

Application News

No. 076K

Total Organic Carbon Analysis

의약품 백신의 단백질 추정을 위한 총 질소 (TN) 측정: TNM-L 을 장착한 TOC-L 이용

Measurement of total nitrogen (TN) for protein estimation in pharmaceutical vaccines on the Shimadzu TOC-L with TNM-L

이 뉴스레터는 백신 등의 바이오 의약품에서 단백질 추정을 위한 분석기법으로 총 질소 측정(TNM) 방법을 소개한다.

질소는 단백질의 구성 요소인 아미노산의 기본 성분으로 의약품, 식품, 음료 및 식물체에서 단백질과 단백질 대사물질을 추정하기 위해 질소의 함량 측정법이 널리 사용되고 있다. 질소는 보통 유기물과 무기물의 두 가지 형태로 존재하며, 무기물 형태에는 질산염(NO₃⁻)과 아질산염(NO₂⁻), 암모늄(NH₄⁺)이 있다.

백신 생산 시에 생산 과정의 초기, 중간 및 최종 단계에서 항원의 양을 조절하여야 한다. 따라서, 바이러스 백신이나 박테리아 백신은 약화되거나 비활성화된 바이러스 및 박테리아의 양에 대해 검사한다. 이러한 항원은 일반적으로 단백질로 구성되어 있기 때문에 총 단백질을 분석적으로 정량화 하는 것이 중요하다. 디프테리아와 파상풍 백신은 백일해 항원과 결합하여 DTP 혼합 백신으로 쓰이며, 아이들에게 디프테리아, 파상풍 및 백일해에 대한 면역을 갖도록 해준다.

백신의 단백질 질소 분석에는 전통적인 킬달(Kjeldahl)법 이 사용된다. 하지만 단백질이 가변적인 아미노산 서열을 가지기 때문에 단백질마다 다른 보정 인자가 필요하다는 한계점이 있다. 게다가, 킬달법은 많은 시간과 노력이 필요할 뿐 아니라 높은 온도에서 농축된 황산을 사용하기 때문에 안전과 건강에 상당한 위험을 초래할 수 있다.

이 뉴스레터에서는 유기질소 및 무기질소의 추정을 위해 고온 연소산화와 화학발광 검출 기술이 결합된 방법을 연구하였다. 이는 총 질소(TN) 분석에 의해 질소를 빠르고 효율적으로 모니터링 할 수 있는 방법이다[1]. 그에 따른 결과는 이론적 질소함량 및 킬달법의 실험 수치와 비교하였다.

■ TN 분석

질소화합물을 함유한 시료는 연소온도 720°C 에서 일산화질소(NO)로 분해된다. 열전 냉각 및 제습된 NO 가스는 화학발광 분석기를 통과하면서 오존과 반응하여 이산화질소(NO₂)와 여기된 이산화질소(NO₂^{*})의 조합을 형성한다. 이 때 여기된 NO₂^{*}가 바닥 상태로 돌아가면서 방출한 빛을 검출기에서 전기적 신호로 측정하여 시료의 질소 농도에 비례하는 피크를 보여준다. TN 분석의 반응 과정은 그림 1과 같다. 이 뉴스레터에서는 DPT 백신의 TN 측정에 대해 기존의 킬달법과 TNM 방법을 비교하였다.

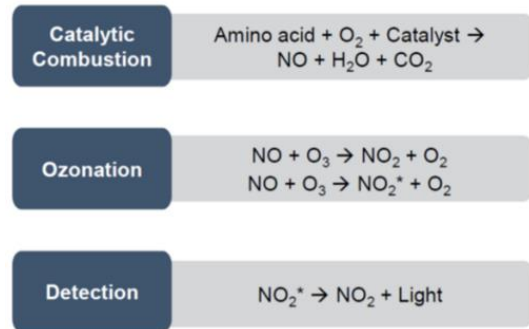


그림 1. TN 반응 과정



그림 2. TNM-L을 장착한 TOC-L 분석기

■ 실험방법

인도혈청연구소(Serum Institute of India Pvt. Ltd.)에서 킬달법과 TOC/TN 방법을 비교 연구하기 위해 파상풍과 디프테리아 백신, 백일해 독소 및 FHA(Filamentous Hamagglutinin)항원에서 각각 3개씩 배치를 선정하였다. TN 분석은 TNM-L이 장착된 TOC-L_{CPH} 분석기를 사용하여 수행하였다.

그림 2와 같은 TNM-L이 장착된 TOC-L 분석기로 아미노산 표준 시료를 분석하여 TOC/TN 기법이 질소 함량을 추정하는데 유효하다는 것을 확인하였다. 킬달법 또한 함께 비교하여 표 1에 나타내었다. TOC/TN 시스템의 검정곡선은 질산칼륨 수용액을 사용하였으며, 회수를 평가를 위해 대표적인 아미노산인 L-글루탐산과 L-히스티딘을 각각 1000 mg/L, 500 mg/L 농도로 사용하였다.

표 1. 아미노산의 TN 분석결과

시료	킬달 질소 함량 (mg/L)-A	TOC/TN 질소 함량 (mg/L)-B	회수율(%) -B/A*100
L-Glutamic acid (1000 mg/L)	95.2	91.5	96.11
L-Histidine (500 mg/L)	101.6	100.3	98.72

■ 결과 및 토론

백신에 대한 킬달법과 TOC/TN 방법 분석 비교 결과는 표 2와 표 3에서 확인할 수 있다.

질산칼륨 검정곡선의 상관계수(r)는 그림 3과 같이 0.9997로 양호한 직선성을 보였다. 대표적인 아미노산 측정 데이터는 그림 4와 같다.

TOC/TN법과 킬달법에 의한 아미노산 총 질소 함량은 유사한 결과를 보였으며, 회수율은 (100 ± 10) % 범위로 확인되었다.

표 2. 파상풍과 디프테리아 백신의 킬달, TOC/TN 분석결과 비교

시료	배치	TOC/TN 질소 함량 (mg/L)	킬달 질소 함량 (mg/L)
파상풍 백신	Batch 1	1.496	1.546
	Batch 2	2.160	2.205
	Batch 3	1.935	1.991
디프테리아 백신	Batch 1	1.481	1.537
	Batch 2	1.523	1.559
	Batch 3	1.544	1.587

표 3. 백일해 독소와 FHA항원의 킬달, TOC/TN 분석결과 비교

시료	배치	TOC/TN 질소 함량 (mg/L)	킬달 질소 함량 (mg/L)
백일해 독소	Batch 1	71.590	69.100
	Batch 2	79.220	74.500
	Batch 3	83.260	76.500
FHA 항원	Batch 1	86.080	81.600
	Batch 2	35.540	32.900
	Batch 3	94.790	96.600

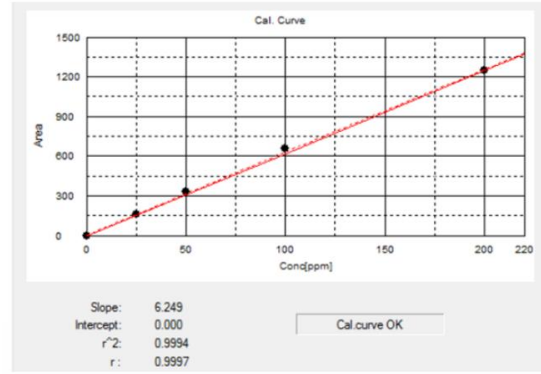


그림 3. TN 검정곡선

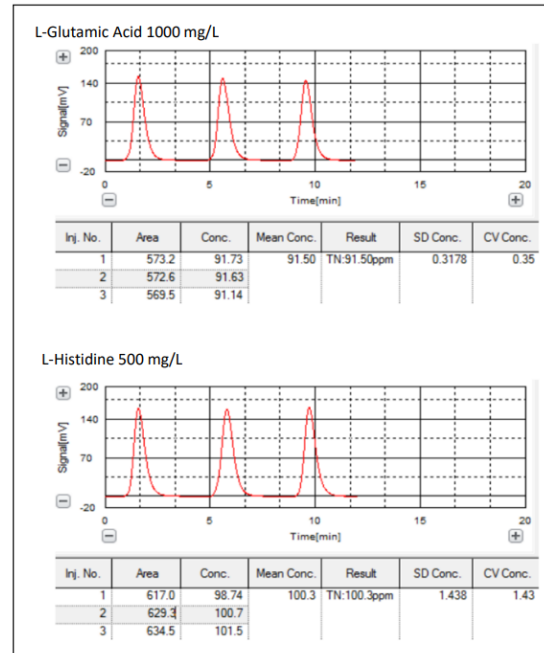


그림 4. 아미노산의 TN 분석결과

■ 결론

TNM-L을 장착한 TOC-L 분석기를 이용하여 단백질의 총 질소를 분석하는 방법은 좀 더 효과적인 대안이 될 수 있으며, 분석 결과 또한 기존의 킬달법과 유사함을 확인하였다. 단백질 추정을 위한 질소함량 분석에 TNM-L과 TOC 분석기를 활용하면, 시간을 절약할 수 있고 안전하다. 따라서, 연구 중인 시료로부터 얻은 결과들을 기반으로 한 본 응용자료는 다양한 질소 함유 의약품 및 바이오 의약품 분석에 활용될 수 있다.

■ 감사의 글

백신 분석과 데이터 해석에 도움을 준 인도혈청연구소에 감사를 표한다.

■ 참고문헌

[1] ASTM D8-83-16: A New method for total Nitrogen(TN)&Total Kjeldahl Nitrogen(TKN)