



AGILENT ADVANCEBIO 역상 컬럼을 사용하여 생체분자 특성 규명 개선

The Measure of Confidence

백서

왜 역상인가?

단백질 바이오 의약품은 매우 불균일하므로 유효 성분(API)을 완전히 특성 규명하려면 많은 크로마토그래피 기법이 필요할 수 있습니다. 적합한 분석법에는 다이머와 응집체의 정량을 위한 크기 배제 크로마토그래피 및 전하 변이체의 식별을 위한 이온 교환이 있습니다. 이 두 기법 모두가 수용성 용리액 및 비변성 조건을 이용합니다. 그러나, 단백질의 완전 특성 규명의 일부로서, 기본 아미노산 서열과 더불어 제조 단계의 정제 또는 제제 과정에 발생할 수 있는 서열에 대한 번역 후 변형(post-translational modifications)을 확인할 필요도 있습니다. 이러한 유형의 분석을 수행하기 위해서는 변성 조건이 필요하며 따라서 역상 HPLC가 일반적인 기법으로 선택됩니다.

역상(RP)은 바이오 크로마토그래피에 사용되는 세 가지 주요 기법 중 하나이며, LC/MS 검출과의 호환성 때문에 특히 유용합니다. 그리고 Agilent ZORBAX RRHD 300Å, 1.8µm 컬럼에서 확인된 바와 같이 향상된 작은 입자 기술 때문에 많은 바이오 의약품 응용 분석에서 RP가 매력적인 선택입니다. Intact 단일클론 항체 및 큰 조각 분리를 위해 AdvanceBio RP-mAb에서 Agilent Poroshell 기술의 사용은 확산 거리 감소로 인해 속도와 분리능에 큰 이점을 제공하므로 고유한 이점이 있습니다. 최신 결합상 케미스트리의 도입과 함께 RP 분리는 또 다른 선택성을 제공할 수 있으며 그 중 일부는 단백질에 높은 감도를 가질 수 있습니다. 예를 들어, AdvanceBio RP-mAb 및 ZORBAX RRHD 300Å 1.8µm 컬럼의 고유한 Diphenyl 상은 다른 케미스트리에서 볼 수 없는 작은 미세한 디테일을 분리합니다.

역상 크로마토그래피의 이점 중 하나는 서로 다른 단백질 단계의 분석에 적용할 수 있는 다양성입니다. 그림 1은 intact mAb부터 펩타이드 mAb 조각까지 mAb의 완전한 특성 규명을 위한 일부 단계를 보여줍니다. 특성 규명은 intact 단백질로 시작하여, 계속해서 환원, 알킬화 및 분리를 수행합니다. 큰 pore의 역상 컬럼은 첫 두 단계에 적절하며 작은 pore의 컬럼은 분리된 단백질의 분석에 가장 적합합니다. 서로 다른 결합상, 컬럼 사양 및 크로마토그래피 조건을 이용하여 서로 다른 선택성을 얻을 수 있습니다.

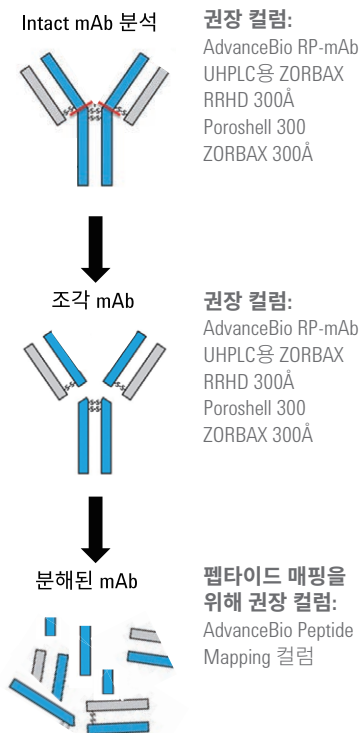


그림 1. Intact 단백질부터 분해된 단백질까지



Agilent Technologies

예를 들어, Heavy chain 및 Light chain 또는 Fab 및 Fc의 분석에 넓은 pore을 가진 컬럼을 사용할 수 있습니다. 매우 큰 분자(150 kDa)의 분석에는 AdvanceBio RP-mAb를 권장합니다. UHPLC 또는 최고의 분리능이 필요한 응용 작업의 경우, ZORBAX RRHD 300Å, 1.8µm 컬럼을 사용하는 것이 더 좋을 수 있습니다. 단백질 분리의 최종 단계는 효소 분리로서 작은 펩타이드 조각을 생성합니다. 그런 다음 Agilent AdvanceBio 펩타이드 매핑 컬럼에서처럼 펩타이드 매핑이 120Å의 pore 크기를 이용해 수행됩니다.

이 간단한 개요가 단백질 특성 규명 과정의 시작이라면, 모든 단백질 분석의 시작점인 시료 전처리는 어떨까요?

더 효과적인 바이오 크로마토그래피를 위한 시료 전처리

시료 전처리는 바이오 크로마토그래피에서 정확하고 재현 가능하며 의미 있는 결과를 얻기 위한 중요한 단계입니다. 생물학적 세포나 유기체로부터 분리된 단백질에는 자연적으로 존재하는 케라틴, 알부민, 혈청 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 및 다당류와 같은 오염물질이 포함되어 있습니다. 게다가, 효소 또는 생물학적 활성을 유지하기 위해 다양한 무기 염, 버퍼, 환원제, 계면활성제, detergent 및 방부제 등도 시료에 추가될 수 있습니다. 이러한 물질은 질량분석법에 의한 검출 및/또는 정량과 같이 액체 크로마토그래피 기법의 성능에 영향을 미치므로 성공적인 결과를 얻기 위해서는 반드시 제거해야 합니다.

단백질은 여러 형태로 존재하며 서로 다른 세포 위치(예: 세포막이나 세포질)에서 발견되고 다양한 용해도를 가지기 때문에 모든 단백질을 분리하기 위한 범용 시료

전처리 절차는 없습니다. 일반적인 단백질 시료 전처리 과정에는 탈염, 농축, 원심분리, 친화성, 투석, 여과 및 초미세여과, 침전 및 동결, 건조 등이 포함됩니다. 등전점, 분자량, 형태, 용해도 및 소수성과 같은 단백질의 독특한 특징으로 인해 이 정제를 설계하게 되었습니다. 단백질은 매우 약하기 때문에, 시료 전처리 과정에서 형태 및 생물학적 활성을 변화시키는 원치 않는 변형이 생기지 않도록 주의를 기울여야 합니다.

바이오 크로마토그래피 시료 전처리 분석법은 검출기, 기기 및 기타 요소를 기준으로 시료의 유형과 필요한 분리의 종류에 영향을 받습니다. 표 1은 시료 전처리 분석법을 선택할 때 주요 옵션들을 보여줍니다. 이러한 방법은 상호 배타적이지 않으므로, 오염된 시료로부터 입자를 제거하기 위해 시린지 프리필터를 사용하고 이어서 인지질을 제거하고 이온 억제제를 방지하기 위해 Captiva ND Lipids 플레이트나 튜브를 사용할 수 있습니다.

표 1. 바이오 크로마토그래피를 위한 시료 전처리 옵션

시료	시료 전처리 장치	참고	참고 문헌
고농도 단백질	Agilent Multiple Affinity Removal System	혈청, 플라스마 등 생물학적 시료로부터 얻을 수 있는 매우 가치있는 저농도 단백질과 바이오마커의 식별 및 특성 규명이 가능합니다. MARS는 인간의 체액에서 발견된 최대 14개의 고농도 단백질과 쥐의 체액에서 발견된 3개의 고농도 단백질을 다양한 LC 컬럼 사양 및 spin 카트리지 형태의 제품으로 재현성있게 특이적으로 제거할 수 있습니다. 애질런트의 최적화된 버퍼, 편리한 spin 필터 및 농축기와 함께 사용하는 경우 MARS는 대부분의 LC 기기(컬럼) 및 벤치탑 원심분리기(spin 카트리지)와 호환되는 자동화된 통합 제거 솔루션을 생성합니다. MARS를 이용해 제거된 시료는 2-D 겔 전기영동, LC/MS 및 기타 분석 기법을 이용한 후속 분석을 위한 준비가 된 상태입니다.	Agilent HPLC 컬럼 선택 가이드
탈염	mRP-C18	Agilent mRP-C18 컬럼은 MARS를 이용해 고농도 단백질을 제거한 후 인간 혈청에 대한 최적화된 탈염 및 농축 효과를 제공합니다. 이렇게 조합된 워크플로를 통해 바이오마커 연구에서 추가적인 후속 처리를 위한 높은 회수율을 제공할 수 있습니다. 추가적으로, 분자량 차단(MWCO) 기술로 spin 농축 단계를 생략하고 5kDa 미만의 펩타이드와 폴리펩타이드를 안전하게 회수할 수 있습니다. 이 기술을 결합하면 mRP-C18 컬럼에 의해 제거 가능한 염 또는 기타 첨가제로 인한 방해 없이 작고 분리가 가능합니다.	응용 자료 5989-2506EN
높은 입자 로드 시료	Captiva 프리미엄 시린지 필터 유리 섬유/나일론	유리 섬유는 입자를 막을 막기 전에 수집하는 프리필터처럼 작용하여, PTFE가 시료로부터 입자를 효율적으로 여과할 수 있습니다.	응용 자료 5991-1308EN
단백질 분석, 생체분자, 버퍼	Captiva 프리미엄 시린지 필터 PES	PES는 극히 낮은 단백질 결합 특성 때문에 권장됩니다. PES는 소수성 막이며 추출 가능성이 매우 낮습니다. PES는 수용액 및 일부 유기 용액과 호환됩니다.	응용 자료 5991-1308EN
마이크로 부피의 SPE	OMIX	OMIX 피펫 팁은 MALDI-TOF 또는 LC/MS/MS 이전에 펩타이드 및 단백질을 femtomole 및 picomole 수준으로 확실하게 정제하고 농축합니다. OMIX에 사용된 고유한 monolithic 흡착제 기술은 일정한 유속과 강한 분석물질-표면 상호 작용을 일관되게 제공합니다. OMIX의 높은 결합 능력은 높은 생산성을 제공합니다. 10µL 팁은 최대 8µg의 펩타이드를 결합합니다. OMIX의 우수한 유속 및 탁월한 결합 능력으로 펩타이드를 확실하게 회수하고, 다중 분취, 다중 팁 및 증발 단계에서 펩타이드 손실을 최소화합니다.	응용 자료 5990-8885EN
용해물 여과	Captiva ND 플레이트 또는 튜브	고처리량의 자동 in-well 단백질 침전을 위해 고안된 사용이 간편한 여과 장치. 고유한 홀림 방지(ND) 막으로 구성된 Captiva ND 플레이트에서 메탄올이나 아세토니트릴을 이용한 용매 우선 단백질 침전이 가능합니다. Captiva의 고유한 듀얼 필터 디자인은 시료 손실 및 필터 막힘을 방지하면서 균일화하고 빠른 유속을 제공합니다.	응용 자료 5990-8388EN
지질 제거를 통한 용해물(lysate) 여과	Captiva ND Lipids 플레이트 또는 튜브	플라스마의 LC/MS 바이오 분석을 위해 특별히 설계된 Captiva ND Lipids는 Captiva ND의 사용이 쉽고 우수한 유속 속성과 고유한 화학적 필터를 결합한 것입니다. 이 플레이트는 침전된 플라스마 시료로 인한 이온 억제 인지질, 단백질 및 계면활성제 간섭을 효율적으로 제거합니다.	응용 자료 5991-0445EN

의약품 발굴(Drug discovery)

의약품 발굴 응용 분야에서는 질량 분석법(MS)을 다양하게 사용할 수 있도록 최고 수준의 감도와 분리능이 요구되며 역상 분리가 이상적입니다. MS의 높은 감도는 mAbs 및 기타 재조합 단백질의 특성 규명과 복합 펩타이드 분해물의 식별에 유용합니다. MS는 펩타이드 식별 및 번역 후 변형(post translational modifications)에 대한 정보를 제공합니다.

의약품 발굴 성공을 위한 팁

분리에 적합한 pore 크기 선택

실리카의 pore 크기는 바이오 크로마토그래피를 위한 역상 컬럼의 매우 중요한 파라미터입니다. 5,000Da 미만의 분자량을 가진 분자의 경우 90 ~ 150Å의 작은 pore 크기를 가진 컬럼이 일반적으로 선택됩니다(바이오 응용 분야의 경우 60Å pore 크기의

컬럼을 사용하지 마십시오). 200 ~ 300Å의 pore 크기는 일반적으로 저분자량 단백질(5 ~ 150kDa)에 사용됩니다. 단일클론 항체는 약 150kDa이므로, 1000 ~ 4000Å 같이 300Å, 450Å 및 그 이상 pore 크기의 컬럼은 RP 분리에 적합합니다. 가장 큰 실리카 pore 크기는 450Å입니다.

폴리머 PLRP-S는 매우 높은 분자량의 단백질과 백신용으로 1000 및 4000Å의 pore 크기에 이용할 수 있습니다. 분자량이 약 5,800Da인 인슐린과 같은 작은 단백질은 작은 pore 크기로 분석할 수 있지만 더 큰 pore 크기를 검토해야 합니다. 적절한 pore 크기를 선택하면 효율을 극대화할 수 있습니다. Pore 크기와 분자량이 너무 작으면 pore 사이에 확산이 제한됩니다. 높은 효율은 적절한 pore 크기에서 얻어집니다. 효율을 극대화하기 위해, 최적의 pore 크기에 작은 입자 크기를 선택해야 합니다.

AdvanceBio 펩타이드 매핑 컬럼에서 쓰이는 120Å와 같이 작은 pore 크기를 가진 컬럼이 대개 펩타이드에 최적으로 고려됩니다. 폴리펩타이드, 단백질 조각 및 intact 단백질의 경우 300Å 이상의 pore이 더 적합합니다. 그림 4는 300Å pore 크기를 가진 컬럼에 대비하여 <100Å pore 크기를 가진 컬럼에서 얻은 결과를 비교할 때 인슐린의 분리 효율이 두 배 이상임을 보여줍니다. 피크 모양도 pore 크기가 가장 작은 컬럼(ZORBAX SB-C18)과 가장 큰 컬럼(ZORBAX 300SB-C18) 사이에 크게 개선되었습니다. 이 두 개의 컬럼은 pore 크기만 다르며, 결합 유형 및 컬럼의 입자 크기는 동일합니다. 이는 pore 크기의 영향을 비교적 더 정확하게 보여주며, 인슐린의 가장 효율적인 분리를 위해서는 80Å 이상의 pore 크기가 필요함을 나타냅니다.

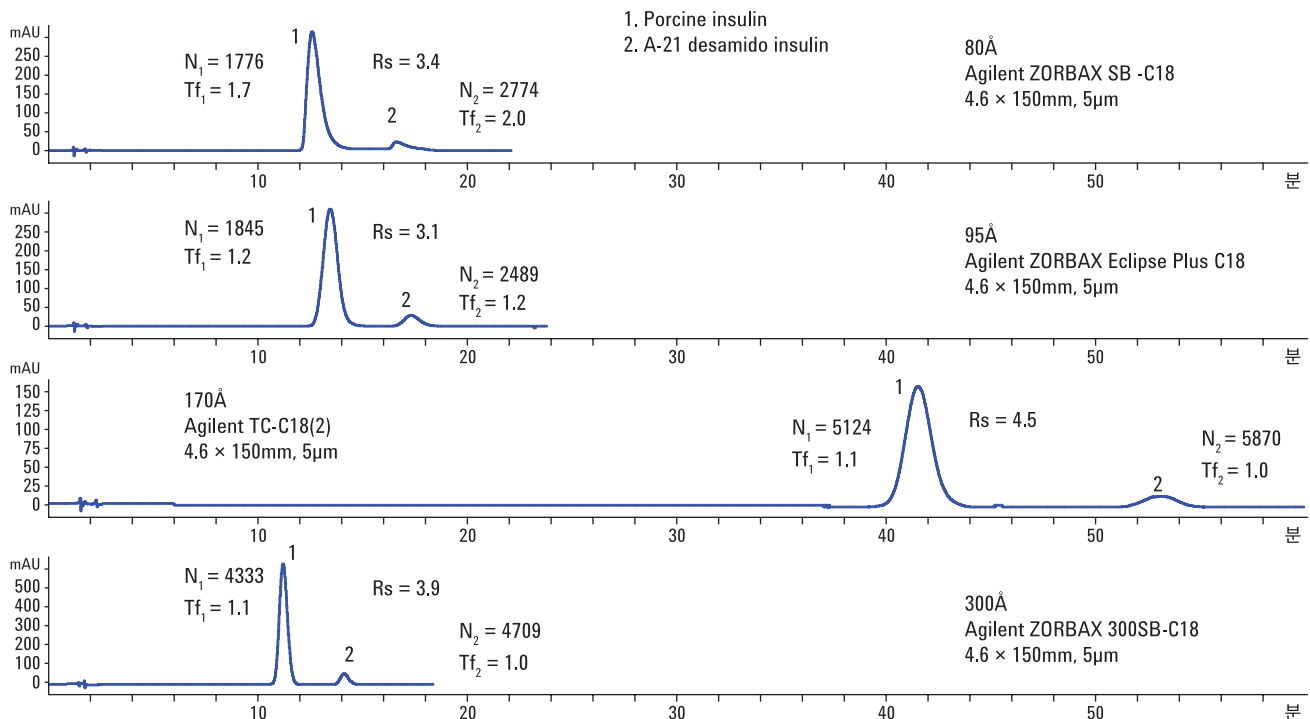


그림 4. Agilent ZORBAX 4.6 × 150mm, 5μm LC 컬럼에서 인슐린 분리의 크로마토그램, 분리 효율에 대한 pore 크기의 영향을 보여줍니다.

분리능 개선을 위해 작은 입자 크기를 가진 컬럼 선택

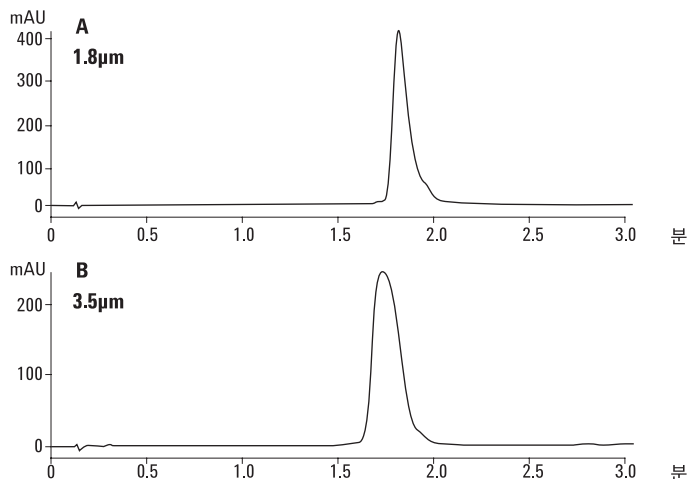
작은 입자는 더 뾰족한 피크와 더 높은 분리능을 가능하게 합니다. 더 빠른 유속에 가파른 기울기를 적용하여 intact mAb를 분석한 그림 5에서 1.8 μ m ZORBAX 300SB-C8 컬럼은 더 높은 분리능, 개선된 피크 모양 그리고 거의 두 배의 감도를 제공합니다.

감도 개선을 위해 좁은 내경의 컬럼 선택

더 좁은 ID 컬럼은 더 뾰족한 밴드를 얻을 수 있으며, 컬럼 외적인 영향을 제어할 경우, 더 높은 감도와 MS와의 호환성을 얻을 수 있습니다. MS, UHPLC 또는 둘 모두를 이용하는 분석가들은 최적의 결과를 위해 2.1mm ID 컬럼을 선호합니다.

분리 개선을 위한 이온쌍 시약 조절

단백질 및 펩타이드 분석을 위한 RPLC에 사용된 이동상은 이온쌍 시약으로 작용하는 첨가제가 들어 있습니다. 이러한 성분은 하전된 그룹과 이온쌍을 형성하여 분자의 소수성을 증가시킵니다. 결과적으로, 소수성 고정상과 분자 간의 상호작용이 가능하며 따라서 분리도 가능합니다. 트리플루오로아세트산(TFA), 포름산(FA) 및 아세트산(AcOH)과 같이 더 일반적인 첨가제는 매우 낮은 pH를 생성할 수 있으며, 단백질 언폴딩 및 변성을 촉진할 수 있습니다. 따라서 분자가 더 뾰족하고 더 대칭적인 피크로 용출됩니다. 단백질 및 펩타이드의 분리에 가장 널리 사용되는 이온쌍 시약은 TFA이지만, ESI LC/MS를 사용할 경우 TFA는 분석법의 신호와 극미량 감도를 감소시킵니다. 이로 인해 분석법의 활용도가 제한되며, 작은 피크를 식별하기 더 어렵게 만들 수 있습니다. TFA를 적게 사용하면 신호를 개선하는데 도움이 될 수 있지만 ESI LC/MS 분석에는 TFA 대신 FA와 AcOH를 사용할 수도 있습니다.



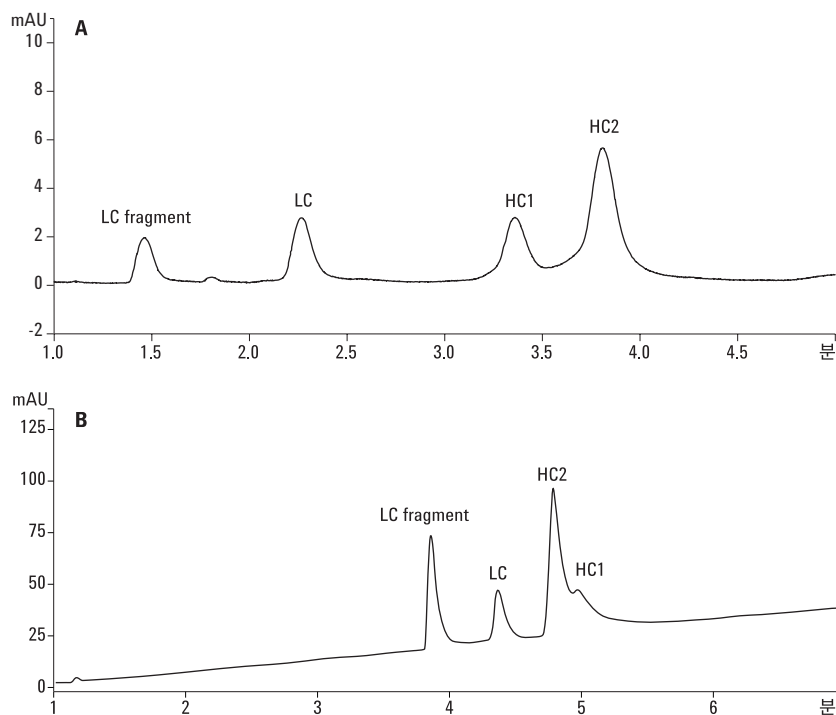
분석 조건

컬럼:	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 2.1 × 50mm, 1.8 μ m(p/n 857750-906) Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 2.1 × 50mm, 3.5 μ m(p/n 865750-906)										
용리액:	A: H ₂ O:IPA(98:2) + 0.1% TFA(v/v) B: IPA:ACN:H ₂ O(70:20:10) + 0.1% TFA(v/v)										
주입량:	1 μ L(2mg/mL)										
유속:	1mL/분										
이동상 변화도:	다중 분할 및 선형 용출 <table border="1"> <thead> <tr> <th>시간(분)</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>25</td></tr> <tr><td>3</td><td>25</td></tr> <tr><td>4</td><td>90</td></tr> <tr><td>5</td><td>25</td></tr> </tbody> </table>	시간(분)	% B	0	25	3	25	4	90	5	25
시간(분)	% B										
0	25										
3	25										
4	90										
5	25										
온도:	80°C										
검출기:	UV, 225nm										
시스템:	자동 주입기, Binary 펌프, 항온 컬럼 격실 및 다이오드 어레이 검출기를 가진 Agilent 1290 Infinity LC 시스템										

그림 5. Intact mAb의 분리, 1.8 μ m(A) 및 3.5 μ m(B) Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 2.1 × 50mm LC 컬럼의 비교. 1.8 μ m 컬럼에서 얻은 크로마토그램은 향상된 피크 모양(A), 분리능 및 감도를 보여줍니다.

당사는 LC/MS 분석을 위한 기존 ACN/TFA 전용 시스템의 대안으로 더 높은 신호 세기를 제공하기 위해 다양한 이온쌍 첨가제와 유기 이동상 B의 여러 조합을 평가했습니다. 이온쌍 시약의 농도는 0.5% ~ 5% 사이로 조정되었으며, B 이동상에는 ACN, 1-프로판올 및 이소프로판올 또는 그 조합이 포함되었습니다.

그림 6은 이 연구에서 얻은 최적의 분리 결과를 보여줍니다. 정의된 기울기 조건에서, 5분 이내에 각 분리를 완료할 수 있는 빠른 분석을 위해 Light와 2개의 Heavy chain 변이체의 분리가 완전히 최적화되었습니다. 위 그림의 분리는 0.05%의 TFA에 0.5% AcOH를 추가하여 최적화되었습니다. 아래 그림은 0.05%의 TFA와 0.05% FA가 추가된 일반적인 물/ACN 기울기로부터 분리되었습니다. 이 분리에서, 2개의 Heavy chain 변이체는 위의 그림과 동일하지 않은 선택성을 보여주며, HC1 및 HC2의 머무를 위치가 바뀌었습니다. 그림 6의 경우 동일한 기울기와 이동상 조성을 사용하지만 FA를 사용하지 않으면 HC1 및 HC2 사이에 충분한 분리능을 제공하지 못함을 확인했습니다. 각 분리에 대해 FA 또는 AcOH에 TFA 양을 줄인 조건은 mAb의 초고속 분석에 매우 적합하며, LC/MS 분석을 위한 대체 프로필을 제시합니다.



조건, 그림 6A

용리액:

A: $H_2O + 0.5\% \text{ AcOH} : 0.05\% \text{ TFA} (v/v)$

B: $n\text{-프로판올} : \text{ACN} : H_2O (80:10:10) + 0.5\% \text{ AcOH} : 0.05\% \text{ TFA} (v/v)$

이동상 변화도:

시간(분) % B

0 25

10 35

12 35

14 90

18 25

조건, 그림 6B

용리액:

A: $H_2O + 0.05\% \text{ FA} : 0.05\% \text{ TFA} (v/v)$

B: $n\text{-프로판올} : \text{ACN} : H_2O (80:10:10) + 0.05\% \text{ FA} : 0.05\% \text{ TFA} (v/v)$

이동상 변화도:

시간(분) % B

0 25

7 50

8 90

9 25

그림 6. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, $2.1 \times 100\text{mm}$ 컬럼을 사용하여 환원 및 알킬화 항체의 초고속 LC/MS 특성 규명을 위한 MS-친화적인 이동상 조성. 위 그림(A)의 분리에서, MS 신호 세기를 높이기 위해 아세트산이 용리액에 추가되었습니다. 아래 그림(B)은 더 일반적으로 사용되는 물:아세트산:니트릴 이동상으로 실시되었지만, 신호 억제를 줄이기 위해 TFA의 양을 줄이고 포름산을 추가했습니다.

넓은 pore의 표면 다공성 입자에 기초한 컬럼 사용

큰 분자는 작은 분자보다 훨씬 더 느리게 확산되므로, 단백질이 pore을 충분히 들어오고 나갈 수 있도록 단백질 분리를 위한 일반적인 유속은 더 낮습니다. 따라서 단백질 이동에 대해 더 짧은 확산 경로를 가진 컬럼이 훨씬 더 적합합니다. Agilent AdvanceBio RP-mAb 컬럼은 표면 다공성 입자 구조 때문에 이렇게 짧은 확산 거리를 제공하며, 더 높은 유속에서 추가적인 밴드 효과 없이 더 가파른 기울기로 사용할 수 있습니다. 그림 7은 Poroshell 기술을 사용하여 빠른 고분리능 mAb 조각 분석을 완료할 수 있는 방법과 입자의 다공성이 분리 품질에 영향을 미치는 방법에 대한 적절한 예입니다.

또는, 더 짧은 컬럼 길이에서 sub-2 μ m 입자는 우수한 분리능을 제공하면서 짧은 실행 시간 동안에 높은 감도와 적은 밴드 넓어짐을 얻기 위해 매력적인 선택입니다.

Agilent Rapid Resolution High Definition(RRHD) sub-2 μ m 컬럼은 매우 짧은 실행 시간 동안에 단백질의 빠른 분리를 수행하기 위해 최적화되었습니다. Intact 단일클론 항체를 사용하여, 다양한 컬럼 유속에서 분리 속도와 mAb 분리에 대한 이어지는 분리능 효과를 평가하기 위해 체계적인 기울기 최적화가 수행되었습니다.

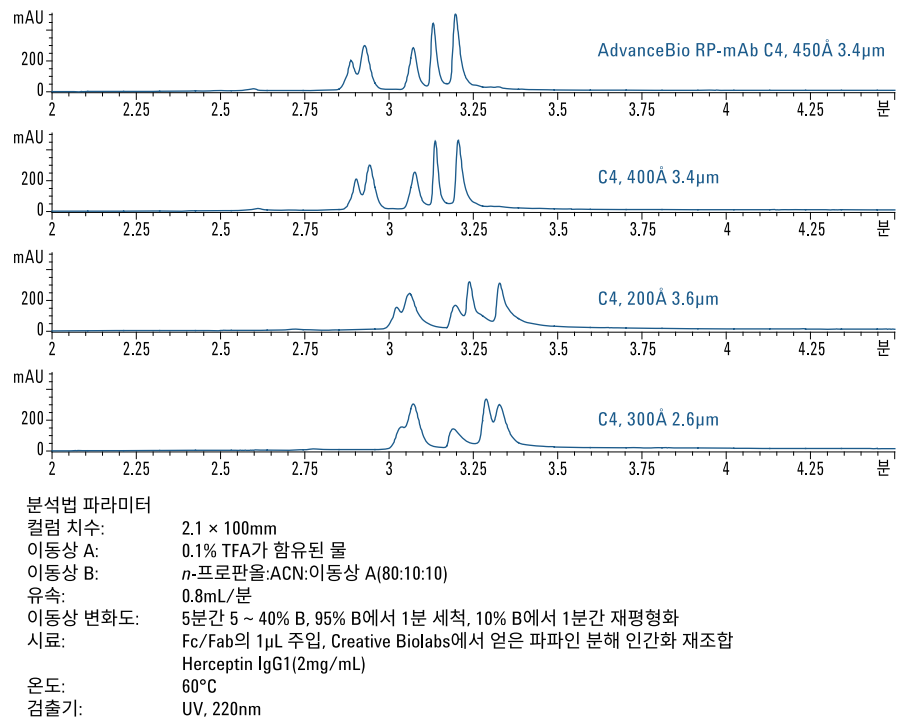
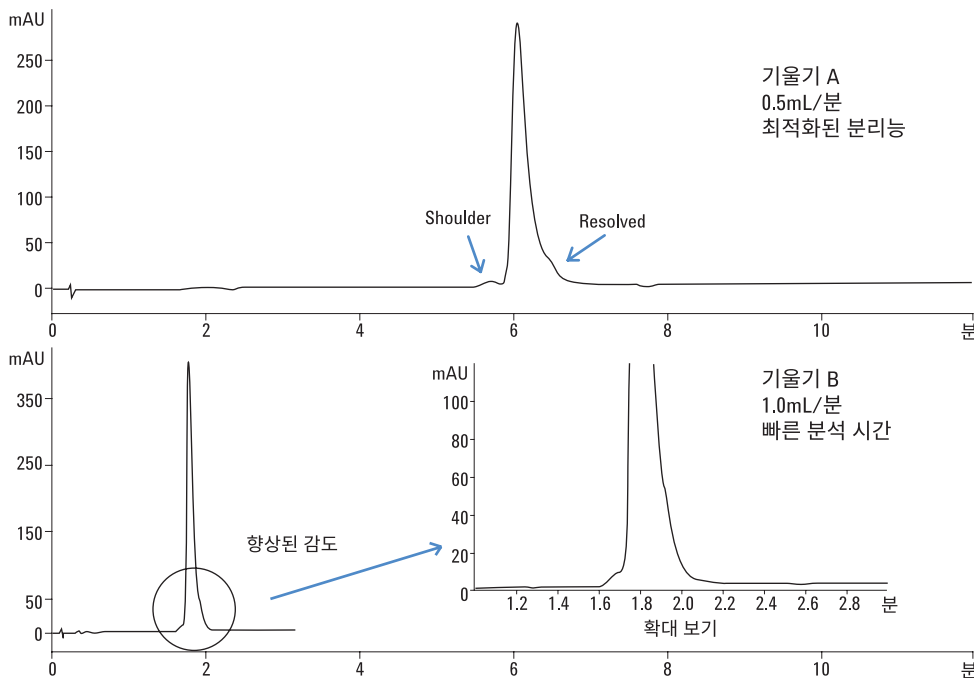


그림 7. Agilent AdvanceBio RP-mAb 컬럼은 추가적인 밴드 효과 없이 짧은 확산 거리와 가파른 기울기 제공

그런 다음 빠른 mAb 프로파일링을 위한 분리 효율을 강조해서 보여주기 위해 두 개의 기울기가 선택되었습니다. 특별히, 그림 8(위 크로마토그램)의 기울기는 7분의 빠른 실행 시간 동안에 intact mAb와 어깨 피크의 초고분리능을 강조해서 나타내기 위해 최적화되었으며, 높은 감도와 약간 낮은 분리능으로 2.0분 이내에 초고속 분리를 강조해서 보여주기 위해 그림 8 아래 크로마토그램의 기울기가 선택되었습니다. 두 분리는 우수한 결과를 제공하며 바이오 의약품 프로파일링을 위해 바람직한 mAb 분리의 여러 요소를 강조해서 보여줍니다.

표 2. 분리능 또는 속도를 위해 최적화된 기울기

최적화된 분리능을 위한 기울기 A		고속 분석을 위한 기울기 B	
시간(분)	%B	시간(분)	%B
0	25	0	25
10	35	3	35
12	35	4	90
14	90	5	25
18	25		



분석 조건

컬럼: Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 1.8μm, 2.1 × 50mm(p/n 857750-906)
 용리액: A: H₂O:IPA(98:2) + 0.1% TFA(v/v)
 B: IPA:ACN:H₂O(70:20:10) + 0.1% TFA(v/v)
 주입량: 1μL(2mg/mL)
 유속: 0.5 또는 1mL/분
 이동상 변화도: 다중 분할 및 선형 용출
 온도: 80°C
 검출기: UV, 225nm
 시스템: 자동 주입기, Binary 펌프, 항온 컬럼 격실 및 다이오드 어레이 검출기를 가진 Agilent 1290 Infinity LC 시스템

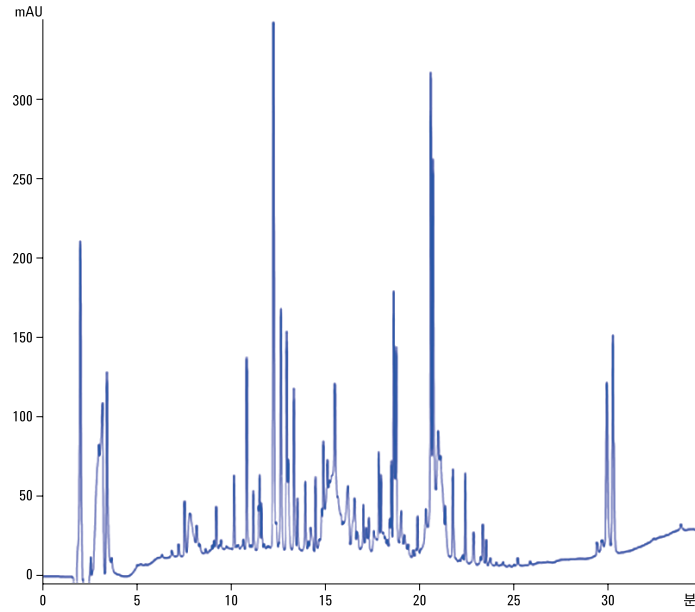
그림 8. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C8, 1.8μm 컬럼에서 intact mAb의 최적화된 기울기 분리를 보여주는 두 개의 크로마토그래피 비교. 위 크로마토그램은 더 긴 실행 시간에 느린 유속으로 획득한 초고분리능을 보여주는 반면, 아래 크로마토그램은 확대 보기를 통해, mAb 스크리닝에 유용한 매우 빠른 분석 시간(표 2 참조)에 충분한 분리능을 통해 향상된 감도를 보여줍니다.

전체 시퀀스를 커버리지 가능한 컬럼 및 분석법의 조건 확보

펩타이드 맵의 완전한 분리를 위해, 컬럼은 몇 가지 주요한 속성을 가져야 합니다.

- 펩타이드의 분자량에 대한 최적의 pore 크기 – 120Å이 이상적입니다.
- 펩타이드 매핑 조각을 분리하기에 적절한 선택성을 가진 상을 이용합니다. 이를 통해 MS로 식별할 수 있습니다. 엔드캡핑되는 조밀한 C18-결합상은 소수성, 친수성 및 염기성 펩타이드에 우수한 머무름과 선택성을 제공합니다.
- 고분리능으로 빠른 분리를 수행할 수 있는 컬럼이어야 합니다.

Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 펩타이드 매핑을 위한 분리를 개선하고 향상된 분리능, 높은 감도 및 에리스로포이에틴(rhEPO) 매핑 및 향상된 글리코펩타이드 마이닝과 같은 고효율 펩타이드 프로파일링에 필요한 높은 선택성을 제공하기 위해 특별히 설계되었습니다. 게다가, 2.7µm 표면 다공성 입자를 통해 높은 유속에서 2.1 × 250mm의 더 긴 컬럼을 사용할 수 있으므로, sub-2µm 컬럼에 비해 매우 작은 역압(backpressure)에서 rhEPO의 더 높은 분리 성능을 제공합니다. 그림 9는 최적화된 EPO 펩타이드 맵의 예입니다. 분리는 전체 기울기 프로필에 걸쳐 우수한 분리능, 선택성 및 피크 모양을 보여주므로, ESI-MS 분석에 매우 적합하며 100%의 시퀀스 커버리지를 제공합니다(그림 10).



분석 조건

컬럼:	AdvanceBio Peptide Mapping, 2.1 × 250mm, 2.7µm(p/n 651750-902)
시료:	분해된 재조합 인간화 EPO
시료 농도:	2.0mg/mL
용리액:	A: 물(0.1% FA) B: ACN(0.08% FA), 0 ~ 28분, 3 ~ 45% B; 28 ~ 33분, 45 ~ 60% B; 33 ~ 34분, 60 ~ 95% B
주입량:	5µL
유속:	0.4mL/분
온도:	55°C
검출기:	UV, 220nm

그림 9. 2.1 × 250mm Agilent 2.7µm AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼을 이용한 역상 rhEPO 펩타이드 맵

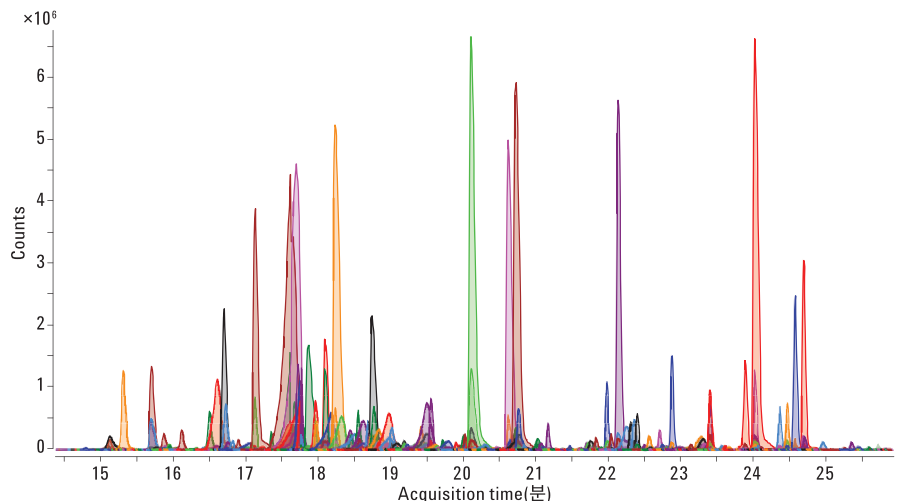


그림 10. 2.1 × 250mm AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼 및 ESI-MS를 이용해 달성한 100% rhEPO 시퀀스 커버리지. 데이터는 Agilent Masshunter 정성 MS 분석 소프트웨어에서 Molecular Feature Extractor(MFE)를 이용해 생성되었습니다.

의약품 개발(Drug development)

단백질의 정제 및 특성 규명은 의약품 개발에 매우 중요하며, 일상적으로 다양한 분석 기법이 사용됩니다. 특성 규명에서 얻는 많은 정보와 더불어 개발 단계 중 재현성 및 컬럼 수명이 더 중하게 되었습니다.

mAbs의 소수성 구조의 Heterogeneity 때문에, 역상 분리는 의약품의 제조, 제제 및 보관 중 순도와 안정성을 모니터링하기 위한 하나의 옵션이 되고 있습니다. Agilent ZORBAX RRHD 컬럼은 더 작은 1.8 μ m의 입자, 재현성 있는 성능 및 선택성 옵션을 가지므로, 역상 분석 중에 mAb 불순물의 특성 규명에 빠른 분석 시간과 함께 확실한 분리 성능을 보여줍니다. LC/UV는 mAbs 및 펩타이드 매핑을 위해 우수한 선택입니다.

의약품 개발 성공을 위한 팁

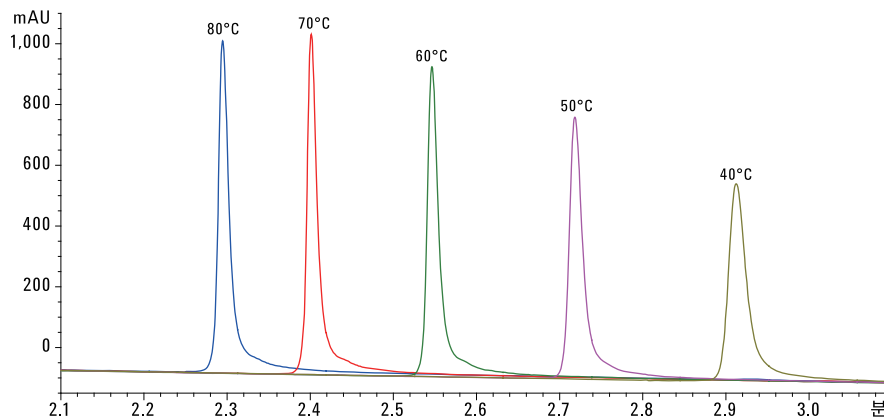
컬럼 온도를 높여서 피크 모양 성능을 개선하고, 머무름을 감소시키고, 감도를 개선시킬 수 있습니다.

용매 점도, 단백질 확산계수 및 이동상 극성도는 온도에 크게 좌우됩니다. 컬럼 온도의 조절은 소수성 펩타이드 및 단백질 분리에 중요한 변수입니다. 그림 11에 나오는 단일클론 항체(mAb) 분리는 온도가 증가할 때 피크 모양과 머무름에 대한 온도의 영향을 보여주는 좋은 예입니다. 낮은 온도에서 mAb와 mAb 조각은 좋지 않은 피크 모양을 보여주므로 충분한 프로필을 제공하기

위해 높은 비율의 유기 이동상으로 용출시키기도 합니다. 또는 동일한 크로마토그래피 조건이지만 높은

온도에서는 분리는 짧은 용출 시간 동안 우수한 피크 모양을 제공하며, 감도와 분리능을 향상시킵니다.

- A) 0.1% TFA가 함유된 물:IPA(98:2)
B) IPA:ACN:이동상 A(70:20:10), 1.0mL/분, 5분간 10 ~ 70% B, Creative Biolabs에서 얻은 인간화 재조합 Herceptin intact IgG1의 5 μ L 주입(1mg/mL), 254, 8nm; Ref = Off, RP-mAb Diphenyl, 2.1 $\times$ 100mm, 3.5 μ m



- A) 0.1% TFA가 함유된 물
B) *n*-프로판올:ACN:이동상 A(80:10:10), 1.0mL/분, 5분간 5 ~ 50% B, Fc/Fab의 1 μ L 주입, Creative Biolabs에서 얻은 파파인 분해 인간화 재조합 Herceptin IgG1(2mg/mL), 60°C, 220, 8nm; Ref = Off, RP-mAb Diphenyl, 2.1 $\times$ 100mm, 3.5 μ m

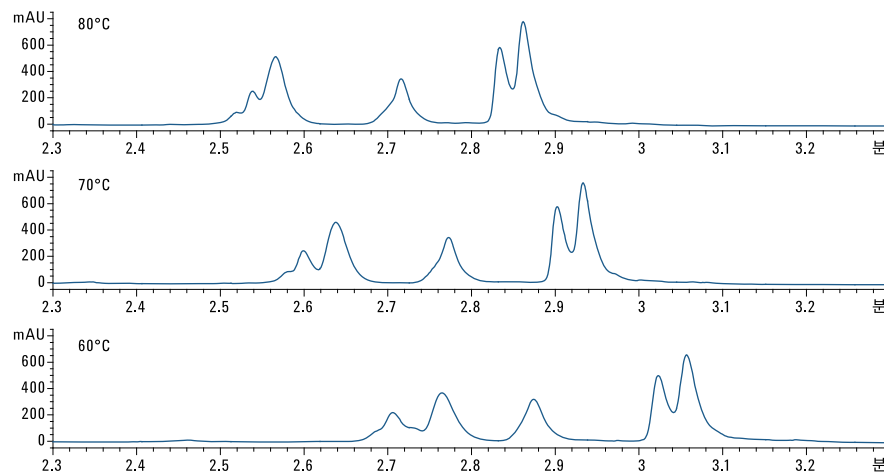
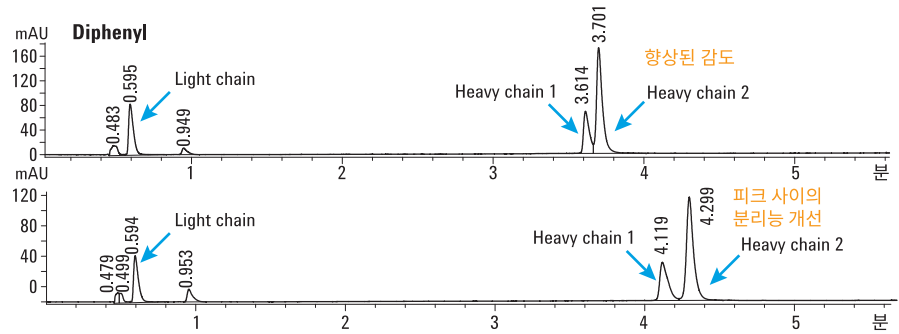


그림 11. Agilent AdvanceBio RP-mAb 컬럼에서 intact 단일클론 항체 분리의 온도 의존 성능. 위) 컬럼 온도 증가에 따라 피크 모양이 개선되고 머무름 시간이 단축됩니다. 아래) 높은 컬럼 온도에서 조각 피크가 더 효과적으로 분리되므로 mAb 프로파일링이 개선됩니다.

최적의 분석을 위한 기율기 조정

그림 12의 크로마토그래피 비교는 환원되고 알킬화된 단일클론 항체에 대해 두 가지 최적화된 고속 분리를 보여줍니다. ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 × 100mm 컬럼과 크로마토그래피 조건에서는 환원된 mAb Light chain과 2개의 Heavy chain 변이체에 대한 적절한 분리가 가능했습니다. 위쪽의 크로마토그램은 좁은 밴드와 높은 분리능으로 분석한 Heavy chain의 분리 결과를 자세히 보여줍니다. 이에 비해, 아래 그림에 나타난 분리는 Heavy chain의 적절한 분리가 가능하도록 최적화되었지만 피크 너비는 약간 증가합니다. 이 분리에서, 2개의 Heavy chain은 거의 바탕선까지 분리되었습니다. 반대로, 두 분리 사이에서 디페닐 상에서는 기율기만 약간 바꾸면서 두 개의 Heavy chain 분리능을 향상시킬 수 있었습니다.



분석 조건

컬럼:	Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1 × 100mm, 1.8μm(p/n 858750-944)
시료:	환원된 단일클론 항체(IgG1) BioCreative IgG1
시료 농도:	1.0mg/mL
용리액:	A: 0.1% TFA가 함유된 물 B: 80% <i>n</i> -프로필 알코올, 10% ACN, 9.9% 물 및 0.1% TFA
주입량:	2μL
유속:	0.5mL/분
이동상 변화도:	첫 번째 조건: 0분 1% B, 2분 20% B, 5분 70% B 두 번째 조건: 0분 1% B, 2분 20% B, 5분 50% B
온도:	74°C
검출기:	UV, 280nm

그림 12. Agilent ZORBAX RRHD 300-Diphenyl, 2.1mm × 100mm LC 컬럼을 이용해 서로 다른 최적화된 기율기 조건에서 달성한 환원된 단일클론 항체에 대한 두 개의 초고속 분리의 비교. 상단 그림은 짧은 머무름 시간으로 좁은 피크 너비를 제공하는 분리 결과를 나타내고 있습니다. 하단 그림은 두 개의 Heavy chain 피크에서 효율성은 낮지만 높은 분리능으로 분리된 결과를 나타내고 있습니다.

체계적인 기율기 분석법에 따라, 최적의 분리능을 가진 고속 분리가 가능하도록 각 mAb에 대한 기율기를 연구하였습니다. 그림 13의 위 그림에 표시된 분리는 CDH 미디어에서 발현된 애질런트 표준 항체에 최적화되었으며 표 3에 나오는 기율기 조건인 기율기 A를 사용했습니다. 분리는 4분 이내에 완료되었으며 매우 좁은 밴드 너비를 가진 intact 피크에 대해 우수한 분리능을 보여줍니다. 이에 비해, 아래 크로마토그램은 CHO 세포주에서 발현된 인간화 mAb에 최적화되었으며 표 3B의 기율기 조건인 기율기 B를 사용했습니다. 이 분리에서 기율기는 mAb 기본 피크로부터 프론트 솔더를 분리한 완만한 기율기 커브로 최적화되었습니다. 그림 13의 두 분리는 높은 효율로 mAb 특성 규명을 실행하기 위해 고처리량이 가능하도록 개발되었습니다. 각 분리는 반복 주입 시퀀스가 가능하도록 빠르게 90% 이소프로판올로 세척하고 신속한 재평형화로 마무리하였습니다.

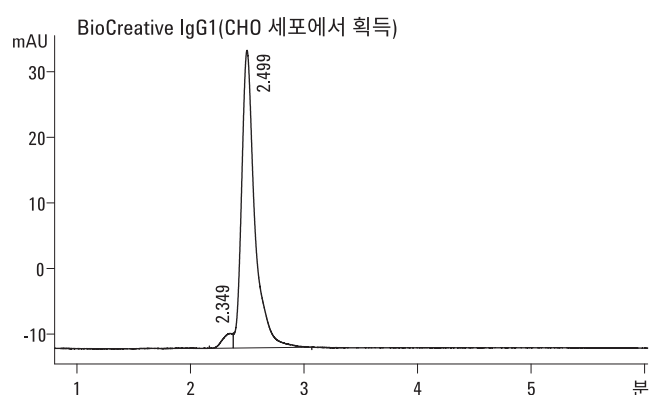
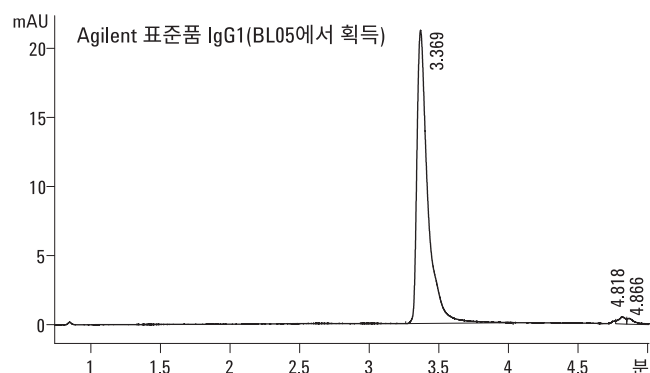


표 3. 최적의 선택성을 위해 최적화된 기율기

Agilent 표준 IgG1을 위한 기율기 A		BioCreative IgG1을 위한 기율기 B	
시간(분)	%B	시간(분)	%B
0	10	0	5
2.5	25	5	25
4.5	35	7	25
4.56	90	8	90
5	90	9	5
6	10		

분석 조건

컬럼:	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 100mm, 1.8μm(p/n 858750-909)
시료:	CDH 미디어(Agilent)에서 얻은 표준 IgG1, CHO(BioCreative)에서 얻은 IgG1
시료 농도:	1.0mg/mL
용리액:	A: 0.1% TFA가 함유된 물 B: 70% 이소프로필 알코올, 20% ACN, 10% 물 및 0.1% TFA
주입량:	2μL
유속:	1.0mL/분
이동상 변화도:	표 3 참조
온도:	75°C
검출기:	UV, 280nm

그림 13. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3 2.1 × 50mm LC 컬럼에서 두 개의 단일클론 항체에 최적화된 UHPLC 분리. 이 분리는 1.0mL/분 및 75°C에서 수행되었습니다. 위 그림은 CHO 미디어에서 발현된 mAb에 최적화되었으며, 아래 크로마토그램은 CHO 세포주에서 발현된 인간화 mAb에 최적화되었습니다. 각 분리는 분석 실행 후 2분의 빠른 재평형화를 진행했습니다.

최적의 단백질 분리를 위한 서로 다른 선택성 비교

한편, 선택성은 mAbs의 단백질 분리를 개선하기 위한 추가적인 방법이며, 바이오 의약품 분석을 가능하게 할 전망이 높습니다.

그림 14는 Poroshell 300 컬럼의 높은 분리능과 연계한 선택성 차이가 분리를 개선하는 데 도움을 줄 수 있음을 보여줍니다.

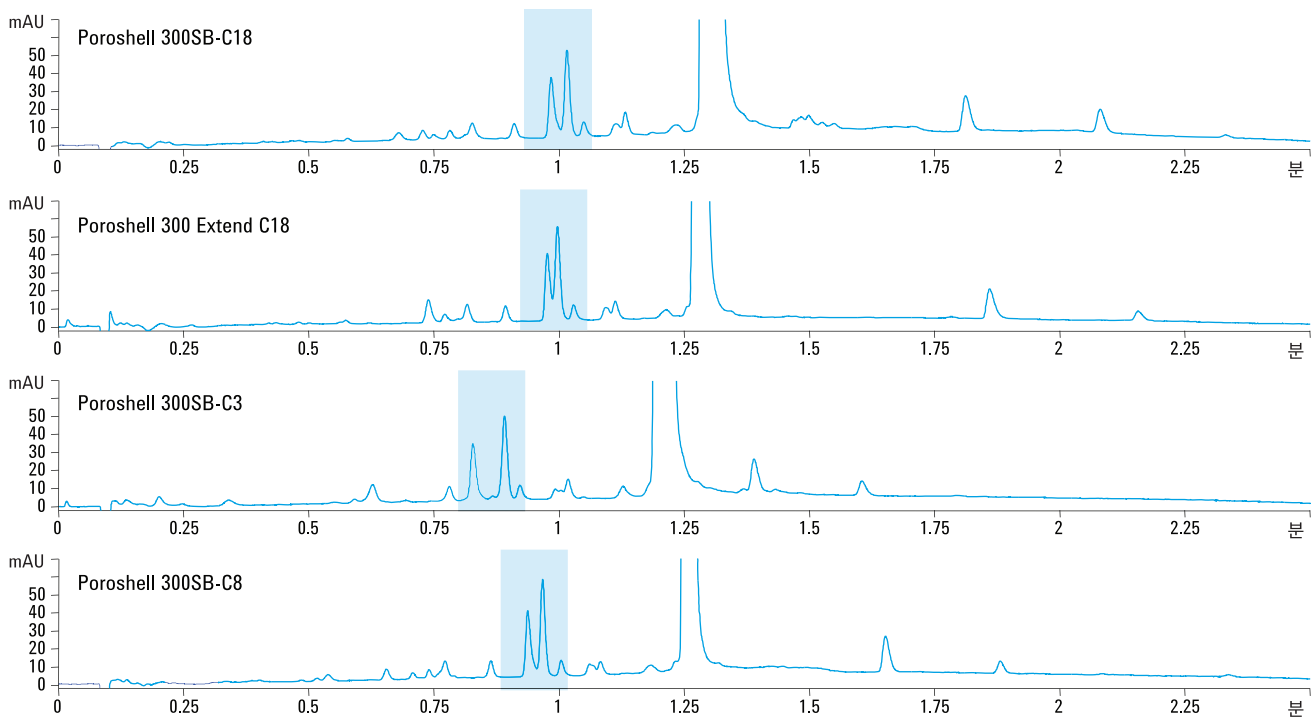
수명이 긴 컬럼 이동상 선택

일반적으로 역상 분석에 사용되는 이동상은 트리플루오로아세트산(TFA) 또는 포름산(FA)이 들어 있는 산성 상입니다. 이러한 이동상은 대부분의 HPLC 컬럼에 가장 긴 수명을 제공합니다. 컬럼을 선택할 때는 최적의 피크 모양을 제공하는 성능뿐 아니라 사용되는 조건에 따라 수명의 관점에서 성능을 고려해야 합니다.

일반적인 펩타이드 매핑 응용 작업의 경우 0.1% TFA 및 포름산을 사용할 수 있습니다. 조밀하게 결합된 상을 가진

AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 탁월한 피크 모양을 제공하며 이러한 조건들에서 매우 효과적인 성능을 볼 수 있습니다.

고농도의 TFA 또는 기타 Modifier를 사용하여 실험할 경우, 낮은 pH 환경에서 안정성을 유지하도록 개발된 StableBond 기술을 고려하십시오. 기억해야 할 참고사항: 때때로 아세트산이 트리플루오르산이나 포름산 대신 사용됩니다. 높은 온도에서 아세트산은 컬럼 수명에 영향을 미칩니다.



분석 조건

컬럼: Agilent Poroshell 300, 2.1 × 75mm, 5μm(p/n 660750-902)
 시료: 분해된 인슐린
 용리액: A: 물 + 0.1% TFA
 B: ACN + 0.08% TFA
 유속: 1.75mL/분
 이동상 변화도: 5% B는 0.3분 유지, 5 ~ 65% B, 2.7분
 온도: 45°C

그림 14. Agilent Poroshell 300의 결합상을 변경하면 중요한 피크 쌍의 분리능을 높여 분석 정확도가 개선됩니다.

ZORBAX RRHD 300SB-C3 컬럼의 수명은 반복 주입 시퀀스 동안 낮은 pH 조건에서 평가되었습니다. 컬럼 충전 베드 안정성, 상 안정화 및 주입구 frit 성능은 모두 반복 mAb 분석 동안에 고온과 고압에서 지속적 작동을 위해 중요한 요소입니다. 이 성능을 평가하기 위해 리보뉴클레아제 A, 시토크롬 C 및 리소자임을 1,000회 반복 주입했습니다. 이 분리의 크로마토그래피 보기는 그림 15에 나와 있습니다. 그림 16은 수명 플롯입니다.

분석 조건

컬럼:	Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 50mm(p/n 857750-909)	
용리액:	이동상 A: H ₂ O + 0.1% TFA(v/v) 이동상 B: ACN + 0.1% TFA(v/v)	
주입량:	2μL	
유속:	1.25mL/분	
이동상 변화도:	% 용매 B	시간(분)
	10	0
	70	2.5
	90	2.6
	90	3.0
	10	5.0
온도:	75°C	
압력:	900bar	
시스템:	자동 주입기, Binary 펌프, 항온 컬럼 격실 및 다이오드 어레이 검출기를 가진 Agilent 1290 Infinity LC 시스템	

Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 50mm, 1.8μm 컬럼을 사용하여 표준 단백질의 빠른 분리 및 그 분해 산물

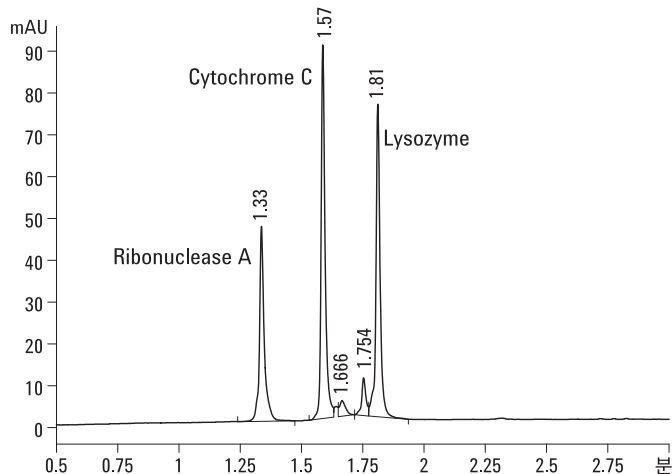


그림 15. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 50mm LC 컬럼을 이용하여 수명 안정성 모니터링을 위해 리보뉴클레아제 A, 시토크롬 C 및 리소자임의 고속 분리

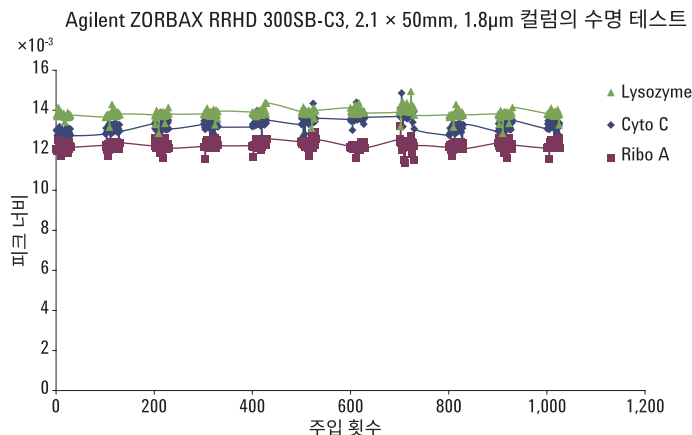


그림 16. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 50mm LC 컬럼의 수명 플롯. 그래프는 1,000회의 주입 과정에서 매 100회 실행 간격 동안 플롯된 리보뉴클레아제 A, 시토크롬 C 및 리소자임의 연속적인 단백질 피크 너비 기록을 보여줍니다.

품질 관리

QC 방법은 신뢰성과 완전성에 중점을 두어야 합니다. 추가적으로, 분석 속도가 훨씬 더 중요해지고 있습니다.

우수한 QC를 위한 팁

컬럼 재현성 평가

ZORBAX RRHD 300Å 컬럼은 제조 단계에서 일관된 성능을 보장하는 오랜 QC의 전통에 뿌리를 두고 우수한 배치간 재현성을 보여줍니다. 그림 17 및 표 4는 ZORBAX RRHD 300SB-C18 컬럼의 재현성을 검사하기 위해 200회 연속 주입의 결과를 보여줍니다. 피크 모양의 무결성, 비대칭성, 머무름 시간 및 효율성은 컬럼을 세척하지 않고도 주입 후 동일하게 유지되었습니다.

표 4. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 1.8µm LC 컬럼의 재현성을 증명하기 위해 인슐린의 200회 주입

주입 횟수	Heavy chain 피크 1			Heavy chain 피크 2		
	RT(분)	피크 너비	대칭성	RT(분)	피크 너비	대칭성
1	6.845	0.043	1.74	6.912	0.048	0.611
50	6.871	0.043	1.75	6.935	0.049	0.609
150	6.864	0.040	1.70	6.924	0.049	0.617
200	6.867	0.041	1.76	3.928	0.051	0.592

분석 조건

컬럼: Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3,
2.1 × 100mm, 1.8µm
시료: 환원된 단일클론 항체(IgG1)
(1.0mg/mL)- Agilent BL05 IgG1
주입량: 2µL
이동상 A: 0.1% TFA가 함유된 물
이동상 B: 80% *n*-프로필 알코올, 10% ACN,
9.9% 물 및 0.1% TFA

이동상 변화도: 0분-1% B,
2분-20% B,
5분-50% B,
7분-50% B,
8.0분-90% B,
8.3분-1% B,
2분 유지
온도: 75°C
유속: 0.4mL/분
검출기: UV, 280nm

컬럼 재현성 - Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C3, 2.1 × 100mm, 1.8µm 컬럼을 이용해 환원된 단일클론 항체의 200회 주입

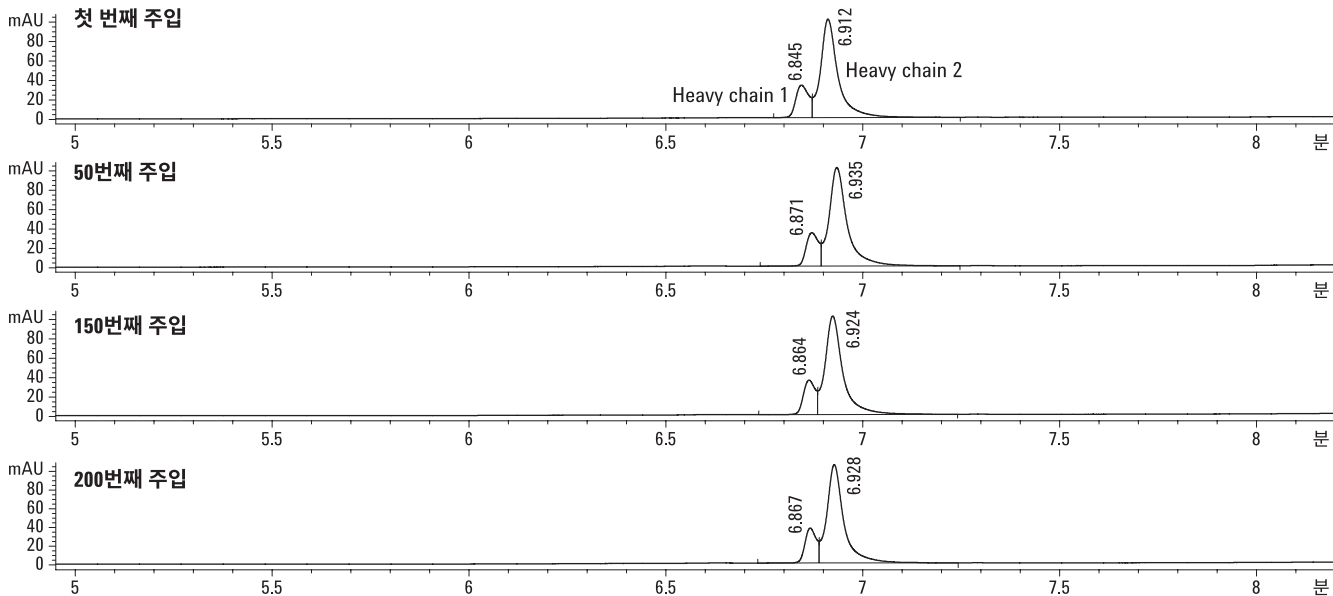


그림 17. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 1.8µm LC 컬럼의 재현성은 200회 주입에서도 볼 수 있습니다.

유속과 짧은 컬럼으로 분석 속도 개선

짧은 컬럼 길이에서 빠른 분리를 위해 유속도 조절할 수 있습니다. 피크 비대칭성과 효율은 변하지 않고 유지되며, 빠른 분리가 가능한 sub-2 μ m 입자의 특징입니다. 그림 18 및 표 5는 재조합 인간 에리스로포이에틴(erythropoietin)의 분석에서 유속의 영향을 나타내며 그림 19와 표 6은 인슐린 분리에 관한 내용입니다.

표 5. rEPO 단백질 분리에서 머무름 시간, 비대칭성 및 피크 너비에 대한 유속의 영향

유속 (mL)	압력 (bar)	머무름 시간(분)	비대칭성	피크 너비
0.5	350	1.64	0.60	0.047
1.0	680	1.41	0.85	0.030
1.5	890	1.26	0.84	0.030

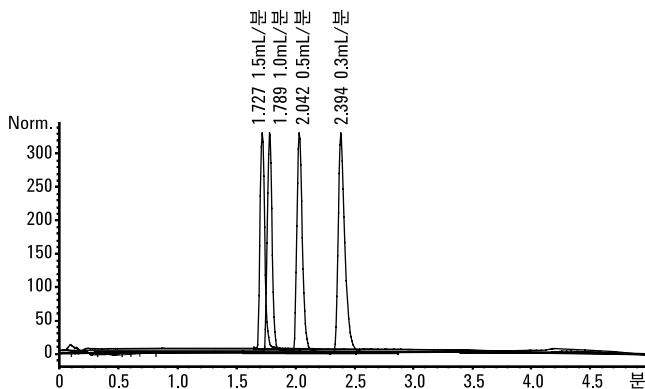
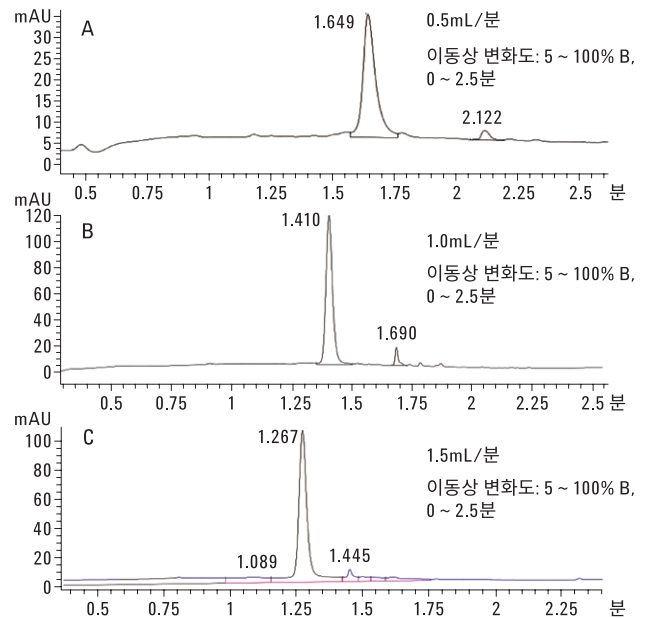


그림 18. Agilent ZORBAX RRHD 300 SB-C18, 2.1 × 50mm, 1.8 μ m LC 컬럼에서 인슐린 단백질을 분리하기 위해 다양한 유속의 사용

표 6. 인슐린 분리에서 머무름 시간, 비대칭성 및 피크 너비에 대한 유속의 영향

유속 (mL)	압력 (bar)	머무름 시간(분)	비대칭성	플레이트 수
0.3	230 ~ 150	2.39	0.80	8,815
0.5	350 ~ 250	2.04	0.82	8,390
1.0	680 ~ 520	1.78	0.88	8,034
1.5	890 ~ 670	1.72	0.88	8,060



분석 조건

컬럼:	Agilent ZORBAX 300SB-C18, 2.1 × 50mm, 1.8 μ m (p/n 857750-902)
시료:	인슐린, 돼지 이자에서 얻은 산화 인슐린 사슬 A 및 사슬 B(Sigma-Aldrich Corp.)
시료 농도:	1mg/mL
용리액:	A: 0.1% TFA가 함유된 증류수 B: 80% ACN 및 0.01% TFA가 함유된 증류수
주입량:	3 μ L
유속:	표 6 참조
이동상 변화도:	5 ~ 100% B, 0 ~ 4분
압력:	~ 650bar
검출기:	UV, 280nm
시스템:	Agilent 1290 Infinity LC 시스템

그림 19. Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18, 2.1 × 50mm, 1.8 μ m LC 컬럼에서 rEPO 단백질을 분리하기 위해 다양한 유속의 사용



AdvanceBio RP-mAb

단일클론 항체 특성 규명의 고유한 문제를 해결하는 데 중점을 둔 유일한 역상 컬럼

모든 AdvanceBio RP-mAb 컬럼에 내장된 독점적인 Agilent Poroshell 기술은 다음과 같은 이점을 제공합니다.

- **정확도 개선:** 넓은 pore(450Å)을 가진 표면 다공성 입자(3.5µm)가 모든 LC 기기와의 호환성을 유지하면서 mAb 분리를 개선
- **속도:** 동일한 크기의 완전 다공성 입자로 충전된 컬럼에 비교하여 짧은 분석 시간
- **비용 절감:** 견고한 Poroshell 충전 베드와 2µm 주입구 frit이 주입구 막힘을 방지하여 컬럼 수명을 연장
- **유연한 분석법 개발:** 다양한 케미스트리 – SB-C8, C4 및 diphenyl

Agilent AdvanceBio RP-mAb 컬럼

결합상	Pore 크기	온도 한계	pH 범위	엔드캡핑
C4	450Å	90°C	1.0 ~ 8.0	예
SB-C8	450Å	90°C	1.0 ~ 8.0	아니요
Diphenyl	450Å	90°C	1.0 ~ 8.0	예



ZORBAX Rapid Resolution High Definition(RRHD) 300Å, 1.8µm

1.8µm 입자의 컬럼은 기존 300Å 3.5µm 컬럼에 비교할 때 향상된 피크 모양, 높은 분리능과 함께 높은 감도를 보여주는 UHPLC 성능을 제공합니다. 성능의 재현성이 매우 높으며 ZORBAX의 제조 품질 관리를

증명합니다. 이러한 컬럼은 안정성을 위해 1200bar 프리미엄 UHPLC에서 특별히 사용되었으므로, 유속을 확실하게 높일 수 있습니다.

ZORBAX RRHD 300Å, 1.8µm 컬럼은 정밀한 선택성과 성능 프로필을 위해 고유한 diphenyl을 비롯해 다양한 상에서 이용 가능합니다. 그래서,

StableBond 코팅은 우수한 낮은 pH 안정성과 열 유연성을 가지며, 300SB-C18 컬럼은 90°C에서 안정적이므로, 온도 증가에 유연성을 제공하여 분리를 개선하며 ZORBAX StableBond C8와 같은 특수 결합상은 더 빠른 실행 시간으로 고분리능의 mAb 분리가 가능합니다.

Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition(RRHD) 300Å 컬럼

결합상	입자 크기	Pore 크기	온도 한계	pH 범위	엔드캡핑	압력 한계(bar)
300SC-C18	1.8µm	300Å	90°C	1.0 ~ 8.0	아니요	1200(18,000psi)
300SB-C8	1.8µm	300Å	80°C	1.0 ~ 8.0	아니요	1200(18,000psi)
300SB-C3	1.8µm	300Å	80°C	1.0 ~ 8.0	아니요	1200(18,000psi)
300Diphenyl	1.8µm	300Å	80°C	1.0 ~ 8.0	예	1200(18,000psi)



Poroshell 300

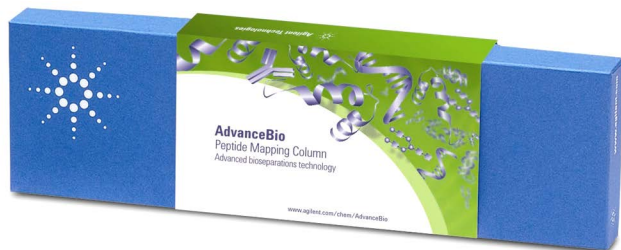
이 컬럼의 특별한 입자 기술은 큰 intact 단백질의 역상 분석을 개선합니다. Poroshell 300은 300Å의 pore 크기를 가지는 반면에, 더 큰 pore 크기를 가진 컬럼처럼 작동하며, 더 많은 고분자량(50kDa,

mAbs의 경우 150kDa)을 가진 생체분자를 처리할 수 있습니다. Poroshell 300 frit은 작은 입자를 가진 컬럼에 비해 잘 막히지 않습니다. Poroshell 300의 표면 다공성 입자는 역압(backpressure)이 거의 증가하지 않고도 높은 유속과 빠른 분석 시간을 제공하면서, 우수한 분리능을

얻을 수 있습니다. Poroshell 300은 거의 더 큰 pore의 컬럼처럼 동작하므로 표면 다공성 입자 때문에 상당한 속도상의 이점으로 큰 intact 단백질을 처리할 때 특별한 장점이 있습니다.

Agilent Poroshell 300 컬럼 사양

결합상	입자 크기	Pore 크기	온도 한계	pH 범위	엔드캡핑	압력 한계
300SB, C18, C8, C3	5µm	300Å	90°C	1.0 ~ 8.0	아니요	400bar(6,000psi)
300Extend C18	5µm	300Å	pH 8 위에서 40°C, pH 8 아래에서 50°C	2.0 ~ 11.0	예	400(6,000psi)



AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼

AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼은 다양한 분자량 범위를 가진 펩타이드 조각을 식별하기에 이상적인 120Å pore 크기를 가집니다. 이 컬럼은

펩타이드 매핑의 성능과 재현성을 확인하기 위해 까다로운 펩타이드 혼합물로 테스트했습니다. 애질런트 고유의 표면 다공성 입자 기술을 이용해 높은 유속과 전체 펩타이드 시퀀스의 우수한 분리능을 제공할 수 있습니다.

Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼

결합상	입자 크기	Pore 크기	온도 한계	pH 범위	엔드캡핑	압력 한계
EC-C18	2.7µm 표면 다공성	120Å	60°C	2.0 ~ 8.0	Double	600bar(9,000psi)

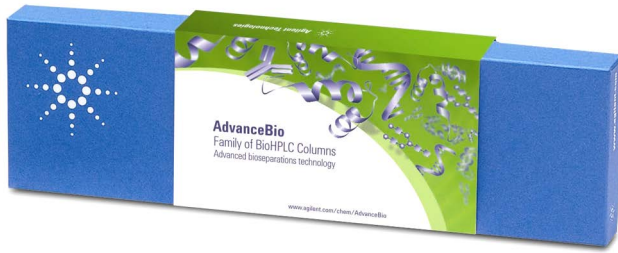
주문 정보

Agilent AdvanceBio RP-mAb 컬럼, 3.5µm					
설명	크기(mm)	부품 번호	설명	크기(mm)	부품 번호
C4	2.1 × 50	799775-904	SB-C8	4.6 × 50	789975-906
C4	2.1 × 75	797775-904	SB-C8	4.6 × 100	785975-906
C4	2.1 × 100	795775-904	SB-C8	4.6 × 150	783975-906
C4	2.1 × 150	793775-904	Diphenyl	2.1 × 50	799775-944
C4	4.6 × 50	799975-904	Diphenyl	2.1 × 75	797775-944
C4	4.6 × 100	795975-904	Diphenyl	2.1 × 100	795775-944
C4	4.6 × 150	793975-904	Diphenyl	2.1 × 150	793775-944
SB-C8	2.1 × 50	789775-906	Diphenyl	4.6 × 50	799975-944
SB-C8	2.1 × 75	787775-906	Diphenyl	4.6 × 100	795975-944
SB-C8	2.1 × 100	785775-906	Diphenyl	4.6 × 150	793975-944
SB-C8	2.1 × 150	783775-906			

Agilent Poroshell 300, 5µm					
설명	크기(mm)	300SB-C18	300SB-C8	300SB-C3	300Extend-C18
		USP L1	USP L7		USP L1
캐필러리	0.5 × 75		5065-4468		
MicroBore	1.0 × 75	661750-902	661750-906	661750-909	671750-902
Narrow Bore	2.1 × 75	660750-902	660750-906	660750-909	670750-902
가드 카트리지, 4/pk	2.1 × 12.5	821075-920	821075-918	820975-924	
가드 하드웨어 키트		820888-901	820888-901	820888-901	
MicroBore 가드, 3/pk	1.0 × 17	5185-5968	5185-5968	5185-5968	5185-5968

Agilent ZORBAX Rapid Resolution High Definition(RRHD) 300Å 컬럼, 1.8µm						
설명	크기(mm)	300SB-C18	300SB-C8	300SB-C3	300-Diphenyl	300-HILIC
		USP L1	USP L7		USP L11	
Narrow Bore	2.1 × 100	858750-902	858750-906	858750-909	858750-914	959758-901
Narrow Bore	2.1 × 50	857750-902	857750-906	857750-909	857750-914	959757-901

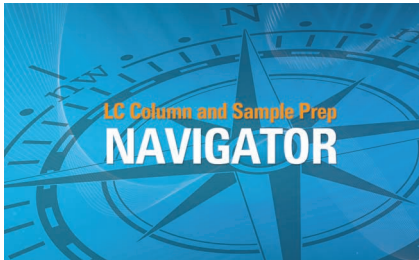
Agilent AdvanceBio Peptide Mapping 컬럼, 2.7µm	
설명	부품 번호
4.6 × 150mm	653950-902
3.0 × 150mm	653950-302
2.1 × 250mm	651750-902
2.1 × 150mm	653750-902
2.1 × 100mm	655750-902
4.6mm 간편 가드	850750-911
3.0mm 간편 가드	853750-911
2.1mm 간편 가드	851725-911



Agilent AdvanceBio 컬럼

Agilent는 AdvanceBio 바이오 컬럼 제품군을 이용해 바이오 크로마토그래피의 정확도와 생산성 향상을 위해 노력하고 있습니다. AdvanceBio 컬럼에는 재현성 있는 결과를 보장하여, UHPLC 성능과

바이오 크로마토그래피 테스트를 개선하기 위한 고유한 혁신 기술이 내재되어 있습니다. AdvanceBio 컬럼은 바이오 의약품 과학자들이 모든 특성 규명으로부터 더 많은 정보를 얻을 수 있도록 설계되었습니다.



성공적인 결과를 얻는 방법

www.agilent.com/chem/navigator

다양한 바이오 컬럼 및 작은 분자용 컬럼을 통해 애질런트는 응용 분야에 적절한 컬럼을 선택할 수 있도록 LC 컬럼 및 시료 전처리 NAVIGATOR를 소개해 드렸습니다.

NAVIGATOR는 4개의 간단한 검색 옵션을 제공합니다.

- 부품 번호를 기준 검색, LC 컬럼과 시료 전처리 제품을 교차 참조하여 최적의 애질런트 교체품을 찾습니다
- 컬럼 기준 검색(분석법에 기초한 권장 사항 이용)
- 화합물 드롭 다운 목록 기준 검색
- USP 분석법 기준 검색. 게다가, 이 도구는 크로마토그래피 최적화를 위한 컬럼 지원, 시료 전처리 제품 권장 사항 및 기술 지원 리소스와 기타 도구에 대한 빠른 액세스를 제공

자세한 내용을 확인하거나 컬럼을 구매하려면 www.agilent.com/chem/advancebio를 방문하시기 바랍니다.

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2014
2014년 11월 13일 한국에서 발행
5991-2032KO

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



Agilent Technologies