

液体クロマトグラフィー用カラムのスケールアップ

(その1)

西 本 一 雄
 中 原 康 博
 松 原 健 一
 坂 本 澄 昭

Scaling-up of Liquid Chromatography Columns. Part I.

Kazuo NISHIMOTO
 Yasuhiro NAKAHARA
 Ken-ichi MATSUBARA
 Kiyoaki SAKAMOTO

Simple and convenient methods for predicting optimum conditions of gel filtration chromatography (GFC) and ion-exchange chromatography (IEC) from the experimental results obtained with small columns are presented and their validity is confirmed experimentally. On the basis of these methods, the following two applications have been successfully carried out:

- i) Separation of two standard proteins on a GFC column.
- ii) Separation of β -galactosidase on a large scale on a IEC column.

1. はじめに

近年、バイオテクノロジーなどを中心とした分野で物質を高純度に分離・精製する技術を生産規模に拡大する動向が高まっており、その技術の中心である液体クロマトグラフィーがとりわけ注目されその利用が活発になっている。

液体クロマトグラフィーの分取精製システムの基本は送液ポンプ、分取カラム、検出器、フラクションコレクターなどで構成され、分離したい試料をカラムに注入、溶離液を展開し、カラム内の充填剤の各種分離性能を利用して、有用物、不用物に分離することである。このシステムの中で分取カラムの役割は生産性、純度、分離性能を支配する重要な因子として位置づけられる。

カラムの機能は石油精製プラントに於ける蒸留塔に似ており、蒸留塔が取扱い物質の物性や充填材の特性により化学工学的に容易にスケールアップできるのに対して、液体クロマトグラフィーの場合、その取扱いについ

て充分には確立されておらず、少なからず経験や感に頼っているのが実情である。

しかしながら、産業界の要望はカラムを一気に巨大化する或いは巨大化しなければならない傾向にあり、メーカー、ユーザーともども、そのスケールアップ技術の確立が囑望されているのである。

カラムの大口径化には分離性能を目標に合致させるソフトウェア上の問題と均一液流に関する構造上の問題の二つがある。本報では液体クロマトグラフィーの理論的取り扱いについて述べ、その解析法および工業規模にスケールアップするための工学的検討、当社カラムデザインの背景などについて報告する。

2. 分離性能に及ぼすカラム因子¹⁾

カラムの効率を表わすパラメータとして、理論段数の一段当たりのカラム高さ「HETP」が用いられ、理論段相当高さと呼ばれる。GIDDINGS と MALLIK²⁾ はゲルクロマトグラフィーにおける溶質帯の広幅化について

速度論により次式を理論式として導いた。

$$HETP = \frac{4}{3} \cdot \frac{D_m}{Ru} + \frac{1}{20} \cdot R \cdot (1-R) \frac{d_p^2 u}{D_m} + \frac{1}{\sum_i \left(\frac{1}{2\lambda_i \cdot d_p} + \frac{D_m}{\omega_i \cdot d_p^2 \cdot u} \right)} \quad (1)$$

ここで、

D_m : 移動相中の溶質の拡散係数

u : 移動相の線速度

R : 溶質と移動相の移動速度の比

d_p : 第2項では固定相の厚さ, 第3項では充填剤の直径

λ_i, ω_i : カラムの内径, 充填剤粒子の直径と形状, 充填状態などによる幾何学的パラメーター

である。

第1項はカラムの縦軸方向の分子拡散に基づく広がりをおよぼすが, 通常 $v \gg D_m$ であるから無視しても差しつかえない。

第2項は固定相における非平衡物質移動の効果を表わしており, 固定相の厚さ或いは粒子径に依存する。

第3項は充填剤粒子間の移動相における非平衡物質移動効果と渦巻拡散によるピークの広がりを表わしている。渦巻拡散因子 ($2\lambda_i d_p$) は充填剤の形状と粒子径及び充填状態に依存する。十分に均一に充填されたカラムでは $u \rightarrow 0$ で $H = 2d_p$ に漸近する。これらのことから「HETP」は d_p, u の相関となる。

3. ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC) の理論

(1) GFC のスケールアップ因子^{3),4)}

分離性能を表わすものとして、「HETP」のほかにピークのシャープ性を示す理論段数 $[N_p]$ と二つのピークの間隔の度合を表わす $[R_s]$ とがあり, Fig. 1 においてそれぞれ次式で表わされる。

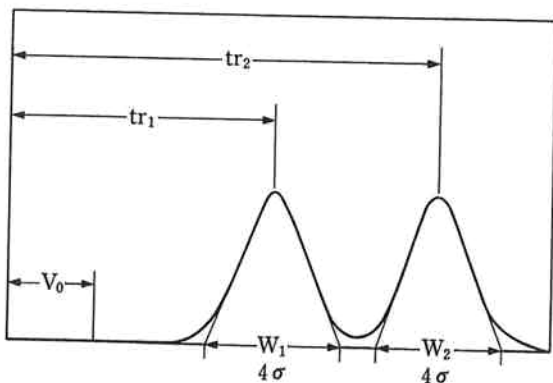


Fig. 1 Typical elution curve in isocratic elution.

$$N_p = 16 \left(\frac{tr}{W} \right)^2 \quad (2)$$

$$R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{(W_1 + W_2)} \quad (3)$$

ただし W はピークのベースライン上での幅である。各ピークがガウス曲線で近似される場合, 次式となる。

$$tr = \tau(1 + HK) \quad (4)$$

$$\left(\tau = \frac{V_0}{v}, H = \frac{V_i - V_0}{V_0} \right)$$

ここで、

v : 流量 V_0 : 空隙容積 V_i : カラム容積

K : 分配係数

である。

更に「 R_s 」について展開すると(3)(4)式より(5)式を得る。

$$R_s = \frac{2\tau(K_2 - K_1)}{(W_1 + W_2)} \quad (5)$$

$W = 4\sigma$, $\sigma_\theta = \frac{\sigma}{\tau}$ (時間で無次元化) であり, $\sigma_{\theta 1} = \sigma_{\theta 2}$ と仮定すると

$$R_s = \frac{H(K_2 - K_1)}{4\sigma_\theta} \quad (6)$$

$$HETP = \frac{z}{N_p} = \frac{z \cdot \sigma_\theta^2}{(1 + HK)^2} \quad (7)$$

ここで

z : カラム長

である。

(6)(7)式より(8)式を得る。

$$R_s = \frac{H(K_2 - K_1)}{4 \left[\frac{(1 + HK_1)^2 \cdot HETP}{z} \right]^{1/2}} \quad (8)$$

(8)式において分離条件が同一であるならば

$$R_s \propto \frac{z^{1/2}}{HETP^{1/2}} \quad (9)$$

となる。

このことは「 R_s 」に関して

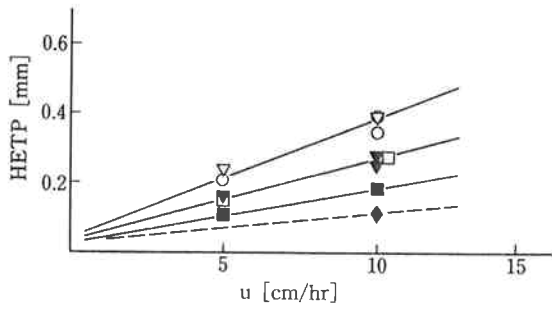
1) カラム長さの1/2乗に比例する。

2) 粒子径, 流速等に依存する「HETP」の1/2乗に反比例

を意味している。

(2) 実験による検討

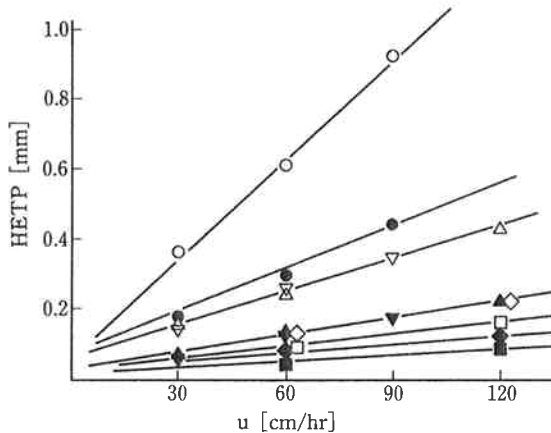
これらの理論に基づき, TSK-GEL TOYOPEARL HW-55S, F, TSK-GEL G3000SW について, 試料にウシ血清アルブミン (BSA), ミオグロビンをを用いた流速と「HETP」の測定結果を Fig. 2, 3 に示す。更にこれらについて無次元化すると Fig. 4, 5 に示す結果となつ



Gel : TSK-GEL TOYOPEARL HW-55
 Eluent : 0.2M Phosphate buffer (PH 6.8)
 Sample : BSA[2.0mg/cm²] + Myoglobin[0.5mg/cm²]

diameter mm I.D.	dp μm	key		
		BSA	Myoglobin	Acetone
310	47.9	○		◆
108	47.9	▽	▼	
55	33.1	□	■	

Fig. 2 Experimental relations between *HETP* and Flow rate for BSA and Myoglobin on TSK-GEL TOYOPEARL HW-55.



Gel : TSK-GEL G3000SW
 Eluent : 0.2M Phosphate buffer (PH 6.8)
 Sample : BSA[2.0mg/cm²] + Myoglobin[0.5mg/cm²]

diameter mm I.D.	dp μm	key	
		BSA	Myoglobin
210	31	○	●
108	16.5	▽	▼
55	16.5	△	▲
21.5	12.5	◇	◆
7.5	10	□	■

Fig. 3 Experimental relations between *HETP* and Flow rate for BSA and Myoglobin on TSK-GEL G3000SW.

た。Fig. 4 は口径 55~310 mm で約30倍, Fig. 5 は口径 7.5~210 mm で約780倍のスケールの相関がプロットされている。

これらの結果より, 同一基材の充填剤では粒子径の影響も含めて直線関係にあることがわかる。このことはカラムのスケールアップを行う場合, 目標とする分離性能が設定されれば小口径カラムデータでもって, 極めて容易に分取カラムの具体的な設計が可能であることを示している。

4. リニアグラジェント型イオン交換クロマトグラフィー (IEC) の理論

(1) IEC のスケールアップ因子^{3), 4), 5), 6)}

基本的な考え方は GFC と同様で, 「*HETP*」, 「*N_p*」, 「*R_s*」の相関を理論的に導くことができる。Fig. 6 において 「*N_p*」, 「*R_s*」はそれぞれ次式で与えられる。

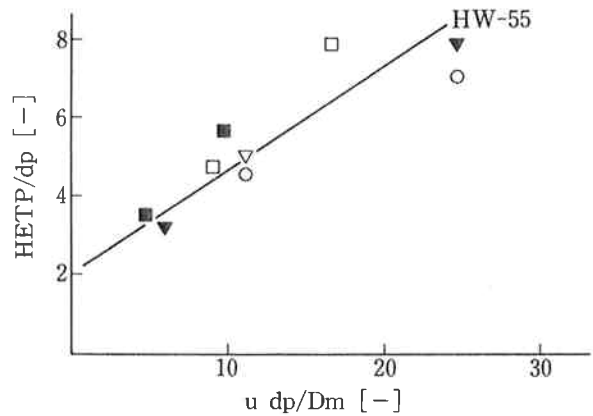


Fig. 4 Experimental relations between *HETP/d_p* and *u d_p/D_m*.

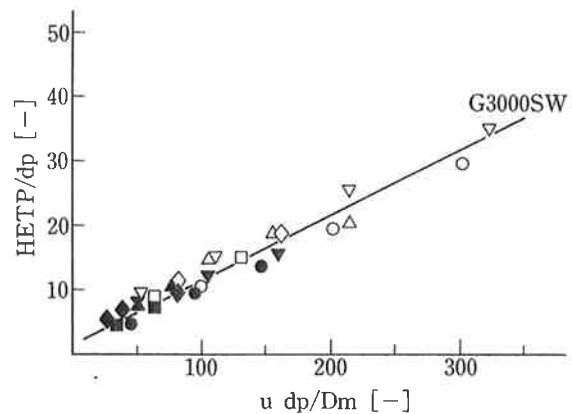


Fig. 5 Experimental relations between *HETP/d_p* and *u d_p/D_m*.

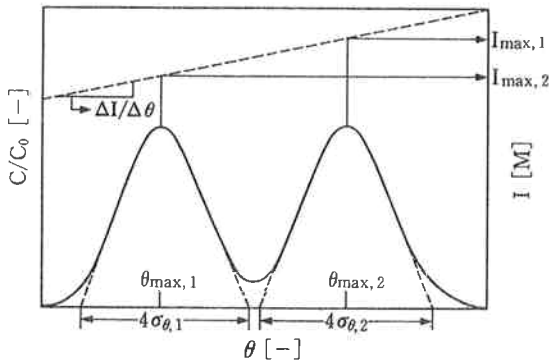


Fig. 6 Typical elution curve by linear gradient elution

$$N_p = \left(\frac{\theta_{max}}{\sigma_\theta}\right)^2 \tag{10}$$

$$R_s = \frac{(\theta_{max,2} - \theta_{max,1})}{2(\sigma_{\theta,1} + \sigma_{\theta,2})} \tag{11}$$

リニアグラジェントにおけるカラム出口のイオン強度 I_{max} は次式で与えられる。

$$I_{max} = I_0 + \frac{\Delta I}{\Delta \theta} [\theta_{max} - (1 + HK')] \tag{12}$$

ここで

I_0 : 初期イオン強度 $\frac{\Delta I}{\Delta \theta}$: イオン強度勾配

K' : 塩の分配係数

$H = (1 - \epsilon) / \epsilon$ (ϵ は空隙率)

である。

$$\theta_{max} = \frac{(I_{max} - I_0)}{\Delta I / \Delta \theta + (1 + HK')} \tag{13}$$

(11) (13)式より次式を得る。

$$R_s = \frac{|I_{max,1} - I_{max,2}|}{2 \frac{\Delta I}{\Delta \theta} (\sigma_{\theta,1} + \sigma_{\theta,2})} \tag{14}$$

quasi-steady state column⁵⁾ を考えると

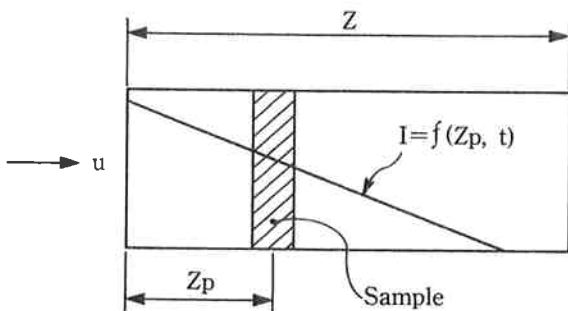


Fig. 7 Moving mechanism of sample in the column by linear gradient elution.

$$I_{max} = I_{crit} \because K(I_{crit}) = K' \tag{15}$$

$$\sigma_\theta^2 = -\frac{1}{2} \frac{(1 + HKI_{max})^2}{H \cdot \frac{\Delta I}{\Delta \theta} (1 + HK')} \frac{dK}{dI} \cdot N_p \tag{16}$$

$K_{I_{max}} = K'$ であるから

$$\sigma_\theta^2 = -\frac{1}{2} \frac{(1 + HK')^2}{H \cdot \frac{\Delta I}{\Delta \theta} \frac{dK}{dI}} \cdot N_p \tag{17}$$

で表わされる。

$\sigma_{\theta,1} \doteq \sigma_{\theta,2}$ と仮定し、(14) (15) (17)式より次式を得る。

$$R_s = \frac{|I_{crit1} - I_{crit2}|}{4 \frac{\Delta I}{\Delta \theta} (1 + HK')} \left(-\frac{1}{2} \frac{?}{H \cdot \frac{\Delta I}{\Delta \theta} \frac{dK}{dI} \cdot N_{p1}} \right)^{1/2} = \frac{|I_{crit1} - I_{crit2}| \cdot z^{1/2} \cdot \left(-\frac{dK}{dI} \right)^{1/2} \cdot H^{1/2}}{\sqrt{8} (1 + HK') \left(\frac{\Delta I}{\Delta V} \cdot V_0 \right)^{1/2} \cdot HETP_1^{1/2}} \tag{18}$$

同一溶離条件であるならば(18)式は

$$R_s \propto \frac{1}{\left(\frac{\Delta I}{\Delta V} \right)^{1/2} \cdot HETP^{1/2}} \tag{19}$$

となる。

これによりリニアグラジェントにおける分離性能は

1) カラム長さには無関係である。

2) 粒子径による「HETP」の変動は $\Delta I / \Delta V$ で調整することができる。

というスケールアップに極めて有益な結論が得られている。

分取システム的设计においては溶出曲線の溶出位置と幅の予測が必要であり且つ重要である。GFC の場合、溶出液量 V_e は $V_e = V_0 + K(V_i - V_0)$ で表わされ、 K が既知ならば容易に溶出位置を予測することができるが、IEC の場合、 K はイオン強度、 I の関数であり時間 t と距離 z によって変化するのでその予測は以下の通り展開される。

Fig. 7 においてカラム内の試料ゾーンの移動速度 dz_p/dt は

$$\frac{dz_p}{dt} = u / (1 + HK) \tag{20}$$

で表わされるとすると、カラム入口に供給される I の直線的増加は

$$I = I_0 + \Delta I / \Delta V \cdot v \cdot t \tag{21}$$

ここで

$\Delta I / \Delta V$: イオン強度勾配 v : 流量

である。

となる。

これを z_p と t の関数として書き換えると(22)式となる。

$$I = I_0 + \Delta I / \Delta V (V_0/z) [tu - (1 + HK')z_p] \quad (22)$$

(22)式を t に関して微分し

$$dI/dt = (\Delta I / \Delta V) (V_0/z) [u - (1 + HK') dz_p/dt] \quad (23)$$

(20)式を代入すると(24)式を得る。

$$dI/dt = (\Delta I / \Delta \theta) \left[\frac{H(K - K')}{1 + HK'} \right] (u/z) \quad (24)$$

$$(\Delta I / \Delta \theta = V_0 \cdot \Delta I / \Delta V)$$

(20) (24)式より dt を消去し

$$dI/dz_p = (\Delta I / \Delta \theta) [H(K - K')] / z \quad (25)$$

更に $z_p = 0$ から z まで積分すると

$$H(\Delta I / \Delta \theta) = (V_i - V_0) \Delta I / \Delta V = \int_{I_0}^{I_{\max}} \frac{dI}{K - K'} \quad (26)$$

I_{\max} : ピーク位置でのイオン強度

を得る。

これより K が I の関数として既知ならば「 $K - K'$ 」を I に関して積分することにより、任意のカラム体積および勾配 $\Delta I / \Delta V$ に対するピーク位置に予測することができる。

(26)式について $\Delta I / \Delta \theta = G$, $\Delta I / \Delta V = g$ とおくと

$$GH = g(V_i - V_0) \quad (27)$$

で表わされる。

(27)式はスケールアップしたカラムにおいても同一の

Separation pattern of β -Galactosidase

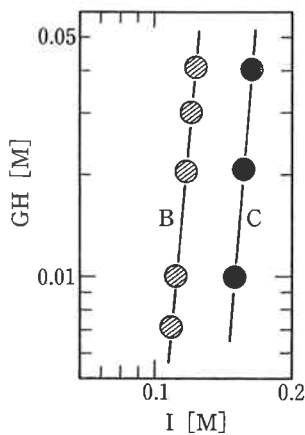
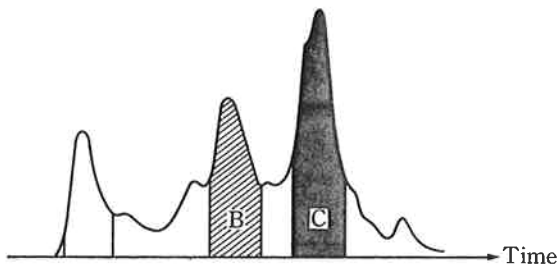


Fig. 8 Relationship between GH and I .

ピーク位置 (同一の分離度) で分離を行うためには GH を同一に設定すべきことを意味しており、運転条件 (グラジエント勾配) を決定するための基礎式である⁶⁾。

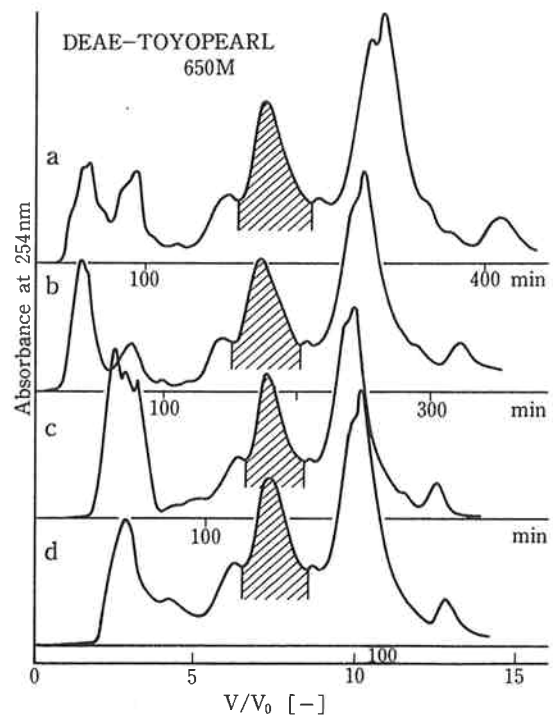
(2) 実験による検討

試料として β -Galactosidase の B, C 成分に着目し、DEAE-TOYOPEARL 650M 系の分離における GH vs

Table 1 Experimental conditions.

D (mm ϕ)	z (mmL)	v (ml/min)	g (Mol/ml)	GH (Mol)
14	150	1	2.1×10^{-3}	0.029
108	300	60	1.8×10^{-5}	0.029
310	400	500	1.6×10^{-6}	0.029
600	400	1,600	4.3×10^{-7}	0.029

Purification of Commercial β -Galactosidase



Column Dimension	Injection Volume
a. 600mm I.D. \times 40cm	a. 40000ml
b. 310 40	b. 10000
c. 108 30	c. 1000
d. 14 15	d. 7

Sample: Crude β -Galactosidase 1 wt % Soln.

Fig. 9 Chromatogram of β -Galactosidase in experimental conditions.

Iについて測定した。結果を Fig. 8 に示す。ここでB, Cの間隔は分離度を表わしている。

次に前章の理論に基づき小口径カラムをベースに GH を一定とし、スケールアップカラムの溶出位置を同一位置とすることを試みた。

Table 1 は口径 14 mm カラムの分析条件に基づく 600 mm カラムまで3段階の口径について GH を0.029 となるようにした場合の分取条件であり、その分離結果を Fig. 9 に示す。ここで斜線部分は酵素活性を示し、良好な一致をみた。

この様に分離パターンが予め推定できることは分離操作上及びスケールアップ上極めて有意義となる。

すなわち分離条件が適切に設定できるため、この設定を誤った場合に生ずる予測を得ないピークの広がりや溶出位置の変動、他ピークと重なるといった分取操作上問題点が回避でき生産スケジュール、タイムスケジュールが予め予測できるため、スケールアップ上の基本的な条件が満たされることになるからである。

この理論は IEC のみならず、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等溶離液をリニアに変化させる場合には適応できると考えている。

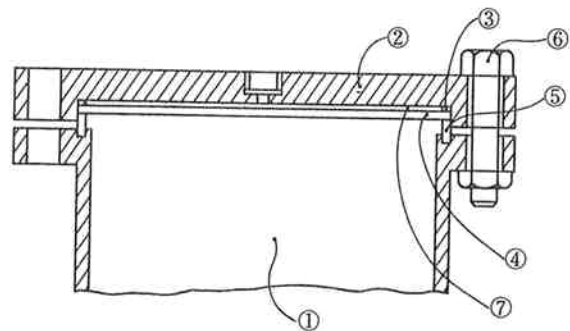
5. 分取用カラムの構造

各理論を実証した際極めて満足する結果を得たことはカラム構造はスケールアップ上に関して理想に近いことを意味しているとも言えるのである。これまでに用いたカラムは実験に先立ち以下の構造上の問題を確認して取組んだものである。

(1) カラム構造と問題点

カラムのスケールアップにおける構造上の問題点は、大口径カラムになっても小口径カラム同様にカラム断面の全面において液流れが片流れすることなく均一に流れることが理想であり且つ重要である。このことが小口径カラムの性能で大口径カラムの性能を推察する不可欠の条件となる。

Fig. 10 は分取カラムの構造図であり、上部も下部も同一の構造となっている。Fig. 10 中の④Filter (濾過板) は焼結金属: SUS 316L である。その Filter は充填剤をカラム外に洩らさない役目と均一流れのための分散板の役目を果たしている。Fig. 10 ⑦部にはある容量の空間が設けてある。この空間部分をカラム長さ方向に十分長くすれば、理論的にはカラム全面に均一流れが期待できる。一方試料の供給に際しては空間容量はできる



- ① Sorbents
- ② Flange (SUS316)
- ③ Seal plate (PTFE)
- ④ Filter (SUS316L)
- ⑤ Seal ring (PTFE)
- ⑥ Bolt & Nut (SUS316)
- ⑦ Space

Fig. 10 Column construction

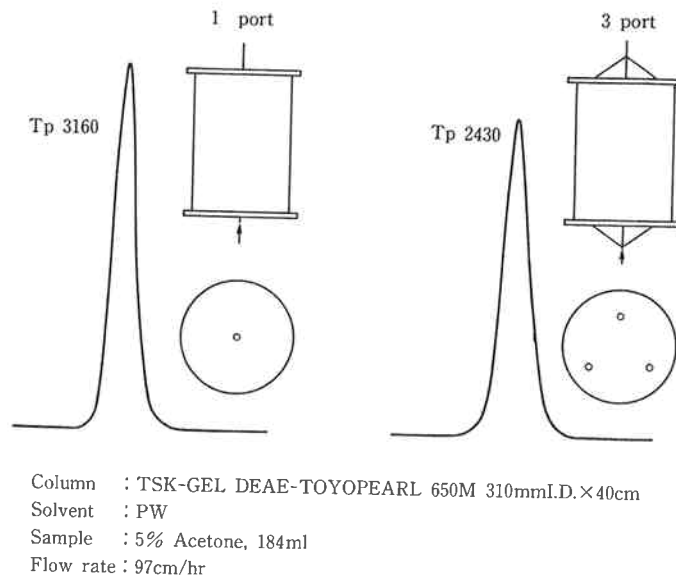


Fig. 11 Effect of port numbers

だけ小さく、拡散の場が少ないことが理想となる。カラムの構造設計はこの相反した両者の特性を考慮しなければならない。我々はこの容積については流れ抵抗に差しつかえない範囲でできるだけ小さくすることを方針とした。

〔2〕 ポート数の検討

次に均一流れを得るための液の供給方法であるが、分析カラム等小口径カラムでは中心1ポートで十分であることが容易に理解できるが、カラム口径を大きくした場合、分析カラム同様に1ポートで良いのか、或いは他社で見られるように分割ポートで分散注入した方が良いのかといった問題が発生する。

Fig. 11 は中央1ポートと面積3等分した3ポートとの性能比較結果である。このことより1ポートの場合は極めて単純な試料バンドが構成されるのに対して、3ポートの場合は、それぞれのポートの流れの境界域において他ポートの干渉により乱れが発生しているものと推察した。これより当社のカラムは中央1ポートとした。

〔3〕 当社カラム構造の特色

カラムの構造については充填操作性を考慮した設計が必要となる。必要とされる機能の面でとらえた場合充填層は使用時に液流により圧縮されても、空隙が発生するというトラブルがないようにカラム内ボリューム以上の充填剤を高密度に充填できる構造が必要となる。

また、充填操作を行う場合カラムに付属するガスケット、濾過板はカラムの蓋に固定されていることが、便利であり、その場合脱着が自由に容易に部品交換できることが必要となる。

以上を考慮し大口径カラム 600 mm までの標準設計

と商品化を終了し、その商品群を Photo 1 に示す。

6. ま と め

以上要約すると

- 1) カラムスケールアップの基本となる分離能、粒子径、流速の相関を当社代表グレードについて把握し工学的に整理した。
- 2) リニアグラジェント型のスケールアップに関し分離性能、すなわちクロマトパターンをコントロールし目標に合致させる手法を確認した。
- 3) スケールアップ上問題の少ないカラム構造を策定し、口径 600 mm までのカラムを商品化設計した。
- 4) 以上により少なくとも5,000倍の範囲でのスケールアップが同一の工学的手法で解析が可能なることを実証した。

7. お わ り に

液体クロマトグラフィーにはその多様な分離原理を応用することで物理的、化学的性質の差の小さい物質の分離・精製を可能にし、操作条件が比較的穏和なため化学物質においてはその活性を損うことなく分離が行なえるという利点がある。この技術を更に拡大し、より高度な分離が行なえる手法や担体の開発、大規模分取システムの設計法の確立を計ることは今なお重要である。今後に残される課題は少なくなく、更に検討を重ねる考えである。最後にスケールアップ理論の展開に関して御指導をいただいた山口大学工学部の山本修一先生に感謝いたします。

文 献

- 1) 橋本勉編著；“充てん剤（固定相）”，武蔵野書房，1978.
- 2) J. C. Giddings, K. L. Mallik; *Anal. Chem.*, **38**, 997 (1966).
- 3) 山本修一，佐野雄二；“醗酵工学，第63巻”，p. 471 (1985).
- 4) 山本修一，佐野雄二；“第18回化学工学秋期大会要旨集”，SK317 (1984).
- 5) S. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno and T. Kamikubo; *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 25, p. 1373, p. 1465 (1983)
- 6) S. Yamamoto, M. Nomura and Y. Sano; *Proceedings of World Congress III of Chemical Engineering (Tokyo)*, vol. I, p. 988 (1986)

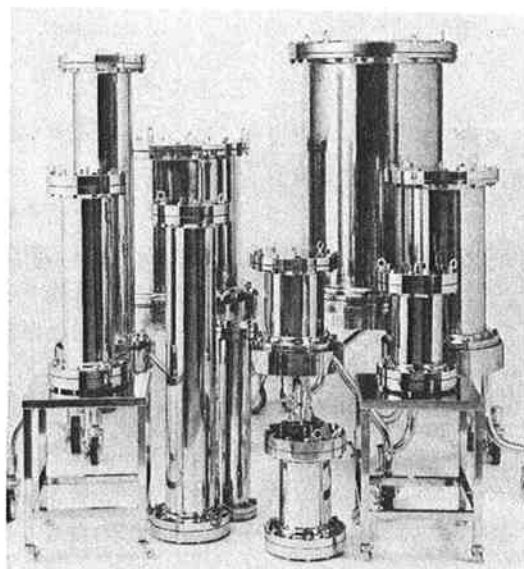


Photo 1 Commercial columns.