

セルファイン MAX 疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤の

カラム充填方法

セルファイン MAX 相互作用クロマトグラフィー充填剤はセルファインの次世代のクロマトグラフィー充填剤である。真球状のセルロース粒子に新しい架橋方法を用いているため、物理的強度が高い特長を持つ。このため高流速でのクロマトグラフィー操作が可能である。セルファイン MAX 疎水性相互作用クロマトグラフィーのラインナップには MAX ブチル、MAX フェニル、MAX フェニル LS がある。これらの疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤は、例えばプロテイン A 担体後の dsDNA などのポリッシング精製など様々な用途に使用できる。またセルファイン MAX 疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤は物理的強度が高く、化学的に安定的なセルロース粒子を使用しているため、少量ラボスケールから大型カラムを使用した製造スケールまで幅広く使用することができる。

フローパッキングの手順（直径 30 cm カラムまで）

- 1) カラム体積 < 1 L の場合：必要量の充填剤スラリーをガラスフィルターでろ過して、5 倍容量の純水で 3 回洗浄する。この操作で保存液を除去する。洗浄は必要に応じてバッファを用いても良い。
- 2) カラム体積 > 1 L の場合：製品ボトルを静置することで充填剤を十分に沈降させた後、保存液をデカンテーションで取り除く。その後、純水を加えてスラリー状に懸濁させる。再び静置させて充填剤を十分に沈降させた後、上清を取り除く。この操作を 2~3 回繰り返して保存液を置換する。同時にカラムの流路も洗浄しておく。
- 3) 最後の洗浄が完了したら、50~60% のスラリーになるようにパッキング用のバッファを加えて懸濁する。
- 4) 自然沈降体積を測定するために、スラリーの一部を 50mL メスシリンダーに入れて、4 時間以上または終夜で静置する。自然沈降体積を測定して正確なスラリー濃度を計算する。計算式は以下の通り。
スラリー濃度% = 自然沈降カラム体積 / 全体積

- 5) スラリー濃度が 50% になるようにパッキング用バッファ量を調節する。

- 6) カラムに充填する 50% スラリー量は以下の計算式で算出できる。

$$50\% \text{スラリー量} = (\text{目標カラム体積} \times 2) \times (Cf)$$

Cf はコンプレッションファクターで、以下の式で導かれる。

$$Cf = \text{自然落下沈降体積} / \text{パッキング体積}$$

例えば、100mL のカラム体積に充填する場合、Cf が 1.15 で最適なパッキング結果が得られる場合、必要なスラリー量は以下の通り計算できる。

$$(100 \times 2) \times 1.15 = 230 \text{ mL}$$

- 7) 下部アダプターを所定の位置に取り付ける。カラム底部を開けた後、バッファをカラムに加えながら、下部フィルターに残存している空気をシリンジやポンプで除く。空気が入らないようにバッファはカラム底部から 1cm 程度は残して置くと良い。

- 8) 必要に応じて、リザーバーをカラムの上部

に設置した後、スラリーの全量をカラムに加える。

Note: 均一な充填を達成するために、スラリーは一気にカラムに加えること。

9) カラム底部のエンドフィッティングを閉める。

10) 空気がゲル内に入り込まないように注意しながらスラリーを一気にカラム内に注ぎ込む。

11) カラム底部のエンドフィッティングを開けてゲルを沈降させる。ゲルが沈降すると、充填用バッファよりもゲルの方が早く沈降するため液面が透明になる。2~3 cm までバッファが透明になったらカラム底部のエンドフィッティングを閉じる。

12) 注意深くバッファをカラム上部まで満たす。このとき沈降しているゲルが浮き上がらないようにする。

13) 上部アダプターの準備をする。シリンジなどを利用して上部アダプターの流路に存在するすべての空気を除去して充填用バッファで満たしておく。

14) パッキングバッファを 200 cm/h で 30~60 分通液して充填剤を圧縮していく。

Note: この段階ではカラムの背圧*が 0.25~0.30 MPa になるように流速を調節すること。

この流速は安定的なカラムパッキングを保証するために、充填後の操作流速よりも高流速である必要がある。

*この圧力は充填剤を含むカラムシステム全体の圧力である。充填剤にかかる圧力を確認するには、事前に充填剤を加えない条件でカラムを組み立てて背圧を確認しておくことと良い。圧力損失はカラム入口側の圧力計で測定すること。

16) ゲルの高さが安定した後、通液を止める。次いで流入口を閉じる。その後カラム上部アダプターから充填用バッファが流れるように流路を変更する（上部アダプターは外さないこと）。ゆっくりと上部アダプターを下げていくと空気と充填用バッファがあふれてくるようになる。上部アダプターを充填剤の表面の位置まで下げていく。

17) 充填用バッファがカラムに通液できるようにした後、カラム底部のエンドフィッティングを開けて流速 30~800cm/h で通液する。上部アダプターよりもベッドが縮む場合、上部アダプターを下げて調節する。

18) 最終的なカラム高さからカラム体積を計算する。計画していたカラム体積より多い場合、上部アダプターを下げて調節していく。カラム体積は目標とするカラム体積に近づけるべきである。一方で計画していたカラム体積よりも低い場合、カラムに投入する前に調製したスラリー濃度が薄い、ゲルが圧縮されすぎてコンプレッションファクターが計算よりも高くなっている可能性がある。

19) カラムパッキングを評価するために、HETP およびアシンメトリー (As) を求める。カラム体積の 1% 液量の 2% アセトン（純水に溶解）または 1M 塩化ナトリウムを 30cm/h の流速でカラムに通液する。

ピーク形状から HETP とアシンメトリー (As) を算出して評価する。As が 0.8~1.4 かつ還元理論段数 RPH が 2~3 であれば問題ない。

20) カラム充填後にカラムを通液してコンディショニングすることができる。例えば上部入口から 0.25~0.30 MPa の操作圧力で、30~60 分通液した後、逆に出口側から同様に通液する。この操作によってより均一な充填が可能となる。

また逆洗浄は定置洗浄にも使用できる。カラム上部フィルターに不純物が堆積した場合に逆洗浄することで効果的に定置洗浄ができ

る。この操作は 5~10 サイクルの使用後に使用することを推奨する。

内径 10 cm カラムでのセルファイン MAX ブチルの充填事例

- カラム： 10 cm ID x 50 cm L
- カラム高さ： 23 cm
- 充填方法： 50%スラリー液を 0.30 MPa の圧力で充填
- Cf 値 1.15、1.18、1.20、1.22、1.25 で充填
- 充填バッファー： 0.5M NaCl
- 充填方法： 50%スラリー液を 0.25~0.30 MPa の圧力で充填
- 評価方法： カラム体積の 1%量の 1M NaCl を通液して評価

カラム充填効率を表 1 に示す。また溶出ピークを図 1 に示す。

表 1 MAX ブチルのカラム充填効率

Cf	N [m ⁻¹]	As	RPH
1.150	5100	1.28	2.17
1.175	5200	1.22	2.15
1.200	5100	1.23	2.17
1.215	5100	1.24	2.17
1.245	5000	1.25	2.21

N：理論段数、As：ピーク非対称性、RPH 還元理論段数

粒径：90 μm

図 1 溶出ピーク

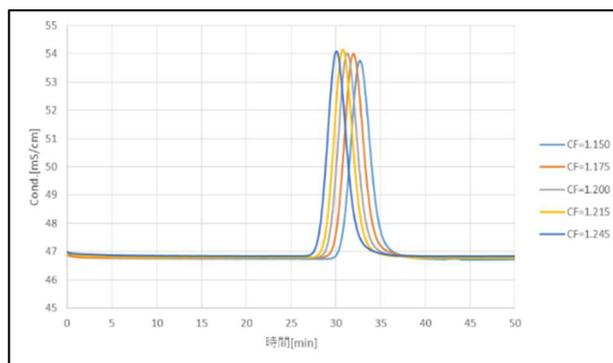
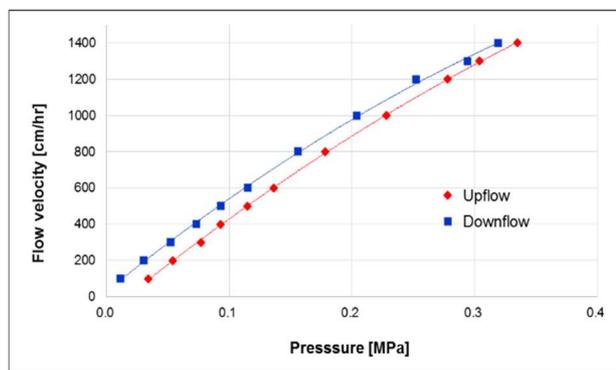


図 2 ではセルファイン MAX ブチルの内径 10cm カラムにおける流速特性を示している。移動相はアップフロー（下部アダプターより通液）およびダウンフロー（上部アダプターより通液）で通液して比較した。

図 2 MAX ブチルの流速特性（内径 10cm カラム*）



* カラム高さ 19.8 cm

セルファイン MAX ブチルを内径 10cm x カラム高さ 23cm のカラムに異なる Cf 値で充填した。このときのピーク非対称性 (As) は 1.22~1.28 であった。これらのカラムにおいてはいずれも 0.3 MPa の圧力で 1200 cm/h の流速で通液することができた。

内径 10 cm カラムでのセルフライン MAX フェニル/フェニル LS の充填事例

- カラム： 10 cm ID x 50 cm L
- カラム高さ： 19.8 および 21.9 cm
-
- 充填方法： 50%スラリー液を 0.20、0.25、0.30 MPa の圧力で、30 分間通液して充填
- Cf 値 1.10 で充填
- 充填バッファー： 0.5M NaCl
- 評価方法： カラム体積の 1%量の 1M NaCl を通液して評価

カラム充填効率を表 2 に示す。

表 2 MAX フェニルのカラム充填効率

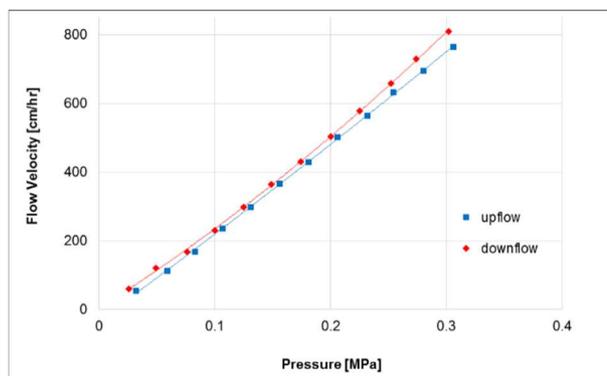
圧力[MPa]	N [m ⁻¹]	As	RPH
0.30	4200	1.25	2.65
0.25	4200	1.31	2.62
0.20	4100	1.35	2.72

粒径: 90 μm

図 3 ではセルフライン MAX フェニル（パネル A）およびセルフライン MAX フェニル LS（パネル B）の内径 10 cm カラムでの流速特性を示している。カラムは 0.3 MPa で 30 分通液した後、Cf 値 1.10 で圧縮した。

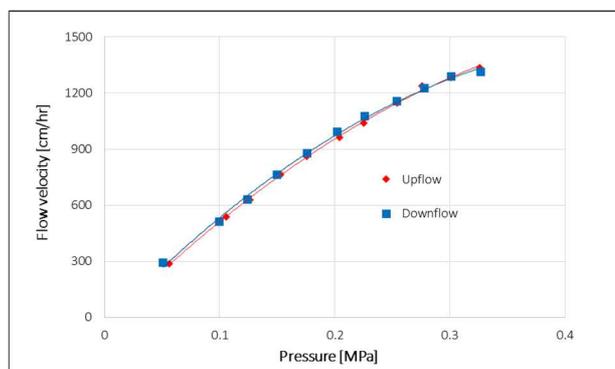
図 3 MAX フェニルの流速特性（内径 10cm カラム）

(A) MAX フェニルの流速特性



カラム高さ 19.8 cm (Cf 1.10)

(B) MAX フェニル LS の流速特性



カラム高さ 21.9 cm (Cf 1.05)

セルフライン MAX フェニルを内径 10cm x カラム高さ 19.8cm のカラムに異なる Cf 値で充填した。このときのピーク非対称性 (As) は 1.25~1.35 であった。セルフライン MAX フェニルの場合、0.3 MPa の圧力で 800 cm/h の流速で通液することができた。またセルフライン MAX フェニル LS の場合、0.3 MPa の圧力で 1200 cm/h の流速で通液することができた。

結論

このテクニカルノートではカラム直径 10cm、高さ 20cm の大型カラムを用いたセルファイン MAX 疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤の最適な充填方法に関して解説した。わずかにテーリングは見られたものの良好なピーク非対称性はコンプレッションファクター-Cf 値 1.15~1.25 の圧縮条件で達成できた。カラム直径 10 cm の大型カラムを用いた場合、セルファイン MAX フェニルでは 0.3 MPa 以内の圧力で 800 cm/h の流速を通液することができた。一方でカラム直径 10 cm の大型カラムを用いた場合、セルファイン MAX フェニル LS では 0.3 MPa 以内の圧力で 1200 cm/h の流速を通液することができた。セルファイン MAX 疎水相互作用クロマトグラフィー充填剤は物理的強度が高く、ラボカラムから産業用途の大型カラムまで簡単に充填できる特長を持つ。

ご注文の案内

製品	容量	カタログ No.
セルファイン MAX プチル	1 mL x 5 (ミニカラム)	21100-51
	5 mL x 1 (ミニカラム)	21100-55
	100 mL	21100
	500 mL	21101
	5 L	21102
	10 L	21103
セルファイン MAX フェニル	1 mL x 5 (ミニカラム)	20700-51
	5 mL x 1 (ミニカラム)	20700-55
	100 mL	20700
	500 mL	20701
	5 L	20702
	10 L	20703
セルファイン MAX フェニル LS	1 mL x 5 (ミニカラム)	20800-51
	5 mL x 1 (ミニカラム)	20800-55
	100 mL	20800
	500 mL	20801
	5 L	20802
	10 L	20803

ご購入/技術サポート

(北米)

JNC America Incorporated

555 Theodore Fremd Avenue, Suite C-206

Rye, NY 10580 USA

TEL: 914-921-5400

FAX: 914-921-8822

E-mail: cellufine@jncamericany.com

(日本、アジア、その他)

JNC株式会社

ライフケミカル事業部

〒100-8105

東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル9階

Tel: 03-3243-6150

Fax: 03-3243-6219

E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

JNC 株式会社

ライフケミカル事業部

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>