

HPLC-SEC から UHPLC-SEC への更新は、これで決まり！

USP<621>に基づいた UHPLC-SEC の分析条件の更新設定



2022 年末に USP<621> Chromatography ガイドラインが改定¹され、国内でも第十八改正日本薬局方第一追補²が出されました。これは市販医薬品のクロマトグラフィー等による試験法を規定した USP モノグラフについて、超高速・高性能クロマトグラフィー(UHPLC)による試験法に更新するためのものです。モノグラフ試験法の UHPLC への更新では、同ガイドラインに従いパラメータを設定することで、再バリデーションを行うことなく、従来の試験法の分離性能を維持しながら、短時間や省溶媒というコストメリットを生かした移行が可能となります。またアイソクラティックのみならず、グラジエント分離にも適用できる内容となっています。ここでは、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)における USP<621>に準拠した L59 該当カラムおよび分析条件の UHPLC への更新について紹介します。

●SEC における HPLC から UHPLC への移行

USP<621>では、分離に影響を与える因子として、カラム内径(dc)、長さ(L)、充填剤の粒子径(dp)、流速(Fc)などのパラメータが挙げられており、これらを適切に変更することで従来の試験法と同等以上の分離性能を短いカラムで短時間、省溶媒にて得ることができます。USP(L59)該当カラムとして TSKgel G3000SW_{XL} (5 μm, HPLC) から TSKgel UP-SW3000-LS (2 μm, UHPLC)へ更新する際の、流速の変更許容範囲を表に示します。あるいは TSKgel G3000SW_{XL} カラムを 2 本接続した高分離能を目的としたカラム系での品質管理・分析法の場合、TSKgel UP-SW3000-LS の 30 cm カラムを使用することで同様な対応が可能です。またモノクローナル抗体 (mAb) の分析には、USP<129>³のガイドラインや、UHPLC の実施例⁴があります。

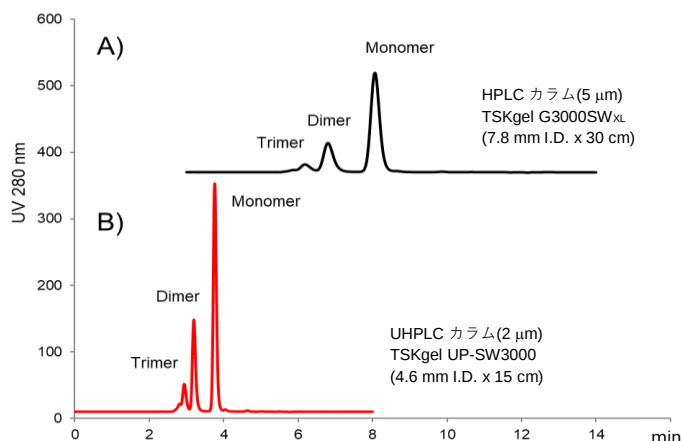
カラム	TSKgel G3000SW _{XL} (HPLC)	TSKgel UP-SW3000-LS (UHPLC)
カラム長さ (L)	30 cm (60 cm*)	15 cm (30 cm*)
カラム内径 (dc)	7.8 mm	4.6 mm
充填剤粒子径 (dp)	5 μm	2 μm
流速 (Fc)**	1.0 mL/min	0.3 - 0.5 mL/min (- 0.35 mL/min*)
	0.5 mL/min	0.2 - 0.5 mL/min

* 30 cm x 2 (カラム2本接続) の場合、UHPLC 30 cmカラムが該当

**カラムの最大圧力を超えない流速で使用

●HPLC-SEC(30 cm カラム)から UHPLC-SEC(15 cm カラム)への更新

mAb の分析について TSKgel G3000SW_{XL} の 30 cm カラムから TSKgel UP-SW3000 (現行 UP-SW3000-LS)の 15 cm カラムへの更新例を以下に示します。USP<621>の指針に適合した分析条件で UHPLC へ移行することで、分離能は同等以上を維持したまま分析時間が約 50 %に短縮され、溶離液も約 80 %削減できました。

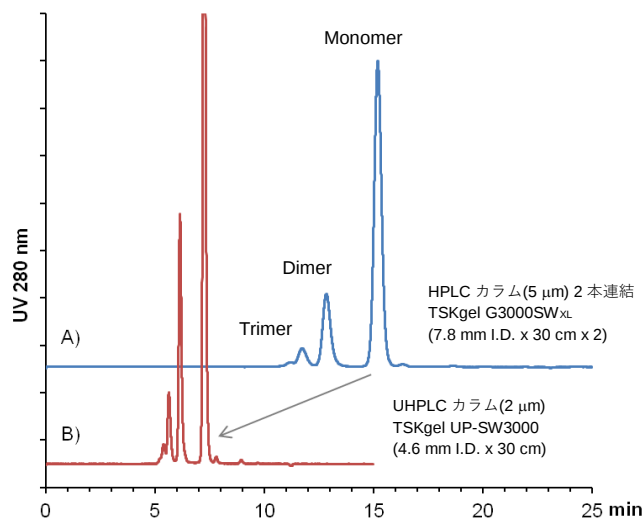


Column	Resolution	
	trimer/dimer	dimer/monomer
TSKgel G3000SW _{XL}	1.19	2.70
TSKgel UP-SW3000	1.52	3.56

Column ; A) TSKgel G3000SW_{XL} (7.8 mm I.D. x 30 cm)
 Column ; B) TSKgel UP-SW3000 (現行UP-SW-3000-LS, 4.6 mm I.D. x 15 cm)
 Eluent ; 0.1 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.7) + 0.1 mol/L Na₂SO₄ + 0.05 % NaN₃
 Flow rate ; A) 1.0 mL/min, B) 0.35 mL/min
 Detection ; UV (280 nm), A) standard cell, B) micro-cell
 Temperature ; 25 °C
 Sample ; mAb, A) 10 μL, B) 5 μL

● (参考) HPLC-SEC(30 cm カラム x 2 本)から UHPLC-SEC(30 cm カラム)への移行の実施例

分離能の向上を目的として TSKgel G3000SW_{xL} の 30 cm カラムを 2 本接続する手法が用いられることもあります。この場合、UHPLC で TSKgel UP-SW3000 (現行 UP-SW3000-LS) の 30 cm カラムへの移行が可能です。UHPLC へ移行する際、30 cm カラムを用いることで前頁の 15 cm カラムよりも高い分離能が得られています。



Column	Resolution	
	trimer/dimer	dimer/monomer
TSKgel G3000SW _{xL}	1.64	4.66
TSKgel UP-SW3000	2.16	5.22

Column ; A) TSKgel G3000SW_{xL} (7.8 mm I.D. x 30 cm x 2)
Column ; B) TSKgel UP-SW3000 (現行UP-SW-3000-LS, 4.6 mm I.D. x 30 cm)
Eluent ; 0.1 mol/L sodium phosphate buffer (pH 6.7) + 0.1 mol/L Na₂SO₄ + 0.05 % NaN₃
Flow rate ; A) 1.0 mL/min, B) 0.35 mL/min
Detection ; UV (280 nm), A) standard cell, B) micro-cell
Temperature ; 25 °C
Sample ; mAb, 10 µL

● グラジエント分離における HPLC から UHPLC への更新

改訂 USP<621>では、グラジエント分離を用いた分析法についても HPLC から UHPLC への更新の指針が示されています。グラジエント分離では、グラジエント容積、グラジエント勾配などの追加設定が必要になりますが、主な機器メーカーの UHPLC システムには、USP<621>に準拠したメソッド移行機能が備わっていますので、そのソフトを利用して試験法の条件設定を行うこともできます。

● 参考文献、関連資料

1. USP<621>, <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/harmonization-november-2021-m99380.pdf>
 2. 第十八改正日本薬局方第一追補, <https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/001022457.pdf>
 3. USP<129>, <https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/biologics/guide-proc-for-recombinant-therapeutic.pdf>
 4. L. Avagyan et al., Fast and sensitive size exclusion chromatography of IgG antibody, Knauer, Application No.:VBS0066, https://www.knauer.net/Application/application_notes/vbs0066_fast-and-sensitive-SEC-of-IgG-antibody.pdf
 5. 東ソー、セパレーションレポート No. 46, TSKgel SW_{xL} シリーズについて
 6. 東ソー、セパレーションレポート No.116, 高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW3000 について
 7. 東ソー、セパレーションレポート No.124, 高性能 SEC カラム TSKgel UP-SW3000-LS について
 8. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 1, SEC カラムを性能アップしよう！！
 9. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 3, 抗体の SEC 分析は、これで決まり！
 10. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 9, USP 該当 HPLC カラムはこれで決まり！
 11. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 13, 超高速・高分離 SEC 分析はこれで決まり！
 12. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 24, 生体高分子の UHPLC-SEC 分析はこれで決まり！
 13. 東ソー、テクニカルノート TSKgel No. 26, 試料の吸着を抑えた UHPLC-SEC カラムはこれで決まり！
- ※東ソー技術資料は、弊社ホームページの「関連資料」から閲覧、ダウンロードが可能です。 <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/litjp>



※ “TSKgel”は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) 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) 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
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 ●製品全般、カタログに関するお問い合わせ hlc@tosoh.co.jp
●カラム、分離に関するお問い合わせ tskgel@tosoh.co.jp
●装置の技術相談に関するお問い合わせ csc@tosoh.co.jp