

고성능 액체 크로마토그래피에서 아미노산과 이들 에스테르의 플루오레닐메톡시카르보닐 유도체의 자외선과 형광 검출에서의 동시 광학분리

이스람 포크룰, 이원재*

Simultaneous Enantiomer Separation of α -Amino Acids and Their Esters as Fluorenylmethoxycarbonyl Derivatives under UV and Fluorescence Detection by High Performance Liquid Chromatography

Md. Fokhrul Islam and Wonjae Lee*

Received: 11 May 2015 / Revised: 23 July 2015 / Accepted: 28 July 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Liquid chromatographic enantiomer separation of α -amino acids and their methyl and ethyl esters as fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivatives was performed using a recently developed chiral column (Chiralpak IE) based on polysaccharide derivative under simultaneous UV detection and fluorescence detection. The degree of enantiomer separation of α -amino acid esters as FMOC derivatives is generally higher than that of the corresponding α -amino acids. Especially, α -amino acid methyl esters showed the greatest enantio-separation. As this method developed in this study can be applied to determine the chemical and optical purity of α -amino acids and esters, it is expected to be quite useful for their chiral separation using Chiralpak IE.

Keywords: Amino acid derivative, Chiral column, Enantiomer separation, Fluorenylmethoxycarbonyl derivative

1. INTRODUCTION

고성능 액체 크로마토그래피에서 다당류 셀룰로오스와 아미노산 유도체를 키랄선택자로 이용하여 만들어진 키랄 컬

럼을 이용하여 여러 종류의 광학 이성질체 화합물을 효과적으로 분리해 왔다 [1-3]. 그런데 이들 다당류 유도체를 이용한 키랄 컬럼들은 실리카 모체에 키랄선택자로 사용된 셀룰로오스와 아미로오스의 유도체를 흡착하여 제조되었기 때문에 순상 (normal phase) 크로마토그래피에서 실험할 경우, 여러 종류의 이동상 용매를 사용할 수 없는 컬럼의 단점을 가지고 있을 뿐만 아니라 키랄선택자를 흡착된 컬럼의 특성상 이들 컬럼의 안정성과 재현성의 여러 단점들이 보고되었다 [2-5]. 그런 결점들을 극복하기 위해 키랄선택자인 다당류 유도체를 공유결합으로 고정시킨 컬럼들이 그 이후에 개발되었는데, 이러한 키랄선택자가 공유결합된 키랄 컬럼들을 이용한 순상 크로마토그래피에서 기존의 키랄선택자가 흡착된 키랄 컬럼에서는 허용되지 않았던 halogenated solvents 같은 용매들을 이동상으로 사용한 여러 연구들이 보고되었다 [4-9]. 최근 amylose tris(3,5-dichlorophenylcarbamate)을 키랄선택자로 사용하여 실리카 젤에 공유결합된 새로운 Chiralpak IE 키랄컬럼이 소개되었다 [10-12]. 그러나 실제적인 많은 광학분리연구가 많이 진행되지 않아 아직까지 이 컬럼의 특성이 깊이 연구되지 않은 상태이며, 보고된 몇 개의 소수의 연구도 supercritical fluid chromatography에 주로 초점이 맞추어져 있다. 본 연구에서는 다당 유도체의 키랄 선택자가 고정상에 공유결합되어 최근 소개된 Chiralpak IE을 이용하여 키랄 물질의 선구물질이나 키랄 중간체로서 매우 유용하게 사용되고 있는 α -amino acid와 α -amino acid ester를 N-fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) 유도체로 만들어 고성능 액체 크로마토

그래피에서 광학분리하는 연구를 수행하고자 하였다. 여기서 사용되는 FMOC 유도체는 amino acid의 protecting group으로 유용하게 사용되고 있고 특히 solid-phase 합성에서 매우 널리 이용되고 있다 [13,14]. 본 연구팀은 선행연구에서 다당류 셀룰로오스와 아밀로오스 유도체를 키랄선택자로 이용한 키랄 컬럼가운데 많이 사용되는 Chiralpak AD, Chiralcel OD, Chiralpak IA, Chiralpak IB 등을 중심으로 FMOC α -amino acid 유도체를 광학분리하는 분석법 연구를 수행하였고 때로는 순상이 아닌 역상 분석조건을 사용하였다 [15-17]. 이 FMOC 유도체는 자외선 검출만이 아니라 선택적이고 높은 감도를 주는 형광 검출이 가능하기 때문에 광학분리에 응용될 경우 미량검출하는 키랄분석에도 큰 장점이 있으리라 예상하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 재료 및 시약

HPLC 용매나 유도체 반응을 위한 용매는 모두 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ)에서, α -amino acid 그리고 amino acid methyl ester 분석물질이나 반응에 필요한 시약들은 모두 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Chem-Impex International (Wood Dale, IL) 회사로부터 구입하였다. FMOC 으로 유도체화된 α -amino acid와 α -amino acid methyl ester 분석물질을 기존의 방법으로 합성하였는데 대표적인 합성과정은 아래와 같다 [14,18]. Racemic (또는 L) α -amino acid이나 α -amino acid methyl ester (5 mmol)를 10% aqueous sodium carbonate solution (12.5 mmol)에 녹인 다음 dioxane (7.5 mL)을 가한다. 용액을 ice-bath에서 9-FMOC chloride (5 mmol)를 천천히 가하여 상온에서 5시간 정도 교반한 다음, 혼합물에 물을 가한 후 diethyl ether로 추출하여 FMOC 유도체화된 α -amino acid와 methyl ester를 각각 얻는다. FMOC α -amino acid ethyl ester 분석물질은 다른 방법으로 합성하였다 [18]. 앞에서 합성한 racemic 또는 L-FMOC α -amino acid (1 mmol)를 5 mL 무수 ethanol에 녹인 다음 N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (1.1 mmol)를 가하여 상온에서 12시간 교반한 후 여과하여 사용하였다.

2.2. 분석기기 및 방법

고성능 액체 크로마토그래피 실험은 Agilent의 1100 series HPLC 기기를 사용하여 수행하였다. 키랄 컬럼으로 Chiralpak IE (250 mm L \times 4.6 mm i.d., 5 μ m, 일본 Daicel Chemical 회사)를 사용하였다. 이동상 용매로 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 포함한 (또는 포함하지 않는) 10% 2-propanol/hexane (v/v)을 사용하였고 유속은 1mL/min, 검출기는 Agilent의 1100 series HPLC 기기의 UV detector와 HP 1046A fluorescence detector를 on-line으로 연결하여 자외선 검출은 UV 262 nm, 형광 검출은 excitation 264 nm, emission 312 nm 하에서 동시분석하였다. 광학분리를 위한 시료의 농도는 0.05 mg/

mL이었고 시료 주입량은 2 μ L이었다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

본 연구의 α -amino acid와 이들 ester들의 광학분리를 위해 이들의 FMOC 유도체를 합성하여 사용하였고 [14,18], Table 1~3은 다당 유도체의 키랄 선택자가 고정상에 공유결합된 Chiralpak IE에서 각각 FMOC α -amino acid 그리고 FMOC α -amino acid methyl ester와 ethyl ester유도체의 광학분리한 결과를 보여주고 있다. 검출방법으로 UV 262 nm과 형광흡수 측정을 동시분석하는 방법으로 이들 광학분리가 수행되었다. Table 1의 FMOC α -amino acid를 광학분리하기 위해서 0.1% TFA가 포함된 10% 2-propanol/hexane (v/v)을 사용하였고 Table 2,3의 FMOC α -amino acid methyl ester와 ethyl ester유도체를 광학분리하기 위해서는 10% 2-propanol/hexane (v/v)를 사용하였다. 대체적으로 FMOC α -amino acid는 FMOC α -amino acid ethyl ester보다 빠르거나 비슷하게 용리되었고 FMOC α -amino acid methyl ester는 전체적으로 가장 늦게 용리되었다. 그래서 FMOC α -amino acid가 FMOC α -amino acid ethyl ester보다 빠르게 광학분리되어 용리될 경우에는, 3가지 분석물질을 하나의 분석조건에서 동시분석할 수 있었다. 또한 일반적으로 Table 1의 FMOC α -amino acid의 광학분리보다는 Table 2,3의 FMOC α -amino acid ester유도체의 광학분리가 더 좋게 나타났고, FMOC α -amino acid ester유도체중에서는 Table 3의 methyl ester유도체의 광학분리가 Table 2의 동일한 ethyl ester유도체의 결과보다 더 좋게 나타났다. 광학분리의 용리순서의 경우, 흥미롭게도 Table 1의 FMOC α -amino acid의 경우 일관성있게 나타나지 않지만, Table 2,3의 광학분리된 FMOC α -amino acid ester유도체의 경우 serine과 tyrosine 유도체만을 제외하고는 모두 일관성있게 D-isomer가 나중에 용리되었다.

Fig. 1은 racemic alanine, 그리고 alanine methyl ester와 ethyl ester의 FMOC유도체를 Chiralpak IE에서 동시 광학분리한 대표적인 chromatogram이다. 세 가지 분석물질을 동시에 광학분리하기 위해 이동상으로 0.1% TFA가 포함된 10% 2-propanol/hexane (v/v)을 사용하였다. Table 1의 FMOC α -amino acid를 광학분리하는 이동상 조건인 0.1% TFA의 첨가제가 포함된 이동상을 이용하여 FMOC α -amino acid methyl ester와 ethyl ester유도체를 광학분리를 수행하더라도 0.1% TFA의 첨가제가 넣지 않은 경우와 동일한 결과를 주기 때문에 3물질의 동시분석이 가능하였다. 또한 UV detector와 fluorescence detector를 on-line으로 직접 연결하여 동시분석하였는데 형광 검출이 UV검출보다 뛰어난 감도를 주는 장점을 쉽게 발견할 수 있다. 앞에서 언급한 것처럼 Fig. 1에서 FMOC alanine이 가장 먼저 용리되었고 FMOC alanine methyl ester가 가장 늦게 용리되었으며 세가지 화합물 모두 일관성있게 D-isomer가 나중에 용리되었다. 본 연구에서 개발한 분석법을 가지고 실제 시판중인 α -amino acid methyl ester

Table 1. Enantiomer separation of N-FMOC α -amino acids on Chiralpak IE

Entry	Analyte	k'_1	α	R_s	Conf.
1	Alanine	3.53	1.15	2.01	D
2	Aminobutyric acid	4.03	1.13	1.88	D
3	Asparagine	16.26	1.04	0.37	L
4	Aspartic Acid	6.36	1.03	0.28	L
5	Glutamine	18.01	1.21	2.19	L
6	Glutamic acid	8.46	1.18	1.95	L
7	Isoleucine	3.91	1.06	0.86	D
8	Leucine	3.13	1.17	1.90	D
9	Methionine	5.86	1.05	0.79	D
10	Norleucine	3.08	1.09	1.02	D
11	Norvaline	3.45	1.07	0.96	D
12	Phenylalanine	5.02	1.11	1.41	D
13	Phenylglycine	6.92	1.02	0.23	D
14	Serine	6.78	1.31	3.21	L
15	Tyrosine	8.86	1.06	0.90	L
16	Valine	3.77	1.16	1.85	D

Mobile phase: 10% 2-propanol/hexane (v/v) containing 0.1% TFA, Flow rate: 1 mL/min, Fluorescence detection excitation: 264 nm, emission: 312 nm. k'_1 : Retention factor of the first eluted enantiomer. α : Separation factor. R_s : Resolution factor. Conf.: The absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 2. Enantiomer separation of N-FMOC α -amino acid ethyl esters on Chiralpak IE

Entry	Analyte	k'_1	α	R_s	Conf.
1	Alanine	4.69	1.07	1.23	D
2	Aminobutyric acid	4.59	1.17	2.57	D
3	Asparagine	12.65	1.13	2.25	D
4	Aspartic Acid	10.47	1.12	2.20	D
5	Glutamine	13.15	1.37	5.67	D
6	Glutamic acid	13.76	1.00	-	-
7	Isoleucine	3.34	1.04	0.63	D
8	Leucine	3.92	1.06	0.98	D
9	Methionine	6.98	1.54	7.53	D
10	Norleucine	3.72	1.07	1.24	D
11	Norvaline	4.04	1.09	1.43	D
12	Phenylalanine	4.93	1.70	6.93	D
13	Phenylglycine	6.14	1.33	4.14	D
14	Serine	8.25	1.94	13.79	L
15	Tyrosine	12.53	1.08	0.80	L
16	Valine	3.68	1.15	2.43	D

Mobile phase: 10% 2-propanol/hexane (v/v), Flow rate: 1 mL/min, Fluorescence detection excitation: 264 nm, emission: 312 nm. k'_1 : Retention factor of the first eluted enantiomer. α : Separation factor. R_s : Resolution factor. Conf.: The absolute configuration of the second eluted enantiomer.

Table 3. Enantiomer separation of N-FMOC α -amino acid methyl esters on Chiralpak IE

Entry	Analyte	k'_1	α	R_s	Conf.
1	Alanine	6.34	1.14	2.01	D
2	Leucine	5.00	1.08	1.09	D
3	Methionine	10.49	2.03	12.24	D
4	Norleucine	5.09	1.09	1.18	D
5	Norvaline	5.56	1.16	2.21	D
6	Phenylalanine	6.10	2.48	10.81	D
7	Phenylglycine	7.75	1.54	6.08	D
8	Serine	12.63	1.38	5.16	L
9	Valine	4.23	1.14	1.88	D

Mobile phase: 10% 2-propanol/hexane (v/v), Flow rate: 1 mL/min, Fluorescence detection excitation: 264 nm, emission: 312 nm. k'_1 : Retention factor of the first eluted enantiomer. α : Separation factor. R_s : Resolution factor. Conf.: The absolute configuration of the second eluted enantiomer.

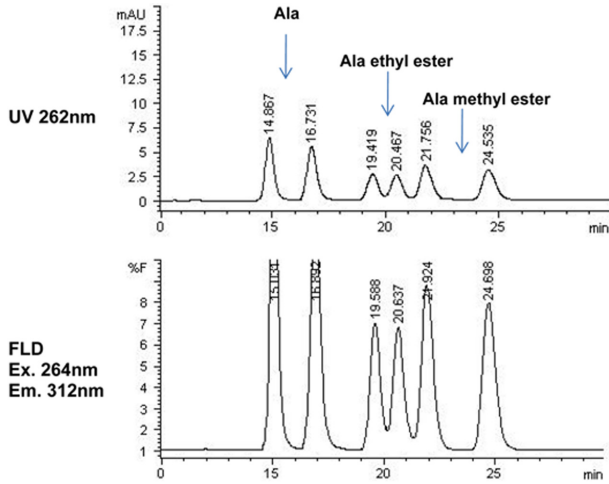


Fig. 1. Chromatograms of the resolution of racemic alanine (the first set), alanine ethyl ester (the second set) and alanine methyl ester (the third set) as FMOc derivatives under simultaneous on-line UV 262 nm (the top) and fluorescence detection (Ex. 264 nm and Em. 312 nm) (the bottom). Mobile phase: 10% 2-propanol/hexane (v/v) with 0.1% TFA, Flow rate: 1 mL/min.

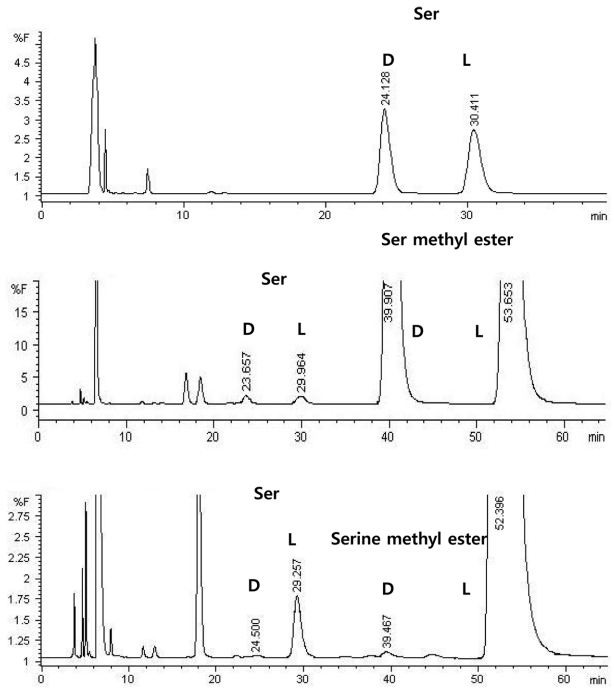


Fig. 3 Chromatograms of the resolution of racemic serine (the top), racemic serine methyl ester (Sigma-Aldrich) (the middle) and L-serine methyl ester (Sigma-Aldrich) (the bottom) as FMOc derivatives under fluorescence detection. See Fig. 1 for chromatographic conditions.

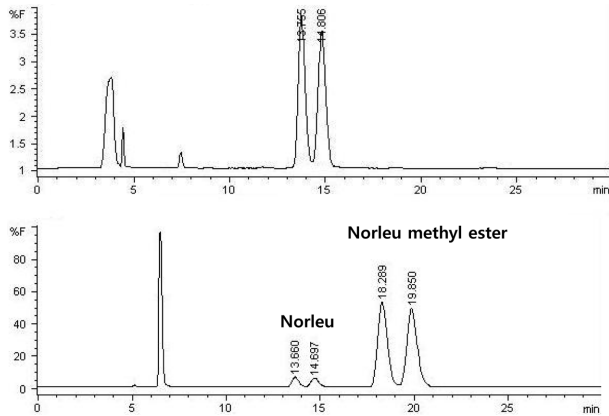


Fig. 2. Chromatograms of the resolution of racemic norleucine (the top) and norleucine methyl ester (Chem-Impex International) (the bottom) as FMOc derivatives under fluorescence detection. See Fig. 1 for chromatographic conditions.

의 광학분리를 수행하였고 이들의 화학적 순도와 광학순도를 측정하였다.

Fig. 2에서 보여주고 있는 것처럼, Chem-Impex International 회사의 racemic norleucine methyl ester (99% HPLC 순도로 표시) 시료의 경우 이를 FMOc 유도체화 반응시킨 이후 그 유도체를 광학분리하였을 때, 본래의 racemic norleucine methyl ester 외에도 불순물로 racemic norleucine이 7.70% 정도로 상당히 많이 함유되어 있음이 확인되었다. 또한 Chem-Impex International 회사의 L-norleucine methyl ester (99% HPLC 순도로 표시) 시료의 경우, 광학순도는 D-isomer : L-

isomer = 0.07 : 99.93으로 나타났지만 이 화합물에는 13.0%의 L-norleucine이 불순물로 포함되어 있었다. 이러한 화학적 순도 분석결과는 아마 racemic 또는 L-norleucine methyl ester를 합성하는 과정이 racemic 또는 L-norleucine으로부터 esterification해서 합성을 하게 되는데 7.7%나 13.0% 정도에 이르는 amino acid 출발물질이 미반응물질로 남아있는 것으로 설명된다. L-norleucine methyl ester 시료의 경우, 전체적인 키랄순도는 D-norleucine : L-norleucine : D-norleucine methyl ester : L-norleucine methyl ester = 0.04 : 12.99 : 0.06 : 86.91으로 분석되었다. 결론적으로 99% HPLC 순도로 표시되어 있는 racemic과 L-norleucine methyl ester 두 시약의 순도는 광학순도가 아닌 화학순도를 의미하지만 이들의 화학순도는 실제로 정확하지 아니한 것으로 나타났다. 본 연구와 같은 α -amino acid와 ester유도체의 동시분석을 통한 광학분리의 분석방법을 사용하지 않는다면, 화학적 순도와 광학순도를 동시에 얻는 것은 쉽지 않으리라 본다.

같은 방법으로 Fig. 3에서 보여주고 있는 것처럼, Sigma-Aldrich회사의 racemic serine methyl ester (98% 순도) 시료의 경우에는 racemic serine methyl ester외에도 racemic serine이 0.80% 불순물로 함유되어 있었다. 또한 Sigma-Aldrich 회사의 L-serine methyl ester (98% 순도) 시료의 광학순도의 경우 D-isomer : L-isomer = 0.06 : 99.94였지만 이 시료에는 0.6%가량의 L-serine이 포함되어 있었다. 동시분석의 광학분리를 통

해 L-serine methyl ester 시료 (Sigma-Aldrich 회사)의 전체적인 키랄순도는 D-serine : L-serine : D-serine methyl ester : L-serine methyl ester = 0.02 : 0.57 : 0.06 : 99.35임을 보여주었다.

4. CONCLUSION

본 연구에서 고성능 액체 크로마토그래피에서 다당 유도체가 키랄선택자로 공유결합되어 최근 소개된 Chiralpak IE 키랄 컬럼을 사용하여 α -amino acid 와 ester의 FMOC 유도체의 광학분리를 수행하였다. 대체적으로 FMOC α -amino acid ester의 경우 해당 α -amino acid의 광학분리보다 더 크게 나타났고 몇 개 시료를 제외하고는 base-line 분리가 되었다. 특히 FMOC α -amino acid methyl ester의 광학분리는 3가지 분석물질가운데 상당히 우수하게 나타났다. 본 분석법을 이용하여 시판중인 여러 α -amino acid methyl ester의 키랄순도를 측정할 수 있었다. 특히 α -amino acid methyl ester를 FMOC 유도체화한 후 광학분리한 결과, 광학적 순도는 물론 그 안에 α -amino acid 도 함유되어 있어 이들 화학적 순도까지 한번에 동시분석으로 측정할 수 있었다. α -amino acid 와 ester의 FMOC 유도체화한 이후 수행한 본 광학분리 연구는 UV detection과 fluorescence detection의 동시분석이 가능하고 특히 fluorescence detection에서 선택적이고 좋은 감도를 주는 훌륭한 장점을 가지고 있다. 그러므로 본 연구에서 개발한 Chiralpak IE 키랄 컬럼을 이용한 α -amino acid 와 ester의 FMOC 유도체의 광학분리 분석법은 많은 연구에 활용되어 유용하게 사용될 수 있으리라 기대한다.

Acknowledgements

이 논문은 2015학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

REFERENCES

1. Yashima, E. (2001) Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation, *J. Chromatogr. A* 906: 105-125.
2. Chankvetadze, B. (2012) Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers, *J. Chromatogr. A* 1269: 26-51.
3. Application Guide for Chiral HPLC selection, 4th ed., (2008) Daicel Chemical Industries, Ltd. Japan.
4. Zhang, T., C. Kientzy, P. Franco, A. Ohnishi, Y. Kagamihara, and H. Kurosawa (2005) Solvent versatility of immobilized 3,5-dimethylphenylcarbamate of amylose in enantiomeric separations by HPLC. *J. Chromatogr. A* 1075: 65-75.
5. Zhang, T., D. Nguyen, P. Franco, T. Murakami, A. Ohnishi, and H. Kurosawa (2006) Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on silica: A new chiral stationary phase for the analysis of enantiomers. *Anal. Chim. Acta* 557: 221-228.
6. 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.
7. Jin, J. Y., W. Lee, and C. -S. Baek (2008) Enantiomer resolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs on chiral stationary phases derived from polysaccharide derivatives. *Chin. J. Anal. Chem.* 36: 1207-1211.
8. 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.
9. Huang, H., W. J. Xu, J. Y. Jin, J. H. Hong, H. J. Shin and W. Lee (2012) A convenient method for the enantiomeric separation of α -amino acid esters as benzophenone imine Schiff base derivatives. *Arch. Pharm. Res.* 35: 1015-1019.
10. Zhang, T., P. Franco, D. Nguyen, R. Hamasaki, S. Miyamoto, A. Ohnishi, and T. Murakami (2012) Complementary enantio-recognition patterns and specific method optimization aspects on immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 1269: 178-188.
11. DaSilva, J. O., B. Coes, L. Frey, I. Mergelsberg, R. McClain, L. Nogle, and C. J. Welch (2014) Evaluation of non-conventional polar modifiers on immobilized chiral stationary phases for improved resolution of enantiomers by supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1328: 98-103.
12. Lee, J., J. T. Lee, W. L. Watts, J. Barendt, T. Q. Yan, Y. Huang, F. Riley, M. Hardink, J. Bradow, and P. Franco (2014) On the method development of immobilized polysaccharide chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using an extended range of modifiers. *J. Chromatogr. A* 1374: 238-246.
13. Burgess, K., (2000) *Solid-Phase Organic Synthesis*. 3rd ed., John Wiley & Sons, NY, USA.
14. Greene, T. W., and P. G. M. Wuts, (1999) *Protective Groups in Organic Synthesis*. 3rd ed., John Wiley & Sons, NY, USA.
15. Lee, K.-A., S. Yeo, K. H. Kim, W. Lee, and J. S. Kang (2008) Enantioseparation of N-fluorenylmethoxycarbonyl α -amino acids on polysaccharide-derived chiral stationary phases by reverse mode liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46: 914-919.
16. 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.
17. Li, Y. H., C.-S. Baek, B. W. Jo, and W. Lee (2005) Direct chiral separation of N-fluorenylmethoxycarbonyl α -amino acids by HPLC for determination of enantiomeric purity, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 26: 998-1000.
18. Bodansky, M. and A. Bodansky (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*. Springer, NY, USA.