

키랄 고정상을 이용한 라세미 이브프로펜의 광학분할

송태호* · 서성섭* · 최민호* · 김영대** · 이증기† · 박달근

한국과학기술연구원 청정기술연구센터

*홍익대학교 화학공학과

**진남대학교 응용화학부

(1999년 12월 10일 접수, 2000년 3월 29일 채택)

Optical Resolution of Racemic Ibuprofen by using Chiral Stationary Phase

Taeho Song*, Sung-Sup Suh*, Min-Ho Choi*, Young Dae Kim**, Joong Kee Lee† and Dalkeun Park

Clean Technology Research Center, Korea Institute of Science and Technology

*Department of Chemical Engineering, Hongik University

**Faculty of Applied Chemistry, Chonnam National University

(Received 10 December 1999; accepted 29 March 2000)

요 약

비스테로이드 계통의 진통 및 소염제로서 널리 사용되어지고 있는 광학 이성질체 혼합물인 라세미 이브프로펜(racemic Ibuprofen)을 분리하기 위하여 여러 가지 키랄 HPLC 컬럼 고정상들을 사용하였다. 고정상으로는 β -CD(β -cyclodextrin) BR®, ODS-H80®, Kromasil®, β -CD가 사용되었다. 라세미 이브프로펜 중에서 오직 S-(+)-enantiomer만이 약리적 활성이 존재하므로 이브프로펜 대장체(enantiomer)들을 HPLC를 이용하여 광학분할을 수행하면서 적합한 분리조건을 조사하였다. 이브프로펜의 분리도와 분리인자는 사용되어진 키랄 고정상들과 이동상의 조성비에 크게 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 4개의 키랄 고정상 중에서 β -CD BR®과 Kromasil® 키랄 고정상에서 이브프로펜의 광학분할이 가능하였다. 각각의 고정상 물질에 따라 적합한 이동상 조성비는 다르게 얻어졌으며, 분리인자(separation factor)의 증가는 항상 분리도(resolution)의 증가와 일치하지 않았다. 컬럼 효율에 영향을 주는 공정 변수를 조사하였는데 주입부피가 증가함에 따라서 분리도는 감소하였으나 이동상 유속이 증가함에 따라 주입부피의 증가가 분리도에 미치는 영향은 다소 적은 것을 알 수 있었다. β -CD BR®과 Kromasil® 컬럼을 사용하여 이동상 유속, 주입부피 그리고 주입농도가 이브프로펜의 분리에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 5,000 ppm이상의 이브프로펜 농도 증가에 대해 피크 형태는 약간 비대칭 경향을 갖고 있지만 100,000 ppm이하의 농도에서 이브프로펜의 분리도는 1.5이상을 유지하였고 피크 형태에 있어서도 꼬리 현상(tailing)이 거의 없어 농도의 변화에 따라 물질전달의 영향이 별로 달라지지 않음을 유추할 수 있었다.

Abstract – Various chiral HPLC stationary phases were employed for the separation of racemic Ibuprofen which is widely used as non-steroidal analgetic and anti-inflammatory agent. Since the pharmacological activity resides in the (S)-(+)-enantiomer only, the optical separation of Ibuprofen enantiomers was carried out and compatible separation conditions were investigated. β -CD BR®, ODS-H80®, Kromasil®, and β -CD were used as the chiral stationary phases(CSPs). The resolution and selectivity of Ibuprofen were found to be strongly influenced by the employed CSPs and composition of eluents. A comparison of the four CSPs showed that β -CD BR® and Kromasil® CSP could separate Ibuprofen enantiomers. The optimum composition of each eluent was obtained differently for each stationary material phase. The increase of selectivity did not always result in the increase of resolution. Process variables effecting column performance were investigated. Resolution decreased with the increase of injection volume, but the increase of injection volume had less effect on the resolution as flow rate increased. The influence of the flow rate, injection volume, and concentration on Ibuprofen enantiomers separation was studied using β -CD BR® and Kromasil® columns. The chromatogram had slightly nonsymmetric form at the concentration over 5,000 ppm; nevertheless, the resolution was more than 1.5 at the concentration below 100,000 ppm. The form of peak which hardly had tailing showed that mass transfer effect nearly changed with the concentration.

Key words: Ibuprofen, Enantiomer, Separation, HPLC, Chiral Stationary Phase

†E-mail: leejk@kistmail.kist.re.kr

1. 서 론

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 라세미 혼합물을 단일 광학 이성질체(enantiomer)로 분리하는 기술이 학문적인 관심과 더불어 실용을 위한 기술로서 발전해 오고 있다. 생물학적 시스템에서 enantioselectivity는 대부분의 과학자들에게 잘 알려져 있으며 약학이나 생화학 분야에서 특히 매우 중요하다. 전통적으로는 한 쌍의 광학 이성질체의 분리를 위해서 광학적으로 활성화된 화합물을 사용하여 원하는 이성질체를 함께 결정화시키는 공정이 사용되어 왔는데 이는 비효율적이고 시간이 많이 소비되는 문제점이 있었다. 따라서 이런 공정은 일반적으로 응용하기에는 실용적인 가치가 떨어지기 때문에 한 쌍의 광학 이성질체를 분리하기 위하여 크로마토그래피 시스템이 발전하게 되었다[1].

최근 키랄 약품의 중요성이 부각됨에 따라 고부가가치의 의약품의 고순도로 분리하는 기술의 개발이 의학 및 정밀 화학 생산공정에 커다란 기술적, 경제적 파급효과를 가져오리라 예상되고 있다[2]. 거울상 이성질체는 서로 다른 의학적 활성을 지니고 있음이 판명되었고, 생산되는 합성 의약품에서 거울상 이성질체 중의 어느 한쪽만이 의학적 효능이 있고 나머지 다른 형태의 거울상 이성질체는 아무런 생리활성을 나타내지 않거나 혹은 각종 부작용의 원인으로 보고되었기 때문이다. 그러나 대부분의 의약품들은 순수한 광학 이성질체만을 포함하는 제품으로 얻는 것이 어렵기 때문에 이성질체들이 혼합된 라세미 혼합물로 사용되고 있는 실정이다[3]. 그러나 의약품 생산에 있어서는 원하는 성질의 물질만을 순수하게 얻는 것이 대단히 중요하기 때문에 키랄 약품을 고순도로 분리 및 정제하는 것이 더욱 필요해지고 있다. 본 연구의 실험 대상 물질인 (R, S)-Ibuprofen(±)-(R, S)-2-(4-isobutylphenyl) propionic acid는 전형적인 비스테로이드 계통의 진통 및 소염제(NSAID)로서 류마티즘, 암 등의 진통제 외에 여러 가지 용도로 널리 사용되는 치료약이며 흔히 라세미 혼합물 상태로 사용되고 있다[4, 5]. 그러나 이브프로펜이 이러한 치료약으로 사용될 때에 S-enantiomer는 약물학적 효과를 갖고 있으나 R-enantiomer는 여러 가지 좋지 못한 부 효과를 갖는다[6].

라세미 혼합물의 광학적 분리는 어렵기는 하지만 약물학적 효과를 가지는 물질을 부작용을 가져오는 다른 거울 이성질체로부터 분리하기 위해서 순수한 한 종류의 광학 이성질체를 얻는 것이 요구되어지는 것이다. 이렇게 순수한 광학이성질체를 얻는 문제는 입체화학에 관련된 유기합성, 약학, 생물화학 등의 연구에서 흔히 다루어지고 있다. 이런 입체화학에 관련된 문제점들을 해결할 수 있는 수단으로서 키랄 고정상을 이용한 HPLC방법이 많이 연구되어 왔고, 최근에 HPLC 사용을 위한 키랄 고정상 칼럼들이 상업화되어지면서 다양한 형태의 키랄 칼럼들이 보고되고 있다[7-9]. 키랄 고정상을 이용한 광학이성질체들의 HPLC 분리공정 개발에 대해서는 많은 과학자들에게 흥미의 대상이 되고 있다[10-12].

키랄 고정상 중에서 화학적으로 실리카젤에 β-CD(β-cyclodextrin) 분자를 결합한 키랄 고정상이 여러 가지 라세미 혼합물의 광학적 분리를 연구하는데 유용하게 사용되어져 왔다[13-15]. 분리가 일어나는 과정은 한 쌍의 광학 이성질체와 β-cyclodextrin 사이에 inclusion process에 기초하여 합리적으로 설명되어질 수 있다[1]. 그리고 이런 키랄 고정상과 두 광학 이성질체 사이에 입체선택성이 나타나는 것에 세 점 상호 작용 모델(three point interaction model)이 사용되어지고 있다[16, 17].

본 연구에서 수행한 실험에서는 분리하고자 하는 라세미 혼합물상태인 이브프로펜의 분자식에 근거하여 분리를 가능하게 할 것으로 예측되는 서로 다른 고정상들을 선택하여 사용하였고 각 고정상에 대하여 적절한 것으로 알려져 있는 이동상을 사용하여 라세미 이브프로펜의 광학 분리의 가능성을 조사하여 보았다. 라세미 혼합물 상태인 이브프로펜의 분리가 뚜렷이 얻어질 수 있는 고정상 물질을 찾은 뒤 크로마토그램을 해석 평가하면서 분리도가 커질 수 있는 조업조건을 찾는 것을 본 연구의 목표로 하였다.

2. 이론적 배경

(R, S)-Ibuprofen(±)-(R, S)-2-(4-isobutylphenyl)propionic acid와 같은 라세미 혼합물이 크로마토그래피에서 분리되는 것은 한 쌍의 광학 이성질체들이 키랄 고정상과 상호작용을 하면서 일시적인 부분 입체 이성질체들의 안정성 차이에 의해 광학적 분할이 이루어지는 것이다[18]. 이러한 분리가 이루어질 때 충전제의 성격에 따른 키랄 칼럼의 종류, 이동상의 조성, 이동상 유속, 주입부피, 주입 시료 속의 농도와 같은 실험 조건들에 변화를 주면 크로마토그램에서 분리되어 나오는 각각의 피크 형태, 체류시간, 피크 폭의 변화로 인하여 분리도에 영향이 나타나게 된다. 또한 충전제를 칼럼에 충전하는 방법에 따라라도 칼럼의 성능이 달라지고 칼럼 성능이 떨어지면 크로마토그램에서 피크의 형태는 대칭형 모양에서 비대칭형 모양으로 변화될 수 있다. 이런 실험 조건의 변화가 band profile에 주는 영향을 분석함으로써 band profile의 형태와 체류시간을 예측할 수 있고 분리하려고 하는 물질에 적합한 분리조건을 얻을 수 있다.

광학 이성질체를 분리하는 메카니즘을 세분화하면 삼차원적 착화합물을 이용한 분리법, molecular interaction에 의한 분리방법, inclusion complex를 이용한 분리방법으로 구분할 수 있다. 광학이성질체를 분리하는 메카니즘이 파악되는 경우에는 키랄 칼럼의 출구로부터 빠져 나오는 광학 이성질체 피크들의 순서로부터 절대배율을 정할 수 있다. 또는 단순한 분별채취(fractional collection)에 의해서 광학적으로 순수한 물질을 쉽게 얻을 수 있다[19].

칼럼의 성능에 영향을 주는 또 다른 요인은 이동상의 선택으로서 적당한 선택도를 갖는 용매의 선택이다. 특히 체류시간과 피크 형태에 영향을 많이 주므로 칼럼 성능을 결정하는 데에 중요하게 고려해야 할 요소가 된다. 이동상 유속의 증가는 분석시료의 칼럼내 용리시간을 감소시키며 이동상의 조성비도 일반적으로 용리시간에 영향을 줄 수 있다. 용리시간의 증가는 용질과 고정상 사이의 작용 시간을 증대시켜 분리도 향상에 기여할 수도 있지만 물질전달의 영향이 큰 고정상을 사용하는 경우에는 band profile에서 각 성분의 band broadening이 심해지므로 오히려 분리도는 감소될 수 있다. 그리고 분자확산(molecular diffusion), 축방향 분산(axial dispersion), 물질전달(mass transfer kinetics)은 모두 주입농도의 변화에 상관 관계를 갖는다[20-24].

본 연구의 실험에서 얻어지는 결과의 분리능을 표현해 주는 방법으로써 아래와 같은 식들을 사용하였다. 분리도(resolution) R은 다음과 같이 표현된다.

$$R = \frac{t_2 - t_1}{(w_2 + w_1)/2} = \frac{2 \Delta t}{w_1 + w_2} \quad (1)$$

여기에서 t_1 , t_2 는 시료 1, 2의 체류시간이며, w_1 , w_2 는 피크 1, 2의 기준선에서의 폭이며 시간 단위로 표시한다. 칼럼의 효율을 알기 위해서 baseline에서 측정된 피크의 폭 w 를 이용한 아래 식에 의해서 이론단수를 측정하였다.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

여기에서 t_R 은 용질의 칼럼 안의 체류시간이다. 용량인자 k' 는 이동상에 있는 분석시료량 M_m 과 고정상에 있는 분석시료 양 M_s 의 비로 정의되어지며 아래의 식으로 표시할 수 있다.

$$k' = \frac{M_s}{M_m} = \left(\frac{t_R - t_0}{t_0} \right) \quad (3)$$

위식에서 t_0 은 용매 경계면이 칼럼 출구에 도착하는 시간으로서 분석시료가 이동상 내에서 용해되지 않는 경우의 체류시간에 상응하며 칼럼

dead time이라 부르기도 한다. 크로마토그래피에서 retention은 용질의 고정상과 이동상 사이 평형분배(equilibrium distribution)에 의해서 나타나는 현상이므로 용질 체류시간을 측정하여 이동상의 유속을 곱해 주면 retention volume(V_R)을 알 수 있다.

S-성분에 대한 R-성분의 분리인자(separation factor) α 는 다음 식에 의해서 측정하였다.

$$\alpha = k'_R/k'_S = \frac{t_R - t_0}{t_S - t_0} \quad (4)$$

여기에서 t_R 과 t_S 는 광학 이성질체 중 R-성분과 S-성분의 체류시간을 나타낸다.

3. 실험

3-1. 실험장치와 실험재료

본 실험에서는 4종류의 HPLC 칼럼을 사용하였는데, 상업적으로 나와있는 β -CD BR[®]을 기반으로 한 칼럼(실리카젤에 β -cyclodextrin을 결합시킨 칼럼 YMC co. Japan)과 ODS-H80[®](실리카젤에 C18을 결합시킨 칼럼, YMC Co. Japan)을 구입하여 사용하였고, 충전제로 개발 중인 β -CD(실리카젤과 β -cyclodextrin이 amine functional group으로 연결된 고정상물질)과 Kromasil[®]충전제(Eka chem., Sweden)를 직접 칼럼에 팩킹하여 사용하였다. 팩킹은 내경이 4.6 mm, 길이가 250 mm인 stainless-steel 칼럼(Alltech)에 슬러리 팩킹하였다. β -CD를 슬러리 상태로 만들기 위한 용매로는 ethanol[HPLC grade]을 사용하였으며 슬러리로 분산하기 위해 sonicator를 사용하였다. 이때 충전 칼럼에 압력을 가하기 위한 용매도 슬러리 용매와 같은 ethanol을 사용하였다. Kromasil[®]에 사용된 슬러리 용매는 methanol/acetonitrile[50/50, v/v%]을 사용하였고 가압용매로는 methanol을 사용하였다. β -CD를 충전하기 위한 절차는 ethanol 20 ml에 β -CD 3.4 g을 sonicator를 사용하여 30초 정도 분산시킨 후 SSI reservoir에 넣고 가압 용매의 압력을 1분 사이에 7,000 psig까지 증가하여 β -CD를 칼럼에 충전 하였다. 칼럼 충전의 확인은 SSI reservoir의 부피가 20 ml이므로 충전된 칼럼을 통해 배출되는 ethanol의 부피가 SSI reservoir 부피의 두배 이상 흘러나왔을 때 용매 압력을 줄여주고 팩킹 칼럼과 SSI reservoir를 분리하여 칼럼의 팩킹을 확인하였다. Kromasil[®] 칼럼을 만들 때에는 3.3 g 양을 위와 동일한 방법으로 충전하였다.

이동상 용매로는 0.1 M ammonium acetate(ammonium acetate, 99.99% +HPLC water), acetonitrile(Baker analyzed[®] HPLC solvent), hexane(95% n-hexane), tert-Butyl methyl ether(99.8%, HPLC grade, Aldrich Chem. Co.), acetic acid(Baker analyzed[®] HPLC reagent), methanol(ChromAR[®] HPLC), water(Baker analyzed[®] HPLC reagent)를 실험에 사용하였다.

시료인 이브프로펜의 라세미 혼합물은 삼일제약에서 제공받은 것과 USP reference standard [U.S.P.C., INC]를 사용하였고, 이브프로펜의 S-(form)은 [(S)-(+)-4-Isobutyl- α -methyl-phenyl acetic acid, 99%, Aldrich Chem. Co.]를 사용하였다. 팩킹 물질을 충전하기 위한 장치로는 slurry packer(Altech model 1666)를 사용하였다.

실험장치의 주요 부분들은 고압펌프(Waters 510, Yonung-Lin M930), injection system(syringe+sample loop), HPLC 칼럼, UV spectrometer(waters, Lambda-Max Model 481, Young-Lin M720) 및 data acquisition (Young-Lin, Autochromin)으로 이루어져 있다. UV detector는 데이터 모듈에 직접 연결되어 모듈에서 PC로 데이터를 전달해 주어 피크의 면적과 높이, 체류시간 등을 얻을 수 있게 하였다.

3-2. 실험방법

이브프로펜 분리 여부를 확인하기 위해서 β -CD, BR[®] 칼럼에서는 이동상으로서 0.1 M ammonium acetate와 acetonitrile의 혼합물을 부

피비 10/90(v/v%)로 사용하였다. ODS-H80[®] 칼럼에서는 이동상으로 methanol/water/acetic acid(65/35/1, v/v%)를 사용하였으며 슬러리 팩킹한 β -CD칼럼에서는 β -CD BR[®] 칼럼과 같은 이동상을 사용하였다. Kromasil[®]을 충전물로 사용하였을 때는 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid (75/25/0.1, v/v%)를 사용하였다.

실험은 상온에서 수행하였으며 칼럼은 실험을 시작하기 전 정상상태에 이를 때까지 충분한 시간 동안 이동상으로 씻어 주었다. 이동상의 흐름을 조절하기 위해 HPLC 펌프를 사용하여 이동상의 흐름을 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0(ml)로 변화시키면서 실험을 하였다. 시료의 주입은 주사기를 사용하여 샘플 루프를 5, 10, 20, 50(μ l)로 바꾸어주면서 주입부피에 변화를 주었다. 유출되는 성분은 UV detector로 검출한 뒤 데이터 모듈을 통하여 PC에서 데이터를 얻는 프로그램을 이용해서 각 성분의 크로마토그램을 얻었다.

초기의 실험에서 β -CD BR[®] 칼럼 경우에 이브프로펜을 methanol에 용해하여 100 ppm으로 실험을 하였으나 실험에 사용된 UV absorbance에서 피크의 크기가 크로마토그램 분석에 곤란할 정도로 작게 나타났기 때문에 1,000 ppm으로 농도를 증가하여 실험을 행하였다. 이동상은 0.1 M ammonium acetate와 acetonitrile을 10/90, 20/80, 30/70, 40/60(v/v%)의 조성비에서 일정용매조성법으로 사용하였고 유속은 1.0, 1.5, 2.0, 2.5(ml)로 변화시키면서 흐르게 하였다. β -CD BR[®] 칼럼에서 라세미 이브프로펜이 S-enantiomer와 R-enantiomer로 분리된 크로마토그램으로부터 분리된 두 개 피크의 물질을 판별하기 위해서 순수한 S-enantiomer를 주입하므로써 두 개의 피크 중 각각의 광학 이성질체를 확인하였다.

Kromasil[®]을 충전한 칼럼에서 시료로는 라세미 이브프로펜을 hexane에 용해하여 주입농도 1,000 ppm으로 만든 것을 사용하였다. 이동상에서는 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid의 조성비를 85/15/0.1, 75/25/0.1, 60/40/0.1(v/v%)로 변화를 주면서 최적의 이동상 조성비를 찾는 실험을 하였다. 한편 β -CD BR[®] 칼럼과 동일한 이동상 유속과 주입부피로 실험하여 비교하여 보았다. 라세미 이브프로펜을 hexane속에서 100 ppm으로 시료의 농도를 고정시키고 이동상 유속을 1.0, 1.5, 2.0, 2.5,

Table 1. Properties of chiral stationary phase

β -CD column [slurry packing]	Bonded-phase	β -cyclodextrine grafted silicagel by amine functional group
	CHN analysis	C7.291, H1.471, N1.613
	Particle size	10 μ m
	Column void fraction(ϵ)	0.3
	Packed density	0.794 g/ml
	Detection	UV at 254 nm
ODS-H80 [®] column	Bonded-phase	Octadecylsilane, C18
	Particle size	10 μ m
	Column void fraction(ϵ)	0.42
	Pore size	120 Å
	Detection	UV at 260 nm
β -CD BR [®] column	Bonded-phase	β -cyclodextrine grafted silicagel
	Particle size	10 μ m
	Column void fraction(ϵ)	0.73
	Pore size	120 Å
	Detection	UV at 254 nm
Kromasil [®] column [slurry packing]	Bonded-phase	O,O'-bis(4-tert-butylbenzoyl)- N,N'-diallyl-L-tartar diamide
	Carbon content	15%
	Packed density	0.79 g/ml
	Particle size	10 μ m
	Column void fraction(ϵ)	0.70
	Pore size	100 Å
	Detection	UV at 220 nm

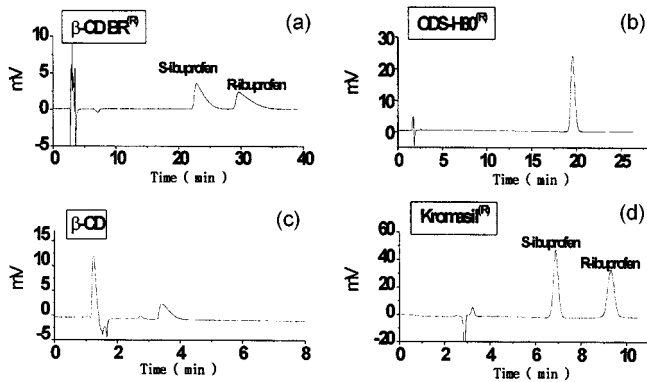


Fig. 1. Elution profiles of racemic Ibuprofen for various species of chiral columns.

(a) β -CD BR[®] column, (b) ODS-H80[®] column, (c) β -CD column (slurry packing), (d) Kromasil[®] column (slurry packing)

3.0(ml/min)로 변화시키면서 주입부피는 5, 10, 20, 50(μ L) 주입하여 각각의 경우 실험조건에 따른 크로마토그램의 변화를 관찰하였다. 또한 100, 1,000, 5,000, 10,000, 30,000, 50,000, 70,000, 100,000(ppm)으로 분석시료의 농도를 증가시키면서 크로마토그램의 변화를 관찰하였다. 실험에 사용된 각각의 칼럼에서 UV detector의 absorbance값과 이동상의 유속 등 실험조건을 Table 1에 나타내었다.

4. 결과 및 고찰

라세미 이브프로펜의 분리를 수행할 목적으로 β -CD BR[®], ODS-H80[®], β -CD, Kromasil[®] 4가지 칼럼을 실험에 사용하면서 비교하였다. 각각의 칼럼에서 이동상 유속을 1 ml/min로 고정시킨 채로 실험을 수행하면서 시간의 함수로서 크로마토그램을 얻었다. Fig. 1을 보면 ODS-H80[®] 칼럼은 분석시료의 칼럼 내 체류시간이 20분 정도를 나타내면서도 피크의 전면과 후면에서 퍼짐이 없이 날카로운 형태를 가짐으로서 단일 피크의 이론단수가 매우 높음을 알 수 있고 칼럼효율도 좋을 것으로 예측되었다. 그러나 이브프로펜 분리 목적을 달성하기 위한 두 개의 피크가 나타나지 못하였고 단일 피크만이 나타남으로서 이브프로펜의 분리에는 적합하지 못하다는 것을 알 수 있다. β -CD칼럼에서는 분석시료의 체류시간이 4분 이내이면서 단일 피크를 형성하였고 피크 후면의 끌림현상(tailing)이 뚜렷하게 나타났다. 실험에 사용된 다른 칼럼보다 상대적으로 빠른 속도로써 칼럼을 통과하지만 물질전달의 영향은 더 커지고 칼럼의 효율도 좋지 못할 뿐만 아니라 분리도 제대로 이루어지지 못하는 것을 알 수 있었다. 이런 결과로서 실리카젤과 β -cyclodextrin이 amine functional group으로 연결된 고정상 물질[β -CD]은 키랄 특성을 가지는 라세미 이브프로펜을 단일 광학 이성질체로 분리하지 못한다고 사료된다. 그러나 Fig. 1(a)와 (d)에 보여지는 것처럼 β -CD BR[®]과 Kromasil[®] 칼럼은 라세미 이브프로펜을 분리할 수 있었다. 크로마토그램의 결과로서 라세미 이브프로펜은 거울상 이성질체로서 이런 약품의 광학 분할을 위해서는 β -CD BR[®]과 Kromasil[®]이 키랄 고정상으로 선정될 경우에 HPLC에서 분리될 수 있음을 보여주었다. 따라서 라세미 이브프로펜의 분리가 가능한 두 개의 칼럼에 대해서 실험조건의 변화에 따른 분리도의 변화를 살펴보았다.

β -CD BR[®] 칼럼에서 이동상 조성비의 변화에 따른 분리인자의 변화를 여러 주입부피에 대하여 Fig. 2에 나타내었고 이동상 조성비와 주입부피의 변화가 분리도에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 2에서 이동상 성분인 0.1 M ammonium acetate가 증가할수록 분리인자는 증가하였지만 분리인자의 증가가 분리도의 증가를 반드시 수반하지는

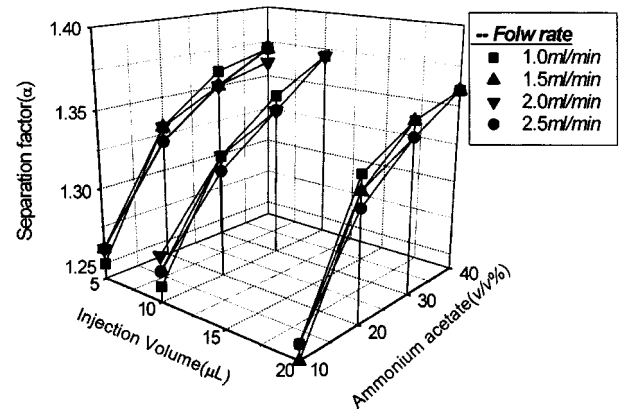


Fig. 2. Effects of the volume percent of 0.1 M ammonium acetate and the amount of injection volume on the separation factor for β -CD BR[®] CSP. Injection concentration of 1,000 ppm in methanol.

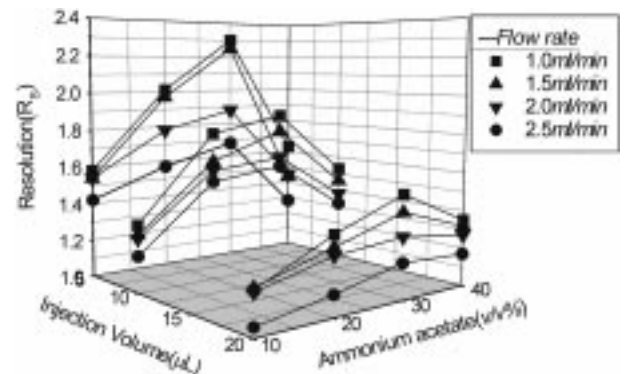


Fig. 3. Effects of the volume percent of 0.1 M ammonium acetate and the amount of injection volume on resolution of Ibuprofen racemate for β -CD BR[®] CSP. Injection concentration of 1,000 ppm in methanol.

않는 것으로 나타났다. 그러나 Fig. 3에서 나타나듯이 0.1 M ammonium acetate의 이동상 부피비율이 10%에서 30%까지 늘어날 때에 분리도가 계속 증가하였으나 40%에서는 30%보다 분리도가 감소하였다. 그리고 주입부피의 증가에 따라 분리도는 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 주입부피에 관계없이 0.1 M ammonium acetate의 부피 비율이 30%일 때 일정하게 좋은 분리도를 나타냄을 알 수 있었다.

이런 결과의 원인을 고찰하기 위해 R-Ibuprofen의 체류시간을 Fig. 4를 통해 보면 서로 다른 주입부피에서 일정한 경향을 나타내는 것을 알 수 있다. Ammonium acetate가 10%에서 20%로 증가하면서 체류시간은 빨라지고 30%에서 40%로 증가할 때 체류시간이 다시 느려지는 것을 알 수 있다. 크로마토그램에서 ammonium acetate의 부피비율이 20%와 30%에서는 두 번째 피크인 R-Ibuprofen의 용량인자가 모든 경우의 실험결과에서 10이상을 나타내는데 반하여 10%와 40%일 때 10이하가 되었으며 이것은 칼럼내의 분석시료의 용리시간이 길어짐을 의미하며, 이로부터 칼럼 내에서 분석시료가 통과하는 시간이 증가함을 알 수 있다. 이것은 용리시간이 길어짐에 따라 피크의 폭을 넓게 하는 band broadening이 증대되어 0.1 M ammonium acetate의 부피비율이 40%일 때에는 분리도가 감소한 것으로 보인다. 이런 결과로부터 β -CD BR[®] 칼럼에서 분석시료의 체류시간이 길수록 분리도를 상승시키는 것이 아니며, band broadening을 가져오는 여러 가지 현상들이 칼럼 효율과 분리도를 실질적으로 좌우한다는 것을 알 수 있다. 그리고 라세

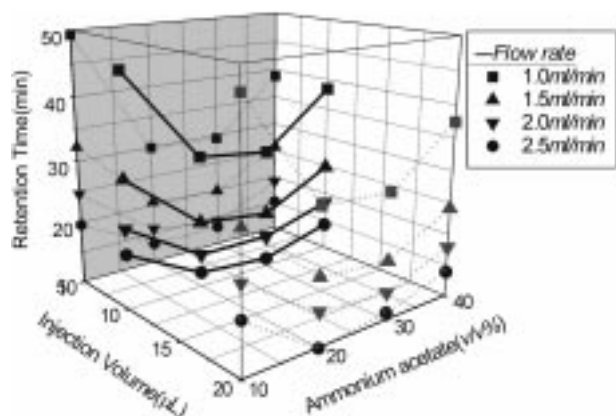


Fig. 4. Effects of the volume percent of 0.1 M ammonium acetate and the amount of injection volume on retention time of (R)-Ibuprofen for β -CD BR[®] CSP. Injection concentration of 1,000 ppm in methanol.

미 이브프로펜의 분리에서 β -CD BR[®] 칼럼을 사용할 때 분리된 두 개의 피크 중 두 번째 피크(R-enantiomer)의 용량인자(k')가 10 이상을 갖는 이동상은 적합하지 못함을 알 수 있었다. 한편 0.1 M ammonium acetate의 부피비율이 50%일 때에는 전혀 분리가 되지 않음으로서 HPLC를 이용한 분리공정으로서 조업이 가능한 이동상 조성비가 존재하는 것을 유추할 수 있었다. β -CD BR[®] 칼럼에서는 Fig. 3에서 보여진 것처럼 최적의 분리조건은 이동상 부피비율에서 0.1 M ammonium acetate가 30%인 경우로 나타났다.

Kromasil[®] 칼럼에서 시료의 주입농도는 100 ppm, 주입부피는 20 μ l, 이동상 유속 범위를 1.0-2.0 ml/min로 운전하였을 때, 이동상 내에 hexane과 tert-butyl methyl ether의 부피비율을 변화하여 실험해 본 결과 hexane의 부피비율이 85%와 75%에서는 거의 비슷한 분리도를 나타내었지만 hexane의 부피비율이 75%에서 약간 더 높은 분리도를 보여주었으며 hexane의 부피비율이 60%에서는 분리도가 감소되었다. 이런 실험결과로부터 Kromasil[®] 칼럼에서 적합한 이동상 조성비는 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid[75/25/0.1, v/v/v]임을 알 수 있었다.

라세미 이브프로펜이 순수한 광학이성질체로 분리가 가능했던 두 개의 칼럼을 비교하기 위하여 Kromasil[®] 칼럼과 β -CD BR[®] 칼럼에서 각각의 칼럼에 적합한 이동상 조성비로써 두 개의 칼럼을 비교하여 보았다. 시료농도는 1,000 ppm으로 주입하였고 주입부피는 5 μ l로 고정시킨 상태에서 이동상 유속을 변화시키면서 분리도를 조사한 Fig. 5를 보면 동일한 실험조건에서 Kromasil[®] 칼럼의 분리도가 더 좋은 것을 알 수 있다. 따라서 Kromasil[®] 칼럼이 β -CD BR[®] 칼럼보다 더 높은 이론단수 값을 Fig. 6에 나타내었다. β -CD BR[®] 칼럼에서는 두 개의 피크에 해당되는 S-enantiomer와 R-enantiomer의 이론단수가 비슷하였으나 Kromasil[®] 칼럼에서는 두 번째 피크에 해당되는 R-enantiomer의 이론단수가 S-enantiomer의 이론단수보다 더 높았다. 분리된 두 개의 피크 중에서 나중에 나오는 피크는 칼럼 내에서 물질전달의 영향을 더 받는다. 그러나 위의 결과에서 보여진 것처럼 Kromasil[®] 칼럼에서는 R-enantiomer의 이론단수가 높기 때문에 β -CD BR[®] 칼럼보다 칼럼 내에서 물질 전달의 영향이 작음을 알 수 있었고 더 좋은 분리도를 나타낼 수 있는 것이다. 일반적으로 분리도가 1.5 이상이 될 때 두 개의 피크가 중첩되지 않는 분리가 이루어진다는 것을 고려하면 두 개의 칼럼에서 모두 분리도가 1.5 이상이 됨으로써 피크의 분리는 확실히 구분되어진다고 볼 수 있으며 그 중에서 Kromasil[®] 칼럼의 경우 각 피크에 band broadening이 작아서 더 좋은 분리 결과를 나타내었고 분리도는 2.0 이상을 유지할 수 있었다.

Kromasil[®] 칼럼을 사용하여 라세미 이브프로펜의 주입농도는 100 ppm

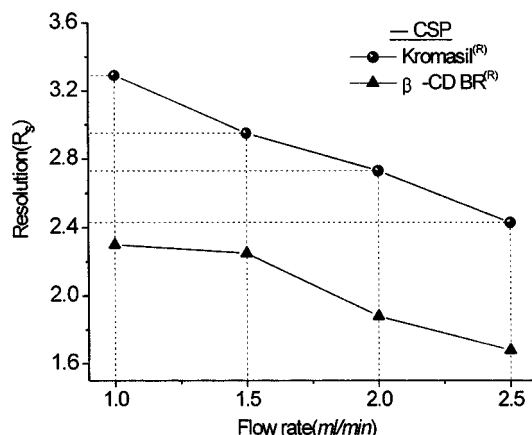


Fig. 5. Comparison of resolution with eluent flow rate between β -CD BR[®] and Kromasil[®] columns. Injection concentration of 1,000 ppm and injection volume of 5 μ l.

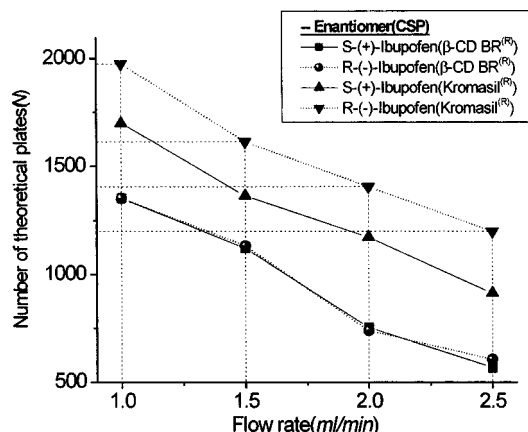


Fig. 6. Comparison of theoretical plate number between β -CD BR[®] and Kromasil[®] columns with eluent flow rate. Injection concentration of 1,000 ppm and injection volume of 5 μ l.

으로 고정시키고 주입부피를 달리하여 이동상 유속의 증가에 따른 분리도의 변화를 Fig. 7에 나타내었고 이동상 유속을 달리하여 주입부피의 증가에 따른 분리도의 변화를 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 7에서 보면 주입부피를 다르게 하였을 경우에 이동상 유속이 증가할수록 분리도는 감소한다는 것을 알 수 있다. 특히 유속이 느린 경우에 분리도는 주입부피의 변화에 따라서 차이가 있었다. 그러나 이동상 유속이 3 ml/min 이상으로 운전할 때 주입부피 변화가 분리도에 미치는 영향이 다소 작아지는 것을 알 수 있다. Fig. 8을 보면 이동상 유속이 고정되어 있을 때 주입부피 증가가 분리도에 어떻게 영향을 주는지를 명확히 알 수 있다. 이동상 유속이 1.0 ml/min로부터 10 ml/min까지 각각의 유속에서 살펴보면 가장 느린 유속인 1.0 ml/min에서 주입부피 증가에 따른 분리도를 나타내는 그래프 유형이 감소하는 형태를 갖는 것을 볼 수 있다. 그러나 유속이 증가함에 따라서 주입부피의 증가가 분리도에 미치는 영향이 점차 줄어들어가는 것을 그래프의 기울기가 작아지는 것으로부터 살펴 볼 수 있다.

이 원인을 살펴보기 위하여 S-enantiomer와 R-enantiomer의 이론단수를 Fig. 9 및 10에 각각 나타내어 각각의 유속에서 칼럼의 효율을 조사하여 보았다. 이동상의 유량이 1 ml/min일 때에 주입부피 증가는 이론단수를 감소시켰다. 그러나 이동상 유량이 3 ml/min 이상으로 커지게 되면 주입부피 증가는 이론단수 값에 변화를 주는 경향이 작아짐으

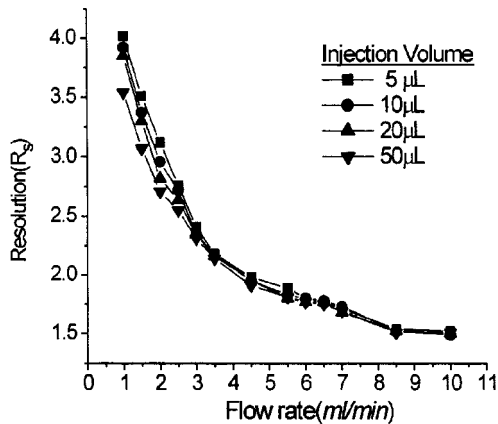


Fig. 7. Effect of the eluent flow rate on the resolution of Ibuprofen for Kromasil® CSP.

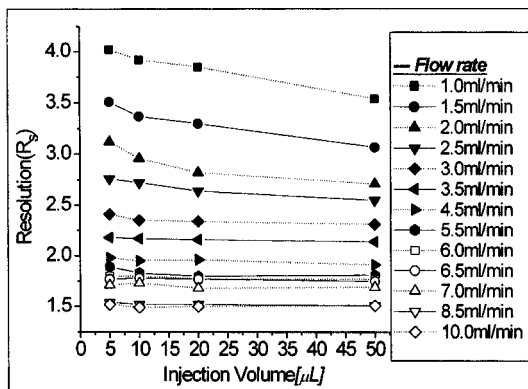


Fig. 8. Effect of the amount of injection volume on the resolution of Ibuprofen for Kromasil® CSP.

로써 주입부피의 증가가 칼럼 효율에 큰 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이로부터 이동상 유량이 3 ml/min 이상에서는 주입부피 변화가 분리도에 큰 영향을 주지 못함을 유추해 볼 수 있었다. 이 결과는 라세미 이브프로펜을 분리하는 공정에 있어서 Kromasil® 칼럼을 사용할 경우 주입부피의 영향이 이동상 유량의 변화에 비하여 칼럼 효율에 상대적으로 작은 영향을 준다는 것을 알 수 있게 해준다. 한편 이동상 유량이 일정한 값으로 증가하게 되면 주입량의 증가가 분리공정의 분리도를 감소시키지 않음으로서 공정의 생산성을 확보하는데 유리할 수 있을 것으로 예측할 수 있었다.

이브프로펜의 주입농도를 100 ppm에서 100,000 ppm까지 증가시켜 각각의 농도에서 이브프로펜이 분리된 크로마토그램을 Fig. 11에 나타내었다. 100 ppm에서 5,000 ppm까지 피크는 거의 동일한 체류시간에 나타났으며 좌우대칭 형태인 가우시안 형태를 보여주었다. 5,000 ppm에서 100,000 ppm으로 증가되었을 때 농도의 증가에 따라 체류시간이 빨라지면서 피크 형태는 좌측으로 기울어지는 비선형 크로마토그래프 형태를 나타내었다. 농도가 증가할수록 다소 비대칭 형태를 보이면서도 농도가 100,000 ppm까지 두 개 피크의 분리도는 1.5 이상을 유지했고 피크의 전면과 후면의 형태가 끌림 현상(tailing)이 거의 없는 형태를 유지하였다. 이런 결과로부터 농도가 증가함에 따라 물질전달의 영향이 크게 달라지지 않음을 알 수 있었다.

5. 결 론

본 연구에서는 고부가가치를 갖고 있는 거울상 이성질체 의약품인 라

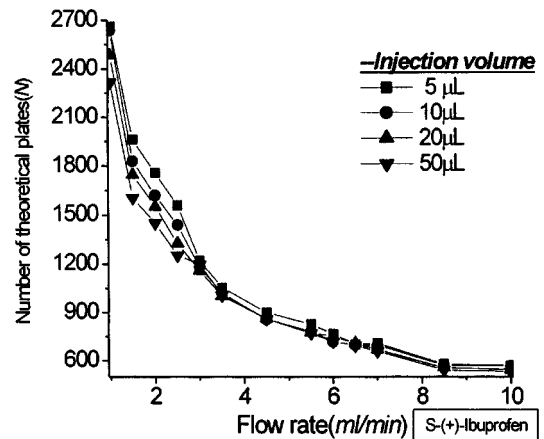


Fig. 9. Effects of the eluent flow rate and on the theoretical plate number of (S)-Ibuprofen for Kromasil® CSP. Injection concentration of 100 ppm in hexane.

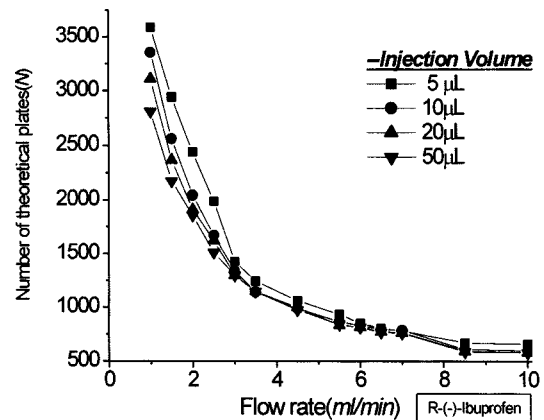


Fig. 10. Effect of the amount of injection volume on the theoretical plate number of (R)-Ibuprofen for Kromasil® CSP. Injection concentration of 100 ppm in hexane.

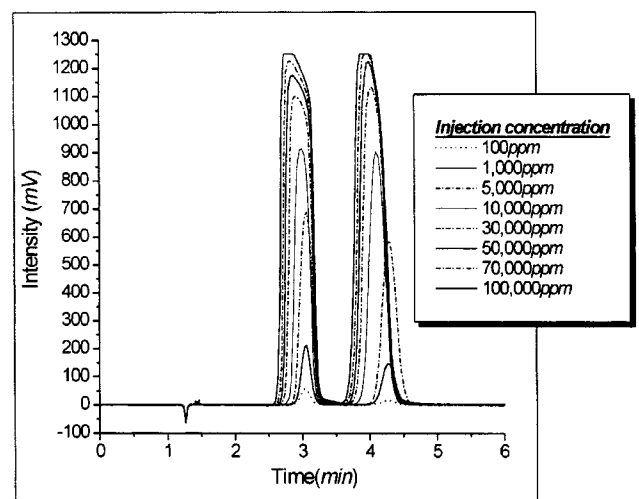


Fig. 11. Elution profiles of Ibuprofen with increase of input concentration for Kromasil® CSP. Eluent flow rate of 2 ml/min, eluent composition of hexane/tert-butylmethyl ether/acetic acid(75/25/0.1, v/v%).

세미 이브프로펜을 키랄 고정상을 이용하여 단일 거울 이성질체로 광학분할하기 위한 실험을 수행하였다. 산업용 크로마토그래피 기술과 연

속운전을 모사하는 크로마토그래피 기술을 개발하기 위한 기초연구가 되도록 하기 위하여 적절한 키랄 고정상을 찾으면서 그에 적합한 실험 조건을 규명한 실험을 수행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

외국의 상업용 칼럼과 물질 및 국내에서 개발 중인 키랄 물질을 슬러리 팩킹 작업을 통해 제작한 칼럼들을 사용하여 실험한 결과 라세미 이브프로펜의 분리를 가능하게 하는 고정상 물질로서 β -CD BR[®] 칼럼과 Kromasil[®]이 적합하다는 것을 알 수 있었다. 각 키랄 고정상에 대해 가장 적합한 용매 조성비를 찾아서 유속과 주입부피 등 운전조건을 동일하게 하여 실험을 수행한 결과 키랄 고정상 물질로서 Kromasil[®]을 슬러리 팩킹하여 사용한 칼럼에서 β -CD BR[®] 칼럼에서 보다 더 좋은 분리도와 이론단수를 얻을 수 있었다. Kromasil[®] 칼럼을 산업용 크로마토그래피로 사용하여 주입부피와 이동상 유속의 변화에 따른 분리도의 변화를 살펴본 결과 일정한 유속 이상이 되면 주입부피의 증가가 분리도를 감소시키는 경향이 비교적 작아짐을 알 수 있었다. 따라서 원하는 특정 분리도를 얻을 수 있는 이동상 유속에서 원료의 주입량을 늘려가면서 생산성의 향상을 가져오리라 예측할 수 있다. 라세미 이브프로펜의 농도가 100 ppm에서 100,000 ppm까지 실험한 범위 내에서 분리도는 1.5 이상이 유지되면서 칼럼 내에서 농도의 증가가 물질전달의 변화에 미치는 영향은 작다는 것을 알 수 있었다.

분리도가 커질 수 있는 최적 실험조건들은 다음과 같이 나타났다. 이동상의 조성비가 분리도에 미치는 영향을 조사하는 실험과정을 통하여 β -CD BR[®] 칼럼에서는 0.1 M ammonium acetate/acetonitrile(30/70, v/v%)가 분리도를 크게 해주는 데에 가장 적합한 이동상 조성비에 해당함을 알 수 있었다. 또한 이동상 조성비를 변화시키면서 선택도(selectivity)를 증가시키더라도 선택도의 증가가 반드시 분리도의 증가를 가져오는 것은 아니라는 것을 알 수 있었다. Kromasil[®] 칼럼에서는 최적의 이동상 조성비가 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid[75/25/0.1, v/v%]로 나타났으며 β -CD BR[®] 칼럼에서보다 Kromasil[®] 칼럼에서 이동상 조성비의 변화가 분리도에 미치는 영향이 상대적으로 작았다. 최적의 분리도를 나타내는 조업조건은 이동상 유속이 1 ml/min일 경우와 주입부피는 5 μ l에서 가장 높은 분리도를 나타내었다.

감 사

본 연구는 과학기술부의 신화학공정 기술개발사업(98J02-03-01-A-01)에 의해 수행되었으며 Kromasil[®] 충전제를 기증해 주신 P. T. Jageland (Eka Chemicals, 스웨덴)와 연구수행에 있어 여러 가지 귀중한 조언을 해 주신 황우성씨(RMC Korea)에게 감사드립니다. 또한 키랄용 충전제를 제조하여 본 연구에 도움을 주신 서울대학교 응용화학부 현택환 교수님과 박사과정 김상욱님께도 감사드립니다.

사용기호

R_S : resolution
 t_R : retention time [min]
 t_0 : dead time [min]
 M_m : amount of solute in the mobile phase

M_s : amount of solute in the stationary phase
 α : separation factor
 w : bandwidth [min]
 k' : capacity factor
 N : number of theoretical plates

참고문헌

- Willie, L. H. and Terrence, E. R.: *Anal. Chem.*, **57**, 237(1985).
- Cho, O. S. and Kim, O. D.: "Research on the Development of High Efficiency Separation System," KIST annual report UCE1526-6343-6 (1999).
- Ravi, B. and Jürgen, M.: *Biomedical Chromatography*, **12**, 309(1998).
- Yoshio O., Ryo A., Kazuhiro H. and Koichi H.: *J. Liquid Chromatography*, **11**(9&10), 2147(1988).
- Tan, S. C., Jackson, S. H. D., Swift, C. G. and Hutt, A. J.: *J. Chromatography B*, **53**, 701(1997).
- Wright, M. R., Sattari, S., Brocks, D. R. and Jamali, F.: *J. Chromatography Bimed. Appl.*, **259**, 121(1992).
- Armstrong, D. W.: *Anal. Chem.*, **59**, 84A(1987).
- Pirkle, W. H. and Pochapsky, T. C.: "Advances in Chromatography," J. C. Giddings, Ed., Marcel Dekker, New York, **27**, Chap 3(1987).
- Pirkle, W. H. and Finn, J.: in J. Morrison(Ed.), "Asymmetric Synthesis," Academic Press, New York, **1**, Chap 6(1983).
- Lochmüller, C. H. and Souter, R. W.: *J. Chromatography*, **283**, 113(1973).
- Pirkle, W. H. and Finn, J. M.: in J. D. Morrison(Ed.), "Asymmetric Synthesis," Academic Press, New York, **1**, 87(1983).
- Allenmark, S. J.: *Biochem. Biophys. Method*, **1**, 9(1984).
- Minoru T., Yoshihiro K., Mitsugu N., Yoshikazu M. and Toshiyuki S.: *J. Chromatography*, **299**, 341(1984).
- Lippmann, T., Hartenstein, H. and Sicker, D.: *Chromatographia*, **35**, 5/6, 302(1993).
- Song, L. and William Purdy, C.: *J. Chromatography*, **109**, 625(1992).
- Pirkle, W. H. and Pochapsky, T. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5627(1986).
- Pirkle, W. H. and Pochapsky, T. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5975(1987).
- Kim, T. J. and Lee, J. S.: "A Study on the Separation, Analysis or Interpretation of Valuable Material," KIST The third year last report(1992).
- Hyun, M. H.: "Preparation and Evaluation of a Chiral Stationary Phase Bearing Both-Acidic and -Basic Sites," Korea Science and Engineering Foundation, Project Number(863-0302-005-1)(1987).
- Lederer, K., Amtmann, L., Vijaykumar, S. and Billiani, J.: *J. Liq. Chromatography*, **13**, 1849(1990).
- Gallagher, W. and Woodward, C.: *Biopolymers*, **28**, 2001(1989).
- Gibbs, S., Chu, A., Lightfoot, E. and Root, T.: *J. Phys. Chem.*, **93**, 467 (1991).
- Al-Duri, B. and McKay, G.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **55**, 245(1992).
- Seidel-Morgenstern, A., Jacobson, S. C. and Guiochon, G.: *J. Chromatography*, **19**, 637(1993).