

## 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 기능성 헤테로 고리 화합물의 분리(II)

조윤진 · 이영철 · 이광필<sup>\*</sup> · 박금식  
경북대학교 사범대학 화학교육과  
(1998. 3. 12 접수)

### Separation of Functionalized Heterocyclic Compounds by High Performance Liquid Chromatography (II)

Yun Jin Cho, Young Cheol Lee, Kwang-Pill Lee<sup>\*</sup> and Keung-Shik Park  
Department of Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea  
(Received March 12, 1998)

**요 약:** 헤테로 고리 화합물인 isoquinoline과 외부치환체로서 COOCH<sub>3</sub>, CN 및 CH<sub>3</sub> 작용기들이 치환된 화합물들의 혼합물을 정상 및 역상법으로 분리 한 결과, 이동상의 종류에 따라 용리순서에 용매화 효과가 나타났다. 또한, 헤테로 고리 화합물 내부의 방향족성이 없는 2-methylindoline과 방향족성이 있는 2-methylindole, 그리고 헤테로 원자가 질소와 산소인 benzoxazole과 질소와 황인 benzothiazole의 머무름거동은 정상 액체 크로마토그래피의 경우 시료 분자와 충전제의 흡착 표면과의 흡착력으로 설명할 수 있었고, 역상 액체 크로마토그래피의 경우는 시료와 정지상과의 소수성 상호작용 등으로 설명할 수 있었다.

**Abstract:** Normal phase or reversed phase liquid chromatographic separation of isoquinoline of heterocyclic compounds and structural isomers of external substituents, COOCH<sub>3</sub>, CN and CH<sub>3</sub> has been carried out by using several different columns and various mobile phases. From this results, the order of elution of heterocyclic compounds appears to depend on the solvent effect with kinds of mobile phases. Retention mechanism of normal phase system for 2-methylindoline, 2-methylindole, benzoxazole and benzothiazole was also studied depending on adsorption strength between solute and stationary phase of column. However, retention factors of reversed phase system were found on hydrophobic interaction with solvophobic effect.

**Key words:** mobile phases, heterocyclic compound, reversed phase, hydrophobic interaction

### 1. 서 론

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)의 분리방법이 발전함에 따라 종전에 분리하기 어려웠던 구조이성질체나 광학이성질체의 분리가 가능해졌고, 이 분야의 연구가 크게 발전되어 왔다. 그리고 작용기가 많은 기능성이 큰 화합물에 대한 분리분석과 그 메카니즘에 대한 연구가<sup>1</sup> 활발히 진행되고 있으며, 그 중에서도 생리활성이 큰 기능성 헤테로 고리 화합물에 대한 크로마토그래피적 분리와 분석에 대한 연구가 크게 요

구되어지고 있다. 특히, 천연물 및 합성 화합물중 생리활성을 가지는 물질은 대부분이 헤테로 고리 화합물로서<sup>2-4</sup> 생화학 및 의약품 등의 원료로 광범위하게 공급되어지고 있으며, 이들을 분리함에 있어서는, 높은 안정성으로 기울기 용리를 비교적 쉽게 수행할 수 있고 적용범위가 넓은 이점 때문에 silica, alumina, 또는 이들을 지지체로 하는 결합상 충전제 컬럼 등이 많이 이용되고 있다.<sup>5-6</sup>

선행 연구로서<sup>7</sup> 기능성 헤테로 고리화합물의 구조와 고성능 액체 크로마토그래피에서의 용리거동간의

상관관계, 정지상과 용리분자 사이의 상호작용으로 인한 머무름 현상 등을 조사하기 위해 헤테로 고리 구조이성질체들을 정상 혹은 역상 컬럼과 다접촉형 상호작용 정지상인 cyclodextrin 컬럼으로<sup>8-12</sup> 그 선택성을 조사했다.

본 연구에서는 정상 및 역상법으로 기능성 헤테로 고리 화합물에 대한 자세한 분리거동을 검토하기 위하여 헤테로 고리 화합물의 외부치환기의 종류에 따른 분리효과와 내부의 방향족성의 차이와 헤테로 원자의 종류에 따른 분리효과를 조사하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 기기장치

본 실험에서 사용한 고성능 액체 크로마토그래프(HPLC)의 구성은 Shimadzu LC-10AD HPLC 펌프와 Beckman 160의 UV 검출기, 그리고 Varian 4290 integrator를 연결하여 사용했으며, 시료 주입은 Beckman 210A injector를 이용했다. 또한 이동상의 소비를 최소화하기 위해 Altech 345 solvent recycler를 사용해 이동상을 순환시켜 실험했다. HPLC의 정상 또는 역상 컬럼은 Varian MicroPak NH<sub>2</sub>-5 (4.0×150 mm, 5 μm), Varian MicroPak CN-5 (4.0×150 mm, 5 μm), Varian MicroPak SI-5 (4.0×150 mm, 5 μm), Astec. Cyclobond I. BETA (4.6×250 mm, 5 μm), Shimadzu Shim-pack CLC-ODS (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하였다.

### 2.2. 시 약

본 연구에 사용한 헤테로 고리화합물은 모두 Aldrich chemical(St. Louis, Mo. USA)사의 특급시약으로 Fig. 1에 그 구조식을 나타내었다. 그리고 사용한 물은 1차 증류수를 ELGA (U.K.)사의 water purification system으로 탈 이온화시킨 것이며, 정상 HPLC의 용매인 n-hexane은 덕산시약사의 특급시약으로 정제 한 후 사용하였다. 그 밖에 사용된 유기 용매는 E. Merck(Germany)사의 LC grade로서 정제하지 않고 그대로 사용했다.

### 2.3. 헤테로 고리 화합물의 분리

각각의 헤테로 고리 화합물 시료를 1 mL의 아세톤에 녹인 다음, 이동상 용매로 묽혀  $1.0 \times 10^{-3}$  M되게

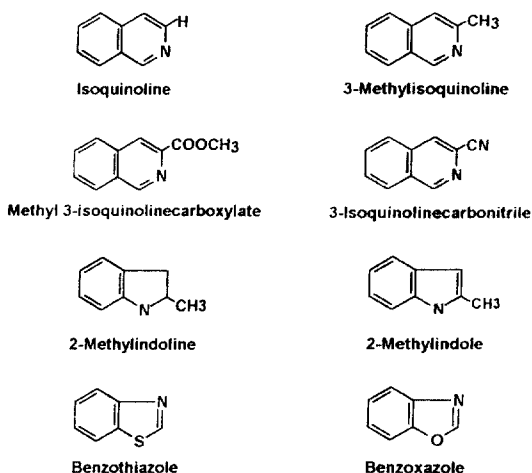


Fig. 1. Chemical structure of heterocyclic compound samples.

만들었다. 10 L씩 정확하게 취한 후 주입하고, 각 이성질체들은 UV(280 nm) 검출기로 검출하였다. 모든 이동상 용매는 사용하기 전에 탈기 시켰으며, 펌프의 flow rate는 1.0 mL/min으로 조정하였고, 그 밖의 다른 분리 조건은 선행 연구의 경우와 동일 하다.<sup>7</sup>

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 헤테로 고리 화합물의 외부 치환기 종류에 따른 효과

헤테로 고리 화합물의 외부 치환기 종류에 따른 분리거동을 조사하기 위하여 isoquinoline과 외부치환체로서 COOCH<sub>3</sub>, CN 및 CH<sub>3</sub> 작용기들이 치환된 헤테로 고리 화합물들의 혼합물을 역상컬럼으로 분리하였다. Fig. 2에 isoquinoline과 작용기들이 치환된 4가지 헤테로 고리 화합물들의 혼합물을 최적의 용매조건에서 작성한 크로마토그램을 나타냈다. 모두 바탕선 분리가 되었고, 일반적으로 역상 컬럼에서 용질의 극성이 약할수록 늦게 용리되는 경향이 있지만, 본 연구에서는 이동상의 종류에 따라 용리순서에 용매화 효과가 나타났다. 이동상으로 acetonitrile이나 tetrahydrofuran을 사용하였을 때에는 세 번째로 용리 된 CN기가 치환된 3-isoquinolinecarbonitrile이 methanol을 이동상으로 사용했을 경우에는 제일 먼저 용리됨을 보였다. 이는 열기도가 큰 methanol과 용질의 수소결합으로 인해 정지상과의 상호작용 보다는 이동상과의 회합

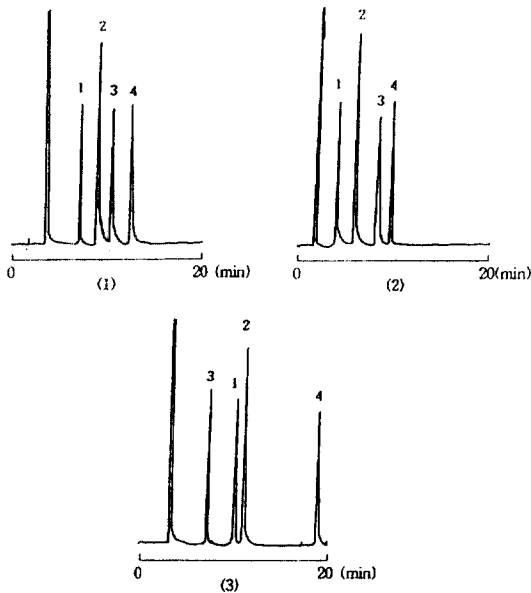


Fig. 2. Chromatograms of isoquinoline substituents on Shim-pack CLC-ODS column (4.6×250 mm, 5 μm). The mobile phase: (1) 60% water and 40% acetonitrile (2) 70% water and 30% tetrahydrofuran (3) 50% water and 50% methanol. Peak identification: ① -COOCH<sub>3</sub> ② -H ③ -CN ④ -CH<sub>3</sub>. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: 280 nm.

력이 커져 다른 치환체보다 먼저 용리되는 용매화 효과를 보인 것으로 생각된다. 그리고, CN기가 다른 작

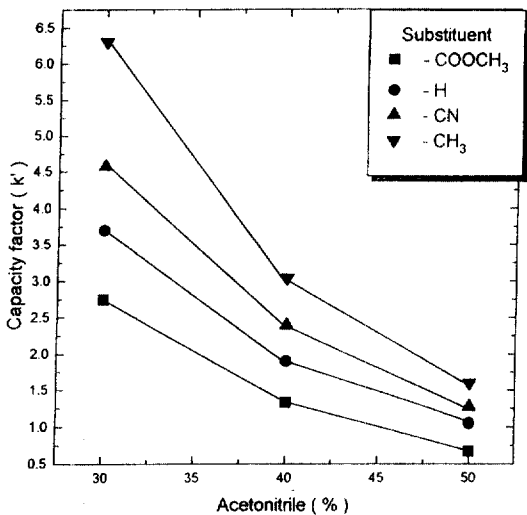


Fig. 3. Effect of organic solvent (MeCN) concentration on capacity factor of isoquinoline substituents. Column: Shim-pack CLC-ODS (4.6×250 mm, 5 μm). Mobile phase: water and acetonitrile. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: 280 nm.

용기들 보다 전기음성도가 크므로 methanol과 상호작용이 증가하므로 극성변화도 빠른 용리에 영향을 줄 것이다.

유기용매의 조성에 따른 영향을 조사하기 위하여 Fig. 3에 유기용매인 acetonitrile의 조성에 따른 용량인자(k')값을 도시하였다. 이 결과 acetonitrile의 부피비가 증가할수록 k'값이 감소하는 것은 이동상의 극성이 상대적으로 감소하기 때문이라고 생각된다.

### 3.2. 헤테로 고리 내부의 방향족성 및 헤테로 원자의 종류에 따른 효과

헤테로 고리 내부에 방향족성이 없는 2-methylindoline과 방향족성이 있는 2-methylindole을 정상과 역상 컬럼으로 분리하고, 얻어진 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었다. 결과에서 보는바와 같이, 바탕선 분리가 잘되었으며 2-methylindole이 2-methylindoline 보다 나중에 용리되는 것을 볼 수 있다. 이는 메틸기가 전자를 제공해 주면 2-methylindole의

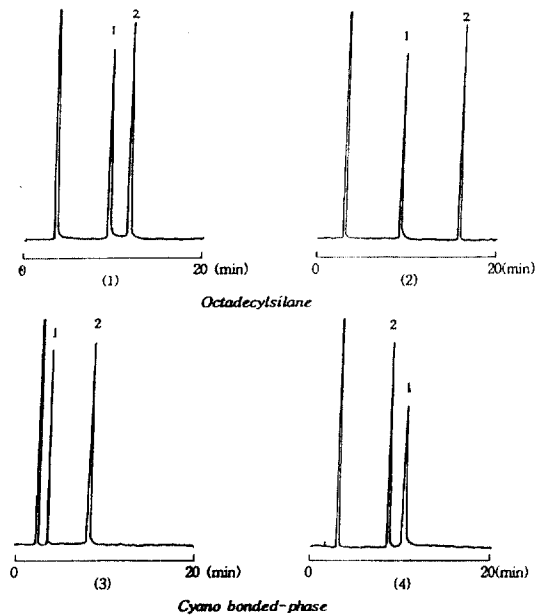


Fig. 4. Chromatograms of 2-methylindoline and 2-methylindole on reversed-phase column (ODS) and normal-phase column (cyano bonded-phase). The mobile phase: (1) 50% water and 50% acetonitrile (2) 50% water and 50% methanol (3) 98% n-hexane and 2% 2-propanol (4) 90% n-hexane and 10% dichloromethane Peak identification: ① 2-methylindoline ② 2-methylindole Flow rate: 1.0 mL/min Detection: 280 nm.

헤테로 고리 원자와 이중결합이 전자를 비편재화 시키므로 헤테로 고리 원자에게로 전자가 편재화되는 2-methylindoline 경우 보다 상대적으로 극성이 낮기 때문에 늦게 용리된다고 생각된다. 또한, 정상에서는 이동상의 조성에 따라 용리순서가 반전이 되는데 2-propanol을 이동상으로 사용할 때에는 2-methylindoline이 먼저 용리되고 dichloromethane을 사용할 때에는 2-methylindole이 먼저 용리되었다. 이는 dichloromethane의 경우, 정지상과 헤테로원자에 편재화된 2-methylindoline과의 상호작용이 2-methylindole보다 강하므로 2-methylindoline이 나중에 용리되는 결과를 얻었다. 그러나 염기도가 큰 양성자 주체인 2-propanol의 경우에는 헤테로 원자에 전자가 편재화된 2-methylindoline과 이동상간의 상호작용이 상대적으로 증가하므로 2-methylindoline이 먼저 용리된다고 생각된다.

헤테로 고리 원자가 질소와 산소인 benzoxazole과 질소와 황인 benzothiazole을 정상과 역상 컬럼으로 분리하고, 얻어진 크로마토그램을 Fig. 5에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 benzoxazole가 역상 및 정상컬럼에서 모두 먼저 용리되었다. 이것은 benzoxazole이 benzothiazole보다 상대적으로 극성이 크므로 역상 컬럼에서는 benzoxazole이 먼저 용리될 것으로 예상된다. 전기음성도는 산소, 질소, 황의 순서로 크기 때문에 극성은 전기음성도에 따라 예측할

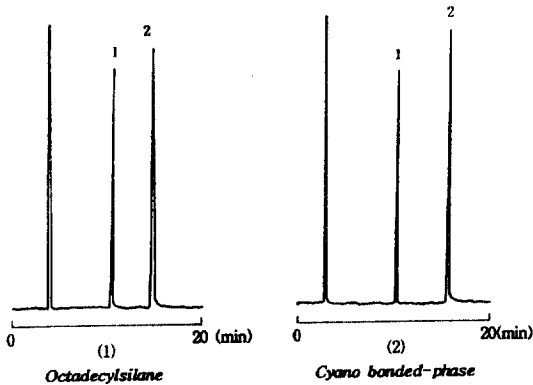


Fig. 5. Chromatograms of benzoxazole and benzothiazole on reversed-phase column (ODS) and normal-phase column (cyano bonded-phase). The mobile phase: (1) 70% water and 30% acetonitrile (2) 90% n-hexane and 10% dichloromethane. Peak identification: ① benzoxazole ② benzothiazole. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: 280 nm.

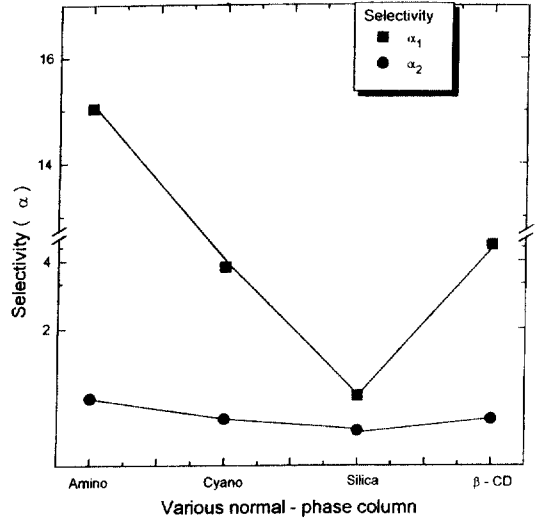


Fig. 6. Effect of various columns on selectivity of 2-methylindoline vs. 2-methylindole and benzoxazole vs. benzothiazole. Mobile phase: 98% n-hexane and 2% 2-propanol α<sub>1</sub>: Selectivity (α) of 2-methylindoline and 2-methylindole. α<sub>2</sub>: Selectivity (α) of benzoxazole and benzothiazole. Flow rate: 1.0 mL/min. Detection: 280 nm.

수 있다. 정상에서는 용리순서가 역상의 반대일 것으로 예상되었지만 실제로는 역상과 같은 결과가 얻어졌다. 이는 시료의 주된 흡착원자인 질소와 정지상간의 흡착세기에 따라 머무름이 결정되는 정상 시스템에서 헤테로 고리 원자가 질소 및 산소인 benzoxazole 보다 benzothiazole이 질소 쪽으로 전자의 비편재화가 크게 일어날 가능성이 있다. 이와 같은 관점에서 볼 때 정지상과의 상호작용이 더 크게 작용하기 때문에, 그 결과 benzothiazole이 늦게 용리된다고 생각한다.

헤테로 고리 화합물을 분리함에 있어서 용질과 정지상과의 상호작용을 조사하기 위하여 2-methylindoline과 2-methylindole 그리고 benzoxazole의 benzothiazole의 각각에 대한 컬럼의 선택성을 조사하여 Fig. 6에 도시하였다. 상대적으로 amino 결합상의 컬럼이 나머지 세가지의 컬럼보다 높은 선택성(α)을 갖는 것으로 나타났다. 이는 극성이 상대적으로 큰 시료의 분리에 있어서는 보다 극성이 큰 amino 결합상 컬럼이 분리에 효과적이라고 할 수 있다. 아울러 amino 기와 같이 시료와 정지상간의 작용기가 서로 유사한 경우 "like dissolves like"의 원리가 비교적 잘 적용된다고 할 수 있다.

#### 4. 결 론

헤테로 고리 화합물의 외부치환기의 종류에 따라, 일반적으로 역상컬럼에서 용질의 극성이 약할수록 낮게 용리 되지만, 본 연구에서는 이동상의 종류에 따라 용매화효과가 나타났으며, 유기용매의 조성에 따른 이동상 극성의 감소에 따라 용량인자가 감소하였다.

또한, 헤테로 고리 화합물 내부의 방향족성의 차이와 헤테로 원자의 종류에 따른 컬럼선택성을 조사했다. 선행 연구결과와 같이 컬럼의 종류와 사용된 이동상의 조성에 따라 약간의 차이는 있으나 정상 HPLC의 머무름 거동은 용질분자와 충전제의 흡착 표면과의 흡착력에 의존하고, 이 때 흡착 경쟁으로 인해 이동상의 종류에 따라 상이한 머무름 현상이 나타남을 알 수 있었다. 역상 HPLC의 머무름은 시료와 정지상과의 수소성 상호작용의 정도와 용매화 효과가 가장 중요한 머무름 인자라는 것을 다시 확인했다. 정상컬럼 중에서도 상대적으로 amino 결합상 컬럼이 다른 컬럼보다 상대적으로 높은 선택성( $\alpha$ )을 갖는 것으로 나타났다. 이것은 극성이 상대적으로 큰 시료의 분리에 있어서는 보다 극성이 큰 amino 결합상 컬럼이 분리에 효과적이며, 또한 amino 기의 경우와 같이 시료와 정지상간의 작용기가 서로 유사한 경우 "like dissolves like"의 원리가 비교적 잘 적용된다고 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구에 많은 지도와 가르침을 주신 고 이선행 교수님에게 감사드리며, 명복을 빕니다.

#### 참 고 문 헌

1. M. Dehnhard, R. Claus, M. Hillenbrand and A. Herzog, *J. Chromatogr.*, **616**, 205 (1993).
2. P. R. Marsham, A. J. Hayter, L. R. Hughes, A. L. Jackman, B. M. O'Conrio and J. A. Bishop, *J. Med. Chem.*, **32**, 569 (1989).
3. E. C. Taylor, G. S. K. Wong, *J. Org. Chem.*, **54**, 3618 (1989).
4. A. Rosowsky, R. A. Forsch, H. Bader and J. H. Freisheim, *J. Med. Chem.*, **34**, 1447 (1991).
5. K. K. Unger, N. Becker and P. Roumeliotis, *J. Chromatogr.*, **125**, 115 (1976).
6. J. N. Seiber, *J. Chromatogr.*, **94**, 151 (1976).
7. K-P Lee, Y J Cho and Y C Lee, *Anal. Sci. and Tech.*, **10**(6), 408 (1997).
8. D. W. Armstrong, U.S. Patent No. 4, **539**, 399 (1985).
9. D. W. Armstrong and W. Demond, *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 411 (1984).
10. D. W. Armstrong, A. M. Stalcup, M. L. Hilton, J. D. Duncan, J. R. Faulkner and S. C. Chang, *Anal. Chem.*, **62**, 1610 (1990).
11. A. M. Stalcup, S. C. Chang and D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, **540**, 113 (1991).
12. S. H. Lee, B. H. Kim, and Y. C. Lee, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, **16**, 4 (1995).