Korean Chem. Eng. Res., Vol. 47, No. 1, February, 2009, pp. 54-58

Kromasil HPLC 칼럼에서 온도와 이동상 조성비에 따른 Ketoprofen과 Ibuprofen 라세미체의 분리특성

박문배 · 김인호†

충남대학교 화학공학과
305-764 대전시 유성구 궁동 220
(2008년 11월 18일 접수, 2009년 1월 9일 채택)

Effect of Temperature and Eluent Composition on the Separation of Ketoprofen and Ibuprofen Racemates in Kromasil HPLC Column

Moon-Bae Park and In Ho Kim†

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea
(Received 18 November 2008; accepted 9 January 2009)

요 약

Ketoprofen과 Ibuprofen은 비스테로이드 계통의 진통 및 소염제로서 관절염 등을 위한 진통제나 해열제로 이미 널리 사용되고 있다. 그러나 이 두 물질이 치료약으로 사용될 때 (S)-ketoprofen과 (S)-ibuprofen은 약리학적으로 항염증 작용을 하며 (R)-ketoprofen과 (R)-ibuprofen은 약효가 없거나 부작용을 일으키는 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 Ketoprofen과 Ibuprofen을 Kromasil HPLC 칼럼을 사용하여 이동상 조성비(hexane/t-BME/acetic acid)와 온도 변화(25~55 ºC)가 분리에 미치는 영향을 실험하였다. 분리특성은 선택도, 분리도, 이론단수 그리고 용량인자와 절대온도의 역수사이의 관계에서 계산된 엔탈피 변화 ΔH에서 Ketoprofen과 Ibuprofen의 kromasil HPLC column 고정상과의 상호작용의 크기를 열역학적으로 검토하였다. 온도 25 ºC, 이동상 조성비(hexane/t-BME/acetic acid) 80/20/0.1에서 선택도, 분리도, 이론단수 엔탈피 수치가 높게 나타났다.

Abstract – Ketoprofen and ibuprofen are non-steroid anti-inflammatory drug(NSAID) that have analgesic and anti-pyretic properties. (S)-ketoprofen and (S)-ibuprofen have pharmacological activity, while (R)-ketoprofen and (R)-ibuprofen are either inactive or have side effect. The chiral separation of racemic ketoprofen and ibuprofen enantiomers was carried out by using a Kromasil HPLC column. Some chromatographic parameters (selectivity, resolution, number of theoretical plates and ΔH) are calculated under different mobile phase compositions of hexane/t-BME/acetic acid and temperatures. The selectivity, resolution and number of theoretical plates were observed high at 25 ºC and the composition of hexane/t-BME/acetic acid (80/20/0.1).

Key words: Ketoprofen, Ibuprofen, Kromasil Column

1. 서 론

의약품의 개발은 고부가 가치의 산업으로 관심의 대상이 되는 분야이다. 현재 시판되고 있는 의약품 중 대부분은 거울상 이성질체를 동량으로 혼합한 라세미 혼합물이고, 한 쌍의 거울상 이성질체가 생체 내에서 서로 다른 생화학적 성질로 작용하며 하나는 의약적 효능이 있는 반면에 다른 하나는 아무런 생리적 활성을 나타내지 않거나 혹은 부작용을 나타낸다[1]. 따라서 한 쌍의 광학이성질체로 존재하는 키랄 의약품에 있어서 두 광학이성질체의 인체 내의 의약 활성은 매우 중요하다. 그 결과 전 세계적으로 키랄 의약품을 고순도로 분리하는 기술의 개발에 대한 관심이 급증하고 있다.

크로마토그래피는 혼합된 시료 성분이 이동상과 고정상을 통과하면서 서로 다른 물리적·화학적 상호작용에 의한 체류시간 차이로 분리하는 기술이다. 고성능액체 크로마토그래피(HPLC)는 과거의 액체크로마토그래피 보다 더 작은 입자를 사용하고 훨씬 높은 압력을 가하여 고속으로 분리하는 도구이다[2]. HPLC는 고압, 낮은 불감부피의 칼럼 및 예민한 검출기의 개발, 최신 LC로 분리시간이 짧을 뿐 아니라 분리도가 높고, 정확도와 정밀도가 크며(±0.5~1%), 낮은 농도에서도 검출이 가능하다(10^{-9}g 정도). HPLC 장치의 개략도를 Fig. 1에 표시하였다.

거울상 이성질체 Ketoprofen과 Ibuprofen은 비스테로이드제로서 소염제, 관절염치료제 그리고 해열진통제로 사용된다. 이중 (S)-

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

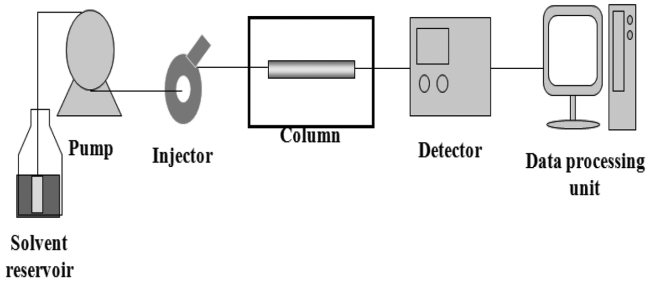

Fig. 1. HPLC equipments.

Ketoprofen과 (S)-Ibuprofen 만이 약리학적으로 항염증 작용을 하며 (R)-Ketoprofen과 (R)-Ibuprofen은 약효가 없거나 부작용을 일으킨다[3, 4].

거울상 이성질체는 주위의 분자 그리고 이온들과 상호작용에 따라 열역학적 활성화 에너지가 조절되는 특성을 가지고 있다[5]. 현재까지 Ketoprofen과 Ibuprofen 라세미체의 분리특성연구에 대한 많은 논문이 발표되었다. 이동상 유속에 따른 R, S-form의 체류시간, 용량인자, 선택도, 분리도 그리고 칼럼의 이론단수를 비교하고 또한 칼럼과 시료의 농도를 달리하여 흡착 등온 식을 구하는 실험, 첨가제인 acetic acid의 조성비를 다르게 하여 분리특성을 연구한 실험 등 많은 논문이 발표되었다[6-9]. 그러나 Ketoprofen과 Ibuprofen의 고정상과 열역학적인 상호작용을 연구하기 위해 온도와 이동상 조성비를 바꾸어 실험한 보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 칼럼의 온도와 이동상 조성비를 변화시켜 Ketoprofen과 Ibuprofen 라세미체의 분리특성을 실험하였다.

크로마토그램의 분리특성인 선택도(selectivity), 분리도(resolution), 이론단수(the number of plate) 그리고 용량인자 k′ 엔탈피 변화인 ΔH의 관계를 구하기 위해 아래와 같은 식들을 사용하였다.

$$\text{선택도}(\alpha) = \frac{t_{R2}-t_0}{t_{R1}-t_0} = \frac{k_2}{k_1} \quad (1)$$

k는 t_R-t_0로 정의되며 t_{R2} t_{R1}은 각성분의 체류시간을 나타내며 각각의 peak의 highest peak time으로 계산하였다. t_0은 시료가 고정상과 상호작용이 없고 검출기에 도달하는 시간을 표시한다. 칼럼의 불감시간(dead time)이라고도 부른다.

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

Fig. 2를 보면 w_1과 w_2는 두 피크의 기준선사이의 폭을 나타내고 시간단위로 표시한다.

$$\text{이론 단수}(N) = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (3)$$

$$\ln k' = \left(-\frac{\Delta H}{R}\right)\frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln\phi \quad (4)$$

$$\ln\alpha = -\frac{\Delta\Delta H}{RT} + \frac{\Delta\Delta S}{R} \quad (5)$$

여기서 R은 기체상수, T는 절대온도, ΔH는 엔탈피, ΔS는 엔트로피를 나타낸 것이다. ΔΔH는 엔탈피 변화를 ΔΔS는 엔트로피 변화를 나타낸 것이다. ϕ는 hexane에 대한 t-BME의 비, $k'=\left(\frac{t_R-t_0}{t_0}\right)$, α는 선택도를 나타낸다[10]. vant Hoff 식 (4, 5)는 두 거울상 이성질체와 Kromasil CHI-II column 사이의 온도에 따른 열역학적 상호작용을 엔탈피, 엔트로피 그리고 Gibbs free energy를 사용하여 나타낸 것이다[10].

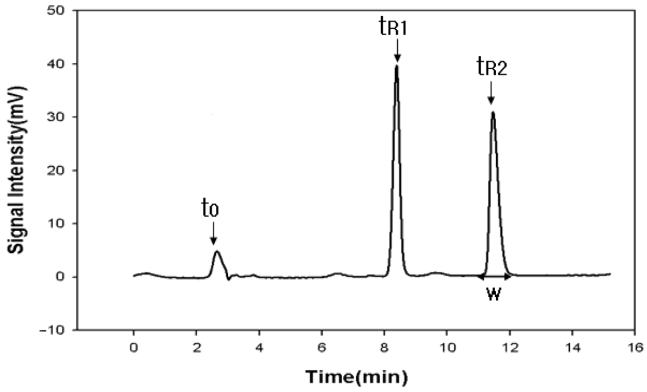

Fig. 2. Chromatograph.

2. 재료 및 방법

2-1. 재료 및 시약

사용한 시료로서 Ketoprofen(Sigma, Spain)과 Ibuprofen(Sigma, Belgium)은 라세미 혼합물로 판매되고 있으며 특급시약을 사용하였고 이동상으로는 hexane(95%, J.T. Baker, U.S.A), tert-butyl-methyl-ether(t-BME, 99.9%, J.T. Baker, U.S.A), acetic acid(99.7%, JUNSEI, Japan)를 사용 하였다.

2-2. 기기 및 장치

HPLC 펌프(M-1330, Bio Rad, U.S.A), UV검출장치(783A, Applied Biosystem, U.S.A), 데이터 수집 장치(540-0247W, Young Lin, Korea), Kromasil CHI-II column(4.6 mm×250 mm, 100-5-TBB, Akzo-Nobel, Netherland)을 사용하였다. 그리고 정확한 부피의 시료를 주입하기 위해 5 μl의 sample loop를 부착하였고 이동상조성의 mixing을 위해 UL Trasonic Cleaner(3210, Bransonic, USA) 사용하였다. Column heater(M-1330, Bio-Rad, USA)를 이용하여 온도를 25 ºC, 40 ºC, 55 ºC로 조절하였다.

2-3. 실험방법

이동상유속은 1.0 ml/min으로 고정하고 Ibuprofen과 Ketoprofen 시료는 3,000ppm의 농도로 t-BME에 용해시켜 제조하였다. Hexane에 Ibuprofen은 잘 용해되지만 Ketoprofen은 100 ppm 정도만 용해되고 t-BME에는 Ibuprofen과 Ketoprofen 모두 잘 용해되기 때문이다. UV검출장치의 파장은 254 nm로 고정하였다.

기본 이동상으로 hexane과 tert-butyl methyl ether(t-BME)를 사용하였으며, pH에 의해 체류시간과 용양인자에 영향을 미치므로 acetic acid를 0.1%로 유지하였다. 이동상 hexane/t-BME/acetic acid의 조성비를 80/20/0.1, 70/30/0.1, 50/50/0.1(%v/v)로 변화를 주면서 분리도, 선택도 등에 미치는 영향을 조사하였다. 그리고 칼럼의 온도를 column heater를 사용하여 25 ºC, 40 ºC, 55 ºC로 변화시켰다.

3. 결과 및 고찰

이동상의 조성과 온도를 변화시켜 선택도 변화를 관찰하였다. 이

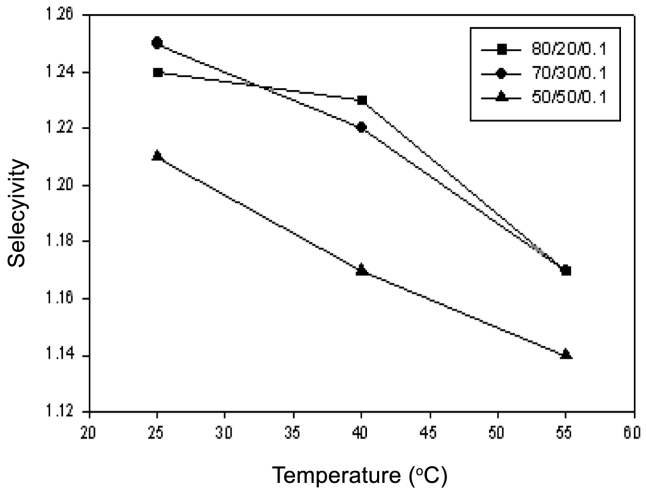

Fig. 3. Selectivity of ketoprofen according to the change of temperature and mobile phase composition of hexane/t-BME/acetic acid, sample loop = 5 μl, concentration = 3,000 ppm, wavelength = 254 nm.

동상의 세조성 물질의 mixing을 위해 Sonic cleaner로 실험 전 약 1시간 동안 mixing을 해주었다. 불감시간인 t_0을 측정하기 위해 t-BME를 사용하였고 그 결과 t_0 = 3 min이었다. 이를 식 (1)에 넣어 선택도를 계산하였다. Fig. 3은 Ketoprofen의 이동상 조성(hexane/t-BME/acetic acid)과 칼럼 온도에 따른 선택도를 그래프로 나타낸 것이다. 이동상 조성비(hexane/t-BME/acetic acid) 70/30/0.1(%v/v)과 25 ºC에서 가장 높은 선택도를 얻었다. 또한 같은 이동상 조성이라도 온도가 높아질수록 선택도는 감소함을 볼 수 있다. Fig. 4의 경우는 Ibuprofen의 경우에 선택도를 계산한 결과이다. 이동상 조성비 80/20/0.1(%v/v)의 25 ºC에서 가장 높은 선택도 수치를 나타냈지만 50/50/0.1(%v/v)에서는 다른 이동상 조성비와 달리 40 ºC에서 제일 높은 선택도를 나타내었다. 두 물질의 선택도를 비교하면 Ibuprofen의 선택도가 Ketoprofen보다 컸다. 이는 Ibuprofen의 체류시간이

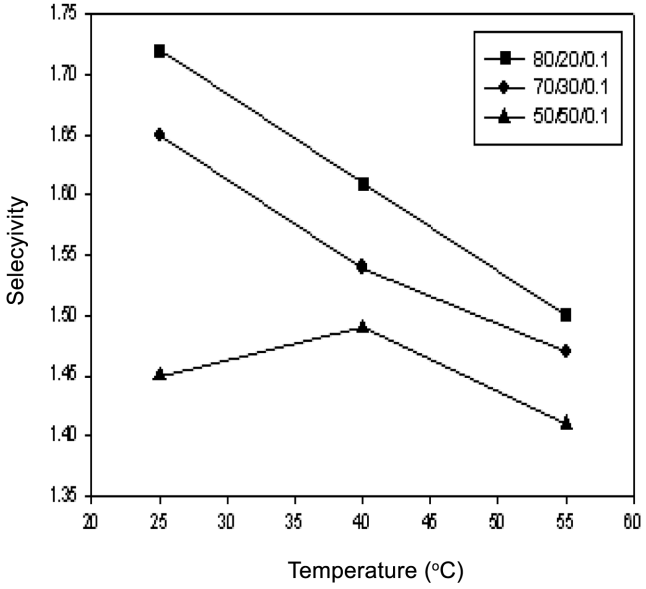

Fig. 4. Selectivity of ibuprofen according to the change of temperature and mobile phase composition of hexane/t-BME/acetic acid, sample loop = 5 μl, concentration = 3,000 ppm, wavelength = 254 nm.

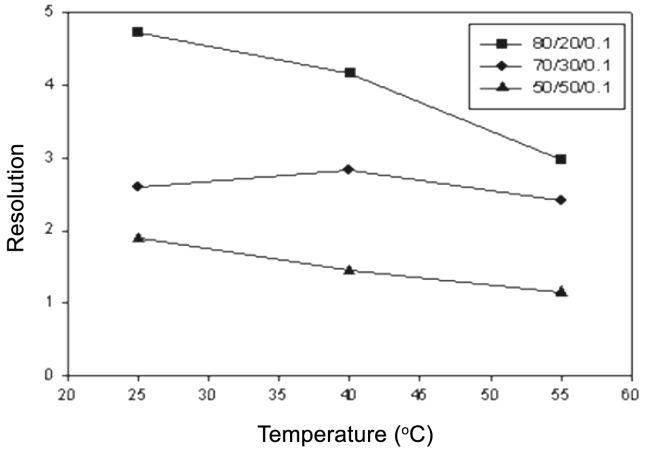

Fig. 5. Resolution of ketoprofen according to the change of temperature and mobile phase composition of hexane/t-BME/acetic acid, sample loop = 5 μl, concentration = 3,000 ppm, wavelength = 254 nm.

Ketoprofen보다 비록 짧았지만 R, S-form의 상대적인 체류시간 비가 Ibuprofen이 Ketoprofen보다 높아 더 높은 선택도를 나타냈다. 또한 Ketoprofen은 70/30/0.1(%v/v)과 25 ºC에서 가장 높은 선택도를 얻었지만 Ibuprofen은 80/20/0.1(%v/v)의 25 ºC에서 가장 높은 선택도를 나타냈다. 그러나 Ketoprofen의 경우 70/30/0.1(%v/v) 25 ºC와 80/20/0.1(%v/v)의 25 ºC의 date를 비교하면 미세한 차이를 보여 두 물질이 공히 80/20/0.1, 25 ºC 조건이 최적 분리 조건으로 사료된다.

Fig. 5는 온도와 이동상 조성에 따른 Ketoprofen의 분리도를 나타낸 것이다. 이 역시 이동상 조성비 80/20/0.1(%v/v)과 25 ºC에서 분리도가 다른 두 조건들의 분리도와 비교하여 상당히 높다. 70/30/0.1(%v/v)에서는 다른 두 조성비와 달리 40 ºC에서 가장 높은 분리도가 나왔다. Fig. 6은 Ibuprofen의 이동상조성비와 칼럼의 온도에 따른 분리도를 계산한 것이다. 온도 25 ºC, 이동상 조성비 80/20/0.1(%v/v) 일 때 가장 높은 분리도를 나타냈다. 온도와 이동상조성비(hexane/t-BME/acetic acid)에서 t-BME의 비가 높아질수록 분리

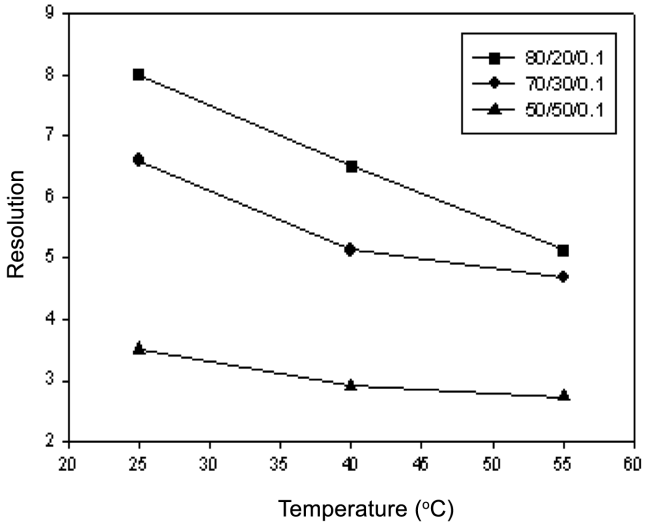

Fig. 6. Resolution of ibuprofen according to the change of temperature and mobile phase composition of hexane/t-BME/acetic acid, sample loop = 5 μl, concentration = 3,000 ppm, wavelength = 254 nm.

도는 작아진다. Ibuprofen과 Ketoprofen의 분리도를 비교하면 Ibuprofen이 Ketoprofen보다 더 높은 수치를 보인다. 이는 분리도는 두 체류시간의 차이 뿐만 아니라 두 peak의 평균 폭까지 고려하여 계산되기 때문이다. 즉 Ibuprofen이 Ketoprofen보다 두 체류시간 차이가 대체적으로 크고 peak의 평균 폭도 더 좁기 때문이다. 선택도와 분리도는 다음의 측면에서 다르게 고려되어져야 한다. 선택도가 R, S-form의 상대적인 체류시간 비를 나타낸 것이면 분리도는 R, S-form의 두 체류시간 차이를 두 peak의 평균 폭으로 나눈 것이다. 분리도 계산에서 선택도처럼 체류시간만으로 계산되는 것이 아니라 peak의 폭도 고려해야 한다. Ketoprofen의 70/30/0.1(%v/v)에서는 다른 조성비와 달리 40 ºC에서 가장 높은 분리도를 보인다. 이동상 조성비 70/30/0.1(%v/v)에서 25 ºC에서의 피크의 체류시간 차이가 조금 더 크지만 두 peak의 평균 폭이 더 크기 때문에 40 ºC에 비해 작은 값을 가진다.

Table 1은 온도와 이동상 조성에 따른 S, R-ketoprofen 중의 이론단수(칼럼의 효율성)를 나타낸 것이다. 25 ºC와 이동상 조성비 80/20/0.1(%v/v)에서 이론단수가 가장 컸다. 같은 조성비라도 온도가 높아질수록 이론단수가 작아졌다. Table 2는 온도와 이동상 조성에 따른 중 S, R-ibuprofen 이론단수를 계산한 것이다. 이동상 조성비 80/20/0.1(%v/v), 25 ºC에서 역시 이론단수가 높았다. 주목할 점은 S-ibuprofen의 이론단수를 R-ibuprofen과 비교하면 같은 조성비에서는 낮은 온도에서 이론단수 차이가 작았다. 이론단수는 식 (3)을 이용해 계산되는데, 체류시간과 peak의 폭이 S-ibuprofen과 R-ibuprofen이 낮은 온도에서 차이가 작기 때문이다. 또 Ketoprofen과 Ibuprofen을 비교하면 가장 높은 이론단수를 가지는 80/20/0.1(%v/v), 25 ºC 같은 조건에서 Ketoprofen이 더 높은 이론 단수를 가진다. 80/20/0.1(%v/v), 25 ºC에서 Ketoprofen이 Ibuprofen보다 체류시간이 크기 때문에 이론단수의 수치가 높다. peak의 폭 역시 변화 요인이 되지만 그보다 체류시간의 차이가 더 큰 영향을 미친다. 또 R, S-form을 비교해보면 체류시간이 긴 R-form이 S-form보다 높은 이론단수를 가진다.

Table 3은 Ketoprofen과 Ibuprofen 모두 선택도, 분리도, 이론단수가 가장 좋은 이동상 조성비 80/20/0.1, 온도 25~55 ºC에서 Ketoprofen

Table 1. Number of plates of S, R-ketoprofen according to the change of temperature and mobile phase

	25 °C		40 °C		55 °C	
	S	R	S	R	S	R
80/20/0.1	9184	10241	9094	10154	6470	8343
70/30/0.1	4207	4663	4060	5067	4044	4582
50/50/0.1	4137	3705	3989	3656	3972	3507

Flow rate = 1.0 ml/min, wavelength = 254 nm, sample loop = 5 μl, mobile phase = hexane/t-BME/acetic acid

Table 2. Number of plates of S, R-ibuprofen according to the change of temperature and mobile phase

	25 °C		40 °C		55 °C	
	S	R	S	R	S	R
80/20/0.1	6400	8400	6000	8000	5200	7000
70/30/0.1	5800	6700	5800	6500	5000	6000
50/50/0.1	3700	4900	3600	4800	3600	4500

Flow rate = 1.0 ml/min, wavelength = 254 nm, sample loop = 5 μl, mobile phase = hexane/t-BME/acetic acid

Table 3. Thermodynamic parameters of ketoprofen and ibuprofen enanioseperaion

	ΔH	ΔS'	ΔΔH	ΔΔS
S - Ketoprofen	−15200	−33.53		
R - Ketoprofen	−16600	−37.42		
S - Ibuprofen	−8600	−22.15		
R - Ibuprofen	−12000	−30.02		
Ketoprofen			−1390	−2.82
Ibuprofen			−3870	−8.32

Flow rate = 1.0 ml/min, wavelength = 254 nm, sample loop = 5 μl, mobile phase = hexane/t-BME/acetic acid

과 Ibuprofen의 용량인자인 k′와 선택도 α를 이용하여 vant Hoff 식 (4,5)에 대입하여 열역학적 매개변수인 엔탈피, 엔트로피 계산한 결과를 표로 나타낸 것이다. 표를 살펴보면 모두 R-form이 S-form보다 절대 값이 크다. 이는 R-form이 S-form보다 고정상에 더 강한 친화력을 가지는 것을 나타낸다[10]. ΔS′는 $\Delta S' = \Delta S + R\ln\phi$로 얻을 수 있으며 S-form이 R-form보다 더 크게나왔다. lnk′와 ΔH/RT의 그래프에서 절편에서 계산되어 나온 ΔS의 값이 R-form이 더 작은 수치를 가졌기 때문이다. ΔH와 ΔS′의 차이점으로 ΔH의 절대 값으로 친화력을 표현하며 ΔS′는 ΔS에 조성비 ϕ가 고려된다는 점이다. Ketoprofen과 Ibuprofen의 ΔH를 비교하면 Ketoprofen의 이동상 조성비 80/20/0.1(hexane/t-BME/acetic acid)에서 Ibuprofen보다 체류시간이 크기 때문에 ΔH 값의 절대 값이 크고 칼럼과의 친화력도 더 높다는 것을 알 수 있다. 선택도인 α를 이용하여 계산하는 ΔH와 ΔΔS는 두 거울상이성질체의 상대적인 체류시간 차이를 이용한 것으로 S-form과 R-form의 ΔH와 ΔS 차이를 의미한다. 식 (4)과 달리 식 (5)은 용량인자 k가 아닌 선택도를 사용한 것으로 선택도가 높은 Ibuprofen의 ΔΔH가 Ketoprofen보다 더 크게 계산되었다. 그리고 (ΔΔH)> T(ΔS)으로 계산되므로 Ketoprofen과 Ibuprofen이 Kromasil 칼럼에서 분리되는 과정은 엔탈피 의존성이라는 것을 확인하였다.

본 실험에서는 거울상 이성질체 의약품인 Ketoprofen과 Ibuprofen을 HPLC를 이용 고정상과 열역학적인상호작용을 연구하기 위해 이동상 조성비(hexane/t-BME/acetic acid)와 온도 변화(25~55 ºC)에 따른 체류시간과 선택도, 분리도, 이론단수 그리고 vant Hoff식을 이용하여 열역학적 매개변수인 엔탈피, 엔트로피 계산하여 최적 분리 조건을 찾고자 하였다. 그 결과 이동상 조성비와 온도 변화가 물질의 분리도, 선택도, 이론단수 등에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 80/20/0.1, 온도 25 ºC에서 가장 높은 분리도, 이론단수, 엔탈피 수치가 계산되었다. 다만 선택도에서 이동상 조성비 70/30/0.1, 온도 25 ºC에서 가장 높은 수치를 나타냈다. 이는 80/20/0.1, 온도 25 ºC의 선택도와 비교하면 거의 차이가 없음을 볼 수 있다. 지금까지의 나온 결과들을 고려하여 이동상 조성비 80/20/0.1, 온도 25 ºC에서 최적 분리 조건을 갖는다.

참고문헌

1. Hyun, M. H., *Separation of Optical Isomers by LC*, Minumsa, Seoul(1996).
2. Boisvert, J., Caille, G, McGilveray, I. J. and Qureshi, S. A., "Quantification of Ketoprofen Enantiomers in Human Plasma Based on Solid Phase Extraction and Enantioselective Column Chromatography," *J. Chromatogr. B*, **690**, 189(1997).
3. Meyring, M., Chankvetadze, B. and Blaschke, G., "Simultaneous

Separation and Enantioseparation of Thalidomide and its Hydroxylated Metabolites using High-Performance Liquid Chromatography in Common-size Columns, Capillary Liquid Chromatography and Nonaqueose Capillary Electrochromatography," *J. Chromatogr. A,* **876**, 157(2000).
4. Pietta, P., Manera, E. and Ceva, P., "Purity Assay of Ketoprofen by High Performance Liquid Chromatography," *J. Chromatogr.,* **387**, 525(1987).
5. Thomas, E. B. and Raymond, P. W. S., "Chiral Chromatography," (1998).
6. Yoon, T. H. and Kim, I. H., "Chiral Separation of Racemate by using Chirex 3005 and Kromasil CHI-II Chral Column," *Korean J. Chem. Eng.,* **21**(2), 521-526(2004).
7. Song, T. H., Suh, S. S., Choi, M. H., Kim, Y. D., Lee, J. K. and Park, D. K., "Optical Resolution of Racemic Ibuprofen by using Chiral Stationary Phase," *HWAHAK KONGHAK*, **38**(3), 373-379 (1999).
8. Kim, S. Y., Lee, J. K., Suh, S. S., Choi, M. H., Park, D. K. and Park, T. J., "Optical Separation of Racemic Ketoprofen by Chiral High-performance Liquid Cromatography," *HWAHAK KONGHAK*, **39**(6), 703(2001).
9. Park, T. H., Yoon, T. H. and Kim, I. H., "Simplistic Determination of Operation Parameters for Simulated Moving Bed (SMB) Chromatography for the Separation of Ketoprofen Enantiomer," *Biotechnology and Bioprocess Engineering.,* **10**(4), 341-345(2005).
10. Yan, H. Y. and Row, K. H., "Optimum Operation Condition for Chiral Speration of Tryptophan Enantiomers Using Ligand Exchange Liquid Cromatogaphy," *Biotech. Bioproc. Eng.,* **12**, 235(2007).