

HPLC를 이용한 ketoprofen racemate의 분리

윤태호, 김형원, 김인호

충남대학교 공과대학 화학공학과 생물공정연구소

전화 (042) 821-7675, FAX (042) 822-8995

Abstract

Ketoprofen racemate is very useful pharmaceutical intermediate, but the hardness of separation to each enantiomer is most a barrier to apply pharmaceutical industry. To overcome this difficulty, we would like to separate S-ketoprofen from ketoprofen racemate. To design suitable mobile phase, hexane and t-BME(tri-buthyl-methyle-ether) were used to elute peaks of ketoprofen racemate separately. When the ratio of hexane/t-BME/acetic acid was 60/40/0.1(%v/v), each component was separated successfully. In order to separate large amount of S-ketoprofen, sample concentration was increased from 100ppm to 2000ppm. In this case, resolution was decreased due to the overlapping of peaks(1.65→0.94).

서론

천연계에 존재하는 대부분의 생체 구성물질들은 광학적으로 거울상을 가진 광학 이성질체로 존재하고 있으며, 특정 화합물은 생체내에서 서로 다른 역할을 수행한다(1). 이러한 광학 이성질체를 chiral 화합물이라 하며, 거울상으로 대칭인 구조를 가지고 있으므로, 임의의 방법을 통하여 서로 일치되는 입체구조를 갖도록 할 수 없다(2). 이러한 chiral 화합물중에서 현재 몇몇의 물질들은 의약품 원료로서 광이성질체의 분리에 대한 관심도가 증가하고 있으며, 범용적이면서도 FDA의 승인을 받아 수년 이내로 산업화가 될 것으로 예상되는 프로펜류 의약품을 대상으로 분리기술의 발전이 시급한 단계이다. 현재는 chiral 화합물의 분리를 수행하기 위한 chiral 고정상이 개발되어 시판되고 있으며, 기존의 효소를 이용한 합성방법에 비하여 크로마토그래피를 이용한 분리공정이 개발되고 있다(3). 본 연구는 ketoprofen 중에서 광학적으로 활성을 갖는 S-ketoprofen을 효과적으로 분리하기 위하여 용매의 조성ة 따른 각 enantiomer들의 분리도 변화와 농도의 변화에 따른 크로마토그램의 변화를 조정하여, 분취에 따른 S-ketoprofen의 분리를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 ketoprofen(국전시약)은 라세미 혼합물로 시판되고 있는 특급시약을 사용하였으며, 이동상으로는 hexane(95%, n-hexane, J. T. Baker, U.S.A), tri-butyl-methyl-ether(99.8%, Aldrich, U.S.A)을 HPLC, acetic acid(특급시약, 동양화학)를 사용하였다.

2. 실험장치

본 실험에 사용한 HPLC는 M-930용매 이송펌프, M-720 UV 검출장치, D520B 기록장치(Young Lin, Korea)이며, 시료 주입장치(Lot. 4995, Rheodyne, USA)에 필요에 따라 각각 20, 100, 200, 1000 μ l의 sample loop를 부착하였다. 또한 칼럼은 Kromasil CHI-II(4.6mm \times 250mm, 100-5CHI-II, Eka-Nobel, Sweden)으로 칼럼내에 chiral selector로써 0,0'-bis(4-tert-butylbenzoyl)-N,N'-diallyl-L-tartar diamid가 실리카에 공유결합되어 충전되어 있으며, column heater(CH-30, Eppendorf, USA)의 내부에 장착하여 일정한 온도에서 실험을 수행하였다.

3. HPLC 운전조건

HPLC의 조작 유속은 0.5에서 1.0ml/min으로 변화하였으며, ketoprofen의 농도는 각각 100ppm에서 2,000ppm까지 농도로 t-BME에 용해시켜 시료를 제조하였다. UV 검출장치의 파장은 254nm에서 흡광도를 기록하였으며, 칼럼의 온도는 40 $^{\circ}$ C에서 실험을 수행하였다. 레코더에서 그려진 크로마토그램의 분리도(R)와 capacity factor(K), 선택도(α)는 다음의 식들로 계산하였다.

$$Resolution(R) = \frac{t_2 - t_1}{(w_2 + w_1)/2} \quad (1)$$

$$Capacity\ factor(K_1) = \frac{t_1 - t_0}{t_0} \quad (2)$$

$$Capacity\ factor(K_2) = \frac{t_2 - t_0}{t_0} \quad (2)$$

$$Selectivity(\alpha) = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{K_2}{K_1} \quad (3)$$

where, t_1, t_2 : retention time of enantiomer

t_0 : zero retention time

w_1, w_2 : peak width

(1) 이동상의 조성에 의한 분리도 변화

기본 이동상으로 hexane과 tert-butyl methyl ether(t-BME)를 사용하였으며, pH의

변화에 따른 분리도를 얻기 위하여 acetic acid를 0.1(%v/v)첨가하였다. 이동상의 조성을 hexane/t-BME = (100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 80/20, 100/0(%v/v))와 같이 변화시켰으며, pH가 분리도에 미치는 영향을 보기 위하여 0.1(%v/v)의 acetic acid를 첨가하였다.

(2) 시료의 농도 변화에 따른 분리도 변화

Ketoprofen racemate를 가능한 고농도에서 각 enantiomer로 분리하기 위하여 시료의 농도에 따른 크로마토그램의 관찰하여 분리도와 선택도를 계산하였다. 또한 시료의 농도를 증가시켜 과량 주입에 의한 분취에 의하여 S-ketoprofen의 분리를 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 이동상의 조성에 따른 체류시간 및 분리도의 변화

이동상의 조성중 hexane과 t-BME의 비를 변화시켜 실험을 수행한 결과, 순수한 hexane을 이동상으로 사용한 경우, 용출이 일어나지 않았으며, acetic acid를 첨가하지 않은 경우, enantiomer의 분리가 일어나지 않았다. 이동상에 acetic acid를 첨가하여 hexane과 t-BME의 비를 변화시킨 경우 t-BME가 증가할수록 체류시간이 감소하였으나, 체류시간의 단축에 비례하여, 분리도의 감소가 발생하였다(Fig. 1). 또한, 이동상과 고정상간의 상호작용이 낮은 pH에서 잘 일어나는데, 이것은 ketoprofen racemate가 acid 형태로 존재하는 것에 기인한다(4).

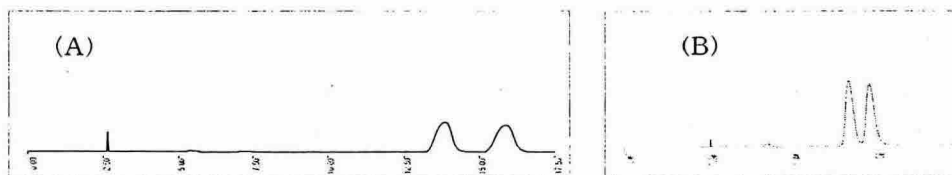


Fig. 1. Variation of retention time at the different mobile phase compositions ((A) Hexane/t-BME/acetic acid=80/20/0.1(v/v); (B) Hexane/t-BME/acetic acid=60/40/0.1(v/v), sample loading amount=20 μ l, concentration=100ppm, wavelength=254nm).

2. 시료의 농도에 따른 체류시간 및 분리도의 변화

시료의 농도를 100ppm에서 2000ppm까지 변화하여 실험을 수행한 경우, 선택도는 약간씩 증가하는 경향을 보였으나, 크로마토그램상에서 피크가 겹치게 되어 분리도는 감소하는 경향을 보였다(Table 1.) 이와같이 피크가 겹치는 현상을 억제하기 위하여 시료의 부피에 대한 영향을 고려하여 칼럼내에서의 dispersion을 최소화하여야 하며, 시료의 농도를 더욱 증가시켜 시료를 과량 주입한 후 분취에 의한 각

enantiomer의 분리를 수행할 수 있다.

Table 1. Selectivity and resolution at different sample concentrations.

	100ppm	500ppm	1000ppm	2000ppm
$t_{R-ketoprofen}(\text{min.})$	8.54	8.32	8.30	8.25
$t_{S-ketoprofen}(\text{min.})$	10.12	9.52	9.50	9.45
α	1.20	1.20	1.22	1.22
R	1.65	1.32	1.01	0.94

Sample loaded amount : $20\mu\text{l}$, wavelength:254nm, mobile phase hexane/t-BME /acetic acid=60/40/0.1, flow rate = 1.0ml/ml

요약

Ketoprofen racemate를 각 enantiomer로 분리하고자 이동상의 조성을 변화하여 실험을 수행한 결과, hexane과 t-BME의 비가 60/40(%v/v)인 경우 적합한 체류시간과 분리도를 얻을 수 있었으며, 이동상의 acetic acid를 0.1%(v/v) 첨가한 경우 낮은 pH에서 분리가 효율적으로 일어났다. 또한, 시료의 농도를 변화시켜 실험을 수행한 경우, 2000ppm까지는 선택도에 큰 변화없이 분리를 수행할 수 있었으나, 농도가 1000ppm이상인 경우 분리도가 1.00미만으로 낮은 값을 보였다.

참고문헌

1. Wainer, I. W. and Drayer, D. E.: "Drug stereochemistry, Analytical methods and pharmacology", (1988), Marcel Dekker Inc., New York & Basel.
2. Kakodkar, S V; Zief, M, "Resolution of derivatized acids and amines on JTB-X: a new urea bonded chiral stationary phase", (1990), *Chirality*, 2(2), 124.
3. Francotte, E. R., Richert, "Applications of simulated moving-bed chromatography to the separation of the enantiomers of chiral drugs", (1997), *J. Chromatogr. A*, 769, 101.
4. A. E. Gindy, A. Ashour, L. A. Fattah and M. M. Shababa, "Application of LC and HPTLC-densitometry for the simultaneous determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide", (2001), *J. Pharm. & Biomedical anal.*, 25(2) 171.