

セルファイン GH-25 による脱塩

JNC 株式会社

ライフケミカル事業部

東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号

TEL : 03-3243-6150 Fax : 3-3243-6219

e メールアドレス: cellufine@jnc-corp.co.jp

ホームページアドレス: <http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>

目次

セルファイン GH-25 の紹介	2
分子量と K_{av} の関係	
セルファイン CH-25 の性質	3
1. 性質	
粒径, 排除限界分子量, 水吸収度, ベッド容積	
2. 流速	
自然落差圧, ポンプによる加圧	
3. 物理的, 化学的特性	
耐酸, アルカリ性, 耐熱性, 特殊溶媒中での安定性	
4. 耐久性	5
セルファイン GH-25 の応用	6
1. アルブミンの脱塩	6
2. リゾチームの脱塩	7
3. その他のタンパク質の脱塩	8
ヘモグロビン, β -ラクトグロブリン, ミオグロビン, チトクロム C	
4. ヒト血清アルブミン製造工程に含まれるアルコールの除去	9
5. GH-25 による大量脱塩	11
脱塩に及ぼす諸条件の影響	12
1. 溶出液の塩濃度	
ギ酸アンモニウム, 蒸留水, 塩濃度と HETP, 分離度の関係	
2. 試料の容量	14
試料の容量と分離度の関係	
3. 流速	15
流速と HETP, 分離度の関係, 高流量でのアルブミンからの脱塩	

セルファイン GH-25 の紹介

セルファイン GH-25 は天然物であるセルロースのみを素材として作られた真球状の多孔性ゲル粒子である。セルファインシリーズの中で、この GH-25 タイプは脱塩用として製造されている。セルロースはその分子間に多くの水素結合を有するため、従来のゲルろ過剤の素材であるデキストランやアガロースと比較して機械強度が大きく、そのためセルファイン GH-25 は従来の軟質ゲルとは比較にならないほど大きな耐圧性を有し、その事が第1の特徴となっている。そのため、溶出時の必要とする流速が、高流量でも可能であり、工業的脱塩を行う場合には特に有利である。

セルファイン GH-25 の第2の特徴は独特の分離パターンである。図1の分子量と K_{av} の関係からわかるように、分子量1,000と分子量3,000に対する K_{av} の差が大である。このことは、分子量1,000以下の低分子化合物とタンパク質等の高分子化合物の分離に非常に有利であることを示している。

セルファイン GH-25 の第3の特徴はタンパク質等に対する非特異的吸着がほとんど無いことである。このことは特に工業的に脱塩を行う場合大切であり、添加したタンパク質等が100%回収されることは経済的に重要なことである。

この資料では、特に脱塩について多くの実験例を記述してセルファイン GH-25 の特徴を紹介した。

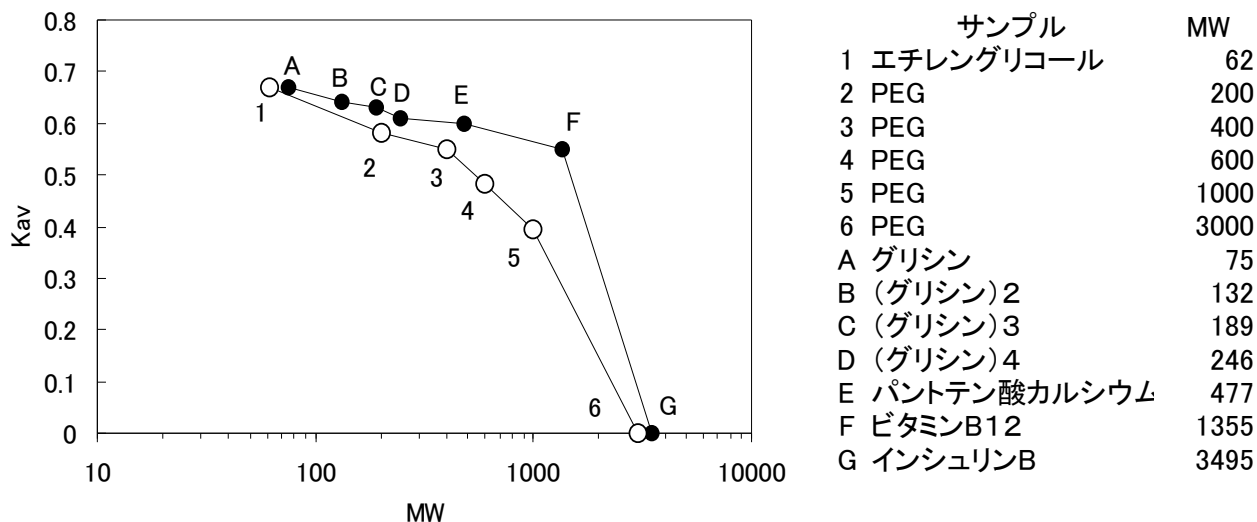


図1 分子量と K_{av} の関係

セルファイン GH-25 の性質

1. 性質

粒径	:	45 — 105	μm
排除限界分子量			
ポリエチレングリコール	:	2,500	
球状タンパク質（ペプチド）	:	3,500	
水吸収度	2.0 ± 0.2	g/g	
ベッド容積	3.0 ~ 4.0	mL/g	

2. 流速

セルファイン GH-25 は非常に高い流速が得られ、しかも良い分離能を示すのが特徴である。セルファイン GH-25 を自然落下法によって充填し、負荷する水圧を水面の高さで調節して流速を測定したのが図2である。図3はポンプで加圧充填したカラムにポンプで加圧して溶出液を流した時の流速である。

図2, 3とも従来のゲルでは得られない高流速が得られる事を示している。さらの図3では3Kg/cm² (≒0.3Mpa)まで加圧しても圧力と流速は直線関係にあり、セルファイン GH-25 の耐圧性が優れているを示している。

3. 物理的, 化学的特性

耐酸, 耐アルカリ性

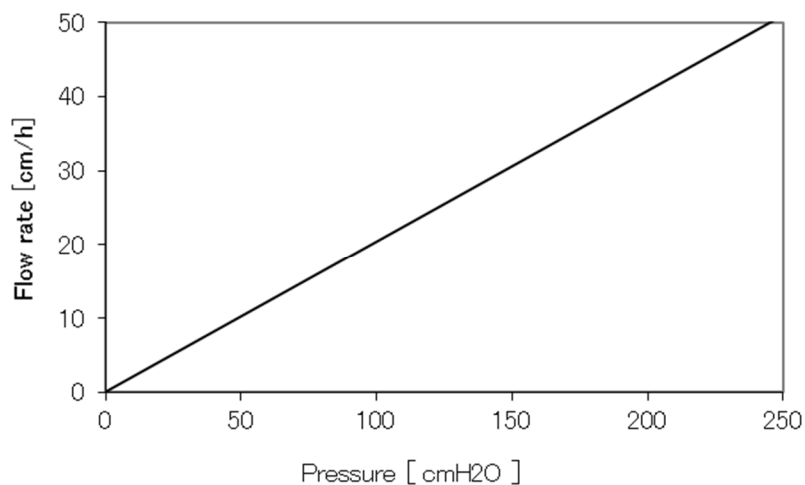
セルファイン GH-25 は酸やアルカリに対して安定であり、0.1Nの塩酸や水酸化ナトリウムの室温で30日間放置しても、また1Nの塩酸や水酸化ナトリウムを室温で短時間洗浄のために用いても、形状の変化、脱塩能力の変化はなかった。

耐熱性

セルファイン GH-25 は (120, 60分) のオートクレーブに十分耐える。

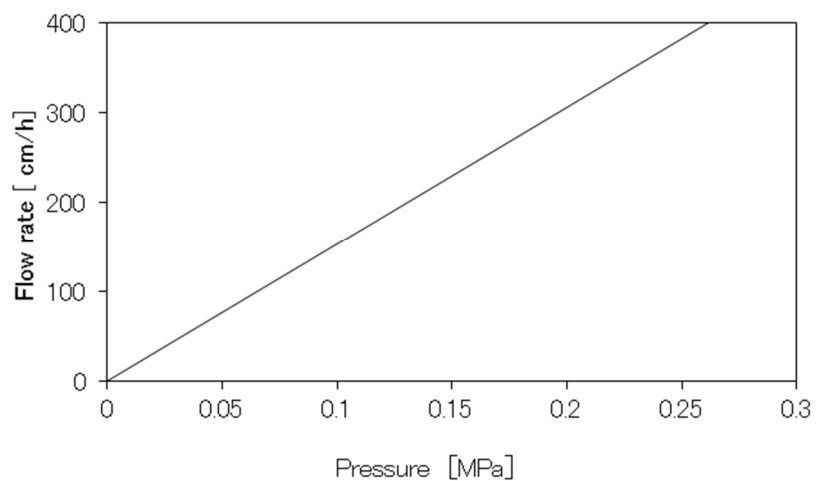
特殊溶媒中での安定性

6Mの尿素、塩酸グアニジン中の室温で7日間放置しても、形状の変化、脱塩能力の変化はなかった。



カラム : 2. 2 × 90 cm
 溶出液 : 0. 05 M ギ酸アンモニウム
 温度 : 25 °C

図 2 圧力と流速の関係（自然落差圧）



条件は図 2 と同じ

図 3 圧力と流速の関係（ポンプにより加圧）

タンパク質の吸着

多くのタンパク質の吸着試験の結果、吸着するタンパク質はほとんどなく、回収率はほぼ100%に近い。塩基性タンパク質であるリゾチームは、一般にゲルに吸着して回収率が低かったり、溶出位置が遅れたりする傾向があるが、セルファイン GH-25ではそのようなことは無く、回収率も100%近く得られ、水や非常に濃度の低い塩溶液で溶出した場合、ややテーリングが見られる程度である。表1に種々タンパク質の回収データを示した。

表1 セルファイン GH-25 充填カラムによる種々試料の回収試験結果

試料	回収率 (%)	試料	回収率 (%)
アルブミン	98	フェリチン	92
リゾチーム	96	フィブリノーゲン	100
γ-グロブリン	92	アポフェリチン	100
Cyt.C	98	キモトリプシノーゲン	90
ミオグロビン	96	DNA	100
β-ラクトグロブリン	100	アデノシン	100
カタラーゼ	100	トリプトファン	100

(実験条件)

カラム	: 1.3 × 12 cm (16 ml)
試料	: 10 mg / 5 ml
溶出液	: 0.05 M トリス塩酸バッファー, pH7.5 + 0.1 M KCl
溶出液量	: 50 ml

4 耐久性

以下の条件でアルブミンの脱塩テストを250日間、1000サイクル行ったが、脱塩能力の変化は全く見られなかった。

(実験条件)

カラム	: 2.6 × 55 cm (292 ml)
試料	: 8 ml (BSA 3.75%, NaCl 18.75%)
溶出液	: 0.05 M ギ酸アンモニウム
流速	: 130 ml / h (24.5 cm / h)

セルファインGH-25の応用

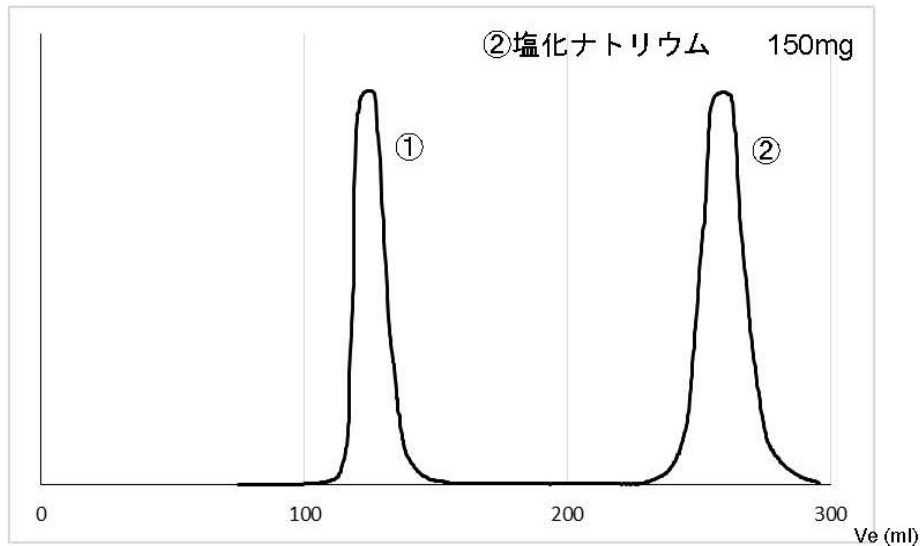
1. アルブミンからの脱塩

1. アルブミンの脱塩

(I) サンプル 2ml

①ウシ血清アルブミン 30mg

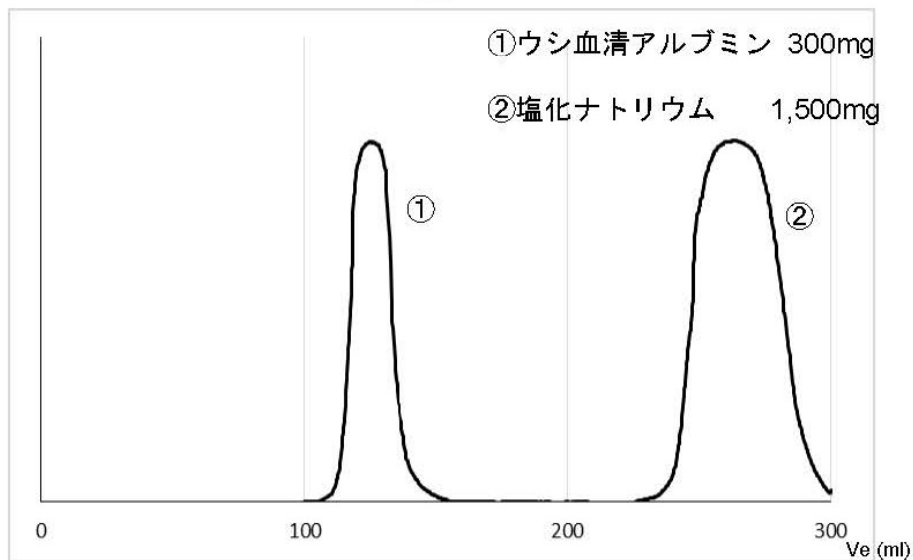
②塩化ナトリウム 150mg



(II) サンプル 8ml

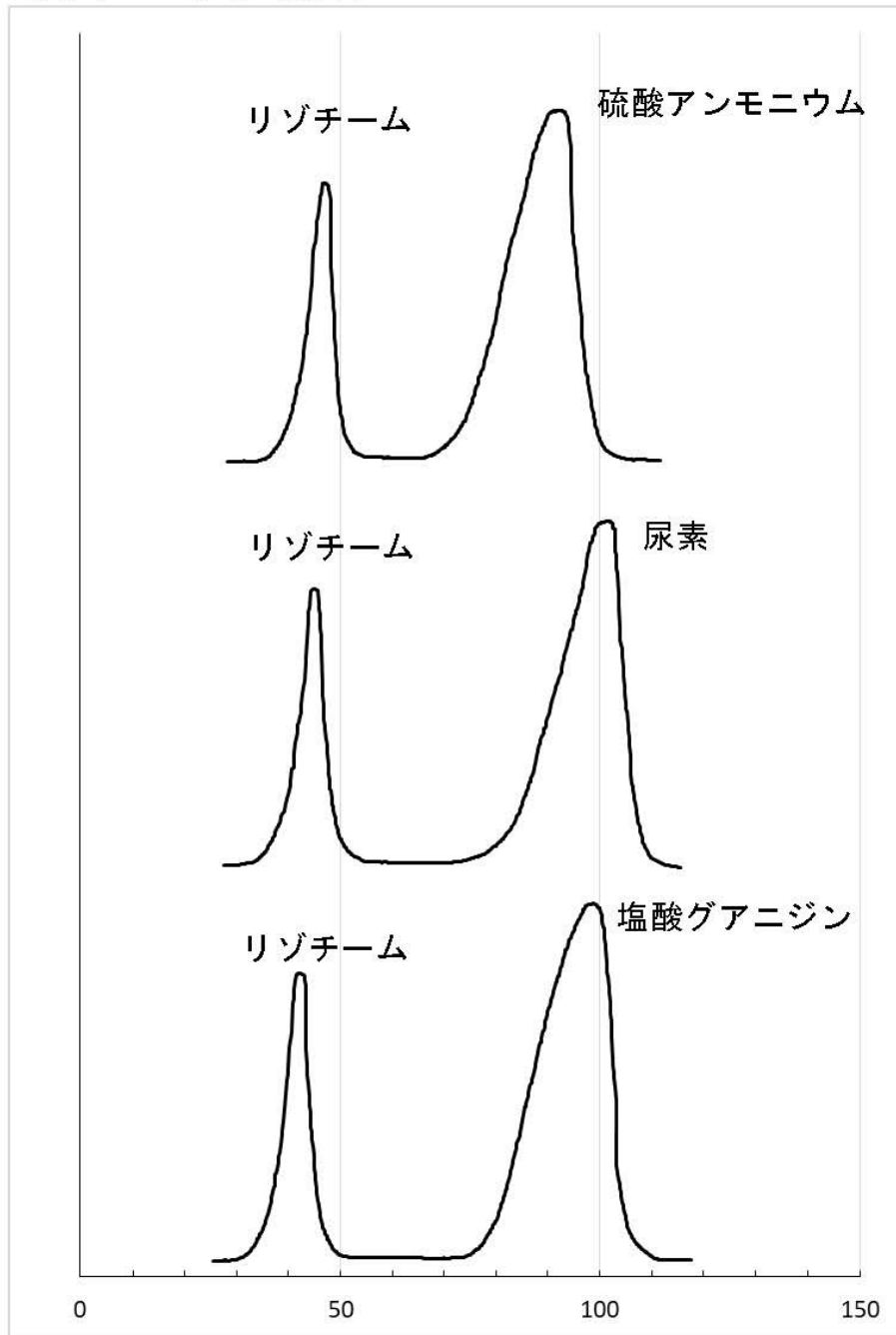
①ウシ血清アルブミン 300mg

②塩化ナトリウム 1,500mg



カラム : 2.6 x 60 cm (Vt = 318ml)
 ゲル : セルファインGH-25
 溶出液 : 0.05M ギ酸アンモニウム
 流速 : 36ml/hr (6.8cm/hr)
 検出 : RI

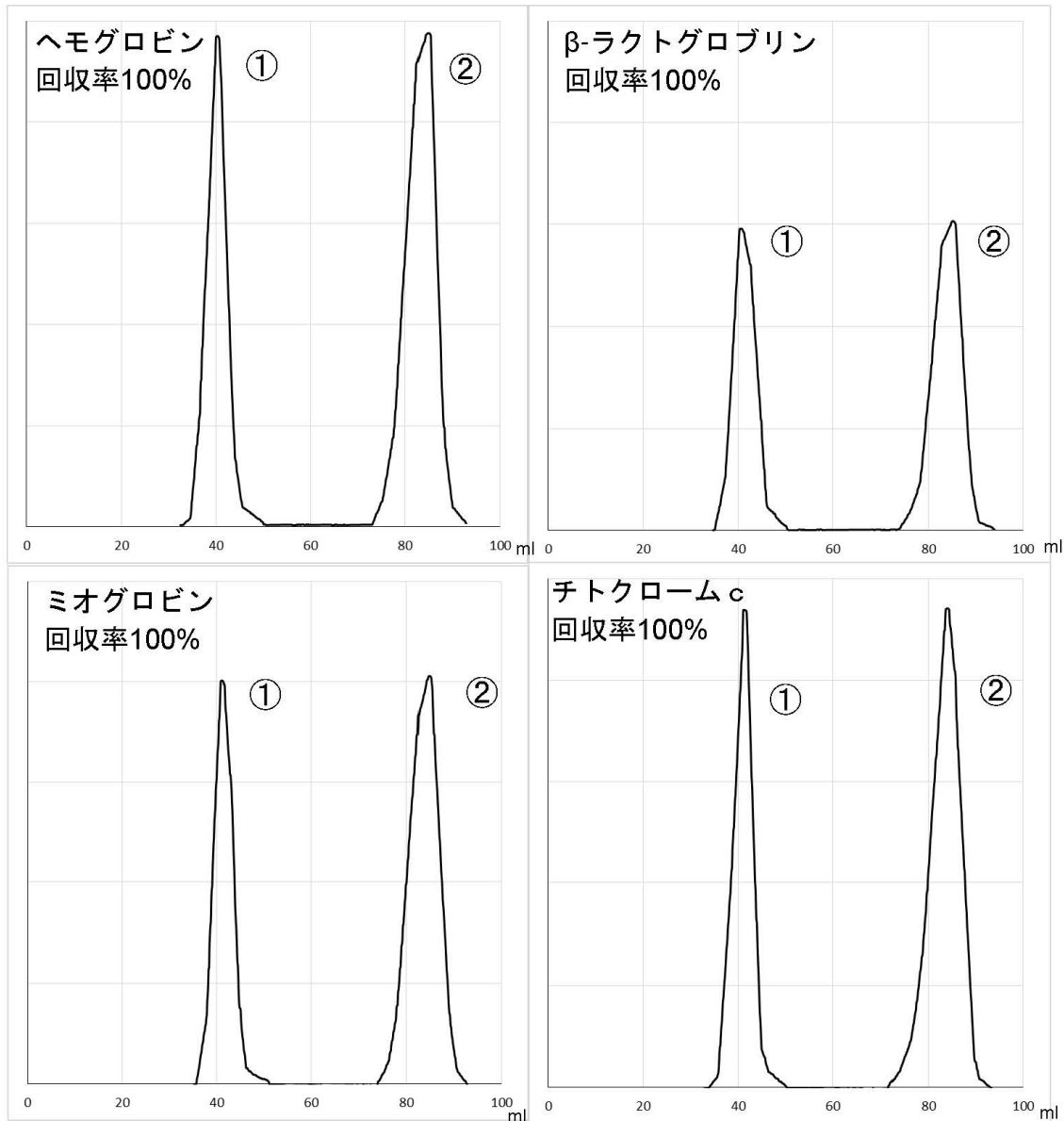
2. リゾチームからの脱塩



カラム : 1.6 x 52cm (Vt = 104ml)
 ゲル : セルフラインGH-25
 試料 : 2 ml リゾチーム 30mg / 塩 150mg
 溶出液 : 0.05M ギ酸アンモニウム
 流速 : 42ml/hr (21cm/hr)
 検出 : RI

3. その他のたんぱく質の脱塩

ヘモグロビン、ミオグロビン、 β -ラクトグロブリン、チトクロームcと塩化ナトリウムの分離例を示した。これらのたんぱく質と塩化ナトリウムの分離は非常にシャープでしかもほぼ100%の回収率を得た。



カラム : 1.5 x 49 cm (Vt = 86 ml)

ゲル : セルフラインGH-25

試料 : 2 ml ①たんぱく質50mg、②NaCl 250mg

溶出液 : 0.05M ギ酸アンモニウム

流速 : 30 ml/hr (17 cm/h)

検出 : A280nm(たんぱく質)、硝酸銀滴定法 (NaCl)

4. ヒト血清アルブミン製造工程中に含まれるアルコールの除去

アルコール分画したアルブミンからアルコールを除く工程は、製品を医薬品等に使用する場合特に重要である。セルファインGH-25を使用して、種々の条件を検討した結果を表2に示した。特にNo. 3, 4, 6の実験ではエタノールの含量が0.001%以下になっており、しかもアルブミンの回収率はほとんど100%である。全ての実験を通して従来のゲルろ過剤より良好な結果を得た。

表2 ヒト血清アルブミンからのエタノールの除去

分離条件(室温)							
Exp.No.	1	2	3	4	5	6	7
カラムID(cm)	5	5	2.6	2.6	5	5	2.6
カラム長(cm)	68	67	82×3	82×3	76.5	76.5	26.6
ベット体積[Vt](ml)	1335	1316	1306	1306	1502	1502	141.2
流速(ml/h)	570	2010	560	440	2010	590	1014
線速(cm/h)	29.03	102.4	105	83	102.4	30.05	191
1サイクルの時間(h)	2.3	0.7	2.3	3.0	0.7	2.5	0.1
試料							
Exp.No.	1	2	3	4	5	6	7
sampl Vol. [Vs] (ml)	310	310	310	400	360	360	34
Vs/Vt (%)	23	24	24	31	24	24	24
アルブミン濃度(%)	12	12	12	12	12	12	12
エタノール濃度(%)	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
結果							
Exp.No.	1	2	3	4	5	6	7
回収液量[Vs'] (ml)	546	525	403	477	550	550	46
Vs'/Vs	1.76	1.69	1.30	1.19	1.53	1.53	1.35
回収アルブミン濃度(%)	6.6	6.9	9.0	9.9	7.4	8.0	8.5
残存エタノール濃度(%)	0.002	0.010	<0.001	0.001	0.023	0.001	0.002
アルブミン回収率(%)	97	97	98	98	94	102	96

次に9℃と0℃で行った実験結果を表3に示した。No. 12, 13, 14の実験は同一条件で他社製品を使った比較データである。残存エタノール濃度において、セルファインGH-25の方が遥かに優れていることがわかる。

表3 ヒト血清アルブミンからのエタノールの脱塩(低温の場合)

分離条件(9℃)							
Exp.No.	8	9	10	11*	12	13	14
ゲル	JNC	JNC	JNC	JNC	他社	他社	他社
カラムID(cm)	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
カラム長(cm)	53.3	53.2	53.1	52.8	53.3	52.2	51.2
ベット体積[Vt](ml)	429	428	427	425	429	420	412
流速(ml/h)	70	255	544	291	70	255	544
線速(cm/h)	9	32	68	36	9	32	68
1サイクルの時間(h)	6.1	1.7	3.6	6.8	6.1	1.6	0.8
試料							
Exp.No.	8	9	10	11*	12	13	14
sampl Vol. [Vs] (ml)	86	86	86	86	86	86	86
Vs/Vt (%)	20	20	20	20	20	20	21
アルブミン濃度(%)	12	12	12	12	12	12	12
エタノール濃度(%)	10	10	10	10	10	10	10
粘度(cp at 9℃)	6	6	6	10	6	6	6
結果							
Exp.No.	8	9	10	11*	12	13	14
回収液量[Vs'] (ml)	139	146	149	144	141	148	147
Vs'/Vs	1.62	1.70	1.73	1.67	1.64	1.72	1.71
回収アルブミン濃度(%)	7.4	7.0	6.8	7.5	7.2	6.8	6.7
残存エタノール濃度(%)	0.007	0.006	0.012	0.002	0.014	0.032	0.097
アルブミン回収率(%)	100	99	98	105	98	98	95

* サンプル温度 -7℃ (13cp) ゲルろ過時温度 0℃ (10cp)

5. セルファインGH-25による大量脱塩

セルファインGH-25による脱硫酸アンモニウムの実験例を表4に示した。試料の負荷率は32%で、アルブミンの回収率は98%、硫酸アンモニウムはほぼ完全に除去された。しかも試料の希釈率は1.14倍以内であった。これらの結果から、セルファインGH-25は大量処理においても、従来のゲルろ過剤に比べ優れていることがわかる。

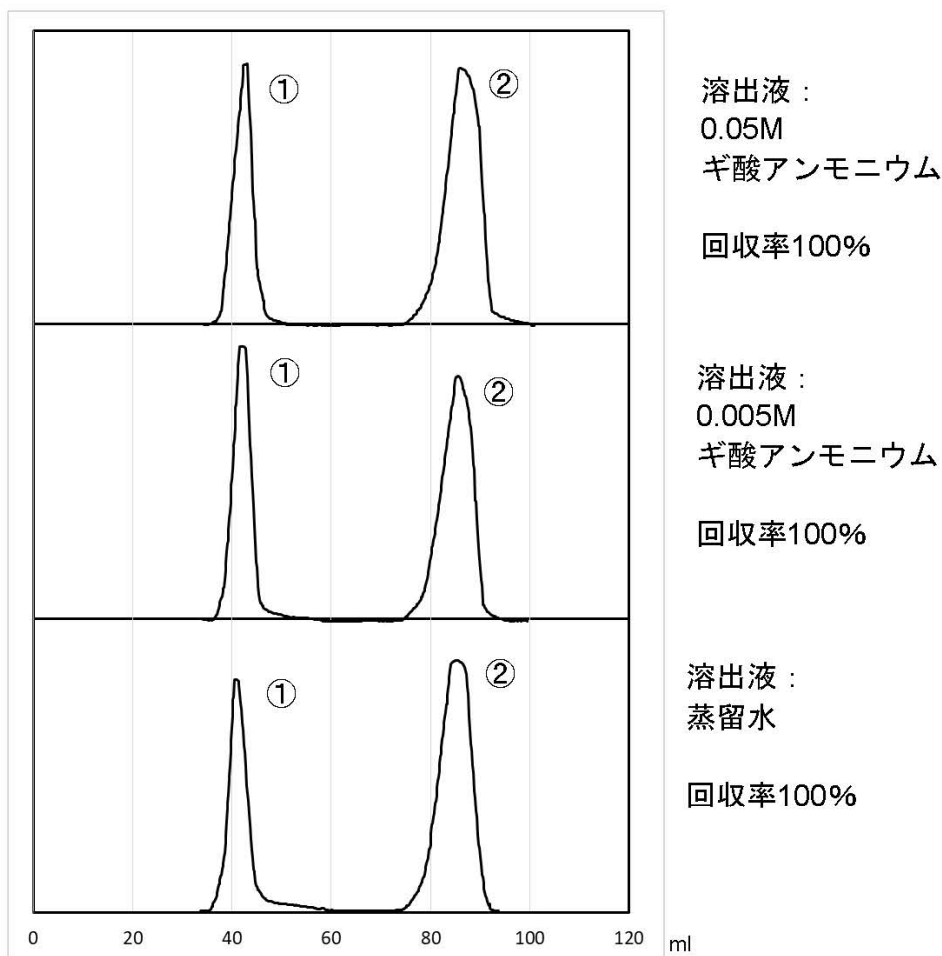
表4 GH-25によるアルブミンからの硫酸アンモニウムの脱塩

分離条件				
Exp.No.	1	2	3	4
カラムID (cm)	14	14	14	14
カラム長 (cm)	87	87	87	87
ベット体積[Vt] (L)	13	13	13	13
流速 (L/h)	6.7	13.5	6.7	13
線速 (cm/h)	44	88	44	84
1サイクルの時間 (h)	2.0	1.0	5.7	2.9
操作圧力 (MPa)	0.02-0.05	0.09-0.1	0.03-0.04	0.06-0.08
試料				
Exp.No.	1	2	3	4
sampl Vol. [Vs] (L)	4.3	4.3	4.3	4.3
負荷率Vs/Vt (%)	32	32	32	32
処理能力 (L/h)	2.2	4.3	0.8	1.5
アルブミン濃度 (%)	5.6	5.6	5.6	5.6
硫酸濃度 (%)	24	24	24	24
結果				
Exp.No.	1	2	3	4
回収液量[Vs'] (ml)	4.7	4.8	4.9	4.9
希釈率Vs'/Vs	1.09	1.12	1.14	1.14
回収アルブミン濃度 (%)	5.0	4.9	4.8	4.8
残存硫酸濃度 (%)	0.007	0.011	0.021	0.038
アルブミン回収率 (%)	98	98	98	98

脱塩に及ぼす諸条件の影響

1. 溶出液の塩濃度

使用する溶出液の塩濃度については特に制限はない。実験例で示すように、比較的吸着性の強いリゾチームを水で溶出した場合でもほとんど吸着されず、溶出の遅れも見られなかった。



カラム : 1.5x50cm (Vt=88ml)

ゲル : セルフラインGH-25

試料 : 2ml ①リゾチーム 25mg ②塩化ナトリウム 125mg

流速 : 33ml/hr (18.6 cm/hr)

検出 : A280nm(リゾチーム) 硝酸銀滴定法 (NaCl)

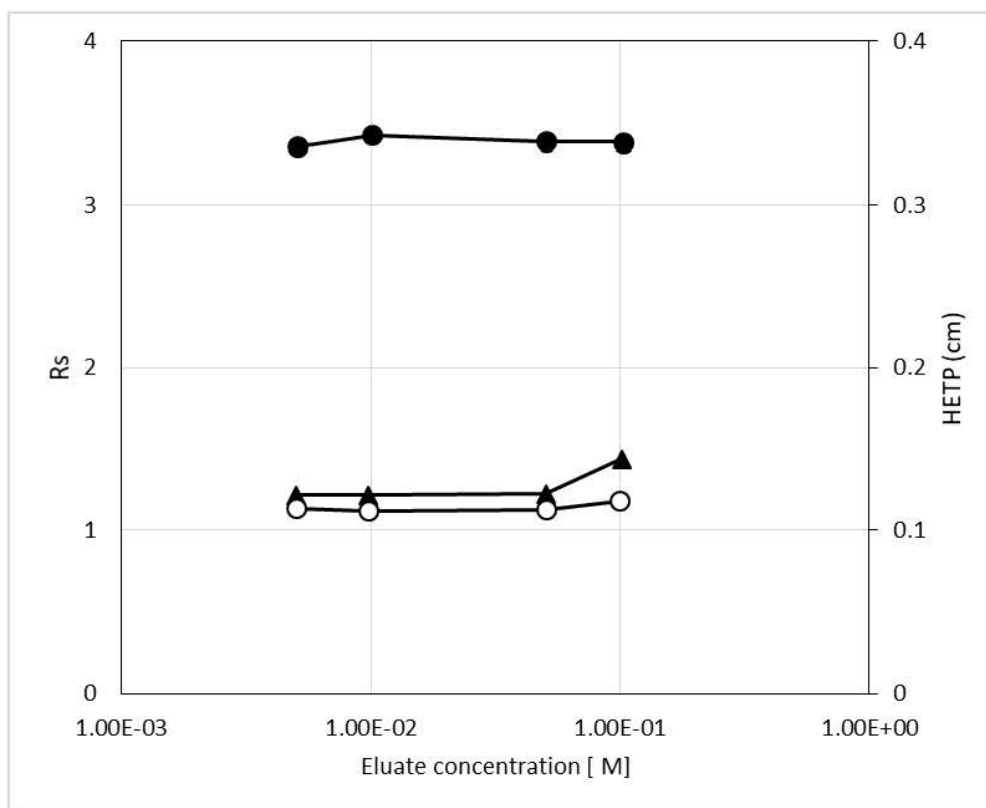
さらに溶出液の塩濃度と理論段数高さ(HETP)及び分離度(Rs)の関係を実験値より求めグラフで示した。ギ酸アンモニウム濃度を変えても両パラメータに変化ほとんどない。

$$HETP = L \times 16 \times (W / 4V_e)$$

L: カラムの長さ, V_e : 溶出液量, W: 溶出ピークの幅

$$R_s = 2(V_2 - V_1) / (W_1 + W_2)$$

V_1, V_2 : 溶出1, 2の溶出液量, W_1, W_2 : ピーク1, 2の幅

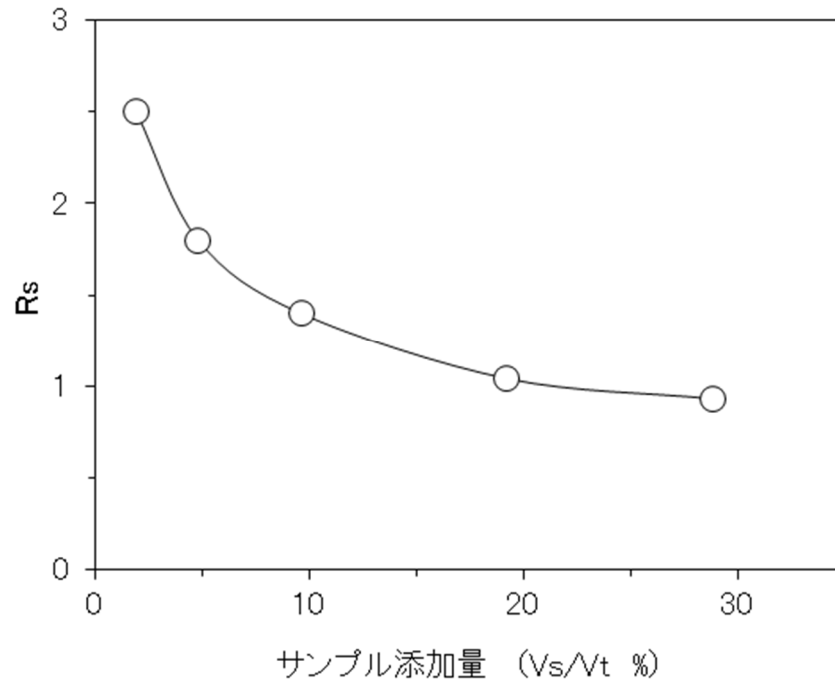


(実験条件)

カラム	: 1.6 × 52 cm (104 ml)
ゲル	: GH-25
試料	: 2 ml (リゾチーム 30 mg / 硫安 150 mg)
流速	: 40 ml / h (20 cm / h)
検出	: 示差屈折計

2. 試料の容量

工業的に脱塩を行う場合、ゲル容積の10%以上の試料容積を添加することが多い。試料の容量と分離度（Rs）の関係をグラフで示したが、ゲル容量の30%の試料を添加しても十分に分離できることがわかる。

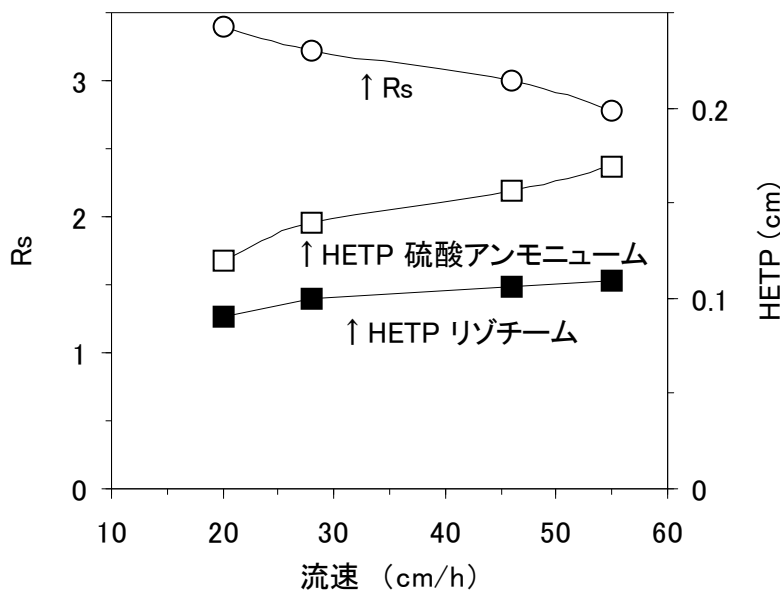


(実験条件)

カラム	: 1.6 × 52 cm (104 ml)
ゲル	: GH-25-m
試料	: (リゾチーム 1.5% / 硫安 7.5%)
溶出液	: 0.05M ギ酸アンモニウム
流速	: 40 ml/h (20 cm/h)
検出	: 示差屈折計

3. 流速

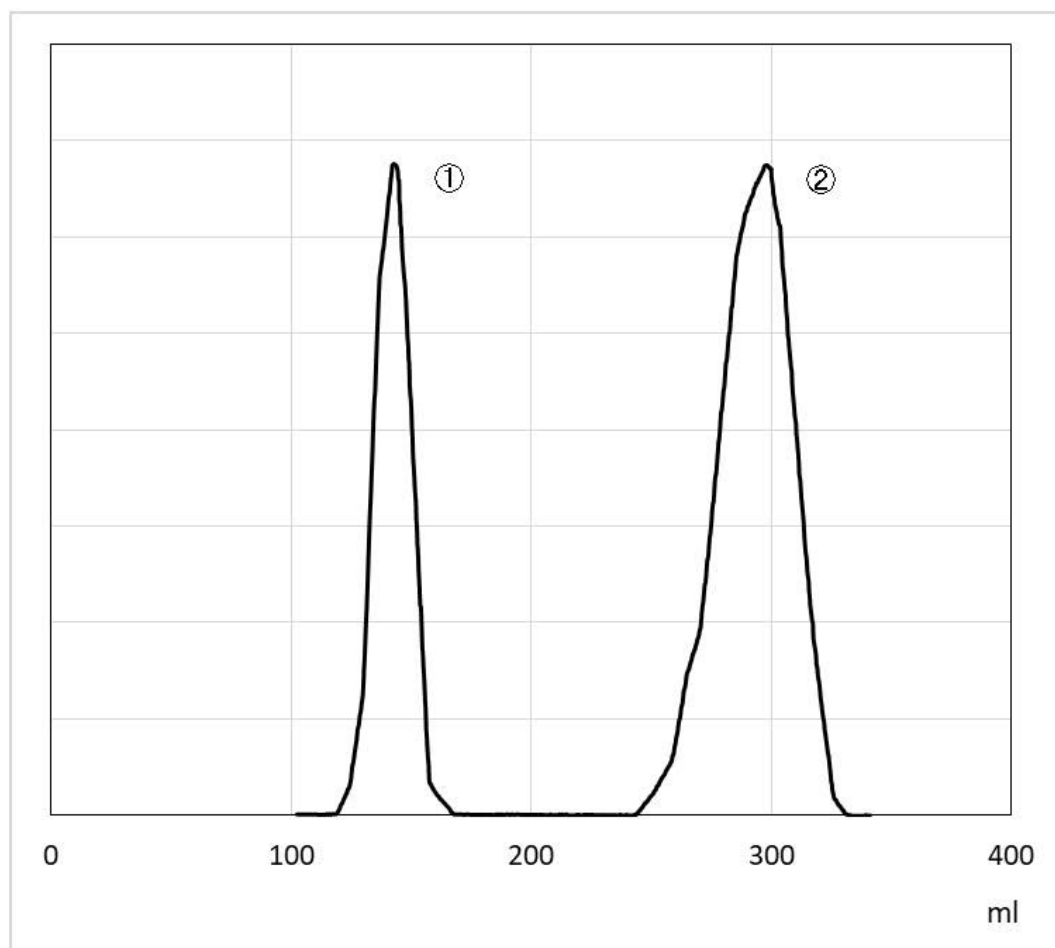
セルファイン GH-25 は従来のゲルに比較して非常に高い流速が得られるのが大きな特徴である。ゲルろ過では普通、10~60 cm/hr 程度の流速で行われることが多く、流速が速くなると分離が悪くなる。以下に流速と分離度および HETP の関係を示したが、セルファイン GH-25 は60 cm/hr 以下の流速では分離度および HETP に大きな変化はなく、高流速下でも十分に脱塩可能であることを示している。



(実験条件)

カラム	: 1.6 × 52 cm (104 ml)
ゲル	: GH-25-m
試料	: 2 ml (リゾチーム 30 mg / 硫酸アンモニウム 150 mg)
溶出液	: 0.05M ギ酸アンモニウム
検出	: 示差屈折計

次に超高速下でのアルブミンの脱塩結果を下図に示すが、所要時間約25分、牛血清アルブミンも塩化ナトリウムも回収率ほぼ100%で完全に分離されている。



(実験条件)

カラム	: 2. 2 × 90 cm (342 ml)
ゲル	: GH-25
試料	: 10 ml (①BSA 375 mg / ②NaCl 1,875 mg)
溶出液	: 0.05M ギ酸アンモニウム
流速	: 850 ml/h (224 cm/h)
検出	: BSA A280nm / NaCl 硝酸銀滴定法
