

고속역류크로마토그래프의 분리효율에 미치는 작동조건의 영향

이창호 · 이부용 · 이철호*

한국식품개발연구원, *고려대학교 생명공학원

The Effects of Operating Parameters of High-Speed Countercurrent Chromatograph on Efficiency

Chang-Ho Lee, Boo-Yong Lee and Cherl-Ho Lee*

Korea Food Research Institute,

*Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul

Abstract

The studies on separation and purification of bioactive material by countercurrent chromatography which performs efficient separation without solid support were carried out. Effects of the operating parameters such as column rotation speed, elution mode of mobile phase and flow rate on the separation efficiency were investigated using high speed countercurrent chromatography apparatus. Retention of stationary phase (S_f), theoretical plate number (N) and peak resolution (R_s) increased with an increased column rotation speed. The application of high flow rate resulted in a short retention time of solute, and decreased retention of stationary phase (S_f), theoretical plate number (N) and peak resolution (R_s). Stationary phase was retained, when upper phase eluted in tail to head mode or lower phase eluted in head to tail mode, while no retention occurred with the reversed modes of elution.

Key words: Countercurrent chromatography, efficiency, theoretical plate number, resolution

서 론

Countercurrent chromatography (CCC)는 고체 지지체를 필요로 하는 일반적인 크로마토그래피와 달리 고정상과 이동상이 모두 액상인 새로운 분리 기술이다. CCC라는 이름은 countercurrent distribution (CCD)과 liquid chromatography (LC)라는 2가지의 고전적인 분리방식으로부터 유래된 것으로서 양쪽의 장점이 혼합된 분리 방법을 지칭하고 있다(Craig와 Post, 1949; Craig *et al.*, 1951; Martin과 Syngé, 1941).

CCC는 고체상의 충전물질로 채워진 컬럼내부로 액상의 이동상을 흘려보내어 고체상의 고정상과 이동상 사이의 용질간 친화성 차이를 이용하여 물질을 분리시키는 기존의 HPLC방식과는 달리 서로 섞이지 않고 혼합 후 2개의 층으로 분리될 수 있는 용매이면 어느 것이나 혼합하여 분리된 2개의 층중 한 층을 이동상으

로, 다른 층을 고정 상으로 하여 고체 지지체없이 물질을 분리 정제할 수 있는 기법이다(Ito *et al.*, 1966).

CCC 장치의 전체적인 기기구성은 pump, injector, countercurrent chromatograph 본체, detector, fraction collector로 구성되어 있어서 HPLC와 유사하나, 물질의 분리 정제가 이루어지는 컬럼이 장착되어 있는 본체가 크게 다르다. CCC장치의 컬럼은 원통형의 홀더에 PTFE (polytetrafluoroethylene) 튜브가 여러층으로 감겨있는 다층방식으로 되어 있다. CCC는 컬럼에 작용하는 중력에 따라서 일정한 중력장이 적용되는 HSES 형식과 컬럼 자체가 회전하여 여러 방향으로 다양하게 중력이 작용하는 HDES 형식이 있다. HSES 형식의 CCC로는 droplet CCC, rotation CCC, centrifugal partition chromatography 등이 개발되어 상업화 되어 왔으며, HDES는 combined flow-through coil planet centrifuge와 high-speed CCC가 상업화 되어 있다. 본 실험에서는 역류크로마토그래피 기법을 이용하여 천연물로부터 생리활성을 가지는 유용성분을 분리하기 위한 시도로써 컬럼의 회전속도, 이동상 유속 및 elu-

tion 방향이 고속역류크로마토그래프의 분리 효율에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 은행잎 flavonoid 표준품은 각각 kaempferol, quercetin, isorhamnetin으로 Carl Roth (Germany)로부터 구입하여 사용하였으며 CHCl₃, MeOH, H₂O, hexane, butanol 등의 용매는 모두 HPLC 등급을 사용하였다.

HSCCC

실험에 사용한 고속역류크로마토그래프(HSCCC)는 semipreparative용(CCC-1000, Pharma-Tech Research Co. USA)으로 내경이 0.8 mm인 Polytetrafluoroethylene 튜브로 감겨져 있는 컬럼 3개가 홀더에 연결되어 있어 기어로 동력이 전달되는 방식이다. 컬럼 3개의 총부피는 325 ml 이며 컬럼을 교환함으로써 용량을 늘릴 수 있다. 본 실험에 사용한 HSCCC의 작동조건은 Table 1과 같다.

컬럼내 체류되는 고정상(stationary phase) 부피 측정

HSCCC 운용 시 컬럼내에 유지되는 고정상의 부피는 정지된 상태에서 펌프를 이용하여 고정상 용매를 컬럼내에 전부 채운 후 정해진 회전속도로 컬럼을 회전시키면서 이동상(mobile phase)을 일정 유속으로 주입한다. 이동상에 의해 고정상이 밀려나오다가 어느 순간 더 이상 고정상이 밀려나오지 않고 이동상만이 흘러나오기 시작한다. 컬럼내 유지되는 고정상의 부피는 이동상을 주입하기 시작하여 컬럼내에 이동상과 고정상 사이에 평형이 이루어져 고정상이 더 이상 밀려나오지 않고 이동상만이 흘러나오기 시작할 때 까지 컬럼 출구에서 메스실린더로 받은 고정상의 부피로부터 계산한다. 즉 컬럼내 유지되는 고정상의 부피는 컬럼의 전체 부피로부터 메스실린더로 받아낸 밀려나온 고정상의 부피를 뺀 것으로 한다. 컬럼내 유지되는 고정상의 비율은 본 실험에 사용한 HSCCC 장치

의 컬럼 부피 325 ml에 대한 컬럼내 유지되는 고정상의 비율로써 나타낸다.

크로마토그래픽 parameter 계산

본 실험에서 HSCCC의 분리 효율은 이론단수(theoretical plate number, N)와 분리능(resolution, R_s)으로 나타내었으며 계산은 식 (1)과 식 (2)와 같다(Conway, 1986).

Theoretical plate number (N)

$$N = 5.54 \left(\frac{V_R}{W_{b2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{d_R}{d_{b2}} \right)^2 \quad (1)$$

V_R: 피크에 해당하는 용매부피

W_{b2}: 1/2 피크높이일 때 그 피크 폭의 길이

d_{b2}: W_{b2}에 해당하는 크로마토그램상의 거리

d_R: 피크에 해당하는 크로마토그램상의 거리

Resolution (R_s)

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

t₁, t₂: 피크에 해당하는 시간

W_{b1}, W_{b2}: 4σ에 해당하는 피크의 폭

결과 및 고찰

컬럼의 회전속도에 따른 stationary phase retention (S_r) 변화

HSCCC 운용 시 물질의 분리는 용매시스템 이외에 컬럼내에 유지되는 고정상의 양에 의해 많은 영향을 받게 된다. Table 2는 컬럼의 회전속도에 따른 컬럼내에 유지되는 고정상의 비율을 나타낸 것이다. 회전속도가 증가할수록 컬럼내에 유지되는 고정상의 비율이 증가하는 경향을 나타내었으나 200 rpm이하에서는 전혀 유지되지 않았으며 컬럼내 고정상의 유지율이 최소한 70% 이상되는 400 rpm 이상이 적절한 컬럼회전속도임을 판단할 수 있다. 또한 하층부 용매를 이동상으로 사용한, T → H 방향, 상층부 용매를 이동상으로 사용한, H → T 방향이 rpm에 관계없이 고정상이 유지되지 않아 CHCl₃/MeOH/H₂O 용매시스템에서는 이들 elution 방식이 부적합한 것으로 나타났다. 매우 낮은 컬럼 회전 속도하에서는 컬럼내부에서 섞이지 않는 두 용매가 같은 비율로 일정하게 분포하게 되어 어느 한쪽 용매를 이동상으로 하여 흘리고 나머지 한쪽 용매를 고정상으로 하게 되면 고정상으로 존재하

Table 1. Operation conditions of HSCCC

Apparatus: CCC-1000(Pharma-Tech Research Co. USA)
Column: ID 0.8 mm PTFE tube
Column volume: 325 ml
Solvent system: CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O
Column rotation speed: 200, 400, 600, 800, 1000 rpm
mobile phase flow rate: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 ml/min

Table 2. Retention of stationary phase in column with various methanol content in aqueous phase for CHCl₃/Aq. MeOH 4: 6 system (% , Flow rate: 1 ml/min)

Mobile phase (Elution mode)	% MeOH ^a	Interfacial tension (dynes/cm)	Column rotation speed (rpm)			
			200	400	600	800
Lower phase (H → T) ^b	10	25.1	0	74	82	85
	20	18.6	0	74	82	85
	30	17.6	0	78	85	89
	40	14.6	0	80	86	89
	50	9.9	58	78	83	86
	60	7.0	62	80	86	88
(T → H) ^c	60	7.0	0	0	6	3
Upper phase (T → H)	10	25.1	0	53	89	90
	20	18.6	0	0	0	94
	30	17.6	0	0	92	94
	40	14.6	0	0	91	92
	50	9.9	0	86	89	92
	60	7.0	0	0	88	89
(H → T)	60	7.0	0	0	2	2

a: % MeOH in H₂O for CHCl₃/Aqueous MeOH-4: 6 system

b: Head to tail, c: Tail to head

Head: The column end toward which any object travel, whether it is lighter or heavier than the solvent, when a solvent-filled coil is rotated.

Tail: The opposite column end

는 용매는 계속해서 이동상과 함께 달려나와 컬럼내 고정상의 부피는 계속해서 줄어들게 된다. 컬럼의 회전속도를 일정 속도 이상으로 높이면 컬럼내에 두 용매분포가 서로 양분되어 한쪽 용매는 head 쪽으로, 나머지 다른쪽 용매는 tail 쪽으로 이동하게 되는 현상이 나타나게 되는 unilateral hydrodynamic equilibrium system (HDES) 분포를 나타내게 된다(Ito, 1986). 이 때 head 쪽 용매를 tail에서 head로 흐르는 이동상으로 하고, tail 쪽 용매를 head에서 tail 쪽으로 흐르는 이동상으로 선택할 경우 고정상 용매가 이동상과 함께 떨어져 나오지 않고 높은 비율로 컬럼내에 유지될 수 있다. 본 실험의 용매시스템 조건에서는 하층부를 이동상으로 사용한, H → T 방향, 상층부를 이동상으로 사용한, T → H 방향이 매우 높은 컬럼내 고정상 유지율을 나타내어 하층부가 tail 쪽으로 향하게 되고 상층부가 head 쪽으로 향하는 용매시스템임을 판단할 수 있다. 또한 컬럼 회전속도가 하층부용매를 이동상으로 한 H → T 방향에서는 400 rpm에서부터, 상층부용매를 이동상으로 한 T → H 방향에서는 600 rpm에서부터 70% 이상의 컬럼내 고정상 유지율을 나타내어 unilateral HDES를 나타내는 컬럼의 임계회전속도가 각각 H → T 방향에서는 200~400 rpm 사이, T → H 방향에서는 400~600 rpm 사이인 것으로 나타났다.

HSCCC에서는 상하층부 사이의 계면장력의 크기에 따라 컬럼내에서의 두 층의 방향성이 달라지게 된다.

계면장력이 큰 용매 시스템, hexane/water 시스템의 경우 하층부(heavy phase)가 tail 쪽으로 향하게 되어 하층부를 이동상으로 한 경우 H → T, 상층부를 이동상으로 한 경우 T → H mode가 되며, 반면 계면장력이 매우 작은 sec-BuOH/water 시스템에서는 하층부가 head 방향으로 향하게 되어 이동상의 elution 방향은 반대가 된다(Conway, 1986). 본 실험에서는 CHCl₃/MeOH/H₂O 용매시스템에서 CHCl₃의 함량을 40%로 고정시키고 나머지 60%인 MeOH과 H₂O 부분을 100으로 하여 MeOH의 함량을 10%에서 70%까지 달리하여 10%인 경우 25.1 dynes/cm에서 70%인 경우 7.0 dynes/cm로 차이가 미미하여 컬럼내에 유지되는 고정상의 양에 영향을 미치지 않았다. 보고에 의하면 컬럼의 회전속도와 flow rate는 CCC의 효율에 크게 영향을 미치며 컬럼의 회전속도가 증가할수록, flow rate가 작을수록 컬럼내 고정상의 유지율은 증가하는 경향을 나타내었다(Oka et al., 1992; Shinomiya et al., 1993; Bousquet et al., 1991).

컬럼의 회전속도에 따른 이론단수(theoretical plate number, N)의 변화

HSCCC를 이용하여 유효 생리 활성 물질을 분리 정제하기 위한 기기 운용 조건을 최적화 하기 위하여 컬럼의 회전속도에 따라서 크로마토그래피에서 분리효율을 나타내는 지표인 이론단수(theoretical plate num-

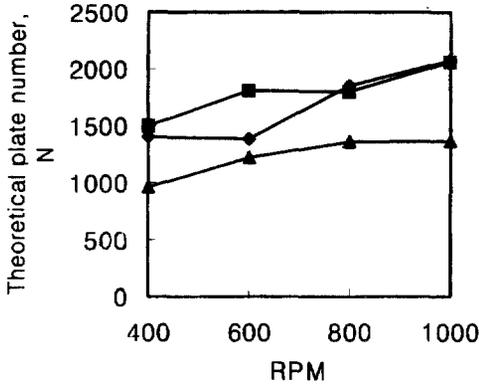


Fig. 1. Theoretical plate number (N) of ginkgo flavonoid aglycone with various rotation speed. ◆—◆: Isorhamnetin, ■—■: Kaempferol, ▲—▲: Quercetin

ber)를 비교하였다. 본 실험에 사용한 표준품은 isorhamnetin, quercetin, kaempferol의 세가지 은행잎 flavonoid를 사용하였으며 컬럼의 회전속도는 각각 400, 600, 800, 1000 rpm으로 하였다. HPLC에서는 고정상의 부피가 일정하므로 resolution은 주어진 solute에 대한 이론단수(N)값에 의해서만 결정되며 따라서 N값은 HPLC의 resolution을 나타내는 유일한 parameter가 된다. 그러나 CCC에서는 실험조건에 따라서 컬럼내 체류되는 고정상의 양이 달라지므로 solute의 resolution은 N값과 컬럼내 체류되는 고정상의 유지율 같은 여러 요인에 의해서 결정된다(Oka et al., 1992).

컬럼의 회전속도에 따른 이론단수값의 변화는 Fig. 1과 같다. 400 rpm에서 1000 rpm까지 증가시키면서 분리효율을 비교한 결과 rpm이 증가할수록 N 값이 증가하여 HSCCC의 분리효율을 높이기 위해서는 가급적 rpm을 높이는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

컬럼의 회전속도에 따른 resolution (Rs)의 변화

HSCCC를 이용한 유효 생리 활성 물질을 분리 정제하기 위한 기기 운용 조건을 최적화 하기 위하여 컬럼의 회전속도에 따른 분리능(resolution, Rs)을 크로마토그램에서 계산하여 비교하였다. 크로마토그램 상에서 이웃한 두 peak인 isorhamnetin과 kaempferol, kaempferol과 quercetin 사이의 분리능을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 컬럼의 회전속도가 400 rpm에서 1000 rpm으로 증가됨에 따라서 분리능도 비례하여 증가하는 경향을 보였다. Isorhamnetin/kaempferol의 경우 400 rpm에서 1.48에서 1000 rpm일 때 2.54로 증가하였으며 kaempferol/quercetin의 경우 400 rpm 일 때 3.37에서 1000 rpm 일 때 5.15로 증가하여 증가폭이 Isorhamnetin/

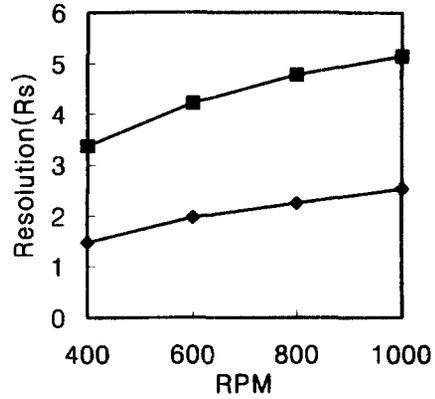


Fig. 2. Resolution (Rs) of ginkgo flavonoid aglycone with various rotation speed. ◆—◆: Isorhamnetin/Kaempferol, ■—■: Kaempferol/Quercetin

kaempferol에 비하여 크게 나타났다.

컬럼의 회전속도에 따른 크로마토그램 비교

Fig. 3은 컬럼의 회전속도에 따른 은행잎 flavonoids의 크로마토그램 패턴을 나타낸 것이다. 컬럼의 회전속도의 변화가 크로마토그램 상의 피크의 체류시간에 큰 영향을 주지는 않았다. 앞의 실험 결과에서 컬럼의 회전속도가 증가함에 따라서 고정상의 유지율도 비례하여 증가하는 경향을 나타내었다. 고정상이 증가한다는 것은 분리하고자 하는 물질이 이동상과 더불어 컬럼내를 흘러가면서 친화력의 차이에 따라 이동할 때 고정상으로 분획될 수 있는 물질의 양이 증가한다는 의미가 된다. 이는 회전속도의 증가로 인한 컬럼내

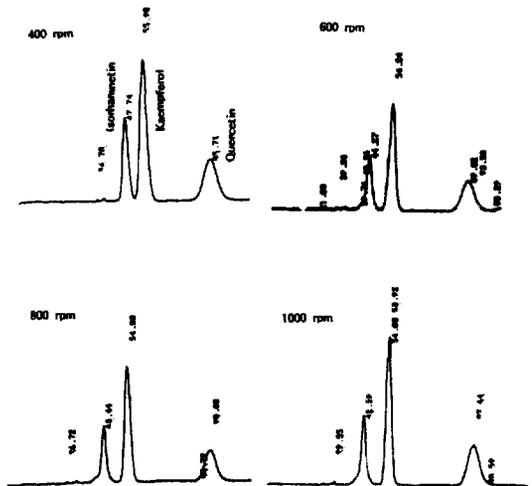


Fig. 3. HSCCC chromatograms of ginkgo flavonoid aglycone with various rotation speed.

Table 3. Retention of stationary phase in column by flow rate of mobile phase for solvent system with various methanol content (600 rpm)

Mobile phase (Elution mode)	% MeOH ^a	Interfacial tension (dynes/cm)	Flow rate (ml/min)				
			0.5	1.0	2.0	3.0	5.0
Lower phase (H → T) ^b	10	25.1	87	82	82	80	75
	20	18.6	86	82	82	79	74
	30	17.6	87	85	83	80	75
	40	14.6	88	86	83	81	78
	50	9.9	88	83	83	81	76
	60	7.0	88	86	82	80	75
Upper phase (T → H) ^c	10	25.1	95	89	75	0	0
	20	18.6	94	0	0	0	0
	30	17.6	94	92	0	0	0
	40	14.6	93	91	87	83	0
	50	9.9	92	89	86	79	0
	60	7.0	91	88	86	82	0

a: % MeOH in H₂O for CHCl₃/Aqueous MeOH-4: 6 system

b: Head to tail

c: Tail to head

부에서의 혼합, 분리 횟수의 증가와 더불어 컬럼의 분리 효율과 피크의 분리능을 증가 시키는 요인이 된다. 그러나 400~1000 rpm의 회전속도 범위는 고정상의 유지율이 75~85%로 비교적 큰 차이가 나지 않고 고르게 분포하여 본 실험에서 직접적인 피크의 체류시간의 증가로 나타나는 것은 적은 것으로 판단되었다.

이동상의 유속에 따른 stationary phase retention (S_r)의 변화

CCC 운용 시 물질의 분리능은 용매시스템 이외에 이동상의 유속에 의해서 많은 영향을 받게 된다. Table 3은 이동상의 유속에 따른 컬럼내에 유지되는 고정상의 비율을 나타낸 것이다. 이동상의 유속이 증가할수록 컬럼내 유지되는 고정상의 비율이 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 하층부를 이동상으로 하여 H → T 방향으로 흘린 경우 이동상 유속 0.5 ml/min에서는 86~88%의 컬럼내 유지율을 나타내었으며 5.0 ml/min의 유속에서는 74~78%의 컬럼내 고정상 유지율을 나타내었다. 상층부를 이동상으로 한 T → H 방향의 경우 이동상의 유속이 증가함에 따라 감소하는 고정상의 컬럼내 체류량이 상층부를 이동상으로 한 T → H 방향보다 감소하였으며 특히 20% MeOH 함유 용매시스템에서는 이동상 유속 1 ml/min 이상에서는 고정상이 이동상과 함께 떨어져나와 컬럼내에 유지되지 않았다. 구성 용매중 MeOH와 H₂O의 함량을 조절하여 용매시스템의 극성을 달리하여 이동상의 유속이 컬럼내 고정상 유지율에 미치는 영향을 알아본 결과 크게 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

용매시스템의 phase distribution에 미치는 여러 요인 중 특히 두 층 사이의 계면장력(interfacial tension)이 매우 중요한 역할을 한다. 두 층 사이의 계면장력이 크면 컬럼의 회전 시 두 층의 분리, 혼합속도가 빨라지게 되고(평형에 이르는 속도가 빠르므로), 반대로 계면장력이 작으면 두 층 사이의 유화현상이 발생하여 혼합된 두층이 충분히 분리되지 못하고 고정상이 이동상과 함께 떨어져나오는 현상이 발생한다(Ito와 Bowman, 1973).

이동상의 유속에 따른 이론단수(N)의 변화

HSCCC를 이용하여 유효 생리 활성 물질을 분리 정

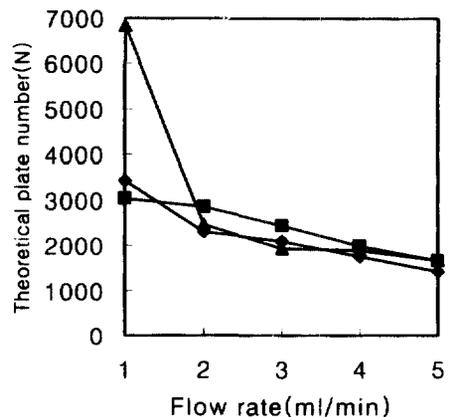


Fig. 4. Theoretical plate number (N) of ginkgo flavonoid aglycone with various flow rate of mobile phase. ◆—◆: Isorhamnetin, ■—■: Kaempferol, ▲—▲: Quercetin

제하기 위한 기기 운용 조건을 최적화 하기 위하여 컬럼내 이동상 용매의 유속에 따라서 크로마토그래피에서 분리효율을 나타내는 지표인 이론단수(theoretical plate number, N)를 비교하였으며 그 결과는 Fig. 4와 같다. 표준품으로는 은행잎으로부터 분리된 세가지 은행잎 flavonoid, isorhamnetin, quercetin, kaempferol를 사용하여 이동상의 유속을 각각 1, 2, 3, 4, 5 ml/min로 하였다. 전반적으로 이동상의 유속이 증가함에 따라서 이론단수가 감소하는 경향을 나타내었으며 특히 이동상 유속 1, 2, 3 ml/min의 영역에서 감소 폭이 크게 나타났다. 이론단수는 앞에서의 관계식에 보듯이 피크의 체류시간의 함수이다. 피크의 체류시간은 컬럼내에 유지되는 고정상의 양과 밀접한 관계가 있다.

이동상의 유속이 빨라지면 자연 이동상과 더불어 떨어져나가는 고정상의 양이 증가하게 되어 N값이 감소하게 된다.

이동상의 유속에 따른 resolution (Rs)의 변화

HSCCC를 이용한 유효 생리 활성 물질을 분리 정제하기 위한 기기 운용 조건을 최적화 하기 위하여 이동상 용매의 유속에 따른 분리능(resolution, Rs)를 크로마토그램에서 계산하여 비교하였다. 크로마토그램 상에서 이웃한 두 피크인 isorhamnetin과 kaempferol, kaempferol과 quercetin 사이의 분리능을 비교한 결과는 Fig. 5와 같다. 컬럼내 이동상의 유속이 1 ml/min에서 5 ml/min으로 증가함에 따라서 분리능이 감소하는 경향을 보였다. Isorhamnetin/kaempferol의 경우 이동상 유속 1 ml/min에서 6.45에서 5 ml/min일 때 3.73으로 감소하였으며 kaempferol/quercetin의 경우 1 ml/min 일 때 14.1에서 5 ml/min 일 때 8.17로 감소하였다. 이동

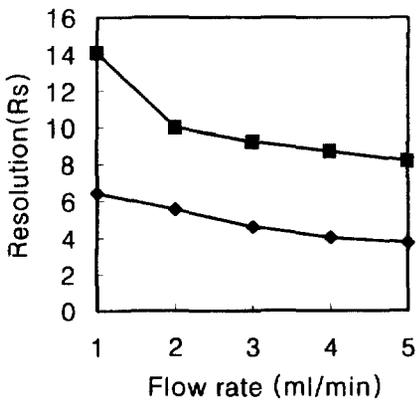


Fig. 5. Resolution(Rs) of ginkgo flavonoid aglycone with various flow rate of mobile phase. ◆—◆: Isorhamnetin/Kaempferol, ■—■: Kaempferol, Quercetin

상의 유속 증가는 컬럼내에 고정상유지율의 감소를 동반하게 되며, 이는 물질을 분획해 낼 수 있는 고정상의 용량을 감소시키게 되어 피크의 분리능을 떨어뜨리는 결과를 초래한다.

이동상 유속에 따른 크로마토그램 비교

Fig. 6은 컬럼내 이동상의 유속에 따른 은행잎 flavonoids의 크로마토그램 패턴을 나타낸 것이다. 이동상의 유속이 증가함에 따라 각 피크들의 체류시간이 크게 감소하였다. 이동상의 경우 고정상과 달리 계속해서 많은 양이 새로 공급되므로 물질을 분획해내는 용량이 고정상과는 비교할 수 없을 정도로 크며 따라서 고정상의 컬럼내 유지율이 피크 체류시간에 거의 영향을 미치지 않은 것과 달리 이동상의 유속 변화는 피크의 체류 시간에 크게 영향을 미친다.

따라서 분리 용량 및 분리능 등을 고려하여 최적 분리 조건을 결정하는 것이 매우 중요한 것으로 판단되었다.

Elution 방식에 따른 영향

HSCCC 운용 시 이동상의 elution 방향에 따른 컬럼내 고정상의 유지율을 알아보기 위하여 2상계 용매시스템을 각각 H → T 방향과 T → H 방향으로 하여 컬럼내에 유지되는 고정상의 양을 비교하여 효율적인 용매의 elution 방향을 선정하고자 하였으며 그 결과는 Table 4, 5와 같다. 상층부를 이동상으로 선택한 경우에는 T → H 방향이 효과적인 컬럼내 이동상 유지율을 나타내었으나 반대로 H → T 방향에서는 고정상이 거의 모두 이동상과 함께 떨어져나와 유지율이 0에 가까웠다. 하층부를 이동상으로 선택한 경우에는 H → T 방향이 효과적인 고정상 유지율을 나타내었으며

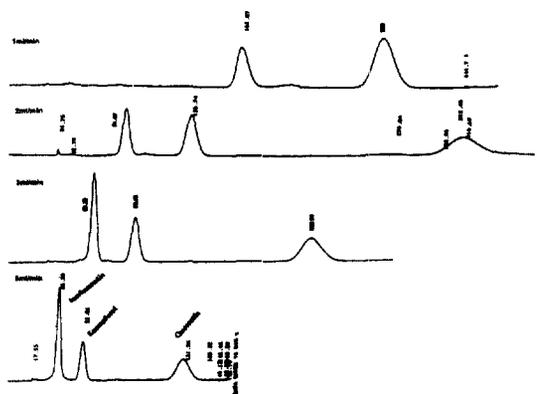


Fig. 6. HSCCC chromatogram of ginkgo flavonoid aglycones with various flow rate of mobile phase.

Table 4. Stationary phase retention in column with various rotation speed (Flow rate: 1 ml/min)

Elution mode		Column rotation speed (rpm)			
		200	400	600	800
Upper mobile	H → T	14	11	4	2
	T → H	0	64	88	91
Lower mobile	H → T	57	73	81	84
	T → H	0	0	6	3

Solvent system: CHCl₃:MeOH:H₂O (4:3:2)**Table 5. Stationary phase retention in column with various flow rate of mobile phase**

Elution mode		Flow rate (ml/min)			
		0.5	1.0	1.5	2.0
Upper mobile	H → T	6	4	3	2
	T → H	91	88	86	85
Lower mobile	H → T	90	87	83	83
	T → H	0	0	0	0

CHCl₃:MeOH:H₂O (4:3:2), 600 rpm

T → H 방향하에서는 고정상이 유지되지 않았다. HSCCC의 elution 방향은 일반적으로 용매시스템에 따라서 달라진다. 문헌에 의하면 hexane/water와 같은 hydrophobic 용매시스템의 경우 상층부를 이동상으로 하였을 경우 T → H 방향이 적합하고, 하층부를 이동상으로 하였을 경우에는 H → T 방향이 적합한 elution 방향이고 butanol/water와 같은 hydrophilic 용매시스템의 경우에는 그 반대가 된다. Intermediate solvent system의 경우에는 기기의 configuration parameter인 β값 (r/R)에 따라 달라지게 된다(Ito, 1973; Ito, 1984). 본 실험에서 적용한 용매시스템인 CHCl₃/MeOH/H₂O 용매시스템은 hydrophobic system으로 hexane과 같은 elution 방향을 따르게 된다.

요 약

본 연구는 기존의 HPLC방법과는 달리 고정상과 이동상이 모두 액상으로 구성되어 분리하고자 하는 물질의 활성을 상실하지 않고 비교적 높은 순도로 분리, 정제할 수 있는 HSCCC 방법을 이용하여 인체에 유효한 약리작용을 나타내는 생리활성 물질을 분리하기 위한 기초 연구로써 수행 하였다.

HSCCC의 운용변수에 따른 분리 효율을 알아보기 위하여 컬럼의 회전속도, 이동상의 유속 그리고 elution 방식에 따른 분리 효과를 알아보았다. HSCCC의 분리 효율을 알아보기 위하여 고정상의 컬럼내 유지

율, 크로마토그램으로부터 산출한 이론단수 및 피크의 분리능을 비교하였다. 컬럼의 회전속도가 증가할수록 컬럼내에 유지되는 고정상의 양이 증가하였으며 이론단수(N) 및 피크분리능(R_s)이 증가하는 경향을 나타내어 컬럼의 회전속도가 HSCCC를 이용한 물질의 분리, 정제 시 매우 중요한 요소임을 알 수 있었다. 이동상의 유속이 증가할수록 물질의 체류시간은 단축되나 컬럼내에 유지되는 고정상의 양이 감소하여 분리 효율이 저하되었으며 이론단수 및 피크분리능도 비례적으로 감소하여 HSCCC를 이용한 물질의 분리, 정제 시 기기의 분리 용량과 분리능을 고려한 적절한 이동상 유속을 결정할 필요가 있었다. 이동상의 elution 방식에 따른 컬럼내 고정상 유지율을 측정된 결과 본 실험에서 사용한 CHCl₃/MeOH/H₂O 용매시스템하에서는 상층부를 이동상으로 선택한 경우 tail에서 head쪽 방향, 하층부를 이동상으로 택한 경우에는 head에서 tail쪽 방향이 효과적인 elution 방향임을 알 수 있었다.

참고문헌

- Bousquet, O., A.P. Foucault and F.L. Goffic. 1991. Efficiency and resolution in countercurrent chromatography. *J. Liquid Chromatog.*, **14**(18), pp. 3343-3363.
- Conway, W.D. 1990. *Countercurrent Chromatography*. VCH Publishers Inc, New York.
- Craig, L.C. and O. Post 1949. Apparatus for countercurrent distribution. *Anal. Chem.*, **21**, 500.
- Craig, L.C., W. Hausman, E.H. Jr. Ahrens and E.J. Harfenist. 1951. Automatic countercurrent distribution equipment. *Anal. Chem.*, **23**, 1236.
- Ito, Y., M. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, E. Kimura and K. Nunogaki. 1966. The coil planet centrifuge. *Nature*, **212**, December, 3, p. 985.
- Ito, Y. 1986. High-speed countercurrent chromatography. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, Vol 17, Issue 1, 65.
- Ito, Y. 1992. Discrepancy between the theoretical plate number (N) and peak resolution (R_s) for optimizing the flow rate in countercurrent chromatography. *J. Liquid Chromatog.*, **15**(15 & 16), pp. 2707-2719.
- Ito, Y., and R.L. Bowman. 1973. Countercurrent chromatography with the Flow-through coil planet centrifuge. *J. Chromatographic science.*, Vol 11, June, 284.
- Ito, Y. 1984. Experimental observations of the hydrodynamic behavior of solvent systems in high-speed countercurrent chromatography. I. Hydrodynamic distribution of two solvent phases in a helical column subjected to two types of synchronous planetary motion. *J. Chromatography*, **301**, pp. 377-386.
- Ito, Y. 1984. Experimental observations of the hydrodynamic behavior of solvent systems in high-speed countercurrent chromatography. II. Phase distribution diagrams for he-

- lical and spiral columns. *J. Chromatography*, **301**, pp. 387-403.
- Martin, A.J.P. and R.L.M. Synge. 1941. A new form of chromatogram employing two phases. *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941).
- Oka, H., Y. Ikai, J. Hayakawa, K.I. Harada, K. Nagase, M. Suzuki, H. Nakazawa, K. Shinomiya, J.M. Menet, H.M. Fales. and Y. Ito. 1993. Studies on a new cross-axis coil planet centrifuge for performing counter-current chromatography, I. Design of the apparatus, retention of the stationary phase, and efficiency in the separation of proteins with polymer phase systems *J. Chromatog.*, **644**, pp. 215-229 (1993).