

プロセスクロマトグラフィー用充填剤、充填カラム 〈TOYOPEARL / TSKgel PW〉

TOYOPEARL For Process Chromatography

- | | |
|-----------------|--------------------|
| P. 142 - P. 143 | トヨパールの商品概要、バリデーション |
| P. 144 - P. 145 | トヨパールの特長、使用法・充填法 |
| P. 146 - P. 147 | サイズ排除クロマトグラフィー |
| P. 148 - P. 153 | イオン交換クロマトグラフィー |
| P. 154 - P. 157 | 疎水クロマトグラフィー |
| P. 158 - P. 159 | マルチモードクロマトグラフィー |
| P. 160 - P. 165 | アフィニティークロマトグラフィー |
| P. 166 - P. 167 | 高速分取クロマトグラフィー |
| P. 168 - P. 172 | SkillPak |
| P. 173 - P. 175 | カラムのスケールアップ |
| P. 176 - P. 177 | 工業スケールでの分取 |
| P. 178 - P. 179 | トヨパールの洗浄 |

トヨパール

トヨパールは、従来の分離剤と比べ速い流速で使用でき体積変化もなく、強酸、強アルカリ及び有機溶媒に対しても安定であるためたんぱく質をはじめさまざまな試料の前処理・精製に適しています。また、GMP、バリデーション支援・試験データも充実しており、医薬品などの分離にもお使いいただけます。

トヨパールは、親水性のビニルポリマーを基材とし、従来の分離剤とは異なった特長を持つ半硬質全多孔性球状のプロセスクロマトグラフィー用充填剤です。速い流速で使用できるため、分取用及び大型工業用分離剤として適します。

トヨパールは高流速で高分離を示すことにより、FFLC用分離剤として多用されています。充填剤の他に、トヨパールを更に利用

しやすくするためにスクリーニング用をはじめとした目的に使用できる各種充填カラム (SkillPak) を併せて発売しています。

▼
主な対象物質

- 酵素、たんぱく質、糖類、抗生物質など
- 生体関連物質の分離精製、脱塩
- 医薬品の分離・精製

バイオバーデン対応

工業的使用に対応

▼
製品概要

充填剤	サイズ排除クロマトグラフィー用	TOYOPEARL HWタイプ	
イオン交換クロマトグラフィー用	陰イオン交換体	TOYOPEARL GigaCap Q-650	
		TOYOPEARL GigaCap DEAE-650	
		TOYOPEARL SuperQ-650	
		TOYOPEARL DEAE-650	
		TOYOPEARL QAE-550	
		TOYOPEARL NH ₂ -750	
		陽イオン交換体	TOYOPEARL GigaCap S-650
			TOYOPEARL GigaCap CM-650
			TOYOPEARL SP-650
			TOYOPEARL CM-650
	疎水クロマトグラフィー用	750シリーズ	New TOYOPEARL Phenyl FT-750
		650シリーズ	TOYOPEARL Ether-650
			TOYOPEARL Phenyl-650
			TOYOPEARL Butyl-650
600シリーズ		TOYOPEARL PPG-600	
	TOYOPEARL Phenyl-600		
550シリーズ	TOYOPEARL Butyl-600		
	TOYOPEARL SuperButyl-550		
マルチモードクロマトグラフィー用	650シリーズ	TOYOPEARL MX-Trp-650M	
	ハイドロキシアパタイト	Ca ⁺⁺ Pure-HA	
アフィニティークロマトグラフィー用	群特異的AFC用	TOYOPEARL AF-650タイプ	
	活性化型AFC用	TOYOPEARL AF-650タイプ	
充填カラム	プロセス開発用カラム	SkillPakシリーズ	
	セミ分取用、工業用	特別注文にてお受けします*	

*詳細な点やトヨパール充填大口径カラムについては、当社営業までお問い合わせください。

トヨパール

トヨパールのGMP、バリデーション支援データ、法規制関連資料

医薬品などの製造にトヨパールをご使用いただくため、当社では、トヨパールの各種基礎データの充実を図り、GMPやバリデーション支援を行っています。

▼ 法規制関連

- 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）に関する届出
- 少量新規化学物質に関する届出
- 安全データシート（SDS）の提供

▼ GMP、バリデーション支援・試験データ

- バイオバーデン対応（医薬品等の製造原料の微生物汚染に関する品質保証）
- 製品の長期放置安定性試験
- 製品溶液中の全有機炭素（TOC）定量試験
- 製品中の残留モノマー確認試験
- 有機溶媒洗浄における溶出物の定量試験
- 製品の安全性試験（毒性試験、変異原性試験等）
- アルカリ溶液中での長期放置安定性試験
- アルカリ溶液中での溶出物の同定試験
- アルカリ溶液を用いたCIPにおける耐久性試験
- トヨパールCIPマニュアル

※上記試験データの内容等の詳細については、当社営業までお問い合わせください。

※上記試験データは、そのグレード、数値を保証するものではありません。

※トヨパールのバリデーションを含めたインハウスセミナーも行ってまいります。詳細は、当社営業までお問い合わせください。

※工業スケールでの使用に関しましてはP.176を参照ください。

トヨパール

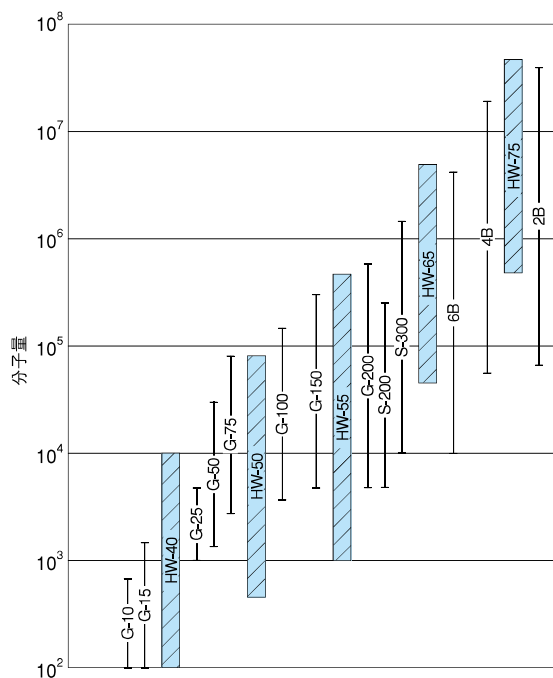
▼
特長

- 流速アップ
非常に固く、高流速での分離が可能のため、分析時間が大幅に短縮できます。
- 一般的な使用方法
カラム寸法20 mm I.D.×70 cm(ゲルろ過、HW-55F)の場合、ペリスタリックポンプにより、充填圧力0.15~0.25 MPaで充填し、溶出流速1~1.5 mL/min程度が最も一般的な使い方です。
- 他社の軟質充填剤・半硬質充填剤に比較して硬質なため、圧力が低く、特に工業規模での使用(大口径カラム)で特長が発揮されます。
- 小スケールから工業的使用へのスケールアップがスムーズに進みます。



▼
他社製品との分画範囲の関係

トヨパールと他社製品との分画範囲の関係を示します。

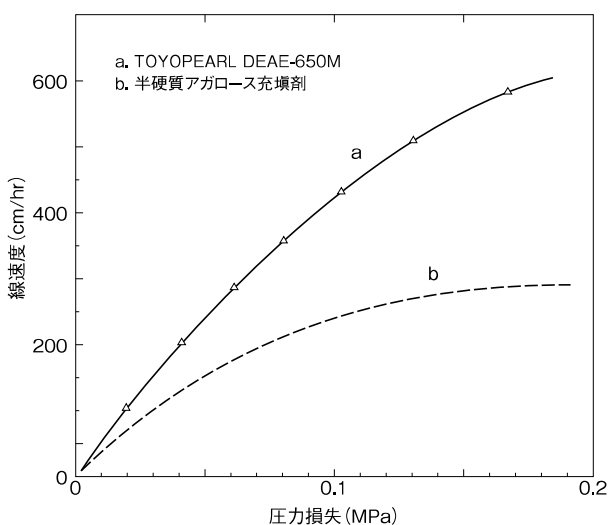


●球状たんぱく質等の分画範囲

TOYOPEARL HWタイプ

他社製品

▼
線速度と圧力損失との関係(水通液時)



TOYOPEARL DEAE-650Mと半硬質アガロース充填剤との圧力損失の比較
(カラム寸法: 108 mm I.D.×30 cm)

トヨパール

トヨパールの使用法・充填法

無加圧でも、ポンプまたは落差圧で圧力をかけた加圧状態でも充填できます。

但し、粒子径が小さく設定されていますので、圧力をかけないと大きなカラムでは流速が非常に遅くなります。

このような場合には、溶出液槽の位置をたとえば1 m程度高くし落差をつけるか、またはポンプ使用により加圧します。

詳細につきましては「TOYOPEARL、TSKgel PW充填法ガイド」を参照ください。

スラリーの調製

1. 微粒子の除去

微粒子の混在はフィルタの目づまりの原因となり流速の低下をまねくこととなります。次の要領で微粒子を除去します。

● 除去方法の一例

—TOYOPEARL DEAE-650S 250 mLの場合—

- ① 懸濁液 250 mLを2 Lのビーカーに取り出し水を約750 mL入れて合計1 Lとする。
- ② 次に2～3分よく攪拌する。
- ③ 1.5時間静置後上澄の浮遊微粒子含有部約500～600 mLを捨てる。
- ④ 以上の操作を3～4回繰り返す。
これは最も細かいSuper Fineの例

であり、粒子径の大きいMediumでは、静置時間を短くします。

2. 必要充填量

充填法により異なります。加圧しないで充填する方法は、カラム体積よりいくらか多めに取ります。

加圧して充填する場合には、カラム体積のおおよそ20%増程度が必要となります。

3. 洗浄

ほとんどのトヨパールは20%エタノール水溶液に懸濁して出荷されますので、使用に先だってグラスフィルタ上で、充填剤の約3倍量以上の水で洗浄する必

要があります。

4. 濃度の調製

- ① デカンテーションで微粒子を除去した充填剤を、充填剤容積の3倍量の充填溶媒で2～3回洗浄します。
- ② 洗浄後、カラム容積の1.2倍量の充填剤をメスシリンダーで計量します。
- ③ スラリー濃度が30～50%になるように充填溶媒を加えてスラリー化します。充填には、分離に使用する溶液のうち最も塩濃度の高い溶液（例えばIECの場合、0.5 mol/L NaCl溶液等）を用います。

カラムへの充填

充填法

以下にTOYOPEARL HWタイプの充填を行うに当たっての注意点を示します。

- ① トヨパールの充填は、緩和な加圧条件(50～数100 kPa)でおこなうのが適しています。この観点からペリスタリックポンプ(HPLC用ポンプも使用可能)を使用する充填法が好ましいものといえます。HPLC用充填剤の場合のように高圧下での充填は、お勧めできません。
- ② 簡便法である自然落差充填法においては、トヨパールはどんな水圧をかけてもつづれることはありません。むしろ、できるだけ水圧を大きく取っていただく方が性能の良いカラムが得られます。また充填溶媒を加温し粘性を下げるなどして、充填流速を大きくすることも良い効果をもたらします。
- ③ 懸濁液中に浮遊微粒子が存在すると、フィルタが目づまりし、圧力上昇、流速低下が起きます。デカンテーションにより浮遊物を取り除いてください。

各種充填法の比較

項目	ペリスタリックポンプによる充填法		自然落差による充填法	
	1.定流速法	2.半定圧法	3.リザーバ使用法	4.簡易法(加温)
特				
充填流速	○速い	◎速い(1よりも速い)	×遅い	×遅い(3よりも速い)
使用流速	○大きいところまで可能	◎大きいところまで可能	×使用流速が制限される	×使用流速が制限される
微				
充填における再現性	○良い	◎非常に良い	○良い	○良い
必要な器具				
ポンプ	×必要	×必要	×必要	○不要
リザーバー	×必要	×必要	×必要	○不要
圧力計	△使用する方がよい	×必要	○不要	○不要

* HPLC用ポンプも使用可能

(○長所、×短所)

定流速充填法における充填流速

各種HW充填剤の充填流速

品名	カラムサイズ mm I.D. × cm	流速 mL/min	線速度 cm/h
HW-40F	10 × 60	1.0 ~ 1.4	70 ~ 110
	16 × 60	2.4 ~ 3.0	70 ~ 90
	22 × 60	4.0 ~ 5.0	60 ~ 80
	44 × 60	10.0 ~ 14.0	40 ~ 60
HW-55F HW-50F	16 × 60	2.0 ~ 3.0	60 ~ 85
	32 × 60	6.0 ~ 9.0	45 ~ 65
	44 × 60	1.0 ~ 6.0	45 ~ 65
	22 × 30	6.0 ~ 8.0	95 ~ 130
	22 × 45	4.0 ~ 6.0	65 ~ 90
	22 × 60	3.0 ~ 5.0	50 ~ 70
HW-65F HW-75F	22 × 60	2.5 ~ 10.0	40 ~ 150
	22 × 60	2.5 ~ 10.0	40 ~ 150

* 使用流速は充填流速の半以下に設定してください。

各種充填剤の充填流速及び使用流速

品名	カラムサイズ (mm I.D. × cm)	グレード	充填流速		使用線速度 cm/h
			mL/min	cm/h	
HW-40	22 × 60	S	2.0 ~ 2.5	30 ~ 40	10 ~ 25
		F	4.0 ~ 5.0	60 ~ 80	25 ~ 50
		C	8.0 ~ 10.0	120 ~ 160	50 ~ 100
HW-50, HW-55	22 × 60	S	1.5 ~ 2.0	25 ~ 35	10 ~ 20
		F	3.0 ~ 5.0	50 ~ 70	25 ~ 35
		C	6.0 ~ 8.0	90 ~ 130	35 ~ 70
HW-65, HW-75	22 × 60	S	1.5 ~ 5.0	20 ~ 75	10 ~ 15
		F	2.5 ~ 10.0	40 ~ 150	15 ~ 30
		C	5.0 ~ 20.0	30 ~ 300	30 ~ 65
IEC	22 × 20	S	<35	<550	45 ~ 65
		M, C	<65	<1000	80 ~ 240
HIC	22 × 20	S	<35	<550	45 ~ 65
		M, C	<65	<1000	80 ~ 240
AF-650タイプ	22 × 10	M	<65	<1000	30 ~ 130

サイズ排除クロマトグラフィー用充填剤

TOYOPEARL HWタイプ

TOYOPEARL HWタイプは、親水性ビニルポリマーを基材とした中速サイズ排除クロマトグラフィー用充填剤です。基材に糖を含まないため、特に、オリゴ糖やポリフェノール類の分離に適します。

▼ 特長

- 強固な充填剤で耐圧性に優れています。速い流速で使用可能です。
- 微小粒径で均一です。シャープな分離ピークが得られます。
- 体積変化が少なく安定です。溶媒交換性及び再現性に優れています。
- 物理的、化学的安定性に優れています。強酸・強アルカリで洗浄可能です。
- 微生物に対して安定です。
- 有機溶媒で使用できます。特にHW-40は安定で、分配クロマトグラフィー用としても使用可能です。

▼ 主な対象物質

- たんぱく質、ペプチド
- 酵素
- 核酸
- 糖類
- ポリフェノール、カテキンなど低分子生理活性物質

(注)強度に優れており、速い流速で使用できるため、充填はポンプを利用し適度に加圧する方法がトヨパールの性能をより発揮できます。

一覧表

品名	排除限界分子量		容量	S		F		C	
	たんぱく質	デキストラン		品番	価格(円)	品番	価格(円)	品番	価格(円)
TOYOPEARL HW-40	1×10^4	7×10^3	500 mL	0007447	59,000	0007448	31,000	0007449	26,000
TOYOPEARL HW-50	8×10^4	4.5×10^4	500 mL	0007452	59,000	0007453	31,000	—	—
TOYOPEARL HW-55	7×10^5	3.8×10^5	500 mL	0007456	59,000	0007457	31,000	—	—
TOYOPEARL HW-65	5×10^6	2.5×10^6	500 mL	0007464	59,000	0007465	31,000	—	—
TOYOPEARL HW-75	5×10^7	2×10^7	500 mL	0007468	59,000	0007469	31,000	—	—

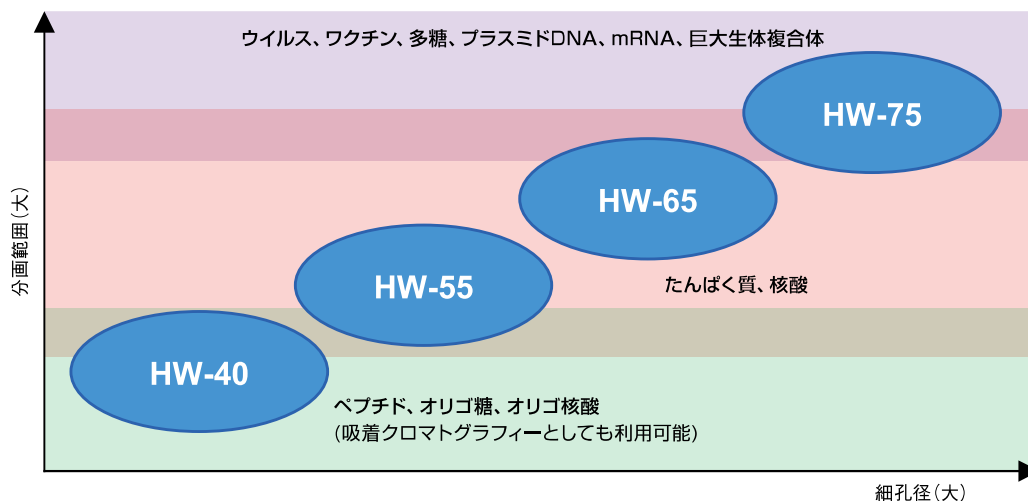
TOYOPEARL HW-40にはECグレードもあります。

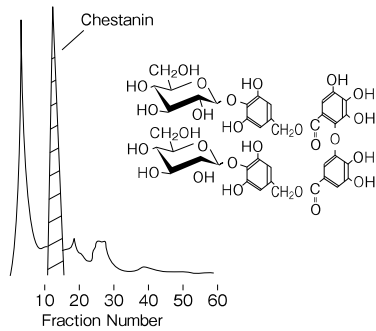
出荷形態：20%エタノール水溶液に膨潤した状態で懸濁液として出荷されます。

粒径(膨潤時)

S (Super Fine) : 20~40 μm、F (Fine) : 30~60 μm、C (Coarse) : 50~100 μm、EC (Extra Coarse) : 100~300 μm

トヨパール充填大口径分取カラムまたは大量に充填剤をご使用の際は、当社営業までお問い合わせください。

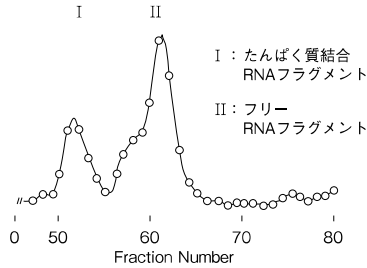


▼
ポリフェノールの分離

カラム：TOYOPEARL HW-40F (9 mm I.D. × 16 cm)
 溶離液：50 % (V/V) メタノール水溶液
 流速：3.5 mL/min
 検出：UV (240 nm)
 試料量：0.1 mL
 分取量：4 g/tube

筑波大学 小澤 哲夫先生のご厚意によります。

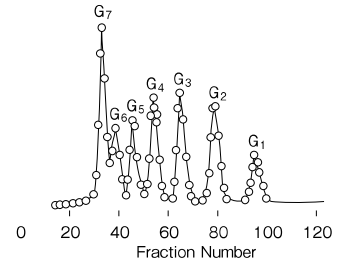
- トヨパールは、有機溶媒に安定であり、有機溶媒系での利用にも適します。
- 特に TOYOPEARL HW-40 は、LH-20 または ODS に類似した使い方が可能でポリフェノール等の分離に好結果が得られます。

▼
たんぱく質結合 RNA フラグメントの分離

カラム：TOYOPEARL HW-55F (15 mm I.D. × 120 cm)
 溶離液：50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)
 + 5 mmol/L MgCl₂ + 1 mol/L NaCl
 検出：UV (260 nm)
 試料量：1.0 mL
 分取量：1 mL/tube

K. Aoyama, T. Tanaka, S. Hidaka and K. Ishikawa
 Binding Sites of Rat Liver 5S RNA to Ribosomal Protein L5
J. Biochem., 95, 1179 ~ 1186 (1984)
 著者及び編者のご厚意によります。

- ラット肝の5S-RNA-L5 Complex を RNaseA で処理したサンプルを良好に分離します。

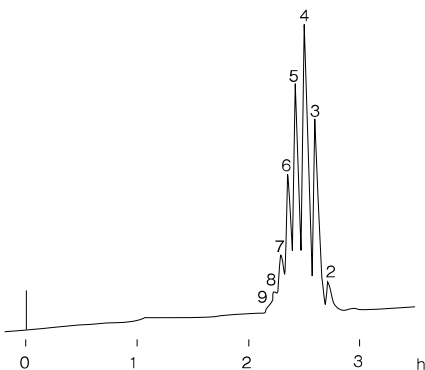
▼
オリゴ糖の分離

カラム：TOYOPEARL HW-40S
 (44 mm I.D. × 60 cm × 2本)
 溶離液：水
 流速：1.4 mL/min
 検出：旋光度測定 (λ 411.3 nm, 光路 5 cm)
 温度：25°C
 試料量：1.0 g (10 mL, 10 %)
 分取量：5.2 mL/tube

H. Kondo, H. Nakatani and K. Hiromi: Rapid Preparation of Maltooligo saccharides from Cyclodextrins by Column Chromatography of Hydrophilic Vinyl Polymer Gel
Agric. Biol. Chem., de (10), 2369 (1981)
 著者及び編者のご厚意によります。

β-シクロデキストリン加水分解により得られた単量体 (グルコース) から 7 量体 (マルトヘptaオース) までの直鎖オリゴ糖の分離

- 負荷量は、軟質充填剤に比べ 2 ~ 4 倍可能です。
- 短時間に大量分取が可能です。

▼
マルトオリゴ糖の分離

カラム：TOYOPEARL HW-50S (22 mm I.D. × 50 cm)
 + TOYOPEARL HW-40S (22 mm I.D. × 100 cm)
 溶離液：0.1 mol/L 水酸化ナトリウム
 流速：0.5 mL/min

大阪市立大学 三崎 旭先生のご厚意によります。
Agric. Biol. Chem., 50 (9), 2171 ~ 2183 (1986)

- 0.1 mol/L 水酸化ナトリウムでも使用できます。