한국생물공학회지 제18권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 4, 261-265(2003)

키랄 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 이부프로펜의 분리도에 관한 실험식

여 미 순 · †노 경 호
초정밀분리기술센터, 인하대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2003. 4. 4. 게재승인 : 2003. 6. 25.)

Empirical Equation for Resolution of Ibuprofen Enantiomers by Chiral High-Performance Liquid Chromatography

Mi-Soon Yeo and Kyung-Ho Row†
Center for Advanced Bioseparation Technology and Department. of Chemical Engineering,
Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2003. 4. 4. Accepted : 2003. 6. 25.)

Ibuprofen was analyzed by chiral high performance liquid chromatography. Retention behaviours of the standard mixtures of ibuprofen were investigated to obtain their acceptable resolution. A chromatographic column (3.9×300 ㎜) was packed by Kromasil CHI-TBB packings (10 ㎛) and n-hexane was used as a mobile phase with 0.1% acetic acid and tert-butyl methyl ether. Isocratic elution of ibuprofen at 1.0 ㎖/min was performed by changing the mobile phase compositions. The experimental variables affecting the resolution were the compositions of mobile phase and chemical buffer (n-hexane and tert-butyl methyl ether). The resolution between the enantiomers were correlated into the several types of empirical equations including linear form, and their agreements between experimental data and calculated values were examined by the regression coefficient.

Key Words : Ibuprofen, chiral HPLC, resolution, retention factor

서 론

최근에 고부가가치 의약품인 키랄 약품을 고순도로 분리하는 기술 개발이 의약 및 정밀 화학 생산공정에 커다란 기술적, 경제적 파급효과를 가져올 것으로 예상하고 있다(1). 천연계에 존재하는 대부분의 생체 구성물질들은 광학적으로 거울상을 가진 광학 이성질체로 존재하고 있으며 특정 화합물은 생체 내에서 서로 다른 역할을 수행한다. 이러한 광학 이성질체를 키랄 화합물이라 하며 키랄성 (chirality)을 갖고 있는 한 쌍의 거울상 이성질체를 말한다(2). 거울상 이성질체는 서로 다른 의약적 활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있다(3). 생산되는 합성 의약품에서 거울상 이성질체 중의 어느 한쪽만이 의약적 효능이 있고 나머지 다른 형태의 거울상 이성질체는 아무런 생리활성을 나타내지 않거나 혹은 각종 부작용의 원인으로 보고되었다(4). 그러나 대부분의 의약품들은 순수한 광학 이성질체만을 포함하는 제품으로 얻는 것이 어렵기 때문에 이성질체들이 혼합된 라세미 혼합물로 사용되는 실정이다. 대부분의 키랄 의약품에 있어 단일 이성질체만을 선호하고 있으며 라세미체 의약품은 예외적인 경우에 속하는 것으로 보고 있다. 의약품 생산에 있어서 원하는 순수한 물질만을 얻는 것이 필수적이기 때문에 키랄 약품을 고순도로 분리 및 정제하는 것이 더욱 중요해지고 있다. 라세미 혼합물의 광학적 분리가 어렵지만 부작용을 가져오는 다른 거울 이성질체를 분리하기 위해서는 순수한 한 종류의 광학 이성질체를 얻는 것이 요구되어 진다.

거울상 이성질체의 분리를 위해서 광학적으로 활성화된 화합물을 사용하여 원하는 이성질체를 함께 결정화시키는 공정이 사용되어 왔다. 그러나 이성질체를 분리하기 위해 광학분할 시약을 이용하여 공유결합을 끊어야 하므로 어느 정도 강한 반응조건이 필요하고 광학 이성질체가 라세미화 할 위험성이 있기 때문에 응용하기에는 실용적인 가치가 떨어진다.

† Corresponding Author : Center for Advanced Bioseparation Technology and Department. of Chemical Engineering, Inha University, 253 Yonghyun-Dong, Nam-Ku, Incheon 402-751, Korea
Tel & Fax : +82-32-860-7470
E-mail : rowkho@inha.ac.kr

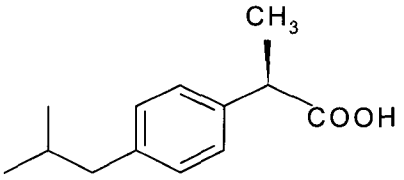
다른 방법으로 키랄 고성능 액체 크로마토그래피 (chiral HPLC)가 점차적으로 발전하게 되었다(3). 키랄 HPLC는 키랄 화합물 중의 한 가지 enantiomer와 선택성을 갖는 키랄 고정상 (CSP)을 이용한 키랄 컬럼이 상용화되고 있다. 현재 키랄 HPLC는 광학 이성질체 분리에 가장 중요하게 사용된다. 분리된 피크를 각각 수거하여 두 개의 순수한 광학 이성질체로 분리하여 두 피크의 면적 혹은 높이의 비로부터 광학활성 물질의 광학순도 (optical purity)를 측정할 수 있다. 두 광학 이성질체와 키랄 고정상 사이의 상호작용 메카니즘을 정확히 이해하여 용출 순서를 예측할 수 있어서 이에 따라 키랄 HPLC는 입체화학에 관련된 문제를 해결하는 데 이용될 수 있는 최상의 방법으로 인식되고 있다(3).

본 연구의 실험 대상 물질인 (R,S)-Ibuprofen[(±)-(R,S)-2-(4-isobutyl phenyl) propionic acid]는 대표적인 비스테로이드 계통의 진통 및 소염제로서 류마티즘, 암 등의 진통제 외에 여러 가지 용도로 널리 사용되는 치료약이며 라세미 혼합물 상태로 사용되고 있다(5). S-enantiomer는 약물학적 효과를 갖고 있으나 R-enantiomer는 여러 가지 부작용을 갖고 있기 때문에 라세미 형태의 이부프로펜에 관한 체류 메커니즘을 규명하기 위해서 키랄 고정상으로 채워진 컬럼을 이용하여 이동상의 조성비를 바꿔가면서 이동상의 조성 변화에 따른 두 물질의 분리도에 관한 상관식을 얻는 것이 본 연구의 목적이다.

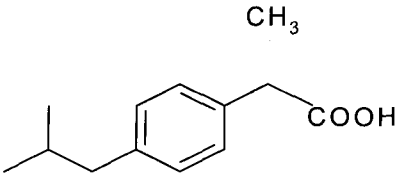
실 험

실험재료

Fig. 1은 (R,S)-ibuprofen의 화학적 구조식이다. 실험에서 사용된 표준 시료 물질인 라세미 형태의 이부프로펜은 Sigma (ST Louis, MO, USA), 순수한 형태의 이부프로펜과 tert-butyl methyl ether은 Aldrich (Milwaukee, USA), 헥산 (HPLC grade)과 아세트산 (analytical grade)은 덕산화학에서 각기 구입하였다. 시약은 전처리 없이 바로 사용하였다. 분석용 컬럼의 정지상은 Eka Chemicals Inc. (Sweden)의 Kromasil (10 ㎛ silica-based)을 사용하였다.



(a) R-enantiomer



(b) S-enantiomer

Figure 1. Chemical structures of Ibuprofen.

실험기기

HPLC 시스템으로는 Waters 600s Multisolvent Delivery System이 부착된 Waters 616 liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, USA), 그리고 Rheodyne injector (20 ㎕ sample loop)가 사용되었다. 데이터 저장 시스템은 Chromate (ver. 3.0, Interface Eng.)를 사용하였다. UV 검출기는 486 UV-visible tunable wavelength absorbance (Waters, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 분석용 스테인레스 컬럼 (3.9×300 ㎜)에 Kromasil (10 ㎛ silica based)을 충진하여 사용하였다. 이동상은 헥산, tert-butyl methyl ether와 첨가제는 아세트산을 사용하였다. 유속은 1.0 ㎖/min, 주입부피는 5 ㎕이고, UV 검출기의 wavelength는 220 ㎚이며 실온에서 실험하였다.

결과 및 고찰

실험조건에 따라서 피크의 체류시간과 이성질체간의 분리도를 계산하여 실험상관식을 얻었다. 체류시간 (t_R)은 무차원 체류인자 (k)로서 다음 식에 의해서 표시된다.

$$k = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

t_0는 컬럼 내에 머무르지 않는 물질의 체류시간이다. 작은 k값은 시료가 컬럼에 잠시 머물러서 분리도가 좋지 않고 큰 k값은 분리도가 증가하지만 분석시간이 길어지고 피크가 넓어지게 된다. 분리도 (R)는 두 피크의 차이와 피크의 평균 폭으로도 정의되며, 체류시간과 피크 폭의 단위가 길이 또는 시간으로 표시되기 때문에 무차원이다(6).

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

t_{R1}는 R-enantiomer, t_{R2}는 S-enantiomer의 체류시간이며, w_1, w_2는 각 성분 피크의 기준선에서의 폭이다. 실험에서 사용된 이동상의 조성에 관한 분리도를 함수의 형태로 나타내기 위해서 Table 1에서 제안된 식에 상관계수 (r^2)를 기준으로 하여 실험식의 타당성을 비교하였다. r^2는 회귀분석으로 구해진 실험식이 얼마나 실험값과 잘 일치하는지를 나타내는 실험값과 실험식의 척도로서 0에서부터 1사이의 값이다. 보통 0.9 이상에서 상관도가 있다고 가정하고 1에 가깝게 될수록 상관관계가 크게 된다. r^2는 다음 식에 의해서 계산된다(7).

$$r^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - y_{est})^2}{\sum (y_i - \langle y_i \rangle)^2}, \quad \langle y_i \rangle = \frac{\sum y_i}{N} \quad (3)$$

y_i는 실험에서 측정한 분리도, $\langle y_i \rangle$는 평균값을 나타낸다.

이동상 조성에 따른 체류인자의 변화

키랄 HPLC를 사용하여 이부프로펜을 분리하였으며, 각각의 이동상들이 미치는 영향에 따른 체류인자 (k)와 분리도

(*R*)의 변화를 고찰하기 위해서 각각의 조성들을 바꿔가면서 실험을 수행하였다. 키랄 고정상이 실리카 지지체이므로 헥산을 기본으로 하였고 첨가제로 아세트산을, 극성 조절을 위해서 tert-butyl methyl ether를 사용하였다. 이동상으로 헥산만을 사용하면 시료의 체류시간이 길어지고 실리카의 표면적에서 시료간의 분리도가 낮아지게 된다. 따라서 비극성인 헥산에 극성인 유기용매를 첨가하게 되는데 그 종류와 이동상중의 양을 정하는 것이 중요하다. 극성인 유기용매는 체류시간에 영향을 준다(8). 충진된 고정상에 사용되는 유기용매 중 중간 정도의 극성을 갖는 tert-butyl methyl ether를 첨가하여 이동상을 만들었다.

각기 다른 이동상 조성에서의 실험에 의해 측정한 값 (t_R, w)을 사용하여 식 (1), (2)에 의해서 체류인자, 분리도를 구하였으며, 이에 대한 결과를 Table 1에 나타내었다. Fig. 2는 이동상을 n-hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid로 75 : 25 : 0.1의 부피 조성비에서 얻은 크로마토그램으로 두 피크 사이의 분리도는 3.1223이고 R-enantiomer가 S-enantiomer보다 빨리 용출되었다.

이동상의 조성에서 유기용매인 tert-butyl methyl ether의 함량이 증가하면 이부프로펜의 체류시간이 증가하였고 분리도와 체류인자가 급격히 감소함을 알 수 있으며 이를 Fig. 3에 나타내었다. 유기용매 tert-butyl methyl ether의 함량은 고정상과 의 상호작용에 의하여 분리도와 체류인자에 크게 영향을 미쳐서 즉 극성이 있는 유기용매의 첨가로 인해서 분리도와 체류인자가 감소하였다. 산성 라세미 혼합물에는 첨가제로 아세트산이 사용된다. 본 실험에 사용된 컬럼에서의 아세트산의 사용 한계는 0.1 %이하로 권장되었다. 아세트산의 함량을 0.02 %에서 0.1 %까지 변화시키면서 실험을 수행하였고 아세트산의 함량이 증가할수록 용질의 체류시간은 작아지고 분리도와 체류인자가 감소하였고 이를 Fig. 4에 나타내었다. 아세트산은 tert-butyl methyl ether보다는 분리도와 체류인자에 적은 영향을 미침을 알 수 있다. tert-butyl methyl ether 뿐만 아니라 아세트산의 함량이 두 키랄 물질의 분리도와 체류인자에 영향을 미치고 특히 분리도에 대하서도 유기용매와 첨가제에 대한 함량의 영향을 수식으로 표현하고자 한다.

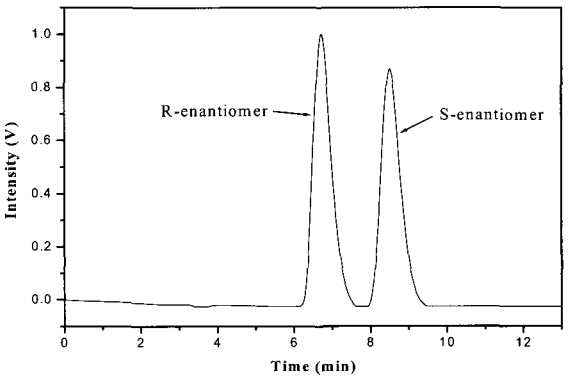


Figure 2. Chromatogram of Ibuprofen free acids in isocratic method (n-Hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid 75/25/0.1 vol. %, 1 ml/min, 5 $\mu\ell$, 1000 ppm)

분리도에 관한 실험식

이동상이 3성분계이기 때문에 헥산을 65~95 vol. %, tert-butyl methyl ether는 5~35 vol. %로 각기 5%씩 변화시키면서 아세트산의 함량을 0.02~0.1 vol. % 사이에서 0.02%씩 변화시켰다. 유기용매인 tert-butyl methyl ether의 양이 증가함에 따라 물질의 용출 시간이 빨라져져 분리시간이 감소하였고 이에 따라서 분리도가 감소하고 있다. 아세트산의 함량이 증가하면 분리시간과 분리도가 감소하였다. 결과로서

Table 1. Number of theoretical plates and resolution of ibuprofen enantiomer*

No.	Composition**	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	w_1 (min)	w_2 (min)	k_1	k_2	R
1	65/35/0.1	5.4333	7.2500	0.9746	1.1379	0.3583	0.8125	1.7200
2	65/35/0.08	5.7833	7.4167	0.5570	0.5725	0.4458	0.8542	2.8923
3	65/35/0.06	6.0667	7.7667	0.5157	0.5848	0.5167	0.9417	3.0895
4	65/35/0.04	6.0833	7.8000	0.5133	0.5763	0.5208	0.9500	3.1511
5	65/35/0.02	7.6000	10.000	0.7009	0.7517	0.9000	1.5000	3.3044
6	70/30/0.1	6.4667	8.1000	0.7223	0.7223	0.6167	1.0250	2.1751
7	75/25/0.1	6.7000	8.5000	0.5615	0.5915	0.6750	1.1250	3.1223
8	75/25/0.08	6.9833	9.6000	0.7443	0.7758	0.7458	1.4000	3.4428
9	75/25/0.06	7.2500	9.7667	0.6586	0.6843	0.8125	1.4417	3.7482
10	75/25/0.04	7.3000	9.7833	0.5844	0.6481	0.8250	1.4458	4.0297
11	75/25/0.02	7.5500	10.3667	0.6264	0.6951	0.8875	1.5917	4.2629
12	80/20/0.1	8.1000	8.1000	0.6740	0.6803	1.0250	1.7833	4.4795
13	85/15/0.1	9.5833	9.5833	0.6153	0.7603	1.3958	2.3000	5.5284
14	90/10/0.1	12.7167	18.5667	0.7725	1.0254	2.1792	3.6417	6.5076
15	90/10/0.08	12.8333	18.9333	0.8020	1.0196	2.2083	3.7333	6.6974
16	90/10/0.06	13.4833	19.5333	0.7540	1.0580	2.3708	3.8333	6.6777
17	90/10/0.04	13.5167	19.7833	0.7747	1.0649	2.3792	3.9458	6.8130
18	90/10/0.02	14.7667	22.5000	0.9097	1.3174	2.6917	4.6250	6.9447
19	95/5/0.1	13.3167	19.7333	0.7855	1.0648	2.3292	3.9333	6.9357
20	95/5/0.08	17.6333	26.4167	0.9985	1.4962	3.4083	5.6042	7.0416
21	95/5/0.06	18.9833	29.0000	1.2457	1.5743	3.7458	6.2500	7.1040
22	95/5/0.04	19.0833	29.0833	1.1891	1.5419	3.7708	6.2708	7.3233
23	95/5/0.02	26.000	39.7500	1.3126	2.2715	5.5000	8.9375	7.6728

* : 1 ; R-enantiomer 2 ; S-enantiomer

** : Hexane/tert-Butyl-methyl ether/Acetic acid (vol. %)

tert-butyl methyl ether와 아세트산의 함량이 분리도에 영향을 미침을 알 수 있다. 헥산의 양이 증가하면 분리도는 증가하고 tert-butyl methyl ether과 아세트산의 함량이 증가하면 분리도는 감소하였다. 분리도를 이동상 조성에 대한 실험식으로 나타내기 위해서 Table 1에 있는 각 이동상 조성에서의 분리도를 Table 2와 같이 다섯 가지 실험식에 대해서 고려하였다. 각기 이동상의 조성에 대한 분리도의 함수로 상관식을 만들었다. 식 (4)에서는 기본적인 헥산과 유기용매의 조성의 항으로 이루어진 선형식으로 구성되었고, 식 (5)에서는 선형식에 헥산과 tert-butyl methyl ether의 상호작용을 고려한 항을 포함하였다. 식 (6)에서는 헥산과 tert-butyl methyl ether에 대한 선형식을 2차항까지 비선형식으로 확장하였고, 식 (7)은 2차항에 헥산과 tert-butyl methyl ether의 상호작용이 있는 항을 추가하였다. 식 (8)에서는 아세트산 (X_3)까지 포함하여 헥산과 유기용매에 대한 선형식과 헥산, tert-butyl methyl ether, 아세트산 세 가지 이동상의 상호작용이 있는 항을 추가하였다. 각 실험식에 대한 r^2를 비교한 결과에 의하면 매개변수의 수가 가장 많은 식 (8)이 1.0000에 가장 근접하였다. 실험식에 따라서 분리도의 실험값과 잘 맞는 정도를 Fig. 5에 표시하였다. 실험식이 비교적 복잡한 식 (7), (8)에서는 보다 실험값에 잘 일치하였다.

Table 2. Correlation equations for the resolutions of ibuprofen

No.	Equation	r^2
(4)	$R = 0.9677+0.0691X_1-0.0678X_2$	0.6660
(5)	$R = 0.9634+0.0760X_1+0.0995X_2-0.0028X_1X_2$	0.9334
(6)	$R = 1.8937-1.7033X_1-0.0177X_1^2+1.5883X_2-0.0152X_2^2$	0.9480
(7)	$R = 5.6186-9.5670X_1+0.0960X_1^2-1.5762X_2+0.1097X_1X_2+0.0161X_2^2$	0.9551
(8)	$R = 0.9407+0.0818X_1-0.0033X_1X_2+0.1409X_2+4.8512X_3-0.1837X_1X_3$ $-2.6518X_2X_3+0.0351X_1X_2X_3$	0.9736

X_1 : Hexane (vol. %),
X_2 : tert-Butyl-methyl ether (vol. %),
X_3 : Acetic acid (vol. %)

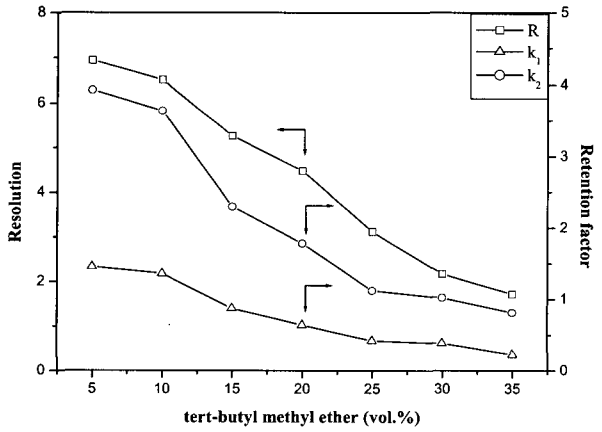


Figure 3. Effect of tert-methyl ethyl ether composition on retention factor and resolution (n-Hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid 65/35/0.1~95/5/0.1, vol. %).

HPLC에서 이동상의 조성은 분리도에 가장 큰 영향을 미친다. 물질 분리를 위한 최적 이동상 조성을 구하기 위해서 모든 이동상 조성의 범위에 대해서 실험적으로 확인하기 위해서는 많은 시간이 소요된다. 또한 모든 조건을 실험적으로 확인하여 최적조건의 이동상의 조성을 정하기도 어렵다. 최적의 분리도와 분리 시간은 물질에 따라 다르게 정의되지만 일반적으로 분리도가 크고 분리시간이 짧아야 한다. 이동상의 조성의 변화에 따른 분리도를 최소한의 실험을 하고 실험상관식으로 예측하여 이부프로펜을 분리하기 위한 최적의 이동상의 조성을 실험상관식으로 구하였다. 실험으로 구한 상관식을 이용하여 두 조건을 만족하는 이동상의 조성을 확인할 수 있었다. 앞으로 이부프로펜과 유사한 구조를 가진 키랄 물질을 분리할 때 이 상관식을 이용하면 이동상의 최적 조성을 예측하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

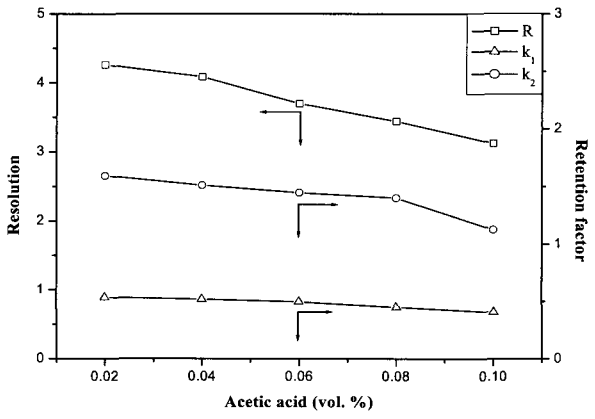


Figure 4. Effect of acetic acid composition on retention factor and resolution (n-Hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid 75/25/0.1~75/25/0.02, vol. %).

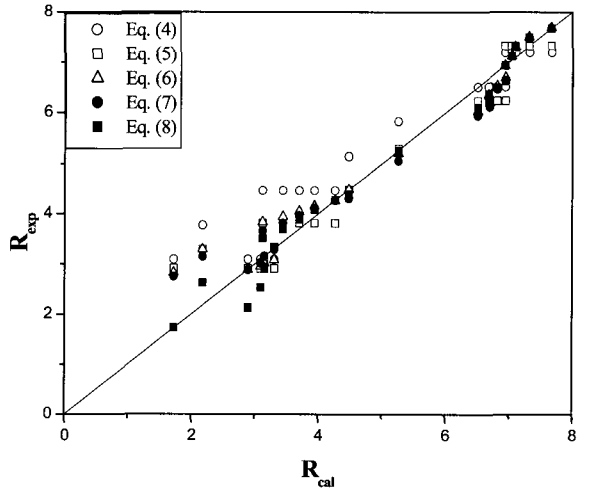


Figure 5. Comparison of experimental data with calculated resolutions by Eqs. (4)-(8).

요 약

이부프로펜 중 S-enantiomer는 약물학적 효과를 갖고 있으나 R-enantiomer는 여러 가지 부작용을 갖고 있다. 이런 라세미 혼합물은 키랄 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 효과적으로 분리 할 수 있었다. 실험에서 이용한 column (3.9×300 ㎜)은 Kromasil 10 ㎛를 충진하였고, 이동상으로는 n-hexane/tert-butyl methyl ether/acetic acid를 사용하였다. 유속은 1.0 ㎖/min, 주입부피는 5 ㎕이고, UV 검출기의 wavelength는 220 ㎚이며 실온에서 실험하였다. 라세미 형태의 이부프로펜을 키랄 고정상으로 채워진 컬럼을 이용하여 이동상의 조성비를 바꿔가면서 이동상의 조성 변화에 따른 두 물질의 분리도의 상관식을 얻었다. 이 상관식을 이용하여 각 조성에 분리도에 미치는 영향을 정량적으로 표시하였고 보간법 또는 외사법에 의하여 실험이외의 조성에 대한 분리도를 예측할 수 있는 장점이 있다.

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도 분리연구실에서 수행하였으며, 인하대학교와 초정밀분리기술센터의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Bhushan, R. and J. Martens (1990), Importance of enantiomeric purity and its control by thin-layer chromatography, *J. Phar. Biomed. Anal.* **8**. 259-269.
2. Ahuja, S. (2000), Chiral Separations by Chromatography, pp3-13, Oxford Univ. Press, New York.
3. Bhushan, R. and J. Martens (1998), Resolution of enantiomers of ibuprofen, *Biomed. Chromatogr.* **12**, 309-316.
4. Medvedovici, A., P. Sandra, L. Toribio, and F. David (1997), Chiral packed column subcritical fluid chromatography on polysaccharide and macrocyclic antibiotic chiral stationary phases, *J. Chromatogr. A* **785**, 159 -171.
5. Ducret, A., M. Trani, P. Pepin, and R. Lortie (1997), Chiral high performance liquid chromatography resolution of ibuprofen esters, *J. Phar. Biomed. Anal.* **16**, 1225-1231.
6. Row, K. H. (1999), Principles and Applications of Liquid Chromatography, pp11-12, Inha Univ. Press, Incheon.
7. Row, K. H. (2001), Excel for Chemical Engineering, pp.117-119, A-Jin Press, Seoul.
8. Cserhati, T., and K, Valko (1993), Chromatographic Determination of Molecular Interactions, pp124-138, CRC Press, London.
9. Kim, S. Y., J. K. Lee, S. S. Suh, M. H. Choi, T. J. Park, and D. K. Park (2001), Optical resolution of racemic ibuprofen by using chiral stationary phase, *Hwahak Konghak* **38**, 373-379.
10. Tan, S. C., S. H. D. Jackson, C. G. Swift, and A. J. Hutt (1997), Stereospecific analysis of the major metabolites of ibuprofen in urine by sequential achiral-chiral high-peroformance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* **701**, 53-63.
11. Blackwell, J. A., R. W. Stringham, D. Xiang, and R. E. Waltermire (1999), Emprical relationship between chiral selectivity and mobile phase modifier properties, *J. Chromatogr. A* **852**, 383-394.
12. Haginaka, J., H. Sanbe, and H. Takehira (1999), Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (*S*)-ibuprofen retention properties in aqueous mobile phases, *J. Chromatogr. A* **857**, 117-125.
13. Sun, Q. and S. V. Olesik (2000), Chiral separation by simultaneous use of vancomycin as stationary phase selector and chiral mobile phase additive, *J. Chromatogr. B* **745**, 159-166.