

세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼을 이용한 광학분할

玄明浩* · 趙允濟 · 柳在政 · 鄭敬圭[†] · 許貴鏞[‡]

부산대학교 자연과학대학 화학과

[†]부산대학교 사범대학 화학교육과

[‡]한국표준과학연구원

(1994. 11. 30 접수)

Separation of Enantiomers by Semi-micro HPLC Chiral Column

Myung Ho Hyun*, Yoon Jae Cho, Jae-Jeong Ryoo, Kyung Kyu Jyung[†], and Gwi Suk Heo[‡]

Department of Chemistry, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

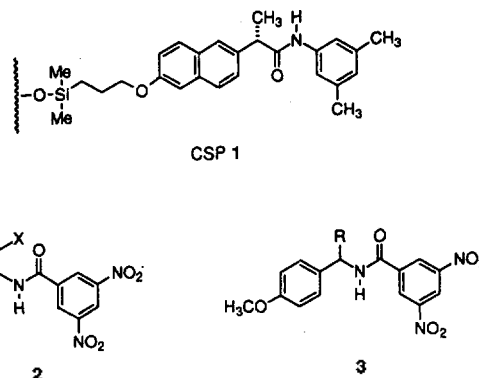
[†]Department of Chemistry Education, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

[‡]Korea Research Institute of Standards and Science, P.O. Box 3, Daedeog-Danji, Daejeon 305-606, Korea

(Received November 30, 1994)

인체는 본질적으로 키랄성이므로 라세미 키랄 의약품의 두 광학이성질체는 인체내에서 서로 다른 생리작용을 나타내는 경우가 많이 알려져 있다. 따라서 키랄 의약품을 구성하는 두 광학이성질체의 생리작용에 대한 연구는 키랄 의약품을 개발하는 과정에서 거의 필수적이며 이 과정에서 광학이성질체의 광학순도를 빠르고 정확하게 측정하는 기술이 필연적으로 요구되고 있다.¹ 광학이성질체의 광학순도를 측정하는 방법에는 여러가지가 있으나² HPLC 키랄컬럼을 이용한 광학분할 방법이 아마도 미량(< 0.1 mg)의 물질을 사용하여 가장 빠르고 정확하게 광학순도를 측정하는 기술로 인식되고 있다.³ HPLC 키랄 컬럼을 이용한 광학분할 방법의 이러한 유용성 때문에 다양한 종류의 라세미체의 광학분할에 적용할 수 있는 새로운 HPLC 키랄 컬럼을 개발하고자 하는 노력이 지난 10여년 동안 꾸준히 지속되었으며⁴ 본 연구실에서도 여러 종류의 HPLC 키랄 컬럼을 개발하여 보고한 바 있다.⁵

그동안 본 연구실에서 새로운 종류의 HPLC 키랄 컬럼을 개발하는 과정에서 흔히 접하게 되었던 어려운 점은 HPLC 컬럼에 충전하기에 충분한 양의 키랄 고정상(CSP)을 합성하기 위하여 키랄 선택자로 사용할 수 있는 광학활성 물질을 충분한 양 얻는



일이었다. 그러나 새로운 CSP를 개발할 때 필요한 광학활성 물질을 충분한 양 얻기가 쉽지 않다는 문제점은 사용하는 CSP의 양을 최소화함으로써 어느 정도 해결될 수 있으며 이것은 보통 크기의 HPLC 컬럼을 충전할 때 필요한 CSP 양의 10% 이하만을 사용하여 충전이 가능한 세미-미크로 HPLC 컬럼을 사용함으로써 가능할 것으로 판단되었다.

세미-미크로 HPLC 컬럼을 사용하여 혼합물을 분리할 때의 여러가지 장점은 이미 많이 연구되어 있다.⁶ 그러나 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼을 이용한 라세미 화합물의 광학분할에 대한 연구는 흔하지 않다. 본 연구에서는 광학활성인 상태로 구할

Table 1. Comparison of the resolution of racemic analytes 2 and 3 by the conventional and semi-micro HPLC chiral column packed with CSP 1

Analytes	R	X	Conventional column (2.0 mL/min)		Semi-micro column (0.15 mL/min)		Semi-micro column (0.5 mL/min)		Semi-micro column (2.0 mL/min)	
			k_1^a	α^b	k_1^a	α^b	k_1^a	α^b	k_1^a	α^b
2a	CH ₃	OCH ₂ CH ₃	12.49(S)	1.52	6.19(S)	1.55	6.58(S)	1.55	5.58(S)	1.52
b	(CH ₃) ₂ CH	OCH ₂ CH ₃	10.73(S)	1.97	5.08(S)	2.02	5.31(S)	2.02	4.57(S)	1.95
c	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	OCH ₃	13.51(S)	2.53	6.20(S)	2.55	6.73(S)	2.51	5.62(S)	2.43
d	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	OCH ₂ CH ₂	11.53(S)	2.54	5.30(S)	2.56	5.49(S)	2.53	4.67(S)	2.41
e	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	O(CH ₂) ₃ CH ₃	10.17(S)	2.47	4.43(S)	2.43	4.77(S)	2.45	4.04(S)	2.35
f	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	O(CH ₂) ₇ CH ₃	8.64(S)	2.50	3.66(S)	2.45	3.98(S)	2.41	3.38(S)	2.32
g	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	NH(CH ₂) ₂ CH ₃	2.18(S)	1.70	0.88(S)	1.76	0.99(S)	1.71		
h	Phenyl	OCH ₃	24.80(S)	1.15	11.57(S)	1.16	12.65(S)	1.16	10.61(S)	1.10
i	Phenyl	OCH ₂ CH ₃	21.57(S)	1.12	9.86(S)	1.13	9.79(S)	1.12	8.83	1.00
j	Phenyl	O(CH ₂) ₃ CH ₃	17.70(S)	1.08	7.92(S)	1.08	8.66(S)	1.06	7.29	1.00
k	Phenyl	O(CH ₂) ₇ CH ₃	15.08(S)	1.09	6.51(S)	1.06	7.18	1.00	5.88	1.00
l	Phenyl	NH(CH ₂) ₂ CH ₃	5.16(R)	1.25	2.30(R)	1.22	2.48(R)	1.21		
3a	CH ₃		39.53(S)	1.21			19.47(S)	1.25	16.32(S)	1.38
b	(CH ₂) ₂ CH ₃		35.45	1.37			19.46	1.44	16.26	1.42
c	(CH ₂) ₆ CH ₃		30.26	1.39			15.93	1.46	13.60	1.45

The HPLC system used in this study consists of a Waters model 510 pump, a Rheodyne 7125 injector with a 20 μ L sample loop, a Youngin model 710 absorbance detector with a 254 nm UV filter and a Youngin D520B computing integrator. All data have been collected using 20% 2-propanol in hexane as a mobile phase at the flow rate indicated in the parentheses beneath the chiral column used. Void volumes were measured using 1,3,5-tri-*tert*-butylbenzene.⁸ For blanks, data have not been collected. ^aCapacity factors of the first eluted enantiomers. Absolute configuration of the first eluted enantiomer is indicated in the parentheses. ^bSeparation factors.

수 있는 (S)-나프록센으로부터 합성한 새로운 종류의 CSP 1⁷이 충전된 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼(250 mm length \times 4.6 mm ID)과 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼(100 mm length \times 2.1 mm ID)에 의한 광학분할을 비교함으로써 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼에 의한 광학분할의 유용성을 제시하고자 한다.

이 연구에 사용된 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼과 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼은 동일한 조건에서 보통 사용되는 슬러리 충전 방법으로 CSP 1을 빈 컬럼에 충전하여 제조되었다. 이렇게 제조된 두 키랄 컬럼은 동일한 HPLC 시스템을 사용하여 동일한 조건에서 라세미 화합물 2와 3의 광학분할에 응용되었으며 그 결과를 Table 1에 요약하고 비교하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼을 이용하여 광학분할할 때의 유속은 정상 이동상을 사용하는 광학분할에서 유용한 유속인 2 mL/min을 유지하였으며 세미-미크로 HPLC 키랄

컬럼을 이용하여 광학분할할 때는 이 유속에서의 광학분할과 함께 다른 두 유속에서의 광학분할도 비교하였다. 두 키랄 컬럼상에서의 광학분할에 대한 크로마토그램의 대표적인 예로서 Fig. 1에 N-(3,5-디니트로벤조일)루이신 메틸 에스테르의 광학분할에 대한 크로마토그램을 제시하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼에서의 광학분할에 대한 분리인자(α)는 대부분의 경우 세 유속에서 모두 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼에서의 광학분할에 대한 분리인자와 비슷함을 알 수 있으며 분리순서에도 변화가 없음을 알 수 있다. 그러나 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼을 사용하여 광학분할할 때 유속을 2 mL/min으로 유지하면 Fig. 1에서 보는 바와 같이 두 광학이성질체의 컬럼내 머무름 시간이 너무 짧아 분석의 용도로는 적절치 않으며 또한 Table 1에서 보는 바와 같이 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼에서 조금 광학분할

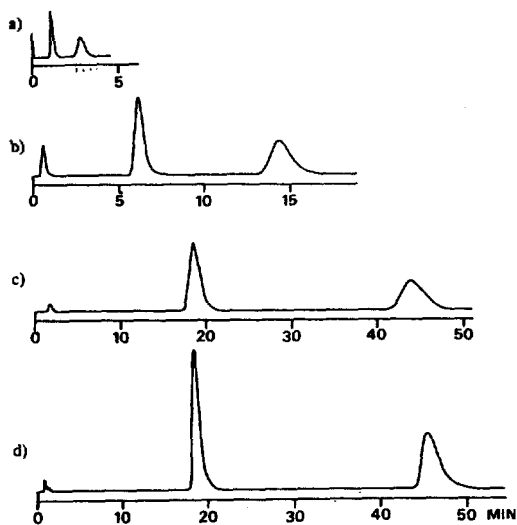


Fig. 1. Comparison of the chromatograms (a, b and c) for resolving N-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine methyl ester by the semi-micro HPLC chiral column at the flow rate of (a) 2.0 mL/min, (b) 0.5 mL/min and (c) 0.15 mL/min with the chromatogram (d) by the conventional HPLC chiral column at the flow rate of 2.0 mL/min. All chromatograms were obtained using 20% 2-propanol in hexane as a mobile phase. For other conditions, see the footnote of Table 1.

되는 라세미체들 중 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼에서는 광학분할이 안되는 것들이 있음(예를들면 2-k)을 알 수 있다. 아마도 분리인자가 작은 라세미체들을 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼에서 광학분할할 때 2 mL/min의 유속이 너무 커서 두 광학이성질체가 컬럼에서 너무 빨리 유출되므로 두 광학이성질체가 구분되지 않는 것으로 추측된다. 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼에서 광학분할할 때 유속을 0.15 mL/min으로 유지하면 Fig. 1에서 보는 바와 같이 두 광학이성질체의 머무름 시간을 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼에서의 머무름 시간과 비슷하게 조절할 수 있었다. 이 경우 늘어난 분석 시간에도 불구하고 Table 1에서 보는 바와 같이 광학분할의 결과에는 거의 변화가 없었다. 그러나 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼에서 광학분할할 때 유속을 0.5 mL/min으로 유지하면 광학분할에 거의 영향없이 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼에서 광학분할할 때의 분석시간과 비교하여 분석시간을 1/3 이하로 줄일 수 있었다. 아울러 이 경우에 광학분할하기 위하여 주입되는 시료의

양을 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼에 주입되는 시료의 양(보통 5 μ L)의 1/5로 조정하면 분석하기에 충분한 크로마토그램을 얻을 수 있었으며 이것은 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼을 이용한 광학분할이 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼을 이용한 광학분할과 비교하여 감도가 5배 증가한 것을 의미하고 있다. 이상의 결과로부터 CSP 1이 충전된 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼을 이용하여 라세미 화합물 2 혹은 3을 광학분할할 때의 적절한 유속은 0.5 mL/min임을 알 수 있다. 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼을 이용하여 라세미 화합물을 광학분할할 때 사용되는 유동상의 양은 유속에 상관없이 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼을 사용하여 광학분할할 때 필요한 유동상의 양과 비교하여 10% 미만이었다.

결론적으로 흔히 사용되는 보통 크기의 HPLC 키랄 컬럼 대신 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼을 광학분할에 이용함으로써 광학분할에는 별 영향을 주지 않으면서 유동상의 양을 90% 이상 절약할 수 있고 분석시간도 70% 이상 절약할 수 있음을 알았다. 미크로 HPLC 컬럼을 사용할 때는 더 많은 양의 유동상을 절약할 수 있으며 분석시간도 더 단축시킬 수 있는 장점이 있으나 세미-미크로 HPLC 컬럼은 위의 결과에서 보는 바와 같이 보통의 슬러리 충전기를 사용하여 충전할 수 있고 사용되는 HPLC 시스템에 어떤 변형도 필요없다는 사실에서 특히 유용하다고 할 수 있다. 특히 충전되는 CSP의 양을 90% 이상 절약할 수 있으므로 세미-미크로 HPLC 키랄 컬럼을 이용한 광학분할은 합성이 어렵거나 가격이 비싼, 광학적으로 순수한 광학이성질체를 사용하여 새로운 CSP를 개발하고 응용하는 과정에서 바람직한 것으로 판단된다.

이 연구는 유기반응연구센터(OCRC)의 지원과 교육부 기초과학연구소, 학술연구조성비(BSRI-94-3410)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- (a) Stinson, S. C. *Chemical & Engineering News*; Sep. 28, 1992; p 46. (b) Stinson, S. C. *Chemical & Engineering News*; Sep. 27, 1993; p 38. (c) Stinson, S. C. *Chemical & Engineering News*; Sep. 19,

- 1994; p 38.
2. Eliel, E. L.; Wilen, S. H.; Mander, L. N. *Stereochemistry of Organic Compounds*; Wiley: New York, 1994.
 3. Ahuja, S. In *Chiral Separations by Liquid Chromatography*; Ahuja, S., Ed.; ACS Symposium Series 471, American Chemical Society, Washington DC, 1991; Chap. 1, p 1.
 4. Allenmark, S. *Chromatographic Enantioseparation*; Ellis Hprwood: New York, 2nd Ed.; 1991.
 5. (a) Hyun, M. H.; Kim, M. H. *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*, 3229. (b) Hyun, M. H.; Jin, J. S.; Ryoo, J.-J.; Jyung, K. K. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **1994**, *15*, 497. (c) Hyun, M. H.; Hwang, S.-Y.; Ryoo, J.-J. *Chem. Lett.* **1994**, 1021. (d) Hyun, M. H.; Min, C.-S. *Chem. Lett.* **1994**, 1463.
 6. Ishii, D., Ed.; *Introduction to Microscale High-Performance Liquid Chromatography*; VCH: Weinheim, 1988.
 7. Preparation and application of CSP 1 will be reported elsewhere.
 8. Pirkle, W. H.; Welch, C. J. *J. Liq. Chromatogr.* **1991**, *14*, 1.