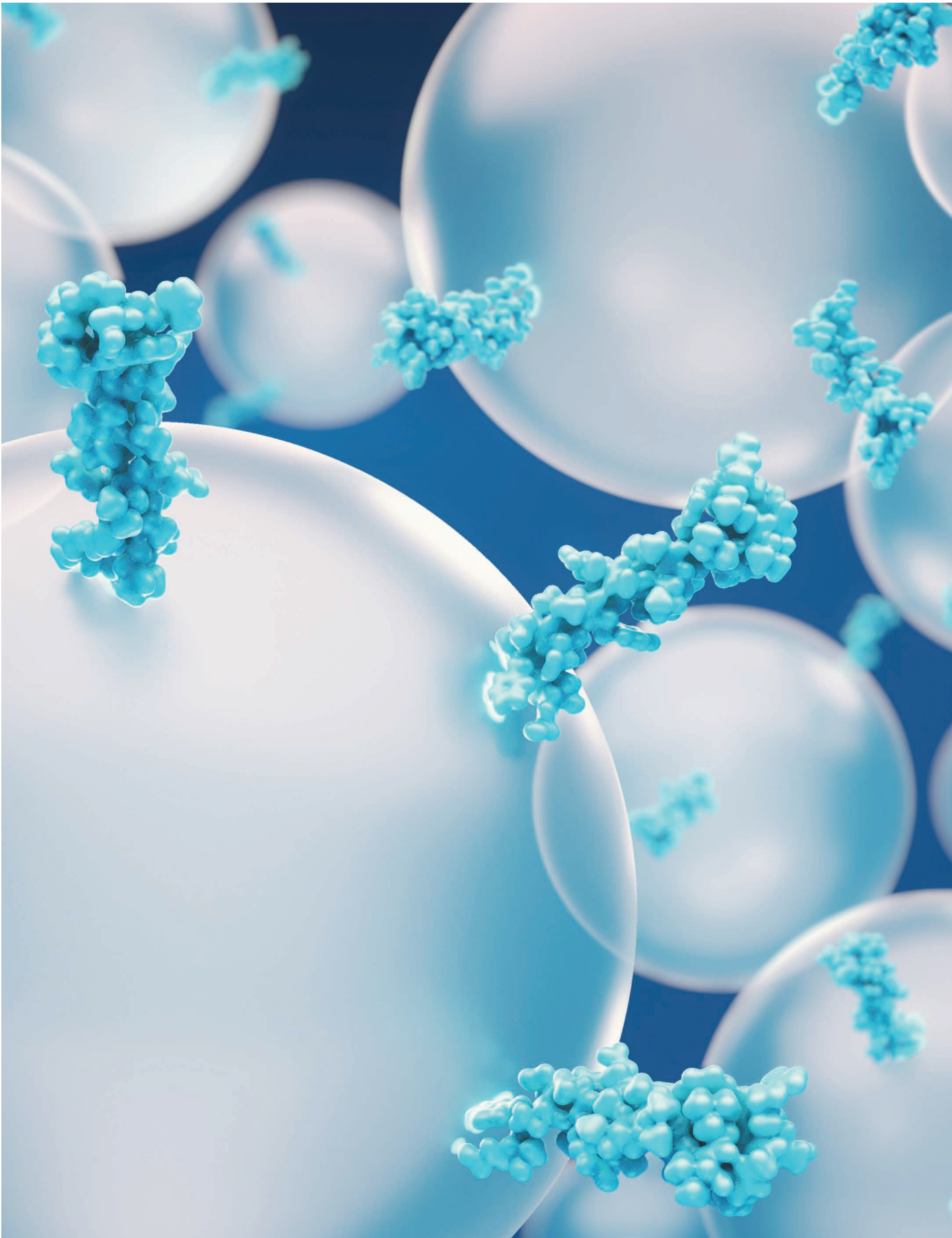


액체 크로마토그래피를 통한 합성 펩타이드의 분석 및 정제

소모품 워크플로 주문 가이드





합성 펩타이드 치료제

합성 펩타이드 치료제는 향상된 효능, 특이성 및 낮은 독성으로 인해 신약 개발 연구에서 점차 더 중요해지고 있습니다. 펩타이드는 경로 신호 전달부터 효소 조절 및 세포 통신 작용에 이르기까지 다양한 생물학적 경로에서 중요한 역할을 합니다. 합성 펩타이드는 이러한 다양한 생물학적 기능에서 중요한 역할을 하는 체내 자연 생성 펩타이드 또는 단백질의 기능을 그대로 재현하도록 설계되었습니다. 또한 이는 새로운 기능을 목표로 하도록 설계될 수 있으며 구조적으로 더 변형시켜 안정성과 생체 이용률을 높임으로써 전반적인 치료 효능을 향상시킬 수 있습니다.

펩타이드 정제 기술

펩타이드는 서열 길이가 2~50개 아미노산인 짧은 아미노산 폴리머입니다. 많은 합성 펩타이드는 폴리머 고체 지지체 레진에 고정된 펩타이드 사슬에 아미노산을 단계적으로 첨가하는 고체상 펩타이드 합성(SPPS)을 사용하여 생산됩니다. 한 아미노산의 카르복실기는 다른 아미노산의 아미노기와 반응하여 펩타이드 결합을 형성합니다. SPPS를 통해 합성 펩타이드를 생성하는 과정에는 여러 번의 탈보호, 활성화 및 결합 단계가 포함되며, 이어서 고체 지지체로부터 최종 서열이 절단됩니다. 최종 조제품에는 약물의 안전성과 효능에 영향을 미칠 수 있는 불순물이 포함되어 있으므로 액체 크로마토그래피로 분리, 특성화 및 모니터링해야 합니다.

UV 검출과 결합된 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 이러한 분리를 위한 확립된 접근 방식입니다.

TFA(Trifluoroacetic acid)는 이 분석에 사용되는 일반적인 이동상 첨가제이자 이온쌍 시약으로, 아미노산 서열의 카르복실기를 양성자화하는 낮은 pH 환경을 조성하여 2차 상호작용을 줄이고 크로마토그래피 분리 및 피크 모양을 개선합니다. 이는 분취 정제 분석 방법을 확장하려는 데 매우 중요합니다. TFA는 또한 펩타이드 서열에서 양으로 하전된 작용기와 이온쌍을 형성하여 비극성 역상 크로마토그래피 매질과 펩타이드의 전반적인 소수성 상호작용을 증가시킬 수 있습니다. 정제된 분획을 확인하고 특성화하기 위해 질량분석법(MS) 검출을 사용하는데, TFA는 이온화 효율을 억제하고 신호 억제를 유발할 수 있습니다. 포름산을 사용하는 대체 LC/MS 분석법은 최종 제품의 특성 규명에 이상적입니다.

펩타이드 정제를 위한 애질런트 역상 컬럼

애질런트는 합성 펩타이드 분석 워크플로를 단순화하도록 설계된 다양한 역상 컬럼 및 매질을 제공합니다. Agilent PLRP-S 역상 컬럼에는 다양한 공극 및 입자 크기로 제공되는 견고한 polystyrene/divinylbenzene(PS/DVB) 입자가 들어 있어 분석 펩타이드 분리에 이상적인 입자 케미스트리이며, 분취 정제로 쉽게 확장할 수 있습니다. 폴리머 입자는 본질적으로 소수성이고, 펩타이드 서열의 전하를 띤 작용기와 불필요한 2차 상호작용을 일으켜 띠 넓어짐과 피크 테일링(peak tailing)을 유발하는 기존의 실리카 기반 입자 지지체에서 볼 수 있는 표면 실라놀 및 미량 금속이 없습니다.

MS 특성 규명이 필요한 확인 분석의 경우, 고분리능 2.7 μ m Agilent Poroshell 입자 지지체를 갖춘 Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 및 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼이 포름산을 TFA의 대체 이동상 첨가제로 사용하는 LC/MS 분리에 이상적입니다. AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 펩타이드 분리의 적합성과 견고성을 보장하도록 특별히 설계된 C18 케미스트리를 사용합니다. 표면 실라놀과의 2차 상호작용으로 인해 피크 넓어짐과 테일링이 발생하는 보다 까다로운 펩타이드 분리에 대응한 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼 케미스트리는 원치 않는 2차 상호작용을 줄여 개선된 피크 모양 및 분리능을 제공하는 하전된 표면 개질을 도입해 대체 C18 선택도를 갖도록 설계되었습니다.

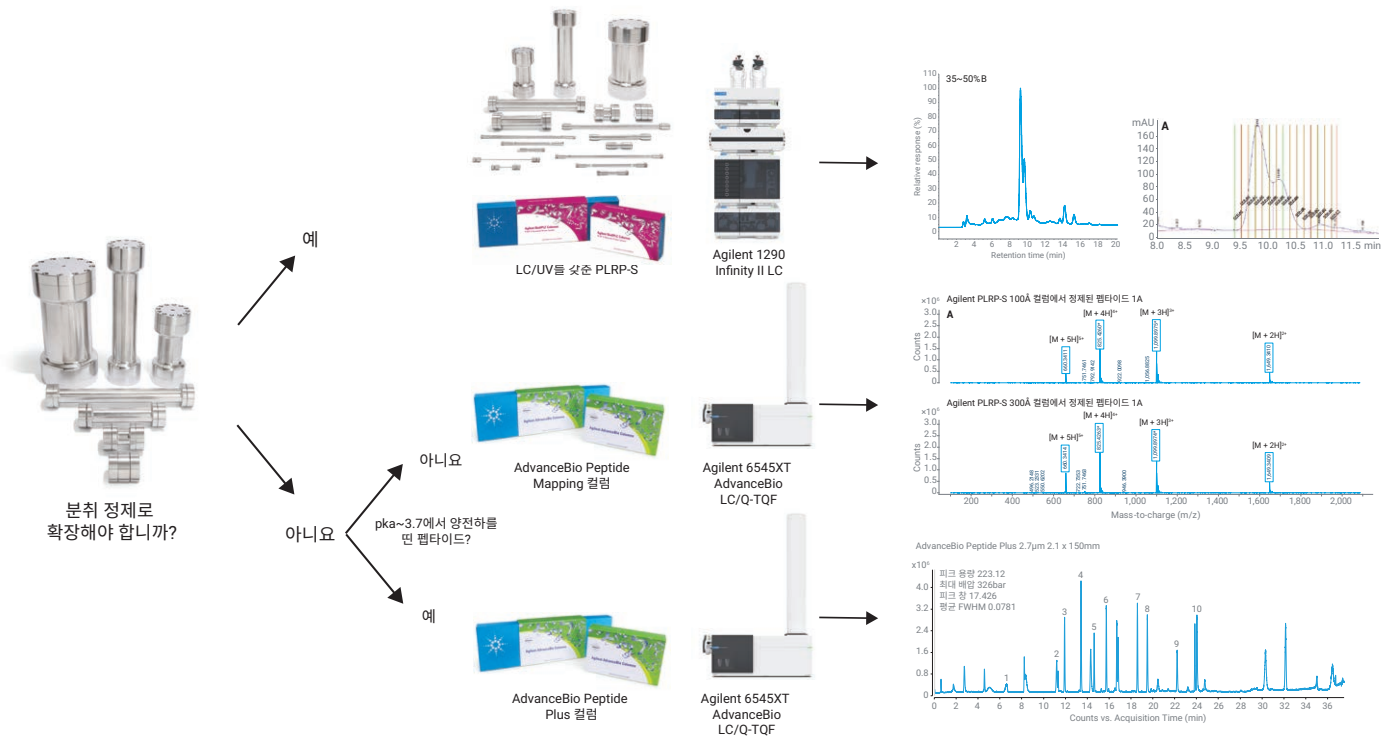


그림 1. 합성 펩타이드에 대한 분석 워크플로 선택은 분리 스케일 및 MS 검출을 통해 시료를 특성화해야 하는 필요성에 따라 달라집니다.

최적의 크로마토그래피 분리 및 검출을 위한 팁



시료 전처리

- Agilent StratoSpheres 고성능 및 고품질 레진 제품 라인¹은 고체 지지체 펩타이드 합성 경로를 통해 합성 펩타이드를 개발하고 제조하기 위한 다양한 폴리머 지지체를 나타냅니다.
- Boc 및 Fmoc 케미스트리와 호환되는 StratoSpheres SPPS 레진은 고순도 펩타이드를 위한 탁월한 합성 성능을 제공합니다.
- 고체 지지체 레진은 공정 관련 불순물 및 부산물을 간단히 클린업할 수 있게 해주어 조품(crude) 시료의 복잡성을 단순화합니다.

크로마토그래피 분리 - UV 검출

- 워크플로에서 UV 검출을 선택하면 TFA를 이동상 첨가제로 사용할 수 있습니다. pKa~0.23인 TFA는 pH를 낮추어 펩타이드의 카르복실 작용기와 실리카 표면의 잔류 실라놀을 양성자화함으로써 피크 넓어짐과 테일링으로 이어지는 원치 않는 2차 상호작용을 줄입니다.
- PLRP-S 컬럼 포트폴리오는 입자와 공극 크기의 선택에 유연성을 제공합니다. 합성 펩타이드의 서열 길이에 따라 다양한 공극 크기(100Å 또는 300Å)를 평가하십시오.
- 5% MPB에서 95% MPB까지의 초기 일반 그레디언트 스퀴밍으로 분석법 최적화²를 시작하여 표적 생성물의 용리 프로파일 및 조품(crude) 시료에 남아 있는 불순물에 대해 파악하십시오.
- 전체 분석 시간을 단축하고 전체 길이의 표적 생성물 및 밀접하게 관련된 불순물 간의 분리능을 최적화하기 위한 보다 집중된 그레디언트를 개발할 수 있습니다.
- 분석 스케일에서 최적화된 분리 방법이 개발되면 분석법을 더 큰 내경의 컬럼으로 쉽게 확장하여 더 많은 시료량을 정제할 수 있습니다.
- 분리능에 따라 분취 스케일에서 정제할 수 있는 순도와 시료 양이 결정되므로 분취 단계로 확장하기 전에 분석 컬럼 차원에서 그레디언트를 최적화하는 것이 중요합니다.

크로마토그래피 분리 - MS 검출

- 워크플로에서 MS 검출을 선택하면 TFA를 이동상 첨가제로 사용할 수 있는 가능성이 제한됩니다. TFA는 시료의 이온화 효율에 영향을 미치고 신호 억제를 유발하여 시료에서 잠재적인 소량 불순물을 검출하고 특성화하는 능력을 떨어뜨릴 수 있습니다. 포름산은 MS 검출에 더 적합한 산성 조정제이지만 pKa가 높아(~3.7) TFA에 비해 시료가 고정상과 상호작용하는 방식에 영향을 미칠 수 있습니다.
- AdvanceBio Peptide Mapping 및 AdvanceBio Peptide Plus 컬럼 케미스트리^{3,4}는 2.7µm Poroshell 입자 지지체에 고분리능 분리가 가능합니다.
- 5% MPB에서 95% MPB까지의 초기 일반 그레디언트 스퀴밍으로 분석법 최적화를 시작하여 표적 생성물의 용리 프로파일 및 조품(crude) 시료에 남아 있는 불순물에 대해 파악하세요.
- 펩타이드의 서열에 높은 수준의 양전하를 띤 작용기가 있고 AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼의 분리에서 피크 넓어짐과 테일링이 나타나는 경우, 이는 시료와 잔류 표면 실라놀의 상호작용 때문일 수 있습니다. AdvanceBio Peptide Plus 컬럼을 평가해 보세요.
- 컬럼 케미스트리를 결정한 후에는 전체 분석 시간을 단축하고 전체 길이의 표적 생성물 및 밀접하게 관련된 불순물 간의 분리능을 최적화하기 위한 보다 집중된 그레디언트를 개발할 수 있습니다.

질량 분석

- TFA 또는 인산염 함유 완충액을 MS 검출과 함께 사용하지 마세요!
- 분석이 끝나고 관심성분의 머무름 시간 이후에는 특히 높은 유기용매 세척으로 가능하면 void volume이 용출될 때까지 LC 흐름을 waste로 전환하여 폐기시킵니다.
- HPLC 또는 더 높은 등급의 용매를 사용합니다.
- MS 소스에 대해 정기적인 세척 작업을 마련합니다.

각 분석법에 대한 시료 분석법 및 크로마토그램

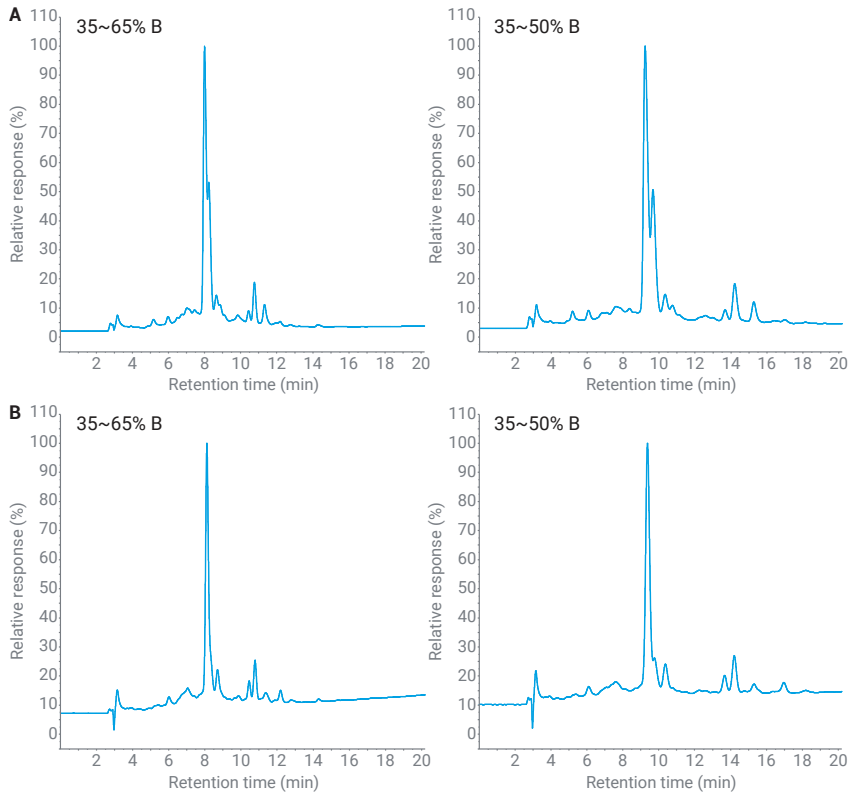


그림 2. ²(A) Agilent PLRP-S 300Å 컬럼에서 펩타이드 1A의 그레디언트 최적화.
(B) Agilent PLRP-S 300Å 컬럼에서 펩타이드 1B의 그레디언트 최적화.

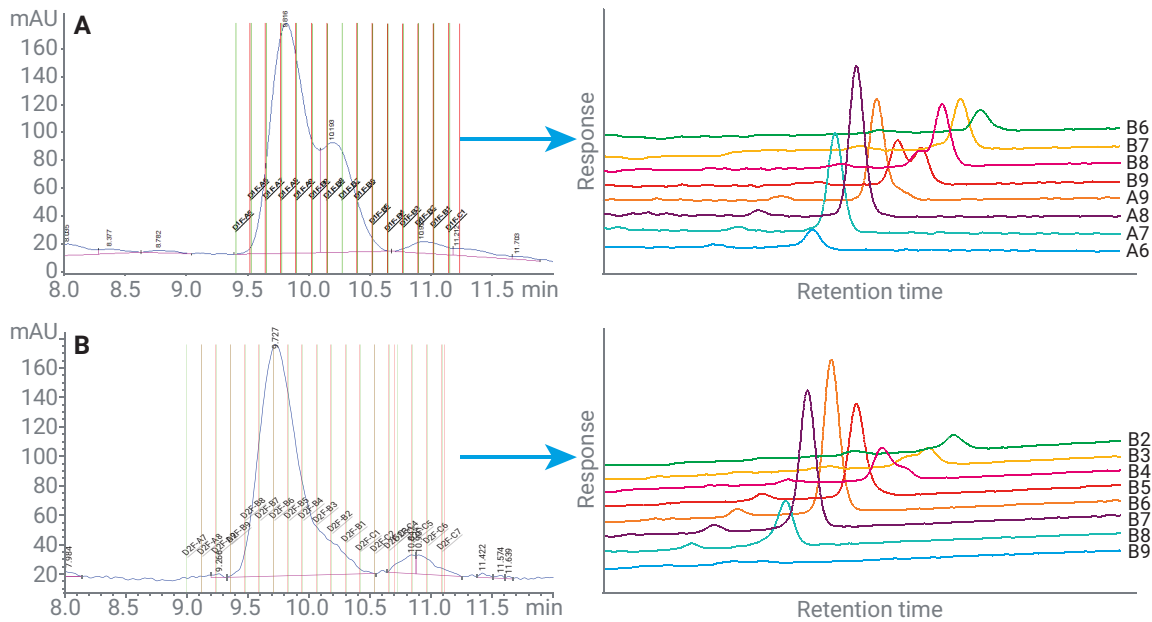


그림 3. ²(A) Agilent PLRP-S 100Å 컬럼에서 분획 재분석을 보여주는 펩타이드 1A(오른쪽).
(B) Agilent PLRP-S 100Å 컬럼에서 분획 재분석을 보여주는 펩타이드 1B(오른쪽).

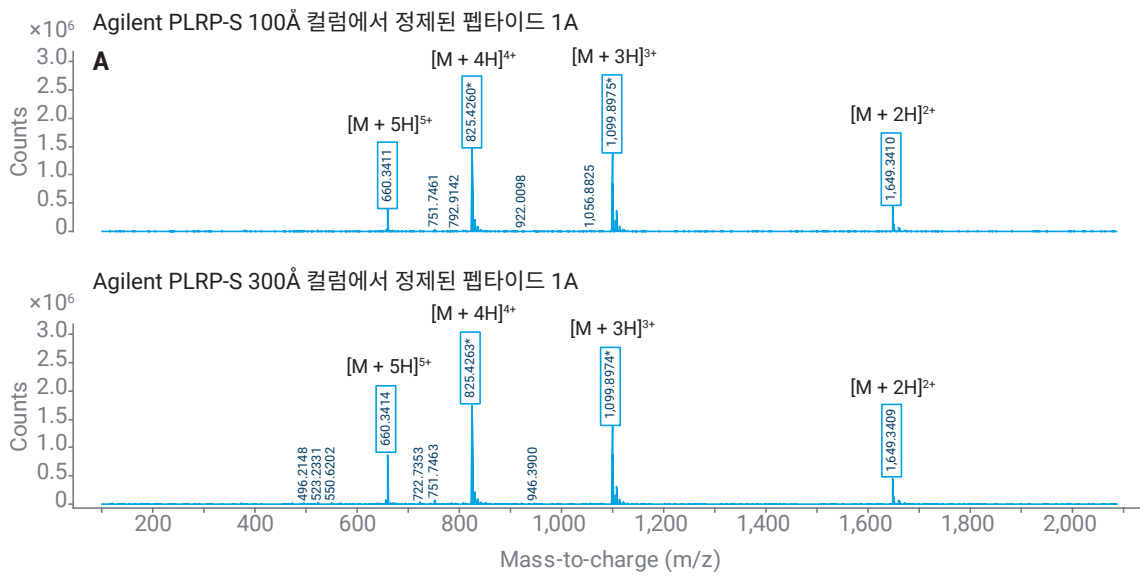


그림 4. Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼에서 LC/MS로 분석한 정제된 펩타이드의 질량 스펙트럼 결과(분석법 조건은 참고 문헌 2 참조)

참고 문헌

1. Production-Scale Peptide Synthesis Using Agilent StratoSpheres Synthesis Support Resins, [5991-1485KO](#)
2. Optimizing Analysis and Purification of a Synthetic Peptide Using PLRP-S Columns, [5994-6087EN](#)
3. Analysis of a Synthetic Peptide and its Impurities, [5994-2760KO](#)
4. Agilent AdvanceBio Peptide Plus 2.7 μm Column for Peptide Characterization, [5994-3508KO](#)

용이한 선택 및 주문 정보



다음 표에 나열된 품목을 주문하려면 헤더의 MyList 링크를 클릭하여 즐겨찾기 목록에 품목을 추가하세요. 향후 주문에 사용할 수 있도록 목록은 내 즐겨찾기에 저장되어 있습니다. 즐겨찾기를 처음 사용하는 경우 계정 확인을 위해 이메일 주소를 입력하라는 메시지가 표시됩니다. 애질런트 계정이 있다면 바로 로그인할 수 있으며, 등록된 애질런트 계정이 없다면 계정을 등록하여 주세요. 이 기능은 전자상거래가 가능한 지역에서만 유효합니다.

품목 번호 링크를 클릭하여 애질런트 온라인 스토어에서, 또는 일반 판매 및 대리점 채널을 통해 개별 품목을 주문할 수도 있습니다.

MyList 1: 펩타이드 합성을 위한 고체상 지지체

설명	제품 번호
고체상 펩타이드 합성	
AmphiSpheres 40RAM, 0.4mmol/g, 75~150µm, 100g	PL3867-4764
PL-Rink Resin (1% DVB) 0.3mmol/g 75~150µm, 100g	PL1467-4749

MyList 2: 펩타이드 정제용 HPLC 컬럼

설명	제품 번호
PLRP-S 컬럼	
PLRP-S 100 Å, 8µm, 2.1 x 150mm	PL1512-3800
PLRP-S 100 Å, 8µm, 2.1 x 250mm	PL1512-5800
PLRP-S 100 Å, 8µm, 25 x 150mm	PL1212-3800
PLRP-S 300 Å, 8µm, 2.1 x 150mm	PL1912-3801
PLRP-S 300 Å, 8µm, 2.1 x 250mm	PL1912-5801
PLRP-S 300 Å, 8µm, 4.6 x 150mm	PL1512-3801
PLRP-S 300 Å, 8µm, 4.6 x 250mm	PL1512-5801
PLRP-S 300 Å, 8µm, 25 x 150mm	PL1212-3801
PLRP-S 300 Å, 8µm, 50 x 150mm	PL1712-3801
AdvanceBio Peptide Mapping	
AdvanceBio Peptide Mapping 120Å, 2.7µm, 2.1 x 100mm	655750-902
AdvanceBio Peptide Mapping 120Å, 2.7µm, 2.1 x 150mm	653750-902
AdvanceBio Peptide Plus 컬럼	
AdvanceBio Peptide Plus 100Å, 2.7µm, 2.1 x 150mm	695775-949

MyList 3: 합성 펩타이드의 HPLC 정제용 공급품 및 용매

설명	제품 번호
Ultra-low Dispersion 키트†	
Ultra-low dispersion tubing kit for Agilent 1290 Infinity II	5067-5963
Ultra-low dispersion tubing kit for Agilent 1290 Infinity II Bio	5004-0007
시료 용기 공급품	
A-Line screw top vial, 2mL, 12 x 32mm (12mm cap) amber, write-on spot, 100/pk	5190-9590
Screw cap, 12mm, bonded, blue, PTFE/white silicone septa, 100/pk	5190-7021
Vial insert, 250µL, 5.6 x 30mm, deactivated glass with polymer feet, 100/pk	5181-8872
InfinityLab well-plate 96/0.5mL, 30/pk	5043-9310
InfinityLab well-plate silicone closing mat for 96-well plates, 50/pk	5042-1389
용매 및 첨가제	
InfinityLab Ultrapure LC/MS grade Water, 1L	5191-4498
InfinityLab Ultrapure LC/MS grade MeOHL, 1L	5191-4497
Formic acid, 99.5% purity, 5mL	G2453-85060
용매 여과 관련 공급품*	
InfinityLab Solvent filtration assembly	5191-6776
InfinityLab solvent filtration flask, glass, 2L	5191-6781
Filter membrane, Nylon 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4341
Filter membrane, regenerated cellulose 47mm, pore size 0.2µm, 100/pk	5191-4340
Solvent bottle glass filter, solvent inlet, 20µm	5041-2168
용매 관리 공급품	
InfinityLab Stay Safe cap starter kit	5043-1222
InfinityLab solvent bottle, clear, 1L	9301-6524
InfinityLab solvent bottle, amber, 1L	9301-6526
Solvent bottle, clear, 2L	9301-6342
Solvent bottle, amber, 2L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe purging bottle	5043-1339
InfinityLab waste can, GL45, 6L with Stay Safe cap (charcoal filter 5043-1193 not included)	5043-1221
InfinityLab charcoal filter with time strip, 58g (use with 5043-1221)	5043-1193

† 1290 Infinity II Bio 시스템을 사용할 경우, Agilent 1290 Infinity II Bio용 초저분산 튜빙 키트를 권장합니다.

* 표에 나열된 용매가 아닌 다른 용매를 사용할 경우, 분석 전 InfinityLab 용매 여과 어셈블리를 사용하세요.

Agilent CrossLab 서비스

CrossLab은 서비스와 소모품을 통합하여 워크플로의 성공과 생산성 및 운용 효율성 향상을 지원하기 위한 애질런트의 부문입니다. 애질런트는 CrossLab으로 귀하의 목표 달성을 지원하기 위해 모든 작업 요소들의 통찰을 제공하기 위해 노력합니다. CrossLab은 분석법 최적화, 유연한 서비스 계획 및 모든 기술 수준에 대한 교육을 제공합니다. 애질런트는 최고 성능을 위해 기기 및 실험실 관리를 지원하는 다른 많은 제품과 서비스를 갖추고 있습니다.

Agilent CrossLab에 대해 더 자세히 알아보고, 실제 우수한 성과를 거둔 사례를 살펴보세요.

www.agilent.com/crosslab



더 많은 애질런트 소모품 워크플로 주문 가이드 찾아보기:

www.agilent.com/chem/ordering-guide

추가 정보:

www.agilent.com/chem/oligonucleotide-analysis

온라인 구매:

www.agilent.com/chem/store

국가별 애질런트 고객센터 찾기:

www.agilent.com/chem/contactus

미국 및 캐나다

1-800-227-9770

agilent_inquiries@agilent.com

유럽

info_agilent@agilent.com

아시아 태평양

inquiry_lsca@agilent.com

DE58592975

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023
2023년 8월 31일, 한국에서 발행
5994-6704KO

한국애질런트테크놀로지스㈜
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화 : 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스 : 82-2-3452-2451
이메일 : korea-inquiry_lsca@agilent.com

