

学位論文要旨 (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	逆相液体クロマトグラフィー分離性能への温度の影響
氏名(Name)	野崎 晋也
<p>液体クロマトグラフィー (LC) 分離は、バイオ医薬品、機能性食品の製造において、その高い品質要求に応えるための重要な工程として位置づけられている。LC 分離操作は多くのパラメータを操作することにより分離性能をコントロールする。代表的なパラメータには例えば、流速、移動相組成、グラジエント条件、分離剤粒子径、カラムの長さなどがある。パラメータのひとつに温度があるが、他のパラメータと比較して、これまで十分に検討されてきたとは言い難い。LC 分離の温度依存性に関しては、HPLC など精密分離を目的とする分析・分取において温度の影響を評価した例はあるが、試料の分離剤への吸着挙動の解析等に留まっており、分離性能を最大化する最適温度を求めた例はほとんどない。製造用の分取クロマトグラフィーでの温度の最適化検討の報告も前例はほとんどない。実際の物質生産プロセスにおける分取 LC 操作でも、コントロールされている例は極めて少ない。分取 LC で温度コントロールを行っている例としては、糖類の陽イオン LC 分離工程において、微生物の増殖抑制、移動相や試料の粘度を低下させる目的で実施されている例等があるが、非常に限られている。しかし温度が LC 工程における物質移動、移動相、試料の粘度などに影響を与え、最終的に分離性能、生産性に影響を与えることは明らかである。また、温度はパラメータとして魅力的である。測定が容易である、工程に新たな化合物を加えない、環境負荷が大きい有機溶媒の使用量を低減できる、などが理由である。以上から、LC 分離における温度条件、特に生産性を最大化する最適な温度を考えることは、生産性向上、環境負荷低減の面からも産業利用上、極めて有用であると考えられる。</p> <p>本研究では、モデル分離系として、実際の機能性食品製造に使用されているクロマトグラフィーの固定相であるポリスチレンジビニルベンゼン (PS-DVB) 由来の分離剤による、エタノール-水系でのポリフェノール類の 2 成分分離系を用い、LC 分離への温度の影響評価、及び最適温度の決定法の検討を実施した。</p> <p>最初に 1 章では、序論として本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。</p> <p>第 2 章では、モデル系の等組成溶出 LC に与える温度の影響について簡便に評価する方法を開発した。15-45°C の幅広い温度域での HETP の値は、無次元化した HETP と無次元化した流速のプロットによる単一の曲線で、良好な相関で説明することができた。決定した相関式を用いて、温度依存性である分配係数 (distribution coefficient) と分子拡散係数 (molecular diffusion coefficient) を含む、単純化した分離度の式も決定した。温度による分離度の変化を解析したところ、溶媒濃度等の LC の条件によっては分離を最大化する温度が存在するが、最終的には分離は温度の上昇とともに緩やかに低下することが明らかとなった。また、温度の上昇とともに分離体積、分離時間共に減少するため、高温での LC はプロセスの経済性の面でメリットがあると考えられた。</p> <p>第 3 章では、第 2 章での解析の前提条件を実際の分離条件と同一とし、より複雑な計算により LC 分離の最適温度の決定を試みた。等組成溶出 LC 実験データを基に、生産性を最大化する温度の決定方法を開発した。移動相濃度が一定である条件下、分配係数、拡散係数を温度依存的な関数として決定し、それらを用いて最終的に分離度、生産性を温度の関数として決定した。これらの関数を用いて、まずは分離度が一定の条件下において、LC 工程の時間が最短となる条件決定を試みた。時間は工程時間、サイクル時間について計算し、それぞれについて最短となる温度と流速の組み合わせを決定することができた。さらに LC 工程の生産性を最大化する温度と流速の組み合わせを決定を試みた。生産性は、等分離条件下における LC 工程の、カラムの単位体積、移動相の単位体積、時間当たりの試料の処理量と定義した。計算の結果、明確な最適温度を決定することが明らかとなった。計算方法は簡単であり、産業上も有用であると考えられた。さらに計算を進めることにより、生産性を最大化する溶媒組成、温度、流速の組み合わせも決定することができた。今回開発した計算手法により、溶媒</p>	

様式 7 号 (第 12 条, 第 31 条関係)

(様式 7 号) (Format No.7)

組成、温度、流速のみならず、カラム長さ、分離剤粒子の粒子径が生産性に与える影響についても評価することが可能となった。温度のみならず、クロマトグラフィーの性能に影響を与える様々なパラメータの影響を総合的に評価できるようになったことは、産業上、価値の高いことであると考えられた。

第 4 章では、最後に結論として本研究によって得られた知見を整理し、今後の展望や課題について述べた。

<b>学 位 論 文 要 旨</b> (Summary of the Doctoral Dissertation)	
学位論文題目 (Dissertation Title)	Temperature effect on the separation performance of reversed phase liquid chromatography
氏 名 (Name)	Shinya NOZAKI
<p>Liquid chromatography (LC) separation is an important process in the manufacturing of biopharmaceuticals and functional foods, to meet the high quality requirements of them. LC separation performance is controlled by manipulating various parameters. Typical parameters include, for example, flow rate, mobile phase composition, gradient conditions, separation agent particle size, and column length. One of these parameters is temperature, which has not been well studied compared to other parameters. There are examples of study evaluating the effect of temperature in fine separations such as HPLC, mainly focusing on analyzing the adsorption behavior of samples to the separation agent. However, there are few examples of determining the optimal temperature to maximize separation performance. Furthermore, there are hardly any studies on the optimization of temperature in preparative chromatography for manufacturing. Even in actual production processes using preparative LC operations, there are very few examples of temperature control. Some limited examples include temperature control in ion exchange LC separation processes of sugars to prevent microbial growth and decrease the viscosity of mobile phases and sample. However, it is clear that temperature affects substance movement, mobile phases, and viscosity in LC processes, ultimately impacting separation performance and productivity.</p> <p>Temperature is also an attractive parameter for several reasons: it is easy to measure, not introducing new compounds into the process, and reducing the impact of environment by reducing the use of organic solvents. Therefore, considering the temperature conditions in LC separation, particularly the optimal temperature to maximize productivity, will be highly useful from an industrial perspective in terms of improving productivity and reducing environmental impact.</p> <p>In this study, we used a two-component separation system of polyphenols with an ethanol-water mixture as a mobile phase and a separation resin based on</p>	

polystyrene divinylbenzene (PS-DVB) as a stationary phase. The resin is the stationary phase used in actual functional food production. Using this model separation system, we try to evaluate the effect of temperature on LC separation and to develop the method to determine the optimal temperature.

Chapter 1 is an introduction, background and objectives of this study and outlined the structure of the paper.

In Chapter 2, we developed a simple evaluation method for assessing the effect of temperature on isocratic LC in the model system. The values of height equivalent to a theoretical plate (HETP) over a wide temperature range of 15-45°C could be well explained by a single curve plot of dimensionless HETP against dimensionless linear velocity, indicating a good correlation. We also determined simplified equations for separation factor that includes temperature-dependent distribution coefficients and molecular diffusion coefficients. Analysis of the changes in resolution with temperature revealed that there is an optimal temperature for maximizing resolution under certain LC conditions, but ultimately, resolution gradually decreases with increasing temperature. Additionally, both separation volume and separation time decrease with increasing temperature, suggesting the economic benefits of conducting LC at high temperatures.

In Chapter 3, we tried to determine the optimal temperature for LC separation by more complex calculations, assuming the same conditions as the actual separation conditions. We developed a method to determine the temperature that maximizes productivity based on experimental data from isocratic LC. Under conditions of constant mobile phase concentration, we determined temperature dependent distribution coefficients and diffusion coefficients, and used them to determine resolution and productivity as functions of temperature. Using these functions, we tried to determine the temperature and flow rate combination that minimizes the time for LC cycle under constant separation conditions. We were able to determine the combination of temperature and flow rate that minimizes the cycle time. Furthermore, we attempted to determine the combination of temperature and flow rate that maximizes the productivity of the LC process. Productivity was defined as the product amount per column volume, mobile phase volume, and time under isocratic conditions. The optimal temperature was determined by the calculation.

様式 7 号 (第 12 条, 第 31 条関係)  
(様式 7 号) (Format No.7)

The calculation method was simple and considered useful from an industrial perspective. By further advancing the calculations, we were able to determine the combination of solvent composition, temperature, and flow rate that maximizes productivity. The developed calculation method made it possible to evaluate the effect of not only solvent composition, temperature, and flow rate, but also column length and particle size of the separation agent on productivity. The ability to comprehensively evaluate the effects of various parameters that effect the performance of chromatography, including temperature, is considered highly valuable from an industrial perspective.

In Chapter 4, we summarized the findings obtained from this study as conclusions and discussed future prospects and challenges.

## 学位論文審査の結果及び試験, 試問の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	野崎 晋也
審査委員	主 査: 吉本 則子
	副 査: 田中 一宏
	副 査: 星田 尚司
	副 査: 吉本 誠
	副 査: 通阪 栄一
	副 査: 山本 修一
論文題目	逆相液体クロマトグラフィー分離性能への温度の影響 (Temperature effect on the separation performance of reversed phase liquid chromatography)
<p>【論文審査の結果及び試験, 試問の結果】</p> <p>液体クロマトグラフィー(LC)分離は、バイオ医薬品や機能性食品の製造において、高品質要求に対応するための重要な工程である。LC 分離性能は流速、移動相組成、カラム長さなど多くのパラメータにより支配される。温度も分離性能を向上できるパラメータであるが、製造用 LC においては十分に検討されていない。しかしながら、工程に新たな化合物を加えない、溶媒使用量を低減できる、などの利点により、最適な温度を決定する方法を確立することは産業上、極めて有用である。</p> <p>本研究では、モデル分離系として、実際の機能性食品製造に使用されているクロマトグラフィーであるポリスチレンジビニルベンゼン分離剤による、エタノール-水系でのポリフェノール類の 2 成分分離系を用い、LC 分離への温度の影響評価、及び最適温度の決定法の検討を実施している。</p> <p>1章では、本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示している。第2章では、モデル系の分離性能を記述するための重要なパラメータである拡散係数と分配係数を温度と移動相溶媒濃度の関数として定式化し、温度の影響について簡便に評価する方法を開発した。第3章では、より複雑な計算により、生産性を最大化する温度の決定方法を開発し、計算の結果、明確な最適温度を決定できることを明らかにした。さらに今回開発した計算手法を拡張することにより溶媒組成、温度、流速のみならず、カラム長さ、分離剤粒子径の影響についても評価することが可能となり、産業上、有用であることを示している。第4章では、本研究で得られた知見を整理し、今後の展望や課題を述べている。</p>	

(様式 14 号)

公聴会には、本学の教員・学生以外に製薬会社や化学会社から多数の研究者が参加し、多くの質問があった。

主な質問は、製造装置における温度の不均一性や、モデル式の単純化、吸着エンタルピーなどのパラメータの信頼性についてであった。

どの質問に対しても発表者からの確かつ明確に回答がなされた。

以上により本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに優れ、博士(生命科学)の論文に十分値するものと判断した。

試験および試問として、4 名の副査から以下の内容の課題が課された。

1. 化学工学の物質収支と熱収支の知識を問う課題
2. 酵素反応を応用するバイオリアクターの設計と操作を問う課題
3. クロマトグラフィーでの分離対象となる物質の、遺伝子工学的な生産技術を問う課題
4. 研究対象とした物質の DDS 技術を問う課題

これらの試問に対し、詳細な解答がレポート形式で提出され、また口頭試問に対しても満足のいく回答がなされた。さらに、語学については英文論文が発表されていること、業務で欧米の関連会社に短期出張およびビデオ会議をひんばんに行っていることから判断して、十分な外国語能力を有するものと判断した。

論文内容および審査会、公聴会での試問応答など総合的に判断して、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。

関連論文 計 3 編

(1) 著者氏名: Shinya Nozaki, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto

論文題目: A Simplified Method for Predicting the Effect of Temperature on the Separation Performance by Chromatography

学術雑誌名: Japan Journal of Food Engineering

巻・号・頁: Vol. 22, No.2, Page 15-22

DOI: <https://doi.org/10.11301/jsfe.21591>

発行年月: 2021 年 6 月

(2) 著者氏名: Shinya Nozaki, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto

論文題目: A Method for Determining the Optimum Temperature for Polyphenol Separation Process by Reversed Phase Chromatography

学術雑誌名: Japan Journal of Food Engineering

巻・号・頁: Vol. 25, No.1, Page 15-22

DOI: <https://doi.org/10.11301/jsfe.23636>

発行年月: 2024 年 3 月

(3) 著者氏名: Shinya Nozaki, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto

論文題目: Temperature Effect on the Separation Performance of Chromatography

学術雑誌名: Proceedings of IChES (International Chemical Engineering Symposia) 2022

巻・号・頁: Page 13-17

DOI: <https://doi.org/10.1252/iches.2022.004>

発行年月: 2022 年 2 月