

## 리파아제에 의한 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 시오에스터의 Dynamic Kinetic Resolution을 위한 라세미화 촉매로서의 고체 염기

김 상 범 · 원 기 훈 · † 문 상 진 · 김 광 제 · <sup>1</sup>박 흥 우  
한국화학연구원, <sup>1</sup>한양대학교 화학공학과  
(접수 : 2004. 2. 28., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

### Solid Bases as Racemization Catalyst for Lipase-catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Naproxen 2,2,2-Trifluoroethyl Thioester

Sangbum Kim, Keehoon Won, Sang-Jin Moon†, Kwang-Je Kim, and Hong Woo Park<sup>1</sup>  
Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-343, Korea  
<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea  
(Received : 2004. 2. 28., Accepted : 2004. 6. 24.)

A variety of solid bases such as inorganic bases, basic anion exchange resins, and resin-bound bases were tested as a catalyst for racemization of (S)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester in isooctane at 45°C. Among the various bases, DIAION WA30, which is a weakly basic anion exchange resin with a tertiary amine based on a highly porous type styrene-divinylbenzene copolymer, showed the highest catalytic activity. The second-order interconversion constant of DIAION WA30 was  $8.6 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and about 3 times higher than that of trioctylamine under the same conditions. The rate of DIAION WA30-catalyzed racemization decreased with increasing an amount of water added to the reaction medium. Lipase-catalyzed kinetic resolution of racemic naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester was successfully carried out under in situ racemization of substrate with DIAION WA30 in isooctane at 45°C. More than 60% conversion and 99% enantiomeric excess for the desired (S)-naproxen product were obtained. Furthermore, such a solid base catalyst could be easily separated and reused in contrast to trioctylamine.

**Key Words** : Dynamic kinetic resolution, lipase, naproxen, solid base, racemization

#### 서 론

키랄 의약품 (chiral drugs)은 보통의 조건에서는 물리적, 화학적 성질이 동일하지만 생체 내와 같은 키랄 환경에서는 흡수 및 대사, 수용체와의 상호작용 등에 있어 이성질체 간에 다른 생리활성을 나타낸다. 대표적인 예로서 1960년대 입산부의 구토 방지 및 안정제로 사용되었던 탈리도마이드 (thalidomide)는 초기에는 별다른 부작용을 감지하지 못해 라세믹 혼합물로 판매되었다. 그러나 판매 개시 이후 기형아의 출생이 급증했고, 결국 (R)-이성질체는 별다른 부작용이 없지만 (S)-이성질체는 태아에 대해 고도의 기형유발작용을 갖고 있다는 사실이 뒤늦게 밝혀졌다. 한편 1992

년 미국 FDA는 새로운 가이드라인을 제시하였는데 이에 따르면 광학활성을 가지는 의약품 개발 시 각각의 단일 이성질체의 독성자료 등을 요구함으로써 약효가 우수하고 부작용이 적은 광학활성 단일 이성질체로의 신약개발을 적극 유도하고 있다. 그 후 단일 이성질체로 판매되는 광학활성 의약품수는 꾸준히 증가하여 2001년 전 세계 의약품 시장인 4,100억불 중 36%인 1,470억불이 단일 이성질체 의약품의 시장규모였다(1).

단일 이성질체 키랄 의약품을 생산하는 방법으로서 효소를 이용한 광학분할 반응은 오랫동안 연구되어져 왔다 (2-6). 효소적 방법은 반응 조건이 온화하고, 환경친화적이며 에너지 소비가 적은 장점을 갖고 있기 때문이다. 효소적 광학 분할 방법은 라세메이트 (racemate)인 기질로부터 효소의 광학선택성을 이용해 한 가지 광학이성질체만을 다른 물질로 변환시켜 라세메이트를 분리하는 것으로 이론적 최대 수율이 50% 밖에 안 된다는 단점이 있다. 이를 해결하기 위해서는 반응 후, 기질과 생성물을 분리하고,

† Corresponding Author : Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-343, Korea  
Tel : +82-42-860-7517, Fax : +82-42-860-7590  
E-mail : moonsj@kRICT.re.kr

다시 미 반응 기질을 라세미화 (racemization)를 해야 한다. 그러나 이러한 일련의 공정, 즉 반응, 분리 및 라세미화를 반복적으로 여러 번 거쳐야 생산수율을 높일 수 있어 비경제적이라고 할 수 있다. 이런 문제점을 해결하고자 최근 다이내믹 분할 (dynamic kinetic resolution, DKR) 방법이 많이 연구되고 있다(7, 8). DKR 방법은 효소적 분할 반응과 기질의 라세미화 반응을 동시에 수행하는 것으로 최대 이론적 수율이 100%가 될 수 있다. 라세미화 방법으로는 현재 염기나 전이금속을 이용한 화학적인 방법(9)과 효소적 방법(10)이 연구되고 있다.

본 연구에서 선정한 나프록센 (2-(6-methoxy-2-naphthyl) propionic acid)은 비스테로이드 계열의 소염진통제 (NSAID)로서 (S)-이성질체가 (R)-이성질체에 비해 28배 더 높은 활성을 가지고 있어 현재 단일 이성질체로 판매되고 있다. 리파아제를 이용한 나프록센의 광학분할에 관한 많은 연구가 이루어졌으나 전통적인 분할방법으로는 50% 이상의 수율을 얻을 수는 없다. 나프록센과 같은 2-아릴프로피온산 (2-arylpropionic acid)의 경우 키랄 센터인 알파-탄소 ( $\alpha$ -carbon)로부터 양성자를 떼어내면 평면의 enolate를 형성하여 라세미화가 가능하다. 그러나 효소적 분할 방법을 수행하면서 동시에 라세미화가 일어나기 위해서는 기질에 있는 키랄 센터 양성자가 온화한 조건에서 deprotonation이 일어나도록 충분히 acidic해야 한다. 씨오에스터 (thioester)의 경우, 알파-양성자 ( $\alpha$ -proton)가 충분히 acidic하여 염기 촉매에 의해 라세미화가 가능하였다(11). 이러한 점을 이용해 Tsai 그룹에서는 나프록센을 먼저 화학적으로 나프록센 씨오에스터로 만든 후 효소와 유기 염기인 트리옥틸아민 (trioctylamine)을 사용하여 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 씨오에스터의 DKR을 성공적으로 수행하였다(12, 13).

그러나 트리옥틸아민과 같은 염기는 반응매질에 용해된 상태로 작용하기 때문에 반응 후 회수가 어려우며 재사용도 불가능하다. 따라서 본 연구에서는 반응매질에 녹지 않아 회수 및 재사용이 가능하면서도 트리옥틸아민보다 더 높은 속도로 기질의 라세미화를 일으킬 수 있는 고체 염기를 찾아보았다.

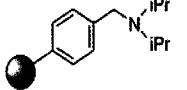
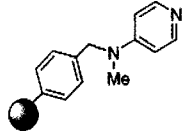
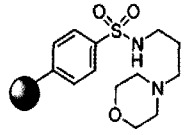
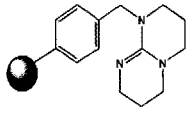
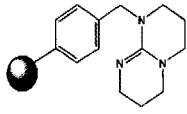
## 재료 및 방법

### 재료

(S)-나프록센 나트륨 염은 화원약품에서 제공받았으며, 분석을 위한 (S)-나프록센과 효소 촉매인 *Candida rugosa* 리파아제 (EC 3.1.1.3)는 미국 Sigma사의 제품 (Type VII, L1754)이었다. 강염기성 음이온교환수지인 DIAION PA308, PA312, PA408, AMP26과 약염기성 음이온교환수지인 DIAION WA30은 삼양사로부터 구입하였고 작용기의 농도는 원소분석법에 의해 측정되었다. 폴리스티렌에 고정화된 염기인 PS-DIEA (*N,N*-(diisopropyl)aminomethyl polystyrene), PS-DMAP (*N*-(methylpolystyrene)-4-(methylamino) pyridine), PS-NMM (3-(morpholino)propyl polystyrene sulfonamide), PS-TBD (1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene polystyrene) 등은 미국 Argonaut Technologies사로부터 제공받았고, PS-TBD의 경우는 스위스 Fluka사로부터도 구입하였다. 고체 염기들은 상

온에서 건조된 후 실험에 사용되었고, Table 1에 정리하여 나타내었다. 그 외의 시약은 분석 등급으로 미국 Aldrich사 등에서 구입하였다.

**Table 1.** Various polystyrene-bound bases tested for the racemization of (S)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester in isooctane

Solid bases	Cross-linker divinylbenzene	Average diameter ( $\mu\text{m}$ )	Loading (mmol/g)	Functional group
DIAION PA308	4%	750	3.66	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
DIAION PA312	6%	750	3.47	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
DIAION PA408	4%	750	3.39	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_4\text{OHCl}^-$
DIAION AMP26	6%	750	3.26	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_4\text{OHCl}^-$
DIAION WA30	5%	750	4.56	$-(\text{CH}_2)_{1-3}\text{N}(\text{CH}_3)_2$
PS-DIEA	2%	415	3.9	
PS-DMAP	4%	384	1.57	
PS-NMM	1%	110	1.7	
PS-TBD	1%	103	1.31	
PS-TBD (Fluka)	2%	167	2.6	

### 라세믹 및 (S)-나프록센 합성

(S)-나프록센 나트륨 염 25 g과 NaOH 16 g을 에틸렌 글리콜 (ethylene glycol) 150 mL에 녹인 후 175°C에서 6시간 동안 reflux하에서 교반하였다(14). 그 후 생성물을 상온에서 식힌 후 1N HCl 120 mL를 첨가하면 백색 결정이 석출된다. 이를 필터를 통해 걸러낸 후 증류수로 여러 번 세척을 한 뒤 건조하여 라세믹 나프록센을 얻었다. 키랄 컬럼 (Chiralcel OD-H, Daicel Chemical Industries)이 장착된 HPLC를 이용하여 2개의 peaks를 확인하였다. (S)-나프록센의 경우 (S)-나프록센 나트륨 염을 상온에서 1N HCl로 처리하여 얻을 수 있었다.

### 라세믹 및 (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 씨오에스터 합성

냉장 보관된 용매 1,2-dimethoxyethane 25 mL에 라세믹 혹은 (S)-나프록센 (200 mM), 무수 pyridine (600 mM), phenyl dichlorophosphate (300 mM), 2,2,2-trifluoroethanethiol (320 mM) 등을 첨가하여 교반하였다. 실온이며 16시간 동안 반

응을 수행하였다(12). 반응 후 생성물을 추출하여 HPLC로 확인하였다.

### (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터의 라세미화 반응

아이소옥탄 10 mL에 3 mM의 (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터를 녹인 후 건조된 50 mg의 다양한 고체 염기를 각각 넣고 45°C에서 교반하여 반응을 수행하였다. 시간에 따른 각 샘플들을 표본하여 HPLC로 분석하였다. 라세미화 반응시 선택성을 측정하는 척도로 enantiomeric excess (ee<sub>s</sub>)값을 사용하였으며 아래의 식(1)과 같이 정의된다.

$$\text{Enantiomeric excess of substrate (ee}_s\text{)} = \frac{[S_S] - [S_R]}{[S_S] + [S_R]} \quad (1)$$

여기서 [S<sub>S</sub>]는 (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터의 농도, [S<sub>R</sub>]은 (R)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터의 농도를 나타낸다.

### DIAION WA30을 이용한 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터의 DKR

아이소옥탄 15 mL에 3 mM의 라세믹 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터, 리피아제 0.45 g, 효소 대비 6.4% (v/w)의 물, DIAION WA30 (50 mg)을 첨가하여 45°C에서 교반하여 진행하였다. 각 시간마다 표본된 샘플을 HPLC 시스템에서 분석하여 아래 식(2), (3)과 같이 정의된 전환율 (conversion)과 enantiomeric excess (ee<sub>p</sub>)을 각각 구하였다. 한편 DIAION WA30은 아이소옥탄 내에서 기질인 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터를 소량 흡착하는 것으로 드러나 데이터로서 나타내지 않았지만 흡착등온선으로 흡착정도를 정량화하였다. Fig. 4에 나타낸 전환율은 흡착된 양을 감안하여 계산된 값이다.

$$\text{Conversion (\%)} = \frac{([S_S]_0 + [S_R]_0) - ([S_S] + [S_R])}{[S_S]_0 + [S_R]_0} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Enantiomeric excess of product (ee}_p\text{)} = \frac{[P_S] - [P_R]}{[P_S] + [P_R]} \times 100 \quad (3)$$

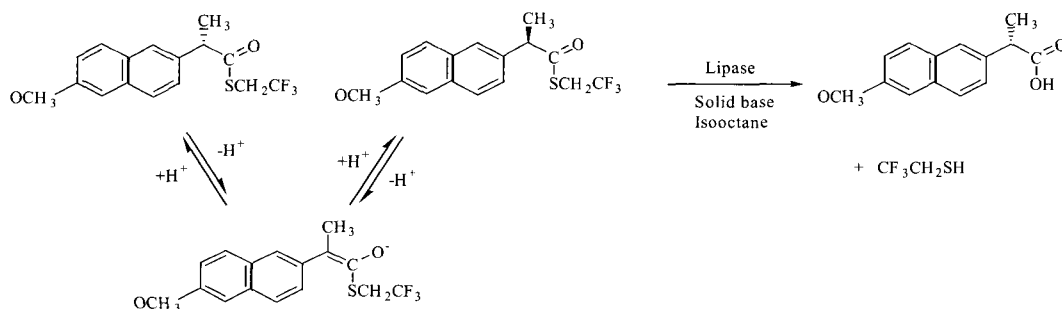


Figure 1. Lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester using solid bases in isooctane.

여기서 [S<sub>S</sub>]<sub>0</sub>와 [S<sub>R</sub>]<sub>0</sub>은 초기 (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터와 초기 (R)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터의 농도를 각각 나타내며 [P<sub>S</sub>]는 (S)-나프록센의 농도, [P<sub>R</sub>]은 (R)-나프록센의 농도를 나타낸다.

### 분석

키랄 컬럼 (Chiralcel OD-H, Daicel Chemical Industries)이 장착된 HPLC를 이용하여 기질과 생성물인 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터와 나프록센의 농도를 분석하였다. 이동상 용매의 조성은 헥산 : 아이소프로판올 : 아세트산 = 97 : 3 : 1 (vol%), 유속은 1.0 mL/min, UV 검출기의 파장은 254 nm이었다.

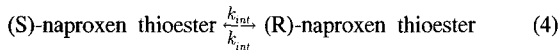
### 결과 및 고찰

본 연구에서는 DKR 반응을 위한 라세미화 염기촉매로서 기존의 반응매질에 녹는 트리옥틸아민 대신에 회수 및 재사용이 용이하며 고효율의 고체 염기를 발굴하여 기존 DKR 공정을 개선하고자 하였다. 모델 기질로는 나프록센을 acyl donor로 여러 가지 써올 (thiol) 중 최적으로 알려진 2,2,2-트리플로로에탄써올 (2,2,2-trifluoroethanethiol)을 acyl acceptor로 합성한 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터를 사용하였으며 반응용매로는 소수성 유기 용매인 아이소옥탄을 사용하였다. 전체적인 DKR 공정을 Fig. 1에 나타내었다.

크게 세 가지 종류의 고체 염기를 기질의 라세미화 반응을 위해 테스트하였다. 1) 무기 염기: NaOH 같은 무기 염기는 물에 용해되지만 DKR 반응에 주로 사용되는 소수성 유기용매에는 일반적으로 녹지 않아 고체 염기로 사용될 수도 있다. 본 연구에 사용된 NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, MgO 등은 반응용매인 아이소옥탄에 녹지 않았다. 2) 염기성 음이온교환수지: 이온교환수지는 촉매로 사용되는 산과 염기와 마찬가지로 유기 반응에서 고체 산촉매 또는 고체 염기촉매로 사용될 수 있다. 이온교환수지가 촉매로 사용되던 초기에는 에스터화 반응이나 가수분해와 같은 극성 용매에서 사용되었지만 porous 타입 이온교환수지가 개발되면서 알킬화 (alkylation) 반응과 같은 비극성용매 시스템에서도 사용이 가능해졌다. 본 연구에 사용된 모든 염기성 음이온교환수지는 porous 타입으로 디비닐벤젠 (divinylbenzene)으로 가교 결합된 폴리스티렌 비드 (polystyrene bead)에 강염기성

음이온교환수지 (DIAION PA308, PA312, PA408, AMP26)인 경우 4급 암모늄이 약염기성 음이온교환수지 (DIAION WA30)인 경우 3급 암모늄이 공유결합으로 고정화된 형태이다. 3) Resin-bound 염기: 유기 합성 반응에서 많이 사용되는 염기들을 고체 담체에 공유결합으로 붙인 resin-bound 염기들이 상업적으로 판매되고 있으며 조합 (combinatorial) 유기합성에 널리 사용되고 있다. 본 연구에 사용된 resin-bound 염기는 PS-DIEA, PS-DMAP, PS-NMM, PS-TBD 등으로 모두 디비닐벤젠으로 가교 결합된 폴리스티렌 비드에 유기 염기가 고정화된 것이다.

고체 염기의 활성을 정량화하기 위해서 interconversion constant ( $k_{int}$ )를 이용하였다. 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 설페이트의 알파-양성자가 염기에 의해 떨어지면서 라세미화가 일어나게 되는데 대부분의 경우 알파-양성자의 deprotonation 과정이 라세미화 속도결정 단계가 된다(15). 이때 라세미화 반응은 아래 식(4)처럼 나타낼 수 있다.



여기서 interconversion constant ( $k_{int}$ )는 식(5)와 같이 표현되고, 염기에 대한 나프록센 설페이트의 시간에 따른 enantiomeric excess ( $ee_s$ ) 변화로부터 구할 수 있다. 또한 식(6)을 이용해 각 염기 농도에 따른  $k_{int}$ 의 변화로부터 2차 interconversion constant ( $k_{int}^*$ )도 구할 수 있다.

$$\ln\left[\frac{ee_t}{ee_0}\right] = -2k_{int}t \quad (5)$$

$$k_{int} = k_{int}^*[\text{base}] \quad (6)$$

염기의 활성이 높을수록  $k_{int}^*$  값은 커지게 되며 동일한 양의 염기를 사용했을 때는  $k_{int}$ 으로 염기의 활성을 정량화할 수 있다. 아이소옥탄 10 mL에 3 mM의 (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 설페이트를 녹인 후 앞에서 소개한 50 mg의 다양한 고체 염기를 각각 넣고 45°C에서 교반하여 라세미화 반응을 수행하였다. 시간에 따른  $ee_s$  값의 변화로  $k_{int}$ 을 구해 고체 염기별로 비교하여 Table 2에 나타내었다.

**Table 2.** Effect of base type on the interconversion constant ( $k_{int}$ ) of (S)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester in isooctane at 45°C

Inorganic bases	$k_{int}$ (h <sup>-1</sup> )	Ion-exchange resins	$k_{int}$ (h <sup>-1</sup> )	Resin-bound bases	$k_{int}$ (h <sup>-1</sup> )
NaOH	0	PA308	0	PS-DIEA	1.2×10 <sup>-3</sup>
NaOH+EtOH	2.5×10 <sup>-4</sup>	PA312	0	PS-DMAP	0
Ca(OH) <sub>2</sub>	1.9×10 <sup>-4</sup>	PA408	0	PS-NMM	0
MgO	1.1×10 <sup>-4</sup>	AMP26	0	PS-TBD	0
		WA30	2.2×10 <sup>-2</sup>	PS-TBD (Fluka)	0

먼저 무기 염기류를 보면 NaOH를 사용했을 때 라세미화 반응은 일어나지 않았다. Xin 등(16)도 NaOH를 이용하여 아이소옥탄내에서 나프록센 메틸에스터의 라세미화를 시도하였으나 실패하였다. 그러나 메탄올 (1 mL/g NaOH)을 첨가했

을 때 라세미화 반응이 일어났으며, 더 많이 첨가할수록 라세미화 반응은 더 빠르게 일어났다. 이유는 NaOH가 아이소옥탄과 같은 소수성 용매에는 녹지 않지만 친수성 알코올 등에는 녹기 때문에 첨가된 메탄올이 NaOH를 녹였기 때문이라 설명되었다. 본 연구에서도 소량의 메탄올 (2 mL/g NaOH)을 첨가하였는데 그 결과 약간의 라세미화 반응이 일어났다. 더 많은 양의 메탄올을 첨가할수록 라세미화 반응이 증가하겠지만 메탄올에 의해 NaOH가 반응매질에 녹기 때문에 본 연구의 목적과는 맞지 않는다. Ca(OH)<sub>2</sub>와 MgO의 경우, NaOH에 비해  $k_{int}$ 가 높았으나 역시 만족할만한 수준은 아니었다.

강염기성 음이온교환수지 4종은 모두 라세미화 반응을 일으키지 못하였다. 그러나 약염기성 음이온교환수지인 DIAION WA30을 사용하였을 때, (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 설페이트의 라세미화 반응이 일어났으며 이때  $k_{int}$ 는 2.2×10<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>이었다. 강염기성 음이온교환수지로 사용되는 4급 암모늄은 질소의 비공유 전자쌍에 이미 다른 물질이 치환되어 있어 알파-양성자를 떼어내기 어렵지만, 약염기성 음이온교환수지로 사용되는 3급 암모늄의 경우 비어있는 비공유 전자쌍이 알파-양성자를 떼어내 라세미화 반응을 일으킨 것으로 추측된다.

Resin-bound 염기의 경우 일반적으로 염기도가 클수록 높은  $k_{int}$  값을 예상할 수 있으므로 각 염기의 염기도를 문헌에서 조사해 보았다. 본 연구에 사용된 PS-DIEA, PS-DMAP, PS-NMM, PS-TBD 등은 *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA), 4-dimethylaminopyridine (DMAP), *N*-methylmorpholine (NMM), 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD) 등이 각각 폴리스티렌에 고정화된 형태이다. 위의 4가지 염기의 짝산의 아세토니트릴(acetonitrile)에서의 pK<sub>a</sub> 값을 살펴보면 다음과 같다(17, 18): triethylamine (pK<sub>a</sub> = 18.63), DMAP (pK<sub>a</sub> = 17.75), morpholine (pK<sub>a</sub> = 16.61), TBD (pK<sub>a</sub> = 25.96). 여기서 염기도가 클수록 pK<sub>a</sub> 값은 커진다. 문헌 값이 없을 경우 비슷한 구조의 염기로 대신하였고, 참고로 라세미화 염기축매로 주로 사용되어왔던 트리옥틸아민의 짝산의 아세토니트릴에서의 pK<sub>a</sub> 값은 18.04이다. 고정화가 염기의 pK<sub>a</sub>에 영향을 주지 않고 라세미화 속도상수  $k_{int}$ 이 pK<sub>a</sub>에 비례한다고 가정하면, PS-NMM, PS-DMAP, PS-DIEA, PS-TBD 순서로  $k_{int}$  값이 증가해야 한다. 그러나 PS-DIEA를 제외하고는 라세미화 반응이 일어나지 않았다. 특히 강염기로 알려진 PS-TBD는 두 회사 제품 모두 라세미화 반응을 일으키는데 실패했으며, 반복 실험에서도 같은 결과를 얻었다. 그러나 최근 PS-TBD를 사용하여 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 에스터의 라세미화를 수행한 연구에서는 라세미화가 진행된다고 보고하고 있어(19), 이 부분에 대해 별도의 연구가 진행 중에 있다.

비록 효소적 DKR 공정에서 반응매질로 소수성 유기용매를 사용하더라도 효소의 활성을 위해서는 소량의 물이 반드시 있어야 한다. 왜냐하면 물은 효소가 활성을 갖게 하는데 필요한 여러 가지 noncovalent interaction에 직접 또는 간접적으로 관여하기 때문이다(20). 일반적으로 효소 활성을 위한 최적의 수분양이 존재해 물이 생성되거나 소모되는 반응의 경우 수분양을 조절해주어야 한다(21, 22). 효소적 DKR 반응에서 광학분할과 라세미화가 같이 일어나므로 염기축매도 효

소속매처럼 소량의 물이 있는 소수성 유기 용매에서 작용하게 된다. 이런 측면에서 수분 첨가량에 따른 염기 촉매의 활성을 조사해보았다. 가장 효율이 높았던 약염기성 음이온교환수지 DIAION WA30을 사용하여 첨가된 물의 양에 따른  $\ln(ee_s/ee_{s0})$ 의 변화 (Fig. 2(A))와  $k_{int}$  값에 미치는 영향 (Fig. 2(B))을 살펴보았다. Fig. 2(B)에서 보듯이 첨가된 물의 양이 증가할수록  $k_{int}$  값은 감소하였으며 아래 식(7)으로 regression하여 나타내 보았다.

$$k_{int} = 2.2 \times 10^{-2} - 1.3 \times 10^{-3} C_w^{0.58}, r^2 = 0.998 \quad (7)$$

여기서  $C_w$ 은 첨가된 물의 양 (%)이다. 라세미화 활성이 떨어진 이유로는 아이소옥탄에 첨가된 물이 염기촉매의 표면을 감싸 그만큼 소수성 기질인 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 씨오에스터가 반응할 수 있는 DIAION WA30의 면적이 줄어들었기 때문인 것으로 추측된다. 만약 물에 의한 염기촉매 면적의 감소가 원인이라면 촉매 활성은 면적에 비례하고 면적은 부피의 0.67승에 비례하므로  $k_{int}$  값은 물의 부피의 0.67승으로 감소해야한다. 위의 식(7)에 의하면 0.58승으로 어느 정도 비슷한 값을 보여 주었다.

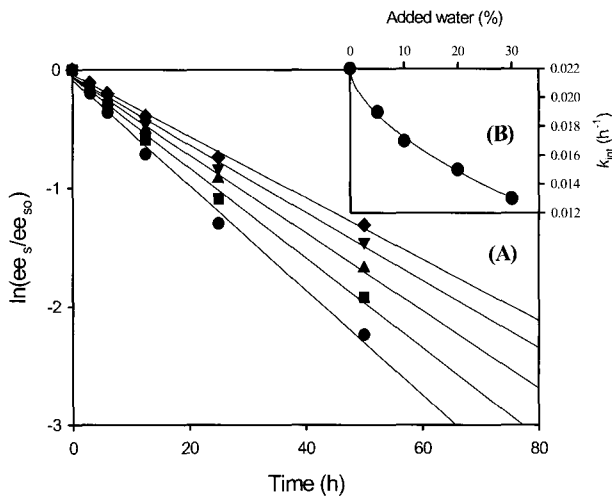


Figure 2. (A) Effect of water on time-course  $\ln(ee_s/ee_{s0})$  in the racemization of (S)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester with DIAION WA30 in isoctane at 45°C. (B) Variations of  $k_{int}$  with an amount of added water.

Fig. 3에서는 라세미화 효율이 가장 컸던 DIAION WA30의 농도를 바꾸어 가면서 시간에 따른  $\ln(ee_s/ee_{s0})$ 를 나타내었고, 이 결과로부터 2차 interconversion constant ( $k_{int}^*$ )를 구해 보았다. DIAION WA30의  $k_{int}^* = 3.9 \times 10^{-6} (mg/L)^{-1} h^{-1} = 8.6 \times 10^{-4} mM^{-1} h^{-1}$ 으로서 동일한 실험조건 하에서 트리옥틸아민의  $k_{int}^* = 2.5 \times 10^{-4} mM^{-1} h^{-1}$  이었다(12). 결국 DIAION WA30이 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 씨오에스터의 라세미화 반응에 트리옥틸아민보다 약 3 배 활성이 더 좋을 것을 알 수 있다.

라세미화 활성이 높은 염기를 사용한다고 반드시 DKR 반응에 좋은 것만은 아니다. 예를 들면, 예비 실험 결과에서  $k_{int}^*$  값이  $2.20 mM^{-1} h^{-1}$  (15)인 강염기 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)를 사용했을 때 라세미화 반응은 매우 빠

르게 일어났으나 효소의 활성은 떨어졌고 염기에 의한 화학적 가수분해 반응이 일어나  $ee_p$  값이 매우 낮았다. 이런 측면에서 본 연구에서 가장 높은 라세미화 활성을 보였던 DIAION WA30이 효소적 DKR 반응에서도 좋은 결과를 가져오는 지를 확인해 보았다. 효소적 DKR 반응은 라세믹 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 씨오에스터를 기질로 45°C, 아이소옥탄 내에서 수행하였다(재료 및 방법 참조).

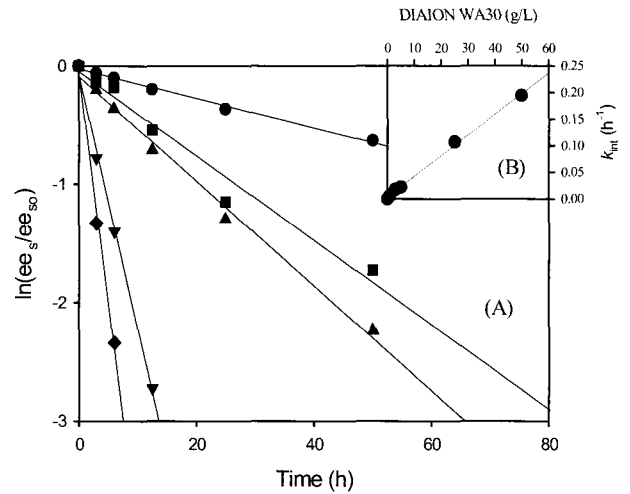


Figure 3. (A) Time-course variations of  $\ln(ee_s/ee_{s0})$  for (S)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester depending on DIAION WA30 concentration in isoctane at 45°C. (B) Variations of  $k_{int}$  with DIAION WA30 concentration.

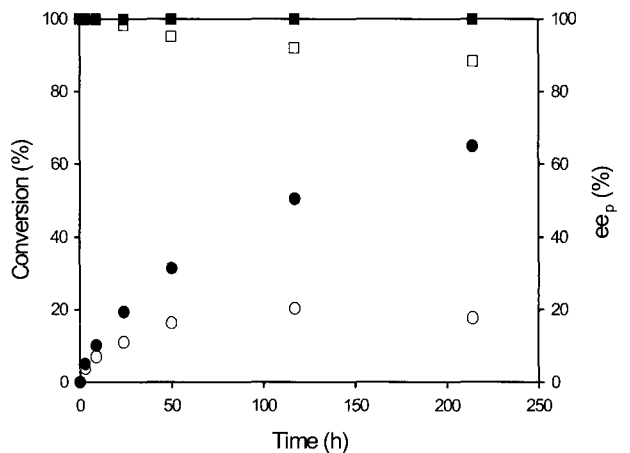


Figure 4. Time-course conversion (circles) and  $ee_p$  (rectangles) in the lipase-catalyzed kinetic resolution of naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester without (empty) or with (filled) DIAION WA30 in isoctane at 45°C.

Fig. 4에 시간에 따른 DIAION WA30의 첨가 효과를 전환율 (conversion)과 enantiomeric excess ( $ee_p$ )에 대하여 살펴보았다. 라세미화 촉매인 DIAION WA30을 넣지 않은 전통적 효소 광학분할 반응의 경우, 214시간에 20%의 전환율과 88%의  $ee_p$  값을 보였다. 이에 비해 DIAION WA30의 첨가는 전환율과 생성물의 광학순도를 급격히 향상시켜주었다. 전통적 광학분할 반응의 최대 50%라는 전환율의 제한이 고체 염기

촉매를 첨가한 DKR 반응에서 성공적으로 극복되었다. 또한 DKR 공정에 본 연구에서 도입한 고체 염기촉매를 사용함으로써 라세미화 촉매의 회수 및 재사용이 가능하게 되었다.

## 요 약

2-아릴프로피온산 계열의 키랄 의약품의 효소적 dynamic kinetic resolution (DKR) 공정에서 라세미화 염기촉매로 트리옥틸아민이 지금까지 주로 사용되어 왔으나 반응매질에 녹은 상태로 작용해 회수 및 재사용이 어려웠다. 본 연구에서는 이를 개선하고자 라세미화 반응을 위한 고효율 고체 염기를 탐색해 보았다. 45°C, 아이소옥탄 내에서 (S)-나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터를 기질로 무기 염기류, 염기성 음이온교환수지류, resin-bound 염기류 등을 시험한 결과, 약 염기성 음이온교환수지인 DIAION WA30을 사용하였을 때 가장 효과적이었다. DIAION WA30의 2차 interconversion constant ( $k_{im}^*$ )는  $8.6 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 이며 동일한 실험조건하에서 수행한 트리옥틸아민 ( $k_{im}^* = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )에 비해 약 3배가 높았다. 효소 활성에 필수적인 물의 양에 따른 DIAION WA30의 라세미화 효율에 관하여 실험한 결과, 물의 양이 증가할수록 그 효율은 감소하였다. DIAION WA30을 라세미화 촉매로 사용하여 아이소옥탄 내에서 라세믹 나프록센 2,2,2-트리플로로에틸 써오에스터의 효소적 DKR 반응을 수행해 보았다. 그 결과 DIAION WA30을 사용하지 않은 경우에 비해 반응 전환율과 생성물의 광학 순도는 급격히 향상되었다. 전통적 광학 분할 반응의 최대 50%라는 전환율의 제한이 본 연구에서 찾은 DIAION WA30을 첨가함으로써 성공적으로 극복되었다. 또한 고체 염기촉매인 DIAION WA30의 사용은 라세미화 촉매의 회수 및 재사용이 가능하게 해준다.

## REFERENCES

1. Maureen Rouhi, A. (2002), Chiral roundup, *Chem. Eng. News* **80**, 43-50.
2. Mustranta, A. (1992), Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 61-66.
3. Tsai, S.-W. and H.-J. Wei (1994), Enantioselective esterification of racemic naproxen by lipases in organic solvent, *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 328-333.
4. Lee, W. H., K.-J. Kim, M. G. Kim, and S. B. Lee (1995), Enzymatic resolution of racemic ibuprofen esters: effects of organic cosolvents and temperature, *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 613-615.
5. Kim, M. G., S. J. Choi, W. A. Choi, and B. H. Chung (1999), *Candida rugosa* lipase-catalyzed production of optically pure S-(+)-ketoprofen, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 225-229.
6. Hong, J.-K., K.-J. Kim, W.-W. So, S.-J. Moon, and Y. T. Lee (2002), Optical resolution of racemic ibuprofen by *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 543-548.
7. El Gihani, M. T. and J. M. J. Williams (1999), Dynamic kinetic resolution, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 11-15.
8. Panke, S. and M. G. Wubbolts (2002), Enzyme technology and bioprocess engineering, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 111-116.
9. Kim, M.-J., Y. Ahn, and J. Park (2002), Dynamic kinetic resolutions and asymmetric transformation by enzymes coupled with metal catalysis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 578-587.
10. Strauss, U. T. and K. Faber (1999), Deracemization of (+/-)-mandelic acid using a lipase-mandelate racemase two-enzyme system, *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 4079-4081.
11. Um, P.-J. and D. G. Drueckhammer (1998), Dynamic enzymatic resolution of thioesters, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5605-5610.
12. Chang, C.-S., S.-W. Tsai, and J. Kuo (1999), Lipase-catalyzed dynamic resolution of naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester by hydrolysis in isooctane, *Biotechnol. Bioeng.* **64**, 120-126.
13. Lu, C.-H., Y.-C. Cheng, and S.-W. Tsai (2002), Integration of reactive membrane extraction with lipase-hydrolysis dynamic kinetic resolution of naproxen 2,2,2-trifluoroethyl thioester in isooctane, *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 200-210.
14. Wu, J.-Y. and S.-W. Liu (2000), Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproxen in isooctane: under controlled water activity, *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 124-130.
15. Chen, C.-Y., Y.-S. Chang, S.-A. Lin, H.-I. Wen, Y.-C. Cheng, and S.-W. Tsai (2002), Racemization of (S)-profen thioesters by strong neutral bases in nonpolar organic solvents: implication for ion-pair kinetic basicity, *J. Org. Chem.* **67**, 3323-3326.
16. Xin, J.-Y., S.-B. Li, Y. Xu, J.-R. Chui, and C.-G. Xia (2001), Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 579-585.
17. Coetzee, J. F. and G. R. Padmanabhan (1965), Properties of bases in acetonitrile as solvent. IV. proton acceptor power and homoconjugation of mono- and diamines, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5005-5011.
18. Rodima, T., I. Kaljurand, A. Pihl, V. Mäemets, I. Leito, and I. A. Koppel (2002), Acid-base equilibria in nonpolar media. 2. self-consistent basicity scale in THF solution ranging from 2-methoxypyridine to EtP<sub>1</sub>(pyrr) phosphazene, *J. Org. Chem.* **67**, 1873-1881.
19. Lin, H. Y. and S. W. Tsai (2003), Dynamic kinetic resolution of (R,S)-naproxen 2,2,2-trifluoroethyl ester via lipase-catalyzed hydrolysis in micro-aqueous isooctane, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **24-25**, 111-120.
20. Zaks, A. and A. M. Klivanov (1988), The effect of water on enzyme action in organic media, *J. Biol. Chem.* **263**, 8017-8021.
21. Won, K. and S. B. Lee (2001), Effects of water and silica gel on enzyme agglomeration in organic solvents, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **6**, 150-155.
22. Won, K. and S. B. Lee (2001), Computer-aided control of water activity for lipase-catalyzed esterification in solvent-free systems, *Biotechnol. Prog.* **17**, 258-264.