

다당 유도체를 기초로 한 키랄 컬럼에서 아미노산 에스테르의 안트라알디민 유도체의 광학분리 및 광학순도 측정

황호¹, 김경옥^{1,2}, 이원재^{1*}

Chromatographic Enantiomer Separation and Determination of Optical Purity for α -Amino Acid Esters as 9-Anthraldimine Derivatives Using Polysaccharide Based Chiral Columns

Hu Huang¹, Jing Yu Jin^{1,2}, and Wonjae Lee^{1*}

접수: 2011년 1월 31일 / 게재승인: 2011년 3월 29일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The chromatographic enantiomer separation of 9-anthraldimine derivatives of α -amino acid methyl and ethyl esters on four polysaccharide based chiral columns was performed. The 9-anthraldehyde Schiff base derivatives of α -amino acid esters were readily synthesized by stirring the α -amino acid ester hydrochloride salts with 9-anthraldehyde in the presence of 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-ene as a base and anhydrous $MgSO_4$. Chiralcel OD or Chiralcel OD-H showed the greatest enantiomer resolution of 9-anthraldimine derivatives of α -amino acid methyl and ethyl esters. The L-enantiomers of all the analytes were preferentially retained on Chiralcel OD or Chiralcel OD-H. This analytical method was applied in the determination of optical purities of several commercially available D- or L- α -amino acid methyl esters.

Keywords: Enantiomer separation, Amino acid ester, Chiral column, Optical purity

1. 서론

키랄 의약품 합성이나 생화학 분야에서 α -amino acid ester 화합물의 광학분리는 중요한 연구에 해당되기 때문에 이들의 광학분리 방법에 대하여 많은 연구가 진행되어 왔다 [1,2]. 이를 위해 α -amino acid ester 형태의 키랄 의약품이나 키랄 중간체의 광학순도 측정을 위해서 키랄 컬럼을 이용한 액체 크로마토그래피 방법이 가장 정확하고 편리한 분석법으로 알려져 있다 [2]. 그 중에서 α -amino acid ester의 아미노 그룹을 자외선 흡수를 강하게 하는 방향족 imine 그룹으로 유도체화한 후에 광학분리를 수행하는 것은 매우 유용한 측면이 있다. 특히 방향족 그룹을 가지고 있지 않는 α -amino acid ester 화합물의 경우 이러한 유도체화를 이용한 분석법이 광학 분리에 매우 유용할 것이기 때문이다. 일반적으로 imine 유도체는 알데히드와 아민과의 간단한 축합반응을 통하여 얻을 수 있으며 이는 일차 아민류의 보호그룹으로 사용되기도 하고 키랄 리간드축매로 사용하여 키랄성 화합물을 합성하는데 유용하게 응용되기도 한다 [3,4]. 키랄 imine 유도체를 이용한 광학분리의 예는 흔치 않는데 키랄 1,2-diamine 화합물을 benzaldehyde-imine의 Schiff base로 유도체화 한 후에 광학분리를 수행한 결과가 보고된 바가 있다 [5]. 본 연구에서 α -amino acid ester 광학분리를 위하여 9-anthraldehyde를 이용하였는데 이들의 축합반응으로 생성된 9-anthraldimine group의 역할은 두가지 측면에서 고려되었다. 먼저 α -amino acid ester 화합물보다 이들의 9-anthraldimine 유도체로 만든 화합물이 상당히 강한 자외선 흡수를 하기 때문에 분석물

¹조선대학교 약학대학 약학과
¹College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, Korea
Tel: +82-62-230-6376, Fax: +82-62-222-5414
E-mail: wlee@chosun.ac.kr

²Zhejiang Apelo Jia Yuan Pharmaceutical Co., Ltd.
²Zhejiang Apelo Jia Yuan Pharmaceutical Co., Ltd., Dongyang
Zhejiang, China

질을 쉽게 검출할 수 있는 장점을 이용하고자 하였다. 또 다른 측면은 9-anthraldimine 유도체로 만들어 키랄컬럼을 이용하여 광학분리하고자 할 때 유도체의 anthryl aromatic group이 chiral recognition interaction site로 작용하도록 하여 광학분리가 원활하도록 하고자 하였다. 그 이유는 광학분리를 수행할 때, 분석물질에 aromatic group이 존재하는 것이 그렇지 않을 때보다 훨씬 용이한 것으로 알려져 있기 때문이다 [6]. 또한 크라운 에테르로부터 유도된 키랄컬럼을 사용해서 α -amino acid나 이들 유도체를 직접적으로 광학분리하는 분석방법을 본 연구실에서 개발하여 매우 효과적으로 이용되고 있으나 본 연구에서와 같이 α -amino acid ester의 아미노 그룹을 자외선 흡수가 강한 방향족 imine 그룹으로 유도체화한 후에 광학분할 하는 방법이 분석물질에 따라 앞의 분석 방법보다 훨씬 유용할 수 있다 [7]. 한 예로 phenylalanine ester나 leucine ester의 경우, 본 연구실에서 개발한 크라운 에테르로부터 유도된 키랄컬럼을 사용하는 직접적 광학분할 방법으로는 분리되지 않는다. α -amino acid ester의 9-anthraldimine 유도체를 만들기 위해 amino acid ester HCl에 9-anthraldehyde, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) 염기를 $MgSO_4$ 와 함께 2-propanol 용매에서 상온 반응시켜 손쉽게 합성할 수 있었다 (Fig. 1). 또한 키랄 컬럼을 사용한 크로마토그래피에서 2-propanol을 이동상으로 사용하기 때문에 반응 용매로 2-propanol을 사용하고 반응한 후 불용물을 여과하여 크로마토그래피에 직접 주입함으로써 광학분리 실험을 매우 용이하게 진행하고자 하였다.

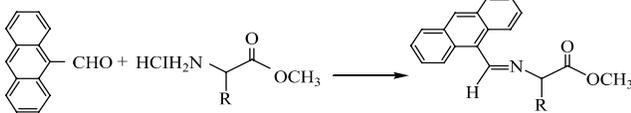


Fig 1. Preparation of 9-anthraldimine derivatives of α -amino acid methyl ester.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 실험 기기 및 시약

액체 크로마토그래피 실험은 다음의 기기들로 구성된 HPLC를 사용하여 수행하였다. Waters model 1525 binary pump, 20 μ L loop를 가진 Rheodyne model 7125 주입기, Waters 2487 detector (미국 Waters)를 사용하였다. HPLC 용매로 사용하는 n-hexane, 2-propanol은 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (일본 순정화학), magnesium sulfate anhydrous (일본 순정화학), 9-anthraldehyde와 기타 분석물질은 모두 Aldrich (Milwaukee, WI), Sigma (St. Louis, Missouri), Advanced Chem Tech (Louisville, KY) 회사로부터 구입하였다. 키랄 컬럼으로 Chiralcel OD, Chiralpak AD, Chiralcel OF (250 mm L \times 4.6 mm i.d., 10 μ m 일본 Daicel Chemical 회사), Chiralcel OD-H (250 mm L \times 4.6 mm i.d., 5 μ m 일본 Daicel Chemical 회사)를, 이동상 용매로 2-propanol/hexane (V/V)을 사용하였고 유속은 1 mL/min 검출파장으로 254 nm에서 실험하였

다. α -amino acid ester의 9-anthraldimine 유도체의 합성방법은 다음과 같다 (Fig. 1) [3]. 10 mL의 2-propanol 용매에 α -amino acid ester HCl 0.75 mmol, 9-anthraldehyde 0.5 mmol, DBU 0.5 mmol, $MgSO_4$ 2.5 mmol를 가하여 12시간동안 상온에서 교반시킨다. 반응후 불용물을 여과하고 여과액을 직접 액체크로마토그래피에 직접 주입하여 광학분리를 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

9-anthraldehyde를 이용하여 여러 종류의 α -amino acid methyl ester와 ethyl ester를 9-anthraldimine 유도체 화합물로 합성한 후 다당유도체에서 유도된 키랄 컬럼을 이용하여 광학분리를 수행하였다 [8-12]. Table 1-4는 8종류의 α -amino acid methyl ester와 ethyl ester의 9-anthraldimine 유도체를 4개의 키랄 컬럼 (Chiralcel OD, Chiralcel OD-H, Chiralpak AD와 Chiralcel OF)에서의 광학분리한 결과이다. 실험결과에서 보여주고 있는 것처럼 α -amino acid methyl ester와 ethyl ester의 9-anthraldimine 유도체의 광학분리는 Chiralcel OD ($\alpha = 1.21 \sim 5.07$, $R_s = 2.15 \sim 13.34$) 또는 Chiralcel OD-H ($\alpha = 1.24 \sim 5.47$, $R_s = 2.68 \sim 13.90$) 컬럼에서 가장 큰 분리결과를 보여 주었는데 이들 컬럼에서 광학분리 선택성과 분리인자는 상당히 높다. 또한 전체적으로 methyl ester의 9-anthraldimine 유도체의 광학분리가 ethyl ester의 유도체의 것보다 조금씩 크게 나타난다. 특히 silica gel의 입자의 크기가 5 μ m으로 충전되어 있는 Table 2의 Chiralcel OD-H가 10 μ m으로 충전되어 있는 Table 1의 Chiralcel OD에 비해 광학분리가 약간 더 좋게 나타난다 [6]. 반면 Table 4의 Chiralcel OF에서 광학분리의 선택성과 분리인자가 가장 낮았고 4개의 분석물질은 분리되지 않았다.

Table 1. Separation of the enantiomers of α -amino acid methyl and ethyl esters as 9-anthraldimine derivatives on Chiralcel OD

Analyte	α	k'_1	R_s	Absolute configuration*
Alanine methyl ester	1.24	4.50	2.56	L
Aspartic acid dimethyl ester	1.31	5.16	2.57	L
Glutamic acid methyl ester	1.92	5.31	7.30	L
Isoleucine methyl ester	3.61	1.12	9.93	L
Leucine methyl ester	3.13	1.68	10.70	L
Phenylalanine methyl ester	1.37	3.64	3.45	L
Phenylglycine methyl ester	5.07	3.33	13.34	L
Valine methyl ester	3.36	1.21	11.43	L
Alanine ethyl ester	1.21	3.67	2.15	L
Isoleucine ethyl ester	3.47	0.79	9.71	L
Leucine ethyl ester	3.09	1.23	10.08	L
Valine ethyl ester	3.26	0.87	9.61	L

Mobile phase: 10% 2-propanol/n-hexane (V/V); flow rate = 1.0 mL/min; detection UV 254 nm; *indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

이동상 용매의 조건에 따라, 예를 들어 2-propanol/hexane (V/V)의 농도가 줄어들어 용매의 비극성 성질이 커질수록

retention time이 증가되어지고 광학분리 선택성과 분리인자가 조금씩 커지는 순상컬럼에서의 일반적인 현상이 나타난다 [8]. 그러나 본 연구에서는 동일한 컬럼에서 동일한 이동상 용매조건을 [5% 또는 10% 2-propanol/*n*-hexane (V/V)] 사용하고자 의도하였던 광학분리 실험 결과를 보여주고 있다. 또한 α -amino acid ester의 9-anthraldimine 유도체의 광학분리 용리순서에 대한 실험을 진행하였다. Table 1-4에서 보여주고 있는 것처럼 Chiralcel OD와 Chiralcel OD-H에서는 L-이성질체가 일정하게 두 번째로 용리됨을 보여주지만 Chiralpak AD와 Chiralcel OF에서는 용리순서가 일정하지 않았다.

Table 2. Separation of the enantiomers of α -amino acid methyl and ethyl esters as 9-anthraldimine derivatives on Chiralcel OD-H

Analyte	α	k'_1	R_s	Absolute configuration*
Alanine methyl ester	1.25	4.10	3.10	L
Aspartic acid dimethyl ester	1.32	4.91	2.68	L
Glutamic acid methyl ester	1.94	5.11	7.65	L
Isoleucine methyl ester	3.81	0.96	13.27	L
Leucine methyl ester	3.22	1.36	11.09	L
Phenylalanine methyl ester	1.38	3.19	4.29	L
Phenylglycine methyl ester	5.47	3.24	13.90	L
Valine methyl ester	3.38	1.23	11.74	L
Alanine ethyl ester	1.24	3.61	2.92	L
Isoleucine ethyl ester	3.72	0.72	12.78	L
Leucine ethyl ester	3.10	1.15	10.56	L
Valine ethyl ester	3.24	0.82	10.02	L

Mobile phase: 10% 2-propanol/*n*-hexane (V/V); flow rate = 1.0 mL/min; detection UV 254 nm; *indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 3. Separation of the enantiomers of α -amino acid methyl and ethyl esters as 9-anthraldimine derivatives on Chiralpak AD

Analyte	α	k'_1	R_s	Absolute configuration*
Alanine methyl ester	1.00	2.65	-	-
Aspartic acid dimethyl ester	1.00	3.36	-	-
Glutamic acid methyl ester	1.14	3.76	4.27	D
Isoleucine methyl ester	1.21	0.96	1.82	D
Leucine methyl ester	1.15	1.11	1.47	L
Phenylalanine methyl ester	1.00	2.27	-	-
Phenylglycine methyl ester	1.29	4.00	3.66	L
Valine methyl ester	1.17	1.16	1.74	D
Alanine ethyl ester	1.00	2.23	-	-
Isoleucine ethyl ester	1.14	0.73	0.86	D
Leucine ethyl ester	1.08	0.80	0.73	L
Valine ethyl ester	1.10	0.86	0.90	D

Mobile phase: 5% 2-propanol/*n*-hexane (V/V); flow rate = 1.0 mL/min; detection UV 254 nm; *indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

본 연구에서 개발된 분석법을 이용하여 현재 실험용 시약으로 시판되고 있는 여러 α -amino acid methyl ester의 광학순

도를 측정하고자 하였다. Table 5은 시판되고 있는 D- 혹은 L-amino acid methyl ester의 광학순도 측정결과이다. 9-anthraldimine 유도체로 합성한 다음에 측정한 amino acid methyl ester 광학순도는 99.1%에서 99.9% 이상으로 나타났다 (분석했던 시약의 광학이성질체 불순물은 < 0.1%-0.9% 이다). Fig. 2는 9-anthraldimine 유도체를 통하여 시판하는 L-phenylalanine methyl ester의 광학순도를 측정한 대표적인 크로마토그램을 보여주고 있다.

Table 4. Separation of the enantiomers of α -amino acid methyl and ethyl esters as 9-anthraldimine derivatives on Chiralcel OF

Analyte	α	k'_1	R_s	Absolute configuration*
Alanine methyl ester	1.18	5.16	1.01	D
Aspartic acid dimethyl ester	1.00	3.41	-	-
Glutamic acid methyl ester	1.00	2.95	-	-
Isoleucine methyl ester	1.18	1.28	0.66	D
Leucine methyl ester	1.00	2.29	-	-
Phenylalanine methyl ester	1.27	6.61	1.19	L
Phenylglycine methyl ester	1.29	5.15	1.26	D
Valine methyl ester	1.17	1.62	0.67	D
Alanine ethyl ester	1.14	4.56	0.59	D
Isoleucine ethyl ester	1.13	1.18	0.38	D
Leucine ethyl ester	1.00	2.03	-	-
Valine ethyl ester	1.12	1.45	0.34	D

Mobile phase: 10% 2-propanol/*n*-hexane (V/V); flow rate = 1.0 mL/min; detection UV 254 nm; *indicates the absolute configuration of the second eluted enantiomer.

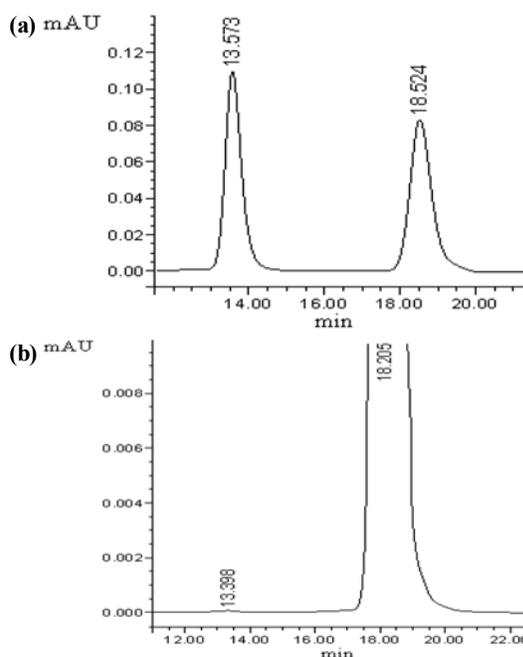


Fig 2. Typical chromatograms for enantiomer separation of 9-anthraldimine derivative of racemic phenylalanine methyl ester (a) and L-phenylalanine methyl ester (Advanced ChemTech reagent) (D : L = < 0.1 : > 99.9) (b) on Chiralcel OD-H, respectively. Mobile phase: 10% 2-propanol/*n*-hexane (V/V); flow rate = 1.0 mL/min; detection UV 254 nm; injection amount 5 μ g.

Table 5. Determination of the optical purity of commercially available α -amino acid methyl esters as 9-anthraldimine derivatives on Chiralcel OD-H

Entry	Analyte	Company	D:L ratio ^a	RSD ^b
1	D-Alanine methyl ester	Sigma	99.7 : 0.3	1.15%
2	L-Alanine methyl ester	Aldrich	0.8 : 99.2	1.21%
3	L-Aspartic acid dimethyl ester	Aldrich	0.9 : 99.1	1.07%
4	L-Leucine methyl ester	Aldrich	0.3 : 99.7	0.58%
5	L-Phenylglycine methyl ester	Aldrich	0.2 : 99.8	0.58%
6	D-Phenylalanine methyl ester	Advanced ChemTech	99.9 : 0.1	1.15%
7	L-Phenylalanine methyl ester	Advanced ChemTech	< 0.1 : > 99.9	0.62%

See experimental for chromatographic conditions. ^aAverage value of more than three times determined ^bRelative standard deviation.

앞에서도 언급한 바와 같이 α -amino acid ester의 9-anthraldimine 유도체는 자외선흡수를 강하게 하기 때문에 분석물질의 검출을 위해 매우 유리하게 이용될 수 있다. 또한 본 연구에서 개발한 분석법으로 α -amino acid의 여러 종류의 ester의 광학분리에도 폭넓게 응용될 수 있으리라 기대한다. 더 나아가서 본 연구에서 개발한 분석법으로 키랄 아민 화합물 특히 자외선흡수가 없는 지방족 키랄 아민류 화합물의 광학분리에도 효과적으로 응용될 수 있으리라 예상되어 현재 지방족 키랄 아민의 9-anthraldimine 유도체의 광학분리에 대한 연구를 진행중에 있다 [5].

4. 결론

고성능 액체 크로마토그래피에서 4개의 키랄 컬럼으로 여러 종류의 α -amino acid methyl ester와 ethyl ester의 9-anthraldimine 유도체의 광학 분리를 수행하였다. 다른 키랄 컬럼에서 보다 Chiralcel OD 또는 Chiralcel OD-H에서 가장 좋은 광학분리의 결과를 보여주었다. 그러므로 Chiralcel OD 또는 Chiralcel OD-H 키랄 컬럼은 다른 여러 가지의 α -amino acid ester의 9-anthraldimine 유도체의 광학분리에서도 가장 효과적일 것이라 기대된다. 본 연구에서 개발된 분석법을 이용하여 시판되고 있는 여러 종류의 α -amino acid methyl ester의 광학순도를 측정하였다.

References

- Subramanian, G. (Ed.) (2001) *Chiral Separation Techniques: A practical approach* second revised ed., VCH, Weinheim.
- Beesley, T. E. and R. P. W. Scott (Ed.) (1998) *Chiral Chromatography*, New York, John Wiley & Sons.
- Greene, T. W. and P. G. M. Wuts (1999) *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- Pu, L. and H.-B. Yu (2001) Catalytic asymmetric organozinc additions to carbonyl compounds. *Chem. Rev.* 101: 757-824.
- Duchateau, A. L. L., J. J. Guns, R. G. R. Kubben, and A. F. P. van Tilburg (1994) High-performance liquid chromatography of diamine enantiomers as Schiff bases on a chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A.* 664: 169-176.
- Application Guide for Chiral HPLC selection, 4th ed. (2008) Daicel Chemical Industries, Ltd.
- Hyun, M. H., J. S. Jin, and W. Lee (1998) Liquid chromatographic resolution of racemic amino acids and their derivatives on a new chiral stationary phase based on crown ether, *J. Chromatogr. A.* 822: 155-161.
- Kim, B.-H. and W. Lee (1999) Direct liquid chromatographic enantiomer separation of N-tert-butoxycarbonyl and benzyloxycarbonyl α -amino acids using polysaccharide derived chiral stationary phases. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* 22: 523-530.
- Jin, J. Y., W. Lee, J. H. Park, and J. J. Ryoo (2006) Covalently bonded and coated chiral stationary phases derived from polysaccharide derivatives for enantiomer separation of N-fluorenylmethoxycarbonyl α -amino acids with fluorescence detection. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* 29: 1793-1801.
- Jin, J. Y., W. Lee, J. H. Park, and J. J. Ryoo (2007) Liquid chromatographic enantiomer separation of N-phthaloyl protected α -amino acids on coated and immobilized chiral stationary phases derived from polysaccharide derivatives. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* 30: 1-9.
- Jin, J. Y., W. Lee, and C.-S. Baek (2008) Enantiomer resolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on chiral stationary phases derived from polysaccharide derivatives. *Chin. J. Anal. Chem.* 36: 1207-1211.
- Jin, J. Y., S. K. Bae, and W. Lee (2009) Comparative studies between covalently immobilized and coated chiral stationary phases based on polysaccharide derivatives for enantiomer separation of N-protected α -amino acids and their ester derivatives. *Chirality* 21: 871-877.