

TOYOPEARL の充填についての検討 (第2報)

ペリスタルティックポンプ充填法

北	村	隆	司
杉	尾	徳	雄
嶋	村	繁	晴
山	本	博	明
松	田	孝	夫
堀	切	英	克

Studies on the Packing Method of TOYOPEARL (Part II)

Packing by Using a Peristaltic Pump

Takashi KITAMURA
Norio SUGIO
Shigeharu SHIMAMURA
Hiroaki YAMAMOTO
Takao MATSUDA
Hidekatsu HORIKIRI

A packing technique for TOYOPEARL gel having a high mechanical strength has been studied using a peristaltic pump. The columns packed by this method gave nearly the same performance as those obtained by the gravity method, but the former columns exhibited better gel bed stability at high speed elution than the latter.

1. はじめに

TOYOPEARL の特徴については、すでに第1報で述べた。従来の軟質ゲルを用いたゲル透過法（水系でのクロマトグラフィ）が、きわめて原始的な手法で行なわれているのに対して、この画期的なゲルは、あらゆる面でゲル透過法の高速度化を可能にした。しかしながら、高速度化を十分満足させるためには、高圧ポンプ、耐圧カラム等の装置が必要となり、この新しい手法をゲル透過に浸透させていく上において1つの障害となっている。

ここでは、従来のゲル透過手法に比較的受け入れられ易い、ペリスタルティックポンプ充填法によって、TOYOPEARL の特徴を生かす高性能カラム及びカラム操

作における作業性を向上させるための充填条件について HW-55 のゲルを用いて検討したので報告する。

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。

[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) スラリー液の調整は、自然落差充填法の場合と同じ操作で行なった。第1報2-[2]-(1)~(4)参照。

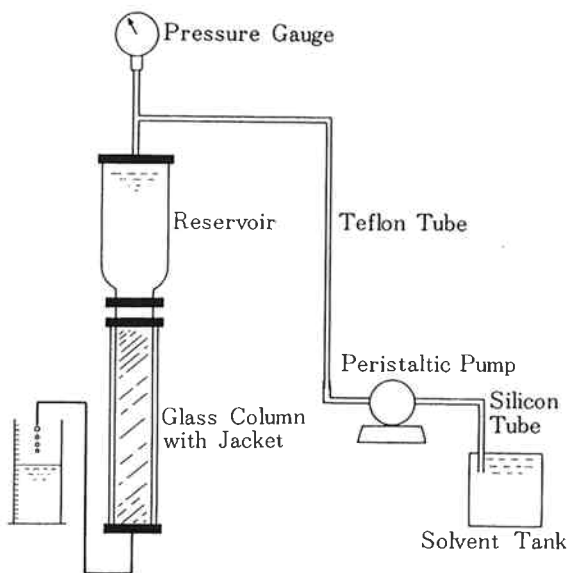


Fig. 1 Packing method by peristaltic pump

- 2) Fig. 1 のように、溶媒槽、ペリスタルティックポンプ*1)、カラム*2)及びリザーバー*2)をセットする。流出液出口はカラム長さの1/2以上の高さにして、出口は栓をしておく。
- 3) 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。
- 4) 空気が入っていないことを確かめて、キャップを閉めて、予じめ設定された流量でポンプをスタートし、速やかに出口の栓を開き充填を開始する。充填開始直後の流速を測定する。
- 5) 充填終了直前の流速及び圧力を測定し、終了と同時にポンプをストップし、流出液出口の栓をする。
- 6) 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。

[3] カラムの検定

第1報2-[3] 参照

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

すでに自然落差充填法の検討で、カラム性能とスラリー濃度の関係が得られているが、一定流速で行なうペリスタルティックポンプ充填法についても、スラリー濃度の影響を調べてみた。充填は、内径 2.2 cm、長さ 60 cm のガラスカラムを用いて、充填流速 70~110 ml/hr.cm²、温度 15°C で行なった。結果を Fig. 2 に示す。最適ス

*1) ATTO 社製 PERISTA MINI PUMP

*2) Amicon 社製

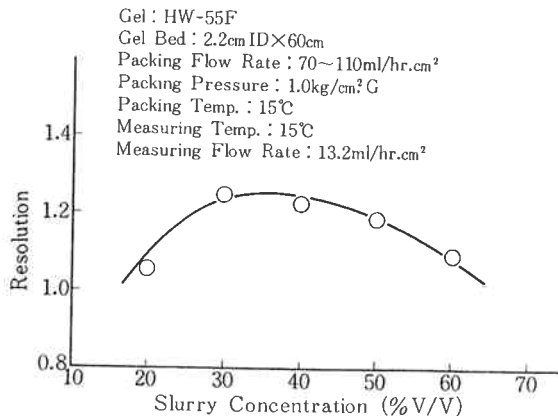


Fig. 2 Dependence of the resolution on slurry concentration

ラリー濃度は、自然落差充填法での実験結果と同様に30~50%の範囲であった。この結果から、HW-55F のゲルについては、スラリー濃度の最適範囲が充填方法によって変わらないことがわかった。

(2) 充填流速

自然落差充填法では、充填流速が液高に依存するため、実用的な液高での充填流速は、25~30 ml/hr.cm² 程度であった。しかし、ペリスタルティックポンプを用いる場合、ポンプ容量によって差はあるが少なくとも自然落差充填法の3~5倍程度の充填流速が得られる。したがって充填流速を速くすることにより、充填時間の短縮、高速下での分離を可能にし、TOYOPEARL の特徴を生かすことができる。ここでは、これらの操作上の利点を生かすための充填流速とカラム性能の関係について検討した。充填は、内径 2.2 cm、長さ 60 cm のガラスカラムを用いて、温度 15°C で行ない流速を30~110 ml/hr.cm² まで変化させた。結果を Fig. 3 に示す。この結果から標準的なカラムサイズ (2.2 cm ID×60 cm) を用

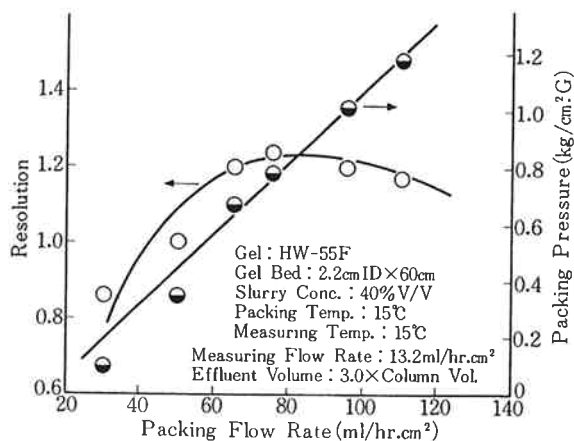


Fig. 3 Dependence of the resolution on packing flow rate

いる場合、高性能のカラムを得るための充填流速は70~110 ml/hr.cm² の範囲であることがわかった。

(3) 充填圧力

充填密度がカラム性能の支配因子の一つであることは、自然落差充填法での実験結果から明らかにされている。しかし、3-(2) の結果では、充填流速の増加にしたがって充填圧力の上昇は見られるが、分離能については、0.85 kg/cm² からは向上していない。ここでは、さらに充填圧力と充填密度、それに対するカラム性能について検討した。充填は、内径 2.2 cm, 長さ 60 cm のガラスカラムを用いて、充填流速 70~110 ml/hr.cm², 温度 25°C で行なった。結果を Fig. 4, 5, 6 に示す。

Fig. 4 の結果では充填圧力が 0.85 kg/cm² までは、充填圧力に比例して分離能は向上しているが、0.85~1.3 kg/cm² の範囲では、ほぼ一定の値を示しているのがわかる。又、Fig. 5 の結果では V_M/V_0 が圧力に比例して大きくなっているにもかかわらず、Fig. 6 の結果では、

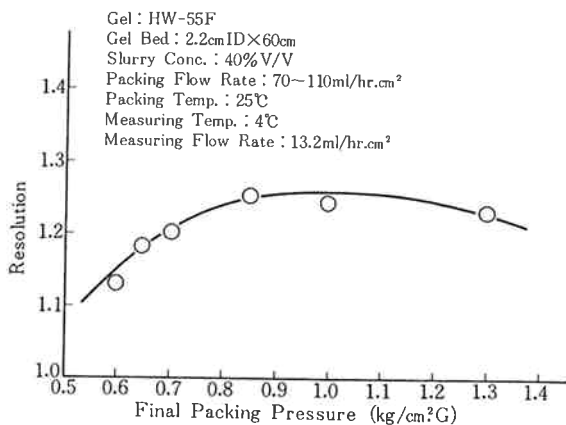


Fig. 4 Dependence of the resolution on final packing pressure

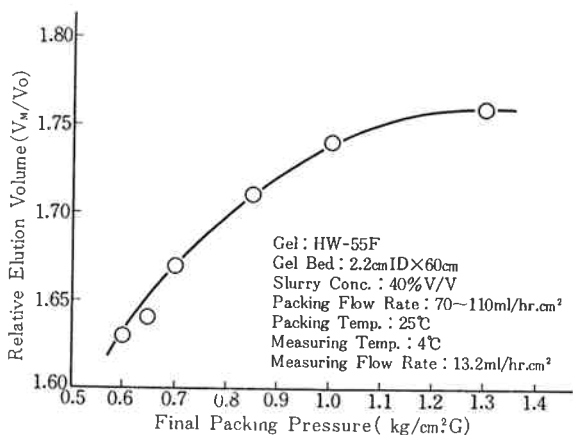


Fig. 5 Relation between the relative elution volume and final packing pressure

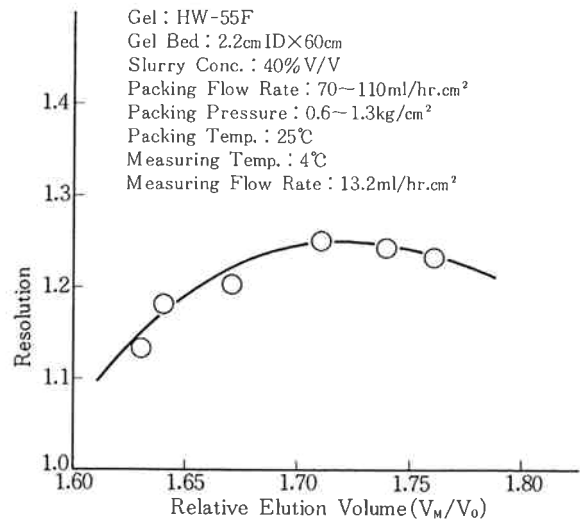


Fig. 6 Relation between the resolution and the relative elution volume

V_M/V_0 の値が1.7以上では分離能の向上は認められなかった。すなわち、 V_M/V_0 が1.70を示す充填密度以上では、Pore Volume は増加せずゲル自身の性能限界値を示唆していると言えよう。

(4) 充填及び測定温度

カラム性能に与える温度の影響が溶媒の粘性に起因していることは、自然落差充填法の実験結果の中で考察した。

充填挙動の異なるペリスタルティックポンプ充填法についても温度の影響を調べてみた。充填は、内径 2.2 cm, 長さ 60 cm のガラスカラムを用い、スラリー濃度40%、充填流速 70 ml/hr.cm² で行なった。結果をTable 1, 2 Fig. 7 に示す。充填温度、測定温度ともに高い方が良い結果を示しており、カラム性能が温度の影響を受けることがわかった。この、一定流速で行なうペリスタルティックポンプ充填法では、充填温度4°C のカラム性能が、自然落差充填法よりも高い値を示し、充填温度 25°C と

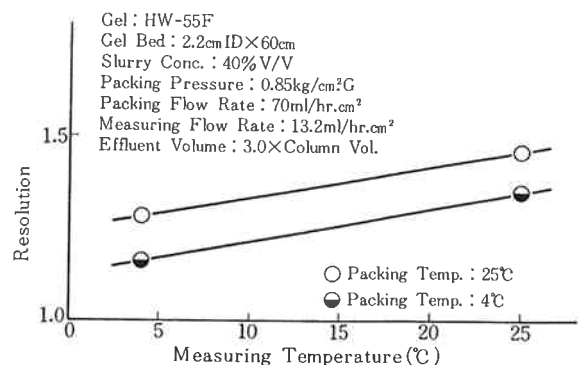


Fig. 7 Dependence of the resolution on measuring and packing temperature

Table 1 Effect of packing temperature on column performance

Packing Condition		V_A/V_0	V_M/V_0	Resolution	Theoretical Plate Number (TP/F)	
Temp. (°C)	Flow Rate (ml/hr.cm ²)				B. S. A	Myoglobin
25.0	70.0	1.47	1.67	1.46	840	1,270
4.0	65.0	1.42	1.60	1.34	880	1,300

Gel: HW-55F

Gel Bed: 2.2 cmID×60 cm

Slurry Conc.: 40% V/V

Final Packing Pressure: 0.85 kg/cm².G

Effluent Volume: 3.0×Column Vol.

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	Theoretical Plate Number (TP/F)	
				B. S. A	Myoglobin
25.0	1.47	1.67	1.46	840	1,270
4.0	1.48	1.70	1.28	510	890

Gel: HW-55F

Gel Bed: 2.2 cmID×60 cm

Slurry Conc.: 40% V/V

Final Packing Pressure: 0.85 kg/cm².G

Effluent Volume: 3.0×Column Vol.

Packing Temp.: 25 °C

Measuring Flow Rate: 13.2 ml/hr.cm²

4°C のカラム性能の差が、自然落差充填法よりも小さいことから、充填温度の影響は少ないと言えよう。測定温度の影響については、自然落差充填法の場合とほぼ同様な結果であった。このことは、自然落差充填法での温度の影響についての考察をよく裏づけている。

(5) カラムサイズ

ここでは、充填流速を変化させて各カラムサイズについての最適充填を行ないそのカラム性能を比較することによって、カラムサイズ依存性を調べた。充填には、内径 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、流速を 35~185 ml/hr.cm² まで変化させて充填を行なった。実験結果を分離能と最終充填圧力で整理すると、Fig. 8 (1), (2) の相関が得られた。この結果から明らかのように、内径 2.2 cm, 4.4 cm のカラムでは最終充填圧力が 0.85 kg/cm² 以上から分離能が一定しているのに対して、内径 1.6 cm のカラムでは 1.35 kg/cm² から分離能が一定しており、カラム性能についても若干低下が見られる。このことから、

ペリスタルティックポンプ充填法においても、内径 1.6 cm のカラムでは壁効果の影響を受けることがわかった。又、カラム長さと分離能の関係についても、内径 1.6 cm, 2.2 cm, 4.4 cm と長さ比のほぼ 1/2 乗に比例しており、

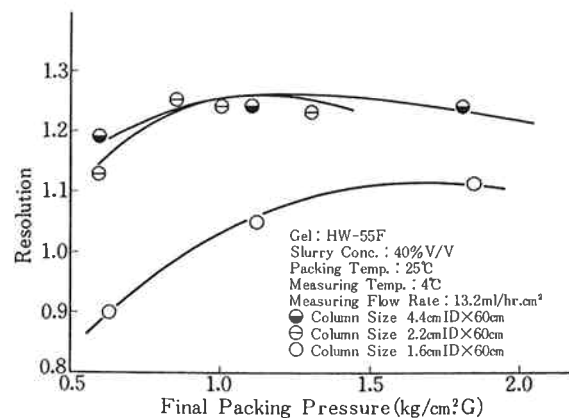


Fig.8(1) Dependence of the resolution on packing pressure for different column sizes

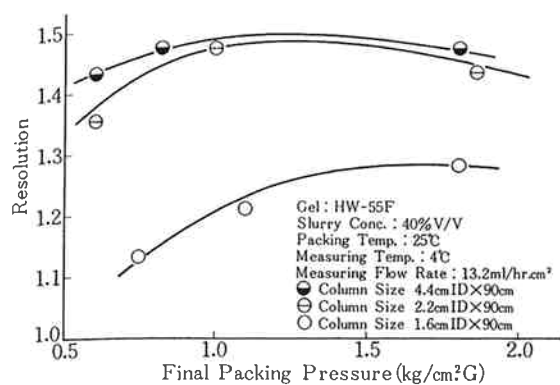


Fig. 8(2) Dependence of the resolution on packing pressure for different column sizes

自然落差充填法と同様な結果であった。

4. ま と め

以上のように、ペリスタルティックポンプ充填法においても、カラム性能に影響を与える充填因子としては、

1) スラリー濃度, 2) 温度, 3) カラムサイズ, 4) 充填流速 (圧力), などがあり 1), 2), 3), の影響については, 自然落差充填法とほぼ同じでありそのカラム性能も同等であることがわかった。

しかし, 自然落差充填法では, 流速を支配する充填液高が実用面で制約を受けるためその流速において TOYOPEARL の特徴を生かしているとは言い難い。一方ペリスタルティックポンプ充填法では, 流速を任意に選択することができ, 例えば標準的なカラムサイズ (2.2 cmID×60 cm) においては, 最適充填流速が 70~110 ml/hr.cm² となり, 充填操作において作業性の向上に寄与している。

したがって, ペリスタルティックポンプを用いることは, TOYOPEARL の特徴をより生かした充填法の一つと言えるであろう。

最後に, 本実験を進めるにあたり御協力いただいた HLC 開発室, 浅田陸夫, 中原康博, 西本一雄の各氏に感謝いたします。