

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 (R) 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。

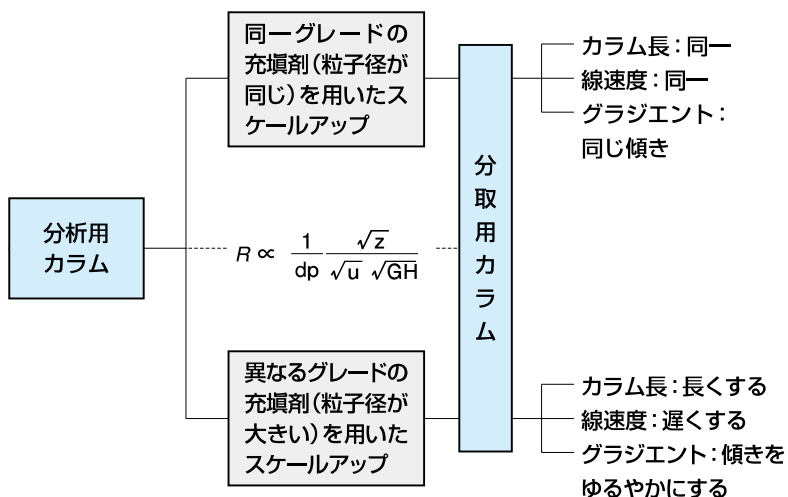
$$R \propto \frac{1}{dp} \frac{\sqrt{z}}{\sqrt{u} \sqrt{GH}}$$

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場合が多く、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 $10 \mu\text{m}$ 、分取用カラム充填剤の粒子径 $14 \mu\text{m}$ 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
TSKgel ODS-80Ts, T _M	流速 (mL/min)	1.0	3.0	5~10	50~100
TSKgel ODS-120T, A	グラジエント時間 (min)	30~60	30~60	60~120	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はありません。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。

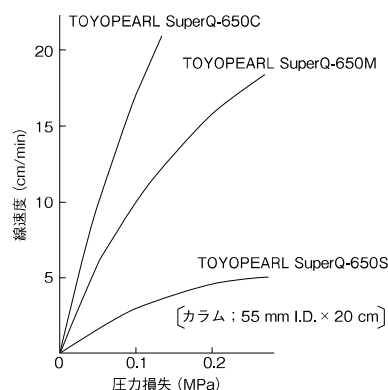
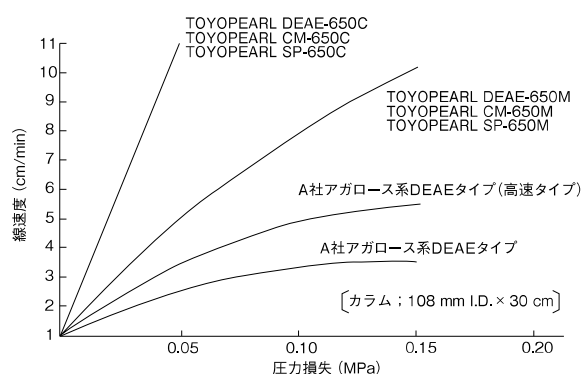
耐久性

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。

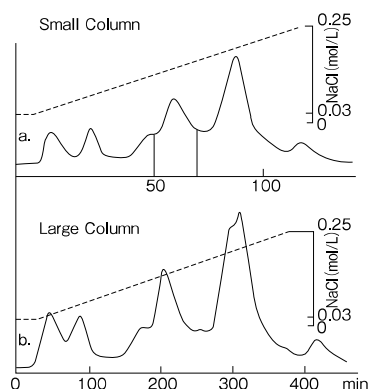
大口径カラムへのスケールアップ

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. x 20 cm	60 cm I.D. x 40 cm
流速	3.7 mL/min	1600 mL/min
溶離液	トリス塩酸緩衝液 (0.03 → 0.25 mol/L NaCl)	トリス塩酸緩衝液 (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)

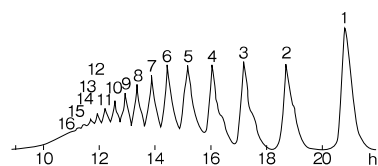
* トヨパール充填大口径分取カラムについては、当社営業までお問い合わせください。

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
オプアルブミン	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)

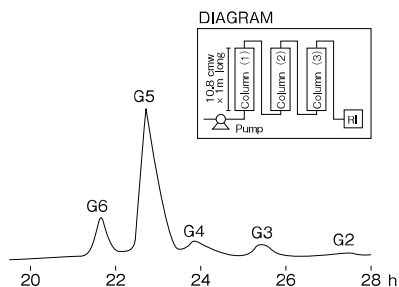
溶離液: 水

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)

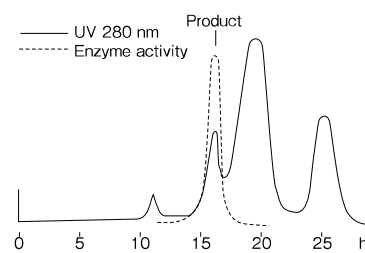
溶離液: 水

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)

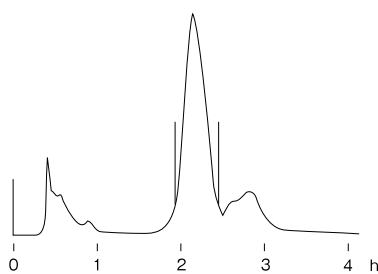
溶離液: 10 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 6.0)

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

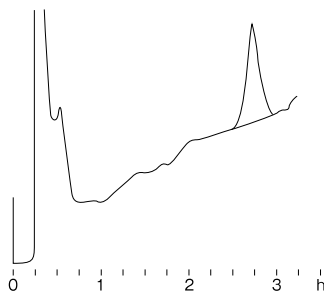
A → B (400 min, リニアグラジエント)

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)

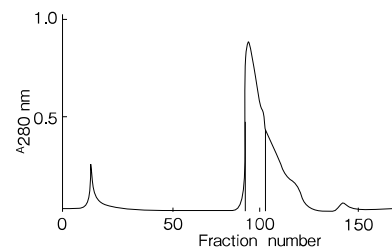
流速: 24 mL/h

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℃