

試料が吸着する場合の SEC 溶離液は、これで決まり！

溶離液の最適化で、より正確な分離を実現



生体高分子のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）では、試料がカラムに吸着してクロマトグラムが変化する、あるいは異常なピークとなる場合があります。これは試料の疎水性や静電的性質に起因するもので、分離におけるカラム間差として反映される場合もあります。このような問題を解決するため、溶離液に種々の試薬を添加して正常な SEC 分離を行います。表に、試料とカラムの相互作用を抑制する試薬や、その際の注意点をまとめました。

添加試薬	原理、効果	試薬例	注意点
カオトロピック塩	疎水的吸着の抑制	NaClO ₄	・尿素や塩酸グアニジンなどの塩（変性剤）は避ける
界面活性剤	疎水的吸着の抑制	C ₁₂ E ₈ *, <i>n</i> -オクチル β-D-グルコシド、DDM*, Triton® X-100、Tween® -80、Emulgen® 911など	・界面活性剤の種類により分離は大きく変化する ・カラム性能が不可逆的に変化する恐れあり ・界面活性剤を含む溶離液専用カラムとする ・大きなシステムピークが出現する場合がある
有機溶媒	疎水的吸着の抑制	アセトニトリル イソプロピルアルコール	・高濃度溶液で、試料が変性、失活する恐れあり
アミノ酸	水素結合の抑制 試料の安定化	アルギニン、リジンなど	・たんぱく質分子間、充填剤との各種相互作用を抑制 ・試料への影響は軽微

*C₁₂E₈；オクタエチレングリコール モノ-*n*-ドデシルエーテル、DDM；*n*-ドデシル-β-D-マルトシド

●SEC 溶離液による試料吸着・相互作用の改善例

SEC 溶離液の改善例を試料別に表にまとめました。静電的相互作用は、溶離液に塩を添加することでほぼ抑制できますが、疎水的相互作用の場合は、添加試薬の選択が重要です。また試薬の添加により、生体高分子の構造が大きく変化し失活、変性する場合がありますので、注意が必要です。

試料分類	試料	TSKgel カラム例	溶離液の改善例（試薬の添加）	効果	備考	文献
ペプチド	組換えインスリン	TSKgel UP-SW2000	20 % アセトニトリル、26 % の0.06 mol/L アルギニンを含む酸性溶液	疎水的吸着の抑制	添加濃度は、試料の疎水性に依存	1
	疎水性ペプチド	TSKgel G2000SWxL	45 % アセトニトリル + 0.1 % TFA		添加濃度は、試料の疎水性に依存	2
たんぱく質	モノクローナル抗体	TSKgel G3000SWxL	0.2 mol/L アルギニンを含むバッファー**	疎水的吸着の抑制	回収率改善による凝集体の定量、分析	3
	モノクローナル抗体	TSKgel SuperSW3000 TSKgel UP-SW3000-LS* TSKgel UP-SW Aggregate	0.4 mol/L NaClO ₄ を含むバッファー		カオトロピック効果による二量体、凝集体の回収率の改善	4, 5, 6
	抗体薬物複合体 (ADC)	TSKgel G3000SWxL TSKgel UP-SW3000	3 - 20 % アセトニトリルまたはイソプロピルアルコールを含むバッファー		添加濃度は、薬物の疎水性に依存	7 - 10
	膜たんぱく質	TSKgel G3000SWxL	1.0 % C ₁₂ E ₈ ***、0.05 - 0.5 % <i>n</i> -オクチル β-D-グルコシドまたはDDM***を含むバッファー		添加濃度は界面活性剤の性質に依存	11, 12
オリゴ核酸	ホスホロチオエート化オリゴ核酸	TSKgel G2000SWxL	20 % アセトニトリルを含むバッファー	疎水的吸着の抑制	添加濃度は、修飾核酸の疎水性に依存	13
ウイルス ウイルス様粒子 (VLP)	手足口病ウイルス	TSKgel G4000SWxL	0.4 mol/L リジンまたはアルギニンを含むバッファー	疎水的吸着の抑制 (カラム間差解消)	特定アミノ酸残基との結合・安定化と、水分子との水素結合の抑制	14
			0.4 mol/L NaClO ₄ を含むバッファー		カオトロピック効果	
	HIV-1 gag VLP	TSKgel G5000PWxL	25 mmol/L リン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) + 0.25 mol/L NaCl	静電的相互作用の抑制	塩、有機溶媒、界面活性剤、変性剤、糖など評価	15
ナノ粒子	脂質ナノ粒子 (LNP)	TSKgel G6000PWxL-CP	PBS、一般的なバッファー	静電的相互作用の抑制	カラム充填剤の変更による吸着抑制	16, 17

*TSKgel UP-SW3000は、新製品TSKgel UP-SW3000-LSで代用

**塩を含むリン酸などの中性付近のpHの一般的なバッファー；（例）0.3 mol/L NaClを含む50 mmol/L リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8)

***C₁₂E₈；オクタエチレングリコール モノ-*n*-ドデシルエーテル、DDM；*n*-ドデシル-β-D-マルトシド

●カラムのエイジング（前処理）

SEC カラムの使用初期に、たんぱく質凝集体などがカラムに吸着する現象が見られます。これを防止する対策として、カラムのエイジング（前処理）を行います。

カラムのエイジング例

（例 1）目的試料（凝集体を比較的多く含む場合）を 5～10 回程度、繰り返し注入、通液する

（例 2）市販ヒト血清（10 g/L、ろ過試料）を 5～10 回程度、繰り返し注入、通液する

※カラムのエイジング後、目的試料を分析し、凝集体等の溶出ピーク面積が一定になっていることを確認ください

※カラムのエイジングは最終手段です。先に溶離液の工夫で吸着が抑えられるか確認ください

●生体高分子の SEC 分析における溶離液の最適化や分離の改善を報告した文献や技術資料

1. 東ソー、セパレーションレポート No. 120, 高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW2000 について
https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/SepaReport/SR_120_UP-SW2000.pdf
2. 東ソー、セパレーションレポート No. 73, TSK-GEL を用いたゲル濾過（サイズ排除）クロマトグラフィーによるペプチドの分離
https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/SepaReport/sr073-SEC%EF%BE%8D%EF%BE%9F%EF%BE%8C%EF%BE%9F%EF%BE%81%EF%BE%84%EF%BE%9E-.pdf
3. R. Yumioka et al., Mobile phase containing arginine provides more reliable SEC conditions for aggregate analysis, J. Pharmaceutical Sciences, 99 (2010) 618, <https://doi.org/10.1002/jps.21857>
4. H. Wang et al., An improved size exclusion-HPLC method for molecular size distribution analysis of immunoglobulin G using sodium perchlorate in the eluent, J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 138 (2018) 330-343, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.025>
5. 東ソー、セパレーションレポート No. 122, 高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW Aggregate について
https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/SepaReport/SR_122_UP-SWAggregate.pdf
6. T. J. Higley et al., Tosoh Bioscience, TSKgel Application Note 04 (AN004), Mobile phase optimization for the analysis of an antibody-based fusion protein and aggregates using TSKgel SuperSW3000 size-exclusion column,
<https://www.separations.us.tosohbioscience.com/literature/advanced-literature-search?Literature%20Type=Application%20Note>
7. A. Goyon et al., Extending the limits of size exclusion chromatography: Simultaneous separation of free payloads and related species from antibody drug conjugates and their aggregates, J. Chromatogr. A, 1539 (2018) 19-29, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.039>
8. A. Goyon et al., Streamlined characterization of an antibody-drug conjugate by two-dimensional and four-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, Anal. Chem., 2019, 91, 14896-14903, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02454>
9. R. M. Hoffmann et al., A novel antibody-drug conjugate (ADC) delivering DNA mono-alkylating payload to condroitin sulfate proteoglycan (CSPG4)-expressing melanoma, Cancers, 2020, 12, 1029, <https://doi.org/10.3390/cancers12041029>
10. R. Hendricks et al., Simplified strategy for developing purification process for antibody-drug conjugates using cation-exchange chromatography in flow-through mode, J. Chromatogr. A, 1666 (2022) 462865, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462865>
11. 東ソー、技術資料 セパレーションレポート No. 50, TSK-GEL による膜たんぱく質の分離
https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/File%20Library/TBJS/Lit_JP/SepaReport/sr050.pdf
12. S. Ravaut et al., The ABC transporter BmrA from Bacillus subtilis is a functional dimer when in a detergent-solubilized state, Biochem. J. (2006), 395, 345-353, <https://doi.org/10.1042/BJ20051719>
13. 東ソー、JASIS 2021 Web Expo、新技術説明会、HPLC を用いた核酸分離のノウハウ
14. Y. Yang et al., Mechanism and inhibition of abnormal chromatographic behavior of serotype type a inactivated foot and mouse disease virus in high-performance size-exclusion chromatography, J. Chromatogr. A, 1686 (2022) 463648, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463648>
15. T. Steppert et al., Quantification and characterization of virus-like particles by size-exclusion chromatography and nanoparticle tracking analysis, J. Chromatogr. A, 1487 (2017) 89-99, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.085>
16. J. Zhang et al., Polydispersity characterization of lipid nanoparticles for siRNA delivery using multiple detection size-exclusion chromatography, Anal. Chem. 2012, 84, 6088-6096, <https://doi.org/10.1021/ac3007768>
17. X. Jia et al., Enabling online determination of the size-dependent RNA content of lipid nanoparticle-based mRNA formulations, J. Chromatogr. B, 1186 (2021) 123015, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123015>



※“TSKgel”は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

“Triton”はダウ・ケミカルの、“Tween”はCroda Internationalの、“Emulgen”は花王の登録商標です

※掲載のデータ等は、その数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社営業部	☎(03) 5427-5180	〒105-8623	東京都港区芝3-8-2
大阪支店 バイオサイエンスG	☎(06) 6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店 バイオサイエンスG	☎(052) 211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎(092) 781-0481	〒810-0001	福岡市中央区天神1-13-2
仙台支店	☎(022) 266-2341	〒980-0014	仙台市青葉区本町1-11-1
カスタマーサポートセンター	☎(0467) 76-5384	〒252-1123	神奈川県綾瀬市早川2743-1

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>
HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>
お問い合わせE-mail hlc@tosoh.co.jp