

관류 크로마토그래피 (Perfusion Chromatography)

金宅濟

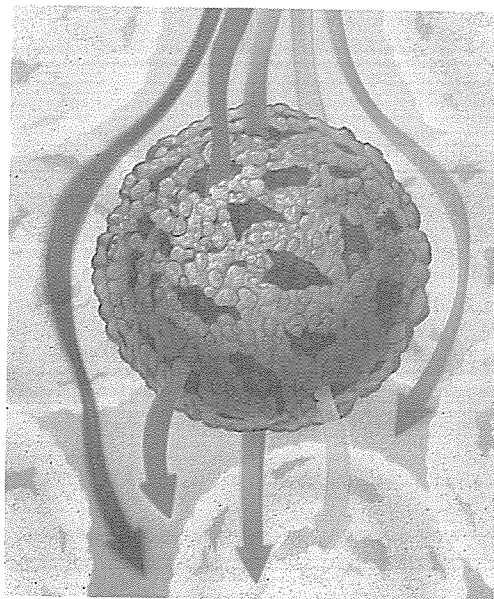
〈경기대교수·화학/분자 운영자문위원〉

관류 크로마토그래피는 1987년 MIT Bioprocess Engineering center의 Noubar Afeyan 교수와 퍼듀대학의 Fred Regnier 교수의 공동 연구에 의해 개발된 기술로서 92년에는 미국산업디자인 협회와 비즈니스 워크에서 미국의 생산품가운데 가장 뛰어난 디자인을 가진 제품에 수여하는 Industrial Design Excellence상을 수상하였다.

관류 크로마토그래피는 기존의 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)와 유사한 기술이지만 칼럼의 충전물에 있어 독특한 설계로 기존의 HPLC보다 10~1백배 정도 빠른 시간에 고해상도의 분리능을 갖는 뛰어난 기술이다. 주로 단백질, 핵산, 항원, 항체 등의 생화학적 물질들을 분리, 분취하는데 응용되어 분석에서부터 대량의 분리정제까지 가능하다.

원리

액체 크로마토그래피 분리의 가장 근본적인 목적은 시료 분자가 칼럼안



〈그림1〉 다공질내에서의 유통과정

에서 신속하고 효과적으로 노출되어 용리액으로 하여금 칼럼안에 있는 화학결합 표면에서 분리시킬 수 있도록 하는 것이다.

‘확산’을 근거로 한 기존의 액체 크로마토그래피 분리에서는 빠른 대류를 통하여 분자 물질이 칼럼내 입자의 바깥 표면을 이용하고 칼럼내 입자의 다공성의 내부에서는 확산이 일어나 단백질이나 펩티드와 같은 생체 고분자

들은 이동 속도가 느리게 된다. 다공성내 확산에 걸리는 시간이 입자 사이를 빠져 나오는 시간보다 많이 걸리면, 분리와 용량에 문제가 야기된다.

즉, 기존의 HPLC에서는 속도, 분리능과 칼럼 용량 사이에는 하나가 희생되어야 하는 문제가 발생한다.

관류 크로마토그래피는 기존의 액체 크로마토그래피의 원리에 바탕을 두면서, 단백질이나 다른 거대 생화학 물질들을 높은 분리능으로 빠른 시간에 분리할 수 있는 새로운 기술이다.

이 기술의 핵심은 PerSeptive사에 의해서 개발되어 특별히 설계된 polystyrene-divinylbenzene재질의 충전물이다.

상업적으로 다공질(POROS)로 알려져 있으며 특허로 되어 있는 이 충전물은 두가지 타입이 있는데 용액이 다공(pore)의 주위와 함께 중심부분을 통과할 수 있다. 내경이 큰 통과구멍(through pore)의 크기(6천~8천Å)

는 내경이 작은 확산구멍(diffusion pore)의 크기(8백~1천5백Å)와 상호 연결되어 있다. 용질은 통과구멍을 통해 대류에 의해서 안으로 운송되고 확산에 의해서 내경이 작은 구멍으로 움직인다.

이러한 두가지가 결합되어 시료 기질(matrix)내에서 물질의 운반이 빠른 속도로 이루어진다(그림1), 유속이 1백cm/hr가 넘어가게 되면 대류현상이 확산보다 우세해지며 결과적으로 분리능과 용량은 유속에 의해서 달라지게 된다. 이러한 다공질 칼럼을 이용해서 크로마토그래피의 분리를 하는 경우에는 높은 분리능과 큰 용량, 빠른 분석 시간이라는 세가지를 어느 하나도 희생시키지 않고 동시에 만족시킬 수 있다.

다공성 입자는 다리 걸친(cross-linked) polystyrene-divinylbenzene (PS/DVB)으로 기질을 만들어 물리적인 내구성이 강하며, pH는 1~14까지의 모든 완충용액을 사용해도 내화학성이 강한 성질을 가지고 있다. PS/DVB 기질에 다리 걸친 polyhydroxyl 표면은 내화학성이 강하며 다양한 관능기를 붙일 수 있는 기반 역할을 하기도 한다(그림2).

이렇게 만들어진 칼럼은 내물리성이나 내화학성이 강하며, 칼럼내 흡착 등의 문제가 발생하지 않고, 단백질 등을 변성시키지 않고 생리활성을 그대로 유지할 수 있도록 해준다.

기기 구성

관류 크로마토그래피의 기기 구성은(그림3)과 같고, 고성능 액체 크로마토그래피의 기기 구성과 같으나, 다만 크

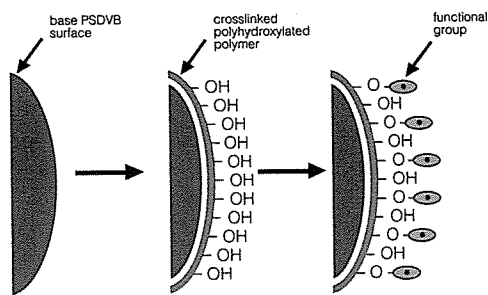
로마토그래피의 심장부라고 하는 칼럼 충전물만이 다르다. 충전물 입자는 시료와 상호결합하는 것을 막기 위하여 특허로 되어 있는 처리 과정을 이용해서 코팅한다. 이러한 코팅 과정을 이용하면 분리 도중에 분석하고자 하는 관심 성분이 결합되는 것을 막아준다.

다양한 종류의 코팅 기술이 있으며 POROS-based 칼럼에서는 역상(reversed phase), 친수성상호작용(hydrophilic interaction), 이온교환(ion-exchange), 금속친화(immobilized metal affinity), 및 생체친화(bioaffinity) 크로마토그래피의 분리 방식이 있다.

응용

다공질의 충전 칼럼은 제조(preparative)용과 일반 분석용이 있으며 제조용은 발효조 내의 묽은 용액에서 단백질을 분리, 채취하는데 이용된다. 따라서 과거에 30시간 걸리던 정제의

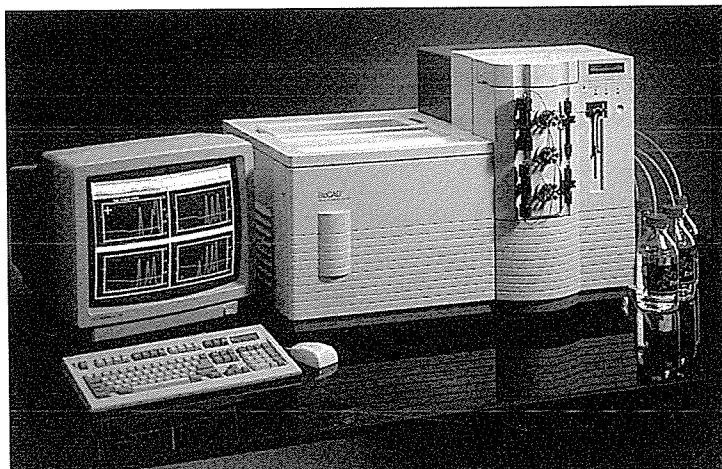
MODULAR SURFACE CHEMISTRY



〈그림2〉 충전물의 입자표면

첫번째 과정으로 발효액 4백L중의 저농도 생체 물질을 4L까지 농축시키는 과정을 1시간 이내에 수행할 수 있다.

관류 크로마토그래피 시스템은 미국 PerSeptive Biosystems사의 특허로서 BioCAD/SPRINT와 BioCAD Workstation이 있다. 미국내에서는 Eli Lilly사, Biogen사, Glaxo사, Monsanto사, Pfizer사, Upjohn사, EPA, MIT, 예일대 등 수백개의 제약 회사와 연구기관들에 설치되어 있고 국내에서는 선일포도당(연구소)에서 구입, 사용중이고, 인성하이텍(주)(TEL:644-1991, FAX:644-1996), 실험실에서 보유, 판매하고 있다(판매가격; 6만 ~ 10만달러). **ST**



〈그림3〉 바이오캐드 워크스테이션