

분취용 LC 정제를 위한 전략

저자

Ron Guillet, Sami Chanaa,
Lakshmi Subbarao
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE

개요

분취용 액체 크로마토그래피(LC)는 혼합물 내에서 하나 이상의 목표 화합물을 분리 또는 정제하는 데 탁월한 기술입니다. 이 기술은 의약품 발견 및 개발 실험실에서 반응 정화, 천연물 정제, 불순물 분리 및 기타 용도에 사용되고 있는 핵심적인 정제 방법입니다. 대부분의 경우에 분취용 LC는 분석적 분리 작업으로 시작하며, 시료 내 목표 화합물의 존재를 확인하기 위해 사용됩니다. 적절한 분리법이 확립되면, 분리법은 분취용 수준으로 조절되기 전 순도, 수율, 처리량 등을 위해 최적화됩니다.

이 백서에서 애질런트는 분석 수준에서 분취용 LC까지의 조절과 관련된 주요 단계를 살펴봅니다. 여기에서 설명된 기본적인 크로마토그래피 및 수학적 원리를 적용해 semiprep 정제로의 통제 가능하고 원활한 전환을 촉진할 수 있습니다.

올바른 분리 방법 및 고정상 선택

크로마토그래피 작업자가 처리해야 할 첫 번째 과제는 적절한 크로마토그래피 기술 또는 분리 방법을 선택하는 것입니다. 이는 대상 용질의 화학적 및 물리적 속성에 따라 달라집니다. 일반적으로 사용되는 크로마토그래피 방법 일부에 대한 설명이 표 1에 기재되어 있습니다.

분리 최적화: 이동상

이동상 선택을 좌우하는 요인은 다음과 같습니다.

- 분리에 최적화된 선택성
- 용액 순도(낮은 농도의 비휘발성 오염물질도 베이스라인 잡음 증가를 야기할 수 있음)
- 검출 유형(UV 투과, MS 호환)

- 휘발성(분리된 물질에서 쉽게 제거하기 위함)
- 점도(높은 점도는 높은 역압(backpressure) 생성)
- 성분의 용해력(이동상 내 시료의 용해도)
- 비용

표 1. 일반적인 크로마토그래피 모드

역상	순상	Ion exchange	크기 배제	키랄성
대부분의 유기물	오일, 지방, 지질 등의 친유성 물질	산, 염기, 펩타이드, 단백질, 핵산 등과 같은 이온	단백질, 핵산을 포함한 폴리머	거울상이성질체
메탄올 또는 아세토니트릴 및 첨가제 등의 수성 혼합물	유기 용매	수용성 완충액, 이온성 용액	수용성 완충액, 유기 용매	수용성 완충액 또는 유기 용매

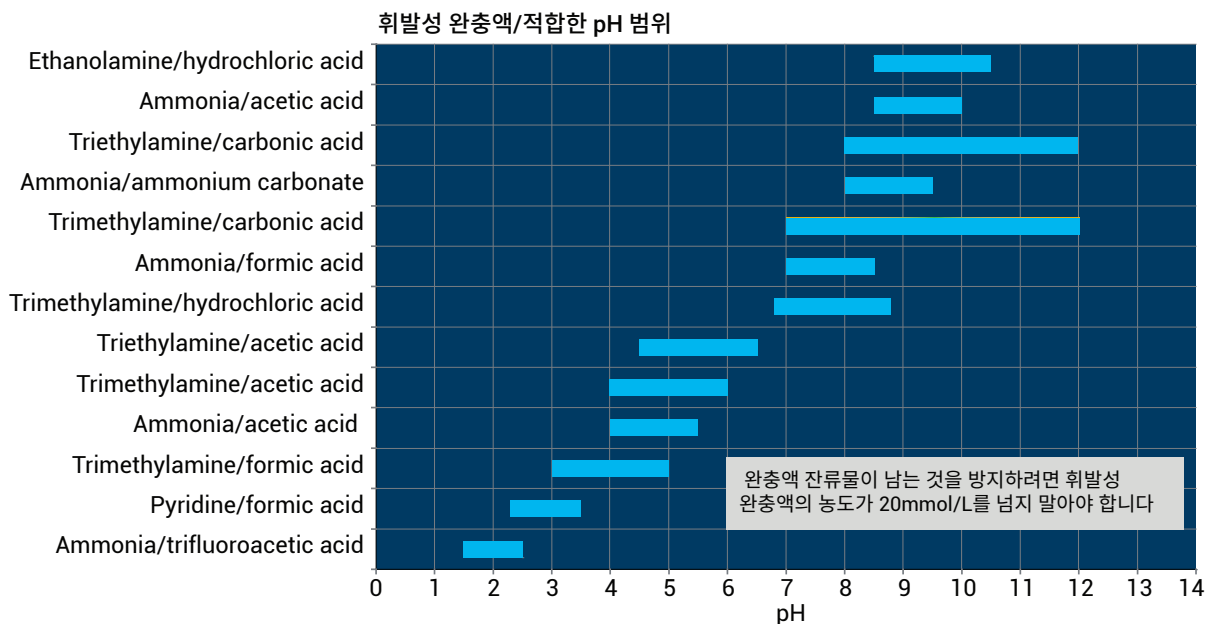


그림 1. HPLC에 쓰이는 일반적인 휘발성 완충액

처리량 최적화: 시료의 양 및 오버로딩 유형

분취용 LC에서 처리량을 늘리기 위해 컬럼 오버로딩을 실행하는 것은 흔한 일입니다. 오버로딩은 피크가 가우스 모양에서 보다 삼각 형태로 변환되는 현상을 유도합니다. 그러나 무분별한 오버로딩은 용액 내 불순물 또는 분석물질의 동시용리를 일으킬 수 있습니다. 적절한 시료 양을 결정하기 위해 로딩 연구가 수행될 수 있습니다. 분석적 컬럼을 이용해 이와 같은 연구를 수행하는 것은 용액 소모 및 폐기를 최소화함으로써 소중한 시료를 절감할 수 있습니다.

컬럼 오버로딩 수행에는 2가지 방법이 있습니다.

- **농도(질량) 오버로딩:** 주입 가능한 최고 농도를 결정하기 위해, 동일한 주입 부피를 유지하면서 농도가 증가하는 여러 시료 용액을 컬럼에 주입하는 것입니다. 피크 분리 현상(시료 침전의 징후) 또는 동시용리 현상을 일으키지 않는 가장 높은 농도를 채택해야 합니다.
- **부피 오버로딩:** 만약 시료의 용해도가 낮다면, 부피 오버로딩을 권장합니다. 동일한 시료를 가지고 부피를 증가시켜 주입하였습니다. 동시용리가 일어나지 않는 가장 많은 부피를 채택해야 합니다.

2가지 방법의 조합 역시 가능합니다. 보통 실용적인 측면에서 농도의 오버로딩이 부피의 오버로딩보다 선호되는데, 이는 수집된 분획물(fraction)에서 농축 또는 동결 건조를 통해 제거해야 할 용매량이 상대적으로 더 적기 때문입니다.

이와 같은 분석 연구에서 얻은 결과는 분취 가능한 규모의 잠재적 로딩을 결정하는 데 사용될 수 있습니다.

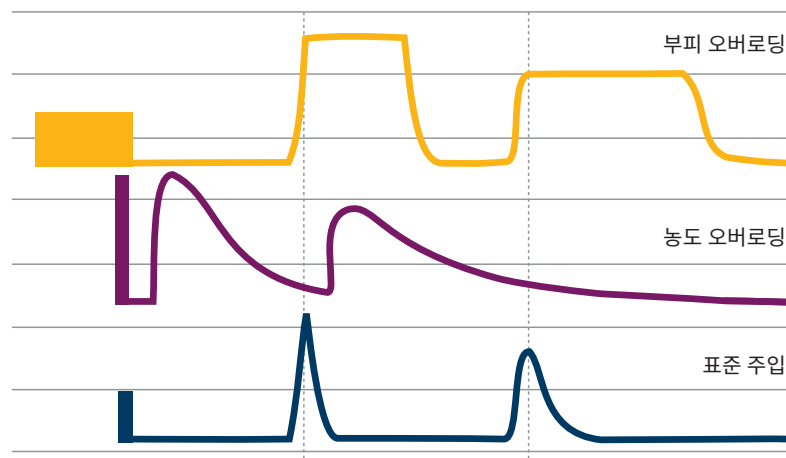


그림 2. 부피 및 농도 오버로딩의 피크 모양

분석법 스케일 업

분취 실행 결과 평가에 중요한 3개의 파라미터는 순도, 수율, 처리량입니다. 이 파라미터들은 상호 의존적이기 때문에, 분취 분석법이 이 3개 파라미터 모두 동시에 최적화되는 것은 불가능합니다. 가장 중요한 최적화된 파라미터가 무엇인지는 응용 방법에 따라 달라집니다.

그림 3에서 크로마토그램 1은 매우 높은 처리량을 보이거나 2개 화합물의 분리 효과 면에서는 열악한 분취용 HPLC 분석을 보여줍니다. 각 화합물의 일부 분획물 (fraction)을 고순도로 얻는 것이 가능할 수 있으나, 수율은 낮습니다. 크로마토그램 2에서 피크는 잘 분리되었으므로 2개의 화합물을 모두 고순도와 고수율로 얻는 것이 가능하나, 처리량은 매우 낮습니다. 크로마토그램 3은 모든 3개 파라미터가 고려되어 최적화된 분취용 HPLC 분석입니다.

분석 수준에서 분취가능한 규모까지의 빠르고 쉬운 선형적 스케일 업은 동일한 고정상과 입자 크기를 가진 분석적 컬럼과 분취용 컬럼 2개 모두의 보유에 달려 있습니다. 이는 3단계로 진행됩니다.

1. **분석 조건 개선:** pH, 이동상, 고정상 등과 같은 올바른 분석 스카우팅 조건을 결정하고 분석능을 위한 분리를 최적화합니다.
2. **시료 로딩 극대화:** 분석능 한계에 이를 때까지 주입량을 증가시킴으로써 분석용 컬럼의 시료 로드를 측정합니다.

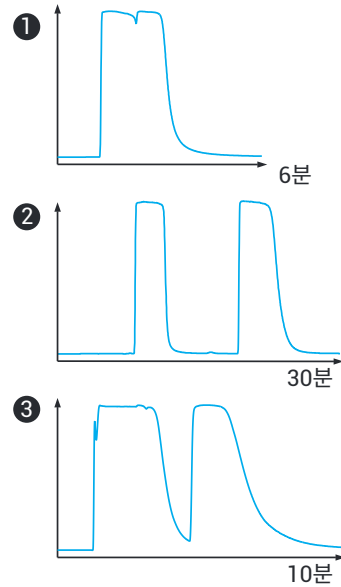
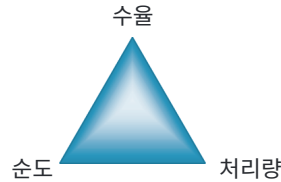


그림 3. 분취용 HPLC의 목적

3. **선형적인 스케일 업 공식 계산 및 적용:** 보다 작은 id 컬럼(분석용)에서 큰 id 컬럼(분취용)으로 옮겨갈 때 스케일 업되어야 할 2개의 파라미터는 유속과 주입 부피입니다. 입자 크기, 고정상, 이동상 등과 같은 모든 다른 파라미터는 일정하게 유지되어야 합니다.

유속과 주입 부피를 위한 선형적인 스케일 업 요소는 등식 1과 2를 이용해 알아낼 수 있습니다.

주입이 이와 같은 스케일 업 요소들의 올바른 응용에 기초하면 semiprep 규모 정제로의 예측 가능하며 원활한 전환을 달성할 수 있습니다.

$$f_{p,P} = f_{a,A} \left(\frac{d_p}{d_A} \right)^2$$

설명:
 $f_{a,A}$ = 분석용 컬럼에서 유속
 d_p = 분취용 컬럼의 내부 직경
 d_A = 분석용 컬럼의 내부 직경

등식 1. 분취용 유속으로 스케일링

$$V_{inj,P} = V_{inj,A} \left(\frac{d_p}{d_A} \right)^2$$

설명:
 $V_{inj,A}$ = 분석용 컬럼에서 주입 부피
 d_p = 분취용 컬럼의 내부 직경
 d_A = 분석용 컬럼의 내부 직경

등식 2. 분취용 주입 부피로 스케일링

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
 2018년 5월 1일 한국에서 인쇄
 5991-9229KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
 한국에일린트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
 고객센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr