creative commons
COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000263621

2013년 2월

박사학위논문

Enantiomer Separation Using Polysaccharides Based Chiral Stationary Phases by HPLC

조 선 대 학 교 대 학 원

약 학 과

황 호

Enantiomer Separation Using Polysaccharides Based Chiral Stationary Phases by HPLC

다당유도체를 기초로 한 키랄 고정상에서의 액체 크로마토그라피에 의한 광학분리

2013년 2월 25일

조 선 대 학 교 대 학 원

약 학 과

황 호

Enantiomer Separation Using Polysaccharides Based Chiral Stationary Phases by HPLC

지도교수 이 원 재

이 논문을 약학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2012년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

약 학 과

황 호

황호의 박사학위논문을 인정함

위원장	조선대학교	교 수	홍 준 희	(인)
위 원	조선대학교	교 수	우 은 란	(인)
위 원	충남대학교	교 수	강 종 성	(인)
위 원	조선대학교	교 수	김 은 애	(인)
위 원	조선대학교	교 수	이 원 재	(인)

2012년 12월

조 선 대 학 교 대 학 원

CONTENTS

Chapter I Liquid Chromatographic Enantiomer Separation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on Immobilized Polysaccharide Derived Chiral Stationary Phase under Reversed and Normal Phase Mode

Abstract ····2

1.1 서론 ····3

1.2 실험방법 ····4

1.2.1 실험기기 ····4

1.2.2 실험시료 및 시약 ····4

1.3 실험결과 및 고찰 ····6

1.4 결론 ····21

References ····22

Chapter II Enantiomer Separation Using a Covalently Immobilized Chiral Column Derived from Polysaccharide Derivative by Reversed Phase Liquid Chromatography

Abstract ····24

2.1 서론 ····25

2.2 실험방법 ····26

2.2.1 실험기기 ····26

2.2.2 실험시료 및 시약 ····26

2.2.3 합성 ····29

2.3 실험결과 및 고찰 ····30

2.4 결론 ····39

References ····40

Chapter III Enantiomer Separation of Benzophenone Imine α-Amino Acid Esters on Chiral Stationary Phases by HPLC

Abstract ····42
3.1 서론 ····43
3.2 실험방법 ····45
3.2.1 실험기기 ····45
3.2.2 실험시료 및 시약 ····46
3.2.3 합성 ····46
3.3 실험결과 및 고찰 ····47
3.4 결론 ····57
References ····58

Chapter IV Comparative Enantiomer Separation on Chiral Stationary Phases Derived from Chiral Crown Ether by HPLC

Abstract ····60
4.1 서론 ····61
4.2 실험방법 ····62
5.2.1 실험기기 ····62
5.2.2 실험시료 및 시약 ····62
4.3 실험결과 및 고찰 ····63
4.4 결론 ····74
References ····75

LIST OF TABLES

Table 1.1 Effect of reversed mobile phase on the enantiomer separation of ibuprofen and naproxen on Chiralpak IA ·····8

Table 1.2 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions ·····9

Table 1.3 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions ·····10

Table 1.4 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions ·····11

Table 1.5 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions ·····12

Table 1.6 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions ·····13

Table 1.7 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions ·····14

Table 1.8 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions ·····15

Table 1.9 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions ·····16

Table 1.10 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions ·····17

Table 1.11 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions ·····18

Table 2.1 Effect of mobile phase on the enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB ·····31

Table 2.2 Effect of mobile phase on the enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB ·····32

Table 2.3 Effect of mobile phase on the enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB ·····33

Table 2.4 Enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB in reversed phase ·····36

Table 2.5 Enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB in normal phase ·····37

Table 3.1 Separation of the enantiomers of α- amino acid methyl esters as benzophenoneimine derivatives on Chiralpak IA ·····49

Table 3.2 Separation of the enantiomers of α- amino acid methyl esters as benzophenoneimine derivatives on Chiralpak IB ·····50

Table 3.3 Separation of the enantiomers of α- amino acid methyl esters as benzophenoneimine derivatives on Chiralpak IC ·····51

Table 3.4 Determination of the optical purity of commercially available or synthetic α-amino acid esters as benzophenone imine derivatives on Chiralpak IC ·····53

Table 3.5 Stability test of optical purity results for L-leucine methyl ester as

benzophenone imine derivatives stored at 4℃ after derivatization with benzophenone imine in 2-propanol ·····54
Table 4.1 Comparative enantiomer separation of α-amino acids on CSP 1 and CSP 2 ·····65
Table 4.2 Comparative enantiomer separation of α-amino acid methyl esters on CSP 1 and CSP 2 ·····66
Table 4.3 Comparative enantiomer separation of primary chiral amine compounds on CSP 1 and CSP 2 ·····67
Table 4.4 Comparative enantiomer separation of α-amino α-alkyl acids on CSP 1 and CSP 2 ·····70
Table 4.5 Comparative enantiomer separation of phenylglycine alkyl esters on CSP 1 and CSP 2 ·····71

LIST OF FIGURES

Figure 1.1 Structures of ChiralpakIA ·····4

Figure 1.2 Structures of NSAIDs ·····5

Figure 1.3 Chromatograms of enantiomer separation of racemic naproxen and determination of the enantiomeric purity of a currently marketed S-naproxen drug under reversed phase condition on Chiralpak IA ·····20

Figure 2.1 Structures of Chiralpak IB ·····26

Figure 2.2 Structures of α-amino acids ·····27

Figure 2.3 Preparation of N-FMOC derivatives of α-amino acids ·····29

Figure 2.4 Chromatograms of enantiomer separation of N-FMOC alanine and N-FMOC serine on chiralpak IB ·····38

Figure 3.1 Structures of ChiralpakIA, Chiralpak IB, Chiralpak IC ·····45

Figure 3.2 Preparation of the benzophenone imine derivatives of α-amino acid esters ·····46

Figure 3.3 Chromatograms of the enantiomer resolution of the benzophenone imine derivative of racemic leucine methyl ester and L-leucine methyl ester on Chiralpak IC ·····55

Figure 3.4 Chromatograms of the enantiomer resolution of the benzophenone imine derivative of racemic valine methyl ester and L-valine methyl ester on Chiralpak IC ·····56

Figure 4.1 The structures of (+)-18-C-6-TA (left) and its derived CSP 1 and CSP

2. Two intramolecular hydrogen bondings between the amide N-H hydrogen of CSP1 and the ether oxygens of the crown ether moiety of the CSP 1 were shown ····62

Figure 4.2 Typical chromatograms of enantiomer separation of phenylglycine on CSP 1 and CSP 2 ····68

Figure 4.3 Separation factor versus the number of alkyl groups of α-amino α-alkyl acids on CSP 1 and CSP 2 ···· 72

Figure 4.4 Resolution factor versus the number of alkyl groups of α-amino α-alkyl acids on CSP 1 and CSP 2 ···· 72

Figure 4.5 Separation factor versus the number of alkyl groups of phenylglycine alkyl esters on CSP 1 and CSP 2 ···· 73

Figure 4.6 Resolution factor versus the number of alkyl groups of phenylglycine alkyl esters on CSP 1 and CSP 2 ···· 73

ABSTRACT

Enantiomer Separation Using Polysaccharides Based Chiral Stationary Phases by HPLC

Hu Huang
Advissor: Wonjae Lee
Department of Pharmacy
Graduate School of Chosun University

Abstract: In chapter Ⅰ, the liquid chromatographic enantiomer separation has become one of the most essential research areas for development of chiral drugs for over two decades. The first generation coating type chiral stationary phases (CSPs) derived from polysaccharides have been the most widely utilized for enantiomer resolution of a wide range of chiral compounds. Recently, the second generation covalently immobilized type CSPs based on polysaccharides have been developed and applied. The new type CSPs overcome the limitation of the coated type CSPs related to solvent versatility and their applications, since the chiral selectors of polysaccharide derivatives of these CSPs have been immobilized to a silica matrix through covalent bonding. The covalently immobilized type CSPs for enantiomer separation had been only employed under normal phase and non-aqueous polar organic solvent mode. However, very recently only a few results employed under reversed phase conditions were reported. Compared to normal phase liquid chromatographic enantiomer separation, reversed phase enantiomer separation using aqueous mobile phases is particularly convenient for biological samples of serum or plasma as well as aqueous synthetic analytes. In this study, we present enantiomer resolution of several NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) on covalently immobilized type

CSP, Chiralpak IA under reversed phase as well as normal phase conditions.

In chapter II, the liquid chromatographic enantiomer separation of N-fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) α-amino acid was performed on covalently immobilized chiral column (Chiralpak IB) based on polysaccharide derivative as a chiral selector by reversed phase liquid chromatography. The effect of the reversed mobile phase on the chromatographic parameters of the enantioselectivities, resolution factors and retention times using covalently immobilized Chiralpak IB was shown. Also the enantiomer separation of N-FMOC α-amino acid in the reversed and normal phase was compared and the results obtained in the former mobile phase were generally lower than those in the latter mobile phase.

In chapter III, the liquid chromatographic method for the separation of α-amino acid esters as benzophenone Schiff base derivatives on covalently immobilized CSPs (Chiralpak IA, Chiralpak IB, and Chiralpak IC) derived from polysaccharide derivatives is described. Benzophenone imine derivatives of α-amino acid esters were readily prepared by stirring benzophenone imine and the hydrochloride salts of α-amino acid esters in 2-propanol. The chromatographic separations were conducted at a flow rate 1 mL/min and a detection wave length of 254 nm; 0.5% 2-propanol/hexane (v/v) was used on CSPs. In general, the resolution of Chiralpak IC was superior to those of the other CSPs. In addition, the resolutions of other arylimine derivatives of α-amino acid esters and the effects of different mobile phases on the enantiomeric separation of α-amino acid esters as benzophenone imine derivatives on Chiralpak IC were investigated.

In chapter IV, the Comparative liquid chromatographic enantiomer separation of α-amino acids, their esters and primary amino compounds is performed using two CSPs prepared by covalently bonding (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid (18-C-6-TA) of the same chiral selector. In general, the separation factors and resolution factors for these analytes on the crown ether type CSP 1 were greater than on the crown ether type N-CH_3 CSP 2, while these capacity factors on the CSP 2 were quite greater than on the CSP 1. Except for leucine methyl

ester and phenylalanine methyl ester, the elution orders of all analytes including α-amino α-alkyl acids and phenylglycine alkyl esters on the CSP 1 are identical to those on the CSP 2. This study showed that different connecting structures for these two CSPs might influence their ability to resolve the analytes depending on their structures related to the chiral recognition mechanism.

Keywords: enantiomer separation, chiral stationary phase, non-steroidal anti-inflammatory drugs, amino acid derivative, liquid chromatography, amino acid ester, benzophenone imine derivative, (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid.

국문 초록

다당유도체를 기초로 한 키랄 고정상에서의 액체 크로마토그라피에 의한 광학분리

황 호
지 도 교 수: 이 원 재
약학과
조선대학교 대학원

제1장에서는 액체 크로마토그래피에서 광학 이성질체의 분리방법은 이미 20여 년간의 역사를 거쳐 키랄 의약품 개발을 위하여 아주 중요한 연구 분야 중 하나가 되었다. 특히 다당류에서 유도된 코팅형태의 제1세대 키랄 고정상은 광학 이성질체의 분리에 관하여 널리 알려져 있으며 키랄 화합물 분리작업에 광범위하게 사용되고 있다. 최근에 들어와서는 다당류에서 유도된 공유결합형태의 제2세대 키랄 고정상이 개발되어 연구실험에서 사용되고 있다. 새로 개발한 고정상은 코팅 타입의 고정상에서의 다양성과 응용성을 극복하였다. 다당류유도체에서 유도된 키랄 선택성을 가진 고정상은 silica matrix의 공유 결합에 의하여 고정되었다. 공유결합 형태의 고정상에서 광학이성질체의 분리는 순상 크로마토그래피에서는 비수성인 유기용매에서만 분리가 가능하였다. 하지만 최근에 들어와서는 역상 크로마토그래피방법으로 광학 분리하는 연구보고결과가 보도되었다. 순상 크로마토그래피의 광학이성질체의 분리에 비해, 역상 크로마토그래피의 광학이성질체 분리에서는 수성인 이동상을 사용할 수 있기 때문에 동물실험에서 혈청 및 혈장 분석뿐만 아니라 수성인 이동상으로 만들어 분석물질을 분석할 수 있기에 아주 유용하고 편리하게 사용될 수 있다. 본 연구에서는 공유결합 형태의 고정상인 Chiralpak IA에서 순상 또는 역상 이동상을 사용하여 여러 가지의 NSAIDs(비스테로이드성 항염증제)의 광학이성질체를 분리하였다.

제2장에서는 역상 액체 크로마토그래피에서 다당유도체 선택자가 공유결합된 키랄 컬럼인 Chiralpak IB을 사용하여 N-FMOC α-amino acid의 광학 이성질체의 분리를

수행하였다. 공유결합된 키랄 컬럼인 Chiralpak IB에서 여러 역상 이동상 조건들이 광학분할의 선택성과 분리인자, 머무름 시간에 미치는 영향을 보여주었다. 또한 역상 액체 크로마토그래피에서 N-FMOC α-amino acid의 광학 이성질체의 분리결과를 순상 액체 크로마토그래피 결과와 비교하였는데 순상이동상을 사용한 것보다는 대체적으로 낮은 광학분할을 보여주었다.

제3장에서는 고성능 액체크로마토그래피에서 키랄 선택자 다당류 유도체가 공유결합된 키랄 고정상(Chiralpak IA, Chiralpak IB, 및 Chiralpak IC)으로 α-amino acid methyl ester를 benzophenone imine Schiff base로 유도체한 화합물의 광학이성질체 분리를 수행하였다. α-amino acid ester 의 benzophenone imine 유도체의 화합물을 만들기 위해 amino acid ester HCl에 benzophenone imine을 2-propanol을 용매로 함께 상온에서 반응시켜 쉽게 합성할 수 있었다. Chiralpak IC는 본 연구에서 사용한 다른 컬럼들에 비해서 모두 기준 분리되며 상당히 좋은 광학분리 결과를 보여주었다. 또한 여러 가지 α-amino acid ester benzophenone imine 유도체한 화합물의 시료와 여러 가지 용매를 이동상으로 사용하여 서로 비교하면서 키랄 컬럼인 Chiralpak IC에서 광학분리 결과를 연구하였다.

제4장에서는 액체 크로마토그래피에서 키랄 크라운 에테르인 (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetra-carboxylic acid (18-C-6-TA)를 키랄 선택자로 하여 공유결합 시킨 키랄 고정상 CSP 1을 개발하여 아미노산을 포함한 1차 아미노기를 가지는 라세미 화합물의 광학분리의 연구결과를 발표하였다. 일반적으로 CSP 1에서 광학분리 결과가 N-CH_3 치환된 CSP 2에서보다 조금씩 크게 나타나고, 용량인자의 경우는 반대로 CSP 2에서 상당히 크게 나타나는데 그 이유는 CSP 2와 달리 CSP 1이 가지고 있는 분자구조에 기인한 것으로 여겨진다. 키랄고정상 구조의 특성상 CSP 1에서 intramolecular hydrogen bonding interaction이 형성됨으로 chiral recognition mechanism에 영향을 미치는 것으로 보아진다.

키워드: 광학이성질체 분리, 키랄 고정상, 비스테로이드성 항염증제, 아미노산 유도체, 액체 크로마토그래피, 아미노산 에스테르, 벤조피논 이민 유도체, (+)-(18-크라운-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid.

Chapter I

Liquid Chromatographic Enantiomer Separation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on Immobilized Polysaccharide Derived Chiral Stationary Phase under Reversed and Normal Phase Mode

Abstract

The liquid chromatographic enantiomer separation has become one of the most essential research areas for development of chiral drugs for over two decades. first generation coating type chiral stationary phases (CSPs) derived from polysaccharides have been the most widely utilized for enantiomer resolution of a wide range of chiral compounds. Recently, the second generation covalently immobilized type CSPs based on polysaccharides have been developed and applied. The new type CSPs overcome the limitation of the coated type CSPs related to solvent versatility and their applications, since the chiral selectors of polysaccharide derivatives of these CSPs have been immobilized to a silica matrix through covalent bonding. The covalently immobilized type CSPs for enantiomer separation had been only employed under normal phase and non-aqueous polar organic solvent mode. However, very recently only a few results employed under reversed phase conditions were reported. Compared to normal phase liquid chromatographic enantiomer separation, reversed phase enantiomer separation using aqueous mobile phases is particularly convenient for biological samples of serum or plasma as well as aqueous synthetic analytes. In this study, we present enantiomer resolution of several NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) on the covalently immobilized type CSP, Chiralpak IA under reversed phase as well as normal phase conditions. Since the same acid additives are used under reversed phase as well as normal phase conditions, this is the first comparative report on both reversed and normal phase liquid chromatographic resolution of NSAIDs regarding acid additive effect using Chiralpak IA.

Keywords: enantiomer separation, chiral stationary phase, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

1.1 서론

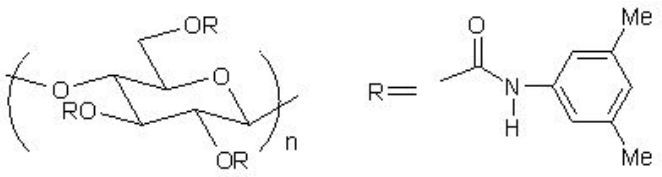
액체 크로마토그래피에서 광학 이성질체의 분리방법은 이미 20여 년간의 역사를 거쳐 키랄 의약품 개발을 위하여 아주 중요한 연구 분야 중 하나가 되었다.[1] 특히 제1세대인 다당류에서 유도된 코팅형태의 키랄 고정상은 광학 이성질체의 분리에 관하여 널리 알려져 있으며 키랄 화합물 분리작업에 광범위하게 사용되고 있다.[2] 최근에 들어와서는 제2세대인 다당류에서 유도된 공유결합형태의 고정상이 개발되어 연구실험에서 사용되고 있다.[3-11] 새로 개발한 고정상은 코팅 타입의 고정상에서의 다양성과 응용성을 극복하였다. 다당류유도체에서 유도된 키랄 선택성을 가진 고정상은 silica matrix의 공유 bonding에 의하여 고정되었다.[9-11] 공유결합 형태의 고정상 CSPs 에서 광학이성질체의 분리는 순상 크로마토그래피에서는 비수성인 유기용매에서만 분리가 가능하였다.[12] 하지만 최근에 들어와서는 역상 크로마토그래피방법으로 광학 분리하는 연구보고결과가 보도되었다.[13-16] 순상 크로마토그래피의 광학이성질체의 분리에 비해, 역상 크로마토그래피의 광학이성질체 분리에서는 수성인 이동상을 사용할 수 있기 때문에 동물실험에서 혈청 및 혈장 분석뿐만 아니라 수성인 이동상으로 만들어 분석물질을 분석할 수 있기에 아주 유용하고 편리하게 사용될 수 있다.[17] 본 연구에서는 공유결합형태의 고정상인 Chiralpak IA에서 순상 또는 역상 이동상을 사용하여 여러 가지의 NSAIDs (비-스테로이드성 항염증제)의 광학이성질체를 분리하였다. 역상 또는 순상 크로마토그래피에서 같은 산 첨가제를 사용하여 서로 비교하였다. 역상 또는 순상 액체크로마토그래피에서 컬럼은 Chiralpak IA를 사용하고 이동상에는 같은 산 첨가제를 사용하여 NSAIDs의 광학이성질체를 분리하였다. 이러한 분석방법은 처음으로 실험결과를 비교분석하여 보고되었다.

1.2 실험방법

1.2.1 실험 기기

액체 크로마토그래피 실험은 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 상온에서 수행하였다. HPLC 구성 기기로 Waters model 1525 binary pump, 20 μL loop를 가진 Rheodyne model 7125 주입기, a dual absorbance detector(Waters 2487 detector)를 사용하였다. 키랄 컬럼으로는 Chiralpak IA(250 mmL×4.6 mm I.D., 일본 Daicel Chemical 회사) 컬럼을 사용하였다.(Figure 1.1)

Chiralpak IA

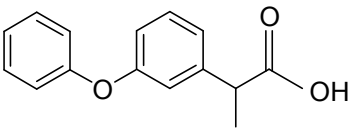


Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) derivative
immobilized on silica gel

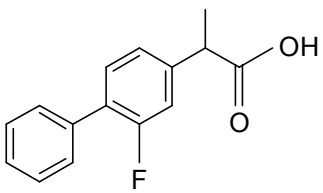
Figure 1.1 Structures of Chiralpak IA.

1.2.2 실험 시약

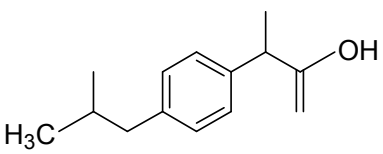
HPLC 용매로 사용하는 methanol(MeOH), acetonitrile(ACN), tetrahydrofuran(THF), hexane, 2-propanol은 J. T Baker(Phillipsburg, NJ)로부터 Methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, trifluoroacetic acid, trichloroacetic acid, acetic acid과 모든 분석물질은 Aldrich(Milwaukee, WI)혹은 Sigma(St. Louis, Missouri) 회사로부터 구입하였다.(Figure 1.2)



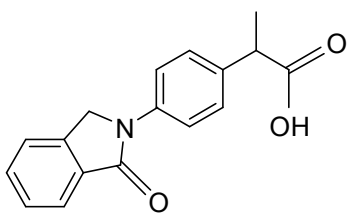
fenoprofen



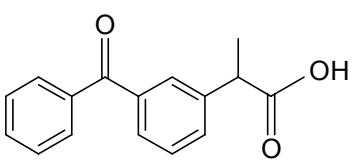
flurbiprofen



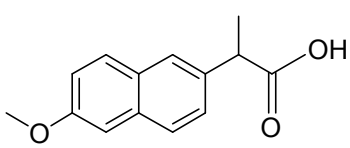
ibuprofen



indoprofen



ketoprofen



naproxen

Figure 1.2 Structures of NSAIDs.

1.3 실험결과 및 고찰

Table 1.1에서는 역상 크로마토그래피에서 컬럼인 Chiralpak IA를 사용하여 두 분석물질(ibuprofen 와 naproxen)의 광학이성질체의 분리결과를 보여주었다. Table 1.2-1.6와 1.7-1.11에서는 각각 역상 또는 순상 크로마토그래피에서 컬럼인 Chiralpak IA를 사용하여 여러 분석물질인 NSAIDs의 광학이성질체의 분리결과를 서로 비교하여 보여주었다. Table 1.1의 항목 1-8에서는 크로마토그래피에서 이동상이 같은 용매 조건하에서 산 첨가제의 양 또는 산 첨가제의 종류 등 매개변수에 따라 분석물질의 분리계수(α)에는 변함이 크지 않지만 분리도(Rs)에는 큰 영향을 준다는 것을 보여주었다. 또한 Table 1에서 역상 크로마토그래피의 여러 이동상 중에서 60% MeOH/water (V/V)에 산 첨가제인 methanesulfonic acid으로 사용하였을 때 가장 좋은 광학이성질체의 광학분할을 보여주었다. Table 1.1의 항목 9와 10에서 methanol 대신 acetonitrile 또는 tetrahydrofuran으로 사용하였을 때 두 분석물질의 광학이성질체의 분리 및 선택성이 가장 낮았다. Table 1.1-1.11에서 역상 또는 순상 크로마토그래피에서 여러 산 첨가제를 사용하고 같은 이동상에서 산 첨가제가 증가함에 따라 그 분석물질의 용량인자와 분리도가 조금씩 커지는 것을 관찰될 수 있다. 이러한 결과는 분석물질의 카르복실 산 그룹의 이온화 억제는 보류시간을 증가하기 위해서이다. 또한 광학분리 및 선택성의 크기는 산 첨가제의 강산일수록 커진다는 것을 관찰되었다.(예를 들면; methanesulfonic acid: pKa = -1.89, ethanesulfonic acid: pKa = -1.61) 따라서 여러 가지 산 첨가제중 강산인 methanesulfonic acid에서 가장 좋은 광학분리결과를 보여주고 약산인 acetic acid에서 가장 낮은 광학분리결과를 보여주었다. 특히, Table 1.6-1.11의 순상 크로마토그래피에서 산 첨가제인 trifluoroacetic acid을 사용하였을 때보다 산 첨가제인 methanesulfonic acid로 사용하였을 때 조금 좋은 광학이성질체의 분리 및 선택성을 보여주었다.[2,7,18] 따라서 산 첨가제인 trifluoroacetic acid보다 methanesulfonic acid가 더 강한 산으로 역상 및 순상 크로마토그래피에서 NSAIDs 광학이성질체 분리에 유용하게 사용할 수 있다.

역상 및 순상 크로마토그래피에서 3가지 분석물질에 대한 용출 순서를 확인하였는데 두 가지 분석물질은 용출 순서가 동일하나 나머지 1가지 분석물질은 용출 순서가 반대로 용출되었다. 즉 역상 크로마토그래피에서 ketoprofen을 제외하고는 모든 분석물질

의 용리순사가 S-이성질체가 두 번째로 용리되는 것으로 나타났다. 하지만 ketoprofen의 경우는 반대로 R-이성질체가 두 번째로 용리되었다. 이것은 chiral recognition interaction이 이동상이 다른 역상과 순상 크로마토그래피에서 다르게 나타남으로 정반대의 용리순서 결과가 나온 것으로 추정된다. 또한 NSAIDs의 광학이성질체의 분리되는 정도는 역상 및 순상 크로마토그래피에서 서로 다르게 나타난다.

역상 및 순상 크로마토그래피에서 전체적으로 보면 순상에서의 분석물질이 좋은 광학이성질체의 분리 및 선택성을 나타내었다. 그러나 분석물질 ibuprofen과 naproxen에서는 분리가 되지 않거나 낮은 광학이성질체의 분리 및 선택성을 나타내었다. 하지만 역상 크로마토그래피에서는 분석물질 ibuprofen과 naproxen은 좋은 광학이성질체의 분리 및 선택성을 보여주었다. 따라서, 역상 및 순상 크로마토그래피방법은 고정상에서 NSAIDs 광학이성질체의 분리결과에 서로 보완하여 사용하게 되리라 예상된다.

Table 1.1 Effect of reversed mobile phase on the enantiomer separation of ibuprofen and naproxen on Chiralpak IA.

Analyte	Ibuprofen				Naproxen			
Mobile phase	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
1. 60% MeOH/water(V/V) with 20mM methanesulfonic acid	1.13	7.94	1.81	S	1.24	6.70	3.15	S
2. 60% MeOH/water(V/V) with 10mM methanesulfonic acid	1.13	7.74	1.78	S	1.24	6.64	3.10	S
3. 60% MeOH/water(V/V) with 5mM methanesulfonic acid	1.13	7.67	1.74	S	1.24	6.52	3.01	S
4. 60% MeOH/water(V/V) with 10mM ethanesulfonic acid	1.12	7.26	1.70	S	1.22	6.18	2.89	S
5. 60% MeOH/water(V/V) with 10mM trifluoroacetic acid	1.12	6.63	1.08	S	1.21	5.43	1.89	S
6. 60% MeOH/water(V/V) with 5mM trifluoroacetic acid	1.12	6.36	1.02	S	1.21	5.43	1.77	S
7. 60% MeOH/water(V/V) with 10mM trichloroacetic acid	1.12	6.98	1.03	S	1.20	5.33	1.85	S
8. 60% MeOH/water(V/V) with 10mM acetic acid	1.12	5.98	0.97	S	1.20	5.13	1.64	S
9. 40% ACN[e]/water(V/V) with 10mM methanesulfonic acid	1.06	4.61	1.43	S	1.13	2.96	2.64	S
10. 40% THF[f]/water(V/V) with 10mM methanesulfonic acid	1.00	4.32	-	-	1.00	3.21	-	-

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

[e]Acetonitrile. [f]Tetrahydrofuran

Table 1.2 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions.

Mobile phase	60% MeOH/water(V/V) with 10 mM methanesulfonic acid			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.05	8.44	0.79	
Flurbiprofen	1.38	11.66	4.74	
Ibuprofen	1.13	7.74	1.78	S
Indoprofen	1.18	16.53	1.21	
Ketoprofen	1.03	5.30	0.38	R
Naproxen	1.24	6.64	3.10	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.3 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions.

Mobile phase	60% MeOH/water(V/V) with 10 mM ethanesulfonic acid			
Analyte	α [a]	k'_1 [b]	Rs [c]	Conf. [d]
Fenoprofen	1.04	7.72	0.62	
Flurbiprofen	1.37	10.89	4.41	
Ibuprofen	1.12	7.26	1.70	S
Indoprofen	1.17	14.99	1.16	
Ketoprofen	1.03	5.09	0.29	R
Naproxen	1.22	6.18	2.89	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.4 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions.

Mobile phase	60% MeOH/water(V/V) with 10 mM trifluoroacetic acid			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.04	6.92	0.33	
Flurbiprofen	1.37	10.47	4.35	
Ibuprofen	1.12	6.63	1.08	S
Indoprofen	1.17	14.19	0.92	
Ketoprofen	1.03	4.66	0.17	R
Naproxen	1.21	5.43	1.89	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.5 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions.

Mobile phase	60% MeOH/water (V/V) with 10 mM trichloroacetic acid			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.04	6.85	0.32	
Flurbiprofen	1.37	10.42	4.20	
Ibuprofen	1.12	6.98	1.03	S
Indoprofen	1.17	13.26	0.91	
Ketoprofen	1.03	4.85	0.14	R
Naproxen	1.20	5.33	1.85	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.6 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under reversed phase conditions.

Mobile phase	60% MeOH/water (V/V) with 10 mM acetic acid			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.04	6.90	0.02	
Flurbiprofen	1.35	9.69	3.89	
Ibuprofen	1.12	5.98	0.97	S
Indoprofen	1.17	13.00	0.85	
Ketoprofen	1.00	4.55	-	
Naproxen	1.20	5.13	1.64	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.7 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions.

Mobile phase	10% 2-propanol/hexane(V/V) with 10 mM methanesulfonic acid			
Analyte	α[a]	k'$_1$[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.25	1.07	3.75	
Flurbiprofen	1.42	0.97	5.80	
Ibuprofen	1.00	0.66	-	
Indoprofen	1.30	23.08	6.48	
Ketoprofen	1.14	2.75	2.82	S
Naproxen	1.09	2.13	1.83	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.8 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions.

Mobile phase	10% 2-propanol/hexane(V/V) with 10 mM ethanesulfonic acid			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.25	1.00	3.70	
Flurbiprofen	1.41	0.94	5.77	
Ibuprofen	1.00	0.65	-	
Indoprofen	1.28	21.07	6.28	
Ketoprofen	1.14	2.74	2.82	S
Naproxen	1.09	2.10	1.80	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.9 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions.

Mobile phase	10% 2-propanol/hexane(V/V) with 10 mM trifluoroacetic acid			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.25	0.97	3.68	
Flurbiprofen	1.41	0.90	5.44	
Ibuprofen	1.00	0.64	-	
Indoprofen	1.27	22.35	5.61	
Ketoprofen	1.13	2.65	2.47	S
Naproxen	1.08	2.02	1.62	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.10 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions.

Mobile phase	10% 2-propanol/hexane (V/V) with 10 mM trichloroacetic acid			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.23	0.94	2.93	
Flurbiprofen	1.40	0.89	5.32	
Ibuprofen	1.00	0.61	-	
Indoprofen	1.27	22.17	5.10	
Ketoprofen	1.12	2.39	2.14	S
Naproxen	1.07	1.86	1.36	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 1.11 Enantiomer separation of NSAIDs on Chiralpak IA under normal phase conditions.

Mobile phase	10% 2-propanol/hexane (V/V) with 10 mM acetic acid			
Analyte	α[a]	k'$_1$[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Fenoprofen	1.22	0.91	2.87	
Flurbiprofen	1.38	0.90	5.16	
Ibuprofen	1.00	0.63	-	
Indoprofen	1.29	21.29	5.53	
Ketoprofen	1.10	2.47	1.92	S
Naproxen	1.07	1.86	1.28	S

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

본 연구에서 개발한 분석법을 이용하여 현재 시판되고 있는 S-naproxen의 광학순도를 Chiralpak IA 컬럼을 사용하여 측정하였다. 또한 실험에서 필요로 한 분석물질은 methanol에 녹이고 여과한 후 주입하여 측정하였다. Figure 1.3에서 보여주는 것과 같이 광학이성질체의 광학순도 측정에서 이동상을 60% MeOH/water (V/V) with 10 mM methanesulfonic acid 으로 사용하였을 때 현재 실험실용 시약으로 시판되고 있는 S-naproxen 시약의 광학이성질체 분순물은 0.8% 이다. 또한 크로마토그램에서 키랄 컬럼인 Chiralpak IA에서 라세미 naproxen의 광학이성질체 광학분리를 하고 광학순도를 측정하며 즉 시판되고 있는 S-naproxen을 측정하였다.

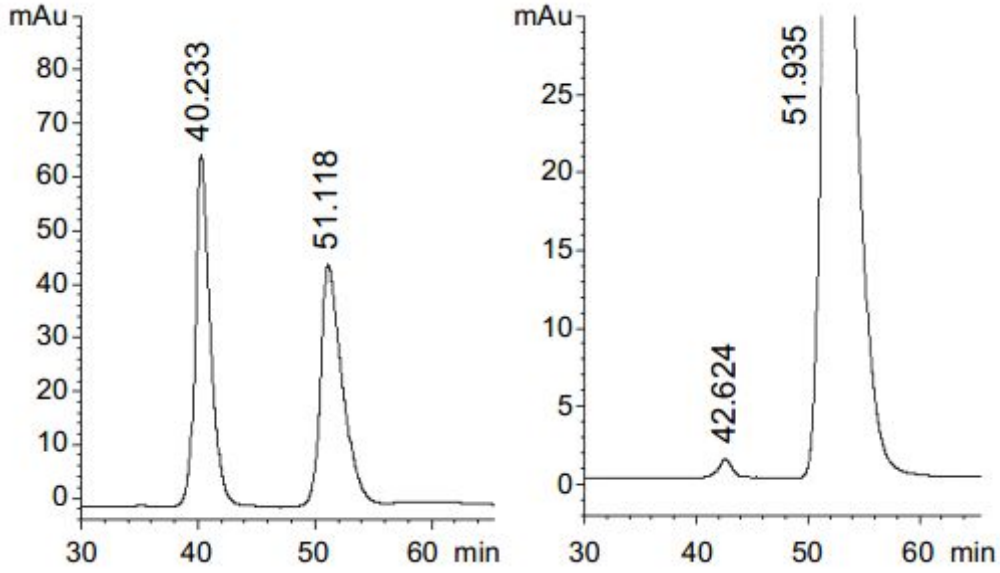


Figure 1.3 Chromatograms of enantiomer separation of racemic naproxen (left) and determination of the enantiomeric purity of a currently marketed S-naproxen drug (R : S = 0.8 : 99.2) (right) under reversed phase condition on Chiralpak IA.

Mobile phase: 60% MeOH/water (V/V) with 10 mM methanesulfonic acid; Flow rate: 0.5 mL/min; Detection UV 254 nm; Injection amount: 5 μg.

1.4 결론

본 연구에서는 공유결합 형태의 컬럼 Chiralpak IA에서 normal phase 조건뿐만 아니라 reversed phase 조건하에서도 NSAIDs의 광학 분리를 할수 있다는 것을 보여주었다. Reversed와 normal phase 이동상의 액체크로마토그래피 분리에서 같은 산 첨가제를 사용하여 비교분석하였다. 또한 본 연구에서 여러가지 산 첨가제중 강산인 methanesulfonic acid에서 제일 좋은 분리 결과를 보여주었다. 따라서 가장 큰 광학이성질체의 분리결과를 보여준 이동상 조건은 reversed phase에서의 60% methanol와 물에 산 첨가제인 methanesulfonic acid이고 normal phase에서는 10% 2-propanol와 hexane에 산 첨가제인 methanesulfonic acid이다. 두 분석물(ibuprofen 와 naproxen)에서의 광학이성질체의 분리는 normal phase에서는 분리가 되지 않거나 분리가 아주 작게 나지만 반대로 reversed phase에서는 비교적 좋은 분리결과를 보여주었다. 하지만 다른 분석물질들의 광학이성질체의 분리는 normal phase에서는 reversed phase보다 더 좋은 광학분리결과를 보여주었다. 따라서 키랄 의약물인 NSAIDs를 포함한 광학이성질체의 분리결과에서 reversed와 normal phase의 mode 사용은 서로 보완하는 역할을 한다. 특히 모든 생물학적인 시료의 경우가 수용액상태이므로 생물학적 시료의 NSAIDs의 광학순도 측정에서 본 연구의 역상 크로마토그래피 분석방법은 앞으로 바람직한 분석연구기술로 발전하게 될 것으로 예상된다.

References

1. Chiral Separation Techniques: A Practical Approach, Second revised ed.; Subramanian, G.; VCH: Weinheim, 2001.
2. Yashima, E.; J. Chromatogr. A. 2001, 906, 105.
3. Zhang, T.; Kientzy, C.; Franco, P.; Ohnishi, A.; Kagamihara, Y.; Kurosawa, H.; J. Chromatogr. 2005, 1075, 65.
4. Li, Y. H.; Jin, J. Y.; Lee, W. Bull. Kor. Chem. Soc. 2005, 26, 1132.
5. Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P.; Murakami, T.; Ohnishi, A.; Kurosawa, H.; Anal. Chim. Acta. 2006, 557, 221.
6. Ali, I.; Aboul-Enein, H. Y.; J. Sep. Sci. 2006, 29, 762.
7. Jin, J. Y.; Lee, W.; Park, J. H.; Ryoo, J. J.; J. Liq. Chrom. & Rel. Tech. 2006, 29, 1793.
8. Jin, J. Y.; Lee, W.; Park, J. H.; Ryoo, J. J.; J. Liq. Chrom. & Rel. Tech. 2007, 30, 1.
9. Ghanem, A.; J. Sep. Sci. 2007, 30, 1019.
10. Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P.; J. Chromatogr. A. 2008, 1191, 214.
11. Franco, P.; Zhang, T.; J. Chromatogr. B. 2008, 875, 48.
12. Thunberg, L.; Hashemi, J.; Andersson, S.; J. Chromatogr. B. 2008, 875, 72.
13. Cirilli, R.; Ferretti, R.; Gallinella, B.; Santis, D. E.; Zanitti, L.; Torre, L. F.; J. Chromatogr. A. 2008, 1177, 105.
14. Cirilli, R.; Ferretti, R.; Santis, D. E.; Gallinella, B.; Zanitti, L.; Torre, L. F.; J. Chromatogr. A. 2008, 1190, 95.
15. Cirilli, R.; Ferretti, R.; Gallinella, B.; Bilia, R. A.; Vincieri, F. F.; Torre, L. F.; J. Sep. Sci. 2008, 31, 2206.
16. Ferretti, R.; Gallinella, B.; Torre, L. F.; Zanitti, L.; Turchetto, L.; Mosca, A.; Cirilli, R.; J. Chromatogr. A. 2009, 1216, 5385.
17. Tachibana, K.; Ohnishi, A.; J. Chromatogr. A. 2001, 906, 127.
18. Okamoto, Y.; Kawashima, M.; Hatada, K.; Chem. Lett. 1984, 739.

Chapter II

Enantiomer Separation Using a Covalently Immobilized Chiral Column Derived from Polysaccharide Derivative by Reversed phase Liquid Chromatography

Abstract

The liquid chromatographicEnantiomer separation of N-fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) α-amino acid was performed on covalently immobilized chiral column (Chiralpak IB) based on polysaccharide derivative as a chiral selector by reversed phase liquid chromatography. The effect of the reversed mobile phase on the chromatographic parameters of the enantioselectivities, resolution factors and retention times using covalently immobilized Chiralpak IB was shown. Also the enantiomer separation of N-FMOC α-amino acid in the reversed and normal phase was compared and the results obtained in the former mobile phase were generally lower than those in the latter mobile phase.

Keywords: enantiomer separation, chiral column, amino acid derivative, liquid chromatography

2.1 서론

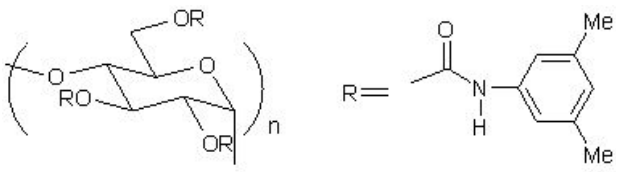
지구상에서의 생명체들은 본질적으로 비대칭이며 키랄 환경에서 작용하고 한쌍의 광학이성질체 중 생체 내에서 서로 다른 물리적 화학적 성질을 나타내어 결국 서로 다른 생리활성을 나타낸다.[1,2] 아미노산 분자구성과 광학적 순도를 결정해야 할 필요성이 약화학과 생화학분야에서 자주 대두되고 있고 이러한 결정을 위한 수많은 방법들이 발전해오고 있다.[3,4] 광학적으로 활성이 있는 N-protected α-amino acid은 펩티드 합성에 널리 이용되고 있다.[5] 또한 FMOC의 유도체는 형광검출기에 아주 민감한 장점을 가지고 있을 뿐만 아니라 FMOC그룹은 1급 아미노산과 2급 아미노산을 모두 쉽게 유도해 낼 수 있고 그 FMOC 유도체들은 아주 안정한 구조를 가진다.[6] 고성능 액체 크로마토그래피에서 다당류 유도체를 키랄 선택자로 사용하여 만들어진 키랄 컬럼을 이용하여 많은 광학 이성질체 화합물을 효과적으로 분리하여 왔음을 보고해 왔다.[7,8] 그런데 이들 상용화된 키랄 컬럼은 실리카 모체에 키랄선택자로 셀루로스와 아밀로오스의 유도체를 흡착하여 제조되었기 때문에 순상(normal phase) 크로마토그래피에서 실험할 경우, 여러 종류의 이동상 용매를 사용할 수 없는 컬럼의 단점을 갖고 있다. 그런 결점을 극복하기 위해 최근에 키랄 선택자인 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 컬럼들이 개발되었는데 이러한 키랄 컬럼들을 이용하여 순상 크로마토그래피에서 기존의 키랄 선택자가 흡착된 키랄 컬럼에서는 허용되지 않았던 용매들을 이동상으로 사용한 최근 연구들이 보고되고 있다.[9,15] 그러나 이들 키랄 컬럼들의 광학분리 연구결과들은 모두 순상 크로마토그래피에서의 결과이었고 아직까지 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 컬럼을 이용한 역상(reversed phase) 크로마토그래피에서의 연구는 보고되지 않았다. 본 연구에서는 최근 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 키랄 컬럼인 Chiralpak IB에서 키랄 물질의 선구물질이나 키랄 중간체로서 매우 유용하게 사용되고 있는 N-fluorenylmethoxycarbonyl(FMOC) α-amino acid의 광학분리를 처음으로 역상 크로마토그래피에서 시도하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 실험 기기

액체 크로마토그래피 실험은 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 상온에서 수행하였다. HPLC 구성 기기로 Waters model 1525 binary pump, 20 μL loop를 가진 Rheodyne model 7125주입기, a dual absorbance detector(Waters 2487 detector)를 사용하였다. 키랄 컬럼으로는 Chiralpak IB(250 mmL×4.6 mm I.D., 일본 Daicel Chemical 회사) 컬럼을 사용하였다.(Figure 2.1)

Chiralpak IB

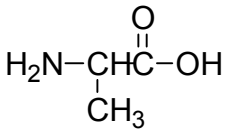


Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) derivative
immobilized on silica gel

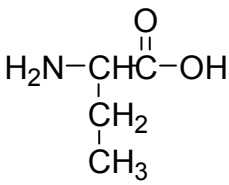
Figure 2.1 Structures of Chiralpak IB.

2.2.2 실험 시약

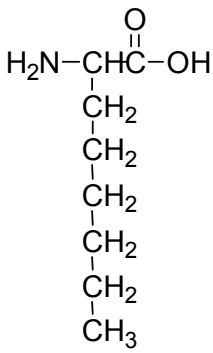
HPLC 용매로 사용하는 acetonitrile(ACN) 은 J. T Baker(Phillipsburg, NJ)로부터 trifluoro-acetic acid(TFA) 등은 모두 Aldrich(Milwaukee, WI)혹은 Sigma(St. Louis, Missouri)회사로부터 구입하였고 분석물질도 Aldrich(Milwaukee, WI)혹은 Sigma(St. Louis, Missouri) 회사로부터 구입하였다.[15,16](Figure 2.2) 이동상 용매로 acetonitrile과 phosphate buffer를 사용하여 1M NaOH나 HCl을 사용하여 pH 2를 맞춘 후 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 사용하였다.



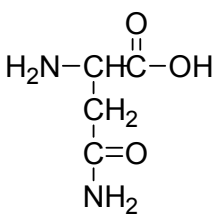
Alanine



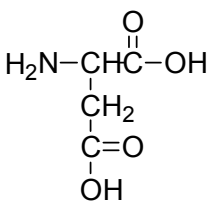
2-Aminobutyric acid



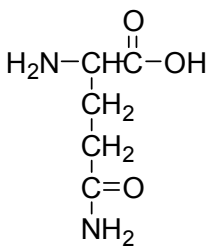
2-Aminocaprylic acid



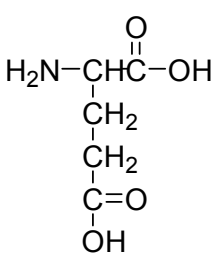
Asparagine



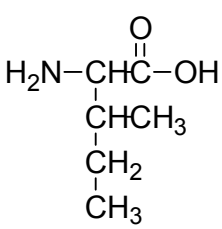
Asparatic acid



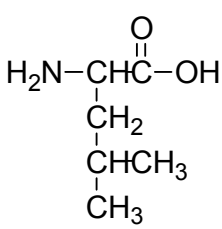
Glutamine



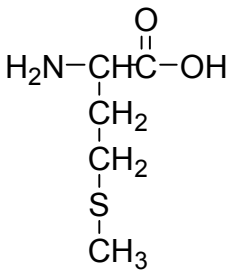
Glutamic acid



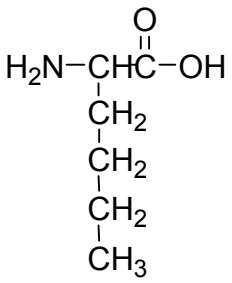
Isoleucine



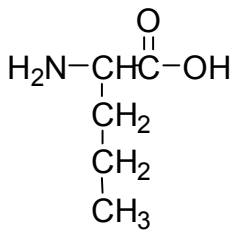
Leucine



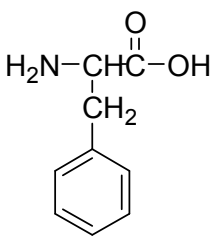
Metionine



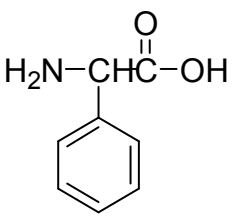
Norleucine



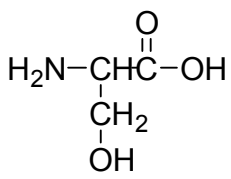
Norvaline



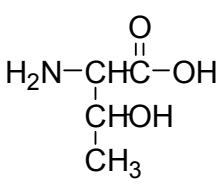
Phenylalanine



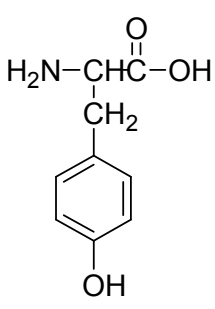
Phenylglycine



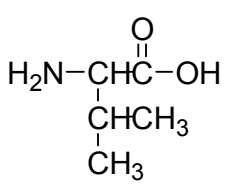
Serine



Threonine



Tyrosine



Valine

Figure 2.2 Structures of α-amino acids.

2.2.3 합성

DL-Phenylglycine을 대표적인 예로 다음과 같이 반응시킨다. Na_2CO_3을 424mg(4mmol) 취하여 플라스크에 넣고 H_2O 10mL를 가하여 녹인다. DL-Phenylglycine 302mg(2mmol) 취하여 가한 후 Dioxane 6mL 가하고 나중에 fluorenylmethoxycarbonyl(FMOC) chloride를 517mg(2mmol)을 가한 후 상온에서 7시간 동안 교반한다. 반응혼합물에 포화 $NaHCO_3$ 용액 10mL와 H_2O 20mL를 가한 다음, Diethyl Ether로 H_2O층을 추출한다. H_2O층을 취하여 ice bath에서 5% HCl 용액으로 pH를 약 2 정도로 맞추면 고체가 석출되는데 이를 여과한 후 진공 건조하여 최종 백색의 고체 산물을 얻는다. (수득률은 94.8%)

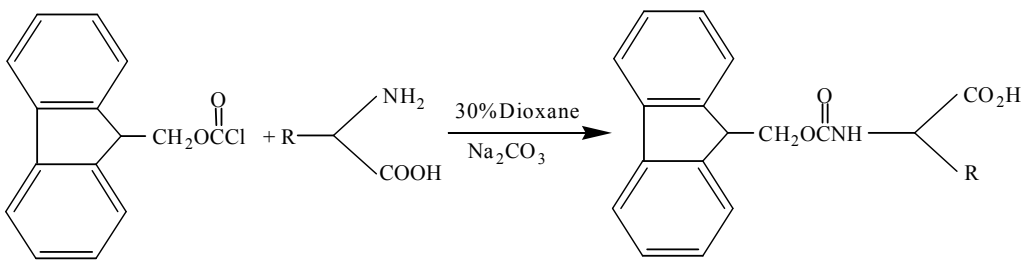


Figure 2.3 Preparation of N-FMOC derivatives of α-amino acids.

2.3 실험결과 및 고찰

Table 2.1-2.3은 키랄 선택자가 공유결합으로 지지된 Chiralpak IB컬럼을 이용한 몇 개의 N-FMOC α-amino 광학분리에서 여러 종류의 역상 이동상이 광학분리에 미치는 효과에 대한 실험결과를 보여주고 있다. 역상 크로마토그래피 실험에서 이동상 용매로 많이 쓰이는 acetonitrile(ACN)의 pH 2 phosphate buffer 용액과 산성 첨가물로 많이 쓰이는 TFA를 첨가한 수용액들을 사용하였다.[15,16]

본 연구에서 사용한 완충용액이나 첨가물 그리고 그 농도에 따라 광학분할에 영향을 미치는데 이러한 변수들이 머무름 시간과 분리도(Rs) 에는 상당한 영향을 주나 분리계수(α)에는 그리 큰 영향을 주고 있지 않음을 보여주고 있다. phosphate buffer용액에서 완충 농도가 증가할수록, TFA를 첨가한 수용액에서 ACN의 농도가 감소할수록 머무름 시간은 길어지고 분리도의 값은 증가한다. 이때 분리계수는 거의 동일하거나 아주 미미하지만 증가하는 경향을 보여준다.

Table 2.1 Effect of mobile phase on the enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB.

Mobile phase	60% ACN in 50 mM phosphate buffer (pH 2)				60% ACN in 75 mM phosphate buffer (pH 2)			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Asparic acid	1.16	0.30	1.12	L	1.16	0.40	1.48	L
Norleucine	1.07	1.66	1.26	L	1.07	1.79	1.54	L
Norvaline	1.09	1.34	1.70	L	1.10	1.39	1.74	L
Phenylglycine	1.03	1.83	0.30	D	1.04	1.87	0.64	D
Serine	1.29	0.41	2.68	L	1.35	0.43	3.50	L
Valine	1.15	1.24	2.24	L	1.16	1.34	2.44	L

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 2.2 Effect of mobile phase on the enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB.

Mobile phase	65% ACN in 0.1% TFA aq. solution				60% ACN in 0.1% TFA aq. solution			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Asparic acid	1.20	0.20	1.38	L	1.25	0.23	1.74	L
Norleucine	1.07	1.07	1.42	L	1.08	1.59	1.52	L
Norvaline	1.09	0.85	1.60	L	1.11	1.23	1.94	L
Phenylglycine	1.04	1.05	0.40	D	1.04	1.56	0.56	D
Serine	1.40	0.25	3.02	L	1.41	0.34	3.68	L
Valine	1.16	0.81	2.04	L	1.16	1.17	2.52	L

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 2.3 Effect of mobile phase on the enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB.

Mobile phase	60% ACN in 0.1% TFA aq. solution				60% ACN in 0.2% TFA aq. solution			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Asparic acid	1.25	0.23	1.74	L	1.25	0.24	1.80	L
Norleucine	1.08	1.59	1.52	L	1.08	1.70	1.60	L
Norvaline	1.11	1.23	1.94	L	1.11	1.32	2.02	L
Phenylglycine	1.04	1.56	0.56	D	1.05	1.64	0.76	D
Serine	1.41	0.34	3.68	L	1.47	0.36	3.96	L
Valine	1.16	1.17	2.52	L	1.16	1.20	2.54	L

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

산성 첨가물로 사용한 TFA 농도가 증가하는 수용액을 이동상으로 사용할 때에도 phosphate 완충 농도가 증가할 때와 동일한 경향을 보여주고 있다. 전체적으로 75mM phosphate의 60% acetonitrile buffer 용액과 0.2% TFA를 포함한 60% acetonitrile 수용액의 이동상이 좋은 광학분할을 보여주었기 때문에 Table 2.4-2.5에서 보여주는 것처럼 두개의 역상 이동상에서 18개의 N-FMOC-α-amino acid의 광학분리를 수행하였다. 두 역상 이동상 중에서 0.2% TFA를 포함한 60% acetonitrile수용액의 이동상을 사용하였을 때 75mM phosphate의 60% acetonitrile buffer 용액의 이동상을 사용하였을 때보다 머무름 시간이 짧다. 그러나 분석물질의 분리계수(α)은 전자의 이동상에서 약간 크게 나타나며 (α=1.05-1.47) 분리도(Rs) 값도 전자의 이동상에서 몇 개를 제외하고는 일반적으로 조금 크게 나타난다.(Rs=0.38-2.73) Figure 2.4은 0.2% TFA를 포함한 60% acetonitrile 수용액의 역상 이동상에서의 전형적인 광학분리 크로마토그램을 보여주고 있다.

또한 동일한 컬럼에서 0.2% TFA를 포함한 60% acetonitrile수용액을 이동상으로 하는 역상에서의 광학분할 결과를 0.1% TFA을 포함하는 5% 2-propanol/hexane 을 이동상으로 하는 순상에서의 광학분리 결과와 비교하였다.[15] 동일한 키랄 컬럼을 사용했을 때 일반적으로 순상에서의 광학분리가 역상에서의 광학분리에 비해 우수한 결과를 보여주는 것처럼, 본 연구에서도 N-FMOC glutamine, methionine, threonine, tyrosine 등 몇 개의 분석물질을 제외하고 대부분의 분석물질의 순상에서의 광학분리가 역상에서의 광학분리에 비해 우수한 결과를 보여주었다.(α=1.09-1.86, Rs=1.00-7.47)[15,17] 예외적인 대표적인 예로, 순상에서 N-FMOC glutamine은 전혀 광학분리되지 않았지만 0.2% TFA를 포함한 60% acetonitrile수용액을 이동상으로 하는 역상에서는 부분 광학분리를 보여주었다.(α=1.21, Rs=0.75) Table 2.1-2.3에서 몇 개의 N-FMOC α-amino 광학 분리에서는 역상의 이동상 종류에 관계없이 일관성 있는 용리순서를 보여주고 있으며 Table 2.4-2.5에서도 역상 이동상에서 동일한 결과를 보여주어 N-FMOC phenylglycine 분석시료만 제외하고는 L-이성질체가 늦게 용리되어진다. 그런데 흥미로운 것은 순상의 이동상에서는 N-FMOC phenylglycine 외에도 N-FMOC isoleucine, valine은 역상의 이동상 결과와 반대로 D-이성질체가 늦게 용리되어진다. 또한 순상에서는 소수성(친유성) 분석물질은 일찍 용리되고 극성 그룹이 있는 친수성 분석물질은 늦게 용리되어지나 역상에서는 hydrophobic-hydrophobic interaction이 중요하게 작용되어 정반대가 된다.[16] 그래서 역상 이동상에서 N-FMOC 2-aminocaprylic acid 같은 소수성(친유성) 물질은 가장 늦게 용리되고 N-FMOC aspartic acid, glutamic acid,

serine, threonine 같은 친수성 물질은 빠르게 용리되어진다. 이러한 실험결과로 추론해 볼 때, 순상과 역상에서 동일한 용리순서를 보여준다고 해서 양쪽 이동상에서의 키랄인지 mechanism이 동일한 형태로 작동된다고 말할 수 없을 것이다. 본 연구에서 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 키랄 컬럼인 Chiralpak IB의 순상만이 아닌 역상에서도 사용가능함을 보여주었기 때문에 이러한 측면을 이용한 광학분리의 응용이 확대되리라 기대된다.

Table 2.4 Enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB in reversed phase.

Mobile phase	60% ACN in 75mM phosphate buffer(pH 2)				60% ACN in 0.2% TFA aq. solution			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Alanine	1.37	0.97	6.82	L	1.38	0.79	5.46	L
2-Aminobutyric acid	1.24	1.16	3.72	L	1.23	1.04	3.74	L
2-Aminocaprylic acid	1.08	3.00	1.74	-	1.09	2.78	1.84	-
Aspargine	1.15	0.40	1.46	L	1.20	0.29	1.66	L
Asparic acid	1.16	0.40	1.48	L	1.25	0.24	1.80	L
Glutamine	1.17	0.30	1.26	L	1.21	0.24	1.50	L
Glutamic acid	1.11	0.38	1.30	L	1.19	0.32	1.50	L
Isoleucine	1.08	1.71	1.46	L	1.09	1.63	1.40	L
Leucine	1.00	1.66	-		1.00	1.51	-	
Metionine	1.09	1.39	1.62	L	1.09	1.25	1.58	L
Norleucine	1.07	1.79	1.94	L	1.08	1.70	1.60	L
Norvaline	1.10	1.39	1.74	L	1.11	1.32	2.02	L
Phenylglycine	1.04	1.87	0.64	D	1.05	1.64	0.76	D
Phenylalanine	1.07	1.97	1.48	L	1.08	1.87	1.52	L
Serine	1.35	0.43	3.50	L	1.47	0.36	3.96	L
Threonine	1.16	0.49	2.10	L	1.19	0.42	2.04	L
Tyrosine	1.09	0.89	1.32	L	1.10	0.79	1.44	L
Valine	1.16	1.34	2.44	L	1.16	1.20	2.54	L

Mobile phase; Flow rate = 0.5 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 2.5 Enantiomer separation of N-FMOC α-amino acids on Chiralpak IB in normal phase.

Mobile phase	5% 2-propanol/hexane with 0.1% TFA			
Analyte	α[a]	k'$_1$[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Alanine	1.64	8.22	7.47	L
2-Aminobutyric acid	1.36	6.81	5.11	L
2-Aminocaprylic acid	1.27	5.57	3.37	-
Aspargine	1.18	5.03[e]	1.28	L
Asparic acid	1.24	4.97[f]	1.78	L
Glutamine	1.00	6.27[e]	-	-
Glutamic acid	1.19	5.80[f]	1.53	L
Isoleucine	1.41	5.13	4.88	D
Leucine	1.35	5.29	4.09	D
Metionine	1.07	4.20[f]	0.79	L
Norleucine	1.17	6.16	2.38	L
Norvaline	1.12	6.61	2.25	L
Phenylglycine	1.34	3.88[f]	3.37	D
Phenylalanine	1.09	3.81[f]	1.00	L
Serine	1.86	1.96[e]	4.58	L
Threonine	1.10	4.40[f]	0.77	L
Tyrosine	1.05	11.36[e]	0.40	L
Valine	1.15	5.30	2.00	D

Mobile phase; Flow rate = 1 mL/min; Detector UV 254 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor of the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

[e,f]20% and 10% 2-propanol/hexane (V/V) with 0.1% TFA, respectively.

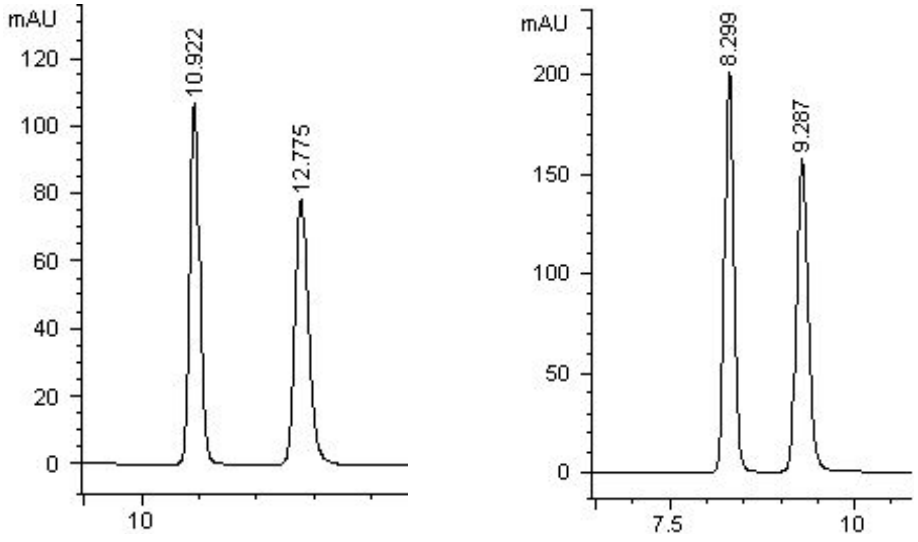


Figure 2.4 Chromatograms of enantiomer separation of N-FMOC alanine (left) and N-FMOC serine (right) on chiralpak IB. Mobile phase : 60% ACN/Water (*V/V*) with 0.2% TFA; flow rate = 0.5 mL/min ; detection UV 254 nm ; injection amount 3 μg.

2.4 결론

본 연구에서는 최근 개발된 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 키랄 컬럼인 Chiralpak IB를 이용하여 N-FMOC-α-amino acid의 광학분리를 최초로 역상 크로마토그래피에서 시도하였으며 순상에서의 실험결과와 비교하였다. 여러 역상에서의 이동상 중에서 TFA를 포함한 acetonitrile 수용액을 이동상으로 사용하는 광학분리가 가장 좋은 결과를 보였지만 TFA를 포함하는 2-propanol/hexane을 이동상으로 하는 순상에서의 결과보다는 좋지 않게 나타났다. 키랄 선택자가 공유 결합된 Chiralpak IB 키랄 컬럼을 이용한 광학분할 연구결과가 현재까지는 순상 크로마토그래피에서만 보고되어 왔지만 본 연구와 같이 역상 크로마토그래피에서도 사용가능함을 보여주었기 때문에 본 연구이후에 광학분리의 적용영역이 확대된 많은 연구가 활발히 진행될 것으로 기대된다.

References

1. Challener, C. A.; Chiral drugs, Ashgate Publishing, Aldershot, England. 2002.
2. Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Mander, L. N.; Stereochemistry of Organic Compounds, John Wiely & Sons, New YORK. 1994.
3. Hutt, A. J.; Tan, S. C.; Drugs, 52, Supp. 1996, 51.
4. Ajuja, S.; Chiral Separation by Liquid Chromatography; ACS Symposium Series, No. 471, American Chemical Society, Washington DC. 1991.
5. Bodansky, M.; Bondansky, A.; The practice of Peptide Synthesis, springer, New York. 1984.
6. Einarssn, S.; Folestad, S.; Josefssn, B.; Lagerkvist, S.; Anal. Chem. 1986, 58, 1638.
7. Yashima, E.; J. Chromatogr. A. 2001, 906, 105.
8. Okamoto, Y.; Yashima, E.; Angew. Chem. Int. Ed. 1998, 37, 1020.
9. Ghanem, A.; J. Sep. Sci. 2007, 30, 1019.
10. Ali, I.; Aboul-Enein, H. Y.; J. Sep. Sci. 2006, 29, 762.
11. Zhang, T.; Kientzy, C.; Franco, P.; Ohnishi, A.; Kagamihara, Y.; Kurosawa, H.; J. Chromatogr. A. 2005, 1075, 65.
12. Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P.; Murakami, T.; Ohnishi, A.; Kurosawa, H.; Anal. Chim. Acta. 2006, 557, 221.
13. Zhang, T.; Nguyen, D.; Franco, P.; Isobe, Y.; Michishita, T.; Murakami, T.; J. Pharma. Biomed. Anal. 2008, 46, 882.
14. Jin, J. Y.; Lee, W.; Park, J. H.; Ryoo, J. J.; J. Liq. Chrom. & Rel. Tech. 2007, 30, 1.
15. Jin, J. Y.; Lee, K. A.; Kang, J. S.; Kang, Y. K.; Baek C. S.; Lee, W.; Arch. Pharm. Res. 2007, 30, 654.
16. Lee, K. A.; Yeo, S.; Kim, K. H.; Lee, W.; Kang, J. S.; J. Pharm. Biomed. Anal. 2008, 46, 914.
17. Pirkle, W. H.; Lee, W.; Bull. Kor. Chem. Soc. 1998, 19, 1277.

Chapter III

Enantiomer Resolution of Benzophenone Imine α-Amino Acid Esters on Chiral Stationary Phases by HPLC

Abstract

A convenient liquid chromatographic method for the separation of α-amino acid esters as benzophenone Schiff base derivatives on coated chiral stationary phases (CSPs) (Chiralcel OD-H, Chiralcel OD, Chiralpak AD-H, Chiralpak AD, and Chiralpak AS) or covalently immobilized CSPs (Chiralpak IA, Chiralpak IB, and Chiralpak IC) derived from polysaccharide derivatives is described. Benzophenone imine derivatives of α-amino acid esters were readily prepared by stirring benzophenone imine and the hydrochloride salts of α-amino acid esters in 2-propanol. The chromatographic separations were conducted at a flow rate 1 mL/min and a detection wavelength of 254 nm; 0.5% 2-propanol/hexane(v/v) was used on CSPs. In general, the resolution of Chiralpak IC was superior to those of the other CSPs. In addition, the resolutions of other arylimine derivatives of α-amino acid esters and the effects of different mobile phases on the enantiomeric separation of α-amino acid esters as benzophenone imine derivatives on Chiralpak IC were investigated.

Keywords: chiral stationary phase, Benzophenone imine derivative, Enantiomer separation

3.1 서론

키랄 의약품을 개발하는 과정부터 키랄 의약품을 품질관리하는 제약분야에서 키랄 중간체 및 의약품의 합성, 분리 등 과정에서 키랄 물질들의 광학분리는 매우 중요한 연구 영역에 해당된다. 그러므로 키랄 의약품개발에서 키랄 중간체나 의약품들의 광학이성질체 순도와 절대구조를 측정하는 광학분리에 대한 많은 연구가 계속하여 진행되어 왔다.[1,2,3] 키랄 물질들의 광학분리를 위한 여러 분석방법 중에서, 키랄 고정상을 이용한 키랄 분석법은 가장 편리하고 정확한 방법으로 알려져 있다.[2] 최근 본 연구실에서 키랄 의약품을 개발하는데 중요한 물질로 알려진 α-amino acid ester와 amino alcohol의 광학 분리한 결과를 보고하였다.[4,5] 이들의 광학분리를 위해 α-amino acid ester와 amino alcohol를 9-anthraldimine Schiff base로 유도체화 한 후에, 다당 유도체의 여러 키랄 고정상에서 광학분리를 수행하였다. 이들 α-amino acid ester와 amino alcohol의 9-anthraldimine 유도체는 Chiralcel OD(OD-H)에서 상당히 좋은 광학분리를 보여주었다. 앞선 연구에서 α-amino acid ester의 9-anthraldimine 유도체를 만들기 위해서 amino acid ester HCl에 9-anthraldehyde, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene(DBU) 염기를 MgSO4와 함께 2-propanol 용매에서 상온 반응시켜 손쉽게 합성할 수 있었지만 좀 더 간편하고 더욱 편리한 유도체화 방법을 찾고자 시도하였다.[4] 그래서 α-amino acid ester와 aromatic Schiff base로 치환된 imine유도체를 만들기 위해 benzophenone imine을 사용하였다. Benzophenone imine과 α-amino acid ester와 반응하여 생성되는 benzophenone imine Schiff base 유도체의 두 개의 phenyl group이 키랄 고정상의 chiral selector에 의해 광학이성질체를 분리하기 위한 aromatic auxiliary group으로써 기능을 할 것이라 기대하였다.[6] Benzophenone imine Schiff base 유도체는 이전에 phase-transfer alkylation에서 α-amino acid ester의 비대칭 합성을 위한 물질로 사용되어 보고된 바가 있다.[7] 유도체화 반응물질로 사용하는 benzophenone imine은 쉽게 구할 수 있는 화합물일 뿐만 아니라 이를 사용할 경우, 앞선 연구의 9-anthraldimine 유도체를 만들 때 사용했던 DBU와 같은 염기를 사용하지 않아도 되기 때문에 광학분리를 위한 aromatic Schiff base 유도체로 합성방법이 더욱 간편해진 장점이 있다. Benzophenone imine은 Benzophenone과 NH_3의 축합반응물이기 때문에 α-amino acid ester HCl을 2-propanol에 녹여 benzophenone imine을 가할 경우 transamination 반응이 일어난다. 그래서 α-amino acid ester의 benz

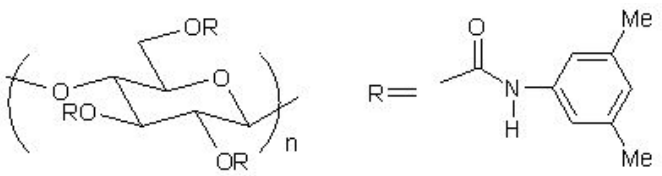
ophenone imine Schiff base 유도체를 합성하여 만들 때, α-amino acid ester HCl에 benzophenone imine만을 넣어 2-propanol 용매에서 상온 반응시킴으로 합성할 수 있지만 무수 MgSO4를 함께 첨가하여 수분을 제거함으로 더 효율적으로 유도체를 합성할 수 있었다.[5,7,8] 이러한 benzophenone imine 유도체화 반응과정은 선행 연구의 α-amino acid ester의 9-anthraldimine 유도체를 만드는 방법보다 훨씬 간편하다.[4] 또한 다당 유도체로부터 유도된 키랄 컬럼가운데 키랄 선택자가 흡착된 키랄 컬럼은 hexane, 2-propanol 등과 같은 이동상 외에 다른 이동상 용매를 사용하는데 제한을 받기 때문에 본 연구에서는 다당 유도체의 공유 결합된 키랄 컬럼만 사용하였다.[9-11] 그러므로 본 연구에서 여러 종류의 α-amino acid ester를 benzophenone imine Schiff base로 유도체한 후에 다당 유도체의 키랄 선택자가 공유 결합된 키랄 컬럼들을(Chiralpak IA, Chiralpak IB, Chiralpak IC) 사용하여 광학 분리한 연구결과를 보고하고자 한다. 이동상 용매로 0.5% 2-propanol/hexane (V/V)을 사용하였고 유속은 1 mL/min, 검출파장으로 UV 254 nm에서 실험하였다. 다만, Chiralpak IC 컬럼을 이용한 광학분석에서 몇 개의 α-amino acid methyl ester의 분석을 수행할 때에만 5% 2-propanol/hexane (V/V)을 사용하였다.

3.2 실험방법

3.2.1 실험 기기

고성능 액체 크로마토그래피 실험은 다음과 같이 구성된 HPLC 기기를 사용하여 수행하였다. Waters model 1525 binary pump, Waters auto-sampler, Waters 2487 detector(미국 Waters 회사)를 사용하였다. 키랄 컬럼으로는 Chiralpak IA, Chiralpak IB, 그리고 Chiralpak IC(250 mm L × 4.6 mm i.d., 5 μm, 일본 Daicel Chemical 회사)를 사용하였다.(Figure 4.1)

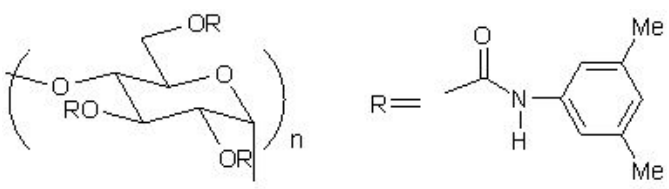
Chiralpak IA



Amylose derivative

immobilized to silica gel

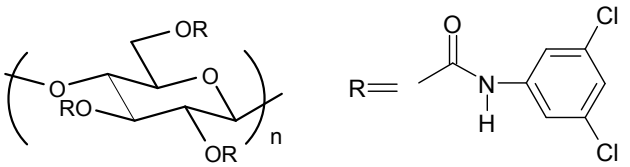
Chiralpak IB



Cellulose derivative

immobilized to silica gel

Chiralpak IC



Cellulose derivative

immobilized to silica gel

Figure 3.1 Structures of ChiralpakIA, Chiralpak IB, Chiralpak IC.

3.2.2 실험 시약

HPLC 용매로 사용하는 hexane, 2-propanol 은 J. T. Baker(Phillipsburg, NJ)에서, anhydrous magnesium sulfate(일본 순정화학), benzophenone imine과 α-amino acid methyl ester분석물질은 모두 Aldrich(Milwaukee, WI), Sigma(St. Louis, Missouri), Advanced Chem Tech(Louisville, KY) 회사로부터 구입하였다.

3.2.3 합성

α-Amino acid ethyl ester분석물질은 α-amino acid에 ethanol을 가한 후 ice-bath에서 2-3 당량의 thionyl chloride을 서서히 가하여 상온에서 밤새 교반한 다음, rotary evaporator를 이용하여 용매를 날려 건조시킨 후 분석물질로 사용하였다.[8] 분석물질의 α-amino acid ester의 benzophenone 유도체를 합성하는 방법은 다음과 같다.[5,7] (Figure 3.2) 10 mL의 2-propanol용매에 α-amino acid ester HCl 0.6 mmol, benzophenone imine 0.5 mmol, $MgSO_4$ 2.5 mmol을 가하여 12 시간동안 상온에서 교반시킨다.

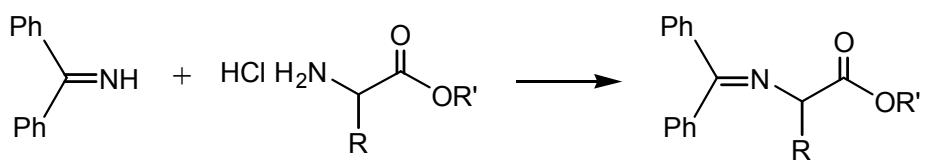


Figure 3.2 Preparation of the benzophenone imine derivatives of α-amino acid esters.

3.3 결과 및 고찰

앞선 연구에서 9-anthryl group이 키랄 고정상의 chiral selector와 광학이성질체를 분리하기 위한 aromatic auxiliary group으로써 기능을 하였던 것처럼, 본 연구의 benzophenone imine Schiff base 유도체의 두 개의 phenyl group이 그러한 역할을 할 것이라 기대하였다.[4-6] 그래서 benzophenone imine을 이용하여 다양한 종류의 α-amino acid ester의 benzophenone imine Schiff base 유도체를 합성하여 다당 유도체의 키랄 선택자가 공유결합 된 키랄 컬럼을 이용하여 광학분리를 수행하였다.

Table 3.1-3.3은 다당 유도체의 키랄 선택자가 고정상에 공유결합된 3개의 키랄 컬럼(Chiralpak IA, Chiralpak IB, Chiralpak IC)에서 10개의 α-amino acid methyl ester와 ethyl ester의 benzophenone imine 유도체를 광학 분리한 결과이다. Table 3.3에 나타난 것처럼 Chiralpak IC 키랄 컬럼에서 α-amino acid ester의 benzophenone imine 유도체의 가장 좋은 광학분리 결과를 보여주고 있다. Table 3.1, 3.2의 Chiralpak IA와 Chiralpak IB 키랄 컬럼에서는 몇 개의 분석물질을 제외하고는 대체적으로 광학분리가 되지 않았지만 Table 3.3의 Chiralpak IC 키랄 컬럼에서는 실험했던 모든 시료의 광학분리가 기준분리로 되고 있음을 보여주고 있다.(α=1.12~2.12, Rs=2.08~12.94) Table 3.1-3.3에서 α-amino acid ester의 benzophenone imine 유도체의 광학분리를 수행할 경우, 전체적으로 동일한 이동상인 0.5% 2-propanol/hexane (V/V)을 사용하였는데 Table 3.3의 Chiralpak IC 컬럼에서 asparagine methyl ester 유도체와 aspartic acid dimethyl ester 유도체 경우에는 2시간 분석시간이 지나도 전혀 용리되지 않았다. 그래서 이들 두 유도체들의 경우, 5% 2-propanol/hexane 이동상을 사용하여 asparagine methyl ester 유도체와 (α=1.48, k'_1=7.23) aspartic acid dimethyl ester 유도체(α=1.47, k'_1=7.57)의 좋은 광학분리 결과를 얻을 수 있었다.

또한 Table 3.3에서 분명하게 보여주고 있는 것처럼, 전체적으로 α-amino acid methyl ester의 benzophenone imine 유도체의 separation factor나 resolution factor의 광학분리 결과는 해당하는 ethyl ester 유도체 것보다 조금씩 더 좋게 나타나 이러한 결과는 9-anthraldimine derivatives에서의 광학분리와 같은 경향임을 보여주고 있다.[4] 또한 α-amino acid ester의 benzophenone imine 유도체의 광학분리에 있어 그

용리순서에 대한 실험을 진행하였다. 모든 시료가 광학 분리되고 있지는 않았지만, Table 3.1의 Chiralpak IA에서는 용리순서가 일정하지 않았고, Table 3.2의 Chiralpak IB에서는 L-이성질체가 일정하게 두 번째로 용리되었다. 한편, Table 3.3의 Chiralpak IC에서는 phenylglycine ester들의 유도체의 경우를 제외하고는 모든 시료에서 L-이성질체가 두 번째로 용리되었다. 아마 phenylglycine ester 유도체의 경우, chiral center에 있는 phenyl 그룹이 Chiralpak IC의 키랄 선택자와 특별한 chiral recognition interaction을 가짐으로 다른 분석물질과 정반대의 용리순서 결과가 나온 것으로 추정된다.

Table 3.1 Separation of the enantiomers of α-amino acid methyl esters as benzophenoneimine derivatives on Chiralpak IA.

Analyte	α[a]	k'1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
alanine	1.00	1.36	-	
asparagine	1.16	5.95	3.01	D
aspartic acid	1.12	4.99	2.20	D
leucine	1.00	1.16	-	
Methionine	1.00	3.83	-	
Norleucine	1.00	4.04	-	
Norvaline	1.00	1.31	-	
phenylalanine	1.00	2.05	-	
phenylglycine	1.23	3.32	2.16	D
valine	1.06	0.99	0.63	L

Mobile phase; 0.5% 2-propanol/hexane (V/V); Flow rate=1 mL/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 eluted enantiomer.

Table 3.2 Separation of the enantiomers of α-amino acid methyl esters as benzophenoneimine derivatives on Chiralpak IB.

Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
alanine	1.00	1.91	-	
asparagine	1.55	4.40	6.19	L
aspartic acid	1.49	4.23	5.70	L
leucine	1.00	0.93	-	
Methionine	1.05	2.38	0.30	L
Norleucine	1.00	1.17	-	
Norvaline	1.00	1.20	-	
phenylalanine	2.62	1.58	8.39	L
phenylglycine	1.17	1.92	0.69	L
valine	1.00	1.32	-	

Mobile phase; 0.5% 2-propanol/hexane (V/V); Flow rate=1 mL/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 eluted enantiomer.

Table 3.3 Separation of the enantiomers of α-amino acid methyl esters as benzophenoneimine derivatives on Chiralpak IC.

Analyte	α[a]	k'$_1$[b]	Rs[c]	Conf.[d]
alanine	1.48	7.32	6.67	L
asparagine	1.48	7.23[1)]	8.47	L
aspartic acid	1.47	7.57[1)]	7.48	L
leucine	1.72	3.91	6.68	L
Methionine	2.09	15.61	11.84	L
Norleucine	1.80	4.36	7.06	L
Norvaline	1.73	4.95	6.78	L
phenylalanine	1.12	8.48	2.03	L
phenylglycine	1.98	9.78	9.59	D
valine	2.12	3.33	12.94	L

Mobile phase; 0.5% 2-propanol/hexane (V/V), 1)5% 2-propanol/hexane (V/V); Flow rate=1 mL/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 eluted enantiomer.

또한 본 연구에서 개발한 분석법을 이용하여 현재 시판되고 있거나 또는 본 연구실에서 합성한 여러 α-amino acid ester의 광학순도를 측정하고자 하였다. 광학분리 실험에서 가장 좋은 결과를 보인 Chiralpak IC 컬럼을 사용하여 9개의 시료의 광학순도 측정실험을 수행하였다. Table 3.4에서 보여주고 있는 것처럼 benzophenone imine 유도체로 합성한 후 측정한 시판되고 있는 α-amino acid methyl ester의 광학순도는 99.0-99.9% 이상으로 나타났다.(이들의 광학이성질체 불순물은 < 0.1-1.0% 이다) 그리고 본 연구실에서 합성한 α-amino acid ethyl ester의 광학순도는 99.0-99.9%으로 나타났다.(이들 광학이성질체 불순물은 < 0.1-1.0%이다) 본 실험실에서 phenylglycine으로부터 합성한 phenylglycine ethyl ester의 광학순도는 99.0% 이어서, 시판되고 있는 phenylglycine methyl ester(Aldrich 시약)보다도 광학순도가 낮게 나타나는데 합성하는 과정에서 일부가 라세미화 현상이 일어난 것으로 추정된다. Figure 3.3과 Figure 3.4는 시판되고 있는 L-leucine methyl ester과 L-valine methyl ester의 광학순도를 benzophenone imine 유도체를 통하여 측정한 대표적인 크로마토그램이다. 또한 2-propanol에서 α-amino acid ester의 benzophenone imine 유도체화 이후 보관시간에 따른 시료의 안정도시험을 수행하였다. Table 3.5는 Aldrich 회사에서 시판되고 있는 L-leucine methyl ester과 L-valine methyl ester를 benzophenone imine 유도체로 합성한 후 한 달여 동안 4 ℃에 보관하면서 광학순도를 측정함으로 시료의 안정성을 보여준 실험 결과이다. Table 3.5에서 보는 바와 같이 4 ℃에서 한 달여 동안 시료를 보관하더라도 L-leucine methyl ester과 L-valine methyl ester의 benzophenone imine 유도체를 실험하여 얻은 광학순도가 매우 일정함을 보였는데 이는 본 연구에서 개발한 α-amino acid ester의 benzophenone imine 유도체 시료가 매우 안정함을 보여주는 것이라 말할 수 있다.

Table 3.4 Determination of the optical purity of commercially available or synthetic α-amino acid esters as benzophenone imine derivatives on Chiralpak IC.

Entry	Analyte	Company	D:L ratio[a]	RSD[b]
1	L-aspartic acid dimethyl ester	Aldrich	0.1 : 99.9	0.58%
2	L-leucine methyl ester	Aldrich	< 0.01 : > 99.99	0.58%
3	L-methionine methyl ester	Aldrich	0.1 : 99.9	1.53%
4	D-phenylglycine methyl ester	Aldrich	99.4:0.6	1.41%
5	L-phenylglycine methyl ester	Aldrich	0.1 : 99.9	1.15%
6	L-valine methyl ester	Aldrich	< 0.01 : > 99.99	2.31%
7	L-aspartic acid diethyl ester	Synthetic[c]	0.1 : 99.9	0.58%
8	L-leucine methyl ester	Synthetic[c]	0.1 : 99.9	2.08%
9	D-phenylglycine methyl ester	Synthetic[c]	99.0:1.0	1.35%

See experimental for chromatographic conditions.

[a]Average value of three determinations.

[b]Relative standard deviation.

[C]Synthesized sample prepared accord ing to the conven tional methods [7].

Table 3.5 Stability test of optical purity results for L-leucine methyl ester as benzophenone imine derivatives stored at 4℃ after derivatization with benzophenone imine in 2-propanol.

Storage period	L:D ratio[a]	RSD[b]
0 Day	<0.1 : >99.9	0.58%
2 Day	<0.1 : >99.9	0.47%
4 Day	<0.1 : >99.9	0.70%
7 Day	<0.1 : >99.9	1.01%
10 Day	<0.1 : >99.9	0.58%
15 Day	<0.1 : >99.9	0.75%
21 Day	<0.1 : >99.9	0.61%
27 Day	<0.1 : >99.9	0.80%
35 Day	<0.1 : >99.9	1.12%

[a]Averages of three determinations.

[b]Relative standard deviation.

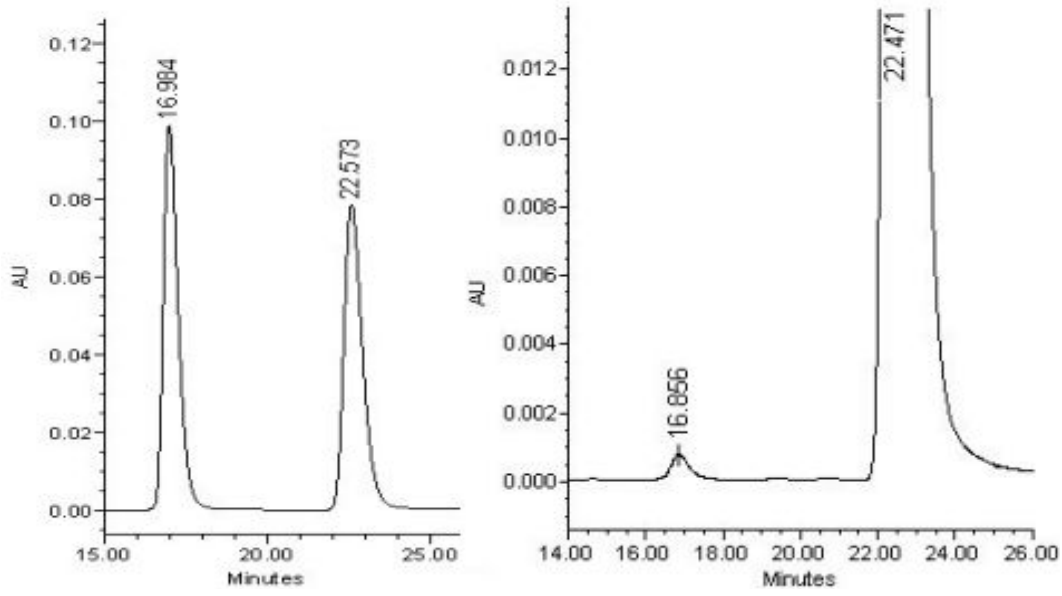


Figure 3.3 Chromatograms of the enantiomer resolution of the benzophenone imine derivative of racemic leucine methyl ester (left) and L-leucine methyl ester (right) (D : L = <0.1 : >99.9) on Chiralpak IC.
Mobile phase : 0.5% 2-propanol/hexane (V/V); flow rate = 1mL/min; detection wavelength: UV 254 nm; injection amount 4-5 μg.

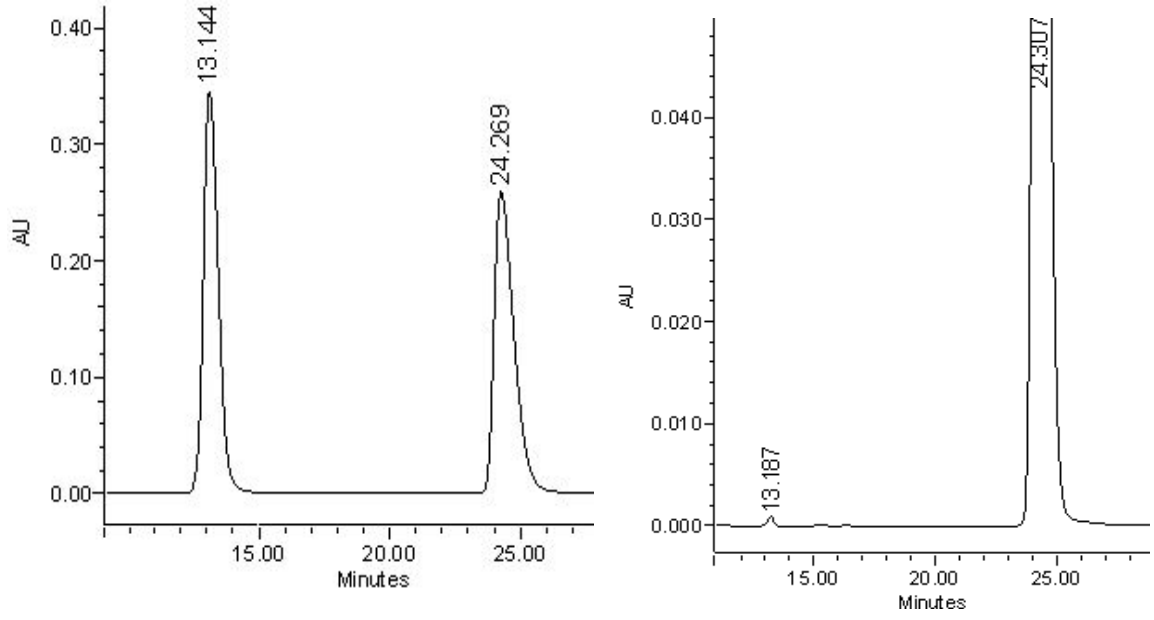


Figure 3.3 Chromatograms of the enantiomer resolution of the benzophenone imine derivative of racemic valine methyl ester (left) and L-valine methyl ester (right) (D : L = <0.1 : >99.9) on Chiralpak IC.

Mobile phase : 0.5% 2-propanol/hexane (V/V); flow rate = 1 mL/min; detection wavelength: UV 254 nm; injection amount 5-6 μg.

3.4 결론

고성능 액체 크로마토그래피에서 다당 유도체가 공유결합한 3 개의 키랄 컬럼을 사용하여 여러 종류의 α-amino acid methyl/ethyl ester의 benzophenone imine 유도체의 광학분리를 수행하였다. 이를 위하여 본 연구에서 크로마토그래피의 이동상으로 사용하는 2-propanol 용매에 α-amino acid ester와 benzophenone imine, $MgSO_4$를 반응시켜 benzophenone imine 유도체를 합성하는 매우 편리한 유도체화 방법을 개발하였다. 또한 Chiralpak IC는 본 연구에서 사용한 다른 컬럼들에 비해서 여러 α-amino acid ester 유도체 시료를 모두 기준분리하며 상당히 좋은 광학분리 결과를 보여주었다. 그리고 본 연구에서 개발한 분석법을 이용하여 현재 시판하고 있거나 합성한 여러 α-amino acid ester의 광학순도를 측정하였다. 또한 본 연구에서 개발한 유도체화 방법으로 합성된 시료의 안정도 시험을 수행하였는데 1달여 정도 4 ℃에 보관하더라도 이들의 광학순도에 변화가 없음을 확인하였다. 그러므로 α-amino acid ester의 광학분리를 위해 본 연구에서 개발한 benzophenone imine 유도체를 이용한 광학분리 분석법이 매우 유용하게 사용될 수 있으리라 기대한다.

References

1. Duchateau, A. L. L.; Guns, J. J.; Kubben, R. G. R.; van Tilburg, A. F. P.; J. Chromatogr. A, 1994, 664, 169.
2. Subramanian, G.; Chiral Separation Techniques: A practical approach second revised ed., VCH, Weinheim, 2001.
3. Francotte, E.; Lindner, W.; Chirality in Drug Research, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
4. Huang, H.; Jin, J. Y.; Lee, W.; Kor. Soc. Biotech. Bioeng. J. 2011, 26, 139.
5. Xu, W. J.; Jin, J. Y.; Lee, W.; Kor. Soc. Biotech. Bioeng. J. 2011, 26, 323.
6. Duchateau, A. L. L.; Guns, J. J.; Kubben, R. G. R.; van Tilburg, A. F. P.; J. Chromatogr. A. 1994, 664, 169.
7. O'Donnell, M. J.; Polt, R. L.; J. Org. Chem. 1982, 47, 2663.
8. Greene, T. W. and P. G. M. Wuts Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, 1999.
9. Jin, J. Y.; Lee, W.; Park, J. H.; Ryoo, J. J.; J. Liq. Chrom. & Rel. Tech. 2006, 29, 1793.
10. Jin, J. Y.; Lee, W.; Bull. Kor. Chem. Soc. 2008, 29, 491.
11. Jin, J. Y.; Bae, S. K,; Lee, W.; Chirality 2009, 21, 871.

Chapter IV

Comparative Enantiomer Separation on Chiral Stationary Phases Derived from Chiral Crown Ether by HPLC

Abstract

Comparative liquid chromatographic enantiomer separation of α-amino acids, their esters and primary amino compounds was performed using two chiral stationary phases (CSPs) prepared by covalently bonding (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid (18-C-6-TA) of the same chiral selector. In general, the separation factors and resolution factors for these analytes on CSP 1 were greater than on CSP 2, while these capacity factors on CSP 2 were quite greater than on CSP 1. Except for leucine methyl ester and phenylalanine methyl ester, the elution orders of all analytes including α-amino α-alkyl acids and phenylglycine alkyl esters on CSP 1 are identical to those on CSP 2. This study showed that different connecting structures for these two CSPs might influence their ability to resolve the analytes depending on their structures related to the chiral recognition mechanism.

Keywords: enantiomer separation, Chiral stationary phase, (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid, Chiral crown ether.

4.1 서론

본 연구팀에서 키랄 크라운 에테르인 (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid (18-C-6-TA)를 키랄 선택자로 하여 공유결합 시킨 키랄 고정상 CSP 1을 개발하여 광학분리한 연구결과를 발표하였다.[1,2] (Figure 4.1) 이 키랄 고정상은 아미노산을 포함한 1차 아미노기를 가지는 라세미 화합물의 광학분리에 매우 효과적으로 이용되었다.[1-10] 비슷한 시기에 일본의 Machida group에서도 (+)-18-C-6-TA를 공유결합시킨 키랄 고정상을 제조하여 광학 분리한 연구결과가 발표되었다.[11,12] 동일한 키랄 선택자인 (+)-18-C-6-TA로부터 출발하여 이를 공유 결합시킨 크라운 에테르 형태의 키랄 컬럼을 두 연구팀에서 독자적으로 각각 제조하였지만 이를 위한 화학적 제조방법이 서로 달라 광학분리를 위한 실제적인 키랄 고정상의 화학적 구조는 다르다. 이보다 중요한 것은, 본 연구팀에서 개발한 키랄 고정상인 CSP 1에서의 광학분리가 Machida group에서 개발한 키랄 고정상에서의 광학분리보다 훨씬 우수하게 보고되었다.[7-11] 한 예로, 1차 아미노기를 가진 모든 α-amino acid들이 CSP 1에서 성공적인 광학분리를 보였지만 CSP 2에 의해서는 전혀 광학분리가 되지 않는 경우도 여러 개 있었고 광학 분리된 경우라 할 찌라도 CSP 1에 비해 좋지 않아 separation factor가 낮게 나타났다. 키랄선택자 18-C-6-TA로부터 출발하여 실리카 젤에 공유결합시켜 개발된 이 chiral HPLC column이 세계 최초로 상품화되어 현재 (+)-18-C-6-TA로 부터 유도된 ChiroSil RCA(+)와 (-)-18-C-6-TA로부터 유도된 ChiroSil SCA(-)라는 이름으로 시판되고 있다.[8,13] 두 키랄선택자가 서로 enantiomer인 관계로 ChiroSil RCA(+)와 ChiroSil SCA(-)를 각각 사용함으로 용리순서(elution order)를 원하는 대로 바꿀 수 있는데 이는 광학순도를 측정하는 실제적인 분석과정에서 매우 유용한 장점이 있다.[8,14] CSP 1의 키랄 인지 효율성을 높이기 위해 (+)-18-C-6-TA를 기초로 한 개선된 키랄 고정상 개발을 위한 여러 노력이 진행되었는데 그 중에서 CSP 1의 aminopropyl silica gel에서의 두 개의 amide tethers의 N-H 대신 N-CH_3로 치환된 CSP 2가 개발되었다.[15] (Figure 4.1) 본 연구에서는 α-amino acids, α-amino acid esters, chiral amines등을 분석물질로 하여 (+)-18-C-6-TA로 부터 유도된 키랄 고정상인 CSP 1, CSP 2를 이용한 광학분리를 비교 수행하여 이에 관련된 chiral recognition mechanism에 대한 연구결과를 보고하고자 한다.

4.2 실험방법

4.2.1 실험 기기

액체 크로마토그래피 실험은 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 상온에서 수행하였다. Agilent 1100 HPLC system 은 HP1100 series quaternary pump, HP1100 series auto-sampler, HP1100 series Diode Array detector 를 사용하였다. Figure 5.1에서 보여주는 바와 같이, 본 연구에서 (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid (18-C-6-TA)으로부터 유도된 Chirosil RCA (250 mm L × 4.6 mm I.D., 5 μm, 대전, RS Technologies) (CSP 1)과 Chirosil N-methyl RCA (250 mm L × 4.6 mm I.D., 5 μm, 대전, RS Tech Corp) (CSP 2)를 사용하였다.

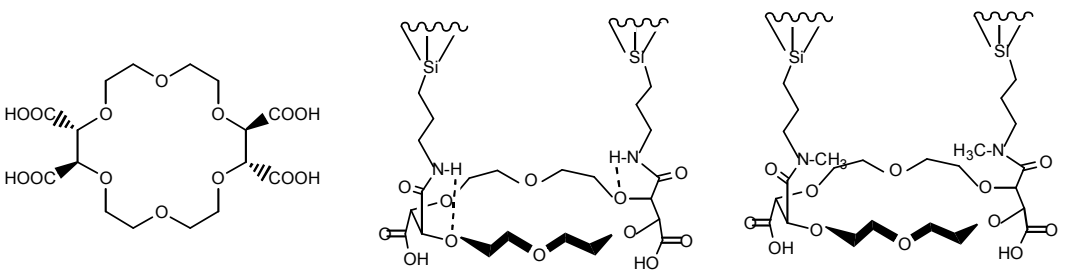


Figure 4.1 The structures of (+)-18-C-6-TA (left) and its derived CSP 1 (middle) and CSP 2 (right). Two intramolecular hydrogen bondings (dotted line) between the amide N-H hydrogen of CSP 1 and the ether oxygens of the crown ether moiety of the CSP 1 were shown.

4.2.2 실험 시약

HPLC 이동상 용매와 시약으로 methanol은 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)에서, perchloric acid는 일본 Junsei Chemical회사로부터 구입하였다. 분석물질은 모두 Aldrich (Milwaukee, WI), Sigma (St. Louis, Missouri), Advanced Chem Tech (Louisville, KY) 회사로부터 구입하였다. 이동상 용매로 perchloric acid를 acid additive로 사용한 100% methanol 또는 90% methanol/water (V/V) 을 사용하였고 유속은 1 mL/min 검출파장으로 UV 230 nm에서 실험하였다.

4.3 결과 및 고찰

Table 4.1-4.3은 여러 종류의 α-amino acid와 이들의 methyl ester 그리고 키랄 1차 아민 화합물들을 동일한 HPLC 분리조건으로 CSP 1와 CSP 2에서 광학분리한 결과이다. 먼저 Table 4.1을 보면 α-amino acid를 분석물질로 하여 전체적으로 CSP 1와 CSP 2 모두에서 좋은 광학분리 결과를 보여주었다. 용량인자는 모든 α-amino acid 분석물질에서 CSP 1보다 CSP 2에서 상당히 크게 나타났지만, 분리계수(α)는 CSP 1에서 CSP 2보다 조금씩 크게 나타나고 분리도(Rs)는 serine과 threonine을 제외한 모든 분석물질에서 CSP 1이 CSP 2보다 조금씩 크게 나타났다. Table 4.1에서 보여주고 있는 것처럼, CSP 1과 CSP 2에서의 용리순서는 같게 관찰된다. 그래서 serine과 threonine을 제외하고는 모든 분석물질의 용리순서는 D-이성질체가 두 번째로 용리되는 것으로 나타났다. 하지만 serine과 threonine의 경우는 반대로 L-이성질체가 두 번째로 용리되었다. 다른 분석물질과 달리 serine과 threonine만 정반대의 용리순서를 보이는 것은 이들 물질의 b-carbon 위치에 hydroxy group이 존재하기 때문으로 보아진다.[8] 이들 분자의 hydroxy group이 18-C-6-TA의 chiral selector와 수소결합을 함으로 앞의 경우와 다른 키랄인지 mechanism이 작용하기 때문으로 설명할 수 있다.[16,17] Figure 5.2는 대표적인 chromatogram으로, 같은 분석조건하에서 CSP 1과 CSP 2에서의 phenylglycine의 광학분리를 보여주고 있다.

Table 4.2의 여러 종류의 α-amino acid methyl esters의 광학분리결과도 전체적으로 Table 4.1의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 용량인자는 CSP 1보다 CSP 2에서 크게 나타났고, 분리계수와 분리도에서는 몇 개의 예외를 제외하고는 CSP 1에서가 CSP 2에서 보다 대체적으로 조금씩 크게 나타났다. 그런데 Table 4.1의 경향과 다르게 leucine methyl ester와 phenylalanine methyl ester는 CSP 1에서 전혀 광학 분리되지 않았지만 CSP 2에서는 광학분리가 되었다. 또한 threonine methyl ester와 serine methyl ester는 분리계수와 분리도가 CSP 2에서 더 크게 나타났다. 또한 용리순서 측면에서도 흥미로운 결과를 보여주고 있다. Table 4.2에서 CSP 1을 사용한 α-amino acid methyl esters 광학분리의 용리순서는 Table 4.1에서 CSP 1을 사용한 α-amino acid 광학분리의 것과 동일하다. 그러나 앞에서 언급하였던 것처럼, Table 4.2에서 예외적으로 CSP 2에서 CSP 1보다 더 좋은 광학분리를 보여준 leucine methyl ester와 phenylalanine methyl ester의 용리순서는 threonine methyl ester와 serine methyl

ester 경우와 같이 반대의 용리순서를 보여 L-이성질체가 두 번째로 용리되었다. 분석물질의 구조가 변화될 때 용리순서가 반대로 바뀌는 것은 이들 화학구조의 변화시 키랄 인지 mechanism에 영향을 주기 때문으로 보아지는데 그 이유에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 본다. 또한 몇 개의 예외가 있긴 하지만 전체적으로 Table 4.1에서의 α-amino acid 광학분리가 Table 4.2에서의 α-amino acid methyl ester 보다 대체적으로 크게 나타나며 용량인자도 후자의 경우가 좀 더 크게 나타난다. Table 4.3의 키랄 1차 아민 화합물의 광학분리의 경우도 Table 4.1-4.2의 전체적인 경향과 비슷하다. 그래서 용량인자는 CSP 1보다 CSP 2에서 크게 나타나지만 분리계수와 분리도는 alanine-β-naphthylamide를 제외하고는 CSP 1에서 CSP 2보다 약간 크게 나타난다.

Table 4.1-4.3에서 보여주고 있는 바와 같이, CSP 1에서 보다 CSP 2에서 분리계수 뿐만 아니라 용량인자가 대체적으로 크게 나타난 이유는 CSP 1이 가지고 있는 분자구조에 기인한 것으로 보인다. 먼저 CSP 2에서 보다 CSP 1에서 분리계수가 약간 크게 나타난 이유는 Figure 4.1의 CSP 1구조에서 보여주고 있는 것과 같이, 실리카겔에 연결된 amide tether의 N-H와 crown ether oxygens간의 intramolecular hydrogen bonding interaction으로 인하여 chiral selector분자의 freedom이 줄어들게 되는데 이것이 에너지 상으로 CSP 2에서 광학 분리하는 것보다 더 유리하게 작용된 것으로 보인다. 또한 CSP 1에서 보다 CSP 2에서의 용량인자가 큰 이유는, CSP 1의 경우 구조 자체에서 이미 형성된 intramolecular hydrogen bonding interaction으로 인해 crown ether oxygen들과 분석물질의 NH_3^+ group간의 tripod형태의 intermolecular hydrogen bonding interaction이 방해받기 때문에 빨리 용리되는 것으로 설명되어진다.[16,17](Figure 4.1) 키랄 고정상의 실리카겔에 연결된 amide tether인 CSP 1의 N-H에서 CSP의 $N-CH_3$로 바뀌는 것만으로도 chiral recognition mechanism과 관련되어 용량인자는 물론 광학분리 전체에 영향을 미치는 것으로 보아진다.

Table 4.1 Comparative enantiomer separation of α-amino acids on CSP 1 and CSP 2

Column	CSP 1				CSP 2			
Analyte	α[a]	k'1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Alanine	1.46	1.97	1.18	D	1.38	3.88	1.17	D
Arginine	1.79	2.39	2.48	D	1.77	8.52	2.32	D
Aspartic acid	1.66	1.40	2.54	D	1.58	2.93	2.48	D
Glutamic acid	1.68	1.14	2.06	D	1.57	3.19	1.98	D
Glutamine	1.45	0.91	1.83	D	1.43	2.41	1.80	D
Isoleucine	1.61	0.27	1.56	D	1.37	0.84	1.45	D
Leucine	1.46	0.50	1.42	D	1.30	1.44	1.18	D
Norleucine	1.72	0.68	1.80	D	1.54	1.60	1.37	D
Norvaline	1.71	0.68	1.57	D	1.57	1.51	1.46	D
Methionine	1.48	1.41	2.94	D	1.37	4.54	2.65	D
Phenylalanine	1.46	0.63	2.11	D	1.32	1.88	1.92	D
Phenylglycine	1.58	1.45	3.74	D	1.42	4.62	2.58	D
Serine	2.17	0.72	2.45	L	2.07	2.65	3.61	L
Threonine	1.45	0.19[1)]	0.74	L	1.42	0.42[1)]	1.09	L
Valine	1.85	0.43[1)]	1.85	D	1.68	1.00[1)]	1.58	D
Aminobutanoic acid	1.81	0.60	1.63	D	1.56	1.76	1.42	D
Aminocarproic acid	1.77	0.70	1.79	D	1.68	1.41	1.72	D

Mobile phase: 100% methanol with 10mM perchloric acid, 1) 100% methanol with 20mM perchloric acid; Flow rate=1 mL/min; Detection UV 230 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor for the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 4.2 Comparative enantiomer separation of α-amino acid methyl esters on CSP 1 and CSP 2

Column	CSP 1				CSP 2			
Analyte	α[a]	k'$_1$[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'$_1$[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Alanine	1.38	2.13	0.93	D	1.35	4.17	0.76	D
Asparagine	1.72	0.62[1)]	2.74	D	1.51	1.22[1)]	2.58	D
Aspartic acid	1.64	0.64[1)]	1.50	D	1.47	1.41[1)]	1.37	D
Leucine	1.00	0.99	-		1.22	4.57	0.52	L
Norleucine	1.36	1.08	1.24	D	1.29	2.28	1.01	D
Norvaline	1.30	1.07	1.10	D	1.27	2.61	1.04	D
Methionine	1.29	1.97	0.90	D	1.13	6.90	0.46	D
Phenylalanine	1.00	2.07	-		1.15	8.17	1.14	L
Phenylglycine	3.31	2.31	8.60	D	3.04	5.37	7.44	D
Serine	2.18	1.18	2.93	L	2.23	3.22	3.03	L
Threonine	1.76	0.17	1.14	L	2.04	0.55	1.89	L
Valine	1.75	0.29	0.83	D	1.19	2.20	0.60	D

Mobile phase: 100% methanol with 10mM perchloric acid, 1) 90% methanol/water (V/V) with 10mM perchloric acid; Flow rate=1 mL/min; Detection UV 230 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor for the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 4.3 Comparative enantiomer separation of primary chiral amine compounds on CSP 1 and CSP 2

Column	CSP 1				CSP 1			
Analyte	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'_1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
Alanine-β-naphthylamide	1.13	9.19	1.15	R	1.22	15.38	1.76	R
α-Methylbenzylamine	1.30	4.57	1.41	S	1.26	10.13	1.21	S
α-Methyltryptamine	1.05	3.53	0.20		1.00	8.12	-	
1-(1-Naphthyl)ethylamine	1.19	3.24	0.99	R	1.12	8.69	0.78	R
Norephedrine	1.07	1.89	0.36	1S,2R	1.07	3.93	0.35	1S,2R
5-Hydroxytryptophan	1.29	1.87	1.97	R	1.29	3.28	1.81	R

Mobile phase: 100% methanol with 10mM perchloric acid; Flow rate=1 mL/min; Detection UV 230 nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor for the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

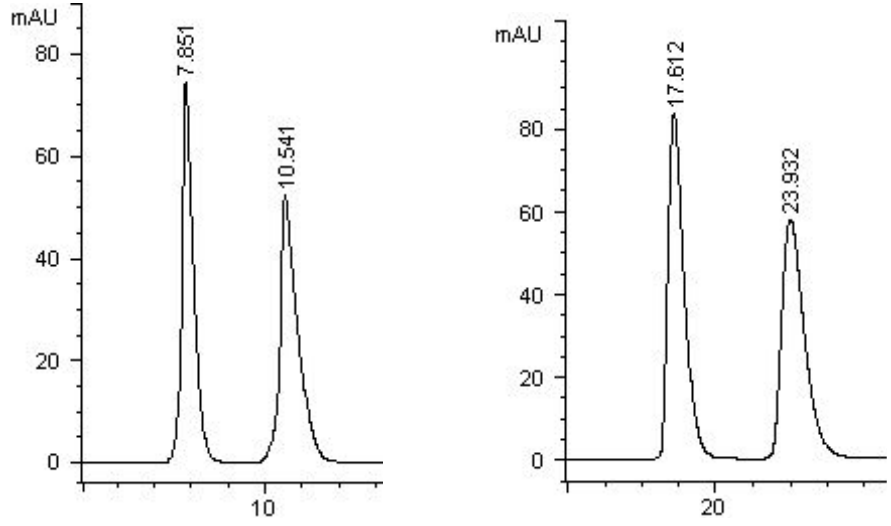
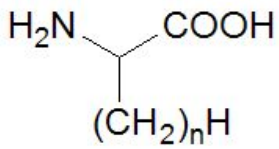


Figure 4.2 Typical chromatograms of enantiomer separation of phenylglycine on CSP 1 (left) and CSP 2 (right) (the first peak: L-isomer, the second peak: D-isomer).
Mobile phase: 100% methanol with 10mM perchloric acid; Flow rate=1mL/min; Detection UV 230nm; Injection amount 1μg.

Table 4.4,4.5는 α-amino α-alkyl acid 와 phenylglycine alkyl ester 분석물질을 대상으로 CSP 1와 CSP 2에서 광학 분리한 결과이다. Table 4.4와 Figure 4.3-4.4에서 α-amino α-alkyl acid의 alkyl group이 증가함에 따라 분리계수와 분리도가 아주 조금씩 증가하는 경향을 보여주고 있다. Table 4.5와 Figure 4.5-4.6에서는 phenylglycine alkyl ester의 alkyl group이 증가함에 따라 분리계수는 아주 작게 증가하지만 분리도는 감소하는 경향을 보여주고 있다. Table 4.4-4.5에서도 Table 4.1-4.2에서 보여주고 있는 것과 동일한 경향을 보여주고 있어 전체적으로 CSP 1에서의 분리계수와 분리도 값이 CSP 2의 값보다 약간씩 크게 나타난다.

Table 4.4 Comparative enantiomer separation of α-amino α-alkyl acids on CSP 1 and CSP 2



Analyte	CSP 1				CSP 2			
n	α[a]	k'1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
1	1.46	1.97	1.18	D	1.38	3.88	1.17	D
2	1.81	0.60	1.63	D	1.56	1.76	1.42	D
3	1.71	0.68	1.57	D	1.54	1.60	1.37	D
4	1.72	0.68	1.80	D	1.57	1.51	1.46	D
6	1.77	0.70	1.79	D	1.68	1.41	1.72	D

Mobile phase: 100% methanol with 10mM perchloric acid; Flow rate=1 mL/min; Detection UV 230 nm.

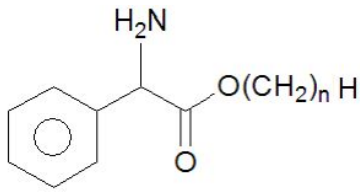
[a]Separation factor.

[b]Capacity factor for the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 4.5 Comparative enantiomer separation of phenylglycine alkyl esters on CSP 1 and CSP 2



Analyte	CSP 1				CSP 2			
n	α[a]	k'1[b]	Rs[c]	Conf.[d]	α[a]	k'1[b]	Rs[c]	Conf.[d]
1	3.31	2.31	8.60	D	3.04	5.37	7.44	D
2	3.31	2.11	7.80	D	3.15	4.68	7.30	D
4	3.35	2.22	7.42	D	3.24	4.68	7.14	D
5	3.44	1.92	7.13	D	3.24	4.44	6.99	D
6	3.47	1.93	6.85	D	3.34	4.22	6.72	D
8	3.49	1.73	6.64	D	3.39	3.93	6.58	D

Mobile phase: 100% methanol with 10mM perchloric acid; Flow rate=1mL/min; Detection UV 230nm.

[a]Separation factor.

[b]Capacity factor for the first eluted enantiomer.

[c]Resolution factor.

[d]Indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

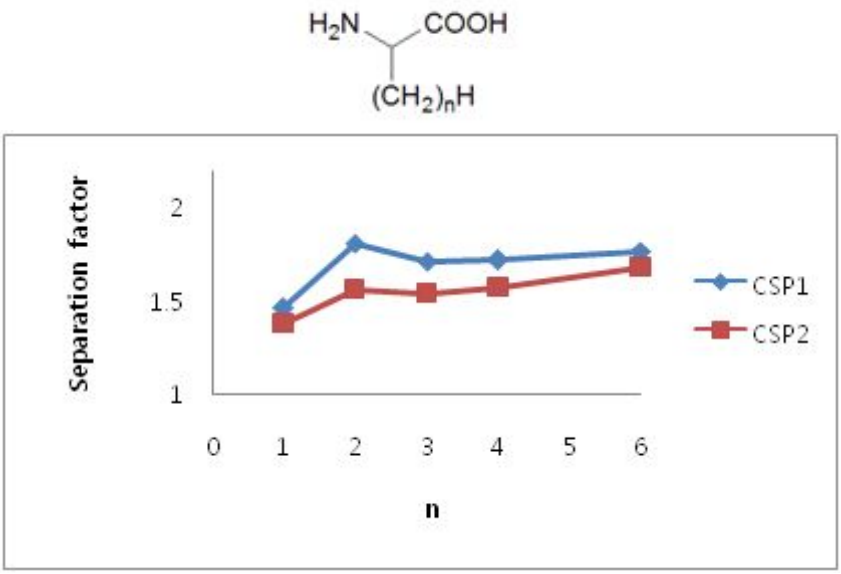


Figure 4.3 Separation factor versus the number of alkyl groups of α-amino α-alkyl acids on CSP 1 and CSP 2

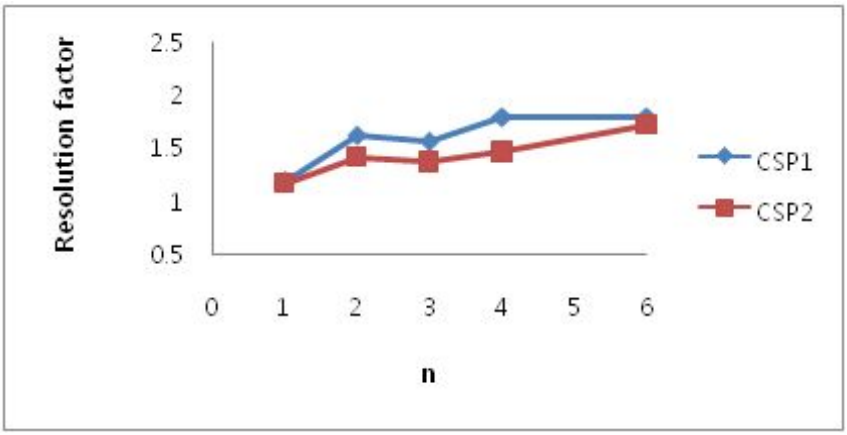
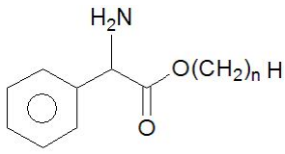


Figure 4.4 Resolution factor versus the number of alkyl groups of α-amino α-alkyl acids on CSP 1 and CSP 2



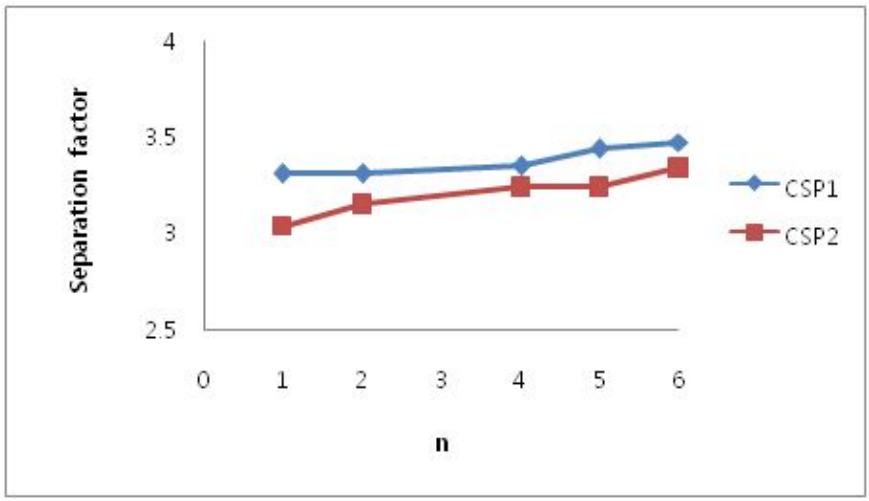


Figure 4.5 Separation factor versus the number of alkyl groups of phenylglycine alkyl esters on CSP 1 and CSP 2

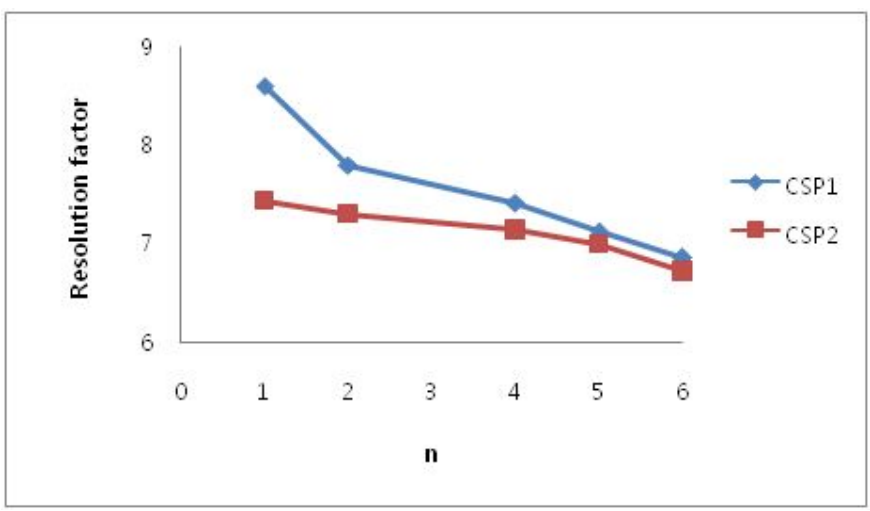


Figure 4.6 Resolution factor versus the number of alkyl groups of phenylglycine alkyl esters on CSP 1 and CSP 2

4.4 결론

본 연구에서 동일한 키랄 크라운 에테르의 키랄선택자 (+)-18-C-6-TA로부터 유도된 키랄 고정상 CSP 1과 CSP 2를 이용하여, 아미노 그룹을 포함한 α-amino acids, α-amino acid esters, chiral amines 등에 대한 광학분리 실험을 수행하였고, 이에 관련된 키랄분리 mechanism에 대해 논의하였다. 일반적으로 CSP 1에서 광학분리 결과가 CSP 2에서보다 조금씩 크게 나타나고, 용량인자의 경우는 반대로 CSP 2에서 상당히 크게 나타나는데 그 이유는 CSP2와 달리 CSP 1이 가지고 있는 분자구조에 기인한 것으로 여겨진다. 키랄고정상 구조의 특성상 CSP 1에서 intramolecular hydrogen bonding interaction이 형성됨으로 chiral recognition mechanism에 영향을 미치는 것으로 보아진다. 본 연구와 같은 키랄분리 연구를 통하여 효율성이 더 좋은 키랄 크라운 에테르 구조를 가진 키랄 고정상이 개발되기를 기대한다.

References

1. Hyun, M. H.; Jin, J. S.; Lee, W.; Bull. Kor. Chem. Soc. 1998, 19, 819.
2. Hyun, M. H.; Jin, J. S.; Lee, W.; J. Chromatogr. A. 1998, 822, 155.
3. Hyun, M. H.; Jin, J. S.; Lee, W.; J. Chromatogr. A. 1999, 837, 75.
4. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Jin, J. S.; Lee, W.; Chromatographic. 2000, 52, 473.
5. Hyun, M. H.; Han, S. C.; Cho, Y. J.; Jin, J. S.; Lee, W.; Biomed. Chromatogr. 2002, 16, 356.
6. Lee, W.; Baek, C. S.; Lee, K.; Bull. Kor. Chem. Soc. 2002, 23, 1677.
7. Lee, W.; Jin, J. Y.; Baek, C. S.; Microchem. J. 2005, 80, 213.
8. Jin, J. Y.; Lee, W.; Hyun, M. H.; J. Liq. Chrom. & Rel. Tech. 2006, 29, 841.
9. Jin, J. Y.; Lee, W.; Chirality. 2007, 19, 120.
10. Jin, J. Y.; Baek, C. S.; Lee, W.; Bull. Kor. Chem. Soc. 2007, 28, 1070.
11. Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K.; Nakai, H.; Sato, T.; J. Chromatogr. A. 1998, 805, 85.
12. Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K.; J. Chromatogr. A. 1998, 810, 33.
13. Refer to RS Tech Corp. homepage (www.rstechcorp.com).
14. Jeon, S. H.; Lee, W.; Kor. Soc. Biotech. Bioeng. J. 2010, 25: 449.
15. Hyun, M. H.; Cho, Y. J.; Kim, J. A.; Jin, J. S.; J. Chromatogr. A. 2003, 984, 163.
16. Bang, E.; Jung, J. W.; Lee, W.; Lee, D. W.; Lee, W.; J. C. S. Perkin Trans. 2001, 2, 1685.
17. Park H. J.; Choi, Y.; Lee, W.; Kim, K. R.; Electrophoresis. 2004, 25, 2755.