

고속역류크로마토그래피 기술을 이용한 생리활성 물질의 분리 및 정제

정동수 · 신현재^{1*}

신한과학주식회사 BPC 사업부, ¹조선대학교 생명화학공학과

Isolation and Purification of Bioactive Materials Using High-Performance Counter-Current Chromatography (HPCCC)

Dong Su Jung and Hyun-Jae Shin^{1*}

BPC Department, Shinhan Science Corporation, Seoul, Korea

¹Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, 375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-759

Abstract Many successive liquid-liquid extractions occur enabling purification of the crude material to occur. In high performance counter-current chromatography (HPCCC), crude material is partitioned between two immiscible layers of solvent phases. The stationary phase (SP) is retained by hydrodynamic force field effect and the mobile phase (MP) is pumped through the column. Purification occurs because of the different solubility of the components in the liquid mobile and stationary phases. There are many key benefits of liquid stationary phases such as high mass and volume injection loadings, total sample recovery, and easy scale-up. Many researchers showed that predictable scale-up from simple test is feasible with knowledge of the stationary phase retention for the planned process scale run. In this review we review the recent advances in HPCCC research and also describe the key applications such as natural products and synthetics (small or large molecules).

Keywords: high performance counter-current chromatography (HPCCC), liquid-liquid extraction, stationary phase, mobile phase, sample recovery, scale-up

서 론

다양한 발효대사물질 (metabolite)의 혼합물 혹은 화학 합성물질의 라이브러리로부터 인체에 유용하고 상업적으로 부가가치가 높은 생리활성물질을 분리, 정제하여 산업적으로 이용하기 위해서는 효율적이고 경제적인 분리정제공정이 필수적이다. 특히 고부가가치 물질의 경우에는 순수한 형태로 빠른 시간에 분리 정제할 수 있는 기술이 반드시 요구된다고 할 수 있다. 지금까지 이러한 목적으로 많이 사용되어 온 것이 분취용 고속액체크로마토그래프 (preparative high-

performance liquid chromatograph, Prep HPLC)인데, 최근 이러한 Prep HPLC를 대체할 수 있는 신기술로서 고속역류크로마토그래피 (high-performance counter-current chromatography, HPCCC)가 각광을 받고 있다 [1,2]. 이 총설에서는 CCC의 일반적인 이론을 간략히 정리하고 최신 HPCCC 장비의 적용 예를 살펴보고 그 응용분야로서 생리활성물질의 분리 및 정제와 관련된 연구동향을 정리하고자 한다.

고속역류크로마토그래프의 개관

고속역류크로마토그래피 (high-performance counter-current chromatography, HPCCC)는 고체 지지체를 필요로 하는 일반적인 크로마토그래피와는 달리 고정상과 이동상이 모두 액상으로 이루어진 분리기술이다. 여기서 역류크로마토그

*Corresponding author

Tel: +82-62-230-7518, Fax: +82-62-230-7226

e-mail: shinhj@chosun.ac.kr

래피 (counter-current chromatography, CCC)라는 이름은 counter-current distribution (CCD)과 liquid chromatography (LC)라는 두 가지의 고전적인 분리방식으로부터 유래된 것으로서 양쪽의 장점이 혼합된 분리방법을 지칭한다 [3,4]. 이 크로마토그래피 장치는 액상 중에서 하나를 고정된 상태로 놔두고 (stationary phase) 다른 액상을 여기에 펌프로 공급하여 이동상 (mobile phase)으로 사용한다. 기존의 HPLC는 고체상의 충전물질로 채워진 컬럼내부로 액상의 이동상을 흘려보내고 고체상의 고정상과 이동상 사이의 용질간 친화성 차이를 이용하여 물질을 분리시키는데 반해서, CCC는 서로 섞이지 않고 혼합 후 2개의 층으로 분리될 수 있는 용매이면 어느 것이나 혼합하여 분리된 2개의 층중 한 층을 이동상으로, 다른 층을 고정상으로 하여 고체 지지체 없이 물질을 분리 정제할 수 있는 기법이다 (Fig. 1). 현대적인 CCC의 개척자들인 Ito 박사과 공동연구자들은 분산액 중에서 입자를 분류하는 장치 혹은 용액 중에서 용질을 분리하는 장치를 용매시스템 내에서 구현하였다. 즉 원심력을 이용하는 coil planet centrifuge라고 불리는 이 장치는 미국에 있던 Ito에 의하여 무척 풍성한 결과가 얻어졌다 [5,6]. 그가 진행한 연구결과 중 일부는 상업화 되었으며 상업화되지 않은 많은 다양한 장치도 개발되었다. 그 외에 여러 다양한 연구자들이 CCC와 관련된 연구를 수행하여 현재 다양한 시스템이 상업적으로 이용이 가능하다.

특별한 고가의 충전제와 이와 관련된 설비 없이 용매만을 이용하여 물질을 높은 순도로 분리해낼 수 있는 역류크로마토그래피를 수행함에 있어 가장 먼저 부딪치는 문제는 최적의 분획계수 ($K_D = C_S/C_M$, K_D : 분획계수, C_S : 고정상에서의 성분농도, C_M : 이동상에서의 성분농도) 를 나타내는 용매를 선정하는 일이다. 실제 역류크로마토그래피를 수행함에 있어서 적절한 분획계수, K_D 값의 범위는 0.2-5 범위이다 [7]. 분획계수 값이 너무 크면 물질들이 충분히 분리되지 않고 이동상과 함께 떨어 나오며 너무 작은 경우에는 체류시간이 길어져 피크의 폭이 넓어지고 분리효율이 낮아진다.

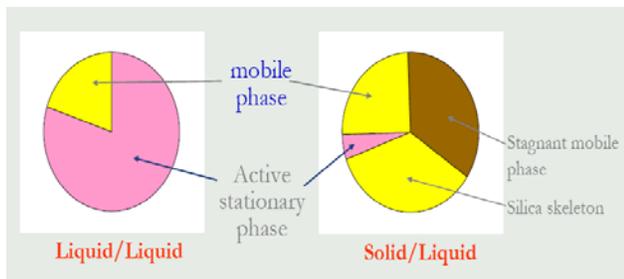


Fig. 1. The difference of mobile and stationary phase between liquid/liquid and solid/liquid chromatography.

고정상이 액체이면 가질 수 있는 장점으로는 high injection loadings, improved sample solubility, reproducibility and ease of scale-up, new elution strategies, total sample recovery, little or no sample preparation 등이 있다. CCC장치의 전체

적인 기기구성은 pump, injector, CCC본체, detector, fraction collector로 구성되어 있어서 HPLC와 유사하나, 물질의 분리정제가 이루어지는 컬럼이 장착되어 있는 본체의 형태가 크게 다르다 (Fig. 2).

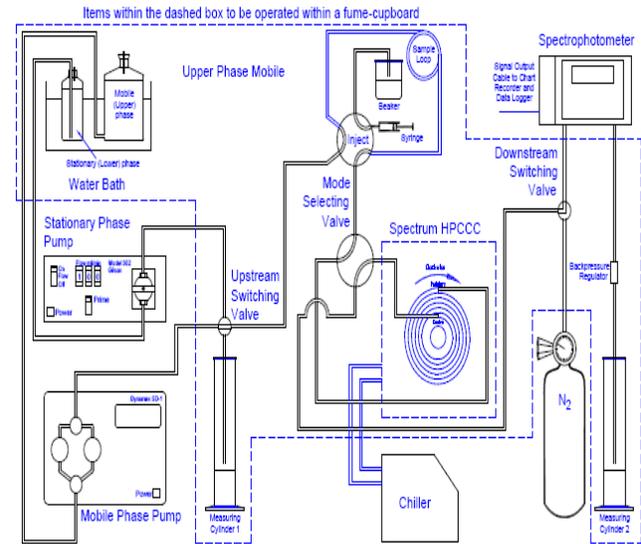


Fig. 2. A. Full installation diagram for HPCCC instrument (Dynamic Extractions, Spectrum-HPCCC Model).

CCC장치의 컬럼은 원통형의 홀더에 polytetrafluoroethylene (PTFE) 튜브가 여러층으로 감겨있는 다층방식으로 되어있다. CCC는 컬럼에 작용하는 중력장이 일정하게 작용하는 정적평형시스템 (hydrostatic equilibrium system, HSES 형식) 과 컬럼자체가 회전하여 여러 방향으로 다양하게 중력이 작용하는 동적평형시스템 (hydrodynamic equilibrium system, HDES 형식)으로 구분할 수 있다. HSES 형식의 CCC로는 droplet CCC, rotation CCC, centrifugal partition chromatography 등이 개발되었으며, HDES로는 combined flow-through coil planet centrifuge와 high-speed CCC (HSCCC) 혹은 high-performance CCC (HPCCC)가 상업화 되어 있다[8-10].

CCC 컬럼과 분리 메커니즘

CCC는 일련의 분배과정을 한 개의 튜브 내에서 연속적으로 일어나도록 고안된 시스템으로 CCC의 컬럼은 polytetrafluoroethylene (PTFE) 튜브가 다층으로 감겨있는 원통형의 홀더 3개가 서로 기어를 통해 물려있으며, 홀더가 회전과 공전을 통해 튜브의 꼬임을 방지하는 rotary seal-free flow centrifuge 시스템으로 되어있다. 컬럼 (column)이라고 하는 분리 기구를 제외하면 CCC와 HPLC는 동일한 기술을 사용한다고 할 수 있다. 역상 HPLC (reverse phase HPLC)에서는 고정상이 실리카에 결합된 유기물단 (organic moiety) 이 수용성 이동상 물질에 의해서 용매화 (solvated)된다.

이때 전체 컬럼의 부피에 대한 고정상의 부피비율은 고작 5%이하이며, 이 비율은 이동상의 조성이 변경된다 할지라도 그리 크게 변화하지 않는다. 반면 CCC는 실리카 대신에 강한 중력장에 의해 분리되는 자유로운 용매가 고정상이 되며 이 고정상의 부피비율은 20-30%에 이른다. 즉 고체담체에 결합된 유기관능기 대신에 물과 섞이지 않는 hexane 같은 유기용제가 고정상으로 사용되는 것이다. 즉, 물과 유기용매가 섞인 무거운 액체방울이 가벼운 hexane의 고정상을 통과하는 형태가 된다 (Fig. 3). 대부분의 경우 실제 조업조건에서 고정상의 부피비율은 50-80%에 이른다.

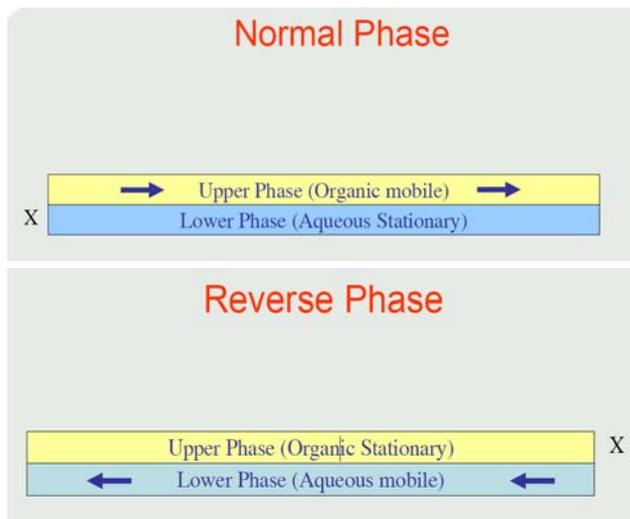


Fig. 3. Defining normal and reverse phase operations in CCC.

Counter-current Distribution (CCD)

Counter-current distribution (CCD)는 CCC의 초기형태로서, 외형상 일렬로 나열된 유리관으로 이루어져 있으며, 두 액체 중 비중이 더 가벼운 액체는 관을 통하여 다음 funnel로 옮겨질 수 있도록 제작되었다. 즉 일렬로 배열된 각각의 액액추출 funnel들에서 동시에 분리가 일어나는 구조로 이루어진 것이다. Craig가 고안한 이 CCD 기술은 분리기술에 있어서 획기적인 발상이었으며, 1940년대 당시에는 대단히 많은 관심을 받는 기술이었다 [4]. 초창기 CCD machine은 비교적 부피가 커서 많은 양의 용매를 필요로 했으며, 100여 개의 funnel로 이루어져 있었다. 각각의 funnel은 수동으로 조작하였으며 분리하려는 샘플은 separatory funnel 안에서 분리되었다. 이때 분리는 기본적으로 two-phase solvent system내에서 이루어졌으며 이때 비중이 더 큰 lower phase는 고정상으로 비중이 더 작은 upper phase인 용매는 이동상으로 사용한다. 일반적으로 분리하려는 물질의 distribution ratio의 차이가 클수록 분리능은 높아진다. 만약 분리 하려는 물질들의 distribution ratio가 거의 비슷할 경우 이를 분리하기 위해서 더 많은 수의 튜브 (separation funnel)가 필요하다. 오늘날 Craig 기계는 최근 발명된 chromatography

장치들의 편리함과 효능에 밀려 거의 사용되지 않고 있으나 counter-current extraction 기술의 원리 및 개념의 소개에는 매우 적합하다고 할 수 있다.

Droplet Counter-Current Chromatography (DCCC)

1960년대 말 미국국립보건원 (NIH)에서 Ito와 그에 동료들이 droplet counter-current chromatography (DCCC) 장치를 제조하였다 [5,11-12]. DCCC 장치 역시 CCD처럼 중력을 이용하여 고정상을 정지시켰기 때문에 DCCC의 유속은 매우 느렸으며, 이런 느린 유속 때문에 biphasic solvent system은 작은 물방울형태로만 이동시키게 되는 한계에 이르게 된다 (Fig. 4).

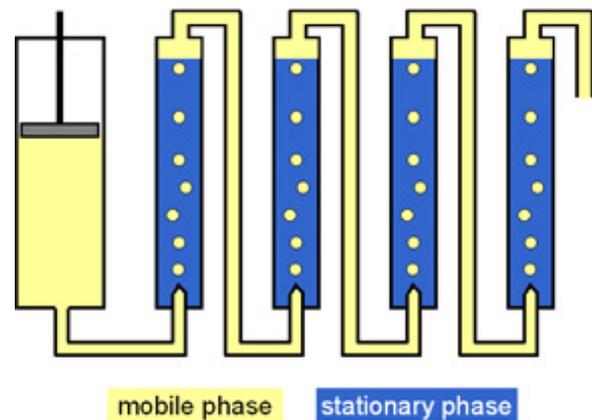


Fig. 4. Schematic diagram of DCCC's operation.

HPCCC의 분리이론 (separation theory)

HPCCC의 분리효율은 이론단수 (theoretical plate number, N)와 분리능 (resolution, Rs)으로 나타낼 수 있으며 구체적인 식은 다음과 같다 [1].

$$N = 5.54 (V_R/W_{h/2})^2 = 5.54 (d_R/d_{h/2})^2$$

N : 이론단수.

V_R : 피크에 해당하는 용매부피.

$W_{h/2}$: 1/2 피크높이일때 그 피크폭의 길이.

$d_{h/2}$: $W_{h/2}$ 에 해당하는 크로마토그램상의 거리.

d_R : 피크에 해당하는 크로마토그램상의 거리.

$$R_s = 2(t_2 - t_1)/(W_{b1} + W_{b2}) = 2\Delta t/(W_{b1} + W_{b2}) = 2\Delta V/(W_{b1} + W_{b2})$$

R_s : 분리능.

t_1, t_2 : 피크에 해당하는 시간.

W_{b1}, W_{b2} : 4σ 에 해당하는 피크의 폭.

일반적으로 높은 크로마토그래피 효율이란 물리단수와 이론단수를 근접시킴으로서 달성되는데, 이를 위해서는 세 가지 단계가 필요하다. 우선 두 상이 잘 혼합되어 평형상태에 도달해야 한다. 즉 용질이 두 상에 녹을 때 이론적 분배계수의 값에 매우 근접할 때까지 용해되어야 한다. 이 단계는 표면적이 넓을수록 쉽게 달성된다. HPLC에서는 고체담체로 사용하는 실리카의 크기를 무척 줄이고 공극을 최대한 넓혀 이것을 달성할 수 있다. 다음으로 두 상은 반드시 상분리가 되어야 하며 이것은 강한 원심력으로 달성될 수 있다. 최종 단계는 이 이동상을 다음 단계의 물리단으로 이동시키는 것이다. HPLC나 HPCCC의 효율에 영향을 미치는 많은 변수 가운데 가장 중요한 것 중 하나는 유속이다. van Deemter plot은 이론단수 혹은 이론단에 해당하는 높이 (height equivalent to a theoretical plate, HETP)가 유속의 함수로서 나타낸다. HSES에 기준을 둔 장비의 경우 van Deemter type의 plot은 최대값을 나타내며 함수 그래프의 형태는 위로 볼록하다. 따라서 보다 효율적인 분리를 위해서는 높은 유속을 유지하는 것이 필수적이다 [2]. 분리능 (resolution, R_s) 역시 분리 효율의 함수로서 이동상부피의 함수이기도 하다. 대부분의 경우 CCC 유속의 증가는 R_s 의 감소를 가져온다. 한편 CCC는 동일한 이상분배용매시스템 (two-phase partition solvent system)을 사용하여 순상 (normal phase) 혹은 역상 (reverse phase)의 형태로 조업이 가능하다. 이러한 특징은 CCC를 많은 복잡한 화합물이 함유된 천연물질 혹은 케미컬 라이브러리에서 원하는 유용물질의 분리를 좀 더 쉽게 구현할 수 있게 한다. 따라서 극성과 비극성인 물질을 한 번의 작업으로 회수할 수 있게 되며 고정상의 비가역적인 흡착이 불가능하다. CCC의 가장 큰 장점은 컬럼 전체 부피에 대한 고정상의 비율이 HPLC에 비해 무척 크다는데 있다. 이러한 큰 비율은 두 가지 중요한 결과를 낳게 된다. 우선, 전체 부피가 동일하다고 가정할 때 CCC 컬럼의 용량이 HPLC에 비하여 무척 크다는 것이다 (Table 1). CCC에서 과부하 (overloading)이라는 말은 의미가 없다. 왜냐하면 제한요인이 주입량이 아니라 샘플의 주어진 고정상과 이동상에 대한 용해도이기 때문이다. 이점 때문에 CCC는 분취용 HPLC (prep-scale HPLC) 보다 훨씬 우수하다는 평가를 받으며, 분취용 크로마토그래프로서 무척 각광을 받고 있다 [13-15]. 일반적으로 같은 컬럼부피를 가질 때 시료가 고체담체에 흡착이 없어 시료의 완전회수가 가능하고 사용되는 고체 담체가 없어 용매비용만 들어가므로 조업 비용이 무척 저렴하다. 물론 CCC의 최초 장치비용은 무척 많이 소요된다고 할 수 있다. 두 번째로서 두 피크사이의 분리도 (resolution)에 차이가 있다. V_m/V_s (이동상부피/고정상부피)의 비율은 HPLC가 무척 크며 [16] CCC는 이 값이 무척 작다 (고정상이 50-80%일 때 그 값은 0.25-1). 이 의미는 주어진 분리인자와 분배계수 하에서 주어진 이론 단수가 같다면 CCC의 분리능이 HPLC에 비하여 훨씬 우수하다는 것이다. 즉 주어진 분리능을 얻기 위해 필요한 이론단수가 더 적어도 된다는 것이다 [16].

Table 1. Operation variables of HPCCC (DE, Spectrum-HPCCC Unit)

System variables	Operation conditions
System	HSES or HDES
Column	ID 0.8 mm, OD 1.6mm, PTFE material
Column volume	18 mL - 120 mL (from analytical to preparative)
Solvent system	2 or 3 components
Column rotating speed	200 - 1,600 rpm
Mobile phase rate	0.1 - 10 mL/min

CCC의 기본 시스템

Ito는 CCC를 두 가지의 기본 시스템으로 구분하였다. 첫 번째는 정적평형시스템 (hydrostatic equilibrium system, HSES)이고 다른 하나는 동적평형시스템 (hydrodynamic equilibrium system, HDES)이다 [6]. 정적평형시스템에서 컬럼은 고정된 스프링처럼 말린 튜브형태이며 이 중력은 코일의 어떤 위치에서도 동일하게 작용한다. 동적평형시스템은 감긴 코일튜브의 통이 축을 따라 회전하면서 “중력장에 더해 혼합을 위한 별도의 회전력”을 받게 되어 코일의 위치에 따라 받는 전체 힘이 달라진다. 이것을 아르키메데스의 나선양수기효과라 한다. 두 경우 모두 일정한 중력장이 여분의 회전축 주위로 회전함으로써 얻어진다. 이 축은 코일의 축과 평행일 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. HDES는 HSES보다 훨씬 좋은 혼합을 보이므로 나중에 고정상과 이동상을 분리하는 공정에서 유리하다. HSES의 효율을 증대시키기 위해 초기에는 나선형 모양의 컬럼을 사용하였으나 최근에는 나선형형태의 컬럼을 사용하지 않는다. 이 시스템을 활용한 두 가지 가장 많이 알려진 모델이 droplet counter-current chromatography (DCCC)와 centrifugal partition chromatography (CPC)이다. 한편 HDES는 다양한 형태가 존재한다. 두 축이 존재하므로 축간의 위치에 따른 변화와 두개의 회전축의 속도와 회전 반지름의 비율 등에 따라 상이하게 된다. Ito는 세부형태를 I, L, J, X type으로 분류하였고 이 type간의 다양한 결합형태가 존재하게 된다. HDES 시스템을 활용한 모델들은 원래 나선모양의 컬럼을 고수하고 있다. 가장 잘 알려진 것이 synchronous scheme J의 기준에 따라 구성된 high-performance (or high-speed) counter-current chromatograph (HPCCC)이다. Type-J multilayer coil planet centrifuge를 사용한 표준 HPCCC에 사용되는 컬럼의 모양과 회전하는 방향에 대한 그림을 아래에 나타내었다 (Fig. 5). 그림에서 보는 것처럼 두 개의 기어가 맞물려 돌아가면서 고유한 운동을 나타내는데, 회전축 두 개가 동일한 각 속도로 움직이는 동시에 (synchronous) 같은 방향으로 움직인다. 최초의 기술에서 진보되어 지금은 분리 속도와 효율이 무척 향상되었다. 물론 HPLC에 비하여 속도와 효율면에서 아직 비교할만한 수준은 아니지만 CCC는 고정상의 부재, 시료의 완전한 회수, 유기용제 충전 비용의 저렴함 등 무척 많은 장점이 존재한다. HPCCC 시스템의 제조메이커로는 [1] hydrostatic 스타일의 장비 (HSES)

형태로 프랑스 Armen Instrument사의 CPC, 중국 Tauto Biotech사의 HSCCC, 영국 AECS-Quickprep사의 Quattro CCC 등이 있으며 [2] hydrodynamic 스타일의 장비 (HDES) 로서 영국 Dynamic extraction사의 HPCCC가 대표적이다.

존재할 경우에 산성용매가 (bromoacetyl-T₃) 아주 날카로운 피크를 보인다는 사실이 그것이다 [17].

CCC의 용매시스템의 선정

CCC에서 2상계 용매시스템을 선택하는 것은 HPLC에서 용출용매와 컬럼 충진제를 선정하는 것과 유사하다. 중요한 결정요소로는 시료의 극성도와 용해도, 전하상태 그리고 복합체의 형성여부이다. CCC분리의 용매최적화의 목표는 다양한 조건의 용매조합을 찾아 분배계수의 차이를 이루어 고정상과 분리 상에서 분리의 차이를 최대한 얻기 위함이다 (Fig. 6). 아주 다양한 조합의 용매조건이 여러 문헌에 다양하게 나와 있으며 이들 중 대부분은 3성분으로 이루어져 있고, 일부는 4성분 혹은 그 이상으로 이루어진 것도 간혹 있다 [6].

Type-J Synchronous Planetary Motion

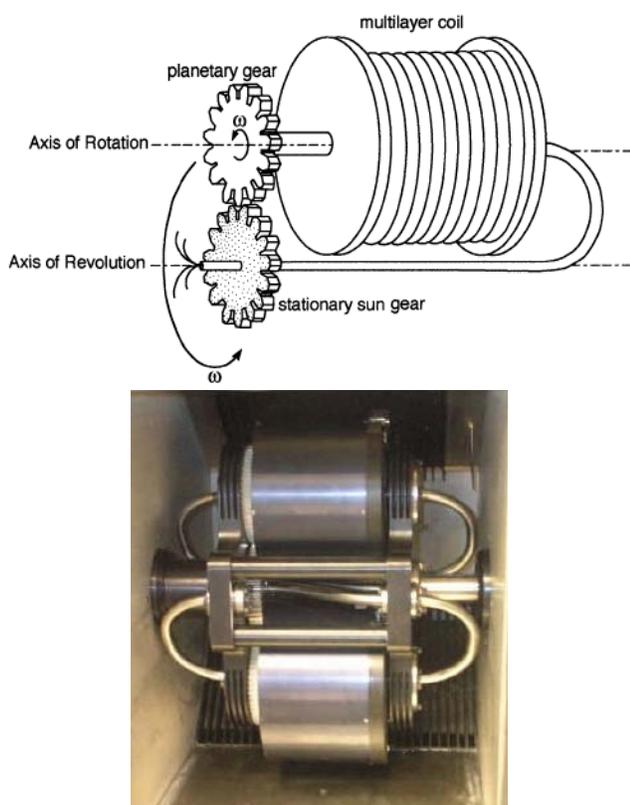


Fig. 5. Type-J planetary motion of a multilayer coil separation column. The column holder rotates about its own axis and revolves around the centrifuge axis at the same angular velocity (ω) in the same direction. This planetary motion prevents twisting the bundle of flow tubes allowing continuous elution through a rotating column without risk of leakage and contamination [2].

pH-zone-refining counter-current chromatography

이 방법은 HPCCC의 조업형태의 하나로서 이온화가 가능한 물질의 대량분리에 적합한 방법으로 알려져 있다. 조업이 성공적으로 이루어지면 아주 농축된 사각형의 피크로 물질을 용출시키면서 옆의 피크와 겹침이 거의 없다. 또한 불순물도 농축되어 나중에 고유한 pK_a 값 및 소수성 성질에 따라 용출되어 나온다. 일정 부분 displacement chromatography와 유사하며 하나 가장 큰 장점으로는 시료 주입량이 많다는 것이다. 동일한 컬럼에서 기존 HPCCC 방법보다 10배나 많은 시료주입이 가능하다. 이 방법의 메커니즘은 우연히 발견되었는데, 시료 용액에 bromoacetic acid 같은 강산이

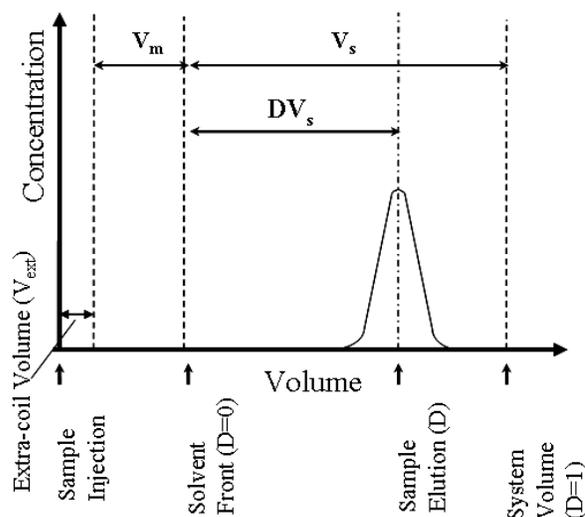


Fig. 6. Important considerations in developing a separation method. Elution time is determined by D. To keep run times to a minimum, D values should be less than 5.0. To produce the best separations, D values should differ by > 0.5 .

가용성 물질의 분류를 위해 다음과 같은 다양한 형태의 용매시스템을 고려할 수 있다. butyl alcohols/water (aqueous salt solutions or buffers), butyl alcohols/methanol or ethanol/water, butyl alcohols/formic or acetic acid/water, propyl alcohols/aqueous ammonium sulfate solutions, and ethyl acetate/water (aqueous salt solutions or buffers). 물에는 약간 녹고 알콜에도 녹는 시료의 경우 다음의 용매시스템을 고려할 수 있다. chloroform/methanol/water, chloroform/methanol/propyl or butyl alcohols/water, chloroform/formic or acetic acid/methanol/water, and butyl alcohols/water (aqueous salt solutions or buffers). 마지막으로 탄화수소나 ether에 녹는 용질을 분류하기 위해서는 다음을 고려할 수 있다. hydrocarbons/acetonitrile, hydrocarbons/methanol (5%

water), and hydrocarbons/ethanol (10-20% water). 보다 자세한 내용은 CCC의 분리와 관련된 generally useful estimate for solvent system in CCC mixture (GUESS)를 참고할 수 있다 [17-18].

CCC의 응용분야

CCC의 응용분야는 무척 다양하다. 우선 많은 것은 천연물화학분야로서, CCC가 가장 활발하게 활용되고 있다 [19-25]. CCC는 기존에 사용되던 분리정제 방법에 대한 대안으로서 가장 강력한 대안이라고 할 수 있다. 우선 고체상과 반응하는 알 수 없는 특성을 가진 화합물의 경우나 비가역적으로 흡착되는 성분이 있는 경우 혹은 쉽게 분해되는 성질을 가진 성분의 경우 CCC의 순한 환경에서 분리가 가능하다. 조추출물을 그대로 주입할 수 있다는 것은 초기 정제단계를 크게 줄일 수 있으며 시간 또한 줄일 수 있다. 특히 분취하려고 하는 물질이 안정성이 낮은 경우에는 더욱 그렇다. 이러한 이유 때문에 많은 과학자들이 액액 분배방법을 이용하여 복잡하고 다양한 원료로부터 원하고자하는 물질을 분리하는 이유가 된다. 또 다른 흥미로운 응용분야는 낮은 농도로 존재하는 미량원소 (trace element)의 농축 (enrichment)이다. CCC는 연속 추출기로서 사용이 가능하다. 유기용매상을 고정상으로 이용하여 희석된 용액으로부터 (염을 추가하여 유기용매상을 포화시킴으로서) 고정상쪽으로 미량원소를 여과할 수 있다. 특히 CCC 방법은 다른 크로마토그래피에 비해 scale-up이 수월하여 대용량 분리정제 장치로서 이용하는데 손색이 없다. 즉 mg 수준에서부터 kg수준까지 거의 1,000,000배의 양을 늘려 분리 정제하는데 큰 어려움이 없는 기술이다 [24-27]. CCC도 HPLC와처럼 gradient elution방법을 이용하여 아주 넓은 영역의 극성차이를 나타내는 시료를 분리, 정제할 수 있다. 또한 용매의 선정과 유속 및 기타 장치의 구성을 조절하여 분석시간을 효과적으로 단축시킬 수 있다. CCC의 gradient를 주는 가장 쉬운 방법은 2상계를 유지하는데 널리 사용되는 삼상액체 혼합물에 대응하는 삼상평형도 (ternary diagram)를 참고하는 것이다. 삼상계에서 널리 사용되는 기본조성은 hexane/1-butanol/water (+ 0.5% TFA)이며 물이 풍부한 쪽이 고정상이다. 고정상 (stationary phase, SP)을 비롯하여 초기 이동상 (initial mobile phase, IMP)에서 최종이동상 (final mobile phase, FMP)을 상평형도에서 계산된다. Gradient 후에 용출의 방향은 역전된다. 즉 물이 풍부한 상이 이동상이 되는 것이다. 이렇게 농도 구배를 주는 이익은 복잡한 혼합물에서 각각의 성분의 분리를 최적화할 수 있는 조성이 가능하다는 것이다. 보통 실험에서 octanol/water system을 많이 사용하기 때문에 이를 이용하면 flask test를 거치지 않고도 CCC만으로 octanol/water를 이용한 기본 분배계수 계산 (K_{ow})이 가능하다 [6,16]. 직접 사용할 수 있는 유용한 식은 다음과 같다.

$$V_r = V_w + K_{ow} \times V_o$$

V_r : the retention volume in CCC column.

V_w : volume of water in CCC column.

V_o : volume of octanol in CCC column.

이때 수용액 (물)은 mobile phase이다. 물론 octanol이 mobile phase로 사용될 수도 있다.

CCC의 조업조건

CCC의 효율에 미치는 영향에 대한 기초적인 연구결과로서 다음의 것이 있다. 컬럼의 회전속도가 증가할수록 컬럼 내에 유지되는 고정상의 양이 증가하였으며 이론단수 (N) 및 피크분리능 (Rs)이 증가하는 경향을 나타내어 컬럼의 회전속도가 HPCCC를 이용한 물질의 분리, 정제 시 매우 중요한 요소임을 알 수 있다 [4,10,25]. 이동상의 유속이 증가할수록 물질의 체류시간은 단축되나 컬럼 내에 유지되는 고정상의 양이 감소하여 분리효율이 저하되었으며 이론단수 및 피크분리능도 비례적으로 감소하여 HPCCC를 이용한 물질의 분리, 정제 시 기기의 분리용량과 분리능을 고려한 적절한 이동상 유속을 결정할 필요가 있다. 이동상의 elution 방식에 따른 컬럼 내 고정상 유지율을 측정된 결과 본 실험에서 사용한 chloroform/methanol/water 용매시스템 하에서는 상층부를 이동상으로 선택한 경우 tail쪽에서 head 쪽 방향, 하층부를 이동상으로 택한 경우는 head에서 tail 쪽 방향이 효과적인 elution 방향이라고 제안할 수 있다. 용매시스템의 pH가 2.0에서 10.0으로 증가할수록 컬럼 내 고정상의 유지율은 각 73.8%에서 68.9%로 감소하는 경향을 나타내었다. 용매시스템의 상층과 하층부 사이의 계면장력은 계속 증가하여 pH 8.0에서 최대로 증가한 후에 pH 10.0에서 감소하였다. 따라서 용매시스템의 pH를 적절히 조절하여 분리하고자 하는 물질의 분획계수를 쉽게 조절할 수 있음을 알 수 있었다 [28]. 용매시스템의 염농도 (예, KCl)가 HPCCC의 분리효율에 미치는 영향을 알아본 결과 KCl의 농도에 따른 컬럼 내 고정상 유지율 변화 및 용매시스템의 계면장력에는 크게 영향을 미치지 않았다. 용매시스템의 극성에 따른 분획계수의 변화는 blending solvent인 methanol 함량의 증가로 인하여 용매시스템의 극성차이가 감소함에 따라 상하층부에 대한 물질의 친화성 차이가 감소하여 분획계수 값이 1에 근접하는 경향을 나타내었다 [28]. 최근 Sutherland의 연구결과에 따르면 HPCCC가 사실은 그리 빠른 속도로 분리되는 방법이 아니라는 편견을 타파하기 위하여 CCC 컬럼내의 혼합을 최대한으로 늘려 용량 (throughput)을 증대시키는 결과를 발표하였다. 즉 높은 원심력을 유지함으로써 높은 이동상 유속에서도 고정상을 잘 보유할 수 있도록 하였다. 또한 기존 분석장치보다 (1 mg/min) 1,000배나 용량이 장치로 (1 g/min 혹은 0.5 kg/day) 스케일 업이 가능함도 보고하였다 [25-30].

CCC를 이용한 천연물 분리

CCC는 이미 은행잎으로부터 혈류개선 효능이 우수한 flavoglycoside의 대량분리에 매우 효과적인 것으로 나타났다 [31-32]. 이상계 용매시스템과 HPCCC를 이용하여 인삼으로부터 생리활성물질인 saponin을 대량 분리 농축하였다 [33]. 용매조성별 인삼 saponin의 분배계수에 따른 인삼 saponin 분리에 적합한 용매시스템은 chloroform/methanol/water (40/39/21, v/v/v)로 결정되었으며 HPCCC의 작동조건은 chloroform/methanol/water 용매시스템의 하층부를 이동상으로 한 head to tail mode에서 이동상의 유속 5 mL/min, 인삼추출물 injection량 200 μ L, 컬럼회전속도 800 rpm의 조건이 적합한 것으로 판단된다. 이러한 조건하에서 분리된 인삼 saponin의 양은 550.7 μ g으로 HPCCC에 주입한 인삼추출물 200 μ L중에 존재하는 총 saponin의 양 864.5 μ g에 비교하여 전체수율은 63.6%로 나타났다 [21]. 최근 신규 사포닌을 분리하는 연구로서 prep HPLC와 HPCCC를 결합하여 사용한 보고에 따르면 n-hexane/n-butanol/methanol/0.02% TFA (1 : 9 : 1 : 9, v/v)를 사용했을 때 96% 이상의 순도로서 5가지의 사포닌을 분리할 수 있었다 [33]. 이제 HPLC와 HPCCC는 상호경쟁적인 관계가 아니라 상호보완적인 관계인 듯싶다. 녹차에 포함된 카테킨류와 black tea에 포함된 theaflavins (TFs)를 HPCCC로 분리하려는 연구가 최근에 중국에서 보고되었다 [31-32]. 천연물로부터 항바이러스 성분을 분리하려는 연구도 HPCCC를 이용하여 진행되었다 [34]. Hexane-ethyl acetate-methanol-water-acetic acid (1 : 5 : 1 : 5 : 0.25, v/v)의 용매조성과 2 mL/min의 이동상 유속과 700 rpm의 컬럼 회전속도를 이용하여 순수한 형태의 물질을 분리할 수 있었다 (Fig. 7).

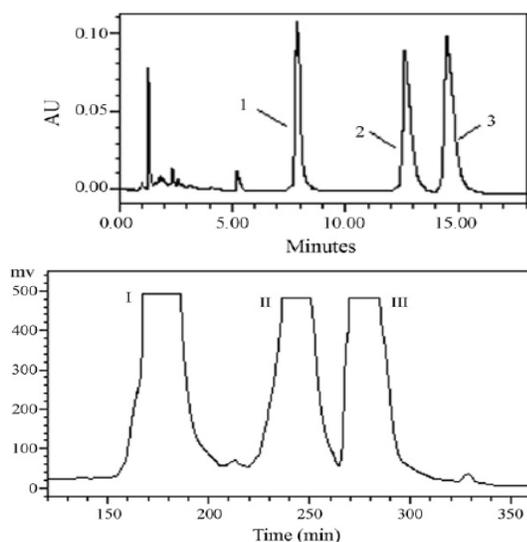


Fig. 7. HPLC and HPCCC separation of enriched extract from *Laggera pterodonta*. Peaks 1, 2 and 3 correspond to 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid, respectively [34].

Taxol의 분리 및 정제

천연물질에서 새로운 항암물질을 개발하려는 연구가 최근 많이 진행되고 있으며 [35-37], Taxol (paclitaxel)은 항암효능이 우수하여 미국 FDA로부터 항암제로 승인받은 대표적인 천연물신약이다. 높은 purity (> 99%)의 Taxol을 생산하기 위해서는 분리·정제 공정이 필수적이며, HPLC 방법을 적용한 분리·정제 공정이 보편적이다. 최근 HPCCC를 이용하여 crude한 paclitaxel로부터 99% 이상의 purity를 얻는 연구결과가 보고되었으며, 이러한 연구는 기존의 HPLC 방법에서의 제약점 (pretreatment, sample loading, solvent usage, run time etc)을 극복하고, high purity를 요구하는 제약 분야에까지 HPCCC를 적용가능 함을 알 수 있다 [37]. 중국 Dalian Institute of Chemical Physics (DICP)에서는 68%의 crude한 Taxol을 HPCCC를 장비를 이용하여 99% 이상의 purity로 분리정제한 연구가 보고되었다 [35]. n-Hexane-ethyl acetate-methanol-water (1 : 1.1 : 1 : 1.1, v/v)의 용매조성과 이동상 유속 6 mL/min 및 1400 rpm의 회전속도를 이용하여 99% 이상의 순도를 가지는 Taxol을 분리할 수 있었다. 이때 사용한 용매는 이동상 300 mL 및 정지상 160 mL을 포함 총 460 mL이며, crude한 Taxol 1 g당 767 mL의 용매가 사용되었다.

HPCCC의 스케일 업 (scale-up)

CCC의 가장 큰 장점중의 하나는 스케일 업이 쉽다는 것이다. 그러나 모든 종류의 CCC가 다 그런 것은 아니다. HSES의 경우에는 컬럼의 내경이 작아 스케일 업이 쉽지 않다. HDES의 경우 최근에 개발된 HPCCC의 경우 컬럼만 교환하는 방식으로 쉽게 스케일 업을 할 수 있다고 알려져 있다 [25-26]. 따라서 20 mL 컬럼과 120 mL의 컬럼 사이에는 1 : 6의 컬럼비가 존재한다. 이 컬럼비에 맞추어 시료의 부피와 이동상의 유속을 변경하면 된다. 우선 분석스케일에서 최적 조건을 잡은 다음 컬럼비를 이용하여 스케일 업을 하면 된다. 스케일 업에서 중요한 사항은 작은 스케일에서 진행했던 변수를 단순히 큰 스케일로 옮겨도 동일한 분리능이 나오느냐 하는 것이다. 이것을 선형 스케일 업 (linear scale-up) 이라고 하는데, 최근에 flavone 계열 물질을 이용한 연구를 통하여 HSCCC의 경우 이러한 선형성이 크게 개선됨이 밝혀졌다 [25-26]. 이 때 고려한 변수는 용매시스템, 시료의 농도, 시료 주입 부피, 회전속도, 유속 등이다.

결언 및 전망

1970년도 이래로 CCC에 관한 대부분의 연구는 천연물화학에 관한 것이었고 최근에는 펩타이드 등의 바이오분자들에 관한 연구가 진행되어 무척 전망이 밝다고 할 수 있다 [27]. 이를 통하여 CCC는 표준적이면서 고가인 역상 분취용

HPLC를 대체할 수 있는 훌륭한 대안이 될 것이다. 수상 2성 분계를 이용한 바이오물질의 분리는 다가올 새로운 분야를 개척해줄 것이다. 예를 들어 dextran와 polyethyleneglycol (PEG) 등의 두개의 섞이지 않는 수성고분자상을 이용하여 혈액세포, 바이오 입자, 기관, 바이오폴리머, 바이오막 등을 분리 및 정제할 수 있는 것이다. 다양한 문헌과 실제 공정의 적용사례가 말해주듯 CCC는 점점 대중화 되고 있다. 이제 천연물 분야나 불안정한 물질이 포함된 정제분야에서는 표준이 되고 있다. 세부적으로는 펩타이드의 분리, 농축, 정제 그리고 금속이온의 농축과 추출, 키랄 물질의 분리분야에서는 더욱 그렇다. 이 분야가 진보하면 진보할수록 CCC에 대한 이해는 더욱 넓어질 것이다. 학계와 산업계에서 좀 더 넓은 응용범위로 CCC가 확대되어 나가려면 두 가지 방향으로 작업이 전개되어야 할 것으로 보인다. 우선 분리의 효율이 증가되어 HPLC 만큼 분리시간이 단축되어야 한다. 특히 복잡한 화합물의 경우 CCC는 아직까지 분리시간이 너무 길다. 현재 100 단의 분리를 이루려면 약 1시간정도가 걸리는 것이 현실이다. 만일 10,000단을 분리하는데 수분이 소요된다면 훨씬 많은 연구자들이 CCC를 사용할 것이다. 두 번째로 용량 (capacity)이 더욱 더 증대되어야 한다. CCC가 특히 이 분야에서 강점을 가지고 있기 때문에 더욱 그렇다. CCC는 용매를 주입하는 비용정도가 소모되기 때문에 초기에 소모되는 자본비 이외에 운영비는 그다지 많이 들지 않는다. 따라서 CCC 컬럼을 교체하거나 재충전하는 것은 빠르며 무척 경제적이다. 이런 점은 HPLC에 비해서 무척 경제적이며 비교가 될 수 없이 우수한 성질인 것이다. HPLC (혹은 HSCCC)는 물질의 분리정제 분야에서 매우 특이한 위치를 차지하고 있다. 경제성과 스케일 업의 편리성 등 여러 가지 장점도 있으나 다른 경쟁 방법 혹은 장비들과 경쟁해야 하는 문제도 안고 있다. 기존의 다양한 크로마토그래피와 모세관전기영동 등의 방법은 경쟁방법인 동시에 상호보완적 방법도 될 수 있다.

요 약

역류크로마토그래피 (counter-current chromatography, CCC)는 일련의 분배과정을 한 개의 튜브 내에서 연속적으로 일어나도록 고안된 시스템으로서 컬럼으로는 polytetrafluoroethylene (PTFE) 튜브가 다층으로 감겨있는 원통형의 홀더 3개가 서로 기어를 통해 물려있으며, 홀더가 회전과 공전을 통해 튜브의 꼬임을 방지하는 rotary seal-free flow centrifuge 시스템으로 되어있다. 역상 HPLC (reverse phase HPLC)에서는 고정상이 실리카에 결합된 유기물단 (organic moiety)이 수용성 이동상 물질에 의해서 용매화 (solvated)되는 반면 CCC는 실리카 대신에 강한 중력장에 의해 분리되는 자유로운 용매가 고정상이 되며 이 고정상의 부피비율은 20-30%에 이른다. 즉 고체담체에 결합된 유기관능기 대신에 물과 섞이지 않는 hexane 같은 유기용제가 고정상으로 사용되는 것

이다. 고속역류크로마토그래피 (high-performance counter-current chromatography, HPCCC)는 CCC의 기능을 향상시킨 분리시스템으로서 높은 중력장하에서 높은 이동상 속도와 높은 분리효율과 짧은 분리시간을 특징으로 하고 있다. 특히 mg 단위에서 kg 단위로의 스케일업이 선형적으로 가능하다는 큰 장점을 지니고 있다. 이 총설에서는 현재까지 개발된 CCC의 일반적인 이론을 간략히 정리하고 최신 HPCCC 장비의 적용 예를 살펴보고 그 응용분야로서 생리활성물질의 분리 및 정제와 관련된 연구동향을 정리하였다.

감 사

본 논문은 2009년 산림청 산림과학기술개발사업 기획연구과제에 의해 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2010년 2월 25일, 게재승인 : 2010년 6월 24일

REFERENCES

1. Conway, W. D. (1990) *Countercurrent Chromatography*. p. 18, VCH Publishers Inc, New York.
2. Berthod, A. (2003) *Counter-current Chromatography*. p10, Elsevier, Amsterdam.
3. Martin, A. J. P. and R. L. M. Synge (1941) A new form of chromatogram employing two phases. *Biochem. J.* 35: 1358.
4. Craig, L. C. and O. Post (1949) Apparatus for countercurrent distribution. *Anal. Chem.* 21: 500.
5. Ito, Y., M. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, E. Kimura, and K. Nunogaki (1966) The coil planet centrifuge. *Nature* 212: 985.
6. Ito, Y. (2005) Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography *J. Chromatogr. A* 1065: 145-168.
7. Sorensen, J. M. and W. Arlt (1980) *Liquid-Liquid Equilibrium Data Collection*. Vol. V, Parts 2 and 3. Dechema, Frankfurt/Main.
8. Lee, C. H., B. Y. Lee, and C. H. Lee (1997) The effects of operating parameters of high-speed countercurrent chromatograph on efficiency. *Food Eng. Progr.* 1: 198-205.
9. Tsao, R. and Z. Deng (2004) Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B* 812: 85-99.
10. Chen, L. and I. A. Sutherland (2006) How to achieve rapid separation in counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1114: 29-33.

11. Becker, H., J. Reichling, and W. Hsieh (1982) Water-free solvent system for droplet counter-current chromatography and its suitability for the separation of non-polar substances. *J. Chromatogr. A* 237: 307-310.
12. Hanke, F. J. and L. Kubo (1985) Increasing the speed of droplet counter-current chromatography separations. *J. Chromatogr. A* 329: 395-398.
13. Yuan, Y., B. Wang, L. Chen, H. Luo, D. Fisher, I. A. Sutherland, and Y. Wei (2008) How to realize the linear scale-up process for rapid purification using high-performance counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1194: 192-198.
14. Zhang, M., S. Ignatova, Q. Liang, F. W. Jun, I. Sutherland, Y. Wang, and G. Luo (2009) Rapid and high-throughput purification of salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-performance counter-current chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216: 3869-3873.
15. Yao, S., J. Luo, X. Huang, and L. Kong (2008) Application of preparative high-speed counter-current chromatography/preparative high-performance liquid chromatography mode in rapid separation of saponins. *J. Chromatogr. B* 864: 69-77.
16. Foucault, A. P. (1991) Countercurrent chromatography. *Anal. Chem.* 63: 569A-579A.
17. Weisz, A., A. L. Scher, K. Shinomiya, H. M. Fales, and Y. Ito (1994) A new preparative-scale purification technique: pH-zone-refining countercurrent chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 704-708.
18. Friesen, J. B. and G. E. Pauli (2005) G.U.E.S.S.-A generally useful estimate of solvent system for CCC. *J. Liq. Chromatogr.* 28: 2777-2806.
19. Guzlek, H., P. L. Wood, and L. Janaway (2009) Performance comparison using the GUESS mixture to evaluate counter-current chromatography instruments. *J. Chromatogr. A* 1216: 4181-4186.
20. Lee, C. H., B. Y. Lee, and C. H. Lee (1999) The separation of major flavonoglycosides from *Ginkgo biloba* L. leaves by high-speed counter-current chromatography. *Food Sci. Biotechnol.* 8: 189-192.
21. Lee, C. H. and B. Y. Lee (2004) Preparative isolation of ginseng saponin from *Panax ginseng* root using high-speed countercurrent chromatography. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 518-521.
22. Chen, X., C. Yi, X. Yang, and X. Wang (2004) Liquid chromatography of active principles in *Sophora flavescens* root. *J. Chromatogr. B* 812: 149-163.
23. Gao, M., M. Gu, and C. Liu (2006) Two-step purification of scutellarin from *Erigeron breviscapus* (vant.) Hand. Mazz. by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. B* 838: 139-143.
24. Chen, L., Q. Zhang, G. Yang, L. Fan, J. Tang, I. Garrard, S. Ignatova, D. Fisher, and I. A. Sutherland (2007) Rapid purification and scale-up of honokiol and magnolol using high-capacity high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1142: 115-122.
25. Yuan, Y., L. Houding, and C. Lijuan (2008) Linear scale-up of the separation of active components from *Oroxylum indicum* using high-speed counter-current chromatography. *Chin. J. Chromatogr.* 26: 489-493.
26. Ye, H., S. Ignatova, H. Luo, Y. Li, A. Peng, L. Chen, and I. Sutherland (2008) Preparative separation of a terpenoid and alkaloids from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. using high-performance counter-current chromatography: Comparison of various elution and operating strategies. *J. Chromatogr. A* 1213: 145-153.
27. Sutherland, I. A., G. Audo, E. Bourton, F. Couillard, D. Fisher, I. Garrard, P. Hewitson, and O. Intes (2008) Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 1190: 57-62.
28. Lee, C. H., B. Y. Lee, H. Y. Lee, and C. H. Lee (1997) Effects of pH and potassium chloride in solvent system of high-speed countercurrent chromatography. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 1222-1227.
29. Sutherland, I., P. Hewitson, and S. Ignatova (2009) Scale-up of counter-current chromatography: Demonstration of predictable isocratic and quasi-continuous operating modes from the test tube to pilot/process scale. *J. Chromatogr. A* 1216: 8787-8792.
30. Sutherland, I., P. Hewitson, and S. Ignatova (2009) New 18-l process-scale counter-current chromatography centrifuge. *J. Chromatogr. A* 1216: 4201-4205.
31. Wang, K., Z. Liu, J. Huang, X. Dong, L. Song, Y. Pan, and F. Liu (2008) Preparative isolation and purification of theaflavins and catechins by high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. B* 867: 282-286.
32. Yang, C., D. Li, and X. Wan (2008) Combination of HSCCC and Sephadex LH-20 methods: An approach to isolation and purification of the main individual theaflavins from black tea. *J. Chromatogr. B* 861: 140-144.
33. Shi, S., D. Jiang, M. Zhao, and P. Tu (2007) Preparative isolation and purification of triterpene saponins from *Clematis mandshurica* by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. B* 852: 679-683.
34. Shi, S., K. Huang, Y. Zhang, Y. Zhao, and Q. Du (2007) Purification and identification of antiviral components from *Laggera pterodonta* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. B* 859: 119-124.
35. Guliyev, V. B., M. Gul, and A. Yildirim (2004) *Hippophae rhamnoides* L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional

- medicine and pharmacological effects. *J. Chromatogr. B* 812: 291-307.
36. Cao X., Y. Tian, T. Y. Zhang, and Y. Ito (1998) Separation and purification of 10-deacetylbaccatin III by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 813: 397-401.
37. Sutherland, I. A. and D. Fisher (2009) Role of counter-current chromatography in the modernisation of Chinese herbal medicines. *J. Chromatogr. A* 1216: 740-753.