

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 11월 30일 (30.11.2023)



(10) 국제공개번호

WO 2023/229255 A1

(51) 국제특허분류:

C07D 311/86 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/006086

(22) 국제출원일:

2023년 5월 4일 (04.05.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0064738 2022년 5월 26일 (26.05.2022) KR

(71) 출원인:

경상국립대학교산학협력단

(IN-)

DUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 김광동 (KIM, Kwang Dong); 52650 경상남도

진주시 새평거리 30, 109동 2704호, Gyeongsangnam-do (KR). 김정윤 (KIM, Jeong Yoon); 52829 경상남도 진주시 내동로348번길 10, 111동 903호, Gyeongsangnam-do (KR). 문성용 (MUN, Sungyong); 06276 서울특별시 강남구 선릉로 221, 103동 1007호, Seoul (KR). 조철연 (JO, Cheol Yeon); 04764 서울특별시 성동구 삼골이길 356, 203호, Seoul (KR). 김민주 (KIM, Min ju); 52731 경상남도 진주시 초북로 55, 402동 901호, Gyeongsangnam-do (KR). 이시현 (LEE, Sihyeon); 52764 경상남도 진주시 도동천로 310, 1동 614호, Gyeongsangnam-do (KR). 김주연 (KIM, Ju Yeon); 52685 경상남도 진주시 축석로158번길 4-2, 2층, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전광역시

서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의

국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의

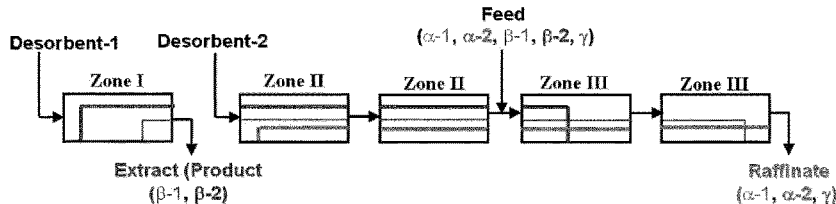
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

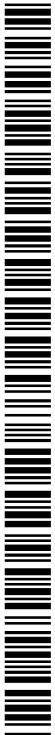
(54) Title: METHOD FOR SEPARATING BETA-MANGOSTIN WITH HIGH PURITY AND HIGH EFFICIENCY BY USING SMB PROCESS AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: SMB 공정을 이용한 고순도 및 고효율의 베타-망고스틴 분리방법 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a method for separating beta-mangostin with high purity and high-efficiency by using a simulated moving bend (SMB) process and use thereof, wherein the use of a beta-SMB process and a post-treatment process in the present invention enables the collection of high-purity beta-mangostin and allows a continuous process compared with general batch chromatography, thereby improving the productivity of beta-mangostin.

(57) 요약서: 본 발명은 SMB (simulated moving bed) 공정을 이용한 고순도 및 고효율의 베타-망고스틴 분리방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 beta-SMB 공정 및 후처리 공정을 이용하면 높은 순도의 베타-망고스틴을 회수할 수 있고, 일반적인 회분식 크로마토그래피와 비교하여 연속공정이 가능함에 따라 베타-망고스틴의 생산성을 향상시킬 수 있을 것이다.



WO 2023/229255 A1

명세서

발명의 명칭: SMB 공정을 이용한 고순도 및 고효율의 베타-망고스틴 분리방법 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 망고스틴 이성질체 성분의 혼합물로부터 최적화된 모사 이동층(simulated moving bed) 크로마토그래피 공정을 이용하여 베타-망고스틴을 고순도 및 고효율로 분리할 수 있는 방법에 관한 것이다.
- [2]
- [3] 본 결과물은 교육부의 한국연구재단 산학연협력고도화지원(R&D) 사업 및 농촌진흥청의 바이오그린연계농생명혁신기술개발 사업의 지원을 받아 연구되었습니다(과제번호: BRIDGE-2021-B04 및 PJ015731).

배경기술

- [4] 천연과일 열매인 망고스틴(*Garcinia mangostana*)의 과피 추출을 통해 산업적 활용 가치가 높은 망고스틴 이성질체 성분(알파, 감마, 베타 망고스틴)들을 확보할 수 있다. 이 중 알파-망고스틴은 소염제, 항산화제, 항암제 등의 제조에 적용 가능한 것으로 알려져 있으며, 베타-망고스틴은 펠라닌의 생성과 관련된 티로시나제(tyrosinase)와 TRP-1 (tyrosinase-related protein-1)의 활성을 저해하여 피부 미백 효과를 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [5] 최근 베타-망고스틴에 대한 관심이 증가하고 있으며 베타-망고스틴의 잠재적 가치와 산업적 유용성을 극대화하기 위해서는 베타-망고스틴에 대한 고순도 생산체제 구축이 필수적이다. 더 나아가 베타-망고스틴 생산 공정의 상용화 촉진과 경제성 확보를 위해서는 고순도 분리 조건 이외에 대량 생산을 위한 높은 수준의 처리속도(throughput)와 고수율(high yield) 확보 조건들이 추가로 요구된다.
- [6] 현재까지 천연원료 추출액으로부터 망고스틴 성분의 분리를 위해 적용되어 온 공정들은 대부분 회분식(batch) 크로마토그래피 공정이다. 이 공정에서는 1개의 유입구(inlet port)와 1개의 유출구(outlet port)가 설치된 흡착제 컬럼에 혼합물을 일정시간 동안만 주입한 후 이들이 컬럼 외부로 모두 배출될 때까지 이동상(mobile phase) 용매를 지속적으로 주입한다. 주입된 이동상 용매는 컬럼 내 빈 공간을 지나 유출구로 배출된다. 이 과정에서 이동상에 존재하는 목표 성분(target component)과 불순물 성분들(impurities)이 흡착제와 서로 다른 상호작용을 하게 되어 궁극적으로 각 성분들 간의 진행속도에 차이를 가져오게 되고, 이와 같은 각 성분들 간 진행속도의 차이를 이용하여 목표 성분만을 분리하게 된다. 상기 회분식 크로마토그래피 공정의 경우 고순도 및 고수율의 동시 확보가 어려울 뿐만 아니라 흡착제 효율성이 매우 낮고 용매 사용량이 매우 크다. 또한 회분식 운전에 기초하고 있기 때문에 정상상태(steady state)의 유지가 불가능하여 공정 운용 관리와 자동화 시스템 구축에 많은 제약이 따르는 것으로 알려져 있다. 더 나

아가 회분식 운전모드의 내재적 한계로 인해 처리속도 향상에 많은 제약이 있을 수밖에 없다.

- [7] 이와 같은 회분식 공정의 단점들을 극복하기 위해서는 다수의 컬럼과 다수의 포트(port)를 조합하여 이동상과 흡착제상이 서로 역방향으로 교차하게 하고 이를 바탕으로 혼합물의 연속 주입과 목표 성분의 고순도 연속 회수를 가능하게 해 줄 수 있는 공정 방식을 채택할 필요가 있다. 이와 같은 공정 방식의 대표적인 것이 바로 모사 이동층(simulated moving bed, SMB) 크로마토그래피 공정(도 1)이며 이 공정은 미국 및 유럽의 바이오, 제약, 정밀화학 산업 등의 분야에서 그 가치를 인정받고 있다.

- [8] 한편, 한국등록특허 제1743063호에는 '유사이동층 흡착 분리방법을 이용한 크레졸 이성질체의 분리 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1837446호에는 회분식 분리 방법이 기재된 '알파-망고스틴, 베타-망고스틴, 감마-망고스틴 또는 가르탄닌 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 주름 개선 또는 피부 보습용 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 'SMB 공정을 이용한 고순도 및 고효율의 베타-망고스틴 분리방법 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 망고스틴 과피 추출액(crude 망고스틴 혼합물)으로부터 베타-망고스틴만을 고순도 및 고효율로 연속분리해낼 수 있는 고성능 고효율의 "베타-망고스틴 분리 SMB 공정"을 개발하고자 하였다.
- [10] 이를 위해 목표 성분 분리에 적합한 흡착제와 용매를 선정하였고, 원료(조추출물) 구성 성분들의 동적 거동 예측 모델 및 관련 파라미터를 결정한 후 이에 기반한 SMB 공정의 최적 운전 조건을 설계하였으며, 최적 운전 조건을 갖춘 SMB 공정 장치를 제작하였다. 그 후, 최적설계 결과 및 제작된 SMB 장치에 대한 실험적 검증 실시하였으며, SMB 공정 산물에 대한 후처리 공정을 확립하여, 원료인 조추출물 시료 내 베타-망고스틴 성분을 96% 이상의 순도로 회수할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 망고스틴 추출물 원료를 모사 이동층(simulated moving bed) 크로마토그래피에 적용하여 베타-망고스틴을 분리하는 단계를 포함하는, 베타-망고스틴(β -mangostin)의 분리 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명에서 개발된 beta-SMB 공정을 이용하면 원료(조추출물) 내 포함되어 있는 베타-망고스틴과 다른 망고스틴 성분들(알파, 감마)을 높은 효율로 분리할 수 있을뿐만 아니라 알려지지 않은 불순물의 상당 부분도 제거할 수 있어, 높은 순도의 베타-망고스틴을 회수할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 SMB 공정을 이용

함으로써, 일반적인 회분식 크로마토그래피와 비교하여 매우 적은 양의 용리액이 사용되고, 고농도 및 고순도의 분리가 가능하며, 연속공정이 가능함에 따라 베타-망고스틴의 생산량 또한 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 일반적인 형태인 4구역 단헨 루프계 SMB 공정 구조의 모식도이다.
- [14] 도 2는 컬럼 모델 기반의 공정 설계 접근 방법에 기반을 둔 beta-SMB 공정(베타-망고스틴 분리 SMB 공정) 개발의 체계를 나타낸다.
- [15] 도 3은 beta-SMB 공정(베타-망고스틴 분리 SMB 공정)의 장치 조립 설계도이다.
- [16] 도 4는 에탄올 수용액을 이동상으로 사용하는 펄스주입 실험(흡착제: Septra C8 레진, 원료: 단일 망고스틴 시약 0.1 g/L, 원료 주입량: 200 mL)의 결과이다. (a) 이동상: 100% 에탄올, (b) 이동상: 95% 에탄올, (c) 이동상: 90% 에탄올, (d) 이동상: 85% 에탄올.
- [17] 도 5는 85% 에탄올 수용액을 이동상으로 사용하고 crude 망고스틴 혼합물 시료를 대상으로 한 펄스주입실험(흡착제: Septra C8 레진, 원료: crude 망고스틴 시료 30 g/L, 원료 주입량: 15 mL)의 결과이다.
- [18] 도 6은 beta-SMB 공정(베타-망고스틴 분리 SMB 공정)의 최적 구조이다. β -1의 앞부분과 β -2의 뒷부분을 각각 zone III와 zone I 내에 위치하게 하고 α -2의 뒷부분은 zone II 내에 위치하게 한다. 한편 γ 성분은 흡착강도가 가장 작기 때문에 잔류물(raffinate) 포트를 통해 자동 배출된다. 이러한 상황 하에서의 베타-망고스틴 성분(β -1, β -2)은 추출물(extract) 포트를 통해 회수되고 다른 망고스틴 성분들(α -1, α -2, γ)은 모두 잔류물 포트를 통해 제거된다. 매 단계마다 유입구 및 유출구 포트들이 용매의 진행방향을 따라 컬럼 한 개의 길이만큼 이동하면서 원료(feed) 혼합물의 연속주입과 베타-망고스틴 성분의 연속회수를 가능하게 한다.
- [19] 도 7은 펄스주입 실험 결과와 컴퓨터 시뮬레이션 결과와의 비교 그래프이다. 흡착제: Septra C18 레진, 이동상: 85% 에탄올, (a) α -1 (고농도 기준: crude 시료), (b) α -2 (저농도 기준: 단일 시약), (c) β -1 (고농도 기준: crude 시료), (d) β -2 (저농도 기준: 단일 시약).
- [20] 도 8은 최적설계된 beta-SMB 공정의 주기적 정상상태 컬럼 프로파일에 대한 시뮬레이션 결과를 보여준다. (a) Beginning of a switching period, (b) Middle of a switching period, (c) End of a switching period.
- [21] 도 9는 beta-SMB 공정 실험 진행 중 촬영된 장치의 사진이다.
- [22] 도 10은 베타-망고스틴 분리를 위한 beta-SMB 공정 실험의 결과이다. (a) Effluent history for extract port (product port) stream, (b) Effluent history for raffinate port (non-product port) stream.
- [23] 도 11은 beta-SMB 공정 실험 결과의 증빙을 위한 HPLC 농도 분석 크로마토그램의 원시 자료(raw data)이다. (a) 원료 용액(crude 망고스틴 시료 용액), (b) SMB product (extract) stream, (c) 베타-망고스틴 표준시약.

[24] 도 12는 prep-HPLC를 이용한 베타-망고스틴 분리 과정의 크로마토그램이다.

[25] 도 13은 prep-HPLC를 이용한 후처리 공정 실험 결과이다. (a) SMB extract (product) stream, (b) re-HPLC-1, (c) re-HPLC-2 (순도 >95%, 베타-망고스틴), (d) re-HPLC-3.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 망고스틴 추출물 원료를 모사 이동층(simulated moving bed) 크로마토그래피에 적용하여 베타-망고스틴을 분리하는 단계를 포함하는, 베타-망고스틴(β -mangostin)의 분리 방법을 제공한다.

[27] 모사 이동층(simulated moving bed, SMB) 공정은 일반적으로 2개의 유입구(feed, desorbent)와 2개의 유출구(extract, raffinate)에 의해 4개의 zone으로 구분되어 있는 형태의 구조를 가지고 있으며(도 1), 각 zone에는 미리 선별된 흡착제로 충전된 한 개 이상의 컬럼들이 연결되어 있다. 흡착제에 상대적으로 친화력이 큰 성분(high-affinity solute)은 이동상 용매(용리액)의 흐름방향을 따라 느린 속도로 이동하는 반면, 친화력이 작은 성분(low-affinity solute)은 빠른 속도로 이동하게 된다. 이 때 4개의 포트를 이동상의 흐름방향을 따라 일정한 시간 간격을 두고 컬럼 한 개의 길이만큼 이동시키고, 그 이동 속도(= column length/port switching time)를 친화력이 큰 성분의 속도보다는 크고 친화력이 낮은 성분의 속도보다는 작도록 선택한다. 이와 같은 조건이 유지되면, 친화력이 큰 성분은 항상 원료(feed) 포트보다 뒤처지기(lag behind) 때문에 추출물(extract) 포트에서 회수되고, 반면에 친화력이 낮은 성분은 항상 원료 포트보다 앞서나가기(advance beyond) 때문에 잔류물(raffinate) 포트에서 얻어지게 된다. 그 결과 원료 혼합물은 항상 친화력이 큰 성분과 친화력이 작은 성분들의 중복 지역(overlapping region)에 주입되고 동시에 잔류물과 추출물은 항상 분리 지역(separated region)에서 얻어지게 된다. 이와 같은 상태가 지속적으로 유지될 경우 원료 혼합물의 연속주입과 각 목표 성분(product)의 연속회수가 가능하게 된다. 아울러 SMB 컬럼 내에서 서로 다른 두 성분(high-affinity solute와 low-affinity solute)의 solute band들이 완벽히 분리되지 않고 일부만 분리되는 partial-separation의 상황 하에서도 고순도 및 고수율의 목표 성분 회수가 가능하게 된다.

[28] 본 발명에 따른 SMB 공정은 개방형(open-loop)으로, 이동상이 재순화되지 않는 시스템이다. 개방형을 선택하면 zone I을 오염으로부터 보호하고 운전 중 문제가 생겼을 때 유량을 조절하기 용이한 장점을 지니고 있다.

[29] 본 발명에 따른 베타-망고스틴의 분리 방법에 있어서, 상기 망고스틴 추출물은 베타-망고스틴 및 이의 이성질체 혼합물이 포함된 것일 수 있으며, 상기 이성질체는 알파-망고스틴 및 감마-망고스틴일 수 있다.

[30] 본 발명에서는 분리가 어려운 망고스틴 이성질체의 혼합물로부터 베타-망고스틴만을 고순도로 분리하기 위해 모사 이동층 크로마토그래피를 사용하였다.

[31] 본 발명의 일 구현 예에 따른 베타-망고스틴의 분리 방법은,

- [32] 모사 이동층 크로마토그래피에 적용된 흡착 칼럼에 대한 알파-망고스틴 및 베타-망고스틴의 흡착계수 및 물질전달계수를 결정하는 단계(단계 1);
- [33] 상기 단계 1에서 결정된 흡착계수 및 물질전달계수를 유전자알고리즘(genetic algorithm) 및 컬럼 모델식을 바탕으로 모사 이동층 전산모사 프로그램에 적용하여 모사 이동층 크로마토그래피 공정의 운전조건을 계산하는 단계(단계 2); 및
- [34] 모사 이동층 크로마토그래피에 망고스틴 추출물 원료와 용리액을 공급하고 상기 단계 2에서 계산된 운전조건을 적용하여 베타-망고스틴을 분리하는 단계(단계 3);를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 단계 1의 흡착 컬럼은 C18이 코팅된 실리카를 고정상으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구현예에서 상기 C18이 코팅된 실리카는 베타-망고스틴과 다른 망고스틴 성분들 간의 분리와 연속공정 적용 가능성 면에서 가장 적합한 흡착제인 것으로 확인되었다. 더 나아가 연속공정 적용을 위해 흡착제의 입자크기는 50 μm 이상이어야 하며, 저압(low pressure) 하에서도 충분한 수준의 분리선택도를 보장할 수 있어야 한다는 점을 확인하였다.
- [36] 또한, C18이 코팅된 실리카를 고정상으로 포함하는 흡착 칼럼에 대한 알파-망고스틴 및 베타-망고스틴의 흡착계수(헨리상수)는 펄스주입 실험 데이터(도 4d, 및 도 5)로부터 확인된 각 성분의 체류시간과 용질운동이론(solute movement theory)을 이용하여 결정하였고, C18이 코팅된 실리카를 고정상으로 포함하는 흡착 칼럼에 대한 알파-망고스틴 및 베타-망고스틴의 물질전달계수는 Chung and Wen correlation 및 컴퓨터 시뮬레이션 결과 등을 이용하여 산출하였다(표 2).
- [37] 또한, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단계 2의 컬럼 모델식은 일괄 대량 이동 모델(lumped mass-transfer model)일 수 있고, 모사 이동층 전산모사 프로그램은 Aspen Chromatography™ 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 단계 2에서 계산된 모사 이동층 크로마토그래피의 운전조건은 표 3과 같다.
- [38] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 단계 3의 용리액은 C1~C4의 저급 알코올일 수 있고, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올일 수 있고, 보다 더 바람직하게는 80~95%(v/v) 에탄올일 수 있고, 가장 바람직하게는 85%(v/v) 에탄올일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 에탄올은 C18이 코팅된 실리카를 고정상으로 포함하는 흡착 칼럼 조건에서 베타-망고스틴과 이의 이성질체간 분리선택도가 우수하게 확인된 것으로서, 흡착 칼럼의 종류에 따라 당업계에 통상적으로 사용되는 다른 종류의 용리액으로 변동 가능할 수 있다.
- [39] 또한, 본 발명에 따른 베타-망고스틴의 분리 방법은, 상기 단계 3의 모사 이동층 크로마토그래피 후 용리된 산물(product)을 대상으로 리사이클링 프랩 HPLC(Recycling Preparative HPLC)를 추가로 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [40] 기존의 프랩 HPLC(Preparative HPLC)는 펌프에서 나오는 용매와 매뉴얼(manual) 인젝터에서 주입된 시료가 혼합되어 흐르면서 컬럼에서 분리가 이루어

지고, 이 분리된 상황을 검출기로 확인한 후 바로 분취를 수행하는 시스템이었다. 그러나, 리사이클링 프랩 HPLC의 경우 재순환 시스템을 자동 재순환기(auto recycler)가 조절하여 분리가 이루어지지 않은 시료의 경우 곧바로 컬럼에 재주입하는, 즉 분리가 이루어지지 않은 시료를 분리가 이루어질 때까지 컬럼에 재순환하는 원리의 방법이다. 또한, 리사이클링 프랩 HPLC의 순환 과정에서 첫 cycle의 컬럼에서 두 번째 cycle의 컬럼까지의 넓은 용적을 시료가 확산 등의 이유로 다시 섞이지 않고 순차적으로 분리가 이루어지게 정압을 유지시켜 용매의 소비가 전혀 이루어지지 않기 때문에 용매비용의 부담이 덜어지는 이점이 있다.

- [41] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 리사이클링 프랩 HPLC의 추가 수행은 모사 이동층 크로마토그래피 후 용리된 산물(product)에 포함된 미소 잔류물의 제거를 위해 수행될 수 있다.
- [42] 본 발명의 모사 이동층(SMB) 크로마토그래피는,
- [43] 3개의 유입구와 2개의 유출구를 구비한 3구역 개방형 SMB 크로마토그래피를 이용하고, 탈착용매(용리액)를 제1구역의 입구로 주입하며 이와 동시에 제1구역의 출구를 통해 베타-망고스틴 산물(product)을 회수하는 단계 (단계 ①);
- [44] 상기 단계 ①과 동시에 제2구역의 입구로 탈착용매를 주입하여 알파-망고스틴 및 감마-망고스틴 성분들이 한 교환시간 이내에 제2구역의 첫 번째 컬럼으로부터 탈착되어 제3구역을 향하여 진행해 나갈 수 있도록 하는 단계 (단계 ②); 및
- [45] 상기 단계 ②와 동시에 망고스틴 시료 용액을 공급액 주입구를 통해 제3구역으로 주입하며 이와 동시에 망고스틴 시료 내 베타-망고스틴 성분의 이동 구간 범위를 제3구역 내로 한정하게 하고 반면 알파-망고스틴과 감마-망고스틴 성분은 한 교환시간 내에 제3구역 출구 지점을 지나 외부로 배출될 수 있도록 하는 단계 (단계 ③);를 포함하는 3구역 개방형 SMB 크로마토그래피로 이해될 수 있다.
- [46] 상기 본 발명에 따른 베타-망고스틴의 분리 방법의 통해, 베타-망고스틴을 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 96% 이상의 고순도로 분리할 수 있으며, 일반적인 회분식 크로마토그래피와는 달리 생산수율이 우수하여 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 96% 이상의 수율을 나타낼 수 있어 대량생산이 가능하며, 이를 통해 상기 분리 방법이 상업적으로 이용하기 적합함을 알 수 있다.

- [47]
- [48] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[49]

[50] 재료 및 방법

[51] 1. 이론적 접근 방법

- [52] 본 발명의 목표인 beta-SMB 공정(베타-망고스틴 분리 SMB 공정) 개발을 위해 도 2에 개시한 바와 같은 "컬럼 모델 및 파라미터 기반의 공정 설계 접근 방법"을 전체적인 진행 방식으로 채택하였다. 본 발명의 공정 개발 과정은 크게 흡착제와 이동상의 용매 선별, 선정된 흡착제상에서의 각 성분(알파, 베타, 감마 망고스틴)

의 기초 파라미터 결정, 결정된 기초 파라미터 정보를 바탕으로 한 beta-SMB 공정의 최적설계 및 이론적 검증, 최적설계 결과에 부합하는 beta-SMB 장치의 제작 및 이를 바탕으로 한 실험적 검증과 스케일업(scale-up) 등의 4단계로 구분된다. 각 단계마다 컬럼 모델과 파라미터에 기초한 체계적인 접근 방식을 사용함으로써 공정 설계 결과에 대한 재현성과 신뢰성이 유지되도록 하였다.

[53]

[54] **1-1. 컬럼 모델에 기반을 둔 컴퓨터 시뮬레이션**

[55] beta-SMB 공정 개발의 여러 단계에서 컬럼 모델 기반의 컴퓨터 시뮬레이션이 중요한 역할을 수행하며, 핵심이 되는 부분은 다음과 같다: 주요 망고스틴 성분의 기초파라미터 값 검증, SMB 최적설계, SMB 농도 프로파일 예측.

[56] 시뮬레이션은 컬럼 내 각 성분의 이동 거동(transport behavior)에 대한 수학적 모델식, 이른바 컬럼 모델식의 해(solution)를 산출하는 과정으로서, 컬럼 모델식 자체가 연립 편미분방정식으로 구성되어 있기 때문에 컴퓨터를 기반으로 하는 수치해석적 전산도구의 사용이 필수적이다.

[57] 컬럼 모델과 관련하여 몇 가지 모델식들이 문헌에 소개된 바 있다. 그 중에서 정확성과 계산 효율성이 검증된 lumped mass-transfer model을 본 발명의 컬럼 모델식으로 채택하였다. 채택된 lumped mass-transfer model 방정식의 구성은 다음과 같다 (Z. Ma et al., AIChE J. 1997, 43:2488-2508; Benjamin J. Hritzko et al., AIChE J. 2002, 48:2769-2787; Y. Xie et al., Ind. Eng. Chem. Res. 2003, 42:4055-4067; S. Mun et al., J. Chromatogr. A 2012, 1230:100-109).

[58]

$$\varepsilon_b \frac{\partial C_{b,i}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_b) K_{f,i} (C_{b,i} - C_i^*) + u_0 \varepsilon_b \frac{\partial C_{b,i}}{\partial z} - \varepsilon_b E_{b,i} \frac{\partial^2 C_{b,i}}{\partial z^2} = 0 \quad (1a)$$

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_i^*}{\partial t} + (1 - \varepsilon_p) \frac{\partial q_i}{\partial t} = K_{f,i} (C_{b,i} - C_i^*) \quad (1b)$$

[59] 위의 식에서 아래 첨자 i 는 용질(solute)을 나타내며, $C_{b,i}$ 와 C_i^* 는 각각 inter-particle void (이동상)와 intra-particle void (pore phase) 내에서의 용질 액상 농도, q_i 는 pore phase 내 액상 농도와 평형 관계인 흡착제상(adsorbent phase)에서의 농도를 일컫는다. 평형 상태에 있는 액상 농도와 흡착제상의 농도 간의 관계는 흡착 모델식(adsorption model equation)으로 표현된다. 한편 위의 컬럼 모델식 내 K_f 는 lumped mass-transfer coefficient이며 다음과 같은 방법으로 그 값을 계산할 수 있다.

[60]

$$\frac{1}{K_f} = \frac{(d_p/2)^2}{15 K_e \varepsilon_p D_p} + \frac{(d_p/2)}{3k_f} \quad (2)$$

[61]

위의 식에서 d_p 는 흡착제 입자의 지름을 나타내며, D_p 와 k_f 는 각각 intra-particle diffusivity와 film mass-transfer coefficient를 일컫는다.

- [62] 상기 설명한 컬럼 모델식을 바탕으로 한 단일컬럼 시뮬레이션과 SMB 공정 시뮬레이션은 Aspen Chromatography Simulator를 이용하여 수행하였다.
- [63]
- [64] **1-2. SMB 공정의 최적설계**
- [65] 여러 개의 흡착제 컬럼과 다수의 포트에 이루어진 연속분리공정의 최적화와 관련하여 기존의 전통적인 최적화 기법보다는 유전자알고리즘(genetic algorithm)과 같은 확률론적(stochastic) 이론에 바탕을 둔 최적화 기법이 더욱 효과적이라는 사실이 이전에 보고된 바 있다. 특히 SMB 공정의 경우에는 유전자알고리즘에 입각한 최적화 사례가 다수 보고된 바 있으며 그 정확성이 매우 뛰어난 것으로 알려져 있다 (S. Mun et al., J. Chromatogr. A 2012, 1256:46-57; Z. Zhang et al., AIChE J 2002, 48:2800-2816; H.J. Subramani et al., Comput. Chem. Eng. 2003, 27:1883-1901).
- [66] 유전자알고리즘에 입각한 SMB 공정의 최적화는 크게 두 가지 영역으로 구분해 볼 수 있다. 첫 번째 영역은 SMB 컬럼 내 각 성분들의 동적 거동(dynamic behaviors)을 정확하게 예측해 줄 수 있는 컬럼 모델과 이 모델식의 해를 구할 수 있는 solution method이다. 두 번째 영역은 SMB의 최적 운전 변수(flow rate, switching time)를 결정하기 위해 유전자알고리즘에 입각한 단계별 절차를 밟아 최적의 운전 변수(operation parameter)에 해당되는 해를 추적해 나가는 부분이다.
- [67] 위에서 언급한 두 영역의 조합은 다음과 같은 방식으로 이루어진다. 유전자알고리즘 단계로부터 산출된 각 세대별 SMB operation parameter가 컬럼 모델식에 대입된 후 이 모델식의 수치해석적 해(numerical solutions)를 통하여 각 성분들의 분리 거동 및 SMB의 순도와 수율을 파악할 수 있게 된다. 이 결과는 다시 유전자알고리즘의 각 단계에서 최적 operation parameter를 추적하는 핵심 정보로 활용된다. 이와 같은 컬럼 모델과 유전자알고리즘의 상호 조합을 통하여 SMB 최적 operation parameter 해를 결정할 수 있게 된다. SMB 최적화 도구의 핵심인 이 두 영역에 대한 구체적인 설명을 아래에 요약하였다.
- [68] SMB 최적화 도구의 첫 번째 영역인 컬럼 모델의 경우 앞서 언급한 lumped mass-transfer model을 최적화 도구의 시뮬레이션 모델로 채택하였다. 아울러 채택된 컬럼 모델식(Eq. (1))의 수치해석적 해 산출을 위해 biased upwind differencing scheme (BUDS)과 Gear integration method에 바탕을 둔 Aspen Chromatography simulator를 사용하였다.
- [69] SMB 최적화 도구의 두 번째 영역인 유전자알고리즘은 그 동안 여러 차례의 개선을 이루어 왔으며 그 중 가장 최신의 버전은 바로 NSGA-II-JG (elitist nondominated sorting genetic algorithm with jumping gene)이다 (R.B. Kasat et al., Comput. Chem. Eng. 2003, 27:1785-1800; S. Mun et al., 2012). 본 발명에서는 NSGA-II-JG 알고리즘에 기반을 둔 SMB 최적화 전산 도구를 Visual Basic Application (VBA) 프로그래밍 언어를 사용하여 제작하였다. 이 과정에서 SMB 공정의 operation parameters (flow rate, switching time)를 염색체의 대상으로 설정

하였으며 이 염색체의 적합도(fitness)를 결정짓는 SMB 성능에 대한 예측은 컬럼 모델식의 해를 바탕으로 수행하였다.

[70]

[71] **2. 실험적 접근 방법**

[72] **2-1. 실험에 사용된 물질**

[73] 본 발명의 beta-SMB 공정 개발 연구에 사용된 crude 망고스틴 혼합물 시료와 단일 망고스틴 순수 시약(알파, 베타, 감마 망고스틴)은 각각 경상대학교 산학 협력단과 바이오클론(한국)으로부터 제공받았다. HPLC 농도 분석 시 이동상의 구성 용매로 사용된 아세토니트릴(acetonitrile)과 아세트산은 각각 대정화금(한국)과 Sigma-Aldrich Co.(USA)로부터 구매하였다. 본 발명의 흡착제 테스트에 사용된 실리카(silica) 레진과 Septra C18 레진은 각각 Osaka Soda Co.(Japan)와 Phenomenex Co.(USA)에서 구매하였으며 이들의 평균 입자크기는 모두 50 μm 였다. 위의 흡착제를 Bio-Chem Fluidics Co.(USA)에서 구입한 preparative-scale 컬럼(2.5x22 cm)에 충전하여 사용하였다.

[74] 본 발명의 단일컬럼 실험(펄스주입실험)에서 정상 및 역상 크로마토그래피 컬럼의 이동상 용매로 사용된 n-헥산(n-hexane), 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올은 모두 대정화금에서 구입하였다. 실험에 사용된 물은 모두 탈이온증류수(distilled deionized water, DDW)로 Millipore Co.(USA)에서 구입한 Milli-Q system으로부터 얻어 실험의 모든 부분에서 사용하였다.

[75]

[76] **2-2. 실험에 사용된 기기**

[77] ① 펄스주입실험 장치

[78] 펄스주입실험에 영런기기(한국)에서 구입한 Young-Lin HPLC 시스템을 사용하였다. Young-Lin HPLC 시스템은 Young-Lin SP930D 펌프 2대, Young-Lin UV730D 검출기(detector), Autochro-3000 소프트웨어로 구성되어 있다. Young-Lin SP930D 펌프는 용매의 원활한 이송을 담당하며 Young-Lin UV730D 검출기는 컬럼 유출물 내 각 성분 농도의 실시간 모니터링을 담당한다. Autochro-3000 소프트웨어는 펌프와 검출기의 제어 및 데이터 수집을 담당한다.

[79]

[80] ② HPLC 농도분석 장치

[81] Crude 망고스틴 시료를 대상으로 한 펄스주입실험과 SMB 실험으로부터 얻은 샘플의 농도를 분석하기 위한 장치로 Waters HPLC 시스템을 사용하였다. Waters 515 HPLC 펌프로 용매를 이송하였으며 샘플의 농도 분석은 Waters 996 PDA 검출기(wavelength = 254 nm)에 의해 수행되었다. 아울러 HPLC 분석 컬럼으로는 Agilent Eclipse XDB-C18 분석용 컬럼(0.46x15cm)을 구입하여 사용하였다. 샘플의 주입은 Rheodyne 7725i 인젝터(injector)를 통하여 수행되었으며 샘플 주입량은 10 μl 로 하였다. HPLC 분석은 상온 하에서 구배(gradient) 모드로 운용되었으며 이에 사용된 두 종류의 용매(편의상 A와 B로 지칭)들 중 용매 A는 100% 아세

토니트릴이고 용매 B는 0.1% 아세트산 수용액이다. 용매 A와 B를 바탕으로 한 구배 모드 운용 방식은 표 1에 나타내었다. HPLC 분석 전반에 있어서 유량(flow rate)은 1 ml/min으로 유지하였고 Waters HPLC 시스템의 제어는 Empower 2.0 소프트웨어에 의해 수행되었다.

[82] [표1]

HPLC 분석에 적용된 구배(gradient) 모드 운용 방식

Time (min)	용매 A (%)	용매 B (%)	비고
45	95	5	Linear gradient
60	100	0	Linear gradient
75	100	0	Washing
90	5	95	Equilibrium

[83]

[84] ③ SMB 공정 실험 장치

[85] 본 발명의 beta-SMB 공정 실험 장치는 3-zone open-loop 방식 하에서 1-2-2 column configuration 구조를 가지도록 자체 조립 및 제작되었다. 제작된 SMB 장치(도 3)는 5개의 로터리 밸브(rotary valve), 5개의 컬럼, 3대의 펌프로 구성되었다. SMB 장치에 사용된 로터리 밸브는 Valco Instrument Co.(USA)에서 구입한 Select-Trapping (ST) 밸브로, 이 밸브는 각 컬럼과 각 포트를 연결하여 연속분리가 가능한 흐름 구조를 유지하도록 하는 기능을 가진다. 로터리 밸브의 제어는 Labview 8.0 소프트웨어를 이용하여 수행하였다. SMB 장치의 각 포트로 주입되는 stream은 Waters 기업에서 구입한 Waters 515 HPLC 펌프를 이용하여 유량제어를 하였다. 한편 잔류물(raffinate) 포트로 배출되는 stream의 유량은 별도의 펌프 없이 물질균형(mass balance)에 의해 결정되도록 하였다.

[86]

[87] 2-3. 실험절차

[88] ① 펄스주입 실험

[89] 흡착제 후보군(silica gel, Septra C18)으로 충전된 preparative-scale 컬럼 (2.5×22cm)을 Young-Lin HPLC 시스템 장치에 설치한 후 단일 망고스틴 시약 성분(알파, 베타, 감마)과 crude 망고스틴 시료 각각에 대한 펄스주입 실험을 수행하였다. 컬럼 내로 주입된 원료(feed)의 주입량과 농도는 단일 망고스틴 성분의 경우 200 μ l와 0.1 g/L로 각각 설정하였고, crude 망고스틴 시료의 경우에는 15 ml와 30 g/L로 각각 설정하였다. 컬럼 내 원료의 주입과 관련하여 단일 망고스틴 성분의 경우 Rheodyne 7725i 인젝터를 사용하여 주입하였고, crude 망고스틴 시료의 경우 SP930D 펌프를 사용하여 주입하였다.

[90] 펄스주입 실험이 진행되는 동안 유량을 2 ml/min로 일정하게 유지시켰다. 펄스주입에 따른 각 성분에 대한 effluent history 데이터(시간에 따른 컬럼 유출물 내

각 성분의 농도 프로파일 데이터)는 단일 망고스틴 성분의 경우 UV730D 검출기를 이용하여 실시간 확보하였고, crude 망고스틴 시료의 경우 컬럼 유출물을 시간대별로 채취하고 이에 대한 HPLC 농도분석을 통해 확보하였다.

- [91] 이동상 용매는 컬럼 내 충전된 흡착제의 상(phase)에 따라 다음과 같이 적용하였다. 실리카 레진을 흡착제로 사용한 경우에는 n-헥산과 에틸 아세테이트를 1:1, 15:1, 30:1로 변경해가면서 실험을 반복 수행하였다. 반면 Septra C18 레진을 흡착제로 사용한 경우에는 메탄올-DDW(메탄올 함량: 100%, 99%, 95%로 변경) 혼합용매 또는 에탄올-DDW(에탄올 함량: 100%, 95%, 90%, 85%로 변경) 혼합용매를 이동상으로 사용해가면서 실험을 반복 수행하였다.

[92]

[93] ② SMB 공정 실험

- [94] SMB 실험의 시작은 각 펌프의 작동과 Labview 8.0 소프트웨어의 실행 개시를 기점으로 하였다. 실험 시작과 동시에 원료와 용리액(desorbent)이 SMB 내로 연속 주입되었다. 30 g/L 농도의 crude 망고스틴 혼합물 용액이 원료 포트에 연속 주입되었으며 상기 원료 용액 내 알파, 베타, 감마 망고스틴의 농도는 각각 4.80 g/L, 0.13 g/L, 및 0.70 g/L이다. 한편 desorbent-1 포트와 desorbent-2 포트에 연속 주입되는 용리액으로는 85% 에탄올 수용액이 사용되었다. SMB 실험은 주기적 정상 상태(cyclic steady state)에 충분히 도달될 때까지 진행하였다. SMB 실험이 진행되는 동안 매 단계(switching period)마다 유량(flow rate)의 정확성 여부를 체크하고 추출물(extract) 및 잔류물 포트에서 배출되는 stream의 농도를 상기 언급한 Waters HPLC 농도분석 시스템을 이용하여 실시간 분석하였다.

[95]

- [96] 실시예 1. Crude 망고스틴 시료 내 베타-망고스틴과 다른 망고스틴 성분들 간의 연속분리에 적합한 흡착제 상(phase)의 결정

- [97] 본 발명의 목표 공정인 beta-SMB 공정에 적용될 흡착제를 선정하기 위해 SMB와 같은 연속분리공정에 적합한 흡착제 상(phase)의 종류를 결정해야 한다. 이를 위해 정상(normal phase)과 역상(reversed phase) 크로마토그래피 흡착제를 대표하는 실리카 레진과 C18 계열의 레진을 각각 선별하여 일련의 펄스주입 실험을 수행하였다.

- [98] 실리카 컬럼(실리카 레진으로 충전된 컬럼)을 바탕으로 한 펄스주입 실험에서는 n-헥산(hexane)과 에틸 아세테이트 용매의 혼합용매를 이동상으로 사용하였으며 이 과정에서 n-헥산과 에틸 아세테이트 용매의 비율을 변경해가면서 실험을 진행하였다. 그 결과, 극성용매에 해당되는 에틸 아세테이트의 함량이 클수록 베타-망고스틴의 탈착이 보다 더 원활하게 진행된다는 점을 확인하였다. 이는 정상 크로마토그래피 흡착제가 극성을 띠기 때문이다. 반면, 비극성용매에 해당되는 n-헥산의 함량이 클수록 베타-망고스틴의 탈착이 원활하게 진행되지 못하였고 이로 인해 베타-망고스틴의 용질(solute) 밴드 뒷부분이 길게 늘어지는 꼬리플림(tailing) 현상이 발생하였다. 다만 베타-망고스틴 성분의 breakthrough time은 변

화가 없거나 또는 약간씩 빨라지는 경향을 나타내었으며 이는 베타-망고스틴의 비극성 물성에 기인한 것으로 예측되었다.

[99] SMB 공정의 연속적 운전 모드 실현을 위해 고려되어야 할 중요 사항들 중 하나는 모든 성분들의 탈착이 원활하게 진행될 수 있어야 한다는 점이다. 또한 이러한 조건이 충족되는 크로마토그래피 환경 하에서 목표 성분과 비목표 성분 간의 흡착제 분리선택도(selectivity)가 어느 정도 이상의 수준이 되어야 한다. 이러한 사항들을 고려해 본 결과 실리카 레진은 모든 성분들의 원활한 탈착과 적절한 수준의 분리선택도 보장이라는 2가지 요건 모두를 충족시킬 수 없다는 점을 확인하였다.

[100] beta-SMB 공정에 대한 역상 크로마토그래피 흡착제의 적용 적합성을 조사하기 위해 역상 계열 흡착제들 중 내구성이 특히 우수한 것으로 알려진 Septra C18 레진을 사용하여 펄스주입 실험을 실시하였다. 예비실험 차원에서 메탄올 100% 용매를 이동상으로, 실험결과와 신속한 파악을 위해 단일 망고스틴 시약(알파, 베타, 감마 망고스틴으로서 순수 시약)을 이용하였다. 그 결과, Septra C18 흡착제가 베타-망고스틴과 기타 주요 비목표 성분(알파-, 감마-망고스틴) 간에 의미있는 수준의 분리선택도를 제공할 수 있음을 확인할 수 있다. 또한 베타-망고스틴의 탈착 또한 원활하게 진행되고 있음을 확인할 수 있다. 다만 감마-망고스틴의 심각한 꼬리끌림으로 인해 베타-망고스틴의 고순도 확보에 지장을 줄 수 있다는 점도 파악되었다. 이러한 이유로 역상 크로마토그래피 환경 하에서의 용매 종류 및 조성에 대한 최적 결정이 필요할 것으로 사료되었다.

[101]

[102] 실시예 2. 역상 크로마토그래피 (Septra C18 흡착제) 환경 하에서의 이동상 내 에탄올 함량의 최적 결정

[103] 메탄올에 비해 환경친화적이고 인체에 유해하지 않으면서 베타-망고스틴 성분과 다른 망고스틴 성분들 간의 분리선택도를 보다 더 향상시킬 수 있는 이동상 용매를 발굴하여 적용해 볼 필요가 있었기에, 에탄올과 DDW의 혼합용매를 이동상 용매 후보로 선정하여 그 적용 가능성에 대한 실험을 수행하였다. 이 실험에서는 에탄올과 DDW의 혼합용매 내 에탄올의 함량을 100%에서 85%까지 5% 간격으로 변화시켜가면서 단일 망고스틴 시약 성분을 대상으로 한 일련의 펄스주입 실험을 진행하였다.

[104] 그 결과 도 4에 개시된 바와 같이, 이동상 내 에탄올 함량이 낮아질수록 모든 망고스틴 성분들의 컬럼 내 체류시간이 증가하는 경향을 보이고 있다. 주목할 점은 에탄올 함량 감소에 따른 베타-망고스틴의 체류시간 증가속도와 기타 망고스틴 성분들의 체류시간 증가속도 간에 큰 차이가 있다는 점이다. 즉, 에탄올 함량이 감소함에 따라 베타-망고스틴 성분의 체류시간은 급격히 증가하는 경향을 보이는데 반해 다른 망고스틴 성분들의 체류시간은 서서히 증가하는 패턴을 보이고 있다. 이러한 점 때문에 베타-망고스틴과 다른 망고스틴 성분들간의 분리선택도는 대체적으로 에탄올 함량이 낮아질수록 향상되는 경향을 보이고 있다. 한편 감

마-망고스틴 성분의 경우 심각한 꼬리끌림 현상이 발생되고 있지만 85% 에탄올 함량 조건 하에서는 크게 완화되고 있음을 볼 수 있다(도 4d). 이러한 결과를 고려해볼 때 이동상 내 에탄올의 최적 함량은 85%인 것으로 결론 내릴 수 있었다.

- [105] 상기 결론은 단일 망고스틴 시약을 대상으로 한 결과이므로, crude 망고스틴 시료에 대해서도 유효한지 확인하기 위해 crude 망고스틴 시료를 대상으로 한 펄스주입 실험을 실시하였다. 본 실험에서 이동상은 단일 망고스틴 시약을 대상으로 한 실험에서 최적 용매로 확인된 85% 에탄올 용매가 사용되었다. 실험 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이 crude 망고스틴 시료를 대상으로 한 펄스주입 실험에서도 단일 망고스틴 시약을 대상으로 한 실험에서와 비슷한 수준의 베타-망고스틴 분리 선택도가 확인되었다. 상기 결과로 미루어 볼 때 역상 크로마토그래피 환경 하에서 베타-망고스틴과 다른 망고스틴 성분들 간의 분리에 최적인 이동상은 85% 에탄올 용매로 결정되었다.

[106]

[107] 실시예 3. **beta-SMB** 공정에 대한 최적설계 접근법

- [108] 상기 실시예 2의 펄스주입 실험에서 주목할 점은 원료(feed) 주입 시 crude 망고스틴 시료의 주입량을 단일 망고스틴 시약의 주입량보다 75배 이상 높게 설정하였다는 점이다. 이는 crude 망고스틴 시료의 펄스주입 실험 조건이 컬럼 내 망고스틴 농도를 더 높게 유지시키는 조건임을 의미한다. 이러한 점을 바탕으로 도 4d와 도 5를 분석해보면 감마-망고스틴을 제외한 나머지 망고스틴 성분들(알파, 베타)은 농도가 증가할수록 체류시간이 빨라진다는 점을 파악할 수 있었고, 이는 알파와 베타 망고스틴 성분이 랑그뮤어(Langmuir) 형태의 비선형 흡착 경향을 따른다는 것을 의미한다.

- [109] 이에 상기 결과를 바탕으로 다음과 같은 방식의 **beta-SMB** 공정 설계 접근법을 채택하였다. 각 망고스틴 성분을 고농도(crude 시료 기준의 농도: **SMB** 공정 투입 농도와 유사한 수준의 농도에 해당) 기준과 저농도(단일 시약 성분 기준의 농도) 기준의 2개 성분으로 구분하여 취급하고 각 개별 성분에 대한 헨리상수(Henry constant, 선형흡착계수)를 결정한다. 편의상 베타-망고스틴의 고농도 기준 성분과 저농도 기준 성분을 각각 β -1과 β -2로 표기하고, 알파-망고스틴과 감마-망고스틴의 경우에도 각각 α -1, α -2, γ 로 표기하기로 한다.

- [110] 또한, 본 발명의 목표인 **beta-SMB** 공정 구조의 경우 장치 및 관리 비용의 절약을 위해 컬럼 및 밸브의 개수를 최소화하는 방향으로 구조를 선정한다. 다만 베타-망고스틴과 다른 망고스틴 성분들 간의 분리효율을 향상시키기 위해 separation zone (원료 포트 주위에 위치한 두 개의 zone)에 더 많은 개수의 컬럼을 배치하도록 하였으며, 컬럼 재생(regeneration)의 경우 그 부담을 줄이고 재생 효율을 향상시키기 위해 가급적 1개의 zone이 아닌 2개의 zone에서 담당하도록 하였다. 위에서 언급한 모든 사항들을 만족시킬 수 있는 **SMB** 공정 구조를 검토한 결과 도 6에 제시한 구조가 가장 적합한 것으로 확인되었다.

[111] 도 6에 개시된 beta-SMB 공정은 β -1의 앞부분과 β -2의 뒷부분을 각각 zone III와 zone I 내에 위치하게 하고 α -2의 뒷부분은 zone II 내에 위치하게 한다. 한편 γ 성분은 흡착강도가 가장 작기 때문에 잔류물(raffinate) 포트를 통해 자동 배출될 수밖에 없다. 이러한 상황 하에서의 베타-망고스틴 목표 성분(β -1, β -2)은 추출물(extract) 포트를 통해 회수되고 다른 망고스틴 성분들(α -1, α -2, γ)은 모두 잔류물 포트를 통해 제거된다. 아울러 매 단계마다 유입구 및 유출구 포트들이 용매의 진행방향을 따라 컬럼 한 개의 길이만큼 이동하면서 원료(feed) 혼합물의 연속주입과 베타-망고스틴 목표 성분의 연속회수를 가능하게 한다.

[112]

[113] 실시예 4. beta-SMB 공정의 최적 설계를 위한 알파, 베타, 감마 망고스틴 성분들의 기초 파라미터 결정

[114] beta-SMB 공정의 최적설계 수행을 위해서는 알파 및 베타 망고스틴 성분들(α -1, α -2, β -1, β -2)의 기초 파라미터(헨리상수, 물질전달계수) 확보가 필요하다. 이를 위해 실시예 2에서 수행된 펄스주입 실험 결과(도 4d, 5)로부터 각 성분의 체류시간을 파악하고 이 정보와 용질운동이론(solute movement theory)을 이용하여 각 성분의 헨리상수(H)를 결정할 수 있었다(표 2). 상기 헨리상수에 이어서 추가적으로 결정되어야 할 주요 기초 파라미터인 물질전달계수에는 axial dispersion coefficient (E_b)와 film mass-transfer coefficient (k_f)가 있다. 이들 중 E_b 의 값은 Chung and Wen correlation을 사용하여 결정하였고, k_f 값은 컴퓨터 시뮬레이션 결과를 펄스주입 실험 데이터에 가장 가까이 근접시킬 수 있는 값으로 결정하였다. 결정된 각 망고스틴 성분들(α -1, α -2, β -1, β -2)의 물질전달계수 값은 표 2와 같다.

[115] [표2]

beta-SMB 공정 설계를 위한 주요 망고스틴 성분들의 기초 파라미터

	H	E _b (cm ² /min)	k _f (cm/min)
α-1	1.45	Chung & Wen, AIChE J. 196 8, 14:857-866	0.01
α-2	2.55		0.25
β-1	4.44		0.04
β-2	5.29		0.95
H: 헨리 상수, E _b : axial dispersion coefficient, k _f : film mass-transfer coefficient.			

[116] 표 2에 제시된 각 성분 기초 파라미터 값들의 적정성을 확인하기 위해, 표 2의 파라미터 값과 컬럼 모델식(Eq. (1))을 바탕으로 한 컴퓨터 시뮬레이션을 수행하였다. 이 컴퓨터 시뮬레이션 결과와 실험데이터를 각 성분 별로 비교하였다. 그 결과, 도 7에 개시된 바와 같이 컴퓨터 시뮬레이션 결과와 실험데이터가 잘 일치하고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 표 2에 제시된 기초 파라미터 값들이 Septra C18 기반 역상 컬럼 내에서의 각 성분의 이동현상(transport phenomena) 및 분리

거동을 비교적 잘 표현해주고 있음을 의미한다. 따라서 표 2에 제시된 각 성분들의 기초 파라미터 값들은 차후에 진행될 **beta-SMB** 공정의 최적설계 과정에 성공적으로 활용될 수 있을 것으로 기대되었다.

[117]

[118] 실시예 5. **beta-SMB** 공정의 최적설계

[119] 결정된 각 망고스틴 성분의 기초 파라미터(표 2)와 확정된 **SMB** 공정 구조(도 6) 하에서 **beta-SMB** 공정의 최적설계(최적 운전 조건의 결정) 연구를 수행하였다. 최적설계는 다음과 같은 절차에 따라 추진되었다.

[120] Throughput 즉, 원료 유량(feed flow rate)을 고정한 상태에서 베타-망고스틴 성분(β -1, β -2)의 수율과 다른 망고스틴 성분들(α -1, α -2, γ)의 제거율을 모두 99.9% 이상 유지되도록 하는 최적화 프레임을 구성하였다. 상기 최적화 프레임에 부합되는 최적화 도구를 구성하였으며 이 과정에 유전자알고리즘과 컬럼 모델식(Eq. (1)) 기반의 Aspen chromatography simulator가 사용되었다. 상기 구성된 최적화 도구를 이용하여 **beta-SMB** 공정의 최적 운전조건을 결정하였으며 그 결과를 표 3에 제시하였다.

[121] [표3]

beta-SMB 공정의 최적 운전조건

Zone flow rates (ml/min)	Q_1	1.95
	Q_2	3.05
	Q_3	3.55
Inlet and outlet flow rates (ml/min)	Q_{des-1}	1.95
	Q_{des-2}	3.05
	Q_{feed}	0.5
	Q_{raf}	3.55
Switching time (min)	t_{sw}	64.63

[122] **beta-SMB** 공정의 최적설계 결과에 대한 이론적 검증을 위해 상기 확보된 최적 운전조건(표 3)과 컬럼 모델식을 바탕으로 **SMB** 공정 시뮬레이션을 진행하였다. 상기 시뮬레이션을 통해 주기적 정상상태(cyclic steady state) 하에서의 컬럼 프로파일을 획득하였으며 그 결과는 도 8에 제시하였다.

[123] 도 8의 컬럼 프로파일에서 볼 수 있듯이 β -1 solute band의 앞부분과 β -2 solute band의 뒷부분 모두 zone III와 zone I 내에서 잘 통제되고(well-confined) 있다. 또한 α -2 band의 뒷부분도 zone II 내에서 잘 통제되고 있다. 이러한 상황 하에서는 나머지 망고스틴 성분들(α -1, γ) 모두 잔류물 포트를 통해 자동 배출될 수 밖에 없기 때문에 이 성분들의 거동은 목표 성분(extract) stream에 전혀 영향을 미치지 않는다. 이러한 점들을 모두 고려해볼 때 표 3의 운전조건(최적설계의 결과)은 베

타-망고스틴과 다른 망고스틴 성분들 간의 고순도 및 고수율 연속분리를 보장할 수 있는 SMB 운전조건이라고 판단되었다.

[124]

[125] 실시예 6. 최적설계된 beta-SMB 공정의 실험적 검증

[126] 상기 최적설계된 beta-SMB 공정에 대한 실험적 검증을 위해 도 6의 최적 구조에 부합하는 SMB 공정 장치를 조립 및 제작하였다. 이 장치와 표 3의 최적 운전조건을 바탕으로 crude 망고스틴 시료 내 베타-망고스틴과 다른 망고스틴 성분들(알파, 감마)간의 연속분리 실험을 수행하였다. 도 9는 이 실험 진행 중 촬영된 SMB 장치의 사진이다.

[127] SMB 실험 중 원료 포트로는 crude 망고스틴 시료 30 g/L 용액이 연속 주입되었고, desorbent-1과 desorbent-2 포트로는 85% 에탄올 수용액이 연속 공급되었다. SMB 실험은 총 23 단계 동안(25 시간) 실시하였으며 실험의 전과정 동안 extract 포트(베타-망고스틴 product port) stream과 잔류물 포트(non-product port) stream에 대한 단계별 농도 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 농도에 대한 정량분석은 주요성분에 해당되는 알파, 베타, 감마 망고스틴 성분들에 대해서만 실시되었다. 따라서, 베타-망고스틴 순도의 경우 주요성분 (알파, 베타, 감마 망고스틴)만을 고려한 순도는 정량적으로 조사되었고, 전체성분 모두를 고려한 순도는 SMB product stream에 대한 HPLC analysis chromatogram raw data로 대신하였다.

[128] 도 10a의 결과에서 볼 수 있듯이 extract 포트로는 주요 망고스틴 성분들 중 베타-망고스틴의 존재만 확인되었다. 반면 raffinate 포트로는 알파와 감마 망고스틴의 유출만 확인되었다(도 10b). 상기 결과는 주요 성분만을 고려했을 때 beta-SMB 공정을 통해 베타-망고스틴을 분리할 경우 순도와 수율 모두 100% 수준에 이른다는 것을 의미하였다.

[129] 상기 결과에 대한 증빙자료로서 beta-SMB 공정에 투입되었던 crude 망고스틴 시료 용액, extract stream 용액, 베타-망고스틴 표준시료 각각에 대한 HPLC 농도 분석 크로마토그램 raw data를 확보하여 도 11에 제시하였다. 도 11b에서 볼 수 있듯이 beta-SMB 공정의 extract (product)에 대한 크로마토그램에서는 알파와 감마 망고스틴 성분의 피크들은 전혀 발견되지 않았다. 더 나아가 도 11a (crude 망고스틴 시료에 대한 크로마토그램)에서 베타-망고스틴 피크의 앞에 위치한 수많은 미지의 불순물 피크들이, 도 11b에서 상당부분 제거되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명에서 개발된 beta-SMB 공정이 crude 시료 내에 다량 함유되어 있는 알파 및 감마 망고스틴 성분들의 완전 제거뿐만 아니라 기타 소량 또는 미량의 불순물까지도 상당부분 제거해 낼 수 있음을 의미하였다.

[130] 상기 실험결과에 대한 추가적인 증빙을 위해 도 11b의 beta-SMB 공정 extract (product) 크로마토그램과 베타-망고스틴 표준시료 크로마토그램(도 11c)을 비교해보았다. 그 결과 beta-SMB 공정의 extract (product) stream 내 베타-망고스틴 성분의 존재가 분명하게 확인되었고 베타-망고스틴 피크 주변의 불순물의 존

재 또한 목격되었다. 다만 상기 불순물 피크의 개수 및 크기는 crude 망고스틴 시료 내 불순물 피크(도 11a)의 개수 및 크기보다 확연히 감소되었다. 이로 인해 crude 망고스틴 시료 내에서는 minor 성분에 지나지 않았던 베타-망고스틴이 SMB product stream 내에서는 가장 큰 함량을 차지하는 major 성분이 되었다는 점을 주목할 필요가 있다.

[131]

[132] 실시예 7. Recycling preparative HPLC를 이용한 후처리 공정

[133] 상기 결과에도 불구하고 beta-SMB 공정의 extract (product) stream 내에는 베타-망고스틴 성분 이외에 몇 가지 종류의 minor 불순물 (잔존 불순물 포함)들이 존재하고 있다. 이 불순물의 추가적인 제거를 위해 beta-SMB 공정의 산물에 대한 후처리 공정의 개발을 다음과 같은 절차에 따라 수행하였다.

[134] HPLC 크로마토그램을 통해 beta-SMB 공정 산물 내 목표물질(베타-망고스틴)을 선택적으로 분리하기 위해 JAI NEXT recycling preparative HPLC를 이용하였다. 컬럼은 Thermofisher scientific의 Acclaim Polar Advatage II (5 μ m, 250 x 20 mm)를 이용하였으며 이동상은 isocratic 조건에서 100% 아세트니트릴을 흘려주었다. 그 결과 도 12와 같이 나타났으며 Peak 15와 56으로부터 re-HPLC-1, peak 27과 72로부터 re-HPLC-2, peak 28, 73, 74로부터 re-HPLC-3의 총 3개 분획물을 확보하였다. 상기 3개 분획물의 HPLC 확인 결과, 2번째 분획인 re-HPLC-2에서 베타-망고스틴 (t_R = 53 min)의 선택적 피크를 확인할 수 있었다(도 13). Recycle-HPLC 공정의 사용시 injection volume 5,000 mg/ml로부터 2.1 mg의 베타-망고스틴을 확보하였으며 최종 순도는 >96% 였다. 이로써 본 발명에서 개발된 "beta-SMB 공정과 recycle-HPLC 기반의 후처리 공정"의 2단계 공정 절차를 통해 crude 망고스틴 시료 내 베타-망고스틴 성분을 96% 이상의 순도로 회수해낼 수 있음을 확인하였다.

청구범위

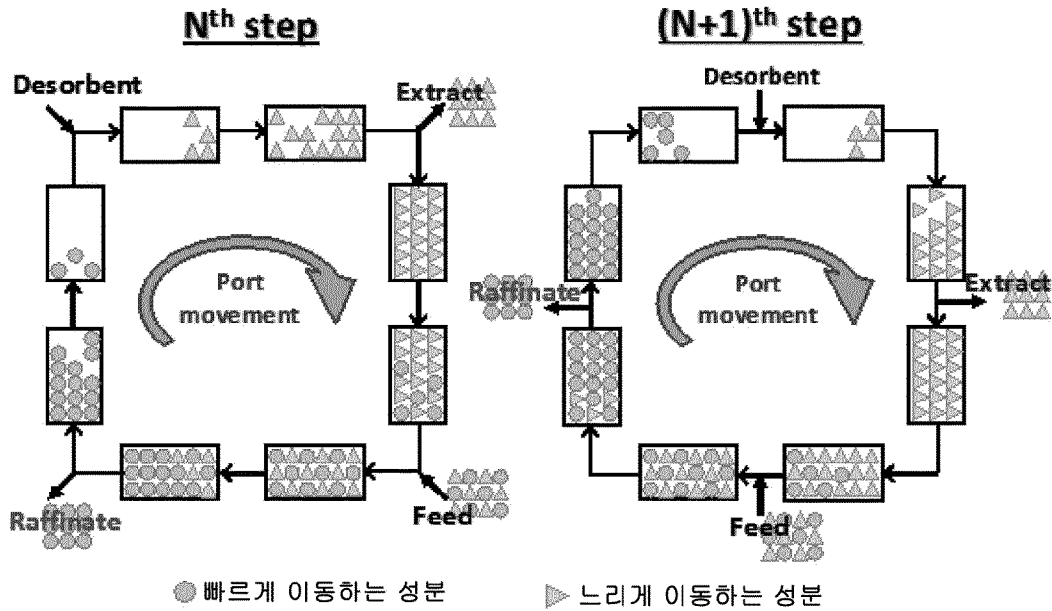
- [청구항 1] 망고스틴 추출물 원료를 모사 이동층(simulated moving bed) 크로마토그래피에 적용하여 베타-망고스틴을 분리하는 단계를 포함하는, 베타-망고스틴(β -mangostin)의 분리 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 망고스틴 추출물은 베타-망고스틴 및 이의 이성질체 혼합물이 포함된 것을 특징으로 하는, 베타-망고스틴의 분리 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 이성질체는 알파-망고스틴 및 감마-망고스틴인 것을 특징으로 하는, 베타-망고스틴의 분리 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 방법은
모사 이동층 크로마토그래피에 적용된 흡착 칼럼에 대한 알파-망고스틴 및 베타-망고스틴의 흡착계수 및 물질전달계수를 결정하는 단계(단계 1);
상기 단계 1에서 결정된 흡착계수 및 물질전달계수를 유전자알고리즘(genetic algorithm) 및 컬럼 모델식을 바탕으로 모사 이동층 전산모사 프로그램에 적용하여 모사 이동층 크로마토그래피 공정의 운전조건을 계산하는 단계(단계 2); 및
모사 이동층 크로마토그래피에 망고스틴 추출물 원료와 용리액을 공급하고 상기 단계 2에서 계산된 운전조건을 적용하여 베타-망고스틴을 분리하는 단계(단계 3);를 포함하는 것을 특징으로 하는 베타-망고스틴의 분리 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 단계 1의 흡착 컬럼은 C18이 코팅된 실리카를 고정상으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 베타-망고스틴의 분리 방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서, 상기 단계 2의 컬럼 모델식은 일괄 대량 이동 모델(lumped mass-transfer model)인 것을 특징으로 하는, 베타-망고스틴의 분리 방법.
- [청구항 7] 제4항에 있어서, 상기 단계 3의 용리액은 C1~C4의 저급 알코올인 것을 특징으로 하는, 베타-망고스틴의 분리 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올인 것을 특징으로 하는, 베타-망고스틴의 분리 방법.
- [청구항 9] 제4항에 있어서, 상기 단계 3의 모사 이동층 크로마토그래피 후 용리된 산물(product)을 대상으로 리사이클링 프랩 HPLC(Recycling Preparative HPLC)를 추가로 수행하는 것을 특징으로 하는, 베타-망고스틴의 분리 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 모사 이동층(SMB) 크로마토그래피는,
3개의 유입구와 2개의 유출구를 구비한 3구역 개방형 SMB 크로마토그래피를 이용하고, 탈착용매(용리액)를 제1구역의 입구로 주입하며 이와 동시에 제1구역의 출구를 통해 베타-망고스틴 산물을 회수하는 단계 (단계 ①);

상기 단계 ①과 동시에 제2구역의 입구로 탈착용매를 주입하여 알파-망고스틴 및 감마-망고스틴 성분들이 한 교환시간 이내에 제2구역의 첫 번째 컬럼으로부터 탈착되어 제3구역을 향하여 진행해 나갈 수 있도록 하는 단계 (단계 ②); 및

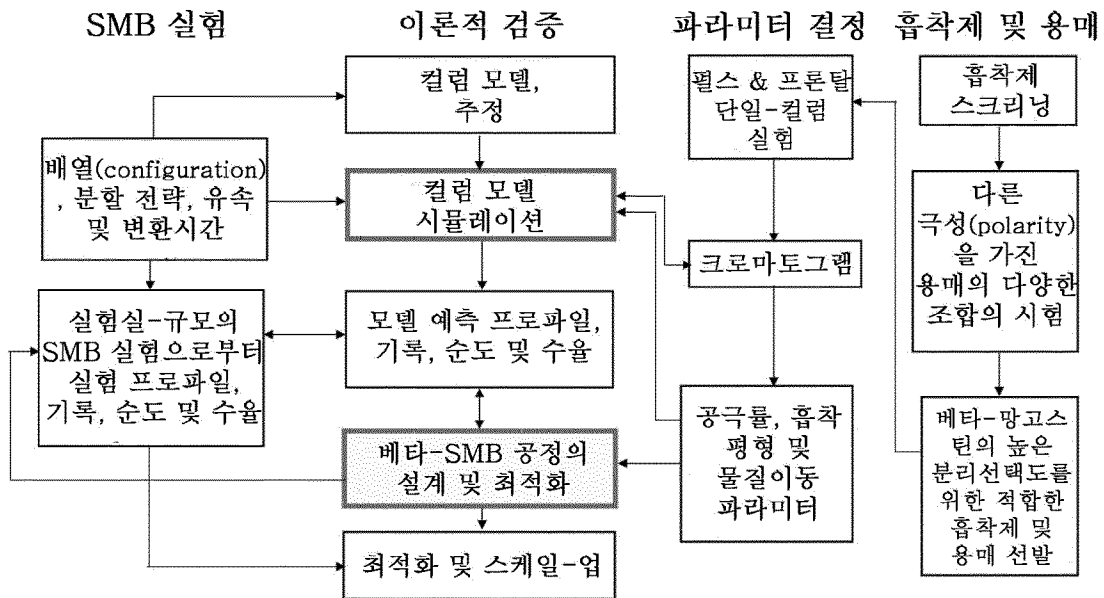
상기 단계 ②와 동시에 망고스틴 시료 용액을 공급액 주입구를 통해 제3구역으로 주입하며 이와 동시에 망고스틴 시료 내 베타-망고스틴 성분의 이동 구간 범위를 제3구역 내로 한정하게 하고 반면 알파-망고스틴과 감마-망고스틴 성분은 한 교환시간 내에 제3구역 출구 지점을 지나 외부로 배출될 수 있도록 하는 단계 (단계 ③);를 포함하는 3구역 개방형 SMB 크로마토그래피인 것을 특징으로 하는, 베타-망고스틴의 분리 방법.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 분리 방법에 의해 분리된 베타-망고스틴은 순도가 96% 이상인 것을 특징으로 하는 분리 방법.

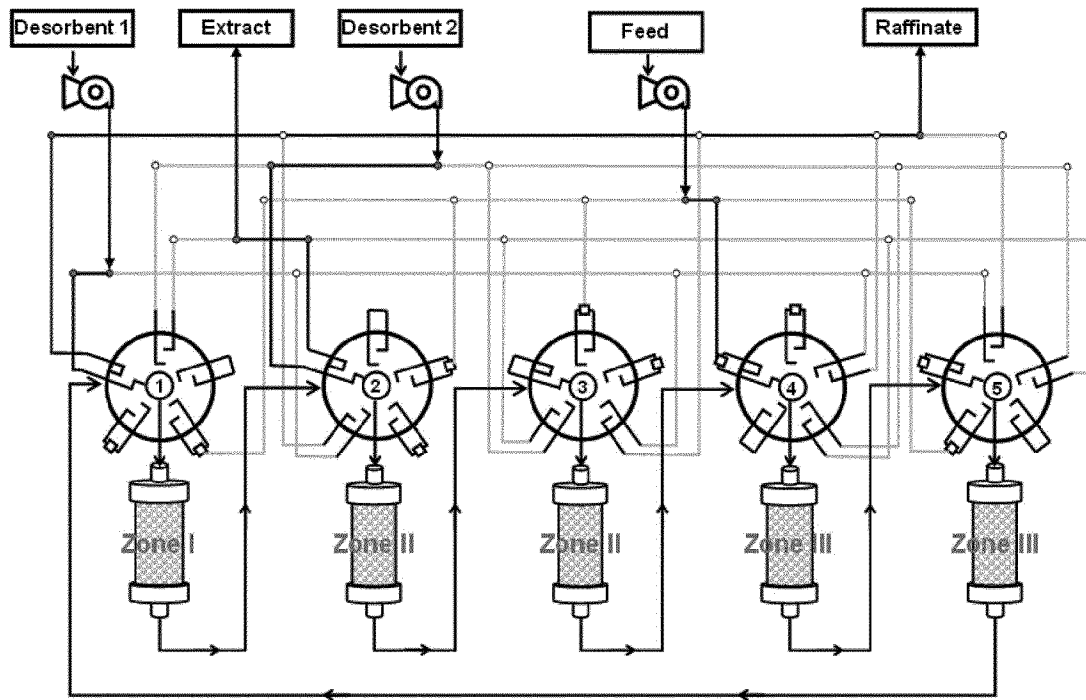
[도1]



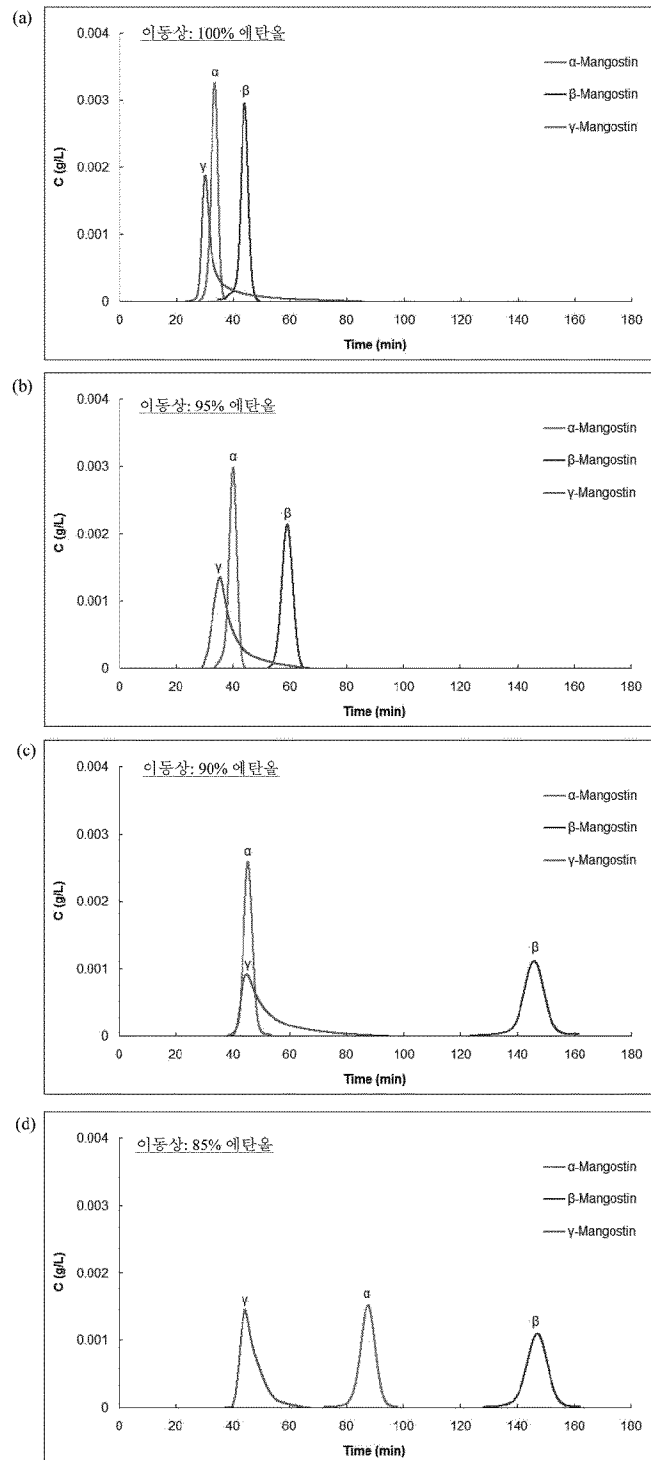
[도2]



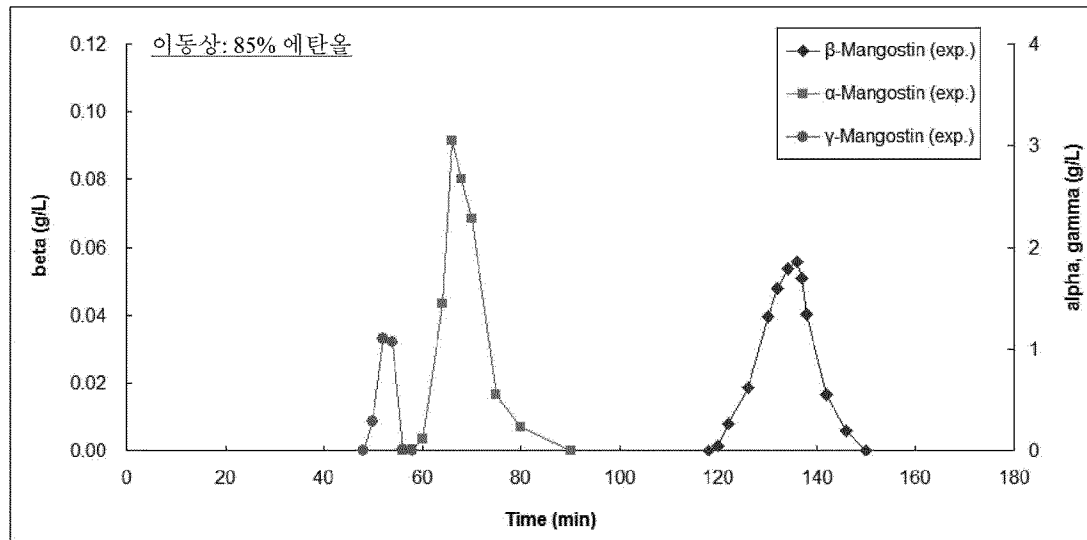
[도3]



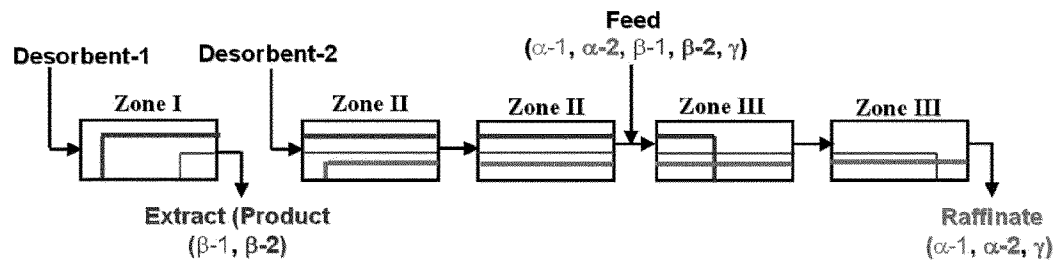
[도4]



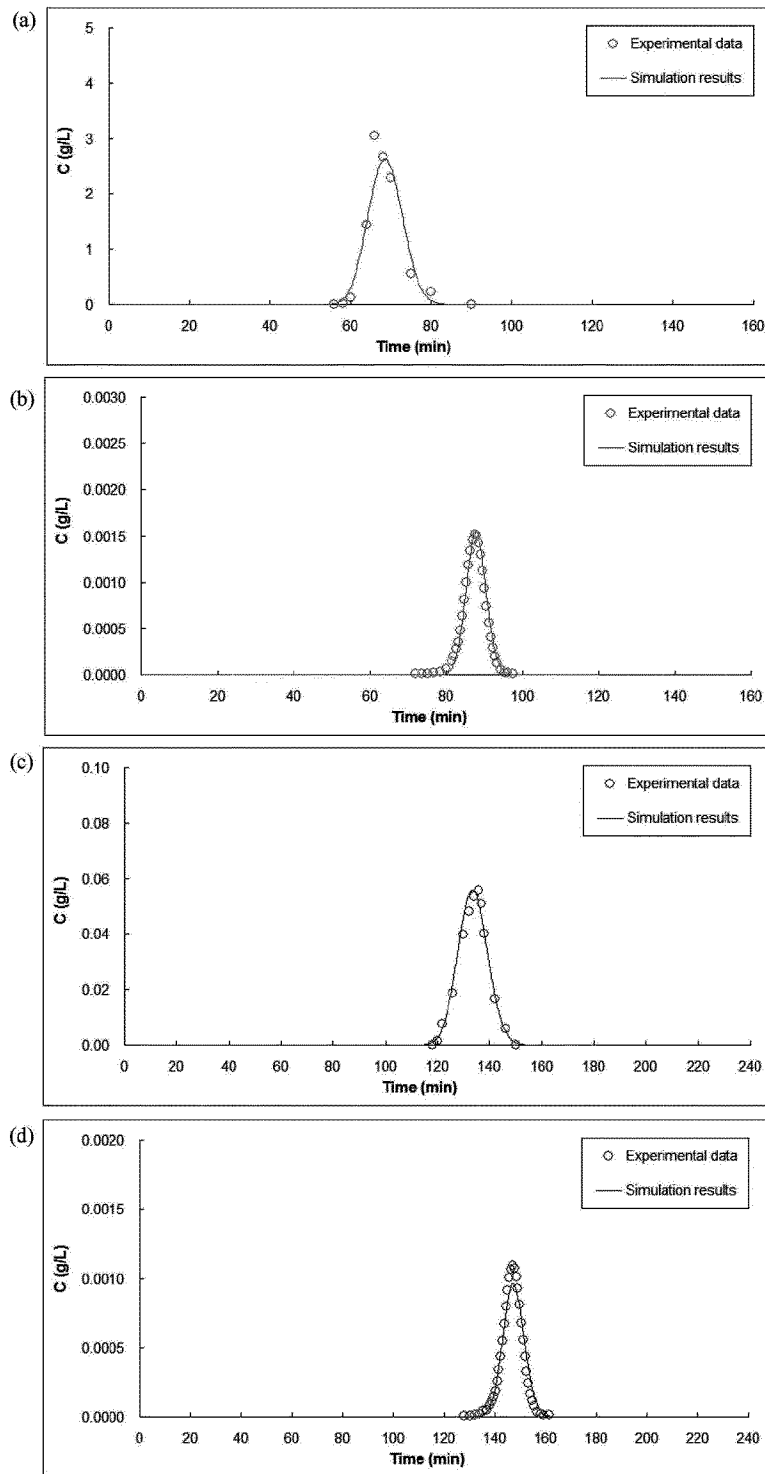
[도5]



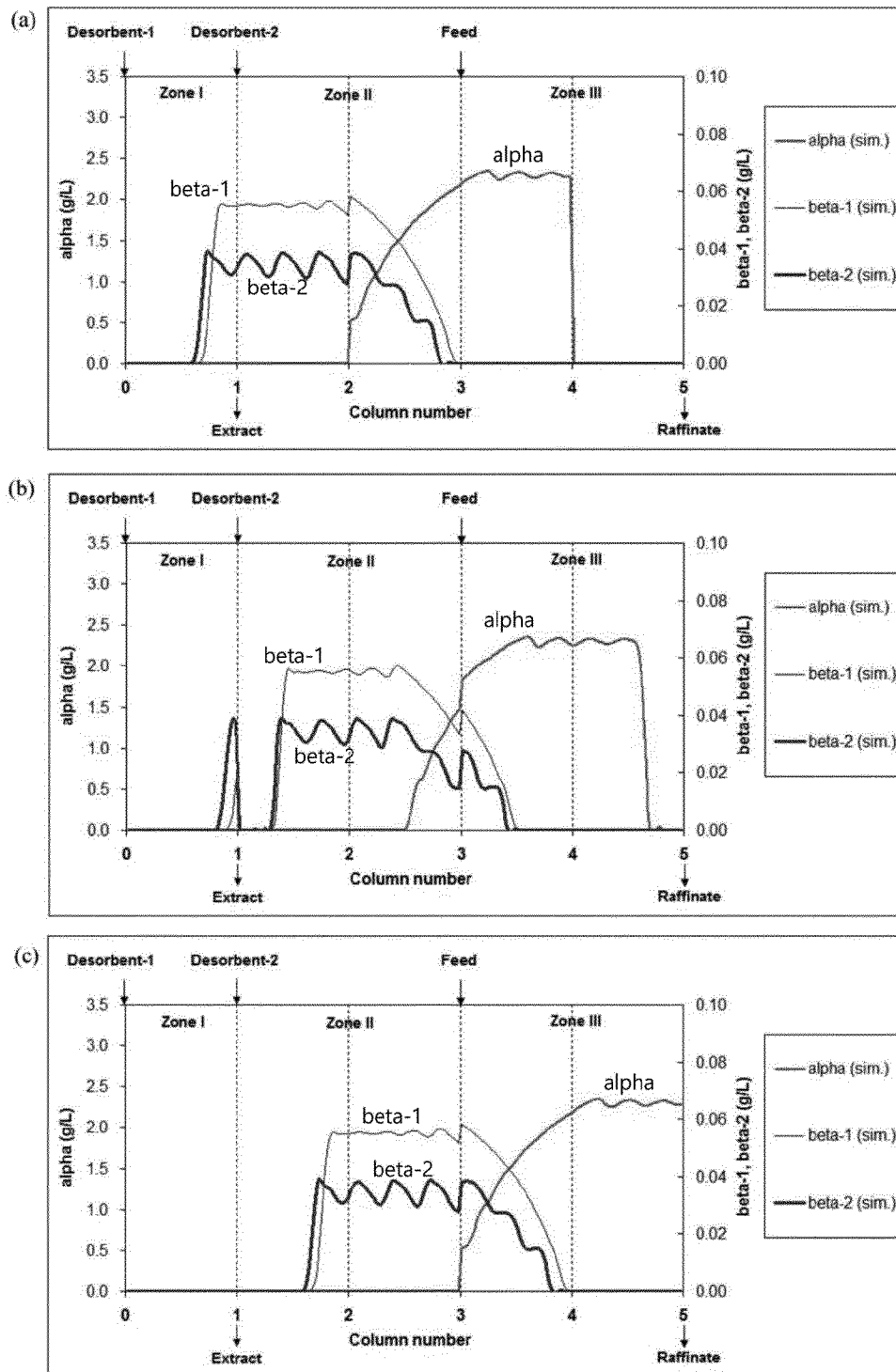
[도6]



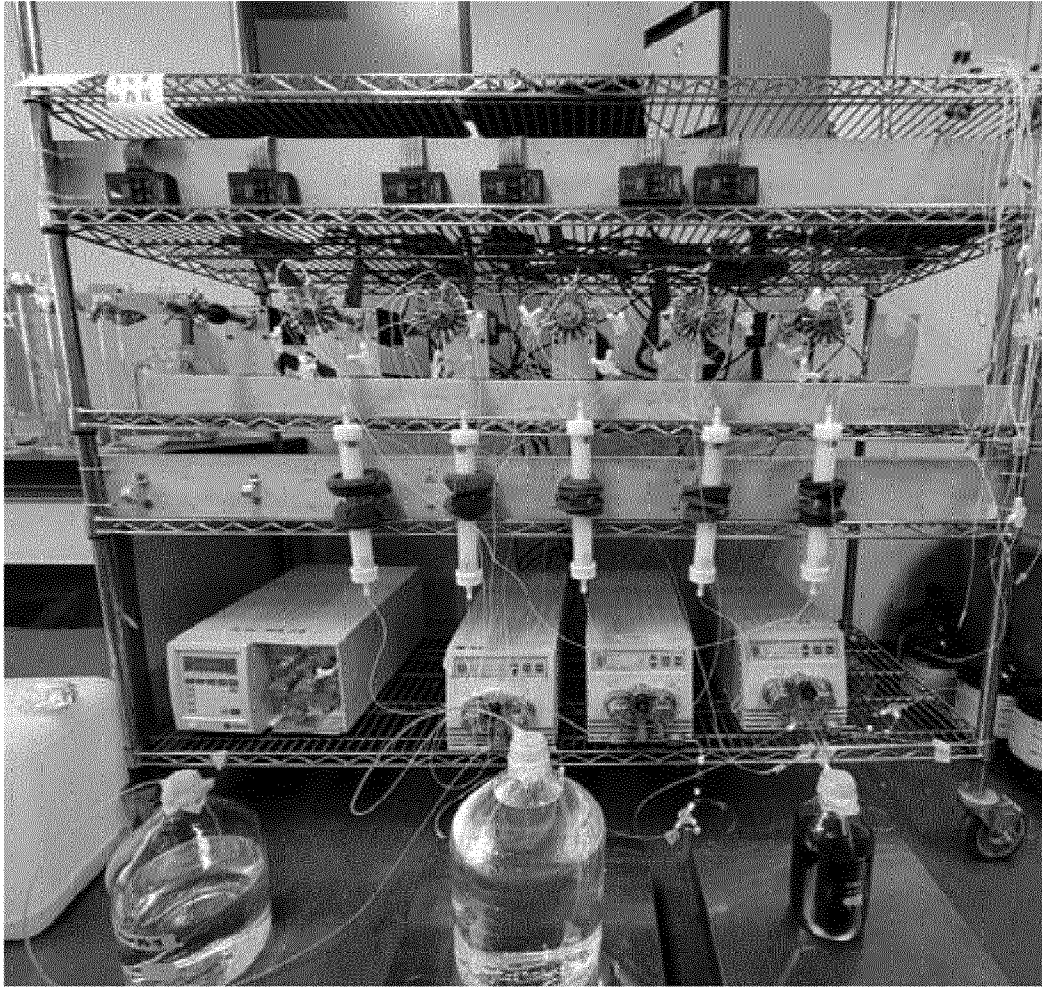
[도7]



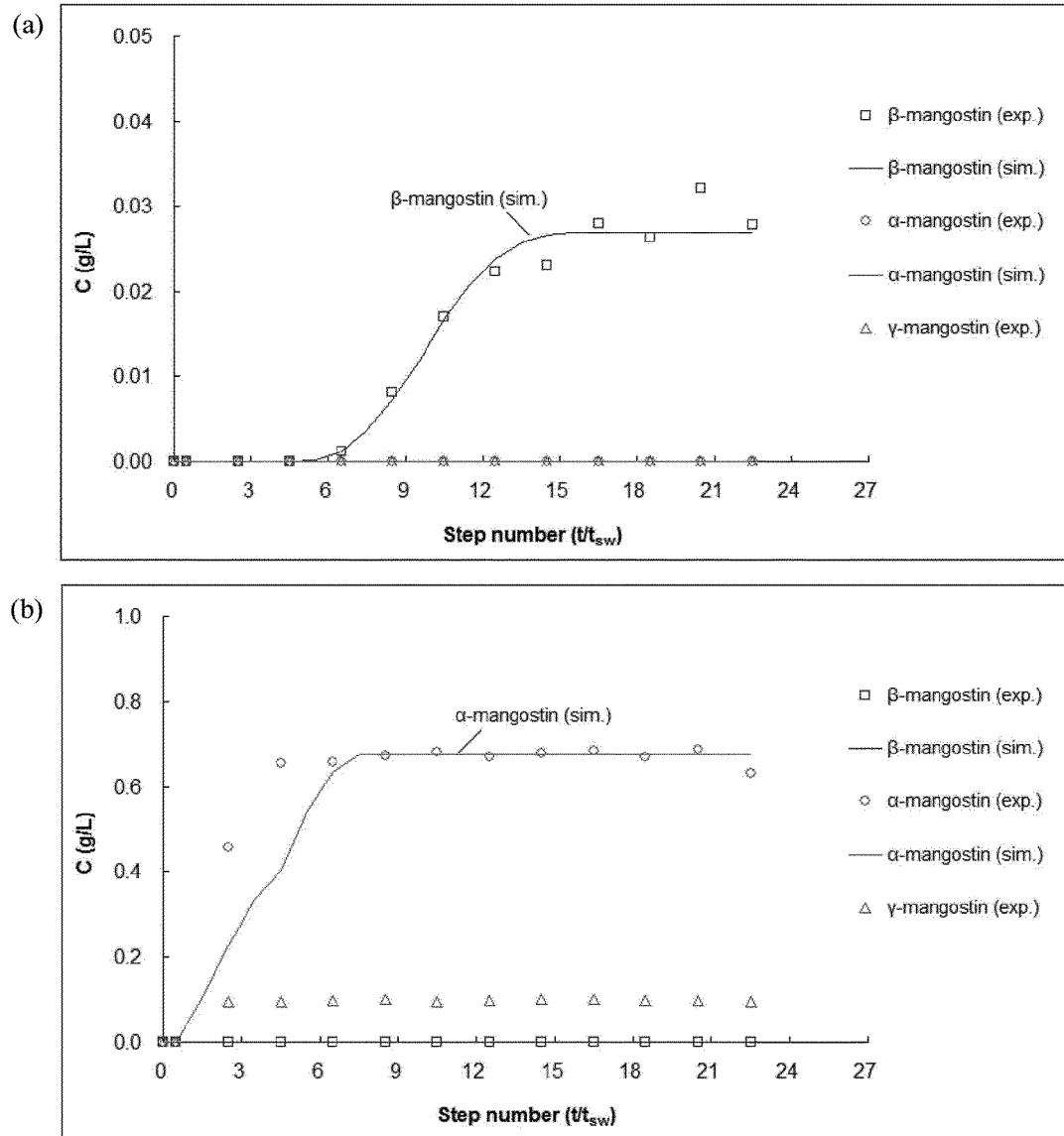
[도8]



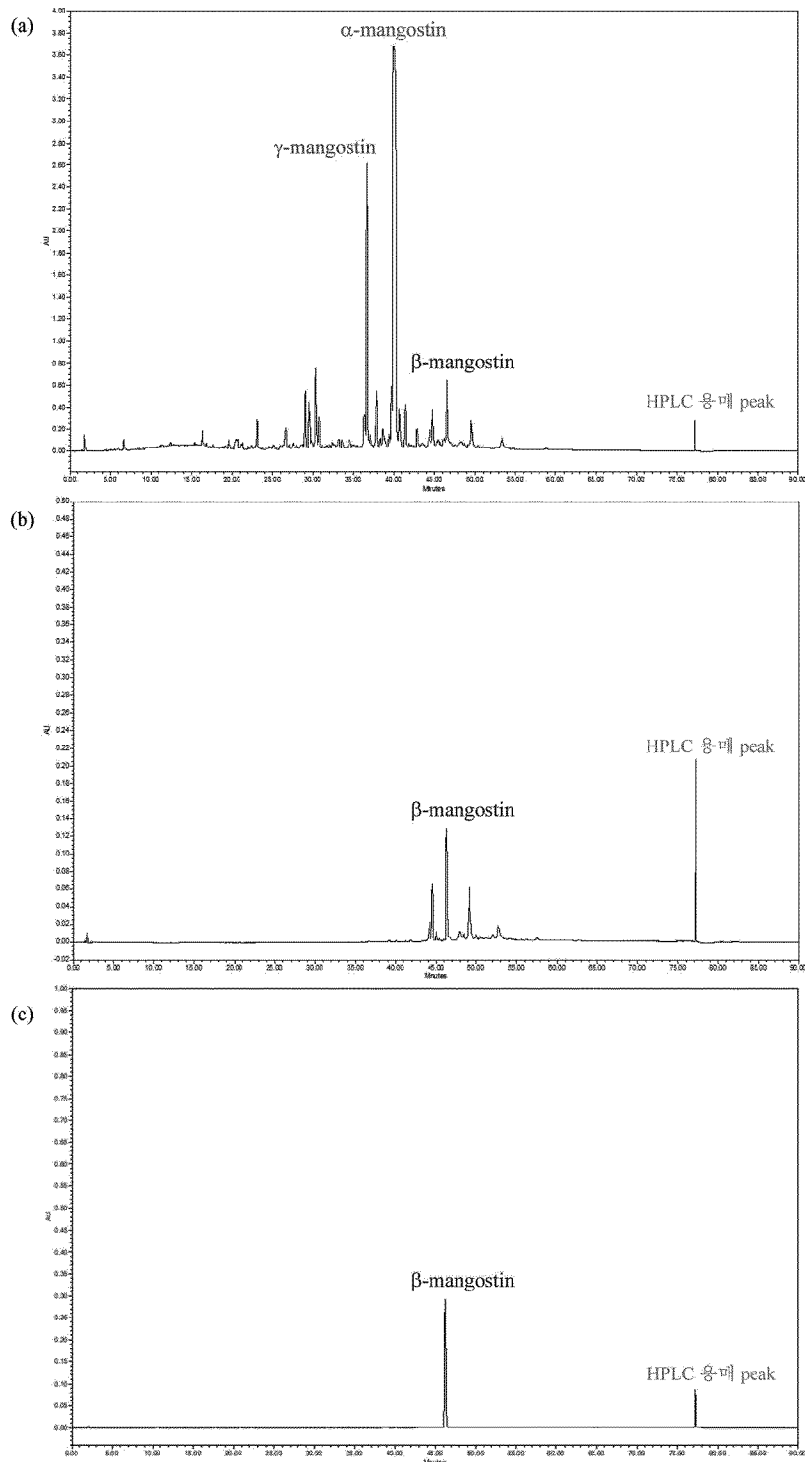
[도9]



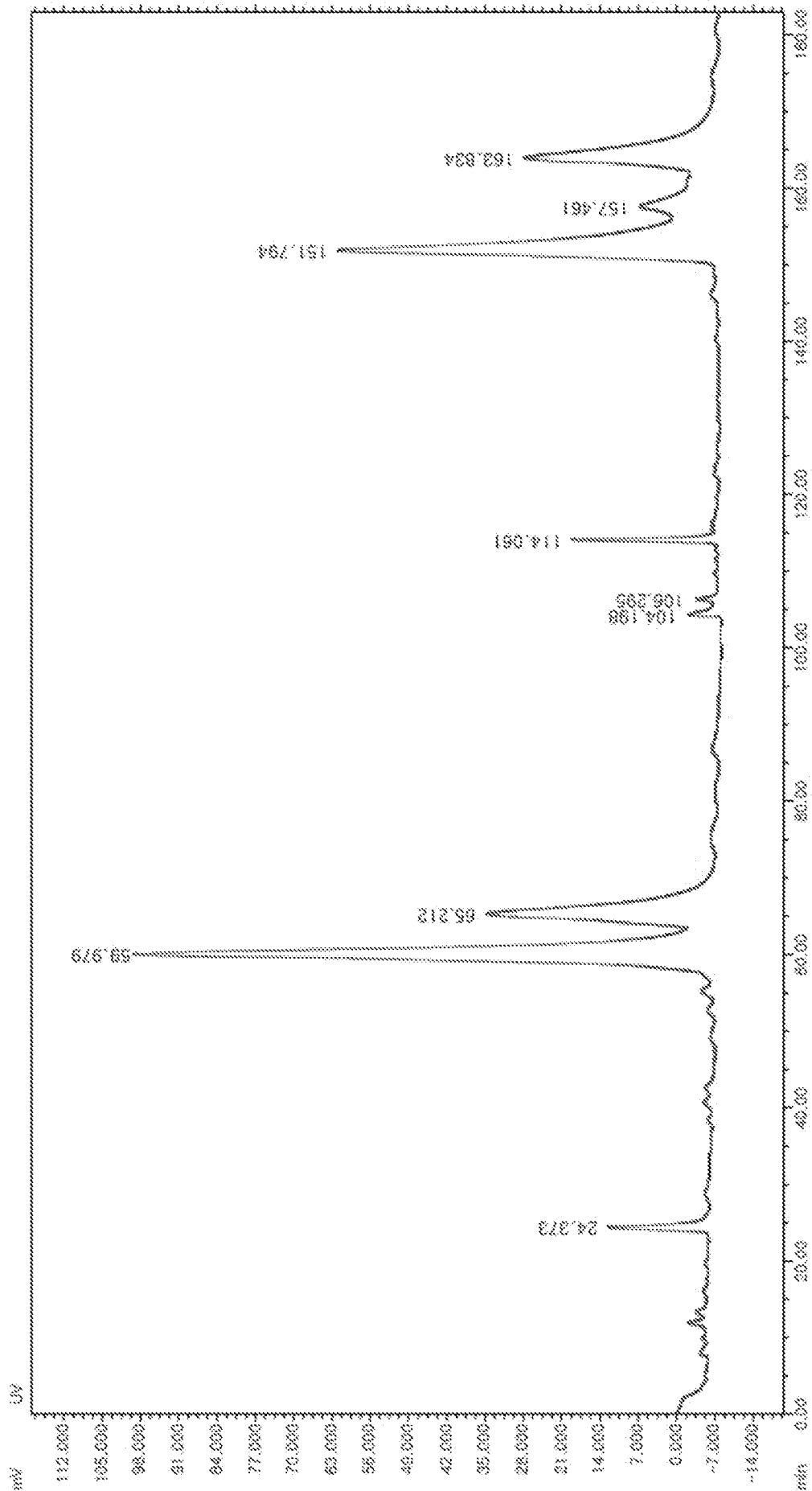
[도 10]



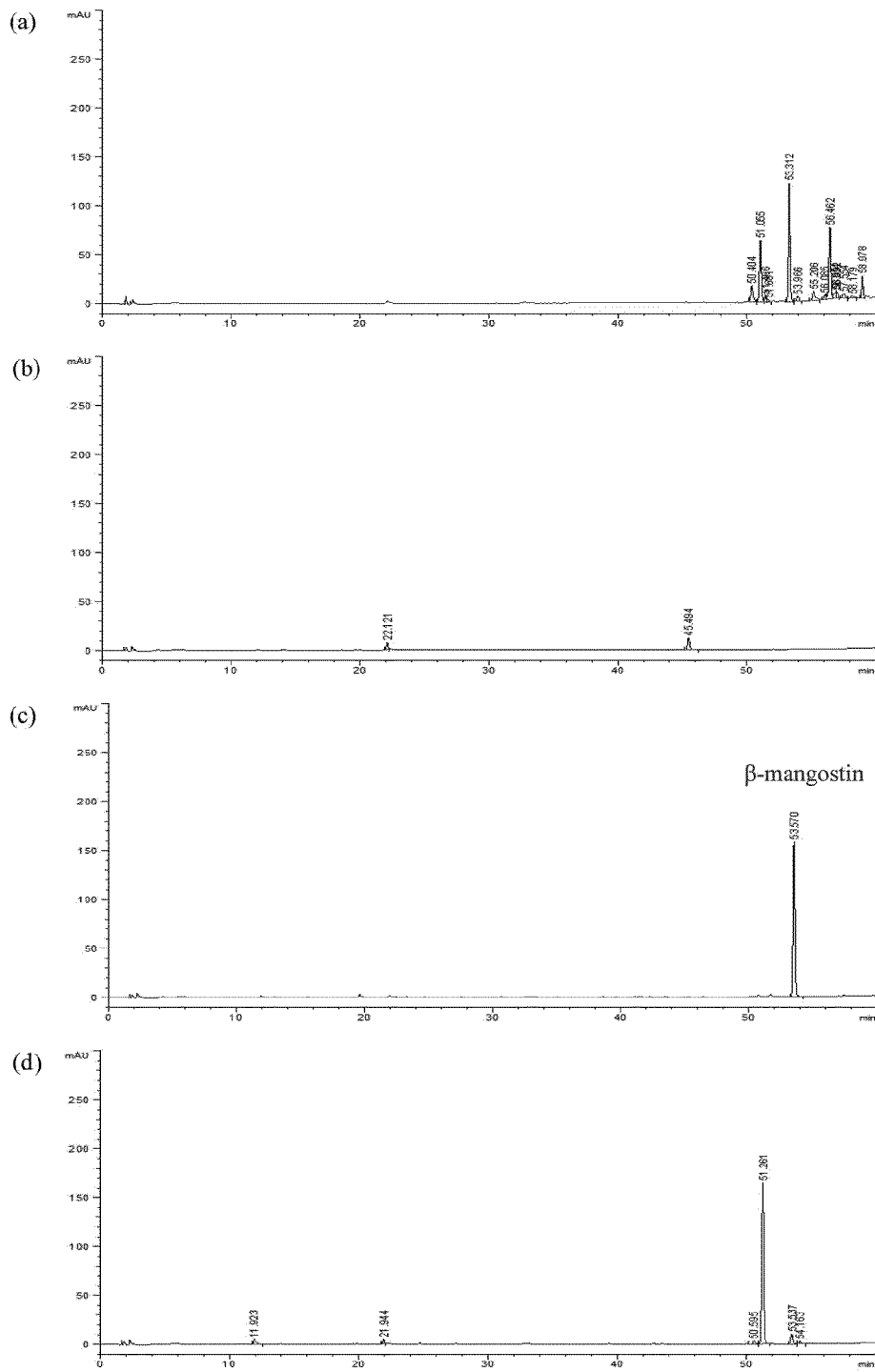
[도 11]



[도 12]



[도 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 311/86(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 311/86(2006.01); A61K 8/97(2006.01); A61P 35/00(2006.01); B01D 11/02(2006.01); B01D 15/08(2006.01); B01D 15/10(2006.01); B01D 15/18(2006.01); B01D 3/40(2006.01); C07C 227/40(2006.01); C07C 37/72(2006.01); C07H 17/04(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 베타 망고스틴(beta-mangostin), 모사 이동층(simulated moving bed), 크로마토그래피(chromatography), 일괄 대량 이동 모델(lumped mass transfer model)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 111170981 A (ZHEJIANG PROVINCIAL PEOPLE'S HOSPITAL) 19 May 2020 (2020-05-19) See claims 1, 2 and 5; and paragraphs [0030], [0046], [0051] and [0055].	1-11
Y	WO 2020-028198 A1 (BIOMASS OIL SEPARATION SOLUTIONS, LLC) 06 February 2020 (2020-02-06) See claims 17, 20 and 21.	1-11
Y	KR 10-1449808 B1 (CJ CHEILJEDANG CORPORATION et al.) 14 October 2014 (2014-10-14) See claims 1 and 12; paragraphs [0010], [0047] and [0049]-[0058]; and figure 9.	4-11
A	US 2021-0230206 A1 (SPECTRUM THERAPEUTICS GMBH) 29 July 2021 (2021-07-29) See claim 1; and paragraphs [0002] and [0029].	1-11
A	KR 10-2011-0126719 A (DANISCO A/S) 23 November 2011 (2011-11-23) See claim 1.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 August 2023

Date of mailing of the international search report

23 August 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006086

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1721917 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 31 March 2017 (2017-03-31) See claim 1; and paragraphs [0046]-[0047].	1-11
A	DE MELLO, R. F. Alexandre et al. A fast and efficient preparative method for separation and purification of main bioactive xanthones from the waste of <i>Garcinia mangostana</i> L. by high-speed countercurrent chromatography. <i>Arabian Journal of Chemistry</i> . 2021, vol. 14, 103252, pp. 1-13. See abstract; and figure 4.	1-11
A	MANEewan, S. et al. Separation of vitexin and iso-vitexin from mung bean seed coats using a three-zone simulated moving bed (SMB). <i>Waste and Biomass Valorization</i> . 2021, vol. 12, pp. 6601-6618. See abstract.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/006086

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111170981	A	19 May 2020	CN	111170981	B	19 April 2022
WO	2020-028198	A1	06 February 2020	CA	3073093	A1	06 February 2020
				US	10793498	B2	06 October 2020
				US	2020-199055	A1	25 June 2020
KR	10-1449808	B1	14 October 2014	BR	112014019488	A2	27 October 2020
				BR	112014019488	B1	10 August 2021
				CN	104203903	A	10 December 2014
				CN	104203903	B	28 September 2016
				EP	2812309	A1	17 December 2014
				EP	2812309	A4	09 September 2015
				EP	2812309	B1	26 May 2021
				ES	2882617	T3	02 December 2021
				HU	E055656	T2	28 December 2021
				IN	1764MUN2014	A	03 July 2015
				JP	2015-506958	A	05 March 2015
				JP	2018-024679	A	15 February 2018
				MY	171770	A	29 October 2019
				US	2013-0204040	A1	08 August 2013
				WO	2013-119034	A1	15 August 2013
US	2021-0230206	A1	29 July 2021	CA	3062750	A1	02 December 2019
				EP	3409339	A1	05 December 2018
				EP	3630326	A1	08 April 2020
				US	11306116	B2	19 April 2022
				WO	2018-233991	A1	27 December 2018
KR	10-2011-0126719	A	23 November 2011	BR	PI1007829	A2	25 April 2017
				BR	PI1007829	B1	20 October 2020
				CA	2753002	A1	02 September 2010
				CA	2753004	A1	02 September 2010
				CA	2753005	A1	02 September 2010
				CN	102405085	A	04 April 2012
				CN	102405085	B	17 September 2014
				CN	102413890	A	11 April 2012
				CN	102413890	B	04 June 2014
				CN	102413891	A	11 April 2012
				CN	102413891	B	05 November 2014
				DK	2401046	T3	03 August 2020
				DK	2401047	T3	14 April 2020
				DK	2401048	T3	23 September 2019
				EA	018890	B1	29 November 2013
				EA	019296	B1	28 February 2014
				EA	201101173	A1	28 February 2012
				EA	201101174	A1	28 February 2012
				EP	2401046	A1	04 January 2012
				EP	2401046	A4	25 February 2015
				EP	2401046	B1	29 April 2020
				EP	2401047	A1	04 January 2012
				EP	2401047	A4	25 February 2015
				EP	2401047	B1	15 January 2020
				EP	2401048	A1	04 January 2012
				EP	2401048	A4	04 March 2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/006086

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				EP	2401048 B1	12 June 2019
				JP	2012-518424 A	16 August 2012
				JP	2012-518536 A	16 August 2012
				JP	5753101 B2	22 July 2015
				JP	5762313 B2	12 August 2015
				UA	105206 C2	25 April 2014
				UA	105656 C2	10 June 2014
				US	2010-0212662 A1	26 August 2010
				US	2010-0213130 A1	26 August 2010
				US	2012-0010429 A1	12 January 2012
				US	7959811 B2	14 June 2011
				US	8192629 B2	05 June 2012
				US	8951416 B2	10 February 2015
				WO	2010-097510 A1	02 September 2010
				WO	2010-097511 A1	02 September 2010
				WO	2010-097513 A1	02 September 2010
KR	10-1721917	B1	31 March 2017	CN	107920980 A	17 April 2018
				CN	107920980 B	11 June 2021
				EP	3354254 A1	01 August 2018
				EP	3354254 A4	27 March 2019
				EP	3354254 B1	01 April 2020
				JP	2018-523678 A	23 August 2018
				JP	6681974 B2	15 April 2020
				US	2018-0256486 A1	13 September 2018
				WO	2017-052155 A1	30 March 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07D 311/86(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07D 311/86(2006.01); A61K 8/97(2006.01); A61P 35/00(2006.01); B01D 11/02(2006.01); B01D 15/08(2006.01); B01D 15/10(2006.01); B01D 15/18(2006.01); B01D 3/40(2006.01); C07C 227/40(2006.01); C07C 37/72(2006.01); C07H 17/04(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 베타 망고스틴(beta-mangostin), 모사 이동층(simulated moving bed), 크로마토그래피, 일괄 대량 이동 모델(lumped mass transfer model)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	CN 111170981 A (ZHEJIANG PROVINCIAL PEOPLE'S HOSPITAL) 2020.05.19 청구항 1, 2, 5; 단락 [0030], [0046], [0051], [0055]	1-11
Y	WO 2020-028198 A1 (BIOMASS OIL SEPARATION SOLUTIONS, LLC) 2020.02.06 청구항 17, 20, 21	1-11
Y	KR 10-1449808 B1 (씨제이제일제당 (주) 등) 2014.10.14 청구항 1, 12; 단락 [0010], [0047], [0049]-[0058]; 도면 9	4-11
A	US 2021-0230206 A1 (SPECTRUM THERAPEUTICS GMBH) 2021.07.29 청구항 1; 단락 [0002], [0029]	1-11
A	KR 10-2011-0126719 A (대니스코 에이/에스) 2011.11.23 청구항 1	1-11
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년08월23일(23.08.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년08월23일(23.08.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1721917 B1 (경상대학교산학협력단) 2017.03.31 청구항 1; 단락 [0046]-[0047]	1-11
A	ALEXANDRE DE MELLO, R. F. 등, "A fast and efficient preparative method for separation and purification of main bioactive xanthones from the waste of Garcinia mangostana L. by high-speed countercurrent chromatography", Arabian Journal of Chemistry, 2021 제14권, 103252, 페이지 1-13 초록; 도면 4	1-11
A	MANEewan, S. 등, "Separation of vitexin and iso-vitexin from mung bean seed coats using a three-zone simulated moving bed (SMB)", Waste and Biomass Valorization, 2021, 제12권, 페이지 6601-6618 초록	1-11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 111170981 A	2020/05/19	CN 111170981 B	2022/04/19
WO 2020-028198 A1	2020/02/06	CA 3073093 A1	2020/02/06
		US 10793498 B2	2020/10/06
		US 2020-199055 A1	2020/06/25
KR 10-1449808 B1	2014/10/14	BR 112014019488 A2	2020/10/27
		BR 112014019488 B1	2021/08/10
		CN 104203903 A	2014/12/10
		CN 104203903 B	2016/09/28
		EP 2812309 A1	2014/12/17
		EP 2812309 A4	2015/09/09
		EP 2812309 B1	2021/05/26
		ES 2882617 T3	2021/12/02
		HU E055656 T2	2021/12/28
		IN 1764MUN2014 A	2015/07/03
		JP 2015-506958 A	2015/03/05
		JP 2018-024679 A	2018/02/15
		MY 171770 A	2019/10/29
		US 2013-0204040 A1	2013/08/08
		WO 2013-119034 A1	2013/08/15
US 2021-0230206 A1	2021/07/29	CA 3062750 A1	2019/12/02
		EP 3409339 A1	2018/12/05
		EP 3630326 A1	2020/04/08
		US 11306116 B2	2022/04/19
		WO 2018-233991 A1	2018/12/27
KR 10-2011-0126719 A	2011/11/23	BR PI1007829 A2	2017/04/25
		BR PI1007829 B1	2020/10/20
		CA 2753002 A1	2010/09/02
		CA 2753004 A1	2010/09/02
		CA 2753005 A1	2010/09/02
		CN 102405085 A	2012/04/04
		CN 102405085 B	2014/09/17
		CN 102413890 A	2012/04/11
		CN 102413890 B	2014/06/04
		CN 102413891 A	2012/04/11
		CN 102413891 B	2014/11/05
		DK 2401046 T3	2020/08/03
		DK 2401047 T3	2020/04/14
		DK 2401048 T3	2019/09/23
		EA 018890 B1	2013/11/29
		EA 019296 B1	2014/02/28
		EA 201101173 A1	2012/02/28
		EA 201101174 A1	2012/02/28
		EP 2401046 A1	2012/01/04
		EP 2401046 A4	2015/02/25
		EP 2401046 B1	2020/04/29
		EP 2401047 A1	2012/01/04
		EP 2401047 A4	2015/02/25
		EP 2401047 B1	2020/01/15
		EP 2401048 A1	2012/01/04

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 2401048 A4	2015/03/04
		EP 2401048 B1	2019/06/12
		JP 2012-518424 A	2012/08/16
		JP 2012-518536 A	2012/08/16
		JP 5753101 B2	2015/07/22
		JP 5762313 B2	2015/08/12
		UA 105206 C2	2014/04/25
		UA 105656 C2	2014/06/10
		US 2010-0212662 A1	2010/08/26
		US 2010-0213130 A1	2010/08/26
		US 2012-0010429 A1	2012/01/12
		US 7959811 B2	2011/06/14
		US 8192629 B2	2012/06/05
		US 8951416 B2	2015/02/10
		WO 2010-097510 A1	2010/09/02
		WO 2010-097511 A1	2010/09/02
		WO 2010-097513 A1	2010/09/02
KR 10-1721917 B1	2017/03/31	CN 107920980 A	2018/04/17
		CN 107920980 B	2021/06/11
		EP 3354254 A1	2018/08/01
		EP 3354254 A4	2019/03/27
		EP 3354254 B1	2020/04/01
		JP 2018-523678 A	2018/08/23
		JP 6681974 B2	2020/04/15
		US 2018-0256486 A1	2018/09/13
		WO 2017-052155 A1	2017/03/30