

## ウシ血清アルブミン(BSA)の高分解能粒度分布測定における DLS フローモードの活用



### 1. 概要

BeNano シリーズは、動的光散乱 (DLS)、電気泳動光散乱 (ELS)、および静的光散乱 (SLS) がシステムに統合され、1 台で正確な粒子径、ゼータ電位および分子量を測定することができます。BeNano シリーズは、化学工学、食品および飲料、インクおよび顔料など、さまざまな分野の学術および製造プロセスに広く利用されており、特に製薬・バイオ関連分野で活用されている事例が多いです。

DLS では、サンプルにレーザー光を照射し、液体中に浮遊する粒子のブラウン運動によって生じる散乱光の揺らぎを検出し、時間経過に伴う強度変動が相関計算によって処理され、相関関数が導き出されます。そして、粒径と粒度分布を決定するために、キュムラント、NNLS、CONTIN などのさまざまな数学的モデルが使用されます。DLS 分析装置で一般的に利用されている、石英やプラスチック製のキュベットを使用する従来のモード (Batch モード) において、粒子径が広範囲に分布した試料の測定では、分解能があまり高くなく、細かいサイズの違いを検出することは難しいです。

一方、DLS フローモードと呼ばれるモードでは、DLS 分析装置を分離装置に接続することで、流出成分のサイズを個別に検出することができます。各流出成分は、理想的には単分散またはそれに近い状態であり、濃度検出器を介して得られる信号はアルゴリズムに依存しない粒度分布情報をもたらし、その分解能は 1.3 倍になります。

本稿では、BeNano をフロントエンド SEC (サイズ排除クロマトグラフィー) 装置に接続し、ウシ血清アルブミン (BSA) の粒度分布を測定しました。

## 2. 測定

### ・装置

使用したモデルは BeNano180 Zeta Pro で、レーザー光は 50mW、671nm で、散乱光の検出角度は 173°です。測定セルは 27μL のフロー用の少量キュベットを使用しました。BFC-1 という信号収集器を用いて、フロントエンド SEC 装置の屈折率(RI)検出器から出てきたアナログ信号が集められます。

### ・試料

BSA を PBS で 5 mg/mL に調整し、スターラーで 10 分間攪拌した後、220nm の水性フィルターで濾過しました。資料の注入と分離は、RI 検出器を備えたフロントエンド SEC 装置で行われました。その後、分離された個々の成分は BeNano に入り、25℃の条件下で粒子径測定が行われました。移動相は PBS、フローレートは 0.4mL/min、サンプル量は 100μL でした。

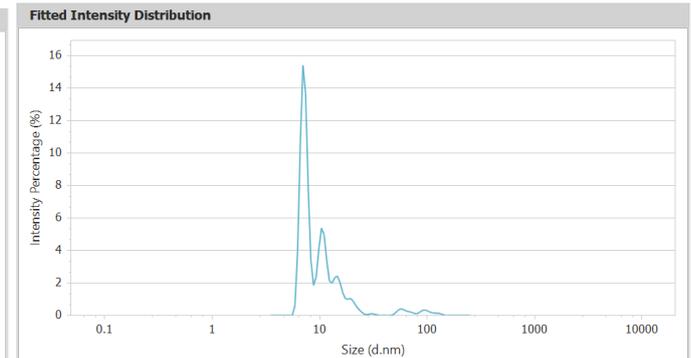
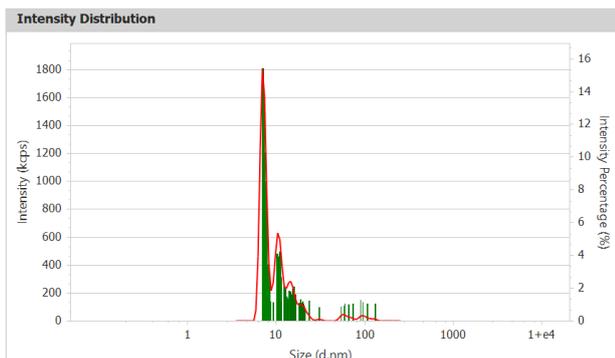
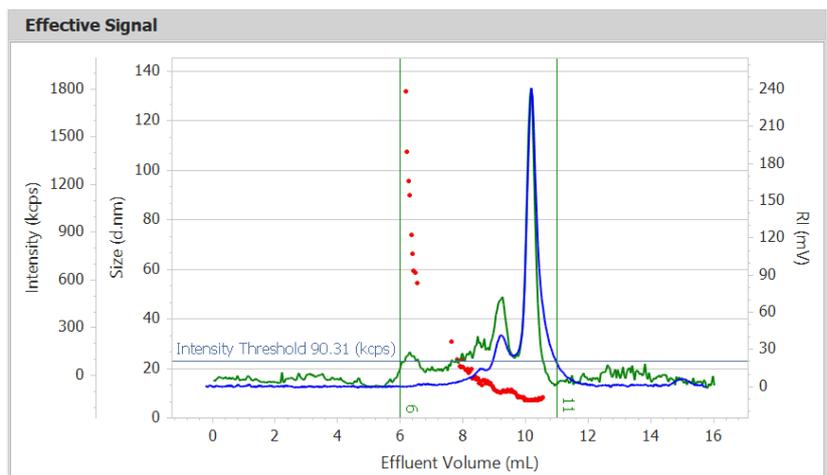
## 3. 結果

右図の流出曲線(緑、散乱強度)は、BSA の複数のピークを示しました。6mL 前後のピークは凝集体のピークを表し、8~10mL のピークは分離したオリゴマーを表します。10.5mL 前後の最後の主要ピークは、BSA のモノマーを表します。主要ピークの面積が大きいほど、タンパク質の大部分がモノマーとして存在することを示します。

サイズ流出曲線(赤い点)で検出さ

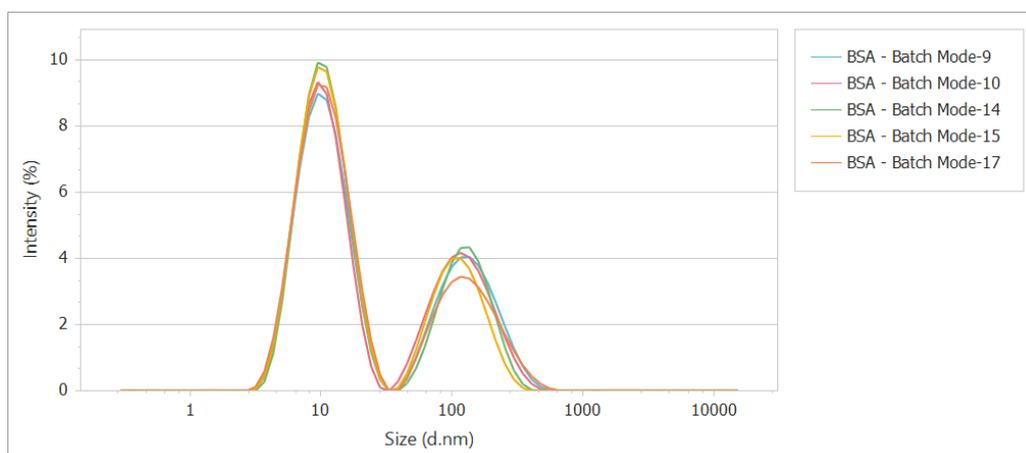
れた粒子径の減少は、SEC 分離の原理とよく対応しています。これにより、サンプル分離におけるフロントエンド SEC 装置の有効性が確認され、BeNano が検出器として検証され、各流出成分の粒子径情報が効果的に得られたことがわかります。

下記の図は、クロマトグラフィーの流出曲線を強度分布曲線に変換したもので、BSA モノマーの理論サイズ (~7nm) と見事に一致し、7.21nm のモノマーを持つ、分離されたオリゴマーを明確に特定しています。

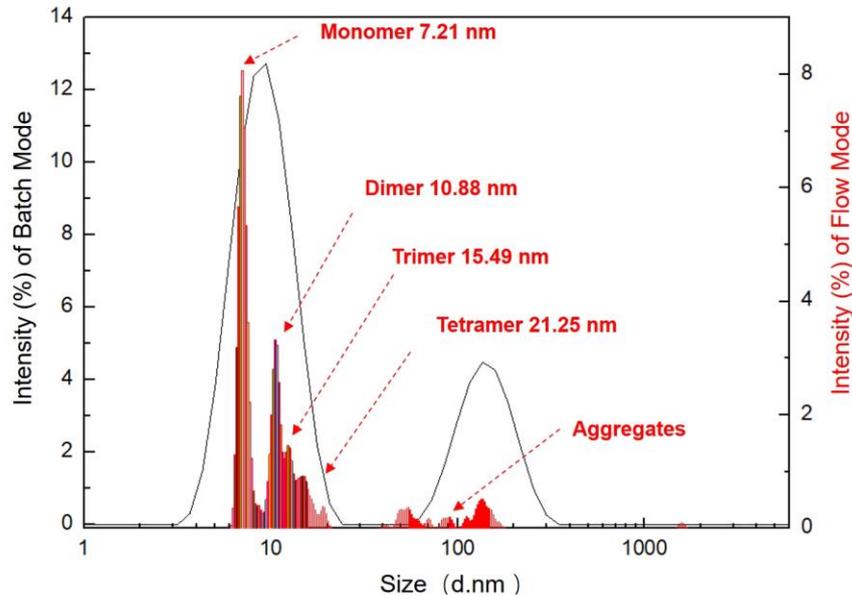


下記の表はその他の流出成分のサイズとピークの面積です。

サンプル	粒子径(d.nm)	Area%	ピーク SV(nm)	CV(%)
ピーク 1	7.21	57.42	0.61	8.49
ピーク 2	10.88	24.31	1.07	14.84
ピーク 3	15.49	10.29	1.44	19.98
ピーク 4	21.25	3.33	1.87	25.89
ピーク 5	31.19	0.35	1.91	26.50



Batch モード検出の強度分布曲線（上図）を見ると、ピークは2つのみです。小さい方のピーク（10nm 前後）はモノマー、ダイマー、トリマー、その他のオリゴマーのサイズ分布に対応し、大きい方のピーク（100nm 前後）はより大きな凝集体を表します。



一方、上図のフローモードと Batch モードの検出結果の比較から、フローモードは、小さい粒子径のピークの中の非常に小さなサイズ差のオリゴマー成分をうまく区別できることがわかりました。

#### 【結論】

BeNano のフローモードは、フロントエンド分離装置と組み合わせて検出器として使用され、サイズ測定の分解能を大幅に向上させることを目的としています。BSA を測定することにより、本稿では、BeNano フローモードの検出能力を実証し、高分解能サイズ測定分野における BeNano の可能性を効果的に紹介しています。



#### 粒子径・ゼータ電位・分子量測定装置 BeNano シリーズ

[BeNano シリーズ](#)は光散乱法により、粒子径、ゼータ電位、分子量、マイクロオロジーを評価することが可能です。後方光散乱光検出技術や光散乱位相解析技術などの技術により、高精度な測定を可能としております。

ご要望に応じて、粒子径測定のみ、ゼータ電位測定のみなどのモデルもご用意がございます。

<お問い合わせ>

[ホームページ](#)よりお問い合わせください。