

Candida rugosa lipase를 촉매로 한 Ibuprofen의 에스테르화 반응

홍중기, 소원욱, 김광제, 이용택*, 문상진
한국화학연구원, 충남대학교*

Esterification of Ibuprofen and alcohols using *Candida rugosa* lipase

Jung-Ki Hong, Won-Wook So, Gwang-Je Kim, Yong-Taek Lee, Sang-Jin Moom
Advanced Chemical Technology Division, KRICT
Department of Chemical Engineering, Chungnam National University

서론

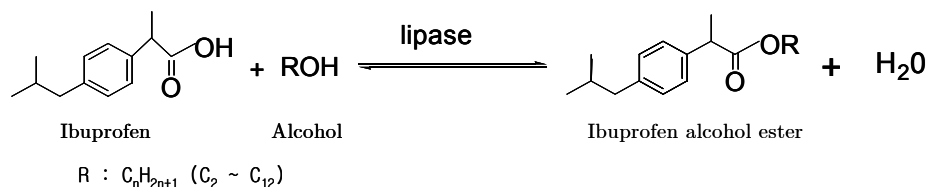
Racemate를 의약품으로 사용할 경우 약효의 감소 또는 부작용의 초래등이 예상되므로 광학적으로 순수한 이성질체 사용이 요구되고 있다. 따라서 chiral compound을 순수하게 분리하는 방법이 제약업계의 주된 관심의 대상이 되고 있다. 라세미 혼합물을 분리하는 방법으로 결정화법, 크로마토그래피법, 효소를 촉매로 한 광학분리법 등이 사용되고 있으며, 이들 가운데 최근에 효소를 이용하는 광학분리[1-2] 공정에 대한 관심이 증가하고 있다. 효소를 이용한 에스테르화 반응의 분리방법은 보다 낮은 온도에서 이루어지는 환경 친화적인 제조공정이라 할 수 있다. 또한 효소는 광학 활성에 대한 특이성 즉 S-isomer 또는 R-isomer에 선택성이 높다. *Candida rugosa* lipase는 유기 용매에 안정하고, S(+)-enantiomer에 선택적이다. Ibuprofen[2-(4-isobutylphenyl)propionic acid] 2-arylpropionic acid 유도체군에 속하며 비스테로이드계 소염진통제로 널리 사용되는 물질이다. Ibuprofen의 경우는 S(+)-enantiomer가 R(-)-enantiomer 보다 100배의 활성이 있다고 알려져 있다[3].

본 연구는 *Candida rugosa* lipase를 이용한 Ibuprofen 에스테르화에 관한 것이며, 에스테르화 반응속도 및 전환율을 조사하기 위해 반응온도, 효소농도, 알코올농도, 알코올 종류를 실험변수로 하여 에스테르화반응을 수행하였다.

실험

1. 에스테르화 반응

효소촉매로 *Candida rugosa* lipase(Sigma L-1754)를 사용하였다. 에스테르화 반응의 용매로 isooctane, 반응 기질로는 R,S-Ibuprofen과 Alcohol의 몰비를 1 : 2로 사용하였다. 효소의 지지체로는 celite를 사용하였으며, 효소 촉매의 활성화를 위해 소량의 증류수를 첨가하였다. 반응온도는 30~80°C 범위내에서 조절하였고, 효소의 농도는 $0.0313 \sim 0.125 \times 10^3$ g/l의 범위내에서 변화시켰다. 알코올 농도의 효과를 조사하기 위하여 기질 중 하나인 옥탄올 농도를 18.75~500mmol/l 범위내에서 변화시켰으며, 알코올 종류로는 ethanol, butanol, hexanol, octanol, decanol, dodecanol등을 사용하였다. 이때 모든 알코올의 농도는 125mmol/l로 고정하였다. 에스테르화 반응식은 Scheme. 1과 같다.



Scheme 1. Esterification of Ibuprofen and Alcohol

2. 분석

에스테르화 반응의 분석은 chiral column[Resis(s,s) Whelk-01]이 장착된 HPLC[waters사]로 수행하였다. 이동상 용매의 조성은 n-Hexane : 2-Propanol : Acetic acid(=98:2:0.5 vol%)였으며, 유속은 0.9 ml/min, UV detector의 wavelength는 254nm이었다. 에스테르화 반응의 선택성을 측정하는 척도로 enantiomeric excess(ee)값을 사용하였으며 다음(1)식과 같이 정의한다.

$$\text{Enantiomeric excess(\%)} = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]} \times 100 \quad (1)$$

[S] : [S]-isomer 에스테르 농도, [R] : [R]-isomer 에스테르 농도

결과 및 고찰

Fig. 1은 효소 농도의 변화에 따른 에스테르화 반응의 전환율과 enantiomeric excess의 결과이다. 효소의 농도가 증가함에 따라 전환율은 증가하였고, 반응시간 동안 enantiomeric excess값은 95% 이상이었다. 효소 촉매량의 증가에 따라 초기반응속도가 증가하였으며 효소농도가 가장 높은 경우 반응 24시간 이후에서 평형반응에 도달하였다. Fig. 2는 효소활성에 대한 최적온도를 알아보기 위해 반응온도에 따른 에스테르화 반응을 수행하여 얻은 초기반응속도와 enantiomeric excess의 결과이다. 온도에 대한 영향은 효소 자체의 활성과 관련이 있기 때문에 효소촉매 반응에서 중요한 요인으로 작용한다. 온도가 높아짐에 따라 초기반응속도가 증가하다가 60°C 이상에서는 감소하였으며, enantiomeric excess 값은 이 온도 이상에서 급격하게 감소하는 경향을 보였다. 반응온도 60°C에서 최대의 전환율을 확보할 수 있었으며, 그 이상의 온도에서는 효소 촉매의 활성저하로 초기반응속도와 enantiomeric excess 값이 현저히 감소함을 알 수 있었다. Fig. 3은 알코올 농도에 대한 초기반응속도의 결과이다. 알코올 농도가 증가할수록 초기반응속도가 감소하는 경향, 즉 반비례 현상을 나타내었다. 이것은 과량의 알코올이 효소반응의 억제제(enzyme inhibitor)로 작용한 것을 의미한다. Fig. 4는 30~60°C 범위 내에서 반응온도에 대한 초기반응속도 결과이다. 활성화 에너지를 결정하기 위하여 식 (2)에 나타난 Arrhenius equation을 사용하였다.

$$\ln K = (-E/R)/T + \ln k_0 \quad (2)$$

반응활성화 에너지는 15.13 KJ/mol이었으며 문헌치와 일치하였다[4]. Table 1은 알코올 종류를 변화시켜 얻은 enantiomeric excess값과 초기반응속도를 보여준다. 알코올의 탄소수가 증가함에 따라 초기반응속도는 증가하였으나, enantiomeric excess 값은 알코올의 종류와 관계없이 약 95% 이상으로 비슷한 결과가 나타났다. *Candida rugosa* lipase를 이용한 Ibuprofen의 에스테르화 반응에 있어서 물과 혼합되는 알코올(Ethyl alcohol, Butyl alcohol)

의 경우에 비해 물과 혼합되지 않는 알코올(hexanol, Octanol, Dodecanol)이 더 높은 전환율을 나타내었다.

참고문헌

1. Klivanov, A. M., *Acc. Chem. Res.*, 23, 114-120(1990)
2. Margolin. A. L., *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 266-280(1993)
3. Adams, S. S., Bresloff, P., and Mason, C. G., *J. Pharm. Pharmacol.*, 28,256-257(1976)
4. Jenta TRJ, Batts G, Rees GD, Robinson BH. *Biotechnol. Bioeng.*, 54,416-427(1997)

Table 1. Effect of alcohol substrate on initial reaction rate and enantiomeric excess(ee,%).

Alcohol	Initial reaction rate ($\mu\text{mol/hr} \cdot \text{g lipase}$)	ee, 24h(%)
Ethanol	3.89	94.63
Butanol	8.36	97.00
Hexanol	12.77	98.10
Octanol	23.24	96.59
Decanol	24.07	99.04
Dodecanol	44.63	99.31

Ibuprofen conc.: 62.5mmol/l; alcohol conc.: 125mmol/l; lipase conc.: $0.0625 \cdot 10^3 \text{g/l}$; reaction temp.: 30°C
reaction time: 24hr.

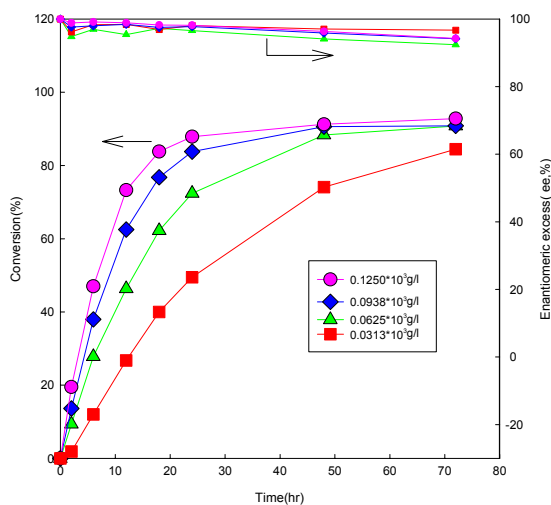


Fig. 1. Effect of lipase concentration on the esterification of ibuprofen. Ibuprofen conc.: 62.5mmol/l; octanol conc.: 125mmol/l; reation temp.: 40°C.

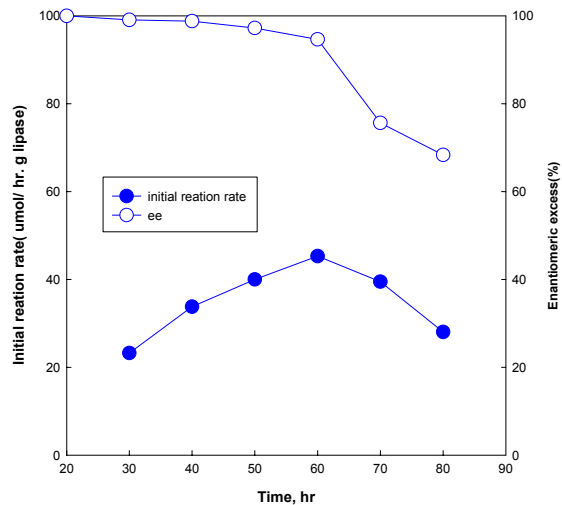


Fig. 2. Effect of temperature on the initial reaction rate of esterification. Ibuprofen conc.: 125mmol/l; lipase conc.: 0.0625*10³g/l; reation tim: 24hr.

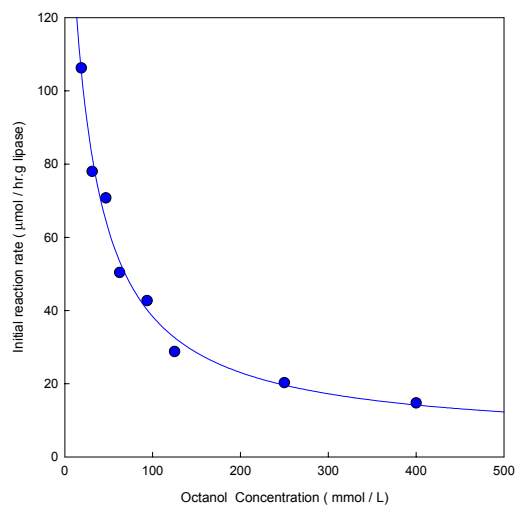


Fig. 3. Effect of octanol concentration on the initial reaction rate of esterification. Ibuprofen conc.: 62.5mmol/l; lipase conc.: 0.0625*10³g/l; reation time: 24hr.

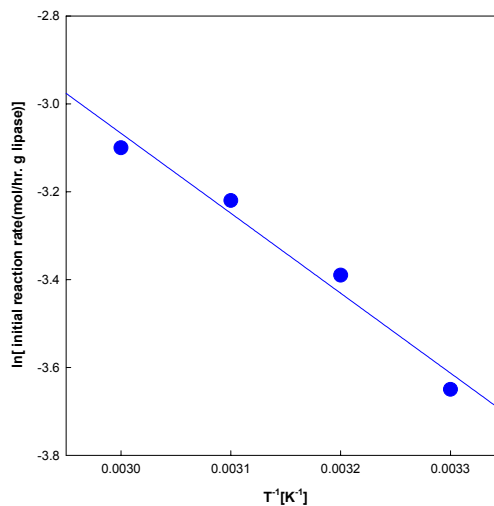


Fig. 4. Effect of temperature on the initial reaction rate in connection with Fig. 2. reaction temp.: 30~60°C.