

모세관 전기 영동을 이용한 퀴놀린계 항생제의 광학 이성질체 분석

姜大天 · 曹勝一¹ · 鄭斗洙¹ · 崔奎成 · 金龍成*

경남대학교 화학공학부

¹서울대학교 전기·컴퓨터공학부

²서울대학교 화학부

(2002. 7. 12 접수)

Chiral Separation of Quinolone Antibacterial Agent by Capillary Electrophoresis

Daechun Kang, Seung Il Cho¹, Doo Soo Chung², Kyuseong Choi, and Yongseong Kim*

Division of Chemical Engineering, Kyungnam University, Kyungnam 631-701, Korea

¹School of Electrical Engineering and Computer Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²School of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received July 12, 2002)

요 약. (+)-(18-crown-6)-tetracarboxylic acid(18C6H₄)를 키랄 선택제로 하여 퀴놀린계 항생제인 gemifloxacin을 모세관 전기영동법으로 키랄 분리하였다. Body fluid에서 퀴놀린계 항생제인 gemifloxacin의 직접적인 분석은 빠른 분석 시간, 다성분 분석 등의 여러 가지 장점을 가진다. 그러나 body fluid내의 높은 농도의 나트륨 이온은 18C6H₄와 강한 전하 상호작용으로 인하여 gemifloxacin과 18C6H₄의 상호작용을 방해한다. 키랄 선택제와 나트륨 이온 사이의 상호 작용을 줄이기 위해 완충 용액에 킬레이트 리간드 EDTA를 첨가하였다. 시료 용액에 150 mM의 나트륨 이온이 존재 할 때에도 분리 효율의 향상과 이동 시간의 감소를 관찰 할 수 있었다.

주제어: 모세관 전기영동, 키랄 분석, 에틸렌디아민테트라아세트산, 크라운 에테르.

ABSTRACT. Chiral separation of gemifloxacin, an quinolone antibacterial agent, using (-)-(18-crown-6)-tetracarboxylic acid (18C6H₄) as a chiral selector was performed by capillary electrophoresis (CE). Direct analysis of quinolone antibacterial agent in body fluid is beneficial in terms of fast analysis time, multicomponent analysis. However, high concentration of sodium ion in body fluid can prevent gemifloxacin from interacting with 18C6H₄ since sodium ion has high affinity with 18C6H₄ due to the strong charge interaction. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), as a chelating ligand, was added in the running buffer in order to reduce the interaction between sodium ion and the chiral selector. Increased separation efficiency and reduced migration time were observed while sodium ion exists in the sample solution at the concentration up to 150 mM.

Keywords: Capillary Electrophoresis, Chiral Separation, Ethylenediaminetetraacetic Acid, (+)-(18-crown-6)-tetracarboxylic Acid

서 론

현재 많은 의약품들이 라세미 화합물로 사용되고 있으며 이 라세미 혼합 의약품의 두 이성질체들은 부여 후 각기 다른 속도로 인체 내에서 분해, 흡수 및 활성화하는 경우가 많이 있다. 이들 두 이성질체들은 보통 한 성분은 유용한 약품으로 작용하고 다른 성분은 약품으로서 작용을 하지 않는다. 그리고 경우에 따라서는 인체에 대하여 해로운 작용을 하게 된다. 그러므로, 키랄 화합물을 포함한 약품에서 각 이성질체의 순도를 규명하고 각각의 약품의 효능을 밝히는 연구가 중요하게 되었고 광학 이성질체들의 분리 기술에 대한 관심도 높아지게 되었다.

이러 가지의 분리 기술 중에서 광학 이성질체들의 분리에 널리 쓰이는 방법은 키랄 컬럼을 이용한 분리도가 좋은 고성능 액체 크로마토그래피법 (High Performance Liquid Chromatography : HPLC)^{1,2}과 가스 크로마토그래피법 (Gas Chromatography : GC)³이다. 그러나 HPLC는 원하는 고정상을 가진 Preparation용 컬럼은 가격이 비싸며 키랄 선택제를 키랄 고정상으로 사용하여 시료의 양이 많이 사용되는데 단점 등이 있다. 그리고 GC는 분리도가 좋다는 장점은 있으나 분석 시료가 휘발성을 가져야 하는 제약이 있으며, 적용의 범위가 그다지 넓지 못하다. 본 실험에서 광학 이성질체들의 분리에 사용한 모세관 전기영동법(Capillary Electrophoresis : CE)은 이동상의 완충 용액에 첨가된 키랄 선택제와 분리할 라세미 혼합물 사이에 형성된 동적 평형 상태의 diastereomeric pair를 이용한다. 그러므로 소량의 선택제만이 필요하다. 모세관 전기영동법은 완충 용액에 키랄 선택제를 첨가하여 주면 되므로 다양한 키랄 선택제를 사용하여 간단하게 광학 이성질체를 분리할 수 있다.⁴ 이러한 광학 이성질체를 분리하는데 α -, β -, γ - 사이클로덱스트린,^{5,6} 크라운 에테르,^{7,8} 키랄 계면활성제,⁹ 단백질¹⁰ 등의 다양한 키랄 선택제가 이용된다. 또한 모세관 전기영동법은 전기 삼부압적 흐름을 이용하여 흐름의 전선이 거의 일직선으로 시료구역의 분산이 적어서 높은 분리 효율과 분석 시간이 짧은 장점 등이 있다.

이 실험에서 광학 이성질체로 퀴놀린계 항생제인 gemifloxacin(Fig. 1a)을 사용하였다. Gemifloxacin은 기존 퀴놀론계 항생제의 장점인 그람 음성균에 대한 효과뿐만 아니라 호흡기계 감염의 원인 균으로 알려진 그람 양성균에 대해서도 탁월한 효능을 가지고 있다.

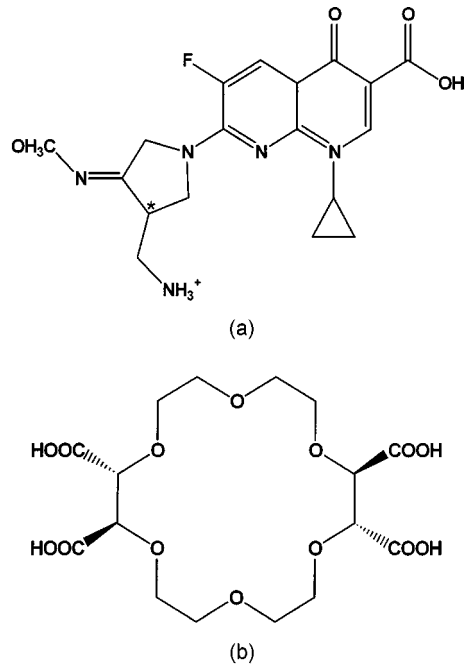


Fig. 1. The structures of (a) gemifloxacin and (b) chiral crown ether, 18C6H₁₂.

Gemifloxacin에는 pyrrolidine치환기 부분에 키랄 탄소(Fig. 1a ★)가 있으며 1차 아미노기를 가지고 있다.¹¹

여러 가지 다양한 키랄 선택제 중 (-)-(18-crown-6)-tetracarboxylic acid(18C6H₁₂; Fig. 1b)는 1차 아미노기를 가진 광학 이성질체의 분리에 널리 쓰인다.¹² 18C6H₁₂의 유도체들의 1차 아미노기를 가진 키랄 선택제로의 유용성은 양성자화된 아민 화합물과 3개의 +NH-O 수소소결합에 의해 크라운 에테르링과 복합체를 형성할 수 있다. 또한 18C6H₁₂의 카르복실기와 광학 이성질체 분자의 이온화한 그룹 사이에서의 입체적 장애, 그리고 전기적 상호작용 등에 의해 광학 이성질체는 서로 다른 에너지를 가지게 된다.

퀴놀린계 항생제 gemifloxacin의 이성질체 분리는 주로 정제 후 이루어져 왔으나 urine과 같은 body fluid에서의 직접적인 분석은 시료 전처리 과정에서의 시간 소요를 줄일 수 있고 대상분 분석의 장점을 가지고 있다. 또한, 전처리 과정에서 시료의 분석 하고자 하는 성분의 손실을 줄일 수 있다. 분헌의 보고에 의하면 대부분의 body fluid는 140 mM 정도의 과량의 나트륨 이온을 함유하고 있다.¹³

그러나, 18C6H₁₂는 나트륨 이온과 같이 복합체를 형

성할 수 있는 물질이 존재하는 경우 전하 상호 작용으로 인하여 1차 아미노기를 가진 광학 이성질체와의 결합보다 더 강한 결합력을 가진다. 그러므로, 광학 이성질체의 분리는 나트륨 이온 등 복합체를 형성하는 이온이 포함된 완충 용액에서 분리 효율이 떨어지기 때문에 18C6H₁₁와 복합체를 형성하는 이온간의 전하 상호 작용의 영향을 최소화 하여야 한다.¹¹

과량의 나트륨 이온은 키랄 선택제인 18C6H₁₁와의 강한 상호 작용으로 인해 광학 이성질체 gemifloxacin의 분리 효율을 크게 떨어뜨린다. 이처럼 나트륨 이온의 영향으로 body fluid에서 gemifloxacin의 직접적 분석에 많은 장애가 따른다.

본 연구에서는 나트륨 이온 농도를 body fluid내의 나트륨 이온 함유량과 같은 농도로 만들어 수용액상에서 키랄 선택제 18C6H₁₁와 복합체를 형성할 수 있는 나트륨 이온이 존재하는 조건에서도 gemifloxacin을 효율적으로 분석하는 방법을 연구하였다. 그리고, 나트륨 이온이 녹아있는 수용액상에서 시료를 직접 분석 함으로써 시료의 전처리에 따른 전처리 과정에서 많은 시간의 소요와 다성분 분석이 되지않는 단점 등을 해결하기 위한 연구를 하였다. 이 실험에서는 1차 아미노기를 가진 퀴놀론계 항생제인 광학 이성질체 gemifloxacin의 분석을 위하여 18C6H₁₁를 키랄 선택제로 사용하였고, 나트륨 이온과 키랄 선택제인 18C6H₁₁ 사이의 강한 전하 상호 작용을 줄이기 위하여 칼레이트 리간드 EDTA⁴⁻를 Bis-Tris 완충 용액에 첨가함으로써, 18C6H₁₁와 복합체를 형성하는 나트륨 이온간의 전하 상호 작용의 영향을 최소화하여 나트륨 이온에 의한 분리효율의 저하를 줄일 수 있었다.

실 험

모세관 전기 영동기기. 이 실험에서는 모세관 전기 영동 장치인 바이오-포커스 3000 모세관 전기 영동장치 시스템(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하였다. 검출기로는 스캔이 가능한 자외-가시선 모놀로서 검출 파장은 270 nm에서 실험을 시행하였다. 시료 주입은 1-psi(6895 Pa)×1 s로 유체 역학적인 주입 방식을 이용하였다. 모세관은 50 μm의 내경과 365 μm의 외경을 가지는 총 길이 24 cm인(검출 창은 20 cm에 위치) 용융 실리카 모세관(Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)을 사용하였다. 모세관은 시료를 분

Table 1. The conditions of capillary electrophoresis

Parameter	Condition
Column	Uncoated fused silica capillary (ID 50 μm · 24 cm; To detector 20 cm)
Running buffer	(20-50 mM Bis-Tris-0.2 mM 18C6H ₁₁ +0-25 mM EDTA)CA
Injection	1-Psi (6895 Pa) 1s
Applied voltage	15 kV
Detection	UV absorbance at 270 nm
Room temperature	25 °C

석한 전 · 후에 높은 압력으로 H₂O, 0.1 M NaOH, H₂O, 완충 용액 순서대로 모세관을 깨끗이 각각 3분 정도 씻어주었다. 이것은 시료를 분석하는데 있어서 모세관 전기 영동장치에서의 분리도를 좋게 하기 위함이다. 모든 실험은 상온 25 °C에서 실행하였고 시료를 분리하는데 필요한 공급전압은 15 kV로 일정하게 유지하였다. 실험 조건을 Table 1에 나타내었다.

완충 용액 및 시료 용액. 이 실험에서 사용된 키랄 선택제로는 18C6H₁₁(Rstech, Daejeon, Korea; Fluka, Buchs, Switzerland)를 사용하였고 분석 물질 시료인 광학 이성질체로는 퀴놀론계 항생제인 gemifloxacin(LG Chemical, Daejeon, Korea)을 사용하였다. 분석 시료의 분리를 위한 완충 용액에는 Bis-Tris(Sigma, St. Louis, MO, USA), Citric acid(Yakuri, Osaka, Japan), EDTA(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 염화 나트륨(Sigma, St. Louis, MO, USA)은 99.99%의 순도를 가진 것을 이용하였다. 완충 용액은 원하는 농도의 Bis-Tris에 citric acid를 가하여 pH 4.0으로 조정하였다. 또한 키랄 선택제인 18C6H₁₁는 0.2 mM의 농도로 완충 용액에 녹여 사용하였다. EDTA는 각각 농도를 변화시키며 완충 용액에 첨가하였다.

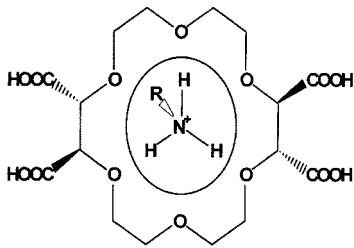
분석 시료로 사용한 광학 이성질체 gemifloxacin의 농도는 100 μM이고 중성의 물에는 거의 녹지 않지만 산성인 물에는 아주 잘 녹는다. 그리고 불에 녹은 후에는 pH를 높여도 침전이 잘 생기지 않는다. 이 시료는 각각의 농도를 달리한 Bis-Tris에 Citric acid(CA)로 pH 4.0으로 조정한 완충 용액에 녹였다. 염화 나트륨은 20 mM에서 150 mM까지 농도를 변화시키며 분석 물질 시료에 첨가시켰다.

Gemifloxacin을 불에 녹여 분광 광도계를 찍은 결과 270 nm 근처에서 최대 흡광도를 보였다. 전기 삼투압적 흐름의 표준 시료로는 아세트(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 실험에 사용된 시료들은 순수한 3차 중

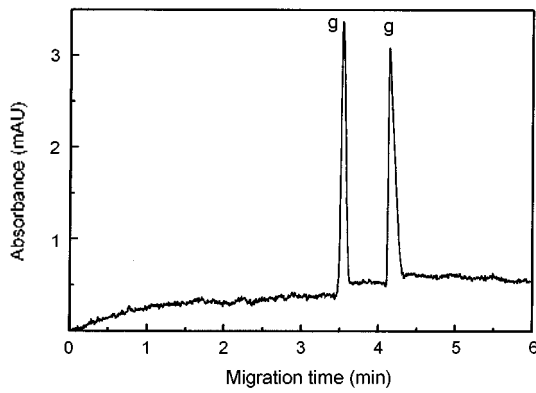
류수(Barnstead, Dubuque, IA, USA)에 녹여 사용하였다.

결과 및 고찰

키랄 분리. 이 실험에 사용된 퀴놀론계 항생체인 광학 이성질체 gemifloxacin에는 pyrrolidine 치환기 부분에 키랄 탄소가 있으며 1차 아미노기가 이 키랄 탄소의 베타위치에 있다(Fig. 1a). 이와 같이 1차 아미노기를 가진 광학 이성질체의 광학 분할에는 크라운 에테르의 유도체들이 키랄 선택제로 유용하다. 양성자화된 아민 화합물은 3개의 -NH-O 수소결합에 의해 크라운 에테르링과 복합체를 형성할 수 있다(Fig. 2a). 크라운 에테르의 카르복실기와 광학 이성질체 분자의 이온화한 그룹 사이에서의 입체적 장애 그리고, 전기적 상호작용 등에 의해 두 복합체는 서로 다른 에너지를 가지게 된다. 이러한 에너지 차이가 클수록 이동도의 차이도 커지며, 좋은 분리능으로 분리가 되게 된다.¹⁶



(a)



(b)

Fig. 2. (a) Schematic representation of interaction between crown ether and gemifloxacin. (b) Chiral separation of gemifloxacin Running buffer, pH 4.0 40 mM Bis-Tris CA; 10 mM EDTA; 0.2 mM 18C6H₁₂. Wavelength: 270 nm, Applied voltage: 15 kV. Gemifloxacin concentration: 100 μM (Gemifloxacin: g).

Fig. 2(b)는 40 mM Bis-Tris에 0.2 mM 18C6H₁₂, Citric acid로 pH 4.0을 맞춘 Bis-Tris 완충 용액에서 100 μM gemifloxacin을 분리한 일렉트로페로그램이다. 그림에서와 같이 18C6H₁₂를 키랄 선택제로 이용한 경우 광학 이성질체인 gemifloxacin을 성공적으로 분리할 수 있었다. 이때의 이동 시간은 각각 3.53 min과 4.14 min이었으며, 분리능은 481.000 m이다.

키랄 분리에서의 나트륨 이온의 영향과 EDTA의 효과. 이 실험에서 사용한 키랄 선택체인 18C6H₁₂는 macrocyclic 폴리에스테르 링을 가지고 있다. 이것은 일반적으로 알칼리 금속, 암모늄 이온, 양자화 되어 있는 아민 화합물과 안정한 착물을 형성한다. 광학 이성질체를 분리하기 위해 첨가한 키랄 선택체인 18C6H₁₂는 나트륨 이온과 전하 상호 작용으로 강한 결합을 할 수가 있다.¹¹ 그러므로 나트륨 이온이 아민 화합물과 함께 존재하는 경우, 나트륨 이온이 먼저 크라운 에테르와 결합하여 아민 화합물이 크라운 에테르와 결합하는 것을 방해하게 된다. 따라서 이러한 금속 이온들이 완충 용액 속에 존재하면, 18C6H₁₂를 이용하여 아민 화합물을 분석할 때 효율이 감소하게 된다. 이러한 금속 이온이 시료 속에 존재하는 경우에도 광학 이성질체 분석에 중요한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 이에 따라 키랄 선택제와 나트륨 이온간의 복합체의 형성을 막고 분리 효율의 감소를 최소화 하여야 한다.

문헌의 보고에 의하면 키랄 선택체인 18C6H₁₂가 첨가된 pH 3.0 완충 용액에서 18C6H₁₂에 대한 나트륨 이온과 광학 이성질체 gemifloxacin의 결합상수는 각각 9100 ± 90016, 1080 ± 8017이다. 이것은 키랄 선택제 18C6H₁₂가 gemifloxacin과의 결합보다 나트륨 이온과의 결합이 보다 강한 결합 상수를 가진다는 것을 보여주고 있다. 그러므로 나트륨 이온은 18C6H₁₂와 상호 작용으로 복합체를 형성 함으로써 1차 아미노기를 가진 광학 이성질체의 분리 효율을 감소 시킨다.

문헌의 보고에 따르면 킬레이트 리간드 EDTA는 다양한 금속 이온과 안정한 착물을 형성하며 나트륨 이온에 대해서 1.66의 형성 상수 값을 가진다(log K_f-1.66).¹⁸ 이에 따라 EDTA는 18C6H₁₂와 나트륨 이온 사이의 복합체 형성을 막고 나트륨 이온과 착물을 형성 할 것이라고 생각된다. 본 실험에서 EDTA의 첨가는 나트륨 이온과 18C6H₁₂의 상호 작용을 억제하고 금속 이온인 나트륨 이온과의 상호작용으로 광학 이성질체 gemifloxacin의 분리효율을 향상시키는 것을 관찰하였다.

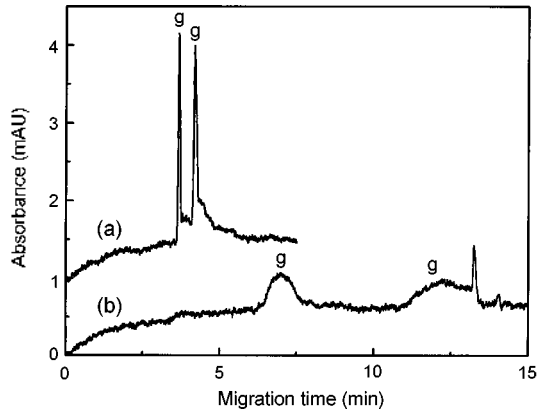


Fig. 3. (a) The effect of EDTA. Running buffer: pH 4.0 50 mM Bis-Tris CA; 20 mM EDTA; 0.2 mM 18C6H₄. Wavelength: 270 nm. Applied voltage: 15 kV. Gemifloxacin concentration: 100 μ M. (b) The effect of sodium ion. Running buffer: pH 4.0 50 mM Bis-Tris CA; 20 mM EDTA; 0.2 mM 18C6H₄. Wavelength: 270 nm. Applied voltage: 15 kV. Gemifloxacin concentration: 100 μ M. Sodium concentration: 20 mM (Gemifloxacin: g).

Fig. 3에서의 실험 조건을 보면 (a)는 20 mM 나트륨 이온이 시료 속에 녹아있을 때, 50 mM Bis-Tris에 0.2 mM 18C6H₄와 20 mM EDTA 완충 용액으로 100 μ M gemifloxacin을 분리한 것이다. (b)는 0.2 mM 18C6H₄를 녹인 50 mM Bis-Tris CA의 완충 용액에서 나트륨 이온을 20 mM 녹인 시료 용액 100 μ M gemifloxacin의 분리를 나타내고 있다. Fig. 3(b)에서는 나트륨 이온의 영향 때문에 피크 폭이 넓어지는 현상과 씨크리지는 현상이 나타난다. Fig. 3(a)에서는 EDTA의 효과로 인하여 20 mM의 나트륨 이온을 함유한 gemifloxacin의 분리된 피크 모양이 일그러짐이 없고 폭이 넓어지는 현상이 현저히 줄어들 것을 볼 수가 있다. 또한 시료 이동도가 빨라지는 현상을 볼 수가 있다. 분리 효율도 크게 향상 되어짐을 볼 수가 있다. 이 그림에 보여 주지는 않지만 50 mM Bis-Tris CA의 완충 용액에서 나트륨 이온이 첨가되지 않은 광학 이성질체의 분리에서도 EDTA의 효과에 의해 피크의 꼬리 끌기 현상이나 폭이 넓어지는 현상이 현저히 줄어드는 것을 보여 준다.

완충 용액의 농도와 EDTA 농도에 따른 이동도의 변화.

Fig. 4(a)에서는 완충 용액의 농도(이온 세기)에 따른 시료의 이동도를 나타내었다. 사용한 완충 용액은 50 mM Bis-Tris:CA에 0.2 mM 18C6H₄와 10 mM EDTA를 첨가하여 만들었다. 그림에서 보는 바와 같이, 이온세기

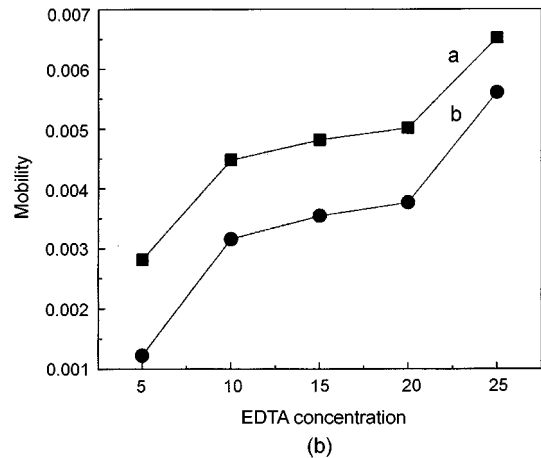
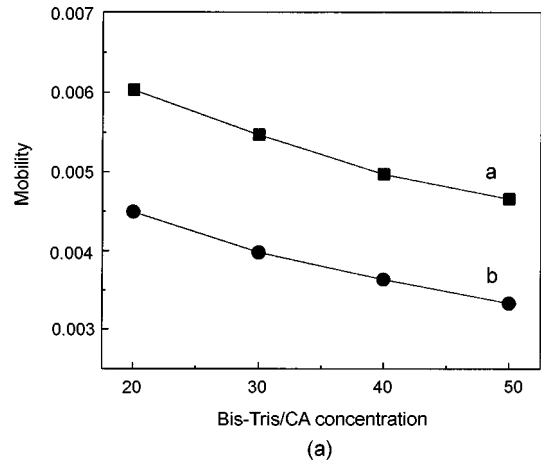


Fig. 4. (a) Electrophoretic mobilities of gemifloxacin as a function of Bis-Tris CA buffer concentration (Gemifloxacin: a, b). Running buffer: pH 4.0 20-50 mM Bis-Tris CA; 10 mM EDTA; 0.2 mM 18C6H₄. Wavelength: 270 nm. Applied voltage: 15 kV. Gemifloxacin concentration: 100 μ M. (b) Electrophoretic mobilities of gemifloxacin as a function of EDTA concentration in Bis-Tris:CA buffer (Gemifloxacin: a, b). Running buffer: pH 4.0 50 mM Bis-Tris CA; 5-25 mM EDTA; 0.2 mM 18C6H₄. Wavelength: 270 nm. Applied voltage: 15 kV. Gemifloxacin concentration: 100 μ M.

및 완충 용액의 농도가 증가하면 제타 전위와 전기 삼투압적 흐름이 감소하기 때문에 시료의 이동도가 감소되는 것을 보여주고 있다.

Fig. 4(b)에서는 0.2 mM 18C6H₄를 녹인 50 mM Bis-Tris:CA의 완충 용액에서 EDTA의 농도를 5-25 mM로 변화시키며 측정된 gemifloxacin의 이동도를 나타내었다. 여기에서는 EDTA의 농도가 증가함에 따라 시료의

이동도가 지속적으로 증가됨을 보여주고 있다.

EDTA 농도에 따른 분리 효율과 분리능의 변화. 이 실험에서는 키랄 선택제 18C6H₄와 나트륨 이온의 강한 상호작용을 조사하기 위하여 킬레이트 리간드 EDTA를 완충 용액 내에서의 농도를 변화시키며 그에 따른 변화를 알아보았다. Fig. 5(a)를 보면 0.2 mM 18C6H₄를 녹인 50 mM Bis-Tris CA의 완충 용액에서 EDTA의 농도를 5-25 mM로 변화시키며 첨가하여 100 μM gemifloxacin의 분리를 나타내고 있다. 이 그래프에 나타나듯이 EDTA의 농도가 높아질수록 분리 효율이 증가하는 것을 알 수 있다.

Fig. 5(b)에서는 분리능을 EDTA의 농도 변화에 따라 나타내었으며 실험 조건은 Fig. 5(a)와 같다. EDTA의 농도 증가에 따라 시료의 분리능이 낮아짐을 알 수가 있다. 분리능은 평균적인 두개의 분석 피크의 전기 영동적 이동도와 전기 삼투압적 흐름의 영향을 받는다.¹⁹ EDTA를 첨가하는 농도의 증가에 따라 전기 삼투압적 흐름(electroosmotic flow)과 시료의 이동도가 빨라지는 것을 볼 수가 있다(Fig. 4b). 그러므로 전기 영동적 흐름과 전기 삼투압적 흐름이 같을 때 EDTA의 첨가로 인하여 EDTA의 농도 증가에 따라 전기 삼투압적 흐름이 증가하여 분리능은 감소하게 되는 것을 보여주고 있다.

EDTA 효과에 의한 나트륨 이온이 녹아있는 gemifloxacin의 분리. 퀴놀린계 항생제인 광학 이성질체 gemifloxacin의 치료 속에 녹아 있는 나트륨 이온의 농도를 0-150 mM로 변화시켜 보았다. 사용한 완충 용액은 50 mM Bis-Tris:CA에 0.2 mM 18C6H₄와 25 mM EDTA를 녹인 후 만들었다. Fig. 6은 이러한 조건에서 100 μM gemifloxacin을 분석한 결과이다. 완충 용액 내에 EDTA를 첨가하지 않은 상태에서 나트륨 이온이 함유된 시료들을 분리하면 피크의 모양이 일그러지고 분리 효율이 매우 낮아지게 됨을 알 수가 있다(Fig. 3.b). 그러나 Fig. 6에서와 같이 EDTA를 첨가한 경우에는 나트륨의 농도가 body fluid에서 나트륨 이온의 농도 조건과 유사한 150 mM일 때에도 Fig. 3(b)와 달리 분리된 gemifloxacin 피크의 꼬리 끌기 현상과 폭이 넓어지는 현상이 줄어들 수 있다. 또한 피크 모양의 일그러짐도 감소되었다. 이 실험으로 나트륨 이온이 150 mM의 농도로 존재하는 수용액 상에서의 gemifloxacin분리는 body fluid에서도 시료 전처리 없이 신속하고 효율적으로 직접적인 분석이 가능함을 알 수가 있다.

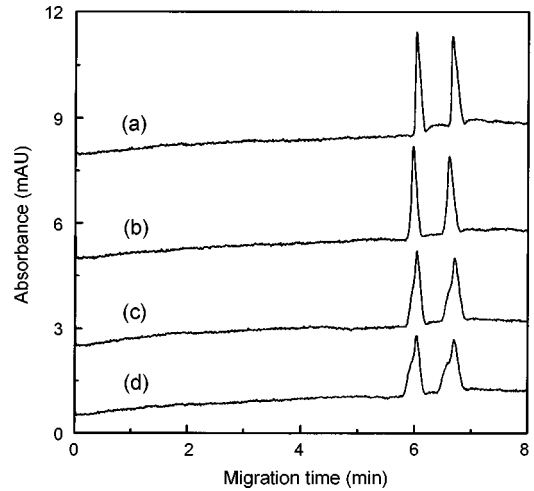


Fig. 6. Chiral separation of gemifloxacin in saline solution using 18C6H₄ in 50 mM Bis-Tris CA buffer (pH 4.0) containing 25 mM EDTA. Running buffer: pH 4.0 50 mM Bis-Tris CA; 25 mM EDTA; 0.2 mM 18C6H₄. Gemifloxacin concentration: 100 μM. Wavelength: 270 nm. Applied voltage: 15 kV. Sodium concentration: (a) 0 mM, (b) 20 mM, (c) 100 mM, (d) 150 mM.

결론

광학 이성질체의 분리에 가장 널리 사용되는 방법은 키랄 컬럼을 이용한 HPLC와 GC이다. 그러나 이러한 방법들은 컬럼의 가격이 비싸고 과량의 시료가 필요하다는 단점을 가지고 있다. 이 실험에서 사용한 모세관 전기영동법(CE)은 이러한 문제점들을 해결하였으며 body fluid내의 퀴놀린계 항생제인 광학 이성질체 gemifloxacin의 직접적인 분석을 가능하게 하여 시료의 전처리 과정에 따른 많은 시간의 소요와 시료의 분석하고자 하는 성분의 손실을 막고 동시에 다성분 분석을 용이하게 하였다. 대부분의 body fluid는 140 mM 정도의 과량의 나트륨 이온을 함유하고 있다. 과량의 나트륨 이온은 키랄 선택제인 18C6H₄와의 강한 상호작용으로 인해 광학 이성질체 gemifloxacin의 분리 효율을 크게 떨어뜨린다. 이처럼 나트륨 이온의 영향으로 body fluid의 직접적 분석에 많은 장애가 따른다. 키랄 선택제인 18C6H₄는 광학 이성질체 gemifloxacin의 상호작용보다 나트륨 이온과 더 강한 상호작용을 한다. 이러한 나트륨 이온이 시료 속에 존재할 때, 분리 효율의 저하와 피크의 폭이 넓어지는 현상이 나타난다. 그리고

피크 모양의 일그러짐 현상이 관찰되었다. 이러한 문제점을 해결하고 광학 이성질체 gemifloxacin의 직접적인 분석을 위하여 킬레이트 리간드 EDTA를 Bis-Tris CA 완충 용액에 첨가하였다. EDTA를 첨가함으로써 18C6H₄와 복합체를 형성하는 나트륨 이온간의 전하 상호작용의 영향을 최소화하여 나트륨 이온에 의한 분리 효율의 감소를 줄일 수 있었다. Body fluid에서의 조건과 같이 시료 용액 속에 나트륨 이온의 농도가 140 mM정도 존재할 때에도 EDTA의 효과에 의해 높은 분리 효율로 귀놀린계 항생제인 광학 이성질체 gemifloxacin을 분리할 수 있음을 이 실험에서 증명하였다. 또한, EDTA의 첨가로 전기 삼투압적 흐름을 증가 시켜 gemifloxacin 이성질체의 분리 시간도 단축시켰다. 따라서, 앞으로 body fluid에서 광학 이성질체의 직접적인 분석에 의하여 시료의 전처리 없이 키랄 화합물을 포함한 약품에서 각 이성질체의 순도를 규명하고 광학 이성질체를 분할하여 두 이성질체내의 생체 내 효과를 각각 밝혀 각각의 약품의 효능을 밝히는 연구가 가능 할 것이다.

본 연구는 2002 학년도 경남 대학교 학술 논문 게재 연구비 지원으로 이루어졌음.

인용 문헌

- Machida, Y.; Nishi, H.; Nakamura, K.; Nakai, H.; Sato, T. *J. Chromatogr. A*. **1998**, *805*, 85.
- Hyun, M. H.; Jin, J. S.; Lee, W. *Bull. Korea Chem. Soc.* **1998**, *19*, 819.
- Schurig, V. *J. Chromatogr. A*. **1994**, *666*, 111.
- Vespalec, R.; Bocek, P. *Chem. Rev.* **2000**, *700*, 3715.
- Fanali, S. *J. Chromatogr. A*. **1997**, *792*, 227.
- Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743.
- Kuhn, R. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2605.
- Zhang, X. X.; Bradshaw, J. S.; Izatt, R. M. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3313.
- Otsuka, K.; Terabe, S. *J. Chromatogr. A*. **2000**, *875*, 163.
- Haginaka, J. *J. Chromatogr. A*. **2000**, *875*, 235.
- Hong, C. Y.; Kim, Y. K.; Chang, J. H.; Kim, Y. Z.; Kawk, J. H. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3584.
- Kuhn, R.; Wagner, J.; Walbrochl, Y.; Bercuter, T. *Electrophoresis*. **1994**, *15*, 828.
- Seiler, H.; Sigel, A.; Sigel, H. *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*; Marcel Dekker: New York., 1994; p 1.
- Behr, J.-P.; Lehn, J.-M.; Vierling, P. *Helv. Chim. Acta*. **1982**, *65*, 1853.
- Stewart, C. J.; Iles, R. K.; Perrett, D. *Electrophoresis*. **2001**, *22*, 1136.
- Jang, j.; Cho, S. I.; Jung, H.; Chung, D. S. *Electrophoresis*. **2001**, *22*, 4362.
- Cho, S. I.; Jung, H.; Chung, D. S. *Electrophoresis*. **2000**, *21*, 3618.
- A. E. Martell.; R. M. Smith. *Critical Stability Constants*. Plenum Press: New York., **1974**, *1*, 204.
- Baker, D. R. *Capillary Electrophoresis*. John Wiley & Son: New York., 1995; p 44.