(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0092749
(43) 공개일자 2012년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 403/18 (2006.01) *B01J 39/04* (2006.01)
B01J 39/18 (2006.01) *B01D 61/44* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0000721
(22) 출원일자 2011년01월05일
심사청구일자 2011년01월05일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
장영표
서울특별시 강남구 삼성로147길 22, 101동 202호 (청담동, 우성아파트)
지은혜
서울특별시 동대문구 회기로31나길 14 (휘경동)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 9 항

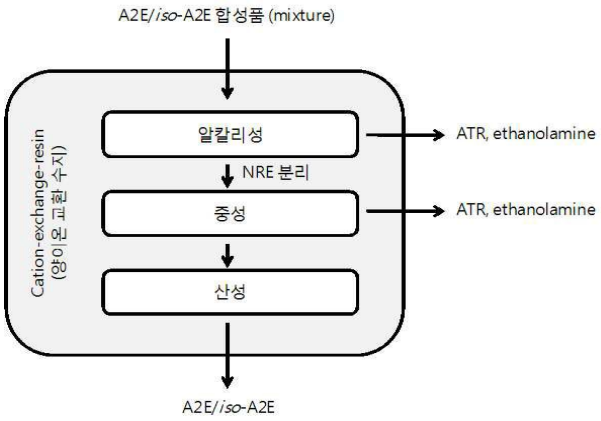
(54) 발명의 명칭 **양이온 교환수지를 이용한 A2E의 정제법**

(57) 요 약

본 발명은 합성 A2E 혼합물로부터 A2E 및 iso-A2E만을 정제하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 양이온 교환 수지를 이용하여 수지의 소모 없이 반복적으로 A2E 및 iso-A2E만을 정제하기 위한 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의한 분리법은 기존 방식의 분리법에서 분리 물질의 순도와 회수율은 유지하면서, 사용되는 용매의 양을 줄이고 소요되는 시간을 단축시킬 수 있다. 또한, 이온교환수지의 재생성을 통해 수지의 소모 없이 반복적으로 정제가 가능하므로 경제성을 높일 수 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20091253
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신진연구자 지원사업
연구과제명	A2E 생합성이 노인성황반변성의 발병에 미치는 영향에 관한 연구
주관기관	경희대학교
연구기간	2008.07.01 ~ 2010.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

A2E 합성품으로부터 A2E를 정제하는 방법에 있어서, 양이온 교환수지 (Cation-exchange-resin)를 이용하여 알칼리성에서 산성으로 변화시키면서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 양이온 교환수지는 약산성 양이온 교환수지 (Weakly cation exchange resin)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 알칼리성은 pH 11 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 알칼리성 용액에 의해 NRE가 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 알칼리성 용액은 수산화나트륨 또는 수산화칼슘으로부터 선택된 1종을 포함한 메탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 NRE 분리 후 90~100%의 메탄올에 의해 레티날 및 수지 내 알칼리를 제거하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 산성은 pH 3 이하인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 산성 용액에 의해 이온 수지에 결합 되어 있는 A2E와 그 isomer가 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 산성 용액은 TFA, 아세트산 (acetic acid), 염산 (HCl), 포름산 (formic acid)으로부터 선택된 1종을 포함한 메탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 합성 A2E 혼합물로부터 A2E 및 iso-A2E만을 정제하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로 양이온 교환 수지를 이용하여 수지의 소모 없이 반복적으로 A2E 및 iso-A2E만을 정제하기 위한 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 연령 관련 황반변성 (AMD)은 고시력 (high-acuity vision)에 관여하는 황반 또는 망막의 중앙 부분에 영향을 주고, 노년기의 비가역적인 시력 상실의 주된 원인이 되는 시력을 상실시키는 쇠약성 질환이다. 유전 및 환경적 요인 모두가 AMD의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, 흡연, 지질 섭취 및 노화가 AMD의 발생에 대한 위험 요인으로 알려져 있다.

[0003] 원인은 주로 크게 wet type과 dry type으로 분류하는데, 전자는 망막의 중심이 되는 황반부의 아래층을 구성하는 맥락막에 비정상적으로 혈관이 생성되고 팽창하여 파괴되어 출혈을 일으켜 발생하게 되고, 후자의 경우 노화 색소물질들이 망막상피세포에 축적되어 세포 위축이 나타나 발생한다.

[0004] AMD를 일으키는 노화 색소 물질로 대표적인 것이 A2E (다양한 isomer형태로 존재)로, Vitamin A의 유도체이며 체내의 visual cycle에서 부산물로 생성된다. A2E와 *iso*-A2E는 체내로부터 분리하여 얻는 것은 한계가 있기 때문에 주로 합성법을 이용하여 생산한다. 이것은 all-*trans*-retinal과 ethanolamine을 기질로 하여 형성되므로 비교적 쉽게 얻을 수 있다. A2E는 2분자의 all-*trans*-retinal과 1분자 ethanolamine이 산성조건에서 결합하여 생성되는데, 합성 후에는 기질 (반응에 참여하지 않은 all-*trans*-retinal과 ethanolamine) 및 합성 중간 물질들을 제거하는 정제를 통해 순수한 A2E만을 얻는다.

[0005] 합성품으로부터 A2E를 정제에 관한 기존에 알려진 정제방법은 사용되는 용매의 양은 많고, 소요되는 시간이 장기인 문제점이 있다. 또한 충진제의 일회성으로 인한 경제성이 낮은 문제점이 있다.

[0006] A2E는 앞으로 건성 타입의 AMD를 비롯한 관련 안과질환을 연구하는데 이용될 것이므로 관련 질환을 연구 및 신약개발에 있어서 연구소나 제약회사 등에서 합성품으로부터 A2E를 분리하는 기술을 필요로 하고 있다. 또한 앞으로 그 수요의 증가에 따라 대량 합성과 분리과정이 필수적인데 향후 활발한 연구와 치료제 개발을 위해 A2E는 단일물질로서 회사를 통해 제품화 될 가능성이 있으며 이를 위해서는 보다 효율적인 정제기술이 요구되고 있는 실정이다.

[0007] 이에 본 발명자는 합성품으로부터 A2E를 분리하는 효율적인 정제방법을 개발하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 합성 A2E 혼합물로부터 A2E 및 iso-A2E만을 정제하는 방법을 제공하는 것이다. 보다 구체적으로 양이온 교환 수지를 이용하여 수지의 소모 없이 반복적으로 A2E 및 iso-A2E만을 정제하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, A2E 합성품으로부터 A2E를 정제하는 방법에 있어서, 양이온 교환수지 (Cation-exchange-resin)를 이용하여 알칼리성에서 산성으로 변화시키면서 수행하는 것을 특징으로 하는 A2E를 정제하는 방법을 제공한다.

[0010] 상기 양이온 교환수지는 약산성 양이온 교환수지 (Weakly cation exchange resin)인 것이 바람직하다.

[0011] 상기 알칼리성은 pH 11 이상인 것이 바람직하고, 상기 알칼리성 용액에 의해 NRE가 분리되는 것을 포함할 수 있다.

[0012] 상기 알칼리성 용액은 수산화나트륨, 수산화칼슘으로부터 선택된 1종을 포함한 메탄올인 것이 바람직하다.

[0013] 상기 NRE 분리 후 90~100%의 메탄올에 의해 레티날 (Retial) 및 수지 내 알칼리를 제거하는 것을 포함할 수 있

다.

[0014] 상기 산성은 pH 3 이하인 것이 바람직하고, 상기 산성 용액에 의해 이온수지에 결합되어 있는 A2E와 그 isomer가 분리되는 것을 포함할 수 있다.

[0015] 상기 산성 용액은 TFA, HCl, acetic acid, formic acid 으로부터 선택된 1종을 포함한 메탄올인 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 의한 분리법은 기존의 방식의 분리법에서의 분리 물질의 순도와 회수율은 유지하면서, 사용되는 용매의 양을 줄이고 소요되는 시간을 단축시킬 수 있다. 또한, 이온교환수지의 재생성을 통해 수지의 소모 없이 반복적으로 정제가 가능하므로 경제성을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 A2E 및 *iso*-A2E의 구조를 나타낸다.

도 2는 A2E 합성품으로부터 A2E 및 *iso*-A2E를 분리하는 과정의 모식도이다.

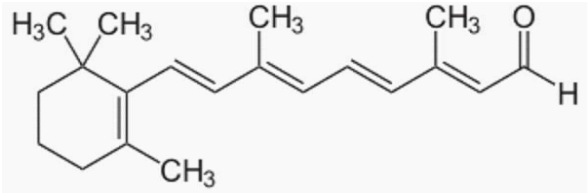
도 3은 양이온 교환수지를 통과한 물질의 UV 430nm에서의 HPLC 크로마토그램에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] A2E (다양한 isomer형태로 존재)는 AMD를 일으키는 노화 색소 물질로 대표적인 것으로서, Vitamin A의 유도체이며 체내의 visual cycle에서 부산물로 생성된다. A2E와 *iso*-A2E는 체내로부터 분리하여 얻는 것은 한계가 있기 때문에 주로 합성법을 이용하여 생산한다. 이것은 하기 구조식 1의 all-*trans*-retinal과 하기 구조식 2의 ethanolamine을 기질로 하여 형성되므로 비교적 쉽게 얻을 수 있다. A2E는 2 분자의 all-*trans*-retinal과 1 분자 ethanolamine이 산성조건에서 결합하여 생성되는데, 합성 후에는 기질 (반응에 참여하지 않은 all-*trans*-retinal과 ethanolamine) 및 합성 중간물질들을 제거하는 정제를 통해 순수한 A2E만을 얻을 수 있다.

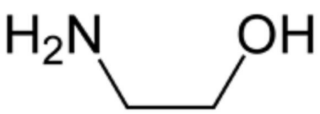
[0019] [구조식 1]

[0020] all-*trans*-retinal

[0021] 

[0022] [구조식 2]

[0023] 에탄올아민 (ethanolamine)

[0024] 

[0025] 합성품으로부터 A2E를 정제에 관한 기존에 알려진 정제방법으로는 Preparative HPLC와 silica gel column chromatograpy를 이용하는 방법이 있다. 이 두 가지 방법은 공통적으로 단일 물질로의 분리, 즉 혼합되어 있는 2개 이상의 물질을 단일 물질들로 분리하는 방식이다. 또한 주입용매를 동일 또는 변화하여 혼합 물질 개개의 극성, 비극성 성질의 차이를 이용하여 유출 시간을 다르게 함으로써 분리하는 것이 특징이나, 사용되는 용매의 양이 많고 소요되는 시간이 장기이며, 경제성이 낮다는 것이 문제가 있다.

[0026] 따라서, 본 발명은 이러한 합성 A2E 혼합물로부터 A2E 및 iso-A2E만을 효율적으로 정제하는 방법을 제공하는 것이다. 보다 구체적으로 양이온 교환 수지를 이용하여 수지의 소모 없이 반복적으로 A2E 및 iso-A2E만을 정제하

기 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0027] 본 발명에서의 “양이온교환수지 (陽－交換樹脂, cation exchange resin)” 란 양이온을 교환하는 이온교환수지를 뜻하며, 다른 수용액에 첨가되어 수용액 속의 양이온과 자신의 양이온을 교환하는 역할을 하는 합성수지이다. 양이온교환수지는 음전하를 띤 고정된 이온에 쉽게 떨어져 나가는 양이온이 붙어 있다. 양이온교환수지가 수용액에 들어가게 되면, 수용액 속의 양이온들이 이온교환수지에 붙어 있던 양이온과 교환, 제거된다.

[0028] 보다 구체적으로, 망상구조의 기초 고분자 모체에 교환기로서 술폰산기 (-SO3H)와 카르복실기 (-COOH)등을 결합시킨 것을 양이온 교환수지라고 하며 Ca2+, Na+, H+ 등과 같은 양이온을 교환한다. 이 수지를 물에 침투시키면 교환기인 부분은 무기산과 같이 전리한다. 이온교환수지의 기초 고분자 모체 부분을 R로 표시하면 양이온교환수지는 R-SO3H, 또는 R-COOH로 표시할 수 있으며 수중에서는 다음과 같이 전리한다.

[0029] R-SO3H → R-SO3- + H+

[0030] R-COOH → R-COO- + H+

[0031] R-SO3H 형의 수지는 전리하기 쉽고 염산, 황산 등의 무기산에 상당하는 강산성이므로 강산성 양이온 (Cation) 교환수지라고 한다. 이에 반하여 R-COOH 형의 수지는 유기산과 같이 전리하기 어렵고 약산의 성질이 있으므로 약산성 양이온 (Cation) 교환수지라고 한다. 강산성 양이온교환수지는 강산성이므로 알칼리 쪽에서는 물론 산성 용액 중에서도 전리하여 이온 교환할 수 있는데 반하여, 약산성 양이온교환수지는 산성에서는 전리하지 않으므로 이온교환성은 중성에서부터 알칼리성 용액 중에만 한정되어 있다. 본 발명의 일실시예에서는 상기 약산성 양이온 교환수지 (Weakly cation exchange resin)가 바람직하다.

[0032] 본 발명에서 이용한 양이온교환수지 방식은 A2E 및 *iso*-A2E가 구조의 특징으로 positive charge를 갖는 점을 이용한 것이다. 알칼리성에서 이온의 기능기 (functional group)는 negative charge를 형성하여 A2E (*iso*-A2E)와 선택적으로 결합한다. 이때 나머지 물질들은 이온 수지를 통과하여 수지에는 A2E (*iso*-A2E)만이 남게 되며 산성으로 변화를 줌으로써 이온 수지의 기능기에 결합했던 A2E (*iso*-A2E)는 proton과의 맞교환이 이루어지면서 수지에서 분리되는 것이다.

[0033] 보다 구체적으로 A2E 합성품은 NRE (retinal 과 ethanolamine의 1 대 1 결합형), all-trans-retinal, A2E, iso-A2E등이 혼합된 것으로서, A2E 합성품에서 A2E 및 그 *iso*-A2E 만을 순수하게 분리하는 것이다.

[0034] 상기 알칼리성의 pH가 11 이상인 것은 비이온성 물질의 선택성 때문이며, 상기 알칼리성 용액은 pH가 11 이상인 강알칼리성 물질이 포함된 메탄올이 바람직하다. 상기 메탄올은 80%메탄올이 바람직하며, 알칼리성 물질로는 수산화나트륨 (NaOH), 수산화칼슘 (KOH) 등을 포함할 수 있다. 즉, 알칼리성 용액에 의해 NRE가 분해되고, retinal만 분리 가능하다.

[0035] 상기 NRE가 분리 후 중성인 메탄올에 의해 나머지 retinal 및 수지 내 남아있는 알칼리를 제거할 수 있으며, 상기 메탄올은 90~100% 메탄올이 바람직하다.

[0036] 상기 산성의 pH가 3 이하인 것은 이온 수지에서 A2E 및 isoA2E가 완전하게 해리되기 때문이며, 상기 산성 용액은 pH가 3 이하인 강산성 물질이 포함된 메탄올이 바람직하다. 상기 메탄올은 100% 메탄올이 바람직하며, 산성 물질로는 TFA, HCl, acetic acid, formic acid등을 포함할 수 있다. 여기서 이온 수지에 결합 되어 있던 A2E 및 그 *iso*-A2E가 순수하게 분리될 수 있는 것이다 (도 2 참조).

[0037] 본 발명의 일실시예에서는 양이온교환수지를 통과한 물질을 UV 430nm에서의 HPLC chromatograms으로 확인하였다 (도 3 참조). 도 3에서 A2E합성품 (A)은 알칼리성의 80% methanol에 의해 NRE (retinal과 ethanolamine의 1대1 결합형)가 분해되고, Retinal만 분리되었으며 (B) 100% methanol에 의해 나머지 retial 및 수지 내에 남아있는 알칼리를 제거하였고 (C) 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 이 포함된 산성 methanol에 의해서 이온 수지에 결합 되어 있던 A2E 와 그 isomers 가 순수하게 분리되었다 (D).

[0038] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 일 예에 지

나지 않으며, 이에 의하여 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0039] **<실시예 1>**

[0040] **1.A2E 합성 (정제에 필요한 A2E 합성품 제조)**

[0041] All-*trans*-retinal (40 mg, 2 equiv)과 ethanolamine (2.8 mg, 1 equiv)을 에탄올(3 mL)에 녹이고, 아세트산(3.72㎕)을 가하여 2~3일 동안 실온에서 밀봉한 후 교반, 방치하였다. 방치 과정 중 합성 과정이 진행되며 방치하는 동안 빛을 차단하였다.

[0042] **2. A2E 정제**

[0043] 1) A2E합성품을 농축기를 이용하여 에탄올을 제거하고, 소량 (약 200~500㎕)의 메탄올에 녹였다.

[0044] 2) 분리에 사용할 Amberlite® IRC-50 ion exchange 수지를 수산화나트륨을 녹인 약 80%메탄올 (약 pH 12)로 미리 담가놓은 후, 약 40 mL을 분별깔대기 또는 오픈 컬럼 등에 충진하였다. 충진 할 때는 수지를 담갔던 것과 동일한 용매를 사용하였다. 용매는 수지가 간신히 잠길 정도로만 (충진 된 수지의 맨 위 기준선까지) 남기고 나머지는 콕을 열어 제거하였다.

[0045] 3) 소량의 메탄올에 녹였던 A2E 합성품을 피펫을 이용하여 수지의 맨 위에 서서히 떨어뜨리고, 떨어뜨린 A2E 합성품이 수지에 스며들 수 있도록 콕을 열어 용매를 제거하면서 용매와 수지의 높이가 같도록 유지하였다.

[0046] 4) 그 후 유리막대 등으로 수지를 저어서 교반 시킬 수 있을 정도로만 다시 수산화나트륨을 녹인 약 80%메탄올 (약 pH 12)을 서서히 떨어뜨리고 대부분의 A2E가 결합 되어 있는 수지의 상층부를 중층부까지 교반시켰다. 이는 A2E 합성품에 포함되었던 아세트산에 의해 수지가 산성화되어 A2E와 수지의 기능기의 결합이 방해되는 것을 방지하기 위함이다. 다시 수지와 용매의 높이가 같도록 콕을 열어 용매를 제거하였다. 4) 의 과정을 몇 번 반복할 수 있는데, 제거하는 용매가 노랗게 나올 경우 작업을 멈추고, 수지의 상층부부터 하층부까지 교반하여 A2E가 수지에 고르게 분포하도록 한 후, 3~5분간 방치하였다.

[0047] 5) 수지 상층부에 용매를 서서히 붓고, 콕을 열어 천천히 용매가 위에서 아래로 수지를 통과하도록 조절하였다. 이때 사용하는 용매의 양은 때에 따라 수지의 부피의 약 4~7배를 사용하며, 필요에 따라 수지를 저어주었다.

[0048] 6) 100%메탄올을 수지의 부피 약 5배를 사용하여 상층부에 서서히 붓고, 수지를 통과시켜 알칼리를 제거하고 중성화하였다. 필요에 따라 수지를 저어주었다.

[0049] 7) 약 0.1~0.2% trifluoroacetic acid가 포함된 메탄올을 사용하여 수지를 통과시켰다. 이때, 수지에 결합 된 A2E와 용매에 존재하는 proton 간의 치환이 충분히 이루어질 수 있도록 때때로 콕을 잠그고 교반하여 빠르게 분리해 낼 수 있었다. 수지의 본래의 색깔로 근접하게 돌아올 때까지 7)의 과정을 반복하여 통과시킨 용매를 모았다.

[0050] 8) 모은 A2E 용액을 농축기 이용하여 용매를 제거하였다.

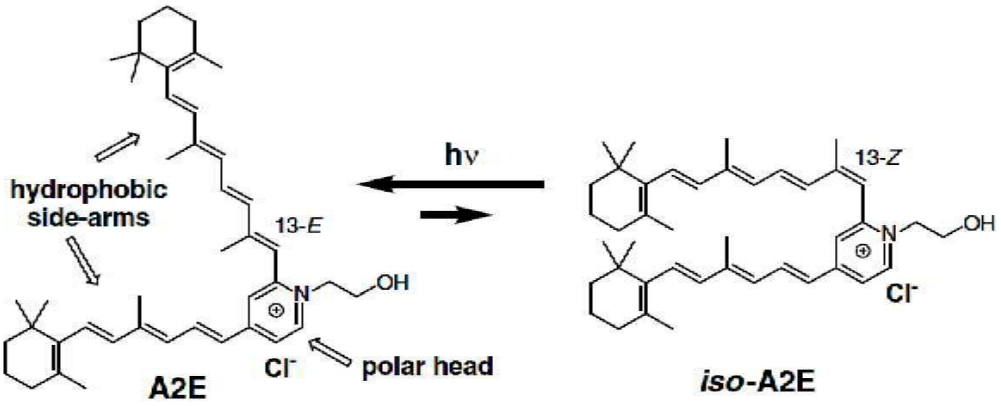
[0051] **3.A2E 정제-trifluoroacetic acid 제거 과정**

[0052] 용매가 제거된 A2E는 methylene chloride와 같은 비극성 용매와 distilled water와 같은 극성 용매를 이용하여 분획 과정을 거쳤다. 이때 사용하는 두 용매는 서로 섞이지 않는 것으로 하며, methylene chloride 층만을 취하여 농축하여 A2E만을 얻었다.

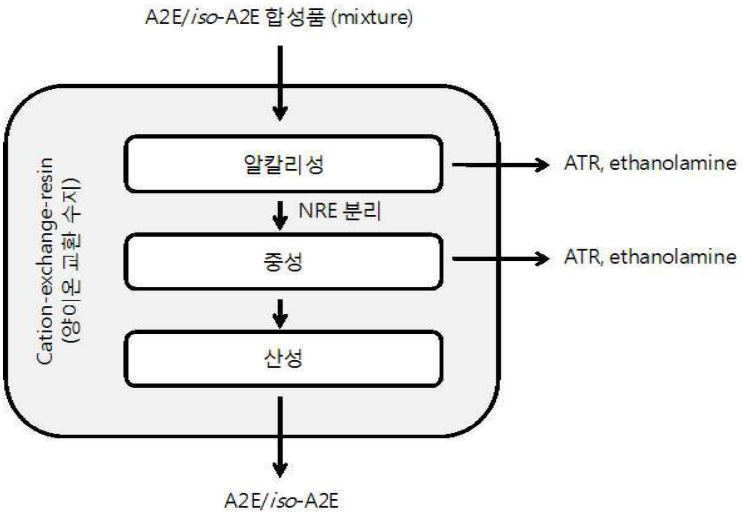
[0053] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

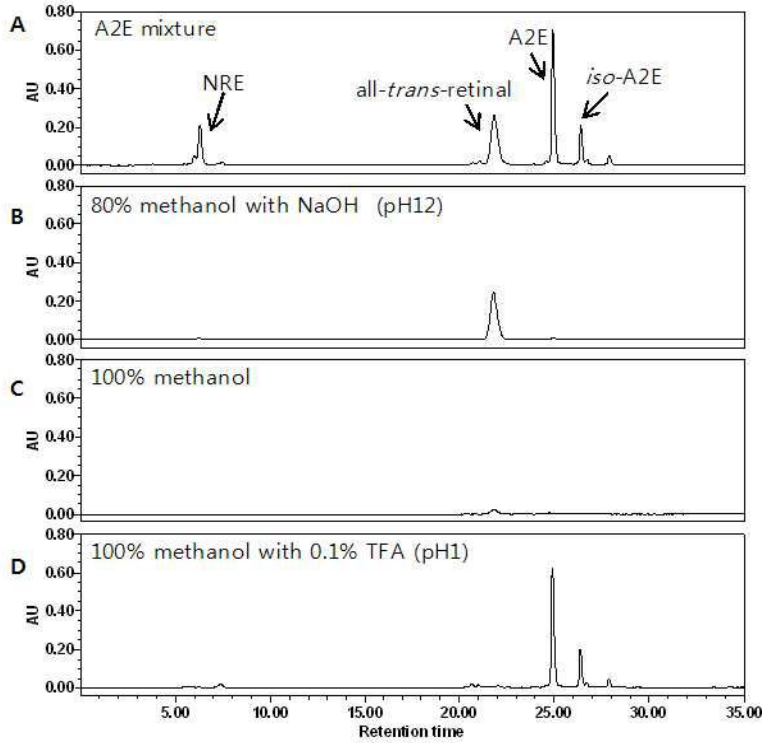
도면1


hydrophobic
side-arms
13-E
hν
13-Z
OH
N
Cl-
polar head
A2E
iso-A2E

도면2


A2E/iso-A2E 합성품 (mixture)
Cation-exchange-resin
(양이온 교환 수지)
알칼리성
ATR, ethanolamine
NRE 분리
중성
ATR, ethanolamine
산성
A2E/iso-A2E

도면3


A
A2E mixture
NRE
all-trans-retinal
A2E
iso-A2E
B
80% methanol with NaOH (pH12)
C
100% methanol
D
100% methanol with 0.1% TFA (pH1)
AU
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
30.00
35.00
Retention time