



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0038392
(43) 공개일자 2016년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/60 (2006.01) G01N 30/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0131421
(22) 출원일자 2014년09월30일
심사청구일자 2014년09월30일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
정원조
서울특별시 서초구 신반포로 45 (반포동, 주공아파트) 102동 202호
(74) 대리인
이원희

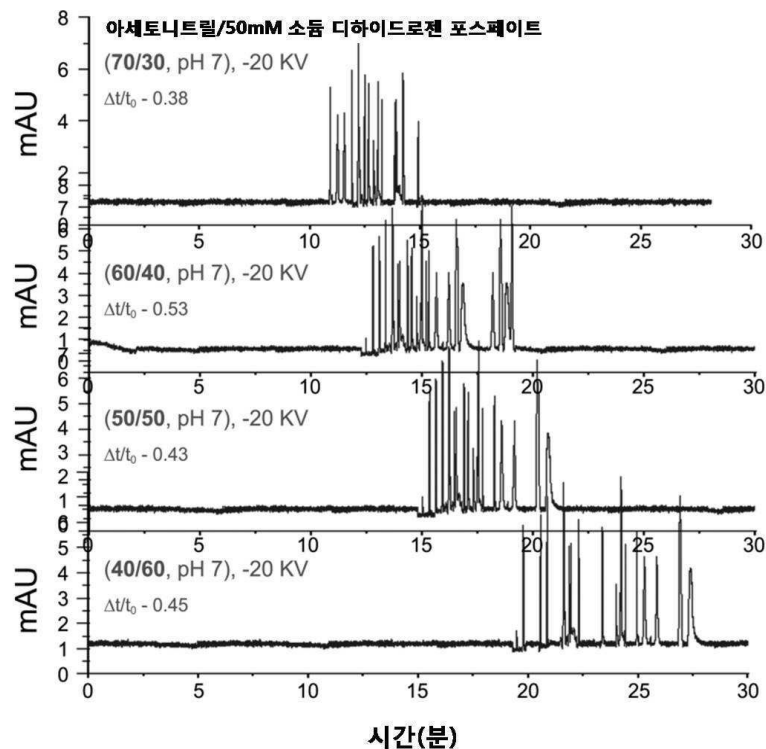
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 실리카 모세관으로 된 프로테오믹 컬럼의 제조방법 및 상기 제조방법으로 얻어진 프로테오믹 실리카 모세관 컬럼

(57) 요약

실리카 모세관 내벽에 이중결합 리간드를 부착시키는 단계(단계 1):기능성 모노머, 가교 모노머, 분자량이 4,000 내지 40,000인 기공 유도물질 및 중합개시제를 포함하는 모노머 혼합물을, 수소결합성 용매 및 비수소결합성 용매로 구성된 혼합용매에 용해시켜 중합혼합물을 제조하는 단계(단계 2);상기 단계 2에서 제조된 중합혼합물을 상(뒷면에 계속)

대표도 - 도2



기 실리카 모세관에 채우는 단계(단계 3);상기중합혼합물이 채워진 실리카 모세관의 양끝을 봉하고 가열하여 중합시키는 단계(단계 4); 및 상기 중합이 완료된 실리카 모세관 컬럼을 세척하는 단계(단계 5);를 포함하는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법을 제공한다. 또한 실리카 튜빙 내벽 표면에 적절한 동공을 지니도록 고분자 박막을 형성한 실리카 모세관 컬럼은 그 제조재현성이 뛰어나고, 프로테오믹 시료 (단백질 가수분해 산물)의 분리분석에 대하여 현재까지 모세관 전기이동 크로마토그래피(capillary electrochromatography, CEC) 분야에서 어떤 경우와 비교해서도 훨씬 우수한 분리효율을 보일 뿐만 아니라, 매우 세척이 용이한 구조의 박막을 생성함으로써, 대량생산이 가능한 새로운 고효율 프로테오믹 CEC 컬럼으로 사용될 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 48916-01

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초과학 지원사업 핵심 개인

연구과제명 초고효율 장출 CEC 및 LC 컬럼의 개발과 프로테오믹스 활용에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

실리카 모세관 내벽에 이중결합 리간드를 부착시키는 단계(단계 1):

기능성 모노머, 가교 모노머, 분자량이 4,000 내지 40,000인 기공 유도물질 및 중합개시제를 포함하는 모노머 혼합물을, 수소결합성 용매 및 비수소결합성 용매로 구성된 혼합용매에 용해시켜 중합혼합물을 제조하는 단계(단계 2);

상기 단계 2에서 제조된 중합혼합물을 상기 실리카 모세관에 채우는 단계(단계 3);

상기중합혼합물이 채워진 실리카 모세관의 양끝을 봉하고 가열하여 중합시키는 단계(단계 4); 및

상기 중합이 완료된 실리카 모세관 컬럼을 세척하는 단계(단계 5);를 포함하는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 기공 유도물질은 분자량이 4,000 내지 40,000인 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리비닐알코올, 폴리비닐아세테이트, 폴리비닐아세톤, 폴리비닐피리딘, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴로니트릴, 폴리에틸렌디아민, 폴리비닐클로라이드, 폴리카프로락탐, 폴리비닐피롤리돈 및 폴리에스터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용하는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 기능성 모노머는 아크릴산, 메타크릴산, 메틸메타크릴산, 메틸메타크릴레이트, 비닐알코올, 비닐아세테이트, 비닐아세톤, 스티렌, 4-에틸스티렌, 4-히드록시스티렌, 알릴아민, 4-아미노스티렌, 4-비닐피리딘, 2-비닐피리딘, 1-비닐이미다졸, 아크릴아미드 및 메타크릴아미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 모노머인 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 가교 모노머는 에틸렌글리콜 디메타크릴레이트, 트리메틸프로판트리아크릴레이트, 트리메틸프로판트리메타크릴레이트, 아크릴이소시아누레이트, 1,4-부탄디올디아크릴레이트, 1,4-부탄디올디메타크릴레이트, 1,6-헥산디올디아크릴레이트, 1,6-헥산디올디메타크릴레이트, 네오펜틸글리콜 디아크릴레이트, 네오펜틸글리콜 디메타크릴레이트, 디시클로펜타디에닐디아크릴레이트, 디시클로펜타디에닐디메타크릴레이트, 펜타에리스리톨 테트라아크릴레이트 및 펜타에리스리톨 테트라메타크릴레이트로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 모노머인 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 가교 모노머는 기능성 모노머 1몰당 2.0 내지 6.0 몰을 포함하는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 기공 유도물질은 기능성 모노머 1몰당 0.002 내지 0.03 몰을 포함하는 것을 특

징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 중합개시제는 기능성 모노머 1몰당 0.05 내지 0.5몰을 포함하는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 혼합용매는 비수소결합성 용매가 80 부피% 내지 95 부피%, 수소결합성 용매가 5 부피% 내지 20 부피%로 이루어지는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 단계 2의 모노머 혼합물은 혼합용매 100 중량부에 대하여 5 내지 20 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법.

청구항 10

제 1항의 제조방법에 의해 얻어지는 실리카 모세관 컬럼.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 실리카 모세관 컬럼의 내경이 20 내지 200 μm 이고, 컬럼의 길이는 25 내지 500cm이며, 컬럼의 내벽의 두께가 0.1 내지 15 μm 인 다공성 모노리트 분자각인고분자 박막이 형성되는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 컬럼은 프로테오믹스 분석용 칼럼인 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 실리카 모세관으로 된 프로테오믹 컬럼의 제조방법 및 상기 제조방법으로 얻어진 프로테오믹 실리카 모세관 컬럼에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 액체크로마토그래피(liquid chromatography)는 복잡한 혼합물로 이루어진 시료의 분리분석에 많이 사용되며, 특히 실리카 모세관을 활용하여 만드는 방법이 많은 연구의 대상이 되고 있다.

[0003] 최근 실리카 마이크로컬럼은 컬럼 전체가 프릿 기능을 동시에 가지는 모노리트형 컬럼으로 신속히 발전하고 있다. 몇 편의 총설 논문(Vissers 등, J. Chromatogr. A, 1999, 856, 117-143; Jinno 등, Trends in Analytical Chemistry, 2000, 19, 664-675; Bartle 등, J. Chromatogr. A, 2000, 892, 279-290)에 그 내용이 상세히 소개되고 있고, 또한 이에 관련된 다양한 특허도 나타나고 있다.

- [0004] 마이크로컬럼 또는 모세관 전기 크로마토그래피 컬럼용 모노리트는 무기고분자형과 유기고분자형 두 가지가 있으며, 일반적으로 모노머 혼합물과 중합촉매, 그리고 생성 고분자를 녹이지 않는 용매(porogen)를 섞어서 용액을 만들고 이를 관 안에 넣은 다음 온도를 올리는 등의 방법으로 중합을 진행시키고, 마지막으로 용매와 미반응 모노머를 씻어냄으로써 제작한다.
- [0005] 무기고분자형 모노리트는 실리카 형이 주종을 이루고 있으며(Bartle 등, J. Chromatogr. A, 2000, 892, 279-290; Tang 등, J. High Resolut. Chromatogr., 2000, 23, 73), 유기고분자형은 스티렌-디비닐벤젠(styrene-divinylbenzene)계 공중합체(Gusev 등, J. Chromatogr. A, 1999, 855, 273-290), 메타크릴레이트(methacrylate)계 공중합체(Peters 등, Anal. Chem., 1988, 70, 2296; Coufal 등, J. Chromatogr. A., 2002, 946, 99-106), 아크릴아미드(acrylamide)계 공중합체(Fujimoto 등, J. Chromatogr. A., 1995, 716, 107; Hoegger 등, J. Chromatogr. A., 2001, 914, 211-222) 등이 있다.
- [0006] 모세관 전기이동법(capillary electrophoresis, CE) 또는 모세관 전기이동 크로마토그래피(capillary electrochromatography, CEC)는 그 뛰어난 크로마토그래피 분리효율로 잘 알려져 있다. 모세관 전기이동법의 단점은 중성분자들을 분리할 수 없다는 것과 주입할 수 있는 시료의 양에 제한이 있다는 것인데, 이러한 문제점들은 정지상을 도입하는 방법(모세관 전기이동 크로마토그래피)에 의하여 극복되었다. 그러므로 모세관 전기이동 크로마토그래피는 고성능 액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatograph, HPLC)의 용질분배 기능과 모세관 전기이동법의 높은 분리효율을 결합시킨 유망한 방법이다.
- [0007] 분자각인고분자(molecule imprinted polymer, MIP) 기술은 3차원적인 가교고분자로 구성된 유기모노리트 골조에 기공 유도물질(각인분자)를 삽입시키는 기술이다. 즉 기공 유도물질을 기능성모노머, 가교모노머, 중합개시제로 이루어진 모노머 혼합물과 함께 중합용매에 녹여 가열하면 모노리트 구조의 고분자가 생성되는데, 추후 기공 유도물질을 세척하여 제거하면 이 고분자는 그 기공 유도물질의 빈 공간을 영구적으로 내포하게 된다.
- [0008] 분자각인 고분자의 분자인식 능력은 고성능 액체크로마토그래피와 모세관 전기이동 크로마토그래피 분야에서 널리 활용되고 있다. 분자각인 고분자 - 모세관 전기이동 크로마토그래피(MIP-CEC)의 다양한 기술은 몇 개의 총설 논문(P. Spiegel 등, Electrophoresis 2003, 24, 3892; C. Liu 등, Electrophoresis 2004, 25, 3997; Z. Liu, 등, Electrophoresis 2007, 28, 127)에 잘 소개되어 있다.
- [0009] 특히 열린구조형(open tubular, OT) 분자각인 고분자 - 모세관 전기이동 크로마토그래피(OT MIP-CEC)가 낮은 컬럼 압력과 안정한 전기삼투흐름(electroosmotic flow) 등의 장점으로 인하여 관심을 받고 있다. OT MIP-CEC는 Bruggermann 등의 연구(O. Bruggermann 등, J. Chromatogr. A 1997, 781, 43)에서 처음 소개되었으며, 그 후에도 몇몇 연구(Z.J. Tan 등, Electrophoresis 1998, 19, 2055; L. Schweitz 등, Anal. Chem. 2002, 74, 1192; Y. Huang 등, Electrophoresis, 2004, 25, 554-561)에서 명맥을 유지해왔다.
- [0010] 그러나 분자각인 고분자 기술을 고분자 내 동공(pore)을 생성하려는 목적으로 사용한 경우는 아직 보고되고 있지 않았다.
- [0011] 프로테오믹스는 단백질의 발현, 단백질 기능 및 변이, 단백질의 구조, 그리고 단백질 간 상호작용 등을 분석하여 복잡한 생물학적 시스템을 연구하는 학문으로서, 단백질의 구조 분석이 그 주요 연구 수단이 된다.
- [0012] 전통적 프로테오믹스 전략은 세포별 또는 세포내 소기관 별로 분별해 모으기, 고체상 추출 등을 거쳐 단백질 농축하기, 이차원 폴리아미드 겔 전기영동 (2-dimensional polyamide gel electrophoresis, 2-D PAGE)으로 평면 상에 점군으로 분리하기, 그리고 각 점군에 대하여 MALDI-TOF MS 또는 LC-MS-MS로 분석하기 등의 단계를 거치게 된다.
- [0013] 프로테오믹 분석에는 크게 하향식 (top-down) 과 상향식 (bottom-up 또는 shot gun)의 두 가지 방법이 있다. 하

향식은 원 단백질 또는 큰 단백질 조각들에 대한 질량분석법의 분석을 행하는 것이고, 상향식은 단백질 시료를 소화시켜 생성되는 펩티드를 LC-MS 또는 LC-MS-MS 등으로 분석하는 것이다.

- [0014] 액체크로마토그래피는 하향식 프로테오믹스에서 시료 준비나 성분별 분할 업무에서 중요하게 쓰이고, 또 상향식 프로테오믹스에서도 소화된 생성 펩티드들의 분리분석에 강력한 수단으로 쓰이기 때문에, 매우 결정적인 역할을 담당 해왔다.
- [0015] 또한 액체크로마토그래피에서 더 좋은 분리성능을 얻으려는 것은 오래 지속되어온 요구 사항으로써, 전형적으로 입자크기 3 마이크론의 C_{18} 정지상으로 충전된 마이크로 또는 나노 컬럼은 상당히 우수한 분리성능을 보여주긴 하지만, 컬럼에 걸리는 높은 압력으로 인하여 컬럼 길이가 대개 20cm 이하로 제한되기 때문에, 컬럼 전체의 분리효율(이론단수)은 그다지 높지 못하였다.
- [0016] 컬럼의 분리효율을 높이는 한 가지 방법으로는, 컬럼의 길이를 연장하는 것이다. 이는, 컬럼의 압력도 증가하기 때문에 열린 구조형 컬럼을 만드는 것이 유력한 방법이다. 실제로 이러한 포맷의 LC 컬럼이 개발되어 기울기 용리 형태로 질량분석기에 연결되어 프로테오믹스 연구에 활용되었다.
- [0017] 내경이 10 마이크론 정도이고, 길이가 3-5 미터 정도 되는 다공성막 열린구조형 (porous layer open tubular) 컬럼이 사용되어왔으나, 열린구조형 컬럼을 쓸 때 내경에 걸쳐 나타나는 포물선형 유속 분포 때문에 유발되는 떠나비 넓힘을 최소화하기 위하여 그와 같은 좁은 내경의 컬럼이 필요하였다. 이러한 컬럼의 실용적인 유용성은 의심을 받고 있는데, 컬럼의 제조나 사용 시에 컬럼이 막혀서 못쓰게 될 위험이 너무 크기 때문이다.
- [0018] 상기한 문제를 해결하기 위하여 모세관 전기이동 크로마토그래피(CEC)가 LC 대신 사용될 수 있다. 이 경우에는 모세관 내경에 걸쳐 균일 유속 분포를 보이기 때문에, 더 내경이 넓고 (50 마이크론 정도) 길이가 짧은 (50cm 정도) 컬럼으로도 좋은 분리효율을 얻을 수 있으며, 컬럼 제조나 사용 시에 컬럼이 막히는 문제도 해결할 수 있다. 프로테오믹 분석에 있어서 CEC의 사용은 꾸준히 늘고 있으며, 이에 대한 몇 편의 총설 논문도 출판되었다 (Ka 등, Electrophoresis 2012, 33, 48-73; El Rassi 등, Electrophoresis 2010, 31, 174-191; Nilsson 등, Electrophoresis 2011, 32, 1141-1147; Sun 등, Proteomics 2014, 14, 622-628.)
- [0019] 프로테오믹 분석에서 최고수준의 분리효율은 열린 구조형 모세관 전기 크로마토그래피(open tubular capillary electrochromatography, OT-CEC)에서 얻어졌다.(Karenga 등, J. Sep. Sci. 2008, 31, 2677-2685).
- [0020] 한편, 열린 구조형 정지상을 제조하는데 따르는 기술이 보편적으로 확립되지 않아서 현재 OT-CEC 방법이 많이 사용되고 있지는 못하다.
- [0021] 또한 본 발명자가 속한 연구실에서는 분자각인고분자 기술을 이용하여 OT-CEC 컬럼을 만드는 안정적인 기술을 개발하였고 이를 기공 유도물질의 이성체 분리에 활용하여 매우 분리효율이 높은 결과를 얻었으며, (Zaidi 등, J. Chromatogr. A, 2009, 1216, 2947-2952; Zaidi 등, Electrophoresis 2009, 30, 1603-1607; Zaidi 등, Electrophoresis 2010, 31, 1019-1028; Zaidi 등, J. Chromatogr. A, 2011, 1218, 1291-1299), 이에 대한 기술도 대한민국 등록특허 10-1012189에 개시된바 있다.
- [0022] 본 발명에서는 적절한 분자량을 가지는 고분자를 기공 유도물질로 쓰는 방법으로, 상기 연구의 분자각인 고분자 기술을 동공(pore)생성이라는 목적으로 활용하고, 반응용액의 조성을 적절하게 변형하여 프로테오믹 시료의 분리분석에 유용한 OT-CEC 컬럼을 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0023] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국 등록특허 제 10-1012189호

비특허문헌

- [0024] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Zaidi 등, J. Chromatogr. A, 2009, 1216, 2947-2952
 (비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Zaidi 등, Electrophoresis 2009, 30, 1603-1607
 (비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Zaidi 등, J. Chromatogr. A, 2011, 1218, 1291-1299
 (비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Karenga 등, J. Sep. Sci. 2008, 31, 2677-2685
 (비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: Ka등, Electrophoresis 2012, 33, 48-73
 (비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: Nilsson 등, Electrophoresis 2011, 32, 1141-1147
 (비특허문헌 0007) 비특허문헌 7: El Rassi 등, Electrophoresis 2010, 31, 174-191
 (비특허문헌 0008) 비특허문헌 9: Sun 등, Proteomics 2014, 14, 622-628
 (비특허문헌 0009) 비특허문헌 10: O. Bruggermann 등, J. Chromatogr. A 1997, 781, 43
 (비특허문헌 0010) 비특허문헌 11: Z.J. Tan 등, Electrophoresis 1998, 19, 2055; L.
 (비특허문헌 0011) 비특허문헌 12 : Schweitz 등, Anal. Chem. 2002, 74, 1192
 (비특허문헌 0012) 비특허문헌 13: Y. Huang 등, Electrophoresis, 2004, 25, 554-561

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0025] 본 발명의 목적은 실리카 모세관으로 된 프로테오믹 컬럼의 제조방법 및 상기 제조방법으로 얻어진 프로테오믹 실리카 모세관 컬럼을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0026] 상기 목적을 달성하기 위하여,
 [0027] 본 발명은
 [0028] 실리카 모세관 내벽에 이중결합 리간드를 부착시키는 단계(단계 1):
 [0029] 기능성 모노머, 가교 모노머, 분자량이 4,000 내지 40,000인 기공 유도물질 및 중합개시제를 포함하는 모노머 혼합물을, 수소결합성 용매 및 비수소결합성 용매로 구성된 혼합용매에 용해시켜 중합혼합물을 제조하는 단계(단계 2);
 [0030] 상기 단계 2에서 제조된 중합혼합물을 상기 실리카 모세관에 채우는 단계(단계 3);
 [0031] 상기중합혼합물이 채워진 실리카 모세관의 양끝을 봉하고 가열하여 중합시키는 단계(단계 4); 및
 [0032] 상기 중합이 완료된 실리카 모세관 컬럼을 세척하는 단계(단계 5);를 포함하는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법을 제공한다.
 [0033] 또한 본 발명은
 [0034] , 상기 제조방법에 의해 얻어지는 실리카 모세관 컬럼을 제공한다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명에 따르면, 실리카 튜빙 내벽 표면에 적절한 동공을 지니도록 고분자 박막을 형성한 실리카 모세관 컬럼은 그 제조재현성이 뛰어나고, 프로테오믹 시료 (단백질 가수분해 산물)의 분리분석에 대하여 현재까지 모세관 전기이동 크로마토그래피(capillary electrochromatography, CEC) 분야에서 어떤 경우와 비교해서도 훨씬 우수

한 분리효율을 보일 뿐만 아니라, 또한 매우 세척이 용이한 구조의 박막을 생성함으로써, 대량생산이 가능한 새로운 고효율 프로테오믹 CEC 컬럼으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 실시예 1 및 비교예 1 내지 3에서 제조된 모세관 컬럼으로 단백질 시료(용리순서대로 라이소자임(lysozyme), 리보뉴클레아제 A(ribonuclease A), 시토크롬-C(cytochrome-C), α -키모트립시노겐 A(α -chymotrypsinogen A) 및 미오글로빈(myoglobin))를 분리한 것을 나타낸 그래프이고;
- 도 2는 실시예 2에서 제조된 모세관 컬럼으로 시토크롬C의 가수분해 산물을 분리분석 최적화한 것을 나타낸 그래프이고;
- 도 3은 실시예 3에서 제조된 모세관 컬럼으로 도 2의 최적화 용리조건 하에서 단백질 시료를 분리분석한 것을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0038] 본 발명은
- [0039] 실리카 모세관 내벽에 이중결합 리간드를 부착시키는 단계(단계 1):
- [0040] 기능성 모노머, 가교 모노머, 분자량이 4,000 내지 40,000인 기공 유도물질 및 중합개시제를 포함하는 모노머 혼합물을, 수소결합성 용매 및 비수소결합성 용매로 구성된 혼합용매에 용해시켜 중합혼합물을 제조하는 단계(단계 2);
- [0041] 상기 단계 2에서 제조된 중합혼합물을 상기 실리카 모세관에 채우는 단계(단계 3);
- [0042] 상기중합혼합물이 채워진 실리카 모세관의 양끝을 봉하고 가열하여 중합시키는 단계(단계 4); 및
- [0043] 상기 중합이 완료된 실리카 모세관 컬럼을 세척하는 단계(단계 5);를 포함하는 것을 특징으로 하는 실리카 모세관 컬럼의 제조방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명에 따른 실리카 모세관 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 실리카 모세관 내벽에 이중결합 리간드를 부착시키는 단계로 일례로써, 문헌(S. Hjerten 등, J.Chromatogr. 1985, 347, 191)에 공지된 방법대로 수행될 수 있다.
- [0045] 상세하게는 실리카 모세관에 1M NaOH 용액을 6 시간 동안 채우고, 물, 0.1 M HCl, 물, 아세톤의 순서로 잘 씻고 질소 기류를 통과시켜 건조시킨 다음, 4 μ L의 메타크릴옥시프로필 트리메톡시실란(methacryloxypropyl trimethoxysilane)을 1mL의 6mM 초산수용액에 녹여 모세관에 채우고 6시간 그대로 두어 반응시킨 후, 메탄올로 철저하게 세척해내고 질소기류로 말리는 과정이다.
- [0046] 상기 단계 2는 본 발명에 따른 특수 조성의 중합혼합물을 제조하는 단계이다.
- [0047] 본 발명은 모세관 전기이동 크로마토그래피에서 사용할 때 분리효율이 뛰어나고 안정적인 전기삼투흐름을 주는 다공성 유기 모노리트 고분자 박막을 실리카 모세관 내벽에 재현성 있게 형성하기 위하여 고안한 특수 중합혼합물의 조성을 제공한다.
- [0048] 이에, 상기 단계 2에서는 기능성 모노머 1몰에 대하여, 가교 모노머 2.0 내지 6.0몰, 기공 유도물질은 0.002 내지 0.03몰 및 중합개시제 0.05 내지 0.5몰을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0049] 또한 본 발명에 따른 상기 중합 혼합물은 기공 유도물질이 프로테오믹 시료분석에 유용하게 쓰일 수 있도록 정

지상 막 내에 적당한 동공생성을 유도하는 목적으로 사용되며, 특히 분자량이 4,000 내지 40,000 정도인 고분자를 사용한다.

- [0050] 상기 범위를 벗어나는 기공 유도물질을 쓰면 프로테옴릭 시료 분석에 적절한 동공생성이 되지 않아 분리효율이 부적합한 수준으로 떨어질 수 있다.
- [0051] 이에, 분자량이 4,000 내지 40,000인 기공 유도물질로는 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리비닐알코올, 폴리비닐아세테이트, 폴리비닐아세톤, 폴리비닐피리딘, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴로니트릴, 폴리에틸렌디아민, 폴리비닐클로라이드, 폴리카프로락탐, 폴리비닐피롤리돈 및 폴리에스터로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 상기 기공유도물질이 이에 제한되는 것은 아니며, 유기모노리트의 성분과 용매의 물성을 고려하여, 일반적으로 공지된 물질들을 적절히 선택하여 사용할 수 있다.
- [0052] 한편 상기 기능성 모노머는 이미 일반적으로 공지된 물질들 중에서 선정하여 사용할 수 있으며, 바람직하게는 프로테옴릭 분석에서 더 좋은 결과를 주는 분자량 500 이하의 염기성 모노머가 더 바람직하다.
- [0053] 예를 들어, 아크릴산, 메타크릴산, 메틸메타크릴산, 메틸메타크릴레이트, 비닐알코올, 비닐아세테이트, 비닐아세톤, 스티렌, 4-에틸스티렌, 4-히드록시스티렌, 알릴아민, 4-아미노스티렌, 4-비닐피리딘, 2-비닐피리딘, 1-비닐이미다졸, 아크릴아미드 및 메타크릴아미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있으나, 상기 기능성 모노머가 이에 제한되는 것은 아니며, 1 이상의 이중결합을 지닌 화합물을 적절하게 선택하여 사용할 수 있다.
- [0054] 또한, 가교 모노머로는 에틸렌글리콜 디메타크릴레이트, 트리메틸프로판트리아크릴레이트, 트리메틸프로판트리메타크릴레이트, 아크릴이소시아누레이트, 1,4-부탄디올디아크릴레이트, 1,4-부탄디올디메타크릴레이트, 1,6-헥산디올디아크릴레이트, 1,6-헥산디올디메타크릴레이트, 네오펜틸글리콜 디아크릴레이트, 네오펜틸글리콜 디메타크릴레이트, 디시클로펜타디에닐디아크릴레이트, 디시클로펜타디에닐디메타크릴레이트, 펜타에리스리톨 테트라아크릴레이트, 펜타에리스리톨 테트라메타크릴레이트 등에서 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있으나, 상기 가교 모노머가 이에 제한되는 것은 아니며, 2 이상의 이중결합을 지닌 화합물을 적절히 선택하여 사용할 수 있으며, 특히 분자량이 500 이하인 것이 바람직하다.
- [0055]
- [0056] 또한, 상기 중합개시제로는 아조비스이소부틸로니트릴 또는 아조비스디메틸발레로니트릴과 같은 아조계 개시제; 벤조일퍼록사이드 또는 라우로일퍼록사이드와 같은 유기 퍼록사이드; 과황산칼륨 및 과황산암모늄과 같은 수용성 개시제 중에서 선택된 어느 하나를 사용할 수 있다.
- [0057] 또한 반응혼합물을 용해시키기 위한 혼합용매는 비수소결합성(aprotic) 용매 80 내지 95 부피% 및 수소결합성 용매 5 내지 20 부피%로 이루어질 수 있다. 이렇게 혼합용매를 사용하는 것은 기공 유도물질의 용해도가 비수소결합성 용매에 대하여 낮아서 그 용해도를 증가시키기 위한 것이다.
- [0058] 상기 수소결합성 용매는 C₁ 내지 C₁₀의 알코올류를 사용하며, 상기 비수소결합성 용매로는 아세토니트릴, 클로로포름, 사염화탄소, 디클로로메탄, 트리클로로메탄, 테트라클로로에탄, 벤젠, 톨루엔, 크실렌, 에틸벤젠, 모노클로로벤젠, 디클로로벤젠, 니트로벤젠, 디에틸에테르, 메틸아세테이트 또는 에틸아세테이트 등을 사용할 수 있다.
- [0059] 상기 모노머 혼합물은 혼합용매 100 중량부에 대하여 5 내지 20 중량부로 포함되는 것이 바람직하다. 만약, 상기 범위를 벗어나 소량으로 혼합용매가 포함되면 중합혼합물을 충분히 용해시킬 수 없는 반면, 과량으로 혼합용매가 포함되면 경제성 제고에 문제가 야기될 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 실리카 모세관 제조방법에 있어서, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 제조된 특수 조성의 중합혼합물을 상기 제 1단계에서 제조된 실리카 모세관에 채우는 단계이다.

- [0061] 상기 단계 4는 상기중합혼합물이 채워진 실리카 모세관의 양끝을 봉하고 가열하여 중합시키는 단계로써, 상기 중합혼합물을 질소로 퍼지하여 산소를 제거하고, 0.2 μm 멤브레인 필터를 매단 주사기로 모세관에 채워, 모세관의 양 끝을 GC용 고무마개(septum)로 봉하고 40 내지 70℃ 항온수조에 넣어 3 내지 12 시간 반응시켜 수행할 수 있다.
- [0062] 상기 단계 5는 중합이 완료된 모세관 컬럼에 세척용액을 흘려 세척하는 단계이다. 메탄올과 초산의 혼합용매, 아세토니트릴로 및 CEC 용리액 순으로 세척하여 수행할 있다. 또한 이렇게 제조된 컬럼은 그 내벽에 적절한 다공성 박막을 이루게 되어 프로테오믹 시료 분리분석에서 분리능과 분리효율이 뛰어난 결과를 준다. 더불어 컬럼 제조의 재현성도 매우 우수하다.
- [0063] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 얻어지는, 내벽에 다공성 유기 모노리트 구조로 고분자 박막이 형성된 모세관 컬럼을 제공한다.
- [0064] 본 발명에 따른 모세관 컬럼은 내경이 20 내지 200 μm 이고 길이가 25 내지 500 cm의 범위에 걸쳐 만들 수 있으며 그 내벽에 형성되는 고분자 박막의 두께는 0.1 내지 15 μm 이다.
- [0065] 보다 바람직하게는, 모세관 컬럼의 내경이 50-100 μm 이고 길이가 30-100 cm, 그리고 고분자 박막의 두께는 1-4 μm 인 것이 제조의 재현성과 사용의 편의성에서 가장 바람직하다.
- [0066] 또한 본 발명에 따른 실리카 모세관 컬럼은 프로테오믹스 분석용 컬럼인 것을 특징으로 하며, 예를 들어 50 cm 컬럼으로 펩티드 시료에 대하여 일부 봉우리의 이론단수가 백만을 넘을 정도로 분리효율이 매우 뛰어난 성능을 보인다.
- [0067] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 단, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] <실시예 1> 단백질 혼합물 시료의 분리 (하향식 프로테오믹 분석)에 사용되는 모세관 컬럼의 제조
- [0069] 단계 1 : 내경 50 μm , 외경 365 μm 인 실리카 모세관(길이 50cm)에 1M NaOH 용액을 6 시간 동안 채우고, 물, 0.1M HCl, 물 및 아세톤의 순서로 세척 한후, 질소 기류를 통과시켜 건조시켰다. 그런 다음, 4 μL 의 메타크릴 옥시프로필 트리메톡시실란(methacryloxypropyl trimethoxysilane)을 1mL의 6mM 초산수용액에 녹여 모세관에 채우고, 6시간 그대로 두어 반응시킨 후 메탄올로 철저히 세척해내고 질소기류로 말렸다.
- [0070] 단계 2: 폴리에틸렌글리콜(분자량 10,000인 기공유도물질) 4.9 mg, 4-아미노스티렌 8.2 μL , EDMA(ethylene glycol dimethacrylate) 59 μL 및 AIBN(azobisisobutyronitrile) 3.5 mg을 아세토니트릴(acetonitrile) 0.9 mL와 2-프로판올(2-propanol) 0.1 mL로 이루어진 혼합용매에 녹이고, 10분 이상 질소로 퍼지하여 산소를 제거한 후, 0.2 μm 멤브레인 필터가 달린 시린지로 상기 이중결합 처리된 모세관에 채웠다.
- [0071] 단계 3 : 상기 모세관 양끝을 GC용 고무마개로 봉하고, 모세관을 50 ℃ 항온수조에 넣어 4 시간 동안 반응시켰다. 그 후 즉시 메탄올과 초산이 9 대 1의 부피비로 섞인 용매로 철저히 세척하여 기공 유도물질을 제거하고, 아세토니트릴로 다시 세척한 다음 마지막으로 CEC 용리액으로 씻었다.
- [0072] 단계 4: 상기 단계 3에서 제조된 모세관의 출구 끝에서 8.4 cm 위치에 외피 고분자 막을 태워 제거함으로써 자외선 검출창을 만들었다.

- [0073] 상기 컬럼의 전체 길이는 50.0 cm이고 컬럼 입구에서 검출창까지 유효길이는 41.6 cm이었다.
- [0074] <실시예 2> 단백질 가수분해 산물(상향식 프로테오믹 분석)에 사용되는 모세관 컬럼의 제조.
- [0075] 단백질의 가수분해로 얻어진 펩티드 혼합물 시료의 분석을 위한 OT-CEC 모세관 컬럼은, 상기 실시예 1의 단계 2에서 반응혼합물의 조성이 폴리에틸렌글리콜(기공유도물질, 분자량 10000) 9.8 mg, 4-아미노스티렌 24.6 μ L, EDMA(ethylene glycol dimethacrylate) 59 μ L, AIBN(azobisisobutyronitrile) 3.5 mg을 아세토니트릴(acetonitrile) 0.9 mL와 2-프로판올(2-propanol) 0.1 mL로 이루어진 혼합용매에 녹인 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 제조과정을 수행하였다.
- [0076] <비교예 1>
- [0077] 상기 실시예 1에 있어서, 단계 2에서 분자량이 600인 폴리에틸렌글리콜을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 수행하여 단백질 혼합물 시료의 분리에 사용되는 모세관 컬럼을 제조하였다.
- [0078] <비교예 2>
- [0079] 상기 실시예 1에 있어서, 단계 2에서 분자량이 1,500인 폴리에틸렌글리콜을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 수행하여 단백질 혼합물 시료의 분리에 사용되는 모세관 컬럼을 제조하였다.
- [0080] <비교예 3>
- [0081] 상기 실시예 1에 있어서, 단계 2에서 분자량이 100,000인 폴리에틸렌글리콜을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 수행하여 단백질 혼합물 시료의 분리에 사용되는 모세관 컬럼을 제조하였다.
- [0082] <실험예 1>
- [0083] 모세관 컬럼의 프로테오믹 분석 성능을 비교 조사하기 위하여, 라이소자임(lysozyme), 리보뉴클레아제 A(ribonuclease A), 시토크롬-C(cytochrome-C), α -키모트립시노겐 A(α -chymotrypsinogen A) 및 미오글로빈(myoglobin)으로 이루어진 단백질 시료를 제조하였다.
- [0084] 실시예 1 및 비교예 1 내지 3에서 제조된 컬럼을 60/40(부피비)의 아세토니트릴/ pH 6.0 50mM 포스페이트 버퍼를 이동상으로 하여 -20 kV의 전압과 25℃의 온도에서 상기 단백질 시료를 용리하였으며, 그 결과를 비교하여 도 1에 도시하였다.
- [0085] 용리 순서는 라이소자임(lysozyme), 리보뉴클레아제 A(ribonuclease A), 시토크롬-C(cytochrome-C), α -키모트립시노겐 A(α -chymotrypsinogen A) 및 미오글로빈(myoglobin)순으로 단백질을 분리하였다.
- [0086] 도 1에서 나타낸 바와 같이, 기공 유도물질의 분자량이 10,000인 경우에만 만족할만한 분리성능을 얻었고, 분자량이 너무 작거나 너무 크면 부적합한 결과를 알 수 있었다.
- [0087] 따라서 프로테오믹 시료 분석에 알맞은 동공을 생성하기 위해서는, 기공 유도물질의 분자량이 어느 특정한 범위 안에 들어와야 한다는 것을 알 수 있으며, 본 발명에 따른 기공 유도물질의 분자량은 4,000 내지 40,000일 때 바람직한 것을 알 수 있다.
- [0088] <실험예 2>
- [0089] 실시예 2에서 제조된 모세관 프로테오믹 분석 성능을 비교 조사하기 위하여, 단백질의 가수분해로 얻어진 펩티드 혼합물 시료를 다음과 같이 제조하였다.
- [0090] 시토크롬C (cytochrom C) 2.5 mg을 트립신(소화효소) 1.0 mg, 2.0 M 우레아 0.5 mL 및 0.1M 암모늄수소탄산

0.5 mL와 혼합한 후 37 °C에서 24시간 숙성하였고, 반응을 종결하기 위하여 0.1% 삼불화초산 수용액 1 mL를 가하여 펩티드 시료를 제조하였으며, 실시예 2에서 제조된 모세관 컬럼으로 상기 시토크롬C의 가수분해 산물을 분리분석 최적화한 결과를 도 2에 나타내었다.

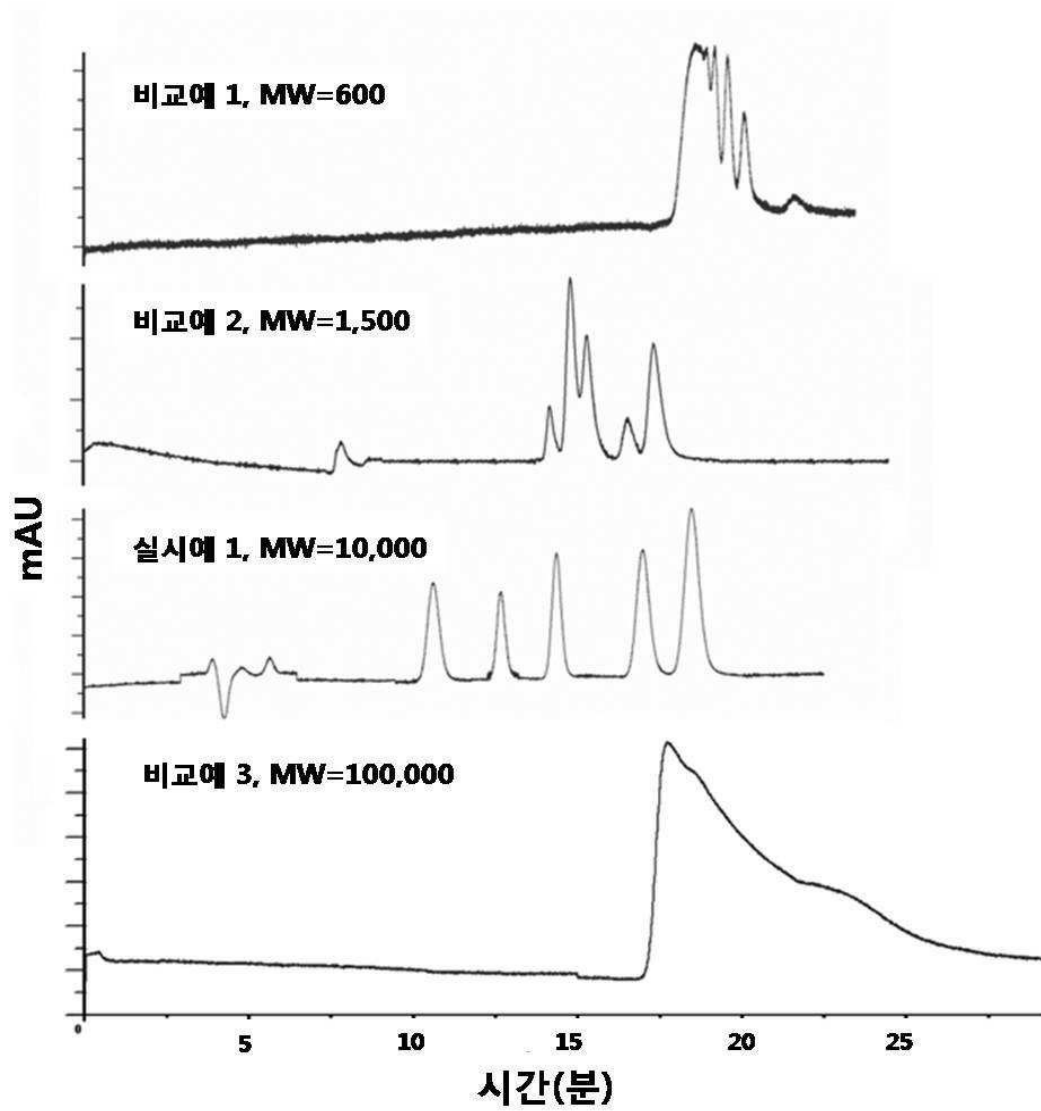
[0091] 최적화 용리조건을 판단하는 지표로서 시료 성분의 머무름 시간 범위를 아세톤(전기삼투흐름 지시 용질)의 머무름 시간으로 나눈 값을 삼았고, 이것이 최대가 되는 조건을 찾았다. 최적화된 용리액은 부피비 60/40인 아세토니트릴/ pH 7.0 50mM 포스페이트 버퍼로 확인되었다.

[0092] 도 2에서 볼 수 있듯이, 분리된 펩티드 봉우리의 떠나비는 매우 좁은 것을 확인할 수 있다. 또한 각 봉우리의 이론단수는 적어도 200,000/m 이상이고, 대부분은 500,000/m 이상이며, 일부분은 1,000,000/m 이상으로 분리효율이 높은 결과를 나타냄으로써, 본 발명에 따른 컬럼의 분리능이 매우 좋은 것을 알 수 있다.

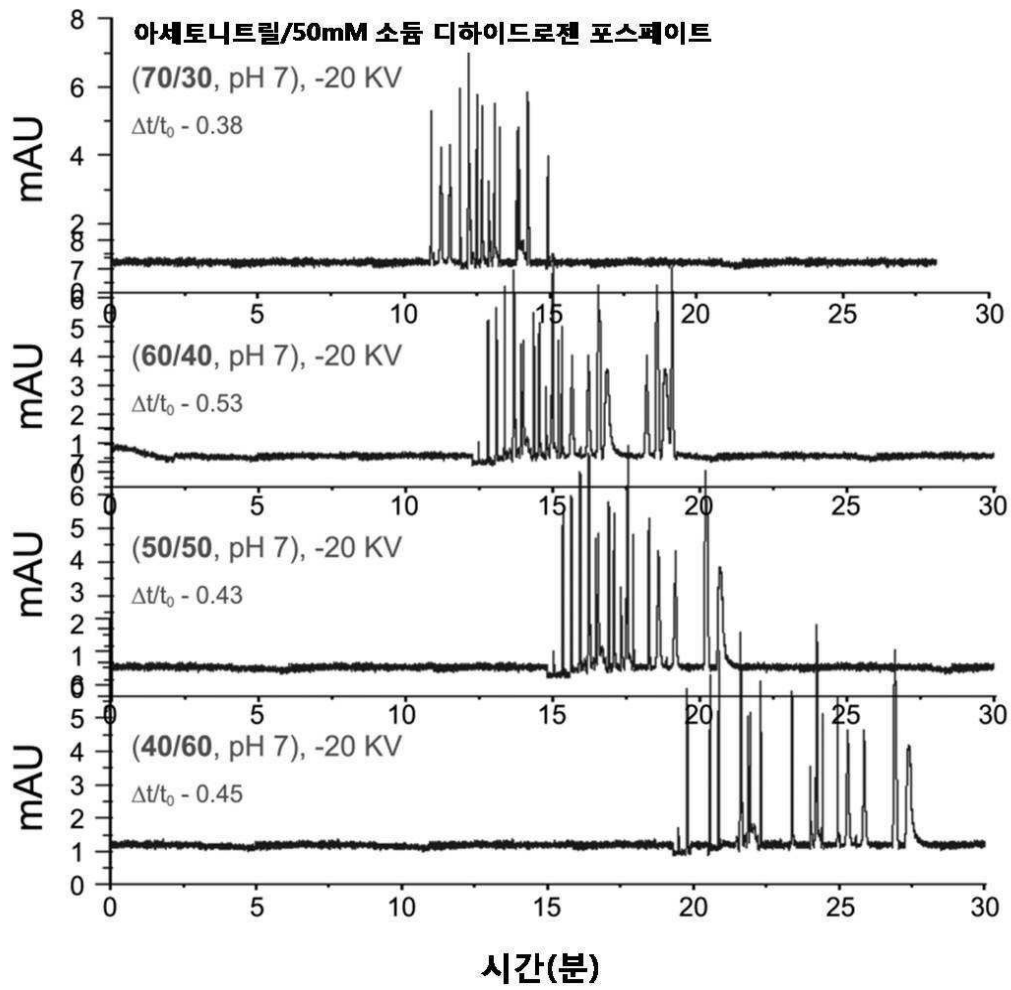
[0093] 한편, 실시예 2에서 제조된 컬럼으로 도 2의 용리조건 하에서 단백질 혼합물 시료를 분리분석한 결과는 도 3에 나타내었고, 분리성능은 도 1과 유사한 결과인 것을 알 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

