

TOYOPEARL の充填についての検討 (第1報)

自然落差充填法

北 村 隆 司
松 田 孝 夫
末 長 章 彦
堀 切 英 克

Studies on the Packing Method of TOYOPEARL (Part I)

Packing by the Gravity Method

Takashi KITAMURA
Takao MATSUDA
Akihiko SUENAGA
Hidekatsu HORIKIRI

A gravity packing technique has been studied for TOYOPEARL gel HW-55 type, a typical gel of TOYOPEARL series developed for high performance gel filtration chromatography. For the evaluation of column performance, the resolution of standard proteins such as bovine serum albumin and myoglobin was used.

Column performance was affected by several packing factors including hydrostatic head, solvent, gel slurry concentration, and temperature. For a series of columns with diameter 16-90 mm used in our experiments, the range of conditions suitable for packing was found to become narrower with a decrease in column diameter.

1. はじめに

TOYOPEARL (トヨパール) は、液体クロマトグラフィのゲル濾過法 (水系でのクロマトグラフィ) の分野において、従来最も多く使用されてきたデキストランゲルやアガロースゲルのような軟質ゲルとは、全く基材の異なる半硬質ゲルである。

ゲル濾過法において、ゲルの性能を最大限に活用できるか否かは、ゲルの充填状態に大きく影響される。一般にゲル粒子をできるだけ均一かつ細密に充填した方が、良い分離能が得られると言われている。TOYOPEARL では、ゲルの特徴である優れた機械的強度により、高圧ポンプ及び耐圧カラム等を用いることによって、加圧充填が可能であり高速下でのゲル濾過を行なうことができる。しかし、ここでは、これらの装置を使用しないで、これまでのゲル濾過法で行なわれている自然落差充填法

によって高性能の充填カラムを得るための、充填条件を HW-55 のゲルについて検討したのでその実験結果を報告する。本報告は、主として充填条件とカラム性能について述べる。

2. 実 験

〔1〕 装置

Fig. 1 に、本実験に用いた充填装置の模式図を示す。カラムの温度調節は、カラムジャケットと循環式恒温槽を接続して行なった。本文中の Head とあるのは図中の H で示した液高をいう。

〔2〕 カラムの作成

実験の目的によって充填条件を設定し、つぎの操作で充填カラムを作成した。

- 1) 充填に用いるゲルを5倍量の蒸留水、又は、イオン交換水 (50~60°C) で十分洗浄する。

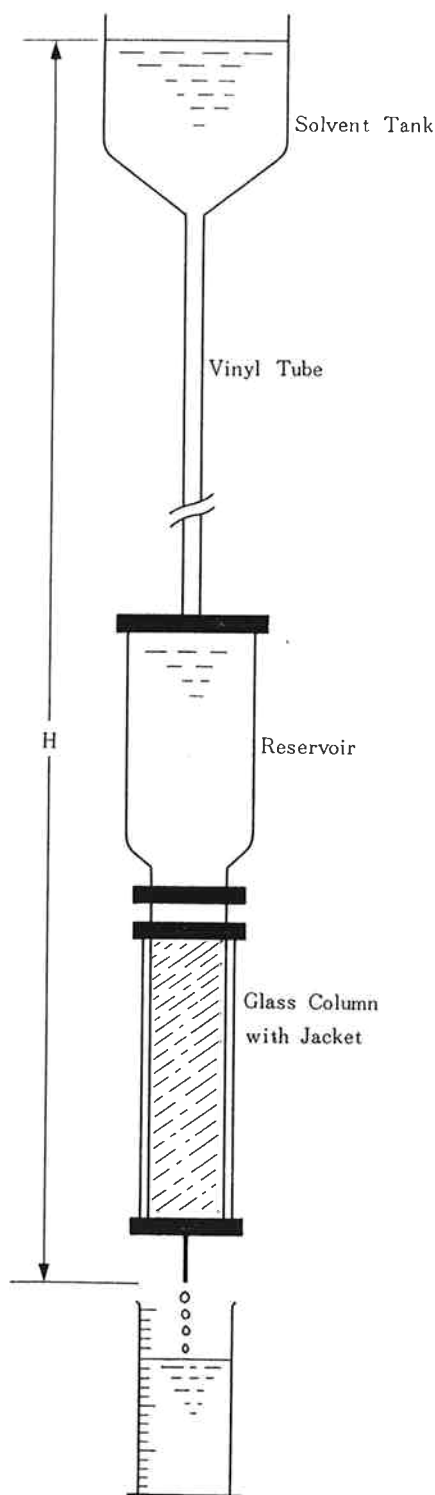


Fig. 1 Gravity packing method

- 2) 洗浄したゲルをメスシリンダーに移し、沈降さす。(16時間放置)
- 3) つぎに、充填するカラム容積の約1.2倍量の沈降ゲルを計量し、ゲル容積の3倍量の充填溶媒^{*1)}で

*1) 実験には、すべて1/15Mりん酸緩衝液+0.1M KCl (pH 6.9)を使用した。

洗浄し溶媒置換する。

- 4) 設定濃度のスラリー液を作り、超音波洗浄装置で脱気^{*2)}を行なう。(30分間)
- 5) Fig. 1のように、溶媒槽、カラム^{*3)}及びリザーバー^{*3)}をセットする。流出液出口は栓をしておく。
- 6) リザーバーのキャップをはずし、スラリー液をよく攪拌して、一度にリザーバー及びカラム内に注ぐ。
- 7) キャップを閉めて、溶媒槽に設定液高まで溶媒を加える。このときチューブ内の空気は完全に抜いておく。
- 8) 速やかに流出液出口の栓を開き充填を開始し、充填開始直後の流速を測定する。充填中、液面が5~6cm下がったら新しい溶媒を加えて液高を一定に保つ。
- 9) 充填終了直前の流速を測定し、終了と同時に流出

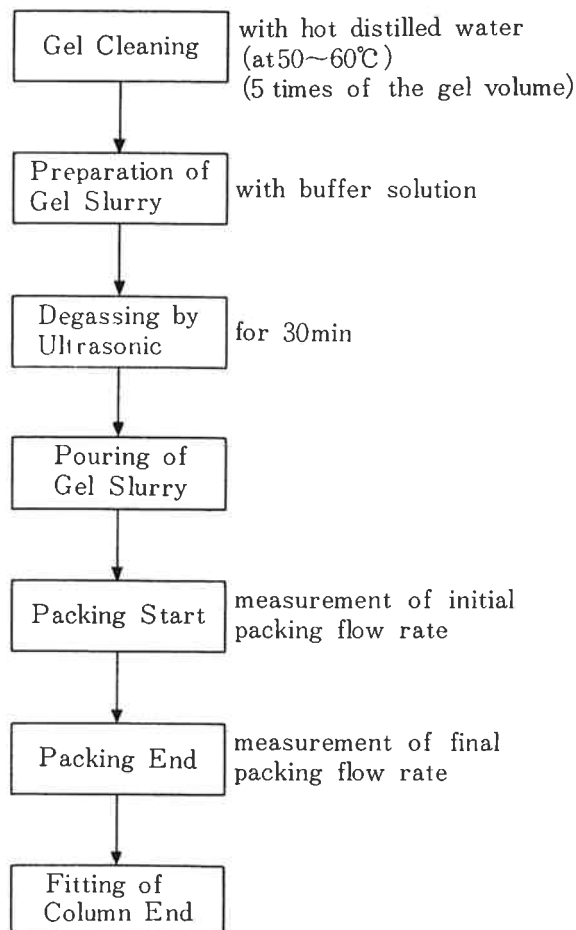


Fig. 2 Block diagram of packing procedure

*2) HW-55のゲルについては脱気操作を特に必要としないが、ここでは実験精度を良くするために行なった。

*3) Amicon社製

液出口の栓をする。

10) 溶媒槽及びリザーバー内の溶媒を抜き、過剰のゲルベッドをとり除いた後、エンドフィッティングをセットする。

これらの操作を Fig. 2 に示す。

[3] カラムの検定

標準試料を用いて溶出を行ないその溶出曲線から、相対溶出容量 (V_e/V_0)、分離能 (Resolution)、理論段数 (Theoretical Plate Number) を計算し、カラム性能を評価した。

相対溶出容量 (V_e/V_0)、分離能 (R_s) および、理論段数 (N) は、以下の式によって定義され¹⁾、Fig. 3 にその分離例を示す。

$$V_e/V_0 = 1 + Kd \cdot V_i/V_0$$

$$R_s = \frac{2(V_M - V_A)}{W_A + W_M}$$

$$N_A = 16 \left(\frac{V_A}{W_A} \right)^2, \quad N_M = 16 \left(\frac{V_M}{W_M} \right)^2$$

ここで

Kd ; ゲル相と溶媒相との分配係数

V_0 ; ゲル粒子間の溶媒の容積

V_i ; ゲル粒子内部の溶媒の容積

$V_e(V_A, V_M)$; 溶出容量

W ; ピーク幅

A ; B. S. A (M, W 6.7万)

M ; ミオグロビン (M, W 1.8万)

なお、測定については、つぎの条件で行なった。

溶離液 ; 1/15M リン酸緩衝液 + 0.1 MKCl (pH 6.9)

流速 ; 5~13.2 ml/hr·cm²

試料 ; ブルーデキストラン + 牛血清アルブミン (B. S. A) + ミオグロビン

濃度 ; ブルーデキストラン (0.1 g/ℓ), B. S. A (4 g/ℓ), ミオグロビン (1 g/ℓ)

注入量 ; 2 ml/ℓ-gel

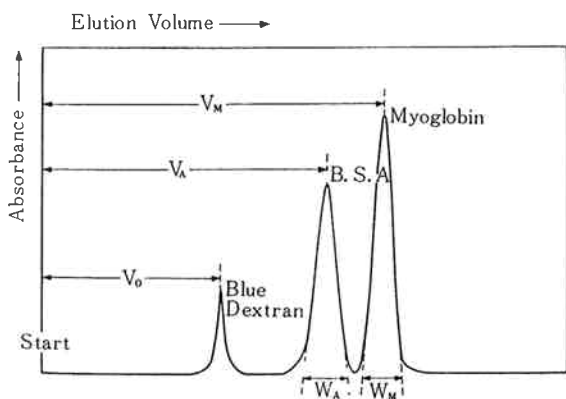


Fig. 3 Chromatogram of the standard sample

温度 ; 4~25°C

検出器*4) ; UV-254 nm

3. 結果と考察

[1] カラム性能に及ぼす諸因子

(1) スラリー濃度

HW-55F のゲルを用いて、カラム性能に与えるスラリー濃度の影響について検討した。充填は内径 2.2 cm、長さ 60 cm のガラスカラムを用いて、液高 210 cm、温度 25°C で行なった。結果を Fig. 4 に示す。この結果から、カラム性能がスラリー濃度に影響され高分離能のカラムを得るための最適スラリー濃度は 30~50% の範囲であることがわかった。

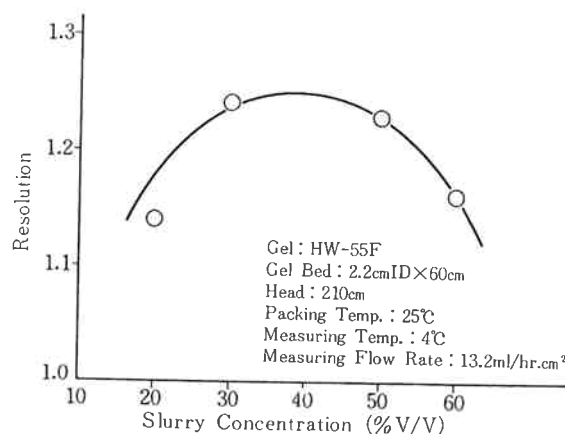


Fig. 4 Dependence of the resolution on slurry concentration

(2) 充填液高

充填に同じゲルを用いる場合、ゲルベッドが均一に形成されるならば、一定量のカラム内に充填されるゲル量が多いほど、すなわちゲル透過に寄与する Pore Volume が大きいほど、カラム性能は向上するはずである。ここでは、液高を 100~360 cm まで変化させて、充填されるゲル量と、それに対するカラム性能について検討した。充填は、内径 4.4 cm、長さ 60 cm のガラスカラムを用いて、スラリー濃度 30%、温度 20°C で行なった。Fig. 5~9 に結果を示す。Fig. 5, 6 では、分離能が液高に比例して大きくなっているのがよくわかる。又、Fig. 7 では液高と V_M/V_0 の関係、Fig. 8 では V_M/V_0 と分離能の関係が得られており、カラム性能が充填密度に依存しているのが明らかにされた。さらに、液高と充填流速の関係調べてみると、Fig. 9 で示されるように、充填流速もまた液高に依存していることから、カラム性能は充填流速に影響を受けると言えよう。

*4) 日本分光 UVIDEC-100 II 型

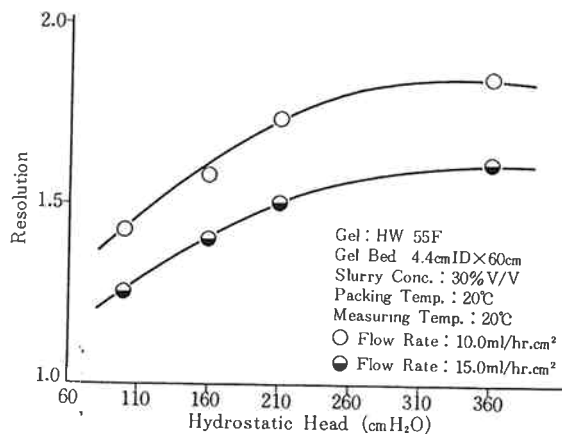


Fig. 5 Dependence of the resolution on hydrostatic head

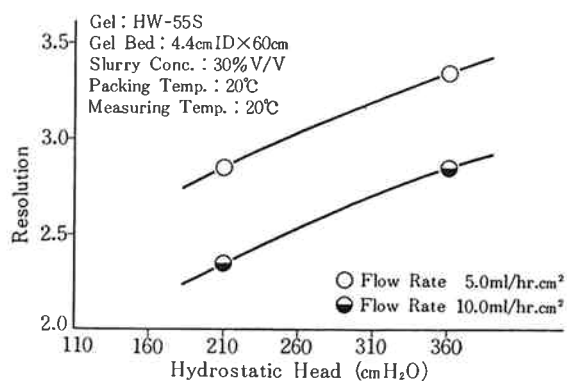


Fig. 6 Dependence of the resolution on hydrostatic head

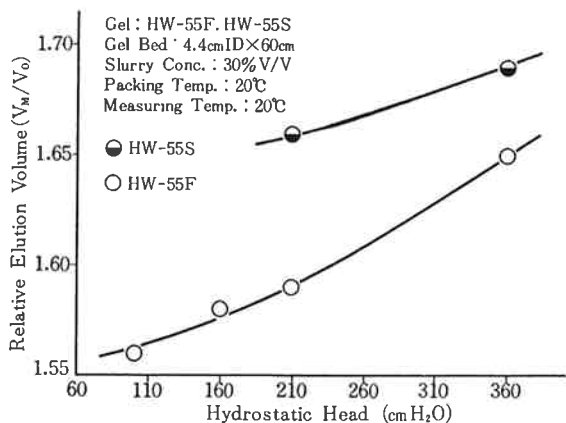


Fig. 7 Relation between the relative elution volume and hydrostatic head

したがって、自然落差充填では液高を高くする方が高性能のカラムが得られるが、通常の実験室ではスペース的な制約を受けるので実用的な液高設定は、150~250 cm の範囲と思われる。

(3) 温度

1) 充填温度

3-[1]-(2) で得られたカラム性能と流速の関係のもと

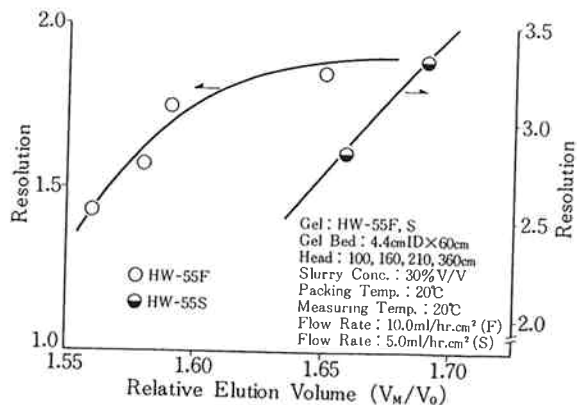


Fig. 8 Relation between the resolution and the relative elution volume

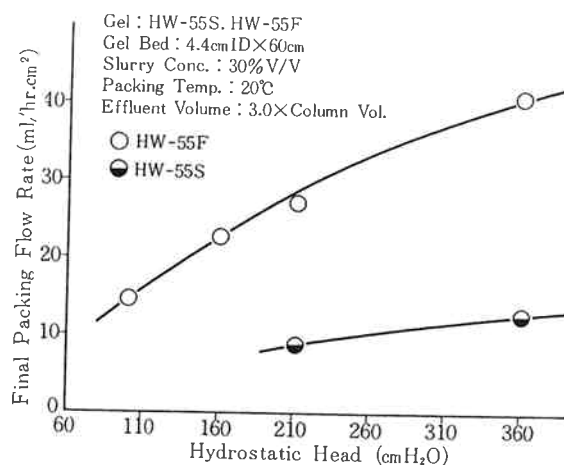


Fig. 9 Relation between final packing flow rate and hydrostatic head

づいて、温度と流速について検討した。充填は、内径 2.2 cm、長さ 60 cm のガラスカラムを用いて、液高を 210 cm で行なった。Table 1 に温度 4°C、25°C で充填したカラムについて、25°C での測定結果を示す。

この結果から明らかなように、高い温度の充填では、充填流速が速くなりカラム性能の向上が見られる。このことは、溶媒の粘度が温度によって変化し充填流速に影響を与えていると考えられる。したがって、液高が一定であれば充填温度を高くする方が高性能のカラムを得られることがわかった。

2) 測定温度

次に、測定温度の影響についても検討した。Table 2 に温度 25°C で充填したカラムの 4°C、25°C における測定結果を示すが測定温度によってカラム性能が異なっている。この原因は、溶媒の粘度変化が、ゲル透過での分離を支配する拡散速度に影響を与えることによって起こるものと推測できる。

生化学物質を取り扱う場合、測定温度に制約を受けるが可能な範囲では高い温度で分離を行なう方が良い結果

Table 1 Effect of packing temperature on column performance

Packing Temp. (°C)	Packing Flow Rate (mℓ/hr. cm ²)		V _A /V ₀	V _M /V ₀	Resolution	N(TP/F)	
	Initial	Final				B. S. A	Myoglobin
25.0	85.0	27.9	1.41	1.58	1.60	1,140	1,980
4.0	64.5	19.0	1.38	1.54	1.24	780	1,370

Gel: HW-55F
 Gel Bed: 2.2 cmID × 60 cm
 Head: 210 cm
 Slurry Conc.: 30%V/V
 Measuring Temp.: 25°C
 Measuring Flow Rate: 13.2 mℓ/hr. cm²

Table 2 Effect of measuring temperature on column performance

Measuring Temp. (°C)	V _A /V ₀	V _M /V ₀	Resolution	N (TP/F)	
				B. S. A	Myoglobin
25.0	1.41	1.58	1.60	1,140	1,980
4.0	1.43	1.62	1.24	590	1,140

Gel: HW-55F
 Gel Bed: 2.2 cmID × 60 cm
 Head: 210 cm
 Slurry Conc.: 30%V/V
 Packing Temp.: 25°C
 Measuring Flow Rate: 13.2 mℓ/hr. cm²

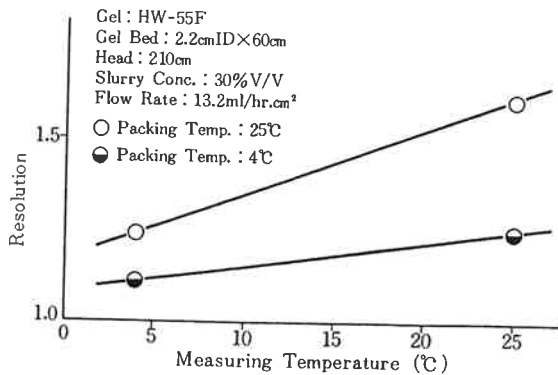


Fig. 10 Dependence of the resolution on measuring and packing temperature

が得られる。Fig. 10 に分離能と充填及び測定温度の関係を示す。

(4) カラムサイズ

一般に、カラム径が小さくなると壁効果 (Wall effect) によってカラム性能が低下すると言われている²⁾。この効果は、ゲル粒子と壁面の摩擦によってゲルが均一に充填されないために起こるものでカラム径が小さくなるにつれてその程度が大きくなる。ここでは、内径が1.6 cm, 2.2 cm, 4.4 cm, カラム長さ 60 cm, 及び 90 cm のガラス

カラムを用いて充填を行ない、カラムサイズとカラム性能について検討した。結果を Fig. 11-(1), (2) に示す。充填は、液高 210 cm, 240 cm, 温度 25°C で行なったがこの条件では、内径 1.6 cm から僅かに壁効果が現われていることがわかる。又、カラム長さについては、内径 2.2 cm, 4.4 cm のカラムでは、分離能がカラム長さ比のほぼ1/2乗に比例しているが、内径 1.6 cm の場合は逆転している。すなわち、カラムが長くなることにより壁の影響を強く受けて、この条件では最適充填が得られていない。最適条件については後で述べる簡易充填法で検討した。Fig. 12 にはカラム内径と充填流速の関係、Fig. 13 にはカラム内径と V_e/V_0 の関係を示す。

(5) 充填通液量

充填液高を一定にして行なう自然落差充填では、ゲルベッドの形成につれて、充填流速が減少していく。そこで安定したゲルベッドを得るための通液量について検討した。充填は、内径 2.2 cm のガラスカラムを用いて液高 210 cm, 温度 25°C で行なった。結果を Fig. 14 に示す。この結果から、充填流速がほぼ一定になるのは、通液比 (通液量/カラム容量) が3.0付近からであることがわかる。したがって安定したゲルベッドの作成には、

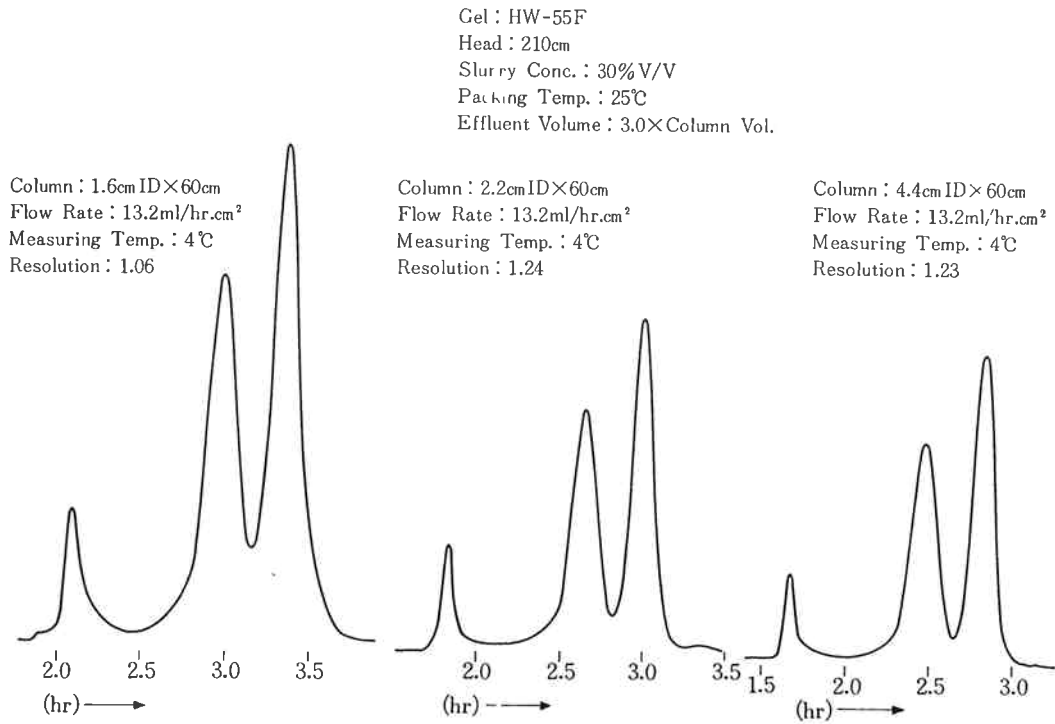


Fig. 11 (1) Examples of chromatograms of different column sizes

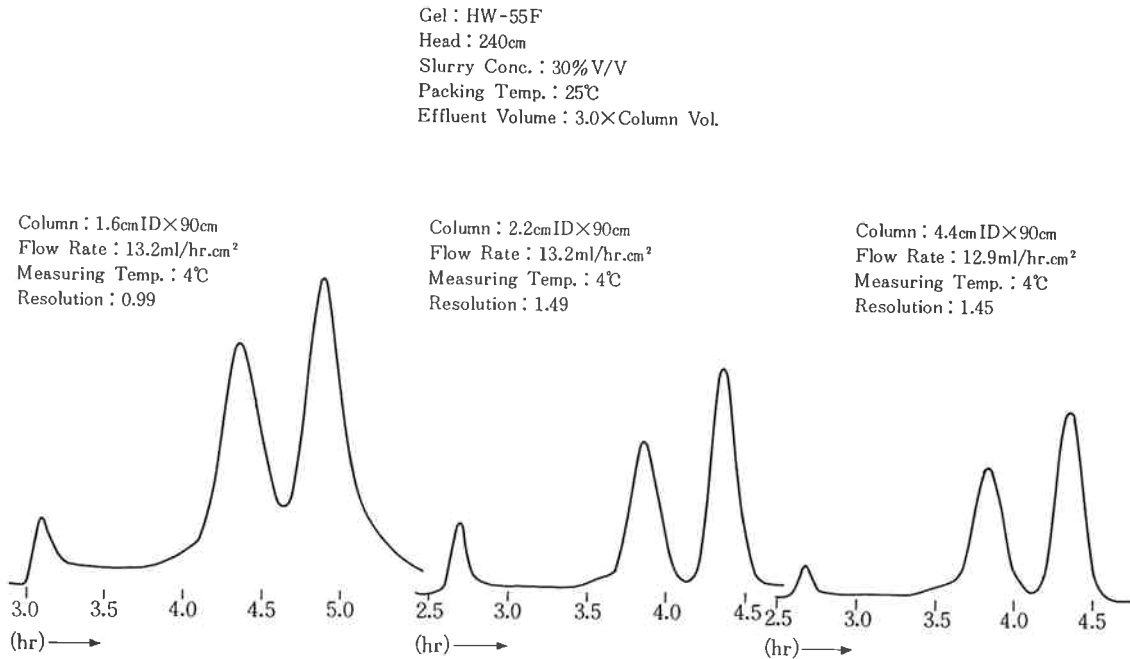


Fig. 11 (2) Examples of chromatograms of different column sizes

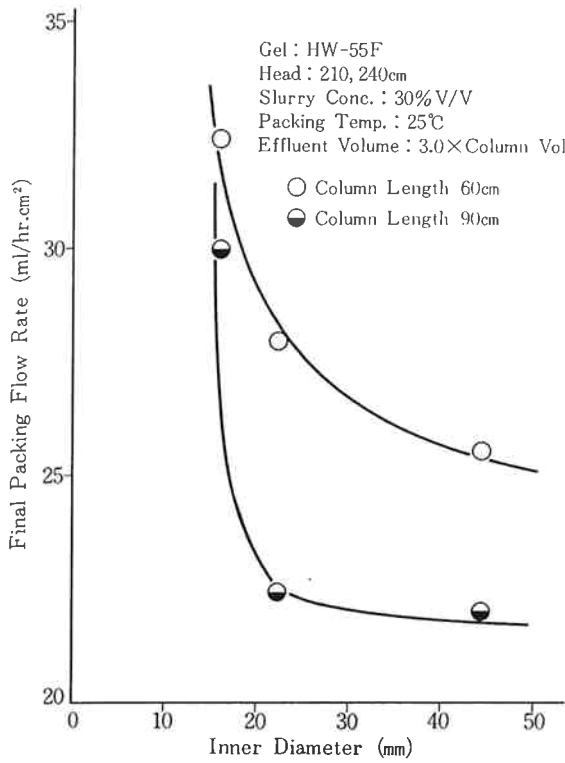


Fig. 12 Dependence of flow rate on inner diameter of column

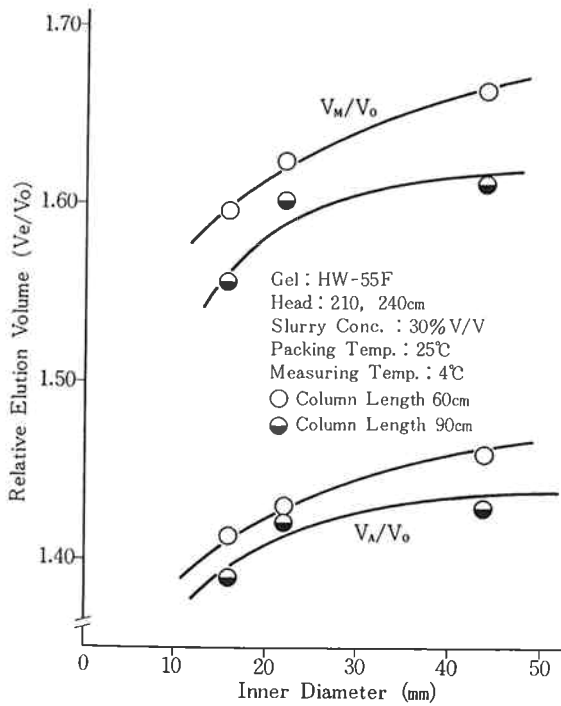


Fig. 13 Relation between relative elution volume and inner diameter of column

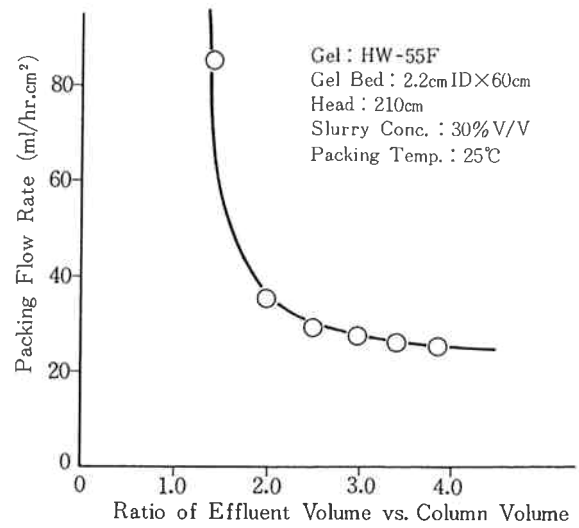


Fig. 14 Relation between packing flow rate and ratio of effluent volume vs. column volume

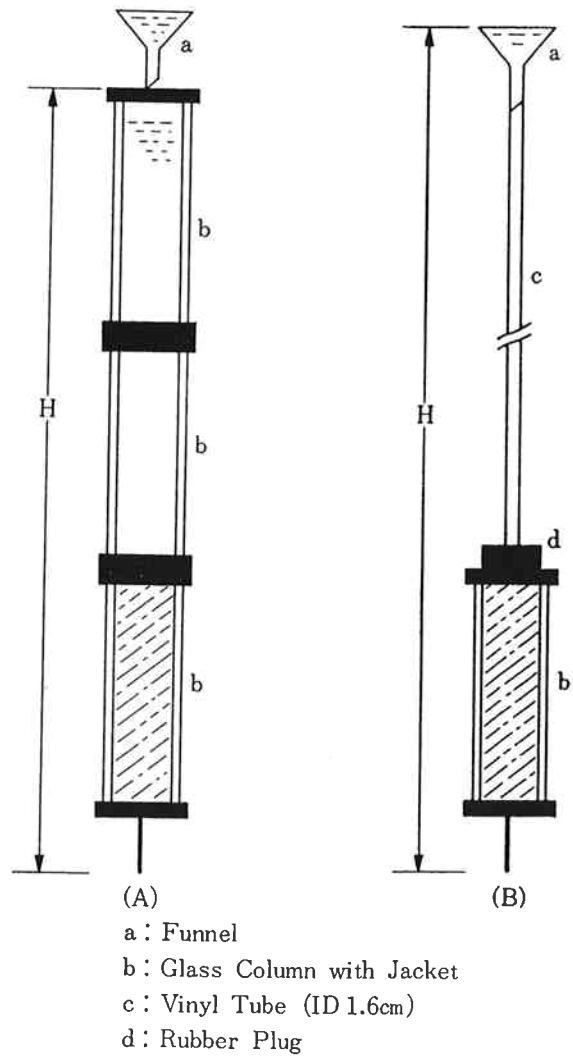


Fig. 15 Gravity packing method without reservoirs

Table 3 Performances of columns packed by gravity packing method without reservoirs

Exp.	Equip-ment of Packing	Head (cm)	Slurry & Solvent Temp. (°C)	Initial Column Condition	Packing Flow Rate (ml/hr. cm ²)		V _A /V ₀	V _M /V ₀	Resolution	Theoretical Plate Number (TP/F)	
					Initial	Final				B. S. A	Myoglobin
					0	A					
1	A	100	60	Slurry	60.5	19.0	1.41	1.59	1.06	490	830
2	B	160	60	Slurry	77.6	27.4	1.42	1.60	1.24	610	1,140
3	B	160	60	Solvent	124.5	23.2	1.44	1.64	1.28	590	1,000
4	B	160	25	Solvent	122.3	23.2	1.40	1.58	1.13	540	970
5	B	110	60	Solvent	100.0	14.5	1.41	1.59	1.18	590	1,070
10	*A	240	25	Slurry	87.0	29.9	1.39	1.55	0.99	340	560
11	*B	240	60	Solvent	213	28.9	1.40	1.57	1.22	450	780

Packing Condition

Gel Bed: 2.2 cmID×60 cm

Slurry Conc.: 30%V/V

Temp.: 25°C

Solvent: 1/15MP. B. S.+0.1 MKCl

Effluent Volume: 3.0×Column Vol.

*Gel Bed: 1.6 cmID×90 cm

Measuring Condition.

Flow Rate: 13.2 ml/hr. cm²

Temp.: 4°C

少なくともカラム容量の3倍量以上の通液量でゲルベッドを平衡化することが望ましい。

〔2〕簡易充填法の検討

3-[1]で述べたカラム性能と充填条件については、Fig. 1の装置で得られた実験結果である。通常、充填にはリザーバーが用いられるが、ここでは、リザーバーを使用せず簡易充填装置によって高性能のカラムを得るための充填方法について検討した。Fig. 15に実験に用いた充填装置の模式図を示す。

Fig. 15-(A)の装置を用いた場合、Fig. 2に示す充填操作と同様であるが、(B)の装置を用いる場合は、スラリーをカラム内に張り込む前に予じめカラム内に充填溶媒を張り込んでおく。又、(A)、(B)の装置においては、3-[1]-(3)で得られた知見にもとづいて、スラリーと溶媒の温度を60°Cに加温して、液高を110~240 cmまで変化させて充填を行なった。

Table 3に実験結果を示す。表中のExp. 0はリザーバーの代わりにカラムを用いた通常の充填法であり、リザーバーを用いた場合と同等のカラム性能が得られている。Exp. 2, 3の充填では、液高を160 cm、スラリー及び溶媒の温度を60°C、さらにExp. 3ではカラム内に溶媒を張り込むことにより、Exp. 0と同等のカラム性能が得られることがわかった。又、自然落差充填法では、操作上、液高をできるだけ低くする方がより簡易な方法である。Exp. 5では液高を110 cmまで下げて、Exp. 3の条件で充填を行なったところ、かなり良い結果が得られた。

次に、Exp. 11では、3-[1]-(4)の検討において、内径1.6 cmのカラムでは壁効果によるカラム性能の低下が見られたので、Exp. 3の条件で充填を行なったところ、最適充填に近い結果が得られた。以上のことから、次のことが言える。1) 充填には、特に、既製のリザーバーを用いる必要はない。(但し、この(B)の方法では、充填ゲル量をカラム容量の1.1倍量にする。)

2) スラリー及び溶媒の温度を60°C、さらに、(B)の方法ではカラム内に溶媒を張り込むことによって、液高を110 cmまで下げることが可能であり、内径の小さいカラムでの性能を向上させる。このことはカラム性能に与える充填流速の影響を裏づけており、3-[1]-(3)の結果と良く一致している。

なお、一連の検討を実施しているなかで、1) スラリー調整における前処理の影響、2) 充填溶媒の影響、3) リザーバー形状の影響、4) カラムサイズ9.0 cm ID×100 cmのカラム性能、についても明らかにされたが本報告では省略した。

4. ま と め

以上述べてきたように、カラム性能は、液高、温度、スラリー濃度、カラムサイズなどの充填因子によって支配され、高性能のカラムを得るための最適条件範囲は以下のようにまとめられる。1) 液高150~250 cm、2) 温度20~60°C、3) スラリー濃度30~50%、そしてこの条件はカラム径が小さく、かつ長くなるにしたがって最適範囲が狭くなり、きびしくなる傾向にある。又、自然落

差充填法では、液高、すなわち圧力を一定にして充填を行なうため、特に、充填流速に与える温度の影響がかなり大きいことも、特徴の一つと言えよう。

なお、本実験には、TOYOPEARL の代表的グレードである HW-55 を用いて検討を実施したが、TOYOPEARL が自然落差充填法に十分適用できるゲルであることが判明した。さらに、これらの検討において得られた TOYOPEARL の基本的性質及び充填についての基

礎的な知見は、他グレードの充填条件の検討において指標となるであろう。

文 献

- 1) 武内次夫, 森 定雄; 「ゲルクロマトグラフィー基礎編」, 講談社, 26, 56, 57 (1976).
- 2) 志村憲助, 江尻慎一郎, 吉田充輝, 石原弘章; 「生物化学実験法11ゲル濾過法」, 54 (1978).