



TOSOH

SEPARATION REPORT

TSK-GELを用いたスケールアップについて (HPLCからMPLCへ)

—— 目 次 ——

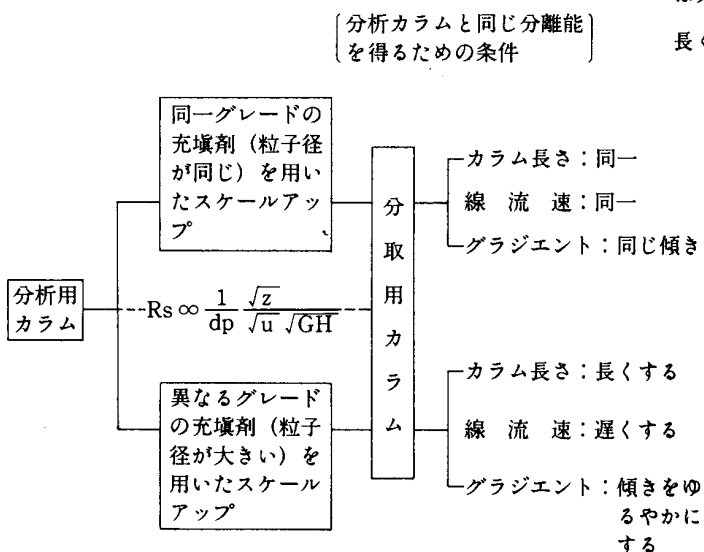
	ページ
1. はじめに	1
2. スケールアップに関する基本概念	1
3. スケールアップの実際	2
4. おわりに	6

1. はじめに

高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)は、タンパク質をはじめ、生体高分子を迅速に分離分析する手段として確立され、短時間で高純度の標品が得られるようになってきました。しかし、HPLCにより精製された少量の試料から得られる情報は限られており、さらにより多くの情報を得るためには試料を大量に調製する必要があります。一方、近年のバイオテクノロジーの発展により、タンパク質などの高純度精製標品は、直接、商品として高付加価値をもつため、迅速で大量に、しかも経済的な精製方法が要求されています。このような背景から、大量分取、精製法の確立が重要であり、そのためには、分析レベルで得られた結果が直ちに分取レベルへ応用できることがスケールアップへの一番の近道になります。

本稿では、TSKgel によるタンパク質の分離において分析用レベルから分取用レベルへのスケールアップについて、分取用HPLCカラムの利用に限らず、特に経済的な側面から、分析用HPLCカラムから分取用中速(MPLC)用充填剤であるトヨパールを用いるスケールアップについて述べます。

図-1 スケールアップの考え方



(例) 分析用カラム充填剤の粒子径 10μ 、分取用カラム充填剤の粒子径 14μ の場合、分取用カラムの長さを2倍にするか、線速を $\frac{1}{2}$ にすれば、分析用カラムとほぼ同じ分離能が得られる。

2. スケールアップに関する基本概念

液体クロマトグラフィにおけるスケールアップについては「本らの詳細な報告^{1)~4)}があります。スケールアップに関する理論は、分離に関する種々の要因の関係を示す次の式から推察できます。

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

Rs : 分離能

dp : 充填剤の粒子径

z : カラム長さ

u : 線速

GH : 無次元塩濃度勾配(グラジエント分離モードの場合)

ただし

GH = $g(Vt - V_0)$ で表わされる。

g : 塩濃度変化量 (Mol/ml)

Vt : カラム容積

V₀ : カラムのボイド容積

ゲル透過クロマトグラフィ(GFC)の場合、GHの影響がないので(1)式より、分離能Rsはカラム長さの1/2乗に比例し、充填剤の粒子径に反比例、さらに線速の1/2乗に反比例することがわかります。したがってスケールアップの際、分析用HPLCカラムと同じ分離能を分取用カラムで得るためには、dp、z、uを同一条件にすればよいことがわかります。しかし、一般的に分取用充填剤は、粒子径が分析用充填剤よりも大きくなるため(1)式により、そのままの条件でスケールアップしたのでは分離能が劣ります。したがって、その比例分だけカラムを長くしたり、線速を遅くする必要があります。イオン交換ク

ロマトグラフィ (IEC) や疎水クロマトグラフィ (HIC) のようなグラジエント分離モードについても同様なことが言えます。スケールアップの際には、カラムを長くする、線速を遅くする、また、グラジエント勾配をゆるやかにする (グラジエント時間を長くする) ことにより分析カラムと同様な分離能を達成することができます。スケールアップに関する考え方を簡単に図-1 に示します。

3. スケールアップの実際

分析用HPLCカラムから分取用HPLCカラムへのスケールアップについては、既に詳細な報告^{9)~11)}があります。スケールアップしても分析カラムと同様な分離能が得られる代表的な溶離条件を表1 a)~c) に示します。スケールアップの際の試料負荷量は、カラム長さが同一の場合、カラムと断面積にほぼ比例します。

表 1 (a) スケールアップの際の代表的な溶離条件

	分析用		分取用 (HPLC)		
	TSKgel G3000SW _{XL}	TSKgel G3000SW	TSKgel G3000SW	TSKgel G3000SW	TSKgel G3000SW
カラム寸法	7.8mmID×30cm	7.5mmID×60cm	21.5mmID×60cm	55mmID×60cm	108mmID×60cm
流速 (ml/min)	1.0	1.0	5~8	15~50	50~90
分析時間 (min)	12	25	30~90	40~120	60~150

(b)

	分析用		分取用 (HPLC)	分取用 (MPLC)
	TSKgel G3000PW _{XL}	TSKgel G3000PW	TSKgel G3000PW	TSKgel Toyopearl HW-55F
カラム寸法	7.8mmID×30cm	7.5mmID×60cm	21.5mmID×60cm	22mmID×60cm
流速 (ml/min)	1.0	1.0	3.0	1.0
分析時間 (min)	12	25	45	240

(c)

	分析用	分取用 (HPLC)		分取用 (MPLC)
	TSKgel DEAE-5PW TSKgel SP-5PW TSKgel CM-5PW TSKgel Phenyl-5PW	TSKgel DEAE-5PW TSKgel SP-5PW TSKgel CM-5PW TSKgel Phenyl-5PW	TSKgel DEAE-5PW TSKgel SP-5PW TSKgel CM-5PW TSKgel Phenyl-5PW	TSKgel DEAE-Toyopearl 650M TSKgel SP -Toyopearl 650M TSKgel CM -Toyopearl 650M TSKgel Butyl -Toyopearl 650M
カラム寸法	7.5mmID×7.5cm	21.5mmID×15cm	55mmID×20cm	22mmID×15cm
流速 (ml/min)	1.0	4.0	30~40	4.0
グラジエント時間 (min)	60	120	120~180	240~480

次に分析用HPLCカラムから分取用カラムとして中速(MPLC)用充填剤TSKgelトヨパールを用いたスケールアップについて述べます。図-2、3にGFCにおける比較、図-4~9にIECにおける比較、図-10、11にHICにおける比較を示します。トヨパールはHPLC用充填剤に比べ粒子径がかなり大きいため、分析用HPLCカラムと同じ分離能を得るためには、分取用HPLCカラムと比較しても、さらにカラム長さを長くする、線速を遅くする、グラジエント時間を長くするなど処置が必要となりますが、条件を選べば、スケールアップしても分析用HPLCカラムとほぼ同等の分離能が得られます(表1(b)(c)参照)。一般にPW系分析用HPLCカラムからトヨパールへのスケールアップが有効です。またHICではTSKgel Phenyl-5PWからTSK-gel Butyl-トヨパール650Mへのスケールアップが可能です。

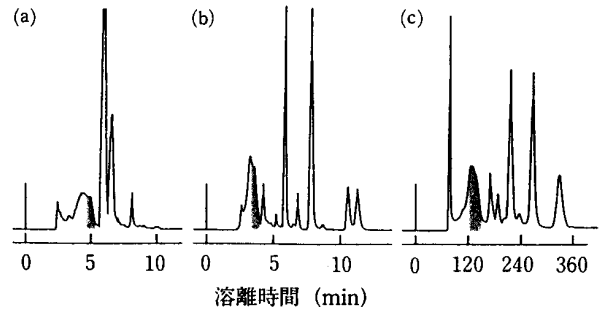


図-3 GFCによるスケールアップ例(2)

-ニホンハツカダイコン粗抽出物-

溶離条件；試料を除き図-2に同じ

試料；ニホンハツカダイコン粗抽出物

試料負荷量；(a),(b)各100µl

(c) 500µl

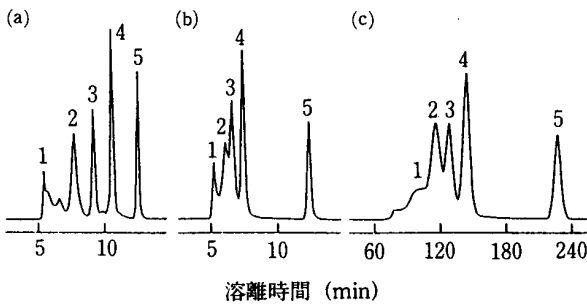


図-2 GFCによるスケールアップ例(1)

-タンパク質混合物-

カラム；(a) TSKgel G3000SW_{XL} 7.8mmID×30cm

(b) TSKgel G3000PW_{XL} 7.8mmID×30cm

(c) TSKgel Toyopearl HW-55F

22mmID×60cm

溶離液；50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) +0.3M NaCl

流速；1 ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；1.チログロブリン 2.γ-グロブリン

3.オプアルブミン 4.リボスクレアーゼA

5.p-アミノ安息香酸

試料負荷量；(a)(b) 全タンパク質 200µg/40µl

(c) " 2.5mg/500µl

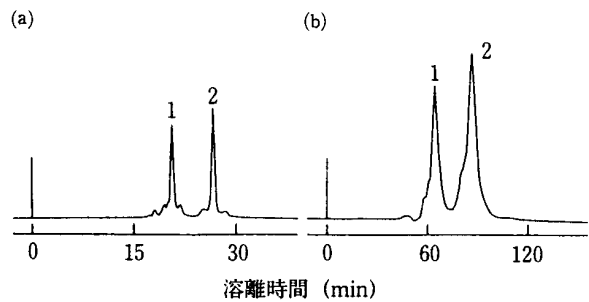


図-4 IECによるスケールアップ例(1)

-タンパク質混合物-

カラム；(a) TSKgel DEAE-5PW 7.5mmID×7.5cm

(b) TSKgel DEAE-Toyopearl 650M

16mmID×15cm

溶離液；A：20mMトリス-HCl緩衝液 (pH8.0)

B：A+0.5M NaCl

A→Bリアグラジエント((a)60min,(b)240min)

流速；(a) 1 ml/min (b) 4 ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；1.オプアルブミン 2.トリブシンインヒビタ

試料負荷量；(a) 200µg

(b) 1mg

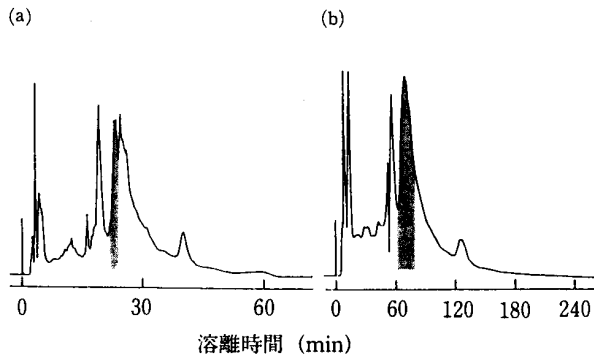


図-5 IECによるスケールアップ例(2)

-酵母由来粗ヘキソキナーゼ-

溶離条件；試料を除き図-4に同じ

試料；酵母由来粗ヘキソナーゼ

試料負荷量；(a) 2 mg

(b) 10mg

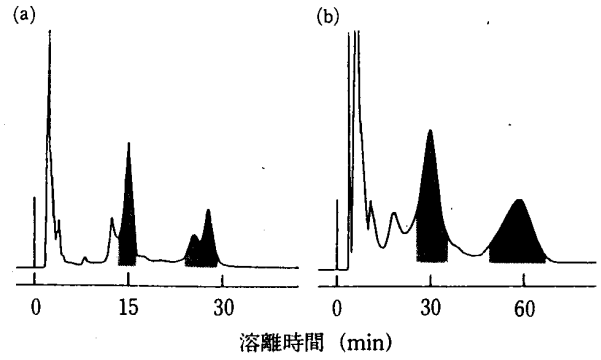


図-7 IECによるスケールアップ例(4)

-粗ヒマメレクチン(RCA)-

溶離条件；試料を除き図-6に同じ

試料；粗ヒマメレクチン (RCA)

試料負荷量；(a) 1.2mg

(b) 6 mg

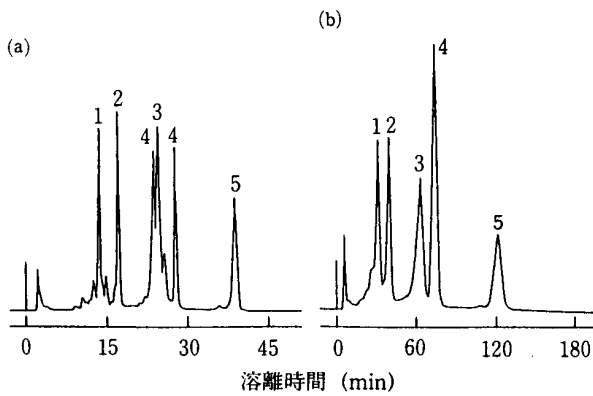


図-6 IECによるスケールアップ例(3)

-タンパク質混合物-

カラム；(a) TSKgel CM-5PW 7.5mmID×7.5cm

(b) TSKgel CM-Toyopearl 650M

16mmID×15cm

溶離液；A：20mMリン酸緩衝液 (pH7.0)

B：A+0.5M NaCl

A→Bリアグラジエント ((a)60min,(b)240min)

流速；(a) 1 ml/min (b) 4 ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；1.トリプシノーゲン 2.リボスクレアーゼA

3.α-キモトリプシノーゲン 4.チトクロムC

5.リゾチーム

試料負荷量；(a) 1.1mg

(b) 5.5mg

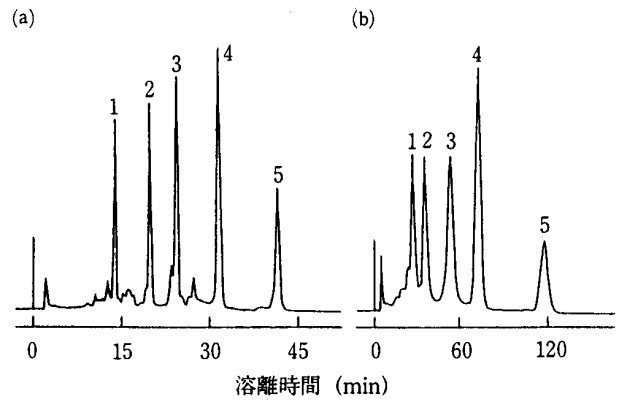


図-8 IECによるスケールアップ例(5)

-タンパク質混合物-

カラム；(a) TSKgel SP-5PW 7.5mmID×7.5cm

(b) TSKgel SP-Toyopearl 650M

16mmID×15cm

溶離液；A：20mMリン酸緩衝液 (pH7.0)

B：A+0.5M NaCl

A→Bリアグラジエント ((a)60min,(b)240min)

流速；(a) 1 ml/min (b) 4 ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；1.トリプシノーゲン 2.リボスクレアーゼA

3.α-キモトリプシノーゲン 4.チトクロムC

5.リゾチーム

試料負荷量；(a) 1.1mg

(b) 5.5mg

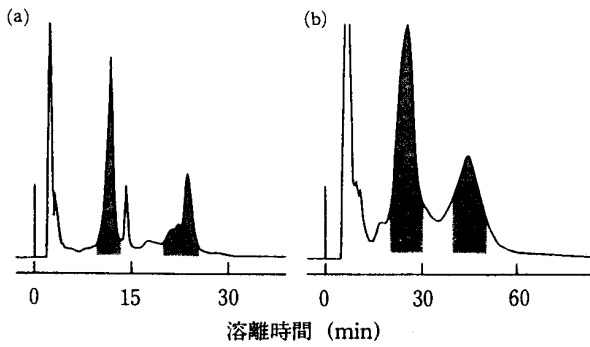


図-9 IECによるスケールアップ例(6)

—粗ヒマメレクチン(RCA)—

溶離条件：試料を除き図-8に同じ

試料：粗ヒマメレクチン (RCA)

試料負荷量；(a) 1.2mg

(b) 6 mg

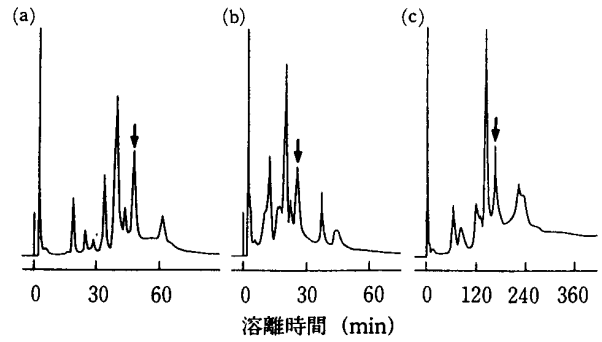


図-11 HICによるスケールアップ例(2)

—兔筋肉粗フォスフォグルコースイラーゼ—

溶離条件；試料及び(c)のグラジエント時間を除き図-10に

同じ

グラジエント時間；(c) 240min

試料；兔筋肉粗フォスフォグルコースイソメラーゼ

試料負荷量；(a)(b) 3 mg

(c) 15mg

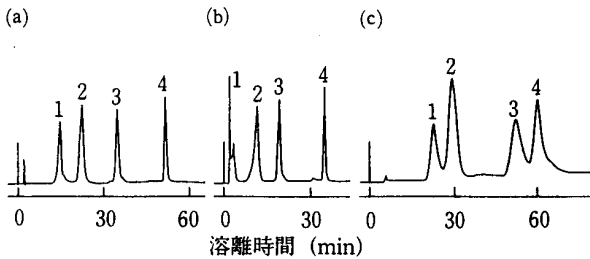


図-10 HICによるスケールアップ例(1)

—タンパク質混合物—

カラム；(a) TSKgel Phenyl-5PW 7.5mmID×7.5cm

(b) TSKgel Ether-5PW 7.5mmID×7.5cm

(c) TSKgel Butyl-Toyopearl 650M

16mmID×15cm

溶離液；A：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)+1.8硫酸

B：0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)

A→Bリニアグラジエント((a),(b),(c)、共60min)

流速；(a),(b) 1 ml/min (c) 4 ml/min

温度；25°C

検出；UV (280nm)

試料；1. ミオグロビン 2. リボヌクレアーゼA

3. リゾチーム 4. α-キモトリプシノーゲンA

試料負荷量；(a)(b) 500μg

(c) 2.5mg

4. おわりに

TSKgelを用いたスケールアップでは、分析用HPLCカラムから分取用HPLCカラムへのスケールアップはもちろん、MPLCカラム（トヨパール）へのスケールアップでも、条件を選べば、分析用カラムから直ちにスケールアップが行えることがわかりました。一般的にはMPLC用充填剤の粒子径は、HPLC用充填剤の粒子径よりはるかに大きいため、同じ分離条件では分取用HPLCカラムより分離能は劣ります。しかし、分析時間を長くしたり、カラム長さを長くすることによりほぼ同じ分離能を得ることも可能です。

一方、充填剤のコスト面からみれば、トヨパールは分取用HPLCカラムよりも安価であるため、分取したい物質の安定性や付価価値、分取システム全体としての経済性を考慮してスケールアップにHPLCを用いるかMPLCを用いるかを選択するのがよいと思われます。

参考文献

- 1) S. Yamamoto et al., Proc. of Autumn meeting of SCEJ, SD203 (1985)
- 2) S. Yamamoto et al., Proc. of Autumn meeting of SCEJ, SD204 (1985)
- 3) S. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno and T. Kamikubo : Biotechnol. Bioeng., 25, 1373 (1983)
- 4) S. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno and T. Kamikubo : Biotechnol. Bioeng., 25, 1465 (1983)
- 5) Y. Kato, K. Komiya, Y. Sawada, H. Sasaki and T. Hashimoto : J. Chromatogr., 190, 305 (1980)
- 6) Y. Kato, K. Komiya, H. Sasaki and T. Hashimoto : J. HRC & CC, 3, 145 (1980)
- 7) K. Nakamura and Y. Kato : J. Chromatogr., 333, 29 (1985)
- 8) Y. Kato, T. Kitamura and T. Hashimoto : J. Chromatogr., 333, 202 (1985)
- 9) Y. Kato, T. Kitamura and T. Hashimoto : J. Liquid Chromatogr., 9, 3209 (1986)