

SEC 分析での溶離液の選択はこれで決まり！

(文献紹介)

試料と SEC カラムとの相互作用を起こさない溶離液の評価手順



サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による試験法の開発では、以下の表に示す項目を確認します。中でも分析種あるいは分析対象成分とカラム充填剤との相互作用を起こさない溶離液を選択することが重要です。

確認すべき項目	具体的な分析項目、内容
試験法の目的	目的物の純度、不均一性（凝集体、分解物）、不純物、目的物と他成分の分離能
	特異性/選択性、可動範囲、真度および精度、頑健性など、試験法としての妥当性を確認
目的物・試料の物性	分子量、多量体の有無、イオン性・等電点(pI)、疎水性、金属配位性、活性、可能な検出法
カラム部材、充填剤	目的物の物性、分子量から、カラムグレード（分画範囲、カラム部材、充填剤）を選定
溶離液の条件	カラムと試料の相互作用を起こさない溶離液；バッファー種、pH、塩、有機溶媒、安定剤
	実験計画法(DoE)や解析ソフトウェアの使用、人工知能(AI)の利用
カラム寿命 (試料注入回数)	試料の性状、溶離液条件に依存（分析時に10%以上の性能低下が見られれば要注意）
	一般に200~500回注入、UHPLCカラムでは100~500回注入可能
	ガードカラムの装着が寿命を延ばす
カラムの 3ロットバリデーション	溶離液が確定した後に、品質管理としての試験法の堅牢性を確認
	要求があれば、弊社から3ロットのカラムを提供可能

SEC におけるカラムグレードや溶離液の選択については、既に本テクニカルノート（裏面参照）でも紹介しています。試料と SEC カラムが二次的相互作用を起こさない溶離液として、基本的には静電的相互作用および疎水性相互作用について検討し、適切な溶離液を選択することが重要です。

文献（総説）紹介

V. D'Atri et al., Size exclusion chromatography of biopharmaceutical products: From current practices for proteins to emerging trends for viral vectors, nucleic acids and lipid nanoparticles, J. Chromatogr. A, 1722 (2024) 464862, CC BY, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464862>

(要旨)

この総説では、SEC の歴史、SEC の充填剤および溶離液の選択、SEC の最新技術（カラム、充填剤の物性、新規な検出器の応用やリサイクル SEC、多次元分析など）が解説されています。また抗体医薬品のほか、新モダリティとして核酸、ウイルス、脂質ナノ粒子(LNP)の SEC 応用の可能性と限界について述べられています。

また Decision Tree を用いて SEC 分析における試料とカラムの相互作用を無くす溶離液の基本的な選択手順が報告されています（裏面の図を参照）。

まず試料の物性、注入量等に基づきカラム部材、カラムサイズ、グレード（充填剤）を選択し、SEC 溶離液として、りん酸緩衝生理食塩水(PBS)を選択します。この溶離液と、以下の溶離液の分析結果を比較します。

- 1) PBS + 5 % アセトニトリル(ACN)またはイソプロピルアルコール(IPA)（疎水性相互作用の有無の確認）
- 2) PBS + 0.1 mol/L KCl（静電的相互作用の有無の確認）
- 3) PBS + 5 % ACN または IPA + 0.1 mol/L KCl（疎水性かつ静電的相互作用の両方を確認）

分析結果に違いがなければ、試料とカラムとの相互作用は無いものとして、溶離液を確定します。もし、分析結果に違いが出た場合は、より強い効果で相互作用を無くす溶離液 A)~C)で再度、分析比較します。その結果に差異がなければ、試料とカラムには弱い相互作用があるため、溶離液 1)~3)のいずれかの溶離液を選択します。しかし分析結果が異なるようであれば、カラム溶離液のさらなる検討を続け最適化を図ります。

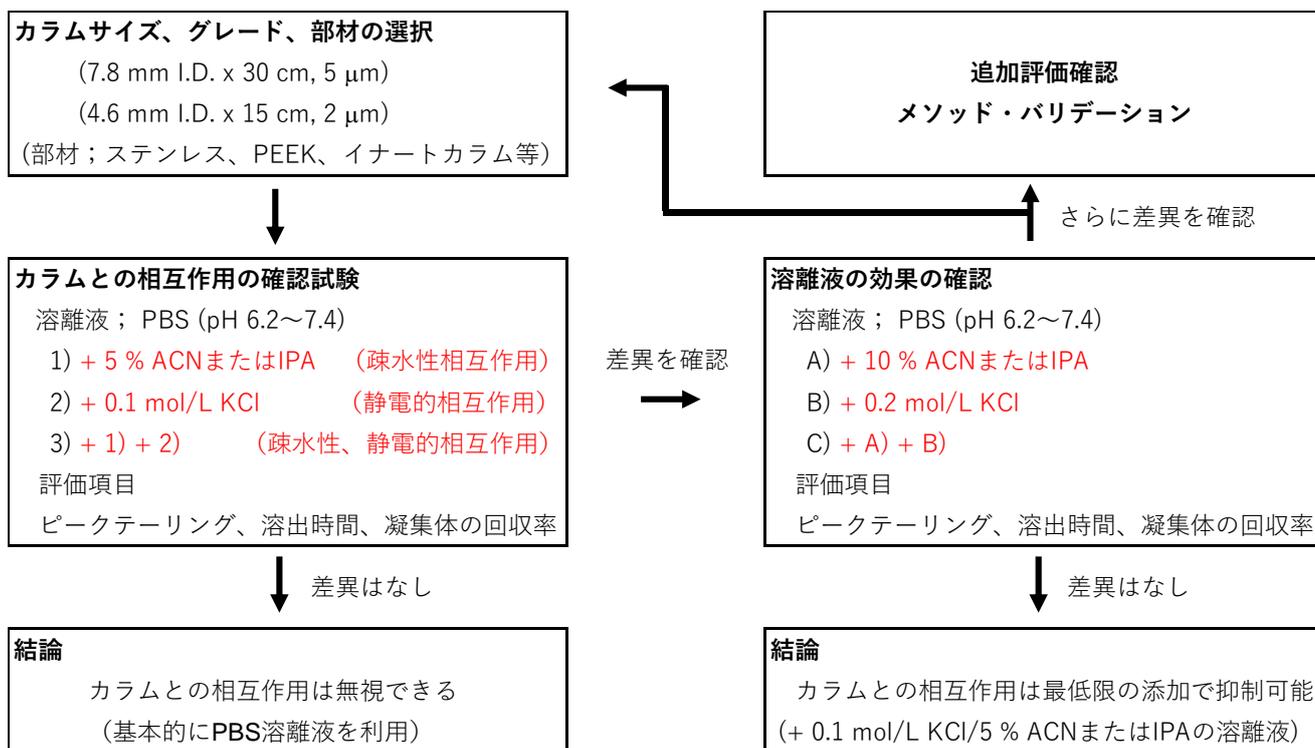


図 SEC 溶離液における試料とカラムの疎水性および静電的相互作用を起こさない溶離液の選択手順*

(*図は、文献データをもとに一部改変)

関連文献

- ・ V. D'Atri et al., Size exclusion chromatography of biopharmaceutical products: From current practices for proteins to emerging trends for viral vectors, nucleic acids and lipid nanoparticles, J. Chromatogr. A, 1722 (2024) 464862, CC BY, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464862>
- ・ A. Goyon et al., Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3μm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins, J. Chromatogr. A., 1498 (2017), pp. 80-89, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.056>
- ・ S. Fekete et al., Investigating the secondary interactions of packing materials for size-exclusion chromatography of therapeutic proteins, J. Chromatogr. A, 1676 (2022) 463262, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463262>

●SEC カラムの選択、溶離液に関するテクニカルノート

- 1) テクニカルノート TSKgel No. 1、SEC カラムを性能アップしよう！
- 2) テクニカルノート TSKgel No. 21、たんぱく質、核酸の SEC 分離はこれで決まり！
- 3) テクニカルノート TSKgel No. 22、細胞外小胞 (EVs) の SEC 分離はこれで決まり！
- 4) テクニカルノート TSKgel No. 27、脂質ナノ粒子(LNP)の SEC 分析はこれで決まり！
- 5) テクニカルノート TSKgel No. 28、試料が吸着する場合の SEC 溶離液は、これで決まり！

※たんぱく質、ペプチド、核酸等の SEC 分離に関する技術資料は、弊社ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/litjp> からアクセスできます



TOSOH

※“TSKgel”は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

※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) 6636-3733 〒104-0028 東京都中央区八重洲2-2-1
 大阪支店 営業部 ☎ (06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9
 名古屋支店 営業部 ☎ (052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7
 福岡支店 ☎ (092) 710-6694 〒812-0011 福岡市博多区博多駅前3-8-10
 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

お問い合わせe-mail tskgel@tosoh.co.jp

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>