Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

タンパク質サイズ排除分離における HPLC⇔UPLC間の良好な分析法移管

Stephan Koza, Susan Serpa, Edouard Bouvier, and Kenneth J. Fountain
Waters Corporation, Milford, MA, USA

アプリケーションのメリット

- タンパク質 SEC 分析法の UPLC® ⇔ HPLC システム間におけるシームレスな移管
- 異なる装置プラットホームのラボ間における分析法移管を容易に
- ピーク特性解析のために UPLC 分析法をスケールアップ可能
- ポアサイズ 200 Åと 450 Åをラインアップし、幅広い範囲のタンパク質分離に対応

ウォーターズのソリューション

XBridge® Protein BEH SEC 200 Å & 450 Å、3.5 µm カラム

ACQUITY UPLC® Protein BEH SEC、200 Å、1.7 µm & 450 Å、2.5 µm カラム

Alliance® HPLC システム

ACQUITY UPLC H-Class Bio システム

Empower® 3 ソフトウェア

Waters BEH200 & BEH450 SEC Protein Standard Mixtur および mAb Standard

キーワード

サイズ排除クロマトグラフィー、UPLC、HPLC、分析法移管、凝集体

はじめに

過去数年に渡り、ウォーターズはタンパク質およびペプチドの分析に向けた非常に高い分離能とサンプルスループットを実現するサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）カラムを製造してきました[1,2]。これらサイズ排除 UPLC（SE-UPLC）カラムはポアサイズ 200 Åまたは 125 Åの粒子径 1.7 µm エチレン架橋型ハイブリッド（BEH）パーティクル、もしくはポアサイズ 450 Åの粒子径 2.5 µm BEH パーティクルで構成されます。SE-UPLC テクノロジーは、その高いサンプルスループットにより製品開発過程でのタンパク質の凝集をモニターする重要なツールとして多くのバイオ医薬品分析ラボに採用されています。しかしながら、多くの場合、UPLC システムを導入していないラボには、SE-UPLC 分析法を移管できません。そのため、UPLC システムと HPLC システム間で SEC 分析法を移管することを目的として、ウォーターズは従来の HPLC システムでの使用に向けた粒子径 3.5 µm の BEH ベースのサイズ排除 HPLC（SE-HPLC）カラムを発売しました。これらカラムは粒子径だけが異なる同じケミストリーを採用しているため、HPLC と UPLC システム間でシームレスに移管が可能です。本アプリケーションノートでは、UPLC と HPLC カラムおよびシステム間で SEC 分析法を移管する際に必要な考慮点を紹介します。

実験方法

サンプル詳細

特に記載の無い限り、サンプルは全て移動相に溶解しました。タンパク質は個別のスタンダードもしくは混合物として購入しました（Waters® および Sigma-Aldrich®）。特に記載の無い限り、サンプル濃度は1.0mg/mL（公称値）です。

Method Condition

LC条件

システム：　Waters Alliance HPLC または ACQUITY UPLC H-Class Bio System（30cm カラムヒーター付）

カラム：　XBridge Protein BEH SEC、200 Å、3.5 µm、7.8 × 300mm（製品番号：176003596）

XBridge Protein BEH SEC、450 Å、3.5 µm, 7.8 × 300mm（製品番号：176003599）

ACQUITY UPLC Protein BEH SEC、200 Å、1.7 µm、4.6 × 300mm（製品番号：186005226）

ACQUITY UPLC Protein BEH SEC、450 Å、2.5 µm、4.6 × 300mm（製品番号：176002997）

カラム温度：　室温

サンプル温度：10℃

注入量：　10 µL

流速：　各図の説明に記載

移動相：　5 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム pH7.2（Auto•Blend Plus™ Technology で調製もしくは 5.5% A：100 mM NaH_2PO_4、14.5% B：100 mM Na_2HPO_4、15.0% C：NaCl、65% D：H_2O）

グラジエント：　アイソクラティック

スタンダード：　BEH200 SEC Protein Standard Mix（製品番号：186006518）

BEH450 SEC Protein Standard Mix（製品番号：186006842）

Intact mAb Mass Check Standard（製品番号：186006552）

サンプルバイアル：不活性ガラス 12 × 32mm スクリューネック トータルリカバリーバイアル、キャップ＆プレスリット PTFE/シリコンセプタム、1mL（製品番号：18600385DV）

検出：　Alliance HPLC TUV 検出器 ACQUITY UPLC TUV 検出器（5 mm チタンフローセル）

波長：　280 または 214 nm

クロマトグラフィーソフトウェア：Waters Empower 3 Pro（v2 & v3）

結果および考察

LCシステムに関する考慮点

SEC 分離において、LC システムの性能は、達成できるクロマトグラフィーの分離の質に大きく影響します。基本的には、Gritti と Guichon により採用された図 1 に示す式で表せます [3]。この式から、トータルのピーク拡散 σ^2 Total は分析種がカラムに到達する前の拡散（σ^2 Pre-Column）とカラムでの拡散（σ^2 Column）、およびカラムから溶出した後の拡散（σ^2 Post-Column）の合計から算出できます。この関係式から、カラムでの拡散（σ^2 Column）に比べてカラム外拡散によるピーク拡散への寄与が増加して顕著になると、SEC 分離の効率が測定できるほどに低減することが容易に分かります。逆に、逆相やイオン交換クロマトグラフィーなどの結合 - 溶出に基づくタンパク質分離では、カラムヘッドで分析種が強く保持され再濃縮されるため、σ^2 Pre-Column の寄与はずっと小さくなります。

$$\sigma^2_{Total} = \sigma^2_{Pre\text{-}Column} + \sigma^2_{Column} + \sigma^2_{Post\text{-}Column}$$

図 1. SEC におけるピーク拡散の原因に焦点を当てた式。緑の拡散（カラム）に対して青の拡散（プレカラム＆ポストカラム）が顕著になると、分離が低減する。更なる詳細は文章を参照。

これら考慮点の実際的な影響を図 2 に示しました。ここでは、1 台の Alliance HPLC システムで同じバッチの粒子径 3.5 µm、ポアサイズ 200 Å の BEH パーティクルを充填した 2 種類のカラムを用いて分析したタンパク質スタンダードの結果の比較を示しています。一方は試験用に製造した内径 4.6 mm で、他方は市販の内径 7.8 mm です。流速は各カラムに対して同等の線速度になるように調整しました。同じシステムで内径 4.6 mm カラムを用いて観測される分離度は内径 7.8 mm カラムで観測される分離度に比べて顕著に低いことが分かります。例えば、内径 7.8 mm カラムでの IgG と BSA 間の分離度は、内径 4.6 mm カラムでの分離度と比べて 30 % 高い値でした。内径 7.8 mm カラムの性能が際立って良好である理由を理解するために、図 1 に表した式の関係について再考しました。この式において、カラム内でのピーク拡散（σ^2 Column）はカラム内径が大きくなると増加します。しかしながら、カラム内径が大きくなるとポアボリュームが比例して増加し、ポアボリュームの増加により分離効率が向上することで相殺され、結果とし SEC カラムの分離能は基本的にカラム内径に依存しません。そのため、SEC カラムの内径が増加すると、カラム充填効率が維持されるとすれば、σ^2 Column は増加する一方で、分離効率は維持されます。結果として、σ^2 Column に対して σ^2 Pre-Column と σ^2 Post-Column が小さくなり、実際の結果としてクロマトグラフィーの分離が向上します。

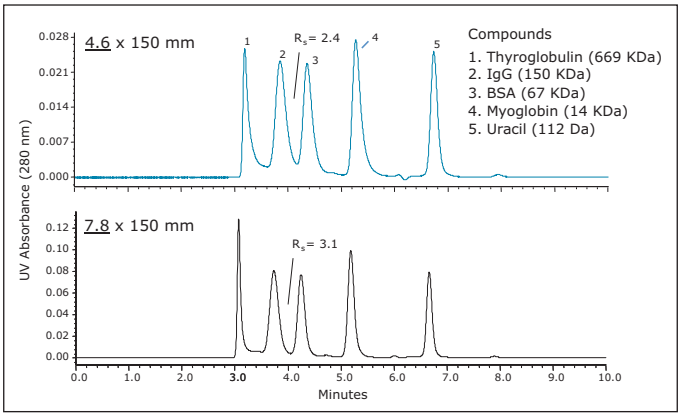

図 2. Waters BEH200 SEC Protein Standard Mix（製品番号 186006518）の分離比較。2 種類の XBridge Protein BEH SEC、200 Å、3.5 µm カラム：試験用に製造した内径 4.6 mm カラム（上）と市販の内径 7.8 mm カラム（下）。どちらのカラムも Alliance HPLC で使用。流速は内径に応じてスケーリングし、内径 4.6 mm では 0.3 mL/min で、内径 7.8 mm では 0.86 mL/min。サンプルロード量もカラム容量に応じて調整。

UPLCとHPLCカラム間でSEC分析法を移管

SEC 分析法をあるカラムから別のカラムに移管する際に、二つの主要な考慮事項があります。最も重要なのは充填剤の固定相に同様のものを用いるという点です。ポアサイズを合わせることに加え、サイズ排除に用いられる充填剤は生体分子とイオン性および疎水性相互作用する可能性があるため、分離に用いられる移動相や温度の条件を同じにする場合にはこれら相互作用の性質も同様のものを用いる必要があります。二点目として、粒子径に応じて分離を適切にスケーリングしなければいけません。粒子径に対してスケーリングを行う最初のステップは、式 1 を用いて 2 つのカラムにおけるカラム長さと粒子径の比率を出来るだけ合わせることです。

$$L_{HPLC} = \frac{L_{UPLC} \times d_{p,HPLC}}{d_{p,UPLC}}$$

式 1：ここで L_{HPLC} および L_{UPLC} は HPLC および UPLC のカラム長さ（mm）、dp、HPLC および dp、UPLC は HPLC および UPLC のカラム粒子径（μm）。

続いて、どちらのカラムも同じ還元線速度になるように流速を計算します。還元線速度は、任意の分析種に対し、線速度と粒子径の積に比例します。流速は線速度とカラム内径の二乗の積に比例するため、正しくスケーリングした流速は式 2 を用いて計算できます。

$$F_{HPLC} = \frac{F_{UPLC} \times d_{p,UPLC} \times D^2_{HPLC}}{d_{p,HPLC} \times D^2_{UPLC}}$$

式 2：ここで F_{HPLC} および F_{UPLC} は HPLC および UPLC カラムの流速（mL/ 分）、D_{HPLC} および D_{UPLC} は HPLC および UPLC カラムの内径（mm）。

最後に、注入量はカラム容量によりスケーリングします。カラム容量はカラム断面積とカラム長さの積に比例します。式 3 に示しました。

$$V_{HPLC} = \frac{V_{UPLC} \times L_{HPLC} \times D^2_{HPLC}}{L_{UPLC} \times D^2_{UPLC}}$$

式 3：ここで V_{HPLC} および V_{UPLC} は HPLC および UPLC カラムの注入量（μL）。

まず ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200 Å、1.7 μm、4.6 × 300 mm カラムと XBrige Protein BEH SEC 200 Å、3.5 μm、内径 7.8 mm HPLC カラム間での良好な移管について実証します。粒子径が約 2 倍になることを考えると、同等の分離度を得るために（式 1 に基づいて）HPLC カラム長さは UPLC カラムの 2 倍（60 cm）必要となります。これは、30 cm の HPLC カラムを 2 本連結して使用することで達成できます。注目すべきは、もし粒子径 1.7 μm で 15 cm の UPLC カラムを使用していた場合には、粒子径 3.5 μm で 30 cm の HPLC カラム 1 本に適切に分離を移管できるという点です。各カラムの内径と粒子径を考慮し、式 2 と 3 を用いて、UPLC 分析に対し HPLC 分析では流速は 1.4 倍、注入量は 5.75 倍となります。

この分析法スケーリングの結果を図 3 および図 4 に示しました。図 3 は BEH200 SEC Protein Standard Mix の分離比較、図 4 はバイオ医薬品モノクローナル抗体 Infliximab の分離比較です。UPLC 分離は ACQUITY UPLC H-Class Bio システムで、HPLC 分離は Alliance HPLC システムで行いました。両分離に用いた移動相はリン酸緩衝液（PBS）で、低イオン強度かつ弱塩基性です（25 mM リン酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH7.2）。一般的に SEC 分離によく使用されるため、この緩衝液を選択しました。さらに、この緩衝液の pH および低イオン強度は、望ましくないタンパク質 - 充填剤の相互作用を引き起こす充填剤表面のケミストリーの微妙な違いを、高イオン強度緩衝液に比べてずっと低い程度までしかマスクしません [4]。どちらの比較も、時間軸は標準化しています。どちらの比較のクロマトグラムでも分析時間が異なるだけで同様のプロファイルが得られ、UPLC では分析時間が 1/4 から 1/5 でした。HPLC 分析時間は顕著に長くなりますが、UPLC 分離と同じ選択性（プロファイル）を示しています。これにより、分析法を受託するラボに UPLC システムがない場合にも、UPLC で迅速に開発した分析法を HPLC に移管できます。

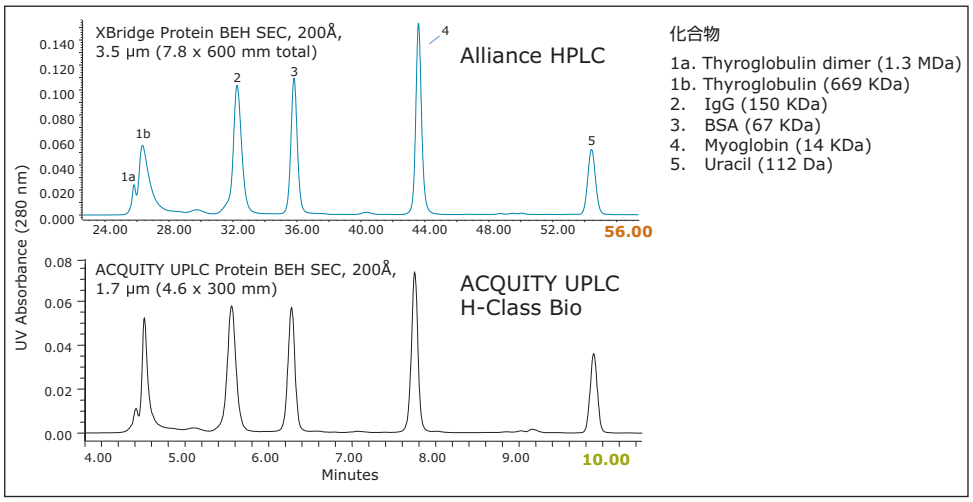

図 3. BEH200 SEC Protein Standard Mix（製品番号 186006518）の分離比較：（上）Alliance HPLC を用いて XBridge Protein BEH SEC 200 Å、3.5 µm、7.8 × 300 mm カラム 2 本連結して分析（下）ACQUITY UPLC H-Class Bio を用いて ACQUITY UPLC Protein BEH 200 Å、1.7 µm、4.6 × 300 mm カラムで分析。流速は粒子径とカラム内径に基づいてスケーリングし、2 本連結した HPLC カラムでは 0.42 mL/min、UPLC カラムでは 0.3 mL/min。サンプル負荷量はカラム容量に応じて調整。

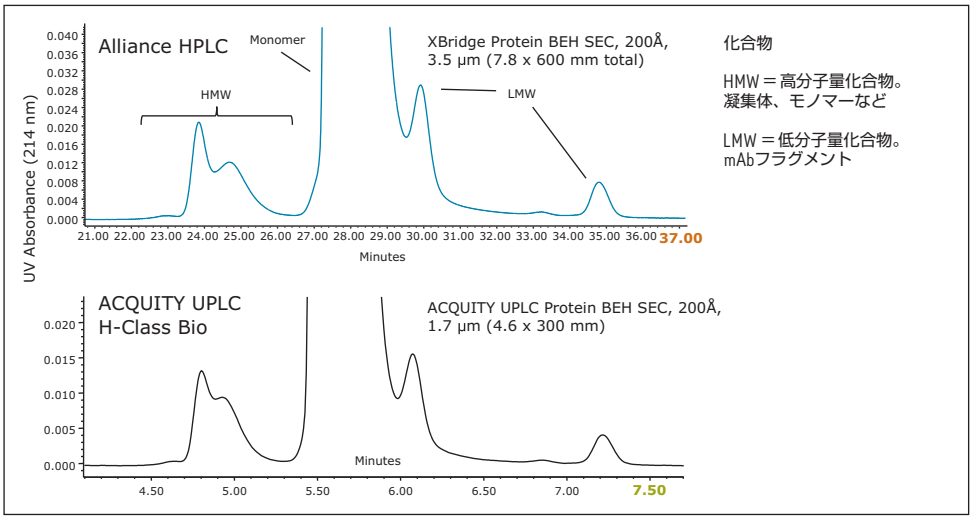

図 4. モノクローナル抗体 Infliximab の分離比較：（上）Alliance HPLC を用いて XBridge Protein BEH SEC 200 Å、3.5 µm、7.8 × 300 mm カラム 2 本連結して分析（下）ACQUITY UPLC H-Class Bio を用いて ACQUITY UPLC Protein BEH 200 Å、1.7 µm、4.6 × 300 mm カラムで分析。流速は粒子径とカラム内径に基づいてスケーリングし、2 本連結した HPLC カラムでは 0.5 mL/min、UPLC カラムでは 0.4 mL/min。サンプル負荷量はカラム容量に応じて調整。ピークは HMW (high molecular weight、凝集体)、モノマーと LMW (low molecular weight、mAb のフラグメント)。

次に、ACQUITY UPLC Protein BEH SEC, 450 Å、2.5 µm、4.6 × 300 mm カラムと XBridge Protein BEH SEC、450 Å、3.5 µm 内径 7.8 mm HPLC カラム間で分析法移管について示します。式 1 を用いると HPLC カラムの長さは 42 cm となり、これは 30 cm と 15 cm の XBridge SEC、3.5 µm カラムを連結して使用することで近似できます。長さ 15 cm の 2.5 µm UPLC カラムから移管する場合、HPLC でのカラム長さは 21 cm となりますが、これは使用できるサイズがありません。この場合には、30 cm カラムが使用できます。ただし、使用する還元線速度を合わせると、分離度の違いは比較するカラム長さの平方根にほぼ比例するため、HPLC カラムの分離度は約 20 % 高くなります。

図 5 および図 6 は 30 cm、2.5 µm, 450 Å , 内径 4.6 mm UPLC カラムからトータル 45 cm の 3.5 µm、450 Å、内径 7.8 mm HPLC カラムへの効率的なスケーリングについて実証しています。図 5 は BEH450 SEC Protein Standard Mix の分離比較を、図 6 は IgM のペンタマーとダイペンタマー（それぞれ分子量は約 900 KDa と 1.8 MDa）の分離比較を示しています。前の例と同様に、UPLC 分離は ACQUITY UPLC H-Class Bio システムで、HPLC 分離は Alliance HPLC システムで行い、時間軸は標準化しました。どちらのクロマトグラムも分子量範囲に渡って同様のプロファイルを示し、従って UPLC と HPLC 間での分析法移管性を示していました。この例では、UPLC では分析時間が HPLC の約 1/2 でした。

全体として、これらデータは UPLC で用いた BEH ベースの SE-UPLC カラムから HPLC システムで用いた BEH ベースの SE-HPLC カラムへのシームレスかつ効果的な分析法移管を実証しています。観測されたクロマトグラフィープロファイルは、充填剤ポア特性だけでなく充填剤表面の化学的同等性についても明確に示しています。

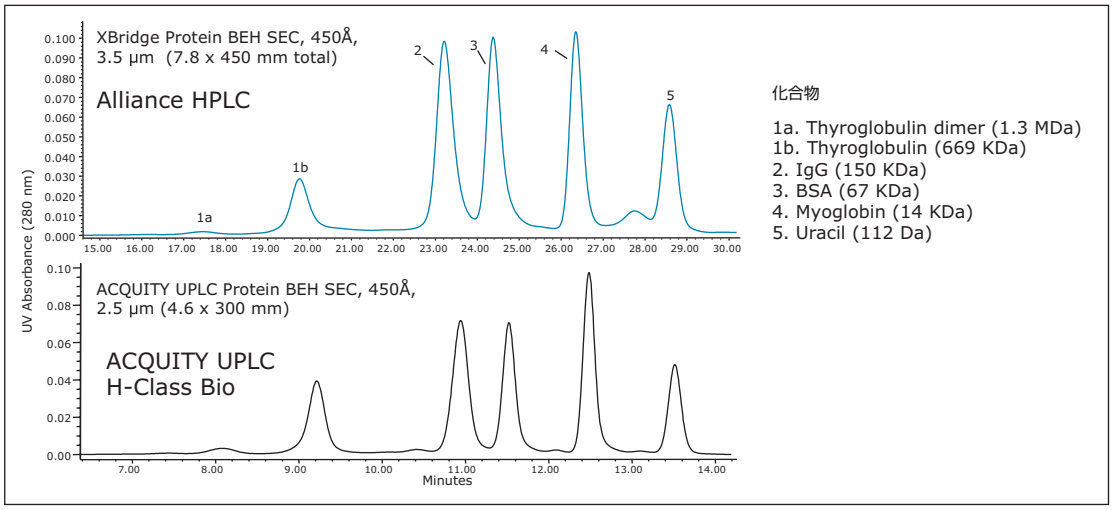

図 5. BEH450 SEC Protein Standard Mix（製品番号 186006518）の分離比較：（上）Alliance HPLC を用いて XBridge Protein BEH SEC, 450 Å、3.5 µm カラム 2 本連結（7.8 × 150 mm + 300 mm）で分析（下）ACQUITY UPLC H-Class Bio を用いて ACQUITY UPLC Protein BEH 450 Å、2.5 µm, 4.6 × 300 mm カラムで分析。流速は粒子径とカラム内径に基づいてスケーリングし、2 本連結した HPLC カラムでは 0.62 mL/min、UPLC カラムでは 0.3 mL/min。サンプル負荷量はカラム容量に応じて調整。

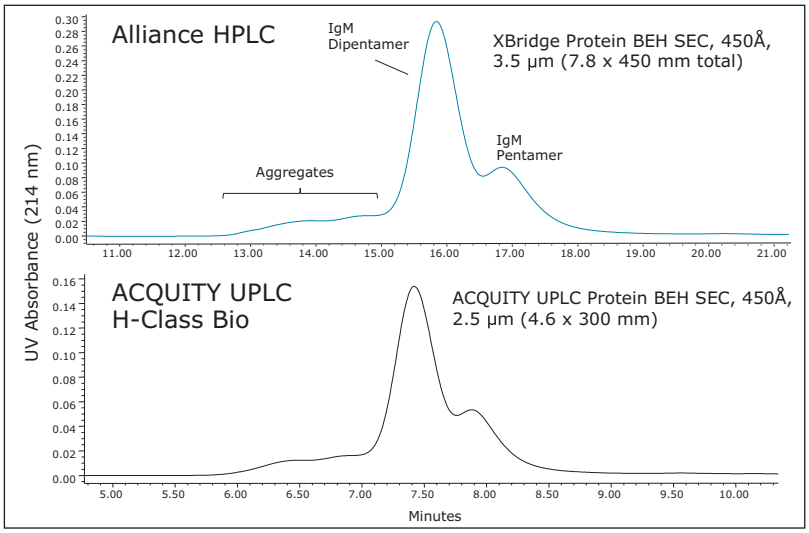

図 6. IgM（1 mg/mL）の分離比較：（上）Alliance HPLC を用いて XBridge Protein BEH SEC、450 Å、3.5 µm カラム 2 本連結（7.8 × 150 mm + 300 mm）で分析（下）ACQUITY UPLC H-Class Bio を用いて ACQUITY UPLC Protein BEH 450 Å、2.5 µm, 4.6 × 300 mm カラムで分析。流速は粒子径とカラム内径に基づいてスケーリングし、2 本連結した HPLC カラムでは 0.62 mL/min、UPLC カラムでは 0.3 mL/min。サンプル負荷量はカラム容量に応じて調整。

結論

SE-UPLC テクノロジーの導入を成功するには、高効率のカラムと高いカラム背圧で操作できる低拡散の LC システムが必要です。SE-UPLC の利点は、サンプルの必要量と移動相消費量を低減しながらサンプルスループットを劇的に向上できるところです。ただし、SE-HPLC と SE-UPLC 間で分離を移管できることが有用な状況があります。分析法移管において装置の制限がある場合、少量の分析種の構造や機能についての特性解析を容易にするために UPLC 分離をスケールアップする必要がある場合などです。しかしながら、BEH ベースのパーティクルを充填した SE-UPLC カラムと従来のシリカベースのパーティクルを充填した SE-HPLC カラム間では両パーティクルの表面ケミストリーが異なるために、同じ移動相と温度条件を用いて直接分析法を移管できず、同様の結果を得るために分析法の再度の最適化が必要となるケースがあります。ウォーターズが最近開発した HPLC 用の 200 Å および 450 Å、粒子径 3.5 µm の Diol 結合 BEH パーティクル（ACQUITY UPLC Protein BEH SEC カラムに採用しているものと粒子径以外は同じ）により、SE-UPLC と SE-HPLC 間での移管が容易にできるようになりました。本アプリケーションノートでは、この分析法移管の使用を成功するための方法について例を上げて詳細を説明しました。

参考文献

1. Fountain K. J., Hong, P. Serpa, S. Bouvier, E. S. P. and Morrison, D., Analysis of Biomolecules by Size-Exclusion UltraPerformance Liquid Chromatography. Waters Corporation, Application Note [serial on the Internet]. 2012; (720004412EN).
2. Hong, P., Koza S., Fountain, K. J., Advances in Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Small Proteins and Peptides: Evaluation of Calibration Curves for Molecular Weight Estimation. Waters Corporation, Application Note [serial on the Internet]. 2010; (WA64226).
3. Gritti, F., Guiochon, G., On the extra-column band-broadening contributions of modern, very high pressure liquid chromatographs using 2.1 mm I.D. columns packed with sub-2-µm particles. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217 (49), 7677–7689.
4. Ricker, R. D., Sandoval, L. A., Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules. *Journal of Chromatography A* 1996, 743 (1), 43–50.

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌 富山

Waters、ACQUITY UPLC、UPLC、Alliance、XBridge、Empower および The Science of What's Possible は Waters Corporation の登録商標です。Auto•Blend Plus は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2015 Waters Corporation. Produced in Japan. 2015年1月 720005214JA PDF