

# E302

## モノリスクロマトグラフィー分離特性の推定

(山口大) (学)西隅由樹子 (学)阿部光代 (正)吉本則子 (正)山本修一\*

【緒言】クロマトグラフィーはタンパク質、DNA、バイオナノ粒子などの分離方法として重要である。通常のクロマトグラフィーでは充填剤細孔内拡散が分離性能を支配し、特に巨大バイオ分子では分離時間を長くする必要がある。対流貫通孔を主体とした一体材料であるモノリスを用いると流速に依存しない分離方法が可能となるが、その機構はよくわかっていない。本研究では、モノリスクロマトグラフィーの分配係数とピーク幅を解析することにより、分離機構を検討した。

【実験】主としてイオン交換基 [陰イオン交換基 QA 基、陽イオン交換基 SO<sub>3</sub> 基] が導入された disk 形状のポリマーモノリス(CIM monolith disk, BIA Separations)を使用した。標準型サイズ( $d_c=1.2$  cm,  $Z=0.3$  cm,  $\epsilon=0.62$ ,  $V_i=0.34$  mL)、ミニサイズ( $d_c=0.52$  cm,  $Z=0.495$  cm,  $\epsilon=0.62$ ,  $V_i=0.1$  mL)である。比較のため多孔性微粒子充填カラム Resource 15 ( $d_c=0.64$ cm,  $d_p=15$   $\mu$ m,  $Z=3.0$  cm,  $\epsilon=0.39$ ,  $V_i=0.965$  mL)を用いた。サンプルとして 95 mer までの合成 DNA(poly A, poly T)や標準タンパク質を使用した。NaCl 塩濃度直線勾配溶出実験を AKTA (purifier or explorer)で実施し、得られた溶出曲線を既に報告しているモデルで解析した[1]。

【結果と考察】典型的な直線勾配溶出曲線を Fig.1 に示す。DNA が大きくなってもピーク幅はむしろ狭くなっている。この現象をモデルによって解析した[1]。勾配溶出曲線のピーク位置での塩濃度  $I_R$  と規格化した塩濃度勾配  $GH$  は Fig.2 で示すように両対数プロットで直線となる。この関係から吸着サイト数  $B$  が求まり、さらに分配係数  $K$  の塩濃度依存性が次式により表される。

$$K=AI^B \quad (1)$$

$B$  は DNA の分子量  $M_w < 10000$  では多孔性カラムとほぼ同じ値となり、 $M_w > 10000$  では非常に大きな値になった(Fig.3)。mini-disk でも同様の結果が得られた。非常に大きな  $B$  値のためカラム内移動時間が短く、鋭いピークになることがわかった[1]。溶出ピーク幅  $W_v$  から(2)式により HETP を算出し[2]、ピーク位置での分配係数  $K_R$  との関係性を Fig.4 に示した[1]。 $K_R$  に依らず一定 HETP を予想したが、 $K_R$  が小さいところで HETP が大きくなった。 $W_v$  は  $K_R$  が小さいところでは非常に小さくなり、死容積による分散の寄与が無視できないためと考えられ、今後精密に査定する必要がある。

$$HETP = (Z/L^2)(W_v/V_R)^2/16 \quad (2)$$

$$L = \begin{cases} \frac{\sqrt{M}}{3.22M} & (M < 0.25) \\ \frac{1+3.13M}{0.95} & (0.25 < M < 4) \\ & (M > 4) \end{cases} \quad M = \frac{1}{2} \cdot \frac{1+HK_R}{1+HK'} \cdot \frac{B+1}{B}$$

$$V_R' = V_0(1+HK_R)$$

以上の結果から、モノリスクロマトグラフィーは、大きなタンパク質、DNA、ウイルス、ウイルス様粒子などのバイオナノ粒子の分離に適していると考えられる。また、0.1mL までの小型化が容易であることや、96 穴マイクロプレート形状が可能であることも[3]、プロセス設計の加速には有利である。

Reference [1] S. Yamamoto et al., J.Chromatogra.A,1216(2009)2612  
 [2] M.D.LeVan, G.Carta. C.M.Yon, Perry's Chemical Engineering Handbook, p.16-44(2003)  
 [3] N.Yoshimoto et al., J.Chem.Eng.Jpn,41(2008)200

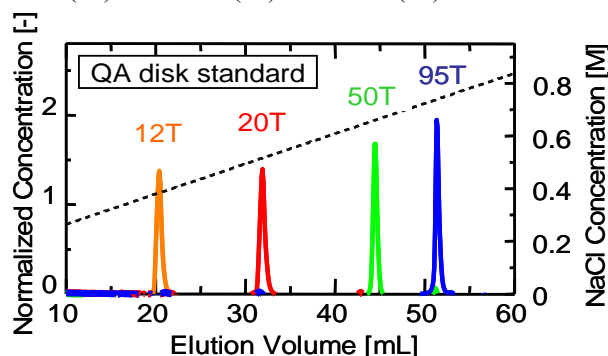


Fig.1 DNA の勾配溶出曲線流(CIM QA standard, sample poly T)

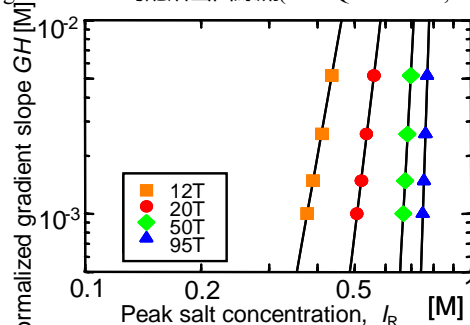


Fig.2 DNA の GH-I<sub>R</sub> 曲線(CIM QA standard, sample poly T)

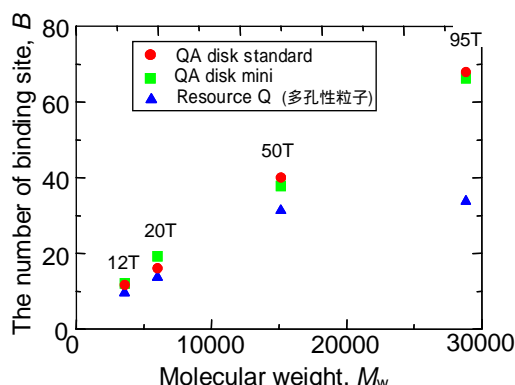


Fig.3 吸着サイト数と DNA 分子量の関係(sample single strand-poly T)

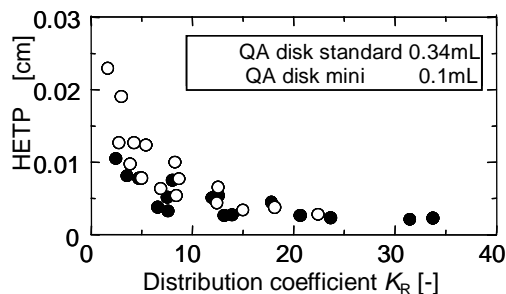


Fig.4 勾配溶出の HETP と  $K_R$  の関係 (sample poly T)

**Symbols**  $A$ : 比例定数[-],  $B$ : 吸着サイト数[-],  $d_c$ : カラム内径 [cm],  $d_p$ : 充填剤粒子径 [ $\mu$ m],  $GH$ : 規格化した勾配 [M],  $H$ : 相体積比[-], HETP: 理論段相当高さ [cm],  $I_R$ : 溶出塩濃度 [M],  $K$ : 分配係数[-],  $K'$ : 塩の分配係数[-],  $K_R = I/I_R$  における  $K$ [-],  $L$ : ゾーン圧縮係数[-],  $M_w$ : 分子量,  $V_0$ : カラム空隙体積 [mL],  $V_i$ : カラム体積 [mL],  $W_v = 4\sigma_v$ : ベースラインピーク幅 [mL],  $Z$ : カラム高さ [cm],  $\epsilon$ : 空隙率[-],  $\sigma_v$ : ピーク標準偏差 [mL]

\*shuichi@yamaguchi-u.ac.jp fax 0836-85-9201