

## 키랄 HPLC를 이용한 라세미 케토프로펜의 광학분할

김소영\* · 이종기† · 서성섭\* · 최민호\* · 박태진 · 박달근

한국과학기술연구원 청정기술연구센터

\*홍익대학교 화학공학과

(2001년 6월 18일 접수, 2001년 8월 11일 채택)

## Optical Separation of Racemic Ketoprofen by Chiral High-Performance Liquid Chromatography

So-Young Kim\*, Joong Kee Lee†, Sung-Sup Suh\*, Min-Ho Choi\*, Tae-Jin Park and Dalkeun Park

Clean Technology Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

\*Department of Chemical Engineering, Hongik University, Seoul 121-791, Korea

(Received 18 June 2001; accepted 11 August 2001)

### 요 약

케토프로펜은 비스테로이드 계통의 진통 및 소염제로서 류마티즘, 관절염 등을 위한 진통제나 해열제로 널리 사용되고 있다. 그러나 케토프로펜이 치료약으로 사용될 때 S-(+)-Ketoprofen이 주로 약리적 활성을 나타내고 R-(-)-Ketoprofen은 불활성이거나 오히려 부작용을 일으키는 문제점을 나타내고 있다. 본 연구에서는 케토프로펜 대장체(enantiomer)를 다양한 키랄 HPLC 칼럼을 이용하여 광학분할을 수행하면서 적합한 분리조건을 조사하였다. 고정상을 찾는 실험에서는  $\beta$ -CD( $\beta$ -cyclodextrin) BR<sup>®</sup>과 Kromasil<sup>®</sup> 칼럼을 이용하여 실험을 하였고, 이동상의 최적의 조성비를 찾는 실험도 수행하였다. 이 과정에서 라세미 Ketoprofen의 분리도는 사용된 키랄 고정상과 이동상의 조성비에 크게 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 따라서 고정상으로는 Kromasil<sup>®</sup> 칼럼을 선택하고 이동상의 유속, 주입부피 그리고 주입농도가 라세미 Ketoprofen의 분리에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과 주입부피가 증가함에 따라서 분리도는 감소하였으나 이동상 유속이 증가함에 따라서 주입부피의 증가가 분리도에 미치는 영향은 점차 감소하는 것을 알 수 있었다.

**Abstract** – Ketoprofen, a phenylpropionic acid derivative, is a non-steroidal anti-inflammatory drug(NSAID) that has analgesic, anti-inflammatory and antipyretic properties. Pharmacological activity has been attributed mainly to the S-(+)-enantiomer, while the R-(-)-enantiomer is either inactive or has side effect. The optical separation of Ketoprofen enantiomers was carried out by various chiral HPLC(chiral high-performance liquid chromatography) columns and most compatible separation conditions of Ketoprofen enantiomers were investigated. The resolution and enantio selectivity of Ketoprofen were found to be strongly influenced by the employed chiral stationary phases(CSPs) and composition of eluents. The employed chiral stationary phases(CSPs) in this study were  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup> and Kromasil<sup>®</sup>. The optimum composition of eluent was obtained differently for stationary material phase. The effects of process variables such as flow rate, injection volume, and concentration of eluent on Ketoprofen enantiomers separation were investigated using Kromasil<sup>®</sup> columns. The resolution decreased with the increase of injection volume, however, the effect became insignificant at higher flow rate.

**Key words:** Ketoprofen, Enantiomer, Separation, HPLC, Chiral Stationary Phase

### 1. 서 론

생체는 본질적으로 비대칭이기 때문에 키랄환경으로 작용한다. 따라서 한 쌍의 광학 이성질체는 생체 내에서 서로 다른 물리적·화학적 성질을 나타내고 결국 다른 생리활성을 나타내게 된다. 한 쌍의 광학 이성질체로 존재하는 키랄 의약품에 있어서 두 광학 이성질체의 인체내

의 다른 의약적 활성은 아주 중요하다. 종종 한 쌍의 광학 이성질체 중 단지 하나의 광학 이성질체만이 의약적 활성을 나타내며 다른 광학 이성질체는 아무런 의약적 활성을 나타내지 않거나 혹은 각종 부작용의 원인이 되는 경우가 많이 보고되고 있다[1]. 이와 같이 많은 키랄 의약품들이 부작용 등의 문제점을 내포하고 있음에도 불구하고 대부분의 이성질체들이 혼합된 라세미 혼합물로 사용되고 있는 실정이다. 이는 의약품을 순수한 광학 이성질체만을 포함하는 제품으로 얻는 것이 어려울 뿐만 아니라 광학활성 의약품들의 광학순도를 정확하게 측정하기가 어려워기 때문으로 사료된다[2]. 그러나 라세미체 형태로 공급되는

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: leejk@kist.re.kr

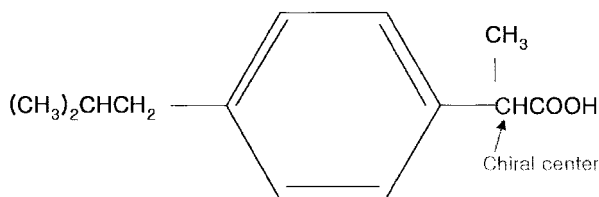


Fig. 1. Structure of Ketoprofen.

의약품들의 문제점들 때문에 미국의 식품 및 의약 관리국(FDA)에서는 순수한 광학이성질체를 의약품으로 시판하는 것을 원칙으로하고 부득이하게 라세미 혼합물을 의약품으로 판매를 할 경우 각 이성질체의 약리학적, 생리학적, 독물학적, 정확한 규명을 한 후 시판이 가능하게 하므로써 현재 라세미 혼합물로 판매되는 의약품들도 순수한 이성질체로 분리, 합성하여 공급하도록 유도하고 있다[3].

최근 키랄 의약품의 중요성이 부각됨에 따라 고부가 가치의 의약품을 고순도로 분리하는 기술의 개발이 의약 및 정밀 화학 생산공정에 커다란 기술적, 경제적 파급효과를 가져오리라 예상되고 있다[4]. 서로 거울상인 두 개의 광학 이성질체를 분리하거나 구별하는 방법은 어느 경우에도 적절한 키랄환경을 제공함으로써 두 개의 광학 이성질체가 키랄 환경과 작용하여 물리적·화학적 성질이 서로 다른 부분 입체 이성질 관계가 되게 하는 것이다[5]. 최근에 이르러 화학, 약학, 의학, 생물학 등 입체화학에 관련된 분야의 연구자들 및 광학적으로 순수한 키랄 의약품을 제조하고자 하는 제약학 등의 분야에서 큰 관심의 대상이 되고 있는 방법은 액체 크로마토그래피(LC)용 혹은 고정상 액체 크로마토그래피(HPLC)용 키랄고정상을 이용하여 라세미 화합물을 광학분할하는 방법이다[6-8]. 이 방법은 고정상 액체 크로마토그래피(HPLC)용 칼럼에 채워진 고정상을 비대칭으로 만들어 서로 거울상인 한 쌍의 광학 이성질체가 칼럼을 통과함에 따라 키랄환경으로 작용하는 비대칭 고정상과 서로 다른 상호작용을 하게 함으로써 두 광학 이성질체를 분리하는 방법이다[9]. 여기서 얻은 크로마토그램의 두 peak를 분리수거하여 두 개의 순수한 광학 이성질체를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 두 peak의 면적 혹은 크기의 비로부터 광학활성 물질의 광학순도를 측정할 수 있고 두 광학 이성질체와 키랄고정상 사이의 상호작용 메커니즘(키랄성인지 메커니즘)을 정확히 이해할 경우 분리순서로부터 광학 이성질체의 절대 배열을 동시에 결정할 수 있기 때문에 액체 크로마토그래피에 의한 키랄고정상법은 입체화학에 관련된 문제를 해결하는 데 이용될 수 있는 최상의 방법으로 고려되고 있다[10-11].

본 연구의 실험대상인 Ketoprofen(Fig. 1), [(R,S)-2-(3'-benzoylphenyl)propionic acid]는 비스테로이드 계열의 진통 및 소염제(NSAID)로서 현재 라세미 혼합물로서 이용되고 있다. 이 의약품은 류마티즘, 관절염 등의 진통제나 해열제로 여러 가지 용도의 치료약으로 널리 이용되고 있다. 그러나 Ketoprofen은 치료약으로 사용될 때에 S-(+)-Ketoprofen이 주로 약물학적 효과를 나타내고 R-(-)-Ketoprofen은 좋지 못한 부작용을 일으키는 문제점을 나타내고 있다[12-15].

본 연구에서 수행한 실험에서는 라세미 혼합물 상태인 Ketoprofen을 광학분할하기 위하여 키랄 분리용 고정상 물질을 가지고 이동상의 조성비, 이동상의 유량, 시료의 종류와 농도 등의 실험조건을 바꿔가면서 크로마토그램을 얻었으며 분리도에 영향을 미치는 인자들을 조절하면서 분리도가 향상될 수 있는 변수영역을 조사하는 것을 본 연구의 목표로 하였다.

## 2. 이론적 배경

크로마토그래피를 이용하여 서로 거울상의 관계에 있는 한 쌍의 광학 이성질체를 분리하기 위한 적절한 방법은 키랄환경을 제공하는 것이다.

크로마토그래피를 이용한 광학분할의 한 가지 방법은 서로 다른 쌍의 광학 이성질체를 키랄유도체 시약(chiral derivatizing agent: CDA)과 반응시켜 물리적, 화학적 성질이 서로 다른 한 쌍의 공유결합성 부분 입체 이성질체를 만들므로써 고정상에 의한 두 부분 입체 이성질체의 흡착의 차이를 이용하여 분리하는 방법이다. 이 방법은 한 쌍의 광학 이성질체를 직접 분리하지 않고 부분 입체 이성질체를 만들어 분리하므로 간접분리 방법(indirect resolution)이라 한다. 반면에 한 쌍의 광학 이성질체를 공유결합성 부분 입체 이성질체를 만들지 않고 한 쌍의 광학 이성질체와 키랄 선택자(chiral selector) 사이의 상호작용에 의하여 일시적인 부분 입체 이성질체(transient diastereomer)를 만들므로써 광학분할이 이루어지는 방법을 직접분리 방법(direct resolution)이라 한다. 직접분리 방법에는 여러 가지가 있으나 광학분할 시약 혹은 키랄 선택자를 크로마토그래피에 쓰일 수 있는 고정상에 적당한 방법으로 결합 시킴으로써 고정상 자체가 비대칭성을 갖게 되어 두 개의 광학 이성질체를 구별할 수 있는 키랄고정상(chiral stationary phase: CSP)을 이용한 광학분할 방법이 가장 이상적인 광학분할 방법으로 인식되고 있다. CSP 방법에서는 키랄 고정상과 두 광학 이성질체 사이에 상호작용이 일어나면서 일시적인 부분 입체 이성질체물 안정화에 의해서 광학분할이 이루어지므로 광학분할 메커니즘이 비교적 단순하다. 또한 소량의 키랄 물질을 칼럼의 고정지지체로 사용할 수 있는 물질에 고정시킴으로써 키랄고정상을 만들 수 있으며 키랄고정상으로 채워진 칼럼은 계속 사용할 수 있기 때문에 다량의 라세미체를 광학분할하거나 많은 라세미체 시료를 광학분할할 때는 경제적인 이점도 크다[1]. 그러므로 실험 대상물질인 Ketoprofen[(R,S)-2-(3'-benzoylphenyl)propionic acid]을 광학분할하기 위해서 키랄고정상법을 이용하여 실험을 하였다.

이러한 광학분할이 이루어질 때 충전제의 성격에 따른 키랄 칼럼의 종류, 이동상의 조성, 이동상 유속, 주입부피, 주입 시료 속의 농도와 같은 실험조건들에 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[5]. 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[16-20].

본 연구의 실험에서 얻어지는 결과의 분리 정도를 정량적으로 표현해 주기 위해서 분리도(resolution), 이론단수(the number of theoretical plates), 체류인자(retention factor)를 정의하여 사용하였다. 두 피크를 두 개의 뚜렷한 다른 피크로 분해할 수 있는 정도를 나타내기 위한 분리도 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 예측할 수 있다.

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

여기에서  $t_R$ 은 용질의 칼럼 안의 체류시간이다. 체류인자  $k'$ 는 이동상에 있는 분석시료량  $M_m$ 과 고정상에 있는 분석시료량  $M_s$ 의 비로 정의되며 아래의 식으로 표시할 수 있다.

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

위 식에서  $t_0$ 는 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 곱해주면 retention volume( $V_R$ )을 알 수 있다.

### 3. 실험

#### 3-1. 실험장치와 실험재료

본 실험에서 사용된 HPLC 칼럼은, 상업적으로 나와있는  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup>을 기반으로 한 칼럼(실리카젤에  $\beta$ -cyclodextrin을 결합시킨 칼럼, YMC co., Japan)을 구입하여 사용하였고, 충전제로 개발 중인 Kromasil<sup>®</sup> 충전제(Eka chem., Sweden)를 직접 칼럼에 팩킹하여 사용하였다. 팩킹은 내경이 4.6 mm, 길이가 250 mm인 stainless-steel 칼럼(Alltech)에 슬러리 팩킹하였다.

Kromasil<sup>®</sup>을 슬러리 상태로 만들어 주기 위한 용매로는 methanol(Chrom AR<sup>®</sup> HPLC)을 사용하였으며 슬러리로 분산하기 위해 sonicator를 사용하였다. 이때 충전 칼럼에 압력을 가하기 위한 용매로는 methanol/acetone [50/50, v/v%]를 사용하였다. Kromasil<sup>®</sup>을 충전하기 위한 절차는 methanol 20 ml에 Kromasil<sup>®</sup> 3.3 g을 넣고 sonicator를 사용하여 30초 정도 분산시킨 후 SSI reservoir에 넣는다. 그리고 air regulator를 이용하여 air pressure를 60 psi까지 증가시킨 후 가압 용매의 압력을 1분 사이에 7,000 psi까지 증가하여 Kromasil<sup>®</sup>을 칼럼에 충전하였다. 칼럼 충전의 확인은 SSI reservoir의 부피가 20 ml이므로 충전된 칼럼을 통해 배출되는 methanol의 부피가 SSI reservoir 부피의 두배 이상 흘러나왔을 때 가압용매의 압력을 줄여주고 팩킹 칼럼과 SSI reservoir를 분해하여 칼럼의 팩킹을 확인하였다.

실험에 사용된 이동상 용매는  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup> column의 경우 0.1 M ammonium acetate[ammonium acetate, 99.99%+water(Baker analyzed<sup>®</sup> HPLC reagent)]와 acetonitrile(Baker analyzed<sup>®</sup> HPLC solvent)을 사용하였고, Kromasil<sup>®</sup>에 사용된 이동상은 hexane(95% n-hexane), tert-butyl methyl ether(99.8%, HPLC grade, Aldrich Chem. Co.), acetic acid(Baker analyzed<sup>®</sup> HPLC reagent)를 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 시료인 Ketoprofen은 라세미 혼합물로 태평양제약에서 제공받은 것을 사용하고, 라세미 Ketoprofen의 S-enantiomer와 R-enantiomer를 구별하기 위하여 (S)-(+)-Ketoprofen (99%, Aldrich Chem.co)을 구입해서 사용하였다. 실험에서 사용한 실험 장치는 고압펌프(Young-Lin M930), injection system(syringe+sample loop), gradient mixer(Waters), UV spectrometer(Young-Lin M720), data acquisition(Young-Lin, Autochrom)으로 이루어져 있다. 유출되는 성분은 UV detector에서 검출한 뒤 데이터 모듈에 연결되어 모듈에서 PC로 데이터를 전달하여 peak의 면적과 높이, retention time 등을 얻을 수 있게 하였다. 팩킹 물질을 충전하기 위한 장치로는 slurry packer(Alltech model 1666)를 사용하였다.

#### 3-2. 실험방법

라세미 Ketoprofen의 분리 여부를 확인하기 위해서  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup> 칼럼에

서는 이동상으로서 0.1 M ammonium acetate와 acetonitrile의 혼합물을 부피비 10/90(v/v%)로 사용하였다. 슬러리 팩킹한 Kromasil<sup>®</sup> 칼럼을 사용하였을 때는 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid(60/40/0.1, v/v%)를 사용하였다.

실험은 상온에서 수행하였으며 칼럼은 실험을 시작하기 전 정상상태에 이를 때까지 충분한 시간 동안 이동상으로 씻어 주었다. 이동상의 유량을 조절하기 위해 HPLC 펌프를 사용하여 이동상의 흐름을 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0(ml)로 변화시키면서 실험을 하였다. 시료의 주입은 0.05 ml 주사기를 사용하였고, 샘플 루프는 5, 10, 20, 50( $\mu$ l)를 가지고 바뀌주면서 주입부피를 조절해 주었다. 유출되는 성분은 UV detector로 검출한 뒤 데이터 모듈을 통하여 PC에서 데이터를 얻는 프로그램을 이용해서 각 성분의 크로마토그램을 얻었다.

초기의 실험에서  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup> 칼럼의 경우에는 Ketoprofen을 methanol에 용해하여 100 ppm으로 실험을 행하였다. 이동상은 0.1 M ammonium acetate와 acetonitrile의 조성비를 10/90, 30/70(v/v%)로 변화를 주면서 실험하였고, 유속은 1.0, 1.5, 2.0, 2.5(ml)로 변화시키면서 흐르게 하였다.

Kromasil<sup>®</sup>을 충전한 칼럼에서 시료로는 라세미 Ketoprofen을 hexane에 용해하여 주입농도 100 ppm으로 만든 것을 사용하였다. 이동상에서는 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid의 조성비를 100/0/0.1, 70/30/0.1, 60/40/0.1, 50/50/0.1, 40/60/0.1, 0/100/0.1(v/v%)로 변화를 주면서 적절한 이동상의 조성비를 찾는 실험을 하였다. 주입시료는 라세미 Ketoprofen을 hexane속에 100 ppm으로 용해시켜 사용하였는데 이는 hexane 속에 Ketoprofen 100 ppm이상은 용해되지 않았기 때문이다. 그래서 이동상에 이용되는 용매, tert-butyl methyl ether와 acetic acid도 주입시료의 용매로 사용해 보았다. 이동상 유속은 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0(ml/min)로 변화시키면서 실험하였고, 주입부피는 5, 10, 20, 50( $\mu$ l)로 변화를 주면서 각각의 경우 실험조건에 따른 크로마토그램의 변화를 관찰하였다. 또한 50, 60, 70, 80, 90, 100(ppm)으로 분석시료의 농도를 증가시키면서 농도에 따른 변화를 관찰하였다. 실험에 사용된 각각의 칼럼에서 UV detector의 absorbance값과 이동상의 유속 등 실험조건을 Table 1에 나타내었다. 라세미 Ketoprofen의 S-enantiomer와 R-enantiomer로 분리된 크로마토그램으로부터 분리된 두 개의 피크의 물질을 판별하기 위해서 순수한 S-enantiomer를 주입함으로써 두 개의 피크 중 각각의 광학 이성질체를 확인하였다.

### 4. 결과 및 고찰

라세미 Ketoprofen을 분리하기 위한 고정상을 선택하기 위해서  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup>과 Kromasil<sup>®</sup> 2가지 칼럼을 가지고 실험을 한 후 비교해 보았다. 각각의 칼럼에서 이동상의 유속을 1 ml/min으로 흘려보내고 주입 부피도 20  $\mu$ l로 고정시킨 후 실험을 수행하여 크로마토그램을 얻었다. Fig. 2

Table 1. Summary of experimental conditions

$\beta$ -CD BR <sup>®</sup> column	Bonded-phase	$\beta$ -cyclodextrine grafted silicagel
	Particle size	10 $\mu$ m
	Column void fraction( $\epsilon$ )	0.73
	Pore size	120 Å
	Detection	UV at 254 nm
Kromasil <sup>®</sup> column [slurry packing]	Bonded-phase	O,O'-bis(4-tert-butylbenzoyl)-N,N'-diallyl-L-tartar diamide
	Packed density	0.66 g/ml
	Carbon content	15%
	Particle size	10 $\mu$ m
	Column void fraction( $\epsilon$ )	0.70
	Pore size	100 Å
	Detection	UV at 260 nm

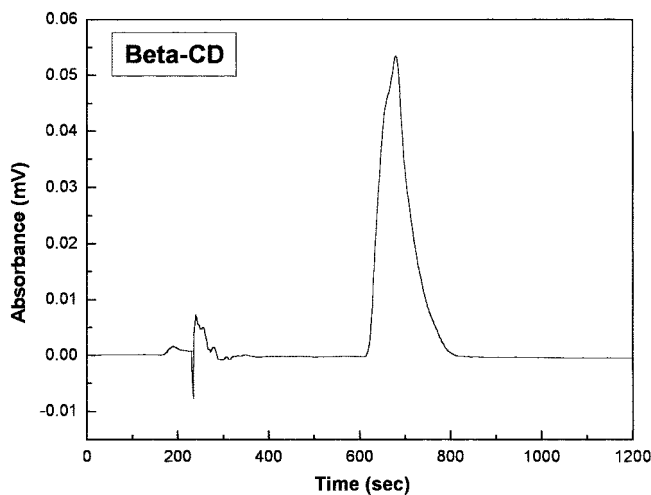


Fig. 2. Elution profile of racemic Ketoprofen from  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup>. Injection concentration of 100 ppm in hexane, injection volume of 20  $\mu$ l.

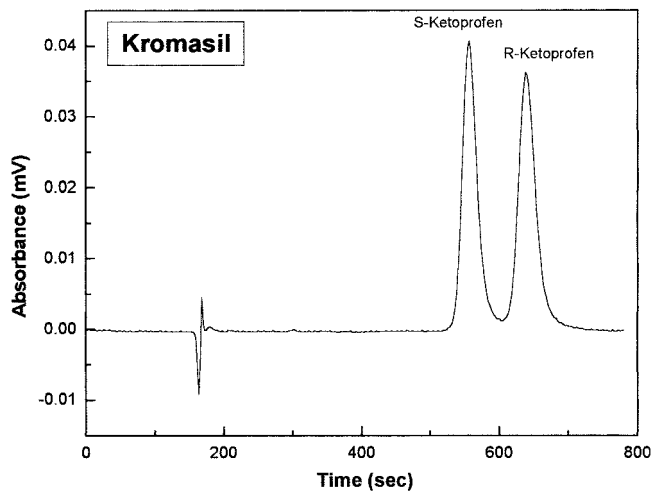


Fig. 3. Elution profile of racemic Ketoprofen from Kromasil<sup>®</sup>. Injection concentration of 100 ppm in hexane, injection volume of 20  $\mu$ l.

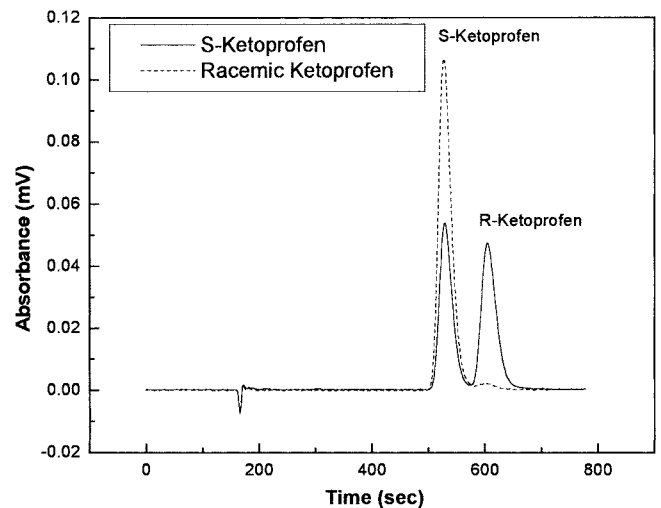


Fig. 4. Comparison of elution profile of pure S-Ketoprofen and Racemic Ketoprofen. Injection concentration of 100 ppm in hexane, injection volume of 20  $\mu$ l.

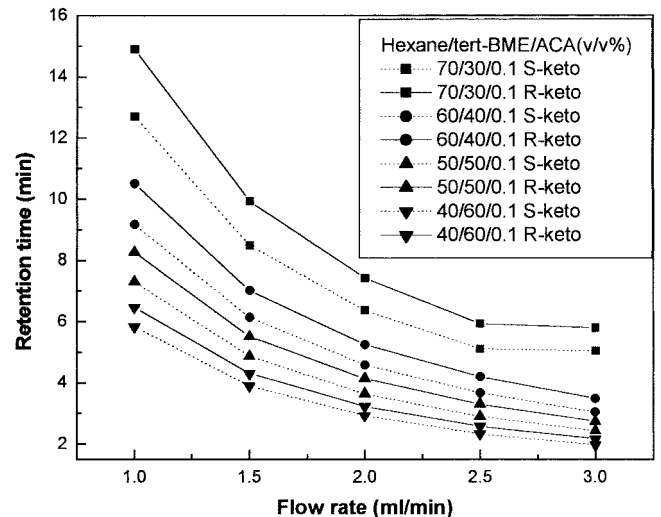


Fig 5. Effect of mobile phase composition and flow rate on retention time of S-Ketoprofen, R-Ketoprofen. Injection concentration of 100 ppm in hexane, injection volume of 10  $\mu$ l.

를 보면  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup> 칼럼은 분석시료의 칼럼 내 체류시간이 10분 정도로 나타났다. 그러나 실험의 목적인 라세미 Ketoprofen을 두 개의 광학 이성질체로 분리하는데 있어 두 개의 피크가 나타나야 하는데 그러지 못하고 단일 피크만 나타났으므로 라세미 Ketoprofen의 분리에 적합하지 못함을 알 수 있었다. 반면에 Fig. 3의 Kromasil<sup>®</sup>을 이용한 라세미 Ketoprofen 분리의 크로마토그램을 보면  $\beta$ -CD BR<sup>®</sup> 칼럼에 비해 체류시간이 2분정도 더 빨랐으며, 두 피크가 확실하게 분리되므로 라세미 Ketoprofen을 두 개의 광학이성질체로 분리가 가능함을 확인할 수 있었다.

Kromasil<sup>®</sup>을 고정상으로 선택해서 라세미 Ketoprofen을 분리한 크로마토그램에서 두 개의 피크 중 라세미 Ketoprofen의 S-enantiomer와 R-enantiomer를 구분하기 위해서 Kromasil<sup>®</sup> 칼럼에서 시료의 주입농도는 100 ppm, 주입부피는 20  $\mu$ l로 하고 이동상의 유속은 1 ml/min으로 흘러 보내면서 순수한 S-ketoprofen을 가지고 실험을 하여 비교한 후 S-enantiomer와 R-enantiomer를 구별한 것을 Fig. 4에 나타내었다. 이로써 Kromasil<sup>®</sup>이 키랄 고정상으로 선정될 경우에 HPLC에서 분리될 수 있음을 보여주었다. 따라서 라세미 Ketoprofen의 분리가 가능한 Kromasil<sup>®</sup> 칼럼에 대해서 실험조건의 변화에 따른 분리도의 변화를 살펴보았다.

고정상을 Kromasil<sup>®</sup> 칼럼으로 사용할 때 이동상은 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid를 사용했는데 이때 이동상의 조성비가 분리도에

미치는 영향을 구체적으로 파악하기 위해서 시료의 주입농도는 100 ppm, 주입부피는 10  $\mu$ l, 이동상의 유속은 1.0-5.0 ml/min까지 변화를 주면서 이동상 내의 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid의 조성비를 100/0/0.1, 70/30/0.1, 60/40/0.1, 50/50/0.1, 40/60/0.1, 0/100/0.1(v/v%)로 변화를 주면서 실험해 보았다. 그 결과 Fig. 5와 6을 비교해 보면 이동상 속의 hexane의 양이 많으면 분리도가 증가하고 retention time은 길어졌다. 반면에 tert-butyl methyl ether의 양이 많아지면 분리도가 감소하고 retention time이 짧아지는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 7은 조성성에 따른 retention factor와 유량의 그래프이다. 여기서는 hexane의 양이 증가할수록 retention factor가 커졌으며, 유량에 따른 영향은 거의 없었다. Fig. 8의 이동상 조성에 따른 라세미 Ketoprofen의 크로마토그램을 보면 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid의 조성비가 100/0/0.1(v/v%)일 때는 라세미 Ketoprofen이 분리가 되지 않고, 70/30/0.1(v/v%)일 때는 두 물질로 분리가 잘 되지만 retention time이 너무 길어진다. 그리고 이동상의 조성비가 50/50/0.1, 40/60/0.1, 0/100/0.1(v/v%)일 때는 라세미 Ketoprofen의 분리가 완전히 일어나지 않는다. 일반적으로 분리도가 1.5이상일 때 두 개

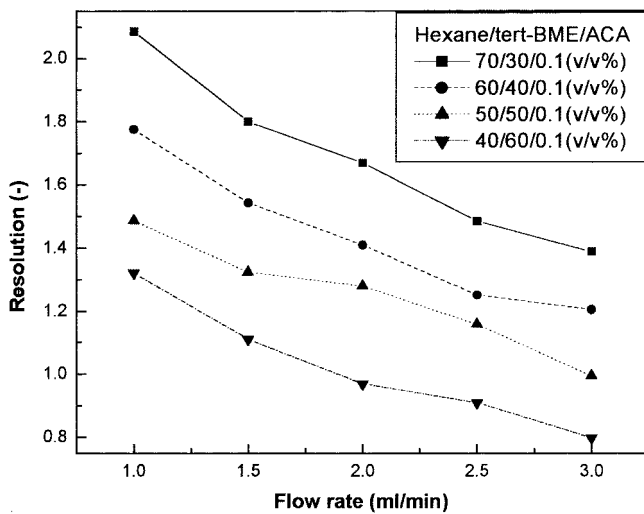


Fig. 6. Effects of mobile phase composition and flow rate on resolution. Injection concentration of 100 ppm in hexane, injection volume of 10  $\mu$ l.

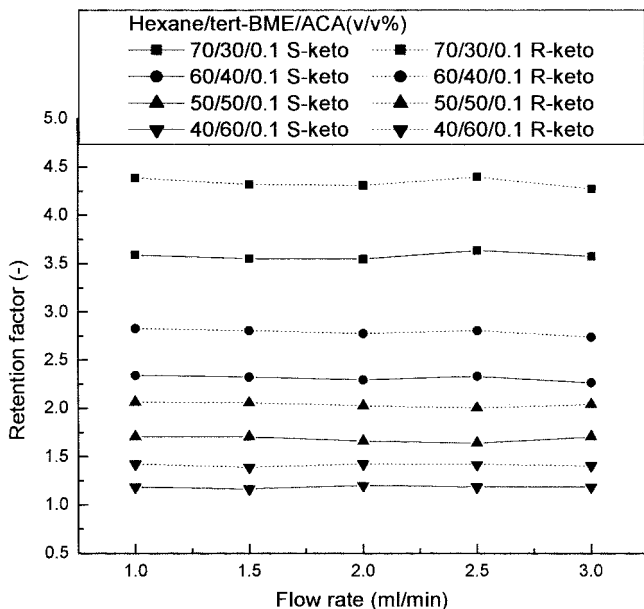


Fig. 7. Effects of mobile phase composition and flow rate on retention factor. Injection concentration of 100 ppm in hexane, injection volume of 10  $\mu$ l.

의 피크가 중첩되지 않는 분리가 이루어진다는 것을 고려하여 분리도가 1.5 이상이 됨으로써 피크의 분리는 확실히 구분되어진다고 볼 수 있다. 또한 retention factor인  $k'$  값을 비교해 볼 때  $k'$  값이 작을 때는 시료가 칼럼에 잠깐 머물러 있어서 분리도가 좋지 않고,  $k'$  값이 큰 경우에는 분리도가 증가하지만 retention time이 길어져서 peak가 넓어지게 되므로 최적의  $k'$ 의 범위는 1.5에서 4이다. 이러한 실험결과로부터 분리도와 retention factor를 모두 고려할 때 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid의 조성비가 60/40/0.1(v/v/v)일 때 두 물질이 완전히 분리되면서 retention time도 가장 적절함을 알 수 있었다.

Fig. 9는 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid의 조성비가 60/40/0.1(v/v/v)이고, Kromasil® 칼럼을 이용해서 S-ketoprofen과 R-ketoprofen의 칼럼 효율의 척도를 알아보기 위해서 유량에 따른 이론단수를 나타내었다. 유량이 증가함에 따라 이론단수는 감소하였으나 S-ketoprofen

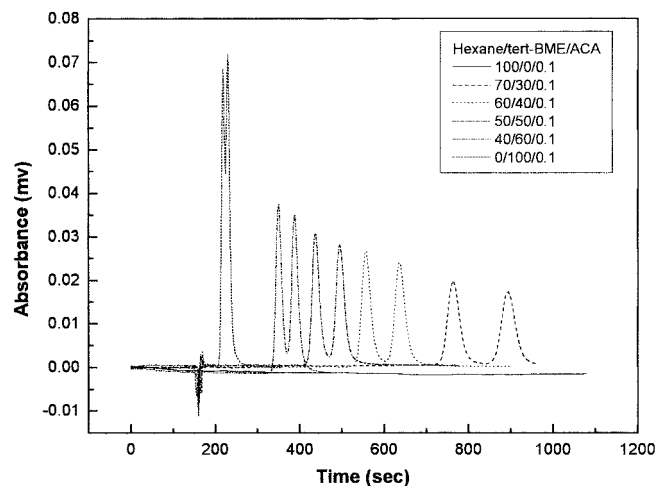


Fig. 8. Chromatogram of S-Ketoprofen and R-Ketoprofen from Kromasil® column at various mobile phase compositions.

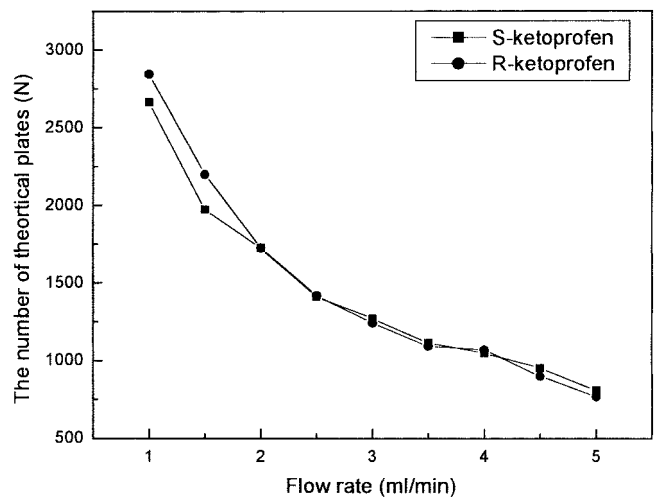


Fig. 9. Effect of flow rate on the number of theoretical plates of S-Ketoprofen, R-Ketoprofen. Injection concentration of 100 ppm in hexane, injection volume of 10  $\mu$ l.

과 R-ketoprofen의 Kromasil® 칼럼의 효율은 거의 차이가 없었다.

Kromasil® 칼럼을 사용하여 라세미 Ketoprofen의 주입농도는 100 ppm으로 고정시키고 주입부피를 달리하여 이동상 유속의 증가에 따른 분리도의 변화를 Fig. 10에 나타내었다. Fig. 10에서 보면 주입부피를 다르게 하였을 경우에 이동상 유속이 증가할수록 분리도는 감소한다는 것을 알 수 있다. 특히 유속이 느린 경우에 주입부피의 변화에 따라서 분리도의 영향이 더 크다는 것을 알 수 있었다. 그러나 이동상 유속이 3 ml/min 이상으로 운전할 때 주입부피 변화가 분리도에 미치는 영향이 다소 작아지는 것을 알 수 있다.

이번엔 주입부피는 10  $\mu$ l로 고정시키고 hexane내의 분석시료의 농도를 100 ppm, 90 ppm, 80 ppm, 70 ppm, 60 ppm, 50 ppm으로 변화를 주면서 주입농도가 라세미 Ketoprofen 분리에 미치는 영향을 실험해보았다. 그 결과 분석시료의 농도 차이가 너무 작으므로 분리도에 커다란 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다. 그래서 분석시료의 주입농도를 높여 봤으나 분석시료의 solvent로 사용하였던 hexane내에는 Ketoprofen이 100 ppm이상 잘 용해되지 않았다. 그래서 이동상으로 사용되고 있는 물질을 가지고 분석시료의 solvent로 사용하여 실험을 해보았다. 그 결과 acetic acid의 경우에는 Ketoprofen이 아주 잘 용해되었지만 Ketoprofen

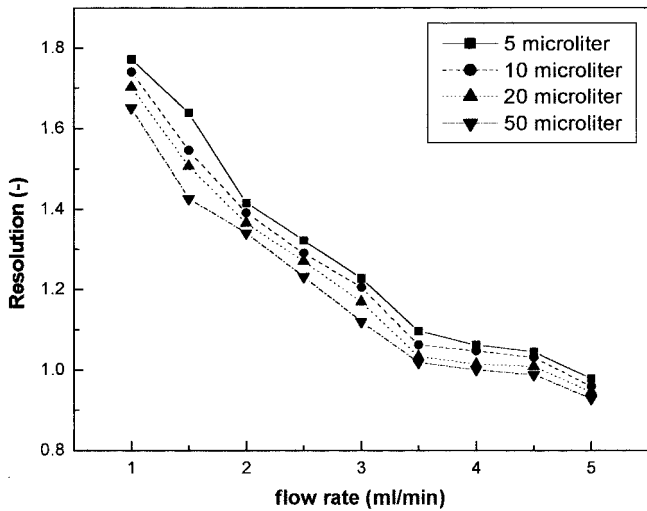


Fig. 10. Effect of the eluent flow rate on the resolution of Ketoprofen for Kromasil® column. Injection concentration of 100 ppm in hexane.

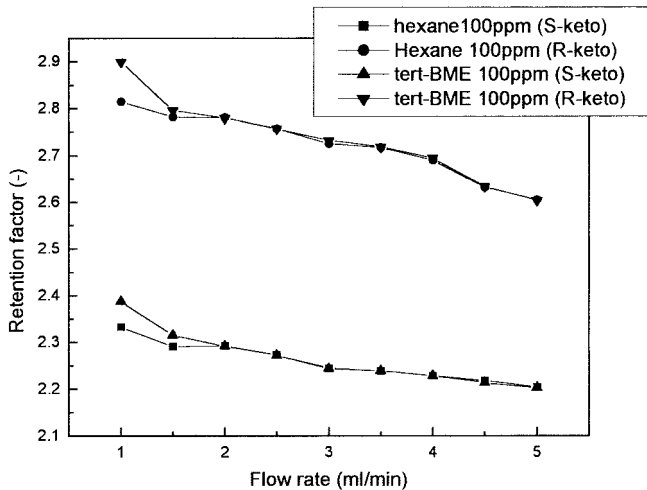


Fig. 11. Effect of feed solvent on retention time of S-Ketoprofen, R-Ketoprofen. Injection volume of 10 µl.

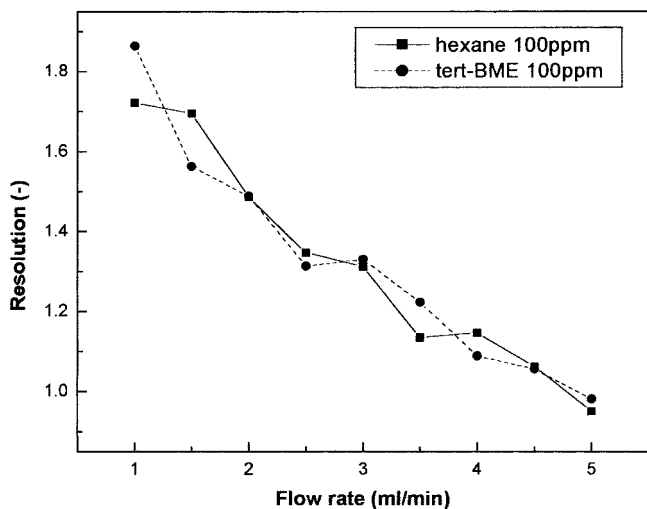


Fig. 12. Effect of feed solvent on resolution. Injection volume of 10 µl.

을 분리할 수 없었으므로 분석시료의 solvent로는 적합하지 못하였다. Fig. 11과 12에서 볼 수 있듯이 hexane과 tert-butyl methyl ether의

경우에는 라세미 Ketoprofen을 분리하는데 있어 분리도 및 retention factor는 비슷하였다. 그러나 tert-butyl methyl ether가 라세미 Ketoprofen을 아주 잘 용해하므로 hexane 보다는 tert-butyl methyl ether가 분석시료의 solvent로 더 적합하다는 것을 알 수 있었다.

## 5. 결 론

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 단일 광학 이성질체로 분리하는 기술이 학문적인 관심과 더불어 실용을 위한 기술로서 발전해 오고 있다. 본 연구에서는 고부가가치를 갖고 있는 거울상 이성질체 의약품인 라세미 Ketoprofen을 키랄 고정상을 이용하여 단일 거울 이성질체로 광학분리하기 위한 실험을 수행하였다. 크로마토그래피 기술을 개발하기 위한 기초연구가 되도록 하기 위하여 적절한 키랄 고정상을 찾으려 하며 그에 적합한 실험 조건을 규명한 실험을 수행하였다.

최근에 HPLC 사용을 위한 키랄 고정상 칼럼들이 상업화되면서 다양한 칼럼이 보고되면서 외국의 상업용 칼럼과 국내에서 개발중인 키랄 물질을 슬러리 팩킹 작업을 통해 제작한 칼럼들을 사용하여 실험한 결과 라세미 Ketoprofen의 분리를 가능하게 하는 고정상 물질로서 Kromasil®이 적합하다는 것을 알 수 있었다. 고정상을 Kromasil® 칼럼으로 선택한 후 고성능 액체 크로마토그래피로 사용하여 주입부피와 이동상 유속의 변화에 따른 분리도의 변화를 살펴본 결과 주입부피가 증가함에 따라 분리도는 감소하는 경향을 보였으며 유속이 빨라지면 주입부피가 분리도에 주는 영향이 작아짐을 알 수 있었다. 따라서 원하는 특정 분리도를 얻을 수 있는 이동상 유속에서 원료의 주입량을 늘려가면서 생산성의 향상을 가져오리라 예측할 수 있다.

이동상의 조성비가 분리도에 미치는 영향을 조사한 결과 분리도가 커질 수 있는 실험조건들은 다음과 같이 나타났다. 이동상의 조성비가 분리도에 미치는 영향을 조사한 결과 hexane의 양이 증가하면 분리도가 증가하고 분리시간이 길어짐을 알 수 있었고, tert-butyl methyl ether의 양이 증가하면 hexane의 결과와 반대로 분리도는 감소하고 분리시간은 짧아지는 것을 알 수 있었다. 따라서 분리도와 분리시간 그리고 최적의 체류인자의 범위가 1.5에서 4 사이임을 고려하여서 적절한 이동상의 조성비는 hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid(60/30/0.1,v/v%)임을 알 수 있었다. Kromasil® 칼럼에서 S-ketoprofen과 R-ketoprofen의 칼럼의 효율을 확인해 본 결과 이론단수 값의 차이가 거의 없음을 알 수 있었다. 분리도를 나타내는 조업 조건은 이동상 유속이 1 ml/min인 경우와 주입부피는 5 µl에서 가장 높은 분리도를 나타내었다. 분석시료의 용매로는 tert-butyl methyl ether가 적절한 물질로 판명되었으나 최종 상업화를 할 때 재회수나 인체 유해도, 기술적 용이, 가격 등을 고려하여 추가의 연구가 필요할 것이다.

## 사용기호

- $R_S$  : resolution
- $t_R$  : retention time [min]
- $t_O$  : dead time [min]
- $M_m$  : amount of solute in the mobile phase
- $M_S$  : amount of solute in the stationary phase
- $w$  : bandwidth [min]
- $\kappa'$  : retention factor
- $N$  : the number of theoretical plates

## 참고문헌

1. 현명호: "LC에 의한 광학 이성질체의 분리", 민음사, Seoul, Chap. 2 (1996).

2. Ravi, B. and Jürgen, M.: *Biomedical Chromatography*, **12**, 309(1998).
3. Ahuja, S. Ed.: *Applications and Technology*, ACS(1997).
4. Cho, O. S. and Kim, O. D.: "Research on the Development of High Efficiency Separation System," KIST annual report UCE 1526-6343-6(1999).
5. Song, T. H., Suh, S. S., Kim, Y. D., Lee, J. K. and Park, D. K.: *HWA-HAK KONGHAK*, **38**, 373(2000).
6. Armstrong, D. W.: *Anal. Chem.*, **59**, 84A(1987).
7. Pirkle, W. H and Pochapsky, T. C.: "Advances in Chromatography," J. C. Giddings, Ed., Marcel Dekker, New York, **27**, Chap. 3(1987).
8. Pirkle, W. H and Finn, J.: in J. Morrison(Ed.), "Asymmetric Synthesis," Academic Press, New York, **1**, Chap. 6(1983).
9. 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).
10. Pirkle, W. H. and Pochapsky, T. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5627(1986).
11. Pirkle, W. H. and Pochapsky, T. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5975(1987).
12. De Jalon, E. G., Josa, M., Campanero, M. A., Santoyo, S. and Ygartua, P.: *J. Chromatography A*, **143**, 870(2000).
13. Robert, A. C., Gilles, C., Anh, H. N. and Robert, T. F.: *J. Chromatography B*, **175**, 668(1995).
14. Grubb, N. G., David, W. R. and Stephen, D. H.: *J. Chromatography B*, **237**, 678(1996).
15. Wechter, W. J. and Clin, J.: *Pharmacol.*, **38**, 1S-2S(1998).
16. Lederer, K., Amtmann, L., Vijaykumar, S. and Billiani, J.: *J. Liq. Chromatography*, **13**, 1849(1990).
17. Gallagher, W. and Woodward, C.: *Biopolymers*, **28**, 2001(1989).
18. Gibbs, S., Chu, A., Lightfoot, E. and Root, T.: *J. Phys. Chem.*, **93**, 467(1991).
19. Al-Duri, B. and McKay, G.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **55**, 245(1992).
20. Seidel-Morgenstern, A. and Jacobson, S. C. and Guiochon, G.: *J. Chromatography*, **19**, 637(1993).