

テクニカルレポート No.34

FlexFire SECカラムのアプリケーション

1. はじめに

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、化合物のサイズによって分離させることを可能とします。SECカラムはバイオ医薬品分析の分野でも使用されることが多く、単量体の他、その凝集体までもを適切に分析できることが求められています。

本レポートでは新たにラインナップした「FlexFire SEC」のカタログに掲載しきれなかったアプリケーションを収載しています。

新たに開発されたシリカゲルを採用した「FlexFire SEC」を是非、お試しください。

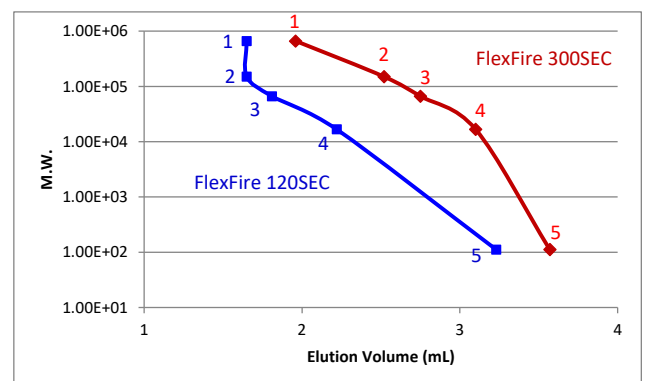
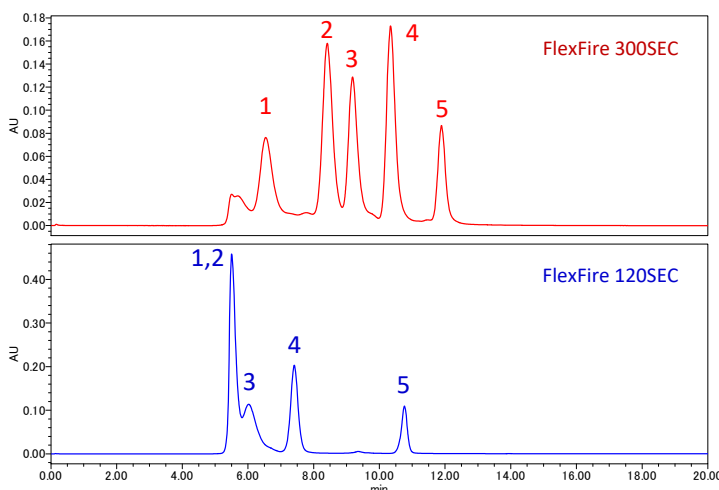
2. 分子量でカラムを選択

FlexFire SECには分子量に合わせて2種類のカラムが選択できます。

- ・ FlexFire 300SEC ⇒ 高分子化合物向け
- ・ FlexFire 120SEC ⇒ 低分子化合物向け

これら2種類のカラムを使い分けることで最適な分離を得ることができます。

ターゲット：高分子化合物



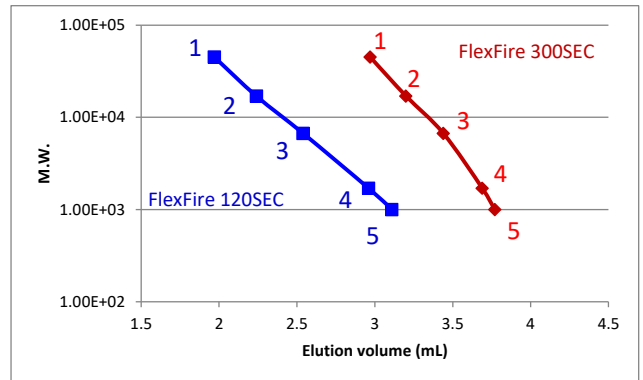
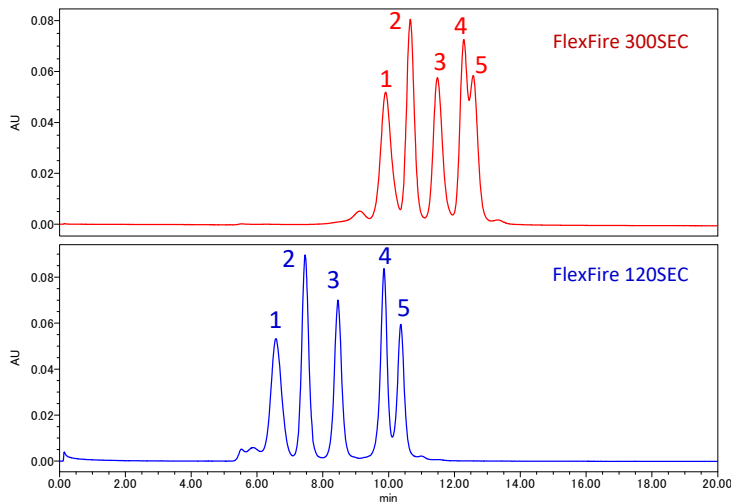
↑ 本データにおける校正曲線

Conditions:

Column: FlexFire 300SEC, 5 μ m 4.6x250mm
FlexFire 120SEC, 5 μ m 4.6x250mm
Mobile Phase: 100mM Potassium Phosphate Buffer pH7.0 + 200mM NaCl
Flow rate: 0.3mL/min
Temperature: 30°C
Detection: UV280nm

Sample: 1. Thyroglobulin (M.W. 660,000)
2. IgG (M.W. 150,000)
3. Bovine Serum Albumin (M.W. 66,400)
4. Myoglobin (M.W. 16,700)
5. Uracil (M.W. 112)
※Waters BEH200 SEC ProteinStandard Mix
Injection volume: 10 μ L
System: Waters alliance e2675

ターゲット：低分子化合物



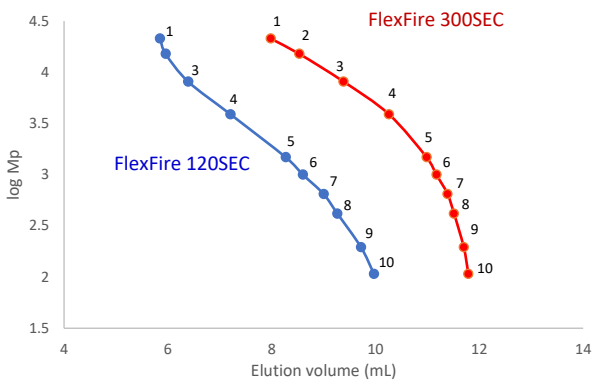
↑本データにおける校正曲線

Conditions;

Column: FlexFire 300SEC, 5 μ m 4.6x250mm
 FlexFire 120SEC, 5 μ m 4.6x250mm
 Mobile Phase: 100mM Potassium Phosphate Buffer pH7.0 + 200mM NaCl
 Flow rate: 0.3mL/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV280nm

Sample: 1.Ovalbumin (M.W. 45,000)
 2. Myoglobin (M.W. 17,000)
 3. Aprotinin (M.W. 6,700)
 4. Neurotensin (M.W. 1,700)
 5. Angiotensin II (M.W. 1,000)
 ※Agilent Technologies AdvanceBio SEC 130 Å protein Standard
 Injection volume: 10 μ L
 System: Waters alliance e2675

ポリエチレングリコール校正曲線



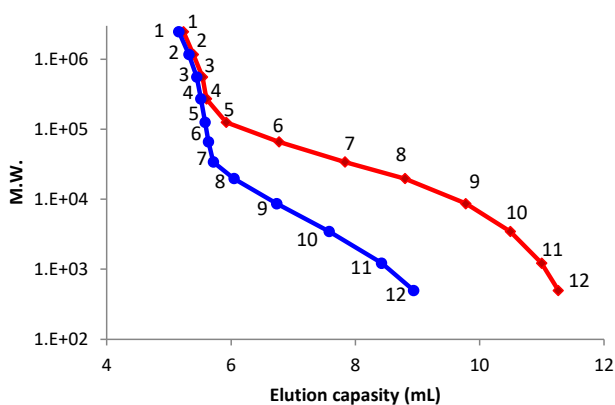
Conditions;

Column: FlexFire 120SEC, 5 μ m (7.8x300)
 FlexFire 300SEC, 5 μ m (7.8x300)
 Mobile phase: Water
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 30°C
 Detection: RI
 Sample: PEG each 0.01g/mL
 ※Agilent PEG calibration kit
 Injection volume: 20 μ L

Sample Information

Number	Mp	Mw/Mn
1	21,160	1.05
2	15,190	1.07
3	8,160	1.05
4	3,860	1.02
5	1,470	1.03
6	1,010	1.05
7	640	1.06
8	420	1.08
9	194	1.00
10	108	1.00

ポリスチレン校正曲線 ※このデータはカタログに掲載されています。



Conditions;

Column: FlexFire 120SEC, 5 μ m (7.8x300)
 FlexFire 300SEC, 5 μ m (7.8x300)
 Mobile phase: THF
 Flow rate: 1.0mL/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV254nm
 Sample: Poly(styrene)
 ※Sigma-Aldrich Polystyrene Standard
 ReadyCal Set
 Injection volume: 20 μ L

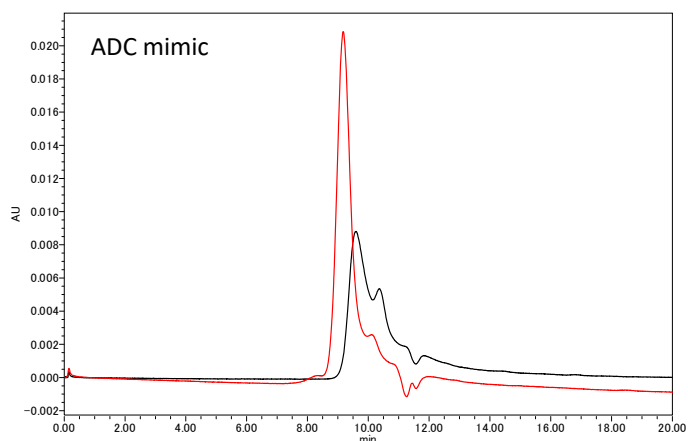
Sample Information

Number	Mw
1	2,460,000
2	1,170,000
3	554,000
4	271,000
5	125,000
6	66,000
7	34,000
8	19,700
9	8,670
10	3,460
11	1,220
12	498

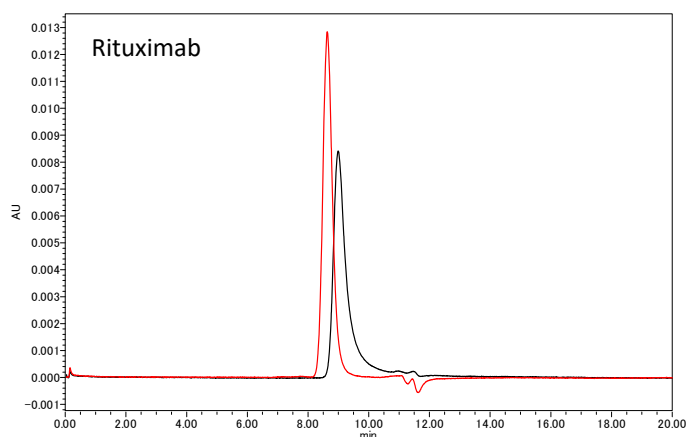


3. ピーク形状の改善

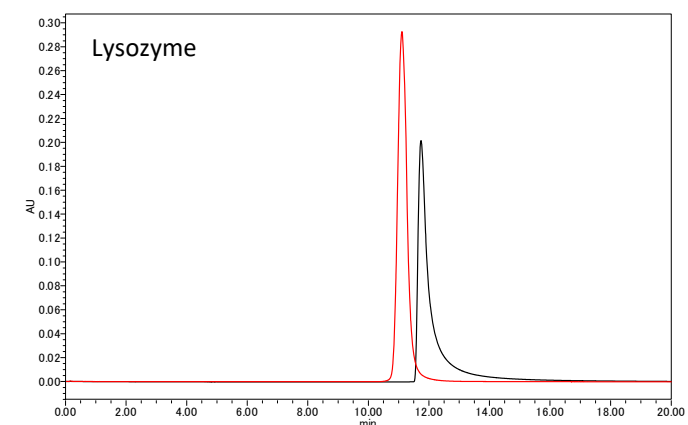
FlexFire SECは揮発性の緩衝溶液での分析が可能です。しかし、化合物によっては抑制効果が不足してしまいピークブロードやテーリングを起こします。弊社でもこのような化合物がいくつか出てきましたので、改善事例をご紹介します。

**Conditions;**

Column: FlexFire 300SEC, 5 μ m (4.6x250mm)
Mobile phase: 100mM HCOONH₄
100mM Phosphate Buffer (pH7.0) + 0.2M NaCl
Flow rate: 0.3mL/min
Temperature: 30°C
Detection: UV280nm
Sample: SIGMA Cycteine-Fluorophore Conjugate ADC mimic
Injection volume: 20uL
System: Waters alliance e2695

**Conditions;**

Column: FlexFire 300SEC, 5 μ m (4.6x250mm)
Mobile phase: 100mM HCOONH₄
100mM Phosphate Buffer (pH7.0) + 0.2M NaCl
Flow rate: 0.3mL/min
Temperature: 30°C
Detection: UV280nm
Sample: Rituximab
Injection volume: 20uL
System: Waters alliance e2695

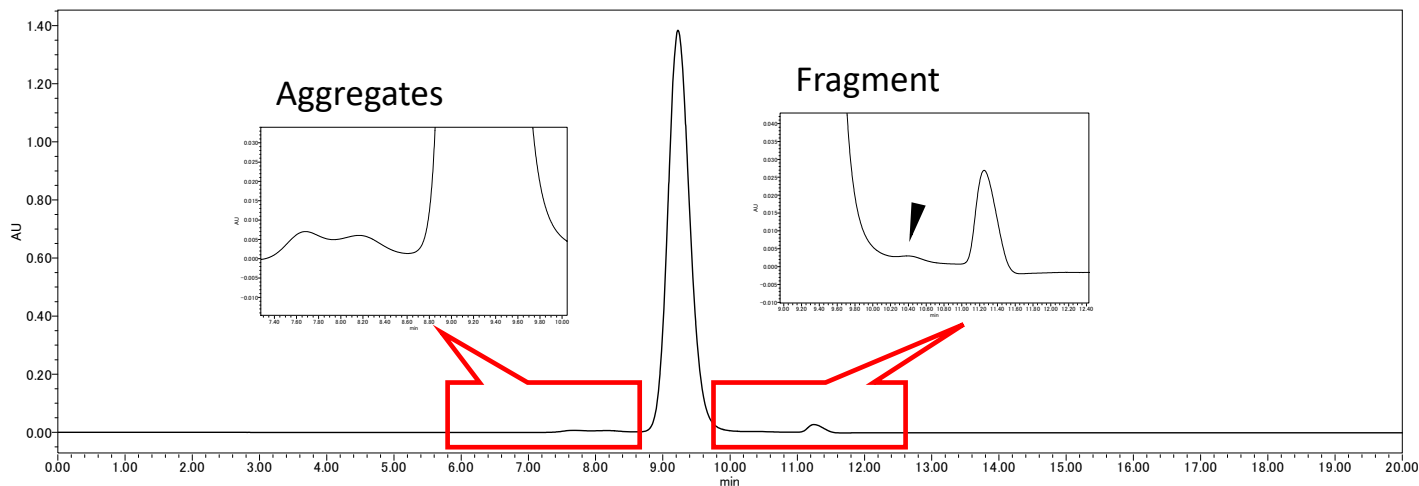
**Conditions;**

Column: FlexFire 300SEC, 5 μ m (4.6x250mm)
Mobile phase: 100mM HCOONH₄
100mM Phosphate Buffer (pH7.0) + 0.2M NaCl
Flow rate: 0.3mL/min
Temperature: 30°C
Detection: UV280nm
Sample: Lysozyme
Injection volume: 20uL
System: Waters alliance e2695

ファーストメソッドを100mMギ酸アンモニウムとし、ピーク形状や感度、凝集体の検出において良好な結果が得られない場合にはリン酸系の緩衝溶液で検討を行っててください。

また、メタルフリーもしくはこれに相当する添加剤も販売されてますので、カラム内の二次的作用なのか金属吸着なのかを見極めることも容易になりました。





Conditions;

Column: FlexFire 300SEC, 5 μ m (4.6x250mm)
 Mobile phase: 100mM Phosphate Buffer (pH7.0) + 0.2M NaCl
 Flow rate: 0.3mL/min
 Temperature: 30°C
 Detection: UV280nm
 Sample: Rituximab (10mg/mL)
 Injection volume: 10uL

System: Waters alliance e2695

FlexFireは野村化学の登録商標です。

本レポート中に掲載している会社名および製品名は、該当する会社の商標、登録商標になります。

本カタログ中におけるデータ等を無断で複製および転写することを禁止しています。

■ お問い合わせ/Contact us



野村化学株式会社
 〒489-0004 愛知県瀬戸市日の出町15
 Tel: 0561-48-1853 Fax: 0561-48-1434
 e-mail: info@develosil.net

Nomura Chemical Co., Ltd.
 15, Hinode-cho, Seto, 489-0004, Japan
 Tel: +81-561-48-1853 Fax: +81-561-48-1434
 e-mail: info@develosil.net



Develosil USA
 10060 Carroll Canyon Rd. Ste. 100 San Diego, CA 92131
 Phone: 858-800-2433
 Web: <https://develosil.us/>

