

## Kromasil HPLC 칼럼을 이용한 Ibuprofen의 분리특성 연구

박준섭 · 김병립 · 윤태호 · †김인호

충남대학교 화학공학과

(접수 : 2005. 5. 17., 게재승인 : 2005. 6. 24.)

## Separation Characteristics of Ibuprofen in Kromasil HPLC Column

Joon Sub Park, Byung Lip Kim, Tae Ho Yoon, and In Ho Kim†

Department of Chemical engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received : 2005. 5. 17., Accepted : 2005. 6. 24.)

Chiral separation of racemic ibuprofen was achieved on a Kromasil KR100-5CHI-TBB column. Some chromatographic parameters (resolution, number of theoretical plates, HETP, capacity factor) are calculated under different separation conditions such as change of mobile phase compositions (hexane / t-BME = 85 / 15, 75 / 15, 65 / 35, 55 / 45) as well as acetic acid concentrations for adjusting pH (0.1 to 1 v/v%). Flow rate versus number of theoretical plates and HETP were compared to evaluate column efficiency. To determine the adsorption isotherms, PIM (Pulsed Input Method) was carried out. At concentrations of racemic ibuprofen between 0.1 and 0.3 mg/ml, S- and R-ibuprofen have the same retention time of 4.48 and 5.81 min. Ibuprofen isotherms show a linear form under concentrations of 0.3 mg/ml with eluent (hexane / t-BME = 55 / 45).

**Key Words** : Ibuprofen, chiral separation, HPLC, PIM

### 서론

의약품 개발분야는 고부가가치 산업으로 관심의 대상이 되고 있다. 이러한 의약품 중에서 어떤 두 분자가 서로 겹칠 수 없는 3차원적 구조에 기인하여 서로 완전히 겹치지 않는 거울상을 가질 때 이를 거울상 이성질체라고 하며, 키랄 의약품으로 분류된다. 거울상 이성질체는 물리적, 화학적 성질이 동일하여 서로 구분되진 않지만, 인체 내에서 서로 다른 약리작용을 하여 부작용을 일으키는 경우가 있다. 그러므로 두 거울상 이성질체로 구성되어있는 의약품은 임상 실험 단계에서 반드시 순수한 거울상 이성질체로 분리하여 생리활성을 시험하여 인체 유해성 여부를 판별하여야 한다. 1992년 미국 식품의약국 (Food and Drug Administration)에서는 키랄 의약품에 대한 지침을 발표하였다. 이 지침에 따르면, 새로이 개발되는 키랄 의약품은 두 광학 이성질체 각각에 대한 약리학 및 독성학적 특성, 인체 내에서의 안정성 및 상호전환 등에 관한 사실들이 밝혀져야 한다는 것이다. 그 결과 전 세계적으로 키랄 의약

품 분리에 대한 관심이 급증하였으며, 키랄 화합물의 단일 enantiomer들의 개발을 위한 연구가 수행되고 있다(1).

크로마토그래피를 사용한 혼합물의 분리는 다른 분리 방법에 비해 낮은 에너지를 사용하는 장점이 있으며, 특히 상온에서 분리가 주로 이루어져 열에 민감한 의약품이나 생약 제등의 분리에 적합하다(2). 대상물질인 (R, S)-ibuprofen [(R, S)-2-(4-isobutyl phenyl) propionic acid] (이하 ibuprofen)은 Fig. 1.에서 보는 바와 같이 한 개의 chiral center를 가지고 있으며 이로 인해 두개의 이성질체가 존재한다. 이 중 (S)-ibuprofen만이 약리학적으로 항염증작용을 하는 것으로 알려져 있다(3).

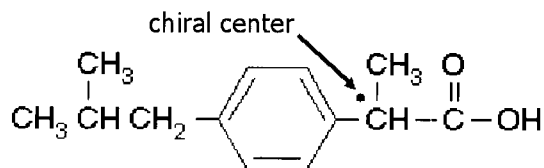


Figure 1. Chemical structure of ibuprofen and its chiral center.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering  
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea  
Tel : 82-42-821-5685, Fax : 82-42-821-8873  
E-mail : ihkim@cnu.ac.kr

본 연구에서는 ibuprofen의 분리 특성을 분석하기 위한 지표로 분리도 (resolution), 이론단수 (number of theoretical plates), 이론단높이 (HETP; Height Equivalent to a Theoretical Plate), 용량인자 (capacity factor)를 사용하였고,

Pulsed Input Method (PIM)를 사용하여 등은 흡착식을 구하였다.

분리도  $R$ 은 한 성분이 인접한 다른 성분과 어느 정도 정량적으로 분리되어 있는지를 표시하는 값이며 Eq. (1)에 의해 정의된다. 체류시간과 피크의 폭의 단위가 길이 또는 시간으로 표시되므로 단위는 무차원이 된다.

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

여기에서  $t_1, t_2$ 는 시료 1, 2의 체류시간이며,  $w_1, w_2$ 는 피크 1, 2의 baseline에서의 폭이며 시간 단위로 표시한다. 이론단수 ( $N$ )는 칼럼의 길이, 충전제의 입자모양 및 표면적, 이동상에 의존하여 액체 크로마토그래피에서는  $10^3$  정도의 이론단수를 갖는다(1). 본 실험에서는 Eq. (2)에 의해서  $N$  값을 구하였다.

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

여기에서  $t_R$ 은 용질의 칼럼 안에서의 체류시간이고,  $\sigma$ 는 표준편차이다. 실험에서 얻은 피크로부터  $N$ 값을 구할 수 있다. 실험에서 얻은 피크로부터  $N$ 값을 구할 수 있고, 칼럼의 길이  $L$ 을 알면 Eq. (3)에 의해 HETP를 구할 수 있다.  $N$ 은 칼럼의 길이에 비례하여 증가하기 때문에 칼럼의 효율을 측정하는 척도로서는 HETP가 사용되어지는 것이 일반적이다.

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (3)$$

용량인자는 고정상과 이동상중의 용질량의 비로서 Eq. (4)에 의해 얻을 수 있으며, 2상 사이의 용매변화 등에 따라서 성분의 머무름이 변화할 수 있음을 나타내는 지표이다(4).

$$k' = \frac{M_s}{M_m} = \left(\frac{t_i - t_0}{t_0}\right) \quad (4)$$

여기에서  $t_0$ 는 용매 경계면이 칼럼 출구에 도착하는 시간으로서 분석시료가 이동상 내에서 용해되지 않는 경우의 체류시간에 상응하며 칼럼 dead time이라 부르기도 한다. 실험적으로 가장 적합한  $k'$ 값의 범위는  $1 \leq k' \leq 10$ 으로 알려져 있다(5).

등온흡착식을 결정하는 방법은 전통적으로 정적 방법에 의해 측정되는데, 이 방법은 용액에 흡착제를 넣어 용질의 농도변화를 측정하고 이로부터 등온흡착 곡선상의 점들을 각각 구하는 것이다. 그러나 이 방법은 정확한 측정을 위해서 필요한 용질과 흡착제의 양이 너무 많으며, 평형의 도달 여부에 대한 불확실성과 실험 시간이 많이 소요되는 단점을 지니고 있다. 또한 동적인 방법으로서 가장 많이 사용되는 frontal analysis는 단일 성분의 흡착곡선 측정에

적합하므로 라세미 화합물이 분리되어 나오는 대장체들의 흡착곡선의 측정에는 적합하지 않다(6). 따라서 본 논문에서는 Pulsed Input Method (PIM, 7)을 사용하여 ibuprofen의 등은 흡착식을 결정하였다.

시료의 농도가 충분히 낮아 두 성분 상호간에 비경쟁적인 선형 등온흡착식의 거동을 따르는 경우 고정상에 흡착된 시료의 양은 Eq. (5)와 같이 표현된다.

$$C_{Si} = H_i \cdot C_{Mi} \quad (5)$$

그리고,  $t_R$ 과  $H$ 와의 관계는 Eq. (6)와 같이 정의된다(8).

$$t_R = t_0 \cdot \left(1 + \frac{(1-\epsilon)}{\epsilon} \cdot H_i\right) \quad (6)$$

여기에서  $H$ 는 Henry 상수로서 고정상과 용리액간의 평형상수이다.  $t_R$ 과  $t_0$ 는 실험에 의해 구할 수 있으며, Eq. (6)에 의해서  $H$ 를 구하여 Eq. (5)에 대입하여 고정상에 흡착된 농도 ( $C_s$ )를 구할 수 있다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

분리대상 물질인 ibuprofen은 Sigma aldrich사의 제품을 별도의 정제과정 없이 이동상과 동일한 용매에 용해시킨 후 멤브레인 필터 (0.22  $\mu\text{m}$  GVPP, Millipore, USA)를 통한 여과 과정만을 거친 후 사용하였다. 이동상 용매는 hexane (95% n-hexane, J. T. Baker, USA), tert-butyl methyl ether (t-BME, J. T. Baker, USA), acetic acid (Assay min. 99.7%, Junsei Chem., Japan)를 사용하였으며, hexane, tert-butyl methyl ether는 멤브레인 필터 (0.22  $\mu\text{m}$  GVPP, Millipore, USA)를 통한 여과 과정을 거친 후 sonicator (Brason, USA)로 20분간 탈기한 후 사용하였다.

### 기기 및 장치

실험장치는 용매 이송 펌프 (6000A Solvent delivery system, Waters, USA)와 검출기 (Model M720, Younglin, Korea)를 사용하였다. 칼럼은 Kromasil KR100-5CHI-TBB (4.6 mm  $\times$  250 mm, particle size = 5  $\mu\text{m}$ , Eka Chemical, Sweden)를 구입하여 사용하였다. 데이터 수집 시스템으로 Clarity (DataApex, ver. 2.1.0.15, Czech)를 사용하였다.

### 실험방법

이동상은 hexane / t-BME (v/v%)로 사용하였으며, pH 조정을 위해 acetic acid를 첨가하여 사용하였다. 실험은 상온에서 수행하였으며 칼럼은 실험을 수행하기 전 정상상태에 이를 때까지 충분한 시간동안 이동상을 흘려주었다. 시료의 주입은 100  $\mu\text{l}$  주사기를 사용하였고, 샘플 루프는 20  $\mu\text{l}$ 를 사용하였다. 검출기의 wavelength는 220 nm로 실험하였다.

첨가제인 acetic acid의 농도가 ibuprofen의 분리에 미치는

영향을 보기 위하여 칼럼 구입처인 Kromasil(9)에서 제공하는 이동상 조성 hexane / t-BME (75 / 25)에서 acetic acid의 농도를 0.1 v/v%에서 1 v/v%까지 변화시키며 실험하였다. 이동상의 조성 변화가 ibuprofen 분리에 미치는 영향을 보기 위한 실험으로 hexane / t-BME의 조성을 (85 / 15), (75 / 25), (65 / 35), (55 / 45)로 변화시키며 실험하였다. 이때 주입된 ibuprofen의 농도는 1 mg/ml였다. 이동상의 유속을 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ml/min으로 변화시키며 실험조건에 따른 크로마토그램의 변화를 관찰하였다.

Ibuprofen을 Kromasil KR100-5CHI-TBB column을 이용하여 분리한 후 분리된 두 enantiomer들의 등온흡착식을 구하기 위해 PIM을 사용하였다. 이동상 hexane / t-BME의 조성이 55 / 45에서 1 v/v%의 acetic acid를 첨가하고, ibuprofen을 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml의 농도로 주입하였다.

**결과 및 고찰**

Acetic acid의 농도변화에 따른 체류시간의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. Acetic acid의 농도가 증가할수록 체류시

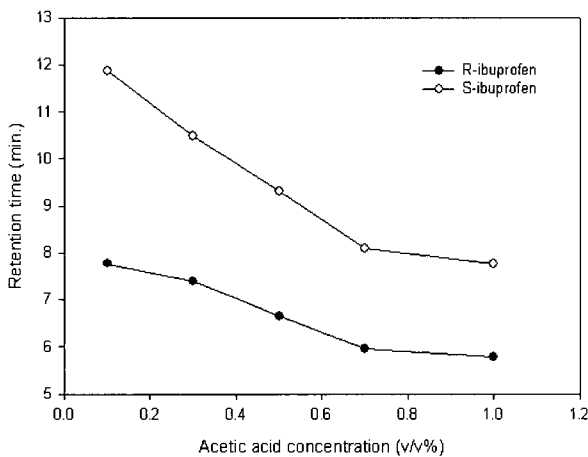


Figure 2. Effect of acetic acid concentrations on retention time in mobile phase (hexane/t-BME = 75/25).

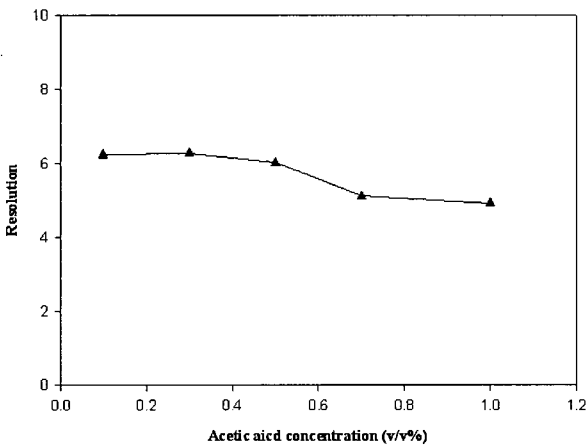


Figure 4. Effect of acetic acid concentration on resolution in mobile phase (hexane/t-BME=75/25).

간 ( $t_R$ )이 단축되고, 용량인자 ( $k'$ )도 감소하는 경향을 확인할 수 있었다(Fig. 3). Acetic acid가 분리도 (Resolution)에 미치는 영향은 앞의 두 경우에 비해 감소의 경향이 적은 것을 확인하였다(Fig. 4). 분리도의 값이 1.5의 경우 baseline까지의 분리가 이루어진다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 ibuprofen은  $R_S = 4$  이상의 완전한 분리가 이루어짐을 알 수 있다.

용량인자가 hexane의 조성이 감소함에 따라 감소하는 경향을 Fig. 5에 나타내었다. 용량인자 ( $k'$ )가 분리도에 미치는 영향은 용매세기 (solvent strength)에 기인한다. 용매세기란 이동상인 용매가 시료성분을 이동시키는 정도를 뜻한다. 용량인자가 작을 경우 용매세기가 강하다고 말하고, 반대의 경우 용매세기가 약하다고 정의된다. 이동상 내에서 비극성 용매인 hexane의 조성이 감소함에 따라 이동상의 극성이 증가하여 극성을 지닌 고정상에 대한 용매 세기가 강해져서 ibuprofen의 체류시간을 단축시켰고, 분리도의 감소 경향을 보였다고 사료된다. 조성 변화에 따른 분리도의 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 모든 실험 조건에서 정성분석 조건을 충족시키는  $R_S = 5.59$  이상의 값을 얻을

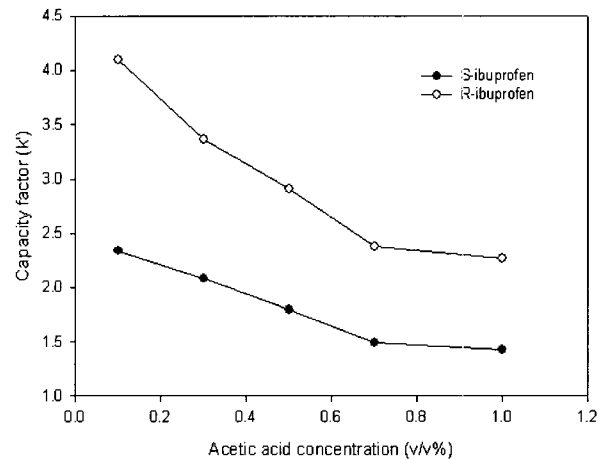


Figure 3. Effect of acetic acid concentration on capacity factor in mobile phase (hexane/t-BME=75/25).

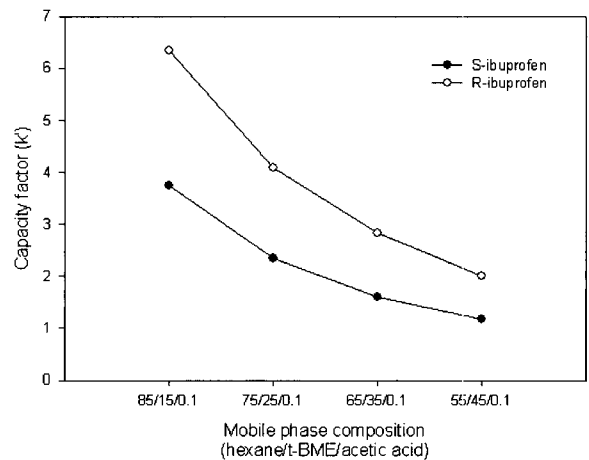


Figure 5. Effect of mobile phase composition on capacity factor.

수 있었다. Fig. 7에 이동상 조성비에 따른 ibuprofen의 크로마토그램을 나타내었다. 이동상 내에서 hexane의 조성비가 증가할수록 ibuprofen의 두 enantiomer들의 체류시간이 길어져 용량인자와 분리도가 증가한 반면, 피크의 폭이 넓어지는 현상을 볼 수가 있다. 따라서 분리도와 체류시간의 결과를 종합하여, 기준 이상의 분리도를 갖고 분리시간을 단축할 수 있는 hexane / t-BME의 조성비가 55 / 45일 때 1%의 acetic acid를 첨가했을 때의 용매가 최적의 이동상이라고 사료된다.

유속이 ibuprofen의 분리에 미치는 영향을 확인하기 위하여 위에서 결정한 이동상을 가지고 acetic acid 1%를 첨가하여 ibuprofen 1 mg/ml를 주입한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 유속은 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 ml/min으로 변화를 주었다. 실험결과 이동상의 유속이 증가할수록 체류시간이 감소하게 되어 분리도가 감소하는 것을 볼 수 있다. 유속에 따른 칼럼의 효율을 살펴보기 위해 Eq. (2)를 이용하여 이론단수 (number of theoretical plates)를 구하고 Eq. (3)을 이용하여 HETP 값을 계산하여 Fig. 9와 Fig. 10에 각각 나타내었다. 시료는 충전물 표면과 세공 내에서의 유속에 의한 물

질전달에 영향을 받게 되는데 이동상의 유속이 낮아지면 이동상의 진행방향에 따라서 시료의 확산이 증가하게 되어 피크의 폭이 증가하게 된다. 유량이 증가하면 이동상 내의 시료가 칼럼 내에서 물질전달저항에 의해 고정상과의 접촉시간이 줄어들게 되어 체류시간이 짧아진다. 이로 인하여 칼럼의 이론단수는 작아지고 HETP는 증가하는 경향을 보인다.

Ibuprofen의 두 enantiomer들의 등온흡착식을 결정하기 위하여 동적 흡착방법인 PIM을 사용하였다. 동적 방법에 의해서 등온흡착식을 구하는 경우 흡착결과 흡착제 사이에 물질전달의 영향이 존재하게 된다. Fig. 10은 물질전달에 영향을 줄 수 있는 주입부피, 이동상의 유속, 이동상의 조성비와 같은 실험조건을 일정하게 유지하고 racemic ibuprofen의 농도만을 변화시켜 구해진 크로마토그램이다. Fig. 11로부터 증가된 racemic ibuprofen의 농도에 대한 체류시간을 알 수 있고, 농도가 증가할수록 Langmuir 등온흡착식을 따르는 비선형 거동을 보였으며, 각 성분의  $t_R$ 이 감소하였음을 Fig. 12에 나타내었다. 주입 농도가 0.1 mg/ml에서 0.3 mg/ml 사이에서는 체류시간이 S-ibuprofen은

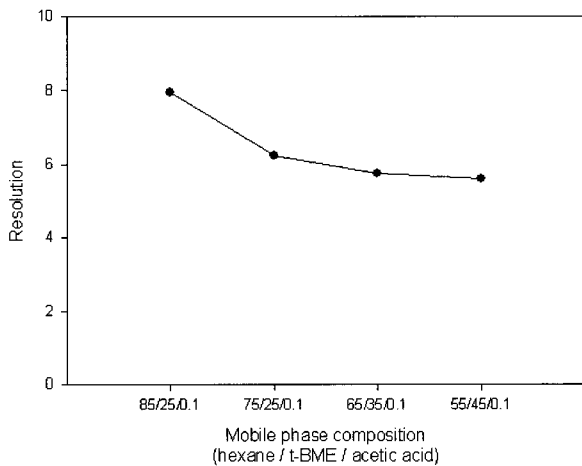


Figure 6. Effect of mobile phase composition on resolution.

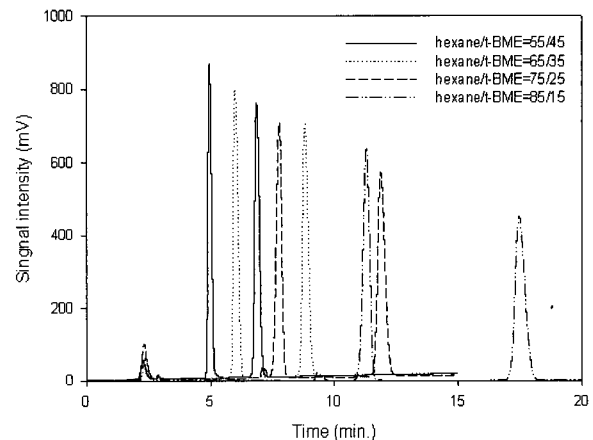


Figure 7. Chromatograms of ibuprofen with change of mobile phase compositions.

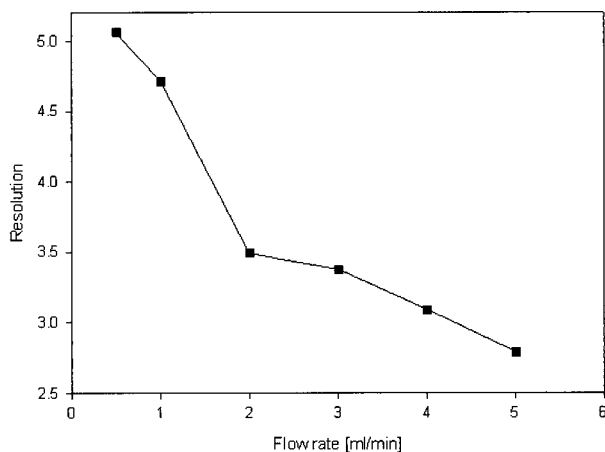


Figure 8. Effect of the mobile phase flow rate on the resolution of ibuprofen for Kromasil KR100-5CHI-TBB column. Injection concentration of 1 mg/ml and injection volume of 20  $\mu$ l.

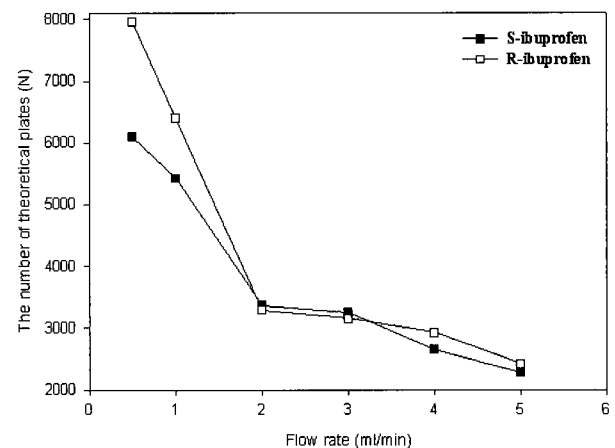


Figure 9. Effect of flow rate on the number of theoretical plates of S-, R-ibuprofen. Injection concentration of 1mg/ml and injection volume of 20  $\mu$ l.

4.48분, R-ibuprofen은 5.81분으로 측정되어  $t_R$ 에 변화가 없는 선형 조건에 위치하였으며, 이로부터 선형 크로마토그래피 영역 예측이 가능하였다. 각 데이터 포인트에서의 피크의 체류시간 ( $t_R$ )과 dead time ( $t_0$ )을 Eq. (6)에 대입하여 Henry 상수  $H$ 를 계산하였고, 이 값을 Eq. (5)를 사용하여 고정상에서의 농도 ( $C_s$ )를 구하여 Fig. 13에 등온흡착곡선을 나타내었다. 회귀분석에 의해 각 enantiomer에 대한 등온흡착식을 추산하였다. 등온흡착식은 Eq. (7), Eq. (8)과 같다.

$$C_{s,S} = \frac{1.178C_{M,S}}{1 + 0.019C_{M,S}} \quad (7)$$

$$C_{s,R} = \frac{1.866C_{M,S}}{1 + 0.017C_{M,S}} \quad (8)$$

이상의 결과로부터 이동상의 조성비, 이동상의 유속, 주

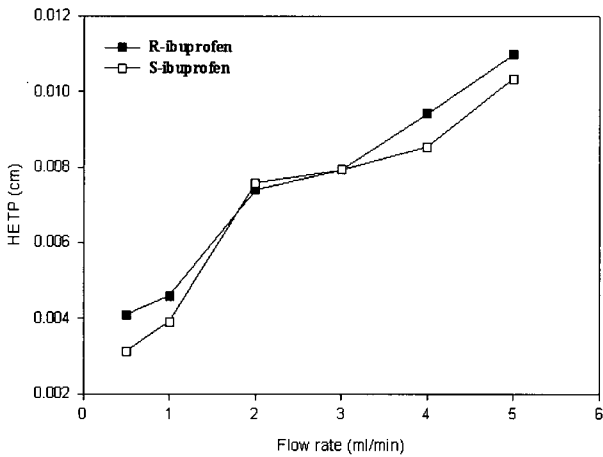


Figure 10. Effect of flow rate on HETP of S-, R-ibuprofen. Injetion concentration of 1mg/ml and injection volume of 20 $\mu$ l.

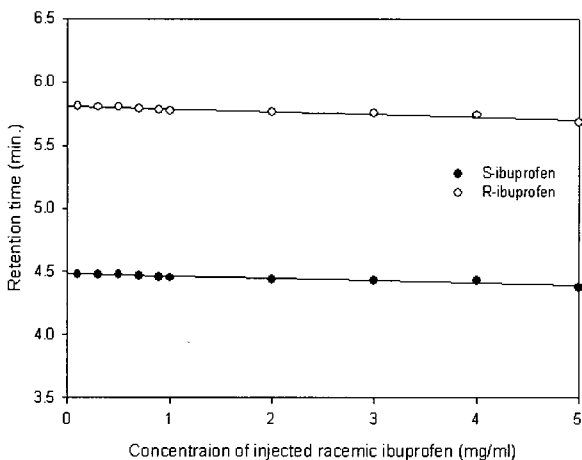


Figure 12. Retention time of ibuprofen enantiomers at different concentrations.

입농도와 같은 조업조건의 변화와 ibuprofen의 체류시간 사이의 상관관계를 규명함으로써 크로마토그램의 시간적 또는 경제적 조각과 분리도를 향상시키는데 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

### 요약

Kromasil KR100-5CHI-TBB 칼럼을 사용하여 HPLC를 통한 비스테로이드 계통의 진통 및 소염제인 racemic ibuprofen의 분리특성을 연구하였다. 이동상의 조성비 변화에 따른 분리도 (resolution), 이론단수 (number of theoretical plates), 이론단 높이 (HETP; Height Equivalent to a Theoretical Plate), 용량인자 (capacity factor)를 계산하고, 그 결과 정성분석 기준치 이상의 분리도를 갖고 분리시간을 단축할 수 있는 hexane / t-BME의 조성이 55 / 45일 때 1%의 acetic acid를 첨가했을 때의 용매를 최적의 이동상으로 결정했다. 유속에 따른 칼럼의 효율을 비교하기 위한 실험을 통해 유속의 상승은 칼

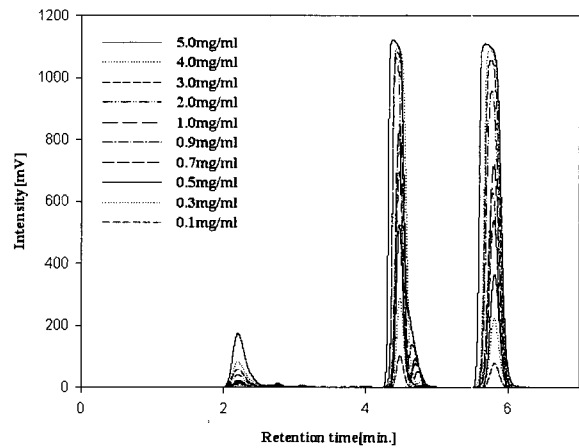


Figure 11. Elution profile of ibuprofen with increase of concentration for Kromasil KR100-5CHI-TBB. Mobile phase flow rate of 1 ml/min, mobile phase composition of hexan/t-BME(55/45), 1v/v% acetic acid added.

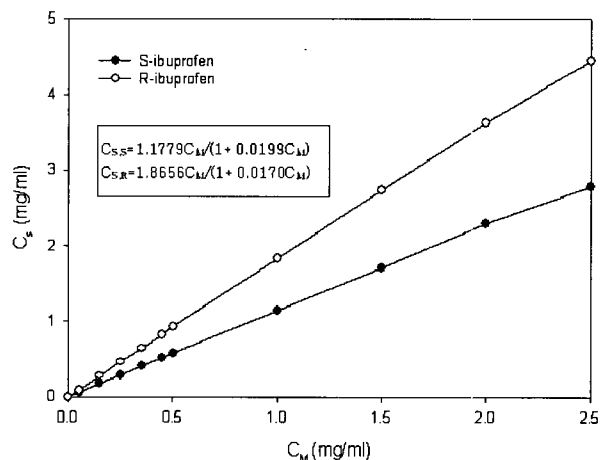


Figure 13. Adsorption isotherms of ibuprofen enantiomers.

럼의 효율의 감소를 야기하고, 분리도를 감소시킴을 보였다. PIM (Pulsed Input Method)을 사용하여 분석한 결과 ibuprofen의 농도가 증가할수록 Langmuir 등온흡착식을 따르는 비선형 거동을 보임을 증명하였고, 그 결과 등온흡착식을 결정하였다. 등온흡착식은 S-form과 R-form의 경우 각각

$$C_{s,S} = \frac{1.178C_{M,S}}{1+0.019C_{M,S}}, \quad C_{s,R} = \frac{1.866C_{M,S}}{1+0.017C_{M,S}}$$

## 감 사

본 연구는 과학재단 지원 인하대학교 초정밀 생물분리 기술 연구센터 (BSEP ERC)의 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Kim S. Y., J. K. Lee, S. S. Suh, T. J. Park, and D. Park (2003), Optical Separation of racemic pelubipufen by high-performance liquid chromatography, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(6), 721-727.
2. Won J. H., Y. S. Cho, Y. D. Kim, and D. J. Ahn (2001), Enantio-separation of R, S-ibuprofen using Simulated Moving Bed (SMB) Chromatography, *HWAHAK KONGHAK*, **39**(6), 685-691.
3. Bonato P. S., M. P. F. M. D. Lama, and R. Carvalho (2003), Enantioselective determination of ibuprofen in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **796**, 413-420.
4. Park C. I., C. I. Lee (1993), HPLC의 이론과 실제, **p19**, 자유아카데미.
5. Lee D. W. (1991), 크로마토그래피, **p89**, 민음사.
6. Kim S. Y., T. Song, J. K. Lee, S. S. Suh, and M. H. Choi (2002), Adsorptive correlations of chromatography for ibuprofen enantiomers, *HWAHAK KONGHAK* **40**(3), 324-329.
7. Row K. H. (1999), 액체 크로마토그래피의 원리와 응용, **p164**, Inha University Pub. Department, Incheon, Korea.
8. Yoon T. H. and I. H. Kim (2003), Chiral separation of loxoprofen racemate using SMB (Simulated Moving Bed) chromatography, Ph. D. Dissertation, Dept. of Chemical Engineering, Chungnam Nat'l University, Daejeon, Korea.
9. <http://www.kromasil.com/>