

Chiral Drugs의 광학분할을 위한 HPLC Column의 응용

이 원 재[#]

조선대학교 약학대학 약학과

(Received November 16, 2008; Revised December 30, 2008; Accepted February 1, 2009)

The Application of Chiral HPLC Columns for Enantiomer Separation of Chiral Drugs

Wonjae Lee[#]

College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-709, Korea

Abstract — In terms of chiral issue, two enantiomers of chiral drugs often differ significantly in their pharmacological, toxicological and pharmacokinetic profile. Chiral switches of racemic drugs have been redeveloped as single enantiomers. Several chiral resolution techniques in chirotechnology are introduced and the most used chiral HPLC chromatographic method among several chiral analysis techniques is described with its several advantages. Several types of chiral HPLC columns derived from their chiral selectors are discussed with their property and applications for enantiomer separation.

Keywords □ chiral drug, chiral separation, chiral HPLC column, chromatography

자연계에는 원자들의 공간상 배열의 차이로 구조식은 동일하지만 서로 겹쳐지지 않는 서로 거울상의 관계를 가지는 거울상이성질체(enantiomer)물질이 존재한다. 한 쌍의 enantiomer는 각각 편광 광선(plane polarized light)을 회전시키는 선광도(optical rotation) 값은 동일하나 부호가 정반대되는 것을 제외하고는 모든 물리적, 화학적 성질이 동일하여 구별이 불가능하며 단지 chiral 환경에서만 구별이 가능하다. 그런데 지구상의 모든 생명체는 본질적 구조상 chirality를 가지고 있어 chiral환경을 제공하므로 한 쌍의 enantiomer는 생체 내에서 서로 다른 생리활성(biological activity)를 나타낼 수 있다.^{1,2)} 키랄 의약품(chiral drug) 중 라세미체(racemate)로 구성된 두 개의 enantiomer 중 하나의 enantiomer는 원하는 biological activity를 나타내는데 다른 enantiomer는 biological activity를 나타내지 않거나 전혀 다른 성질 또는 독성 등의 부작용을 나타내기도 한다.¹⁻³⁾ 2001년 Nobel 화학상으로 chiral catalysis를 이용하여 asymmetric synthesis하는데 크게 기여한 William S. Knowles, Ryoji Noyori, Barry K. Sharpless 세 과학자가 수상하였다. William S. Knowles와 Ryoji Noyori는 asymmetric hydrogenation 반응에서 그리고 Barry K.

Sharpless는 asymmetric oxidation 반응에서 chiral catalysis를 이용해 원하는 한쪽 enantiomer만을 optically pure한 상태로 손쉽게 합성할 수 있는 방법을 개발하는 커다란 공헌을 인정할 것인데 이는 chiral drug을 개발하는데 매우 중요한 합성기술로 사용되고 있다.¹⁾

키랄 화합물을 구성하는 두 개의 enantiomer가 흡수, 분포, 대사 배설과정의 약동력(pharmacokinetic) 성질의 차이와 수용체나 효소와의 상호작용으로 인해 다르게 나타나는 biological activity 및 독성 등의 차이를 가져오는 이러한 문제점 때문에 1992년부터 미국 FDA에서 chiral drug의 regulation guideline을 통하여 stereogenic center를 가지고 있는 의약품을 규제하기 시작하였고 1997년에는 FDA에서 기존에 시판되는 racemic 의약품을 single enantiomer로 개발할 경우 5년간 시장독점권을 주도록 인정하였다.³⁻⁵⁾ 이러한 결정은 세계의 유수한 제약회사들에게 기존의 시판되고 있는 racemic 의약품을 single enantiomer로 재개발하도록 하는 racemic drug의 chiral switch 열풍을 불게 하였다.^{6,7)}

Racemic drug의 chiral switch의 사례

Chiral switch란 기존에 허가되어 시판하고 있던 racemic drug을 원하는 biological activity를 나타내는 single enantiomer로 바꾸는 것을 말한다(Fig. 1).⁷⁾ Chiral switch 시킨 의약품은 racemic

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 062-230-6376 (팩스) 062-222-5414
(E-mail) wlee@chosun.ac.kr

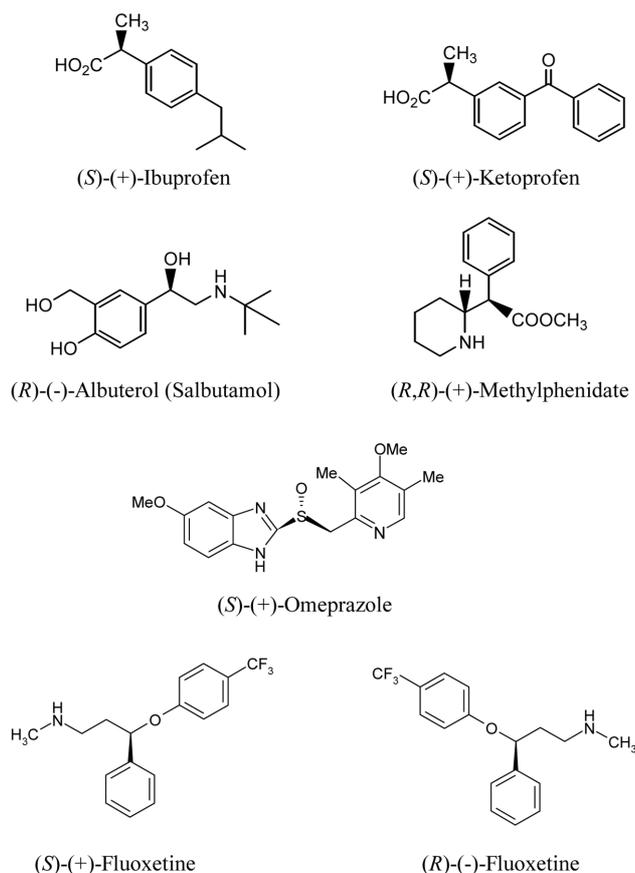


Fig. 1 - Typical examples of chiral switches of racemic drugs.

drug보다 약동력(pharmacokinetic) 성질을 이용하여 부작용을 줄이고 선택성을 높여 원하는 약효를 높이는 잠재적인 장점을 보여줄 수 있다. 이러한 racemic drug의 chiral switch의 대표적인 사례로 1969년부터 소염진통제로 사용된 ibuprofen을 들 수 있다. Ibuprofen을 대상으로 racemic drug과 chiral drug의 술한 논쟁후에 1994년 오스트리아에서 (S)-(+)-ibuprofen(dexibuprofen)이 Gebro Broschek에 의해 Seractil 라는 이름으로 개발되었고, 또한 1997년 말에 스위스에서 Spirig AG에 의해 DexOptifen라는 이름으로 개발되었다. Ibuprofen과 함께 NSAIDs(non-steroidal anti-inflammatory drugs) 중의 하나인 Wyeth 제약회사의 ketoprofen도 racemic drug으로 사용되다가 Warner-Lambert와 Menarini에 의해 chiral switch되었는데 (S)-(+)-ketoprofen(dexketoprofen)이 Enantyum 라는 이름으로 1998년 유럽에서 개발되었다.^{7,8)}

Glaxo의 항천식제로 사용되던 racemic albuterol(유럽에서는 salbutamol로 알려짐)도 Sepracor회사에 의해 (R)-(-)-albuterol(levabuterol)이 Xopenex 라는 이름으로 1999년 미국에서 개발되었으며 대표적인 집중력 강화제와 ADHD 치료제로 쓰이는 methylphenidate(Retalin)도 Novatis와 Celgene 회사에 의해

(R,R)-(+)-methylphenidate(dexmethylphenidate)가 Focalin라는 이름으로 2001년 미국에서 chiral switch되어 시판되고 있다.^{9,10)}

Racemic drug이 chiral switch된 가장 이상적이면서 대표적인 것은 세계에서 가장 많이 팔리는 의약품중 하나인 위궤양치료제의 omeprazole(Losec, Prilosec)의 경우이다. Racemic drug인 omeprazole은 실제로 (S)-enantiomer만이 생리활성을 나타내므로 AstraZeneca에서 1998년 이 single enantiomer만으로 특허를 얻어 2002년 racemic drug의 특허권이 만료되기 전인 2000년부터 esomeprazole(Nexium)라는 이름의 새로운 chiral drug으로 시판하고 있다. 이외에도 세계의 유수한 제약회사에서 이미 시판되고 있는 많은 racemic drug들을 single enantiomer로 전환하고자 하는 많은 실례가 보고되고 있다.^{8,10,11)}

위의 경우와 달리 racemic drug의 chiral switch의 실패의 예로는 20여년 동안 우울증 치료제로 Eli Lilly가 개발하여 시판하여 온 racemic fluoxetine(Prozac)이 있다. 1996년 Sepracor라는 작은 회사에서 (S)-(+)-fluoxetine과 (R)-(-)-fluoxetine에 대해 각각 편두통과 우울증치료제로 특허를 제출함으로 큰 이슈가 되었고 그 후에 Sepracor와 Eli Lilly가 각각의 enantiomer를 신의약품으로 개발을 진행하였지만 2000년 phase 2에서 안전성 문제와 지적 재산권문제로 개발을 보류하였다.^{10,12)}

Chiral switch를 위한 chirotechnology 기술과 여러 광학분할 분석법

1983년부터 20년 동안 현재 전 세계적으로 시판되고 있는 의약품 중에서 chiral drug은 약 60% 정도를 차지하고 있다. 그 가운데 순수한 하나의 거울상이성질체 형태로 판매되는 의약품은 40% 이하이고 아직도 20% 이상의 의약품이 두 거울상이성질체가 반반씩 혼합되어 있는 racemic drug 형태로 판매되고 있다.⁶⁾ 그러나 1991년 이후로부터 전 세계적으로 시판되도록 허용된 의약품가운데 racemic drug의 비율이 점차 줄어들어가고 있다. Racemic drug에서 순수한 하나의 enantiomer 만의 drug을 개발할 경우, 이것을 신규 의약품으로 간주했기 때문에 제약회사에서 이미 알고 있는 racemic drug의 성질을 기초로 한 chiral switch를 통한 신의약품 개발에 대한 매우 큰 관심이 있어 왔다.⁷⁾ Chiral switch drug으로 성공적으로 진행할 목적으로 신물질 혹은 신약 개발과 관련된 전 세계의 의약학 및 화학계에서는 광학적으로 순수한 optical active 물질을 합성하는 연구와 더불어 racemate로부터 enantiomer를 분리해내는 chiral resolution과 광학활성 물질의 순도를(enantiomeric purity) 정확하게 측정할 수 있는 분석기술 등을 포함하는 chiral separation technology를 확보하기 위한 노력에 심혈을 기울였다.¹⁻³⁾ 원하는 생리활성을 나타내는 하나의 광학이성질체만을 얻고자 하는 광학활성 화합물의 비대칭 합성, 광학활성 물질의 enantiomeric purity 측정, absolute stereochemistry의 결정 등 chiral 화합물과 관련된 모

든 기술을 *chirotechnology*라 일컫는데, 이 가운데 가장 핵심적인 기술은 광학활성물질을 제조하는 기술과 획득한 광학활성물질의 광학순도를 측정하는 기술이다. 특히 전자의 경우 비대칭 합성방법을 통해 광학활성물질을 획득한다고 해도 후자의 분석 기술을 통해 *enantiomeric purity*를 측정하는 것이 필수적이기 때문에 후자의 키랄분석기술은 더욱 핵심적이고도 기초적인 분석학문의 영역이라 말할 수 있다.

광학분할 분석법을 통하여 *enantiomeric purity*를 측정하는 방법으로는 1) *polarimeter*를 이용하는 분석 2) NMR 키랄분석 (*Europium* 유도체 등을 이용한 *chiral lanthanide shift* 시약, 1-(9-anthryl)trifluoroethanol 같은 *chiral solvating agent*, Mosher's reagent 등을 이용) 3) Chiral HPLC, Chiral GC를 사용하는 chromatographic 키랄분석 4) Chiral capillary electrophoresis 등 여러가지 방법이 있다.^{2,13-17} 그러나 *polarimetry* 경우, 1980년도 전에는 고전적인 방법으로 많이 사용되었으나 지금은 거의 사용되지 않으며 NMR 분광기기를 이용한 키랄분석 방법은 오차범위가 넓어 정밀측정이 어려운 단점이 있어 일반적으로 적용하기는 어려움이 있다. Chiral GC의 경우 *chiral separation* 영역에서 가장 먼저 시작된 연구영역으로 분석물질이 휘발성인 경우 매우 탁월하게 적용할 수 있으나 그 외의 경우에는 시료 성질의 한계를 가지고 있으며 *chiral capillary electrophoresis* 경우 Chiral HPLC에서 사용하고 있는 *chiral selector*를 이용하여 최근들어 분석법이 개발되고 있는 분야이다.

Chiral HPLC chromatography 분석법

다른 여러가지 키랄분석법 가운데 HPLC에서 *chiral column*을 이용한 *racemate*의 광학분할 분석법은 기기사용이 간편하고 *chiral* 물질의 *enantiomeric purity*를 정확하고 빠르게 측정하는 정보를 제공할 뿐만 아니라 LC-MS 분석으로 미량의 대사물질 분석에 적용하기에 용이하며 또한 각 *enantiomer*의 *absolute stereochemistry*를 결정할 정보를 제공할 수도 있기 때문에 *stereochemistry*와 관련된 문제점들을 해결할 수 있는 가장 좋은 방법으로 인식되고 있어 가장 많이 사용되어져 왔다.¹⁵⁻¹⁷

특히 HPLC를 이용하는 키랄분석의 가장 큰 장점중의 하나는 *preparative liquid chromatography*상에서 대용량 *chiral column*을 사용하여 *chiral resolution*을 실시하는 경우, *enantiomeric purity*가 아주 높은, 각각의 *enantiomer*를 동시에 얻을 수 있기 때문이다. 또한 용량이 작은 *chiral column*을 사용하여 *biological activity*를 테스트할 수 있을 정도의 소량의 순수한 *enantiomer*만을 얻을 수 있기 때문에 이 방법은 새로운 *chiral drug*을 개발하는 과정에서 아주 유용하게 사용될 수 있다. 즉 얻어진 소량의 각각의 순수한 *enantiomer*를 사용하여 각각의 *enantiomer*의 *biological activity*를 시험하고 그 결과에 따라 *chiral drug*으로서의 성공 가능성을 진단한 후 원하는 *biological activity*를 나타내

는 하나의 *enantiomer*만을 대량으로 얻을 수 있는 다른 방법(예를 들면 *asymmetric synthesis*이나 *kinetic resolution*, *enzymatic resolution*, 발효법 등)을 개발하는 것이 시간과 개발비를 대폭적으로 절약하는 방법이 된다.

또한 *chiral drug*의 경우에는 소량의 *optical impurity*라도 원하지 않는 독성을 나타낼 수 있기 때문에 *chiral drug*을 개발, 생산하는 과정에서 얻어지는 모든 *chiral* 중간체와 최종의 *chiral drug*의 *enantiomeric purity*를 확인하는 것 뿐만 아니라 생체내에서 일어나는 *chiral drug*의 *pharmacokinetic*(PK) 또는 *pharmacodynamic*(PD) 결과를 측정하고 이에 관련된 *chiral drug*의 *mechanism*을 규명하는 것이 필요하다. 이를 위해 HPLC에서 *chiral column*을 사용하여 *chiral drug*의 생체내 실험시료를 간단한 전처리 과정후 직접 *enantiomeric purity*를 측정하거나 *chiral drug*의 대사물질을 분석할 수 있는 장점이 *liquid chromatography*의 특성상 다른 어느 분석기술보다도 유용한 면으로 활용될 수 있다.^{3,15}

HPLC용 chiral column의 종류와 특징

1980년 초에 *chiral HPLC column*이 상품화된 이후로부터 매우 다양한 HPLC용 *chiral column*이 개발되었다. 이들 *chiral column*은 키랄 선택자(*chiral selector*)를 합성하여 만든 *chiral column*과 자연계에 존재하는 고분자나 *protein* 등의 천연물질이나 합성고분자를 키랄 선택자로 하여 만든 *chiral column*으로 크게 구분할 수 있다. Table I에는 현재 상품화되어 시판되고 있는 주요 *chiral column*을 소개하였는데 여기에서는 실제적으로 학계나 산업체에서 가장 많이 사용하는 *column*을 중심으로 그 *chiral column*의 특성과 개발 그리고 그 응용범위에 대해 기술하고자 한다.¹⁵⁻¹⁸

Pirkle type(brush type) chiral column - Chiral separation 영역의 개척자로 가장 먼저 이스라엘 Emanuel Gil-Av 교수에 의해 1960년대에 *amino acid* 유도체를 이용한 *chiral GC column*을 개발하여 시작하였지만 HPLC *chiral column*의 경우, 선구자적인 역할로 미국 일리노이 주립대학의 William H. Pirkle교수에 의해 1980년에 처음 개발한 Pirkle type *column*이다.^{18,19} Pirkle type *column*은 *chiral selector*가 *silica gel*과 같은 지지체에 마치 칫솔에서와 같이 배열되었다 해서 *brush type column*이라 불리우기도 한다. Pirkle은 *chiral recognition*의 상호성 개념(*reciprocal principle*) 아주 유용하고 적절하게 이용하여 여러 종류의 *chiral column*을 개발하였다.¹⁹ 사용한 키랄 선택자(*chiral selector*)는 전하이동 착물(*charge transfer complex*)을 형성하는 π -acidic 또는 π -basic성질을 가지는 작은 분자의 유기화합물이므로 (+)와 (-)의 *chiral selector*를 이용한 (+)와 (-)의 *chiral column*을 모두 가질 수 있어 *elution order*를 원하는 대로 바꿀 수 있는 장점이 있다. 또한 대부분의 Pirkle type *column*

Table I – Commercially available HPLC chiral columns

Chiral columns derived from synthesized chiral selectors of small molecules			
Type	Chiral selector	Chiral HPLC column	Supplier
Pirkle type (Brush type)	π -acidic type: DNB amino acids or small molecules	Phenylglycine, Leucine, β -Gem 1, α -Burke, Pirkle 1-J DACH-DNB	Regis
	π -basic type: small molecules	Naphthylleucine	
	π -acidic and π -basic type: small molecules	Whelk-O, ULMO	
	DNB amino acids	Sumichiral OA series (2500, 3200, 4000)	Sumika
Crown ether type	Binaphthyl 18-crown-6 derivative	Crownpak CR(+)/CR(-)	Daicel
	18-Crown-6 tetracarboxylic acid derivative	ChiroSil RCA(+)/SCA(-)	RS Tech
Chiral ligand exchange type	Amino acids or small molecules	Chiralpak WH, Chiralpak WM, Chiralpak WE, Chiralpak MA(+)	Daicel
Chiral columns derived from chiral selectors of polymer products (natural or synthetic polymer and protein etc)			
Type	Chiral selector	Chiral HPLC column	Supplier
Polysaccharide type	Cellulose ester derivatives	Chiralcel OJ, OB, OA, OK	Daicel
	Cellulose carbamate derivatives	Chiralcel OD, OC, OG, OF Chiralcel OD-R, OJ-RH (Reversed phase) Chiralpak IB, Chiralpak IC	
	Amylose carbamate derivatives	Chiralpak AD, AS Chiralcel AD-RH, AS-RH (Reversed phase) Chiralpak IA	
Cyclodextrin type	β -CD(Cyclodextrin) γ -CD α -CD	Cyclobond I Cyclobond II Cyclobond III	Astec
Natural protein type	AGP (α_1 -Acid glycoprotein)	Chiral AGP/EnantioPac	Chrom Tech/Pharmacia
	BSA (Bovine serum albumin)	Resolvosil BSA-7	Macherey-Nagel
	HSA (Human serum albumin)	Chiral HSA	Chrom Tech
	CBH (Cellobiohydrolase)	Chiral CBH	Chrom Tech
Synthetic polymer type	Poly(triphenylmethyl methacrylate)	Chiralpak OT(+)	Daicel
	Poly(diphenyl-2-pyridylmethyl methacrylate)	Chiralpak OP(+)	Daicel
	Tartaric acid derived polymers	Kromasil Chiral DMB, TBB	Akzo Nobel
Macrocyclic antibiotic type	Vancomycin	CHIROBIOTIC V	Astec
	Ticoplanin etc	CHIROBIOTIC T, CHIROBIOTIC TAG	
	Ristocetin A	CHIROBIOTIC R	

의 경우, chiral selector를 silica gel과 같은 고체지지체에 covalent bonding시킴으로써 column자체가 상당히 안정할 뿐만 아니라 어떤 용매도 mobile phase로 사용할 수 있어 preparative separation 실험을 실시할 때나 *in situ* 반응의 실제적 실험에서 상당한 장점이 있다. 또한 chiral selector가 실험실에서 합성가능한 분자량이 작은 유기화합물이기 때문에 chiral column상에서 chiral separation이 일어날 때의 chiral recognition mechanism을 NMR이나 X-ray연구를 통해 직접적으로 관찰하기가 용이한 면이 있다. Chiral recognition mechanism을 밝힘으로써 이를 바탕으로 효과적인 chiral selector를 고안하여 맞춤형(tailor-made) chiral column을 개발할 수 있기 때문이다.²⁰⁾

미국의 Regis Technologies(www.registech.com)에서 시판하는 여러 가지의 Pirkle type column 중에서 Whelk-O column은 소염진통제로 쓰이는 ibuprofen이나 naproxen 같은 NSAIDs 계통의 광학분할에 탁월하다.^{20,21)} 또한 미국의 Regis Technologies에서 상품화되어 있는 α -Burke과 Pirkle 1-J column은 고혈압과 협심증 치료제로 쓰이는 β -blockers의 광학분할에 매우 유용하다.^{21,23)} 일반적으로 Pirkle type column은 전하이동 착물형성을 chiral mechanism으로 하고 있기 때문에 광학분할 하고자하는 분자내에 π -acidic 또는 π -basic group을 가지고 있거나 혹은 그러한 작용기를 가지는 유도체로 만들어서 사용한다.²¹⁾ Fig. 2는 Pirkle type column중 Whelk-O와 Pirkle 1-J의 고정상 구조와

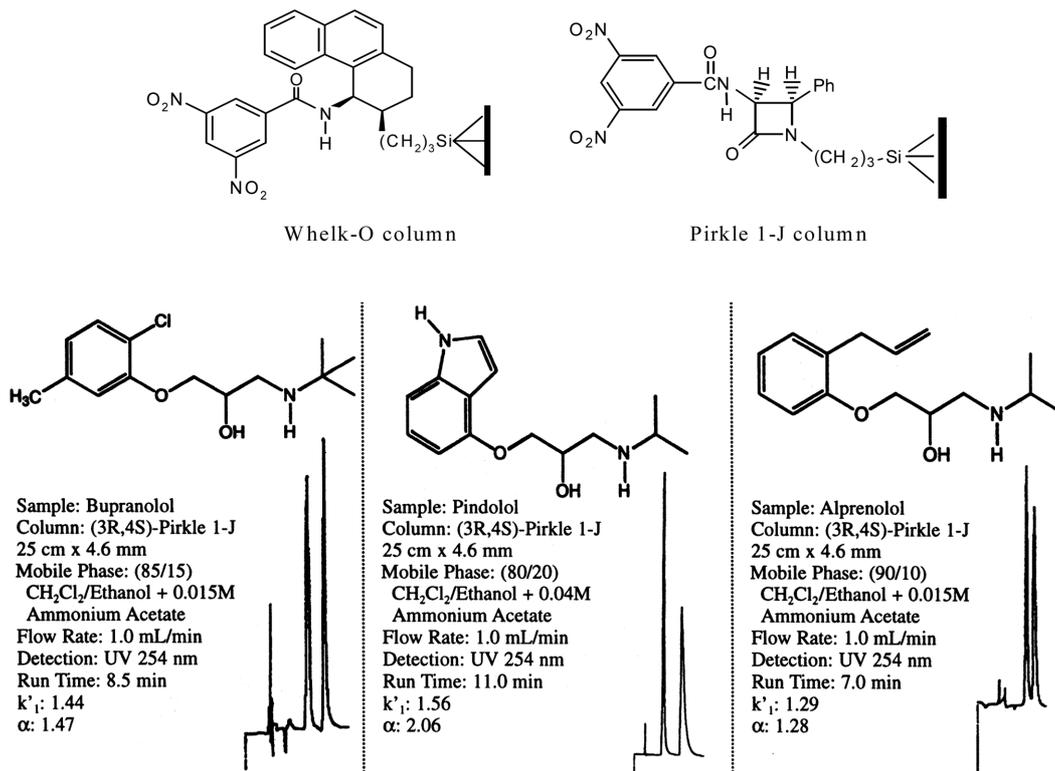


Fig. 2 – Structures of Pirkle type columns and chromatograms of enantiomer separation of β -blockers on Pirkle 1-J.

Pirkle 1-J에서 β -blockers을 광학분할하는 대표적 크로마토그램을 보여주고 있다.

Crown ether type chiral column – Crown ether type column은 host-guest chemistry로 노벨화학상을 수상한 Donald J. Cram 교수에 의해 1979년 소개되었으며²⁴) 그중 가장 대표적인 chiral column으로 1987년 Shinbo에 의해 개발되어 일본의 Daicel company에서 (www.chiraltech.com) Crownpak CR이라는 이름으로 상품화되었다.^{25,26}) Crownpak CR의 chiral selector는 binaphthyl group과 함께 분자내의 chiral crown ether의 chiral cavity를 가지고 있으며 이것과 일차 아미노기를 가지는 racemic 화합물사이의 host-guest stereoselective complexation을 통하여 광학분할을 일으킨다.^{24,25}) 이 column은 아미노산을 포함한 일차 아미노기를 가지는 racemic 화합물의 광학분할에 매우 효과적으로 이용되고 있다. 그러나 Crownpak CR의 경우 HPLC C_{18} 고체지지체에 chiral selector로 쓰이는 chiral crown ether를 coating 시키기 때문에 15% methanol/water 이내의 이동상만 사용해야하는 본질적인 약점을 가지고 있다. 그러므로 15% methanol/water 이상의 용매나 methanol이 아닌 다른 용매를 사용할 경우, chiral selector가 씻겨나가 column이 손상되는 문제가 있다. 따라서 hydrophobicity가 큰 화합물이 경우 elution이 되지 않거나 분석시간이 매우 길어지는 단점을 보인다.²⁶⁻²⁸) Fig. 3은 해외시장판매를 목적으로 국내기술로 개발되어

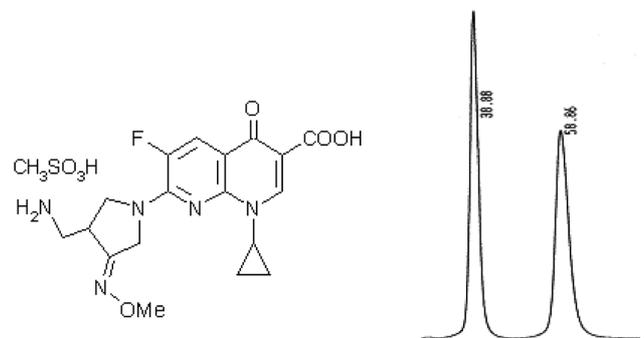


Fig. 3 – Structure of Gemifloxacin (LB20304a) and chromatogram of enantiomer separation on Crownpak CR(+).

FDA 허가를 받은 국내 최초의 신약이라 불리우는 제 4세대 항생제인 racemic Gemifloxacin(LB20304a)의 Crownpak CR(+)에서의 광학분할의 결과이다.²⁷)

Crown ether chiral selector가 coating 되어 있는 단점을 보완하기 위해 1998년부터 국내에서 silica gel에 covalent bonding시킨 새로운 crown ether type column을 개발하였다.²⁸⁻³³) 새로 개발한 crown ether column의 경우, (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid로부터 출발하여 silica gel에 covalent bonding시켰기 때문에 어떤 이동상에도 손상되지 않으면서 사용할 수 있는 장점이 있고 앞에서 언급한 Crownpak CR과 같이

일차 아미노기를 가지는 racemic 화합물의 광학분할에 매우 유용하다. 이는 특히 preparative separation이나 hydrophobicity가 큰 화합물의 광학분할에서 Crownpak CR보다 더욱 우수한 효과를 보여주는 것으로 평가되고 있다. 현재 이 chiral HPLC column은 국내 벤처회사(RS Tech Corp.: www.rstechcorp.com)를 통하여 상품화하여 (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid로 부터 유도된 ChiroSil RCA(+)와 (-)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid로 부터 유도된 ChiroSil SCA(-)라는 이름으로 시판하고 있는데 두 개의 chiral selector가 서로 enantiomer인 관계로 ChiroSil RCA(+)와 ChiroSil SCA(-)를 각각 사용함으로써 elution order를 원하는 대로 바꿀 수 있는데 이는 실제적인 분석과정에서 매우 유용한 장점이 있다.^{28,33} 이들 ChiroSil column은 미국의 Regis Technologies(www.registech.com/chiral/index.htm) 뿐만 아니라 유럽의 여러 chiral column 회사에 공급하고 있다. Fig. 4는 국내에서 개발하여 시판하고 있는 ChiroSil column의 고정상 구조와 racemic diphenylalanine을 Crownpak CR과 ChiroSil SCA에서 광학분할하여 비교한 크로마토그램이다.²⁸ Amino acid 중 하나인 diphenylalanine은 hydrophobic한 성질을 가지고 있기 때문에 Crownpak CR에서 이동상을 아무리 조절한다 해도 분석시간은 1시간 이상으로 매우 길게 나타나지만 ChiroSil SCA에서 5분 이내에 광학분리됨을 볼 수 있다. 계

다가 Crownpak CR에서는 매우 긴 분리시간에도 부분 분리만 얻어지나 ChiroSil column에서는 짧은 분리시간에도 base-line separation되는 탁월한 광학분할이 이루어진다.

Cellulose와 amylose 유도체를 이용한 chiral column - 자연에서 쉽게 구할 수 있는 천연 고분자로서 cellulose와 amylose의 다당류 유도체를 키랄선택자로 사용하여 1984년 Nagoya대학의 Okamoto교수에 의해 개발되어 일본 Daicel 회사에서(www.chiraltech.com) 판매되고 있는 column이 대표적이다. 이 영역에서 가장 많이 사용되고 있는 column으로 normal phase에서 사용하는 Chiralcel OD, Chiralpak AD 등이 있으며 reversed phase에서 사용하도록 개발된 Chiralcel OD-R, Chiralpak AD-RH가 있다(Fig. 5).^{16,26,34} 다당류 유도체 유형의 컬럼들은 다양한 종류의 racemic 화합물을 광학분할하는데 매우 유용한데 특히 방향족고리를 가지고 있는 화합물인 경우에 더욱 효과적이다. 그러나 chiral selector로 cellulose와 amylose 유도체를 silica gel의 지지상에 coating하였기 때문에 normal HPLC로 사용할 경우, 이동상으로 hexane과 alcohol 만을(주로 2-propanol) 사용해야 하고 기타 다른 용매들을(특히 chlorinated solvents) 사용할 경우 chiral selector가 coating된 것에서 씻겨나가 column이 손상되어지는 결정적인 단점이 있다. 특히 preparative separation을 수행할 경우, 제한된 용매사용으로 인한 분석물질의 용해도

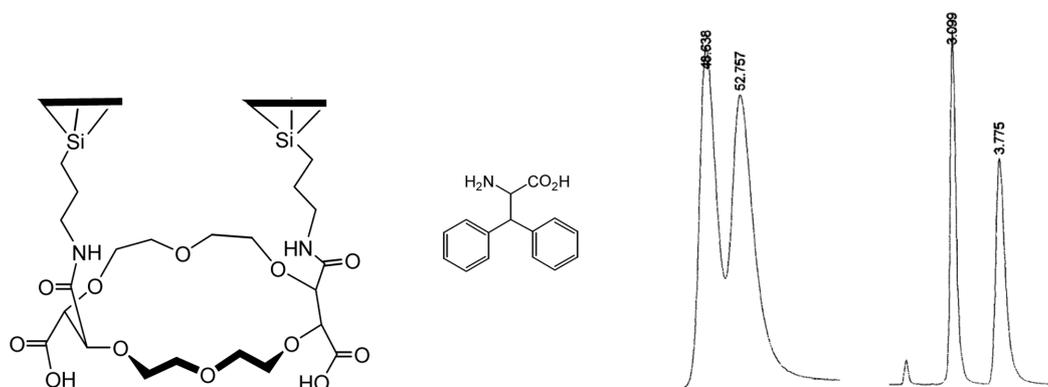


Fig. 4 - Structure of the crown ether type ChiroSil HPLC column and chromatograms of enantiomer separation of racemic diphenylalanine on Crownpak CR(+) (the left) and ChiroSil SCA(-) (the right).

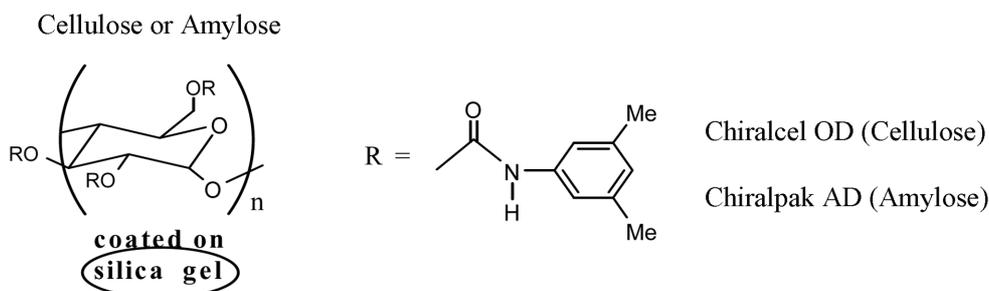


Fig. 5 - Structures of cellulose and amylose derived columns.

문제가 발생될 수 있으며 또한 coating 되어진 chiral selector가 흘러나와 잔류물질로 남아있지 않음을 확인하는 작업이 필요하다. 또한 Pirkle type column이나 crown ether type column과 달리 chiral selector가 천연물로부터 유래한 거대 고분자물질이기 때문에 한 쪽 enantiomer 형태만 존재함으로 elution order를 원하는대로 바꾸지 못하는 본래적인 단점과 chiral recognition mechanism이 복잡하고 이를 규명하기에 쉽지 않은 단점이 있다.³⁴⁾ 최근에 chiral selector를 실리카에 coating한 컬럼의 단점을 보완하기 위하여 공유결합으로 지지한 Chiralpak IA, IB, IC 컬럼을 상품화하였다.^{35,38)} 이들 컬럼들은 normal HPLC에서 hexane과 alcohol 같은 이동상의 용매에 제한되지 않고 여러 종류의 용매를 이동상과 분석물질 용매로 제한없이 사용할 수 있기 때문에 비대칭 합성반응 중간에 직접적인 on-line 분석이나 preparative separation 분석에 매우 유용하다.

Cyclodextrin을 이용한 chiral column - Chiral selector로 cyclodextrin을 이용하여 1984년 미국 Armstrong교수에 의해 개발되어 Cyclobond라는 상품명으로 Astec회사에서(www.astecusa.com) 시판되고 있는 chiral column이다.^{16,39,40)} 이 chiral column의 유형은 분석하고자 하는 racemic의 두 enantiomer와 cyclodextrin이 입체선택적인 내포화합물을 형성하여 광학분할하는 것으로 알려져 있다. Chiral cavity의 크기에 따라 α -, β -, γ -cyclodextrin column이 있으며 그 중 β -cyclodextrin이나 그 유도체를 silica gel에 공유결합한 column이 Cyclobond I의 이름으로 가장 많이 사용되고 있다. Cyclodextrin 유형의 column은 reversed phase의 이동상에서 일반적으로 사용되는데 그 경우 분석물질에 aromatic ring이 최소한 하나이상 존재해야만 광학분할이 원활하게 이루어지며 cyclodextrin의 chiral cavity 크기와 분석물질의 방향족크기가 서로 잘 맞아야 광학분리를 기대할 수 있다.⁴⁰⁾ 또한 chiral selector가 silica gel의 지지상에 공유결합으로 연결되어 있어 어떤 종류의 용매를 사용해도 되는 장점이 있다. 이들 chiral selector들도 천연물로부터 유래한 cyclodextrin이 사용되기 때문에 elution order를 원하는대로 바꾸지는 못하나 거대 고분자물질은 아니기 때문에(MW 1300 이하) cyclodextrin을 이용한 chiral recognition mechanism을 규명하는데 가끔 사용되기도 한다(단 이들의 chiral selector 순도에 유의해야 한다.).

Natural protein을 이용한 chiral column - 천연 단백질(natural protein)을 이용한 chiral column은 혈장 단백질인 AGP(α_1 -acid glycoprotein), 소의 혈청알부민(bovine serum albumin)인 BSA, 인간 혈청알부민(human serum albumin)인 HSA, 셀룰로오스를 가수분해하는 효소(cellobiohydrolase)의 CBH, 인간 혈청알부민(human serum albumin)인 HSA, 계란 흰자의 glycoprotein인 OVM(ovomuroid protein) 등과 같은 천연 단백질을 chiral selector로 이용한다. 이들을 silica gel에 고정시킨 column으로 각각 Chiral AGP(EnantioPac), Resolvosil BSA-7,

Chiral HSA, Chiral CBH, ES-OVM 이름으로 Chrom Tech 등의 회사에서(www.chromtech.se) 시판하고 있는데 1983년 스웨덴의 Hermansson에 의한 Chiral AGP가 대표적인 column으로 다양한 구조의 chiral drug을 분리하므로 가장 많이 사용되고 있다.^{16,41-42)} 천연 단백질은 L-amino acid의 peptide 결합에 의하여 이루어진 고분자물질로 특수한 3차구조를 가지는 천연 chiral 물질이므로 그 특수한 구조의 단백질과 분석하려는 racemic의 두 enantiomer와 입체선택적인 상호작용에 의해 광학분할이 이루어진다. Natural protein을 이용한 chiral column은 reversed phase의 이동상에서 사용되는데 단백질의 특성상 용매, pH, 완충용액의 종류 등 이동상의 조건에 따라 매우 민감하게 광학분할의 결과가 달라지기 때문에 적절한 분석조건 선택이 매우 중요하다.^{41,42)} 일반적으로 natural protein을 이용한 chiral column은 다른 컬럼에 비해 안정성이 떨어지는 단점과 capacity가 낮기 때문에 preparative separation에 사용하기는 부적합하다.

Macrocyclic antibiotics을 이용한 chiral column - Macrocyclic antibiotics을 이용한 chiral column은 vancomycin, ticoplanin, ristocetine A 등과 같은 macrocyclic glycopeptides를 chiral selector로 이용하여 silica gel에 공유결합으로 연결한 column으로 CHIROBIOTIC V, CHIROBIOTIC T, CHIROBIOTIC R의 상품명으로 Astec회사에서 시판되고 있다.^{17,39,41)} Cyclodextrin과 달리 이들 chiral selector는 3~4개의 깊지 않은 cavity를 가지고 있으면서 18~28개의 chiral center를 가지고 있기 때문에 cyclodextrin 유형의 column보다 빠른 kinetic 성질의 입체선택적인 내포화합물을 형성하여 빠른 광학분리를 가져온다.^{39,41)} 이동상으로 일반적으로 reversed phase를 사용하는데 분석물질과 column에 따라 normal phase에서 더 좋은 광학분할을 보이는 경우도 있다.

결 론

지금까지 의약품개발과 분석에 관련되어 chiral drug의 일반적인 내용과 제약회사에서 racemic drug의 chiral switch 실패 그리고 chiral drug의 광학분할에 대한 chirotechnology의 기술에 대해 살펴보았다. 특히 chirotechnology 기술에서 chiral HPLC column을 이용한 키랄 분석기술 그리고 현재 가장 많이 사용하고 있는 chiral HPLC column을 중심으로 그 특성과 응용범위에 대해 살펴보았다. Chiral 물질은 의약품뿐만 아니라 농약, 화장품, 향료, 식품첨가물, 전자재료 등에서도 광범위하게 이용되고 있기 때문에 chiral 물질의 광학분할 기술은 21세기를 선도할 의학, 화학분야의 고부가가치 산업이라 말할 수 있다. 특히 chirotechnology 분야의 경우, 비대칭 합성방법을 통한 키랄물질 제조법과 함께 크로마토그래피를 이용한 광학분할 분석기술은 현재 국내 자체기술만으로도 세계시장에 경쟁력있고 전세계적으로

로 널리 쓰이는 고부카카치의 chirotechnology 기술을 확보할 수 있는 가능성이 높기 때문에 chiral 물질의 연구와 관련된 학계와 산업체에서 이 분야에 대한 보다 전문적인 연구와 노력이 요청되고 있다.

참고문헌

- 1) Francotte, E. and Lindner, W. (Ed.) : *Chirality in Drug Research*, Wiley-VCH, Weinheim (2006).
- 2) Subramanian, G. (Ed.) : *Chiral Separation Techniques*, Wiley-VCH, Weinheim (2001).
- 3) Challener, C. A. (Ed.) : *Chiral Drugs*, Ashgate Publishing, Aldershot (2002).
- 4) FDA's Policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality* **4**, 338 (1992).
- 5) Daniels, J. M., Nestmann, E. R. and Kerr, A. : Development of stereoisomeric (chiral) drugs: a brief review of scientific and regulatory considerations. *Drug Information Journal* **31**, 639 (1997).
- 6) Caner, H., Groner, E., Levy, L. and Agranat, I. : Trends in the development of chiral drugs. *Drug Discovery Today* **9**, 105 (2004).
- 7) Tucker, G. T. : Chiral switches. *Lancet* **355**, 1085 (2000).
- 8) Agranat, I. and Caner, H. : Intellectual property and chirality of drugs. *Drug Discovery Today* **4**, 313 (1999).
- 9) Stinson, S. C. : Chiral drugs. *Chem. Eng. News* 79(40) p. 79, Oct. 1 (2001).
- 10) Rouhi, A. M. : Chirality at work. *Chem. Eng. News* 81(18) p. 56, May 5 (2003).
- 11) Stinson, S. C. : Chiral drugs. *Chem. Eng. News* 78(43) p. 55, Oct. 23 (2000).
- 12) McConathy, J. : Stereochemistry in drug action. *J. Clin. Psychiatry* **5**, 70 (2003).
- 13) Schreier, P., Bernreuther, A. and Huffer, M. : *Analysis of Chiral Organic Molecules*, Walter de Gruyter, Berlin (1995).
- 14) Sheldon, R. A. : *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker, New York (1993).
- 15) Allenmark, S. G. : *Chromatographic Enantioseparation, Methods and Applications*, 2nd ed., Ellis Horwood, Chichester (1991).
- 16) Krstulovic, A. M. (Ed.) : *Chiral Separations by HPLC: Applications to Pharmaceutical Compounds*, John Wiley and Sons, New York (1989).
- 17) Beesley, T. E. and Scott, R. P. W. : *Chiral Chromatography*, John Wiley and Sons, New York (1998).
- 18) Perrin, S. R. and Pirkle, W. H. : *Chiral Separations by Liquid Chromatography*, ACS Symposium Series 471, Ahuja, S. (Ed.) Washington, D.C. p. 43 (1991).
- 19) Welch, C. J. : Evolution of chiral stationary phase design in the Pirkle laboratories. *J. Chromatogr. A* **666**, 3 (1994).
- 20) Pirkle, W. H., Welch, C. J. and Lamm, B. : Design, synthesis, and evaluation of an improved enantioselective naproxen selector. *J. Org. Chem.* **57**, 3854 (1992).
- 21) *Chiral HPLC Application Guide III*, Regis Technologies, Illinois (2000).
- 22) Pirkle, W. H. and Lee, W. : Chiral selector useful for separation of enantiomers of β -amino alcohol compounds. *U. S. Patent* 5,578,212 (1996).
- 23) Chilmoneczyk, Z., Ksycinska, H., Aboul-Enein, H. Y. and Lee, W. : Enantiomeric separation of some clinically used racemic drugs on Pirkle 1-J chiral stationary phases. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* **24**, 2505 (2001).
- 24) Cram, D. J. : The design of molecular hosts, guests, and their complexes. *Angew. Chem. Int. Engl.* **27**, 1009 (1988).
- 25) Shinbo, T., Yamaguchi, T., Nishimura, K. and Sugiura, M. : Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings. *J. Chromatogr.* **405**, 145 (1987).
- 26) *Application Guide for Chiral HPLC Selection*, 3rd ed., Daicel Chemical Industries (2002).
- 27) Lee, W. and Hong, C. Y. : Direct liquid chromatographic enantiomer separation of new fluoroquinolones including gemifloxacin (LB 20304a). *J. Chromatogr. A* **879**, 113 (2000).
- 28) Lee, W., Baek, C.-S. and Lee, K. : Chromatographic enantiomer separation of diphenylalanine on chiral stationary phases derived from chiral crown ethers. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **23**, 1677 (2002).
- 29) Hyun, M. H., Jin, J. S. and Lee, W. : Liquid chromatographic resolution of racemic amino acids and their derivatives on a new chiral stationary phase based on crown ether. *J. Chromatogr. A* **822**, 155 (1998).
- 30) Hyun, M. H., Jin, J. S., Koo, H. J. and Lee, W. : Liquid chromatographic resolution of racemic amines and amino alcohols on a chiral stationary phase derived from crown ether. *J. Chromatogr. A* **837**, 75 (1999).
- 31) Hyun, M. H., Koo, H. J., Jin, J. S. and Lee, W. : Liquid chromatographic resolution of racemic compounds containing a primary amino group on a dynamic chiral stationary phase derived from chiral crown ether. *J. of Liquid Chrom. & Rel. Tech.* **23**, 2669 (2000).
- 32) Bang, E., Jung, J.-W., Lee, W., Lee, D. W. and Lee, W. : Chiral recognition of (18-crown-6)-tetracarboxylic acid as a chiral selector determined by NMR spectroscopy. *J. C. S. Perkin Trans.* **2**, 1685 (2001).
- 33) Jin, J. Y., Lee, W. and Hyun, M. H. : Development of the antipode of the covalently-bonded crown ether type chiral stationary phase for the advantage of the reversal of elution

- order. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* **29**, 841 (2006).
- 34) Yashima, E. : Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr. A* **906**, 105 (2001).
- 35) Zhang, T., Kientzy, C., Franco, P., Ohnishi, A., Kagamihara, Y. and Kurosawa, H. : Solvent versatility of immobilized 3,5-dimethylphenylcarbamate of amylose in enantiomeric separations by HPLC. *J. Chromatogr. A* **1075**, 65 (2005).
- 36) Zhang, T., Nguyen, D., Franco, P., Murakami, T., Ohnishi, A. and Kurosawa, H. : Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized on silica: A new chiral stationary phase for the analysis of enantiomers. *Anal. Chim. Acta* **557**, 221 (2006).
- 37) Jin, J. Y., Lee, W., Park, J. H. and Ryoo, J. J. : Covalently bonded and coated chiral stationary phases derived from polysaccharide derivatives for enantiomer separation of N-fluorenylmethoxycarbonyl α -amino acids with fluorescence detection. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* **29**, 1793 (2006).
- 38) Jin, J. Y. and Lee, W. : Enantiomer separation of N-protected α -amino acids on covalently immobilized cellulose tris(3,5-chlorophenylcarbamate) chiral stationary phase in HPLC. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **29**, 491 (2008).
- 39) *Astec HPLC Handbook*, Advanced Separation Technologies Inc. (2000).
- 40) Menges, R. A. and Armstrong, D. W. : *Chiral Separations by Liquid Chromatography*, ACS Symposium Series 471, Ahuja, S. (Ed.) Washington, D. C. p. 67 (1991).
- 41) Ahuja, S. : A Strategy for Developing HPLC Methods for Chiral Drugs. *LC-GC NORTH AMERICA*, **25**, 1112-1128 (2007).
- 42) Subramanian, G. (Ed.) : *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, VCH, New York (1994).