

Recycling Preparative HPLC를 이용한 물질분리

김현택[†] · 이연형

한국자이

I. 서 언

21세기 국가전략사업으로 양성되고 있는 Bio분야에서, 현재 우리에게 취약한 분야인 신물질 탐색, 즉 생리활성물질의 탐색에 있어서 Preparative HPLC의 중요성은 더욱 부각되고 있다.

그러나, 미량의 분석·분리만이 가능한 HPLC와 단순히 양적인 면만을 대량화시킨 일반 Preparative HPLC는 일반 천연물이나 약재 등 다양하고 복잡한 Compound를 지닌 시료의 경우에는 그 분석·분리·생산에 있어서 충분한 효과를 보지 못했다.

따라서 더 많은 양을 더 좋은 분리능으로 분리·분취를 하고자 하는 욕구에 발을 맞추어 시료를 Column에 재순환 시켜 분리하는 Recycling기능을 통하여 완벽한 대용량, 고순도 정제용 Recycling Preparative HPLC가 개발되었다.

즉, 대용량의 시료를 목적하는 순도까지 자동으로 처리할 수 있게 된 것이다. 또한, 이 과정에서 일어날 수 있는 확산 등의 문제를 정압기술로 완벽하게 차단하였으므로 운용자의 조작없이 최대 3g, 부피로는 최대 50 ml까지 시료주입이 가능하며 시료주입부터 원하는 순도의 분취까지 24시간 무인 운전 체제를 완성하였다. 또한 분취·생산의 부가가치를 높이기 위하여 용매의 소비량을 획기적으로 줄였고, 더불어 폐용매의 재사용까지 가능한 시스템을 구축하였다. 따라서 본장에서는 Recycling Preparative HPLC의 원리 및 Scale Up Method에 대해 기술해 보겠다.

II. Recycling Preparative HPLC

1. Recycling Preparative HPLC의 원리

기존의 Preparative HPLC는 Pump에서 나오는 용매와 manual injector에서 주입된 시료가 혼합되어 흐르면서 column에서 분리가 이루어지고, 이 분리된 상황을 Detector로 확인한 후 바로 분취를 행하였다. 그러나 Recycling Preparative HPLC의 경우, 아래의 모식도에서 보이는 Recycling System을 Auto Recycler가 조절하여 분리가 이루어지지 않은 시료의 경우, 곧바로 column에 재주입하게 된다. 따라서 500 mm길이의 column을 10회 recycling할 경우 5m 길이의 column으로 분리하는 분리능을 가지게 된다. 즉, Recycling은 분리가 이루어지지 않은

[†]Corresponding author: (Phone) +82-2-553-1191 (E-mail) powerht@jaikorea.co.kr, kor0158@jaikorea.co.kr

시료를 분리가 이루어 질 때까지 Column에 재순환하는 원리이며, 이 순환 과정에서 첫 Cycle의 Column에서 두 번째 Cycle의 Column까지의 넓은 용적을, 시료가 확산등의 이유로 다시 섞이지 않고 순차적으로 분리가 이루어지게 정압을 유지 시켜주는 것이 독특한 기술이다. 또한, 이 과정에서 용매의 소비가 전혀 이루어지지 않기 때문에 저렴하게 분리할 수 있으므로 많은 연구소들이 기존에 LC시스템에 의한 용매비용의 부담을 덜어서 생산라인에 응용중이다.

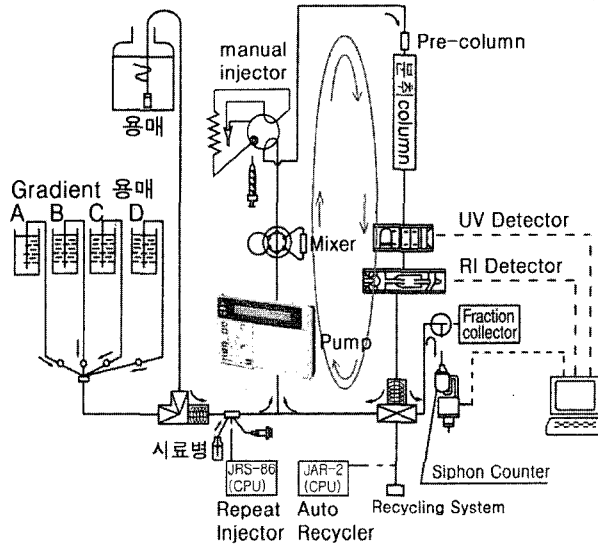


Fig. 1. Recycling preparative HPLC의 모식도.

2. Recycling Preparative HPLC의 실제 분리 예

1) Oligosaccharide 분리

Oligosaccharide 시료를 Table 1의 조건으로 Recycling Preparative HPLC로 분리하여 Fig. 2와 같은 결과를 나타내었다. Oligosaccharide 시료는 Cycle 1에서 분리 목적하는 구간을 6회의 Recycling을 통하여 완전하게 분리하고 3개의 fraction으로 나누어 분취를 받았다.

2) 오가피 분리

오가피 시료를 Table 2의 조건으로 Recycling Preparative HPLC로 분리하여 Fig. 3과 같은 결과를 나타내었다. 오가피 시료는 Cycle 1에서 분리 목적하는 구간을 UV와 RI detector를 동시에 사용하여 recycle을 통하여 분리하였다. 따라서 200 nm의 파장에서 흡광도가 좋지 않았던 compound를 RI를 통하여 확인하여 완전 분취하였다.

3. Recycling Preparative HPLC의 장점

1) Recycling 기술을 이용한 Auto Recycler 및 Repeat Injector등의 자동화 장비를 통하여 편리하게 고순도 대량 정제 분리가 가능하다. 시료처리량이 1일 최대 20 g까지 가능하다.

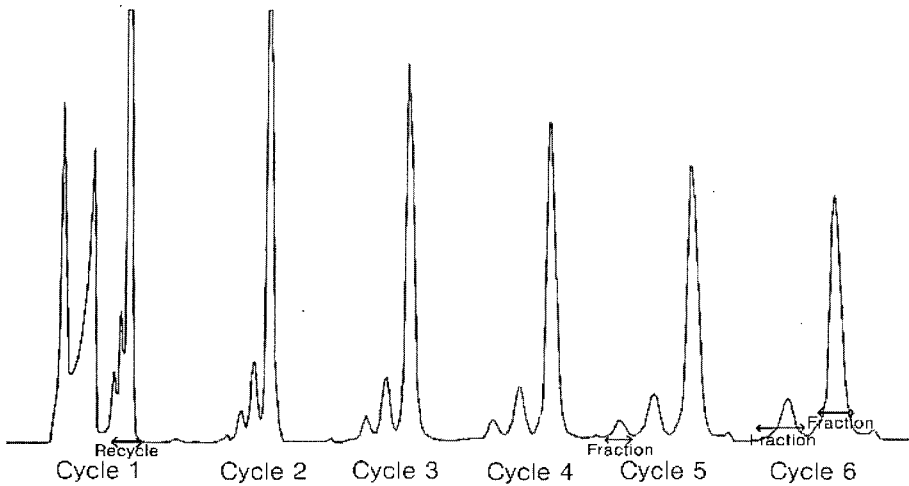


Fig. 2. Oilgosaccharide의 분리 크로마토그래프.

Table 1. Recycling Preparative HPLC을 이용한 Oilgosaccharide 분리 조건

Instrument :	JAI Associates Recycling Preparative HPLC
Column :	JAIGEL W-252, 20 mm×500 mm
RI Detector :	JAI RI-5 detector
Solvent :	Water (100%)
Injection Volumn :	3 ml (200 mg)
Flow Rate :	3.5 ml/min

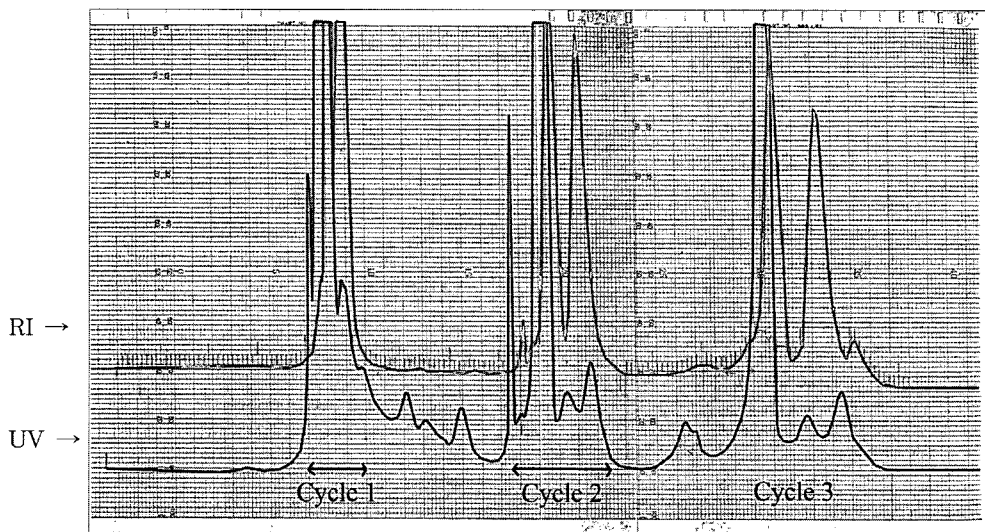


Fig. 3. 오가피의 분리 크로마토그래프.

Table 2. Recycling Preparative HPLC을 이용한 오가피 분리 조건

Instrument : JAI Associates Recycling Preparative HPLC
Column : JAIGEL GS-310, 20 mm×500 mm
UV Detector : JAI UV-3702B (200 nm)
RI Detector : JAI RI-5 detector
Solvent : Methanol (100%)
Injection Volumn : 3 ml (300 mg)
Flow Rate : 3.5 ml/min

- 2) JAI사 Column의 이론단수(Theoretical Plate Number)는 일반적인 동급 Column의 약 3배 정도이며, 분리능 또한 3배 이상이다. 즉, JAI사 Column의 이론단수는 15,000 이상이며, 일반적인 동급 Column의 경우는 5,000정도의 이론단수를 나타 낸다. 또한, Column의 수명이 타사의 2배 이상으로 비용절감 효과가 높음을 알 수 있다.
- 3) UV Detector와 RI Detector의 동시 시료 검출이 가능하여 UV의 장점인 민감한 반응, RI의 장점인 넓은 범위의 검출을 통하여 시료를 정확하게 분취를 할 수 있다. 따라서, 시료의 손실 없이 고순도 정제 분리가 가능하게 된다.
- 4) 이론단수가 높은 Column의 사용 및 여러 가지 획기적인 기술의 개발로 용매 소비량이 동급의 일반 분취용 HPLC 보다 1/10~1/50배 수준으로 낮아 HPLC 유 지비용으로 가장 많은 비율을 차지하는 용매비용 절감효과를 볼 수 있다. 용매 소비량과 용매비용의 비교는 Table 3와 같다. 또한, 시료를 Recycling 기술을 이 용하여 분리할 때는 용매의 소비가 없어 더욱 용매비용 절감효과를 볼 수 있다.

Table 3. Recycling preparative HPLC와 일반 preparative HPLC의 용매 사용량 비교

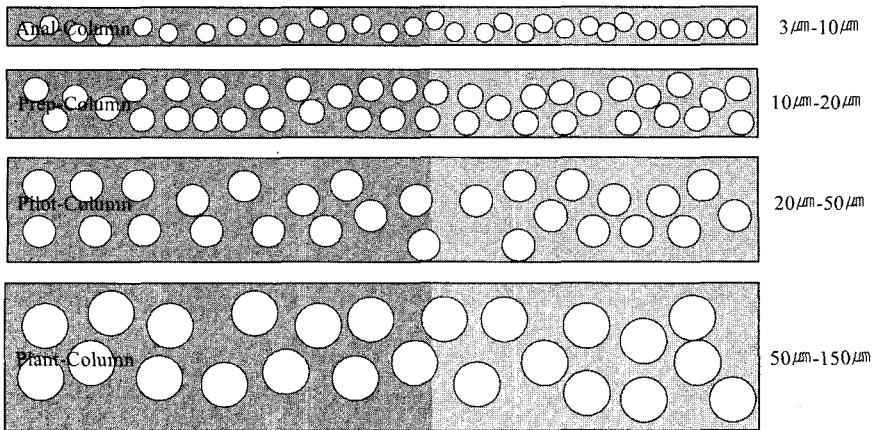
	Flow rate	용매 소비량 (1 day)	용매 비용 1년/일 24시간 사용	용매 비용 1년/주 15시간 사용
JAI	3 ml/min	4.3 l/day	13,733,125원	1,134,000원
일반	100 ml/min	144 l/day	459,900,000	37,800,000

4. Recycling Preparative HPLC을 이용한 Scale Up Method

1) Column의 Resin Size

실제로 분석용 Column 조건을 기준으로 Scale Up을 하게 될 때 조건이 틀어지거나, 기준에 잡은 조건과 상이한 경우가 많다. 이는 여러 가지 요인이 있을 수 있으나, 가장 큰 이유는 Column의 Resin Size가 Scale Up 과정에서 점점 커진다는 것이다. 예를 들어 아래의 Fig. 4와 같이 분석용 column의 경우 충전된 resin이 모래알 수준인데, 분취용은 탁구공, Pilot용은 야구공, Plant용은 축구공 크기의 resin이 충전되어 있는 경우 각각의 Scale상의 Column이 똑같은 분리능을 가지지 못한다는 것은 자명한 일이다.

이렇게 Column의 Resin Size가 커질 수 밖에 없는 이유는 Column에 걸리는 압력의 영향 때문에 Scale Up시 큰 Column에는 내구성이 강한, 즉 비교적 Size가 큰 Resin을 충전해야 하는 문제에서 파생된다.



원인 : Column의 압력을 견디기 위하여

Fig. 4. 각각의 Scale에 맞는 Column Resin 크기 비교.

따라서, 단순히 분석 조건만을 가지고, Scale Up을 이루는 것은 어렵기 때문에 최소한 Prep(분취)의 Scale에서 조건을 잡는 것이 좋다. 또한, JAI사의 Recycling Preparative HPLC의 경우, 앞의 Column Resin Size 단점을 보완하기 위하여, 위에서도 밝힌바와 같이 시료를 Column에 재순환시키는 Recycle 원리를 이용하여 Column의 효율을 극대화시켜 그 분리능을 최대로 올렸을 뿐만 아니라 내구성이 강한 Resin과 Packing 기술의 개발로 Column의 이론단수가 높아 Scale Up의 문제점을 최소화 시켜 이를 산업화하고 생산설비에 접목시킴으로 고효율 부가가치 창출에 힘을 보태고 있다.

2) Column의 분리 Method

Column의 분리 Method는 크게 GPC(Gel-Permeation Chromatography), GFC (Gel-Filtration

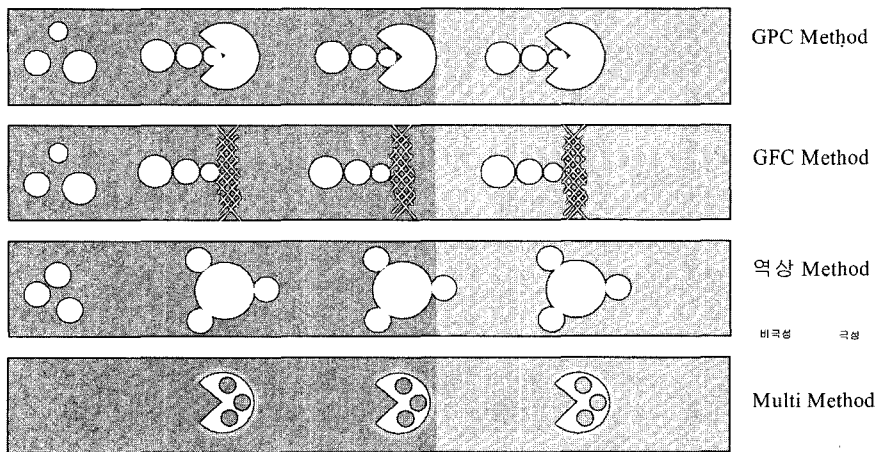


Fig. 5. Column의 분리 Method.

Chromatography), 역상, 순상 Method로 나눌 수 있다. 또한, 각각의 단일 분리 Mode를 통한 분리가 가장 일반적이므로 복잡한 Compound인 경우 각각의 분리 Mode를 따로 적용해야 하는 번거로움과 분리능 또한 높지가 않았다.

그러나 JAI사의 Column Method의 경우 Fig. 5에서 볼 수 있듯이 단순히 단일 분리 Mode (GFC, GPC, 역상, 순상등..)를 통한 일반적인 분리뿐만 아니라 Multi 분리 Mode Column(위 분리 Mode가 동시에 적용)을 통하여 그 분리능을 극대화 시켰다. 즉, Fig. 5의 하단 그림과 같이 Column Resin에 GPC Method를 가지기 위해 GPC-Gel을 만들었으며, GFC Method를 위해 구멍(hole)을 뚫었다. 또한, Resin 주변에 C18 코팅을 하여 용매의 조성에 따라 분리 Method를 다르게 적용 시킬 수 있는 Multi 분리 Column을 개발하였다.

현재 우리에게 취약한 분야인 신물질 탐색, 즉 생리활성물질의 탐색에 있어서 Recycling Preparative HPLC의 중요성은 더욱 부각되고 있음을 앞에서도 강조하였다. 따라서 사용자의 편의와 고효율 부가가치 창출에 도움을 줄 수 있는 Recycling의 원리 및 실제 분리 실험의 예와 Scale Up시에 문제가 되는 점과 해결방안에 대해 모색해 보았다.

참고문헌

1. Baek, Y. I. 2002. The Cytotoxic Constituents from Eupatorium Chinense Var. Simplifolium. Department of Newly-Developed Drugs, Professional Graduate School of Oriental Medicine Wonkwang University.
2. Isao, K., Sakae, K., Tetsuo, I, and David, L. Wood, 1986, Analytical and preparative separation of bark beetle pheromones by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography., 363 : 309-314.
3. Isao, K. and Mujo, K., 1987, New Insect Growth Inhibitory Flavan Glycosides from *Viscum tuberculatum*., Tetrahedron Letters, 28(9) : 921-924.
4. Lee, H. O., 2000, Antimicrobial Effects and Anticancer Activities of Natural Products from Medicinal Plants., Professional Graduate School of Biology Wonkwang University.

Separation and Scale-up of Natural Products Using Recycling Preparative HPLC

Hyun-Taek Kim[†] and Youn-Hyoung Lee

*Jai Korea, Ltd., 723-11, Yeoksam-dong, Kangnam-Ku, Seoul, Korea
+82-2-553-1191, powerht@jaikorea.co.kr, kor0158@jaikorea.co.kr*