으 로 하는 키랄고정상에서는 Chiralcel OD-R 키랄 고정상을 이용하여 유일하게 2차 아미노산형태의 일종인 N-FMOC-pipecolinic acid 유도체인 한개의 화합물만이 역 상 조건하에서 광학분할된 것이 보고되었다 [8].

본 연구에서는 일련의 N-FMOC-α-아미노산을 Chiralpak IA와 Chiralpak IB 등 공유결합 형태의 키랄고정상을 포함하여 모두 9가지 다당류 유도체를 기본으로 하는 키랄고정상을 이용하여 순상조건하에서 액체크로마토그래피를 이용한 광학 분할을 시도하려 한다[15-18].

2. 실험기기 및 방법

액체크로마토그래피 분석은 Waters model 510 펌프, 20mL loop를 가진 Rheodyne 7125주입기, UV검출기(Waters 490), HP 3396 시리즈 II 기록기로 구성된 HPLC 혹은 SCL-10A 시스템 제어기, LC-10AD 펌프, SPD-10AVP diode array 검출기로 구성된 HPLC(Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 상온에서 수행하였다. 키랄고정상으로는 Daicel Chemical Company (Tokyo, Japan)에서 구입한 Chiralcel OD-H, Chiralcel OD, Chiralpak IB, Chiralpak AD-RH, Chiralpak AD, Chiralpak IA, Chiralcel OJ-H, Chiralpak AS, Chiralcel OF 컬럼 (250mm L x 4.6mm I.D.)을 사용하였다. HPLC급 헥산(hexane)과 2-프로판올(2-propanol)은 J. T. Baker, (Phillipsburg NJ), trifluoroacetic acid (TFA)는 Aldrich (Milwaukee, WI)로부터 구입하였다. 라세미 혹은 enantiomerically pure한 N-FMOCα-아미노산은 문헌에 보고된 방법으로 합성하여 얻었다 [1].

3. 실험결과 및 고찰

Table 1-9에서는 N-FMOC-α-아미노산 광학이성질체의 9가지 다당류유도체의 키 랄고정상에서의 액체크로마토그래피 분리결과를 보여주고 있다. 이동상으로는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)을 포함한 2-propanol/hexane (v/v) 순상이동상을 사용하였다. Table 1-6에서 사용된 키랄고정상을 살펴보면, Chiralcel OD-H과 Chiralcel OD는 셀룰로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 코팅된 키랄고정상이고 Chiralpak IB는 셀룰로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 공유결합된 키랄고정상이다. 또

함 아밀로오스 Chiralpak AD-RH과 Chiralpak AD는 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 코팅된 <u>키랄고정상이고</u> Chiralpak IA는 아밀로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 공유 결합된 키랄고정상이다. Table 1-6 결과를 비교하여 보면 분리인자는 일반적으로 셀룰로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 키랄고정상에서 아밀 로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 키랄고정상에서보다 더 크다. 또한 Table 7,9의 Chiralcel OJ-H 와 Chiralcel OF 키랄고정상에서의 분리 Table 1,2 에서의 Chiralcel OD-H와 Chiralcel OD 키랄고정상에서보다 이성질체분리인자가 더 크거나 작다. 그러나 Chiralcel OJ-H 와 Chiralcel OF 키랄고정상에서의 광학분할 결과는 Chiralcel OD-H와 Chiralcel OD 키랄고정상 에 비하여 대부분 피크의 폭이 넓은 낮은 분리 결과를 보여준다. Table 1-9의 모 든 분석결과를 살펴보면 대체적으로 Chiralcel OD-H와 Chiralcel OD 키랄고정상 에서 가장 높은 분리인자를 보여준다. 또한 실험한 모든 N-FMOC-lpha-아미노산은 셀룰로오스 tris(3.5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 코팅된 OD-H 혹은 Chiralcel OD에서 base-line 을 유지하며 분리되었다. 또한 Chiralcel OD-H의 경우, Chiralcel OD와 비슷한 이성질체 입체선택성을 관찰할 수 있었다. 이와 반대로 Chiralpak AD-RH와 Chiralpak AS은 모든 키랄고정상 중에서 가 장 낮은 분리도를 보여주었으며 각각 6가지 분석물질의 이성질체가 분리되지 않 았다. 일반적으로 Chiralpak AD-RH의 경우 역상이동상에 광범위하게 사용되고 있 것으로 알려져 있다[19]. 그러나 본 연구에서는 0.1% TFA을 2-propanol/hexane(v/v)의 순상 이동상에서도 사용될 수 있음을 보여주고 있으 며 이것은 우리가 알기에는 처음으로 실험하여 연구발표한 결과로 알고 있다. 주 목할 것은 Table 1-9에서 실험한 모든 N-FMOC-α-아미노산의 광학분할 결과를 볼 때 Chiralcel OF 키랄고정상에서는 분리된 모든 분석물질의 경우 L-이성질체가 우선으로 용리되나 그 외의 다른 키랄고정상에서는 용리순서가 항상 일정하지는 않음을 보여준다. 이러한 결과는 N-FMOC-lpha-아미노산 분석물질과 Chiralcel OF 키랄고정상의 경우는 전반적으로 한가지 키랄인식 메커니즘이 주요하게 작용되는 것으로 생각하나 Chiralcel OF가 아닌 다른 키랄고정상들 사이에는 한가지 이상 의 키랄인식 메커니즘이 적용될것으로 여겨진다.

흥미로운 것은 동일한 키랄 분석물질의 결과를 비교해 볼 때, 아밀로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 공유결합 유형의 Chiralpak IA(Table 5)와 셀룰로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 공유결 합 유형의 Chiralpak IB(Table 6)는 각각의 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 코팅 유형의 Chiralpak AD(Table 4) 와 셀룰로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)에서 유도된 Chiralcel OD(Table 2)에 비해 일반적으로 낮은 이성질체 분리를 보여주고 있다 [17,18]. 또 한 앞에서 언급한 바와 유사하게 셀룰로오스 유도체를 기반으로 한 공유결합 유 Chiralpak IB는 아밀로오스 유도체를 기반으로 한 공유결합 Chiralpak IA에 비해 분리인자가 일반적으로 더 크다. 또한 Table 5와 Table 6의 Chiralpak IA와 Chiralpak IB의 공유결합 유형의 키랄고정상은 고정상과 키랄선택 자와의 공유결합 된 성질 때문에 Table 2와 Table 4의 Chiralpak AD나 Chiralcel OD의 코팅 유형의 키랄고정상보다 HPLC에서 훨씬 더 안정성을 보여주는 키랄고정 상의 장점을 갖고 있다. 그렇기 때문에 코팅 유형의 키랄고정상에서 전혀 사용할 수 없는 디클로로메탄 혹은 클로로포름 등 할로겐화 용매를 포함한 넓은 범위의 이동상의 사용에 적용될 수 있다.

Table 10-12 에서는 공유결합 유형의 Chiralpak IA과 Chiralpak IB에서 몇 가지 N-FMOC-α-아미노산의 광학이성질체 분리에 영향을 주는 이동상의 결과를 보여주고 있다. 위의 결과에서 분리인자와 용리순서는 이동상의 영향을 크게 받는 것을 보여주고 있다 [17,18]. Table 5,6에서 보여주는 바와 같이 대체적으로 0.1% TFA을 포함한 2-propanol/hexane(v/v) 을 이동상으로 사용 하였을 때 가장 높은 분리도를 나타내는 경향을 보여주고 있다. Chiralpak IB에서의 광학분할이 Chiralpak IA에서보다 훨씬 좋기 때문에 특히 Table 6의 경우 이러한 현상을 쉽게 찾아볼 수 있다.

그러나 Table 12의 결과에서는 이동상을 0.1%TFA을 포함한 dichloromethane/hexane/2-propanol 혹은 0.1% TFA 을 포함한 dichloromethane/hexane/ethanol을 사용하였을 때가 0.1% TFA을 포함한 2-propanol/hexane에서보다 분리도가 높은

경우도 있고 낮은 경우도 있어 분석물질에 따라 다름을 보여준다. 예를 들면 N-FMOC- α -leucine과 N-FMOC- α -valine은 0.1% TFA 을 포함한 dichloromethane/hexane/2-propanol 혹은 0.1% TFA 을 포함한 dichloromethane/hexane/ethanol을 사용하였을 때가 0.1% TFA을 포함한 2-propanol/hexane에서보다 분리도가 높은 경우이다. 그러나 N-FMOC- α -alanine, N-FMOC- α -phenylalanine 의 경우에는 대체적으로 0.1% TFA을 포함한 2-propanol/hexane에서보다 분리도가 높음에서보다 분리도가 높음을 나타낸다. 그러므로 Chiralpak IA과 Chiralpak IB의 공유결합의 키랄고정상은 넓은 범위의 용매 사용의 유리한 점으로 인하여 이성질 체분리의 새로운 적용을 위하여 아주 유용할 것으로 기대된다.

4. 결론

결론적으로 여러종류의 N-FMOC으로 보호된 α-아미노산들의 광학분할을 위해서 액체크로마토그래피를 이용하여 9가지 다당류유도체를 기본으로 한 키랄고정상에 순상조건하에서 키랄분리실험을 수행하였다. 그 중 셀룰로오스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) 다당류에서 유도된 Chiralcel OD-H와 Chiralcel OD 키랄고정상에서 가장 높은 광학분리도를 보여준다. 반면 아밀로오 스 tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) 다당류에서 유도된 Chiralpak AD-RH 와 Chiralpak AS에서는 광학분리도가 가장 작다. 실험한 모든 N-FMOC-α-아미노산 이성질체는 Chiralcel OD-H 혹은 Chiralcel OD에서 base-line 을 유지하며 분리 되었다. 따라서 이 두 키랄고정상은 N-FMOC-α-아미노산 이성질체 분리에 유용하 게 적용 될 것으로 기대된다. 또한 키랄선택자가 공유결합된 키랄고정상인 Chiralpak IA와 Chiralpak IB 은 안정한 공유결합 성질때문에 다당류에서 유도된 코팅타입의 키랄고정상에서 사용될 수 없는 넓은 범위의 용매 사용에 적합하여 Chiralpak IA와 Chiralpak IB의 두 키랄고정상은 이와 관련된 실험뿐만 아니라 여러 가지 이성질체분리에 아주 유용하게 적용될 것이라 기대된다.

Table 1. Chiralcel OD-H에서의 N-FMOC α-Amino Acids의 광학분리

	Analyte	e α ^a	k' ₁ ^b	Rs ^c	Conf. ^d
1	Ala	1.94	5.73	3.38	L
2	ABA^e	1.44	4.97	2.18	L
3	ACA^f	1.39	3.79	1.89	_
4	Asn	2.53	27.29	1.97	L
5	Asp	1.93	8.12	2.75	L
6	Gln	1.09	13.70	0.97	D
7	Glu	1.47	8.86	1.92	D
8	lleu	1.20	5.64	1.10	D
9	Leu	1.26	4.84	1.63	D
10	Met	1.27	9.00	1.68	D
11	Norleu	1.32	5.11	1.98	L
12	Norval	1.22	4.92	1.46	L
13	PG	1.82	7.90	2.09	L
14	Phe	1.32	8.47	1.54	L
15	Ser	2.70	6.98	4.15	D
16	Thr	1.41	5.11	1.57	L
17	Tyr	1.13	15.90 ^g	0.76	L
18	Val	1.00	4.40	-	-

Mobile phase; 10% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA .

a Separation factor. b Capacity factor for the first eluted enantiomer.

c Resolution factor. d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

e 2-Aminobutyric acid. f 2-Aminocaprylic acid.

g 30% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA.

Table 2. Chiralcel OD에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리

	Analyte	α a	k¹¹ ^b	Rs ^c	Conf. ^d
 1	Ala	1.79	5.47	5.14	 L
2	ABA ^e	1.37	4.94	2.84	L
3	ACA ^f	1.39	4.27	2.71	_
4	Asn	1.60	4.81 ^g	1.84	L
5	Asp	1.58	8.34 ^h	2.91	L
6	GIn	1.17	13.74	0.85	D
7	Glu	1.32	9.28	1.83	L
8	lleu	1.50	4.10	3.51	D
9	Leu	1.25	4.91	1.95	D
10	Met	1.13	7.41	1.07	L
11	Norleu	1.15	4.48	1.21	L
12	Norval	1.08	4.77	0.63	L
13	PG	1.69	7.54	3.50	D
14	Phe	1.10	8.09	0.67	L
15	Ser	2.55	2.55 ^g	5.09	L
16	Thr	1.49	6.94	3.03	L
17	Tyr	1.10	19.60 ^g	0.53	L
18	Val	1.13	4.32	1.05	D

Mobile phase; 10% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA .

a Separation factor.

b Capacity factor for the first eluted enantiomer.

c Resolution factor.

d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

e 2-Aminobutyric acid.

f 2-Aminocaprylic acid. g,h 20% and 15% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA, respectively.

Table 3. Chiralpak AD-RH에서의 N-FMOC α-Amino Acids의 광학분리

	Analyte	lpha a	k'¹ ^b	Rs ^c	Conf. ^d	
1	Ala	1.44	4.87	1.33	D	
2	ABA ^e	1.08	3.47	0.37	D	
3	ACA^f	1.10	2.82	0.60	_	
4	Asn	1.22	6.31	0.89	L	
5	Asp	1.08	4.59	0.63	L	
6	Gln	1.00	1.51	-	-	
7	Glu	1.39	4.87	1.40	L	
8	lleu	1.22	4.35	0.84	D	
9	Leu	1.21	3.29	0.89	L	
10	Met	1.00	5.77	-	-	
11	Norleu	1.00	3.43	-	_	
12	Norval	1.00	3.89	-	_	
13	PG	1.50	7.75	1.88	L	
14	Phe	1.16	5.04	0.83	L	
15	Ser	1.00	4.24	-	_	
16	Thr	1.10	4.88	0.68	D	
17	Tyr	1.00	1.52	-	_	
18	Val	1.14	4.58	0.82	D	

Mobile phase; 10% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA.

a Separation factor.

b Capacity factor for the first eluted enantiomer.

c Resolution factor.

d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

e 2-Aminobutyric acid.

f 2-Aminocaprylic acid.

Table 4. Chiralpak AD에서의 N-FMOC α-Amino Acids의 광학분리

	Analyte	lpha a	K'1 ^b	Rs ^c	Conf. ^d
1	 Ala	1.12	2.98	1.44	D
2	ABA ^e	1.12	3.23	1.37	D
3	ACA^f	1.12	2.75	1.36	_
4	Asn	1.21	6.65	2.10	L
5	Asp	1.17	4.70	0.94	D
6	GIn	1.44	5.42	3.83	L
7	Glu	1.26	5.14	2.72	L
8	lleu	1.19	3.71	1.99	D
9	Leu	1.18	3.02	1.83	L
10	Met	1.00	5.38	-	_
11	Norleu	1.07	9.44 ^g	0.94	D
12	Norval	1.11	10.19 ^g	1.60	D
13	PG	1.38	7.12	4.24	D
14	Phe	1.12	4.59	1.48	L
15	Ser	1.10	4.40	1.07	L
16	Thr	1.13	4.89	1.50	D
17	Tyr	1.29	23.79	3.45	L
18	Val	1.12	3.99	1.38	D

Mobile phase; 10% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA .

a Separation factor.

b Capacity factor for the first eluted enantiomer.

c Resolution factor.

d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

e 2-Aminobutyric acid.

f 2-Aminocaprylic acid. g 5% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA.

Table 5. Chiralpak IA 에서의 N-FMOC α-Amino Acids의 광학분리

	Analyte	α^{a}	k ' 1 b	Rs ^c	Conf. ^d
1	Ala	1.09	7.30	1.27	D
2	ABA ^e	1.03	7.75	0.21	D
3	ACA^f	1.04	6.55	0.60	_
4	Asn	1.29	9.56h	1.92	L
5	Asp	1.07	4.62h	0.73	D
6	Gln	1.09	7.46h	0.60	L
7	Glu	1.13	4.82h	1.29	L
8	lleu	1.08	7.76	1.10	L
9	Leu	1.24	6.68	3.36	L
10	Met	1.05	13.40	0.81	L
11	Norleu	1.05	7.06	0.51	L
12	Norval	1.00	7.56	_	_
13	PG	1.28	5.76h	3.50	D
14	Phe	1.09	4.00h	1.01	L
15	Ser	1.07	4.47h	0.76	L
16	Thr	1.06	4.60h	0.72	D
17	Tyr	1.17	13.58h	1.90	L
18	Val	1.06	8.10	0.87	L

Mobile phase: 5% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA

a Separation factor.

b Capacity factor for the first eluted enantiomer.

c Resolution factor.

d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

e 2-Aminobutyric acid.

f 2-Aminocaprylic acid. h 20% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA.

Table 6. Chiralpak IB에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리

	Analyte	lpha a	k'ı ^b	Rs ^c	Conf.d	
 1	Ala	1.64	8.22	7.47	L	
2	ABA^e	.36	6.81	5.11	L	
3	ACA ^f	1.27	5.57	3.37	-	
4	Asn	1.18	5.03h	1.28	L	
5	Asp	1.24	4.97j	1.78	L	
6	GIn	1.00	6.27h	-	-	
7	Glu	1.19	5.80j	1.53	L	
8	lleu	1.41	5.13	4.88	D	
9	Leu	1.35	5.29	4.09	D	
10	Met	1.07	4.20j	0.79	L	
11	Norleu	1.17	6.16	2.38	L	
12	Norval	1.12	6.61	2.25	L	
13	PG	1.34	3.88j	3.37	D	
14	Phe	1.09	3.81j	1.00	L	
15	Ser	1.86	1.96h	4.58	L	
16	Thr	1.10	4.40j	0.77	L	
17	Tyr	1.05	11.36h	0.40	L	
18	Val	1.15	5.30	2.00	D	

Mobile phase: 5% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA

a Separation factor. b Capacity factor for the first eluted enantiomer.

c Resolution factor.

d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

e 2-Aminobutyric acid.

f 2-Aminocaprylic acid.

h,i,j 20%, 15% and 10% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA, respectively.

Table 7. Chiralcel OJ-H 에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리

	Analyte	α	k¹¹ ^b	Rs ^c	Conf. ^d
1	Ala	1.47	3.67	1.32	D
2	ABA^e	2.38	3.01	2.78	D
3	ACA^f	1.52	1.26	0.84	
4	Asn	1.16	9.37	0.76	D
5	Asp	1.21	7.09	0.86	D
6	Gln	1.32	13.29	1.03	L
7	Glu	1.48	10.13	1.21	L
8	lleu	3.53	1.37	1.82	D
9	Leu	1.41	1.33	2.20	D
10	Met	1.74	6.34	2.05	D
11	Norleu	2.69	1.52	1.50	D
12	Norval	3.64	1.94	2.39	D
13	PG	1.00	12.75	-	-
14	Phe	1.11	5.20	0.69	D
15	Ser	1.10	7.27	0.73	D
16	Thr	4.68	4.48	2.75	D
17	Tyr	1.75	41.27	3.36	D
18	Val	2.89	1.74	2.90	D

Mobile phase; 10%, 5%, 20% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA

Flow rate=1mL/min;

Detection UV 254 nm.

- a Separation factor.
- b Capacity factor for the first eluted enantiomer.
- c Resolution factor.
- d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.
- e 2-Aminobutyric acid. f 2-Aminocaprylic acid.

Table 8. Chiralpak AS에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리

	Analyte	$\alpha^{\text{ a}}$	k′¹b	Rs°	Conf. ^d
1	Ala	1.00	9.97	_	_
2	ABA ^e	1.12	3.36 ^g	0.44	D
3	ACA^f	1.37	4.84	0.34	
4	Asn	1.33	7.29 ^h	0.92	D
5	Asp	1.24	25.18	1.06	L
6	Gln	1.00	16.73 ^h	_	-
7	Glu	1.19	10.54 ^g	0.65	D
8	lleu	1.00	5.49	_	-
9	Leu	1.00	6.48	_	-
10	Met	1.00	17.08	_	-
11	Norleu	1.29	6.21	0.77	L
12	Norval	1.24	8.45	0.55	L
13	PG	1.20	5.07 ^g	1.03	L
14	Phe	1.24	11.10	0.97	L
15	Ser	1.00	6.40 ^g	-	-
16	Thr	1.44	4.75 ^g	2.09	D
17	Tyr	1.10	6.63 ^h	0.22	L
18	Val	1.30	5.17	1.64	D

Mobile phase; 5% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA

a Separation factor.

b Capacity factor for the first eluted enantiomer.

c Resolution factor.

d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

e 2-Aminobutyric acid.

f 2-Aminocaprylic acid. g,h 10% and 20% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA, respectively.

Table 9. Chiralcel OF에서의 N-FMOC α-Amino Acids 의 광학분리

	Analyte	α ^a	K' ₁ ^b	Rs ^c	Conf. ^d
1	Ala	1.28	3.28	1.05	D
2	ABA^e	1.28	2.62	0.91	D
3	ACA^f	1.36	1.80	0.93	_
4	Asn	1.93	5.51 ^g	1.61	D
5	Asp	1.34	7.60	1.01	D
6	Gln	1.37	5.57 ^g	0.76	D
7	Glu	1.00	7.67	_	-
8	lleu	1.34	1.72	0.93	D
9	Leu	1.50	1.71	1.31	D
10	Met	1.00	6.90	_	-
11	Norleu	1.33	2.21	0.99	D
12	Norval	1.34	2.33	1.04	D
13	PG	1.26	6.02	0.82	D
14	Phe	1.00	4.89	-	_
15	Ser	1.79	2.13 ^g	1.97	D
16	Thr	2.77	3.75	3.38	D
17	Tyr	1.00	7.16 ^g	_	_
18	Val	1.34	1.72	0.99	D

Mobile phase; 20% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA; Flow rate=1mL/min; Detection UV 254 nm.

a Separation factor.

b Capacity factor for the first eluted enantiomer.

c Resolution factor.

d indicates the absolute configuration of the second retained enantiomer.

e 2-Aminobutyric acid.

f 2-Aminocaprylic acid. g 40% 2-propanol/hexane(V/V) containing 0.1% TFA.

Table 10. Chiralpak IA에서 몇 가지 N-FMOC- α -아미노산의 광학이성질체 분리에 영향을 주는 여러 이동상에서의 광학분할

Mobile ^a phase	5% IPA/Hxn with 0.1% TFA	15% THF/Hxn with 0.1% TFA	20% EA/Hxn with 0.1% TFA	25% DM/Hxn with 0.1% TFA		
Analyte	α ^b k' ₁ ^c Conf. ^d	α ^b k'₁ ^c Conf. ^d	α ^b k'₁ ^c Conf. ^d	α^b ${k^{\scriptscriptstyle \dagger}}_1{}^c$ Conf.		
Alanine	1.09 5.28 D	1.07 6.15 D	1.00 5.76 -	1.00 4.37 -		
Leucine	1.26 4.82 L	1.00 5.21 -	1.07 4.08 L	1.16 3.04 L		
Phenylalanine	1.08 3.31 L	1.03 8.22 D	1.81 6.38 D	1.16 7.84 D		
Phenylglycine	1.31 5.02° D	1.09 9.92 D	1.11 6.35 L	1.18 8.40 L		
Valine	1.08 5.92 L	1.08 4.02 D	1.00 3.59 -	1.21 2.81 L		

^aMobile phase; IPA(2-propanol), Hexane (Hxn), Tetrahydrofuran (THF) Ethyl acetate (EA), Dichloromethane (DM). Flow rate=1mL/min.

^bSeparation factor.

^cCapacity factor for the first eluted enantiomer.

 $^{^{\}mathrm{d}}$ indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

^{°10% 2-}Propanol/Hxn (V/V) with 0.1% TFA.

Table 11. Chiralpak IB에서 몇 가지 N-FMOC- α -아미노산의 광학이성질체 분리에 영향을 주는 여러 이동상에서의 광학분할

Mobile ^a phase			15% THF/Hxn with 0.1% TFA		20% EA/Hxn with 0.1% TFA			20% DM/Hxn with 0.1% TFA				
Analyte	α ^b	k¹¹°	Conf. ^d	α b	k' ₁ °	Conf. ^d	α ^b	k'1 ^c	Conf. ^d	α ^b	k¹¹°	Conf. ^d
Ala	1.64	8.22	L	1.07	6.43	L	1.13	10.97	L	1.04	11.7	6 D
Leu	1.35	5.29	D	1.15	4.00	D	1.21	5.87	D	1.29	4.62	D
PG	1.34	3.88e	D	1.11	7.30	D	1.20	10.34	D	1.03	10.41	D
Phe	1.09	3.81e	L	1.05	6.81	L	1.00	10.53	-	1.00	10.48	-
Val	1.15	5.30	D	1.10	3.35	D	1.19	5.42	D	1.14	4.76	D

a Mobile phase; IPA(2-propanol), Hexane (Hxn), Tetrahydrofuran (THF), Ethyl acetate (EA),

Dichloromethane (DM) Flow rate=1mL/min; Detection UV 254 nm

b Separation factor.

c Capacity factor for the first eluted enantiomer.

d indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

e 10% IPA/Hxn (V/V) with 0.1% TFA.

Table 12. Chiralpak IB에서 몇 가지 N-FMOC- α -아미노산의 광학이성질체 분리에 영향을 주는 여러 이동상에서의 광학분할

Mobile ^a phase		1			2			3		4		
Analyte	α ^b	k'1 ^c	Conf. ^d	α ^b	k¹¹°	Conf.d	α ^b	k¹¹°	Conf. ^d	α ^b	k¹¹°	Conf.d
Ala	1.02	4.80	L	1.15	3.48		1.07	2.98	L	1.00	8.78	_
Leu	1.48	2.87	D	1.49	2.09	D	1.32	1.93	D	1.48	5.99	D
PG	1.16	4.06	D	1.27	3.44	D	1.14	3.27	D	1.18	7.35	D
Phe	1.10	4.05	D	1.06	3.53	D	1.00	3.45	-	1.11	8.46	D
Val	1.48	2.52	D	1.38	1.98	D	1.24	1.80	D	1.42	5.27	D

a Mobile phase : Dichloromethane (DM), Hexane (Hxn), IPA(2-propanol), Ethanol (EtOH),

Mobile phase 1: DM/ Hxn/IPA/TFA = 200/800/20/0.1,

Mobile phase 2: DM/ Hxn/ IPA/ TFA = 100/ 900/ 50 /0.1,

Mobile phase 3: DM/ Hxn/ EtOH/ TFA = 200/ 800/ 20 /0.1,

Mobile phase 4: DM/ Hxn/ EtOH/ TFA = 200/ 800/ 10 /0.1;

Flow rate=1mL/min;

Detection UV 254 nm

- b Separation factor.
- c Capacity factor for the first eluted enantiomer.
- d indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

5. 참 고 문 헌

- 1 Bodansky, M. and Bodansky, A., The Practice of Peptide Synthesis. Springer, New York, (1984).
- 2 Subramanian, G., (Ed.) A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography. VCH, New York, (1994).
- 3 Greene, T. W. and Wuts, P. G. M., Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley & Sons. Inc, 3rd Ed., New York, (1999).
- 4 Burgess, K., Solid-Phase Organic Synthesis. John Wiley & Sons Inc, 3rd Ed., New York, (2000).
- 5 Einarsson, S., Folestad, S., Josefsson, B., and Lagerkvist, S., High-resolution reversed-phase liquid chromatography system for the analysis of complex solutions of primary and secondary amino acids. Anal. Chem. 58, 1638-1643 (1986).
- 6 Zukowski, J., Pawlowska, M., and Armstrong, D. W., Efficient enantioselective separation and determination of trace impurities in secondary amino acids (i.e., imino acids). J. Chromatogr., 623, 33-41 (1992).
- 7 Tang, Y., Zukowski, J., and Armstrong, D. W., Investigation on enantiomeric separations of fluorenylmethoxycarbonyl amino acids and peptides by high-performance liquid chromatography using native cyclodextrins as chiral stationary phases. J. Chromatogr. A, 743, 261-271 (1996).
- 8 Knoche, B., Milosavljev, S., Gropper, S., Brunner, L. A., and Powell, M. L., Enantioselective determination of selfotel in human urine by high-performance liquid chromatography on a chiral stationary phase after derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate. J. Chromatogr. B, 695, 355-363 (1997).
- 9 Ekborg-Ott, K. H., Liu, Y., and Armstrong, D. W., Highly enantioselective

- HPLC separations using the covalently bonded macrocyclic antibiotic, ristocetin A, chiral stationary phase. Chirality, 10, 434-483 (1998).
- 10 0i, H., Kitahara, H., Aoki, F., and Kisu, N., Direct separation of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with amide and urea derivatives bonded to silica gel as chiral stationary phases. J. Chromatogr. A, 689, 195-201 (1995).
- 11 Lämmerhofer, M. and Lindner, W., Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers. J. Chromatogr. A, 741, 33-48 (1996).
- 12 Pirkle, W. H. and Lee, W., Separation of the enantiomers of N-benzyloxycarbonyl, 9-fluoromethoxycarbonyl and phthaloyl protected a-amino acids and their ester or amide derivatives. Bull. Kor. Chem. Soc., 19, 1277-1280 (1998).
- 13 Czerwenka, C., Lämmerhofer, M., and Lindner, W., Structure-enantioselectivity relationships for the study of chiral recognition in peptide enantiomer separation on cinchona alkaloid-based chiral stationary phases by HPLC: Influence of the N-terminal protecting group. J. Sep. Sci. 26, 1499-1508 (2003).
- 14 Krawinkler, K. H., Maier, N. M., Sajovic, E., and Lindner. W., Novel urea-linked cinchona-calixarene hybrid-type receptors for efficient chromatographic enantiomer separation of carbamate-protected cyclic amino acids. J. Chromatogr. A. 1053, 119-131 (2004).
- 15 Kim, B.-H. and Lee, W., Direct liquid chromatographic enantiomer separation of N-tert-butoxycarbonyl and benzyloxycarbonyl a-amino acids using polysaccharide derived chiral stationary phases. J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech., 22, 523-530 (1999).
- 16 Li, Y. H., Jin, J. Y., and Lee, W., Comparative liquid chromatographic

enantiomer resolution on two chiral stationary phases derived from amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate). Bull. Kor. Chem. Soc., 26, 1132-1134 (2005)

- 17 Zhang, T., Kientzy, C., Franco, P., Ohnishi, A., Kagamihara, Y., and Kurosawa, H., Solvent versatility of immobilized 3,5-dimethylphenylcarbamate of amylose in enantiomeric separations by HPLC. J. Chromatogr. A, 1075, 65-75 (2005).
- 18 Zhang, T., Nguyen, D., Franco, P., Murakami, T., Ohnishi, A., and Kurosawa, H., Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on silica: A new chiral stationary phase for the analysis of enantiomers. Anal. Chim. Acta, 557, 221-228 (2006).
- 19 Tachibana, K. and Ohnishi, A., Reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers on polysaccharide type chiral stationary phases. J. Chromatogr. A, 906, 127-154 (2001).

저작물 이용 허락서										
학 과	식품의약학과 학 번 20047503				과 정	박사				
성 명	한글: 강영구 한문 : 姜映求 영문 : Youngku Kang									
주 소	광주서구금호동 코아루 아파트 105-1101									
연락처	062-376-0726 E-MAIL ykk0510@hanmail.net									
	한글 : UV-VIS 분광기기 밸리데이션 및 아미노산유도체 이성질체의 광학분할 연구									
논문제목	영어 :The investigation of instrument validation of UV-VIS spectrophotometer and enantiomer separation of amino acids derivatives									

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

- 1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
- 2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
- 3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
- 4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
- 5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
- 6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
- 7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(√) 반대()

2007 년 2월 일

저작자: 강 영 구 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하