

대사산물의 분리, 정제 및 화학구조의 결정



이화여자대학교 약대 이 강 만

물질의 추출, 분리, 정제는 활성을 확인한 시료로부터 활성의 원인물질을 추적하며, 더 나아가 새로운 물질일 경우 물질의 성질 및 구조를 밝히는 데 필연적으로 거쳐야 할 과정일 것이다. 물질의 성질은 저분자에서 고분자, 수용성에서 지용성에 이르기까지 다양하므로 분리, 정제를 위하여는 대상물질의 성질에 알맞은 추출, 분리, 정제수단을 강구해야 할 필요성이 있다. 이러한 정제수단을 통하여 생리활성의 원인물질을 순수한 상태로 얻으며 또한 새로운 물질의 경우 구조확인을 위하여 필요한 양을 얻을 수 있을 것이다.

활성물질을 추출 분리하는 경우는 일반적으로 3 단계로 구분하여 생각할 수 있을 것이다. 1단계는 배양액 등으로부터 추출하는 단계일 것이고, 2단계는 각종 chromatography (e.g. liquid chromatography, thinlayer chromatography, electrophoresis, countercurrent chromatography, etc.) 등을 이용하여 정제하는 단계일 것이며, 제3 단계는 HPLC를 통한 정제 단계일 것이다. 제1단계는 배양액 또는 시료로부터 좋은 수율로 활성물질을 추출하기 위한 용매추출 또는 특정 성질을 지니는 물질을 흡착하는 흡착제를 이용하는 방법을 고려할 수 있다. 추출 대상물질이 지용성일 경우 ester 또는 chloroform 등의 유기용매 추출을, 수용성 물질의 경우는 이온교환수지, 활성탄흡착 등을, 지용성과 수용성의 중간 정도에 속하는 물질의 경우는 butanol 추출방법을 선택할 수 있다. 근년에 합성흡착제 등을 이용하여 목적하는 물질을 선택적으로 흡착 분리하는 방법도 고안되고 있다. 이러한 목적으로 사용되는 흡착제로는 styrene divinylbenzene copolymer 인 Amberlite XAD 등이 있다. 이러한 흡착제를 사용하여

수용액으로부터 유기물질을 흡착하며, resin에 흡착된 유기물질은 methanol 수용액, acetone 수용액 등으로 추출한다. 이러한 방법은 지용성 물질로부터 수용성 물질에 이르기까지 이용할 수 있어 추출분리방법으로 유용한 면이 있다. 한편, 중성이면서 수용성의 성질을 가지는 물질을 선택적으로 분리 추출하는 방법에는 아직껏 특별한 것이 없어 그러한 성질을 가지는 물질을 분리하는 데는 어려움이 있다.

수용액 중에 존재하는 고분자 물질을 분리하고자 하는 경우는 polyacrylamide, agarose, dextran 등으로 만들어진 gel을 유용하게 사용할 수 있다. 유기용매에 사용할 수 있는 gel 여과제도 개발되어 지용성 물질이나 극성이 큰 유기용매에 잘 용해되지 않는 물질의 정제에 유용한 것으로 알려지고 있다. 대표적인 예로 dextran gel의 개량형태로 Sephadex LH 등을 들 수 있다.

물질의 성질이 지용성일 경우 silica gel, alumina 등의 흡착제를 흔히 이용할 수 있다. 또한 다량의 분리에는 silica gel을 이용한 flash chromatography 방법을 이용할 수 있다.

분자 내에 강한 소수성기와 친수성기를 가지는 물질은 ester, ketone 등의 유기용매에 용해시킬 수 있으나 물질의 정제는 정제수단의 한계로 곤란한 경우가 많다. 그러나 유기용매를 사용 가능한 Sephadex LH 등의 gel을 이용하며 알콜계 또는 수용성 알콜 용매제로 분리할 수 있는 경우도 있다.

산성 또는 염기성 관능기를 포함하고 있는 활성물질의 정제에는 물질이 지니는 이온의 성질을 이용하여 cellulose, dextran, resine 등에 ionic group이 도입된 매질에서 정제할 수 있다. 한편

agarose 나 polyacrylamide 담체에 ionic group 을 도입한 이온교환담체 (e.g. Sepharose) 등이 개발되어 극성 유기용매, 물과 유기용매 혼합 용매 계를 이용하여 chromatography 를 행할 수 있으므로 해서 알콜 등의 극성용매에 녹는 물질로 산성 또는 염기성을 나타내는 물질을 이온 chromatography 를 할 수 있다. 또한 분자 내에 강한 소수성기와 친수성기를 동시에 가지는 물질의 정제에도 이용 가능성이 있다.

HPLC 의 경우 최근 들어 충전제 및 장치면에서 많은 발전이 있어 종전에는 분리가 불가능했던 물질의 경우도 비교적 다량으로 순수하게 분리할 수 있게 되었다. 특히 화학구조가 유사한 물질-기하이성체 또는 입체이성체-등을 분리 정제하는 데 유용한 수단이 되고 있다. HPLC 을 통하여 물질을 분리하고자 할 때는, 경우에 따라서 column 선택이 달라질 수 있다. 즉 다량의 불순물 중에 들어 있는 미량의 목적물질을 분리하는 경우 물질의 특성에 따라 물질 분리의 선택성을 보이는 특별한 충전제가 들어 있는 column 을 사용하게 된다. 또한 목적물질을 다량으로 얻고자 할 때는 직경이 큰 column 을 사용하여 다량 분리를 시도할 수도 있게 된다.

Column 충전제로는 화학적으로 수식된 silica gel 을 이용한 역상 chromatography 가 유기화합물 분리에 적합하다는 사실을 알게된 이후로 C₁₈ n-paraffin 으로 수식된 ODS-silica (octadecylsilane-silica) 등을 담체로 널리 이용하게 되었다. 지용성 물질이나 극성이 큰 유기용매에 용해성이 좋은 물질은 ODS-silica 역상 또는 silica gel 을 이용한 순상(順相) chromatography 를 이용하여 분리할 수 있으며, 수용성 물질의 분리에는 단순한 ODS-silica 보다는 amino 기 또는 nitro 기 등의 관능기가 도입된 ODS-silica 를 이용하여 친수성기에 대한 친화력을 증가시킨 충전제를 고려할 수 있다. 산성기나 염기성기를 함유하는 수용성 물질의 경우는 ion 교환형 담체를 이용할 것이다. 분자 크기의 차이에 따른 분리에는 gel permeation 충전제를 생각할 수 있을 것이다. 그러나 앞에서 언급한 바와 같이 수용성이며 중성물질의 분리에는 이렇다 할 선택성을 보이는 충전제를 이아

기할 수 없는 경우가 허다하다.

새로운 생리활성 물질의 발견을 목적하는 경우는 대상물질의 생리활성 실험, 화학구조 및 생리활성의 작용기전 등을 규명하는 데 순수한 물질이 다량 필요하게 될 것이다. 이러한 경우 분석용 column 을 이용해서 물질 분리의 재현성이 좋은 경우라면 직경이 큰 (d: 8-25 mm) column 을 사용하여 분석용 column 을 사용한 경우의 100-1000 배량의 시료를 한번에 주입하여 대량 분리를 시도할 수 있다.

물질이 위의 여러가지 방법 등을 통하여 순수하게 분리되면 먼저 물리, 화학적 성질 등을 조사할 수 있을 것이다. 용점, 분해점, 비점, 선광도, 각종 chromatography 에서 Rf 치 또는 Rt 치, 각종 정색반응 등을 조사하여 기존의 물질과 비교할 수 있으며, 다음 단계의 구조결정을 위한 실험선택에 유용하게 이용할 수 있을 것이다. 구조결정에 이용되는 방법들에는 질량분석, 적외선 흡수, 자외선 흡수, NMR, X-선 회절분석 등을 들 수 있다. 구조결정의 단계 및 사용되는 방법들을 간략히 살펴보면 다음과 같다.

분자량 또는 분자식의 결정에는 원소분석 (elemental analysis)을 통해 물질의 원자 조성비를 구할 수 있으며, 질량분석법 (mass spectrometry), 용점 강타법, gel permeation chromatography 등을 통하여 분자량을 결정한다. 이 중에서도 질량분석법은 분자량을 결정하는 데 빈번히 이용되는 방법으로 이온을 생성시키는 방법 등에 따라서 electron ionization MS, chemical ionization MS, field desorption MS, fast atom bombardment MS, secondary ion MS 등이 개발되어 이용되고 있다. MS 의 pattern 으로부터 분자량을 알 수 있을 뿐만 아니라, fragmentation pattern 을 읽을 수 있어 구조해석에 유용하게 이용할 수 있다. 한편 물질의 분리와 질량 분석을 동시에 할 수 있는 방법으로 GC-MS 또는 LC-MS 방법들이 이용되고 있다. 이러한 방법들을 이용하여 분자식이 얻어지면, 분자식 중 1가원자(H, D, halogen 등)의 수(I), 3가원자(N, P 등)의 수(III), 4가원자(C, Si 등)의 수(IV)로부터 불포화도(IV - (I/2) + (III/2) + 1)를 구할 수 있

다. 불포화도가 1이면 분자 중 이중결합이 있거나 환(ring)이 1개 포함되어 있음을 시사하며, 3중결합은 불포화도 2, benzene ring 은 4, furan ring 은 3이 된다.

적외선 흡수 spectrum(IR)은 파장 2.5-16 μm (4,000-625 cm^{-1})의 영역에서 분자 내의 stretching, bending 에 따른 특정파장의 흡수를 보는 것으로 분자 내의 고유진동에 관한 정보를 얻을 수 있다. 실제 Spectrum 중 4,000-1,500 cm^{-1} (2.5-6.6 μm) 부분에서 각종 관능기(functional group)의 흡수 pattern 을 볼 수 있어 functional group region(관능기 영역)이라 하여 Olefin, alkyne carboxy, aromatic ring, hydroxyl group, amino group 등의 존재를 확인할 수 있다. 한편 1,500-600 cm^{-1} (6.6-16.0 μm) 영역에서는 원자 결합 간 각도변화(bending)을 볼 수 있는 영역으로 복잡한 흡수 pattern 을 보여 물질의 finger-print region 이라 흔히 칭하며, 시료의 검정에 흔히 이용된다.

자외선 흡수 spectrum(UV)은 분자 중 ground state 에 있는 전자가 자외선의 energy 를 흡수하여 excited state 로 되는 데에서 볼 수 있는 현상으로 분자 중 $\pi-\pi^*$ 또는 $n-\pi^*$ transition 에 기인한다.

따라서 분자구조 중 diene(공액이중결합), ene-one(α, β -unsaturated carbonyl), aromatic ring 등의 존재여부를 확인할 수 있어 UV 흡수 pattern 으로부터 steroid, isoquinoline alkaloid, polysaccharide, flavone 등을 포함한 물질인가를 확인하는 데 유용하다.

핵자기공명 spectrum(NMR)은 일반적으로 nuclear spin 이 0이 아닌 원자(다시말해 원자번호와 질량수가 둘다 짝수가 아닌 경우)가 일정한 자장(magnetic field: H_0) 중에 있을 때 공명주파수의 전자파(H_1)을 조사하면 energy 흡수 pattern 을 보이는 데 이를 관찰하여 분자구조결정에 이용하는 방법이다. 구조결정에서 흔히 관찰하는 원자는 ^1H 과 ^{13}C 이며 분자 중의 각각 ^1H 또는 ^{13}C 가 처해있는 상황(electronic state 에 따른 shield effect 의 차이)에 따라 공명주파수가 다르며 이것이 chemical shift 로 나타난다. 따라서 이

러한 chemical shift 로부터 분자구조에 대한 정보를 얻을 수 있다. 또한 원자와 원자 사이의 spin-spin coupling 현상이 나타나며 상관위치에 따른 일정한 spin-spin coupling constant (J, HZ)를 가져 이 또한 이웃하는 원자들과의 구조적 관계를 밝히는 데 유용하게 이용된다. $^1\text{H-NMR}$ 의 경우 proton signal peak 의 integration 으로부터 분자 중 proton 의 개수를 알 수 있으며, NOE(Nuclear Overhauser Effect)를 이용하여 입체구조관계를 알 수 있다. $^{13}\text{C-NMR}$ 의 경우 자연계에 존재하는 탄소 중 ^{13}C 은 1.1%이며, ^{13}C 의 자기회전비(gyromagnetic ratio)는 ^1H 의 1/4 이어서, 천연에 존재하는 ^{13}C 의 $^{13}\text{C-NMR}$ 는 $^1\text{H-NMR}$ 에 비해 1/6000 정도의 감도를 보인다. 따라서 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 관찰을 위해서는 다량의 시료와 긴 시간이 소요된다. 이러한 이유로 모든 ^{13}C 핵을 동시에 조사하여 관찰하는 PFT-NMR(Pulse Fourier Transform NMR)이 이용되며 scanning 수를 많이 함으로써 적은 양의 시료로부터 ^{13}C signal 을 얻을 수 있게 되었다. 분자 중에 존재하는 탄소수와 각 탄소의 chemical shift 를 관찰하는 데는 proton complete decoupling(또는 broad band decoupling) 방법을 사용하며, 각 탄소에 결합되어 있는 수소수를 관찰하는 데는 off resonance decoupling 방법, DEPT(distortionless enhancement by polarization transfer) 또는 INEPT(insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) 방법 등을 사용한다. NMR 가 구조결정에 널리 이용되게 된 이유는 hard ware(superconductive magnet : up to 600 MHz)와 soft ware 가 공히 개발됨으로써 미량의 sample 인 경우일지라도(최저 수십 μg) data 를 얻을 수 있으며, 실제적인 면에서 5-30 mg 의 순수정제된 시료가 준비된 경우 1차원 spectra 뿐만 아니라 2차원 NMR spectra 로부터, H, C 원자들의 연결 상태, 위치의 상관관계 등을 알아낼 수 있기 때문이다. Hard ware 로서 magnet power 가 커짐으로써 signal separation 이 좋아졌으며, soft ware 면에서는 100종이 넘는 pulse sequence 가 개발되어 coupling constant 결정(J-resolved 2D-NMR), $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ shift 상관관계 결정($^1\text{H-}^{13}\text{C}$

shift correlated 2D-NMR), ^1H -shift 상관관계 (COSY), NOE 상관관계 (NOESY), 탄소-탄소 간의 연결관계 (INADEQUATE)을 알 수 있게 되었다. 따라서 molecular weight 가 그리 크지 않는 물질의 경우(분자량 < 1000-1300) 탄소, 수소의 연결관계와 3차 구조까지 파악할 수 있는 방법이 NMR 을 통해 제공되고 있다.

기하이성체와 입체구조를 밝히는 데는 ^1H -NMR 에서 coupling constant, NOE 등의 유무, ^{13}C -NMR 의 chemical shift 의 변화 등으로부터 상대입체구조에 관한 정보를 얻을 수 있다. 이밖에 선광분산(ORD), 원편광이색성(CD), X-선 구조결정 등으로부터 이성체 및 입체구조를 확인할 수 있다. 특히 물질의 단결정(각변이 0.2-0.4 mm 정도 이상)이 얻어질 수 있다면 X-선 결정 해석방법을 통하여 확실한 구조를 결정할 수 있으며 원자 상호간의 위치관계를 해석할 수 있게 된다. 이상에서 물질의 분리과정과 구조결정에 관련된 단계, 방법들에 대하여 개술하였다. 물질의 분리에서는 분리매질에 있어서 분리하고자 하는 물질의 특이한 물성을 이용할 수 있는 매질의 개발

이 지속될 것으로 생각되며, 구조결정의 각 방법들에서도 soft ware 의 발달로 미량의 물질로부터 구조를 결정할 수 있는 방향으로 진전할 것이다.

참고문헌

1. 大野雅二, 大村智編 “抗生物質研究の最先端”, 東京化學同人, pp.53-69(1987).
2. 官崎利大編 “天然物醫藥品學”, 朝倉書店, pp. 15-26(1987).
3. R.J. Hamilton and P.A. Sewell “Introduction to high performance liquid chromatography”, Chapman and Hall, pp.80-125(1982).
4. J.R. Chapman “Practical Organic Mass Spectrometry” John Wiley & Sons, 1985.
5. Morris Zief and Laura J. Crane “Chromatographic Chiral Separations” Dekker, 1988.
6. E. Breitmaier and W. Voelter “Carbon-13 NMR spectroscopy” VCH, pp.1-181, 1987.
7. J.P. Glusker and K.N. Trueblood, “Crystal Structure Analysis A Primer”, Oxford University Press, pp.3-62, 1985.