

컬럼 효율성 평가 (Column Efficiency Test)

컬럼을 사용하는데 가장 중요한 것은 얼마나 균질하게 레진을 충전하느냐라는 준비단계와 얼마나 내가 원하는 물질을 효율적으로 분리할 수 있는 조건을 찾느냐하는 부분을 이해해야 합니다. 먼저, 팩킹의 균질성은 혼합물의 분리능과 직접적으로 연결이 되기 때문에 목적에 맞는 크로마토그래피를 하기 위해서는 컬럼의 디자인에 맞추어서 적절한 방법을 사용하여 레진을 균질하게 팩킹을 해야 하고 이에 대한 평가가 필요합니다. Column Theory part 에서는 컬럼이 제대로 팩킹이 되었는지에 대한 평가를 하기 위한 Column Efficiency 를 살펴보겠습니다. 그리고 팩킹이 제대로 된 뒤, 실제 실험조건에서 어떻게 물질이 분리되는지에 대한 조건을 살펴보는 DBC의 측정법을 알아보도록 하겠습니다.

컬럼을 이용한 크로마토그래피는 물질의 정제를 위해 널리 사용되는 방법으로 정제 공정과 물질의 품질에 대한 재연성과 안전성을 평가하기 위해서는 컬럼이 제대로 충전되었는 지 살펴보는 것이 중요한 요인으로 작용합니다. 이를 위해서는 적절한 추적물질을 사용하여 물질의 분포에 대한 커브를 분석하여 팩킹된 지지체의 성능평가를 진행하게 되며, 이는 정제된 물질의 품질이나 수율에 대한 예상지표는 될 수 없지만, 정제공정을 시작하기 전 컬럼과 시스템의 적정성을 평가하는 방법으로 사용될 수 있습니다. 이 중에서도 가장 대표적으로 사용하는 방법은 pulse function test 로 추적물질을 최대한 컬럼의 입구에 가깝게 주입한 뒤, 컬럼의 출구 쪽에서 추적물질의 pulse 가 크로마토그래피 커브로 나타나는 것을 분석하게 됩니다. 즉, 컬럼 효율성은 컬럼 내에 이론적인 단이 존재한다는 가정 하에, 피크 넓어짐 현상은 평형단계에서의 단수(N) 또는 환원단높이(h)로 평가하고, 피크의 대칭성은 비대칭비율 (A_s)로 평가하게 되며, 이를 수식적으로 구하는 방법은 아래 (그림 1 및 식) 와 같습니다.

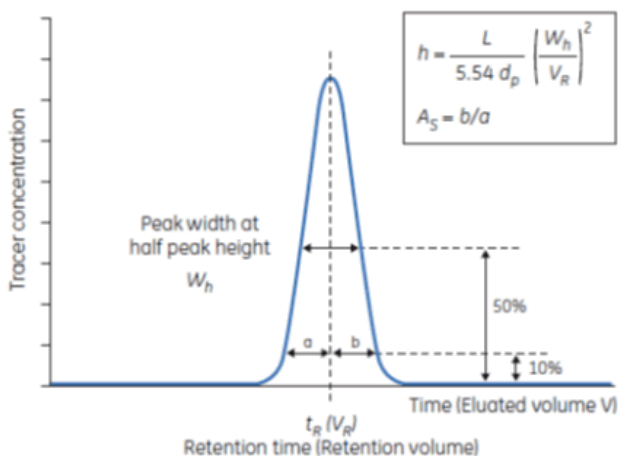


그림 1. 컬럼 평가 그래프 및 평가수식

즉, 이론단수는 컬럼의 용출부피 (V_R)값과 추적물질의 용출비피 (W_h)를 가지고 수식적으로 구하게 되는 데, 각 단의 높이 (HETP)의 경우는 컬럼의 길이를 컬럼 내의 단수로 나누어서 구하게 되며, 각 충전재의 높이 (dp)로 단의 높이를 나누어주면 각 단의 환원단높이 (h)를 구할 수도 있습니다. 비대칭비율 A_s 는 기본선에서 10% 위에서의 피크의 앞뒤 길이의 비율 (b/a)로 나타내는 데 이는 팩킹된 지지체의 불규칙성 자체뿐 아니라 외부시스템의 튜브에서의 옳지 않은 흐름이나 지지체 외부에 공기나 이물이 끼어있거나 분배시스템이나 망이 막혀있을 때에도 영향을 받게 됩니다.

$$N = \frac{\mu_f^2}{\sigma^2} \approx 5.54 \left(\frac{V_R}{W_h} \right)^2$$

$$HETP = \frac{L}{N}$$

일반적으로 환원단높이 (h)의 경우는 3 보다 작은 값을 추천하지만 평가시 사용된 시스템이 부적절하거나 적용되는 경우의 상황에 따라서 이에 대한 편차는 허용될 수 있습니다. 때로는 레진의 사이즈에 따라서 1m 길이 안의 컬럼단수 (N/m)을 이용하여 효율성 기준을 정하기도 합니다. 비대칭비율 (A_s)의 경우에는 일반적으로 0.8-1.8 사이의 값이 추천됩니다.

하지만 이러한 값이 유효성을 가지기 위해서는 적절한 요소를 사용한 평가테스트가 진행이 되어야 합니다. 특히, 추적물질의 경우에는 충전재와 반응하지 않고 안정한 물질을 사용하여야 합니다. 일반적으로 UV 를 이용한 검출을 위해서는 물에 희석한 1-2% 아세톤을 추적물질로 사용하며(표 1), RPC 나 HIC 의 경우에는 최소 20% 에탄올에 희석한 아세톤을 사용합니다.

| Solute | Solvent | Detection |
|--------------------------|----------------------|--------------|
| 1% Acetone (in water) | Water | UV |
| 1% Acetone (in ethanol) | Ethanol | UV |
| 1% Acetone (in methanol) | Methanol | UV |
| NaCl (in water) | Water | Conductivity |
| 0.8M NaCl (in water) | 0.4M NaCl (in water) | Conductivity |

표 1. 추적 물질의 예시

또한, Conductivity 커브를 얻기 위해서는 대부분의 레진의 경우, 0.4M NaCl 을 평형버퍼로 사용한 0.8M NaCl 용액을 검체로서 사용합니다. 또한 피크넓어짐현상의 경우 아래의 Van deemter 식과 같이 유속에 많은 영향을 받으므로 평가시 주요한 요소로 작용합니다.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

where A is related to eddy dispersion
 B is related to molecular diffusion
 C is related to mass transfer resistance
 u is liquid velocity (cm/h)

레진에 대한 대표적인 평가유속은 아래 (표 2)와 같습니다.

| Particle size (µm) | Example media | Velocity (cm/h) |
|--------------------|---|-----------------|
| 15 | SOURCE™ 15 | 60 |
| 30 | SOURCE 30 | 60 |
| 35 | Sepharose High Performance, Superdex™ | 30 |
| 50 | Sephacryl™ | 20 |
| 75-100 | Sepharose Fast Flow, Capto™, MabSelect™ | 20 |
| 200 | Sepharose Big Beads | 10 |

표 2. 대표적 레진에 따른 평가유속

정리하자면 충전재와 반응하지 않는 적절한 추적물질을 컬럼부피의 1% 정도 주입한 뒤, 최대한 오차가 없도록 외부부피가 작은 적절한 시스템을 이용하여 가장 좋은 이론단수를 얻을 수 있는 적절한 유속을 적용하여 시험을 진행하였을 때, 이에 대한 결과로서 환원단높이(h)는 3 이하, 비대칭비율 (As)는 0.8 에서 1.8 사이의 값을 가질 때 적절한 컬럼효율성을 가진다고 평가할 수 있습니다. (표 3 참조)

HETP/d (d = the diameter of the bead)

| | |
|------------------------------|---------|
| Ideally | 1-2 dp |
| Good | 2-4 dp |
| High efficiency applications | 3-5 dp |
| Low efficiency applications | 5-10 dp |

A_s

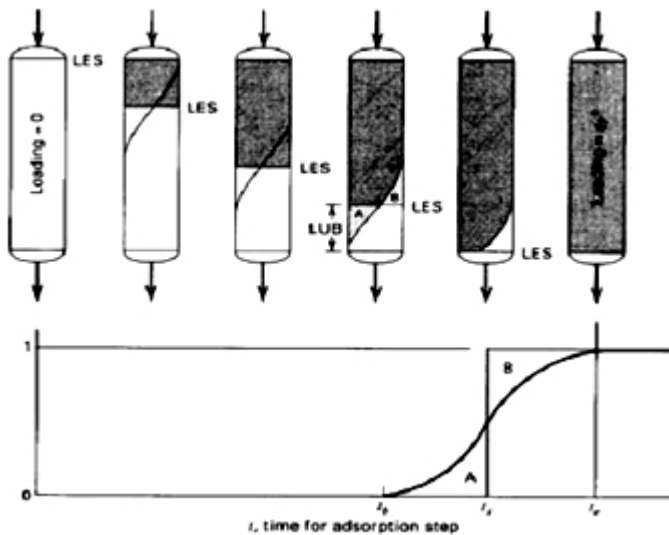
| | |
|------------------------|-----------|
| Ideally | 1.0 |
| Gel filtration columns | 0.8 - 1.2 |
| Long beds (> 30cm) | 0.8 - 1.5 |
| Short beds (≤ 30cm) | 0.8 - 1.8 |

표 3. 추천 평가 결과 예시

Dynamic Binding Capacity (DBC)는 흡착 크로마토그래피에서, 실제 실험을 진행하는 조건 하에서 일정 용량의 레진에 타겟물질이 결합할 수 있는 능력(Q)을 의미합니다. 물질과 물질 사이의 결합 능력은 온도, pH, 유속 등에 따라 평형 및 해리 상수 (K)의 변화를 가져오기 때문에 실제 공정에서 또는 공정을 키울 경우 필요한 레진의 용량을 계산하거나 컬럼 당 실험할 수 있는 검체의 로딩량을 계산하기 위해서는 어느 정도 정립 또는 적합화된 실제 실험 조건에서의 레진에서의 타겟물질의 결합 능력을 알아두는 것이 좋습니다.

레진의 동적 결합 능력을 측정하기 위해서는 1> 실제 사용하는 레진과 2> 작은 용량의 컬럼, 3> 농도를 알고 있는 충분한 양의 타겟물질, 4> 실험에 사용되는 버퍼, 5> 정제 시스템 및 6> 용출된 검체에서의 타겟물질을 측정할 수 있는 분석법을 준비해주셔야 합니다.

실험방법은 다음과 같습니다. 실제 실험 조성과 동일한 조건으로 시스템을 평형화 시켜 줍니다. 컬럼에 농도를 알고 있는 타겟물질을 로딩하면서 컬럼 후단부에서 용출되는 물질을 일정한 볼륨으로 모아줍니다. DBC 는 컬럼에 모든 타겟물질이 결합된 후 용출되기 시작하는 시점을 측정하며 일반적으로 로딩된 타겟물질의 10%의 농도가 되는 시점을 기점 (: Binding Capacity at 10% Breakthrough point)으로 잡습니다. 타겟물질가용이 어려운 경우 5%의 농도 시점을 잡기도 합니다.



타겟물질의 성질에 따라 Identity test 및 측정방법은 ELISA 나 SEC, UV 흡광도 등 시험자분께서 미리 알고계신 분석법으로 10% breakthrough point 를 잡은 뒤, 로딩한 순간에서부터 해당 기점까지의 전체 볼륨 ()을 계산하여 이를 미리 알고 있던 타겟물질의 전체 양을 계산한 뒤, 컬럼 볼륨 (CV, Vc)로 나누어주면 됩니다.

$$Q_{B,10\%} = (V_{10\%} - V_s) * C_0 / V_c$$

일반적으로 정제 시스템에서 detector 로부터 collector 까지의 시스템 볼륨 (Delay 볼륨)을 측정하여 이를 고려하여 용출된 물질을 모은 경우에는 시스템 볼륨 (Vs)를 고려하지 않고 하기와 같은 계산식으로 DBC 를 측정합니다.

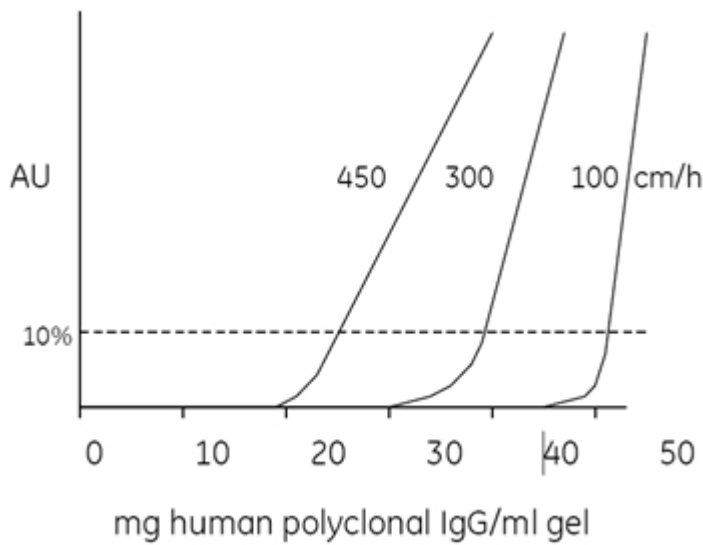
$$Q_{B, 10\%} = V_{10\%} * C_0 / V_c$$

일반적으로, DBC 는 pH 가 높을수록, 염도가 높을수록, 유속이 낮을수록 높은 값으로 측정되는 경향이 있습니다.

예> rProtein Sepharose Fast Flow 레진의 DBC curve

실험조건 : XK 16/10, 100mm bed height,

Sample: Polyclonal human IgG, 1mg/ml



이렇게 측정된 DBC 는 실제 실험에서 얼마만큼의 물질을 분리 정제할 것인지를 정하는 참고 데이터로 사용되며, 일반적으로 실제 실험 조건에서, 일반적으로 Capture 단계에서는 DBC 의 30~50%, Intermediate 단계에서는 20~30% 정도를 로딩하시는 것을 추천하고 있습니다.