

Kromasil HPLC 컬럼에서 Mandelic Acid의 분리특성

김병립 · 김종민* · 김우식** · 김인호†

충남대학교 화학공학과
305-764 대전시 유성구 궁동 220
*동아대학교 화학공학과
604-714 부산시 사하구 하단2동 840
**경희대학교 환경화학대학
446-701 경기도 용인시 기흥구 서천동 1
(2008년 4월 19일 접수, 2008년 5월 3일 채택)

Separation Characteristics of Mandelic Acid in Kromasil HPLC Column

Byung Lip Kim, Jong Min Kim*, Woo Sik Kim** and In Ho Kim†

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

*Department of Chemical Engineering, Dong-A University, 840, Hadan-2-dong, Saha-gu, Busan 604-714, Korea

**School of Environment and Applied Chemistry, Kyung Hee University, 1, Seocheon-dong, Yongin, Gyeonggido 446-701, Korea

(Received 19 April 2008; accepted 3 May 2008)

요 약

Kromasil KR100-5CHI-TBB 컬럼을 사용하여 라세미 mandelic acid를 분리하였다. 분리도(resolution), 이론단수(number of theoretical plates), 용량인자(capacity factor)와 같은 크로마토그래피 변수들을 이동상의 조성(hexane/t-BME = 85/15 - 10/90)과 포름산 농도(0.1, 0.5, 1.0 v/v%)를 변화시켜 실험하여 계산하였다. 컬럼의 효율을 평가하기 위해 유속 대 이론단수를 비교하였다. 등온흡착식을 계산하기 위해 PIM(Pulse Input Method)을 사용하였고, mandelic acid의 농도가 0.1에서 0.3 mg/ml 사이일 때 L-과 D-mandelic acid가 각각 8.8분과 9.4분의 체류시간을 보였다. Mandelic acid의 등온흡착식은 0.3 mg/ml의 농도이하와 이동상 조성(hexane/t-BME = 75/25)에서 선형이었다. Mandelic acid의 농도가 증가할수록 mandelic acid는 비선형 거동을 보였고, Langmuir 등온흡착식은 L-과 D-mandelic acid의 경우 각각 $C_{S,L} = 3.358C_{M,L}/(1+0.0897C_{M,L})$, $C_{S,D} = 3.692C_{M,D}/(1+0.1457C_{M,D})$ 이었다.

Abstract – Chiral separation of racemic mandelic acid was achieved on a Kromasil KR100-5CHI-TBB column. Some chromatographic parameters (resolution, number of theoretical plates, capacity factor) are calculated under different separation conditions such as changes of mobile phase compositions (hexane/t-BME = 85/15 - 10/90) as well as formic acid concentrations for adjusting pH (0.1, 0.5, 1.0 v/v%). Flow rate versus number of theoretical plates was compared to evaluate column efficiency. To determine the adsorption isotherms, PIM (Pulse Input Method) was carried out. At the concentrations of racemic mandelic acid between 0.1 and 0.3 mg/ml, L- and D-mandelic acids have the same retention times of 8.8 and 9.4 min respectively. Mandelic acid isotherms show a linear form under the concentrations of 0.3 mg/ml with eluent (hexane/t-BME = 75/25). As the concentrations of mandelic acids increase, nonlinear Langmuir isotherms were observed as $C_{S,L} = 3.358C_{M,L}/(1+0.0897C_{M,L})$ for L-mandelic acid and, $C_{S,D} = 3.692C_{M,D}/(1+0.1457C_{M,D})$ for D-mandelic acid.

Key words: Mandelic Acid, Chiral Separation, HPLC, Pulse Input Method

1. 서 론

의약품 개발분야는 고부가 가치 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 이

를 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 식품의약품국(Food and Drug Administration)에서는 키랄 의약품에 대한 지침을 발표하였다. 이 지침에 따르면, 새로이 개발되는 키랄 의

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ihkim@cnu.ac.kr

‡ 이 논문은 인하대학교 정성택 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

약품은 두 거울상 이성질체 각각에 대한 약리학 및 독성학적 특성, 인체 내에서의 안정성 및 상호전환 등에 관한 사실들이 밝혀져야 한다는 것이다. 그 결과 전 세계적으로 키랄 의약품 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 생약제 등의 분리에 적합하다[2]. 대상물질인(D,L)-mandelic acid[(D,L)-hydroxy-phenyl acetic acid](이하 mandelic acid)은 한개의 키랄 중심을 가지고 있으며 이로 인해 두개의 이성질체가 존재한다. Fig. 1에서는 두개의 거울상 이성질체의 원인이 되는 mandelic acid 내의 키랄 중심을 보여주고 있으며, D-mandelic acid만이 약리학적으로 항염증작용을 하는 것으로 알려져 있다[3].

본 연구에서는 mandelic acid 거울상 이성질체의 분리 특성을 분석하기 위한 지표로 분리도(resolution), 이론단수(number of theoretical plates), 용량인자(capacity factor)를 사용하였고, Pulse Input Method (PIM)를 사용하여 등온흡착식을 구하였다.

분리도 R은 한성분이 인접한 다른 성분과 어느 정도 정량적으로 분리되어 있는지를 표시하는 값이며 식 (1)에 의해 정의된다. 체류 시간과 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 기준선에서의 폭이며 시간 단위로 표시한다. 이론단수(N)는 칼럼의 길이, 충전제의 입자 모양 및 표면적, 이동상에 의존하여 액체 크로마토그래피에서는 10^3 정도의 이론단수를 갖는다[1]. 본 실험에서는 식 (2)에 의해서 N값을 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, σ 는 표준편차이다. 실험에서 얻은 피크 크기로 부터 N값을 구할 수 있다. 칼럼의 길이 L을 알면 식 (3)에 의해 HETP를 구할 수 있다. N은 칼럼의 길이에 비례하여 증가하기 때문에 칼럼의 효율을 측정하는 척도로서 HETP가 사용되어진다.

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

용량인자는 고정상과 이동상 중의 용질량의 비로서 식 (4)에 의해 얻을 수 있으며, 두상 사이의 용매변화 등에 따라서 성분의 머무

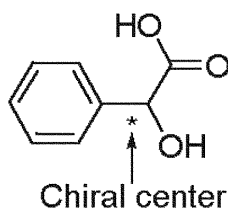


Fig. 1. Chemical structure of mandelic acid enantiomers.

름이 변화할 수 있음을 나타내는 지표이다[4].

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

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 농도 변화를 측정하고 이로부터 등온흡착곡선 상의 점들을 각각 구하는 것이다. 그러나 이 방법은 정확한 측정을 위해서 필요한 용질과 흡착제의 양이 너무 많으며, 평형의 도달 여부에 대한 불확실성과 실험 시간이 많이 소용되는 단점을 지니고 있다. 또한 동적인 방법으로서 가장 많이 사용되는 frontal analysis는 단일 성분의 흡착곡선 측정에 적합하므로 라세미 화합물들의 흡착곡선의 측정에는 적합하지 않다[6]. 따라서 본 연구에서는 Pulse Input Method(PIM)[7]을 사용하여 mandelic acid의 등온흡착식을 결정하였다.

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

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

그리고, t_R 과 H와의 관계는 식 (6)과 같이 정의된다[8].

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

여기에서 H는 Henry 상수로서 고정상과 용리액 간의 평형상수이다. t_R 과 t_0 는 실험에 의해 구할 수 있으며, 식 (6)에 의해서 H를 구하여 식 (5)에 대입하여 고정상에 흡착된 농도 (C_S)를 구할 수 있다.

2. 실험

2-1. 재료 및 시약

분리 대상 물질인 mandelic acid는 Fluka사의 D(-)-mandelic acid와 L(+)-mandelic acid 제품을 별도의 정제 과정 없이 이동상과 동일한 용매에 용해시킨 후 멤브레인 필터(0.22 μ m GVPP, Millipore, U.S.A.)를 통한 여과 과정만을 거친 후 사용하였다. 이동상 용매는 hexane(95% n-hexane, J. T. Baker, U.S.A.), tert-butyl methyl ether (t-BME, J. T. Baker, U.S.A.), formic acid(96%, Aldrich Chem., U.S.A.), acetic acid(Assay min. 99.7%, Junsei Chem., Japan)를 사용하였으며, hexane, tert-butyl methyl ether는 멤브레인 필터를 통해 여과 과정을 거친 후 sonicator(Branson, U.S.A.)로 20분간 탈기한 후 사용하였다.

2-2. 기기 및 장치

실험장치는 용매 이송 펌프(6000A Solvent delivery system, Waters, U.S.A)와 검출기(Model M720, Younglin, Korea)를 사용하였다. 칼럼은 Kromasil KR100-5CHI-TBB(4.6 mm \times 250 mm, particle size = 5 μ m, Eka Chemical, Sweden)를 구입하여 사용하였다. 데이

터 수집 시스템으로 Clarity(DataApex, ver. 2.1.0.15, Czech)를 사용하였다.

2-3. 실험방법

이동상은 hexane/t-BME의 여러 농도 (v/v%)로 사용하였으며, pH 조정을 위해 acetic acid, formic acid를 첨가하여 사용하였다[9]. 실험은 상온에서 수행하였으며 칼럼은 실험을 수행하기 전 정상상태에 이를 때까지 충분한 시간 동안 이동상을 흘려주었다. 시료의 주입은 100 μ l 주사기를 사용하였고, 샘플 루프는 20 μ l를 사용하였다. 검출기의 wavelength는 254 nm로 실험하였다.

첨가제인 산의 농도가 mandelic acid의 분리에 미치는 영향을 보기 위하여 Kromasil 칼럼 제조사인 Eka사[9]에서 제공하는 이동상 조성 hexane/t-BME (70/30)에서 formic acid와 acetic acid의 농도를 0.1 v/v%에서 1 v/v%까지 변화시키며 실험하였다. 이동상의 조성 변화가 mandelic acid 분리에 미치는 영향을 보기 위한 실험으로 hexane/t-BME의 조성을 (85/15)에서 (10/90)로 변화시키며 실험하였다. 이때 주입된 mandelic acid의 농도는 1 mg/ml였다. 이동상의 유속을 0.5-5 ml/min으로 변화시키며 실험 조건에 따른 크로마토그램의 변화를 관찰하였다.

Mandelic acid를 Kromasil KR100-5CHI-TBB column을 이용하여 분리한 후 분리된 두 enantiomer들의 등온흡착식을 구하기 위해 PIM을 사용하였다. 이동상 hexane/t-BME의 조성이 75/25에서 0.5 v/v%의 formic acid를 첨가하고, mandelic acid를 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/ml의 농도로 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

Acetic acid의 농도 변화에 따른 mandelic acid 체류시간의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. acid의 농도가 증가할수록 체류시간(t_R)이 단축되고, 용량인자(k')도 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. Fig. 3에서 formic acid가 acetic acid보다 분리도(Resolution)가 좋음을 확인함으로써, 첨가제로 formic acid를 선택하였다. Formic acid의 경우 분리도의 값이 1.5의 경우 기준선까지의 분리가 이루어지므로 농도를 0.5%로 그후의 실험에서 사용하였다.

용량인자가 hexane의 조성이 감소함에 따라 감소하는 경향을 Fig.

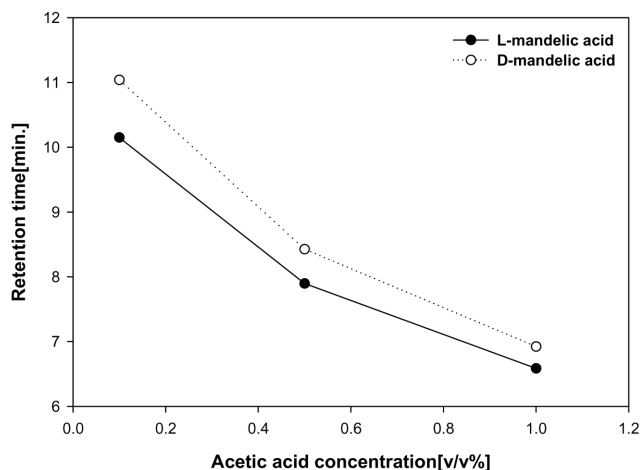


Fig. 2. Effect of acetic acid concentrations on retention time in mobile phase (hexane/t-BME=70/30).

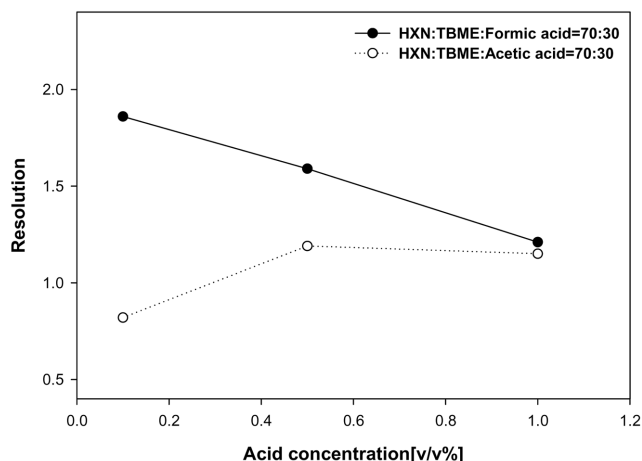


Fig. 3. Effect of formic acid and acetic acid concentrations on resolution in mobile phase (hexane/t-BME=70/30).

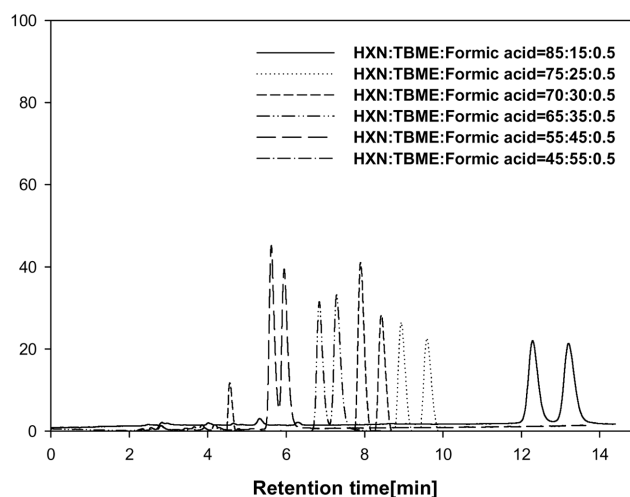


Fig. 4. Chromatograms of mandelic acid with change of mobile phase compositions.

4의 크로마토그램에서 나타내었다. 용량인자(k')가 분리도에 미치는 영향은 용매 세기(solvent strength)에 기인한다. 용매세기란 이동상인 용매가 시료 성분을 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 용매세기가 강해져서 mandelic acid의 체류시간을 단축시켰고, 분리도의 감소를 보였다고 사료된다. 조성 변화에 따른 체류시간의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. Hexane의 조성이 55% 이상에서 라세미 mandelic acid의 분리가 만족할 만 하였다. 이동상 내에서 hexane의 조성이 증가할수록 mandelic acid의 두 enantiomer들의 체류시간이 길어져 용량인자가 증가한 반면, 피크의 폭이 넓어져 분리도의 감소를 볼 수가 있다. 따라서 분리도와 체류시간의 결과를 종합하여, 기준 이상의 분리도를 갖고 분리시간을 단축할 수 있는 hexane/t-BME의 조성이 70/30일 때 0.5%의 formic acid를 첨가했을 때의 용매가 최적의 이동상이라고 사료된다.

유속이 mandelic acid의 분리에 미치는 영향을 확인하기 위하여 위에서 결정한 이동상을 가지고 formic acid 0.5%를 첨가하여

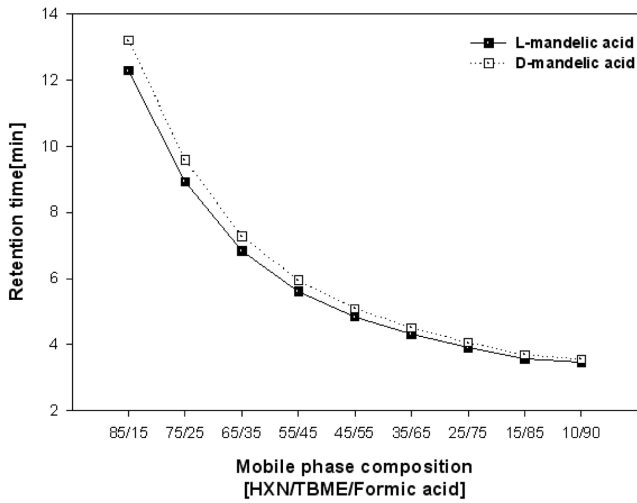


Fig. 5. Effect of mobile phase composition on retention time.

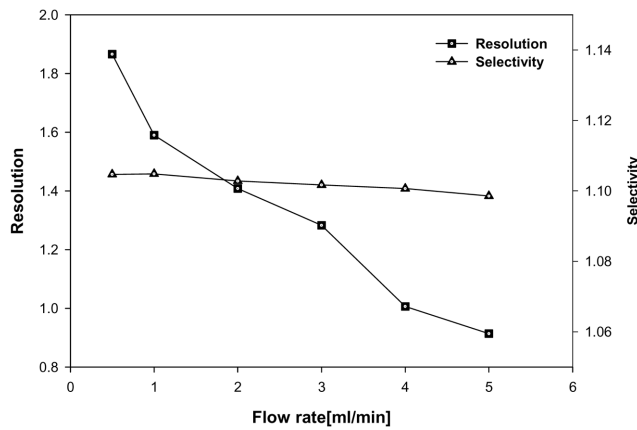


Fig. 6. Effect of Flow rate on resolution and selectivity.

mandelic acid 1 mg/m^l를 주입한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 유속은 0.5-5 ml/min으로 변화를 주었다. 실험 결과 이동상의 유속이 증가할수록 체류시간이 감소하게 되어 분리도가 감소하는 것을 볼 수 있다. 유속에 따른 칼럼의 효율을 살펴보기 위해 식 (2)를 이용하여 이론단수(number of theoretical plates)를 구하고 식 (3)을 이용하여 HETP값을 계산하였고 이론단수를 Fig. 7에 나타내었다. 시료는 충전물 표면과 세공 내에서의 유속에 의한 물질전달에 영향을 받게 되는데 이동상의 유속이 낮아지면 이동상의 진행방향에 따라서 시료의 확산이 증가하게 되어서 피크의 폭이 증가하게 된다. 유량이 증가하면 이동상 내의 시료가 칼럼 내에서 물질전달저항에 의해 정상과의 접촉시간이 줄어들게 되어 체류시간이 짧아진다. 이로 인하여 칼럼의 이론단수는 작아지고 HETP는 증가하는 경향을 보인다. 유속을 1 ml/min으로 정함으로 분석시간을 최소화하고 이론단수를 최대한 유지할 수 있도록 유속을 정하였다.

Mandelic acid의 두 enantiomer들의 등온흡착식을 결정하기 위해서 동적 흡착방법인 PIM을 사용하였다. 동적 방법에 의해서 등온흡착식을 구하는 경우 흡착질과 흡착제 사이에 물질전달의 영향이 존재하게 된다. Fig. 8은 물질전달에 영향을 줄 수 있는 주입부피, 이동상의 유속, 이동상의 조성비와 같은 실험조건을 일정하게 유지하고 라세미 mandelic acid의 농도만을 변화시켜 구해진 크로마토그램이다. Fig. 9로부터 증가된 라세미 mandelic acid의 농도에 대

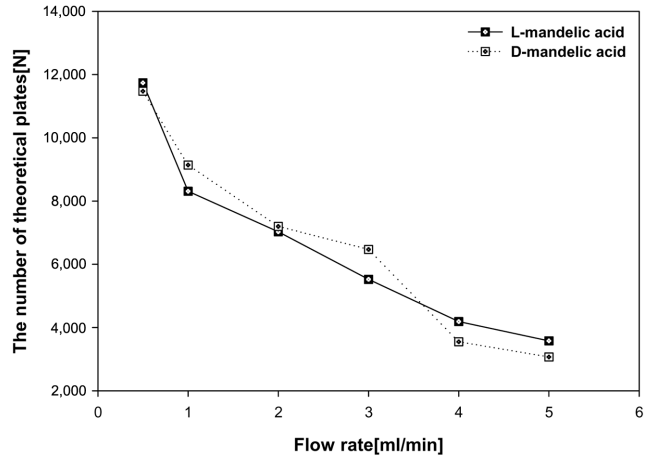


Fig. 7. Effect of flow rate on the number of theoretical plates of L-,D-mandelic acid. Injection concentration of 1mg/ml and injection volume of 20 ml.

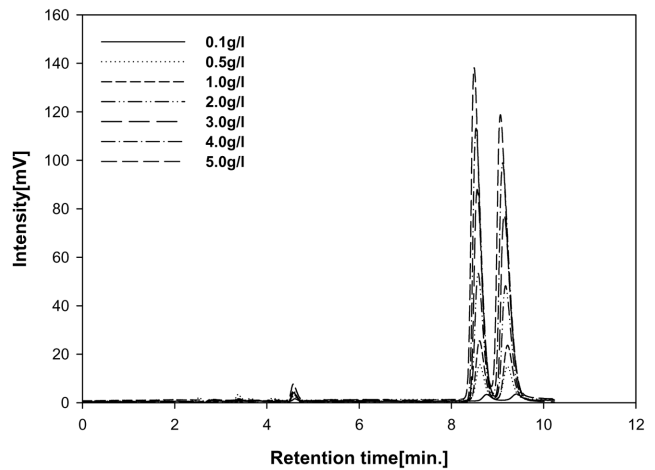


Fig. 8. Eluent profile of mandelic acid with increase of concentration for Kromasil KR100-5CHI-TBB. Mobile phase flow rate of 1 ml/min, mobile phase composition of HXN/TBME (75/25), 0.5 v/v% formic acid added.

한 체류시간을 알 수 있고, 농도가 증가할수록 Langmuir 등온흡착식을 따르는 비선형 거동과 두 mandelic acid의 라세미 mandelic acid의 농도만을 변화시켜 구해진 크로마토그램이다. Fig. 9로부터 증가된 라세미 mandelic acid의 농도에 대한 체류시간을 알 수 있고, 농도가 증가할수록 Langmuir 등온흡착식을 따르는 비선형 거동과 두 mandelic acid의 t_R 이 감소하였음을 보였다. 주입 농도가 0.1-0.3 mg/m^l에서는 체류시간이 L-mandelic acid는 8.8분, D-mandelic acid는 9.4분으로 측정되어 t_R 에 변화가 없는 선형 조건에 위치하였으며, 이로부터 선형 크로마토그래피 영역 예측이 가능하였다. 각 점에서의 피크의 체류시간과 dead time을 식 (6)에 대입하여 Henry 상수 H를 계산하였고, 이 값을 식 (5)를 사용하여 고정상에서의 농도(C_s)를 계산하여 등온흡착곡선을 구하였다. 등온흡착식은 식 (7), (8)과 같다.

$$C_{s,L} = \frac{3.358C_{M,L}}{1 + 0.0897C_{M,L}} \quad (7)$$

$$C_{s,D} = \frac{3.692C_{M,D}}{1 + 0.1457C_{M,D}} \quad (8)$$

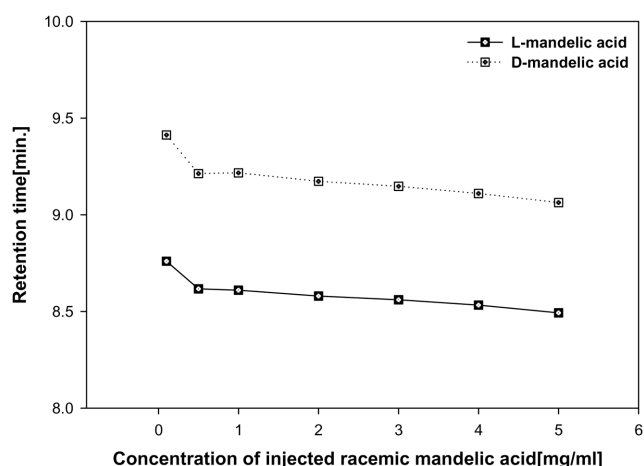


Fig. 9. Retention time of mandelic acid enantiomers at different sample concentrations.

4. 결 론

Kromasil HPLC 칼럼을 사용하여 D-, L-mandelic acid의 분리 실험을 수행하였다. 분리 이동상의 조성을 hexane/tBME/formic acid = 75/25/0.5으로 하고 유량을 1 ml/min으로 하였을때 우수한 분리결과를 얻을 수 있었으며 주입농도를 바꾸어 pulse input method를 통하여 두 mandelic acid의 흡착등온곡선을 아래와 같이 얻었다.

$$C_{S,L} = \frac{3.358C_{M,L}}{1 + 0.0897C_{M,L}} \quad (7)$$

$$C_{S,D} = \frac{3.692C_{M,D}}{1 + 0.1457C_{M,D}} \quad (8)$$

이상의 결과로부터 이동상의 조성비, 이동상의 유속, 주입농도와 같은 조업조건의 변화와 mandelic acid의 체류시간 사이의 상관관계를 규명함으로써 크로마토그램을 얻는데 시간적 또는 경제적 효율

성 제고와 분리도를 향상시키는데 이 실험결과가 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 충남대학교 교원 연구력 강화 사업비로 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim, S. Y., Lee, J. K., Suh, S. S., Park, T. J. and Park, D., "Optical Separation of Racemic Pelubipirofen by High-Performance Liquid Chromatography," *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**, 721-727(2003).
2. Won, J. H., Cho, Y. S., Kim, Y. D., and Ahn, D. J., "Enantio-separation of R, S-ibuprofen using Simulated Moving Bed (SMB) Chromatography," *HWAHAK KONGHAK*, **39**, 685-691(2001).
3. Bonato, P. S., Lama, M. D. and Carvalho, R., "Enantioselective Determination of Ibuprofen in Plasma by High-performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry," *J. Chromatogr. B*, **796**, 413-420(2003).
4. Park, C. I. and Lee, C. I., "Theory and Practice of HPLC," p.19, Free Academy Publishing Co.(1993).
5. Lee, D. W., "Chromatography," p.89, Mineumsa(1991).
6. Kim, S. Y., Song, T., Lee, J. K., Suh, S. S. and Cho, M. H., "Adsorptive Correlations of Chromatography for Ibuprofen Enantiomers," *HWAHAK KONGHAK*, **40**, 324-329(2002).
7. Row, K. H., "Principles and Applications of Liquid Chromatography," p.164, Inha University Press(1999).
8. Yoon T. H., "Chiral Separation of Loxoprofen Racemate using SMB(Simulated Moving Bed) Chromatography," Ph. D. Dissertation, Dept. of Chemical Engineering, Chungnam Nat'l University, Daejeon, Korea(2003).
9. <http://www.kromasil.com/>.