

HPLC 키랄 정지상에 의한 거울상 이성질체의 분리

류 재 정

1. 서 론

우리들의 몸을 포함한 모든 동·식물의 생체는 키랄성을 갖고 있다. 따라서 생체는 라세미체를 구성하는 두 거울상 이성질체에 대해 각각 다른 생물학적 감응도를 나타낸다. 예로서, 우리는 (D)-sodium glutamate를 쓴 맛으로, 또 그것의 거울상인 (L)-sodium glutamate를 단맛으로 감응한다. 의약품에 있어서 두 광학 이성질체가 나타내는 인체 내의 서로 다른 생리작용은, 의약품의 종류에 따라 그 정도의 차이는 있지만, 우리들의 건강과 생명에 직접 관련되므로 특히 중요하다. 1950년대 말, 진정제로 시판된 thalidomide는 태아기형 등의 심각한 부작용을 일으키는 것으로 알려졌는데, 이러한 부작용은 오직 (S)-형태의 이성질체에 의해서만 야기됨이 밝혀졌다.¹ 반면 비스테로이드계 진통소염제로 널리 이용되고 있는 2-arylpropionic acid 계통의 화합물들은 오직 (S)-이성질체만 생리활성을 가지고, (R)-이성질체의 경우 체내 대사과정에서 (S)-이성질체로 전환되나 그 과정에서 심한 간장장애 (hepatotoxicity)를 유발하는 것으로 알려졌으며, 이들 중 특히 모 제약회사에서 상품화된 benoxaprofen의 경우 이로 인하여 미국에서 26명이 사망하여 큰 사회적 문제가 된 일이 있다.²

많은 라세미 의약품들은 위의 예에서 보는 바와 같이 임상효능이나 독성 등에 있어서 많은 문제점을 가지고 있기 때문에 지난 1992년에 미국의 식품 및 의약 관리국 (FDA)에서는 새로운 의약품 (농약이나 식품 첨가물도 포함)을 허가하는 과정에서 그

의약품이 라세미체 형태로 사용해도 좋은 충분한 근거가 없는 한 라세미체 형태로는 제조 판매를 허가하지 않는 새로운 규정을 마련하였으며,³ 이 규정의 시행에 따라 전 세계의 제약 관련 업체들은 라세미 의약품과 순수 광학 이성질체 의약품의 임상효능 차이에 관련된 연구와 라세미 의품을 순수 광학 이성질체 의약품으로 전환하는 연구에 많은 노력과 투자를 하고 있다.

이러한 연구 가운데 가장 활발하게 연구되고 있는 분야는 키랄 촉매를 이용한 비대칭 유기합성이며,^{4,5} 이 분야의 발전에 기여한 공로로 미국의 Knowles 박사,⁶ Sharpless 교수,⁷ 그리고 일본의 Noyori 교수가⁸ 작년에 노벨 화학상을 수상하였다.

광학활성 키랄 화합물의 개발과정에서 또 중요한 것은 여러 방법으로 제조한 광학활성 물질의 신속, 정확한 광학순도 측정이다. 키랄 크로마토그래피에 의한 분리분석 방법은 두 거울상 이성질체가 절반씩 섞여 있는 거울상 이성질체 혼합물, 즉 라세미체들을 직접 분리하여 광학적으로 순수한 물질을 직접 얻는다는 점 외에도 비대칭 합성 (asymmetric



류재정

1987 부산대학교 화학과 (이학사)
1994 부산대학교 화학과 (이학박사)
1994 ~ 포항공대 생리분자연구센터
1995 연구원
1995 ~ 삼성SDI 종합연구소 선임연구원
1997
1997 ~ 경북대학교 화학교육과 (조교수)
현재

Enantioseparation by HPLC Chiral Stationary Phases

경북대학교 화학교육과 ((Ryoo Jae Jeong, Department of Chemistry Education, Kyungpook National University, Buk-Gu, Taegu 702-701, Korea)

synthesis)이나 천연물 추출 등으로 부터 얻은 광학 활성 물질의 광학 순도를 신속·정확히 결정할 수 있고, 분리된 각 이성질체의 절대배열도 예측할 수 있는 큰 장점을 갖고 있다.⁹ 따라서 최근 들어 다양한 키랄 크로마토그래피 방법이 보다 활발하게 연구되고 있으며,¹⁰ 이와 더불어 새로운 키랄 정지상의 개발에 대한 연구도 많이 수행되고 있다.¹¹ 일반적으로 이러한 키랄 컬럼의 개발은 주로 키랄 HPLC (high performance liquid chromatography; 고성능 액체크로마토그래피)에 의해 수행되는데 최근까지 전세계적으로 100여종의 키랄 컬럼들이 상품화되어 있다.¹² 따라서 많은 유기화학자 및 약학자들이 다양한 키랄 HPLC 컬럼을 구매하여 독자적으로 키랄 크로마토그래피를 실시하고 있으나 분리 및 분석이 쉽게 이뤄지지 않아서 연구와 고가의 키랄 컬럼을 선택하는데 있어서 많은 어려움이 뒤따른다. 따라서 본 원고에서는 키랄 HPLC에 대한 기본 지식을 설명하면서 다양한 키랄 정지상의 종류를 소개하는데 초점을 맞추었다.

2. 키랄 HPLC의 기본 이론

한 쌍의 광학 이성질체는 비키랄 환경에서 물리적 화학적 성질이 완전히 동일하므로, 이들을 광학 분할하기 위하여는 적당한 방법으로 키랄 환경을 제공해 주어야만 한다. 라세미 혼합물을 순수한 광학 이성질체로 광학분할하는 가장 일반적인 방법은 라세미 물질을 한쌍의 부분 입체 이성질체로 만들어서 이들을 분리하는 것으로, 이 방법을 흔히 광학 이성질체 분리의 간접 분할 방법이라고 한다.⁹ 이 경우에는 부분 입체 이성질체를 분리한 후에도 또 다시 가수분해 등의 방법에 의하여 각각을 순수한 거울상 이성질체로 분해해야 하므로 상당한 시간적, 경제적 손실과 번거로움이 뒤따르나 많은 양의 광학 이성질체 분리가 필요한 경우에는 현재도 이 방법이 많이 이용되고 있다.

라세미 혼합물을 부분 입체 이성질체로 만들지 않고 직접 분리하는 방법을 광학 이성질체 분리의 직접 분할 방법이라고 하며, 그 주된 기술이 키랄 크로마토그래피이다. 키랄 크로마토그래피에서는 키랄 선택자(chiral selector)로 불리우는 광학적으로 순수한 물질에 의해서 분리하고자 하는 라세미 혼합물의 키랄 인식(chiral discrimination)이 이

루어지는데, 이때 키랄 선택자는 라세미 혼합물을 구성하는 각 거울상 이성질체 중에서 한쪽의 거울상 이성질체에 보다 선택적으로 인식할 수 있어야 한다.

크로마토그래피를 이용한 직접 분리 방법은 공유 결합성 부분 입체 이성질체를 만들 필요가 없이 일시적인 부분 입체 이성질체를 형성하는 과정에 의하여 순수한 광학 이성질체를 직접 분리하므로, 간접 분리 방법에서 공유 결합성 부분 입체 이성질체를 만들기 때문에 생기는 여러 문제점들을 피할 수 있다. 액체 크로마토그래피에 의한 직접 분리 방법은 키랄 선택자의 존재 형태에 따라 키랄 이동상(chiral mobile phase, CMP) 방법, 키랄 이동상 첨가제(chiral mobile phase additive, CMPA) 방법 그리고 키랄 정지상(chiral stationary phase, CSP) 방법으로 나눌 수 있다.¹³ CMP 방법은 이동상으로 키랄 용매를 사용하는 방법으로서 용매 선택의 제한과 고가의 키랄 용매를 다량 사용하여야 하는 어려움 때문에 보편화될 수 없는 방법이다. 이러한 어려움을 극복하기 위하여 키랄 선택자 역할을 하는 키랄 물질을 이동상에 첨가함으로써 라세미 혼합물을 광학분할하는 방법을 CMPA 방법이라 한다. CMPA 방법의 가장 큰 장점은 비키랄성인 보통 컬럼을 사용하여 광학분할이 가능하며, 키랄 선택자 역할을 하는 키랄 물질을 쉽게 교체할 수가 있으므로 다양한 분석 방법의 개발이 가능하다는 점이다. 그러나 이 방법의 문제점은 분리하는 동안 키랄 이동상 첨가제가 계속 필요하다는 것과 분리 후 분리한 시료로부터 이동상 첨가제를 제거해야 한다는 점이다. 따라서 분석이 목적이 아니라 다량의 라세미체를 광학분할하는 것이 목적이라면 적절한 방법으로 키랄 이동상 첨가제를 분리해 내어야 하는 번거로움이 뒤따른다. 또한 CMPA 방법에 의해 분리된 것은 순수한 형태의 광학 이성질체가 아니고 키랄 이동상 첨가제와의 혼합물이므로 두 광학 이성질체에 대한 검출기의 감응도가 달라서 두 피크의 크기로부터 광학 순도를 정확히 측정할 수가 없다. CMPA 방법의 또 다른 문제점은 Davankov와 Kurganov가 지적한 것처럼 이 방법에서는 광학분할의 메커니즘이 복잡하여 용리 순서를 설명하기가 어렵고, 따라서 절대배열을 결정하기가 힘들다는 것이다.¹⁴

반면 CSP 방법은 키랄 컬럼이 가격 면에서 보통 컬럼에 비해 비싸나 두 광학 이성질체가 직접 분리

되므로 검출기의 감응도에 차이가 없고, 따라서 크로마토그램 상의 두 피크 크기를 단순 비교함으로써 광학 순도를 쉽게 측정할 수 있다. 또한 CSP 방법에서는 키랄 정지상(키랄 고정상이라고도 함)과 두 광학 이성질체 사이에 형성되는 일시적인 부분 입체 이성질 착물의 안정성 차이에 의해서만 광학분할이 이뤄지고 광학분할 메카니즘이 비교적 단순하므로 용리 순서로부터 각 이성질체의 절대배열도 예측 가능하다. 뿐만 아니라 소량의 여러 키랄 물질을 컬럼의 고정 지지체로 사용할 수 있는 물질에 고정시킴으로써, 여러 종류의 키랄 고정상을 다양하게 만들 수 있으며, 키랄 정지상으로 채워진 컬럼은 계속적으로 사용할 수 있기 때문에 다량의 라세미체를 광학분할할 때는 경제적인 이점이 크다. 이와 같은 장점 때문에 CSP 방법은 입체 화학에 관련된 세가지 문제점-순수 광학활성 물질 획득, 절대배열 결정, 광학순도 측정을 해결하는데 있어서 거의 이상적인 방법으로 인식되고 있다.

일반적으로 광학 이성질체의 분리 메카니즘을 밝히는 일은 광학활성 물질의 절대배열을 결정하는 일과 보다 우수한 키랄 정지상을 개발하는데 있어서 매우 중요하다. 그러나 상대적으로 쉽게 메카니즘을 예측할 수 있는 키랄 정지상(CSP)법에 의해서도, CSP와 라세미 혼합물간의 상호작용 메카니즘을 정확히 밝힌다는 것은 상당히 힘든 일이다. CSP에 의한 키랄성 인지 메카니즘은 사용하는 CSP와 광학분할하려는 라세미체의 구조에 따라 달라진다. 어떤 경우든 키랄 고정상(CSP)이 한쌍의 광학 이성질체를 식별할 수 있기 위해서는 CSP와 한쌍의 광학 이성질체 중 어느 하나와 적어도 세점에서 동시적인 상호작용(simultaneous three point interaction)이 있어야 하며,¹⁵ 이 세점에서의 상호작용 중 적어도 하나는 입체 선택적으로 이뤄져야 한다는 세 점 상호작용 모델(three point interaction model) 개념이 CSP와 광학 이성질체간의 상호작용을 설명하기 위해 도입되었다. 이 개념은 1933년 Eassan 등이 효소와 기질 사이의 상호작용을 설명하기 위해 최초 도입하였으나, 이것이 크로마토그래피에 의한 광학분할 메카니즘을 설명하기 위해 도입된 것은 1952년 영국의 과학자 Dalglish에 의해서이다.¹⁶ 그는 종이 크로마토그래피를 이용하여 아미노산 광학 이성질체들의 광학분할을 연구하는 과정에서 광학 이성질체 아미노산이 종이의 광학 활성 성분인 셀룰로오스 분자에 입체 선택적

으로 흡착되는 것을 설명하고자 아미노산의 아미노기, 카르복시기, 그리고 결사슬 등의 세자리와 종이의 셀룰로오스 분자 간에 수소결합과 입체 반발에 의한 세자리 작용 모델을 제시하였다. 그 후 키랄 정지상에 의한 키랄성 인지를 설명하는 세점 상호작용 모델은 Lochmüller,¹⁷ Pirkle 등에¹⁸ 의하여 광범위하게 이용되었고, 1980년대 중반에 들어서 Pirkle과 Hyun 등에 의해 새로운 키랄 정지상의 개발에 성공적으로 응용되기 시작하였다.

키랄성 인지를 위한 세 점 상호작용 모델은 **그림 1**과 같다.

그림 1에서 키랄 정지상과 두 광학 이성질체 사이의 A-A' 및 B-B' 상호작용은 수소결합, 정전기적 상호작용, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 전하 이동 상호작용, 소수성 상호작용, $\pi-\pi$ 상호작용 등과 같이 주로 친화적인 상호작용을 나타내고, 세 번째 상호작용은 입체 장애에 의한 반발적 상호작용을 나타낸다. 이 때 CSP와 거울상 이성질체 1 사이에 형성되는 순간적인 부분 입체 이성질 착물 및 CSP와 거울상 이성질체 2 사이에 형성되는 순간적인 부분 입체 이성질 착물의 안정성에 차이가 생기게 되므로 거울상 이성질체 1과 2의 분리가 이뤄지게 된다. **그림 1**의 경우에는 A-A'의 상호작용과 B-B'의 상호작용이 두 부분 입체 이성질체 착물에서 동일하므로, CSP와 거울상 이성질체 사이의 반발적 상호작용이 적은 광학 이성질체 2(enantiomer 2)가 CSP상에 더 오래 머무른다. 만일 A-B', B-A' 간의 상호작용력이 A-A', B-B' 간의 상호작용력과 비슷하거나 극히 미미한 차이가 난다면 이러한 키랄 선택자를 이용하여서는 이들 광학 이성질체의 좋은 분리를 기대할 수가 없다.

어떤 한 CSP가 모든 종류의 라세미체를 분리할

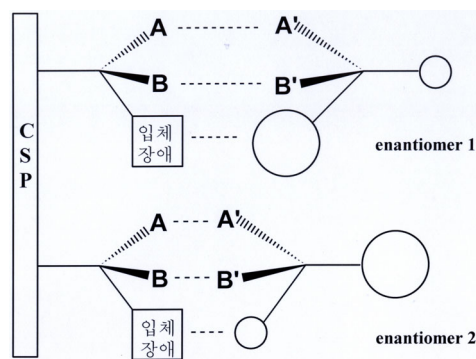


그림 1. 키랄성 인지를 위한 세 점 상호작용 모델.

수는 없으며, 어떤 특정 기능기를 갖는 광학 이성질체에 대해서는 그것에 적당한 CSP를 개발해야만 한다. Pirkle은 이러한 CSP를 개발하는 과정에서 키랄성 인지의 교호성(reciprocity of chiral recognition) 개념을 도입하여 다양한 종류의 CSP들을 개발할 수 있었다.¹⁹ 이 개념에 의하면 (+)-A라는 키랄 물질로 부터 유도된 CSP-(+)-A가 임의의 라세미체인 (±)-B를 잘 광학분할한다면, (+)-B 또는 (-)-B로 부터 유도된 CSP-(+)-B 또는 CSP-(-)-B는 라세미체 (±)-A를 역시 잘 광학분할할 수 있다. 즉, (+)-A로 부터 만들어진 CSP-(+)-A가 라세미체 (±)-B를 잘 광학분할한다면, 결국 A와 B간에는 강한 세자리 상호작용을 하고 있다는 증거이므로, 광학적으로 순수한 B를 CSP로 만든다면 이 CSP 역시 강한 세자리 상호작용에 의하여 (±)-A를 잘 분리해 낼 것으로 예측이 가능하다.

따라서, 어떤 라세미 혼합물을 효율적으로 분리하기 위해서는 많은 노력을 거쳐 수백종의 CSP를 직접 합성하여 광학분할을 일일이 시도해 볼 수도 있겠지만, 그 대신에 분리할 물질을 기저로 CSP를 만든 후, 이 CSP에서 광학분할되는 여러 라세미 화합물들 중에서 만들기 쉽고, 가장 잘 분리되는 키랄 화합물을 키랄 선택자로 선택하여 CSP를 만드는 것이 훨씬 효과적이다. 특히 키랄 의약품들의 광학분할에 있어서도 이러한 키랄성 인지의 교호성 개념을 도입하여 CSP를 개발할 경우, 개발된 CSP를 이용하여 어떤 특정기를 갖는 많은 유사한 키랄 의약품들을 충분히 잘 분리할 수 있을 것이다.

최근에 대량 분리에 적합한 HPLC 기기인 kilo prep. LC, SMB (simulated moving bed) system 등이 이미 개발되어 있고, 지금도 많은 양의 분리에 보다 효과적인 기기장치 개발에 대한 연구가 활발히 진행중이므로, CSP에 의한 광학 이성질체의 분리는 실용적인 면에 있어서도 앞으로 중요하게 이용될 수 있을 것이다. 또한 분석용 HPLC에 있어서도, 내경 4.6 mm의 일반적인 컬럼을 사용하지 않고, 내경 1~2 mm의 세미 마이크로 컬럼 또는 내경 1 mm 이하의 마이크로 컬럼과 특히 최근에는 다양한 모세관 칼럼의 제조 방법이 속속 보고되고 있어서,²⁰ 고가의 HPLC 용매, 키랄 정지상, 시료 그리고 분석시간 등의 소비를 1/10~1/10,000로 줄일 수 있기 때문에, 환경친화적일 뿐 아니라 새로운 키랄 정지상을 개발하는데도 시간과 비용을

대폭 절약할 수 있게 되었다.

3. 키랄 정지상의 종류

액체 크로마토그래피에 의한 광학 이성질체의 분리는 1938년 Henderson과 Rule이 *d*-lactose를 이용한 크로마토그래피 컬럼에서 *p*-phenylene-bis-iminocamphore의 라세미체를 분리한 것이 최초이다.²¹ 이어 1951년에 Kotake는 종이 크로마토그래피에 의한 아미노산의 광학분할에 있어서 키랄 이동상의 영향을 조사하던 중, 광학분할은 고체 지지체(셀룰로오스)의 키랄성에 큰 영향을 받는다는 것을 알아내었다.²² 그들은 동일한 셀룰로오스 지지체를 키랄 정지상으로 사용하여 여러 아미노산들의 광학분할 실험을 실시하였는데, 3,4-dihydroxyphenylalanine 및 그와 비슷한 물질들이 분리되는데 반해 3,4-dihydroxyphenylalanine은 전혀 분리되지 않았다. 이 현상을 설명하고자, 그 다음 해인 1952년에 Dalgliesh는 분리할 아미노산과 셀룰로오스 표면 간에 세자리 동시 접근론을 제안하였는데,¹⁶ 이 이론은 몇 년 뒤 Krebs 등이²³ 전분(starch)에서 몇몇 아미노산과 히드록시산 유도체들의 광학분할을 설명하는데도 이용되었으며, 이것이 앞서 소개한 세점 상호작용론(three point interaction theory)이다.

1960년대 이후 GC (Gas Chromatography)가 본격 개발되면서 동위원소나 부분 입체 이성질체 등의 분리에 GC가 이용되기 시작하다가 1966년에 이르러 Gil-Av 등에 의해 키랄 GC 컬럼을 이용하여 광학 이성질체의 직접 분리가 성공적으로 수행되었다.²⁴ 이들은 N-TFA-(L)-isoleucine lauryl-ester 유도체를 키랄 정지상으로 사용하여 몇몇 아미노산 유도체들의 두 거울상 이성질체들을 성공적으로 분리하였으며, 이로부터 이 키랄 정지상과 유사한 키랄 정지상들이 많이 개발되었다.

1968년 Rogozhim과 Davankov는 키랄 리간드 교환 크로마토그래피(LEC : Ligand Exchange Chromatography)를 이용하여 라세미체의 광학분할에 성공하였다.²⁵ 키랄 LEC는 금속 이온을 매개로 하여 키랄 정지상과 두 광학 이성질체 사이에 두개의 부분 입체 이성질체 착물이 형성될 때 두 부분 입체 이성질체 착물의 안정성에 차이가 있는 점을 이용하여 라세미체를 광학분할하는 것이다. Da-

vankov 등은 처음에 수지 (resin)에 아미노산을 결합시키고 착물 형성 금속 이온으로 구리를 이용하여 아미노산을 유도체로 만들지 않고 직접 광학분할하였다. 이후 점차 방법을 발전시켜 키랄 선택자 역할을 하는 리간드를 공유결합시키지 않고서도, 쉽게 구입할 수 있는 C₁₈ 역상 컬럼에 N-alkyl-L-hydroxy proline 등과 같은 키랄 선택자를 소수성 상호작용에 의해 고정시킨 동적 키랄 정지상 (dynamic chiral stationary phase)에서 자유 아미노산을 광학분할하였다.²⁵ Hyun 등은 아미노산을 변형한 동적 키랄 정지상에서 여러 종의 자유 아미노산을 보다 효과적으로 광학분할하는데 성공하였고,^{26,27} 최근에는 동적 정지상을 고정화된 정지상으로 제조하여 다양한 조성의 이동상에서 자유 아미노산을 분리하였다.²⁸

광학활성 천연물을 키랄 정지상으로 이용한 예는 앞서 언급한 것처럼 1938년 Henderson과 Rule이 단당류인 *d*-lactose 또는 glucose를 사용한 것이 처음이고,²¹ 이후 Hess 등이 감자 녹말을 이용하여 biaryl 계통의 라세미 화합물들을 광학분할하였다.²⁹ 다당류인 셀룰로오스는 나선형에 의한 광학 활성을 가지므로, 초기엔 종이 크로마토그래피에 의해 라세미체의 광학분할에 이용되었으나 최근에는 수많은 히드록시기로 인한 높은 극성 등의 문제점으로 인해 이 히드록시기를 에스테르나 카르복산 에스테르기로 변화시킨 유도체들이 주로 HPLC 키랄 정지상으로 이용되고 있다.³⁰ 한편 일본 Nagoya대학의 Okamoto교수는 이러한 셀룰로오스나 아밀로오스 유도체들을 실리카 겔에 흡착시켜 보다 효과적인 정지상들을 개발하였고,³¹ Daicel사 (<http://www.daicel.co.jp/chiral/e-home.html>)에서 이들 키랄 정지상들을 상업화하였다.

단당류나 다당류 외에 올리고당류인 시클로덱스트린 (cyclodextrin, CD)을 이용한 광학 이성질체의 분리도 아주 활발히 연구되고 있는 분야이다. CD는 D-글루코스가 6개 (α 형), 7개 (β 형) 또는 8개 (γ 형) 연결된 고리형 올리고당으로 밀집된 바구니 모양을 하고 있고, 이것의 바구니 안쪽은 주로 수소와 탄소에 의해 연결되어 있으므로 소수성이며, CD 분자의 바구니 입구는 히드록시기 때문에 친수성을 가진다. CD 키랄 정지상에서 분리 가능한 라세미 화합물들은 대부분 키랄 중심 탄소에 방향족기와 극성기를 함께 가지는 혼합물인데, 분리를 위해서는 그 방향족기가 CD의 소수성 바구니 내부

에 끼어 들어가 가역적인 내포 (inclusion) 착물을 형성하는 것이 필수적이다. CD를 이용한 키랄성 인지의 대표적인 예는 여러 종류의 라세미 의약품들을 성공적으로 광학분할한 Armstrong 등의 연구에서 찾을 수 있다.³² 그는 이 연구에서 β -CD를 이용하여 라세미 propranolol을 광학분할 할 때 propranolol의 naphthyl기는 CD의 소수성 바구니 내부에 들어가고, propranolol의 극성기는 CD의 소수성 바구니 입구에 있는 히드록시기와 상호작용에 의하여 키랄성 인지가 일어난다는 사실을 밝혔다. Armstrong 교수는 최근 항생물질인 teicoplanin과 vancomycin을 기저로 한 새로운 형태의 키랄 정지상을 개발하여 다양한 키랄 화합물의 분리에 성공적으로 적용하였다.³³ 이들 정지상은 키랄 시료와 정지상 간의 수소결합을 위주로 한 여러 상호작용을 이용한 것이 특징으로 단백질 키랄 정지상 등과 마찬가지로 광학분리 메커니즘을 알기는 쉽지 않다. Armstrong 교수가 개발한 키랄 정지상들은 주로 Astec사 (<http://www.astecusa.com/>)에 의해 상용화되었다.

광학 이성질체의 분리에 이용된 또 다른 키랄성 천연 고분자 물질은 단백질이다. 단백질은 (L)-아미노산의 펩티드 결합에 의하여 이뤄진 특수한 3차원 구조를 갖는 물질이다. 특히 인체의 혈장에 존재하는 당 단백질인 α_1 -acid glycoprotein (AGP)와 소의 혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA)으로부터 합성된 키랄 정지상은 많은 종류의 라세미체의 광학분할에 성공적으로 이용되었으며, 특히 이들 정지상을 이용하여 라세미 의약품들의 인체 내 대사과정을 밝히려는 연구는 매우 흥미로운 일이다.³⁴⁻³⁶

광학활성 천연 고분자들의 장점을 살려서 여러 광학활성 고분자를 합성하여 키랄 정지상으로 사용하면, 여러 종류의 라세미 혼합물들을 쉽게 광학분할할 수 있을 것이다. 광학활성 합성 고분자는 크게 고분자의 나선성 때문에 키랄성을 갖는 것, 키랄 단량체로부터 중합하여 만들었기에 키랄성을 갖는 것, 그리고 합성 고분자 구조에 키랄 공동이 존재하는 것 등 세 가지로 분류할 수 있으며 모두 그 자체로서 또는 실리카 겔에 흡착시키거나 실리카 겔에 공유결합시켜서 키랄 정지상으로 사용할 수 있다.

합성 키랄 고분자의 한 예로 구조의 나선성 때문에 광학활성을 갖는 고분자는 1979년 Okamoto 교수

에 의해 처음 보고되었다.³⁷ (-)-Sparteine-BuLi를 이용하여 triphenylmethyl methacrylate (TrMA)를 중합하면 (+)-polytriphenylmethyl methacrylate (PtrMA)가 합성되는데, (+)-PtrMA는 순수하게 한쪽 방향만의 나선성을 가진 고분자 물질로서 나선성 때문에 광학 활성을 나타내는 최초의 합성 고분자이다. Okamoto 교수는 이것을 20-40 mm로 잘게 분쇄한 후 HPLC 칼럼에 충전하여 여러 라세미 화합물들을 분리하였다.³⁸

한편 Wulff 등에 의해 키랄공동(chiral cavity)을 가진 고분자 키랄 정지상도 등장하였는데, 광학적으로 순수한 키랄형판(chiral template) 분자와 결합하고 있는 단량체로부터 고분자를 제조한 후에 키랄형판 분자를 제거하면 키랄형판 분자가 차지하고 있던 공간과 동일한 키랄공동을 가진 고분자가 제조될 수 있다.³⁹ 이 고분자를 정지상으로 이용하면 형판분자의 두 거울상 이성질체 혼합물을 효과적으로 분리할 수 있다. 즉, 키랄공동을 제조하는데 사용되었던 이성질체는 공동에 끼어서 늦게 진행되는 반면에 다른 입체이성질체는 상대적으로 빨리 칼럼을 통과하여 두 이성질체의 분리가 이뤄진다. Wulff는 이러한 특성을 가진 키랄 정지상을 주문자방식의 키랄 정지상(tailor-made chiral stationary phase)이라고 칭하였다.⁴⁰

천연물은 아니지만 CD처럼 키랄 동공에 분석질이 내포되는 과정을 거쳐 라세미체의 광학분할이 가능한 또 하나의 예는 키랄 크라운 에테르를 이용한 광학분할이다. Cram 등은 크라운 에테르가 1차 아민기를 가지는 화합물과 선택적으로 착물을 형성하는 점을 이용하여 키랄 크라운 에테르를 키랄 선택자로 도입하였고, 이를 키랄 정지상(CSP)법이나 키랄 이동상 첨가제(CMPA)법에 의하여 1차 아민기를 가지는 거울상 이성질체(enantiomer)들의 광학분할에 효과적으로 적용하였다.⁴¹ 최근 부산대학교 현명호 교수는 키랄 모세관 전기영동에서 키랄 이동상 첨가제로 이용되는 크라운 에테르(18-Crown-6) 테트라 카르복시산을 출발물질로 사용하여 이를 정지상 지지체에 공유결합한 새로운 키랄정지상을 개발하였다.⁴² 이 정지상은 1차 아민은 물론이고 2차 아민기를 가지는 키랄화합물도 광학분할할 수 있는 우수한 것으로, 국내 최초로 케이맥(주) (<http://www.kmac.to/>)를 통해 상업화되어, 현재 우리나라 기업인 케이맥(주)와 RSTech을 통해 해외시장에 시판되고 있다.

라세미 화합물이 CSP에 의해 광학분할될 때 CSP와 라세미 화합물 사이의 상호작용에는 수소결합, 정전기적 상호작용, 소수성 상호작용, $\pi-\pi$ 상호작용 등 여러 주요한 상호작용들이 있다. 이들 여러 상호작용 중에서 수소결합 상호작용이 입체 장애 현상과 함께 다른 것에 비해 강하게 작용하여 광학분할이 가능할 때 이와 같은 CSP를 특별히 수소결합 CSP이라고도 한다. 이것에 대한 연구는 Hara 등에 의해 많이 행하여졌다.^{43,44}

한편, CSP와 광학분할하고자 하는 라세미 화합물 사이의 여러 상호작용 가운데 $\pi-\pi$ 상호작용(혹은 전하 이동 착물 형성 상호작용)이 다른 상호작용에 비해 중요한 역할을 하여 광학분할이 이뤄질 때, 이러한 CSP를 전하 이동 착물 형성 CSP 또는 이에 대한 많은 연구를 한 과학자의 이름을 따서 Pirkle형 CSP라고도 한다.¹⁹ 1976년 Gil-Av 등은 이 개념을 라세미 화합물의 광학분할에 이용하여 전하 이동 착물 형성 키랄 정지상들을 최초로 개발하였고, 이들 정지상으로 헬리센 계통 화합물들을 광학분할하였다.^{45,46} 1980년대 들어서 미국 일리노이 대학의 W. H. Pirkle 교수에 의해 전하 이동 착물 형성 키랄 정지상에 대한 체계적인 연구가 시작되면서 이 분야 뿐 아니라 전반적인 LC에 의한 광학 이성질체의 분리에 보다 많은 사람들이 큰 관심을 갖게 되었다.⁴⁷ Pirkle형 키랄 정지상은 대체로 분자 내에 π -전자 끄는기를 가지는 π -산성 키랄 고정상과 π -전자 주는기를 가진 π -염기성 키랄 정지상으로 크게 나눌 수 있는데, 다른 종류의 키랄 정지상들이 대부분 시행착오의 방법에 의해서 제조된 반면, Pirkle은 얻어진 실험 결과와 키랄성 인지 메카니즘을 근거로 하여 합리적인 방법으로 새로운 키랄 정지상을 고안하였다.⁴⁸ 가장 쉽게 제조할 수 있는 Pirkle형 키랄 정지상은 아미노산인 페닐글리신과 루이신에 3,5-dinitrobenzoyl (DNB)기를 도입한 π -산성 키랄 정지상이며, Regis사(<http://www.registech.com/>)에서 이들과 이들을 보다 발전시킨 다양한 칼럼들을 상품화하였다. 한편, 부산대 현명호 교수는 DNB-루이신 키랄정지상을 보다 발전시킨 새로운 정지상을 개발하였고,^{49,50} 본 저자도 아미노알콜을 출발물질로 사용하여 두 종류의 π -산성 키랄 정지상을 개발하여,^{51,52} 이들을 각각 케이맥(주) (<http://www.kmac.to/>)를 통해 상업화하였다.

4. 결 론

참 고 문 헌

한국인 과학자가 연구에 참여하여 Science 최근 호에 소개된 “키랄 항체를 실리카 나노튜브에 고정화하여 하나의 거울상 이성질체 의약품들의 각 이성질체를 구별한 일”은 키랄 분리 측면에서는 그다지 중요한 일은 아니지만 키랄 구분 (chiral discrimination)과 관련된 새로운 방식의 시도였다는 점에서 큰 관심을 끌었다.⁵³ 최근 몇 년 사이에 Nature 나 Science에서 키랄 인식 (chiral recognition)과 관련된 일들이 자주 소개되고 있는 사실은 이 분야의 중요성이 그만큼 널리 인식되고 있다는 것을 의미한다.

키랄 크로마토그래피에 의한 분리분석 방법은 두 거울상 이성질체가 절반씩 섞여 있는 거울상 이성질체 혼합물, 즉 라세미체들을 직접 분리하여 광학적으로 순수한 물질을 직접 얻는다는 점 외에도 광학순도를 정확히 결정할 수 있고, 분리된 각 이성질체의 절대배열도 예측할 수 있는 큰 장점을 갖고 있다. 최근 들어 모세관 전기영동 (capillary electrophoresis; CE), 모세관 전기 크로마토그래피 (capillary electrochromatography; CEC)와 초임계 유체 크로마토그래피 (supercritical fluid chromatography; SFC) 등 다양한 크로마토그래피 방법이 많이 개발되고 있다. 또한 HPLC에 의해서도 동일한 정지상을 충전용, 코팅형, 모노리스형 등 다양한 형태와 모세관 HPLC, 마이크로 HPLC, Prep. LC, Industrial 또는 Process scale HPLC 등 다양한 크기의 컬럼에 정지상을 고정화한 연구가 많이 수행되고 있다.⁵⁴ 또한 대량분리 방법에서도 Industrial 또는 Process scale HPLC 방법 이외에 여러 개의 분취용 컬럼을 이용한 SMB(simulated moving bed) 등의 방법이 상용화되어 있으므로 우수한 정지상만 개발되면 거울상 이성질체의 극미량 분석과 대규모 분리는 전혀 문제가 아니다. 문제는 결국 하드웨어가 아닌 키랄 화합물의 분리에 효과적인 키랄 정지상, 즉 소프트웨어를 개발하는 것이며, 이것은 결국 유기합성이나 고분자 합성을 전공하는 학자들의 몫이다. 특히 분자날인 기법에 의한 맞춤형 키랄 정지상의 개발과 최근에 활발하게 연구되고 있는 일체형 (monolith type) 키랄 정지상은⁵⁵⁻⁵⁷ 고분자를 연구하는 학자들이 손쉽게 접근할 수 있는 분야이다.

1. D. R. Taylor and K. Maher, *J. Chromatographic Science*, **30**, 67 (1992).
2. (a) E. Marshall, *Science*, **229**, 1071 (1985).
(b) *Chemical and Engineering News*, March 19, 38 (1990).
3. S. C. Stinson, *Chemical and Engineering News*, Sep. 28, 46 (1992).
4. D. G. Blackmond, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 545 (2001).
5. B. Tao, M. M.-C. Lo, and G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 353 (2001).
6. Knowles, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 1998 (2002).
7. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2024 (2002).
8. Noyori, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2008 (2002).
9. J. C. Touchstone, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 1647 (1993).
10. T. J. Ward, *Anal. Chem.*, **74**, 2863 (2002).
11. F. Gasparrini, D. Misiti, and C. Villani, *J. Chromatogr. A*, **906**, 35 (2001).
12. J. G. Dorsey, W. T. Cooper, B. A. Siles, J. P. Foley, and H. G. Batyh, *Anal. Chem.*, **68**, 515R (1996).
13. M. H. Hyun, in “Resolution of Optical Isomers by Liquid Chromatography”, p. 91, MinEmSa, Seoul, 1992.
14. V. A. Davankov and A. A. Kurganov, *Chromatographia*, **13**, 339 (1980).
15. L. H. Easson and E. Stedman, *Biochem. J.*, **27**, 1257 (1933).
16. C. E. Dalglish, *J. Chem. Soc.*, 3940 (1952).
17. C. H. Lochmüller and R. W. Sourer, *J. Chromatogr.*, **113**, 283 (1975).
18. W. H. Pirkle, M. H. Hyun, and B. Bank, *J. Chromatogr.*, **316**, 585 (1984).
19. W. H. Pirkle and T. C. Pochapsky, *Chem. Rev.*, **89**, 347 (1989).
20. J. P. C. Vissers, H. A. Claessens, and C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, **779**, 1 (1997).
21. G. M. Henderson and H. G. Rule, *Nature*, **141**, 917 (1938).
22. M. Kotake, T. Sakan, N. Nakamura, and S. Senon, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2973 (1951).
23. H. Krebs, J. A. Wagner, and J. Diewald, *Chem. Ber.*, **89**, 1875 (1956).
24. E. Gil-Av, B. Feibush, and R. Charles-Sigler, *Tetrahedron Lett.*, 1009 (1966).
25. S. V. Rogozhim and V. A. Davankov, *Usp. Khim.*,

- 37, 1327 (1968).
26. M. H. Hyun, D. H. Yang, H. J. Kim, and J. J. Ryoo, *J. Chromatogr. A*, **779**, 1 (1997).
27. M. H. Hyun and J. J. Ryoo, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **19**, 2635 (1996).
28. M. H. Hyun, S. C. Han, C. W. Lee, and Y. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **779**, 1 (1997).
29. R. K. Haynes, H. Hess, and H. Musso, *Chem. Ber.*, **107**, 3733 (1974).
30. G. Hesse and R. Hagel, *Chromatographia*, **9**, 62 (1976).
31. (a) Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, and K. Hatada, *Chem. Lett.*, 739 (1984).
(b) Y. Okamoto, M. Kawashima, and K. Hatada, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 5357 (1984).
32. D. W. Armstrong, T. J. Ward, R. D. Armstrong, and T. E. Beesley, *Science*, **232**, 1132 (1986).
33. K. H. Ekborg-Ott, Y. Liu, and D. W. Armstrong, *Chirality*, **10**, 434 (1998).
34. E. D. J. Lee, S. B. Ang, and T. L. Lee, *J. Chromatogr.*, **420**, 203 (1987).
35. Y. K. Tan and S. J. Soldin, *J. Chromatogr.*, **422**, 187 (1987).
36. S. Allenmark, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 425 (1986).
37. Y. Okamoto, K. Suzuki, K. Ohta, K. Hatada, and H. Yuki, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4763 (1979).
38. H. Yuki, Y. Okamoto, and I. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6356 (1980).
39. G. Wulff, H.-G. Pol, and M. Minarik, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 385 (1986).
40. G. Wulff and M. Minarik, in "Chromatographic Chiral Separation", Marcel Dekker, chap. 2, New York, 1988.
41. G. Dotsevi, Y. Sogah, and D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1259 (1975).
42. M. H. Hyun, J. S. Jin, and Y. Lee, *J. Chromatogr. A*, **822**, 155 (1998).
43. S. Hara and A. Dobashi, *J. Chromatogr.*, **186**, 543 (1979).
44. A. Dobashi, Y. Dobashi, and S. Hara, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 243 (1986).
45. F. Miles, G. Boshart, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **122**, 205 (1976).
46. F. Miles and G. Boshart, *J. Chromatogr.*, **149**, 455 (1978).
47. W. H. Pirkle, D. W. House, and J. M. Finn, *J. Chromatogr.*, **192**, 143 (1980).
48. W. H. Pirkle and J. M. Finn, *J. Org. Chem.*, **46**, 2935 (1984).
49. M. H. Hyun, J. B. Lee, and Y. D. Kim, *J. High Resol. Chromatogr.*, **21**, 69 (1998).
50. M. H. Hyun, Y. D. Kim, S. C. Han, and J. B. Lee, *J. High Resol. Chromatogr.*, **21**, 464 (1998).
51. J. J. Ryoo, S. H. Im, K.-P. Lee, J. H. Park, and M. H. Hyun, *Microchemical J.*, **63**, 128 (1999).
52. J. J. Ryoo, T. H. Kim, S. H. Choi, K-P. Lee, and J-W. Lee, *26th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques(HPLC 2002)*, p. 74. June 2-7, Montreal, Canada, 2002.
53. S. B. Lee, D. T. Mitchell, L. Trofin, T. K. Nevanen, H. Soderlund, and C. R. Martin, *Science*, **296**, 2198 (2002).
54. W. R. LaCourse, *Anal. Chem.*, **74**, 2813 (2002).
55. M. Lammerhofer, E. C. Peters, C. Yu, F. Svec, and J. M. Frechet, *Anal. Chem.*, **72**, 4614 (2000).
56. Q. Fu, N. Zheng, Y. Z. Li, W. B. Chang, and Z. M. Wang, *J. Mol. Recognit.*, **14**, 151 (2001).
57. T. Takeuchi and J. Matsui, *J. High Resol. Chromatogr.*, **23**, 44 (2000).