

## HPLC를 이용한 키랄의약품의 광학분할에 관한 연구

윤지연\*, 김소영\*, 이중기, 박대진, 박달근, 서성섭\*  
한국과학기술연구원 나노환경 연구센터, 홍익대학교 화학공학과\*

### Optical separation of chiral drug by using HPLC

Jee Yeon Yoon\*, So-Young Kim\*, Joong Kee Lee,  
Tae-Jin Park, Dalkeun Park, Sung-Sup Suh\*  
Eco-Nano Reserch Center, KIST,  
Department of Chemical Engineering, Hongik University\*

#### 서론

생체는 본질적으로 비대칭이기 때문에 키랄 환경으로 작용하며 따라서 두 광학 이성질체는 생체 내에서 서로 다른 특성을 나타낼 수 있다. 즉, 한 쌍의 광학 이성질체 중 단지 하나의 광학 이성질체만이 약리 활성을 나타내며 다른 광학 이성질체는 아무런 약리 활성을 나타내지 않거나 혹은 독성을 갖고 있는 경우가 많이 보고되고 있다[1]. 의약품 생산에 있어서는 원하는 성질의 순수한 물질만을 얻는 것이 대단히 중요하기 때문에 키랄 의약품을 고순도로 분리 및 정제하는 것이 더욱 필요해지고 있다. Chiral chromatography는 이성질체의 고정상이나 첨가물의 매개체와 분석물질의 상호작용을 이용한 분리방법으로 짧은 시간동안 거울상 이성질체를 부분입체 이성질체로 형성하여 분리를 가능하게 하는 것으로 안정한 착물을 형성할수록 더 분리가 잘 되는 것으로 알려져 있다. 단일 이성질체의 키랄 약품 개발 방향은 새로운 합성방법 개발과 기존 라세미 혼합물을 분리하는 방법이 있으나, 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 단일 이성질체 분리 기술은 asymmetric 합성방법과 같은 새로운 합성방법에 비해 시간과 개발비를 크게 줄일 수 있는 장점이 있다[2]. 이와 같은 장점 때문에 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 한 쌍의 광학 이성질체로 존재하는 키랄 의약품을 분리하는 기술은 학문적 관심과 더불어 실용을 위한 학문으로 발전하고 있는 것이다.

본 연구의 대상물질인 키랄의약품 [(R,S)-1-butyl-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-piperidine carboxamide], bupivacaine은 산부인과용 국소마취제로 많이 사용되는 물질이며 S(-)-enantiomer는 마취제로서의 약리적 특성을 가진 반면 R(+)-enantiomer는 중추신경과 심장혈관에 독성을 끼친다고 보고된 바 있다[3]. 또한 경구투입이나 피하주사로 투여될 경우 S(-)-enantiomer의 경우가 혈장 내에 좀 더 오래 머물러 국소 마취제로서의 역할을 더 오래하는 것으로 밝혀졌다[4].

본 실험에서는 라세미 혼합물상대인 bupivacaine으로부터 독성을 가진 R(+)-enantiomer의 광학분리를 위해 bupivacaine의 분자식에 근거하여 선택된 키랄 분리용 고정상 물질을 사용한 컬럼을 가지고, 이동상의 유량, 시료의 종류와 농도에 따른 분리도, 이론단수, 분리인자의 변화 경향을 실험하였다. 또한 분리도에 미치는 인자를 조절하면서 라세미 bupivacaine의 분리도를 높일 수 있는 실험조건을 조사하였다.

#### 이론

본 실험에서 얻은 분리결과를 정량적으로 표현해 주기 위해서 분리도(resolution), 이론단수(the number of theoretical plates), HETP(height equivalent to a theoretical plate), 용량인자(capacity factor) 등을 정의하여 사용하였다.

분리도(R)는 두 물질 간의 분리 정도를 나타내며 아래의 식으로 정의된다. 체류시간과

peak 폭의 단위가 길이 또는 시간으로 표시되므로 분리도는 무차원이 된다.

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

$t_1, t_2$ 는 시료 1, 2의 체류시간이며,  $w_1, w_2$ 는 시간단위로서 peak 1, 2의 기준선에서의 폭이다.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2)$$

$t_R$ 은 용질의 칼럼 안의 체류시간,  $t_0$ 은 고정상과 상호작용이 없는 물질의 체류시간 (dead time)이다. 칼럼의 효율은 baseline에서 측정된 peak의 폭( $w$ )을 이용한 다음 식에 의해서 계산하였다.

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

$\sigma$ 는 표준편차이고, 실험에서 얻은 peak로부터  $N$ 값을 구하고 column의 길이  $L$ 을 알면 다음과 같은 관계식으로부터 HETP( $H$ )를 구할 수 있다. HETP는 관내의 충전물과 시료에 대한 관의 효율을 나타낸다. HETP는 이동상의 유속, 이동상의 조성, 관의 온도, 시료의 주입량 및 관의 크기와 같은 실험변수에 의해 주로 영향을 받는다.

$$H = \frac{L}{N} \quad (4)$$

컬럼의 선택도( $\alpha$ )는 peak사이의 상대적인 분리에 의해 측정되며 다음과 같은 식에 의해서 구한다.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_m}{t_{R1} - t_m} = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (5)$$

## 실험방법과 장치

### 1. 시약

분리 대상물질 [(R,S)-1-butyl-N-(2,6-dimethylphenyl)-2-piperidine carboxamide], bupivacaine hydrochloride 는 Sigma Aldrich 제품을 사용하였으며 실험에 사용된 이동상 용매로는 hexane[95% n-hexane], 2-propanol[Baker analyzed<sup>®</sup> HPLC reagent], acetic acid[Baker analyzed<sup>®</sup> HPLC reagent], triethylamine[99.5%, Aldrich Chemical Co.]을 사용하였다. Chiral 고정상은 Kromasil<sup>®</sup> (Eka chem., Sweden)이며 O,O-bis(4-tert-butylbenzoyl)-N,N-diallyl-L-tartar diamide의 chiral monomer가 silica에 결합된 것으로 particle size는 10  $\mu m$ , pore size는 100 Å이다.

### 2. 실험장치

실험에서 사용한 HPLC 시스템은 고압펌프 (Young-Lin M930), injection system (syringe and sample loop), gradient mixer (Waters), UV spectrometer (Young-Lin M720), 및 data aquisition (Young-Lin, Autochromin) 등으로 구성되어 있다.

본 실험에서 사용된 HPLC 칼럼은 Kromasil<sup>®</sup> 충전제(Eka chem., Sweden)를 사용하여 자체 제작하였다. 팩킹 물질을 충전하기 위한 장치로는 slurry packer(Alltech model 1666)를 사용하였다. 팩킹은 내경이 10mm, 길이가 100mm인 stainless-steel 칼럼 (Alltech)에 슬러리 팩킹하였다. Kromasil<sup>®</sup>에 사용된 슬러리 용매는 methanol/acetone [50/50, v/v%] 혼합물이었고, 가압 용매로는 methanol을 사용하였다.

### 3. 실험방법

대상물질인 bupivacaine의 용해도를 높이기 위해서 염 상태의 bupivacaine HCL을 DCM(Dichloromethane)에 녹인 뒤 포화시킨  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 가했다. 이 상태에서 약 1 분가량 흔들어준 후 DCM을 증발시키고 얻어진 결정을 hexane/IPA를 92:8로 섞은 용매에 녹였다. Feed의 농도는 15mg/ml이다.

실험은 상온에서 수행하였으며 칼럼은 실험을 시작하기 전 정상상태에 이를 때까지 충분한 시간 동안 이동상으로 씻어 주었다. 시료의 주입은 0.05ml 주사기를 사용하였고, 이동상의 흐름을 조절하기 위해 HPLC 펌프를 사용하여 이동상의 흐름을 변화시키면서 실험하였다. 유출되는 성분은 UV detector의 absorbance값을 240nm에서 검출한 뒤 데이터 모듈에 연결시켜서 모듈에서 PC로 데이터를 전달하여 peak의 면적과 높이, retention time 등을 얻을 수 있었다.

### 결과 및 고찰

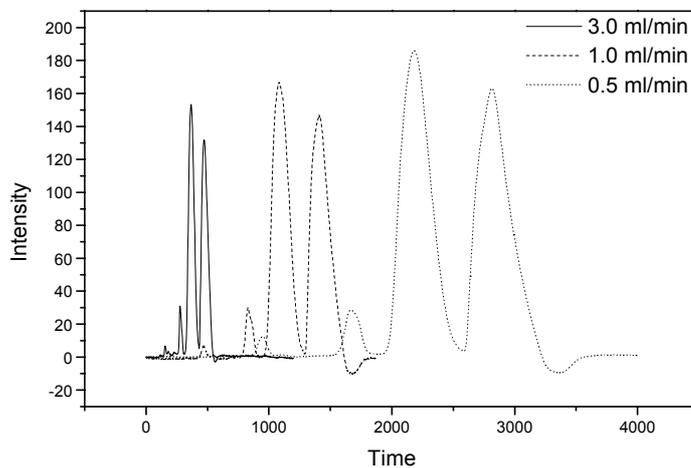


Fig. 1. Chromatogram of R-bupivacaine and S-bupivacaine from Kromasil<sup>®</sup> column at various flow rate.

(Injection volume of 10 $\mu$ l)

본 연구에서는 고부가가치를 갖고 있는 거울상 이성질체 의약품인 라세미 bupivacaine을 HPLC 키랄 고정상법을 이용하여 단일 enantiomer로 광학분리하기 위한 조업 조건을 찾는 실험을 수행하였다.

라세미 bupivacaine 분리를 위해 Kromasil<sup>®</sup> 컬럼에서 시료의 주입농도는 15mg/ml, 이동상 유속의 범위는 0.5~ 3.0ml/min까지 0.5ml 씩 증가하며 실험을 하였다.

이동상 용매는 hexane[95% n-hexane]/2-propanol/acetic acid/triethylamine의 조성비가 99/1/0.3/0.05(v/v%)로 되도록 만들어서 사용하였다.

분리결과를 살펴보면 figure 1에서 볼 수 있듯이 이동상 유속이 3.0ml/min일 때는 R-bupivacaine과 S-bupivacaine의 retention time이 각각 6.1분과 7.9분인 반면 이동상 유속이 0.5ml/min 일 때는 각각 36.300분과 46.933분으로 크게 증가하였다. 크로마토그램에서 알 수 있듯이 유량이 감소할수록 peak이 broadening되는 현상이 관찰되었고 tailing도 심한 편이었다.

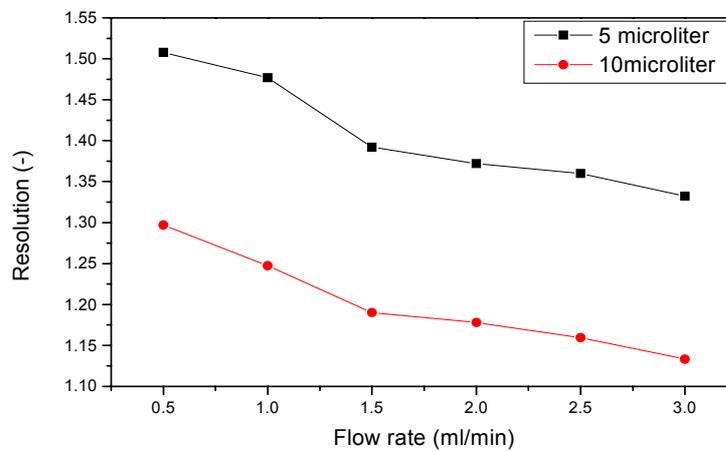


Fig. 2. Effect of the eluent flow rate on the resolution at various injection volume of bupivacaine for Kromasil<sup>®</sup> column.

Figure 2는 Kromasil<sup>®</sup> 컬럼을 이용하여 시료 주입부피에 따른 분리도의 영향을 유량을 증가시키며 실험한 결과이다. 주입부피는 5 $\mu$ l와 10 $\mu$ l의 sample loop를 이용하여 변화시켰다. 그 결과 주입부피가 증가할수록 분리도는 감소함을 알 수 있었다.

### 참고문헌

- [1] 현명호, "LC에 의한 광학 이성질체의 분리", Chapter 2(1996).
- [2] Yoshio, O., Ryo, A., Kazuhiro, H. and Koichi, H., J. of Chromatography B. 53, 701, (1997).
- [3] Mather, L. E., Brit. J. Anaesth., 67, 239(1991).
- [4] Nath, S., Nagmark, S. and Johansson, G., Anaesth. Anlog., 65, A223 (1985).