

## 제조용 단백질 크로마토그래피의 시뮬레이션

†김인호·이선목·<sup>1</sup>황우성  
충남대학교 화학공학과, <sup>1</sup>RMC Korea  
(접수 : 1999. 6. 3., 게재승인 : 1999. 6. 12.)

### Simulation of Preparative Protein Chromatography

In-Ho Kim<sup>†</sup>, Sunmook Lee, and WuSong Whang<sup>1</sup>

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Kungdong, Yusunggu, Taejon 305-764, Korea  
<sup>1</sup>RMC Korea, c/o TIC/TBI Center, KAIST Daeduk Science Town, Taejon 305-701, Korea

(Received : 1999. 6. 3., Accepted : 1999. 6. 12.)

Simulation of preparative protein chromatography becomes necessary for separation as well as optimal operation. A mathematical model describing the behavior of elution peaks in preparative protein chromatography for single and binary component separation was solved numerically using a PDEsolver Macsyma<sup>®</sup>(Macsyma Inc., Arlington, MA, U.S.A). Band profiles were calculated with the equilibrium-dispersive model of chromatography. The effects of the sample volume, concentrations of solutes in the sample, flow velocity and column length on the band profile of the elution peaks are discussed. The results in this paper suggest the model simulation for the binary mixture can be extended to multicomponent separations.

Key Words : Simulation, Preparative protein chromatography, Mathematical model, Moment analysis

### 서론

크로마토그래피는 혼합물이 2가지 상(이동상 및 고정상)에 분배되어 분리되는 분리법으로, 분석 등의 소규모 기기에서부터 대규모 흡착탑에 이르기까지 사용 범위가 광범위하다. 액체 크로마토그래피는 생물 공학 연구에서 단백질의 합성과 대사 과정에 대한 연구의 진보와 더불어 단백질의 분석용, 제조용으로 과거 10년간 큰 역할을 하여 왔다. 특히 제조용 단백질을 생산하기 위한 최종 단계에서, 온화한 조작 조건 아래 고순도의 분리 효과를 얻을 수 있는 장점 때문에 크로마토그래피 조작은 필수적이며, 최종 제품의 품질 관리를 위해서도 널리 사용되었다(1).

Peptide, protein을 정제할 수 있는 새로운 분리방법에 대한 제약산업에서의 관심의 증가로 인해, 제조용 액체 크로마토그래피에서 실험조건을 최적화하는 것은 주요한 관심사이다(2). 실험 조건의 최적화를 통해 실험실 규모나 pilot plant scale의 실험을 가능한 줄이기 위해서는 수학적 모델링을 해야 하는데(3), 수학적 모델은 운전조건을 변경시킬 때 크로마토그래피 피크를 예상하는데 중요한 역할을 한다. 또한, 이동상과 고정상의 solute들간의 interaction kinetics와 thermodynamics의 특성을 이용하여 크로마토그래피 공정을 scale-up하는데

사용될 수 있다(4).

액체 크로마토그래피의 성능을 설명하기 위해 사용된 모델은 칼럼의 축방향 좌표와 시간의 함수로 이동상의 용질 농도가 표현되며, 편미분 방정식이 물질수지식으로 표시된다(5). 선형 크로마토그래피에서는 이 모델의 analytical solution이 가능한데, 이것은 흡착등온식이 선형인 구간에서는 단일성분에 대한 물질수지식이 상당히 간략화 되기 때문이다. 그렇지만, 제조용 크로마토그래피에서는 흡착등온선의 비선형성, 각각의 성분에 대한 물질수지식의 coupling, 각각의 성분에 대한 물질전달 kinetics의 coupling, thermodynamic과 kinetic effect의 coupling등과 같은 복잡한 문제들이 발생하기 때문에, 단지 수치해석적인 방법만으로 해를 구할 수 있다(6).

제조용 크로마토그래피를 이론적으로 해석하려는 많은 연구 노력이 Guiochon 연구 그룹과 Snyder 연구 그룹에서 이루어졌다. 그리고 크로마토그래피의 이론 모델의 개발과 더불어 크로마토그래피 공정 제어의 목적으로 모델 개발과 제어 알고리즘에 대한 연구 보고도 나타나고 있다(5). 최근의 연구에서는 제조용 액체 크로마토그래피에서 이성분 분리의 실험조건을 최적화하는 것에 초점을 맞추고 있으며, 비선형 크로마토그래피의 ideal model이나 equilibrium model을 사용해 과당 주입된 isocratic elution에서 생산 속도를 최대화하기 위한 최적의 실험 조건을 결정하는 연구가 행해지고 있다(7).

본 연구에서는 제조용 액체 크로마토그래피에서 물질수지식에서의 파라미터들이 단일 성분의 용출 피크와 2성분 분리에 미치는 영향에 대해 equilibrium-dispersive model을 바탕으로 상용 컴퓨터 프로그램 Macsyma를 이용해 수치모사 하였다.

<sup>†</sup> Corresponding Author · Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 220 Kungdong, Yusunggu, Taejon 305-764, Korea  
Tel · 042-821-5685, Fax · 042-822-8995  
e-mail · ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

이론적 배경

속도 방정식

Equilibrium-dispersive model을 속도 방정식으로 사용하였다. 이 모델에서는 고정상과 이동상 사이에서의 순간적인 평형을 가정하고 nonequilibrium을 유발하는 모든 요인 - axial diffusion, eddy dispersion, finite rate of mass transfers - 은 apparent axial dispersion항으로 표현할 수 있다. Equilibrium-dispersive model은 간단하기 때문에 이론적인 연구를 하는데 있어서 유용하다(2).

시료의 각각의 성분에 대한 물질 수지식은 다음과 같이 쓸 수 있다(8).

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + F \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_{i,a} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (1)$$

(1)식에서  $C_i$ 와  $q_i$ 는 각각 이동상과 고정상에서의  $i$ 성분의 농도이고,  $z$ 는 칼럼 길이,  $t$ 는 시간,  $u$ 는 이동상의 선속도,  $F$ 는 phase ratio,  $(1 - \epsilon)/\epsilon$ ,  $\epsilon$ 은 칼럼의 총 공극율이다.  $D_{i,a}$ 는 apparent dispersion coefficient이다.

위의 식에는 4가지 현상이 고려되었다(9)

- 이동상에서의 칼럼 축방향 물질전달

$$D_{i,a} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2}$$

- 이동상에서 대류성 물질전달

$$u \frac{\partial C_i}{\partial z}$$

- 이동상에서 누적항

$$\frac{\partial C_i}{\partial t}$$

- 고정상에서의 누적항

$$F \frac{\partial q_i}{\partial t}$$

초기조건은

$$C_i(z, 0) = 0 \quad (2)$$

이다.

시료는 펄스로 칼럼에 주입된다. 시료의  $i$ 성분의 농도는  $C_i^0$ 이고, 시료주입 시간은  $t_{inj}$ 이다

시료가 주입되는 동안 입구 경계조건은

$$C_i(0, t) = C_i^0 \quad 0 < t \leq t_{inj} \quad (3)$$

이고, 출구 경계조건은

$$\frac{\partial C_i}{\partial z} = 0, \quad z = L \quad (4)$$

이다.

흡착 등온식(Adsorption Isotherms)

(1) Single-component isotherm

Equilibrium-dispersive model에서는 평형에 있는 2상 사이의 농도를 간단히 흡착 등온식으로 관계를 맺어줄 수 있다. Langmuir isotherm은 비교적 넓은 농도 범위에서 흡착실험 data와 잘 일치한다고 보고되고 있다(10).

Figure 1은 염의 농도가 높을수록 흡착이 감소하는 Lysozyme의 흡착 등온선인데, 이 실험 결과는 Lysozyme의 흡착 실험 data가 Langmuir 식에 매우 잘 일치한다는 것을 보여주고 있다.

Langmuir 흡착 등온식은 다음과 같이 표현된다.

$$q = \frac{aC}{1 + bC} = \frac{bq_s C}{1 + bC} \quad (5)$$

여기서,  $a$ 와  $b$ 는 수치계수이다. 매우 높은 이동상의 농도에서의 고정상의 농도 한계치,  $q_s = a/b$ 를 고정상의 saturation capacity라고 한다

(2) Competitive multi-component isotherm

2성분을 칼럼에 주입했을 때, 각각의 시료 성분들이 competitive Langmuir isotherm model에 따라 거동한다고 가정하였다. 이 model에 의해서 설명되는 수많은 흡착 거동 system이 문헌에 보고(10)되어 있는데, Figure 2는 silica에 부착된 BSA에 *N*-benzoyl-*D*-와 *L*-alanine의 competitive isotherm을 보여주고 있다.

$$q_i = \frac{a_i C_i}{1 + b_1 C_1 + b_2 C_2} \quad i = 1, 2 \quad (6)$$

여기서,  $a_i$ 와  $b_i$ 는 수치계수이고, 이 값들은 열역학적 일관성을 위해서 column saturation capacity,  $q_s = a_i/b_i$ 가 모든 성분에 대해 동일하도록 선택되어졌다.

식(1-6)를 기초로 편미분 방정식 solver인 Macsyma를 이용하여 수치모사 하였다(11).

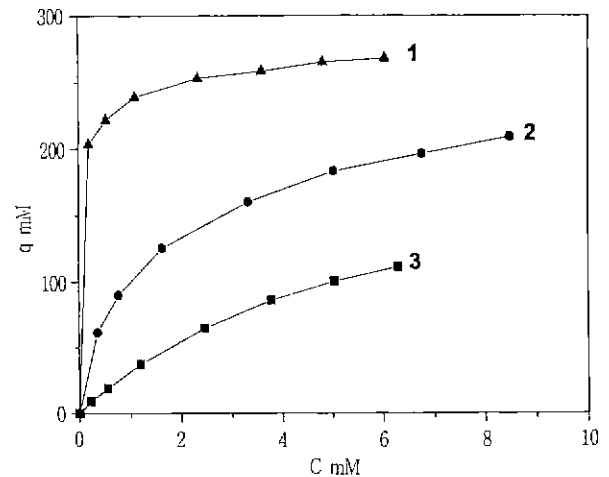


Figure 1. Experimental isotherms of proteins. Lysozyme; 1, 0.0 M; 2, 0.05 M; 3, 0.1 M ammonium sulfate with 25 mM sodium phosphate. WCX-300H DuPont, 25°C (adopted from ref. 10).

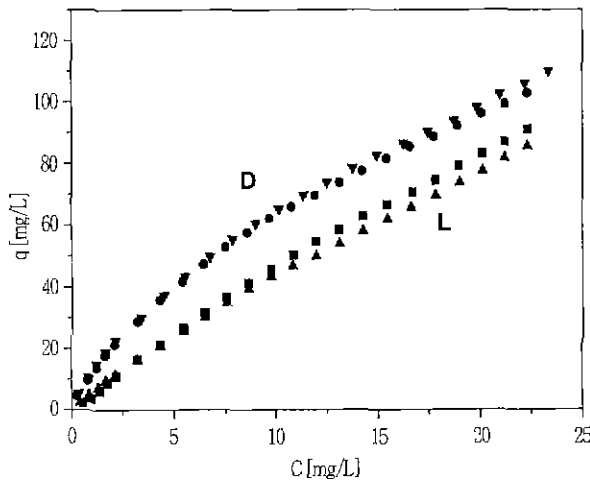


Figure 2 Competitive isotherms of *N*-benzoyl *D*- (●) and *L*-alanine (▲) in the racemic mixture; single component isotherms of *N*-benzoyl *D*- (▼) and *L*-alanine (■) (adopted from ref. 10)

Moment 분석

응답곡선의 평균 체류 시간(mean residence time)  $\bar{t}$ 과 분산(variance)  $\sigma$ 는 각각 다음과 같이 표현된다.

$$\bar{t} = \frac{\int_0^\infty C \cdot t dt}{\int_0^\infty C dt} \tag{7}$$

$$\sigma = \frac{\int_0^\infty C \cdot (t - \bar{t})^2 dt}{\int_0^\infty C dt} = \frac{\int_0^\infty t^2 C dt}{\int_0^\infty C dt} - \bar{t}^2 \tag{8}$$

Resolution

Resolution은 분리된 정도를 정량적으로 나타내는 값으로, 크로마토그래피 공정의 성능을 평가하는데 있어서 전통적인 기준이 되는데, 한 성분의 피크가 완전히 바탕선까지 내려온 후 성분 2의 피크가 생긴 경우에는 다음 식으로 계산한다

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{(W_1 + W_2)/2} \tag{9}$$

여기서  $t_{Rn}$ 는 피크의 체류시간,  $W_n$ 는 시간으로 환산된 피크 밑면의 폭이다

결과 및 고찰

운전변수가 단일성분 크로마토그래피에 미치는 영향

(1) 주입농도에 따른 영향

크로마토그래피 칼럼에 단백질 샘플이 주입되고 용매가 isocratic 조건으로 공급될 때 용출되는 곡선을 Figure 3에 도시하였다. 용출 곡선이 전형적인 비선형 흡착식에 의한 비대칭 형태를 나타내고 있다. 전산모사결과, 흡착등온선의 비선형 부분의 농도를 주입시료 농도로 택해 주입했기 때문에, 농도를 증가시

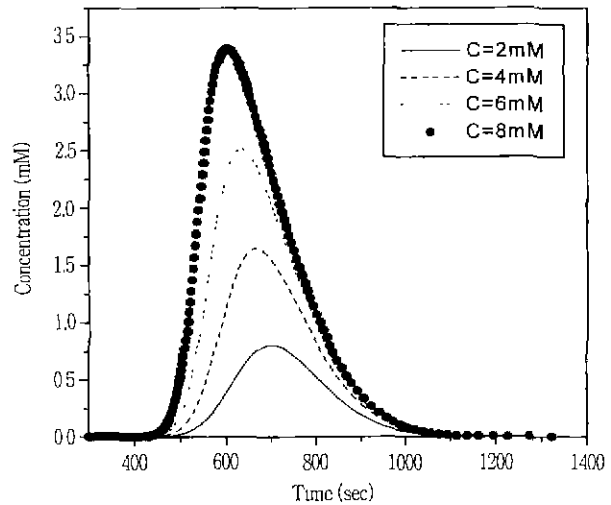


Figure 3. Simulated elution profiles with different inlet concentration. Other parameters :  $\epsilon=0.4$ ,  $u_0=0.1$  cm/s,  $L=10$  cm,  $t_{0j}=100$  sec.

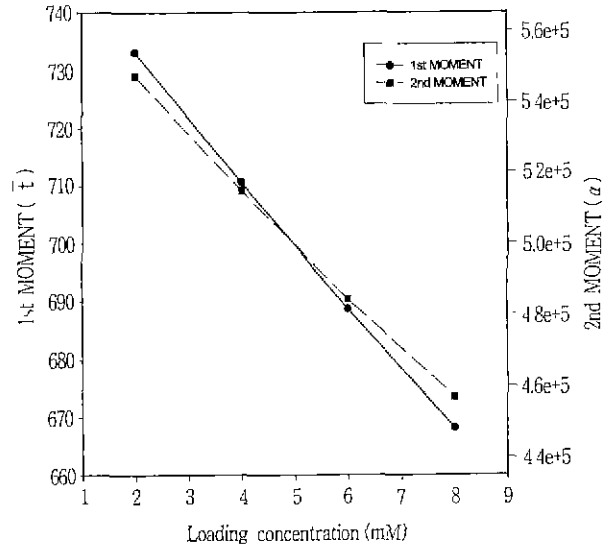


Figure 4. Effect of loading concentration on mean residence time and variance of response curve.

킬수록 피크가 점점 비대칭 형태가 되면서 용출되는 시점이 앞당겨졌다.

Macysma를 이용한 전산모사 data는 data file로 저장시킬 수 있는데, 이 data와 식 (7)과 (8)을 이용해 주입되는 시료 농도와 응답 곡선의 체류 시간 및 분산과의 관계를 Figure 4에 도시했다. 시료의 주입 농도를 증가시킬수록 시료의 용출 시점이 앞당겨져 평균 체류 시간이 감소하는 효과를 유발하고 분산이 감소해 용출 피크가 더 날카로워지는 것을 알 수 있다.

(2) 유속에 의한 영향

Figure 3의 수치모사 실행조건을 기준으로 유속을 변화시켰을 때 크로마토그램이 변하는 모양을 Figure 5에 보여주고 있다. Figure 5에서 보듯이 유속을 증가시키면 시료의 용출이 일어나는 시점이 앞당겨지고 고정상과 이동상 사이의 상호작용할

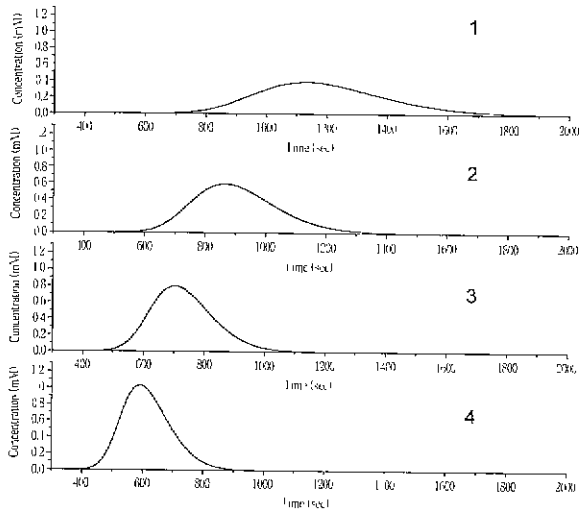


Figure 5. Elution profiles with different superficial velocity,  $u_0$ (cm/s) (1)0.06 ; (2)0.08 ; (3)0.1 ; (4)0.12

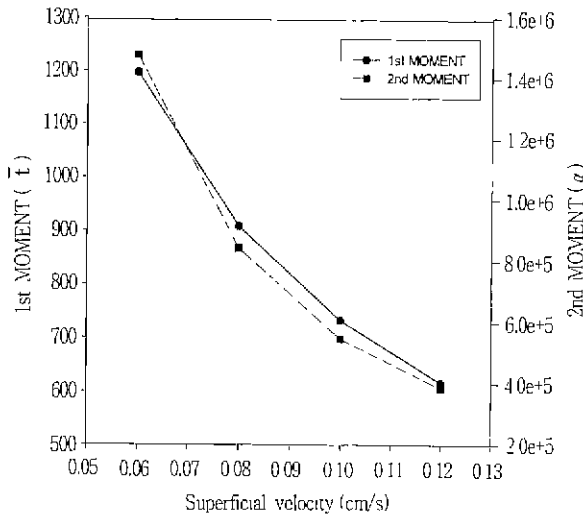


Figure 6. Effect of superficial velocity on mean residence time and variance of response curve

시간이 줄어 빨리 용출되게 하므로 피크폭이 날카로워지게 된다 유속을 변화시켰을 때 평균 체류 시간과 변화폭의 변화를 Figure 5에서 얻은 data와 식 (7)과 (8)을 기초로 계산해 Figure 6에 도시하였다. 유속이 증가할수록 시료의 용출시점이 앞당겨지므로 평균체류시간이 감소하고, 피크폭이 날카로워지므로 분산이 감소하는 것을 확인할 수 있다

운전변수가 2성분 크로마토그래피에 미치는 영향

(1) Concentration overloading의 영향

Figure 7은 칼럼에 주입된 제 2시료성분의 농도변화에 따른 용출 피크의 변화를 나타낸다. 성분 2의 주입농도를 증가시키에 따라 성분 2의 피크면적과 높이가 증가하고, 피크의 모양이 대칭형에서 비대칭 모양으로 변하는 것을 관찰할 수 있다. 성분 1의 피크 모양은 전산모사한  $C_{20}$ 의 변화에 따라 변하지 않았고 성분 2의 피크모양만 대칭형에서 비대칭형으로 변화하였다.

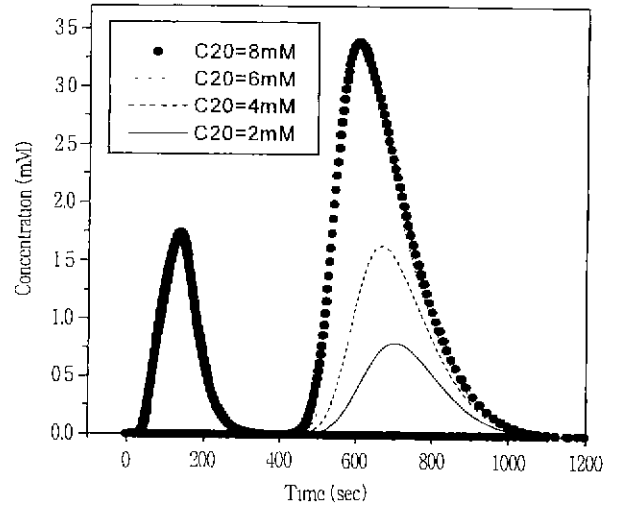


Figure 7 Simulated elution profiles simulated with different concentration of component 2 in the sample Other parameters are  $\epsilon=0.4$ ,  $u_0=0.1$  cm/s,  $L=10$  cm,  $t_{m1}=100$  sec,  $C_{10}=2$ mM.

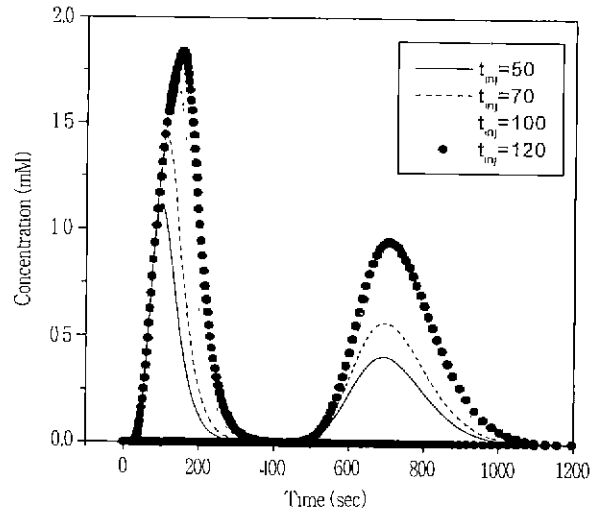


Figure 8. Simulated elution profiles with different sample volume :  $C_{10}=2$  mM,  $C_{20}=2$  mM.

(2) Volume overloading의 영향

Figure 7의 수치모사 실행조건에서 다른 조건은 동일하게 하고 칼럼내에 주입되는 시료의 주입량만 변화(volume overloading)시켰을 때 용출되는 크로마토그램의 모양을 Figure 8에 나타내었다. 주입량을 증가시키에 따라 용출피크는 제 2성분 피크의 앞쪽과 제 1성분 끝쪽에서 퍼짐현상이 일어나 주입된 두 개의 시료성분 모두에 대해 피크의 분산이 커졌다 칼럼에 주입되는 시료의 주입농도를 증가시켜 overloading했을 때는 제 2성분 시료가 용출되는 시점이 앞당겨졌지만, 동일한 농도조성에서 주입 부피를 증가시켜 overloading하게 되면 제 1성분과 제 2성분의 주입량이 같이 증가하므로 두 피크의 모양이 모두 변하고 제 1성분의 변화가 두드러진다

(3) 충전 칼럼 길이의 영향

Figure 9은 운전변수로 칼럼의 길이를 변화시켰을 때 크로마토그램의 분리성능을 나타낸 결과이다 다른 수치모사 실행조건

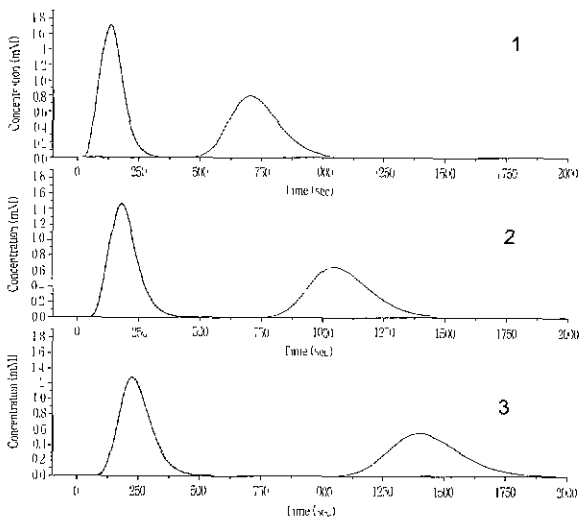


Figure 9 Simulated elution profiles with different column length, L(cm) (1)10;(2)15;(3)20.

은 Figure 7의 실행조건과 동일하다. 컬럼길이가 길어질수록 이동상이 칼럼을 통과하는데 걸리는 시간이 길어지므로 시료가 용출되는 시점이 늦어지고, 이동상내의 시료 성분들이 고정상과 충분한 상호 작용을 일으키게 되므로 용출되는 두 피크의 폭과 간격이 더 넓어졌다.

**분리도 측정**

일반적으로, 분리도는 두 성분의  $t_R$ 의 차이가 크고, 피크의 폭이 좁을수록 크다 크로마토그램에 나타나는 시료의 용리 봉우리를 정규분포곡선(normal distribution curve)으로 생각하여 두 성분의 정상적인 분리도를 계산하는데,  $R_s$ 값이 1.5이상일 경우를 완전분리 또는 바탕선 분리라 하며, 1.0인 경우에는 두 성분이 각각 2%씩 중첩되어 있는 분리를 의미한다. 분리도와 실제 크로마토그램과의 관계를 살펴보면 2성분이 존재하더라도 분리도가 0.4 이하인 경우에는 하나의 피크인 것처럼 보인다. 분리도가 약 0.6 정도에서 봉우리가 갈라지기 시작한다. 분리도가 1.0이 되더라도 두 피크는 완전히 분리되지 않고 분리도 값이 1.5가 되어야 바탕선에서 완전히 분리된다.

$R_s$ 를 계산하기 위해서, 각 성분이 용출될 때 최고 농도에서의 시간을  $t_R$ 로 정했고,  $W$ 는 각각의 성분이 용출이 시작하고 끝나는 지점의 폭으로 계산을 수행했다. 본 연구에서는 시료를 과량 주입했을 때의 분리도를 고려하기 때문에 크로마토그램이 정규분포곡선을 그리지 않아서 분리도 값이 1.5 미만의 값을 가져도 바탕선에서 완전한 분리가 이루어졌다.

성분 2의 농도가 증가할수록 성분 2가 빨리 용출되어 체류시간의 차가 작아지고 피크의 폭이 넓어지기 때문에 계산된  $R_s$ 값은 결과적으로 성분 2의 농도가 증가함에 따라 Figure 10과 같이 작아지는 것을 알 수 있다.

Figure 11은 시료의 주입량을 증가시켰을 때의 분리도의 값을 도사한 것으로 시료의 주입량을 증가시킬수록 체류시간의 차이는 작아지고 피크의 피침 현상이 커서 밑변의 폭이 넓어지므로  $R_s$ 의 값이 점점 작아졌다

Figure 9에서 보듯이 컬럼의 길이가 길어질수록 시료성분이 이동상과의 충분한 상호작용을 거친 후 용출되기 때문에 두 피

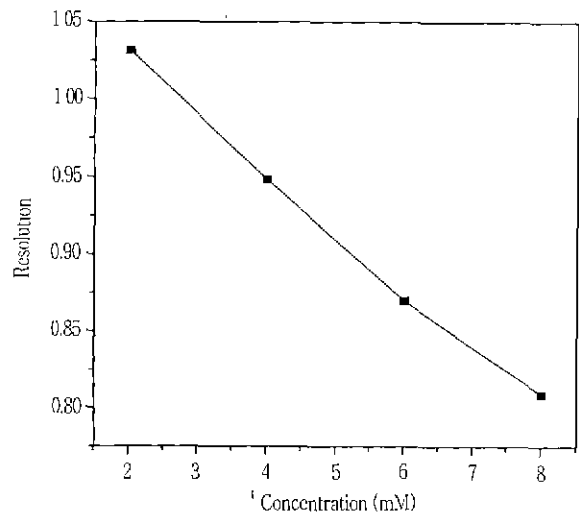


Figure 10 Variation of resolution with different concentration of component 2 in the sample

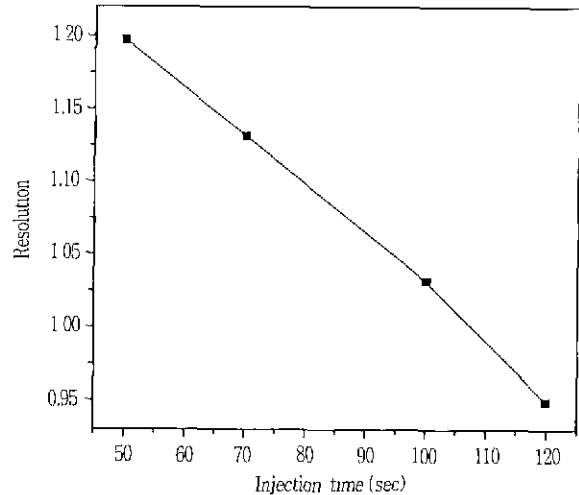


Figure 11. Variation of resolution with different sample volume.

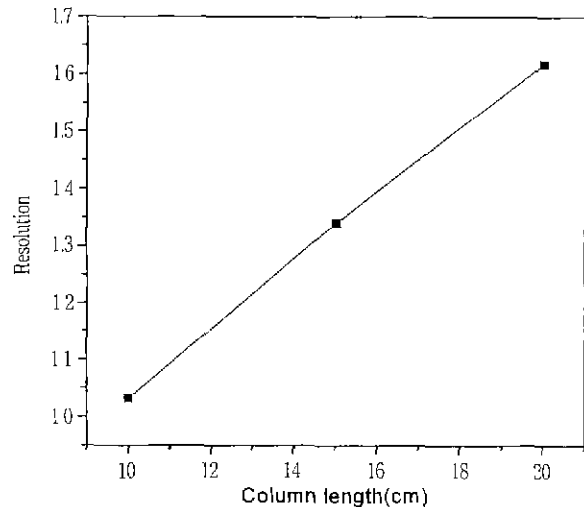


Figure 12. Variation of resolution with different column length.

크의 간격이 넓어졌다. 그렇지만 각각의 피크폭도 넓어지게 되는데, 분리도를 계산하는데 있어서 피크 각각의 폭이 넓어지는 것보다 두 피크간의 간격이 넓어지는 영향이 더 커지게 되므로 칼럼길이를 길게 할수록 분리도는 Figure 12와 같이 더 좋아진다.

## 요 약

제조용 액체 크로마토그래피를 전산모사하는 것은 최적의 분리와 운전 조건을 위해 필수적이다. 제조용 액체 크로마토그래피에서의 단일 성분과 2성분 용출 피크의 거동을 설명하는 수학적 모델을 equilibrium-dispersive model을 이용해 계산을 수행하였다. 모델의 전산모사를 통해 주입되는 시료부피, 시료속의 용질의 농도, 유속, 칼럼길이가 용출되는 피크에 미치는 영향을 확인해 보았다.

Equilibrium-dispersive model로 전산모사된 data를 이용하여 단일 성분 시료 주입에 대해 주입 농도와 유속에 대한 영향을 알아본 결과 주입 농도를 증가시킬수록 용출이 일어나는 시점이 앞당겨져 평균 체류 시간이 감소하고 날카로운 피크를 얻을 수 있다. 유속을 증가시키면 시료의 용출 시점이 앞당겨지고, 고정상과의 충분한 상호 작용을 일으키기 전에 용출되기 때문에 피크가 날카로와 진다.

2성분 시료 주입에 대해 분리도값들을 계산한 결과 두번째로 용출되는 시료의 농도를 증가시킬수록 이 시료성분이 더 빨리 용출되므로 분리도값이 감소함을 알 수 있다. 칼럼길이가 분리도에 미치는 영향을 보면 칼럼길이를 길게 할수록 시료성분이 고정상과의 완전한 상호작용으로 분리가 잘되고, 시료의 주입량을 증가시키면 두 성분간의 용출 피크의 간격이 좁아져 분리도값이 감소함을 알 수 있다.

이 내용을 바탕으로 다성분 분리에 대한 simulation 연구로 확장할 수 있다.

## 사 용 기 호

- $a_i$  : constant in Langmuir isotherm for component  $i$
- $b_i$  : adsorption equilibrium constant for component  $i$
- $C$  : mobile phase concentration
- $D_a$  : apparent dispersion coefficient
- $F$  : phase ratio
- $L$  : column length
- $q$  : stationary phase concentration
- $q_s$  : saturation capacity of stationary phase
- $R_s$  : resolution
- $t$  : time
- $u$  : local average mobile phase velocity
- $W$  : band width
- $z$  : axial coordinate

## 그리스문자

- $\sigma$  : variance of peak
- $\epsilon$  : voidage of bed

## 하 첨 자

$i$  : component

## 참 고 문 헌

1. 박창일, 이치호 (1992), HPLC의 이론과 실제, 자유아카데미, 서울.
2. Felinger, A. and G. Guiochon (1994), Optimizing Experimental Conditions for Minimum Production Cost in Preparative Chromatography, *AIChE Journal*, **40**, 594-605
3. 이주원, 노경호 (1997), 단일론과 모멘트방법을 이용한 테옥시리보뉴클레오사이드의 평형상수의 계산 및 비교, *J. of Korean Ind. & Eng. Chemistry*, **8**, 403-409.
4. Lun, W. B., F. S. Wang and W. C. Lee (1998), Model Simulation and Optimizing in Preparative Liquid Chromatography Using a Combination of Perturbation and Modified Collocation Methods, *Ind Eng Chem. Res.*, **37**, 4399-4407.
5. 김인호, 정봉현 (1994), 단백질 크로마토그래피의 모델링, *CHEMICAL INDUSTRY and TECHNOLOGY*, **12**, 316-326
6. Golshan-Shirazi, S. and G. Guiochon (1994), Modeling of Preparative Liquid Chromatography, *J. of Chromatography A*, **658**, 149-171.
7. Felinger, A. and G. Guiochon (1998), Comparing the Optimum Performance of the Different Modes of Preparative Liquid Chromatography, *J. of Chromatography A*, **796**, 59-74.
8. Guan, H., B. Scott Broyles and G. Guiochon (1996), Modeling of the influence of the experimental conditions on the separation of the components of a binary mixture in isocratic overloaded elution preparative chromatography, *J. of Chromatography A*, **734**, 49-62.
9. Bellot, J. C. and J. S. Condoret (1991), Liquid Chromatography Modelling : A Review. *Process Biochemistry*, **26**, 363-376.
10. Guiochon, G., S. Golshan-Shirazi and A.M. Katti (1994), Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography, pp.49-135, Academic Press, Boston, MA.
11. Macsyma Inc. (1996), PDEase2DTM Reference Manual, Arlington, MA.