

# 大型カラム充填手順書

## BioPro IEX / BioPro IEX SmartSep

### 目次

1. はじめに
2. 製品仕様一覧表
3. カラム充填手順
4. カラム性能の確認
5. 使用済み担体の抜き取りと保管
6. 充填と検査の実例
7. トラブルシューティング
8. 補足情報

### 1. はじめに

BioPro IEX および BioPro IEX SmartSep は、YMC のイオン交換クロマトグラフィー (IEX) 担体です。本製品は親水性ポリマーに強アニオン交換基 (第 4 級アンモニウム基; Q) または強カチオン交換基 (スルホ基; S) を導入したイオン交換担体で、バイオ医薬品やオリゴ核酸などの精製に適しています。担体の優れた吸着容量、分離能、回収率により最大の生産性を可能にし、物理的、化学的な耐久性も高いことから堅牢な生産プロセスの構築を保証します。また、豊富な担体ラインナップにより、ターゲット化合物の初期精製、中間精製、最終精製に広く使用できます。

カラムの充填が適切でないと、ピークが広がる、分離能が低下するなどして、十分な担体の性能を得られないことがあります。本手順書では、カラム充填を適切に行うための方法を説明します。

### 2. 製品仕様一覧表

パラメーター	BioPro IEX SmartSep Q/S		BioPro IEX Q/S
粒子径 (μm)	20	30	75
推奨使用圧力	≤2 MPa		≤0.3 MPa
耐圧	3 MPa		0.3 MPa
最適用途	中間精製から最終精製		初期から中間精製

### 3. カラム充填手順

次の手順では、バイオコンパチブルなカラムハードウェア（ガラスカラム、アクリルカラムなど）を使用した充填手順を説明します。異なるタイプのカラムを使用する場合は、対応するカラムの手順書を参照し、それに従って充填を行ってください。

また、充填にご使用する器具・容器は事前に確認し、劣化や傷がなく清潔なものをご用意ください。

#### 3.1 推奨充填パラメーター

コンプレッションファクター (CF) *1		20 μm	1.05 - 1.12
		30 μm	1.05 - 1.12
		75 μm	1.10 - 1.15
スラリー濃度 (C <sub>SLURRY</sub> )	推奨	30% - 50%	
	最大	70%	
充填用溶媒 *2		1 M NaCl, 0.5 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
充填流速		精製で使用する流速の 2 倍以上	

\*1 カラムの種類によっては推奨 CF まで押し込めない場合があります。

\*2 分析や精製に使用する移動相よりもイオン強度の大きい溶媒を使用することをお勧めします。20% エタノール水溶液や 100% 水を充填用溶媒として使用することも可能ですが、良好なクロマト性能を得るためには充填条件を変更する必要がある場合があります。

- CF: 層の圧縮率 = 重力によって沈降する非圧縮担体の体積/圧縮された担体の体積
- C<sub>SLURRY</sub>: 総スラリー量に対する担体量の割合

#### 3.2 カラム充填のための計算

圧縮担体の体積: ベッド体積 (V <sub>BED</sub> ) (r = カラム半径, L = 必要なベッド長)	$V_{BED} = \pi \times r^2 \times L$
必要担体量 (V <sub>M</sub> )	$V_M = V_{BED} \times CF$
全スラリー量 (V <sub>SLURRY</sub> )	$V_{SLURRY} = V_M / C_{SLURRY}$

#### 3.3 担体の準備: 微粒子の除去とスラリーの調製

必要な材料:

- 担体（購入時ボトル封入状態）
- 必要担体量 (V<sub>M</sub>) の 2 倍以上の容量の目盛付き容器（メスシリンダーやビーカーなど）
- 混合器具（微粒子の生成を防ぐため、鋭利なへらや攪拌子は使用しないでください）
- 10~100 mL のメスシリンダー
- 充填用溶媒

手順	操作
1	ボトルを静かに振って担体を懸濁させ、準備した容器に移す
2	下記の各粒子に指定された沈降時間静置してスラリーを沈降させる
3	静置後、デカンテーションまたはサイフォンにより上澄み液を取り除く

4	担体の等量の充填用溶媒を加え、混合器具で静かに攪拌し均一化する
5	担体が沈降するまで静置する
6	手順 3~5 を 3 回以上繰り返し、充填用溶媒に完全に交換する
7	混合器具で静かに攪拌し均一化する
8	スラリー濃度 (C <sub>SLURRY</sub> ) を算出するために、懸濁したスラリーの一部を 10~100 mL のメスシリンダーに移し、下記の指定された時間をかけ沈降させ、C <sub>SLURRY</sub> が 30-50% になっていることを確認する
9	手順 8 での C <sub>SLURRY</sub> の値を参考に、カラム充填に使用するスラリーの C <sub>SLURRY</sub> が 30% - 50% になるように、必要に応じて充填用溶媒を抜き足して調整する
10	<p>目的のベッド長のカラムを充填するために必要な全スラリー量 (V<sub>SLURRY</sub>) を下記の計算式より決定する</p> $V_{SLURRY} = V_M / C_{SLURRY}$ <p>例えば、内径 20cm × 目標ベッド長 30cm (V<sub>BED</sub> = 9.4 L) のカラムに CF=1.10、C<sub>SLURRY</sub> = 50% で充填する場合</p> $V_{SLURRY} = 9.4 \text{ L} \times 1.10 / 0.50 = 20.7 \text{ L}$

#### 各粒子径の沈降時間

20 μm	300 min ~ 終夜
30 μm	120 min ~ 終夜
75 μm	60 min ~

### 3.4 カラムの準備

必要な材料:

- ・ 目標ベッド体積 (V<sub>BED</sub>) 以上の容量のカラム
- ・ 充填リザーバー (V<sub>SLURRY</sub> がカラム容量を超える場合)
- ・ カラムを垂直に固定可能なスタンド
- ・ 小型水平器
- ・ 必要な流量が送液可能なクロマトグラフポンプ
- ・ 充填用溶媒
- ・ 配管
- ・ 密栓およびコネクター
- ・ 廃液容器

手順	操作
1	充填リザーバーをカラム上部に取り付ける (必要な場合)
2	下部ピストンをカラム下部に取り付け、O-リングを締める
3	カラムをスタンドに垂直に固定する (水平器で確認)
4	ポンプをカラム下部のインレットに接続する
5	カラムの下から 1-2 cm の高さまでポンプで充填用溶媒を送液し、ピストンの空気を抜く
6	素早くポンプを外し、カラム出口を密栓で塞ぐ
7	ポンプを上部ピストンに接続して充填用溶媒でピストン内をパージし、O-リングを緩める

### 3.5 カラム充填

必要な材料:

- ・ 3.3 で用意した担体

- ・ 3.4 で用意したカラム
- ・ 混合器具（微粒子の生成を防ぐため、鋭利なへらや撈拌子は使用しないでください）
- ・ マーカーペン（後で消せるもの）
- ・ スラリーポンプのような移送装置（必要な場合）

次の手順では、スラリーをカラムに充填します。フローでの充填方法と沈降での充填方法の2つの手順を記載します。

#### [フロー条件での充填]

注意：フロー条件での充填を行う場合は、カラムにスラリーを投入すると担体の沈降がすぐに始まりますのでご注意ください。この沈降により最終的な充填層に充填密度の違いが生じ、クロマトグラムにピークテーリングなどの悪影響が及ぶ可能性があります。スラリーの投入後の沈降を完全に回避することはほとんど不可能ですが、その影響を軽減するためには手順 4~10 を可能な限り手早く実行することがポイントとなります。

手順	操作
1	フリットを十分に充填用溶媒で濡らしておく
2	スラリーが均一になるまで、混合器具を用いて静かに撈拌する
3	気泡が入らないようにスラリーをカラムに投入する、又はスラリーポンプのような移送装置でスラリーをカラムに移送する
4	充填用溶媒を用いて、カラム内壁に付着した担体を洗い落とす
5	気泡が入らないように、上部ピストンをカラムに接続する
6	上部ピストンの O-リングを締める
7	カラム内の空気を抜くため、上部ピストンをスラリー液面まで下げる（溶媒が上から排出される）
8	ポンプをカラム上部インレットに接続する
9	カラム出口を廃液容器に接続する
10	充填流速の 1/5~1/2 の流速で送液を開始する
11	充填流速までゆっくり流量を上げていく
12	充填層が圧縮され、ベッド長が変化しなくなるまで通液する
13	変化しなくなったベッド長の位置にマーカーペンで印をつける
14	通液を停止し、ポンプを外す
15	カラム下部の出口を密栓で塞ぐ
16	充填リザーバーを使用していた場合、取り外して上部ピストンをカラム本体に再接続する
17	マーカー位置まで上部ピストンを下げる
18	カラム出口を開放し、ポンプを再接続して通液を再開する
19	充填層が動かなくなるまで、手順 13~18 を繰り返す（通液後目的のベッド長に到達しない場合は必要に応じて上部ピストンを押し込む）
20	カラム出口を密栓で塞ぎ、ポンプを外し、カラム入口も密栓で塞ぐ

## [沈降条件での充填]

注意：沈降条件での充填を行う場合は、手順5の静置の際に液面を揺らさないことが重要になります。

手順	操作
1	フリットを十分に充填用溶媒で濡らしておく
2	スラリーが均一になるまで、混合器具を用いて静かに攪拌する
3	気泡が入らないようにスラリーをカラムに投入する、又はスラリーポンプのような移送装置でスラリーをカラムに移送する
4	充填用溶媒を用いて、カラム内壁に付着した担体を洗い落とす
5	カラムの出口側の密栓を開放し沈降を開始する
6	充填層が動かなくなる程度または充填層と液面の間が1cm程度になったらカラム出口側を密栓する
7	気泡が入らないように上部ピストンをカラムに接続する
8	上部ピストンのOリングを締める
9	充填層の位置まで上部ピストンをゆっくりと下げる(溶媒が上から排出される)
10	ポンプをカラム上部インレットに接続する
11	カラム出口を廃液容器に接続する
12	充填流速の1/5~1/2の流速で送液を開始する
13	充填流速までゆっくり流量を上げていく
14	充填層が圧縮され、ベッド長が変化しなくなるまで通液する
15	変化しなくなったベッド長の位置にマーカープンで印をつける
16	通液を停止しポンプを外す
17	カラム下部の出口を密栓で塞ぐ
18	マーカ位置まで上部ピストンを下げる
19	カラム出口を開放し、ポンプを再接続して通液を再開する
20	充填層が動かなくなるまで、手順13~18を繰り返す(通液後目的のベッド長に到達しない場合は必要に応じて上部ピストンを押し込む)
21	カラム出口を密栓で塞ぎ、ポンプを外し、カラム入口も密栓で塞ぐ

#### 4. カラム性能の確認

カラムの充填が完了したら、サンプルを注入してカラムの性能を評価し、カラムの理論段数(N/m)と非対称係数(As)を確認します。代表的な評価条件を以下に示します。得られた値と以下に示すカラム性能に大きな差がある場合は、充填条件(スラリー濃度、CFなど)を調整し、再充填してください。

##### カラム充填評価の測定条件

検出方法	導電率	吸光度 (220 nm)
移動相	0.5 M NaCl	低イオン強度緩衝液
		強アニオン交換 (Q): 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8)
		強カチオン交換 (S): 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7)
サンプル	1 M NaCl	ホルムアミド (2 µL/mL)
流速		約 70 - 90 cm/h
温度		室温 (25 °C)
注入量		ベッド体積の 1~2 %

粒子径 (μm)	カラム性能		
	20	30	75
理論段数 (N/m)	≥ 6,500	≥ 5,000	≥ 2,500
非対称係数 (As)	0.7 – 1.8		

カラム性能は目安であり、使用条件によっては上記の範囲外でも目的の分離が得られる場合があります。

システム流路内のサンプル拡散（カラム外拡散）は、カラムの性能に大きく影響します。充填条件を変更してもカラムの性能が変化しない場合は、7のトラブルシューティングを確認してください。

## 5. 使用済み担体の抜き取りと保管

下記に記載する担体の抜き取り方法は一例です。使用されたカラムの説明書も合わせてご確認ください。

必要な材料:

- ・精製後の充填カラム
- ・20%エタノール水溶液またはその他の保存溶媒
- ・廃液容器
- ・混合器具（微粒子の生成を防ぐため、鋭利なへらや攪拌子は使用しないでください）
- ・スラリー量より大きい容量の担体保管用樹脂容器
- ・スラリーポンプのような移送装置（必要な場合）

手順	操作
1	カラムを20%エタノール水溶液またはその他の保存溶媒で洗浄し、カラム内を保存溶媒で完全に置換する
2	カラム上部の注入口を開き、カラム内の圧力を大気圧まで解放する
3	上部ピストンのO-リングを緩める
4	上部ピストンを取り外す
5	20%エタノール水溶液またはその他の保存溶媒をカラムに注ぎ、スラリーが均一になるまで混合器具で担体をゆっくり攪拌する
6	均一になったスラリーを、スラリー容量よりも大きい容量の容器に移す（必要に応じて、スラリーポンプなどを使用する）
7	カラム内に付着した担体を水または20%エタノール水溶液で洗いこむ
8	カラムをきれいにふき取る
9	抜き取った担体は20%エタノール水溶液またはその他の保存溶媒中4~35°Cで保管する

## 6. 充填と検査の実例

BioPro IEX SmartSep S30 と BioPro IEX S75 の充填実例を示します。内径 200 mm I.D. のカラムを用いて、下記の条件で充填を行いました。検査は、4 の導電率法に記載された方法に従って行いました。また、充填したカラムについて圧力と流量の相関を測定しました。圧力はテスト範囲の線流速と比例関係になりました。

担体	BioPro IEX SmartSep S30	
カラム	カラム内径	200 mm I.D.
	ベッド長 (L)	288 mm
充填条件	スラリー濃度 (C <sub>SLURRY</sub> )	70%
	充填用溶媒	1.0 M NaCl
	充填流速	180 cm/h
	コンプレッションファクター (CF)	1.08
評価条件	移動相	0.5 M NaCl
	流速	90 cm/h
	サンプル	1.0 M NaCl
	注入量	ベッド体積の 2%
	温度	Ambient

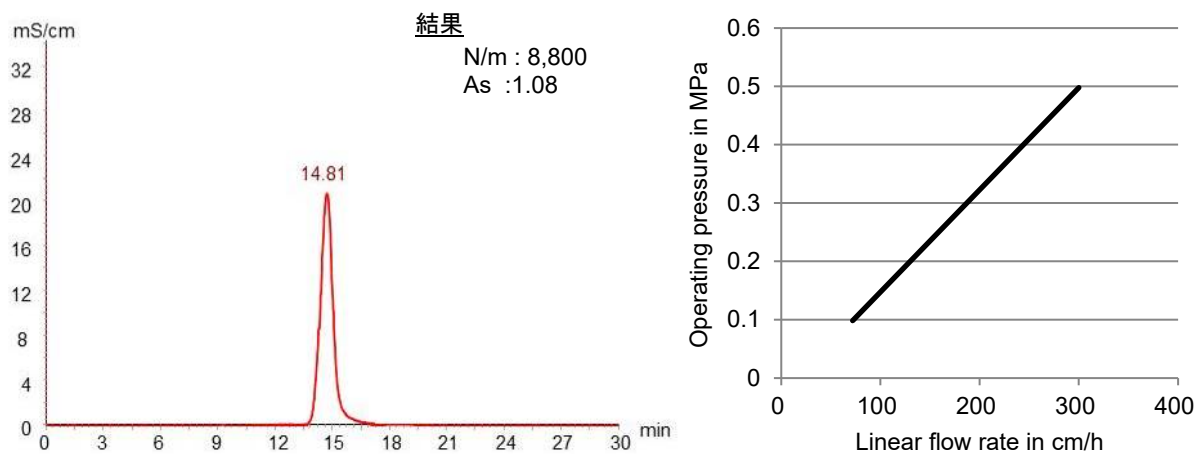


図. BioPro IEX SmartSep S30 の充填例

担体	BioPro IEX S75	
カラム	カラム内径	200 mm I.D.
	ベッド長 (L)	278 mm
充填条件	スラリー濃度 (C <sub>SLURRY</sub> )	70%
	充填用溶媒	1.0 M NaCl
	充填流速	180 cm/h
	コンプレッションファクター (CF)	1.15
評価条件	移動相	0.5 M NaCl
	流速	90 cm/h
	サンプル	1.0 M NaCl
	注入量	ベッド体積の 2%
	温度	Ambient

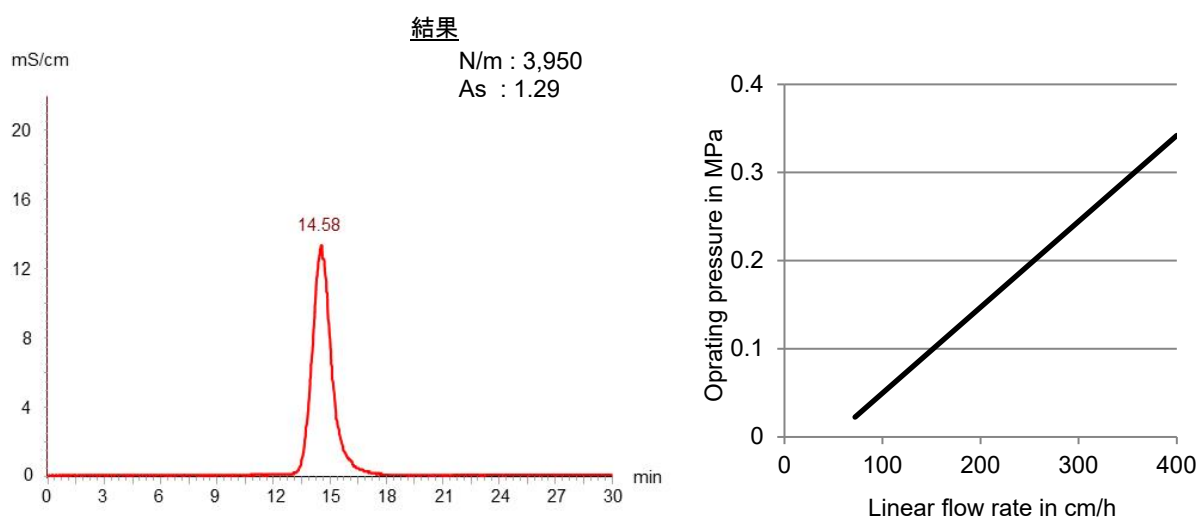


図. BioPro IEX S75 の充填例



## 7. トラブルシューティング

項目	原因	対処方法
ピークのテーリング	ピストンと充填層表面の間にボイドができています	ボイドがなくなるまで上部ピストンを下げます
	充填層が十分に圧縮されていない	上部ピストンを下げ充填層を圧縮する CF 値を上げて再充填する スラリー濃度を上げて再充填する
	カラムフリット内に空気又は汚れが付着している	フリットを十分に充填溶媒で濡らし取り付ける フリットの汚れを取り除く。解消しない場合はフリットの交換を推奨します
	システム流路内でサンプル拡散が生じている（カラム外拡散）	接続チューブの内径と機器の性能が適切かどうかを確認する
ピークのリーディング	充填層が圧縮されすぎている	CF 値を下げて再充填する スラリー濃度を上げて再充填する
ピーク割れ	充填層に割れが生じている	再充填を実施する
	担体の破碎やフリットにつまりが生じている（カラム背圧が高い）	担体のデカンテーションを実施し、フリットを交換した後に再充填を実施する
低理論段数	カラムの充填不良	充填流速やスラリー濃度が適正か見直す
	システム流路内でサンプル拡散が生じている（カラム外拡散）	接続チューブの内径と機器の性能が適切かどうかを確認する

## 8. 補足情報

参考動画 Packing ECO and ECOPLUS Glass Columns

<https://youtu.be/V9wUbMII8Jg?si=x2CJWeqBP3bftzpo>