

SMB 크로마토그래피에서 키랄정지상 (Chiral Stationary Phase, CSP)의 사용

김 병 립 · † 김 인 호

충남대학교 화학공학과

(접수 : 2005. 6. 17., 게재승인 : 2005. 6. 24.)

CSP (Chiral Stationary Phase) for SMB Chromatography

Byung-Lip Kim and In-Ho Kim†

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received : 2005. 6. 17., Accepted : 2005. 6. 24.)

Simulated moving bed (SMB) chromatography was used in the petrochemical industry in the 1960s and its use has been widened to separate chiral compounds in the 1990s. Chiral stationary phase (CSP) is the key component in SMB for the separation of the chiral compounds. CSP has been developed for the analytical use in HPLC, however, its development successfully adapted for the preparative use in SMB chromatography. This review covers the present state-art technology of CSP for SMB chromatography in terms of selectivity, stability, and capacity.

Key Words : SMB, CSP, chiral compounds, selectivity, stability, capacity

서 론

키랄화합물은 광학이성질체로서 광학활성 외에 다른 물리화학적 성질이 같으므로 이를 분리하기 위한 많은 노력이 필요하며 연구도 많이 진행되어 왔다(1). 크로마토그래피는 비키랄화합물이나 키랄화합물 모두를 분리할 수 있는 도구로 우선 실험실 분석기술로 개발되어 왔으며 근래 제조용으로 여러 분야에서 순수물질 분리 생산에 이용되고 있다(2). 크로마토그래피는 일반적으로 고가의 분리공정으로 인식되어 왔고 생화학 물질의 분리와 같은 특수분야에서만 제조용으로 사용될 수 있다고 생각되어졌다(3). 그러나 석유화학과 제당산업에서 연속식 크로마토그래피가 상업화에 성공함으로써 크로마토그래피가 제조단위공정으로 부각되었다(4). 연속식 크로마토그래피는 SMB 공정으로 불리며 고정상의 움직임 (Moving Bed)을 칼럼사이의 밸브조작에 의해 모사함 (Simulation)으로 이런 이름이 붙어졌다(5). 석유화학이나 제당산업에서는 저가의 고정상이 사용되며 제올라이트 등이 대중적이다(6). 1960년대의 SMB 개념도입과 그 후 30년간의 기술개발로 Barker 연구

진은 교체를(7) 편집하였고 1990년대 들어 제약산업에 SMB 기술을 도입하는데 기초를 제공하였다.

제약산업에서 키랄 화합물 분리의 필요성은 탈리도마이드 사건에서 유래한다. 키랄체 중 하나가 독성이 있는 것을 인식하지 못하고 수면제로 시판된 탈리도마이드는 기형아 출산으로 유명하여졌다(8). 그후 약효성분을 갖는 키랄체와 비약효성분인 키랄체의 분리가 실험실적으로 이루어졌으며 키랄 HPLC 칼럼 개발이 Okamoto 연구팀과 Pirkle 연구팀에 의해 진행되었다(9, 10). 키랄분리를 SMB 시스템에서 1992년에 성공(11)하였으며 이때 사용된 CSP는 chiralcel OD였다. 1992년에 Negawa와 Shoji는 SMB 장치를 이용하여 키랄물질을 제조용 수준으로 분리하였다. 이를 위해 선결될 문제점으로 dead volume이 작은 장치개발과 SMB용의 CSP 개발, 그리고 SMB 조업조건을 결정하기 위한 simulator 개발을 제시하였다.

1980년대까지 CSP 개발에 주역은 Okamoto 연구진이였다. Cellulose를 실리카에 부착하여 HPLC 고정상을 제조하였고 분석용 HPLC 칼럼이 Daicel 회사를 통하여 시판되었다(12). 키랄 분석용 HPLC기술로 키랄성 신약의 약리학과 약동역학 연구가 가능하였다. 키랄물질분리로 enantiomer를 새로운 신약으로 등록할 가능성을 약학 연구진들이 제시하였으며(13) 미국 FDA에서도 이를 공포하였다(14). SMB용 CSP 개발에서 경제성 문제는 제일 먼저 고려할 점이었으며 SMB 칼럼 충전용 CSP를 1990년대 초에 구하기가 쉽

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel : 82-42-821-5685, Fax : 82-42-821-8873
E-mail : ihkim@cnu.ac.kr

지 않았다(15). 근래에 100여 가지의 분석용 칼럼에 사용되는 CSP가 시장에 나와있으나 제조용 CSP는 수종에 불과하다. 본 총설에서는 시판 칼럼에 충전된 CSP의 현황과 SMB 칼럼에 충전될 수 있는 벌크 SMB용 CSP에 대한 소개를 하고자 한다.

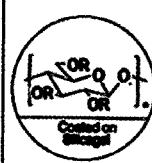
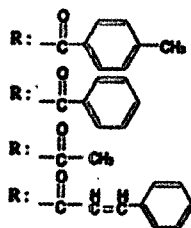
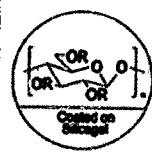
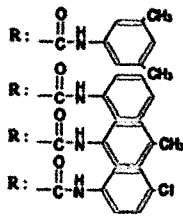

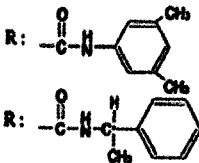
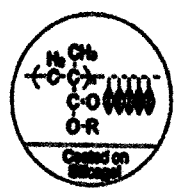
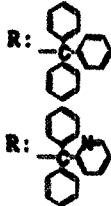
키랄 CSP 현황

셀룰로오스와 아밀로우스 같은 자연 고분자가 키랄분자를 구별할 수 있으므로 이 고분자들의 수산기를 수정하여 Daicel사는 Table 1과 같은 키랄 CSP를 제조하였다(16). 상품명 Chiralcel은 셀룰로오스를, Chiralpak은 아밀로오스를 변형시킨 제품이다. 수식된 잔기는 에스터와 카바메이트

유도체로 방향족 고리가 포함된다. 용매는 순상용매로 헥산과 알코올의 혼합물이다. Chiralcel과 Chiralpak은 실리카 위에 입혀진 상태이고 압력에 잘 견디며 제조용 칼럼에 충전할 수 있다.

Pirkle 교수는 CSP를 개발하기 위한 이론을 제시하였다. Fig. 1과 같이 키랄 선택자 (chiral selector)가 실리카겔 표면에서 키랄분자와 적어도 3점에서 작용한다고 하였다(17). Pirkle 교수는 CSP에서 접촉점의 종류를 π -염기성 방향족 고리나 π -산성 방향족 고리, 산점, 그리고 염기점으로 분류하였다. 방향족 고리는 π - π 상호작용, 산점은 분자간 수소결합, 염기점은 수소결합을 제공한다. Pirkle CSP를 3가지로 분류하면 Table 2와 같고 키랄 선택자를 Fig. 2에 보이고 있다. Whelk-O1은 tetrahydrophenanthrene π -system, dinitrobenzamide π -system, 그리고 H-bond donor로 구성되어

Table 1. Daicel chiral stationary phase

name	type of adsorbent	separation	eluent
Chiralcel OJ-H Chiralcel OB-H Chiralcel OA Chiralcel OK	Cellulose ester derivative  		·Hexane/IPA ·Hexane/Ethanol
Chiralcel OD-H Chiralcel OC Chiralcel OG Chiralcel OF	Cellulose carbamate derivative  	compounds possessing amide group, carbonyl group, nitro group, sulfonyl group, cyano group, hydroxyl group, amine, and carboxylic acid	·Hexane/IPA
Chiralpak AD-H Chiralpak AS	Amylose derivate  		·Hexane/Ethanol ·Hexane/IPA
Chiralcel OD-R Chiralcel OD-RH Chiralcel OJ-R Chiralpak AD-RH	10um, reversed-phase type of Chiralcel OD 5um, reversed-phase type of Chiralcel OD 5um, reversed-phase type of Chiralcel OJ 5um, reversed-phase type of Chiralpak AD	(in addition to the above, amino acid derivatives)	·Buffer/ACN ·Buffer/Methanol
Chiralpak OT(+) Chiralpak OP(+) dPolymethacrylate	 	compounds possessing aromatic group	·Methanol ·Hexane/IPA

있고 naproxen을 분리하기 위해 설계되었다. 이 CSP는 다양한 종류의 키랄 화합물을 분리하는 범용성을 보이며 앞서 Chiralcel과 대응될 만큼 좋은 분리능을 갖고 있다. 또 하나의 장점은 다양한 용매에 적합하여 역상이나 순상 용매를 모두 사용할 수 있다. Whelk-O2는 Whelk-O1에 공유 결합된 3중 관능기를 갖도록 변형시킨 것이며 강한 용매에 저항성을 증가시킨 CSP이다.

Table 2. Pirkle CSP category

π -electron acceptors / π -electron donors	π -electron acceptors	π -electron donors
Whelk-O ULMO	Phenylglycine Leucine β -Gem1 α -Burk2 Pirkle 1-J	Naphthylleucine

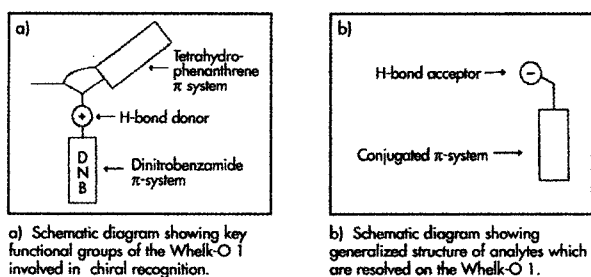
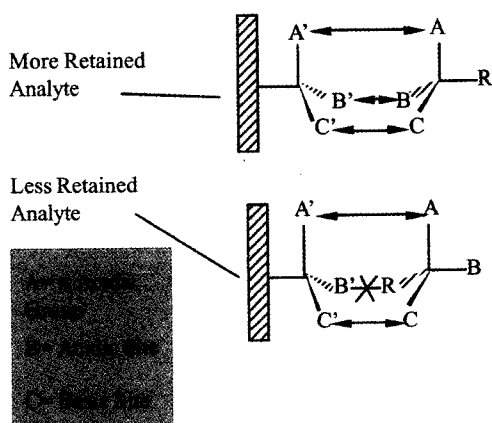


Figure 1. Three points interaction between chiral selectors and analytes.

ULMO는 최근에 개발된 Pirkle CSP이며 aryl carbinol을 분리하는데 효과적이다. Phenylglycine과 Leucine은 3, 5 DNB (dinitrobenzoyl) 유도체를 aminopropyl 실리카에 부착시킨 CSP로 π 전자를 받아들인다. π 전자를 제공하는 Naphthylleucine은 C11 실리카에 leucine의 N-(2-naphthyl) 유도체를 에스터 결합 반응으로 CSP로 아미노산의 DNB 유도체를 분리한다.

다당류 CSP와 Pirkle CSP 외에 기타 CSP로 Table 3에 수록한 종류가 있다. Kromasil CHI-TBB는 C2 대칭형 공유결합으로 tartarate를 안정성 있게 유지하며 NSAIDS (Nonsteroid antiinflammatory drug) 분리에 자주 사용된다.

Cyclodextrin CSP는 화학적 안정성이 좋고 용량이 큰 반면 Cyclodextrin 내부 공간에 들어갈 수 있는 크기의 키랄 화합물만이 분리된다. 단백질 CSP는 범용성과 우수한 분리 효율로 분석용 칼럼으로 추천되나 용매에 대한 제한성과 용량이 작아 대규모 분리에는 부적합하다.

Table 3. Other chiral selectors

Chiral Selector	Solvents	Trade name	Supplier
O,O'-bis(4-tertbutylbenzoyl)-N,N'-diallyl-L-tartardiamide	Hexane / 2-propanol	Kramasil CHI-TBB	Akzo-Nobel
Cyclodextrin	Water /MeOH	Cyclose	Chiralsep
Protein (human serum albumin)	Water	Chiral HSA	Regis
18-Crown-ether CTA (cellulose triacetate)	Universal Hexane / propanol	ChiroSil	Regis Daicel, Merck

Table 4. Chiral CSP's Used in SMB

CSP	Purified substance	Reference
Chiralpak AD	Troeger base	23
TA	Praziquantel	24
Chiralcel OD	1-Phenyl ethanol	11
Chiralcel OD	Guafenesin	25
Chiralcel OJ	Formoterol	25
Chiralpak AD	EMD53986	26
Chiralspher	Oxazolidinone	27
Chiralpak AD	SB 202026	28
Chiralpak AD	Tramadol	29
Chiralcel OF	DOLE	30
CTA	Sandoz-epoxide	31
CTA	Troeger base	32
3,5-dinitrobenzoyl phenylglycine bonded silica	binaphtol	33
Chiralcel OD	1-phenoxy-2-propanol	34

SMB용 CSP

제조용으로 사용될 수 있는 CSP의 특성을 선택도, 용량 인자. 안정도면에서 살펴보면 다음과 같다.

선택도 (Selectivity)

분석용 키랄 HPLC 칼럼은 다양한 키랄물질을 잘 분리하기 위해 크로마토그램상에서 큰 선택도를 시판 회사에서 선호한다. 그러나 SMB에서는 1개의 특정물질에 대해 선택도가 1.3~2.0에 있도록 하는 CSP가 선택된다. 너무 큰 선택도는 과량의 용매를 필요로 하며 경제적이지 않다. 따라서 SMB용 CSP는 분리 대상물질이 정해지면 CSP를 맞춤으로 합성하려는 연구가 진행되고 특수하게 설계된다. Pirkle 연구진은 대상 키랄체를 분리하기 위해 그 키랄물질을 실리카에 부착시키고 다수의 키랄물질을 분리하였다

(18). 이들 중 잘 분리되는 키랄물질을 선택하여 새로운 정지상을 합성하고 HPLC용 분리 CSP를 개발하였다. 이 정지상은 대상 키랄물질을 잘 분리하였다. 2번째 다른 접근법은 키랄 선택성 물질군을 선택하여 CSP를 다수 합성하고 분리 대상물질을 가장 잘 분리하는 CSP를 선택하는 방법이다. 이때는 실험회수가 아주 많아지므로 자동화된 스크리닝 방법이 필요하다(19).

용량인자 (Saturation capacity)

단위 CSP g당 흡착되는 g enantiomer의 값이 용량인자이다. 분석용 키랄 HPLC 카럼은 보통 선형 흡착등온선상에 조업되며 선택도만 크면 HPLC 칼럼의 역할을 잘 한다고 생각된다. 그러나 제조용 칼럼에서는 많은 양의 키랄 물질이 주입되어 생산성을 높이는 것이 필요하다. 이때 키랄물질의 용매에 대한 용해도를 높여 용량인자가 큰 CSP가 채

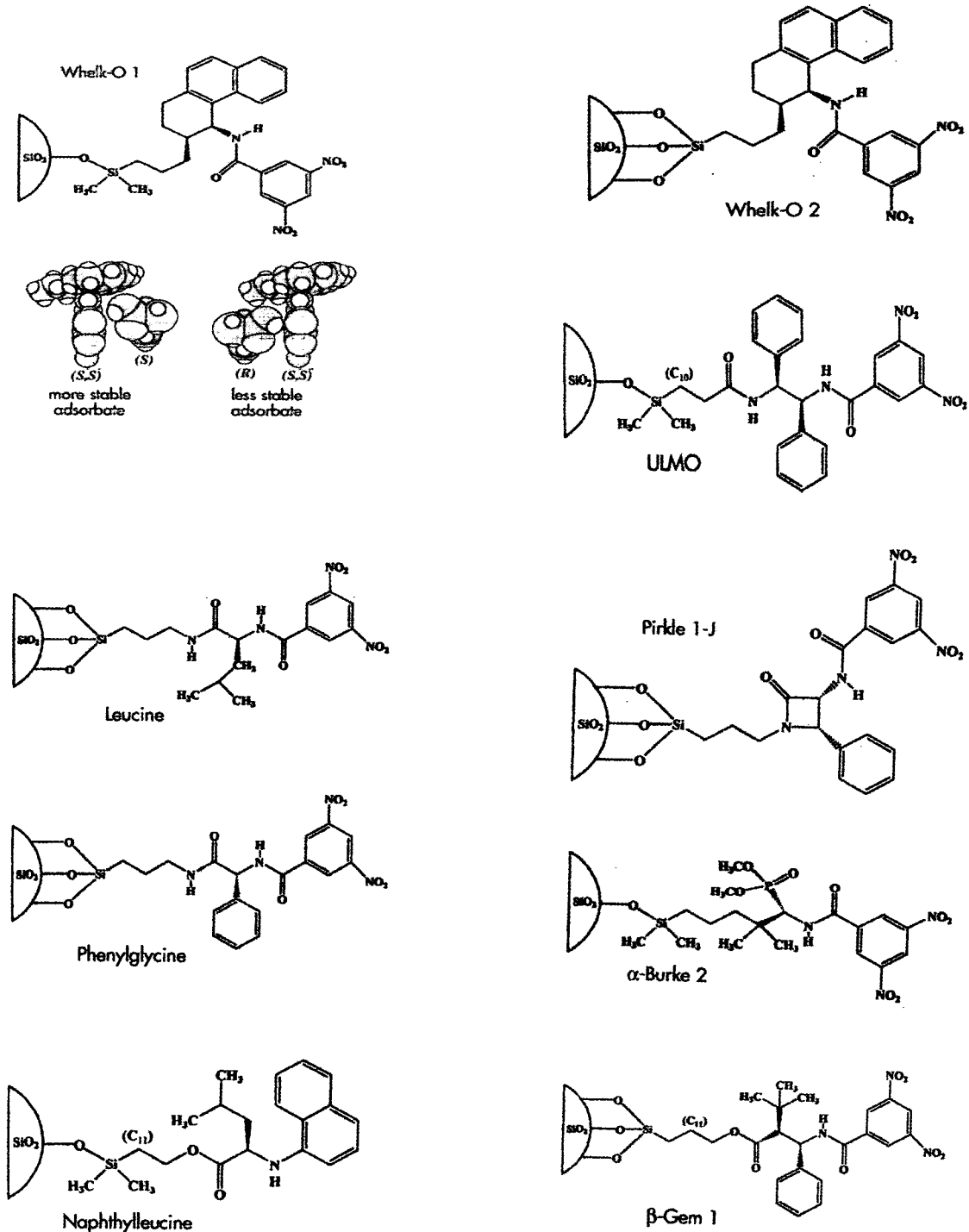


Figure 2. Pirke chiral selectors.

워진 칼럼에 키랄물질을 주입하는 것이 중요하다. 용매군을 여러개 정하고 분리대상 키랄물질에 대해 최고의 용해도를 제공하는 용매를 선택한 후 CSP를 선택하는 것이 일반적인 SMB용 CSP 선택요령이다. 선택된 CSP는 큰 용량인자를 물론 가져야 한다.

안정도 (mechanical and chemical stability)

SMB의 경제성은 분리속도에 크게 좌우된다. 분리 속도를 높이기 위해 컬럼에 공급되는 용매의 유량이 커야하며 컬럼 내의 압력은 상승한다. 현재 SMB 컬럼은 대개 스텐레스틸 재질로 고압으로 조작되며, 컬럼 충전도 동적축방향압축 (dynamic axial compression, DAC) 방법으로 이루어진다. DAC 방법은 컬럼이 오래 사용됨에 따라 발생하는 컬럼 상부의 dead zone을 줄여주어 SMB에 사용되는 다수의 컬럼의 동일성을 보증한다. 컬럼의 k' (용량인자)를 측정하여 k' 의 값의 상대표준편차가 2% 이내로 보고되고 있다(20).

기계적 안정도 외에 화학적인 CSP의 안정도도 고려하여야 한다. CSP 중 0.1% 정도의 물에도 분리도의 변화가 일어나는 것이 있다고 보고되고 있다(21). 주입액 중의 어떤 불순물은 CSP에 강하게 결합하고 제거되지 않으므로 컬럼에 축적되고 선택도에 변화가 생긴다(22). 따라서 주입액의 불순물을 철저히 조사할 필요가 있다.

키랄 CSP를 사용한 SMB 공정의 검토

SMB를 이용한 키랄 분리 공정을 Table 4에 정리하였다. 다당류 CSP가 가장 많이 사용됨을 볼 수 있다. 이는 Daicel 사의 벌크 CSP의 공급능력과 관련성이 있어 보인다. 초기의 CTA를 이용한 저압의 SMB 공정개발에서는 컬럼의 신뢰성이 문제가 되었고, 컬럼 내에서 생긴 공간이 SMB 각 컬럼의 효율을 변화시키며, SMB의 분리능의 저하를 가져온다고 우려가 표명되었다. CTA는 결정형 셀룰로스로 실험실 규모의 SMB에서 많이 사용되었으며 Daicel사의 CSP를 사용한 SMB 실험은 유럽 제약회사와 관련된 연구과제에서 회사기밀에 저촉되지 않는 범위에서 발표되었다.

감 사

본 총설작성은 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Subramanian, G. (2001), Chiral Separation Techniques, New York, Wiley-VCH.
- Francotte, E. (1994), Contribution of preparative chromatographic resolution to the investigation of chiral phenomena, *J. Chroma. A.* **666**, 565-601.
- Guiochon, G., S. Golshan Shirazi, and A. Katti (1994), Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography, Boston, Academic Press.
- Ruthven, D. M. and C. B. Ching (1989), Counter-current and simulated counter-current adsorption separation processes, *Chem. Eng. Sci.* **44**, 1011-1038.
- Juza, M., M. Mazzotti, and M. Morbidelli (2000), Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology, *Trends Biotechnol.* **18**, 108-118.
- Johnson, J. A. and R. G. Kabza (1993), SORBEX: Industrial-scale adsorptive separation, In Preparative and Production Scale Chromatography, G. Ganetos and P. E. Barker Eds., Marcel Dekker, New York.
- Ganetos, G. and P. E. Barker (1993), Preparative and Production Scale Chromatography Marcel Dekker, New York.
- <http://www.fda.gov/cder/news/thalidomide.htm>
- <http://www.polymer.or.kr/suite/conference>
- Pirkle, W. H. and B. C. Hamper (1991), The direct preparative resolution of enantiomers by liquid chromatography on chiral stationary phases, In Preparative Liquid Chromatography, B. A. Bildingmeyer Ed., Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Negawa, M. and F. Shoji (1992), Optical resolution by simulated moving-bed adsorption technology, *J. Chromato. A.* **590**, 113-117.
- Nicoud, R. M. (1993), A packing procedure for high flow rate and high stability columns using cellulose triacetate, *LC - GC Int.* **6**, 636-637.
- Zhang, Y., D. R. Wu, D. B. Wang-Iverson, and A. A. Tymiak (2005), Enantioselective chromatography in drug discovery, *Drug Discovery Today*, **10**, 571-577.
- <http://pubs.acs.org/ceu/coverstory/8224/8224chiral.html>
- Shulte, M. and J. Strube (2001), Preparative enantioseparation by SMB chromatography, *J. Chromato. A.* **906**, 399-416.
- http://choongin.com/211d_2a.htm
- <http://www.registech.com>
- Pirkle, W. H., D. W. House, J. H. Finn (1980), Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases, *J. Chromato.*, **192**, 143-158.
- Job, G. E., A. Shvets, W. H. Pirkle et al. (2004), The effects of aromatic substituents on the chromatographic enantioseparation of diarylmethyl esters with the Whelk-O1 chiral stationary phase, *J. Chromato. A.* **1055**, 41-53.
- K. Muhlbachler., A. Jupke, A. Seidel-Morgenstern, H. Schmidt-Traub, and G. Guiochon (2002), Effect of the homogeneity of the column set on the performance of a simulated moving bed unit: II. Experimental study, *J. Chromato. A.* **944**, 3-22.
- Application guide, Daicel Chemical Ltd.
- Nicoud, R. M. (1999), The separation of optical isomers by SMB chromatography, *Pharmaceutical Technology Europe*, March, 0330.
- K. Muhlbachler., K. Kaczmarek, A. Seidel-Morgenstern, and G. Guiochon (2002), Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Troeger base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase, *J. Chromato. A.* **955**, 35-52.
- Ching, C. B., B. G. Lim, E. J. D. Lee, and S. C. Ng (1993), Preparative resolution of praziquantel enantiomers by simulated counter-current chromatography, *J. Chromato. A.* **634**, 215-219
- Francotte, E. and P. Richert (1997), Applications of simulated moving-bed chromatography to the separation of the enantiomers of chiral drugs, *J. Chromato. A.* **769**, 101-107
- Schulte, M., R. Ditz, R. M. Devant, J. N. Kinkel, F. Charton (1997), Comparison of the specific productivity of different chiral stationary phases used for simulated moving-bed chromatography, *J. Chromato. A.* **769**, 93-100.
- Seebach, D., M. Hoffmann, A. R. Sting, J. N. Kinkel, M. Schulte, Kusters, E. (1998), Chromatographic resolution of synthetically useful chiral glycine derivatives by high-performance liquid chromatography, *J. Chromato. A.* **796**, 299-307.
- Guest, D. W. (1997), Evaluation of simulated moving bed chromatography for pharmaceutical process development, *J. Chromato.*

- A. **760**, 159-162.
29. Cavoya, E., M. F. Deltenta, S. Lehoucq, Miggianno, D. (1997), Laboratory-developed simulated moving bed for chiral drug separations, Design of the system and separation of Tramadol enantiomers, *J. Chromato. A.* **769**, 49-57.
 30. Nagamatsu, S., K. Murazumi, S. Makino (1999), Chiral separation of a pharmaceutical intermediate by a SMB process, *J. Chromato. A.* **832**, 55-65.
 31. Pais, L. S., J. M. Loureiro, A. E. Rodrigues (1998), Separation of enantiomers of a chiral epoxide by simulated moving bed chromatography, *J. Chromato. A.* **827**, 215-233
 32. Zenoni, G., M. Pedferri, M. Mazzotti, and M. Morbidelli (2000), On-line monitoring of enantiomer concentration in chiral simulated moving bed chromatography, *J. Chromato. A.* **888**, 73-83.
 33. Pais, L. S., J. M. Loureiro, A. E. Rodrigues (2000), Chiral separation by SMB chromatography, *Sep. Purif. Technol.*, **20**, 67-77.
 34. Heuer, C., E. Kuster, T. Plattner. A. Seidel-Morgenstern (1998), Design of the simulated moving bed process based on adsorption isotherm measurements using a perturbation method, *J. Chromato. A.* **827**, 175-191.