

ラボ用カラム充填手順書

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)		20 μm	1.05 - 1.15
		30 μm	1.05 - 1.15
		75 μm	1.10 - 1.20
スラリー濃度 (C_{SLURRY})	推奨	30% - 50%	
	最大	70%	
充填用溶媒*		1 M NaCl, 0.5 M Na ₂ SO ₄	
充填流速		精製で使用する流速の 2 倍以上	

*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_{SLURRY} : 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_{BED}) (r = カラム半径, L = 必要なベッド長)	$V_{\text{BED}} = \pi \times r^2 \times L$
必要担体量 (V_{M})	$V_{\text{M}} = V_{\text{BED}} \times \text{CF}$
全スラリー量 (V_{SLURRY})	$V_{\text{SLURRY}} = V_{\text{M}} / C_{\text{SLURRY}}$

3.3 担体の準備: 微粒子の除去

必要な材料:

- 担体 (購入時ボトル封入状態)
- 必要担体量 (V_{M}) 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)
- 充填用溶媒

手順	操作
1	ボトルを慎重に振って担体を懸濁させ、準備した容器に移す
2	下記の各粒子径に指定された時間静置してスラリーを沈降させ、担体の量を測定する
3	必要に応じて懸濁液を抜き足しし、充填に必要な担体量 (V_{M}) に調整する
4	静置後、デカンテーションにより上澄み液を取り除く
5	担体の等量の充填用溶媒を加え、混合器具で慎重に均一化する

6	担体が沈降するまで待つ
7	手順 4~6 を 3 回以上繰り返す

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 スラリーの準備

必要な材料:

- ・担体 (3.3 で準備したもの)
- ・スラリー量より大きな容量の容器 (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)
- ・ろ過装置 (ヌッチェと濾紙、又はガラスフィルターなど)
- ・充填用溶媒

手順	操作
1	デカンテーションにより 3.3 後の上澄み液を取り除く
2	担体を慎重にろ過装置に移す (容器に残った担体は充填用溶媒で洗いこむ)
3	担体を必要担体量 (V_M) の 3 倍量の充填用溶媒を用いて吸引ろ過する
4	洗浄した担体を必要スラリー量 (V_{SLURRY}) より大きな容量の容器に移す
5	充填用溶媒を追加し V_{SLURRY} に調整する

3.5 カラムの準備

必要な材料:

- ・目標ベッド体積 (V_{BED}) 以上の容量のカラム
- ・充填リザーバー (V_{SLURRY} 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	下のピストンをカラム下部に取り付ける
3	目標ベッド容積 (V_{BED}) に合わせて下部ピストンの長さを調整する
4	カラムをスタンドに垂直に固定する (水平器で確認)
5	ポンプをカラム下部のインレットに接続する

6	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
7	素早くポンプを外し、カラム出口を密栓で塞ぐ
8	ポンプを上部ピストンに接続し、充填用溶媒でピストン内をパージする

3.6 カラム充填

必要な材料:

- ・ 3.5 で用意した部材
- ・ 3.4 で用意した担体
- ・ 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）
- ・ マーカーペン（後で消せるもの）

注意：次の手順では、スラリーをカラムに充填します。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 3~9 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、静かにスラリーをカラムに投入する
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	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）
7	ポンプをカラム上部インレットに接続する
8	カラム出口を廃液容器に接続する
9	充填流速の 1/5~1/2 の流速で送液を開始する
10	充填流速まで、ゆっくり流量を上げていく
11	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
12	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
13	通液を停止しポンプを外す
14	カラム下部の出口を密栓で塞ぐ
15	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
16	マーカー位置まで上部ピストンを下げる
17	カラム出口を開放し、ポンプを上部インレットに再接続して通液を再開する
18	充填層が動かなくなるまで、手順 12~17 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）
19	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例

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 %	

	カラム性能		
粒子径 (µm)	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
- ・ スラリー量より大きい容量の担体保管用樹脂容器

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	カラム出口を開き、カラム内の圧力を大気圧まで解放する
3	カラム下部のピストンを外す
4	カラム上部の注入口から 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通液し、静かに担体を保管用樹脂容器に押し出す
5	上部ピストンを取り外す
6	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
7	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すい 4~35°C で保管する

6. 充填と検査の実例

BioPro IEX SmartSep S30の充填実例を示します。内径15 mm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	15 mm I.D.
	ベッド長 (L)	300 mm
	リザーバー	500 × 15 mm I.D.
充填条件	スラリー濃度 (C _{SLURRY})	30%
	充填用溶媒	1.0 M NaCl
	充填流速	576 cm/h
	コンプレッションファクター (CF)	1.10
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 1%
	温度	Ambient

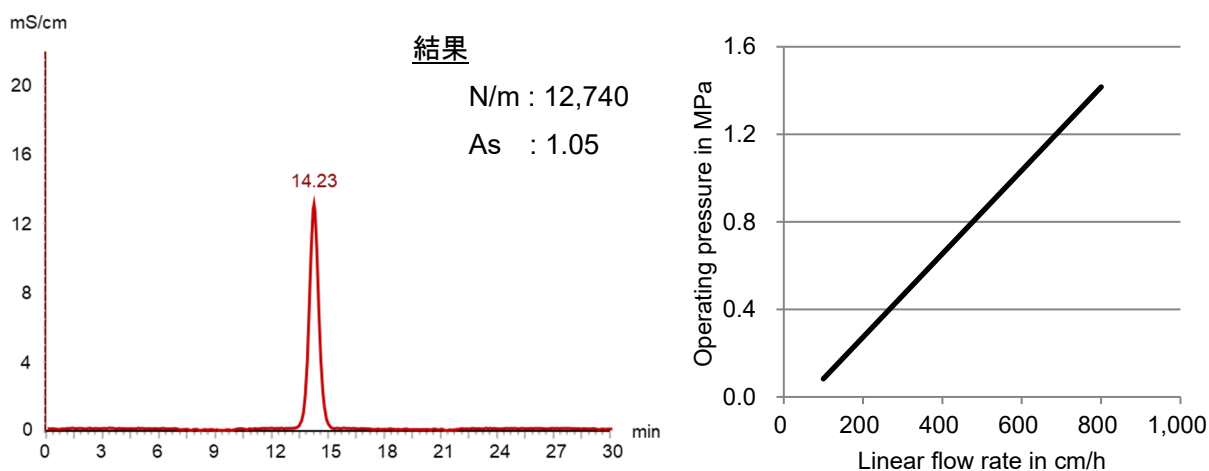


図. BioPro IEX SmartSep S30 の充填例

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ポイドが できている	ポイドがなくなるまで上部ピストンを下げ る
	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 スラリー濃度を下げて再充填する
	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>