

スケールアップ / トヨパールの洗浄

カラムのスケールアップ	P.174 – P.175
工業スケールでの分取	P.176 – P.177
トヨパールの洗浄	P.178 – P.179

カラムのスケールアップ

スケールアップの考え方

スケールアップ計画は、基本的には分離能を変えないという視点から考えます。分離能(Rs)は次の因子によって決定されます。すなわち、充填剤の粒子径(dp)、カラム長さ(z)、線速度(u)及びリニアグラジエント因子(GH) [GH = g(Vt-Vo) : リニアグラジエント勾配(g)、総カラム容積(Vt)、空隙容積(Vo)]であり、これら因子の関係は、次式のように表されます。

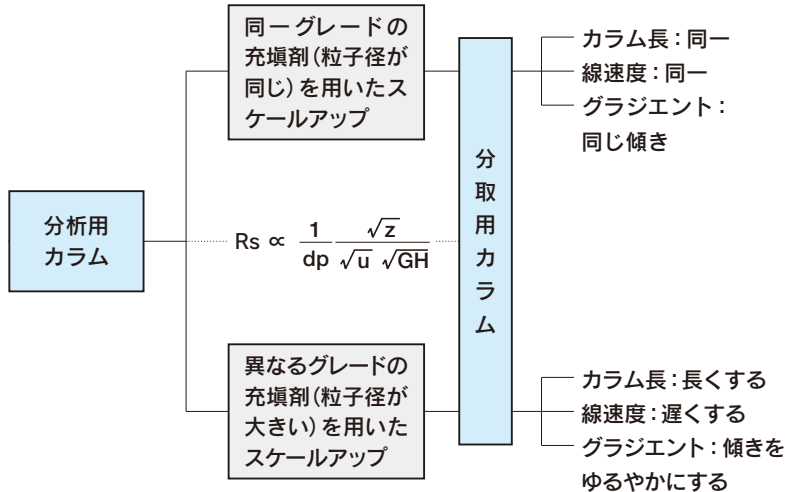
$$Rs \propto \frac{1}{dp} \frac{\sqrt{z}}{\sqrt{u} \sqrt{GH}}$$

この関係式に基づくと、分離能はカラム長さ(Z)の平方根に比例、充填剤の粒子径(dp)に反比例、線速(u)とリニアグラジエント因子(GH)の、それぞれ平方根に反比例することがわかります。試料負荷量は、一般的にカラムの断面積に比例します。

分取用カラムでは、粒子径の大きな充填剤を使用する機会が多く、その場合、関係式より、分離能が低下することが分かります。そこで、カラム長さ、線速度、グラジエント因子等を変更し、分離能の低下を小さくします。

なお、スケールアップを容易にするため、分取用充填剤(大粒子径)を充填した分析用カラムも特別注文にてお受け致します。

分析カラムと同じ分離能を得るための条件



(例) 分析用カラム充填剤の粒子径10 μ m、分取用カラム充填剤の粒子径14 μ mの場合、分取用カラムの長さを2倍にするか、線速度を1/2にすれば、分析用カラムとほぼ同じ分離能が得られます。

▼ スケールアップする際の分析カラム及び分取カラムの標準条件

サイズ排除クロマトグラフィー

		分析カラム			分取カラム	
		7.8 mm I.D. × 30 cm	7.5 mm I.D. × 60 cm	21.5 mm I.D. × 60 cm	55 mm I.D. × 60 cm	108 mm I.D. × 60 cm
TSKgel SWタイプ	流速 (mL/min)	1.0	1.0	5~8	15~30	50~90
TSKgel Hタイプ	分析時間 (min)	12	25	30~90	40~120	60~150
TSKgel PWタイプ	流速 (mL/min)	1.0	1.0	3	15~30	—
	分析時間 (min)	12	25	45	60~90	—

逆相クロマトグラフィー (シリカ系)

		分析カラム	セミ分取カラム	分取カラム		
		4.6 mm I.D. × 15 cm	7.8 mm I.D. × 30 cm	21.5 mm I.D. × 30 cm	55 mm I.D. × 30 cm	108 mm I.D. × 30 cm
TSKgel ODS-80Ts、T _M	流速 (mL/min)	1.0	3.0	5~10	50~100	200~300
TSKgel ODS-120T, A	グラジエント時間 (min)	30~60	30~60	60~120	120~240	120~240
		分析カラム	セミ分取カラム	分取カラム		
		4.6 mm I.D. × 25 cm	7.8 mm I.D. × 30 cm	20 mm I.D. × 25 cm	55 mm I.D. × 30 cm	
TSKgel ODS-80Ts (5 μm)	流速 (mL/min)	0.5	—	10	—	
	グラジエント時間 (min)	30~60	—	30~60	—	

逆相クロマトグラフィー (ポリマー系)

		分析カラム	セミ分取カラム	分取カラム	
		4.6 mm I.D. × 7.5 cm	4.6 mm I.D. × 15 cm	21.5 mm I.D. × 15 cm	55 mm I.D. × 20 cm
TSKgel Octadecyl-4PW	流速 (mL/min)	—	1.0	4.0	30~40
	グラジエント時間 (min)	—	30~60	120~240	120~240
TSKgel Phenyl-5PW RP	流速 (mL/min)	1.0	—	4.0	30~40
	グラジエント時間 (min)	30~60	—	120~240	120~240

順相クロマトグラフィー (シリカ系)

		分析カラム	セミ分取カラム	分取カラム
		4.6 mm I.D. × 25 cm	7.8 mm I.D. × 30 cm	21.5 mm I.D. × 30 cm
TSKgel Amide-80	流速 (mL/min)	1.0	3.0	5~10
TSKgel Silica-60等	分析時間 (min)	20	40	40~80

イオン交換、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー

		分析カラム	分取カラム	
		7.5 mm I.D. × 7.5 cm	21.5 mm I.D. × 15 cm	55 mm I.D. × 20 cm
TSKgel DEAE-5PW	流速 (mL/min)	1.0	4.0	30~40
TSKgel Phenyl-5PW等	グラジエント時間 (min)	60	120	120~180

工業スケールでの分取 (GMP支援データ充実)

トヨパールは、優れた性能を持っているため、分析レベルでの実験結果から、大口径カラムへのスケールアップが容易に行えます。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。

▼ 機械的強度

トヨパールと他の基材を比較した場合、大口径カラムで大きな差があらわれます。トヨパールは、大口径カラムで流速を充分上げても、充填剤がつぶれることがありません。

従ってカラムの洗浄時や再平衡化時に流速を上げ、分離時間の短縮を図ることも可能です。

▼ 耐久性

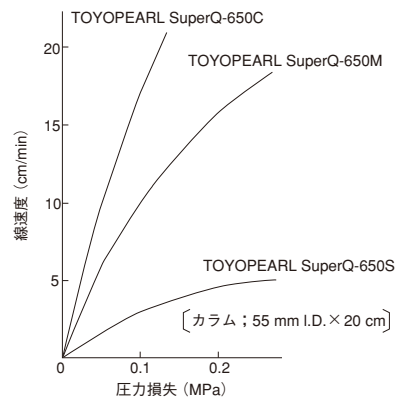
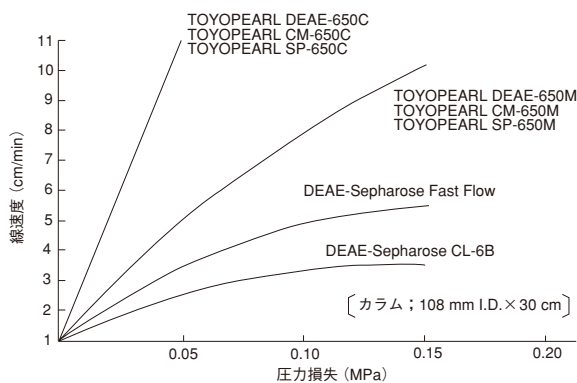
分離にグラジエントを用いるイオン交換や疎水クロマトグラフィーでは、充填剤の膨潤収縮が、大口径カラムでは大きな問題になりますが、トヨパールはイオン強度の変化による膨潤収縮が最小限に抑えられています。

また、粗試料の分離におけるカラムの汚れも、NaOH等によるカラム洗浄が簡単にできます。カラムのパイロジェンフリー化も可能です。

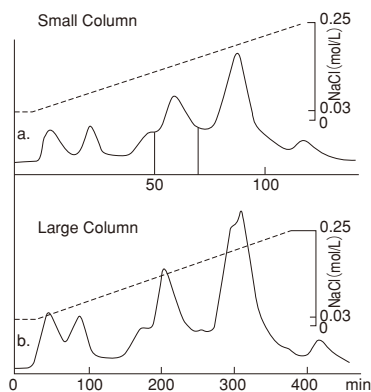
▼ 大口径カラムへのスケールアップ

分析用カラムから大口径カラムへのスケールアップも、P.174のスケールアップ理論に基づいて行うことができます。

▼ 圧損と流速との関係 (水通液時)



▼ 大口径カラムへのスケールアップ (スケールアップが簡単です)



	小型カラム	工業用大型カラム
ゲル量	0.08 L	113 L
カラムサイズ	2.2 cm I.D. × 20 cm	60 cm I.D. × 40 cm
流速	3.7 mL/min	1600 mL/min
溶離液	トリス塩酸塩緩衝液 (0.03 → 0.25 mol/L NaCl)	トリス塩酸塩緩衝液 (0.03 → 0.25 mol/L NaCl)
試料負荷量	β -galactosidase 1%, 0.025 L (0.25 g)	β -galactosidase 1%, 40 L (400 g)

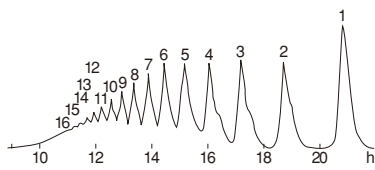
* トヨパール充填大口径分取カラムについては、当社営業までお問い合わせください。

大型分取カラムでの分取実施例一覧表

試料	充填剤	カラム寸法	カラム容積 (liter)	試料負荷量、その他備考
糖類				
オリゴ糖	HW-40S	108 mm I.D.×100 cm×2本	16	1.1 g
オリゴ糖	HW-40S	108 mm I.D.×100 cm×3本	24	—
オリゴ糖	HW-40F	210 mm I.D.×100 cm×3本	104	— カラムジャケット付
オリゴ糖	HW-40F	310 mm I.D.×100 cm×2本	150	— カラムジャケット付
たんぱく質、酵素				
ウシ血清アルブミン	HW-55F	310 mm I.D.× 60 cm	45	1.5 g
たんぱく質	HW-55F	500 mm I.D.× 60 cm×3本	353	—
酵素	HW-65F	440 mm I.D.× 76 cm	120	60 g
オパールブミン	CM-650M	108 mm I.D.× 30 cm	2.4	500 mL
たんぱく質	SP-650M	310 mm I.D.× 30 cm	23	—
たんぱく質	Butyl-650M	310 mm I.D.× 30 cm	23	—
たんぱく質	QAE-550C	800 mm I.D.× 20 cm	100	—
β -ガラクトシターゼ	DEAE-650M	600 mm I.D.× 40 cm	113	400 g

* トヨパール充填大口径分取カラムについては、当社営業までお問い合わせください。

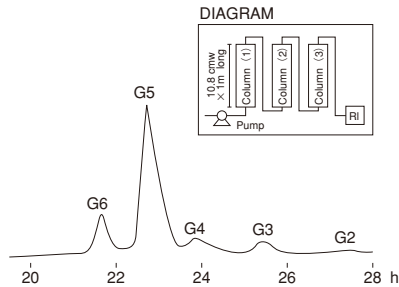
▼ デキストランT-40の酸加水分解物の分離



カラム ; TOYOPEARL HW-40S
(108 mm I.D.×100 cm×2本)

溶離液 ; 水
流速 ; 9.1 mL/min 検出 ; RI
温度 ; 25℃
試料 ; デキストランT-40加水分解物 (11 g)

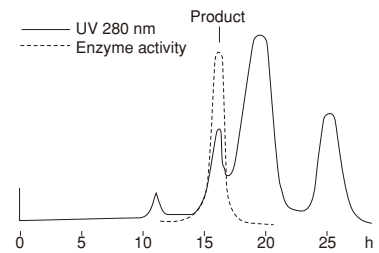
▼ オリゴ糖の分離



カラム ; TOYOPEARL HW-40S
(108 mm I.D.×100 cm×3本)

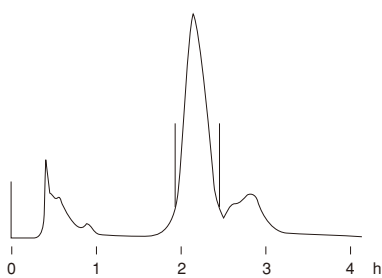
溶離液 ; 水
流速 ; 9.3 mL/min (6 cm/h) 検出 ; RI
温度 ; 50℃
試料 ; オリゴ糖 (4 g in 40 mL)

▼ 酵素の分離



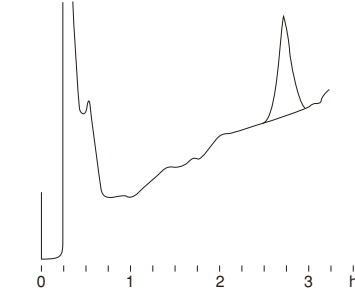
カラム ; TOYOPEARL HW-65F
(440 mm I.D.×76 cm) (= 120 L)
溶離液 ; 10 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 6.0)
流速 ; 4.5 L/h (= 3 cm/h) 検出 ; UV (280 nm)
温度 ; 4℃
試料 ; 粗酵素 (60 g)

▼ 卵白たんぱく質 (アルブミン) の精製



カラム ; TOYOPEARL CM-650M
(108 mm I.D.×30 cm)
溶離液 ; A: 酢酸緩衝液 (pH 4.5)
B: 酢酸緩衝液 (pH 4.5) + 0.2 mol/L NaCl
A→B (400 min、リニアグラジエント)

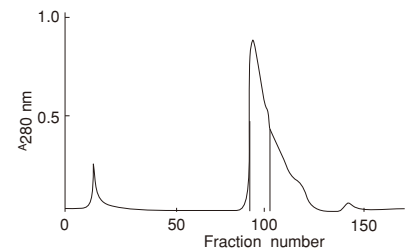
流速 ; 92 mL/h
検出 ; UV (280 nm)
試料 ; 50 mL

▼ α -アミラーゼの精製

カラム ; TOYOPEARL Butyl-650M
(55 mm I.D.×20 cm)
溶離液 ; A: 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) +
2 mol/L 硫酸アンモニウム
B: 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)
A→B (180 min、リニアグラジエント)

流速 ; 24 mL/h
検出 ; UV (280 nm)
温度 ; 25℃
試料 ; 市販の α -アミラーゼ抽出物 20 mL

▼ ミオシンたんぱく質の分離



カラム ; TOYOPEARL DEAE-650M
(55 mm I.D.×40 cm)
溶離液 ; A: 40 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.5) +
1 mmol/L DTT + 1 mmol/L EDTA
B: A + 0.5 mol/L KCl
A (14 h)、A→B (22 h、リニアグラジエント)

流速 ; 100 mL/h
検出 ; UV (280 nm)
温度 ; 4℃

トヨパールの 洗浄



トヨパールの一般的洗浄法としては、P. 141で紹介したたんぱく質分離用カラムの洗浄方法をお試しください。

ここでは、生物由来の汚染物質の除去方法、有機溶媒を用いた洗浄方法、変性剤を用いた洗浄方法を紹介します。

アルカリ洗浄(生物由来の汚染物質の除去方法)

トヨパールの品質管理項目には菌体数やエンドトキシン濃度が含まれていますが、医薬品などの精製を目的とする場合には使用に先立って、これらの生物由来の汚染物質を除去する必要があります。もちろん、これらが問題となるような実験的な利用にも使用前に洗浄を行う必要があります。エンドトキシンの除去には一般的にアルカリ水溶液が用いられますが、ほとんどのトヨパールでもアルカリ洗浄をお勧めしています。

また、アルカリ洗浄ではたんぱく質の分解除去も行えるため、たんぱく質の吸着により劣化したトヨパールの性能が回復ができる可能性もあります。

トヨパールは化学的に安定で、アルカリ洗浄が可能なため、容易にこれらの生物学的汚染物質を除去することができます。なお、QAE-550Cや一部のアフィニティーグレー

ドは他のトヨパールと比べてアルカリ耐久性が乏しいため、アルカリ水溶液の代わりに1500 mg/L程度の過酢酸や次亜塩素酸ナトリウムを用いた方がよい場合があります。以下にカラム充填状態での洗浄手順を示します。

● 洗浄手順

生物由来の汚染物質の除去を目的としたトヨパールのアルカリ洗浄は、一般的に以下のような手順で行います。

1. カラムの3倍容量以上の0.1~1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液をカラムに通液します。(*)
2. 精製水を通液してアルカリを除去します。(**) カラムからの流出液をサンプリングして汚染物質濃度を確認します。
3. 汚染物質濃度が目的とするレベルに低下するまで、上記の操作を繰り返し行います。
4. 使用する溶離液でカラムを平衡化します。

(*) 水酸化ナトリウム水溶液への接触時間は1~6時間となるように流速を設定してください。水酸化ナトリウム水溶液の使用量を減らすために置換後、送液を停止して、1~24時間の水酸化ナトリウム封入時間を設けるのが効果的です。

(**) アルカリ除去のための精製水通液は、充填剤のタイプによっても異なりますが、カラム容量の5~10倍が目安になります。pHが9以下になるまで洗浄して下さい。pHが十分に下がるのに時間がかかる場合には、精製水の代わりに使用緩衝溶液を通液するのが有効です。

最後に、洗浄後にカラムを通過した液の汚染物質濃度の確認は忘れずに行ってください。

有機溶媒を用いた洗浄

サンプルはその由来により油脂などの高疎水性物質を多く含んでいることがあります。前処理を行ってサンプルからあらかじめ除去することは可能ですが、完全に除去するのは困難で、微量な残存物が充填剤を覆うように蓄積して性能を落としていきます。これらを洗浄するには、まずこれらの高疎水性物質を良く溶かす溶媒を選択する必要があります。最もよく使用されるのがエタノールやアセトンなどの極性有機溶媒です。これらの溶媒は疎水性物質を良く溶かし、また、充填剤に対してもダメージを与えることがほとんどなく（一部アフィニティーを除く）容易に使用することができます。以下にこれらの溶媒を使用した例を示します。

● TOYOPEARL Butyl-650M、100 L スケールの場合

1. 純水（バイロジェンフリー水）300 L で通液洗浄を行う。
2. 50 %エタノール300 L で通液洗浄を行う。（汚れがひどい時は100 %エタノール、もしくは50 %アセトンで通液洗浄を行う。）
3. 純水（バイロジェンフリー水）300 L で通液洗浄を行う。
4. 20 %エタノールを300 L通液後、そのまま保存する。

一度の洗浄で汚れが十分取り除けない場合は、2、3の工程を繰り返したり、2の工程で封入放置（数時間）した後、3の工程で洗い流すことが有効です。

最後に、洗浄方法や洗浄頻度は小スケールの実験によりSOPとして確立しておくことが大切です。また、初期性能をどれくらい維持しているかを定期的に確認することも重要です。

変性剤を用いた洗浄

たんぱく質による汚染の場合、水酸化ナトリウムを用いた洗浄が基本的ですが、リガンドの性質により水酸化ナトリウムが使用できない場合もあります。このような場合には洗浄液として変性剤を用いることができます。たんぱく質を変性させて溶解させ洗い流すように

します。以下に一例を紹介します。

● TOYOPEARL AF-Heparin HC-650Mの場合

1. 純水（バイロジェンフリー水）でカラムボリュームの約2倍量通液洗浄を行う。
2. 6 mol/L塩酸グアニジン水溶液でカラムボリュームの約3倍量通液洗浄し、そのまま約8時間封入放置する。
3. 純水（バイロジェンフリー水）でカラムボリュームの約3倍量通液洗浄を行う。
4. 1 mol/L NaCl水溶液でカラムボリュームの約3倍量通液洗浄を行う。
5. 純水（バイロジェンフリー水）でカラムボリュームの約3倍量通液洗浄を行う。
6. 20 %エタノールでカラムボリュームの約3倍量通液洗浄し、そのまま保存する。

汚れが取りきれない場合は工程2～3を数回繰り返します。たんぱく質の汚染の場合は変性剤を用いることで高次構造を壊し、溶解させやすくします。そのため工程2では、たんぱく質変性のために一定時間放置する必要があります。かなり高塩濃度の水溶液を流すので流速（操作圧）に注意し、装置を含めたその後の洗浄は十分に行うことが大切です。

最後に、洗浄方法や洗浄頻度は小スケールの実験によりSOPとして確立しておく事が大切です。また、初期性能をどれくらい維持しているかを定期的に確認することも重要です。