

역상 크로마토그래피에서 다당유도체로 공유결합된 키랄 컬럼을 이용한 거울상 이성질체의 광학분리

황 호 · 김경옥 · 백채선 · 이원재*

조선대학교 약학대학 약학과

(2009. 1. 30. 접수, 2009. 3. 23. 승인)

Enantiomer separation using a covalently immobilized chiral column derived from polysaccharide derivative by reversed phase liquid chromatography

Hu Huang, Jing Yu Jin, Chae-Sun Baek and Wonjae Lee*

College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, Korea

(Received January 30, 2009; Accepted March 23, 2009)

요 약: 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 광학분리의 선택성과 분리인자, 머무름시간에 미치는 영향을 보여주었다. 또한 역상 액체 크로마토그래피에서 *N*-FMOC α -amino acid의 광학 이성질체의 분리 결과를 순상 액체 크로마토그래피 결과와 비교하였는데 순상이동상을 사용한 것보다는 대체적으로 낮은 광학분리를 보여주었다.

Abstract: 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.

Key words : enantiomer separation, chiral column, amino acid derivative, liquid chromatography

1. 서 론

고성능 액체 크로마토그래피에서 다당류 유도체를 키랄선택자로 사용하여 만들어진 키랄 컬럼을 이용하

여 많은 광학 이성질체 화합물을 효과적으로 분리하여 왔음을 보고해 왔다.^{1,2} 그런데 이들 상용화된 키랄 컬럼은 실리카 모체에 키랄선택자로 셀룰로스나 아밀로오스의 유도체를 흡착하여 제조되었기 때문에 순상

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)62-230-6376 Fax : +82-(0)62-222-5414

E-mail : wlee@chosun.ac.kr

(normal phase) 크로마토그래피에서 실험할 경우, 여러 종류의 이동상 용매를 사용할 수 없는 컬럼의 단점을 갖고 있다. 그런 결점을 극복하기 위해 최근에 키랄선택자인 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 컬럼들이 개발되었는데 이러한 키랄 컬럼들을 이용하여 순상 크로마토그래피에서 기존의 키랄선택자가 흡착된 키랄 컬럼에서는 허용되지 않았던 용매들을 이동상으로 사용한 최근 연구들이 보고되고 있다.^{3,9} 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 키랄컬럼인 Chiralpak IB에서 키랄 물질의 선구물질이나 키랄 중간체로서 매우 유용하게 사용되고 있는 *N*-fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) α -amino acid의 광학분리를 처음으로 역상 크로마토그래피에서 시도하였다.

2. 실험

2.1. 실험 기기 및 시약

액체 크로마토그래피 실험은 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 상온에서 수행하였다. HPLC 구성 기기로 Waters model 1525 binary pump, 20 μ L loop를 가진 Rheodyne model 7125 주입기, a dual absorbance detector (Waters 2487 detector)를 사용하였다. 키랄 컬럼으로는 Chiralpak IB (250 mm L \times 4.6 mm I.D., 일본 Daicel Chemical 회사) 컬럼을 사용하였다.⁶ HPLC 용매로 사용하는 acetonitrile (ACN)은 J. T Baker (Phillipsburg, NJ)로부터 trifluoroacetic acid (TFA) 등은 모두 Aldrich (Milwaukee, WI)

혹은 Sigma (St. Louis, Missouri)회사로부터 구입하였고 분석물질은 앞선 실험에서 합성한 물질을 사용하였다.^{9,10} 이동상 용매로 acetonitrile과 phosphate buffer를 사용하여 1M NaOH나 HCl을 사용하여 pH 2를 맞춘 후 membrane filter (0.45 μ m)로 여과하여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

Table 1은 키랄선택자가 공유결합으로 지지된 Chiralpak IB 컬럼을 이용한 몇 개의 *N*-FMOC α -amino 광학분리에서 여러 종류의 역상(reversed phase) 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.^{9,10} 본 연구에서 사용한 완충용액이나 첨가물 그리고 그 농도에 따라 광학분할에 영향을 미치는데 이러한 변수들이 머무름 시간과 분리인자(R_s)에는 상당한 영향을 주나 광학분할 선택성(α)에는 그리 큰 영향을 주고 있지 않음을 보여주고 있다. phosphate buffer 용액에서 완충 농도가 증가할수록, TFA를 첨가한 수용액에서 ACN의 농도가 감소할수록 머무름 시간은 길어지고 분리인자(R_s) 값은 증가한다. 이 때 광학분할 선택성(α)은 거의 동일하거나 아주 미미하지만 증가하는 경향을 보여준다. 산성 첨가물로 사용한 TFA 농도가 증가하는 수용액을 이동상으로 사용할 때에도 phosphate 완충 농도가 증가할 때와 동일한 경향을 보여주고 있다. 전체적으로 75 mM phosphate의 60% acetonitrile buffer 용액과 0.2% TFA를 포함한 60% acetonitrile 수용액의 이동상이 좋은 광학분할을 보여주었기 때문에 Table 2에

Table 1. Effect of mobile phase on the enantiomer separation of *N*-FMOC α -amino acids on Chiralpak IB

Analyte	60% ACN in 50 mM phosphate buffer (pH 2)				60% ACN in 75 mM phosphate buffer (pH 2)				65% ACN in 0.1% TFA aq. solution				60% ACN in 0.1% TFA aq. solution				60% ACN in 0.2% TFA aq. solution			
	α^a	k_1^b	R_s^c	Conf. ^d	α^a	k_1^b	R_s^c	Conf. ^d	α^a	k_1^b	R_s^c	Conf. ^d	α^a	k_1^b	R_s^c	Conf. ^d	α^a	k_1^b	R_s^c	Conf. ^d
Asp	1.16	0.30	0.56	L	1.16	0.40	0.74	L	1.20	0.20	0.69	L	1.25	0.23	0.87	L	1.25	0.24	0.90	L
Norleu	1.07	1.66	0.63	L	1.07	1.79	0.97	L	1.07	1.07	0.71	L	1.08	1.59	0.76	L	1.08	1.70	0.80	L
Norval	1.09	1.34	0.85	L	1.10	1.39	0.87	L	1.09	0.85	0.80	L	1.11	1.23	0.97	L	1.11	1.32	1.01	L
PG	1.03	1.83	0.15	D	1.04	1.87	0.32	D	1.04	1.05	0.20	D	1.04	1.56	0.28	D	1.05	1.64	0.38	D
Ser	1.29	0.41	1.34	L	1.35	0.43	1.75	L	1.40	0.25	1.51	L	1.41	0.34	1.84	L	1.47	0.36	1.98	L
Val	1.15	1.24	1.14	L	1.16	1.34	1.22	L	1.16	0.81	1.02	L	1.16	1.17	1.26	L	1.16	1.20	1.27	L

Chromatographic conditions: Flow rate=0.5 mL/min; Detection UV 254 nm; ^aSelectivity factor. ^bCapacity factor of the first eluted enantiomer. ^cResolution factor. ^dThe absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 2. Enantiomer separation of *N*-FMOC α -amino acids on Chiralpak IB in reversed phase and normal phase

Analyte	Reversed phase mode								Normal phase mode ⁹			
	60% ACN in 75mM phosphate buffer (pH 2)				60% ACN in 0.2% TFA aq. solution				5% 2-propanol/hexane with 0.1% TFA			
	α^a	k_1^b	R_s^c	Conf. ^d	α^a	k_1^b	R_s^c	Conf. ^d	α^a	k_1^b	R_s^c	Conf. ^d
Ala	1.37	0.97	3.41	L	1.38	0.79	2.73	L	1.64	8.22	7.47	L
ABA ^e	1.24	1.16	1.86	L	1.23	1.04	1.87	L	1.36	6.81	5.11	L
ACA ^f	1.08	3.00	0.87	-	1.09	2.78	0.92	-	1.27	5.57	3.37	-
Asn	1.15	0.40	0.73	L	1.20	0.29	0.83	L	1.18	5.03 ^g	1.28	L
Asp	1.16	0.40	0.74	L	1.25	0.24	0.90	L	1.24	4.97 ^h	1.78	L
Gln	1.17	0.30	0.63	L	1.21	0.24	0.75	L	1.00	6.27 ^g	-	-
Glu	1.11	0.38	0.65	L	1.19	0.32	0.75	L	1.19	5.80 ^h	1.53	L
Ileu	1.08	1.71	0.73	L	1.09	1.63	0.70	L	1.41	5.13	4.88	D
Leu	1.00	1.66	-	-	1.00	1.51	-	-	1.35	5.29	4.09	D
Met	1.09	1.39	0.81	L	1.09	1.25	0.79	L	1.07	4.20 ^h	0.79	L
Norleu	1.07	1.79	0.97	L	1.08	1.70	0.80	L	1.17	6.16	2.38	L
Norval	1.10	1.39	0.87	L	1.11	1.32	1.01	L	1.12	6.61	2.25	L
PG	1.04	1.87	0.32	D	1.05	1.64	0.38	D	1.34	3.88 ^h	3.37	D
Phe	1.07	1.97	0.74	L	1.08	1.87	0.76	L	1.09	3.81 ^h	1.00	L
Ser	1.35	0.43	1.75	L	1.47	0.36	1.98	L	1.86	1.96 ^g	4.58	L
Thr	1.16	0.49	1.05	L	1.19	0.42	1.02	L	1.10	4.40 ^h	0.77	L
Tyr	1.09	0.89	0.66	L	1.10	0.79	0.72	L	1.05	11.36 ^g	0.40	L
Val	1.16	1.34	1.22	L	1.16	1.20	1.27	L	1.15	5.30	2.00	D

Chromatographic conditions: Flow rate=0.5 mL/min (reversed phase), 1mL/min (normal phase); Detection UV 254 nm; ^aSelectivity factor. ^bCapacity factor of the first eluted enantiomer. ^cResolution factor. ^dThe absolute configuration of the second eluted enantiomer. ^e2-Aminobutyric acid. ^f2-Aminocaprylic acid. ^{g,h}20% and 10% 2-propanol/hexane (V/V) with 0.1% TFA, respectively.

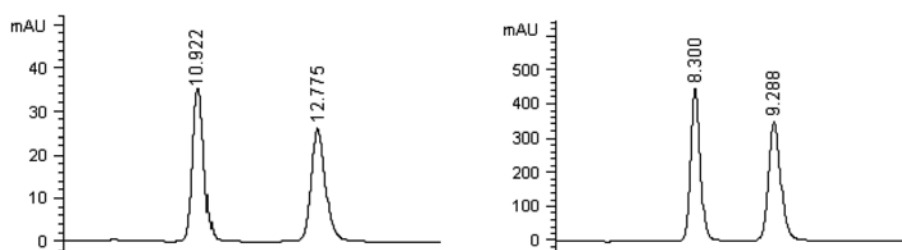


Fig. 1. Chromatograms of enantiomer separation of *N*-FMOC alanine (left) and *N*-FMOC serine (right) using 60%ACN in 0.2% TFA aqueous solution as a mobile phase. See Table 2 for chromatographic conditions.

서 보여주는 것처럼 두 개의 역상 이동상에서 18개의 *N*-FMOC α -amino acid의 광학분리를 수행하였다. 두 역상 이동상 중에서 0.2% TFA를 포함한 60% acetonitrile 수용액의 이동상을 사용하였을 때 75 mM phosphate의 60% acetonitrile buffer 용액의 이동상을 사용하였을 때 보다 머무름 시간이 짧다. 그러나 분석 물질의 광학분할 선택성(α)은 전자의 이동상에서 약간 크게 나타나며($\alpha=1.05-1.47$) 분리인자(R_s) 값도 전자의 이동상에서 몇 개를 제외하고는 일반적으로 조금 크게 나타난다($R_s=0.38-2.73$). Fig. 1은 0.2% TFA

를 포함한 60% acetonitrile 수용액의 역상 이동상에서의 전형적인 광학분리 크로마토그램을 보여주고 있다.

또한 동일한 컬럼에서 0.2% TFA를 포함한 60% acetonitrile 수용액을 이동상으로 하는 역상(reversed phase)에서의 광학분할 결과를 0.1% TFA를 포함하는 5% 2-propanol/hexane을 이동상으로 하는 순상(normal phase)에서의 광학분리 결과와 비교하였다.⁹ 동일한 키랄컬럼을 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($\alpha=1.09-1.86$, $R_s=1.00-7.47$).^{9,11} 예외적인 대표적인 예로, 순상에서 *N*-FMOC glutamine 은 전혀 광학분리되지 않았지만 0.2% TFA 를 포함한 60% acetonitrile 수용액을 이동상으로 하는 역상에서는 부분 광학분리를 보여주었다($\alpha=1.21$, $R_s=0.75$). Table 1에서 몇 개의 *N*-FMOC α -amino 광학 분리에서는 역상의 이동상 종류에 관계없이 일관성있는 용리순서(elution order)를 보여주고 있으며 Table 2에서도 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.¹⁰ 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 키랄 인지 메커니즘이 동일한 형태로 작동된다고 말할 수 없을 것이다. 본 연구에서 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 키랄컬럼인 Chiralpak IB이 순상만이 아닌 역상에서도 사용가능함을 보여주었기 때문에 이러한 측면을 이용한 광학분리의 응용이 확대되리라 기대된다.

4. 결 론

본 연구에서는 최근 개발된 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 키랄컬럼인 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 좋지않게 나타났다. 키랄선택자가 공유결합된 Chiralpak IB 키랄컬럼을 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.

인용문헌

1. E. Yashima, *J. Chromatogr. A*, **906**, 105-125(2001).
2. Y. Okamoto and E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 1020-1043(1998).
3. A. Ghanem, *J. Sep. Sci.*, **30**, 1019-1028(2007).
4. I. Ali and H. Y. Aboul-Enein, *J. Sep. Sci.*, **29**, 762-769 (2006).
5. T. Zhang, C. Kientzy, P. Franco, A. Ohnishi, Y. Kagamihara and H. J. Kurosawa, *Chromatogr. A*, **1075**, 65-75 (2005).
6. T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, T. Murakami, A. Ohnishi and H. Kurosawa, *Anal. Chim. Acta*, **557**, 221-228 (2006).
7. T. Zhang, D. Nguyen, P. Franco, Y. Isobe, T. Michishita and T. Murakami, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, **46**, 882-891(2008).
8. J. Y. Jin, W. Lee, J. H. Park and J. J. Ryoo, *J. Liq. Chrom. & Rel.Tech.*, **30**, 1-9(2007).
9. J. Y. Jin, K.-A. Lee, J. S. Kang, Y. K. Kang, C.-S. Baek and W. Lee, *Arch. Pharm. Res.* **30**, 654-664(2007).
10. K.-A. Lee, S. Yeo, K. H. Kim, W. Lee and J. S. Kang, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46**, 914-919(2008).
11. W. H. Pirkle and W. Lee, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **19**, 1277-1280(1998).