크로마토그래피의 원리와 분석법

SEC(GPC)의 원리와 분석법

Soonchunhyang University

Department of Chemical Engineering

Prof. Jungkyun Im

순천향대학교

순천향대

나노화학공학과

임 정 균 교수

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 정의

Size exclusion chromatography(SEC)는 사이즈 배제 크로마토그래피라고 부르며 분자체 크로마토그래피라고도 한다.

3차원적인 그물눈 구조를 한 겔 내부로 침투할 수 있는가 여부에 따라 크기가 다른 분자가 분리되며, 보통 분자량이 큰 것이 먼저 용출한다.

이동상(mobile phase)으로서 수계(acqueous) 용매를 사용하는 것을 겔 여과(gel-filtration chromatography, GFC), 유기(organic) 용매를 사용하는 것을 겔 침투 크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)라 한다.

SEC 장치

분자량: characterization 기술들

M_n

- techniques related to colligative properties (dependence on the number of molecules)
  - membrane osmometry (> 25 000 g/mol)
  - vapor pressure osmometry (< 25 000 g/mol)
- mass spectrometry
  - electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS)
  - matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)
- size exclusion chromatography

M_w

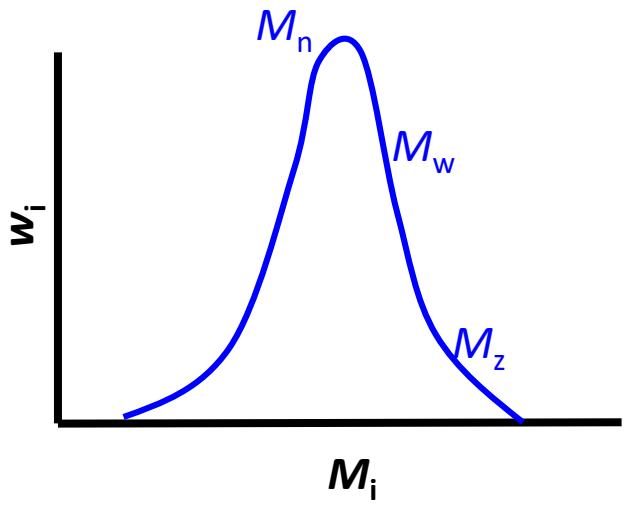
- static laser light scattering
- analytical ultracentrifuge
- size exclusion chromatography

M_z

- static laser light scattering
- analytical ultracentrifuge
- size exclusion chromatography

M_η

- viscometry
- size exclusion chromatography



Size Exclusion Chromatography (SEC)의 배경

Background

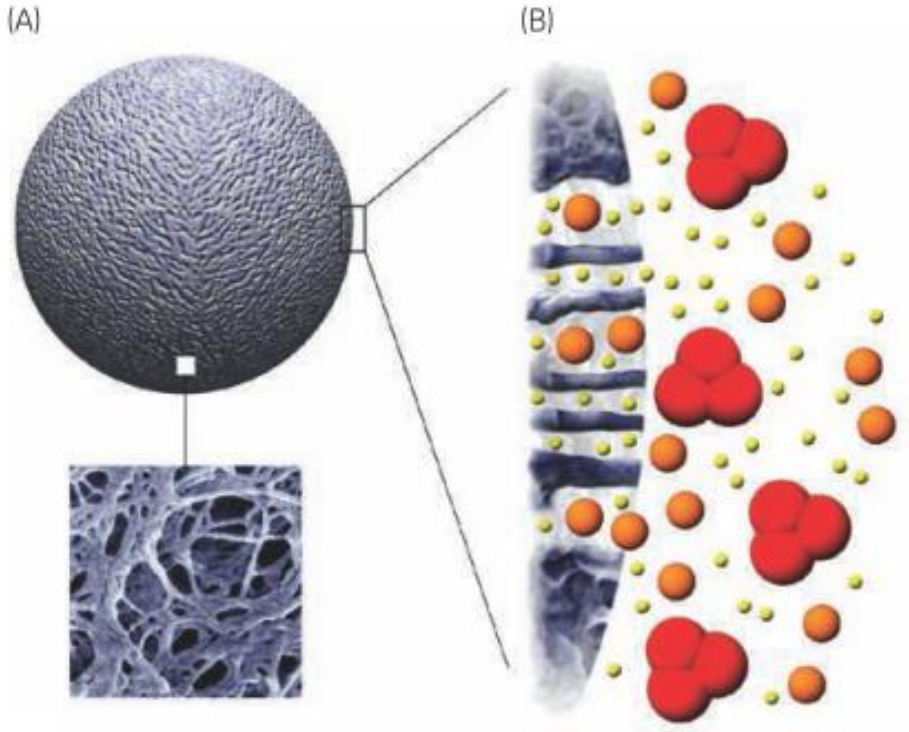
- SEC는 주로 물질의 정성분석과 semi-preparative purification에 주로 쓰인다.

- SEC는 많은 양의 샘플의 분석이나 정제에 쓰이지는 못한다. Column에 loading할 수 있는 양의 한계가 있다.

- Tosoh Corporation (Toyo Soda)가 1973년에 처음으로 SEC를 소개하였고 그 후 새로운 형태의 column을 개발하여 출시하였다.

- 주로 단백질, 펩타이드와 같은 거대생체분자(macro biomolecule)와 상업적인 고분자, 레진의 분석 및 정제에 쓰인다.

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 원리

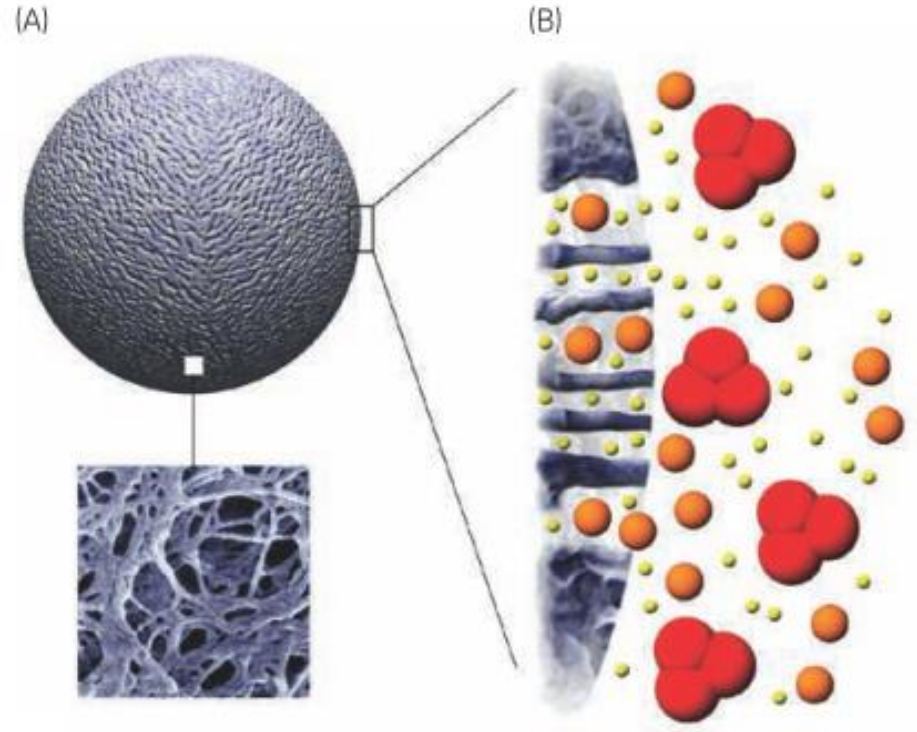


SEC 미디어는 다공성 입자로 이루어져있으며, 입자는 소재는 물리적, 화학적으로 안정하며 반응성이 없다.

다공성 입자의 종류와 재료는 다음과 같다.

1. dextran polymer(Sephadex), 2. agarose(Sepharose), 3. polyacrylamide (Sephacryl or BioGel P)

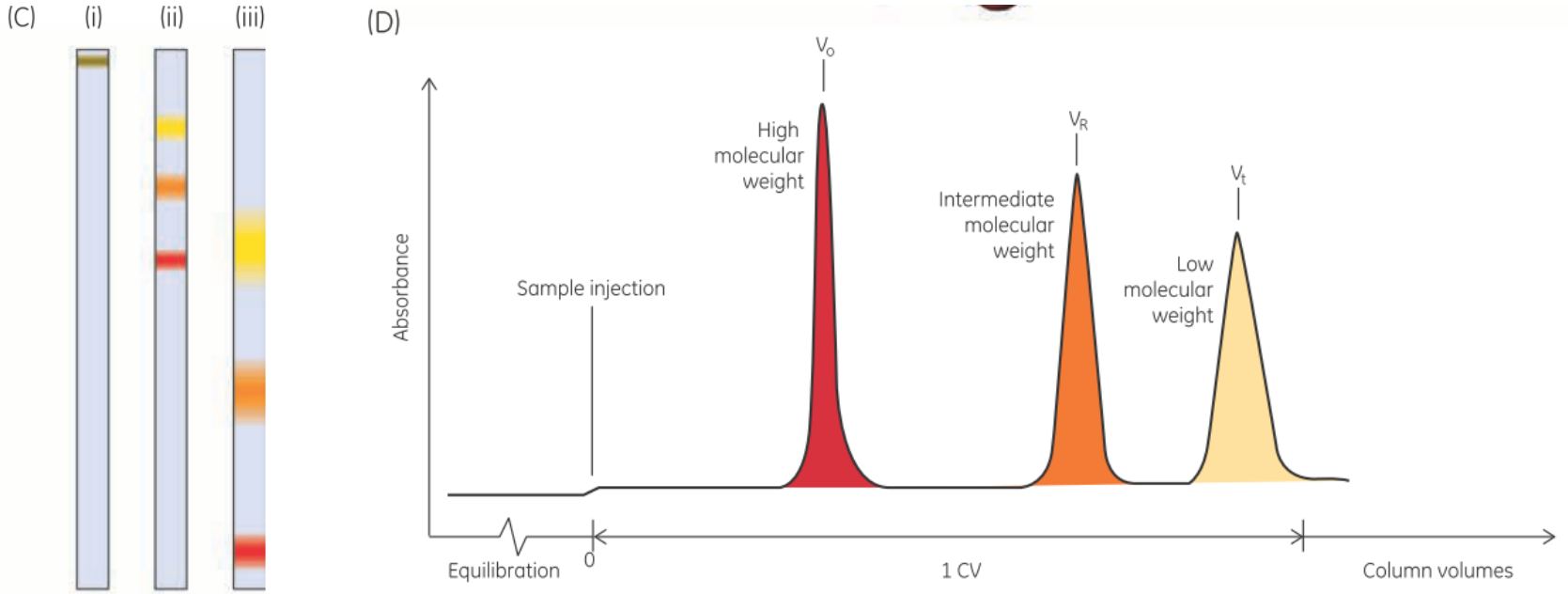
Size Exclusion Chromatography (SEC)의 원리



미디어는 buffer용액으로 채워져 있으며 고정상인 다공성 입자와 이동상인 buffer용액은 평형상태에 놓여져 있다.

SEC를 이용하면 분자는 용액 내 분자 크기에 비례하여 제일 큰 것부터 작은 것까지 차례로 분리됩니다.

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 원리



큰 분자는 충진 베드에서 배제되어 틈새 부피(void volume)에서 제일 먼저 용출됩니다.

작은 분자는 크기에 따라 각기 다른 정도로 pore에 스며들며, 분자 크기가 작을수록 pore 구조에 더 깊게 확산되어 더 늦게 용리됩니다.

따라서 분자량에 따라서 용출되는 시간이 달라지고 분자량이 큰 물질이 가장 먼저 용출된다.

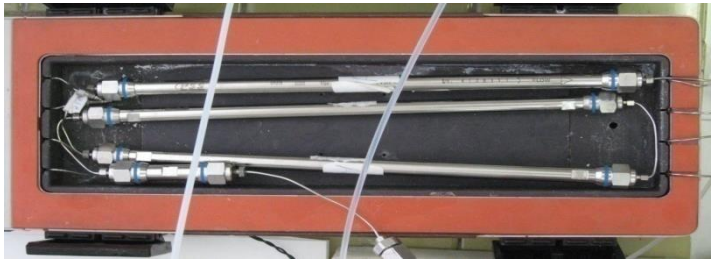
Size Exclusion Chromatography (SEC)의 기기 구성

Injection of polymer of unknown molecular weight characteristics

Pump

eluent

Commercial columns of defined characteristics for column packing: **diameter, exclusion limit, pore-size distribution**

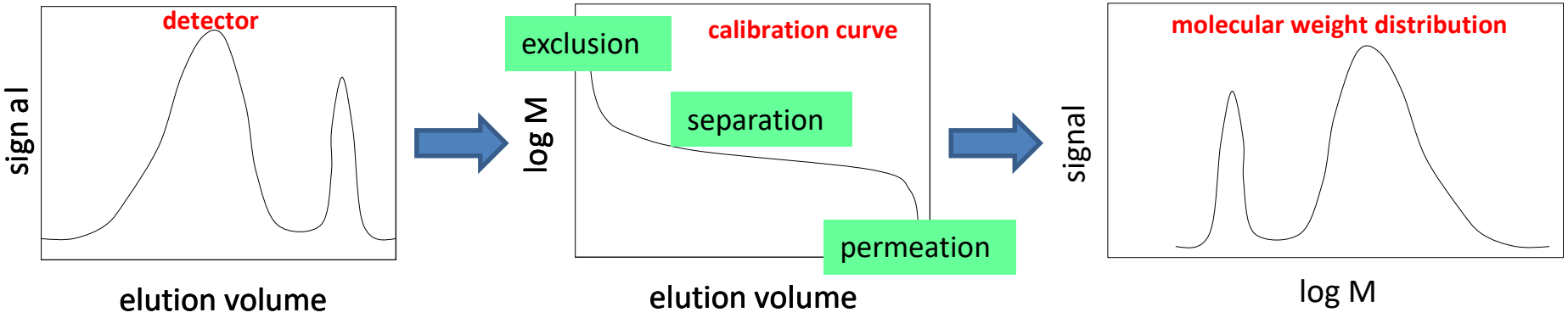


Detector

signal = *f*(elution volume)

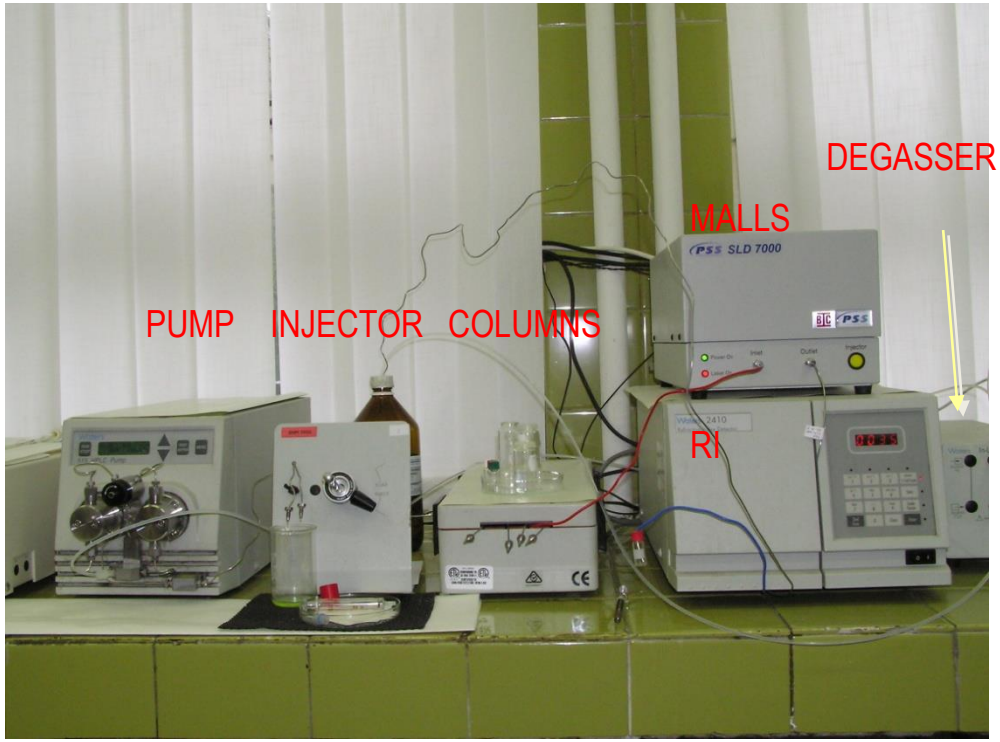
calibration curve with standards: ***elution volume = f(MW)***

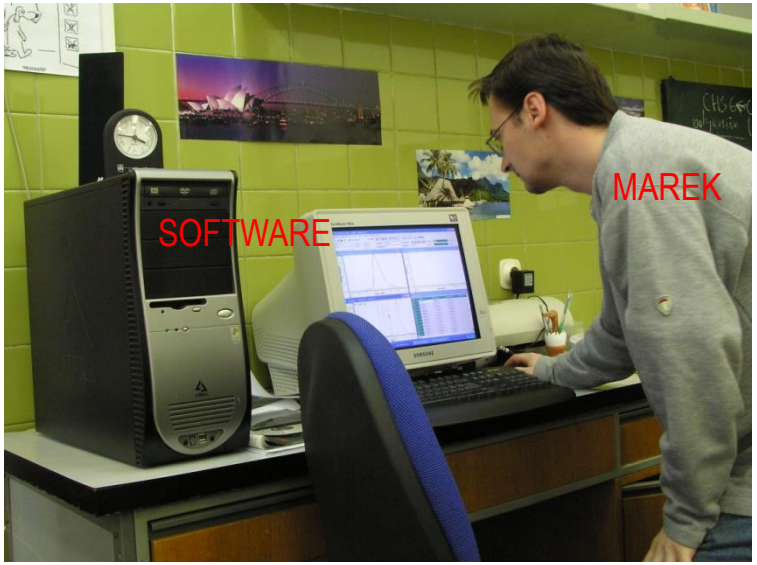
molecular weight characteristics (MWD, M_w, M_n) of polymer

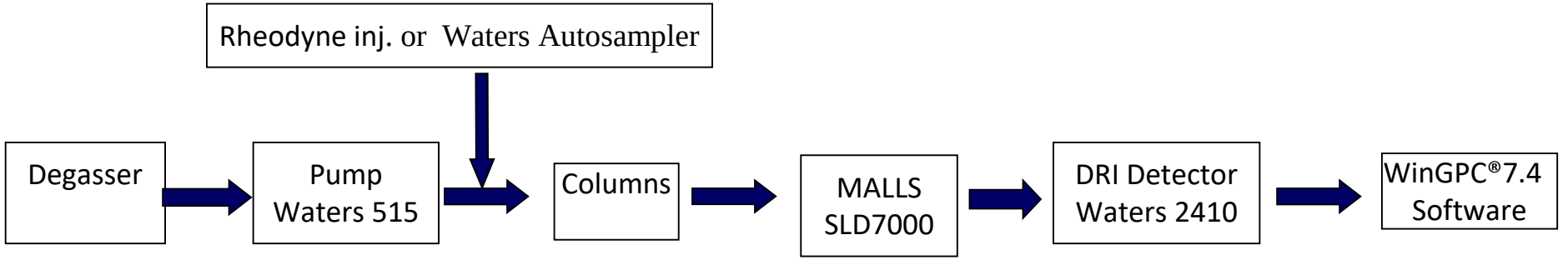


$$GPC\ signal = w(\log M) = \ln(10)\, M\ f_w(M) = \ln(10)\, M^2\ f_n(M)$$

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 기기 구성







Size Exclusion Chromatography (SEC)의 컬럼들

Product	pH stability	Particle size
Superdex Peptide	Long term: 1-14 Short term: 1-14	13-15 µm
Superdex 75	Long term: 3-12 Short term: 1-14	13-15 µm
Superdex 200	Long term: 3-12 Short term: 1-14	13-15 µm
Superdex 30 prep grade	Long term: 3-12 Short term: 1-14	22-44 µm
Superdex 75 prep grade	Long term: 3-12 Short term: 1-14	22-44 µm
Superdex 200 prep grade	Long term: 3-12 Short term: 1-14	22-44 µm

Superdex 200 - the molecular weight of the protein of interest is unknown
Superdex 200 or Superdex 200 prep grade - especially suitable for the separation of monoclonal antibodies from dimers and from contaminants of lower molecular weight

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 컬럼들

컬럼의 직경에 따른 분류

7.5–8mm for analytical columns
22–25mm for (semi)preparative columns; usual column lengths are 25, 30, 50, and 60 cm

The packings are based on either porous silica or semirigid (highly crosslinked) organic gels, in most cases copolymers of styrene and divinylbenzene

TSKgel GFC columns for protein analysis (TSKgel SW-type columns are silica-based)

125Å pore size: 작은 단백질이나 펩타이드의 분석용
250Å pore size: 대부분의 단백질 분석에 적합함
450Å pore size: 사이즈가 큰 단백질 및 핵산의 분석용

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 예

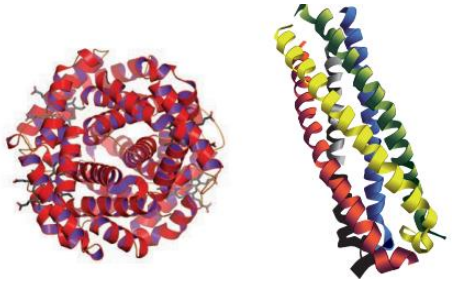


그림. compact 단백질과 cylindrical type의 단백질 size의 차이

보통 분자량이 큰 분자가 먼저 용출되나, 진정한 SEC분리 메커니즘은 용액 내 크기에 기초한다.

분자량이 비슷하여도 단백질의 종류에 따라 compact모양의 단백질도 있고, 원통형 단백질도 존재하므로, 수력학적 반경(hydrohynamic radius)이 상대적으로 큰 원통형 단백질이 더 일찍 용출될 수 있다.

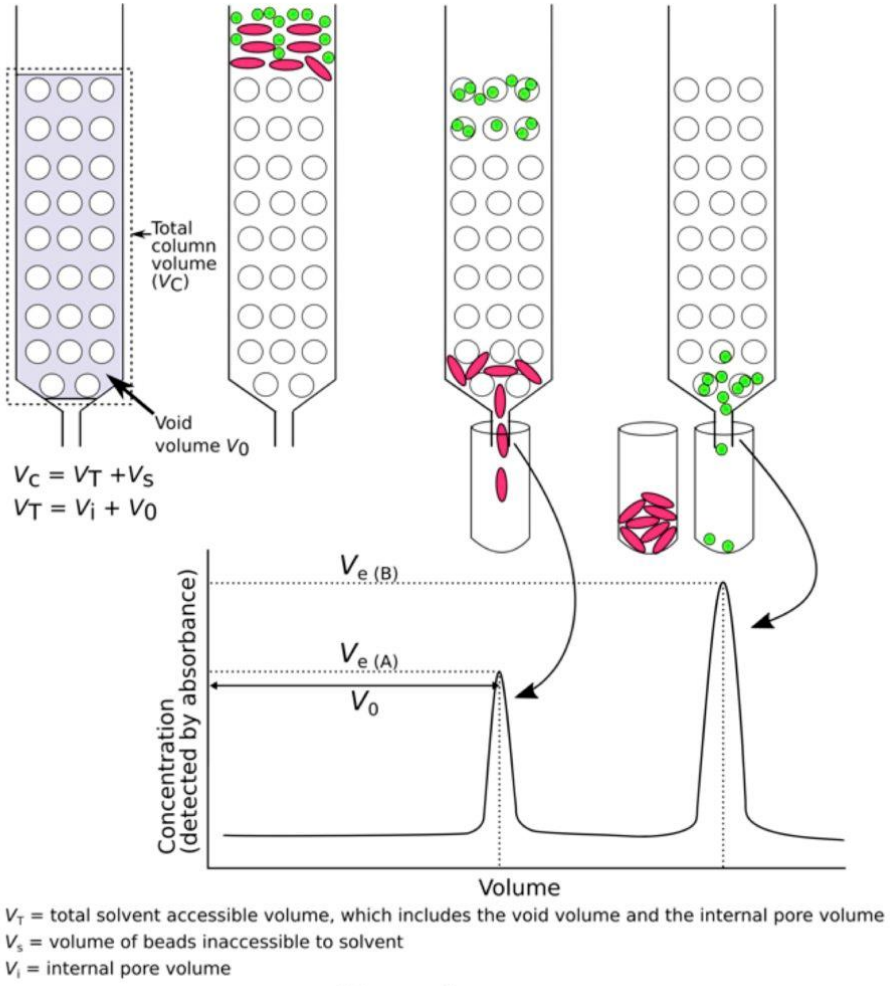
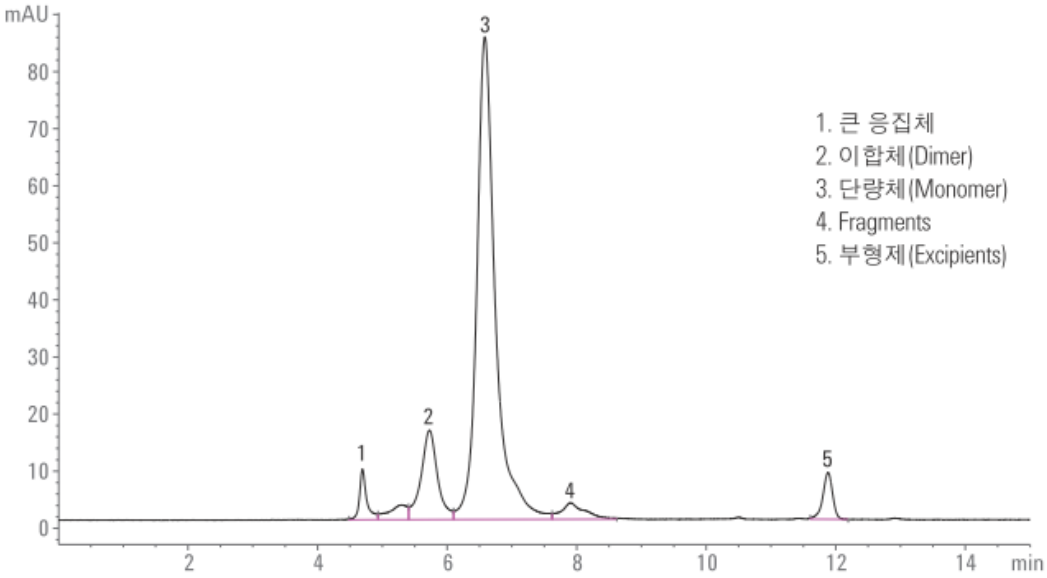


Figure 1

선형과 compact단백질의 용출의 속도의 차이

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 예



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

위 그림과 같이 동일한 단백질에서 응집체의 종류(dimer, trimer, tetramer등)에 따라서도 용출속도가 달라진다.

치료용 단백질에서 응집은 효능과 저장 수명에 영향을 미치며, 심지어 심각한 면역 원성 반응을 보일 수 있기 때문에 이를 이해하고 제어할 수 있어야 한다.

특정 조건(pH, buffer, 온도)에서 단백질의 응집형성 정도를 정성적, 정량적으로 분석 할 수 있다.

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 장점

Advantages

이온교환 크로마토그래피나 **affinity** 크로마토그래피와 다르게, 분석물질들이 고정상과 결합을 하지 않아서 버퍼의 조성을 자유롭게 해도 된다.

SEC는 생체분자의 분석에 매우 적절하며 단백질의 종류에 따라 **pH,** 농도, 금속 이온의 여부, **co-factor,** 기타 조건들을 맞춰줄 수 있다.

다른 종류의 크로마토그래피 또는 다른 분석 후에 바로 연결하여 **SEC**를 수행 할 수 있다. 이 때 용출액의 조건을 변경할 필요가 없다.

차후 생체분자의 정제, 분석, 저장 등의 조건에 맞추어 **SEC**수행시 분석조건이나 용매의 조건을 적절하게 바꿀 수 있다.

분석샘플과 고정상 간에 어떠한 상호작용도 없기 때문에 샘플의 손실도 없다.

Size Exclusion Chromatography (SEC)의 한계점

Disadvantages

다른 크로마토그래피 분석법 보다 **SEC**는 분리능이 매우 낮다. 분리를 위한 최후의 수단으로 **SEC**를 사용해야한다.

Pore size와 분리 가능한 분자량의 상관관계가 뚜렷하지가 않아서, 실험을 하며 물질의 분리 조건 등을 가늠해야한다.

용출되는 속도나 순서에 따라서 분자량을 가늠하기가 어렵다.

SEC수행시 이동상의 **flow**나 분자들이 다공성입자를 통과하면서 **fluctuation**이 생길 수가 있다. 이럴 경우 크로마토그램에서 **broad band**를 얻게 된다. **Band**의 **overlap**도 심한 편이다.

The End.