

키랄 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 이부프로펜의 분리

여미순 · 나영진 · 노경호
 초정밀분리기술센터, 인하대학교, 화학공학과

Separation of Ibuprofen by Chiral
 High Performance Liquid Chromatography

Mi Soon Yeo · Young Jin Ra · Kyung Ho Row
 Center for Advanced Bioseparation Technology, Dept. of Chem. Eng.,
 Inha University, Incheon 402-751, Korea

서론

최근 키랄 약품의 중요성이 부각됨에 따라 고부가가치의 의약품을 고순도로 분리하는 기술의 개발이 의약 및 정밀 화학 생산공정에 커다란 기술적, 경제적 파급효과를 가져오고 있다. 서로 거울상인 두 개의 광학 이성질체를 분리하거나 구별하는 방법은 어느 경우에도 적절한 키랄환경을 제공함으로써 두 개의 광학 이성질체가 키랄환경과 작용하여 물리적·화학적 성질이 서로 다른 부분 입체 이성질 관계가 되게 하는 것이다. 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) 혹은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)용 키랄 고정상을 이용하여 라세미 화합물을 광학분할하는 방법이다. 이 방법은 고성능 액체 크로마토그래피용 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. 여기서 얻은 크로마토그램의 두 피크를 분리수거하여 두 개의 순수한 광학 이성질체를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 두 피크의 면적 혹은 크기의 비로부터 광학활성 물질의 광학순도를 측정할 수 있고 두 광학 이성질체와 키랄고정상 사이의 상호작용 메커니즘을 정확히 이해할 경우 분리 순서로부터 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.

거울상 이성질체는 서로 다른 의약적 활성을 지니고 있음이 판명되었고, 생산되는 합성 의약품에서 거울상 이성질체 중의 어느 한쪽만이 의약적 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 사용되는 실정이다. 그러나 의약품 생산에 있어서는 원하는 성질의 순수한 물질만을 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-isobutyl phenyl) propionic acid]는 전형적인 비스테로이드 계통의 진통 및 소염제로서 류마티즘, 암 등의 진통제 외에 여러 가지 용도로 널리 사용되는 치료약이며 흔히 라세미 혼합물 상태로 사용되고 있다. 그러나 이부프로펜이 이러한 치료약으로 사용될 때에 S-enantiomer는 약물학적 효과를 갖고 있으나 R-enantiomer는 여러 가지 좋지 못한 부작용을 갖는다.

본 연구에서는 라세미 형태의 이부프로펜을 키랄 고정상으로 채워진 컬럼을 가지고 이동상의 조성비를 바꿔가면서 분리도에 영향을 미치는 인자들을 조절하면서 체류 메커니즘을 규명하고자 한다.

이론

분리도 R 은 임의의 두 물질간에 관계되는 것으로 아래 식으로 표시된다. 두 피크의 차이와 피크의 평균 폭으로도 정의된다. 체류시간과 피크 폭의 단위가 길이 또는 시간으로 표시되기 때문에 분리도는 무차원이 된다.

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(w_2 + w_1)/2} = \frac{2At}{w_2 + w_1} \quad (1)$$

여기에서 t_{R2} 는 S-성분, t_{R1} 는 R-성분의 체류시간이며, w_1 , w_2 는 각 성분 피크의 기준선에서의 폭이며 시간 단위로 표시한다. 칼럼의 효율을 알아보기 위해 기준선에서 측정된 피크의 폭 w 를 이용한 아래 식에 의해서 이론단수를 측정하였다.

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

체류인자(retention factor)는 다음과 같이 표시된다.

$$k = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3)$$

작은 k 값은 시료가 column에 잠깐 머물러 있어서 분리도가 좋지 않다. 큰 k 값은 분리도가 증가하지만 분석시간이 길어지고 peak가 넓어지게 된다. 최적 k 의 범위는 1.5에서 4이다.

실험

분석용 column은 4.6×250mm 크기의 Chiralcel OD-H(5 μ m silica based, Daicel)이다. HPLC는 Waters사의 616 pump(multisolvant delivery system), 486 UV-visible tunable wavelength absorbance, 280nm, Reodyne 주입기(20 μ l sample loop), 데이터 저장 시스템은 Chromate(ver. 3.0, Interface Eng.)를 사용하였다.

이동상은 n-Hexane, 2-propanol을 첨가제로는 trifluoroacetic acid와 acetic acid를 사용하였다. 유속은 1.0ml/min, injection volume은 5 μ l이고, UV detector의 wavelength는 254nm이며 실온에서 실험하였다.

본 실험에서 사용된 표준 시료 물질인 라세미 형태의 ibuprofen은 Sigma Co., standard 형태의 ibuprofen은 Aldrich. Co.에서 각각 구입하였고 methanol에 3mg/ml의 농도로 녹였다. 용해된 시료를 일정 용매 조성법을 사용하여 HPLC로 분석하였다.

결과 및 토론

이동상 조성의 변화에 따른 체류인자의 변화와 분리도의 변화를 알아보기 위해 각각의 조성을 바꿔 가면서 실험을 해보았다. 키랄 고정상이 실리카 지지체이므로 n-Hexane을 기본으로 하였고 첨가제로 trifluoroacetic acid와 acetic acid를, 극성 조절을 위해 2-propanol을 사용하였고, 각각의 조성을 바꿔가며 실험하였다.

각각의 실험에서 체류인자와 분리도를 계산하였으며 칼럼의 효율을 알아보기 위해 이론단수를 구하였다.

Figure 1은 ibuprofen의 화학적 구조식이다. Figure 2는 이동상을 n-Hexane / 2-propanol / trifluoroacetic acid를 100 : 2 : 0.1의 볼륨 조성비로 하여 실험한 크로마토그램이다. 크로마토그램에서 보면 두 피크가 완전히 분리가 되어있음을 알 수 있다. Table 1에서 살펴보면 두 피크 사이의 분리도는 2.731이다. 이동상 중에서 2-propanol의 함량이 증가할수록 체류시간이 짧아지면서 두 피크사이의 간격도 줄어드는 것을 알 수

있다.

Figure 3는 이동상을 n-Hexane / 2-propanol / trifluoroacetic acid를 100 : 1 : 0.11의 볼륨 조성비로 하여 실험한 크로마토그램이다. 크로마토그램에서 보는바와 같이 두 피크가 기준선 근처에서 분리되었으며, Table 1에서 살펴보면 두 피크 사이의 분리도는 0.902이다.

Table 1에는 각각의 조성에 따른 실험결과와 식 (1) - (3)에 의해 구해진 계산값들이 정리되어 있다. Table 1에서 보는 바와 같이 체류인자(k)값이 작아질수록 체류시간은 짧아지지만 분리도가 낮아지는 것을 알 수 있다.

Table 1. Number of theoretical plates and resolution of ibuprofen

조성	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	w_1 (min)	w_2 (min)	N_1	N_2	R	k_1	k_2
100/1/0.1	14.450	15.450	0.531	1.036	11862	3561	1.277	2.599	2.848
100/2/0.1	14.200	15.900	0.498	0.747	13014	7247	2.731	2.537	2.961
100/3/0.1	11.783	12.750	0.493	0.343	9137	22095	2.312	1.935	2.176
100/4/0.1	10.055	10.717	0.338	0.509	14160	7093	1.563	1.505	1.669
100/5/0.1	9.433	9.950	0.302	0.482	15642	6815	1.318	1.350	1.478
100/1/0.11	27.650	28.333	0.932	0.583	14095	37802	0.902	5.887	6.057
100/1/0.12	27.483	27.967	0.913	0.261	14489	183424	0.823	5.846	5.966
100/1/0.13	27.367	29.467	1.952	0.290	3145	165191	1.873	5.817	6.340
100/1/0.14	27.133	28.750	0.292	0.874	137964	17313	2.773	5.759	6.161
100/1/0.15	28.550	30.900	0.178	0.965	411154	16412	4.112	6.111	6.697
100/1/0.1*	21.883	25.500	0.948	0.838	8527	14819	4.051	4.451	5.352
100/1/0.11	21.817	25.300	1.122	0.882	6053	13156	3.476	4.434	5.302
100/1/0.12	21.633	25.200	0.924	0.926	8776	11844	3.856	4.389	5.277
100/1/0.13	21.600	25.017	1.064	0.803	6593	15541	3.660	4.380	5.231
100/1/0.14	21.467	24.883	0.944	0.892	8277	12443	3.722	4.347	5.198
100/1/0.15	21.400	24.683	1.073	0.790	6367	15628	3.526	4.331	5.148

조성은 n-Hexane/2-propanol/trifluoroacetic acid(* : acetic acid)의 볼륨 조성비이다.

참고문헌

1. S.Y. Kim, J.K. Lee, S.S. Suh, M.H. Choi, T.J. Park, D.K. Park, Hwahak Konghak, 39(6), 698-704 (2001).
2. Y.A. Jung and K.H. Row, J. Chrom. A, 828, 445-449 (1998).
3. K.H. Row, Excel for Chemical Engineering, pp118-136 (2001).

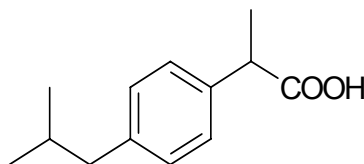


Fig. 1 Chemical structure of Ibuprofen

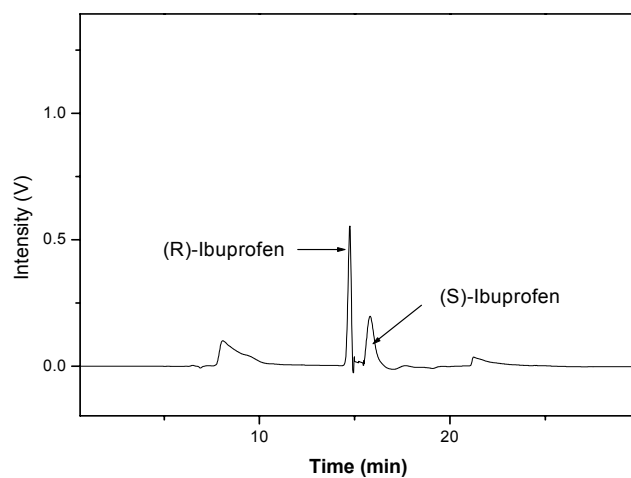


Fig. 2 Chromatogram of Ibuprofen free acid by chiral column in isocratic method (mobile phase : n-Hexane / 2-propanol / TFA (vol.%) = 100/2/0.1, flow rate=0.5ml/min, UV wavelength 210nm, injection volume 5ul, Dical Chiralcel OD-H column, 1000ppm)

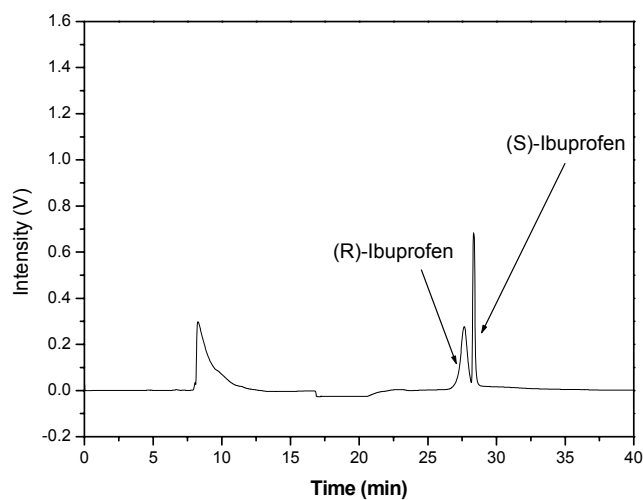


Fig. 3 Chromatogram of Ibuprofen free acid by chiral column in isocratic method (mobile phase : n-Hexane/2-propanol/TFA(vol.%) = 100/1/0.11, flow rate=0.5ml/min, UV wavelength 210nm, injection volume 5ul, Dical Chiralcel OD-H column, 1000ppm)