

Simulated Moving Bed를 이용한 Bupivacaine의 키랄 분리 (2) 모사에 의한 최적 조건 결정

한순구 · 여미순 · 이종기* · 박태진* · 구윤모 · 노경호[†]

인하대학교, 초정밀생물분리기술연구센터

402-701 인천시 용현동 253

*한국과학기술연구원, 나노환경연구센터

136-791 서울시 성북구 하월곡동 39-1

(2003년 7월 23일 접수, 2003년 10월 1일 채택)

Chiral Separation of Bupivacaine by Simulated Moving Bed (2) Determination of Optimum Condition by Simulation

Soon Koo Han, Mi Soon Yeo, Joong Kee Lee*, Tae-Jin Park*, Yoon Mo Koo and Kyung Ho Row[†]

Center for Advanced Bioseparation Technology Inha University, 253, Yonghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea

*Eco-Nano Research Center, Korea Institute Science and Technology, 39-1, Hawolgok-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-791, Korea

(Received 23 July 2003; accepted 1 October 2003)

요 약

본 연구에서는 경부외 마취제로 사용되고 있는 S-bupivacaine을 SMB를 이용하여 R-bupivacaine으로부터 분리하였다. 단일칼럼을 이용한 실험을 통해서 비선형 흡착평형식과 실험식으로부터 물질전달계수를 얻었다. PIM을 이용하여 얻은 경쟁 Langmuir 흡착평형식에서의 매개변수 a 는 R-bupivacaine은 6.20, S-bupivacaine은 8.79 매개변수 b 는 각기 0.364, 0.922 ml/mg이었다. 이 매개변수들은 상용 모사기에 적용되어 두 키랄물질을 분리하기 위한 최적조업조건을 얻었고, 실험적으로 확인하기 위해서 Kromasil® CHI-TBB로 충전된 1×10 cm 칼럼이 2-2-2-2 구성으로 된 SMB를 이용하여 결과적으로 racemic bupivacaine을 98% 이상 고순도로 분리하였다.

Abstract – In this work, S-bupivacaine with the pharmacological activity of epidural anaesthesia was separated from R-bupivacaine by SMB (simulated moving bed). Nonlinear isotherm was suggested from the single column experiment and the mass transfer coefficient was obtained from an empirical equation. The parameters of a in competitive Langmuir adsorption equation empirically determined by PIM (pulsed input method) for R and S-bupivacaine were 6.20, 8.79 respectively, while those of b were 0.364, 0.922 ml/mg, respectively. These equilibrium and kinetic parameters were used by a commercially available simulator to find the optimum operating condition for resolving the two racemic mixtures. It was experimentally confirmed that based on these experimental conditions, the separation of bupivacaine enantiomers was successfully performed with the purity of more than 98% by SMB composed of eight column (2-2-2-2, 1×10 cm) packed with Kromasil® CHI-TBB.

Key words: Chiral Separation, Simulation, Simulated Moving Bed, Bupivacaine

1. 서 론

최근에 고부가가치 의약품인 키랄 약품을 고순도로 분리하는 기술의 개발은 의약 및 정밀 화학 생산공정에 커다란 기술적, 경제적 파급효과를 가져올 것으로 예상하고 있다[1]. 천연계에 존재하는 대부분의 생체 구성물질들은 광학적으로 거울상을 가진 광학 이성질체(enantiomer)로 존재하고 있으며 특정 화합물은 생체 내에서 서로 다른 역할을 수행한다. 이러한 enantiomer인 키랄 화합물은 키랄성(chirality)을 갖고 있는 한 쌍의 거울상 이성질체로서[2], chiral center를 가지고 있으며, 서로

겹치지 않는 거울상 대칭형의 구조를 가지고 있다. Enantiomer는 동일한 분자 구조를 가지고 있기 때문에, 물리·화학적 성질은 동일하지만, 다른 enantiomer와의 구조적 상호작용과 서로 다른 편광의 회전각도와 입체적인 배치상태로 인해 생체 내에서 서로 다른 역할을 수행한다. 거울상 이성질체 중의 어느 한쪽 물질만이 의약적 효능이 있고 나머지 다른 형태의 거울상 이성질체는 아무런 생리활성을 나타내지 않거나 혹은 각종 부작용의 원인으로 보고되었다[3]. 의약품 생산에 있어서 원하는 순수한 물질만을 얻는 것이 필수적이기 때문에 키랄 약품을 고순도로 분리 및 정제하는 것이 필수적이고 이에 따른 enantiomer의 분리기술의 중요성이 증대되었다.

키랄 크로마토그래피는 키랄 화합물 중의 한 가지 enantiomer와 선택

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: rowkho@inha.ac.kr

성을 갖는 키랄 고정상(CSP)을 이용한 키랄 칼럼을 이용하는 방법이다. 하지만 많은 용매 소비와 그에 따른 용질의 희석, 칼럼의 낮은 효율로 인해서 대용량과 원료 물질의 연속 분리에 부적합한 문제점을 지니고 있다. 제조용 규모에서는 이를 대체할 수 있는 기술로서 SMB(simulated moving bed) 크로마토그래피가 부각되었다. SMB는 1960년대 UOP(universal oil products)에 의해 자일렌 이성질체나 과당, 포도당과 같은 대규모의 연속식 분리공정에 적용하기 위해서 개발된 기술로서[4], 기존의 회분식 크로마토그래피와 같은 고순도 분리능력을 지니면서도 용매를 적게 사용함에 의해 운전비를 절감할 수 있고, 용매의 과량사용에 의한 분리대상물질의 희석을 최소화하며, 연속 분리에 의해 대용량의 산업용 분리에 적용할 수 있어 정밀화학 뿐만 아니라 생물공학공정에서도 주목을 받고 있는 중요한 분리기술이다[5]. 하지만, SMB 크로마토그래피 공정에 영향을 주는 복잡한 여러 가지 변수를 고려해야 하기 때문에, 여타의 크로마토그래피 공정의 최적화를 수행하는데 많은 시간이 소요되고, 따라서 최적화 공정 개발에 필요한 비용이 증가하게 된다. 이러한 개발 시간과 소요 비용을 절감하기 위해 전산모사를 병행해야 하는 필요성이 대두되게 되었다.

본 연구에서 사용한 시료물질인 bupivacaine(\pm)-1-buthyl-N(2,6-dimethylphenyl)-2-piperidine-carboxamide)은 분만시 경부의 마취로 사용되는 국부 마취제로 사용되거나[6], 또한 심장의 수축을 억제하는 효과를 지니고 있다[7]. 국부 마취제로서의 의학적 활성은 S-bupivacaine만 가지고 있으며, R-bupivacaine은 심장의 수축을 억제하는 부작용을 보이고 있다[8]. 선행된 Yoon 등[9]의 단일칼럼과 SMB 실험을 통해 racemic bupivacaine에서 선택적으로 의학적 활성을 보이는 S-bupivacaine을 분리하였다. 상용 simulator를 이용하여 농도에 따른 전산모사를 수행하여, 이를 통해 최적의 분리조건을 구하고 실험적으로 확인하는 것이 본 연구의 목적이다.

2. 이 론

2-1. SMB 원리

SMB의 원리는 이동층(moving bed)과 유사하다. 이동층은 고정상과 이동상을 향류 흐름으로 진행시켜 연속적으로 분리가 진행되어지는 시스템이다. 일반적인 4개의 zone으로 구성된 SMB는 충전된 칼럼이 서로 연결되어 있는 닫혀진 시스템으로 Fig. 1과 같은 구성을 가지고 있다. 분리하고자 하는 원료 혼합물과 순수한 용매로 유입되는 두 개의 흐름과 분리하고자 하는 물질 중 흡착력이 약한 성분, B가 농축되어 배출

되는 raffinate와 상대적으로 흡착력이 높은 성분, A가 농축되어 배출되는 extract의 두 개의 흐름으로 구성되어 있다. 서로 연결된 칼럼에 유입되고 배출되는 네 개의 흐름으로 각기 4개의 section(1, 2, 3, 4)으로 나눌 수 있다. 각각의 section에는 최소한 칼럼이 1개씩 연결되어 있고 각 section마다 다른 역할을 한다. 유동층과 동일하게 고정상의 흐름을 만들기 위해서 고정된 충전 칼럼을 각각의 유입부와 배출부를 일정한 시간 간격으로 이동상의 흐름 방향으로 이동시키거나 유입부와 배출부는 고정시킨 후 이동상의 흐름에 따라 칼럼을 이동시키면, 고정상과 이동상 간에 향류 흐름을 가지는 효과가 생긴다. 이러한 향류 흐름을 이동층과 같은 원리에 의해 분리가 진행되어진다. 고정상의 이동 속도는 칼럼과 주입부/배출부의 위치가 변하는 스위칭 시간을 통해 결정되어진다.

실제 분리가 진행되어지는 곳은 원료 주입부와 extract 사이의 section 2와 원료 주입부와 raffinate 사이의 section 3이다. Section 2에서는 주입된 이성분계의 혼합물 중에서 상대적으로 흡착력이 강한 성분, A가 고정상에 흡착되어 extract 쪽으로 모사 이동하게 되고, 상대적으로 흡착력이 약한 성분, B는 향류 방향으로 흘러들어 오는 이동상에 의해 쉽게 탈착이 진행되어 이동상과 함께 raffinate 방향으로 진행되어지면서 상대적으로 흡착력이 강한 성분, A가 농축되어진다. Section 3에서는 주입된 혼합물이 이동상의 진행방향으로 이동하면서 고정상에 흡착되어 향류 흐름으로 이동하게 되어 상대적으로 흡착력이 약한 성분, B가 이동상에서 농축된다.

2-2. 수학적 모사

시료가 크로마토그래피 칼럼에 주입되면 이동상과 고정상에서의 물질수지식은 다음과 같다.

$$-\epsilon_i E_{z,i} \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2} + v_i \frac{\partial c_i}{\partial z} + \epsilon_b \frac{\partial c_i}{\partial t} + (1 - \epsilon_i) \frac{\partial q_i}{\partial t} = 0 \quad (1)$$

q_i 는 성분 i 의 고정상에서의 평형 농도이고 c_i 는 이동상에서 용질의 농도이다, $E_{z,i}$ 는 겉보기 분산계수이다. v_i 는 이동상의 흐름 속도를 나타내며, ϵ_b 는 전체 공극률이고 $\epsilon_b = \epsilon_i + \epsilon_p(1 - \epsilon_p)$ 이다. ϵ_i 는 충전체에 의한 공극률이고, ϵ_p 는 충전체의 내부 공극률이다. 각각 칼럼내에서 물질전달과 축확산, 유속, 고정상에서의 흡착을 고려하였다. $E_{z,i}$ 는 식 (2)로 부터 구하였으며, 칼럼이 무한히 길다고 가정하였다[10].

$$\frac{v_i r_p}{\epsilon_i E_{z,i}} = \frac{0.2}{\epsilon_i} + \frac{0.011}{\epsilon_i} \left(\frac{Re}{\epsilon_i} \right)^{0.48} \quad (2)$$

크로마토그래피에서 물질전달 모델은 흡착-탈착 속도는 무한히 빠르고 유한한 물질전달 속도를 가정한다. 이동상에서 흡착제 겉 표면으로 시료의 물질전달은 막의 저항을 선형적으로 표시한 고체막 선형 구동력 모델을 적용하였고, 식 (3)과 같이 나타낼 수 있다. q_i 는 고정상에서의 용질의 농도로 이동상 농도 C_i 와 평형을 이루는 값이고 k_f 는 겉보기 물질전달계수이다.

$$\frac{\partial q_i}{\partial t} = \frac{3k_f}{r_p} (q_i^* - q_i) \quad (3)$$

2-3. 삼각형 이론(triangle theory)

삼각형 이론은 축확산의 확산과 물질전달 저항을 고려하지 않은 평형이론을 근거로 한다. 이성분의 혼합물의 흡착력의 차이로 인한 각 물질의 체류시간과 스위칭 시간, t^* 은 식 (4)와 같은 관계를 만족한다.

$$t_{R,B} < t^* < t_{R,A} \quad (4)$$

$t_{R,i}$ 는 각 성분의 체류시간이며, 식 (5)와 같이 나타낼 수 있다.

선형 흡착평형식을 가진다고 가정할 때 식 (4)는 식 (6)으로 정리할 수 있다.

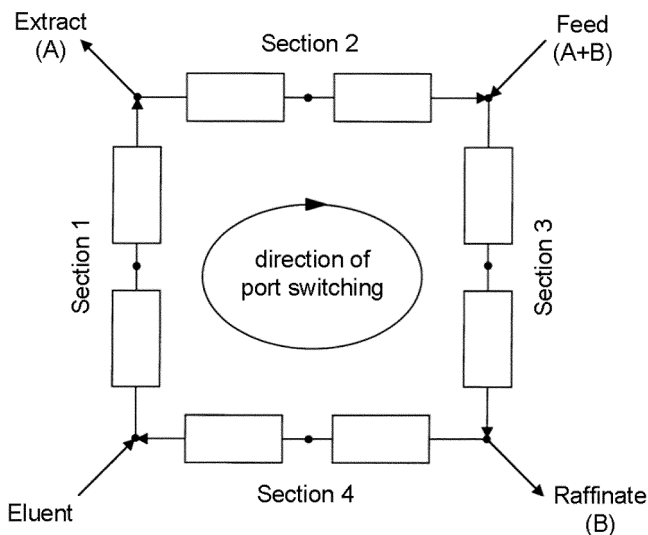


Fig. 1. Scheme of SMB.

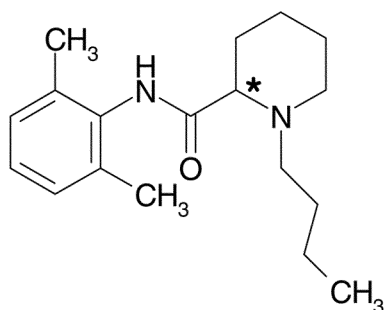


Fig. 3. Chemical structure of bupivacaine.

액을 만들기 위해 사용된 물은 3차 증류된 것으로 J.T. Baker(USA)에서 구입하였다.

SMB 실험장치는 실험실에서 자체 제작하였으며, 칼럼은 1×10 cm 스테인레스 칼럼에 slurry packer(Alltech, USA)를 이용하여 Kromasil® CHI-TBB(Eka Chemicals, Sweden)을 충전하여 사용하였다. SMB의 구성은 각 section 당 칼럼이 2개씩 연결된 2-2-2-2 구성으로 하였으며, 펌프는 SP930D 고압펌프(Younglin, Korea) 4개를 각각 feed, eluent, raffinate, recycle에 연결하여 사용하였다. Multi-position valve(Valco Instruments Co. Inc., USA) 5개를 칼럼과 연결하여 사용하였고, check-valve (Upchurch Scientific, USA) 8개를 각각의 칼럼 사이에 연결하여 역류 혼합을 방지하였다. Extract와 raffinate에는 relief-valve(Swagelok, USA)를 사용하여 일정 압력 이상에서 각 배출부로부터 액이 배출되도록 하였다. Multi-position valve는 HplcCtrl 버전 1.0(Younglin, Korea)을 펜티엄II급 컴퓨터에 설치하여 일정한 시간 간격으로 위치가 변하도록 제어하였다.

흡착평형식을 측정하고 분석을 위해 사용된 단일 칼럼은 1×10, 0.46×25 cm 스테인레스 칼럼에 각각 Kromasil® CHI-TBB를 충전하여 사용하였으며, HPLC는 M930 고압펌프(Younglin, Korea)와 M720 UV 검출기(Younglin, Korea)로 구성하였다. 데이터 수집은 Autochro-WIN 버전 2.0(Younglin, Korea)을 펜티엄II급 컴퓨터에 설치하여 수행하였다. 전산모사에 사용된 상용 simulator는 Aspen Chromatography ver. 11.1, service pack 1(Aspen Tech., USA)으로 펜티엄IV급 컴퓨터에 설치하여 모사 수행하였다.

3-2. 실험방법

실험에 사용되는 순수한 성분의 bupivacaine을 얻기 위하여 시료에 있는 sodium hydrocarbonate와 DCM을 이용하여 hydrochloride를 제거하기 위한 전처리를 하였다. 시료 3 mg당 sodium hydrogen carbonate 포화액과 DCM을 각각 2 ml의 비율로 준비하였다. Sodium hydrogen carbonate 포화액은 3차 증류된 물 100 ml당 7.0 g 이상의 비율로 넣어 과포화 상태가 되도록 준비하였다. 일정량의 시료를 준비된 DCM에 완전히 녹인 후 DCM과 같은 양의 sodium hydrogen carbonate 포화액을 넣은 후 두 상간의 물질전달이 용이하도록 약 1분간 흔들어 주었다. 1분간 평평한 곳에 두어 상 분리가 일어나도록 한 후 상대적으로 비중이 높은 DCM상을 분별 깔대기를 이용하여 분리한 후, 평판 가열기를 이용하여 DCM을 증류시킨 후 생성된 결정을 사용하였다.

이동상 조건은 n-hexane/IPA/acetic acid/triethylamine=99/1/0.2/0.05(vol. fraction) 이었다. 흡착평형식을 얻기 위해 주입부피를 0.02 ml로 고정하고 농도는 1, 5, 10, 20 mg/ml가 되도록 주입한 후 용출곡선을 얻었다. 단일 칼럼에서 구한 흡착평형식의 매개변수 값을 이용하여 최적의 작업조건을 결정하기 위해 전산모사를 수행하였다. SMB운전 중 스위칭 시간이 일정하지 측정하여 일정한 시간에 각 포트가 스위칭이 되도록 하였다.

4. 결과 및 고찰

4-1. 흡착평형식 및 물질전달 계수

크로마토그래피 칼럼내에서 일어나는 흡착 메커니즘을 이해하고 공정을 예측하는데 있어서 가장 기초적인 자료는 이동상과 고정상에서 시료의 평형관계를 나타내는 흡착평형식이고 이동상과 고정상에서의 상호간의 시료 농도에 함수로 표시할 수 있다. 흡착평형식을 결정하는 정적 방법과 동적 방법 중에서, 전자는 비교적 정확한 흡착평형 값을 얻을 수 있지만, 실험 방법과 시간이 오래 걸리는 단점이 있고, 이에 비해서 후자는 계산 과정이 복잡한 단점이 있지만 용출 곡선으로부터 가정된 흡착평형식의 매개변수를 얻을 수 있다[14].

먼저 주입농도를 1, 5, 10, 20 mg/ml로 변화시키고, 주입부피 0.02 ml로 고정하여 주입하였을 때 Fig. 4에서 보는 것과 같은 비선형의 용출 곡선을 얻었다. 여기서, 사용된 칼럼은 SMB 장비에 설치된 칼럼 중 하나를 선택하여 사용하였다. 주입농도에 따른 용출곡선을 비교하였을 때 주입농도가 증가함에 따라 S-bupivacaine의 피크 폭은 증가하였지만, R-bupivacaine의 피크 폭은 거의 변화가 없었다. 비교적 고농도에서 용출 곡선의 전반부는 경사가 심하고 후반부는 긴 꼬리꼬기(tailing)가 생기는 Langmuir 평형식으로 관찰되어 경쟁 Langmuir 흡착평형식을 가정하였다. 칼럼의 무용 부피(dead volume)와 공극률을 알아보기 위하여 n-hexane을 0.02 ml 주입하여 t_0 가 2.749 min이기 때문에 빈 칼럼의 부피를 고려하여 공극률이 0.7임을 구하였다. Langmuir 흡착 평형식에서의 매개 변수 a 를 구하기 위하여, 주입 농도에 따른 체류시간을 외삽하여 희석된 농도에서의 체류시간을 정하였다. 이 체류시간을 이용하여 평형상수 값을 구하고 이를 매개변수 a 값으로 취하여서 R-bupivacaine은 6.24, S-bupivacaine은 8.65 값을 얻었다. 단일 성분에 대해서 매개변수 b 값은 동적방법인 PIM(pulsed-input method)을 이용하여 구하여서 [15], R-bupivacaine은 0.538 ml/mg, S-bupivacaine은 0.409 ml/mg 값을 얻었다. 흡착평형식을 사용하여 계산된 농도분포곡선과 실험값과 비교하였을 때 R-bupivacaine의 경우 약 0.4 min의 체류시간이 감소하였고, S-bupivacaine의 경우 약 0.6 min이 증가하여 실험값과 차이가 있었다. 따라서 PIM을 통해 계산을 통해 얻은 경쟁 Langmuir 흡착평형식의 매개변수를 조절하여 실험값과 일치하도록 보정하여 Table 1에서 보는 것과 같은 새로운 흡착평형식의 매개변수 값을 얻었고 이를 통해 계산된 용출곡선과 실험값을 비교하였을 때 Fig. 4에서 보는 바와 같이 매우 잘 일치하였다[9].

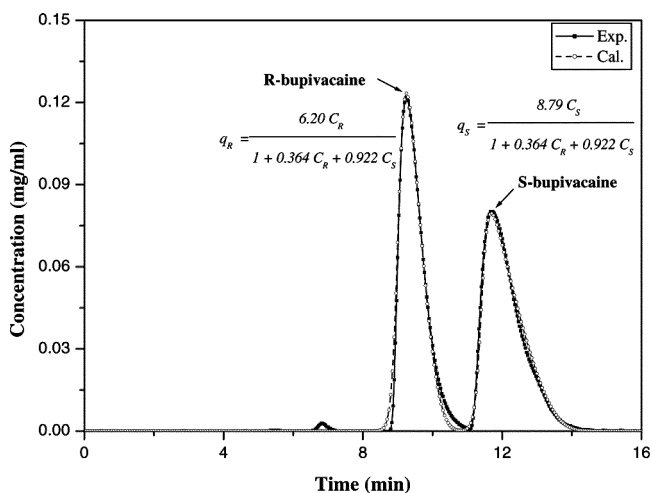


Fig. 4. Comparison of the calculated values and experimental data (Concentration=20 mg/ml, injection volume=0.02 ml, flow rate=2 ml/min).

Table 1. Equilibrium and kinetic parameters

	R-bupivacaine	S-bupivacaine
Total porosity	0.7	
Langmuir isotherm parameter, a	6.20	8.79
Langmuir isotherm parameter, b (ml/mg)	0.364	0.922
Effective mass-transfer coefficient (cm/min)	0.308	

물질전달 계수는 Sherwood 수($Sh=k_f r_p/D_m$)와 Reynolds 수($Re=v_g 2r_p \rho_g/\mu$), Schmidt 수($Sc=\mu/D_m \rho_g M$)에 대한 다음과 같은 관계식으로 계산하였다 [14].

$$Sh = \frac{1.09}{\epsilon_b} Re^{0.33} Sc^{0.33} \quad (23)$$

D_m 은 이동상에서의 시료의 확산계수로 Wilke-Chang식을 이용하여 계산하였을 때 [16], $1.93 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 이었으며, 비점에서의 bupivacaine의 물 부피는 Schroeder이 제안한 additive method를 사용하여 구하였을 때 [17] 308 cm^3 이었다. μ 는 혼합된 이동상의 점도로 Grunberg와 Nissan 방법을 사용하여 예측하였을 때 [18], 0.3034 cP 이었다. 식 (20)에 의해서 구한 물질전달 계수 값은 Table 1에서 보는 것과 같이 0.308 cm/min 이었다.

4-2. SMB 모사

SMB 모사를 하는데 필요한 매개변수는 단일 칼럼 실험을 통해서 얻었고 이 매개변수를 이용하여 칼럼내의 물질거동에 관한 물질수지식의 해를 구하여 SMB의 최적조건을 구하였다. 하지만, 상호 연관된 변수가 10개 이상으로 많아, 최적 조건의 설정에 어려움이 따른다. 기본적으로 주입농도가 고정되어 있을 때, SMB 공정을 운영하는데 있어서 가장 중요한 변수는 각 section에서의 유속과 스위칭 시간이다. 주입 농도에 따라서 각 section에서의 유속과 스위칭 시간이 다르기 때문에 배출부에서의 수율과 순도도 각기 다른 값을 가진다. SMB에서 주입 농도가 작아질수록 분리도는 증가하여 높은 순도로 혼합물을 분리할 수 있지만, 실제 제조용 규모의 공정에 적용하기에는 주입 농도가 매우 작아서는 곤란하기 때문에 적절한 주입 농도를 설정하는 것이 중요하다.

n-hexane에 bupivacaine은 10 mg/ml 이상의 초기 농도가 유지되었지만, 시간이 지남에 따라 과포화되어 결정이 석출되어 SMB 운영 중 일정한 농도를 유지하기 위하여 주입농도를 5 mg/ml 이내에서 설정하여 SMB 모사를 수행하였다. 본 연구에서는 95% 이상의 순도와 100%의 수율을 얻기 위한 조업 조건을 모사로서 구하기 위해, Fig. 5에서 보는 것

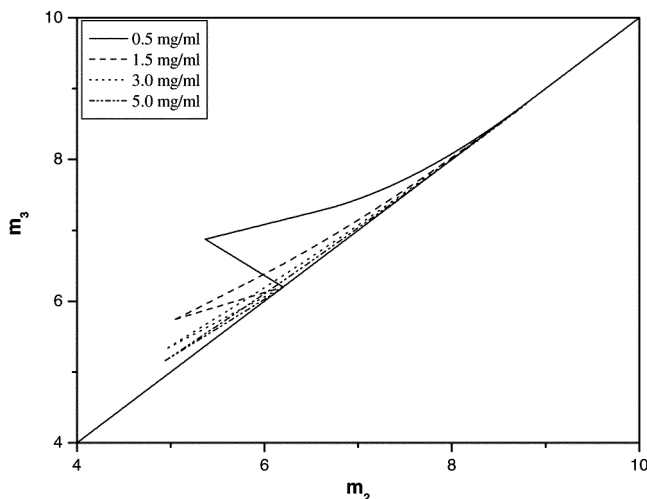
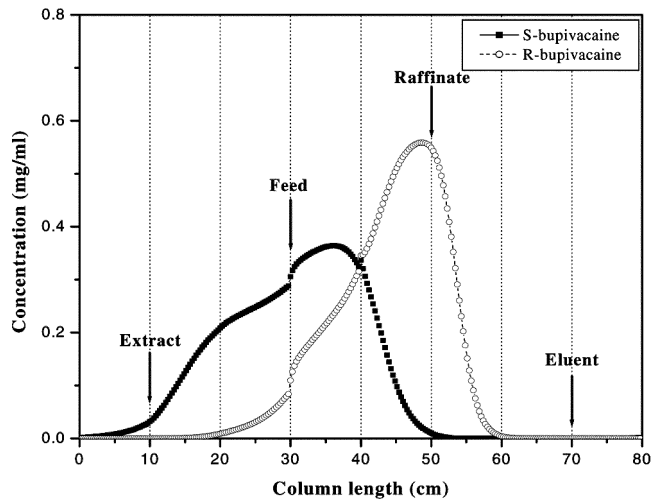
Fig. 5. Plot of m_2 vs m_3 with feed concentrations.

Table 2. Calculated operation condition

Switchin time (min)	15
Feed flow rate (ml/min)	0.1
Eluent flow rate (ml/min)	0.86
Extract flow rate (ml/min)	0.66
Raffinate flow rate (ml/min)	0.3
Recycle flow rate (ml/min)	1

(feed concentration: 1.5 mg/ml)

Fig. 6. Steady-state concentration profile (Feed concentration= 1.5 mg/ml , $t^*=15 \text{ min}$).

과 같이 주입 농도에 따라 삼각형 이론을 적용하여 m_2 , m_3 를 도식하였다. 주입 농도가 증가함에 따라 완전 분리가 가능한 영역이 점차 감소하고 삼각형의 경계 역시 대각선에 가까워지는 것을 알 수 있었다. 이를 바탕으로 적정 주입농도를 1.5 mg/ml 로 설정하였다. 주입 농도가 1.5 mg/ml 에서의 m_2 와 m_3 의 plot을 통해 최적조건에서의 각 section의 유속과 스위칭 시간을 구하여 초기조업조건으로 설정하였다. 초기 조업조건에서 95% 이상의 순도가 되도록 스위칭 시간과 각 유입부 및 배출부의 유속을 변화시켜 주었다. 여러 번의 모사를 통해 Table 2와 같은 최적 조건을 구하였다. SMB에 고정된 8개의 칼럼을 하나로 연결된 단일 이동층 시스템으로 가정하고, 평형농도에 도달하였을 때의 전산모사를 통해 얻어진 칼럼내의 농도 구배는 Fig. 6과 같다. 이동상의 방향은 7번째 칼럼에서 8번째 칼럼 방향으로 진행하고 있으며, 고정상은 이동상과 모사 향류 흐름으로 8번째에서 7번째 칼럼으로 이동하고 있다. Racemic bupivacaine이 원료로 주입된 후에 고정상과의 흡착력이 강한 S-bupivacaine은 이동상의 방향으로 농도가 증가하고 이동상에 들어오는 부분에서는 탈착이 진행되어 농도가 감소하였다. 상대적으로 흡착력이 약한 R-bupivacaine은 쉽게 탈착이 이루어져 이동상 진행방향으로 농도가 증가하고 있지만, 진행되는 고정상에 의해 흡착이 된 후 고정상과 함께 이동하다가 다시 이동상에 의해 탈착이 진행되어 농도가 감소하는 경향을 보이고 있다. 각 배출부에서는 Fig. 7과 같이 시간에 대한 농도 구배를 얻을 수 있다. 여기서, 위아래로 진동하는 곡선은 본 연구에서 사용된 SMB에서 8개의 연결된 칼럼이 스위칭되어 다시 시작위치로 돌아오는 것을 하나의 사이클이라 한다. 또한, Fig. 7에서 위아래로 진동하는 하얀점은 각 배출부에서 동적인 농도구배를 나타내며, 이를 각 스위칭 시간에 대한 평균값으로 나타낸 것이 검은점이다. 주입농도가 1.5 mg/ml 인 경우, 스위칭 시간이 15분이기 때문에 1 사이클에 120분이 소요된다. 10 사이클인 1,200분이 경과하였을 때, 농도가 일정하게 유지되는 평형농도에 도달한 것을 알 수 있었다.

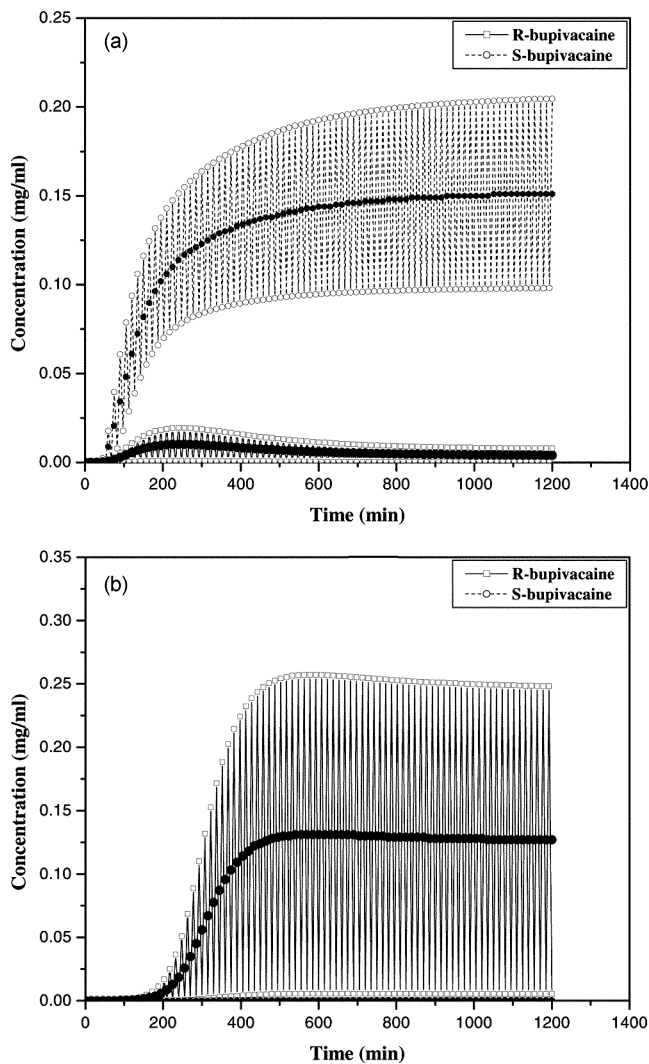


Fig. 7. Elution profile of extract (a) and raffinate (b) (Feed concentration=1.5 mg/ml).

Fig. 8에서는 주입농도를 5 mg/ml로 하였을 때 전산모사를 통해 얻어진 칼럼의 농도 구배를 보여주고 있다. 주입부에서 연속적으로 이성분계의 혼합물인 racemic bupivacaine이 주입되어 section 2로 모사 이동하는 고정상에 계속적으로 흡착이 진행되어진다. 이 때, 과량으로 주입된 원료 물질 중에서 흡착력이 약한 R-bupivacaine이 모사 이동하는 고정상과 향류 흐름으로 진행되는 이동상에 의한 탈착 진행속도가 느려지게 되고, 흡착되지 않은 S-bupivacaine이 이동상에 녹아 section 3으로 이동하게 된다. 과량의 원료가 주입되어서 이동상에 녹아 section 3으로 이동한 S-bupivacaine은 이동상과 모사 향류방향으로 진행되는 고정상에 흡착하게 된다. 이동상내의 S-bupivacaine의 양이 고정상의 흡착량보다 과량으로 존재하게 되어 완전히 흡착을 하지 못한 소량이 이동상과 함께 raffinate로 이동한 후 농축된 R-bupivacaine과 함께 배출된다. 이로 인해 S-bupivacaine의 농도 분포곡선이 넓어지면서 section 3을 오염시켜 raffinate에서의 R-bupivacaine의 순도가 감소하게 된다. 또한, 스위칭 시간이 경과하여 새로운 section 2에 해당하는 고정상에서 흡착된 R-bupivacaine의 양이 이전의 낮은 농도에 비해 증가한 상태이다. 따라서 과포화 상태인 새로운 section 2에서는 이동상에 의해 R-bupivacaine이 탈착되지만, 상대적으로 탈착속도가 늦어지게 된다. 이로 인해 section 2가 오염되어 extract에서의 S-bupivacaine의 순도가 감소하게 된다. 따라서 Fig. 8에서 보는 것과 같이 주입 농도가 증가할수록 칼럼 축방

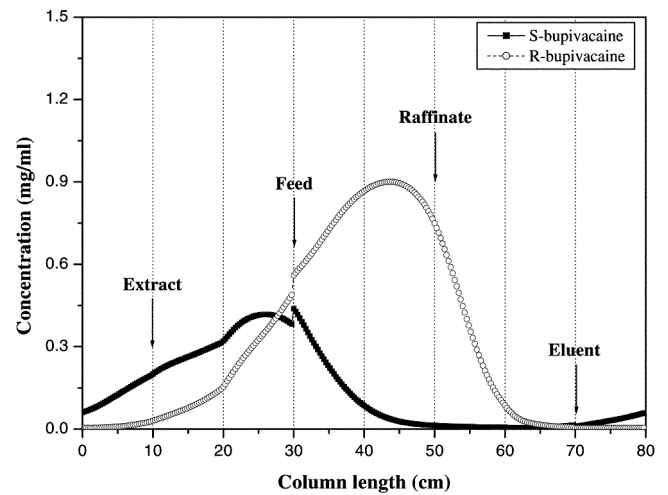


Fig. 8. Steady-state concentration profile (Feed concentration=5.0 mg/ml).

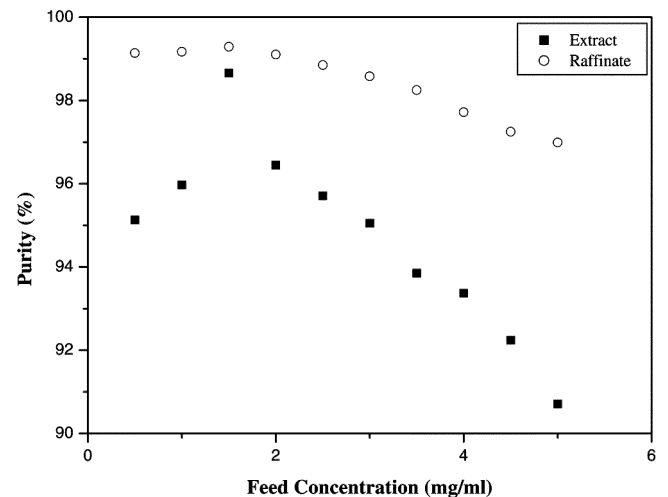


Fig. 9. Effect of feed concentration on purity of extract and raffinate.

향의 농도 분포 곡선에서 꼬리꼬기(tailing) 현상이 증가하여 raffinate에서와 extract에서의 각각의 R,S-bupivacaine의 순도는 감소하는 경향을 보이게 된다. R,S-bupivacaine의 주입농도에 따른 최적조건에서의 extract와 raffinate의 순도 변화가 Fig. 9에 나타나 있다. 특히, 주입농도가 증가함에 따라 raffinate에서 R-bupivacaine의 순도가 감소하는 비율보다 extract에서 S-bupivacaine의 순도가 감소율이 훨씬 컸다.

4.3. SMB 조건의 최적화

SMB를 10 사이클 운용하여 정상상태에 도달시킨 후 다음 11 사이클이 진행되는 동안 배출부에서 분취하였다. 분취한 배출액을 농축하기 위해서, 평판가열기를 이용하여 용매를 휘발시킨 후 5 ml의 n-hexane에 녹여 단일칼럼을 이용하여 분석하였다. 여기서, 농축된 정도는 extract와 raffinate에서 각각 15.84, 7.2배이다. Fig. 10은 11 사이클이 운용되는 동안, 각각 extract (a)와 raffinate (b)에서 분취한 배출액의 농도분포곡선이다. Extract에서 분취한 배출액의 용출곡선은 S-bupivacaine이고, 피크 면적을 기준으로 S-bupivacaine의 순도는 98.9%이었다. 또한, raffinate 상에서 분취한 배출액의 농도분포곡선에서는 R-bupivacaine의 순도가 98.3%이었다. 주입된 원료물질인 racemic bupivacaine의 피크이외의 불순물이 검출되어서 각 배출부에서의 순도가 감소하게 되었다. 이는 사용된 시료가 순도 100%의 racemic bupivacaine이 아니고, 용매 또는 전처리과정 중에서 혼합된 불순물의 피크로 추측된다. 단일칼럼을 이용한

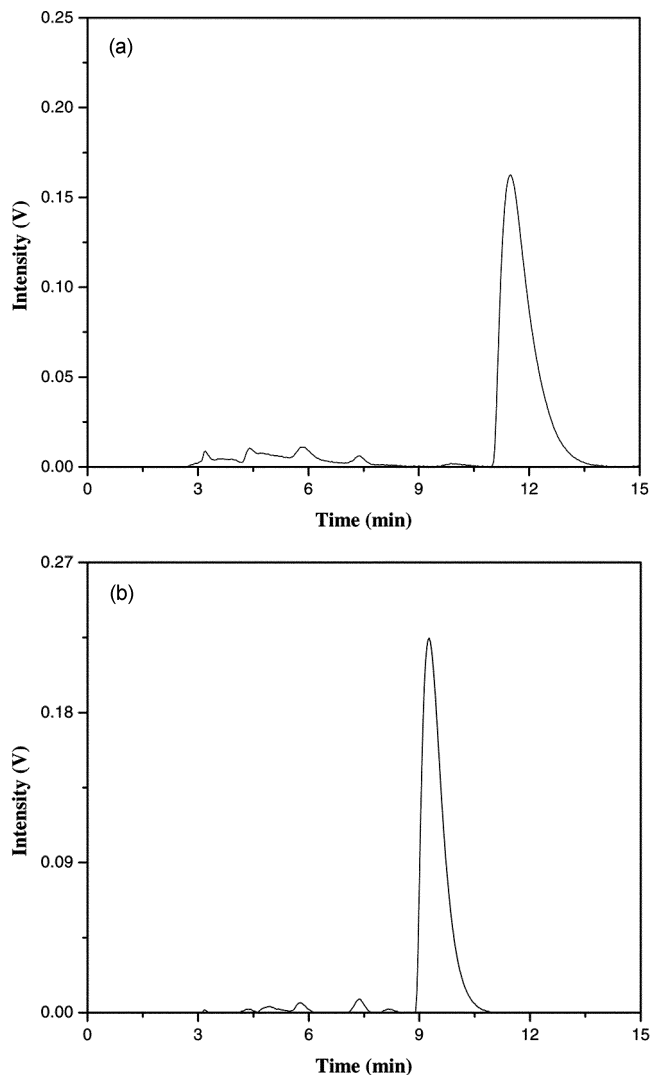


Fig. 10. Chromatogram of effluents from extract (a) and raffinate (b) (Feed concentration=1.5 mg/ml, 11 cycles).

Table 3. Comparison of calculated and experimental purities

	Calculation		Experiments	
	Extract	Raffinate	Extract	Raffinate
R-bupivacaine	1.34%	99.29%	1.1%	98.3%
S-bupivacaine	98.66%	0.71%	98.9%	1.7%

실험에서는 미량의 시료가 칼럼에 주입되어 검출되지 않았지만, SMB를 운용할 경우 이러한 불순물이 긴 운용시간동안 칼럼에 축적되어 배출된다. SMB에 장착된 칼럼을 초기 상태로 깨끗하게 유지되지 않아서 칼럼내에 이전에 잔존하고 있었던 불순물도 포함되어 있다. 이러한 불순물을 포함한 피크 면적을 기준으로 순도를 계산하였을 때, raffinate와 extract에서 각각 98%이상의 고순도의 R,S-bupivacaine로 분리되었다 (Table 3). 이 때, extract와 raffinate의 수율은 각각 82%, 93%의 수율을 얻을 수 있었다.

5. 결 론

R,S-bupivacaine 중에서 의학적으로 유용한 S-bupivacaine을 얻기 위해서 SMB를 사용하였다. SMB 조절조건을 모사를 통해서 얻기 위하여

평형 및 속도상수를 단일칼럼 실험에서 구하였다. R,S-bupivacaine의 비선형 용출곡선을 이용하여 경쟁적 Langmuir 흡착평형식을 얻었고, 실험식으로부터 물질전달 계수를 이용하여 SMB 모사를 수행하였다. 계산된 결과에 의해 주입농도가 1.5 mg/ml와 각 section에서의 유속에서 실험한 결과에 의하면, R,S-bupivacaine을 98%이상의 고순도로 분리할 수 있었다.

감 사

본 연구를 지원해 주신 초정밀생물분리기술연구센터(인하대학교)와 나노환경연구센터(한국과학기술연구원)에 감사드립니다. 또한, 단일칼럼 실험과 SMB실험을 협력해 주신 한국과학기술연구원에 윤지연씨에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Bhusan, R. and Martens, J., "Importance of Enantiomeric Purity and its Control by Thin-Layer Chromatography," *J. Phar. Biomed. Anal.*, **8**, 259-269(1990).
2. Ahuja, S., *Chiral Separations by Chromatography*, Oxford Univ. press, New York(2000).
3. Medvedovici, A., Sandra, P., Toribio, L. and David, F., "Chiral Packed Column Subcritical Fluid Chromatography on Polysaccharide and Macrocyclic Antibiotic Chiral Stationary Phases," *J. Chromatogr. A*, **785**, 159-171(1997).
4. Pais, L., Loureiro, J. M. and Rodrigues, A. E., "Modeling Strategies for Enantiomers Separation by SMB Chromatography," *AIChE J.*, **44**, 561-569(1998).
5. Miler, L., Orihuela, C., Fronek, R. and Honda, O., "Chromatographic Resolution of the Enantiomers of a Pharmaceutical Intermediate from the Milligram to the Kilogram Scale," *J. Chromatogr. A*, **849**, 309-317(1999).
6. Yang, H. Y., Shin, M. H., Chang, H. K., Jang, M. H., Lee, T. H., Kim, Y. J., Chung, J. H. and Kim, C. J., "Bupivacaine and Ropivacaine Suppress Glycine- and Glutamate-Induced Ion Currents in Acutely Dissociated Rat Hippocampal Neurons," *Neurosci., Lett.*, **344**, 33-36(2003).
7. Mio, Y., Fukuda, N., Kusakari, Y. and Tanifuji, Y., "Bupivacaine Attenuates Contractility by Decreasing Sensitivity of Myofilaments to Ca^{2+} in Rat Ventricular Muscle," *Anesthesiology*, **97**, 1168-1177(2002).
8. Gu, X. Q., Fryirs, B. and Mater, L. E., "High-Performance Liquid Chromatography Separation and Nanogram Quantitation of Bupivacaine Enantiomers in Blood," *J. Chromatogr. B*, **719**, 135-140(1998).
9. Yoon, J. Y., Lee, J. K., Suh, S. S., Choi, M. H. and Park T. J., "Chiral Separation of Bupivacaine by Simulated Moving Bed - (1) Optical Separation Conditions for Preparative Chromatography," *HWAHAK KONGHAK*, **41**(6), 736-743(2003).
10. Slater, M. J., *The Principles of Ion Exchange Technology*, Butterworth Heinemann, Oxford(1991).
11. Storti, G., Mazzotti, M., Carra, S. and Morbidelli, M., "Optimal Design of Multicomponent Countercurrent Adsorption Separation Process Involving Nonlinear Equilibria," *Chem. Eng. Sci.*, **44**, 1329-1345(2000).
12. Mazzotti, M., Storti, G. and Morbidelli, M., "Robust Design of Countercurrent Adsorption Separation Process: 2. Multicomponent Systems," *AIChE J.*, **40**(11), 1825-1842(1994).
13. Mazzotti, M., Storti, G. and Morbidelli, M., "Robust Design of Countercurrent Adsorption Separation Process: 3. Nonstoichiometric Systems,"

- AIChE J.*, **42**(10), 2784-2796(1996).
14. Guiochon, G., Golshan-Shirazi, S. and Katti, A. M., *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*, Academic Press, Boston(1994).
15. Choi, Y. S., Lee, J. W. and Row, K. H., "Comparison of Frontal Analysis and Pulsed Input Method for Determining Adsorption Isotherm," *HWAHAK KONGHAK*, **38**(4), 474-478(2000).
16. Wilke, C. R. and Chang P., "Correlation of Diffusion Coefficients in Dilute Solutions," *AIChE J.*, **1**, 264-270(1955).
17. Partington, J., *An Advanced Treatise on Physical Chemistry*, Vol. I, *Fundamental Principles: The Properties of Gases*, Longmans, Green, New York(1949).
18. Grunberg, L. and Nissan, A. H., "Mixture Law for Viscosity," *Nature*, **164**, 799-800(1949).