



TOSOH

TOYOPEARL®、TSKgel® PW

充填法ガイド

— 目 次 —

1. はじめに	1	6. 充填評価	26
2. 充填手順	1	6.1 カラムの充填状態評価に用いられる指標 (理論段数、非対称係数)	26
3. 微粒子の除去 (デカンテーション)	1	6.2 充填状態の評価に用いる試料及び条件	28
3.1 デカンテーション手順	1	6.2.1 アセトンを用いた充填状態の評価	28
3.1.1 ラボスケールでの デカンテーション実施例	4	6.2.2 NaCl 水溶液を用いた充填状態の評価	28
3.1.2 パイロットスケールでの デカンテーション実施例	4	6.3 期待するカラム性能 (理論段数、非対称係数) が得られないとき	28
3.1.3 プラントスケールでの デカンテーション実施例	4	7. カラムの保管	29
4. スラリーの調製	5	7.1 保管温度	29
4.1 スラリー溶媒について	5	7.2 保管溶媒	29
4.2 スラリー濃度について	7	7.3 遮光	30
4.3 充填剤の準備量について	7	8. 充填剤の再充填	30
4.4 スラリーの調製手順	7	8.1 固定栓カラムおよびラボスケールの 可動栓カラムからの充填剤の抜き出し	30
4.4.1 ラボスケールでのスラリー調製例	8	8.2 プラントスケールカラム (DAC カラムを除く) からの充填剤の抜き出し	30
4.4.2 パイロットスケールでのスラリー調製例	9	8.3 DAC カラム (ポンプによる水圧押し下げタイプ) からの充填剤の抜き出し	30
4.4.3 プラントスケールでのスラリー調製例	10	8.4 DAC カラム (モーター駆動による全自動タイプ) からの充填剤の抜き出し	31
5. カラムへの充填	10	9. 充填剤の廃棄	31
5.1 充填溶媒	11	10. 終わりに	32
5.2 充填線速	11		
5.3 充填操作	11		
5.3.1 オープンカラムへの充填	11		
5.3.2 固定栓カラムへの充填	16		
5.3.3 可動栓カラムへの充填	18		

1. はじめに

プロセスクロマトグラフィー用充填剤 TOYOPEARL[®]、高速分取用充填剤 TSKgel[®] PW シリーズ、Ca⁺⁺Pure-HA[™] は、生体高分子の分離・精製に適した分取クロマトグラフィー用充填剤です。親水性メタクリレートやハイドロキシアパタイト結晶を基材としており、優れた圧力・通液特性と pH 安定性（ハイドロキシアパタイトは pH ≥ 6.5）を備えています。TOYOPEARL の電子顕微鏡写真を図 1 に示します。種々の分離モード、粒子径の製品が多彩な容量（図 2）でラインナップされており、たんぱく質やペプチド、核酸などの分離・精製用として、ラボスケールからプラントスケールまで幅広くご利用いただけます。これら充填剤の性能を十分に発揮させるには、適切なカラム充填が重要です。本稿では TOYOPEARL、TSKgel PW シリーズ、Ca⁺⁺Pure-HA の充填方法について具体的に説明していきます。



図 1 TOYOPEARL の電子顕微鏡写真



図 2 TOYOPEARL の出荷形態

2. 充填手順

TOYOPEARL、TSKgel PW シリーズ、Ca⁺⁺Pure-HA の充填手順を図 3 に示します。

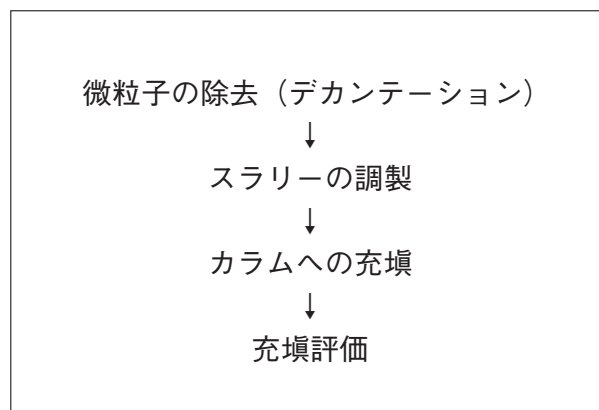


図 3 充填剤の充填手順

3. 微粒子の除去（デカンテーション）

TOYOPEARL、TSKgel PW シリーズは充填剤が水溶液中に分散した懸濁液の状態で、Ca⁺⁺Pure-HA は乾燥粉体の状態で出荷されます（一部のプレパックカラム製品を除く）。そのため、輸送中に加わる振動や衝撃により充填剤の一部が破碎し、微粒子が生じることがあります。あるいは、激しい攪拌も微粒子を発生させる要因となります。微粒子は、カラムのフリットに目詰まりすることで圧力損失の増大や、カラム内の流れを不均一にする原因になりますので、充填前に除いておく必要があります。微粒子は沈降速度が遅いため、デカンテーション操作により除去することができます。デカンテーション操作の手順を図 4 に示します

3.1 デカンテーション手順

- (1) 充填剤量に対して十分な大きさ（好ましくは 3 倍体積以上）の容器に、懸濁状態の充填剤を注ぎ入れます。

ポイント

- ・ 充填剤は容器の底に沈降していますので、攪拌または揺動して懸濁状態にして取り出します。
- ・ 充填剤が入っていた容器を純水で数回共洗いすることで、充填剤を全て取り出すことができます。

- (2) 充填剤に対して十分な量（好ましくは 3 倍体積以上）の純水を加えます。

- (3) 葉さじ、攪拌棒、パドル、プロペラなど、スケールに応じた適切な器具を用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。

注意！

- ・ 攪拌の際、マグネチックスターラー（攪拌子）は使用しないで下さい。攪拌子と容器の間で充填剤が摺り潰され、新たな微粒子が発生する恐れがあります。また、激しい攪拌や、充填剤を攪拌棒などで壁に押し付けるような操作も同様に充填剤を破碎させる可能性がありますので避けて下さい。特に $\text{Ca}^{++}\text{Pure-HA}$ は破碎しやすいので注意が必要です。そのため新品の $\text{Ca}^{++}\text{Pure-HA}$ では、デカンテーションせずに充填することもあります。
- ・ 静置することで充填剤は沈降し、硬くしまったゲルベッドを形成します。沈降した充填剤を再分散させる際は、上澄みのみをやや素早く攪拌して渦を発生させ、水流によりゲルベッドの表面から徐々に分散させるようにします。攪拌器具をゲルベッドの中に差し込み、かき混ぜるような操作はしないでください。

- (4) 静置し、充填剤を沈降させます。静置後数分で上澄み層、充填剤が沈降中の層、充填剤が堆積して形成されたゲルベッドの3層に分離し始めます。中間の層（充填剤が沈降中の層）が全て沈降し、上澄みとゲルベッドの2層になるまで待ちます。

ポイント

- ・ 静置時間は充填剤の粒子の大きさや溶媒、デカンテーションに用いる容器の形状や大きさなどにより異なります。静置時間の目安を表1に示します。
- ・ 静置の際は、必要に応じて容器を蓋やラップなどで覆い、埃などの混入を防ぎます。

- (5) 充填剤が沈降した後、上澄みを除去します。

ポイント

- ・ 上澄みは、ラボスケールでは容器を静かに傾けて除去するのが一般的です。パイロットスケールやプラントスケールでは容器を傾けることが困難なため、ポンプを用います。サイフォンの原理を利用して吸引除去することも可能です。
- ・ 十分に沈降した充填剤は硬くしまったゲルベッドを形成するので、容器を傾けても底に堆積した状態のまま流動化することはありませんが、溶媒の組成が大きく変化した場合やデカンテーションの初期などでは、硬いゲルベッドが形成されず、容器を傾けた際、流動化することがあります。その場合もできるだけ充填剤が容器から流れださないように静かに操作して上澄みだけを除去します。
- ・ 大型のタンク中の上澄みの除去操作をする場合、手動のポンプでは効率よく作業を行えないことがあります。その場合はローラーポンプ（チューブポンプ）などを用いて上澄みを除去することも可能です。
- ・ 初期の上澄みは破碎分などの微粒子により白濁（有色の充填剤は充填剤と同色）していますが、デカンテーション操作を繰り返すことで徐々に減少し、透明になっていきます。

- (6) 上澄みに濁りが見られなくなるまで(2)から(5)までの操作を繰り返します（3回から5回が目安）。

表1 充填剤の静置時間の目安（純水）

TOYOPEARL	粒子径（ μm ）	静置時間（min）※
Superfine（S）グレード	35	80～120
Fine（F）グレード	45	50～90
Medium（M）グレード	65	40～60
Coarse（C）グレード	100	20～40
Extra Coarse（EC）グレード	200	5～20
TSKgel PW シリーズ	20	120～160
TSKgel PW シリーズ	30	100～140
$\text{Ca}^{++}\text{Pure-HA}$	35	50～70

※充填剤の粒子径やロット、溶媒、容器の形状や大きさによって静置時間は異なります

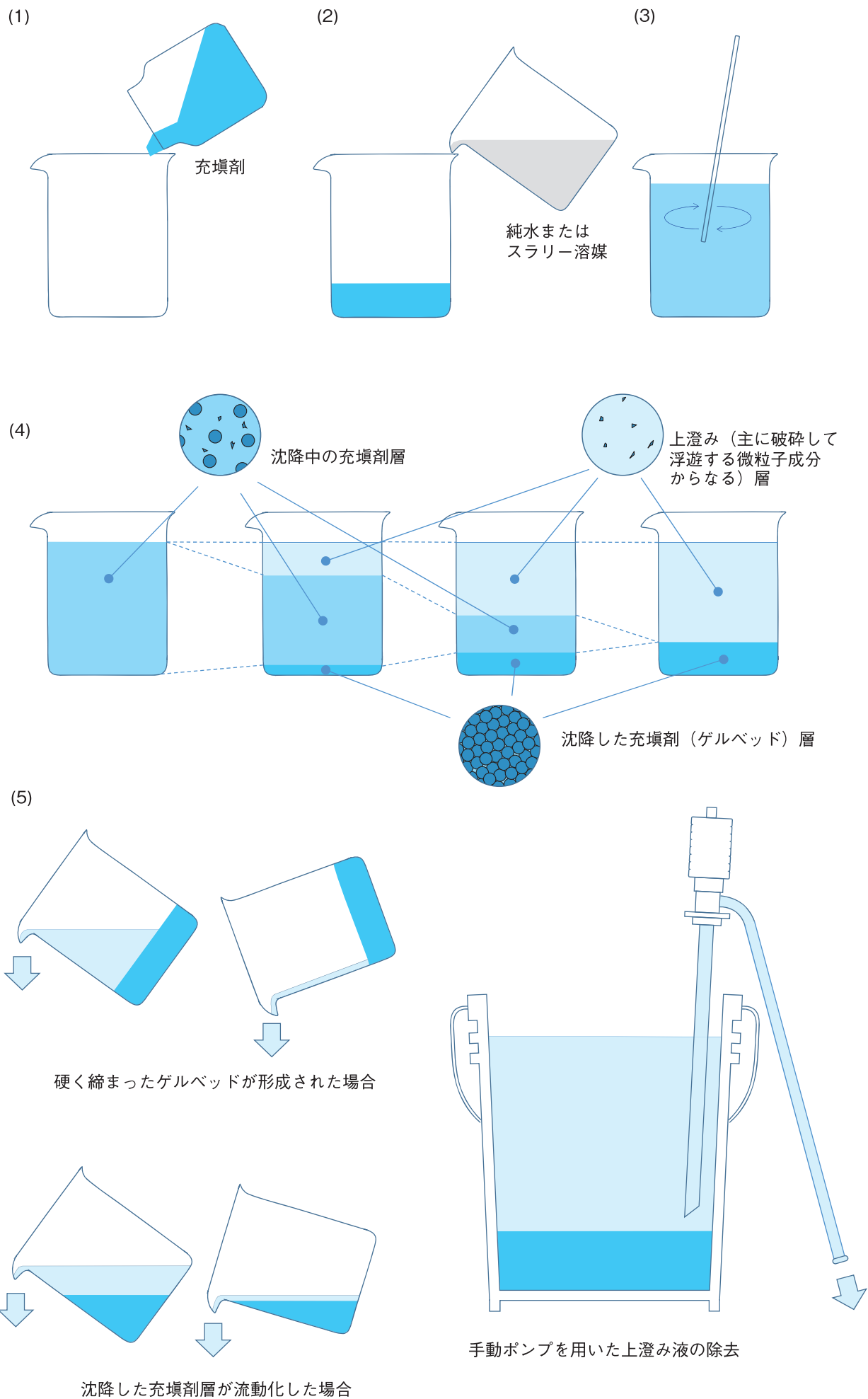


図4 デカンテーション

3.1.1 ラボスケールでのデカンテーション実施例

準備するもの
充填剤 500 mL
純水
2 L ビーカー
大型の薬さじ

- (1) 充填剤の入った 250 mL ボトル 2 本（計 500 mL）を揺動して懸濁させた後、開栓して 2 L ビーカーに注ぎ入れます。ボトル内を純水で数回共洗いし、ビーカーに加えます。
- (2) 純水を加えて総量を約 1500 mL ～ 2000 mL にします。
- (3) 大型の薬さじを用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
- (4) 静置して充填剤を沈降させます。
- (5) 充填剤が沈降した後、ビーカーを静かに傾けて上澄みを除去します。
- (6) 上澄みに濁りが見られなくなるまで(2)から(5)までの操作を繰り返します。

3.1.2 パイロットスケールでのデカンテーション実施例

準備するもの
充填剤 5 L
純水
20 L 容器
手動ポンプ
パドルまたは長さ数 10 cm 程度の攪拌棒

- (1) 透明な軟質樹脂製のバロンボックスに入った 5 L の充填剤を揺動して懸濁させた後、開栓して 20 L の容器に注ぎ入れます。バロンボックス内を純水で数回共洗いし、容器に加えます。
- (2) 純水を加えて総量を約 15 L ～ 20 L にします。
- (3) パドルまたは攪拌棒を用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
- (4) 静置して充填剤を沈降させます。

- (5) 充填剤が沈降した後、容器を傾けるか、手動のポンプを用いて上澄みを除去します。
- (6) 上澄み液に濁りが見られなくなるまで(2)から(5)までの操作を繰り返します。

3.1.3 プラントスケールでのデカンテーション実施例

準備するもの
充填剤 100 L (50 L × 2)
純水
100 L 空容器
ポンプ
プロペラ型攪拌機またはパドル

- (1) 50 L 充填剤（100 L の樽型の硬質樹脂容器に入った荷姿で出荷されます）を 2 本用意し、それぞれの上澄みをポンプで吸引除去します。
- (2) 純水を加えてそれぞれ約 100 L にします。
- (3) プロペラ型攪拌機またはパドルを用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
- (4) 充填剤の入った 2 つの容器からそれぞれ約 1/3 量の懸濁液を空の 100 L 容器に移します（充填剤が 3 つの容器に等量になるよう分割します）。
- (5) 各容器に全体量が 100 L 程度になるまで純水を加えます。
- (6) プロペラ型攪拌機またはパドルを用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
- (7) 静置して充填剤を沈降させます。
- (8) 充填剤が沈降した後、沈降したゲルベッドの表面を乱さないように上澄みをポンプで吸引除去します。
- (9) 上澄みに濁りが見られなくなるまで(5)から(8)までの操作を容器毎に繰り返します。

ポイント

- ・ 3 つの容器の操作に時間差をつけておくことで、1 容器ごとに順に作業を進めていくことができ効率的です。

4. スラリーの調製

4.1 スラリー溶媒について

TOYOPEARL, TSKgel PW シリーズ, Ca⁺⁺Pure-HA は、充填剤をスラリー溶媒中に分散させた充填剤スラリーを調製し、これをカラムに導入する湿式（スラリー）充填法を用いて充填します。（Ca⁺⁺Pure-HA は乾式（ドライ）充填法を用いて充填することもできます。乾式（ドライ）充填法の詳細は Ca⁺⁺Pure-HA ハンドブックに記載されています。）

充填性は、充填剤の性質の他、スラリー溶媒の組成やスラリー濃度などによって大きく影響を受けます。充填するカラムのタイプによっても適した充填条件は異なります。固定栓カラムの充填条件例を表2に、可動栓カラムの充填条件例を表3、4にそれぞれ示します。

表2 固定栓カラムの充填条件例

充填剤タイプ		PW グレード 20 μm	PW グレード 30 μm	S グレード	F グレード	M グレード	C グレード	EC グレード
HW シリーズ	HW-40	スラリー溶媒	—	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	—	1.0 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl
		スラリー濃度	—	30 – 50 %	30 – 50 %	—	30 – 50 %	30 – 50 %
		充填溶媒	—	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	—	1.0 mol/L NaCl	純水
		充填線速	—	30 – 40 cm/h	60 – 80 cm/h	—	120 – 160 cm/h	500 – 1000 cm/h
		操作最大圧力	—	0.5 MPa	0.5 MPa	—	0.3 MPa	0.3 MPa
	HW-50 HW-55	スラリー溶媒	—	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	—	1.0 mol/L NaCl	—
		スラリー濃度	—	30 – 50 %	30 – 50 %	—	30 – 50 %	—
		充填溶媒	—	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	—	1.0 mol/L NaCl	—
		充填線速	—	25 – 35 cm/h	50 – 70 cm/h	—	90 – 130 cm/h	—
		操作最大圧力	—	0.5 MPa	0.5 MPa	—	0.3 MPa	—
	HW-65 HW-75	スラリー溶媒	—	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	—	1.0 mol/L NaCl	—
		スラリー濃度	—	30 – 50 %	30 – 50 %	—	30 – 50 %	—
		充填溶媒	—	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	—	1.0 mol/L NaCl	—
		充填線速	—	20 – 75 cm/h	40 – 150 cm/h	—	30 – 300 cm/h	—
		操作最大圧力	—	0.5 MPa	0.5 MPa	—	0.3 MPa	—
	IEC シリーズ	スラリー溶媒	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	—
		スラリー濃度	40 – 50 %	40 – 50 %	40 – 50 %	40 – 50 %	40 – 50 %	—
		充填溶媒	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	1.0 mol/L NaCl	—
		充填線速	100 cm/h	200 cm/h	400 – 600 cm/h	800 – 1000 cm/h	800 – 1200 cm/h	—
		操作最大圧力	1.0 MPa	1.0 MPa	0.5 MPa	0.5 MPa	0.3 MPa	—
		スラリー溶媒	—	—	—	—	1.0 mol/L NaCl	—
		スラリー濃度	—	—	—	—	30 – 50 %	—
		充填溶媒	—	—	—	—	1.0 mol/L NaCl	—
		充填線速	—	—	—	—	800 – 1200 cm/h	—
		操作最大圧力	—	—	—	—	0.3 MPa	—
	MegaCap II SP-550	スラリー溶媒	—	—	—	—	—	1.0 mol/L NaCl
		スラリー濃度	—	—	—	—	—	30 – 50 %
		充填溶媒	—	—	—	—	—	1.0 mol/L NaCl
		充填線速	—	—	—	—	—	800 – 1200 cm/h
		操作最大圧力	—	—	—	—	—	0.3 MPa
HIC シリーズ	スラリー溶媒	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	—
	スラリー濃度	40 – 50 %	40 – 50 %	30 – 50 %	30 – 50 %	30 – 50 %	30 – 50 %	—
	充填溶媒	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	2 mol/L 硫酸アンモニウム	—
	充填線速	100 cm/h	200 cm/h	400 – 600 cm/h	800 – 1000 cm/h	800 – 1000 cm/h	800 – 1200 cm/h	—
	操作最大圧力	1.0 MPa	0.5 MPa	1.0 MPa	0.5 MPa	0.5 MPa	0.3 MPa	—
ProteinA / L	スラリー溶媒	—	—	—	1.0 mol/L NaCl	—	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	30 – 50 %	—	—	—
	充填溶媒	—	—	—	1.0 mol/L NaCl	—	—	—
	充填線速	—	—	—	800 – 1000 cm/h	—	—	—
	操作最大圧力	—	—	—	0.5 MPa	—	—	—
AFC	スラリー溶媒	—	—	—	—	1.0 mol/L NaCl	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	—	30 – 50 %	—	—
	充填溶媒	—	—	—	—	1.0 mol/L NaCl	—	—
	充填線速	—	—	—	—	800 – 1000 cm/h	—	—
	操作最大圧力	—	—	—	—	0.5 MPa	—	—
Ca ⁺⁺ Pure-HA	スラリー溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	50 %	—	—	—
	充填溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	充填線速	—	—	—	300 cm/h	—	—	—
	操作最大圧力	—	—	—	1.0 MPa	—	—	—

※ HW シリーズはカラム長さ 30 cm、その他の充填剤はカラム長さ 20 cm での充填が目安。

操作最大圧力は充填時にかかる最大圧力です。これ以上かかる場合、充填剤の破砕やカラムフィルターの目詰まりが生じる可能性がありますのでご注意ください。充填の際はカラム耐圧も勘案して充填線速を設定してください。耐圧が低いカラムの場合、カラム取扱説明書に記載された圧力上限を超えないよう充填線速を落として充填してください。

オープンカラムや固定栓カラムに充填する場合、純水や塩濃度の低い水溶液をスラリー溶媒に選択すると充填不足になりやすく、その結果、カラム入口側に空隙が発生して分離が低下する恐れがあります。そのため、分離に用いる溶離液の中で最も高い塩濃度の溶液をスラリー溶媒に選択するのが一般的です。一方、可動栓カラムでは、ゲルベッドを圧縮することで空隙の発生を抑えることができるため、スラリー溶媒の組成が充填に与える影響は比較的小さくなります。そのため塩水溶液の他、純水がスラリー溶媒に選択されることもあります。純水または低塩濃度のスラリー溶媒を用いることで、塩の析出によるカラム部材の劣化や金属腐食の低減、溶媒コストの低減が期待できます。そのため、大型可動栓カラムへの充填では、純水が多用されます。

表 3 可動栓カラム (DAC カラムを除く) の充填条件例

充填剤タイプ	PW グレード 20 μm	PW グレード 30 μm	S グレード	F グレード	M グレード	C グレード	EC グレード	
HW シリーズ	スラリー溶媒	—	—	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	—	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl
	スラリー濃度	—	—	50 %	50 %	—	50 %	50 %
	充填溶媒	—	—	純水	純水	—	純水	純水
	充填線速	—	—	50 cm/h	100 cm/h	—	150 cm/h	300 cm/h
	操作最大圧	—	—	0.5 MPa	0.5 MPa	—	0.3 MPa	0.1 MPa
IEC シリーズ	スラリー溶媒	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl
	スラリー濃度	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %
	充填溶媒	純水	純水	純水	純水	純水	純水	純水
	充填線速	100 cm/h	200 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	300 cm/h	300 cm/h	300 cm/h
	操作最大圧	1.0 MPa	1.0 MPa	0.5 MPa	0.5 MPa	0.5 MPa	0.3 MPa	0.2 MPa
HIC シリーズ	スラリー溶媒	純水	純水	純水	純水	純水	純水	—
	スラリー濃度	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	—
	充填溶媒	純水	純水	純水	純水	純水	純水	—
	充填線速	100 cm/h	200 cm/h	100 cm/h	300 cm/h	300 cm/h	300 cm/h	—
	操作最大圧	1.0 MPa	1.0 MPa	0.5 MPa	0.5 MPa	0.5 MPa	0.3 MPa	—
ProteinA / L	スラリー溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	50 %	—	—	—
	充填溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	充填線速	—	—	—	200 cm/h	—	—	—
	操作最大圧	—	—	—	0.5 MPa	—	—	—
AFC	スラリー溶媒	—	—	—	—	0.5 mol/L NaCl	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	—	50 %	—	—
	充填溶媒	—	—	—	—	純水	—	—
	充填線速	—	—	—	—	300 cm/h	—	—
	操作最大圧	—	—	—	—	0.5 MPa	—	—
Ca ⁺⁺ Pure-HA	スラリー溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	50 %	—	—	—
	充填溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	充填線速	—	—	—	300 cm/h	—	—	—
	操作最大圧	—	—	—	0.5 MPa	—	—	—

※ HW シリーズはカラム長さ 30 cm、その他の充填剤はカラム長さ 20 cm での充填が目安。

操作最大圧力は充填時にかかる最大圧力です。これ以上かかる場合、充填剤の破砕やカラムフィルターの目詰まりが生じる可能性がありますのでご注意ください。

充填の際はカラム耐圧も勘案して充填線速を設定してください。耐圧が低いカラムの場合、カラムの取扱説明書に記載された圧力上限を超えないよう充填線速を落として充填してください。

表 4 可動栓カラム (DAC カラム) の充填条件例

充填剤タイプ	PW グレード 20 μm	PW グレード 30 μm	S グレード	F グレード	M グレード	C グレード	EC グレード	
HW シリーズ	スラリー溶媒	—	—	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	—	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl
	スラリー濃度	—	—	50 %	50 %	—	50 %	50 %
	充填溶媒	—	—	純水	純水	—	純水	純水
	吸引線速	—	—	(300 cm/h)	(300 cm/h)	—	(300 cm/h)	(300 cm/h)
	充填線速	—	—	50 cm/h	60 – 100 cm/h	—	60 – 150 cm/h	60 – 300 cm/h
	圧縮率 (pf)	—	—	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	—	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15
IEC シリーズ	スラリー溶媒	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl	0.5 mol/L NaCl
	スラリー濃度	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %
	充填溶媒	純水	純水	純水	純水	純水	純水	純水
	吸引線速	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)
	充填線速	60 – 100 cm/h	60 – 200 cm/h	60 – 100 cm/h	60 – 100 cm/h	60 – 300 cm/h	60 – 300 cm/h	60 – 300 cm/h
	圧縮率 (pf)	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15
HIC シリーズ	スラリー溶媒	純水	純水	純水	純水	純水	純水	—
	スラリー濃度	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	50 %	—
	充填溶媒	純水	純水	純水	純水	純水	純水	—
	吸引線速	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)	(300 cm/h)	—
	充填線速	60 – 100 cm/h	60 – 200 cm/h	60 – 100 cm/h	60 – 300 cm/h	60 – 300 cm/h	60 – 300 cm/h	—
	圧縮率 (pf)	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	1.05 – 1.15	—
ProteinA / L	スラリー溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	50 %	—	—	—
	充填溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	吸引線速	—	—	—	(300 cm/h)	—	—	—
	充填線速	—	—	—	60 – 200 cm/h	—	—	—
	圧縮率 (pf)	—	—	—	1.05 – 1.15	—	—	—
AFC	スラリー溶媒	—	—	—	—	0.5 mol/L NaCl	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	—	50 %	—	—
	充填溶媒	—	—	—	—	純水	—	—
	吸引線速	—	—	—	—	(300 cm/h)	—	—
	充填線速	—	—	—	—	60 – 300 cm/h	—	—
	圧縮率 (pf)	—	—	—	—	1.05 – 1.15	—	—
Ca ⁺⁺ Pure-HA	スラリー溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	スラリー濃度	—	—	—	50 %	—	—	—
	充填溶媒	—	—	—	純水	—	—	—
	吸引線速	—	—	—	(300 cm/h)	—	—	—
	充填線速	—	—	—	60 – 300 cm/h	—	—	—
	圧縮率 (pf)	—	—	—	1.05 – 1.15	—	—	—

※ HW シリーズはカラム長さ 30 cm、その他の充填剤はカラム長さ 20 cm での充填が目安。

充填の際はカラム耐圧を勘案して充填線速を設定してください。耐圧が低いカラムの場合、カラムの取扱説明書に記載された圧力上限を超えないよう充填線速を落として充填してください。

4.2 スラリー濃度について

スラリー濃度は、スラリー中の充填剤の割合を示すもので自然沈降した充填剤のゲルベッド体積をスラリー総体積で除した値（%）で表されます。

$$\text{スラリー濃度 (\%)} = \frac{\text{ゲルベッド体積}}{\text{スラリー総体積}} \times 100$$

TOYOPEARLはスラリー濃度 30 ～ 70 %、TSKgel PW シリーズはスラリー濃度 25 ～ 70 %（最適濃度 40 ～ 50 %）に調整して充填するのが一般的です。Ca⁺⁺Pure-HA は 30 ～ 50 % に調整します。

4.3 充填剤の準備量について

固定栓カラムに充填する場合は、リザーバー内の残存分を考慮してカラム体積の 2 倍以上の充填剤を準備します。可動栓カラムに充填する場合は、目標とするカラムのゲルベッド体積に cf（compression factor）を乗じた量を準備します。これは、カラムに充填する際に充填剤のゲルベッド体積が、送液や可動栓による圧縮などにより自然沈降時よりも小さくなるためです。cf は以下の式で表されます。

$$cf = \frac{\text{自然沈降した充填剤のゲルベッド体積}}{\text{カラムに充填された充填剤の最終ゲルベッド体積}}$$

可動栓カラムの充填に必要な充填剤の準備量を表 5 に示します。

表 5 可動栓カラムの充填に必要な充填剤の準備量

充填剤種類	cf	準備する充填剤量
Ca ⁺⁺ Pure-HA	1.1	目標とするカラムゲルベッド体積の 1.1 倍
TOYOPEARL HW-40, HW-50, HW-55	1.1	目標とするカラムゲルベッド体積の 1.1 倍
TOYOPEARL HW-65, HW-75, NH2-750, Sulfate-650, Ether-650, Butyl-タイプ, Hexyl-650, PPG-600, DEAE-タイプ, Q-タイプ, CM-650, SPタイプ, GigaCapタイプ, および Protein A, Protein L を除くアフィニティモード	1.2	目標とするカラムゲルベッド体積の 1.2 倍
TSKgel DEAE-5PW, SuperQ-5PW, SP-5PW, SP-3PW, Ether-5PW, Phenyl-5PW	1.2	目標とするカラムゲルベッド体積の 1.2 倍
Phenyl-タイプ, QAE-550C, SP-550C, Protein A, Protein L, MegaCap II SP-550EC	1.25	目標とするカラムゲルベッド体積の 1.25 倍

ラボスケールでは、ガラスフィルター上で溶媒を吸引除去し、さらに数分吸引を続けて得たウェット状の充填剤ゲルケーキを 1 g ≒ 1.3 ～ 1.4 mL として必要量を量り

取ることもできます（乾燥状態の Ca⁺⁺Pure-HA を重量で量り取る場合は 1 g ≒ 1.5 mL として計算して下さい）。

4.4 スラリーの調製手順

初めにスラリー溶媒に置換し、その後スラリー濃度を調整していきます。スラリー溶媒への置換操作は、溶媒が異なる点以外はデカンテーションと同様です。なお、スラリーを攪拌した際、表面に細かなクリーム様の泡が観察されることがありますが、その場合はエタノールを霧吹きもしくは洗瓶などで少量吹き付けることで消泡することができます。

- (1) 充填剤量に対し十分な大きさ（好ましくは 3 倍体積以上）の容器にデカンテーション済みの充填剤を注ぎ入れます。（デカンテーションから連続して実施する場合は(4)から実施します）
- (2) 静置して充填剤を沈降させます。

ポイント

- ・静置時間は充填剤の粒子の大きさや溶媒、容器の大きさなどにより異なります。静置時間の目安はデカンテーションと同様です（表 1 参照）。
- ・静置の際は、必要に応じて容器を蓋やラップなどで覆い、埃などの混入を防ぎます。

- (3) 充填剤が沈降した後、上澄みを除去します。
- (4) 充填剤に対して十分な量（好ましくは充填剤の 3 倍体積以上）のスラリー溶媒を加えます。
- (5) 薬さじ、攪拌棒、パドル、プロベラなど、スケールに応じて適切な器具を用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
- (6) (2)から(5)の操作を 2 回から 3 回程度繰り返します。

ポイント

- ・ここでは充填剤が分散した溶液の塩濃度を合わせることが目的ですので、例えば純水にて充填剤をデカンテーションした後、これに塩を直接加える、あるいは塩濃度を 2 倍に調整したスラリー溶媒を等量加えるなどの方法によりスラリーを調製することもできます。塩を直接加える場合は、塩添加後に十分に攪拌し、塩を完全に溶解させます。

(7) 充填剤が均一に分散した状態で全量または一部をメスシリンダーに移し、充填剤を沈降させます。一部をメスシリンダーに移す場合は、事前にスラリー全体の液量を測定しておきます。

(8) メスシリンダーに移した充填剤が沈降し、ゲルベッド体積が安定するまで静置します。(一般に 16 時間以上)

ポイント

・静置の際は、必要に応じてメスシリンダー及び容器をラップや蓋などで覆い、溶媒の揮発や埃などの混入を防ぎます。

(9) メスシリンダー内のスラリー総体積と沈降したゲルベッド体積を読み取り、調整前のスラリー濃度を算出します(図 5)。

(10) 全量をメスシリンダーに移した場合は、これにスラリー溶媒を加えるか、または上澄みを除くことで、目標とするスラリー濃度になるようスラリー総体積を調整します。一部をメスシリンダーにサンプリングした場合は、これを均一に分散させた後、元の容器に戻します。メスシリンダーをスラリー溶媒で共洗いし、元の容器に戻した後、スラリー溶媒を加えるか、または上澄みを除くことで、目標とするスラリー濃度になるようスラリー総体積を調整します。目標とするスラリー総体積は以下の式から算出します。

目標とするスラリー総体積

$$= \frac{\text{調整前のスラリー総体積} \times \text{調整前のスラリー濃度}(\%)}{\text{目標スラリー濃度}(\%)}$$

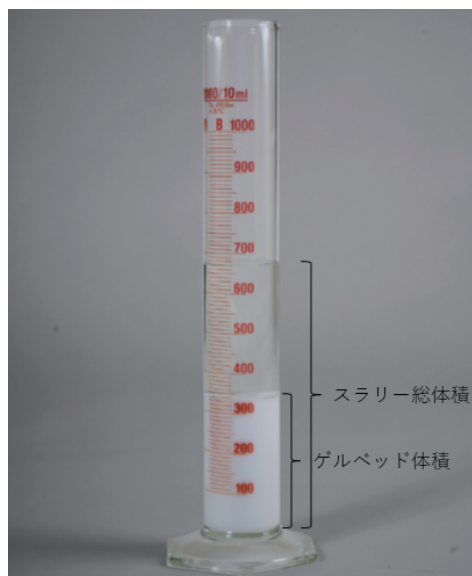


図 5 メスシリンダーによるスラリー濃度の測定 (例)

4.4.1 ラボスケールでのスラリー調製例

準備するもの

デカンテーション済みの充填剤 500 mL

スラリー溶媒

2 L ビーカー

大型の薬さじ

2000 mL メスシリンダー

(保存容器)

(1) 攪拌または揺動により懸濁状態にしたデカンテーション済みの充填剤 500 mL を 2 L ビーカーに注ぎ入れます

(2) 静置し、充填剤を沈降させます。

(3) 充填剤が沈降した後、ビーカーを静かに傾けて上澄みを除去します。

(4) スラリー溶媒を加えて総量を約 1500 mL ～ 2000 mL にします。

(5) 大型の薬さじで攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。

(6) (2)から(5)までの操作を 2 回から 3 回繰り返します。

(7) 静置して充填剤を沈降させた後、上澄みの量を調整してスラリー濃度を 30 ～ 40 % 程度にします(この後スラリー濃度を正確に調整する工程があるので、ここではおおよその濃度で問題ありません)。

(8) 大型の薬さじで攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。

(9) スラリー全量を 2000 mL メスシリンダーに注ぎます。2 L ビーカーをスラリー溶媒で共洗いし、メスシリンダーに加えます。

(10) さらにメスシリンダーの内壁を洗うようにスラリー溶媒を加え、総体積が充填剤の 3 倍～ 4 倍程度になるようにします。

(11) メスシリンダー内のスラリーを攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。

- (12) メスシリンダーの開口部をラップなどで覆い、16時間以上静置します。
- (13) スラリー総体積及び沈降した充填剤のゲルベッド体積を測定します。
- (14) スラリー溶媒を加えるか、または上澄みを除くことで、目標とするスラリー濃度になるようスラリー総体積を調整します。目標とするスラリー総体積は、4.4 (10)に示す計算式から求めることができます。
- (15) スラリーが均一になるよう攪拌し、保存容器に移します。容器に移す際は、メスシリンダーの壁に残った充填剤を共洗いしないようにします（スラリー濃度が変化してしまう可能性があるため）。

4.4.2 パイロットスケールでのスラリー調製例

準備するもの

デカンテーション済みの充填剤 5 L

スラリー溶媒

20 L 容器

パドルまたは長さ数 10 cm 程度の攪拌棒

手動ポンプ

1000 mL メスシリンダー

（保存容器）

- (1) 攪拌または揺動により懸濁させたデカンテーション済みの充填剤 5 L を 20 L 容器に注ぎ入れます。
- (2) 静置して充填剤を沈降させます。
- (3) 充填剤が沈降した後、容器を静かに傾けるか、手動のポンプを用いて上澄みを除去します。
- (4) スラリー溶媒を加えて総量を約 15 L ～ 20 L にします。
- (5) パドルまたは攪拌棒を用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
- (6) (2)から(5)までの操作を 2 回から 3 回繰り返します。

- (7) 静置して充填剤を沈降させた後、上澄みの量を調整してスラリー濃度を 30 ～ 40 % 程度にします（この後スラリー濃度を正確に調整する工程があるので、ここではおおよその濃度で問題ありません）。スラリー総体積を測定します。

ポイント

- ・目盛のない容器を用いる場合は、スラリー濃度調製を行う前に、あらかじめ計量した純水を容器に入れ（例えば 18 L など）、その際の液面の位置をマークしておきます。この位置までスラリー溶媒を加えることで、スラリー総体積を知ることができます。

- (8) パドルまたは長さ数 10 cm 程度の攪拌棒を用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
- (9) スラリーが均一な状態にて一部をサンプリングし、1000 mL メスシリンダーに注ぎます。
- (10) メスシリンダーの開口部をラップなどで覆い、16時間以上静置します。
- (11) メスシリンダー内のスラリー体積と沈降した充填剤のゲルベッド体積をそれぞれ測定し、調整前のスラリー濃度を算出します。
- (12) サンプリングしたメスシリンダー内の充填剤を攪拌などにより懸濁状態にした後、元の容器に戻します。メスシリンダーを共洗いし、元の容器に加えます。なお、共洗いに用いるスラリー溶媒量はあらかじめ体積を求めておきます。
- (13) (7)で得たスラリー総体積と(11)で得た調整前のスラリー濃度から、全体の充填剤の量を算出します。これを元に目標とするスラリー総体積を求め、調整前のスラリー総体積との差分のスラリー溶媒を加えるか、または上澄みを除くことで、目標とするスラリー濃度になるようスラリー総体積を調整します。その際、メスシリンダーの共洗いに用いたスラリー溶媒量も、濃度調整のために増減するスラリー溶媒量に含めます。目標とするスラリー総体積は、4.4 (10)に示す計算式から求めることができます。

4.4.3 プラントスケールでのスラリー調製例

準備するもの

デカンテーション済みの充填剤 100 L

スラリー溶媒

500 L 容器

プロペラ型攪拌機

ポンプ

1000 mL メスシリンダー

(保存容器)

- (1) 攪拌により懸濁させたデカンテーション済みの充填剤 100 L を 500 L 容器に注ぎ入れます。
 - (2) 静置して充填剤を沈降させます。
 - (3) 充填剤が沈降した後、沈降したゲルベッドの上端面を乱さないようにポンプで上澄みを吸引除去します。
 - (4) スラリー溶媒を加えて約 300 L ～ 400 L にします。
 - (5) プロペラ型攪拌機を用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
 - (6) (2)から(5)までの操作を 2 回から 3 回繰り返します。
 - (7) 静置して充填剤を沈降させた後、上澄みの量を調整してスラリー濃度を 30 ～ 40 % 程度にします（この後スラリー濃度を正確に調整する工程があるので、ここではおおよその濃度で問題ありません）。スラリー総体積を測定します。
- ポイント**

・ 目盛のない容器を用いる場合は、スラリー濃度調整を行う前に、あらかじめ計量しておいた純水を容器に入れ（例えば 300 L など）、その際の液面の位置をマークしておきます。この位置までスラリー溶媒を加えることで、スラリー総体積を知ることができます。
- (8) プロペラ型攪拌機を用いて攪拌し、全体が均一な懸濁状態になるまで充填剤を分散させます。
 - (9) スラリーが均一な状態で一部をサンプリングし、1000 mL メスシリンダーに注ぎます。

- (10) メスシリンダーの開口部をラップなどで覆い、16 時間以上静置します。
- (11) メスシリンダー内のスラリー体積と沈降した充填剤のゲルベッド体積をそれぞれ測定し、調整前のスラリー濃度を算出します。
- (12) サンプリングしたメスシリンダー内の充填剤を攪拌などにより懸濁状態にした後、元の容器に戻します。メスシリンダーを共洗いし、元の容器に加えます。なお、共洗いに用いるスラリー溶媒量はあらかじめ体積を求めています。
- (13) (7)で得たスラリー総体積と(11)で得た調整前のスラリー濃度から、全体の充填剤の量を算出します。これを元に目標とするスラリー総体積を求め、調整前のスラリー総体積との差分のスラリー溶媒を加えるか、または上澄みを除くことで、目標とするスラリー濃度になるようスラリー総体積を調整します。その際、メスシリンダーの共洗いに用いたスラリー溶媒も、濃度調整のために増減するスラリー溶媒量に含めます。目標とするスラリー総体積は、4.4 (10)に示す計算式から求めることができます。

5. カラムへの充填

充填剤は、カラム内を溶離液が均一な速度で層流様に流れるように充填することが重要です。そのためには、充填剤やカラムのタイプに合わせ、スラリー溶媒、スラリー濃度、ゲルベッドを形成させる際に使用する充填溶媒や充填線速など、種々の充填条件を適切に選択する必要があります。また、スラリーを複数回に分けてカラムに投入すると充填状態が不均一になるため、一度に投入することも重要なポイントになります。

充填方法には、重力を利用した自然落差による充填法と、ポンプなどで加圧して充填する方法があります。一般に、ポンプ送液により充填剤に圧力をかけながら充填した方が、充填剤がより密に充填されるため分離能および耐久性に優れたカラムを作製することができます。しかしながら、過剰に圧力をかけて充填した場合、充填剤が変形することにより部分的な圧密（閉塞状態）が生じ、カラム内の流れが局所的に不均一となって分離は低下してしまいます。そのため、適切な線速、あるいは適切な圧力の範囲で充填することが重要になります。加えてカラム部材の耐圧などによる制限も考慮しなければなりません。カラム部材の耐圧上限を超えた圧力が加わると、

カラム部材を破損してしまう可能性があります。充填剤の最大圧力損失の目安は TOYOPEARL では 0.3 MPa 以下、TSKgel では 2.0 MPa 以下（共にシステム、配管圧などを除く）になります。カラム部材の耐圧については使用するカラムの取扱説明書に従います。充填作業に必要な器具類の例を図 6 に示します。



図 6 充填作業に必要な器具例（パイロットスケール）

5.1 充填溶媒

充填溶媒は、カラムに導入したスラリーをポンプなどで送液し、カラム内にてゲルベッドを形成させる際に使用します（後述の DAC カラムに充填する場合には充填溶媒は不要です）。充填剤の性質や分離条件、充填カラムの形式などを勘案し、適した組成（純水、塩水溶液、エタノール水溶液、緩衝液など）のものを選択します。オープンカラムや固定栓カラムの充填には、使用する溶媒の中で最も塩濃度の高い水溶液を用いるのが一般的です。一方、可動栓カラムの場合はゲルベッドを圧縮することで空隙の発生を抑えることができるため、スラリー溶媒と同様に、充填溶媒の組成が充填に与える影響は比較的小さいと考えられます。そのため、塩水溶液の他、純水が用いられることも多く、特に大型可動栓カラムへの充填では、コストや塩の析出による金属腐食の可能性を考慮して純水が多用されます。

カラムの充填に必要な充填溶媒の量は、充填するカラム容量の 5 倍量から 10 倍量が目安になります。同じ溶媒で充填状態の評価まで行う場合は 20 倍量程度を準備します。

5.2 充填線速

線速は、流速をカラムの断面積で除した値で表されます。充填線速が速く、充填圧が高いほど充填剤は密に充填されます。粒子径が大きい充填剤ほど圧力損失が小さく、また沈降も早くなるため、粒子径が大きくなるにつれ、充填線速を高くするのが一般的です。

至適充填線速は、充填剤の種類や粒子径の他、使用条件やカラムのタイプによっても異なります。固定栓カラムでは、一旦充填剤とフリットの間に空隙が生じってしまうと、改善することができません。そのため、比較的高速で充填剤を密に充填することで、繰り返し使用してもカラム内に空隙が生じないようにする必要があります。一方、可動栓カラムは充填剤とフリットの間に隙間が生じても可動栓を押し下げることができるため、比較的低流速で充填することが可能です。

5.3 充填操作

カラムタイプごとの充填操作の例を以下に示します。

5.3.1 オープンカラムへの充填

オープンカラムへの充填は、自然落差充填法を用いるのが一般的です。ポンプ送液による充填と比較して充填密度が低くなるため、分離ならびに耐久性に劣りますが、ポンプが不要で簡便な充填法であることから、充填剤の簡易スクリーニングや精密分離を必要としない精製、また前処理用のカラムを作製する際にしばしば用いられます。

オープンカラムには、コック付ガラス管タイプ（フィルターなし）や、フィルターが挿入された樹脂製のディスプレイタイプなどがあります。

5.3.1 (a) オープンカラム（コック付ガラス管タイプ）への充填例

準備するもの

充填剤スラリー

スラリー溶媒

脱脂綿

海砂（フィルターが装着されたガラス管の場合、脱脂綿、海砂の装填は省略できます）

充填溶媒

オープンカラム

カラム懸架台

葉さじ

ガラス棒

廃液容器

ピペット

充填操作は、手順(1)～(12)に従って行います。(図7参照)

- (1) カラムを懸架台に垂直に固定します。
- (2) コックを閉じた状態で少量のスラリー溶媒をカラムに注ぎます。
- (3) カラム下部に少量の脱脂綿を空気が入らないようにガラス棒で軽く押し込みます。
- (4) 洗浄した海砂を 0.5 ～ 1 cm ほど堆積させます。海砂がカラムの壁面に付着した場合は、スラリー溶媒を加えて洗い落とします。海砂の上端面に乱れがあれば、カラムに軽く振動を与えるなどして水平になるよう整えます。
- (5) 液面が海砂の上端付近になるまでコックを開いてスラリー溶媒を排出します。
- (6) コックを閉じた後、攪拌により均一化した充填剤スラリーを静かにかつ一度に全量注ぎ入れます。この時カラム内に空気（気泡）を巻き込まないように注意します。

注意！

- ・スラリーは一度に全量を注いでください。複数回に分割して注ぐとゲルベッドの充填状態が不均一になり、カラムの性能が著しく低下します。

ポイント

- ・スラリーは、ガラス棒などを用いてカラム壁面を静かに流れ落ちるように注ぎ、海砂層を崩さないようにします。
- ・カラム体積以上のスラリーを注ぐ必要がある場合はリザーバーをあらかじめ接続しておきます。
- ・カラム内に気泡が残ってしまった場合は、カラムを軽くたたいて振動を与え、取り除きます。

- (7) 充填剤スラリーを全量注ぎ終えた後、粒子が沈降する前に手早くコックを開き、充填剤を沈降させてゲルベッドを形成していきます。

ポイント

- ・十分な充填線速が得られない場合には、カラム出口にチューブを接続するなどして液柱を長くすると排出が促進されます。
- (8) ゲルベッドが形成された後、上澄み液が減少してゲルベッド上端面と一致し、カラムからの溶液の溶出が止まったところでコックを閉じます。リザーバーを使用している場合はここでリザーバーを取り外します。
 - (9) ゲルベッド上端に、充填剤表面を覆う程度に海砂を注ぎます。
 - (10) 海砂が乱れないようピペットなどで静かに充填溶媒を加えます。
 - (11) さらに海砂を 0.5 ～ 1 cm 程度の厚みになるまで加えます。
 - (12) 海砂が乱れないようピペットなどで静かに充填溶媒を加えます。その際カラム壁面に海砂が付着していれば、これを洗い落とすようにします。

注意！

- ・充填剤の粒子径が小さい S グレードおよび PW シリーズは、自然落差充填法では十分な充填線速が得られないためオープンカラムには適していません。また、その他のグレードについても十分な充填線速を得るため、充填高さは 30 cm 以下にしてください。

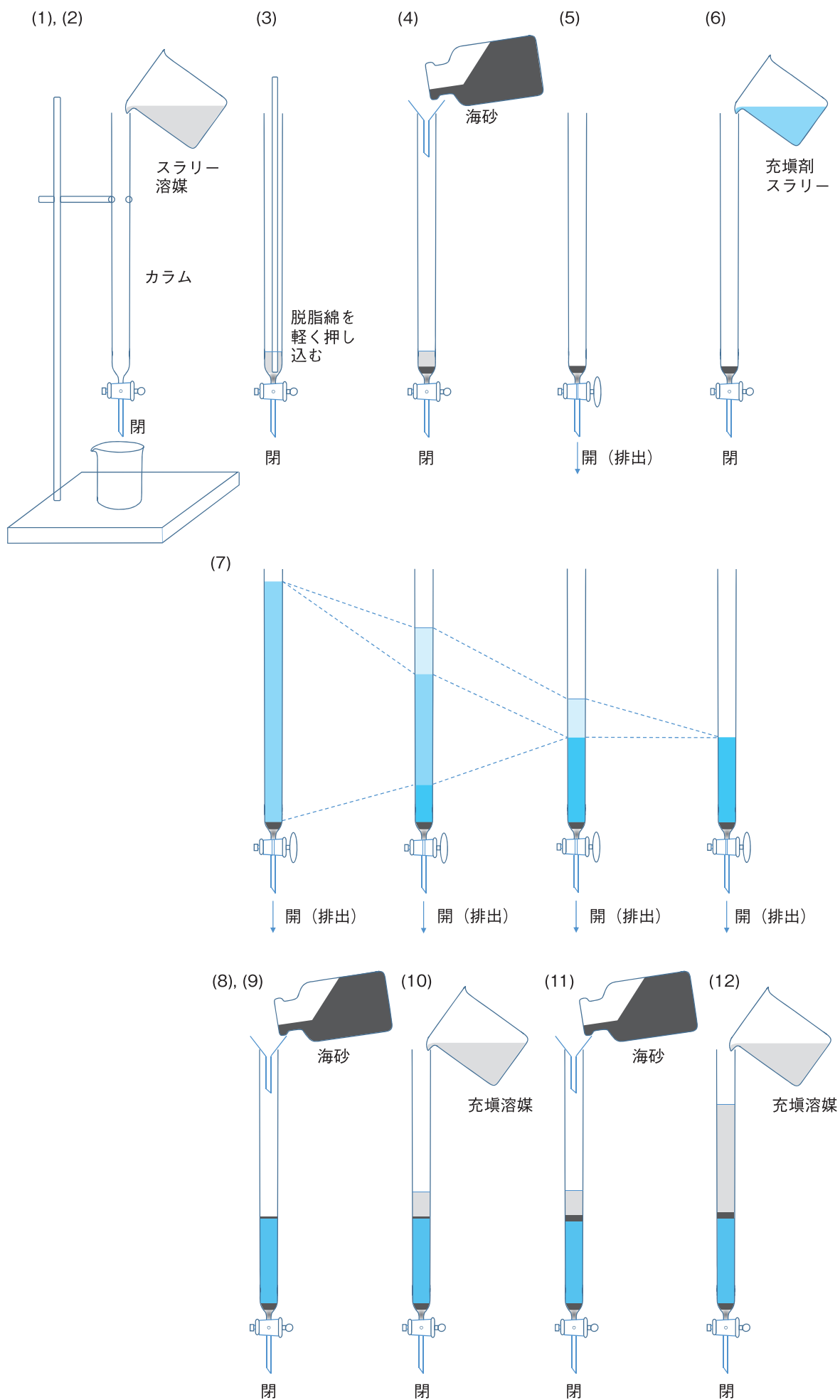


図7 オープンカラム（コック付きガラスタイプ）への充填

5.3.1 (b) オープンカラム（樹脂製ディスポタイプ）への充填例

準備するもの

充填剤スラリー
スラリー溶媒
充填溶媒
オープンカラム
カラム懸架台
薬さじ
廃液容器
ガラス棒
ピペット

充填操作は、手順(1)～(9)に従って行います（図8参照）。

- (1) カラムを懸架台に垂直に固定します。
- (2) カラム下端に栓を取り付け、スラリー溶媒を注ぎます。栓を一旦取り外し、カラム出口の空気を排出します。空気が全て排出されたら、カラム内にスラリー溶媒が残った状態で再び栓を取り付けます。
- (3) あらかじめスラリー溶媒に浸漬して空気を除いておいたフィルターをカラム下部まで押し入れます（あらかじめセットされたタイプのものもあります）。その際、カラム底部の充填溶媒とフィルターの間に気泡が入らないよう、フィルターが液面の下に到達するまではフィルターを斜めまたは垂直の状態です挿入し、その後水平にして最下部まで押し込みます。

ポイント

- ・フィルターがあらかじめセットしてあるタイプの場合は、カラムにスラリー溶媒を注いだ後、出口側からアスピレーターなどで短時間吸引し、フィルターおよびその下の部分をスラリー溶媒で満たします。

- (4) カラム下端の栓を取り外し、液面がフィルターの上端付近になるまで排出します。
- (5) 栓を取り付け、攪拌などにより懸濁させて均一化した充填剤スラリーを静かにかつ一度に全量注ぎ入れます。この時カラム内に空気（気泡）を巻き込まないように注意します。

注意！

- ・スラリーは一度に全量を注いでください。複数回に分割して注ぐとゲルベッドの充填状態が不均一になり、カラムの性能が著しく低下します。

ポイント

- ・カラム体積以上のスラリーを注ぐ必要がある場合はリザーバーをあらかじめ接続しておきます。
- ・カラム内に気泡が残ってしまった場合は、カラムを軽くたたいて振動を与えて取り除きます。

- (6) スラリーを所定量注ぎ終えたら粒子が沈降する前に手早く下端の栓を取り外し、充填剤を沈降させてゲルベッドを形成していきます。

ポイント

- ・十分な充填線速が得られない場合には、カラム下端にチューブを接続するなどして液柱を長くすると排出が促進されます。

- (7) 充填剤が全て沈降したら、上澄み液がまだゲルベッドの上に残っている状態で下端に栓を取り付けます。リザーバーを使用した場合はここでリザーバーを取り外します。
- (8) ゲルベッドが乱れないようピペットなどを用いて充填溶媒を加えます。
- (9) 充填溶媒に浸漬してあらかじめ空気を除いておいたフィルターを挿入し、ゲルベッド上端面と接触するまでガラス棒などを用いて押し下げます。その際、ゲルベッドとフィルターの間に空気が入らないようにするため、フィルターが液面の下に到達するまではフィルターを斜めまたは垂直にした状態で挿入します。水中でフィルターを水平にした後、ゲルベッドと接触するまで注意深くフィルターを押し下げます。

注意！

- ・充填剤の粒子径が小さいSグレードおよびPWシリーズは、自然落差充填法では十分な充填線速が得られないためオープンカラムには適していません。また、その他のグレードについても十分な充填線速を得るため、充填高さは30 cm以下にしてください。

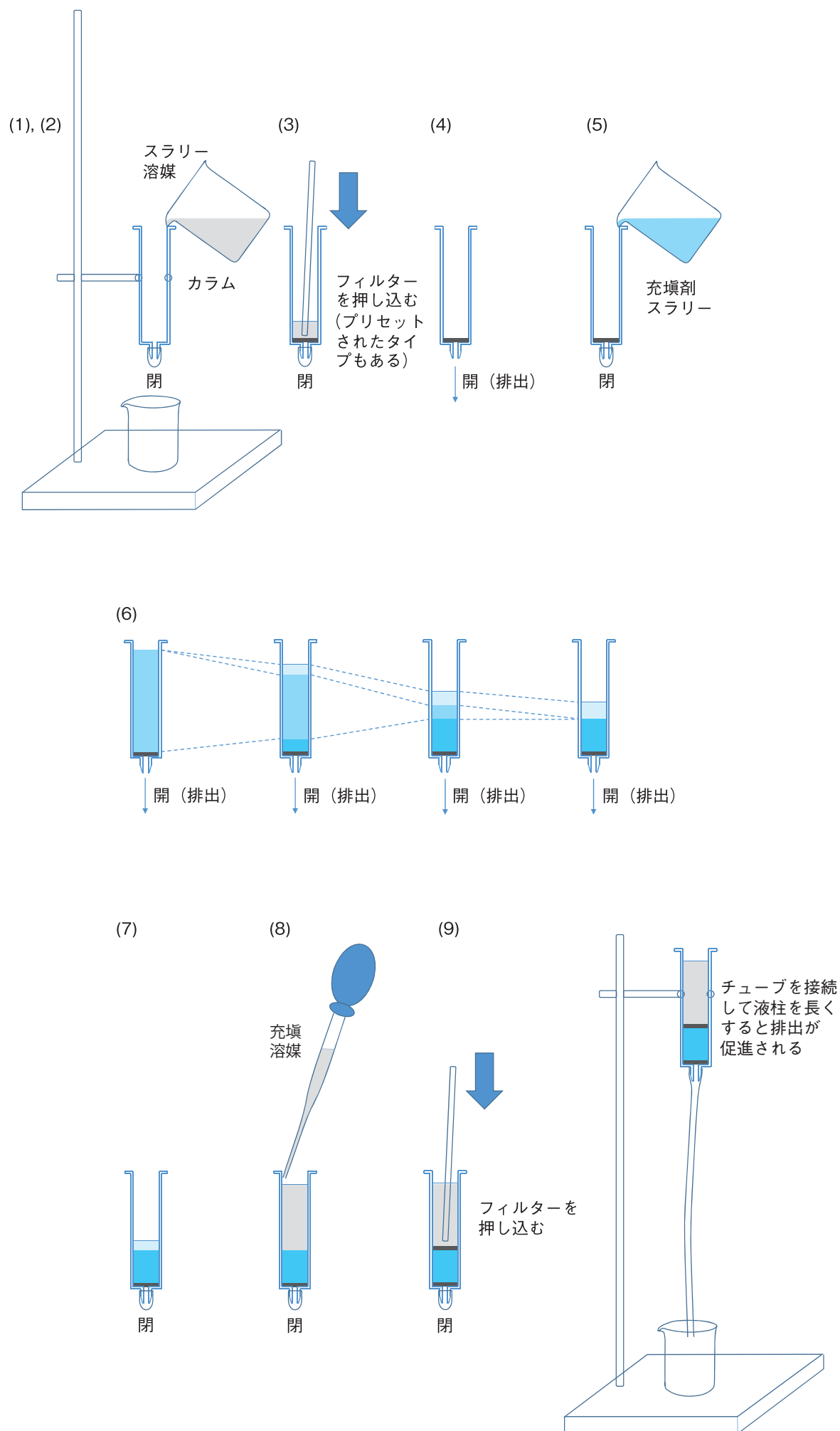


図8 オープンカラム（樹脂製ディスポタイプ）への充填

5.3.2 固定栓カラムへの充填

固定栓カラムへの充填は、ポンプを用いて充填溶媒を送液し、加圧して充填するのが一般的です。

5.3.2 (a) 固定栓カラム（ラボスケール）への充填例

固定栓カラムは一定の体積のカラムを再現性良く作製することが可能で、後述の可動栓カラムに比較して安価であることから、ラボスケールでの精製や充填剤の評価・比較などの用途に用いられます。

固定栓カラムを充填する際には、カラム本体にリザーバーを接続する必要があります。

準備するもの

充填剤スラリー	充填溶媒	固定栓カラム
リザーバー	ユニオン	カラム懸架台
スパーテル	薬さじ	水準器
送液ポンプ	圧力ゲージ	廃液容器

充填操作は、手順(1)~(8)に従って行います (図9 参照)。

- (1) ユニオンを用いてカラムにリザーバーを接続した後、水準器などを用いて懸架台に垂直に固定します。

ポイント

- ・ 固定の際は、リザーバー側をクランプで挟んで懸架台に取り付けます。カラム側にクランプを取り付けると、後述の(6)の操作が困難になります。

- (2) カラム出口側にエンドプラグを取り付け、攪拌により均一化した充填剤スラリーをリザーバーの上端まで一度に注ぎ入れます。この時空気（気泡）がカラム内に巻き込まれないように注意します。

注意！

- ・ 充填剤スラリーは一度に全量を注いでください。複数回に分割して注ぐとゲルベッドの充填状態が不均一になり、カラムの性能が著しく低下します。

ポイント

- ・ カラムまたはリザーバー内に気泡が残ってしまった場合は、カラムまたはリザーバーを軽くたたいて振動を与え、取り除きます。

- (3) 手早くエンドフィッティングをリザーバー上端に取り付けます。その際、カラム内に空気が入らないようにします。

- (4) リザーバーにポンプからの配管を接続します。出口側のエンドプラグを取り外します。直ちに充填溶媒の送液を開始し、充填剤を沈降させてゲルベッドを形成していきます。

注意！

- ・ 送液中は各接続部分から液漏れがないことを確認して下さい。液漏れが生じると、カラム内の流れが不均一になり、カラムの性能が著しく低下します。

- (5) 充填時の圧力が充填剤およびシステムの最大圧力を超えないように注意しながら、カラム + リザーバー体積の3倍程度送液した後、ポンプを停止します。ポンプの圧力が下がったことを確認し、カラム出口側にエンドプラグを取り付けます。

- (6) カラム本体とユニオンの間を緩めてリザーバーとカラムを切り離します。

ポイント

- ・ リザーバーからカラムを切り離す際、リザーバー出口にある程度ゲルベッドが残るよう、カラムサイズやスラリー濃度に応じて適切なサイズのリザーバーを選択して下さい。なお、カラム径が大きくなると、リザーバーとカラムの切り離し操作が困難になります。そのため、本法は粒子径にもよりますが、内径がおおよそ数センチ程度までのカラムの充填に適用可能な方法になります。

- (7) 切り離したカラムの上端から露出した充填剤の表面をスパーテルで平らに成形します。充填剤の表面に窪みが見られる場合には、リザーバー下部からゲルベッドをスパーテルで少量かき取り、カラム本体側の充填剤にのせて補充してから端面を整えます。

- (8) カラムにエンドフィッティングを取り付けます。充填（送液）した方向が分かるようラベルを貼り付けます。

注意！

- ・ カラムには送液方向があります。必ず充填した方向に送液して使用してください。逆方向に送液した場合、耐久性が著しく低下します。

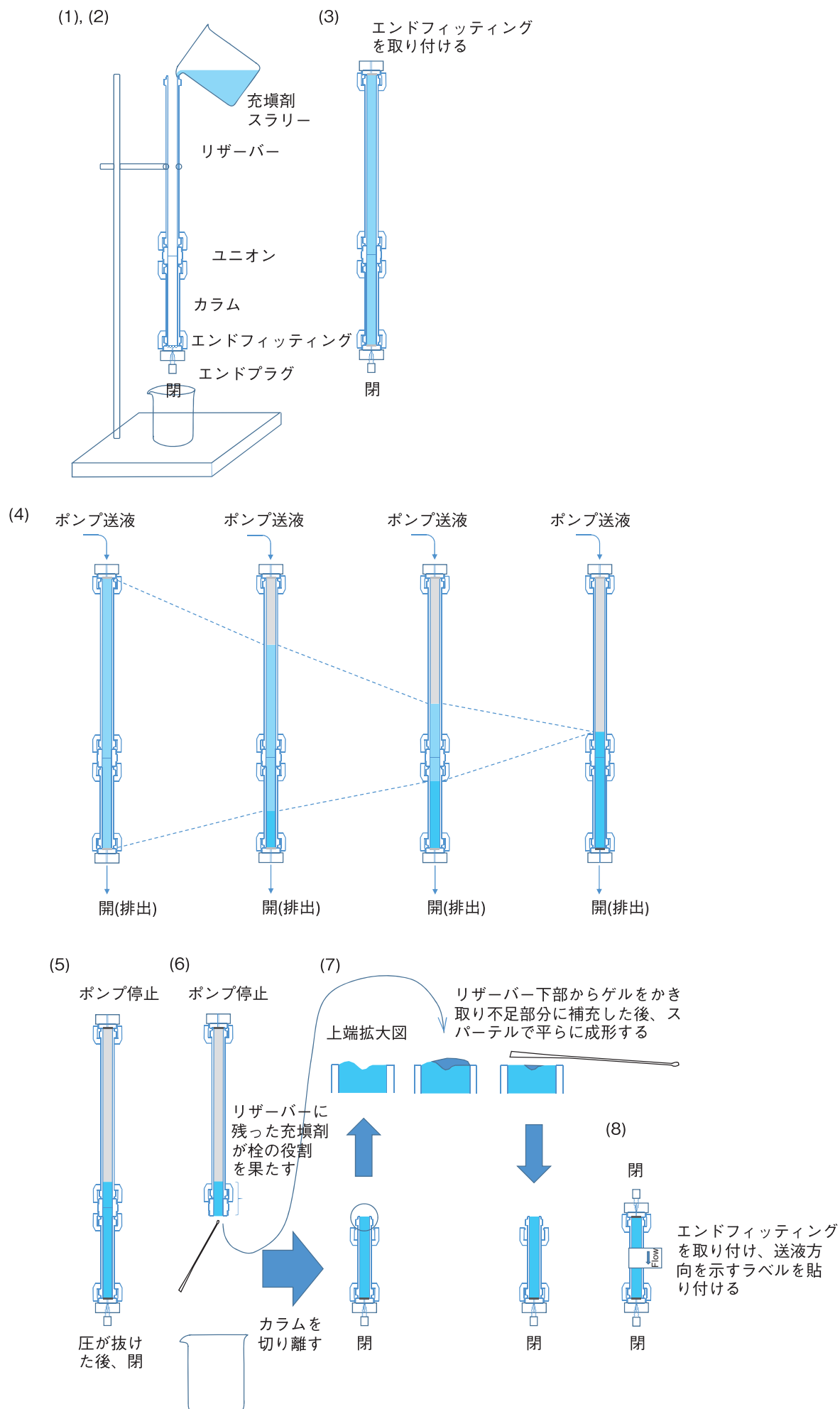


図9 固定栓カラムへの充填

5.3.3 可動栓カラムへの充填

可動栓カラムは充填剤の充填高さ（充填量）を柔軟に設定できること、用意した充填剤が全量カラムに充填できること、またフリットとゲルベッドの間に空隙が生じた場合もアダプタ（可動栓）を押し下げることで解消できるなどの特長を有しており、ラボスケールからプラントスケールまで、幅広く用いられています。送液によりゲルベッドを形成させた後、可動栓を押し下げるタイプが一般的ですが、可動栓をピストンのように移動させながら充填する動的軸方向圧縮（Dynamic Axial Compression、以下 DAC）タイプのカラムもあります。

5.3.3 (a) 可動栓カラム（ラボスケール、ポンプ送液充填タイプ）への充填例

準備するもの

充填剤スラリー（必要量については表5を参照）		
充填溶媒	可動栓カラム	カラム懸架台
スケールに適した攪拌器具		水準器
送液ポンプ	圧力ゲージ	廃液容器

充填操作は、手順(1)～(9)に従って行います（図10参照）。

- (1) 水準器などを用いてカラムを懸架台に垂直に設置します。
- (2) カラム出口側にエンドプラグを取り付けます。攪拌により均一化した充填剤スラリーをカラム上端まで一度に注ぎ入れます。この時空気（気泡）がカラム内に巻き込まれないように注意します。

注意！

- ・充填剤スラリーは一度に全量を注いでください。複数回に分割して注ぐと充填層が不均一になり、カラムの性能が著しく低下します。

ポイント

- ・カラムまたはリザーバー内に気泡が残ってしまった場合は、カラムまたはリザーバーに振動を与え、取り除きます。
- (3) 空気が入らないようにできるだけ手早く可動栓をカラムに取り付けます。その際、入口（可動栓）側の配管は開放状態にしておきます。

ポイント

- ・ラボスケールの小型の可動栓カラムの場合は、カラム上端まで充填剤スラリーを注いだ後、可動栓をやや傾けた状態でスラリーと接液させることで気泡が入ることなく取り付けることができます。可動栓配管内部の気泡は、取り付け前にあらかじめポンプを用いて充填溶媒を通液し、追い出しておきます。

- (4) 可動栓を固定し、ポンプからの配管をカラム入口（可動栓）側に接続します。出口側のエンドプラグを取り外し、直ちに充填溶媒の送液を開始し、充填剤を沈降させてゲルベッドを形成していきます。
- (5) 充填剤が沈降してゲルベッド高さが安定したら、ポンプを停止します。圧力が抜けたことを確認した後、出口側にエンドプラグを取り付けます。
- (6) 入口側の配管を開放状態にした後、可動栓をわずかに緩め、空気が入らないように注意しながらゲルベッドの上端から1～2 cm 付近に到達するまで押し下げます。
- (7) 送液中のゲルベッド高さが変化しなくなるまで(4)から(6)の操作を繰り返します。送液中のゲルベッドの高さが一定になったら、その位置をマークします。
- (8) ポンプを停止します。
- (9) 出口側の配管を開放状態にしたまま可動栓パッキンを緩めずに、送液時にマークしたゲルベッド高さの位置まで押し下げます。

ポイント

- ・耐久性を向上させるため、マークした位置からさらに可動栓を2～3ミリ程度押し下げ、ゲルベッドを圧縮することもあります。
- ・スラリー濃度が低い場合は、リザーバーを接続して充填することもできます。その場合は、ゲルベッドを形成させ、ポンプを停止して出口側の配管を閉じた後、上部の可動栓を一旦取り外し、リザーバー内の上澄みをピペットやポンプなどで吸引除去します。リザーバーとユニオンを取り外し、可動栓を再び取り付けます。その他の操作は前述のとおりです。

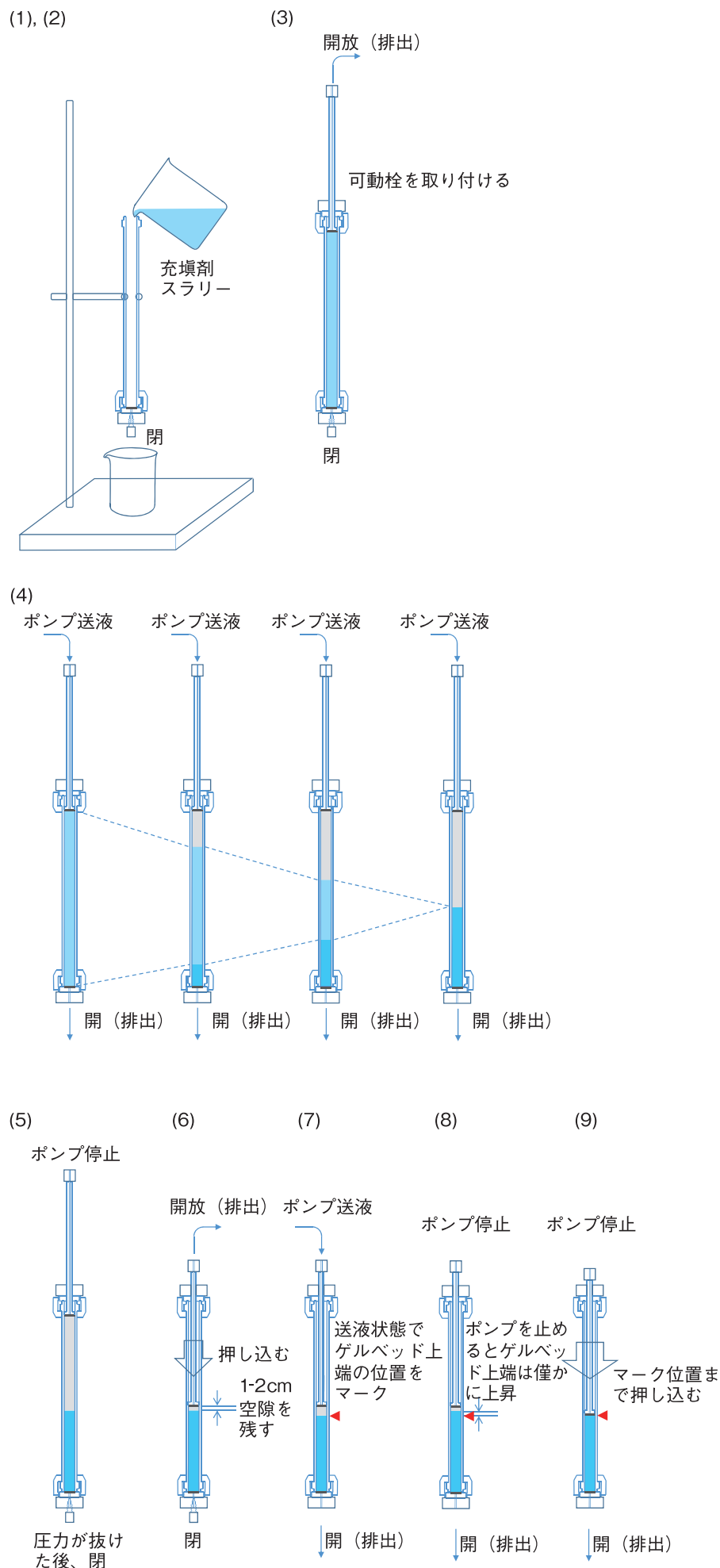


図 10 送液充填型の可動栓カラム（ラボスケール）への充填

5.3.3 (b) 可動栓カラム（プラントスケール、ポンプ送液充填タイプ）への充填例

準備するもの
充填剤スラリー（必要量については表 5 を参照）
スラリー溶媒
充填溶媒
可動栓カラム
カラム懸架台
スケールに適した攪拌器具
水準器
送液ポンプ
圧力ゲージ
廃液容器

充填操作は、手順(1)～(10)に従って行います（図 11 参照）。

- (1) 水準器などを用いてカラムを垂直に設置します。カラム出口の配管を閉じ、少量のスラリー溶媒をカラムに注ぎ入れます。
- (2) カラム下部の配管を開き、スラリー溶媒を排出して出口側フリットおよび配管内の空気を除きます。液面がフリットと同じになったところでカラム出口側の配管を閉じます。
- (3) 攪拌により均一化した充填剤スラリーをカラムに注ぎます。充填剤を加えるのに時間を要し、充填剤が沈降し始めた可能性がある場合は、フリットに損傷を与えないよう注意しながらカラム内でスラリーをバドルなどにより攪拌し、充填剤スラリーを均一にします。
- (4) 可動栓を取り付けます。その際、可動栓上部の配管を開放状態にしておき、可動栓を押し下げることによって空気を上部配管から排出し、カラム内に気泡が残らないようにします。

ポイント

- ・可動栓を傾けながら取り付けることで空気を排出するタイプのカラムもあります。
- (5) 可動栓を固定し、ポンプからの配管を接続します。出口側の配管を開き、直ちにポンプを用いて充填溶媒の送液を開始し、充填剤を沈降させてゲルベッドを形成していきます。

ポイント

- ・初めから所定速度で通液して充填する方法が一般的ですが、プラントスケールなど大型のカラムでは、初速を 1/5 程度に設定し、一定時間ごとに流速を 1/5 ずつステップ状に増加させ、最終的に所定の流速まで上げていく方法も用いられます。
- (6) 充填剤が沈降してゲルベッド高さが安定した後、ポンプを停止します。圧力が抜けたことを確認し、出口側の配管を閉じます。
 - (7) 入口側の配管を開放状態にした後、可動栓をわずかに緩め、空気が入らないように注意しながらゲルベッドの上端から 1 ～ 2 cm 付近に到達するまで可動栓を押し下げます。
 - (8) 送液中のゲルベッド高さが変化しなくなるまで(5)から(7)の操作を繰り返します。送液中のゲルベッドの高さが一定になったところで、送液中のゲルベッド上端の位置をマークします。
 - (9) ポンプを停止します。
 - (10) 出口側の配管を開放状態にしたまま、可動栓を緩めずに送液時にマークしたゲルベッド高さの位置まで押し下げます。

ポイント

- ・耐久性を向上させるため、マークした位置からさらに可動栓を 2 ～ 3 ミリ程度押し下げ、ゲルベッドを圧縮することもあります。
- ・スラリー濃度が低い場合は、リザーバーを接続して充填することもできます。その場合は、ゲルベッドを形成させ、ポンプを停止して出口側の配管を閉じた後、上部の可動栓を一旦取り外し、リザーバー内の上澄みをピペットやポンプなどで吸引除去します。リザーバーとユニオンを取り外し、可動栓を再び取り付けます。その他の操作は前述のとおりです。

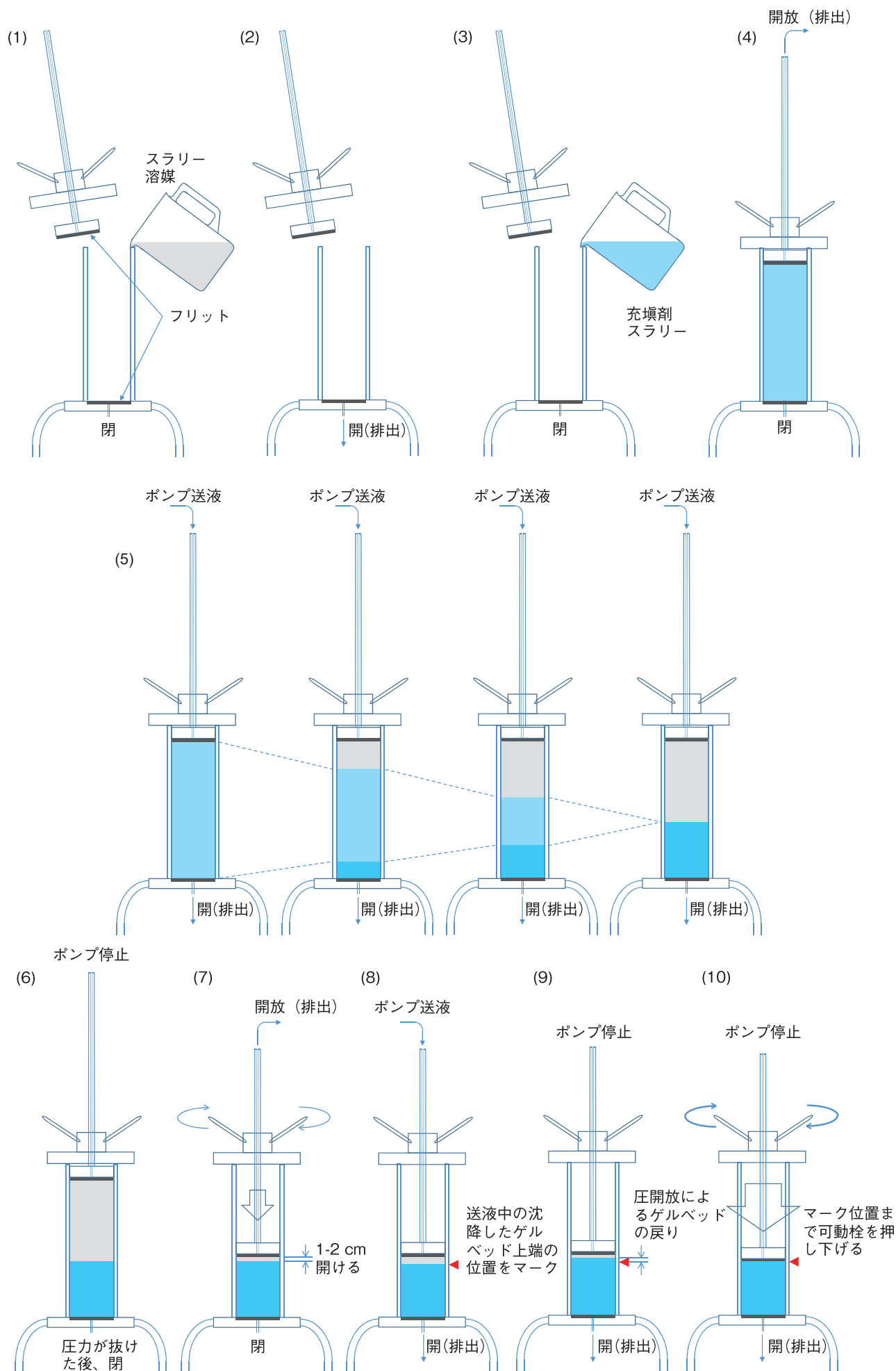


図 11 送液充填型の可動栓カラム（プラントスケール）への充填

5.3.3 (c) DAC カラム（マニュアルによる水圧押し下げタイプ）への充填例

DAC カラムは、やや高価ですが充填時の操作性に優れており、比較的大きなスケールでの精製に多用されています。マニュアルによる水圧押し下げタイプの DAC カラムは、ポンプを利用して上蓋とフリットの間に溶液を注入し、生じた圧力にて可動栓をピストンのように一定の速度で降下させて充填スラリー層を押し下げることによりゲルベッドを形成させて充填します。

準備するもの

充填剤スラリー（必要量については表 5 を参照）		
スラリー溶媒	DAC カラム	カラム懸架台
純水または 20 % エタノール水溶液		
スケールに適した攪拌器具	水準器	
送液ポンプ	圧力ゲージ	廃液容器

充填操作は、手順(1)～(8)に従って行います(図 12 参照)。

- (1) 水準器などを用いてカラムを垂直に設置します。カラム出口側配管を閉じ、少量のスラリー溶媒をカラムに注ぎ入れます。
- (2) カラム出口側配管を開き、カラム下部からスラリー溶媒を排出して出口側フリットおよび配管内の空気を除きます。液面がフリットに到達したところでカラム出口側の配管を閉じます。
- (3) 攪拌により均一化した充填剤スラリーをカラムに注ぎます。注ぎ込み操作に時間を要し、充填剤が沈降し始めた可能性がある場合は、フリットに損傷を与えないよう注意しながらカラム内でスラリーをバドルなどで攪拌し、全体を均一な懸濁状態にします。
- (4) 数分静置し、充填剤が沈み始めることで上部に透明な溶媒層が現れ始めたら可動栓をセットします。その際、可動栓と充填剤スラリーとの間に出来るだけ空気が入らないように取り付けます。
- (5) カラム入口側(可動栓側)配管を解放状態にしたまま、可動栓と上蓋の間に純水または 20 % エタノールをポンプで送液し、可動栓を降下させます。その際の速度は充填線速の半分程度に設定します。この操作により可動栓と充填剤スラリーの間に残っていた気泡を可動栓側の配管から押し出します。気泡が排出された時点で一度ポンプを停止し、可動栓の降下を停止させます。

- (6) カラム入口側(可動栓側)配管を閉じ、出口側配管を開放状態にします。設定した線速で可動栓と上蓋の間への送液を再開し、可動栓を押し下げます。可動栓が降下する際、スラリーには、可動栓との境界付近に透明な溶媒層が生じるとともに、沈降していく充填剤の層と、その下にゲルベッドが形成されていく様子が観察されます(充填線速が早い場合は透明な溶媒層が観察されないこともあります)。注いだ充填剤スラリーの量とスラリー濃度から予想されるゲルベッド高さの位置をあらかじめマークしておき、これを目安に可動栓をゲルベッドに接触するまで降下させます。

ポイント

- ・可動栓がゲルベッドに到達したことは、目視の他、圧力の急激な上昇によって確認することもできます。

- (7) 可動栓がゲルベッドに到達した時点でポンプを一旦停止させます。
- (8) 現在のゲルベッドの高さを基準に、これを pf (packing factor) で除した高さになるまでさらに可動栓を降下させ、充填剤を圧縮します (Ca⁺⁺Pure-HA の場合はゲルベッドまで降下させた時点で終点とします)。pf は以下の式で表されます。

$$pf = \frac{\text{圧縮前のゲルベッド高さ}}{\text{目標最終ゲルベッド高さ}}$$

pf は充填剤の種類ごとに異なります。値は表 4 に示したとおりです。

ポイント

- ・ゲルベッドを圧縮することで、充填剤はより密に充填され、高い線速で使用した場合でもカラム上部に空隙が生じにくい耐久性に優れたカラムを作製することができます。
- ・DAC カラムは、可動栓がカラム壁面と強く接触しているため、摩擦により実際に充填剤にかかる圧力よりも高く表示されます(その場合もカラム部材の破損を避けるため、カラムの取扱説明書に記載された耐圧上限を超えない範囲で操作します)。

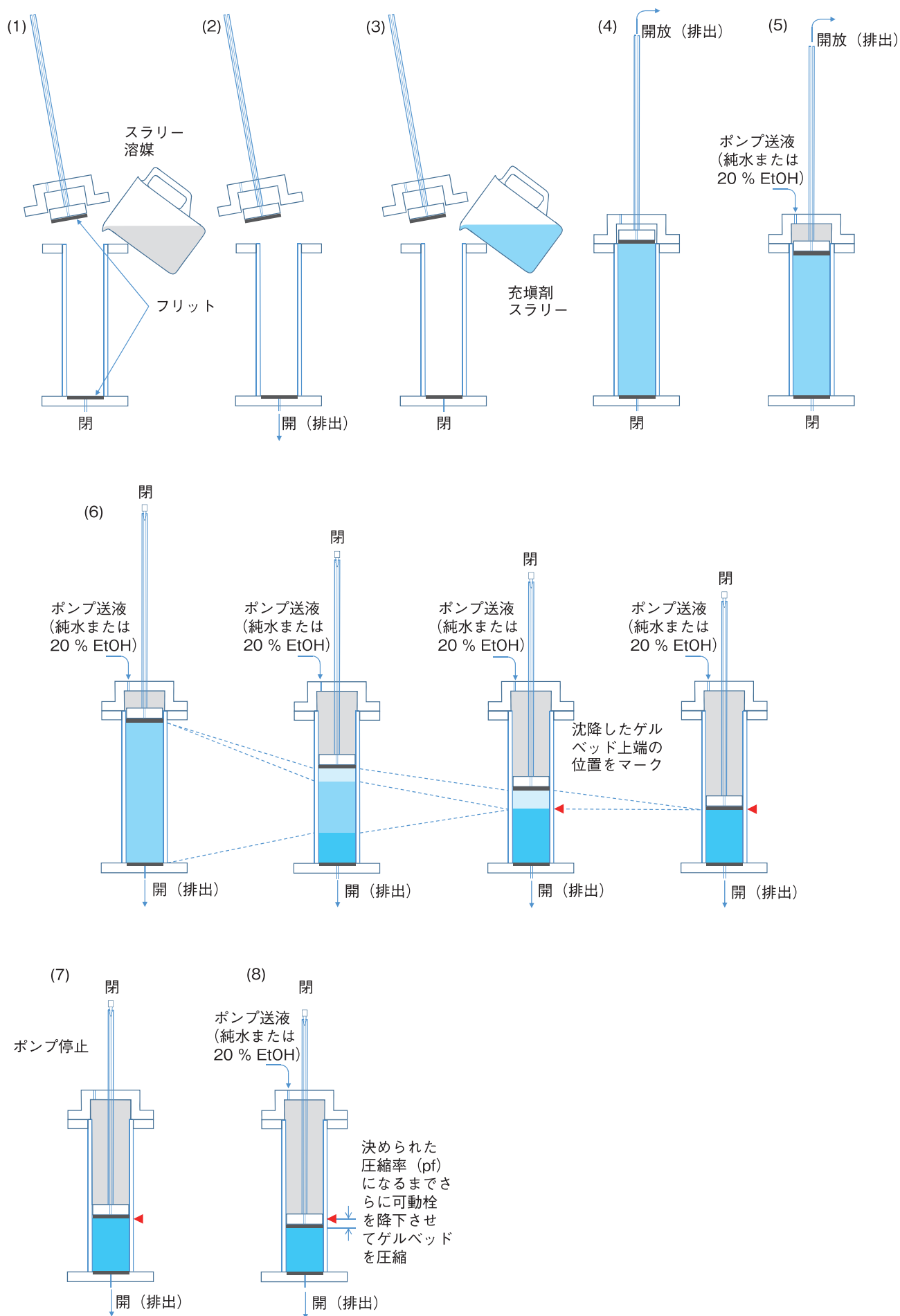


図 12 DAC カラム (マニュアルによる水压押し下げタイプ) への充填

5.3.3 (d) DAC カラム（モーター駆動による全自動タイプ）への充填例

DAC カラムには、可動栓をモーターなどで上下動させる機構をもつタイプ（モーター駆動による全自動タイプ）もあります。DAC カラム（モーター駆動による全自動タイプ）への充填操作も水圧押し下げタイプのものと基本的な操作は同じですが、スラリーをカラム内へ導入する方法が大きく異なります。

準備するもの

充填剤スラリー（必要量については表 5 を参照）
スラリー溶媒
DAC カラム
カラム懸架台
スケールに適した攪拌器具
水準器
圧力ゲージ
廃液容器

充填操作は、手順(1)～(7)に従って行います（図 13 参照）。

- (1) カラム下側の配管をスラリー溶媒からの流路に切り替えます。上側（可動栓側）の配管を閉じた状態で可動栓を上昇させ、スラリー溶媒をカラム下部から吸引導入します。

ポイント

- ・カラム内壁と可動栓の摩擦を低減するため、可動栓を動作させる前に、可動栓からカラム上端までのカラム内壁を、洗瓶などを用いて純水または 20 % エタノール水溶液などで濡らしておきます。
- (2) 可動栓を停止し、下側の配管を閉じます。上側の配管を開放した状態で、可動栓を最下部まで降下させて、カラム内の空気及び溶液を上側（可動栓側）の配管か

ら排出します。

- (3) カラム上側の配管を閉じます。カラム下部の配管を充填剤スラリーからの流路に切り替えます。
- (4) 可動栓を上昇させ、攪拌により均一化した充填剤スラリーをカラム下部から吸引導入します。

ポイント

- ・導入の間も、タンク内の充填剤スラリーを均一な懸濁状態に保つため、攪拌棒やパドルなどを用いてタンク内を適宜攪拌します。
- (5) 予定量の充填剤スラリーがカラム内に吸引導入された後、下部バルブを廃液側に切り替えます。可動栓を充填線速で押し下げてゲルベッドの形成を開始します。注いだ充填剤スラリーの量とスラリー濃度から予想されるゲルベッド高さの位置をあらかじめマークしておき、これを目安に可動栓をゲルベッドに接触するまで降下させます。

ポイント

- ・可動栓がゲルベッドに到達したことは、目視の他、可動栓に加わる抵抗（圧力）の急激な増加により確認することもできます。
- (7) 現在のゲルベッドの高さを基準に、これを pf（packing factor）で除した高さになるまでさらに可動栓を降下させ、充填剤を圧縮します（Ca⁺⁺Pure-HA の場合はゲルベッドまで降下させた時点で終点とします）。pf については 5.3.3 (c) と同様に表 4 に従います。

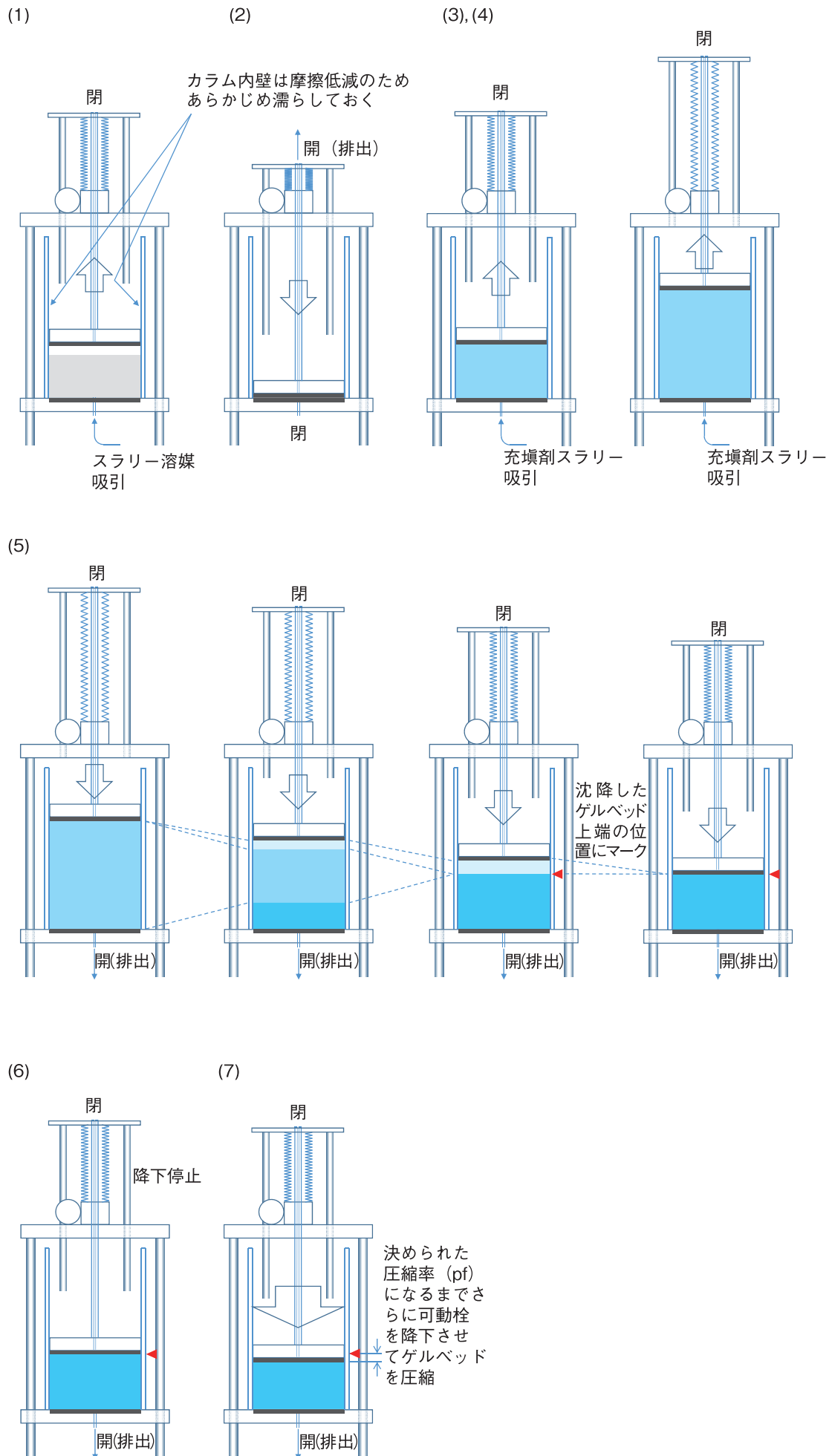


図 13 DAC カラム（モーター駆動による全自動タイプ）への充填

6. 充填評価

優れた性能をもつ充填剤も、カラムへの充填が適切でなければ、本来の性能を発揮することはできません。そこでこの項では、充填状態を評価する方法について説明します。

6.1 カラムの充填状態評価に用いられる指標（理論段数、非対称係数）

カラムの充填状態評価には、理論段数（ N ）とピークの高さの非対称係数（ As ）を指標に用いるのが一般的です。理論段数はその値が高いほど、また非対称係数は1に近いほど良好な充填状態にあると判断できます。理論段数および非対称係数の求め方を図14に示します。

理論段数はカラム長さに比例します。固定栓カラムを用いた場合は一定の長さのカラムを得ることができますが、可動栓カラムは充填ごとにカラム長さ（充填高さ）が異なってきます。そのため、充填状態を比較/評価するためには、単位長さで規格化した理論段数（ N/m ）を用いるのが一般的です。TOYOPEARL、TSKgel PWシリーズ各種の充填評価条件例を表6に、同条件における単位長さ当たりの理論段数（ N/m ）の目安を表7に示します。一般に、理論段数は粒子径に反比例しますので、粒子径が小さいほど理論段数は高くなります。一方、カラム内径が大きくなるにつれ、横方向への拡散の影響が無視できなくなるため、理論段数は低下する傾向を示します。

理論段数は、評価に用いる試料や測定条件によっても変化します。線速が高くなると理論段数は低下します。温度の低下によっても理論段数は低下します。従って理論段数を比較する場合は測定条件を揃えることが重要です。

一方、非対称係数（ As ）は、測定条件やカラムサイ

ズの影響を比較的受けにくいとされており、カラムのサイズや充填剤に関わらず $0.8 < As < 1.8$ （Ca⁺⁺Pure-HAのみ $0.8 < As < 2.6$ ）の範囲にあれば良好に充填されたカラムと判断できます。

その他、理論段数1段に相当する長さ（HETP; Height Equivalent to a Theoretical Plate, 理論段相当高さ）がカラムの充填状態を評価する指標として用いられることもあります。

HETP は以下の式で表されます。

$$\text{HETP} = \frac{\text{カラム長さ (mm)}}{\text{理論段数}}$$

HETP の値が小さいほど分離に優れたカラムであるといえます。一般的に充填剤の粒子径の2倍～5倍程度であれば良好に充填されていると判断できます。

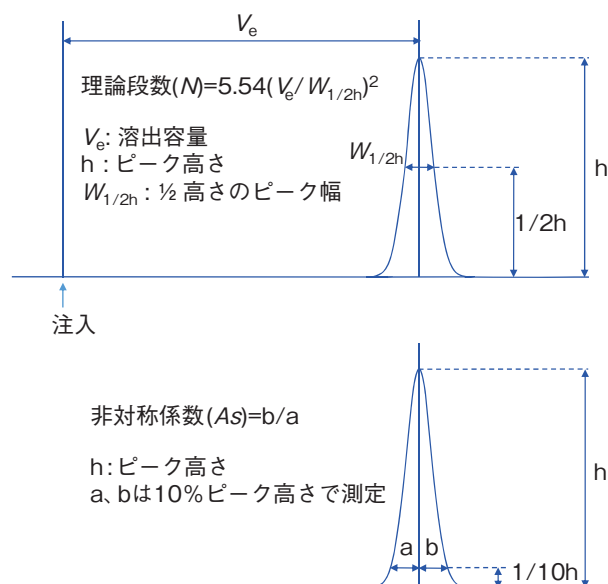


図14 理論段数および非対称係数の計算方法

表 6 充填評価条件例

充填剤タイプ	評価条件	PW グレード 20 μm	PW グレード 30 μm	S グレード	F グレード	M グレード	C グレード	EC グレード
HW シリーズ	溶 媒	—	—	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	—	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl
	線 速	—	—	20 cm/h	50 cm/h	—	100 cm/h	100 cm/h
	試 料	—	—	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	—	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl
	検 出	—	—	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	—	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度
	温 度	—	—	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	—	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$
IEC シリーズ	溶 媒	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl
	線 速	50 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	100 cm/h
	試 料	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl
	検 出	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度
	温 度	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$
HIC シリーズ	溶 媒	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	—
	線 速	50 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	100 cm/h	—
	試 料	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	—
	検 出	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	① UV (280 nm) ②電気伝導度	—
	温 度	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	—
ProteinA/L	溶 媒	—	—	—	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	—	—	—
	線 速	—	—	—	100 cm/h	—	—	—
	試 料	—	—	—	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	—	—	—
	検 出	—	—	—	① UV (280 nm) ②電気伝導度	—	—	—
	温 度	—	—	—	25 $^{\circ}\text{C}$	—	—	—
AFC	溶 媒	—	—	—	—	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	—	—
	線 速	—	—	—	—	100 cm/h	—	—
	試 料	—	—	—	—	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	—	—
	検 出	—	—	—	—	① UV (280 nm) ②電気伝導度	—	—
	温 度	—	—	—	—	25 $^{\circ}\text{C}$	—	—
Ca ⁺⁺ Pure-HA	溶 媒	—	—	—	①純水 ② 0.5 mol/L NaCl	—	—	—
	線 速	—	—	—	100 cm/h	—	—	—
	試 料	—	—	—	① 10 % アセトン ② 3 mol/L NaCl	—	—	—
	検 出	—	—	—	① UV (280 nm) ②電気伝導度	—	—	—
	温 度	—	—	—	25 $^{\circ}\text{C}$	—	—	—

表 7 単位長さあたりの理論段数の目安 (N/m)

充填剤タイプ	カラム内径 (cm I.D.)	PW グレード 20 μm	PW グレード 30 μm	S グレード	F グレード	M グレード	C グレード	EC グレード
HW シリーズ	2	—	—	5,000	4,000	—	3,000	1,500
	5	—	—	5,000	4,000	—	3,000	1,500
	10	—	—	4,000	3,000	—	2,500	1,000
	20	—	—	4,000	3,000	—	2,000	750
	30	—	—	3,000	2,500	—	1,500	750
IEC シリーズ	40	—	—	3,000	2,000	—	1,000	500
	2	10,000	6,000	5,000	4,000	3,000	2,000	1,000
	5	10,000	6,000	5,000	4,000	3,000	2,000	1,000
	10	9,000	5,000	4,000	3,000	2,500	1,500	700
	20	9,000	5,000	4,000	3,000	2,000	1,000	500
HIC シリーズ	30	8,000	4,000	3,000	2,500	1,500	1,000	400
	40	7,000	4,000	3,000	2,000	1,500	750	300
	2	8,000	6,000	5,000	4,000	3,000	2,000	—
	5	8,000	6,000	5,000	4,000	3,000	2,000	—
	10	7,000	5,000	4,000	3,000	2,500	1,500	—
ProteinA/L	20	6,000	5,000	4,000	3,000	2,000	1,000	—
	30	5,000	4,000	3,000	2,500	1,500	1,000	—
	40	5,000	4,000	3,000	2,000	1,500	750	—
	2	—	—	—	3,500	—	—	—
	5	—	—	—	3,000	—	—	—
AFC	10	—	—	—	2,500	—	—	—
	20	—	—	—	2,500	—	—	—
	30	—	—	—	2,000	—	—	—
	40	—	—	—	2,000	—	—	—
	2	—	—	—	—	3,000	—	—
Ca ⁺⁺ Pure-HA	5	—	—	—	—	3,000	—	—
	10	—	—	—	—	2,500	—	—
	20	—	—	—	—	2,000	—	—
	30	—	—	—	—	1,500	—	—
	40	—	—	—	—	1,500	—	—

評価に用いる試料、温度、線速によって得られる理論段数の値は異なります

6.2 充填状態の評価に用いる試料及び条件

アセトンは紫外部に吸収を有しており、紫外吸光光度検出器により容易に検出ができる他、非イオン性で充填剤との間に静電的相互作用を生じないこと、極性が高く疎水的相互作用を生じないこと、低分子で充填剤の細孔深くまで拡散すること、安価であることなどの特長を有していることから、カラム評価用試料として多用されています。食品添加物の抽出溶媒としても用いることが可能（最終的には全て除かれていることが条件になります）で、充填剤への残存性も低いとされています。一方、生体高分子分取用装置の多くは、塩濃度グラジエント溶離条件での塩濃度変化を確認するための電気伝導度モニターを備えています。そのため、NaClは静電的相互作用の影響を受けやすい難点はあるものの、安全性に優れていることから、電気伝導度モニターを備えた装置では、高濃度のNaClも評価用試料として多く用いられるようになっています。

注意！

- ・NaClを用いて充填状態を評価する際は、電気伝導度モニターを用いて電気伝導度を検出します。高感度のHPLC用電気伝導度検出器は、感度が鋭敏すぎるため使用できませんのでご注意ください。

6.2.1 アセトンを用いた充填状態の評価

準備するもの
送液ポンプ
UV 検出器
インジェクターまたは切り替えバルブ
5～10 % アセトン水溶液
溶離液（純水）

- (1) UV 検出器の検出波長を 280 nm（254 nm も使用可能）に設定し、純水をカラムに送液します。（線速 20 ～ 250 cm/h）
- (2) 検出器の応答が安定した後、アセトン水溶液をカラム容量の 0.1 ～ 0.5 vol % 注入します。
- (3) 得られたアセトンの UV 応答ピークから理論段数と非対称係数を算出します。

6.2.2 NaCl 水溶液を用いた充填状態の評価

準備するもの
送液ポンプ
電気伝導度モニター
インジェクターまたは切り替えバルブ
3 mol/L NaCl
溶離液（0.5 mol/L NaCl）

- (1) 0.5 mol/L NaCl をカラムに送液します。（線速 20 ～ 250 cm/h）
- (2) 電気伝導度検出器の応答が安定した後、3 mol/L NaCl をカラム容量の 0.1 ～ 0.5 % 注入します。
- (3) 得られた NaCl の電気伝導度応答ピークから理論段数と非対称係数を算出します。

6.3 期待するカラム性能（理論段数、非対称係数）が得られないとき

期待する理論段数や非対称係数が得られない場合は、まずシステムや測定条件に問題がないかを確認します。カラムの大きさに対して極端に内径の大きな配管、あるいは長い配管を使用している場合、試料が配管内で拡散して広がってしまうため、見かけの理論段数の値が小さくなることがあります。その場合は圧力が過大にかからない程度に内径の小さな配管に交換し、配管長さもできるだけ短くします。次に注入する試料の量を確認します。注入量が多い場合には注入量を少なくします。

充填剤の粒子径が大きくピークがブロードになる場合や、カラムのサイズや形状、また注入量の変更などにより、十分な応答強度が得られないことがあります。その場合は試料濃度を高くします。逆に応答が過大な場合は試料濃度を低減して応答強度を調整します。

評価の際の線速や温度も理論段数に大きな影響を与えます。線速が高くなるにつれ、あるいは温度が下がるにつれ理論段数は低下します。これまでと異なる値が得られた場合には、測定条件に変更がなかったかを確認します。

システムや測定条件に問題がなければ、充填状態に問題があることが考えられます。ゲルベッドが目視可能であれば送液中に入口側フリット（可動栓カラムの場合は可動栓）とゲルベッドの間に空隙が生じていないかを確認します（固定栓カラムの場合は入口側のエンドフィッティングを注意深く取り外して空隙の有無を確認することもあります）。空隙が認められた場合、固定栓タイプ

のカラムであれば、空隙に充填剤を補充した後、端面を整えて再びエンドフィッティングを取り付けます。可動栓タイプの場合は、可動栓を押し下げ、空隙を解消します。ゲルベッドに亀裂（クラッキング）が認められる場合（送液中のみクラッキングが観察される場合を含む）は、回復は困難ですので、再充填します。

以上の操作によっても十分な理論段数が得られない場合には、充填条件が適切でないか、フリットの目詰まりなどの充填剤以外の何らかの原因によりカラム内の流れが不均一になった可能性が高いと考えられます。充填状態の評価によって得られた非対称係数の値は原因の推定や次の充填条件を決定する上で重要な情報となります。非対称係数が大きい場合、小さい場合に考えられる原因と対策をそれぞれ示します。また、それぞれの場合の典型的なクロマトグラムを図15に示します。

非対称係数が小さい場合 ($As < 0.8$)

原因として考えられること

- ・ゲルベッドにクラッキングが生じている
- ・過充填になっている

対策

- ・スラリー濃度を上げる（例：スラリー濃度を 33 % から 50 % に変更する）
- ・充填線速を下げる（例：充填線速を 100 cm/h から 50 cm/h に変更する）
- ・DAC カラムの場合は pf を少し小さくする

非対称係数が大きい場合 ($As > 1.8$)

原因として考えられること

- ・フリットとゲルベッドの間に空隙が生じている
- ・充填剤が密に充填されておらず、充填不足の状態になっている
- ・フリットが目詰まりを起こしている

対策

- ・空隙に充填剤を補填する
- ・スラリー濃度を下げる（例：スラリー濃度を 50 % から 33 % に変更する）
- ・充填線速を上げる（例：充填線速を 100 cm/h から 200 cm/h に変更する）
- ・スラリー溶媒や充填溶媒の塩濃度を高くする（例：純水を 1 mol/L NaCl に変更する）
- ・DAC カラムの場合は pf を少し大きくする
- ・フリットを洗浄または交換する

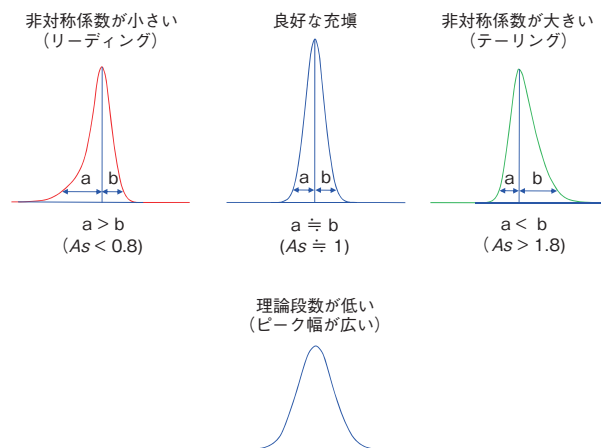


図 15 充填性の評価

その他、NaCl 水溶液を試料に用いて充填状態の評価を実施した場合は、静電的相互作用（反発）の影響を受けた可能性も考えられます。特に表面に多くの電荷をもつイオン交換クロマトグラフィー用充填剤の充填評価においては注意が必要です。静電的相互作用の影響が考えられる場合は、溶離液の塩濃度を高くします。

7. カラムの保管

充填後のカラムは充填剤の種類により適切な保管方法が異なります。カラム保管の際の留意点を以下に示します。

7.1 保管温度

カラムの多くは室温（25 ℃）前後で保管しますが、熱に不安定なリガンドが固定化された一部の充填剤には低温（2～8 ℃）での保管が必要なものもあります。たんぱく質やヘパリンなどがリガンドとして固定化された充填剤（例：TOYOPEARL AF-rProteinA HC-650F や AF-Heparin HC-650M など）を充填したカラムは、リガンドの分解を抑制するため低温（2～8 ℃）で保管します。保管温度は各充填剤の取扱説明書に記載されています。

7.2 保管溶媒

カラムは内部で菌体が発生しないよう 20 % エタノール水溶液に置換して保管するのが基本ですが、一部 20 % のエタノールを含む緩衝液や塩水溶液を用いるものもあります（例：TOYOPEARL Sulfate-650F は 20 % のエタノールを含む 0.2 mol/L 酢酸ナトリウムにて保管、TOYOPEARL AF-rProteinA HC-650F、AF-rProtein A-650F、AF-rProtein L-650F は 20 % のエタノールを含む 1 mol/L NaCl にて保管など）。20 % エタノール水溶液の代わりに、2 % ベンジルアルコール水溶液を用いることも可能です。なお、アルコールを含む水溶液は水に

比較して粘度が高いため、操作圧が上昇しますので、通液の際は流速を下げて送液します（置換時の流速の目安は常用流速の1/2～1/3程度です）。同様に低温下においても操作圧は上昇しますので、温度による圧力の上昇にも注意が必要です。

7.3 遮光

一部の充填剤には光に敏感なりガンドが固定されたものがあります。光により劣化しやすい充填剤（TOYOPEARL MX-Trp-650M など）は直射日光を避け、必要に応じてアルミ箔などでカラムを覆うなどして遮光して保管します。

8. 充填剤の再充填

期待されたカラム性能が得られない場合は、以下の手順で充填剤をカラムから抜き出し、再充填します。抜き出し操作の際、充填剤の一部が破碎して微粒子が生じる可能性がありますので、抜き出した充填剤は、再充填の前にデカンテーションを行います。

8.1 固定栓カラムおよびラボスケールの可動栓カラムからの充填剤の抜き出し

- (1) カラムを垂直に固定した後、カラム上側から純水を通液し、カラム内を純水で置換します。
- (2) ポンプを一旦停止し、カラム下側のエンドフィッティングを取り外し、ビーカーなどの充填剤受け容器をカラムの下に置きます。カラム上側から純水を送液し、充填剤をカラムから押し出すようにして回収します。
- (3) カラム部材を分解し、超音波洗浄機などで洗浄します。

8.2 プラントスケールカラム（DAC カラムを除く）からの充填剤の抜き出し

- (1) 純水を通液し、カラム内を純水で置換します。
- (2) 可動栓を緩め、上昇させてゲルベッドとフリットの間に空隙を作ります。出口側（逆方向）から純水を送液し、ゲルベッドを崩して充填剤を懸濁状態にしています。

ポイント

- ・カラム内壁と可動栓の摩擦を低減するため、可動栓を動作させる前に、可動栓からカラム上端までのカ

ラム内壁を、洗瓶などを用いて純水または20 % エタノール水溶液などで濡らしておきます。

- (3) 可動栓を固定した後、送液する方向を上下数回反転させるなどして、ゲルベッドをさらに崩していきます。
- (4) 可動栓を取り外し、カラム内をさらにパドルなどで攪拌し、充填剤を均一な懸濁状態にします。
- (5) 容器を傾けるか、ポンプを用いるなどして充填剤をカラムから取り出して回収します。
- (6) カラムの取扱説明書に従いカラムを分解し、洗浄します。

パイロットスケール及びプラントスケールの可動栓カラム（DAC カラムを除く）では、カラムから抜き出すことなくカラム内でスラリー溶媒に置換／再懸濁化した後、再度充填溶媒を通液して充填することもあります。この方法はゲルベッドにクラッキングが観察された場合や充填条件（スラリー溶媒組成や充填線速など）が適切でなかった場合などに有効です。しかしながらフリットを洗浄することはできませんので、フリットの目詰まりが原因でカラム性能が得られない場合には、改善は期待できません。また、激しく攪拌すると充填剤の一部が破碎して微粒子が発生し、圧力損失が高くなる可能性がありますので、カラム内での再懸濁化の操作は慎重に行ってください（特に Ca^{++} Pure-HA は破碎が生じやすいので注意が必要です）。カラムの底に沈降した充填剤（ゲルベッド）を分散させる際も、上から葉さじやパドルなどで突く様な操作は行わないでください。フリットの破損や充填剤の破碎が生じる可能性があります。

8.3 DAC カラム（ポンプによる水圧押し下げタイプ）からの充填剤の抜き出し

操作方法はカラムの構造によって異なりますので、詳細はカラムの取扱説明書に従いますが、概要は以下のとおりです。

- (1) 純水を通液し、カラム内を純水で置換します。
- (2) 上蓋と可動栓の間の空間につながる配管を解放状態にします。可動栓上部の配管を閉じます。カラム下部からポンプを用いて送液し、可動栓を上昇させます。

(3) 可動栓がカラム上端に達する直前でポンプを停止します。可動栓を取り外します。

(4) パドルや攪拌棒を用いて充填剤を攪拌し、均一な懸濁状態にします。カラムを傾けるか、ポンプで吸引するなどしてカラムから取り出して回収します。

ポイント

- ・カラム内の充填剤が十分に流動化していない場合は、フリットに損傷を与えないよう注意しながらカラム内でスラリーをパドルなどでゆっくり攪拌し、全体を懸濁状態にします。

(5) カラムの取扱説明書に従いカラムを分解し、洗浄します。

8.4 DAC カラム（モーター駆動による全自動タイプ）からの充填剤の抜き出し

操作方法はカラムの構造によって異なりますので、詳細はカラムの取扱説明書に従いますが、概要は以下のとおりです。

- (1) 純水を通液し、カラム内を純水で置換します。
- (2) カラム下部から純水を吸引させながら可動栓を上昇させてゲルベッドとフリットの間に空隙を作ります。

ポイント

- ・カラム内壁と可動栓の摩擦を低減するため、可動栓を動作させる前に、可動栓からカラム上端までのカラム内壁を、洗瓶などを用いて純水または 20 % エタノール水溶液などで濡らしておきます。
- (3) 送液する方向を上下数回反転させる、あるいは可動栓を数回上下させるなどしてゲルベッドを崩し、充填剤を懸濁状態にします。
 - (4) 下側の配管を充填剤回収用の流路に切り替え、可動栓を降下させて、懸濁状態にした充填剤を排出して回収します。
 - (5) 必要に応じて純水をカラム内に再導入した後、送液方向を上下数回反転させる、あるいは可動栓を上下させるなどしてカラム内に残った充填剤を分散させます。

(6) 下部の配管を充填剤回収用の流路に切り替え、可動栓を降下させ、残りの充填剤を回収します。

(7) カラムの取扱説明書に従いカラムを分解し、洗浄します。

9. 充填剤の廃棄

カラムに充填された充填剤は、試料を繰り返し注入することで次第に性能が低下していきます。洗浄しても性能が回復しなくなった場合は、劣化した充填剤を抜き出し、新たに充填剤を充填する必要があります。劣化した充填剤は、試料に含まれる不可逆的吸着成分などにより汚染されている可能性や、固着してゲルベッドが崩れにくくなっている可能性が考えられます。そのため、カラムから抜き出す前にアルカリ水溶液やアルコールを含む水溶液を通液し、洗浄しておきます。洗浄から廃棄までの一般的な手順は以下のとおりです。

- (1) 汚染物質に応じて 0.1 から 0.2 mol/L 程度の NaOH や 20 % 程度のアルコールを含む水溶液などを通液し、充填剤を洗浄します。

ポイント

- ・充填剤を洗浄することで、ゲルベッドの固着が軽減され、抜き出し操作の際、充填剤を分散させやすくする効果も期待できます。

- (2) 純水を通液し、カラム内を置換します。

ポイント

- ・疎水クロマトグラフィー用の充填剤などでは、純水に変えてエタノールを含む水溶液など、より充填剤が分散 / 懸濁しやすい溶媒を用いることもあります。
- (3) 前述の充填剤の再充填の項に記載された方法にてカラムから充填剤を取り出します。
 - (4) 抜き出した充填剤は、必要に応じてオートクレープ処理するなどして滅菌します。その後、充填剤の取扱説明書に記載された情報に基づき、各自治体により定められた規則に従い廃棄します。

10. 終わりに

本稿では、プロセスクロマトグラフィー用充填剤 TOYOPEARL, 高速分取用充填剤 TSKgel PW シリーズ, Ca++Pure-HA の充填方法および評価方法を中心に記述してまいりました。これらの充填剤は、抗体医薬品や核酸医薬品をはじめ、生体高分子をベースにした医薬品の研究や開発、製造に今では欠かせないものになっていま

す。カラムもラボスケールからプラントスケールまでスケールに応じてさまざまなタイプが用いられています。目的に応じて適切な充填剤を選択頂くとともに、さらにこれらを適切な条件で充填して頂くことで充填剤本来の性能を発揮できるカラムが作製できます。本稿が皆様のお仕事の一助になれば幸いです。

※以下の名称は日本における東ソー株式会社の登録商標です。

“トヨパール／TOYOPEARL”

※以下の名称は日本、米国、欧州共同体、中国等における東ソー株式会社の登録商標です。

“TSKgel”、“TOYOPEARL”、“TOYOPEARL GigaCap”、“TOYOPEARL MegaCap”

※“Ca⁺⁺Pure-HA”、“SkillPak”は日本等におけるTosoh Bioscience LLCの登録商標です。

※当社製品を使用して得られた分離精製物または精製溶液を、製品および中間体として使用する場合は十分にその安全性の確認を行ってご使用ください。

※記載されたデータは当社が取得した参考データで、保証するデータではありません。

お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認もしくはデータの取得をお願い致します。



TOSOH

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	☎(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	☎(052)211-5730	〒460-0008	名古屋市中区栄1-2-7
福岡支店	☎(092)781-0481	〒810-0001	福岡市中央区天神1-13-2
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

お問い合わせe-mail hlc@tosoh.co.jp

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>