

生体分子分析のための サイズ排除クロマトグラフィー

分析の手引き

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

SEC 分析の手引き

生体分子を溶液中での分子サイズにもとづいてクロマトグラフィーにより分離する分析手法をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と言います。他の分離モードとは異なり、SEC では、分析対象成分とカラムに充填された固定相との間で相互作用が生じないことが前提となります。そうした特徴から、凝集体、賦形剤、細胞残屑、その他の分解から生じる不純物などを含む汚染物質からインタクトタンパク質を分離し、分析するためには理想的なソリューションといえます。そのため、開発や製造において、バイオ医薬品用分子の特性分析に広く用いられています。

このガイドでは、SEC の分離原理、溶質のサイズと分子量の影響、カラムの選択、移動相に関する考慮事項、SEC 使用に関する一般的ルールなどを解説します。

分離の原理はいたってシンプル

SEC では、分子は、溶液中での分子サイズに比例して、大きいものから順に分離されます。きわめて大きい分子は充填ベッドから排除され、ポイドボリュームで最初に溶出します。それよりも小さな分子は、そのサイズに応じてさまざまな程度でポアに浸透することができます (図 1)。最も小さい分子は、ポア構造の奥まで拡散し、最後に溶出します。

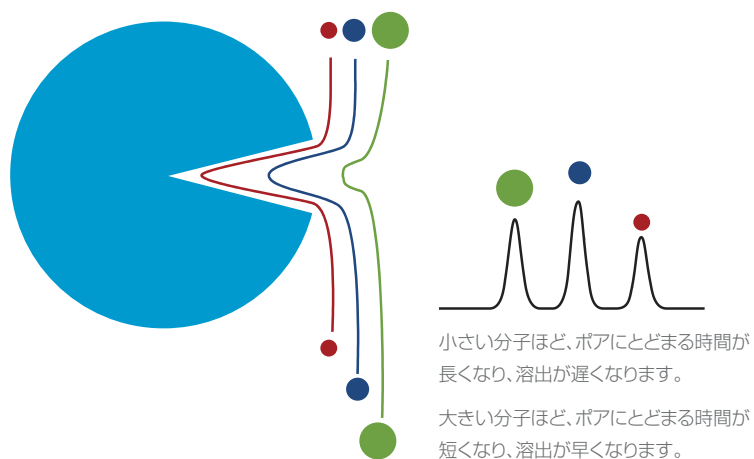


図 1: 分子はそのサイズに応じて、さまざまな程度で固定相のポアに浸透します。

サイズ排除クロマトグラフィーは、タンパク質混合物の分離および定量に適しています。遺伝子組み換えタンパク質製造の品質管理においては、凝集体 (二量体、三量体、四量体など) を測定したり、分子量の大きいタンパク質から低分子量の賦形剤や不純物を分離するための重要な手段として用いられています (図 2)。

治療用タンパク質では、凝集体の把握およびコントロールが不可欠になります。これは、凝集体が効能や使用期限に影響を与え、場合によっては深刻な免疫原性反応につながる可能性があるからです。ICH (Q6B) などの規則では、目的とする製品から凝集体を分離し、定量することが義務付けられています。

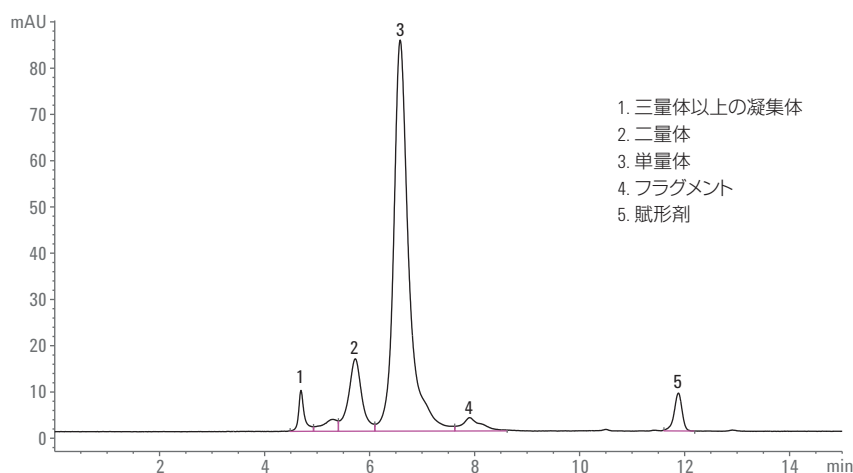


図 2: IgG の凝集体と賦形剤の分離

インタクト IgG の単量体と二量体の分離

カラム: Agilent AdvanceBio SEC、300 Å
7.8 x 300 mm、2.7 μm
(p/n PL1180-5301)

機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナート
クォータナリ LC システム

流量: 1.0 mL/min

温度: 室温

検出器: UV、220 nm

注入量: 5 μL

サンプル: ポリクローナル IgG

サンプル濃度: 150 mM リン酸ナトリウム
バッファ、pH 7.0

通常、分子は分子量の順に溶出し、分子量の最も大きいものが最初に溶出します。しかし、実際には、SEC メカニズムは、溶液中での分子サイズにもとづいて機能します。ほとんどのタンパク質は密集した構造ですが、タンパク質分子によっては円筒状を呈しているものもあります。このような分子は溶液中での流体力学半径が大きくなり、予想よりも早く溶出することがあります (図 3)。また、移動相が異なると、溶液中のサイズ (流体力学半径または回転半径) が変化するため、溶出順序に影響が出ることもあります。

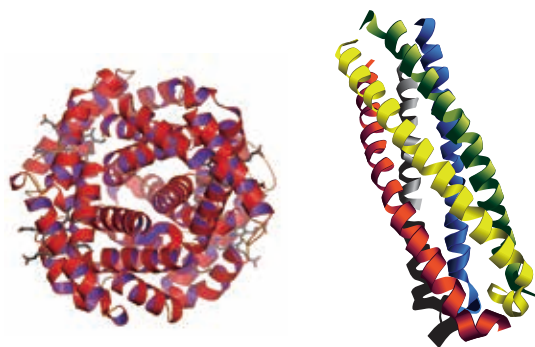


図 3: 密集した球状のタンパク質と円筒状のタンパク質の比較

SEC-UV/DAD メソッド開発ガイド

生体分子、凝集分析 (ペプチド、ポリペプチド、タンパク質) のサイズにもとづく分離のための初期カラムおよび初期条件の選択

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、mAb
MW >0.1 ~ 1,250 kDa

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、mAb
MW >0.1 ~ 10,000 kDa

分子量範囲とポアサイズにもとづくカラムの選択

AdvanceBio SEC (2.7 μm)	
ポアサイズ	MW 範囲 (kDa)
130 Å	0.1~100
300 Å	5~1,250

Agilent Bio SEC-5 (5 μm)	
ポアサイズ	MW 範囲 (kDa)
100 Å	0.1~100
150 Å	0.5~150
300 Å	5~1,250
500 Å	15~5,000
1000 Å	50~7,500
2000 Å	> 10,000

推奨する初期分離条件

カラム: AdvanceBio SEC または Agilent Bio SEC-5

移動相: 150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0*

グラジエント: 10 ~ 30 分間のアイソクラティック

温度: 推奨: 10 ~ 30 °C、最高温度: 80 °C

流量: 内径 4.6 mm カラムの場合は 0.1 ~ 0.4 mL/min
内径 7.8 mm カラムの場合は 0.1 ~ 1.25 mL/min

サンプル量: 総カラム容量の 5% 以下

* 高および低塩濃度のさまざまな水性緩衝液を使用可能

詳細については、次のアプリケーションノートをご覧ください。Defining the Optimum Parameters for Efficient Size Separations of Proteins (効率的なタンパク質サイズ分離のための最適なパラメータの決定) (資料番号 5990-8895EN) www.agilent.com/chem/jp

最初の分離後、分離のさらなる向上、タンパク質溶解度の維持、サンプルとクロマトグラフィー充填剤との相互作用の軽減のために、さらに変更が必要になることがあります。例えば、最適な分離を得るために、移動相のイオン強度を調整することができます。また、pH も一般に ± 0.2 単位で調整可能です。さらに最適化が必要な場合は、範囲を拡張する必要があります。温度の変更や、有機溶媒を追加することも検討します。

その他の塩が必要なプロトコルでは、次の緩衝液が一般的です。

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 100 ~ 150 mM の塩化ナトリウム

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 100 ~ 150 mM の硫酸ナトリウム

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 50 ~ 100 mM の尿素。その他の類似した塩 (KCl など) や塩酸グアニジンも使用できます。

pH 範囲: 2.0 ~ 8.5

添加可能な有機溶媒:

50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 5 ~ 10% のエタノール (または、メタノール、アセトニトリルなどその他の類似した溶媒)。50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0 中に 5% の DMSO。粘度の高い移動相を使用する場合は、最大使用圧力を超えないようにするために、流量の低減が必要になることがあります。

温度:

一般に、SEC による分離は 10 ~ 30 °C で行います。タンパク質やペプチドの分離では、タンパク質や疎水ペプチドの分離能と回収率を高めるために、それよりも高い温度が必要になることがあります。また、温度の影響を受けやすいタンパク質の生物活性を最大の状態で保つために、SEC を低温で行うこともあります。

Agilent Bio SEC カラムの最高使用温度は 80 °C です。これより高い温度で使用すると、タンパク質が変性することがあります。

機器選定での考慮事項

SEC 分離メカニズムでは、ピーク容積またはリテンションタイムが分析においてきわめて重要となります。したがって、高い精度と再現性を確保するためには、高性能の機器が求められます。アイソクラティックポンプまたはアイソクラティックモードで動作するグラジエントポンプが適しているため、示差屈折率 (RI) 検出器のほか、一般的な UV または DAD 検出器も使用できます。特に RI 検出器を使用する場合は、ベースライン安定性を確保するために、移動相のオンラインデガッサやカラムコンパートメントを使用することを強くおすすめします。

困難な溶媒条件でも高い堅牢性と信頼性を実現

生体分子の分析では、2 M NaCl や 8 M 尿素など塩濃度の高い緩衝液や、pH が 1 ~ 13 までの範囲で極端に高い (または低い) 緩衝液が一般に使われます。これは、LC 機器にとってきわめて厳しい条件です。厳密に設計された 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC は、こうした困難な移動相条件にも簡単に対応することができます。送液システムに耐腐食性の高いチタンを採用し、サンプル流路での金属接触を一切排除することで、堅牢性のきわめて高い機器を実現しています。サンプルだけでなく、機器への投資も保護されます。検出器についても、生体分子の分離用に設計されているため、タンパク質の分析結果やピーク形状、回収率に影響をおよぼすことはありません。

タンパク質の変性を防止

タンパク質は熱により変性することがあります。サンプルの完全性を維持するためには、LC 流路全体でサンプルの温度を一定に保つことが重要です。不活性サンプルループとセラミックニードルを採用した Agilent バイオイナートオートサンブラなら、サーモスタットを追加することによりサンプルを冷却できます。また、カラムコンパートメント用のバイオイナート熱交換器が、温度を一定に保ちます。アジレントは、さまざまな条件でタンパク質を確実に分析していただけるよう、幅広いバイオイナートフローセルを用意しています。アジレントのフローセルの詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。



Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム



RFID タグ付きのバイオイナートフローセル、10 mm、13 μ L (p/n G5615-60022)

新たな知見を引き出すソフトウェアソリューション

サイズ排除クロマトグラフィーを用いた分析には、次のソフトウェアを役立てることができます。

- **HPLC ソフトウェア:** Agilent OpenLAB CDS ChemStation ソフトウェアは、クロマトグラフィーデータの採取、検証、および整理や、定量分析に役立ちます。
- **GPC/SEC ソフトウェア:** Agilent GPC/SEC システムに付属しています。分子量からさらに多くの情報を引き出すことができます。
- **Buffer Advisor ソフトウェア:** 塩および pH グラジエントをすばやく簡単に作成できます。メソッド開発に伴う緩衝液の調製、緩衝液の混合、pH スカウティングといった煩雑で誤差を生じやすい手順を排除します。



包括的な分子特性分析

SEC では、天然由来の分子 (多糖、デンプンなど) や合成ポリマー (ポリエチレングリコールやポリエチレンオキッド) など、高分子の分析対象成分の平均分子量を測定できます (図 4)。タンパク質や、ワクチンなど複雑なサンプルの場合は、通常、専用ソフトウェアを用いたより高度なデータ解析が必要になります。SEC に適切な検出器を使用すれば、サンプルの構造に関する有益な情報が得られます。使用可能な検出器の詳細については、17 ページを参照してください。

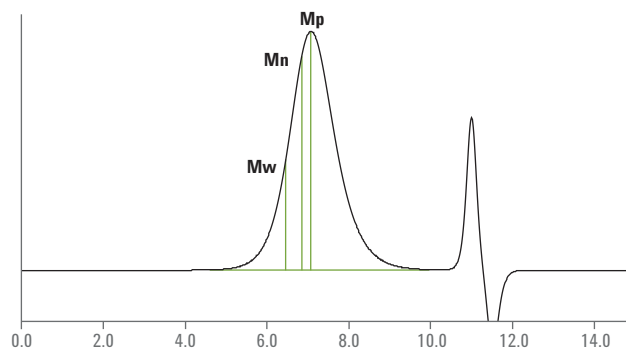
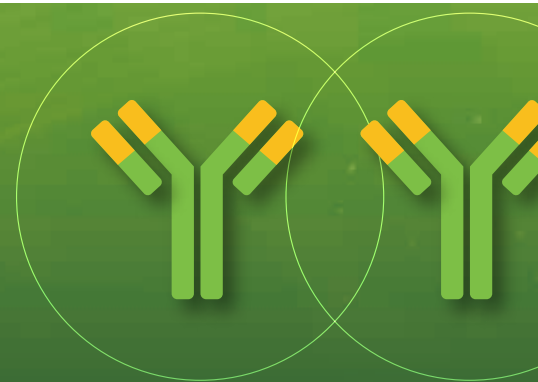


図 4: SEC による多糖の分離と Mw、Mn、および Mp

サイズ排除クロマトグラフィーにおける 検討事項



サンプル前処理

サイズ排除クロマトグラフィーのサンプル前処理は、HPLC メソッドのタンパク質分析と同様です。最も重要な点は、サンプルを溶離液に溶解させる必要がある点です。できれば移動相そのものに溶解させるのが理想的です。他の HPLC モードに比べて、カラムサイズが大きいほか、比較的流量が低いために線速度が低くなることから（後述の「カラムのサイズ」参照）、サンプル濃度および注入量を通常よりも高く（多く）する必要が生じることがあります。カラムの損傷を防ぐため、使用前にサンプルをろ過するか遠心分離し、微粒子を除去することをおすすめします。ただし、ろ過ではサンプルの溶解性の低さを解消することはできません。溶解性が低い場合は、別の溶離液を使用する必要があるでしょう。

サンプル前処理を効率化するためには、サンプルの溶解にあたって、サンプルそのものの性質が変わらない手法を用いることも重要です。タンパク質によっては、凍結融解サイクル、極端な温度、超音波処理、濃度などのストレス条件下で、凝集（二量体やさらに分子量の大きい多量体の形成）や解離（より小さい分子量のサブユニットの形成）が生じます。詳細については、5 ページのメソッド開発ガイドを参照してください。

Captiva 低タンパク質結合フィルタ

どのようなサンプル前処理を行う場合でも、低タンパク質結合特性を備えたフィルタによるサンプルのろ過は効果があります。

アジレントの PES フィルタは、タンパク質に関連するろ過において、一貫性のある優れた低タンパク質結合特性を発揮します。一般に、LC 分析には、PVDF メンブレンより PES フィルタメンブレンの方が適しています。アジレントの PES フィルタは、一般的な LC 溶媒で PVDF と同様に使用でき、タンパク質との結合の低さとろ過効果についてはそれ以上に優れています。詳細については、www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。



Captiva PES フィルタ

直径 (mm)	ポアサイズ (μm)	認証	ハウジング	部品番号
4	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5095
4	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5094
15	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5096
15	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5097
25	0.2	LC/MS	ポリプロピレン	5190-5098
25	0.45	LC	ポリプロピレン	5190-5099

カラムの選択

カラムのサイズ

SEC カラムは通常、他のクロマトグラフィーに用いられるものよりも大幅に長くなります。また、比較的低い流量 (低い線速度) で使用されます。標準的な SEC カラムのサイズは 7.8 x 300 mm、標準的な流量は 1.0 mL/min です。これに対して、逆相カラムのサイズは 2.1 または 4.6 x 150 mm、線速度は SEC の 2 ~ 3 倍です。その理由は、カラムサイズの効果ではなく、SEC の分離メカニズムにあります。

SEC では、他のクロマトグラフィーテクニックで一般に見られるような、固定相への吸着や相互作用に起因するサンプル濃度の上昇は生じません。そのため、SEC で分析するサンプルは注入量が多く (5 ~ 20 μ L)、注入するサンプル濃度も一般に高くなります (1 ~ 4 mg/mL)。ランタイムは通常、1 カラムあたり 10 ~ 12 分 (一般的な 7.8 x 300 mm カラム、流量 1.0 mL/min を想定) で、ピーク幅は一般に太くなります。そのため、高いデータ採取レートは必要ありません。タンパク質凝集の比較や定量では、HPLC ソフトウェアを使用します。多分散ポリマーの分子量分布情報を得るためには、専用の SEC ソフトウェアを使用します。

通常のキャリブレーションにより、選択したカラムの特性を理解することがきわめて重要です。その際に、どのポアにも浸透できない十分に大きな分子を標準液に含めることにより、そのカラムの排除限界を測定することができます。同様に、ポア構造の奥まで浸透する十分に小さな分子を使用することで、カラムの浸透限界を測定できます。実施する予定の分離がこれら 2 つの限界の間に収まるようにする必要があります。サンプルのクロマトグラムに、排除された物質や浸透限界点で溶出する物質のピークが現れた場合は、異なるポアサイズのカラムを使用することを検討してください。

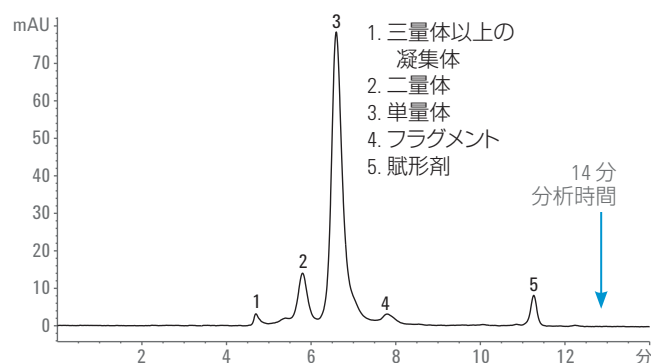
短いカラムによる分析の高速化

分析に求められる分離能を得るためには、通常は長さ 300 mm のカラムを使う必要があります。しかし、分離スピードを上げたい場合は、それよりも短いカラムの使用を検討することも可能です。長さ 150 mm のカラムを使えば、分離の所要時間は半分になりますが、分離能は低下します。ハイスループットが求められる場合は、背圧の限界に達するリスクを冒さない範囲の高流量で短いカラムを使用すれば、分析時間をさらに短縮することができます。図 5 を参照してください。

カラム: AdvanceBio SEC、7.8 x 300 mm

流量: 1.0 mL/min

サンプル: ポリクローナル IgG



カラム: AdvanceBio SEC、7.8 x 150 mm

流量: 2.0 mL/min

サンプル: ポリクローナル IgG

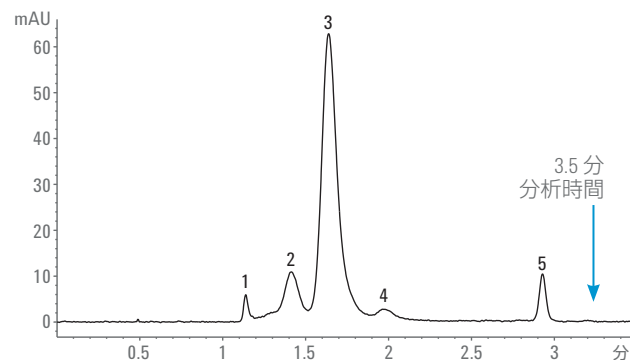


図 5: 300 mm カラムと 150 mm カラムを用いた分析結果の比較による時間短縮効果の実証



カラムメディアの選択

分離に用いる移動相 (水、緩衝液、有機溶媒) へのサンプルの溶解性を確認したら、分子の種類やサイズに適したサイズ排除カラムを選択します。ヘパリン、デンプン、セルロースなどの分子量分布の広い高分子では、ポリマーベースの充填剤を用いたカラムがしばしば使われます。特定の分子量を持つタンパク質や分子には、シリカベースの固定相が最適です (表 1)。

覚えておくべき重要な点は、タンパク質には多くのアミノ酸が含まれ、その側鎖官能基が酸性、塩基性、疎水性、中性/親水性など、さまざまに異なることです。シリカカラムとの相互作用を防ぐためには、移動相に緩衝液を用いる必要があります。

アジレントでは、各アジレント製カラムに適した分子量範囲を提案しています。分析対象成分の分子量がその範囲の中間あたりに収まるカラムを選択することをおすすめします。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

アプリケーション	アジレントのカラム	特徴
タンパク質		
SEC-UV/DAD または LS による mAb、タンパク質、およびペプチドの分析	Agilent AdvanceBio SEC	サンプルの再分析が不要な優れた分離能と、分析時間を短縮するスピードを実現する最新の革新技術を搭載。ラボの生産性を高めます。
SEC-MS による mAb、タンパク質、およびペプチドの分析	Agilent Bio SEC-3	MS 検出に適した安定したベースラインを実現します。
生体高分子や、複数の分子量の成分が含まれるサンプル	Agilent Bio SEC-5	多様な分析対象成分に対応できる幅広いポアサイズオプション (100 Å、150 Å、300 Å、500 Å、1000 Å、2000 Å)。
球状タンパク質、抗体	ProSEC 300S	高塩濃度条件下でのタンパク質分析のためのシングルカラムオプション。
タンパク質、球状タンパク質	ZORBAX GF-250/450	従来型製品。使用の際は、USP L35 にもとづくプロトコルを使用する必要があります。
水溶性分析対象成分		
低分子量ポリマーおよびオリゴマー、オリゴ糖、PEG、リグニンスルホン酸	2 本または 3 本の PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH 8 μm ✓ PL aquagel-OH 20 5 μm ✓ PL aquagel-OH MIXED-M 8 μm	PL aquagel-OH 分析シリーズは、pH 範囲 2 ~ 10 に対応し、有機溶媒 (最大 50 % のメタノール) を使用できます。また、最大 140 bar (2030 psi) の機械的安定性を持ち、カラム使用圧力は低めです。
多分散生体高分子、多糖、セルロース誘導体	2 本または 3 本の PL aquagel-OH ✓ PL aquagel-OH MIXED-H 8 μm ✓ PL aquagel-OH 60/50/40 8 μm	
超高分子量ポリマー、ヒアルロン酸、デンプン、ゴム	PL aquagel-OH 60/50/40 15 μm を連結	

表 1: アプリケーションおよびサンプルサイズに応じたカラムの選択



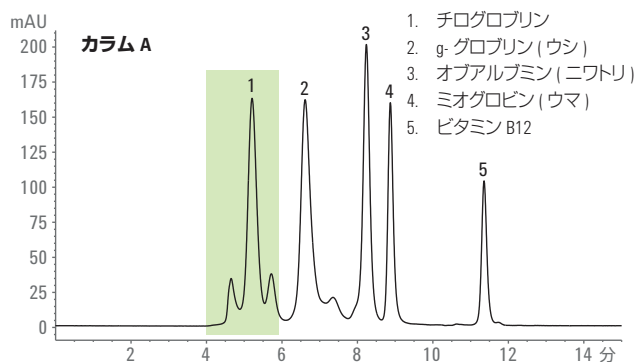
タンパク質凝集体など生体分子の分離に適した Agilent Bio SEC カラムと、多糖の分子量測定など天然ポリマーの分析に適した PL Aquagel-OH カラム

ポアサイズ

タンパク質は、他の生体高分子に比べて小型で密集した構造を持っているため、最初を選択するカラムとしては、ポアサイズが 300 Å のものが適しています。図 6 では、ポアサイズの異なるカラムについて、5 種類のタンパク質の混合参照標準とポリクローナル

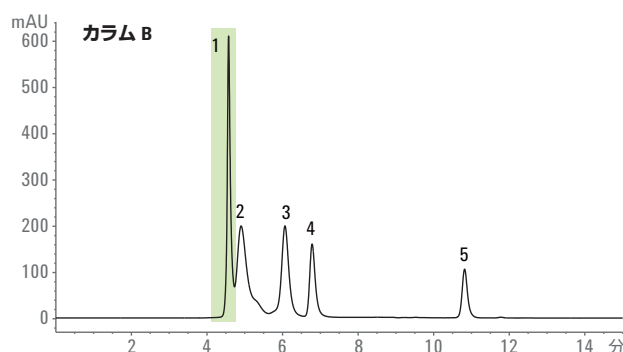
IgG サンプルの分離能を比較しています。ポアサイズによる分離能への影響は明らかです。ポアサイズ 300 Å では、最も大きいタンパク質であるチログロブリンおよび IgG 二量体が分離されています。一方、小さいポアサイズでは、最も大きいタンパク質は排除され、分離されていません。

BioRad ゲルろ過標準混合物



カラム A: AdvanceBio SEC 300 Å
4.6 x 300 mm、2.7 μm (p/n PL1580-5301)

カラム B: AdvanceBio SEC 130 Å
4.6 x 300 mm、2.7 μm (p/n PL1580-5350)



機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

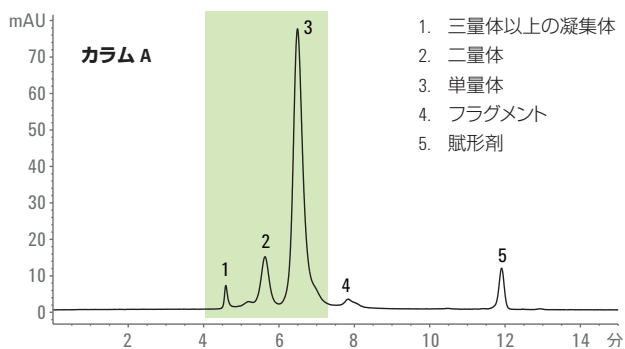
移動相: 150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0

流量: 0.35 mL/min

検出器: UV、220 nm

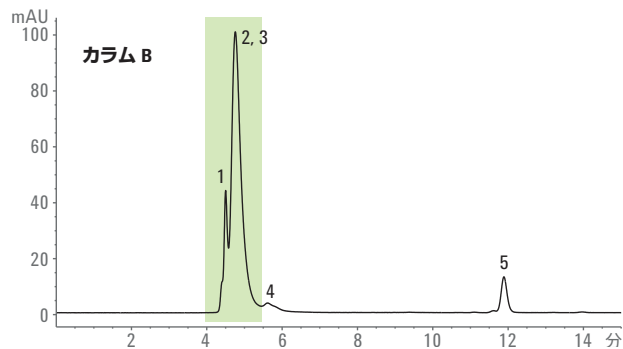
サンプル: BioRad ゲルろ過標準混合物

ポリクローナル IgG の分離



カラム A: AdvanceBio SEC 300 Å
4.6 x 300 mm、2.7 μm (p/n PL1580-5301)

カラム B: AdvanceBio SEC 130 Å
4.6 x 300 mm、2.7 μm (p/n PL1580-5350)



機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

移動相: 150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0

流量: 0.35 mL/min

検出器: UV、220 nm

サンプル: ポリクローナル IgG

図 6: BioRad ゲルろ過標準およびポリクローナル IgG の分離における各種ポアサイズの比較。緑色の枠内は、2 種類のポアサイズによる分離能の違いを示しています。分子量の大きいタンパク質の分析には、より大きいポアサイズが必要です。

SEC 浸透範囲の検証

SECによるタンパク質の分離メカニズムでは、溶質の分子量ではなく、溶液中での分子サイズにもとづいて分離が行われる点を理解しておくことが重要です。タンパク質/ペプチドの検量線とブルラン/多糖および PEG/PEO の検量線を比較すると(図 7)、このことがよくわかります。キャリブ rant がブルラン/多糖および PEG/PEO の検量線は非常によく似ていますが、タンパク質/ペプチドの検量線は、位置と形状が異なっています。

タンパク質は、3次元構造を有する複雑なペプチド鎖で構成されています。この構造は、pH やイオン強度など、周囲の影響を受けます。ペプチド鎖は、周囲の環境に最も適した形状に変化するため、それに伴って構造やサイズが変化することがあります。

溶出時間が分子量ではなく分子サイズによって決まることは、図 8 を見ればわかります。各キャリブ rant の分子量はどれも 50,000 前後ですが、リテンションタイムは大きく異なっています。PEG は 7 分直後に、また多糖は 7.5 分直後に溶出していますが、タンパク質は約 9.5 分で溶出しています。

この結果は、SEC 分離メカニズムが分子量ではなく実際のサイズにもとづいていることを明らかに示しています。そのため、検量線を使用する際には、使用したキャリブ rant を明確にすることが重要です。例えば、「分析対象サンプルは分子量 50,000 に相当するブルラン/多糖」のように記述するとよいでしょう。この相対的な影響を解消する高度な検出器については、17 ページを参照してください。

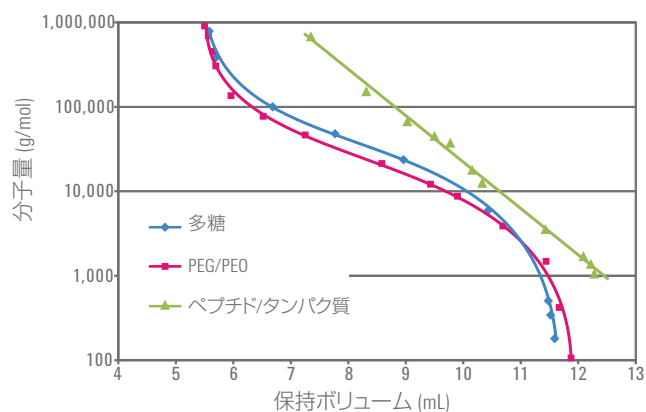


図 7: 3 種類のキャリブ rant で作成した検量線の比較

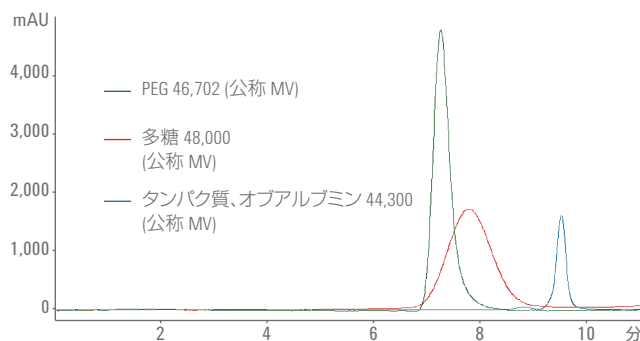


図 8: 同様の分子量を持つキャリブ rant のクロマトグラムの重ね表示

130 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準

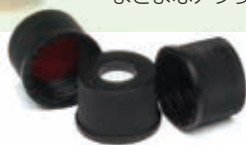
(p/n 5190-9416、130 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準、2 mL バイアル入り)

厳選された 5 種類のタンパク質 (オブアルブミン、ミオグロビン、アプロチニン、ニューロテンシン、アンギオテンシン II) からなるタンパク質混合液です。130 Å の Agilent AdvanceBio サイズ排除カラムのキャリブレーション用に設計されています。この標準を用いて定期的にカラムのキャリブレーションを実施することにより、タンパク質の精製や分析などさまざまなアプリケーションでシステムの性能を最適な状態に保つことができます。

300 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準

(p/n 5190-9417、300 Å AdvanceBio SEC キャリブレーション標準、2 mL バイアル入り)

厳選された 5 種類のタンパク質 (チログロビン、g-グロブリン、オブアルブミン、ミオグロビン、アンギオテンシン II) からなるタンパク質混合液です。300 Å の Agilent AdvanceBio サイズ排除カラムのキャリブレーション用に設計されています。この標準を用いて定期的にカラムのキャリブレーションを実施することにより、タンパク質の精製や分析などさまざまなアプリケーションでシステムの性能を最適な状態に保つことができます。



粒子径

粒子径もカラム選択における重要な考慮事項です。粒子径が小さいほど分離効率は高くなりますが、タンパク質が分解 (切断/変形) されるおそれがあります。図 9 は、3 μm の Agilent Bio SEC-3 カラムと 5 μm の Agilent Bio SEC-5 カラムの比較です。サンプルと溶離液を注意深く前処理しないと、背圧の上昇やカラムの詰まりといったリス

クが高くなります。ろ過により、不溶性物質や残屑を除去することを推奨します。また、ガードカラムやインラインフィルタを使用すれば、カラム寿命を延ばすことができます。

Agilent Bio SEC-3 と Agilent Bio SEC-5 の比較

モノクローナル抗体の分析

カラム:	Bio SEC-3、300 Å 7.8 x 300 mm、3 μm (p/n 5190-2511)
カラム:	Bio SEC-5、300 Å 7.8 x 300 mm、5 μm (p/n 5190-2526)
機器:	Agilent 1260 Infinity バイオイナート クォータナリ LC システム
移動相:	150 mM リン酸ナトリウム、pH 7
流量:	1 mL/min
検出器:	UV、220 nm
サンプル:	ヒトモノクローナル抗体

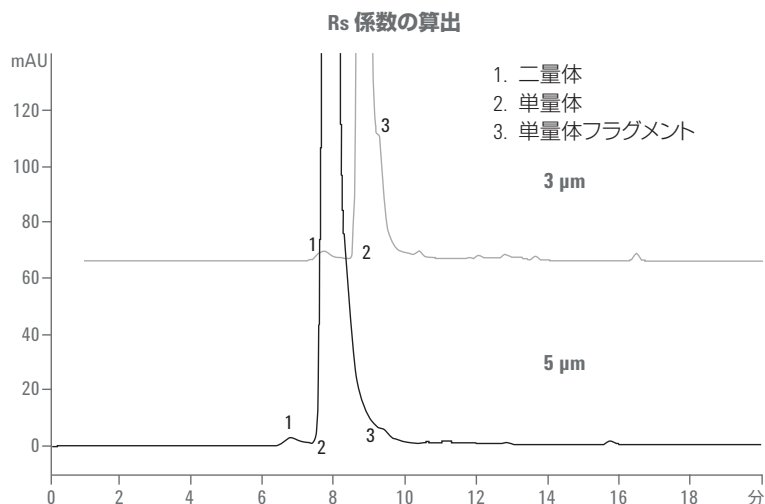


図 9: Agilent Bio SEC-3 カラムと Agilent Bio SEC-5 カラムの比較。
3 μm カラムの方が優れた分離能を示します。

カラム内径

カラム内径も重要な要素で、分析するサンプルの量に応じて決める必要があります。限られた量のサンプルしか使用できない場合は、内径 4.6 mm のカラム (流量 0.35 mL/min) が適しています。ただし、内径の小さいカラムを使用する場合は、過剰な分散や分離能の低下を避けるために、システムボリュームを最小限にすることが重要となります。

水溶性溶離液を使用する場合、SEC は非変性テクニックと見なされます。そのため、その後の分析に備えた複雑なサンプルの分離やサンプル成分の単離にきわめて有効です。21.2 mm 径の Agilent SEC-3 や SEC-5 製品のように内径の大きなカラムを使用すれば、HPLC 分析システムを用いたラボでの分取精製が可能です。



Agilent AdvanceBio SEC カラム 7.8 x 300 mm および 4.6 x 300 mm

メソッドパラメータ

流量

一部のアプリケーションでは、分析のスピードが重要となります。一般的な 300 mm カラムの代わりに 150 mm のものなど短いカラムを使用したり流量を高くすれば、分析時間を短縮することができます。ただし、その場合は分離能に悪影響がおよぶことがあります。SEC では、ポアを出入りする拡散を利用して、カラムを通過する間に異なる長さの流路を作り出しているためです。このようなリスクはありますが、図 10 に示すように、150 mm カラムを流量 2 mL/min で使用することにより、4 分未満で IgG の二量体と単量体の定量に十分な分離能が得られます。

カラム:	AdvanceBio SEC 300 Å, 7.8 x 150 mm、2.7 μm (p/n PL1180-3301)
溶離液:	150 mM リン酸緩衝液、pH 7.0
流量:	0.5、1.0、1.5 mL/min (52、102、152 bar)
検出器:	UV、220 nm
注入量:	5 μL
サンプル:	IgG (2 mg/mL)

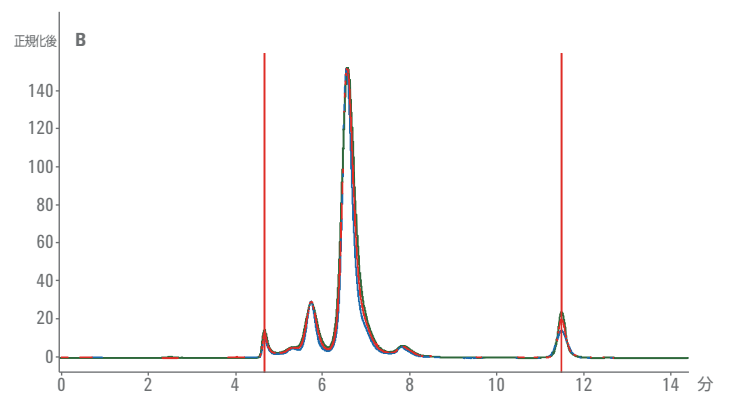
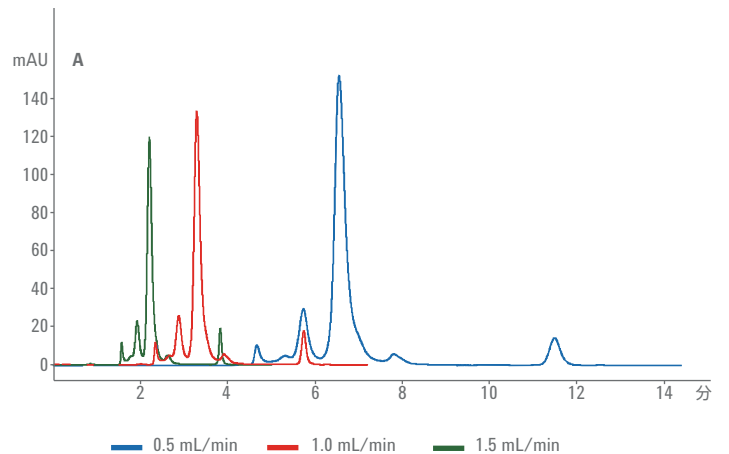


図 10: 流量を高くすることにより、分析時間が 12 分から 4 分に短縮されています (A)。リテンションタイムを正規化してクロマトグラムを重ね合わせると (B)、分離能はわずかに低下していますが、リテンションタイムは変わらないことがわかります。

SEC メソッドのトラブルシューティング

問題点	原因	解決策
回収率が予想よりも低い、またはピーク幅の広がり	親水性物質	少量 (10 ~ 20 %) の有機修飾剤 (アセトニトリルまたはメタノール) を移動相に添加する。
分子量にそぐわないタイミングでピークが現れる、またはピークテーリングが生じる	イオン性相互作用または塩基性タンパク質	イオン強度 (塩濃度) を 50 ~ 100 mM の範囲で高くする。リン酸緩衝液を追加する。
ピーク形状が悪い	非特異的な吸着	塩濃度を高くするか、Agilent 1260 Infinity/バイオイナートクォータナリ LC システムを使用する。
分析対象成分の保持力/分離能が低い	分子サイズに適さないポアサイズ	ポアサイズを確認する。詳細については、11 ページを参照。

移動相の選択

二次的な相互作用から生じる問題

望ましくない二次的な相互作用を避けるために、メソッドの最適化が必要となることがあります。そうした相互作用が生じると、分析対象成分の溶出が予想よりも遅くなったり、実際よりも低い分子量が測定されたりする可能性があります。このような問題は、移動相

の組成 (pH、イオン強度、有機修飾剤) をわずかに調整すれば解決することができます (図 11)。また、望ましい分離を実現するためには、ポアサイズの見直し、複数のカラムの連結、分析流量の低下、温度の変更などが必要となることもあります。

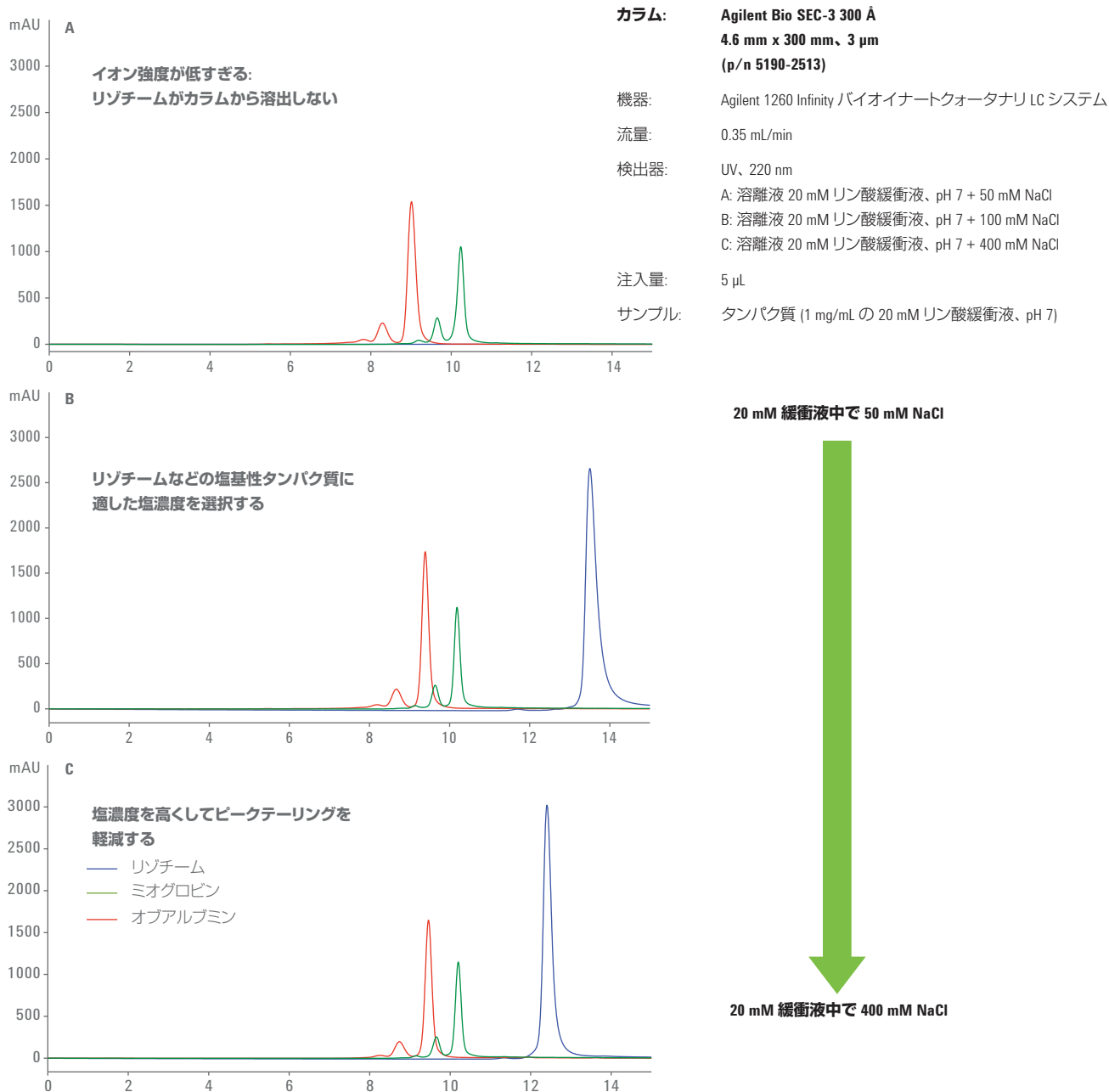


図 11: 目的とする分離に不適切なイオン強度の影響

キャリブレーション

カラムを選択したら、分子量のわかっている標準品を用いてキャリブレーションを行う必要があります。キャリブレーションは、カラムや移動相を変更するたびにやり直す必要があります。検量線は、分子量に対してリテンションタイムをプロットして作成します (図 12)。

分析対象となる分子に適した標準品を選ぶことがきわめて重要です。タンパク質分離の場合、タンパク質分子量標準品を使用します。多糖分離については、プルラン分子量標準品を使用する必要があります。

カラム: Agilent Bio SEC-5
7.8 x 300 mm、5 µm
(p/n 5190-2521)

機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートクォータナリ LC システム

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

流量: 1.0 mL/min

検出器: UV

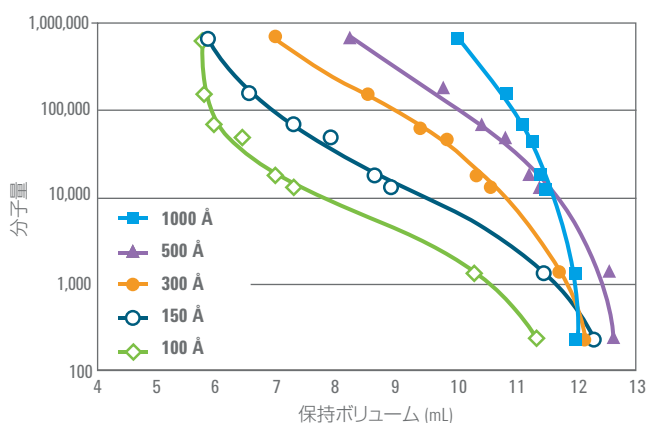


図 12: 分子量に対してリテンションタイムをプロットして得られた検量線

タンパク質	MW	保持ボリューム				
		1000 Å	500 Å	300 Å	150 Å	100 Å
チログロブリン	670,000	10.07	8.23	7.03	5.82	5.77
γ-グロブリン	158,000	10.88	9.80	8.57	6.55	5.79
BSA	67,000	11.13	10.44	9.44	7.29	6.00
オブアルブミン	45,000	11.28	10.83	9.89	7.90	6.40
ミオグロビン	17,000	11.44	11.28	10.42	8.66	7.05
リボヌクレアーゼ A	12,700	11.52	11.41	10.58	8.93	7.32
ビタミン B12	1,350	12.00	12.59	11.78	11.49	10.30
ウラシル	112	12.08	12.68	12.21	12.13	11.41

可能であれば、標準品は移動相に溶解してください。また、サンプルが完全に溶解するように注意を払う必要があります。溶液が濁っているように見える場合は、さらなる措置が必要です。注入前に、遠心分離やろ過により不溶物を除去してください。ただし、物理ブ

ロセスにより分子量組成が変化する可能性があるため、サンプルの溶解性を向上させる別の移動相条件を検討する必要があることもあります。



高度な検出テクニック

そのほかの SEC に関する考慮事項としては、検出器の選択があります。タンパク質の分離には、UV またはダイオードアレイ検出器 (DAD) を用いるのが一般的です。ペプチドおよびタンパク質の場合、最善の結果 (最高の感度) は通常、220 nm で得られます。ただし、一部の緩衝液や有機修飾剤については、低波長ではバックグラウンド吸光度が高くなる場合があります。その場合には、254 nm または 280 nm の波長が必要となるケースもあります。UV 検出の難点は、一部の分子が発色団を持たないことです。ただし、分析対象成分はアイソクラティック方式で溶出するため、代わりに RI 検出器を使

用することができます。高度な光散乱検出を追加すれば、SEC の性能が大幅に向上します。静的光散乱では、カラムのキャリブレーションや不要な相互作用に左右されずに、精密なモル質量を測定することができます。分子サイズを測定する動的光散乱により、それをさらに補完することが可能です。光散乱では、大きい分子に対する感度が向上するため、非常に低濃度の凝集体を検出することもできます (図 13)。クロマトグラフィー性能を低下させることなくこのような追加情報を得るには、デッドボリュームの小さい検出器を選ぶことが重要です。

カラム: Agilent AdvanceBio 300 Å、
7.8 x 300 mm、2.7 μm

機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナート
クォータリ LC システムと
Agilent 1260 Infinity マルチ検出器
GPC/SEC

移動相: 150 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0

流量: 0.8 mL/min

温度: 30 °C

検出器: UV、280 nm + RI + LS 90°

注入量: 5 μL

サンプル: モノクローナル抗体分解物

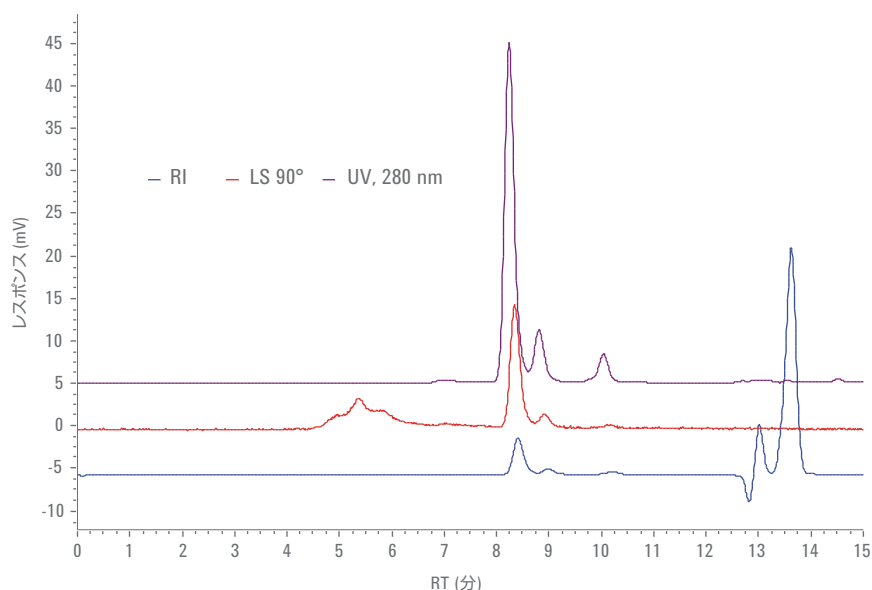


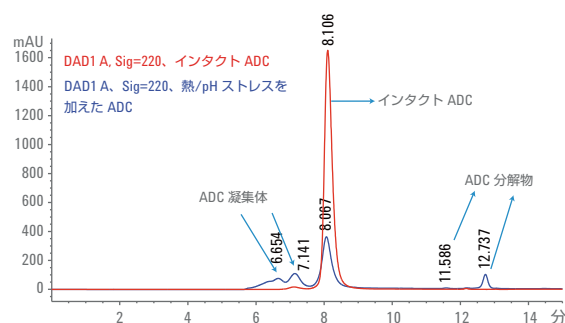
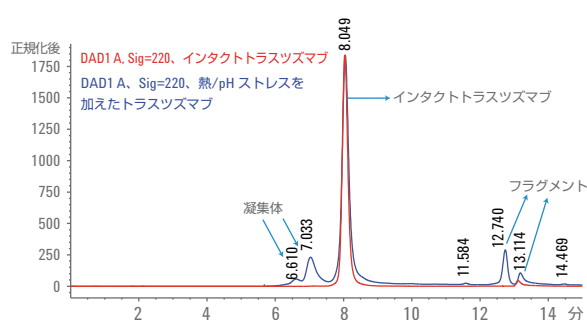
図 13: タンパク質分離において各種の検出器を用いた分析結果

複合タンパク質

治療用タンパク質は、発現、リフォールディング、ダウンストリーム処理、調合、滅菌、保管など、開発のあらゆる段階で凝集したり分解したりする可能性があります。凝集体/分解物は非常に低濃度ですが、バイオ医薬品の品質への影響は大きく、効能の損失、溶解性の低下、および免疫原性の増加につながる可能性があります。サイズ排除クロマトグラフィーは、タンパク質凝集体の特性解析の標準メソッドとして使用されており、規制機関への届け出や承認も必要となります。

該当部位への送達量を増加させ、半減期を延ばし、効能を高めるために、モノクローナル抗体などのタンパク質を複合化すること

ができます。ポリエチレングリコールなどの水溶性ポリマーをタンパク質と結合させると、薬理活性が高まり、血流中での半減期が延び、免疫原性が減少します。近年、薬物送達の標的化と治療効果の向上のためにモノクローナル抗体と細胞毒性剤を複合化した抗体薬物複合体 (ADC) への関心が高まっています。複合化後にも、バイオ医薬品と同じ凝集調査が必要になりますが、サンプルの特性が変化するため、SEC による分離が困難になる可能性があります。水系移動相を用いて抗体と ADC の両方を分析するには、AdvanceBio SEC のように非特異的な結合がほとんど生じないカラムが必要です。図 14 を参照してください。



カラム: AdvanceBio SEC 300 Å
7.8 x 300 mm、2.7 μm

機器: Agilent 1260 Infinity バイオイナートオータナリ LC システム

移動相: PBS、150 mM 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸ナトリウム、pH 7.4

TCC 温度: 室温

注入量: 10 μL

流量: 0.8 mL/min

検出器: UV、220 nm

図 14: 同じ水系移動相を用いて mAb とより疎水性の高い ADC を分析した結果

優れた結果を導き出すためのツール

www.agilent.com/chem/navigator

アジレントの LC カラムおよびサンプル前処理ナビゲータでは、アジレントの幅広いバイオカラムや低分子用カラムから、アプリケーションに最適なカラムを簡単にお選びいただけます。

このナビゲータでは、次の 4 つの条件から検索が可能です。

- 部品番号で: LC カラムおよびサンプル前処理製品のクロスリファレンスにより、最適なアジレント交換用部品が見つかります。



- 化合物で: ドロップダウンリストから選択します。
- USP メソッドで
- カラムで: メソッドにもとづいておすすめのカラムを提示します。

サンプル前処理

- できる限り、サンプルは移動相に溶解させてください。
- サンプルが濁っている場合は、移動相の条件を変更する必要があります。
- ろ過や遠心分離によりサンプルの濁りを解消することができますが、このプロセスによってサンプルの分子量組成が変化することがあります。
- サンプルを溶解させるために、緩やかな加熱、攪拌、超音波処理などを使用することもあります。分子量組成が変化する可能性があるため注意が必要です。
- 保管中にサンプルが変化しないように注意してください。
- サンプルは用時調製し、できる限りすぐに分析してください。
- 緩衝液で細菌が急速に繁殖することがあります。
- 高濃度で調製したサンプルは、経時的に変化し、凝集や沈殿が生じることがあります。



カラムの選択

- サンプルの完全性を確保するために、SECは長いカラムを用いてゆっくりと実施します。
- カラムの長さは、通常 250 mm または 300 mm です。
- 標準的な流量は、内径 7.5 または 7.8 mm カラムの場合は 1.0 mL/min、内径 4.6 mm カラムの場合は 0.35 mL/min です。
- 生体高分子アプリケーションでは、分離能を高めるために、しばしば複数のカラムを連結して使用します。
- 小さい粒子径を使用すれば、タンパク質アプリケーションの分離能が高まります。
- 粒子径の小さい 150 mm カラムで分離すると、分析時間を短縮できます。

カラムメディアの選択

- 分析対象成分との間で非特異的な相互作用が起きないカラムメディアを選択する必要があります。
- ペプチドおよびタンパク質の分析には、シリカベースの充填剤を使用します。
- 多糖類など、分子量分布の広いサンプルの分析には、ポリマーベースの充填剤を使用します。



カラムのパラメータ

- **ポアサイズ** – サンプルの分子量範囲に応じて決定します。サンプル成分が排除されるものは避け、必要な分離領域で最大限のボリュームが得られるものを選択します。
- **粒子径** – 粒子径が小さいほど分離能が高まります (ただし、背圧も高くなります)。
- **カラムの長さ** – 分離能と分析時間を考慮し、両者の間の妥協点を探ります。
- **カラム内径** – カラムの内径が小さいほど、溶媒消費量と注入量が少なくなります。

移動相

- イオン性の相互作用を防ぐために、移動相に緩衝液/塩を加える必要がありますが、多く加えずと、疎水性相互作用が生じる可能性があります。
- 分解/凝集などを避けるために、分析対象成分を変化させないようにしてください。
- 移動相は用時調製し、すぐに使用してください。低濃度の緩衝液を室温で保管すると、細菌が急速に繁殖します。
- 緩衝液の消費期限は、非冷凍状態で 7 日未満です。
- 使用前にろ過し、水 (可能性低) や緩衝液塩 (可能性高) 中の微粒子を除去してください。
- シリカカラムで高 pH のリン酸緩衝液 (特に高温の場合) を使用すると、カラム寿命が大幅に短くなる可能性があります。

アジレントの SEC 用バイオカラムの詳細については、

www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

優れた結果を得るためのパートナー

増え続ける課題に対処するためには、的確な答えが必要です。アジレントのソリューションを使用することで、革新的な疾病研究、創薬の加速化、開発および製造の信頼性向上が可能になります。

アジレントのバイオ医薬品ソリューションの詳細

agilent.com/chem/jp

詳細情報

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本資料掲載の製品は、すべて研究用です。本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2015

Printed in Japan

November 1, 2015

5991-3651JAJP



Agilent Technologies