

애질런트 사용 안내서

크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 이용한 생체 분자 분석

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

성공적인 SEC를 위한 안내서

생체 분자의 용액 내 크기에 기초한 크로마토그래피 분리를 크기 배제 크로마토그래피 (SEC: Size Exclusion Chromatography)라 합니다. 다른 크로마토그래피 모드와 달리, SEC 분리는 분석 물질과 컬럼에 충전된 고정상 사이의 상호 작용에 의존하지 않습니다. SEC는 오염물질(응집체 (aggregates), 부형제 (Excipients), 세포 조각 (cell debris) 및 분해로 인한 기타 불순물 포함)에서 원형 단백질 (intact proteins)을 분리 및 분석하는 데 이상적인 솔루션입니다. 그리하여 SEC는 바이오 치료용 분자의 개발과 제조 과정의 분자 특성화에 널리 사용됩니다.

본 안내서에서는 SEC 분리, 용질 크기와 분자량의 영향, 컬럼 선택 옵션, 중요한 이동상 고려 사항, SEC 사용에 관한 일반 규칙 등등에 대해 설명합니다.



간단한 분리

SEC를 이용하면 분자는 용액 내 분자 크기에 비례하여 제일 큰 것부터 작은 것까지 차례로 분리됩니다. 큰 분자는 충전 베드에서 배제되어 틈새 부피(void volume)에서 제일 먼저 용출됩니다. 작은 분자는 크기에 따라 각기 다른 정도로 pore에 스며들며(그림 1), 분자 크기가 작을수록 pore 구조에 더 깊게 확산되어 더 늦게 용리됩니다.

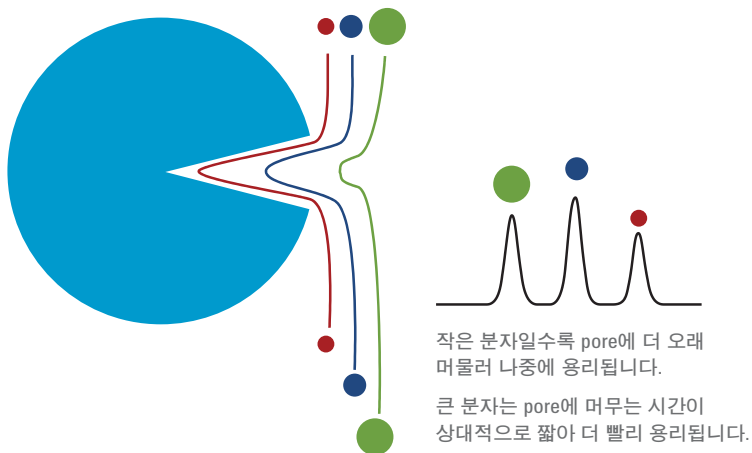


그림 1: 분자는 크기에 따라 다양한 정도로 고정상의 pore에 스며듭니다

SEC용 애질런트 바이오 컬럼에 대한 자세한 내용은
www.agilent.com/chem/bioHPLC에서 확인하실 수 있습니다.

크기 배제 크로마토그래피는 단백질 혼합물의 분리와 정량화에 적합하며, 따라서 재조합 단백질 제조의 품질 관리에 중요한 기법입니다. 응집체 (dimers, trimers, tetramers 등)를 측정하거나 큰 분자량 단백질에서 저분자량 부형제와 불순물을 분리하는 작업이 이에 해당합니다(그림 2).

치료용 단백질에서 응집은 효능과 저장 수명에 영향을 미치며, 심지어 심각한 면역 원성 반응을 보일 수 있기 때문에 이를 이해하고 제어할 수 있어야 합니다. ICH(Q6B)와 같은 규제에서는 반드시 목표산물 내 응집체를 분리 및 정량화하여야 한다고 명확하게 규정합니다.

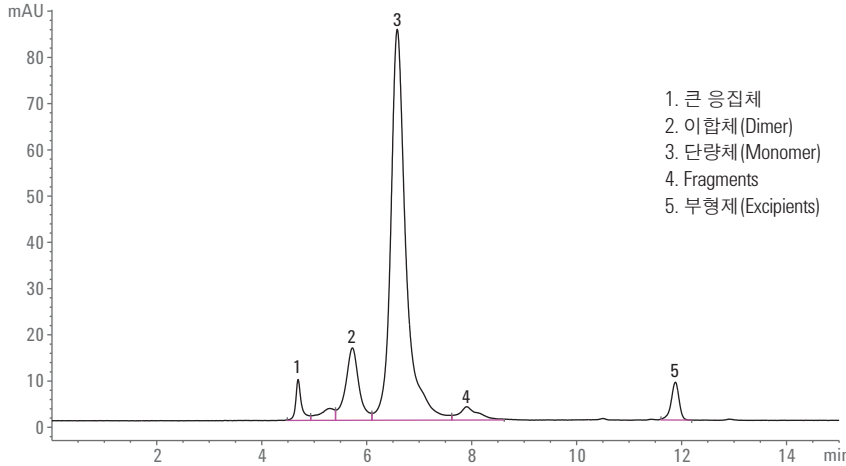


그림 2: IgG 응집체 및 부형제의 분리

Intact IgG Monomer 및 Dimer의 분리

컬럼:	Agilent AdvanceBio SEC, 300Å 7.8 x 300mm, 2.7µm (p/n PL1180-5301)
장비:	Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템
유속:	1.0mL/분
온도:	실온
검출기:	UV, 220nm
주입량:	5µL
시료:	다클론성 IgG
시료 농도:	150mM 인산나트륨 완충액, pH 7.0

용리 순서는 일반적으로 분자량에 의해 결정됩니다. 분자량이 큰 분자가 먼저 용리됩니다. 그러나 진정한 SEC 분리 메커니즘은 용액 내 크기에 기초하는 것입니다. 대부분 단백질은 컴팩트한 모양을 가집니다. 하지만 일부 단백질 분자는 원통형이기 때문에, 용액 내에서의 수력학적 반경 (hydrodynamic radius)이 상대적으로 크므로 예상보다 더 일찍 용리될 수 있습니다(그림 3). 또한, 서로 다른 이동상은 용액 내 분자 크기(수력학적 반경 또는 회전 반경)를 변화시킬 수 있기 때문에 용리 순서에 영향을 줄 수 있습니다.

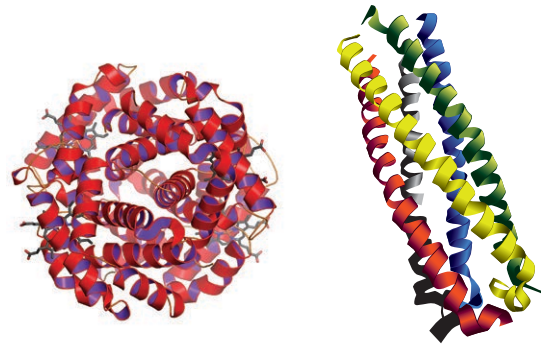


그림 3: 컴팩트한 구상 단백질 대 원통형 단백질의 비교

SEC-UV/DAD 분석법 개발 안내서

생체 분자, 응집 분석, 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질의 크기 기반 분리를 위한 초기 컬럼 및 조건 선택

펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, mAbs
MW >0.1-1,250kDa

펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, mAbs
MW >0.1-10,000kDa

분자량 범위와 pore 크기에 기반한 컬럼 선택

AdvanceBio SEC(2.7µm)	
pore 크기	분자량 범위(kDa)
130Å	0.1-100
300Å	5-1,250

Agilent Bio SEC-5(5µm)	
pore 크기	분자량 범위(kDa)
100Å	0.1-100
150Å	0.5-150
300Å	5-1,250
500Å	15-5,000
1000Å	50-7,500
2000Å	>10,000

권장 초기 분리 조건

컬럼: AdvanceBio SEC 또는 Agilent Bio SEC-5
이동상: 150mM 인산염 완충액, pH 7.0*
이동상 변화도: 10-30분 범위에서 등용매
온도: 권장 온도: 10-30°C, 최고 온도: 80°C

유속: 4.6mm id 컬럼의 경우 0.1-0.4mL/분
7.8mm id 컬럼의 경우 0.1-1.25mL/분
시료 크기: 총 컬럼 용적의 5% 이하
*고염 및 저염의 다른 수용성 완충액을 사용할 수 있음

추가 정보는 응용 자료 참조: 단백질의 효율적인 크기 분리를 위한 최적의 매개 변수 정의(Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins)(발행물 번호 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/library

초기 크로마토그램 후, 분리를 개선하거나 단백질 용해도를 유지하거나 크로마토그래픽 미디어와 시료의 상호작용을 줄이기 위해 추가적인 변경이 필요할 수 있습니다. 이동상의 이온 세기는 최적의 분리를 얻을 수 있는 세기로 증가 또는 감소시킬 수 있습니다. pH도 보통 ± 0.2 단위로 조정할 수 있습니다. 추가적인 최적화가 필요할 경우, 상향 또는 하향 범위를 확대해야 합니다. 이외에도 온도를 변화시키거나 유기 용매를 추가할 수 있습니다.

염 추가가 필요한 프로토콜의 경우, 다음 완충액이 일반적으로 사용됩니다:

100-150mM 염화나트륨이 포함된 50mM 인산나트륨(pH 7.0)
100-150mM 황산나트륨이 포함된 50mM 인산나트륨(pH 7.0)
50-100mM 요소(urea)가 포함된 50mM 인산나트륨(pH 7.0)
기타 유사한 염(예: KCl) 및 염산 구아니딘(guanidine hydrochloride)을 사용할 수 있습니다.

pH 범위: 2.0-8.5

추가 가능한 유기 용매:

5-10% 에탄올(또는 메탄올이나 아세토니트릴 같은 기타 유사한 용매)을 포함한 50mM 인산나트륨(pH 7.0), 5% DMSO를 포함한

50mM 인산나트륨(pH 7.0). 점도가 높은 이동상을 사용할 경우, 최대 작동 압력 이하로 유지하기 위해 유속을 낮출 필요가 있을 수 있다는 점에 유의하시기 바랍니다.

온도:

일반적으로, SEC 분리는 10-30°C에서 실행됩니다. 단백질과 펩타이드의 분리에서는 단백질 및 소수성 펩타이드의 분리능과 회수율을 높이기 위해 더 높은 온도가 필요할 수 있습니다. 온도에 민감한 단백질의 생물학적 활성을 최대로 유지하기 위해 냉장실에서 SEC 분리를 실행해야 할 수 있습니다.

Agilent Bio SEC 컬럼의 최대 작동 온도는 80°C입니다. 고온에서는 단백질 변성을 초래할 수 있다는 점에 유의하십시오.

SEC에 대한 장비 고려사항

SEC 분리 메커니즘은 용리 부피 또는 머무름 시간이 분석에 절대적으로 중요하다는 것을 보여줍니다. 이를 위해 정밀도와 재현성을 보장하는 고성능 장비가 필요합니다. 등용매 모드 작동에는 등용매 펌프나 기울기 펌프가 적합하며, 굴절률(RI) 검출기와 더 일반적인 UV 또는 DAD 검출기도 사용할 수 있습니다. 바탕선(baseline) 안정성을 보장하기 위해, 특히 RI 검출기를 사용할 때는 이동상 온라인 탈기와 항온 장치가 강력히 권장됩니다. 고온에서 작동하면 확산 계수가 증가하여 분해능과 재현성이 높아지고 컬럼 압력이 줄어듭니다. 따라서 항온 장치는 고성능 시스템에 필수적인 요소입니다.

까다로운 용매 조건에서도 가능한 견고하고 신뢰성 있는 작동

일반적으로 생체 분자 분석에는 2M NaCl 또는 8M 요소(Urea)와 같이 염의 농도가 높고 극단의 pH 값(1~13)을 가진 완충액이 사용되며, 이러한 조건은 LC 장비가 해결해야 할 중요한 과제입니다. 그러나 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC의 전용 설계는 이와 같은 가혹한 용매 조건을 손쉽게 처리합니다. 또한, 내부식성 티타늄 재질의 용매 전달 시스템과 비금속 재료로 제작된 시료 유동 경로는 장비의 완건성을 크게 향상시켜 시료뿐 아니라 장비 투자를 보호해 줍니다. 검출기는 또한 생체 분자 분리를 위해 고안되었으며 단백질 분석, 피크 모양 및 회수율에 영향을 미치지 않습니다.

분석 중 단백질 보호

가열은 단백질의 변성을 초래할 수 있으므로 전체 LC 유동 경로에서 시료를 일정 온도로 유지하는 것이 중요합니다. 비활성 시료 루프와 세라믹 니들을 가진 애질런트 생체 비활성 자동 시료 주입기(autosampler)는 추가 항온 장치를 이용해 냉각할 수 있습니다. 항온 컬럼 장치의 생체 비활성 열 교환기는 온도를 일정하게 유지합니다. 애질런트는 다양한 조건에서 신뢰성 있는 단백질 분석이 가능하도록 여러 가지 생체 비활성 흐름 셀을 제공합니다. 흐름 셀 옵션에 대한 자세한 내용은 www.agilent.com/chem/bioflowcells에서 확인하실 수 있습니다.



Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템



RFID 태그가 부착된 생체 비활성 흐름 셀, 10mm, 13 μ L(p/n G5615-60022)

시야를 넓혀주는 소프트웨어 솔루션

크기 배제 크로마토그래피로 작업할 때 다음과 같이 여러 가지 소프트웨어 옵션의 지원을 받을 수 있습니다.

- **HPLC 소프트웨어:** Agilent OpenLAB CDS ChemStation 소프트웨어는 크로마토그래피 데이터를 수집, 검토 및 관리하고 정량 분석을 수행하는 데 도움을 드립니다.
- **GPC/SEC 소프트웨어:** Agilent GPC/SEC 시스템의 일부로 이용할 수 있으며, 분자량에 기반한 추가 정보를 제공합니다.
- **Buffer Advisor 소프트웨어:** 염과 pH 기울기를 빠르고 쉽게 작성하여 완충액 준비, 혼합 및 pH scouting 등의 지루하고 오류가 발생하기 쉬운 분석법 개발 단계를 없앱니다.



종합적인 분자 특성화

SEC는 자연계에 존재하는 분자(다당류, 녹말 등)와 합성 폴리머(폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌 옥사이드)를 포함하는 중합체 분석물질의 평균 분자량을 결정하기 위해 사용될 수 있습니다(그림 4). 단백질이나 백신 같은 더 복잡한 시료의 경우, 일반적으로 전용 소프트웨어를 이용한 보다 정교한 형태의 데이터 분석이 필요합니다. 적절한 검출기를 함께 사용하여 시료의 형태에 대한 유용한 정보를 얻을 수 있습니다. 검출기 선택에 대한 자세한 내용은 17 페이지를 참조하십시오.

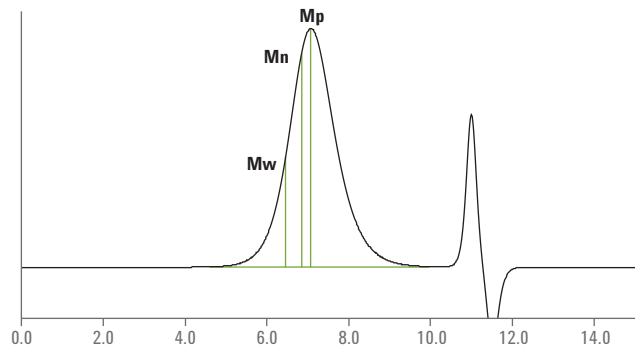
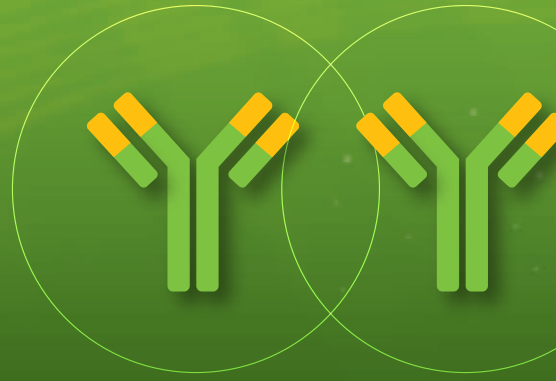


그림 4: 다당류 SEC 분리에서의 Mw, Mn 및 Mp 측정결과

크기 배제 특성화의 단계



시료 전처리

크기 배제 크로마토그래피의 시료 전처리 절차는 단백질 HPLC 분석의 시료 전처리 절차와 유사합니다. 가장 중요한 점은 시료가 용리액에 용해될 수 있어야 하며 이동상에서 이상적으로 분리될 수 있어야 합니다. SEC 분리는 기타 HPLC 분석법에 비해 유속이 느리기 때문에 컬럼 치수가 크고 선속도가 낮습니다(아래 “컬럼 크기” 참조). 그리하여 소요되는 시료 농도와 주입량이 보통보다 커야 합니다. 컬럼의 손상을 막기 위해, 사용하기 전에 시료를 필터링하거나 원심분리시켜 미립자를 제거하는 것이 좋습니다. 그러나 필터링은 시료 용해도가 낮은 문제를 해결할 수 없으며, 이 경우 용리액을 교체해야 합니다.

효과적인 시료 전처리를 위해, 시료 분해에 사용되는 분석법이 시료 자체의 특성에 변화를 주지 않도록 해야 합니다. 일부 단백질은 stress 조건에서 응집(dimers와 고분자량 multimers 형성)되거나 분리(저분자량 sub-units 형성)될 수 있습니다. 여기에는 반복적인 냉동-해동, 극한 온도, 초음파 처리 심지어 농축 등의 조건이 포함될 수 있습니다. 자세한 내용은 5 페이지의 분석법 개발 안내서를 참조하십시오.

Captiva 저단백질 결합 필터

수행하고 있는 시료 전처리 방법과 관계 없이, 저단백질 결합 필터를 이용해 시료를 필터링하는 것이 좋습니다.

Agilent PES 필터는 단백질 관련 필터링에서 우수하고 일관된 저단백질 결합을 제공합니다. 대부분의 LC 분석에서, PVDF 멤브레인보다 PES 필터 멤브레인을 선택하는 것이 좋습니다. Agilent PES는 일반적인 LC 용매에 대해 PVDF 필터와 유사한 호환성을 가지며, 단백질 결합 및 청결도의 측면에서는 PVDF 필터보다 우수합니다. 자세한 정보는 www.agilent.com/chem/filtration에서 확인하실 수 있습니다.



Captiva PES 필터

직경(mm)	pore 크기(μm)	인증	하우징	부품 번호
4	0.45	LC	폴리프로필렌	5190-5095
4	0.2	LC/MS	폴리프로필렌	5190-5094
15	0.2	LC/MS	폴리프로필렌	5190-5096
15	0.45	LC	폴리프로필렌	5190-5097
25	0.2	LC/MS	폴리프로필렌	5190-5098
25	0.45	LC	폴리프로필렌	5190-5099

컬럼 선택

컬럼 크기

SEC 컬럼은 일반적으로 다른 유형의 크로마토그래피에 사용된 컬럼보다 크며, 상대적으로 낮은 유속 또는 느린 선속도에서 작동합니다. SEC 표준 컬럼 크기는 7.8 x 300mm이고 유속은 1.0mL/분이며, 역상 컬럼의 크기는 일반적으로 2.1/4.6 x 150mm 이고 선속도는 SEC의 2-3배입니다. 이는 컬럼 크기의 영향이 아니라 SEC 메커니즘 자체에서 비롯된 것입니다.

흡수 또는 고정상과의 상호작용으로 인해 다른 크로마토그래피 기법에서 일반적으로 나타나는 시료 농도의 증가가 SEC 분리에서는 발생하지 않습니다. 따라서 SEC 분석 시료는 더 높은 농도(1-4mg/mL) 및 양(5-20µL)으로 주입됩니다. 실행 시간은 일반적으로 컬럼 당 10-12분이며(기준 7.8 x 300mm 컬럼이 1.0 mL/분에서 작동한다고 가정), 피크는 보통 넓기 때문에 높은 데이터 수집 속도가 필요없습니다. 단백질 응집의 비교나 정량화에는 HPLC 소프트웨어가 사용되며, 다분산 폴리머에 대한 분자량 분포 정보를 얻기 위해서는 특별 SEC 소프트웨어를 사용합니다.

정기적인 검량을 통해 선택한 컬럼의 특성을 파악하는 것이 매우 중요합니다. 그 어떤 pore도 통과하지 못하는 충분히 큰 분자를 사용하여 컬럼의 배제 한계를 확인할 수 있습니다. 마찬가지로, 모든 pore 구조를 통과할 수 있는 충분히 작은 분자를 사용하여 컬럼의 전체 투과 한계를 확인할 수 있습니다. 그런 다음 수행하고자 하는 분리가 이 두 한계 사이에 놓이도록 해야 합니다. 시료의 크로마토그램에 배제된 물질이나 전체 투과 포인트에서 용리된 물질을 포함할 경우, 이는 분석 수행을 위해 다른 pore 크기의 컬럼을 사용할 필요가 있음을 나타냅니다.

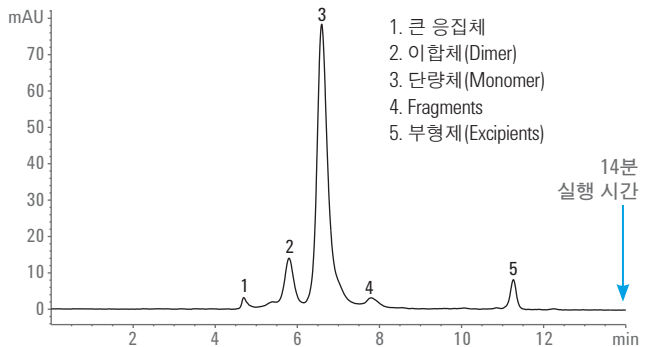
더 짧은 컬럼으로 분석 속도 향상

분석에 필요한 정도의 분리능을 획득하기 위해 보통 길이가 300mm인 컬럼을 사용해야 합니다. 그러나 분리 속도를 높이려면 더 짧은 컬럼 길이를 고려할 수 있습니다. 길이가 150mm인 컬럼을 사용하면 절반의 시간에 분리를 완료할 수 있지만, 분리능이 저하됩니다. 처리량을 높여야 할 경우, 역압(backpressure) 한계를 초과하지 않는 조건하에서 컬럼 길이가 짧을수록 유속이 높아지며, 따라서 분석 시간을 단축할 수 있습니다(그림 5 참조).

컬럼: AdvanceBio SEC, 7.8 x 300mm

유속: 1.0mL/분

시료: 다클론성 IgG



컬럼: AdvanceBio SEC, 7.8 x 150mm

유속: 2.0mL/분

시료: 다클론성 IgG

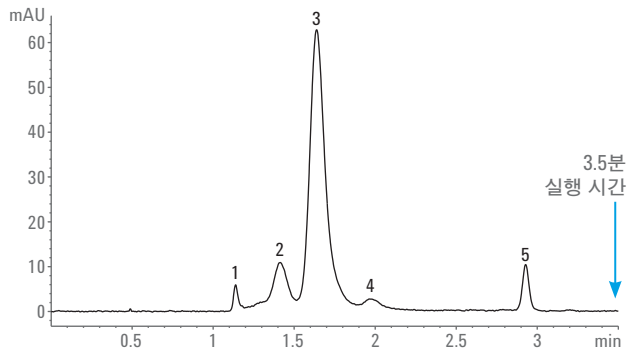


그림 5: 300mm 컬럼과 150mm 컬럼을 사용한 분석을 비교하여 절약된 시간 표시



컬럼 미디어 선택

시료의 용해도와 이동상(물, 완충액 또는 유기 용매)을 결정한 후, 분리하려는 분자 유형과 크기에 적합한 크기 배제 컬럼을 선택합니다. 폴리머 기반 흡착제로 충전된 컬럼은 일반적으로 넓은 분자량 분포 범위를 가진 폴리머 분자(해파린, 녹말 또는 셀룰로오스 등)에 사용됩니다. 실리카 기반의 고정상은 단백질과 분자량이 서로 다른 분자의 분석에 적합합니다(표 1).

단백질에는 서로 다른 결사슬(산, 염기, 소수성 및 중성/친수성)을 가진 다양한 아미노산을 포함하고 있다는 점에 유의해야 합니다. 실리카 컬럼과의 상호작용을 방지하려면 이동상에 완충액을 첨가해야 합니다.

애질런트에서는 컬럼의 적절한 분자량 범위를 제시하며, 이론적으로 컬럼 선택은 작동 범위의 중간에 속해야 합니다.

크기 배제 크로마토그래피(SEC)

응용 분야	애질런트 컬럼	참고
단백질		
mAbs, 단백질 및 펩타이드의 SEC-UV/DAD 또는 LS 분석	Agilent AdvanceBio SEC	최신 혁신 기술은 분리능을 개선하여 시료 재분석의 필요성을 없애고 분석 시간을 단축함으로써 실험실 생산성을 향상시킵니다.
mAbs, 단백질 및 펩타이드의 SEC-MS 분석	Agilent Bio SEC-3	MS 검출을 통해 안정적인 바탕선(baseline)을 제공합니다.
큰 생체 분자 및 다양한 분자량 성분을 포함한 시료	Agilent Bio SEC-5	Pore 크기 옵션(100Å, 150Å, 300Å, 500Å, 1000Å, 및 2000Å)이 다양하여 보다 많은 분석물질을 분석할 수 있습니다.
구상 단백질, 항체	ProSEC 300S	고염 조건에서의 단백질 분석을 위한 단일 컬럼 옵션입니다.
단백질, 구상 단백질	ZORBAX GF-250/450	프로토콜에서 USP 지정 L35의 사용을 요구할 경우 기존 제품을 사용해야 합니다.
수용성 분석물질		
저분자량 폴리머 및 올리고머, 올리고당, PEG, 리그노술폰산염	2 또는 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH 8µm ✓ PL aquagel-OH 20 5µm ✓ PL aquagel-OH MIXED-M 8µm	PL aquagel-OH 분석 컬럼의 pH 범위는 2-10이고 유기 용매(최대 50% 메탄올)와 호환되며, 최대 140bar(2030psi)의 기계적 안정성 및 낮은 컬럼 작동 압력을 가집니다.
다분산 바이오폴리머, 다당류, 셀룰로오스 유도체	2 또는 3 PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8µm ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8µm	
초고분자 폴리머, 히알루론산, 녹말, 검류(gums)	PL aquagel-OH 60/50/40 15µm 시리즈	

표 1: 응용 분야와 시료 크기에 따른 컬럼 선택 옵션



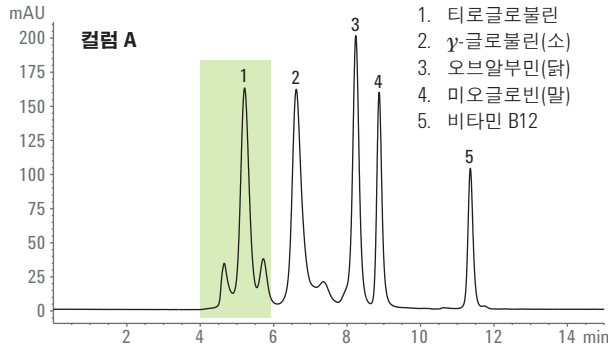
Agilent Bio SEC 컬럼은 단백질 응집을 비롯한 생체 분자의 분리에 사용되고 Agilent GPC 컬럼은 다당류 분자량 결정을 비롯한 천연 폴리머 분석에 사용됩니다.

pore 크기

단백질은 다른 바이오폴리머에 비해 상대적으로 작고 컴팩트하여 초기 컬럼으로 pore 크기가 300Å인 컬럼을 선택하는 것이 적합합니다. 그림 6은 서로 다른 pore 크기를 가지는 컬럼에서 5개의 단백질 혼합물 참조 표준물질과 다클론성 IgG 시료의 분리능을 비교하였으며, 그 결과를

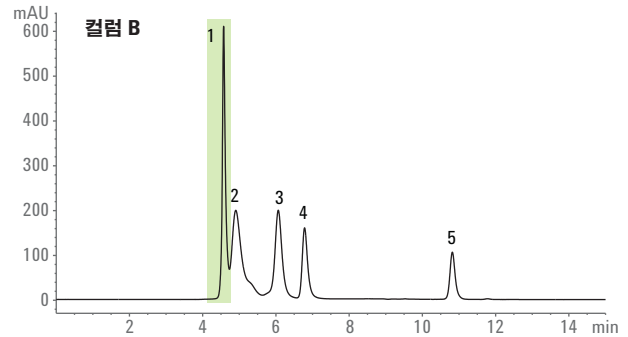
통해 분리능에 대한 pore 크기의 영향을 명확하게 보여줍니다. 300Å pore를 이용할 경우 가장 큰 단백질 티로글로불린과 IgG dimer를 분리할 수 있습니다. 하지만 pore 크기가 작아질수록 가장 큰 단백질이 배제되고 분리가 일어나지 않습니다.

BioRad 겔 여과 표준 혼합물



컬럼 A: AdvanceBio SEC 300Å
4.6 x 300mm, 2.7µm(p/n PL1580-5301)

컬럼 B: AdvanceBio SEC 130Å
4.6 x 300mm, 2.7µm(p/n PL1580-5350)



장비: Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템

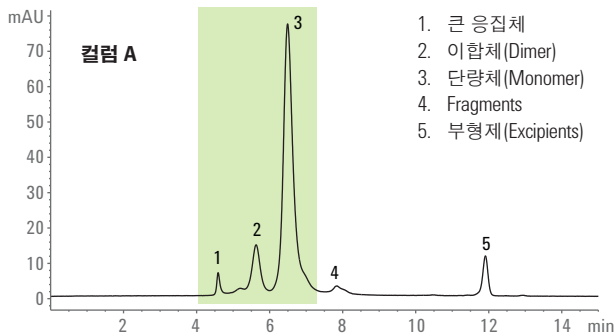
이동상: 150mM 인산염 완충액, pH 7.0

유속: 0.35mL/분

검출기: UV, 220nm

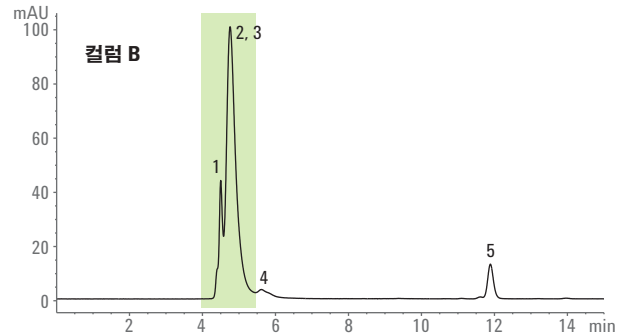
시료: BioRad 겔 여과 표준 혼합물

다클론성 IgG 분리



컬럼 A: AdvanceBio SEC 300Å
4.6 x 300mm, 2.7µm(p/n PL1580-5301)

컬럼 B: AdvanceBio SEC 130Å
4.6 x 300mm, 2.7µm(p/n PL1580-5350)



장비: Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템

이동상: 150mM 인산염 완충액, pH 7.0

유속: 0.35mL/분

검출기: UV, 220nm

시료: 다클론성 IgG

그림 6: BioRad 겔 여과 표준물질과 다클론성 IgG의 분리에서 pore 크기의 영향을 비교. 녹색으로 강조 표시된 영역은 두 pore 크기 사이의 분해능 차이를 보여줍니다. 큰 단백질 분석에는 pore 크기가 큰 컬럼을 사용해야 합니다

SEC 투과 범위 평가

단백질의 경우, SEC 분리 메커니즘은 용질의 분자량이 아니라 용액 내 용질 크기에 기반한다는 점을 이해해야 합니다. 그림 7과 같이, 단백질/펩타이드 및 풀루란(pullulan)/다당류의 검량 곡선을 PEG/PEO 곡선과 비교할 경우, 이는 더 명확해집니다. 풀루란(pullulan)/다당류와 PEG/PEO의 calibrant가 제공하는 검량 곡선은 상당히 유사하지만, 단백질/펩타이드의 검량 곡선은 이동하여 다른 모양을 보입니다.

단백질은 3차원 구조를 형성하는 복잡한 폴리펩타이드 사슬로 이루어져 있습니다. 이러한 구조는 pH 또는 이온 세기와 같은 노출된 환경의 영향을 받습니다. 사슬은 단백질에 가장 적합한 모양을 이루므로 구조와 크기가 다를 수 있습니다.

용리 시간은 분자량보다는 분자 크기에 의해 좌우된다는 것을 증명하기 위해, 약 50,000의 분자량을 가진 calibrant의 머무름 시간을 살펴보십시오. 거기에는 분명한 차이가 있습니다(그림 8). PEG는 단 7분 후 용리되고 다당류는 7.5분을 지나 용리되지만, 단백질은 약 9.5분에 용리됩니다.

이는 SEC 분리 메커니즘이 분자량이 아니라 실제 크기에 의해 좌우된다는 것을 명확하게 증명합니다. 그리하여 검량선을 사용할 때, 사용된 calibrant를 지정하는 것이 중요합니다. 예컨대, 관심 시료는 분자량이 50,000인 풀루란(pullulan)/다당류에 해당한다고 설명할 수 있습니다. 이 상대적 영향을 극복하는 고급 검출기는 16페이지를 참조하십시오.

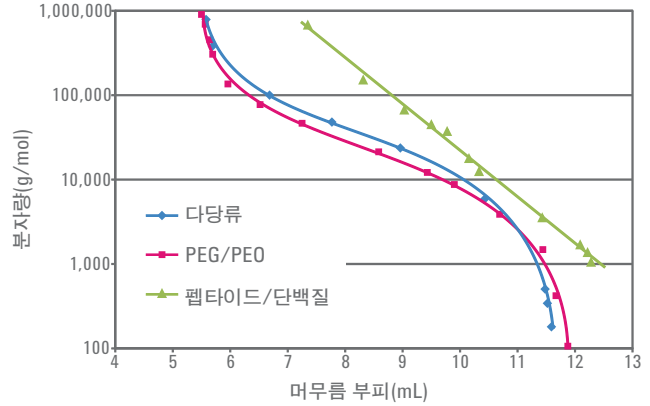


그림 7: 세 가지 유형의 calibrant에 대한 검량 플롯의 비교

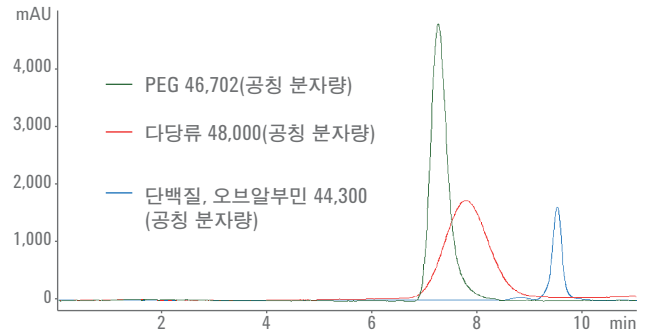


그림 8: 비슷한 분자량의 calibrants의 중첩 크로마토그램



130Å AdvanceBio SEC 검량 표준물질 (p/n 5190-9416 130Å AdvanceBio SEC 검량 표준물질, 2mL 바이알)

Agilent 130Å AdvanceBio 크기 배제 컬럼을 검량하기 위해 주의 깊게 선택한 5가지 단백질로 이루어진 단백질 혼합물(오브알부민, 미오글로빈, 아프로티닌, 뉴로덴신, 안지오텐신 II)입니다. 이 표준물질은 컬럼을 정기적으로 검량하기 위해 사용할 수 있으며, 단백질 정제 및 분석을 비롯한 다양한 응용 작업에서 이상적인 시스템 성능을 보장합니다.

300Å AdvanceBio SEC 검량 표준물질 (p/n 5190-9417 300Å AdvanceBio SEC 검량 표준물질, 2mL 바이알)

Agilent 300Å AdvanceBio 크기 배제 컬럼을 검량하기 위해 주의 깊게 선택한 5가지 단백질로 이루어진 단백질 혼합물(티로글로불린, g-글로불린, 오브알부민, 미오글로빈, 안지오텐신 II)입니다. 이 표준물질은 컬럼을 정기적으로 검량하기 위해 사용할 수 있으며, 단백질 정제 및 분석을 비롯한 다양한 응용 작업에서 이상적인 시스템 성능을 보장합니다.

입자 크기

입자 크기도 컬럼 선택에 중요한 고려 사항입니다. 입자 크기가 작으면 더 효율적인 분리를 제공하지만 단백질 분해(전단/변형)의 위험이 있습니다. 그림 9는 Agilent 3 μ m Bio SEC-3과 5 μ m Bio SEC-5 컬럼의 비교 결과를 보여줍니다. 만약 시료와 용리액을 주의 깊게 전처리하지 않을 경우 높은

역압(backpressure)과 컬럼 막힘의 위험이 증가합니다. 불용성 물질과 잔류물을 제거하기 위해 필터링이 권장됩니다. 또한 가드 컬럼이나 인라인 필터를 사용하면 컬럼 수명을 늘릴 수 있습니다.

Agilent Bio SEC-3과 Agilent Bio SEC-5 사이의 비교 결과

단일클론성항체 분석

컬럼: Bio SEC-3, 300Å
7.8 x 300mm, 3 μ m
(p/n 5190-2511)

컬럼: Bio SEC-5, 300Å
7.8 x 300mm, 5 μ m
(p/n 5190-2526)

장비: Agilent 1260 Infinity Bio-inert
Quaternary LC 시스템

이동상: 150mM 인산나트륨, pH 7

유속: 1mL/분

검출기: UV, 220nm

시료: 인간화 단일클론성항체

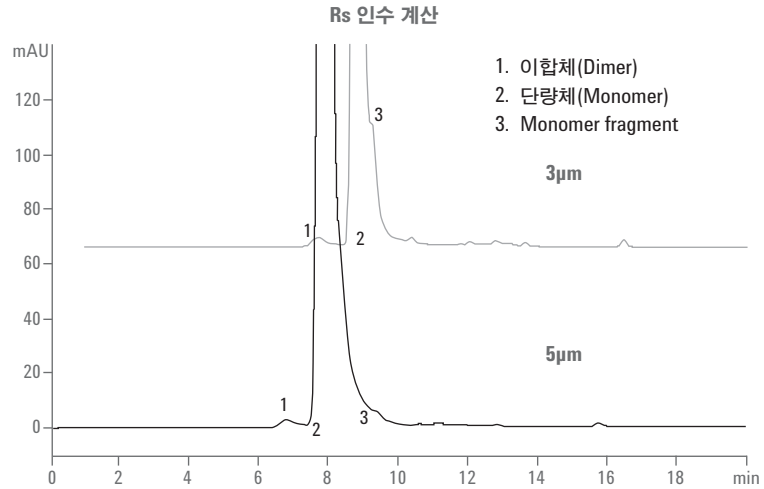


그림 9: Agilent Bio SEC-3과 Agilent Bio SEC-5 컬럼의 비교
3 μ m 컬럼이 더 높은 분리 성능을 제공합니다

컬럼 직경

시료의 양에 따른 컬럼 직경 선택도 아주 중요합니다. 분석물질의 양이 제한될 경우 4.6mm id의 컬럼(0.35mL/분에서 작동)이 적합합니다. 그러나 과도한 분산 및 분리능 손실을 막기 위해 내경이 더 작은 컬럼을 사용할 경우에는 시스템 부피를 최소화하는 것이 중요합니다.

수용성 용리액을 사용할 경우 SEC는 성질을 변형시키지 않는 기법으로 간주되며, 따라서 복잡한 시료의 분획 분리나 추가 분석을 위한 시료 성분의 분리에 매우 유용합니다. Agilent SEC-3 및 SEC-5 컬럼 제품군의 21.2mm 같은 큰 직경의 컬럼을 사용하면, 분석용 HPLC 시스템을 이용해 실험실 전처리 분리를 수행할 수 있습니다.



Agilent AdvanceBio SEC 컬럼 7.8 x 300mm 및 4.6 x 300mm

분석법 매개 변수

유속

일부 응용 분석에서 분석 속도는 매우 중요합니다. 더 짧은 컬럼을 사용하거나(150mm 컬럼으로 300mm 컬럼 대체) 유속을 증가시키는 것 모두 분석 시간을 단축할 수 있습니다. SEC 분리는 컬럼 pore의 안과 밖으로 드나드는 분자의 확산에 의해 생성된 경로 길이 차에 기반하여 분리를 실현하기 때문에, 이 방법은 분리에 부정적 효과를 가져올 수 있습니다. 그럼에도 불구하고, 그림 10에 표시된 것처럼, 150nm 컬럼을 2mL/분의 유속에서 사용할 때 IgG dimer 및 monomer를 4분 안에 정량화하기에 충분한 분리능을 얻을 수 있습니다.

컬럼:	AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 x 150mm, 2.7µm (p/n PL1180-3301)
용리액:	150mM 인산염 완충액, pH 7.0
유속:	0.5, 1.0, 1.5mL/분(52, 102, 152bar)
검출기:	UV, 220nm
주입량:	5µL
시료:	IgG(2mg/mL)

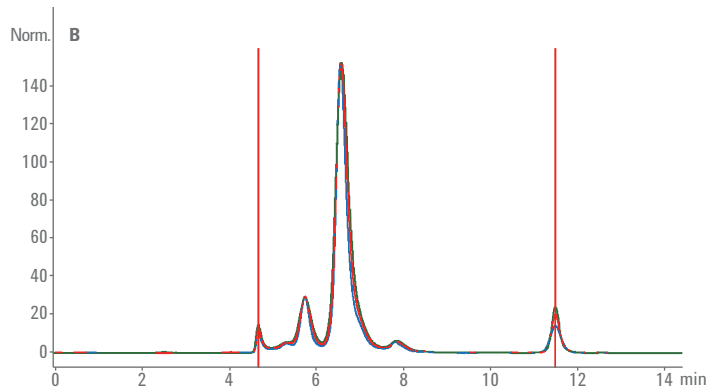
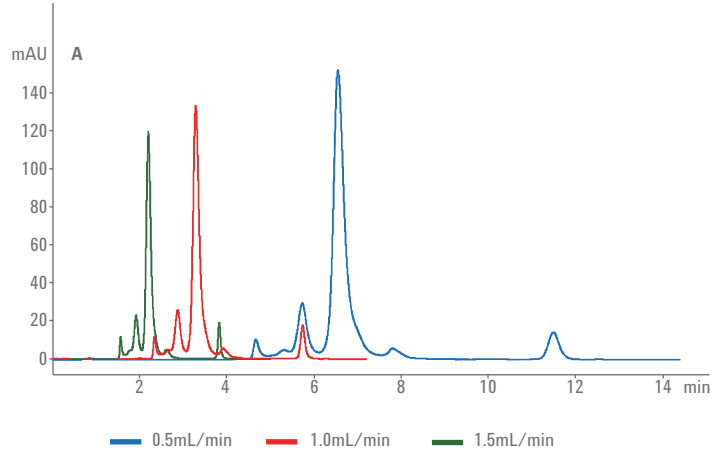


그림 10: 유속을 높이면 분석 시간이 12분에서 4분으로 단축됩니다(A) 머무름 시간이 정규화되고 중첩된 경우(B), 머무름 시간이 일정하게 유지되며 분리능 감소는 최소화되는 것으로 증명되었습니다

SEC 분석법 문제 해결

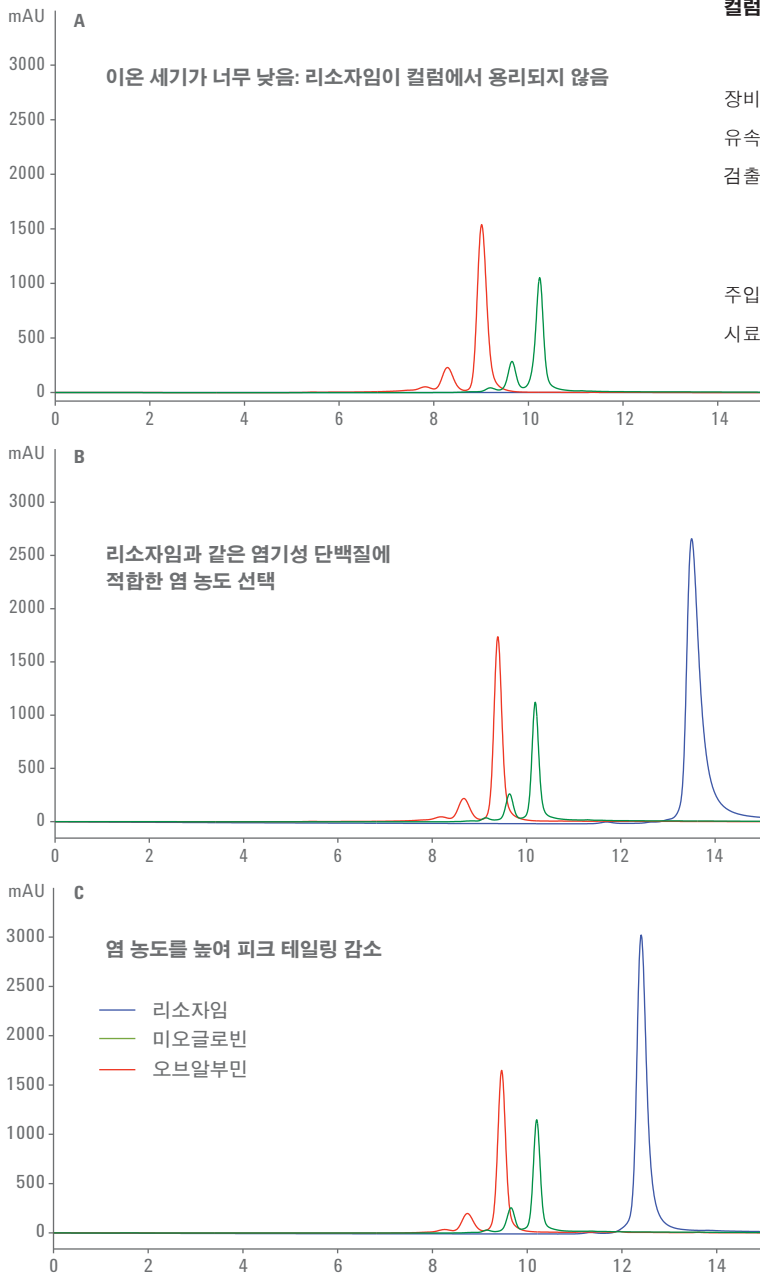
문제점	원인	용액
예상 회수율보다 낮음 또는 피크가 넓어짐	소수성 분석물질	이동상에 소량의 (10-20%) 유기 변형제(아세트니트릴 또는 메탄올) 추가
피크가 나타나지 않아야 할 지점에서 나타나거나(분자량에 기반하여 판단) 피크 테일링이 나타남	이온 상호 작용 또는 염기성 단백질	50-100mM 간격으로 이온 세기-염 농도 증가, 인산염 완충액에 추가
피크 모양 불량	비특이적 흡수	염 농도를 증가시키거나 Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템 사용
분석물질의 머무름/분리능 부족	pore 크기가 분자 크기보다 작음	pore 크기 확인, 자세한 내용은 11 페이지 참조

이동상 선택

이차 상호작용은 문제를 일으킬 수 있음

원하지 않는 2차 상호작용을 극복하려면 분석법 최적화를 수행해야 합니다. 그러한 상호작용으로 예상보다 늦게 분석물질이 용리될 수 있고, 저분자량이 나타날 수 있습니다. 이동상 조성(pH, 이온 세기 또는 유기 변형제)을

약간 조정하면 그러한 문제를 극복하는데 도움이 될 수 있습니다(그림 11). 또한 원하는 분리를 위해 pore 크기 선택을 재정의하거나, 여러 컬럼을 조합하거나, 분석 유속을 낮추거나 온도를 변경하는 등의 조치가 필요할 수 있습니다.



컬럼: Agilent Bio SEC-3 300Å
4.6mm x 300mm, 3µm
(p/n 5190-2513)

장비: Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템

유속: 0.35mL/분

검출기: UV, 220nm

A: 용리액 20mM 인산염 완충액, pH 7 + 50mM NaCl

B: 용리액 20mM 인산염 완충액, pH 7 + 100mM NaCl

C: 용리액 20mM 인산염 완충액, pH 7 + 400mM NaCl

주입량: 5µL

시료: 단백질(1mg/mL 20mM 인산염 완충액, pH 7)

50mM NaCl, 20mM 완충액

400mM NaCl, 20mM 완충액

그림 11: 너무 크거나 작은 이온 세기가 원하는 분리 달성에 대한 영향

검량

컬럼을 선택한 후, 알려진 분자량의 표준물질로 검량을 수행해야 합니다. 컬럼을 변경할 때마다 또는 이동상을 바꿀 때마다, 검량을 반복해야 합니다. 검량선은 분자량 대비 머무름 시간을 플롯하여 얻어집니다(그림 12).

표적 분자에 적합한 표준물질을 선택하는 것이 특히 중요합니다. 단백질 분리의 경우 단백질 분자량 표준물질을 사용하고 다당류 분리의 경우 풀루란(pullulan) 분자량 표준물질을 사용해야 합니다.

컬럼: Agilent Bio SEC-5
7.8 x 300mm, 5µm
(p/n 5190-2521)

장비: Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템

이동상: 150mM 인산염나트륨, pH 7.0

유속: 1.0mL/분

검출기: UV

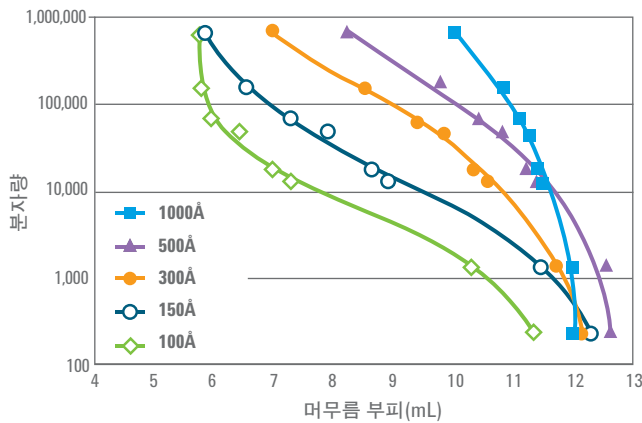


그림 12: 검량 곡선은 분자량 대비 머무름 시간을 플롯하여 얻어집니다

단백질	MW	머무름 부피				
		1000Å	500Å	300Å	150Å	100Å
티로글로불린	670,000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
γ-글로불린	158,000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67,000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
오브알부민	45,000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
미오글로빈	17,000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
리보뉴클레아제 A	12,700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
비타민 B12	1,350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
우라실	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41

이상적인 경우, 표준물질은 이동상에 용해되어야 하며 시료는 이동상에 충분히 용해되어야 합니다. 용액이 혼탁해 보이면 추가 조치를 취해야 할 필요가 있습니다. 주입 전에 불용성 물질을 제거하기 위해 원심분리나 필터링을 이용해야

합니다. 그러나, 물리적 과정은 분자량 조성을 바꿀 수 있기 때문에 시료 용해도를 높이는 다른 이동상 조건을 찾을 필요가 생길 수 있습니다.



고급 검출 기법

추가적인 SEC 고려사항에는 검출기 선택이 있습니다. UV 또는 다이오드 어레이(DAD)는 단백질 분리에 일반적으로 사용됩니다. 펩타이드 및 단백질에 대한 최적의 결과, 즉 최고 감도는 보통 220nm에서 얻어집니다. 일부 완충액이나 유기 변형제는 낮은 파장에서 배경 흡광도가 너무 클 수 있습니다. 이 경우 254nm 또는 280nm의 파장을 선택해야 할 수 있습니다. UV 검출의 단점은 일부 분자가 발색단(chromophore)을 가지지 않는다는 것입니다. 하지만, 분석물질이 등용리 조건으로 용리되기 때문에 RI 검출기를 대신 사용할 수 있습니다.

고급 광산란 검출을 추가하면 SEC의 성능이 크게 개선됩니다. 정적 광산란 검출(Static light scattering)을 통해 컬럼 검량 및 원치 않는 상호작용과 관계 없이 정확한 몰 질량을 결정하며, 동적 광산란 검출(dynamic light scattering)을 결합하여 분자 크기 연구에 사용할 수 있습니다. 광산란 검출은 큰 모이어티(moieties)에 대한 감도를 증가시켰으며, 훨씬 더 낮은 양에서 응집을 검출할 수 있습니다(그림 13). 크로마토그래피 성능을 훼손하지 않고 이 추가 정보를 얻기 위해서는 낮은 무효 부피(dead volume)를 가진 검출기를 선택하는 것이 중요합니다.

컬럼:	Agilent AdvanceBio 300Å, 7.8 x 300mm, 2.7µm
장비:	Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템과 Agilent 1260 Infinity Multi-Detector GPC/SEC 연동 사용
이동상:	150mM 인산나트륨, pH 7.0
유속:	0.8mL/분
온도:	30°C
검출기:	UV, 280nm + RI + LS 90°
주입량:	5µL
시료:	분해된 단일클론성항체

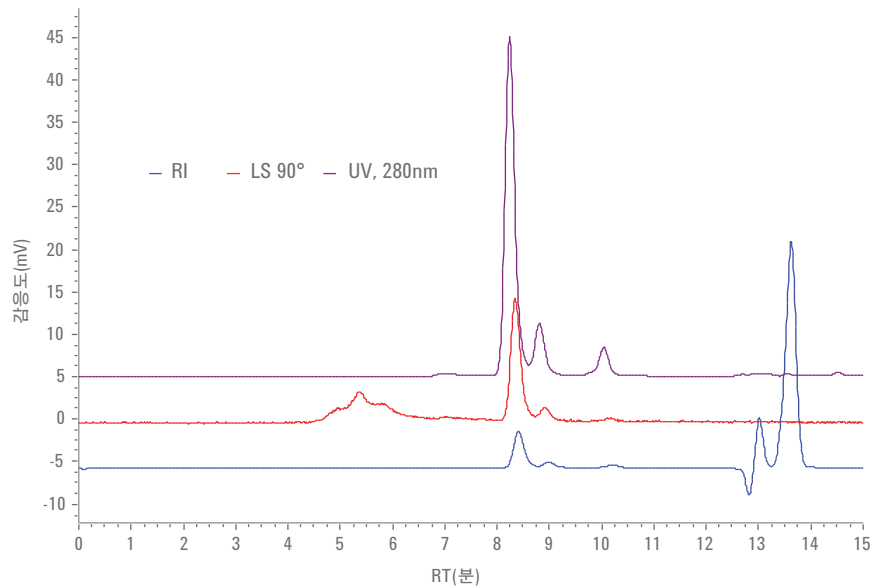


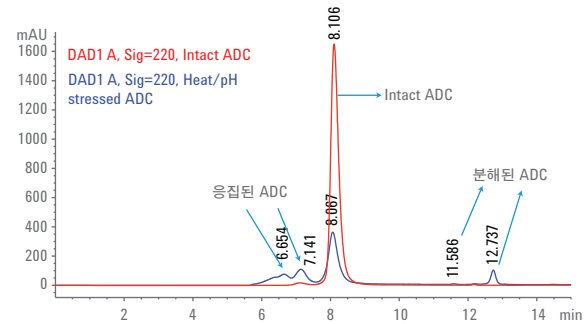
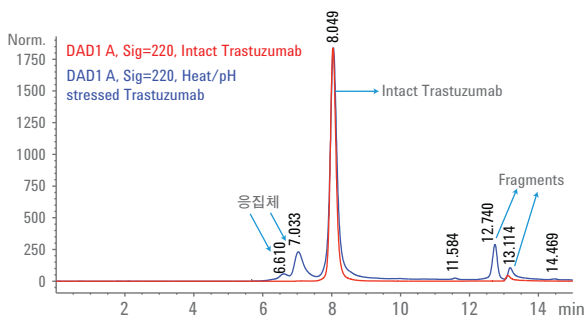
그림 13: 단백질 분리에서 서로 다른 검출기 사용의 결과

결합 단백질

치료용 단백질은 발현, 재접합, 다운스트림 공정, 제형, 멸균 및 보관과 같은 모든 개발 단계 동안에 응집되고 분해될 수 있습니다. 비록 응집체/분해물이 낮은 농도로 존재하지만, 생물학적 치료제의 품질에 큰 영향을 주기 때문에 활성 상실, 용해성 감소 및 면역원성 증가로 이어질 수 있습니다. 크기 배제 크로마토그래피는 단백질 응집을 특성화하기 위해 사용되는 표준 분석법이며 규제 기관 제출 및 승인을 위해서도 필요합니다.

약물 전달 방식을 개선하고 반감기를 증가시키고 효능을 높이기 위해 단일클론성항체 등의 단백질을 결합할 수 있습니다.

폴리에틸렌 글리콜 같은 수용성 폴리머는 단백질과 결합하여 약리 작용을 높여주며, 혈류에서의 반감기를 높여주고 면역원성을 낮추줍니다. 최근에 항체 약물 결합체(ADC)에 대한 관심이 날로 높아지고 있습니다. 여기서 단일클론성항체가 세포독성 약제와 결합되어 표적 약물을 전달하고 치료 효능을 개선합니다. 시료 특성의 변화가 SEC 분리에 더 큰 문제를 야기할 수 있기 때문에 결합 후에도 동일한 응집 시험이 필요합니다. AdvanceBio SEC와 같이 매우 낮은 비특이적 결합을 가지는 컬럼은 수용성 이동상을 이용해 항체와 ADC 모두를 분석하는 데 사용됩니다(그림 14 참조).



컬럼: AdvanceBio SEC 300Å
7.8 x 300mm, 2.7µm
장비: Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC 시스템
이동상: PBS, 150mM 염화나트륨이 포함된 50mM 인산나트륨(pH 7.4)
TCC 온도: 실온

주입량: 10µL
유속: 0.8mL/분
검출기: UV, 220nm

그림 14: mAb와 보다 소수성 강한 ADC에 대해 동일한 수용성 이동상이 사용되었습니다

성공적인 결과를 얻는 방법은

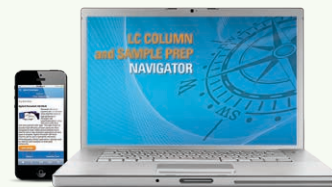
www.agilent.com/chem/navigator

에서 확인하실 수 있습니다

풍부한 바이오 컬럼 및 소분자 컬럼을 구비한 Agilent LC 컬럼 및 시료 전처리 NAVIGATOR는 응용 분야에 적절한 컬럼을 선택하는 데 도움을 드립니다.

NAVIGATOR는 4개의 간단한 검색 옵션을 제공합니다.

- 부품 번호 기준 검색, LC 컬럼과 시료 전처리 제품을 교차 참조하여 최적의 애질런트 교체품을 찾습니다



- 화합물 기준 검색(드롭다운 목록 사용)
- USP 분석법 기준 검색
- 컬럼 기준 검색(분석법에 기초한 권장 사항 이용)

시료 전처리

- 이상적인 경우, 시료는 이동상에 용해되어야 합니다.
- 시료가 혼탁할 경우, 이동상 조건을 변경할 필요가 생길 수 있습니다.
- 시료를 맑게 하기 위해 필터링 또는 원심분리를 사용할 수 있지만, 이러한 과정은 시료의 분자량 조성을 바꿀 수 있습니다.
- 시료 분해하기 위해 때때로 가열, 혼합 또는 초음파 처리를 적당히 사용할 수 있지만, 이는 분자량 조성을 바꿀 수 있기 때문에 주의를 기울여야 합니다.
- 또한 보관 중 시료가 변질되지 않도록 주의를 기울여야 합니다.
- 시료는 새로 준비해야 하며, 가능한 신속하게 분석해야 합니다.
- 완충액에서는 세균 성장이 빨라질 수 있습니다.
- 고농도의 시료는 시간에 따라 변할 수 있어 응집이나 심지어 침전이 일어납니다.



컬럼 선택

- 시료 무결성을 보장하기 위해 긴 컬럼을 사용하여 천천히 SEC 분리를 실행합니다.
- 컬럼 길이는 보통 250 또는 300mm입니다.
- 정상 유속은 7.5 또는 7.8mm ID 컬럼에서 1.0mL/분이며, 4.6mm ID 컬럼에서는 0.35mL/분입니다.
- 바이오폴리머 분리일 경우, 일반적으로 여러 컬럼을 사용하여 분리능을 개선합니다.
- 단백질 분리의 경우, 작은 미립자를 사용하여 분리능을 개선합니다.
- 작은 미립자로 150mm 컬럼에서 분리를 수행하면 분석 시간을 단축할 수 있습니다.

컬럼 미디어 선택

- 분석물질과 컬럼 미디어 사이에 비특이적 상호작용이 없어야 합니다.
- 펩타이드 및 단백질 분석을 위해 실리카 기반 흡착제가 사용됩니다.
- 바이오폴리머 분석을 위해 폴리머 기반 흡착제가 사용됩니다.



컬럼 매개 변수

- **Pore 크기**—시료의 분자량 범위에 의해 결정되며, 시료 성분의 배제를 방지하고 필요한 분리 영역에서 부피를 극대화합니다.
- **미립자 크기**—높은 분해능을 위해 작은 미립자를 사용합니다(하지만 역압은 높음).
- **컬럼 길이**—분리능과 분석 시간 사이에서 절충합니다.
- **컬럼 ID**—용매 소모를 줄이고 주입량을 낮추기 위해 더 작은 컬럼을 사용합니다.

이동상

- 이동상은 이온 상호작용을 방지하기 위해 완충액/염을 포함해야 하지만 너무 많으면 소수성 상호작용을 일으킬 수 있습니다.
- 분해/응집 등을 방지하기 위해 분석물질을 변화시키지 마십시오.
- 실온에서 보관된 희석 완충액에서는 세균 증식이 빨라지기 때문에, 필요시 이동상을 새로 만들고 만든 즉시 사용하십시오.
- 완충액 보관 기간은 냉장하지 않을 경우 7일 미만입니다.
- 물(가능성 낮음) 또는 완충액 염에서(가능성 높음) 미립자를 제거하기 위해 사용 전에 필터링합니다.
- 실리카 컬럼에서 높은 pH의 인산염 완충액(특히 고온에서)을 사용할 경우 컬럼 수명을 크게 단축합니다.

SEC용 애질런트 바이오 컬럼에 대한 자세한 내용은 www.agilent.com/chem/bioHPLC에서 확인하실 수 있습니다.

성공적인 결과를 얻기 위한 협력

난이도가 증가할 수록 더 적절한 해답이 필요합니다. 애질런트 솔루션은 바이오 의약품 과학자들의 질병 연구에 대한 혁신에 도움을 드리고 약물 발견을 가속화하며 약물 개발 및 제조 전반 과정의 신뢰성을 더 한층 개선합니다.

바이오 의약품에 대한 애질런트 솔루션의 자세한 내용은

www.agilent.com/chem/togetherbiopharma에서 확인하실 수 있습니다.

추가 정보

www.agilent.com/chem/BioHPLC

국가별 애질런트 고객 센터 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

이 발행물은 연구용으로만 사용하십시오.
이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.
애질런트 테크놀로지스는 이 발간물에 포함된 오류나, 이 발간물의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2015

한국에서 인쇄, 2015년 11월 1일

5991-3651K0

서울 강남구 역삼로 542 신사제2빌딩 2층 우)06187

한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부

고객지원센터 080-004-5090

www.agilent.co.kr



Agilent Technologies