

I. 서론

일반적으로 자연계에 존재하는 대부분의 생체 구성물질들(탄수화물, 아미노산 등)은 광학적으로 거울상을 가진 광학 이성질체로서 이를 키랄(chiral) 화합물이라 하며, 그 구조에 따라 생체 내에서의 적용 효과가 상이하게 나타난다. 이러한 광학이성질체는 chiral center를 중심으로 각기 다른 4개의 알킬기를 가지고 있으므로 입체적으로 서로 겹쳐질 수 없다. 광학이성질체는 거울상으로 대칭인 위치에 알킬기를 가진 R-form과 S-form으로 세분되며, 각 성분을 enantiomer라고 한다. 이같은 enantiomer들은 특정 enantiomer들과 반응을 수행하는 입체특이성을 갖고 있다[1].

한 쌍의 광학 이성질체는 생체 내에서 서로 다른 물리적·화학적 성질을 나타내고 결국 다른 생리활성을 나타내게 된다. 따라서 한 쌍의 광학 이성질체로 존재하는 키랄 의약품에 있어서 두 광학 이성질체가 인체내에서 갖는 의학적 활성은 아주 중요하다. 종종 한 쌍의 광학 이성질체 중 단지 하나의 광학 이성질체만이 의학적 활성을 나타내며 다른 광학 이성질체는 아무런 의학적 활성을 나타내지 않거나 혹은 각종 부작용의 원인이 되는 경우가 보고되고 있다[2]. 이와 같이 많은 키랄 의약품들이 부작용 등의 문제점을 내포하고 있으므로, 서로의 광학활성을 상쇄시키기 위해 대부분의 이성질체들이 동량으로 혼합된 라세미 혼합물로 사용되고 있는 실정이다. 이는 의약품을 순수한 광학 이성질체만으로 포함하는 제품상태로 얻는 것이 어려울 뿐만 아니라 광학활성 의약품들의 광학순도를 정확하게 측정하기가 어렵기 때문이다[3]. 그러나 라세미체 형태로 공급되는 의약품들의 문제점들 때문에 미국의 식품 및 의약 관리국(FDA)에서는 순수한 광학 이성질체를 의약품으로 시판하는 것을 원칙으로 하고 부득이하게 라세미 혼합물을 의약품으로 판매를 할 경우 각 이성질체의 약리학적, 생리학적, 독물학적, 정확한 규명을 한 후 시판이 가능하게 함으로써 현재 라세미 혼합물로 판매되는 의약품들도 순수한 이성질체로 분리, 합성하여 공급하도록 유도하고 있다[4].

최근 키랄 의약품의 중요성이 부각됨에 따라 고부가가치의 의약품을 고순도로 분리하는 기술의 개발이 의약 및 정밀 화학 생산공정에 커다란 기술적, 경

제적 파급효과를 가져오리라 예상되고 있다[17]. 서로 거울상인 두 개의 광학 이성질체를 분리하거나 구별하는 방법은 어느 경우에도 적절한 키랄 환경을 제공함으로써 두 개의 광학 이성질체가 키랄 환경과 작용하여 물리적·화학적 성질이 서로 다른 부분 입체 이성질 관계가 되게 하는 것이다[18].

라세미 혼합물 분리를 위한 방법으로는 크로마토그래피 [5,6], 결정화 [7,8], partitioning [9] 그리고 효소의 기질특이성을 이용한 stereo-selective trans-formation [10] 등이 있으며 최근에 막을 이용한 affinity ultra-filtration [11-15] 과 생체-나노막을 이용하여 그 동안 크로마토그래피법과 함께 이성질체 분리에 사용되어 온 분리막 이용기술에 나노·바이오 기술을 적용, 화합물질의 2가지 이성질체 형태를 구별할 수 있는 실리카 나노 튜브막'에 관한 연구가 진행중이다[16].

최근에 이르러 화학, 약학, 의학, 생물학 등 입체화학에 관련된 분야의 연구자들 및 광학적으로 순수한 키랄 의약품을 제조하고자 하는 제약학 등의 분야에서 큰 관심의 대상이 되고 있는 방법은 액체 크로마토그래피(LC)용 혹은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)용 키랄고정상(CSP)을 이용하여 라세미 화합물을 광학 분할하는 방법이다[19-21]. 이 방법은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)용 칼럼에 채워진 고정상을 광학적 비대칭으로 만들어 서로 거울상인 한 쌍의 광학 이성질체가 칼럼을 통과함에 따라 키랄 환경으로 작용하는 비대칭 고정상과 서로 다른 상호작용을 하게 함으로써 두 광학 이성질체를 분리하는 방법이다. 여기서 얻은 크로마토그램의 두 peak를 분리 수거하여 두 개의 순수한 광학 이성질체를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 두 peak의 면적 혹은 크기의 비로부터 광학활성 물질의 광학순도를 측정할 수 있고 두 광학 이성질체와 키랄 고정상 사이의 상호작용 메카니즘(키랄성 인지메카니즘)을 정확히 이해할 경우 분리순서로부터 광학 이성질체의 절대 배열을 동시에 결정할 수 있기 때문에 액체 크로마토그래피에 의한 키랄고정상법은 입체화학에 관련된 문제를 해결하는데 이용될 수 있는 최상의 방법으로 고려되고 있다 [22,23]

이러한 회분식 크로마토그래피의 한계성을 극복하고자 연속적인 분리가 가능한 SMB 크로마토그래피가 연구되기 시작하였고, 이는 고정상과 이동상의

역방향 크로마토그래피 process를 실시하는 도구로써 1961년에 UOP에서 inlet 과 outlet 라인의 주기적인 변화와 칼럼과의 적절한 연결을 통해 액체상에 대해 고체상이 역방향으로 이동하는 process에 대해 특허권을 받았다 [24,25]. 이러한 SMB 크로마토그래피는 1960년대 초반에 석유화학공업에서 para-xylene과 톨루엔을 분리하기 위한 흡착탑에서 이용되었으며, 식품 산업에서 과당과 포도당을 대규모로 분리하기 위해 산업적으로 대규모 SMB 기술이 운용되었다. 상용화된 장치로는 미국 UOP사의 100 Sorbex 장치가 있으며, Y-지올라이트를 흡착제로 하여 알킬-방향족 화합물로부터 para-xylene을 연간 생산량 100,000톤 규모로 분리하기 위하여 상용화되었다[26,27].

최근 10년 동안 SMB 크로마토그래피를 이용한 의약품 생산 분야에서 상당한 진전을 보였는데 이것은 SMB 크로마토그래피가 2성분계의 분리에 탁월한 장점을 보이면서 종전의 라세미 화합물의 형태로 사용되던 의약품 원료의 chiral 화합물 분리에 급속도로 이용되기 시작하였다. 이러한 2성분 분리에서의 높은 선택도는 원하는 성분(대부분 단백질)을 고상에서 확실히 흡착시키기 때문이다. SMB는 최소한 2개의 영역(흡착 영역과 탈착 영역)으로 구성되는데 이러한 서로 다른 조건하에서 생산물의 흡착과 탈착이 이루어지므로 고효율을 기대할 수 있다. 또한 Nicoud 등에 의하면 생산용 SMB 크로마토그래피를 이용하여 chiral 화합물을 100-1000g/Kg CSP day의 속도로 생산할 수 있으며, 기존의 크로마토그래피에 비하여 상당한 용매절감 효과를 얻을 수 있었다. 또한 SMB 크로마토그래피는 실험실 규모로부터 연간 100,000톤 내외의 석유화학 규모까지 다양하게 적용할 수 있는 장점도 가지고 있다[28,29].

여러 가지의 키랄 화합물중에서 본연구의 분리 대상인 ketoprofen [(R,S)-2-(3'-benzylphenyl propionic acid)]는 비스테로이드 계열의 진통 및 소염제(NSAID)로서 현재 라세미 혼합물로서 사용되고 있다. 이 의약품은 류마티즘, 관절염 등의 진통제나 해열제로 여러 가지 용도의 치료약으로 널리 이용되고 있다. 그러나 Ketoprofen이 치료약으로 사용될 때에 S-(+)-Ketoprofen이 주로 약물학적 효과를 나타내고 R-(-)-Ketoprofen은 좋지 부작용을 일으키는 문제점을 나타내고 있다.

본 연구에서 수행한 실험에서는 분석용 칼럼을 사용하여 ketoprofen의 등온

흡착곡선을 추산한 후, 이를 SMB 크로마토그래피의 디자인을 위한 파라미터를 계산하고자 하였다. 또한, 이를 토대로 하여 6개의 칼럼을 사용한 SMB 크로마토그래피를 설계한 후, 이를 제작하여 S-ketoprofen enantiomer의 분리공정을 수행하였다.

II. SMB의 원리

2.1. SMB의 원리

SMB 크로마토그래피는 흡착제(Solid)와 이동상(fluid)이 서로 반대방향으로 이송될 때 혼합물의 각 성분과 고정상간의 흡착강도 차이에 기인하여 분리가 이루어지는 것을 바탕으로 한다. 칼럼의 중간 부분에서 유입되는 혼합물은 시료 주입구로부터 일정 거리 밖에서 단일 성분으로 분리가 이루어져 칼럼 양단에서 연속적으로 배출된다. Fig.1(a)와 같이 단순한 예로써 두 성분의 혼합물을 하나의 회분식 크로마토그래피 칼럼으로 분리하는 경우를 고찰해보면, 각 성분은 고정상에 대한 친화력에 상대적인 차이가 있으므로 칼럼을 따라 이동하는 속도가 다르게 나타난다(이때 칼럼은 이 두 성분이 양 끝단에서 분리될 수 있을 정도의 길이를 갖는다). 비유컨대, 이 상황은 고양이와 거북이의 달리기 경주와 유사하다. 이들 고양이와 거북이는 모두 목적지에 도달하지만 그 도착시간에는 차이가 있다. 만약 움직이는 컨베이어 벨트 위에서 벨트의 이동 방향에 반대 방향으로 달리기를 한다고 할 때 비교적 빠른 고양이는 오른쪽 방향에 도달하는 반면 속도가 느린 거북이는 벨트의 왼쪽에 다다를 것이다(Fig.1(b)). 이러한 원리로 움직이는 벨트의 중간부분에 연속적으로 들어오는 고양이와 거북이를 분리할 수 있는 ‘거북이-고양이 연속 분리기’ 작동이 가능한 것이다[1]. 이 원리는 Fig.2에서와 같이 연속 크로마토그래피에도 적용할 수 있다. 고체흡착제 입자는 유체의 반대방향으로 흐르고 성분 A와 B의 이동속도는 각각 음의 방향과 양의 방향으로 구분되며 이때 칼럼의 중간부분에 두 성분의 혼합물이 연속적으로 유입된다. 단일 성분의 농도별로 분리가 이루어진 성분 A와 B는 각각 extract와 raffinate port로 수집된다.

True moving bed 크로마토그래피는 Fig.3과 같이 흐름을 유입.배출시킬 수 있는 port를 기준으로 4개의 영역으로 나눌 수 있는데 zone II와 zone III사이로 연속적으로 주입된 A와 B성분은, 상대적으로 고정상에 흡착력이 센 A성분이 고정상에 흡착된 상태로 고정상과 이동하여 zone II까지 이동한 후 zone I에서 유입되는 새로운 이동상에 의해 extract port에서 분리가 일어나게 된다.

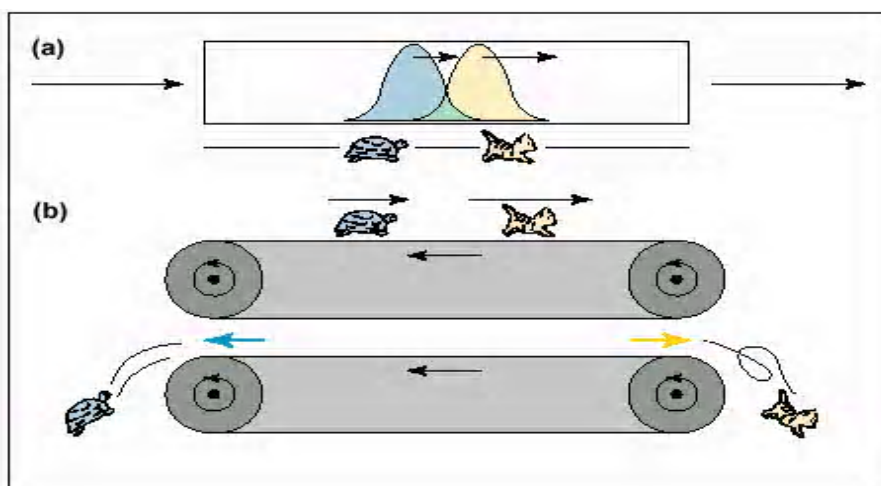


Fig.1.(a) A single chromatographic column and its zoological metaphor; the sluggish turtle and the more-retained species A (turtle) travel more slowly than the swift cat and the less-retained species B (cat). (b) The continuous turtle-cat separator. The velocity of the moving belt is opposite and intermediate to the that of the cat and the turtle.

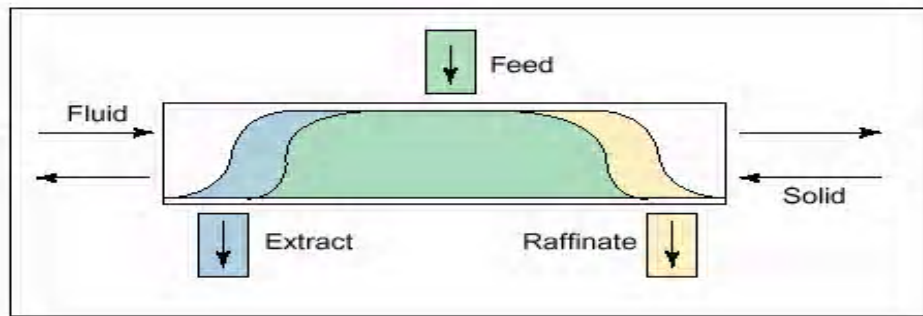


Fig. 2. The continuous countercurrent chromatographic column (the chromatographic metaphor of the turtle–cat separator of Fig.1(a)). A stream of clean, solid particles flows counter currently to the fluid phase. The mixture of A and B to be separated is fed to the middle of the column and the two components are collected pure at the two withdrawal ports.

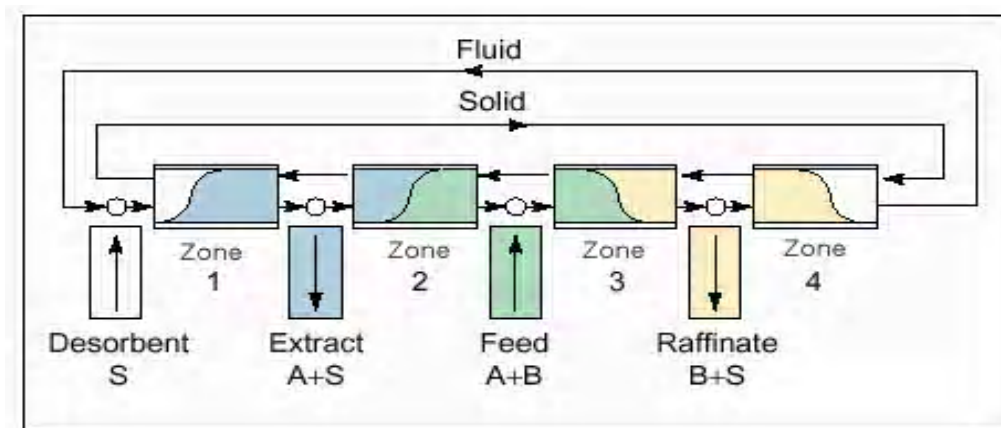


Fig. 3. A four-zone true moving-bed(TMB) unit. Each zone comprises a continuous a counter current chromatographic column and plays a specific role in the separation of A and B. This is accomplished in zone 2 and 3, whereas zone 1 regenerates the solid phase and zone 4 cleans up the solvent; in both cases before recycling. The more-retained species A and the less-retained species B are collected in the extract and raffinate stream, respectively.

흡착력이 약한 성분 B는 주로 이동상과 함께 우측으로 이동하여 zone III에서 회수된다. 그러므로 분리가 일어나는 영역은 zone II, III이고 zone I은 성분 A가 탈착되면서 순수 용매에 의한 재생이 이루어지게 된다. 이와 같이 각 zone에 따른 고정상과 이동상에서의 흡탈착 현상에 의해 분리가 일어나는 기준을 제시하게 된다[3].

Fig.4는 좀더 구체적인 12-column SMB장치를 묘사하였으며, SMB크로마토그래피에서는 실제로 고정상의 흐름은 없고 switching valve(multi-potion valve)에 의해 이동상이 이동하는 방향으로 각각의 port를 일정시간(witching time)마다 움직여 가상의 고정상 흐름에 의해 용매와 향류 흐름을 만들게 된다. 여기서 새로운 이동상과 extract 흐름 사이의 영역은 zone I로서 고정상과 친화력이 강한 extract가 탈착되는 구간으로 이때 고정상의 재생이 일어나며, extract 흐름과 feed 흐름 사이의 zone II는 extract와 feed가 혼합되어 있는 구간이다. feed line과 raffinate line 사이인 zone III는 고정상과의 친화력이 약한 성분이(raffinate) 탈착되는 구간이며, zone IV는 extract가 eluent와 함께 농축되는 구간이다.

일반적으로 SMB 크로마토그래피에 사용되는 칼럼의 수는 4개에서 24개까지 사용되며, 펌프는 5개가 필요하고 각 칼럼의 연결부에 이동상의 흐름을 연속적으로 바꾸어 줄 수 있는 밸브가 장착된다. 또한, 펌프와 밸브는 매우 정밀한 제어를 요구하므로 컴퓨터를 이용한 자동제어가 필요하며, 분리되는 시료는 각기 해당되는 칼럼의 연결 부위에 장착된 밸브를 통해서 회수된다. SMB 크로마토그래피를 조작하는데 요구되는 모든 매개변수들은 회분식 크로마토그래피를 통해서 얻어지며, 이와 같은 방법으로 얻어진 값들을 이용하여 SMB 크로마토그래피가 정상상태로 조작되도록 최적의 조건을 맞추는 것이 중요하다[2]. SMB는 크로마토그램상의 두 성분의 분리능이 낮은 혼합물도 고순도로 분리할 수 있는데 이는 크로마토그램의 두 양쪽 끝림 부분이 순수 단일 성분을 이룬다는 점에 착안한 것이다. 이러한 연속 크로마토그래피는 용매 소비량이 적고 고정상의 질량 당 생산량이 높아 회분식 크로마토그래피의 단점인 용질의 희석과 단위 고정상의 낮은 효율성을 연속식 크로마토그래피인

SMB를 사용하여 개선시킬 수 있다(Fig. 5).

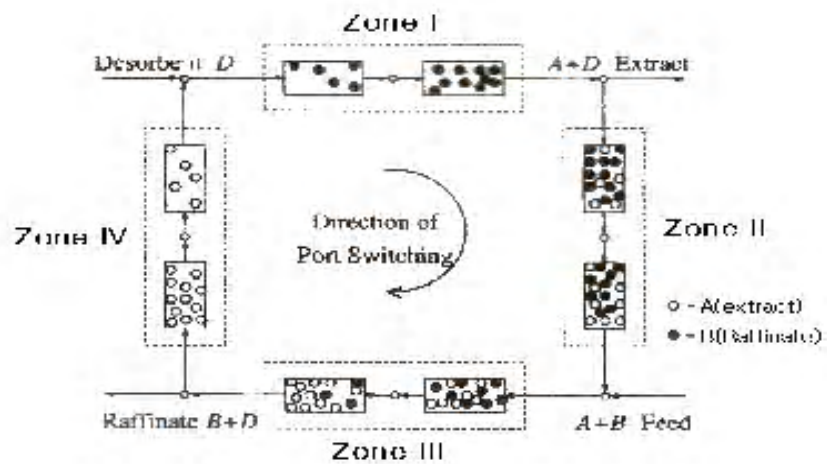


Fig. 4. Four-zone SMB chromatography; Zone I : between eluent line and extract line, Zone II : between extract line and feed line, Zone III : between feed line and raffinate line, Zone IV : between raffinate line and eluent line.

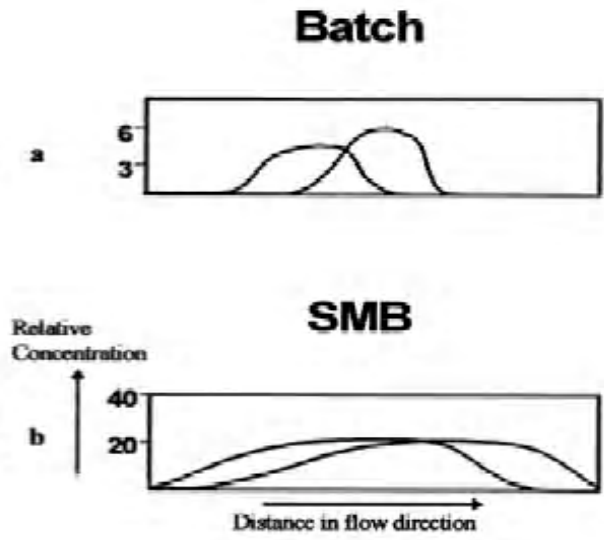


Fig. 5. Binary component process chromatographic separation in (a) a batch (or "elution" or "pulse") mode and in (b) a simulated moving bed mode.

2.2. SMB 크로마토그래피 조업 유속결정

SMB장치 디자인의 중요한 의미는 각각의 속도 즉 recycling, feed, eluent, extract, raffinate, 그리고 고정상의 가상 순환속도를 선택할 넓은 범위를 갖는 것이다. 흐름속도를 얻기 위해서 생각해야 할 첫 번째 아이디어를 잡기 위해서 특별히 우리는 이성분계에서의 선형 등온흡착곡선을 살펴보아야 한다. 이는 고정상의 농도 (\overline{C} , g/l)는 액상의 농도(C g/l)와 선형관계에 있다는 것을 의미한다.

$$\overline{C}_A = \overline{K}_A \cdot C_A \quad (1)$$

$$\overline{C}_B = \overline{K}_B \cdot C_B \quad (2)$$

A가 extract이고 B가 raffinate라 가정하면 $\overline{K}_A > \overline{K}_B$

참고: 위의 관계는 일반적인 추출 크로마토그래피의 측정을 가능하게 해준다.

$$t_{kA} = T_0 \cdot \left(1 + \frac{1-\epsilon}{\epsilon} \overline{K}_A\right) \quad (3)$$

$$t_{kB} = T_0 \cdot \left(1 + \frac{1-\epsilon}{\epsilon} \overline{K}_B\right) \quad (4)$$

단 $t_0 = \frac{\epsilon \cdot V}{Q}$ 는 zero-retention time 이다.

유속은 SMB에 맞게 바로 계산되지 않으므로, 아래의 법칙에 따라 전환되기 전에 먼저 가상적인 TMB(True Moving Bed)를 평가해 봐야한다.

TMB에서의 작동유속 각기 다른 Zone에서의 유속은 다음과 같다.

$$Q_I = Q_{IV} - Q_{Er} \quad (5)$$

$$Q_{II} = Q_I - Q_{Er} \quad (6)$$

$$Q_{III} = Q_{II} + Q_F \quad (7)$$

$$Q_{IV} = Q_{III} - Q_{Ref} \quad (8)$$

Fig.6에 보인바와 같이 System 내의 성분 i가 고체층 아래로 흘러가는 흐름은 $F_d = M \cdot \bar{C}_i$ (M은 고체흐름속도이고 \bar{C}_i 는 i성분의 고정상 내에서의 농도)이고 i가 고체층 위로 흘러가는 흐름은 $F_u = Q \cdot \bar{C}_i$ (Q는 액체 흐름 속도이다) (Fig. 6.)

이때

$$\theta_i = F_u / F_d < 1 \quad \text{The net flux of } i \text{ is downward} \quad (9)$$

$$\theta_i = F_u / F_d > 1 \quad \text{The net flux of } i \text{ is upward}$$

(10)

TMB 또는 SMB에서 각 zone은 고유의 기능을 가지고 있다. 성분 A는 raffinate에서 순수한 생산물인 B를 회수하기 위해 zone III에서 고정상에 흡착이 된후 zone II에서 탈착되어 extract로 순수하게 빠져 나오고 성분 B는 zone III에서 탈착이 된다. 결과적으로 다음의 요구가 다양한 흐름에서 적용이 된다.

At Zone I A is moved up, therefore $Q_I / MK_A > 1$

At Zone II B is moved up, therefore $Q_{II} / MK_B > 1$

At Zone III A is moved down, therefore $Q_{III} / MK_A < 1$

At Zone IV B is moved down, therefore $Q_{IV} / MK_B < 1$

Where, Q: flow rate of mobile phase, M: flow rate of stationary phase

K: equilibrium constant, A: extract, B: raffinate

모든 변화가 같은 safety factor β 에 의해 만족되어 진다고 가정하면 ($\beta > 1$)

$$\frac{Q_I}{M \cdot K_A} = \beta \quad \frac{Q_{II}}{M \cdot K_B} = \beta \quad \frac{Q_{III}}{M \cdot K_A} = 1/\beta \quad \frac{Q_{IV}}{M \cdot K_B} = 1/\beta \quad (11)$$

SMB 크로마토 그래피에서의 각 Zone의 유량은 (12) ~ (15)식에 의해 아래

와 같이 된다.

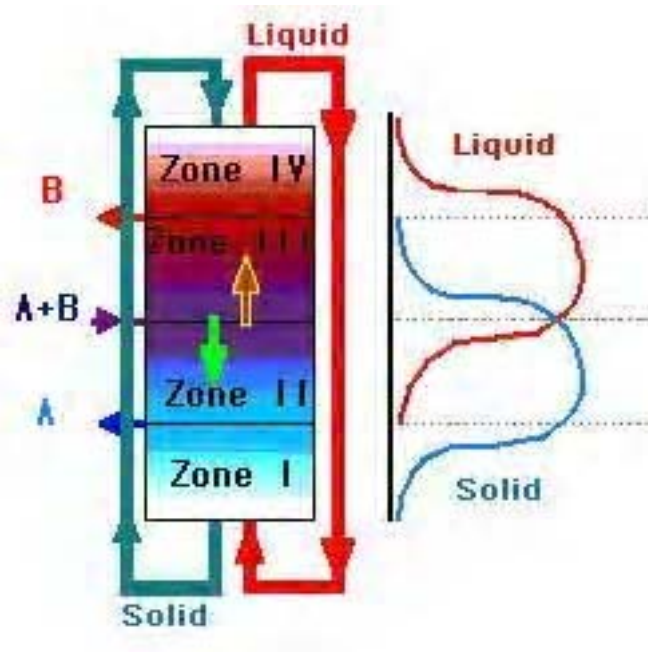


Fig. 6 Principle of SMB chromatography (A: extract; B: Raffinate; A+B: Mixture).

$$M = \frac{Q_F}{\overline{K_A}/\beta - \overline{K_B} \cdot \beta} \quad (12)$$

$$Q_{Rec}^{TMB} = \beta \cdot M \cdot \overline{K_A} \quad (13)$$

$$Q_{Ex} = M \cdot (\overline{K_A} - \overline{K_B}) \cdot \beta \quad (14)$$

$$Q_{Ref} = M \cdot (\overline{K_A} - \overline{K_B})/\beta$$

(15)

따라서, 주어진 feed flow-rate 와 β 값에 의해 system은 모든 TMB의 recycle flow-rates를 얻을 수 있다. 생산력과 용해제 소모는 점에서 가장 최적화 된 상태는 $\beta=1$ 인 상태이다. 하지만 시스템의 안정성을 높이기 위해서는 일반적으로 약 1.02 ~ 1.05로 값을 높이는 것이 좋다. β 값은 numerical simulation에 의해 선택되어지며, (12) ~ (15)식에 따라 β 값은 다음을 만족해야 하는 제약을 갖게 된다.

$$1 < \beta < \sqrt{\frac{\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} + \overline{K_A}}{\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} + \overline{K_B}}}$$

(16)

SMB에서는 고체흐름은 injection과 추출포인트의 일정기간의 밀림으로 묘사 된다. TMB에서의 solid flow-rate에 해당하는 것은 SMB에서의 swithing Time (ΔT)와 대응하게 된다. 이는 아래와 같이 표기가 된다.

$$\Delta T = \frac{(1-\varepsilon)V}{M} \quad (V \text{는 칼럼 부피}) \quad (17)$$

TMB의 유속에 해당하는 것을 SMB의 것으로 계산하는 것은 다음과 같으며 이는 아래 방정식으로 요약될 수 있다. 이 방정식은 고체와 액체의 속도는 일정하다라는 의미이다.

$$(Q_{Rec})_{SMB} = (Q_{Rec})_{TMB} + \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} M \quad k = I, II, III \text{ or } IV \quad (18)$$

또한 Van deemter 식으로부터 이론 단 높이를 계산할 수 있으면, 각 칼럼에서 발생하는 압력강하는 Kozeny 식으로 유도되어질 수 있으며 다음과 같다.

$$1/H = \frac{N}{L} = \frac{1}{a + b \cdot u} \quad a = A \cdot dp, \quad b = B \cdot dp^2, \quad A = 2 \sim 3 \quad (19)$$

$$\frac{\Delta P}{L} = h_k \cdot \frac{36}{dp^2} \cdot \left(\frac{1 - \epsilon}{\epsilon} \right)^2 \cdot \mu \cdot u \quad (20)$$

where, L: column length, h_k : Kozeny constant $\cong 4.5$, dp: particle diameter

μ : viscosity, u: superficial velocity

결과적으로 주어진 feed flow-rate 또는 β 값으로부터 다른 유속들과 switching time을 다음으로부터 추론할 수 있다. 그러나, 이러한 관계식들은 선형 등온흡착일 때 유효하다는 제한이 있으며, 비선형 시스템에서는 이보다 훨씬 복잡하게 나타나게 된다.

III. 실험장치 및 방법

3.1. 분석용 칼럼을 이용한 회분식 실험

Ketoprofen racamate로부터 S-form의 enantiomer를 분리하기 위한 조건을 수립하기 위하여 분석용 HPLC 시스템을 사용하였다. 이때 사용된 분석용 HPLC 시스템은 용매이송펌프(M-930, Younglin, Korea)와 검출기(Model M720, Young lin, Korea)를 사용하였다. 칼럼은 10 μ m의 직경의 실리카에 0,0 '-bis (4-tert- buylbenzoyl)-N,N'-diallyl-L-tartar diamid가 결합된 고정상이 충전되어 있는 Kromasil CHI-II(250 mm \times 4.6 mm, Eka Noble, Sweden)을 사용하였으며, 칼럼의 온도를 일정하게 유지시켜 주기 위한 칼럼 히터(Model CH-30 column heater, Eppendorf, U.S.A) 내부에 설치하였다. 그리고 PC에 Autochro-Win software(Young lin, Korea)를 설치하여 크로마토그램을 분석했다. 시료의 주입은 시료 주입 장치(Model 7725i, Rheodyne, U.S.A)에 각기 20 μ l의 sample loop를 설치한 후 HPLC용 실린지(Model 80765, Hamilton, U.S.A)를 사용하여 시료를 주입하였다.

시약은 HPLC급 tert-Buthyl methyl ether(99.8 %, HPLC grade, Aldrich, U.S.A), hexane(95 %, n-hexane, J.T. Baker, U.S.A), acetic acid(특급시약, 동양화학)을 사용하였으며, ketoprofen 라세미 혼합물은 국전 시약으로부터 S-from과 R-from이 50:50으로 혼합된 상태로 실험에 사용하였다.

실험방법은 ketoprofen을 각 농도별로 소량을 주입하여 분석용 칼럼에 의해 분리되어지는 각 성분들의 체류시간으로부터 농도에 대한 등온 흡착곡선을 구할 수 있다. 이로부터 등온 흡착 곡선에서의 기울기인 평형상수 K값을 계산할 수 있으며, 이를 토대로 SMB 크로마토그래피를 조작하기 위한 설계 변수를 계산하였다.

3.2. SMB 장치의 구성

3.2.1. 펌프

SMB 장치에는 총 5대의 HPLC용 고압펌프가 사용된다(Fig.7). Feed, eluent, extract 및 raffinate 펌프는 단일 헤드의 구조로써 0.001ml/min에서 10ml/min까지 유량 조절이 가능하며, 최대 압력은 6000psi까지 유지할 수 있다. 특히 내부 순환을 위한 recycle pump는 다른 펌프들에 비하여 유량 속도가 크고 맥동이 적어야 하므로 2개의 헤드를 가진 펌프를 사용하였다.

3.2.2. 밸브

① 12-way multi position valve

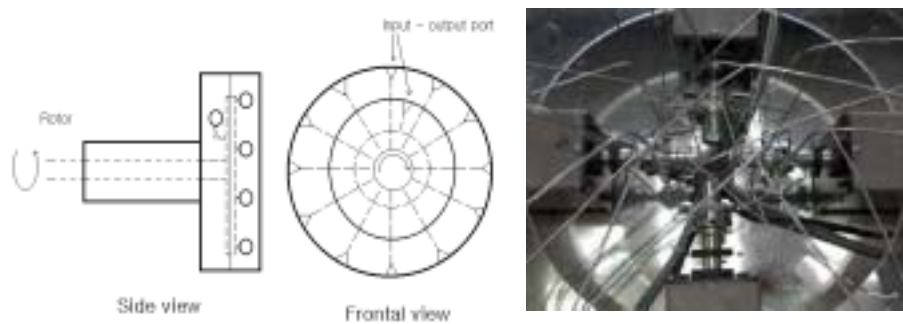
SMB장치는 연속적인 흐름을 기본으로 하기 때문에 이와 같은 효과를 나타낼 수 있는 밸브를 사용해야 한다. 따라서 실험에 사용된 SMB 장치는 연속적인 흐름 효과를 나타내도록 12-way multi position valve를 사용하였으며, 이는 칼럼의 사용가능 개수를 각기 4개, 6개, 12로 사용할 수 있도록 고안되었다(Fig. 8(A)). 12-way valve의 작동은 제어기를 PC에 연결하여, 일정한 시간 간격으로 4개의 12-way valve가 독립적으로 각 칼럼에 지정된 port에 위치하도록 하였으며, 각 12-way valve들은 각기 지정된 feed, eluent, extract 및 raffinate 펌프에 연결되어 시료 및 분리된 성분들이 연속적으로 유입·배출되도록 구성하였다(Fig. 8(B)).

② Pressure relief valve

SMB가 작동되면, 내부에서 recycle pump에 의한 내부 순환 흐름에 존재하게 되는데, 이 때문에 생기는 압력을 상쇄하기 위하여 extract, raffinate pump의 outlet 부분에 pressure relief valve를 장착하여, 내부 순환에 의해 생긴 압력을 상쇄시킨 후, extract와 raffinate pump의 구동력에 의해서만 분리된 성분들이 배출되도록 구성된다(Fig. 9).



Fig. 7. HPLC pump used in SMB chromatography.



(A)

(B)

Fig. 8. (A): Inner shape of 12-way multi position valve;
(B): 12-way multi position valve attached in SMB chromatography.



Fig. 9. Pressure relief valves at extract and raffinate port.

3.2.3. 칼럼

SMB 크로마토그래피 장치에 사용된 칼럼은 총 6개이며, 연결은 6개의 manifold에 의하여 칼럼과 칼럼 사이에 feed, extract, raffinate 및 eluent가 유입·배출될 수 있도록 구성되었다. 칼럼의 내경은 10mm, 길이는 100mm이며, 고정상은 분석용 칼럼에 충전된 것과 동일한 고정상($10\mu\text{m}$, CHI-II, kromasil, Sweden)을 슬러리 충전법에 의하여 고압펌프(Slurry packer, Alltech, USA)로 6000psi에서 칼럼에 충전시킨 후 실험에 사용하였다.

3.2.4. 기타

내부로부터의 시료 채취는 recycle path way에 위치한 6-way valve에 $100\mu\text{l}$ 의 sample loop를 통하여 시료가 통과하도록 한 후, 외부에서 주사기를 이용하여 공기를 주입시켜 시료를 배출시킨 후 채취할 수 있도록 장치하였다(Fig. 10). 모든 배관은 1/16 SUS 튜브로써 외경은 1/16 (1.6mm), 내경은 0.020 (0.5mm)인 type 316 SUS tube가 사용되었다. 칼럼은 SMB 장치 상부에 위치하며, 아크릴 케이스 내부에서 항온을 유지하도록 히터의 반대편에 온도조절 장치를 장착하여 강제 순환식으로 온도를 유지하도록 하였다(Fig. 11). 또한, SMB 크로마토그래피 장치의 세부 부품들에 대한 사양을 Table 1에 나열하였다.

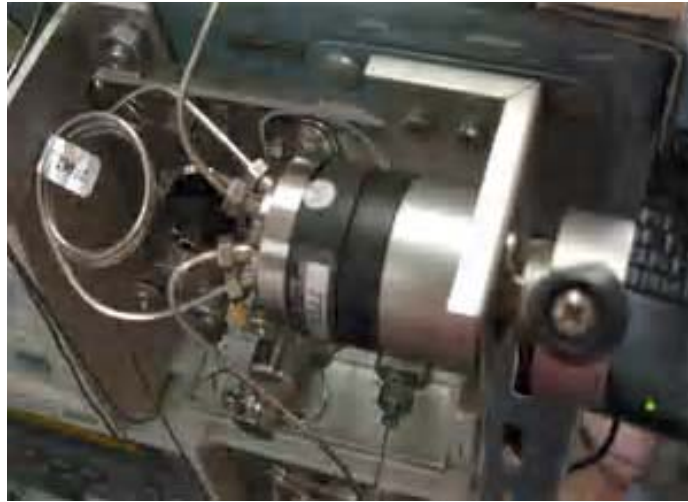


Fig. 10. 6-way injection valve for sampling.



Fig. 11. Heating fan for maintaining column temperature.

Table 1. The list of SMB chromatography compartments.

Part	Unit	Specification	Aim
Feed pump	1	Young Lin 925, 0.001–10ml/min. (6000psi), mono-head	supplying feed
Eluent pump	1	Young Lin 925, 0.001–10ml/min. (6000psi), mono-head	supplying new solvent
Extract pump	1	Young Lin 925, 0.001–10ml/min. (6000psi), mono-head	discharge extract
Raffinate pump	1	Young Lin 925, 0.001–10ml/min. (6000psi), mono-head	discharge raffinate
Recycle pump	1	Young Lin 930D, 0.001–16ml/min. (6000psi), twin-head	recycling inner mass flow
Multi-position valve	4	Valco, 12way, Electric driving	change path way
Computer	1	Notobook	control multiposition valve
Back pressure regulator	2	Swagelok, relief valve, 2250–3000psi	maintain recycling pressure drop
HPLC column	6	Alltech, 10×100mm, 6000psi	packing CSP
3-way valve	4	1/16	change path way
6-way valve	1	Rheodyne, injection kit	sampling
6-way manifold	6	Valco, 1/8	connect compartment
Thermometer	1		Maintain temperature
Heater	1	500W	heating
Tubing		1/16 SUS	
Ferrel		Valve, corn type	

IV. 실험결과 및 고찰

4.1. 분석용 칼럼을 이용한 회분식 실험

고정상에 대한 ketoprofen enantiomer 간의 분리능을 검토하고자 분석용 칼럼을 사용하여 각 농도별로 20 μ l의 시료를 주입하여 분석한 회분식 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 이동상의 조성은 hexane과 tert-butyl methyl ether(HPLC grade)에 아세트산을 소량 첨가하여 pH를 산성 분위기로 유지하였으며, hexane과 tert-butyl methyl ether의 부피비를 100:0에서 40:60까지 변화시켰다. 이동상의 조성에서 tert-butyl methyl ether의 부피비가 증가할수록 체류시간이 감소하였으나, tert-butyl methyl ether가 60%(v/v) 이상인 경우, 분리도가 감소하여 두 성분이 완전하게 분리되지 않았다. 따라서, 비교적 선택도와 분리능이 우수한 조건으로 hexane과 tert-butyl methyl ether의 비율은 60:40으로 결정하였으며, 이때 pH 조절제로써 아세트산을 0.1%(v/v) 첨가하였다. 이때, 칼럼에 부피는 4.2ml, 공극율은 0.6, 이동상의 유속은 1ml/min로 실험을 수행하였다.

시료의 농도에 따른 크로마토그램을 Fig. 12에 나타내었으며, 시료의 농도가 증가할수록 크로마토그램상에 피크의 면적이 점차로 증가함을 보였다. 시료의 농도가 5mg/ml까지는 좌우 대칭인 피크 형태를 나타내었으나, 10mg/ml 이상인 경우 피크의 형태가 점차로 비대칭을 보이며 체류시간이 앞당겨짐을 볼수 있었다. 이는 칼럼 내부에 채워진 고정상들에 대한 흡·탈착 거동이 비선형 영역에 있음을 보여주는 것이며, 이 경우 고정상과 시료간에는 시료의 농도에 의하여 흡·탈착 속도가 영향을 받고 있음을 보여준다. PIM를 사용하여 eq'n (3)과 (4)로부터 체류시간에 따른 고정상과 이동상간의 평형상수(K)를 계산할 수 있으며, 이와같이 얻어진 K값으로부터 등온 흡착곡선을 그릴 수 있었다(Fig. 13). 이때 점선은 단순히 직선을 나타낸 등온 흡착곡선이 선형적 거동에서 벗어나는 비선형 거동을 표시하고자 나타내어 것이다. Fig. 13에서 보이는 바와 같이 1, 2, 5mg/ml의 시료 농도에서는 점선과 실선이 일치하는 경향을 보이나, 10mg/ml 이상의 농도에서는 비선형 거동이 점차로 심해짐을 보이고 있다. 따라서, 비교적 등온흡착 곡선상에서 이동상중에 시료 농도와 고

정상에 흡착된 농도가 선형 영역에 위치하고 있는 조건에서 SMB 크로마토그래피를 조작하기 위하여 feed의 농도 조건은 5mg/ml 이하로 결정하였으며, 회분식 크로마토그래피로 얻어진 결과를 Table 2에 나열하였다.

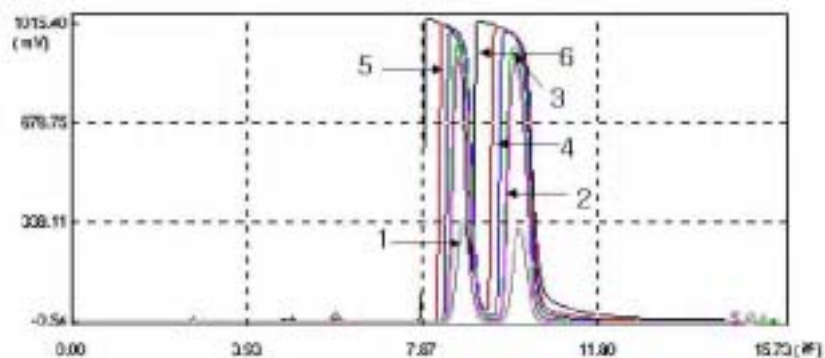


Fig. 12. The overlapped chromatograms with various concentrations; 1 : 0.5mg/ml, 2 : 1mg/ml, 3 : 5mg/ml, 4 : 10mg/ml, 5 : 20mg/ml, 6 : 50mg/ml; flow rate=1ml/min., sample loading amount=20 μ l, temperature=40 $^{\circ}$ C, mobile phase =HXN/t-BME/acetic acid=60/40/0.1, wavelength=254nm.

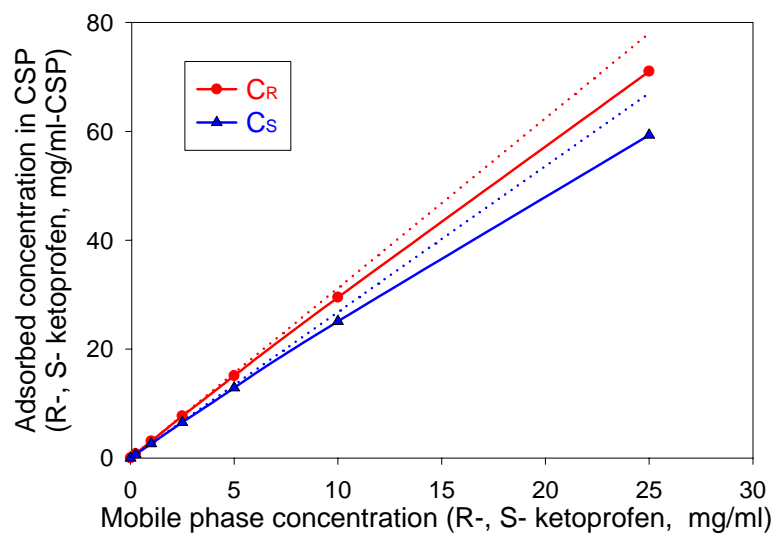


Fig. 13. Isotherms of R-, S- ketoprofen enantiomer (solid line : isotherm; dotted line base line).

Table 2. Obtained values from batch chromatography experiment.

Parameter	Values
Density of packing material	2.2g/ml
Particle diameter	10 μ m
Column volume	4.2ml
Void fraction of column	0.6
Retention times	$t_S=8.3\text{min}$, $t_R=9.6\text{min}$, $t_0=2.5\text{min}$
Initial slope of adsorption isotherm	from Eq. (18) & (19) $\overline{K}_S=3.5$, $\overline{K}_R=4.3$
Viscosity of mobile phase	0.2cP
Theoretical plate number	$N_S=1722$, $N_R=2304$
Superficial velocity	6.02cm/sec

4.2. SMB 유속 계산

4.2.1. TMB로부터의 물질수지식에 의한 유속계산

SMB 크로마토그래피는 TMB(true moving bed) 크로마토그래피로부터 유래되었으므로, 회분식 실험의 평형상수로부터 고정상의 이동속도를 계산한 후, 이를 SMB 크로마토그래피의 recycling 유속으로 변환시키는 방법을 수행하였다. 주입 시료인 feed의 농도를 1mg/ml로 설정한 후, feed의 유속을 0.2ml/min, safety factor(β)를 1.05로 가정한 후 Eq'n (12)부터 (15)을 사용하여, TMB 크로마토그래피의 고정상의 이동속도인 M과 SMB 조작에 필요한 파라미터들을 계산하였으며 이를 Table 3에 나열하였다.

4.2.2. Triangle theory에 의한 SMB 크로마토그래피 유속 범위

앞에서 언급한 바와 같이 물질 수지식으로부터 계산되어진 파라미터들이 SMB 크로마토그래피를 정상적으로 조작하기 위한 범위에 들도록 기준에 연구되어진 triangle theory에 의한 검증을 수행하였다[30]. 이것은 흡착과 탈착이 일어나는 zone II와 zone III에서 평형상수 값에 따른 고정상과 이동상간의 상호속도에 근거를 둔 것이다. 이때 SMB 조작 파라미터 m은 고정상의 이동속도에 대한 전체 이동상의 흐름비로 정의된다(Eq'n (21)).

$$m_j = \frac{Q_j \Delta T - V \varepsilon}{V(1 - \varepsilon)} \quad (21)$$

Where, Q : recycle flow rate, ΔT : switching time,

V : column volume, ε : void fraction, j: zone number.

이때 두 성분간에 완전한 분리가 일어나기 위해서는 다음과 같은 조건을 만족하여야 한다.

$$K_A < m_I \quad (\text{in zone I}) \quad (22)$$

$$K_A < m_{II} < K_B \quad (\text{in zone II}) \quad (23)$$

$$K_A < m_{III} < K_B \quad (\text{in zone III}) \quad (24)$$

$$m_{IV} < K_B \quad (\text{in zone IV}) \quad (25)$$

Table 3. Calculated parameters of SMB chromatography.

Parameter	Used equation	Calculated value
Q_F	Assumed	0.200ml/min
M (Stationary phase flow rate)	(12)	0.263ml/min.
Q_{Rec}^{TMB}	(13)	1.187ml/min.
Q_{Ex}	(14)	0.221ml/min.
Q_{Ref}	(15)	0.200ml/min.
Q_{Etr}	(6)	0.221ml/min.
Q_{Rec}^{SMB}	(8)	1.582ml/min.
Column length	(20)	60cm
ΔT	(17)	2.64min.

회분식 실험을 통하여 구해진 평형상수로써 triangle theory에 의한 operating daigram을 그리면 Fig. 14와 같은 삼각형을 얻을 수 있으며, 이 삼각형 영역에서 두 성분간에 완전한 분리가 일어나게 된다. 본 실험에서 목적으로 하고 있는 S-ketoprofen은 SMB 크로마토그래피 장치에서 raffinate로 배출되므로, 삼각형 영역내에서 순수한 raffinate를 얻을 수 있는 영역으로 선택하여 m_{II} 와 m_{III} 는 각각 3.7과 4.0을 선택하여 실험을 수행하였다.

Eq'n (21)로부터 밸브의 switching time은 3.51min로 계산되었으며, 칼럼에 걸리는 압력을 고려하여, recycling 펌프의 유속을 3ml/min.로 결정하였다. 앞에서 언급한 식을 이용하여 raffinate의 유속은 0.71ml/min., eluent는 1.0ml/min., 그리고 extract는 0.49ml/min.로 계산되었다.

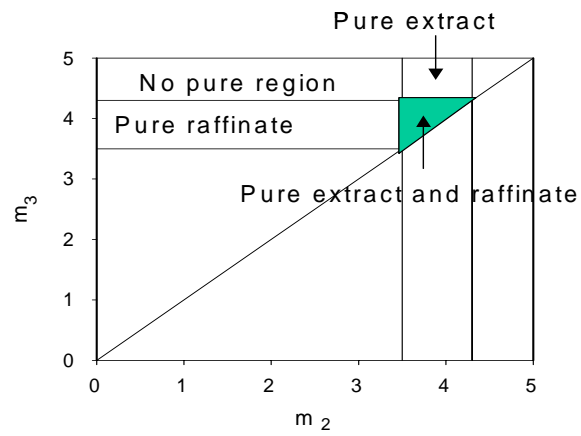


Fig. 14. Separation regimes in the operating plane by flow ratio in two center section of SMB.

4.3. SMB 크로마토그래피를 이용한 ketoprofen racemate의 분리

4.3.1. SMB 크로마토그래피의 내부 농도분포 분석

S-ketoprofen과 R-ketoprofen이 50:50 으로 혼합되어 있는 1.0mg/ml 농도의 라세미 혼합물을 feed로 SMB 크로마토그래피 장치에 주입하였다. 이때 각 칼럼으로의 multi-position valve 초기 위치는 Fig. 15와 같이 설정되었으며, 앞 절에서 계산한 유속으로 각 펌프의 유량을 설정하였다. SMB 크로마토그래피 장치는 약 30분간 안정화시킨 후부터 각 recycle 유로에 설치된 시료 채취 밸브를 통하여 $100\mu\text{l}$ 의 시료를 채취한 후, 분석용 HPLC에 $20\mu\text{l}$ 의 시료를 주입하여 분석을 수행하였다. 이때 채취된 시료는 recycle 흐름에 위치하고 있는 칼럼으로부터 배출되는 흐름을 대표하는 값이며, 첫 번째 밸브 위치에서는 6번 칼럼으로부터 배출되는 흐름의 농도 분포를 나타내고 있다. 이와 같은 방법으로 밸브들이 순차적으로 이동할 때, 채취되는 시료들은 5번, 4번 칼럼의 순으로 농도 분포를 나타낸다. 이때, SMB 크로마토그래피의 조작을 수행하는 중 각 밸브의 switching time마다 동시에 각 밸브의 유로를 변경한 경우, extract와 raffinate에서 상당한 오염이 발생하였으며, 이것은 장치 내부의 순환 흐름이 6번 칼럼으로부터 1번 칼럼으로 유입될 때, recycle 펌프를 거치게 되며 이때 펌프 내부의 실린더 및 댐퍼에 의한 시간 dead volume에 의한 영향을 받았다. 따라서, recycle 펌프에 의한 dead volume을 측정된 결과, $1200\mu\text{l}$ 로 측정이 되었으며, 각 밸브들의 흐름이 6번 칼럼에서 1번 칼럼으로 변경될 때, 이를 보정해 주기 위한 시간 지연이 필요하게 되었다. 따라서, recycle의 유속이 3ml/min.인 경우, 24초 동안 6번 칼럼에서 시간 지연을 수행한 결과 이러한 오염을 상당히 줄일 수 있었다. 이러한 방식으로 분석된 시료의 크로마토그램상에 나타난 피크의 면적비로써 시료중의 S-ketoprofen과 R-ketoprofen의 비율을 정량분석 하였으며, 이를 Fig. 16에 나타내었다. Fig. 16에 나타낸 각 enantiomer들의 농도 분포 상태를 SMB 크로마토그래피의 칼럼 배열에 따라 나열한 그림이 Fig. 17이며, 이를 통하여 정상상태에서 각각 2번 칼럼과 5번 칼럼으로 extract와 raffinate가 연속적으로 배출되며, 1번 칼럼과 4번 칼럼으로 eluent와 feed가 공급됨을

알수 있었다. 이때, 연속적으로 분리가 일어나는 extract에서 R-ketoprofen의 평균농도는 0.1mg/ml 이었으며, raffinate에서 S-ketoprofen의 평균농도는 0.3mg/ml의 농도로 분리를 수행할 수 있었다. 이와같은 방법으로 SMB 크로마토그래피 장치를 사용하여 extract와 raffinate 펌프를 통하여 외부로 배출되는 시료를 분석용 HPLC로 분석한 결과 raffinate인 S-ketoprofen의 순도는 95%, R-ketoprofen의 순도는 80%로 분석되었다. Extract의 순도가 낮은 것은 Fig. 17에 보인 바와 같이 2번 칼럼에 위치하고 있는 extract의 흐름에 raffinate의 성분이 잔류하고 있기 때문이며 이것은 탈착시 크로마토그램 상에서 보여지는 꼬리끌기 현상에 의한 것으로 분석된다. 또한, 각 칼럼을 연결하고 있는 manifolds의 연결 부위에서 흐름에 의한 eddy의 형성으로 내부 흐름의 비이상적인 거동이 나타나기 때문이다.

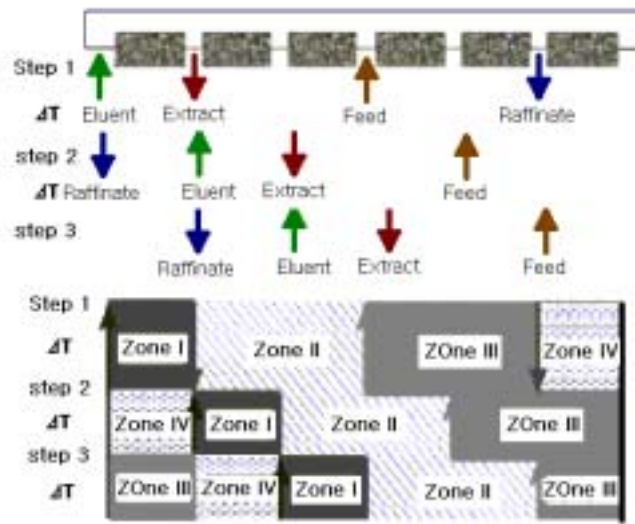


Fig. 15. Valves position and chronogram of SMB chromatography.

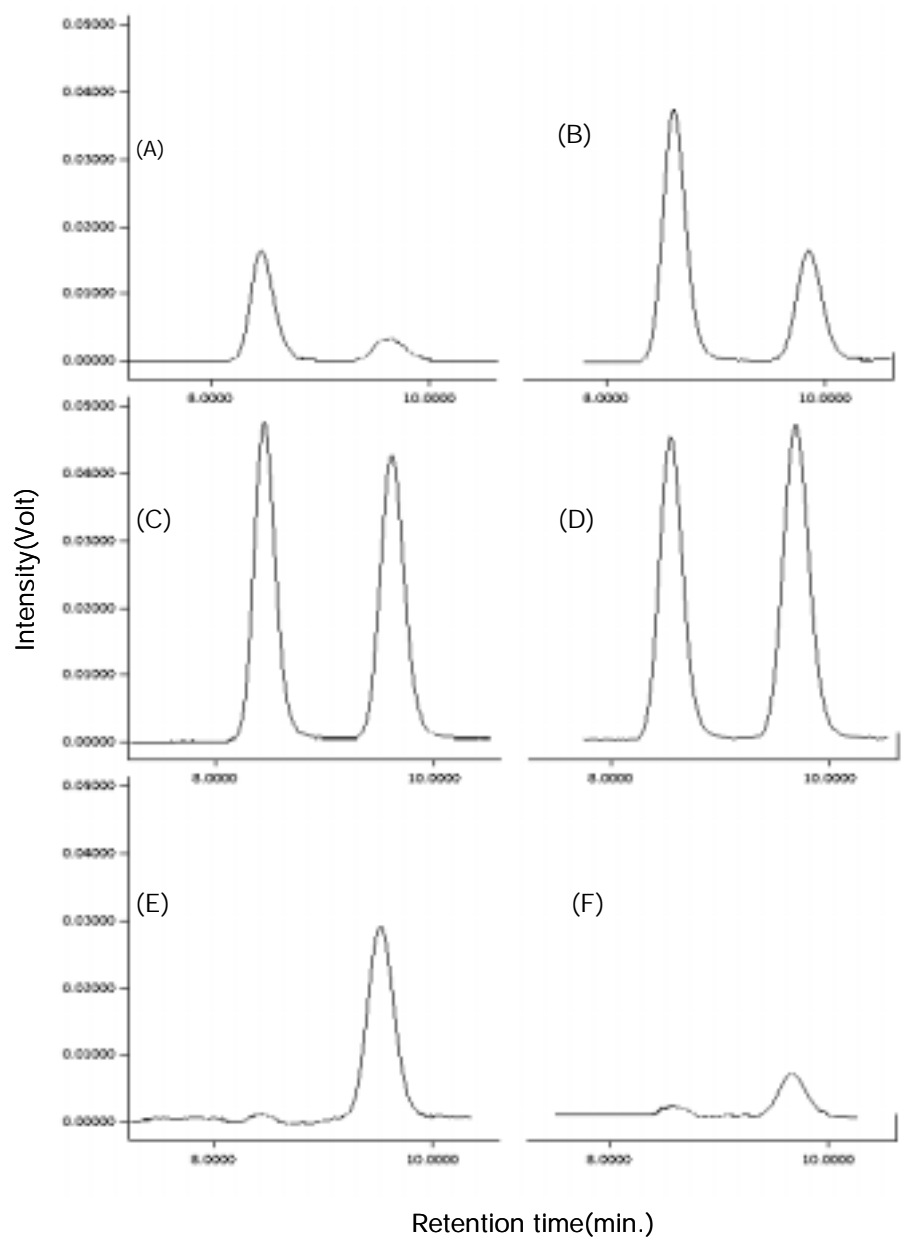


Fig. 16. The ratio of S- and R-ketoprofen enantiomers of each column outlet at different valve switching step by analytical HPLC; ((A) : 1st column, (B) : 2nd column, (C) : 3rd column, (D) : 4th column, (E) : 5th column, (F) : 6th column is located in recycle flow).

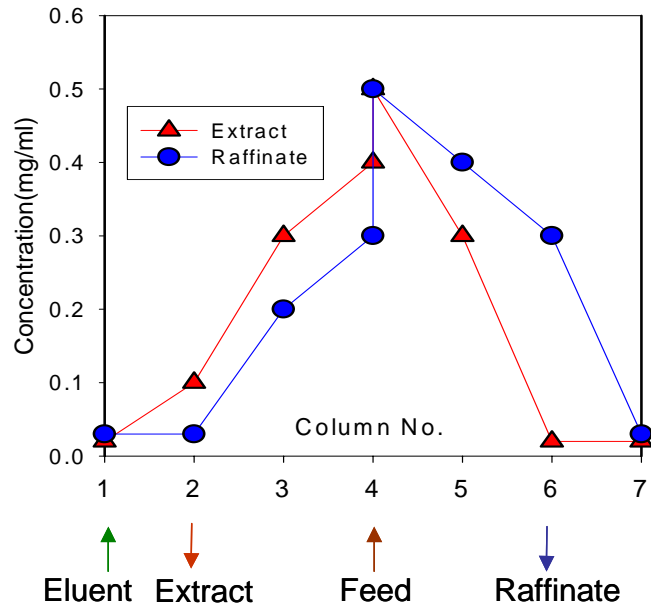


Fig. 17. Internal concentration profile of SMB chromatography.

V. 결론

실험실 규모의 SMB 크로마토그래피 장치를 제작하여 라세미 혼합물 형태의 ketoprofen을 각 enantiomer 형태인 S-ketoprofen과 R-ketoprofen으로의 분리를 수행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. TMB 모델로부터 유도된 SMB 크로마토그래피의 디자인 파라미터를 구하기 위하여, 분석용 HPLC 칼럼을 사용한 회분식 실험으로부터 흡착 평형상수 K를 구할 수 있었다.

2. S-, R-ketoprofen의 분리에 필요한 총 칼럼 길이는 60cm이며, 10cm 길이의 칼럼을 6개 사용하였다.

3. 회분식 실험을 통하여 계산되어진 SMB 크로마토그래피 조작 변수인 각 유량은 feed : 0.2ml/min, extract : 0.49ml/min, raffinate : 1.02, eluent : 1.0ml.min, recycle : 2.0ml/min., 그리고, switching time : 3.51min였다. 또한, 6번 칼럼에서 1번 칼럼으로 밸브의 흐름이 변경될 때, recycle pump에 의한 dead volume인 1200 μ l를 보정하기 위하여 23초의 시간 지연이 필요하였다.

4. 이와같은 SMB 크로마토그래피 장치의 조작을 통하여 얻어진 S-ketoprofen의 최종 순도는 95%이었으며, 농도는 0.3mg/ml로 분리가 가능하였다.

VI. 참고문헌

- [1] Morrison, R. T. and Boyd, R. N., *Organic Chemistry*, Prentice-Hall, Inc. New York, 6th ed.(1992), p.125-153.
- [2] 현명호: “LC에 의한 광학 이성질체의 분리”, 민음사, Seoul, Chap.2 (1996).
- [3] Ravi, B. and Jurgen, M, *Biomedical Chromatography*, 12, 309(1998).
- [4] Ahuja, S. Ed, *Applications and Technology*, ACS(1997).
- [5] Allenmark S, Bomgren B, “Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases. III. Optical resolution of a series of N-aroyl D,L-amino acids by high performance liquid chromatography on bovine serum albumin covalently bound to silica”, *J. Chromatogr.* **264** (1983) 63-68.
- [6] Chase H. , Draeger N. , “Affinity purification of proteins using expanded beds” , *J. Chromatogr.* **597** (1992) 129-145.
- [7] Nohira H., Watanabe K., Kurokawa M., “Optical resolution of N-benzyl-*cis*-2-aminocyclohexanecarboxylic acid by preferential crystallization” , *Chem. Lett.* (1976) 299-300.
- [8] Gupta M., Mattiason B., “Affinity precipitation, in *Highly Selective Separations in Biotechnology*” , Blackie, London, 1994, pp. 7-33.
- [9] Walters H., Johansson G., Brooks D., “Partitioning in aqueous two-phase systems: recent results” , *Anal. Biochem.* **197** (1991) 1-18.
- [10] Jacques J., Collet A., Wilen S., *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, Wiley/Interscience, New York, 1981.
- [11] Higuchi A., Ishada Y., Nakagawa T., “Surface modified polysulfone membranes: separation of mixed proteins and optical

- resolution of tryptophan” , Desalination **90** (1993) 127–136.
- [12] Mattiason B., Ramstorp M., “Ultrafiltration affinity purification” , Ann. N Y Acad. Sci. **413** (1983) 307–309.
- [13] Poncet S., Randon J., Rocca J., “Enantiomeric separation of tryptophan by ultrafiltration using the BSA solution system” , Sep. Sci. Technol. **32** (1997) 2029–2038.
- [14] Romero J., Zydney A., “Chiral separations using ultrafiltration with a stereoselective binding agent” , Sep. Sci. Technol. **36** (7) (2001) 1571–1590.
- [15] Romero J., Zydney A., “Affinity ultrafiltration: effects of ligand binding on process optimization” , Biotechnol. Bioeng. **77** (3) (2002) 256–265.
- [16] Lee, Sang Bok, Mitchell, David T, “Antibody-based bio-nanotube membranes for enantiomeric drug separations” , Science, Volume **296**, Issue 5576, June 21, 2002, Pages 2198–2200
- [17] Cho, O. S. and Kim, O. D. “Research on the Development of High Efficiency Separation System” , KIST annual report UCE
- [18] Song, T. H., Suh, S. S., Kim, Y. D., Lee, J. K. and Park, D. K., HWAHAK KONGHAK, 373(2000).
- [19] Armstrong, D. W, Anal. Chem., 84A(1987).
- [20] Pirkle, W. H and Pochapsky, T. C, *Advances in Chromatography*, J. C. Giddings, Ed., Marcel Dekker, New York, **27**, Chap. 3(1987).
- [21] Pirkle, W. H and Finn, J. in J. Morrison(Ed.), *Asymmetric Synthesis*, Academic Press, New York, 1, Chap. 6(1983).
- [22] Pirkle, W. H. and Pochapsky, T. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5627(1986).
- [23] Pirkle, W. H. and Pochapsky, T. C. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5975(1987).

- [24] Negawa, M. and Shoki F. (1992), "Optical resolution by simulated moving bed adsorption technology", *J. Chromatogr.*, **590**, 113–117.
- [25] Ching, C. B. et al. (1993), "Preparative resolution of praziquantel enantiomers by simulated counter-current chromatography", *J. Chromatogr.*, **634**, 215–219.
- [26] Ruthven, D. M. and Ching C. B. (1989), "Counter-current and simulated moving bed adsorption separation process", *Chem. Eng. Sci.*, **44**, 1011–1038.
- [27] Gattuso, M. J. et al. (1996), "Simulated moving bed technology for cost-effective chiral product", *Chem. Technol. Eur.*, **3**, 27–30
- [28] Nicoud, R. M. (1999), "The separation of optical isomers by simulated moving bed chromatography (part II)", *Pharm. Technol. Eur.*, **11**, 28–34
- [29] Juza, M. (1999), "Development of an high-performance liquid chromatographic simulated moving bed separation from an industrial perspective", *J. Chromatogr. A*, **895**, 35–49.
- [30] Mazzotti, M., Morbidelli M. and Carra S. (1993), "Robust design of binary countercurrent adsorption separation processes", *J. AIChE*, **39**, 3.