

博士論文

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

2024 年 4 月

野崎 晋也

山口大学大学院創成科学研究科

目次

学位論文要旨	1
第1章 緒言	
1.1 背景	5
1.2 LC分離のパラメータとしての温度	6
1.2.1 分析LCにおける温度	7
1.2.2 分取LCにおける温度	8
1.3 食品分野におけるクロマトグラフィー精製	10
1.3.1 機能性食品	10
1.3.2 イオン交換樹脂と合成吸着剤	13
1.3.3 機能性食品素材のクロマトグラフィー分離例	15
1.4 本研究の目的と構成	22
引用文献	25
第2章 逆相クロマトグラフィー分離性能に温度が及ぼす影響の簡単な推算方法	
2.1 概要	27
2.2 実験方法と理論	28
2.3 結果及び考察	29
2.3.1 逆相クロマトグラフィー分離性能の向上	29
2.3.2 温度の関数としての HETP	31
2.3.3 温度の関数としての R_s	36
2.4 まとめ	38
引用文献	40
第3章 逆相クロマトグラフィーにおける最適温度の決定法	
3.1 概要	41
3.2 実験方法と理論	42
3.3 結果及び考察	43
3.3.1 温度の関数としての拡散係数と HETP	43
3.3.2 生産性を最大化する最適温度の決定	47
3.3.3 生産性を最大化する温度、溶媒組成、流速の組み合わせ	53

3.3.4	カラム層高が生産性に与える影響	55
3.3.5	粒子径が生産性に与える影響	57
3.3.6	リニアグラジエント溶出条件下での温度最適化	58
3.4	まとめ	59
	引用文献	61
	第4章 結言	62
	<i>Nomenclature</i>	64
	発表論文リスト	66
	謝辞	68

学位論文要旨

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。

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。

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。

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。

第3章では、第2章での解析の前提条件を実際の実験条件と同一とし、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の決定を試みた。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。

Summary of the Doctoral Dissertation

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. 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.

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 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 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. 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.

第1章 緒言

1.1 背景

液体クロマトグラフィー（LC）分離技術、吸着技術は医薬品、食品分野の製造において広く用いられている[1]。

医薬品製造においては、原薬、原料に求められる高い品質要求に応えるため、LC分離は広く用いられている。特にLC分離以外の分離精製手段の選択が困難であるバイオ医薬品の分野では、一連のLC分離プロセスがプラットフォーム化されて不可欠な工程となっている[2,3]。また、食品分野においても昨今の機能性食品の興隆により、食品素材の高度精製の需要が急速に高まっている[4,5]。

医薬品、食品分野における高度な品質要求に応えるためには、製造工程の精密な条件設定と、厳密な管理が求められる[5]。医薬品製造においてはGMP管理が求められてきた。食品製造においても欧米を中心に導入が進んだ食品の衛生管理方式であるHACCP（Hazard Analysis Critical Control Point）の義務化が日本で決まるなど、求められる管理レベルは上昇してきている[i]。最適な条件を設定することにより、高純度の目的物が得られるクロマトグラフィー工程は医薬品製造においても食品製造においても品質に直結する重要な工程であると位置づけられる。

医薬品、食品の製造においては不純物管理の観点から、製造工程において使用される化合物、添加物の数は少ない方が好ましい。LC分離工程においても同様であり、使用される化合物の数は最小限としつつ、各種パラメータを最適化し、管理することで所望の品質を実現する工程を構築する必要がある。

LC分離機構は移動相・固定相の二相間の吸着平衡と拡散係数などの物質移動を定量化することにより記述できる[1,6]。LC分離プロセスには、分離性能に影響を与える変数（パラメータ）がある。製造プロセス開発は、最適な分離を実現するためのパラメータの組み合わせを探索する活動と言える。

LC 分離工程のパラメータは、流速、移動相組成、グラジエント条件、分離剤粒子径、分離剤の官能基の種類と量、カラムの長さ、カラムの直径、工程 1 サイクルにおける処理量（目的物の負荷量）、温度など多岐にわたる。

温度はパラメータの一つであるが、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がたい。分析分野での精密分析 LC では分離を向上するために経験的に温度コントロールされているが、論理的にコントロールされているとは言いがたい。製造における分取工程においては、流速、グラジエント条件、移動相組成などは頻繁に操作変数として用いられるが、温度をコントロールして精密な条件の最適化を行った例はほとんどない。あったとしても、温度の影響の評価は試料と LC レジンの相互作用解析に留まっている。

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を減少できる可能性がある、などがその理由である。また温度は移動相、固定相の双方に熱力学的な変化を与えることは明らかであり、分析、分取工程のパラメータとして操作可能にすることには意義があると考えられる。医薬品、食品分野では一部のプロダクトは高温に対して不安定な生物化学品であるが、大部分のプロダクトは極端な温度設定を除けば幅広い温度域で安定である。そのため、LC 分取製造プロセスのコントロールに十分に温度を活用する余地があると考えられる。また、その際は分離だけでなく、生産性も含めて最適化を考えることで、本検討の工業的意義はより大きくなると思われる。

1.2 節では、これまでの検討事例を参考に、温度を LC 工程のパラメータとして操作することの有用性を考える。

1.3 節では、食品分野における LC 分離例を幅広く示し、温度の応用展開の可能性を考えてみたい。

1.2 LC 分離のパラメータとしての温度

産業界におけるクロマトグラフィー技術の利用は、分析と分取に大別できる。それぞれの場合で過去の検討事例を整理した。

1.2.1 分析 LC における温度

分析におけるクロマトグラフィーの温度コントロールでは、ガスクロマトグラフィーでは高温でカラム温度をコントロールすることが一般的であるが、ここでは分析、分取の対比を考えるので、LCでの分析の例を考えてみたい。

LC 分析において積極的に温度コントロールを行う例としては、逆相クロマトグラフィーのカラム温度を高温に設定する例がある[7]。HPLC のカラム温度を高温に設定することのメリットとデメリットは整理されている[8]。

高温にするメリットは多い。まず保持時間の低下と移動相の粘度低下により分析時間を短縮できることがある。2点目として、物質移動が効率的になり、移動相と固定相間の吸脱着が速くなることにより分離が向上する（ピークがシャープになる）点がある。物質移動の効率化を最大化するため、90°C近くまでカラム温度を上昇させる例もある[8]。3点目として、一部のイオン交換クロマトグラフィーでは温度により官能基の選択性が変化させることができる。4点目として、有機溶媒の使用量を減らすことで環境負荷を低減できることが挙げられる。分析時間を短縮すること、及び高温ではより低い溶媒濃度での溶出が可能となることで、有機溶媒の使用量削減が可能になる。最後に、移動相中の有機溶媒の濃度が下がることで、UV 検出の感度が向上することが挙げられる。

一方のデメリットは被分析物質（Analyte）が高温により影響を受ける可能性があること、有機溶媒濃度が低い移動相を高温で用いることにより一部のカラムの安定性が低下することが挙げられる。また、以前は高温にすることで分析設備に負荷がかかると考えられていたが、現在では技術が進み、この懸念はほぼ解消されているとあってよい。

以上のように、分析における LC は高温条件下で幅広く実施されていて、実用面でメリットも享受されていると言ってよい。一方で、温度コントロールの目的の大半が、分離の向上と時間の短縮とという単純なものであるにもかかわらず、その現象を定量的に説明できているとは言い難い。報告はあっても、ピークの段数や分析時間など、LC 分離の一側面を論じることで、温度コントロールによって得られる作業の効率化を説明するにとどまっているか[9]、試料と LC レジンの相互作用への影響を説明

するにとどまっている[10]。分離操作の生産性を最大化する最適温度を合理的に説明できておらず、分析 LC における温度の影響を説明する方法の開発のメリットは大きいと考えられる。

1.2.2 分取 LC における温度

本研究の目的は、分取クロマトグラフィー、あるいは工業化されたクロマトグラフィー工程において、温度を有効なパラメータとして使用可能か検討することにある。

逆相 LC 分析を高温条件下で行うことで、ピークをシャープにして分析精度を向上し、分析時間を短縮することは実用上、長年行われてきた[7]。温度の影響を定量的に論じた例もあるが[11]、その多くは温度が分離に与える影響の傾向を論じるにとどまっており、分離の最適化温度を求めるなどの実用的な検討は十分とは言えない。

さらに言えば、工業上は分離の最大化に加えて、生産性の最大化が求められる。しかし、生産性を最大化するための温度の最適化検討はこれまでほとんど行われてこなかった。

温度で分取 LC をコントロールする試み自体には数多くの例が存在する。

移動相溶媒による溶離の代わりに温度グラジエントによる溶出を試みた例は、分析 LC、分取 LC ともに存在する[12, 13, 14]。昇温により、固定相と目的物の相互作用を低下させ、使用溶媒量と工程時間を削減する効果がある。環境負荷低減が求められる現代では、工程改良の効果的なアプローチと考えられる。しかし肝心の工程の生産性までは十分に論じられていない。成果物の純度が安定していることで工程の性能を評価するのみであり、応用面で検討が十分とは言えない。

温度により工程の試みた例として、抗体医薬品のアフィニティクロマトグラフィー工程に温度感作性リガンドを利用する例も報告されている[15]。抗体医薬品の製造プロセスには、抗体の定常領域と強いタンパク質間相互作用を有する Protein A アフィニティリガンドを固定化したレジンが広く用いられている。Protein A リガンドは中性域の pH で抗体との相互作用を有し、pH3~4 の低 pH 領域で、相互作用が弱まる性質を利用して、効率よく抗体を精製できる。上の検討は高温で抗体を吸着し、低温で脱着する機能を有する温度感作性のポリマーを Protein A リガンドの代替として導入を試みたものであ

る。分析スケールでは高精度での抗体の定量が可能とみられるが、製造プロセスへの導入には成功していない。温度は測定が容易で管理が容易な工程パラメータではあるが、大スケールでの工程中に、工程条件を迅速に変換する操作には向いていない。設備が大きくなれば、カラム温度を変更するのに時間がかかるからである。大スケールにおいて温度は、工程中は一定に保つべきパラメータであり、工程中的変更操作は、pH、塩濃度の方が容易である。

製造プロセスにおける温度コントロールとして、最も成功している例は、糖類の陽イオン交換クロマトグラフィー精製と考えられる[16]。糖類の陽イオン交換クロマトグラフィー精製は、最高で80°C近い高温で実施される。高温での実施には微生物の増殖抑制、糖の溶解度上昇、高濃度糖液の粘度低下、糖類のカチオン交換体への吸着増など、工業上のメリットが多い。温度が高すぎると、エネルギーコストの上昇、糖類の加水分解などデメリットも出てくるが、適切な温度設定により、高効率なプロセス構築が可能と考えられる。高温での吸着増の例として、プロセス温度を10°Cから50°Cに増大することで、カルシウム型の陽イオン交換体への吸着はおよそ2倍になる例などがあるが、吸着容量の増大は、当然、1サイクル当たりのプロセスの最大化につながる[17]。また、温度により、精製の選択性をコントロールすることも可能である。カリウム型のイオン交換体によるガラクトース-ラクトース-ラクツロース混合物の分離の場合、15°Cではラクトースの分離より容易になり、55°Cではガラクトースの分離が容易になる。以上のように糖類の陽イオン交換精製は温度をパラメータとして操作することにより、工程の生産性向上に成功しているが、特異な例であり、またここから他の事例に適用可能な理論を得ることは困難と考えられる。

以上のように、分取クロマトグラフィーにおけるパラメータとしての温度は、経験的に用いられているおり、実生産プロセスにおいても生産性の向上に寄与してると言える。一方で、それらは各々が数少なく、かつ特殊な例であり、幅広い産業分野で用いられているクロマトグラフィー工程全体に占める割合は極めて低い。すでに分析クロマトグラフィーにおいて、温度コントロールにより実用的なメリットを生み出している逆相クロマトグラフィーも、合理的な温度コントロールはほとんどおこなわれていないのが実情であると考えられる。

従来、分取クロマトグラフィーは「よく温度コントロールされた室温」下で実施されることが期待されており[18]、多くの場合、クロマトグラフィーの性能に悪影響を及ぼさないように、という消極的なコントロールがなされてきたと考えられる。クロマトグラフィーの温度コントロールを試みた例としては、食品製造においてクロマトグラフィーの溶媒や溶質の粘度を低下させる目的で実施されている例もあるが[19]、非常に限られている。しかし温度条件が物質移動、移動相、基質の粘度などに与える影響はあると考えられ、クロマトグラフィー分離の温度条件、特に生産性を最大化する最適な温度を考えることは、産業利用上も極めて有用であると考えられた。

1.3 食品分野におけるクロマトグラフィー精製

1.3.1 機能性食品

食品とは、本来、生命活動に必要な栄養素を得るためのものであったが、近年、食生活の欧米化などライフスタイルの変化から、食品が肥満や高血圧、糖尿病などの生活習慣病の発症要因となっている。食生活の改善が第一であるが、生活習慣病の予防を目的として食品が元来保有する機能性（第三次機能）を利用した「機能性食品」の開発が精力的に行われている。

「機能性食品」との概念は、文部省が1984年から1986年にかけて実施した特定研究「食品機能の系統的解析と展開」の中で初めて示され、「機能性食品」とは食品中から機能性成分を分離・濃縮し、それを通常の食品に配合し、その配合率や配合号の食品形態を適正に設計・作成し、より効率的にその食品調節機能（疾病予防、整腸機能など）を発現するための食品、と定義された[20]。また、厚生省が公表した昭和62年（1987年）版の厚生白書では、「機能性食品」とはヒトの健康の維持と増進のために第三次機能である生体調節機能を利用した食品であり、「生体防御、体調リズムの調節等に係わる機能を、生体に対して十分に発現できるように設計された日常的に摂取される食品」と定義されている[21]。

機能性食品における制度として、「特定保健用食品（Food for Specific Health Uses, FOSHU）」や「栄養機能食品（Food with Nutrient Function Claims, FNFC）」といった国が一定の範囲で機能表示を許可する食品、企業の責任で機能表示を行う「機能性表示食品（Foods with Function Claims, FFC）」がある。

（「特別用途食品」も国が許可するものであるが、病者用、乳児用、妊産婦用、嚥下困難者用など特別の用途に限定されるため、本稿では触れないこととする）。さらに公益財団が規格基準を設定し適合した製品に対して認定を行う「健康補助食品」などもある[22]。

「特定保健用食品」は 1991 年 9 月 1 日に制度がスタートし、「食生活において特定の保健の目的で摂取する者に対し、その摂取により当該保健の目的が期待できる胸の表示をする食品」とされ、国が有効性及び安全性について基準 3) を定め、専門家による審査を経て、許可された機能の表示が認められた食品である。当該食品の生体（ヒト）に対する機能発現（効果）は栄養学的、医学的に立証されたものでなければならない。2001 年には、すでに機能が明らかとなっていたミネラルやビタミンなどに規格基準を設定し、決められた機能表示を認める「栄養機能食品」が制度化され、その後、2005 年には「規格基準型特定保健用食品」、「条件付き特定保健用食品」、「疾病リスク低減表示特定保健用食品」なども制度化された（図 1、表 1）。

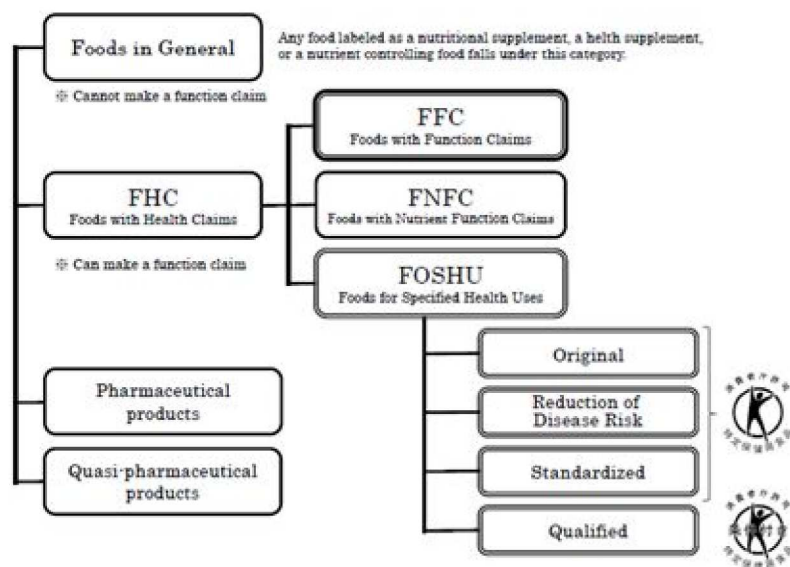


図 1 日本の健康表示制度
(Regulatory systems of health claims in Japan)

表 1 特定保健用食品の分類

(Categories of Food for Specified Health Uses (FOSHU, Food for Specified Health Uses))

FOSHU	Requires detailed review process with scientific evidence for each application.
Standardized FOSHU	<ul style="list-style-type: none"> ・No requirement of detailed review process for food products meeting the established standards and specifications. ・Must be accompanied by sufficient accumulation of scientific evidence. ・For efficiency: short cut process for products whose safety of use already approved.
Reduction of disease risk FOSHU	<ul style="list-style-type: none"> ・Requires detailed review process with scientific evidence for each application. ・Permitted for products whose ingredients are clinically and nutritionally established to reduce any risk of certain disease (<i>i.e.</i>, Calcium for Osteoporosis and Folic acid for neural tube defects).
Qualified FOSHU	<ul style="list-style-type: none"> ・Requires a detailed review process with scientific evidence for each application. ・Permitted for products with ingredients showing certain health effects but not reaching the established standards for FOSHU approval. ・Labelled as "Qualified Food for Specified Health Uses."

現在では 1200 を超える（1226 品目（2016 年 2 月 2 日現在））食品で表示が許可されており、清涼飲料水や乳製品、乳酸菌飲料、オリゴ糖などの食品が許可を得ている。

また「機能性表示食品」は 2015 年 4 月に制度化され、最終製品または機能性関与成分に関する有効性や安全性に関するシステマティック・レビューから肯定的な評価ができた食品については、加工食品だけでなく、野菜や果物、魚介藻類などの生鮮食品についても、機能表示が可能となった（図 1）。

効果といった作用の面から考えると、「機能性食品」とは半健康状態からの回復もしくは病気の発症を予防するために利用する食品であり、通常の食品との中間に位置することになる。

機能性食品素材を成分で分類すると、①ビタミン、②ミネラル、③脂肪酸、④食物繊維・多糖類、⑤タンパク質・ペプチド・アミノ酸、⑥プロバイオ・プレバイオ（乳酸菌・オリゴ糖など）、⑦植物抽出物（フィトケミカル）などに分類される[23]。この分類でわかるように、機能性食品とはその成分を特に新たに作り出したようなものではなく、生物原料素材から分離・濃縮したものが機能性食品素材となる。商品としての機能性食品の開発段階では、特定成分の生理機能の解明と証明が重要であるが、工業的な製造段階になると分離精製プロセスの開発がキーポイントとなる。生物素材の分離精製プロセスといっても化学工学的には特に新しい操作はなく、ほとんど抽出、晶析、クロマト、遠心分離などとその組み合わせである。

一般に水溶液中の溶解成分は分子の大きさ、親水性・疎水性および酸性・塩基性の3つの性質で特徴づけられるであろう。成分の分離プロセスを考える場合、このような3つの性質のどれに着目するかによって、分離プロセスが選定される。

機能性表示食品制度が2015年にスタートし、現在非常に早いペースで機能性をパッケージに表示した食品が市場に出回っている。

機能性表示食品はパッケージに健康強調表示ができるため、商品PR力が高く、供給メーカーの販売戦略上、競合他社商品との差異化ができること、届出制のためにトクホよりも手間がかからないことから、急激に増加している。ただし、機能性表示食品中の機能性関与成分については、トクホ同様に科学的根拠を持つ必要がある。

精製されていない機能性関与成分に混在する不純物があった場合、機能性関与成分の濃度自体が薄い、もしくは他の成分が混合すると科学的根拠が得られないことがある。このため、食品から機能性食品素材を精製して機能性関与成分の濃度を上げるか、不純物の除去などをする必要がある[4]。高純度の機能性成分の取得に、クロマトグラフィーが果たす役割は大きい。

1.3.2 イオン交換樹脂と合成吸着剤

食品素材の分離精製手段として、ろ過、遠心分離、晶析、液液抽出、膜分離などの手段があるが、本稿ではイオン交換樹脂・合成吸着剤を使用したクロマト分離技術を中心に紹介する。

イオン交換樹脂は、3次元に架橋して不溶性とした高分子に、イオン性の官能基が化学的に固定された構造からなり、通常、直径0.2~1mmほどの半透明の粒子である。模式的には、図2.3に示すような、ヘチマの様に架橋された網目構造を持つ高分子の基体に、イオン性の官能基が結合した、不溶性の高分子電解質からできている。高分子基体には、一般にはスチレンを重合したポリスチレンが最も多く使用され、ポリスチレン鎖を三次元架橋するために、二官能性のジビニルベンゼンが架橋剤として、スチレンと共重合するために使用される。ポリスチレン以外にも、アクリル酸類のポリマーも使用される。

イオン性の官能基は、「イオン交換基」と呼ばれ、一般に、スルホン酸やトリメチルアンモニウムのようなイオン性の化合物が使用される。イオンは、陽イオンと陰イオンが必ずペアになって存在するが、このうち高分子基体に共有結合して、固定されているイオンを「固定イオン」と呼び、一方、これと反対電荷をもち、溶液中のイオンと交換することが可能なイオンを「対イオン」と呼んでいる[24]。

ゲル型樹脂とポーラス、ハイポーラス型樹脂の模式的な構造と、その特徴を図 2 にまとめて示した。

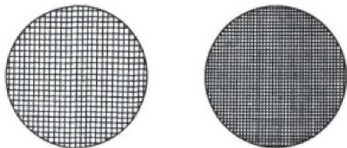
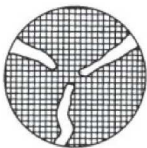
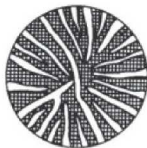
	ゲル型		ポーラス型	
	ゲル樹脂		ポーラス樹脂	ハイポーラス樹脂
模型図				
架橋度	約 1% ←————→ 十数%		ゲル樹脂の範囲	ゲル樹脂より大数十%
交換容量	小 ←————→ 大		ゲル樹脂より小	ポーラス樹脂より小
反応速度	速 ←————→ 遅		————→ 速 ←	———— 遅
体積変化率	大 ←————→ 小		ゲル樹脂より小	ポーラス樹脂より小

図 2 ゲル型樹脂とポーラス型樹脂の比較

ハイポーラス型でイオン交換基が極めて少ないか、またはイオン交換基を持たないイオン交換樹脂の基体樹脂は、大きな表面積を有し活性炭の様な吸着性能を示すので、「合成吸着剤」と呼ばれている。水に溶解したフェノールなどの、極性溶媒中に存在する親油性物質の吸着に有効である。活性炭と比較すると、一般に細孔径が大きいため、通常の活性炭では吸着できない大分子化合物の吸着に適している。また、完全に化学合成できるので、原料の選択を含めて、不純物の制御も容易であり、高い安全性が要求される抗生物質や食品添加物の精製などに多用されている。この合成吸着剤（ハイポーラスポリマーとも呼ばれる）は正確にはイオン交換樹脂ではないが、イオン交換樹脂と同様な製法で作られ、再生もイオン交換樹脂と同様に酸やアルカリ、またはアルコールなどの有機溶剤で処理するだけで可能であり、イオン交換樹脂と同様な使い方ができるため、通常イオン交換樹脂の一種として扱われている。

合成吸着剤は接触している溶液から、ある種の溶質を選択的に吸着する性質もある。これは、合成吸着剤の基体は疎水性の強いポリマーであり、主に樹脂の基体と溶質の親和性に基づくものである。一般に疎水性の強い物質ほど樹脂基体に吸着され易い。合成吸着剤は乾燥状態でも消失しない多孔性があり、活性炭の様な吸着性能を示す。各種の合成吸着剤は有機物と無機物の分離、医薬品、食品、香料などの分離精製に利用されている。

1.3.3 機能性食品素材のクロマトグラフィー分離例

1.3.3.1 柑橘果汁の食味と風味の改善

生鮮果汁、濃縮還元果汁を問わず、天然果汁の食味や風味の向上にイオン交換樹脂や合成吸着剤が利用されている。天然果汁の食味は、酸と糖との比、即ち糖酸比によって人間の嗜好に与える効果が大きく、果実の種類（夏かん、甘夏かん、はっさく、ポンカン、オレンジ、グレープフルーツ等）や産地、採取時期によって異なる。

この糖酸比の調整は、一般には酸を除去することによって行われる。果汁の酸は、柑橘果汁の場合クエン酸が主であり、弱塩基性イオン交換樹脂（DIAION WA10、DIAION WA30 など）で処理して、過剰の酸を減少させ食味の改善を行う方法が実用化されている[25,26]。この場合、有用なビタミンC（アスコルビン酸）は、他の酸より樹脂に対する選択性が低いので、クエン酸が貫流するまで果汁を通液すると、ビタミンCはクエン酸に置換されて、溶出してくるので好都合である。

天然果汁中には、清澄果汁のほか、食物繊維として利用するためにパルプと呼ばれる繊維状物を含んだままの製品もあるが、この場合は、樹脂処理（下向流の場合）の前に遠心沈降などで十分に除去しておき、処理果汁にパルプを再添加するか、または残留パルプ濃度が高い場合は、樹脂層の目詰まりを防ぐために上向流流動床方式やバッチ方式を採用する等、操作に工夫が必要となる。

また、柑橘果汁には風味を損なう苦味成分（ナリンギン、リモニン等）が含まれているが、これらは合成吸着剤で除く脱苦味法が実用化されている[7,9]。苦味成分を吸着した合成吸着剤はアルカリを通液

して再生させることができ、果汁の pH 維持と異臭味防止のため、引続いて塩酸で処理することもある。

果汁に混入するパルプの影響を防ぐことは減酸の場合と同様である。

逆に、食品廃棄物から有用物質を回収する方法としても利用されている。例えば柑橘類の破棄物である八朔の果皮に含まれる油から、SP70 などを利用して強力な抗がん作用を示すアウラプテンを回収する方法が提案されている[ii]。

1.3.3.2 アミノ酸

合成吸着剤によるアミノ酸類の分離精製の例を示す。

側鎖が非極性であるアミノ酸は等電点域においては非極性の合成吸着剤(DIAION HP20、SEPABEADS SP207 等)により疎水的吸着が可能となる。桂皮酸とアンモニアを原料として酵素反応で製造したフェニルアラニンの精製、発酵法で製造したイソロイシン、チロシンの精製などがある。

一例として、ブドウ糖を主原料として発酵生産したイソロイシンを回収する方法を示す。発酵液を強酸性陽イオン交換樹脂で処理し、吸着されたものをアンモニア水で溶離して得られたイソロイシン(pI=6.02)の粗結晶中には副生物としてバリンを初め複数のアミノ酸が含まれている。等電点がほぼ同一であるバリン(pI=5.96)を不純物として含有するか、あるいはバリンとともに α -アミノ酪酸、アラニン、スレオニンなどの中性アミノ酸を不純物として含有するイソロイシン溶液を非極性合成吸着剤(HP20 など)で精製する方法が提案されている[27]。

また、L-リシンは側鎖にアミノ基を持つ塩基性アミノ酸であり、陽イオン交換樹脂で吸着が可能であり、発酵液から強酸性陽イオン交換樹脂で直接 L-リシンをイオン交換してイオン交換樹脂に補足し、次に水酸化アンモニウム水溶液で溶離し、濃縮、晶析し製品化する方法が広く採用されている(図 3)。L-リシンの精製には、イオン交換樹脂が不可欠な精製手段となっている[7, 12]。

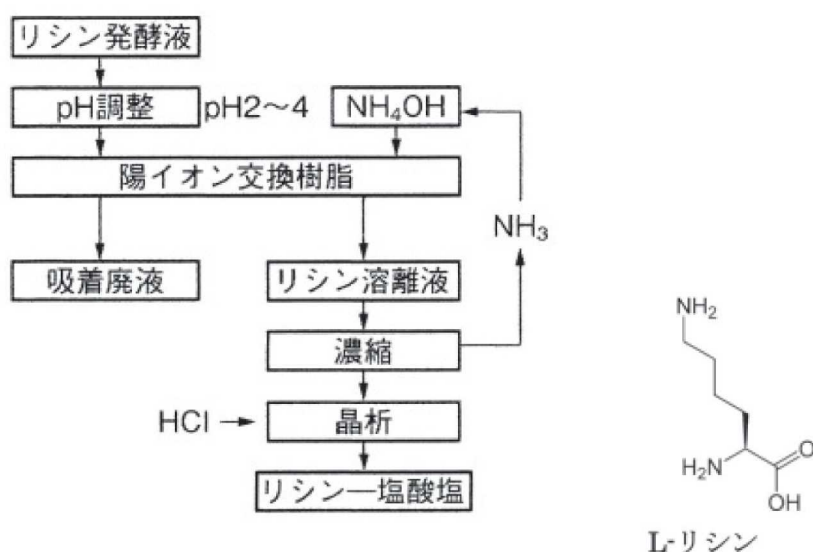


図3 L-リシンの精製工程

その他、アミノ酸系の調味料の原料であるグルタミン酸ナトリウムの製法にもクロマトグラフィーが用いられている。グルタミン酸ナトリウムの製法には、抽出法、発酵法、化学合成法があるが、現在はほとんどすべてが発酵法で生産されている。このグルタミン酸ナトリウムの発酵法は1956年に協和発酵が世界で初めて生産に成功した技術である。発酵液中に精製したL-グルタミン酸はpH調整されL-グルタミン酸が晶析され結晶で採取される。晶析されずに母液に残ったL-グルタミン酸は、塩酸を添加してpHを下げ、L-グルタミン酸を陽イオンとして、強酸性イオン交換樹脂に吸着させ回収する。吸着されたL-グルタミン酸はアンモニア水溶液などで溶離し、再び晶析工程に戻される(図4) [28]。(1980年ころまでは、このような晶析母液からイオン交換樹脂を用いてL-グルタミン酸を回収するプロセスが主に採用されてきたが、最近では晶析母液からpH調整によるグルタミン酸塩酸塩として回収する方法も採用されている)。

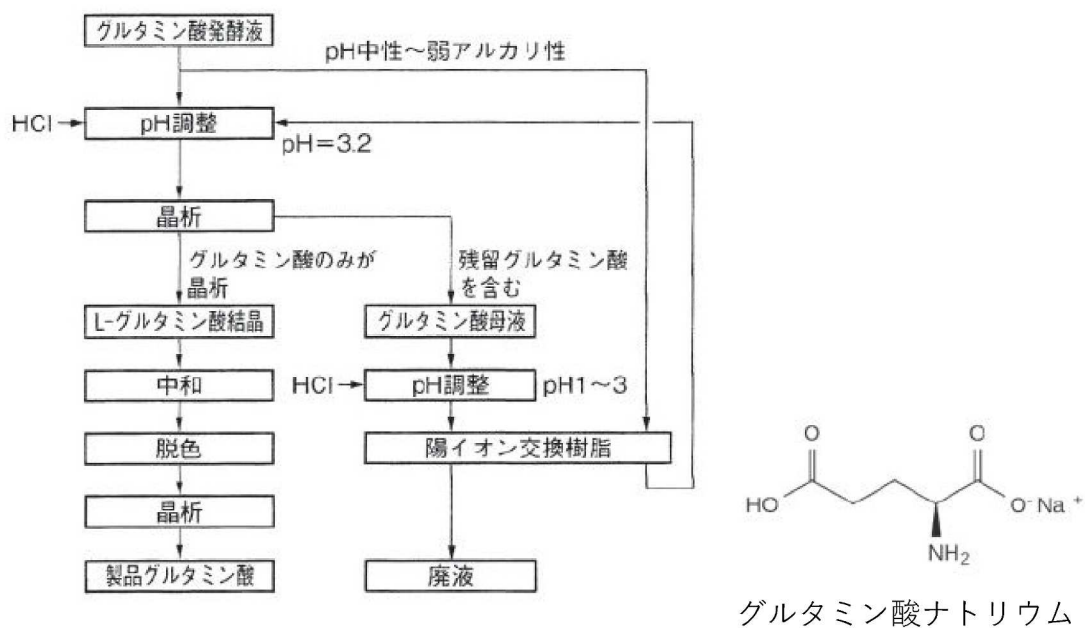


図4 L-グルタミン酸ナトリウムの精製

1.3.3.3 ステビオサイド

ステビオサイド類はキク科植物であるステビア・レバウディアナ・ベルトーニの葉に10～12%含まれるジテルペン配糖体であり、ステビオサイド、レバウディオサイドA、B、C、D、E、ズルコサイドAなどがある(図5)。

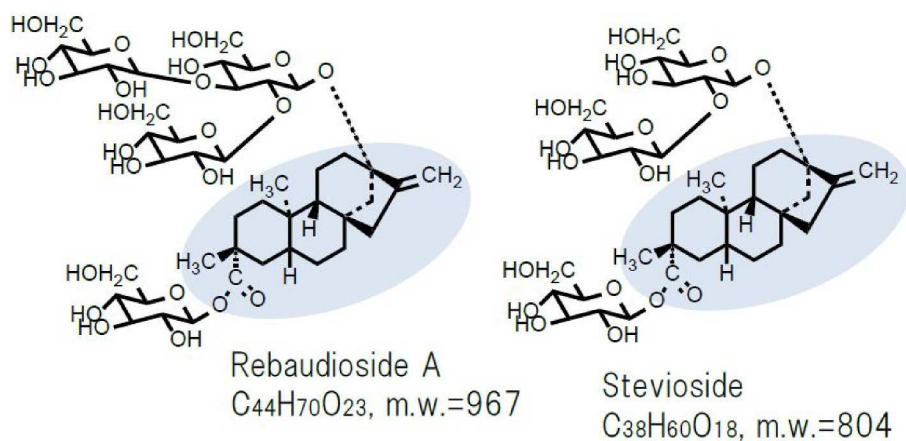


図5 ステビオサイド類

これらステビア甘味料と呼ばれ、砂糖の 60~300 倍の甘さがあるとされており、またほとんどノンカロリーであるため健康志向的にも見直され、甘味資源の少ない日本では大量に製品化されている。

図 6 にステビア甘味料製造フローを示す。ステビア乾葉を熱水抽出し、薬剤処理による析出物をろ過した液をそのままかあるいは 7~8 倍に濃縮後、合成吸着剤（DIAION HP20 など）に通液して甘味成分を吸着させ、アルコール水溶液で溶離させた液からアルコールを留去し、強酸性陽イオン交換樹脂（DIAION SK1B）および陰イオン交換樹脂（DIAION WA30 など）の 2 床 2 塔で脱塩脱色後、仕上げ精製（活性炭、UF 膜など）して噴霧乾燥するという方法が一般的に採用されている[25]。この場合、甘さを砂糖の 100 倍程度に調整するため、デキストリンを混ぜて噴霧乾燥することもありうる。

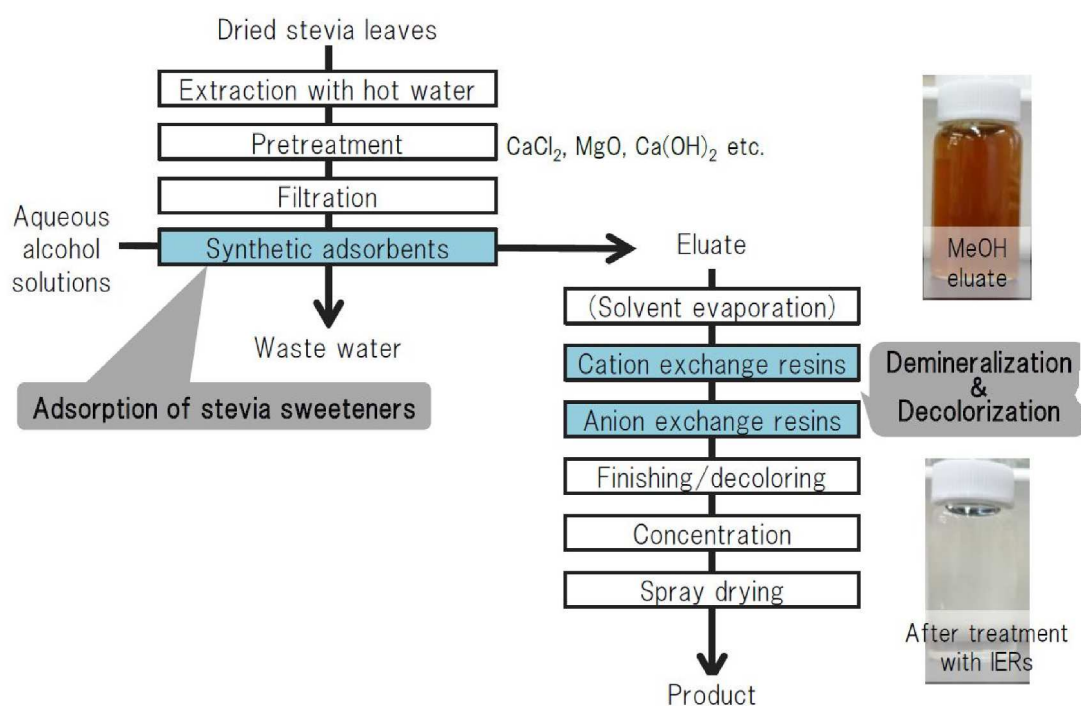


図 6 ステビア甘味料の製造フロー

1.3.3.4 ポリフェノール

ポリフェノールとは、分子内に複数のフェノール性ヒドロキシル基（芳香族炭化水素の 2 個以上の水素がヒドロキシル基で置換された化合物）を持つ成分の総称であり、野菜、果実、穀物、茶、ハーブ、

海藻類などに含まれ、カテキン、イソフラボン、アントシアニンなど、数多くの機能性成分が知られている。なかでもブドウやベリー、シソ、紫サツマイモ、赤キャベツなどに多く含まれるアントシアニンは植物色素として様々な食品に使用され、抗酸化活性、低比重リポタンパク（LDL）の過酸化抑制、視機能改善作用、中性脂肪低下作用、抗変異原性作用などが報告されている。

お茶は古くからの飲料であるが、最近では茶葉の含有する機能性や効能が明らかにされている。その代表が最近よく喧伝されるカテキンである。カテキンとはフラボノール類であり、抗酸化力や色素性が特徴である。狭義には分子量 MW290 の 3,3',4',5,7-flavanpentol をさすが、広義には MW458 までの誘導体のポリフェノールも含む[5]。カテキンは脱臭、抗菌、血糖・血圧上昇抑制、血中コレステロール低下、抗ガン作用など多くの作用が示されている。

普通は先ず茶葉の 80°C 熱水抽出により、原料成分が抽出される。緑茶熱水抽出液にはカテキン 30%、遊離アミノ酸類 8% (MW100~200)、カフェイン 7% (MW194)、ビタミン類及びペクチンなど多糖類成分 (MW10~15 万) がある[5]。分子量の近い成分が多いため、これからカテキン類を濃縮・分離することは分離技術としては困難な部類である。そのためカテキン分離に関して数多くの特許が出願されている[23]。

そのうち図 4 に 3 つの分離法を示す。有機溶媒による抽出法[29]は最も早くからおこなわれており、一般的なものである。温水抽出水溶液から先ず親油性のクロロホルムによる抽出でカフェイン類を除去する。次いでやや親水性の酢酸エチルによる抽出で、抽出液中に茶カテキン類が抽出される。抽出法は成分の溶媒遺体する溶解性の違いを利用したものである。

これに対して、有機溶媒を食品素材に使用することの懸念から、抽出法によらない分離法が開発されている。クロマト法は疎水吸着カラムを用いる[30]。カラムに温水抽出水溶液を通すと高分子量物質および低分子であるが非吸着性の糖・アミノ酸は吸着されずに排出される。次いでこのカラムを水で溶離すると、やや疎水性であり、吸着剤に弱く吸着しているカフェインが水への再溶解により脱離・排除される。最後にエタノール溶媒で溶離することでカテキン類をエタノール中に得ることができる。

お茶の中に含まれるカテキンには、『血糖値の上昇を抑える』、『血中中性脂肪を抑える』など健康への効果が示されている。お茶に含まれる成分にはカテキンのような疎水性の高い性質、カフェインのようなカテキンよりは疎水性の弱いもの、およびアミノ酸や糖類など親水性の高い性質を持つものが混在しているが、この疎水性の差を利用することで分離精製が可能となる。

メタクリル系合成吸着剤を使用し、疎水性の差によりカテキンの分離精製した例を紹介する[31]。カテキン 10%程度含んでいるお茶をメタクリル系合成吸着剤を充填したカラムにカテキン自体が十分量吸着するよう完全破過まで通液する。その後、水洗、10%エタノール液、50%エタノールと順次通液する。親水性の高い成分から順に、すなわちアミノ酸、糖類、カフェイン、カテキンの順に溶出される。カテキン溶出画分の純度は約 75%まで向上し、カフェインとカテキンとの分離性が非常に良好であることから、カテキン画分からカフェインを排除しやすく、カテキンの回収率は 90%を超える。

1.3.3.5 難消化性デキストリンの精製

難消化デキストリンは、健康表示食品の中でも最も使用されており『血糖値の上昇を抑える』、『おなかの調子を整える』、『中性脂肪を抑える』など様々な健康への効力が示されている。

この難消化デキストリンの不純物に製造過程で混在するグルコースがあり、これをゲル型の陽イオン交換樹脂を使用して排除して 2 種類以上の糖類とグルコースを分画分離することで、グルコースの排除をしている[32]。

同様に分子量によるサイズ排除クロマトグラフィーの適用例には、難消化デキストリン、フラクトオリゴ糖、マルトオリゴ糖、サイクロデキストリンなどの精製がある。

1.3.3.5 EPA (エイコサペンタエン酸) の精製

EPA は魚油に含まれ、『記憶の精度を高める』、『血中中性脂肪を抑える』など健康への効果が示されている。食品用に使用される EPA には過剰な高純度精製の要求はないが、スチレン系合成吸着剤を用いた EPA エチルエステルの高純度分離精製した検討例がある。

EPA エチルエステルと DHA エチルエステル混合液を 70%EPA エチルエステル混合液として調製し、これを合成吸着剤に吸着させた後、メタノール水溶液を溶離液として高純度な EPA エチルエステルを DHA エチルエステルよりも早い段階で脱着させ、EPA の高純度画分を回収している。基本骨格は同じであるが、吸着剤の持つ細孔の比表面積が異なる SEPABEADS SP700、SP825L および DIAION HP20SS といった銘柄の合成吸着剤を使用している。いずれの合成吸着剤も 1L あたり 40g の負荷量が得られたこと、試験に使用したいずれの吸着剤でも 95%以上の高純度化が可能であったことを確認している。

1.3.3.5 ビタミン E の精製

機能性表示食品ではないが、抗酸化剤としてよく利用される食品素材としてビタミン E があるが、この分精製例もクロマトグラフィーが利用されている[25]。

植物油精製時に副生する脱臭スカム中に数%以上のビタミン E が存在するが、同時に、不純物としてトリグリセリド、遊離脂肪酸などを含有する。脱臭スカムは、メタノール抽出、メチルエステル化という固液分離プロセスを経て 10%ビタミン E 濃度まで精製される。エステル化後の粗精製液中のビタミン E は、イオン交換樹脂によるイオン交換反応によりアニオン交換基に吸着する。2.5%酢酸エタノール溶液で脱着され、ビタミン E が 73%の純度で画分回収でき、その回収率は 87%となった。

検討例で使用したイオン交換樹脂は、DIAION PA306S という特殊なポーラス型アニオン交換樹脂を使用しているが、ポーラス型にすることで反応速度を上げている。さらに 300 μm 粒径以上の大粒径樹脂をカットすることで、脱着時における溶離ピークをシャープにし、混在する遊離型脂肪酸と混合することをなくし、高純度なままビタミン E を溶離できるようにしている。

1.4 本研究の目的と構成

クロマトグラフィー分離は、バイオ医薬品、機能性食品の製造工程ではその品質に影響を与える重要な工程として位置づけられている。一方で、クロマトグラフィー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、精密分取クロマトグラフィーでは数多くの報告があるが、製造用の分取

クロマトグラフィーでの温度の最適化の報告はほとんどない。これまで、分取クロマトグラフィーは、分離性能に悪影響を及ぼさない程度の消極的なコントロールがなされてきたと考えられる。分取クロマトグラフィーで温度コントロールを試みた例としては、食品製造においてクロマトグラフィーの溶媒や溶質の粘度を低下させる目的で実施されている例もあるが、非常に限られている。しかし温度条件が物質移動、移動相、基質の粘度などに影響を与える可能性は高いと考えられ、クロマトグラフィー分離の温度条件、特に生産性を最大化する最適な温度を考えることは、産業利用上も極めて有用であると考えられた。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) 由来のレジンによるポリフェノール類の分離系を用い、温度最適化の検討を実施した。その際、産業上の利用も考え、複雑な手法ではなく、温度の影響を簡便に推定する手法の開発を目指した。

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。

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。

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の決定を試みた。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。

引用文献

- [1] Takayanagi H, Fukuda J, Miyata E., Downstream Processing of Natural Products. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1996, Ch. 11
- [2] Yamamoto S, Preparative Chromatography for Separation of Proteins. Wiley; 2017
- [3] Carta G, Jungbauer A. Protein Chromatography. Weinheim: Wiley-VCH; 2010
- [4] 食品と開発, Vol. 53, No.1 (2018)
- [5] 機能性食品素材の高度分離・精製と開発 食品産業ハイセパレーション・システム技術研究組合編 p523
- [6] Yamamoto S, Nakanishi K, Matsuo R. Ion-exchange chromatography of proteins. New York, (NY): Dekker; 1988
- [7] Bullock J, J. Chromatography A, 694 (1995) 415-423
- [8] Vanhoenacker G, Anal. Bioanal. Chem (2008) 390: 245-248
- [9] Yang Y, Analytica Chimica Acta 558(2006) 7-10
- [10] J. Cardoso, N. Yoshimoto, S. Yamamoto; Method for Thermodynamic Analysis of Temperature Dependence of Distribution Coefficient in Chromatography Separations. 日本食品工学会誌, (2019) 20, 3, 99-105
- [11] Dorsey J, Chem. Rev. 1989, 89, 331-346
- [12] An Xinghai, J. Chromatography A, 1665 (2022)
- [13] Brandt A, J Chromatography A, 796 (1996) 223-228
- [14] Brandt A, J Chromatography A, 769 (1997) 109-117
- [15] Nagase K, Nature Scientific Report, (2020) 10: 1896
- [16] Kruschitz A, Biotechnology Advances, 43 (2020) 107568
- [17] Wang Ya-Jun, The Canadian Journal of Chemical Engineering, (2016) 94, 3: 537-546
- [18] Omote M., CHROMATOGRAPHY, 31, 1, (2010)
- [19] Schultze-Jena A., Separation and Purification Technology, 237 (2020)116386
- [20] 文部省特定研究「食品機能の系統的解析と展開」
- [21] 厚生白書 (1987 年度版)
- [22] BUNSEKI KAGAKU Vol. 65, No. 6, 309
- [23] 化学工学, Vol.71, No.34(2007)
- [24] 国立科学博物館 北九州産業技術保存継承センター 共同研究編 第7集, Vol. 7, (2014)

- [25] イオン交換樹脂・合成吸着剤マニュアル, 三菱ケミカル株式会社
- [26] 日本食品工業学会誌, Vol.31, No.6(1984)
- [27] J. Agric. Food Chem. 50, No.5(2002)
- [28] WO1996012730A1
- [29] 特開平 01-009922
- [30] 特開平 06-009607
- [31] 機能性食品素材の高度分離・精製と開発 食品産業ハイセパレーション・システム技術研究組合編
p523
- [32] 特開平 11-236401

第2章 逆相クロマトグラフィー分離性能に温度が及ぼす影響の簡単な推算方法

2.1 概要

クロマトグラフィー分離は特にバイオ医薬品の製造工程ではその品質に影響を与える重要な工程として位置づけられている。一方、製品単価が医薬品ほど高くなく、また医薬品ほどの高純度も求められない食料品の生産ではそれほど重視されてこなかった。しかし昨今の機能性食品の興隆により、食品素材の高度精製の需要が急速に高まっている[1]。

食品の生産ではコストはもちろん重視される。しかしそれだけでは十分ではなく、クロマトグラフィーの固定相、移動相、それぞれにおいて当局から認可された素材を使用する必要がある。加えてクロマトグラフィーの固定相であるレジンはコストの面から再利用する必要があるため、高度な洗浄性が求められる。

これらの要求にこたえるレジンとしては例えばポリスチレンジビニルベンゼン (PS-DVB) 由来のものが魅力的である。PS-DVB は化学的に安定であり、エタノールや苛性ソーダなどの、安価で食品生産で実績のある溶媒、溶液で容易に分離操作、洗浄操作を実施することができるからである。このような化学的に安定な分離剤を用いた工業的分離は、医薬品や機能性食品添加物の分離精製工程に適しており、実際に多くの事例が報告されている[2]

機能性食品素材のクロマトグラフィーによる高度分離としては、ポリフェノール類である catechin、epigallocatechingallate (EGCG)をモデル化合物として、最適化の検討がなされてきた。移動相はエタノール-水の混合物であった。分配係数が移動相のエタノール濃度依存的な関数として決定され、等分離条件下で生産性が最大となる移動相組成 (エタノール濃度)、流速が決定された[3, 4]。

本章では、クロマトグラフィーの分離性能に温度が及ぼす影響を簡便に推算する方法の開発を行った。モデル分離系として、上記、PS-DVB 由来の分離剤によるポリフェノール類の分離系を用いた。移動相は水-エタノール系であり、逆相系と言える。分離指標として、カラムの分離性能として広く用いられて

いる、理論段数高さ (height equivalent to a theoretical plate, HETP) 及び分離度 (R_s) を採用した。温度の影響を簡便に推定する手法を開発することは、産業上も有用であると考えられた。

2.2 実験方法と理論

実験装置には、前の研究[2,3]と同じものを用い、HPLC 装置 (UV970 UV-Vis detector, PU980 pump) を用いた。PS-DVB を基材とする樹脂 (DIAION HP20SS、三菱ケミカル社製) をアダプター付カラム (Vantage diameter dc=1.1cm, Millipore, Billerica, MA, USA) の中に充填した。モデルポリフェノールサンプルは、シグマ (MO, USA) の catechin と富士フィルム和光純薬 (Osaka, Japan) の EGCG である。サンプル及び分離担体樹脂の構造式を図 1 に示す。

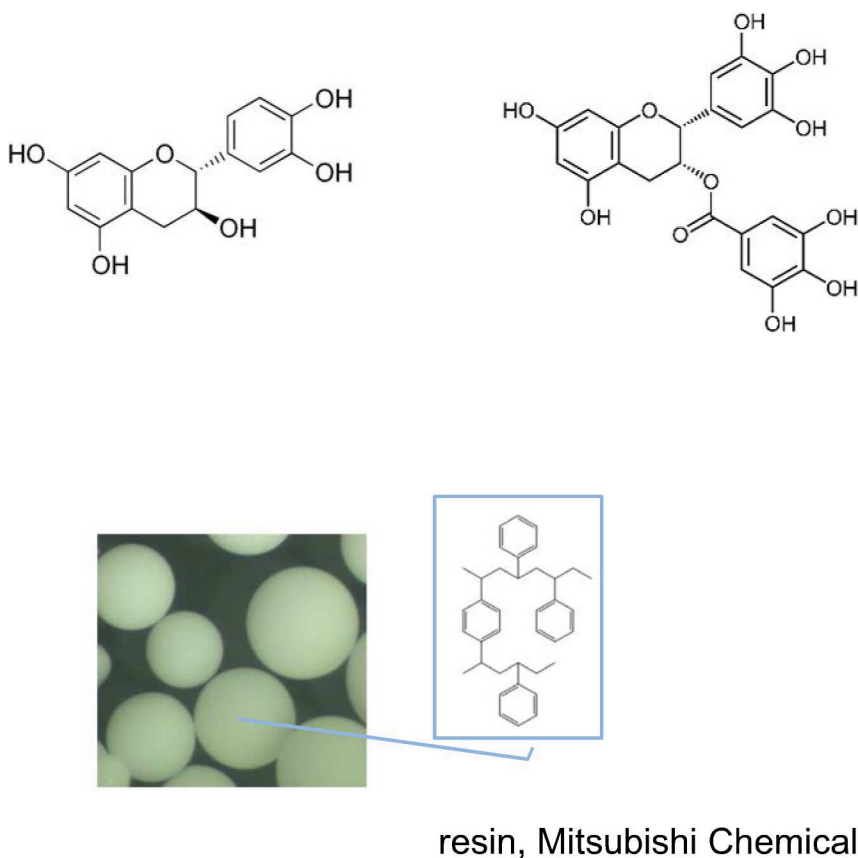


図 1 実験に使用したサンプル (Catechin、EGCG)、分離担体の化学構造

サンプル濃度 C_0 は 1.0 mg mL^{-1} 、サンプル容量 V_F は 0.2 mL とした。移動相にはエタノール水溶液を

用い、種々の温度コントロール下で等組成溶出実験を行った。それぞれの条件下において、ピーク保持時間 t_R 、ピーク幅（標準偏差 σ ）を測定した。 σ 値は、(1)式の修正ガウス曲線（ C_{\max} は最大ピーク濃度）と実験溶出曲線のフィッティングにより求めた。

$$C = C_{\max} \exp\left[-\frac{t_R}{2\sigma^2 t}(t - t_r)^2\right] \quad (1)$$

表 1 に示すように 15、20、25、30、35、45°C で分離操作を実施した。

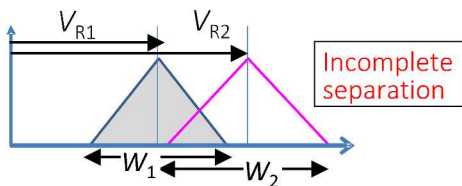
	Catechin	EGCG
Temperature (°C)	15, 20, 25, 30, 35, 45	
Z (cm)	4.9	4.6
d_c (cm)	1.1	1.1
Void fraction ε	0.378	0.384
F_v (mL/min)	1	1
Sample concentration (mg/mL)	1	1
Sample volume (mL)	0.1	0.1
Mobile Phase	20% Ethanol	
Stationary phase	HP20SS (Mitsubishi Chemical)	
d_p (μm)	62-67	

2.3 結果及び考察

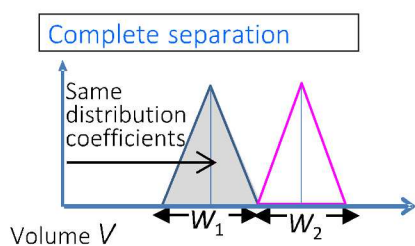
2.3.1 逆相クロマトグラフィー分離性能の向上

クロマトグラフィーの分離性能は、どのように向上させればよいだろうか。本研究のモデル系とした逆相クロマトグラフィー分離の場合、選択肢は3通り考えられる (Figure 2)。(1) 流速 (u) を低下させてピーク幅を狭くすること、(2) 移動相溶媒濃度 (I) を低下させて溶出体積を増大させること、(3) 温度 (T_c) を上昇させてピーク幅をシャープにすることである (図 2)。

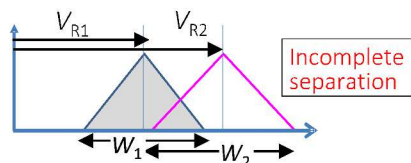
(1) 流速を低下させてピーク幅を狭くする



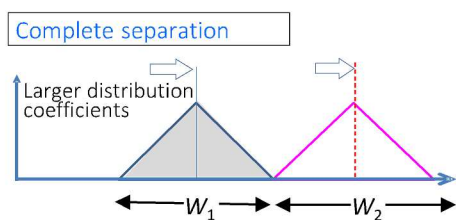
Lower velocity u
results in sharper peaks



(2) 移動相溶媒濃度を低下させて溶出濃度を増大させる



Lower solvent concentration f
results in increasing peak distance and
peak width



(3) 温度を上げてピーク幅をシャープにする

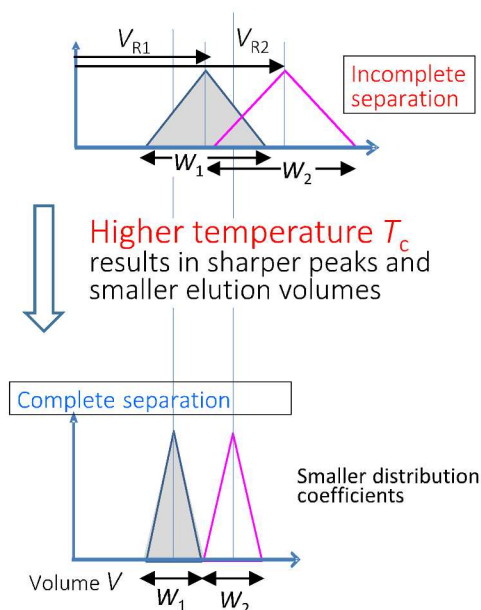


図 2 逆相クロマトグラフィー分離において分離を改善する 3 通りの方法

温度を上昇させた場合、ピークの保持が温度に影響を受けないサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の場合、影響はピークがシャープになるだけで、分離向上のメリットは大きい一方、SEC は食品製造における分取方法としては現実的ではない[5]。逆相分離系では、 T_c が増大すると、ピークがシャープになる一方、溶質の吸着傾向が低下し、保持体積が低下するため、その影響は単純ではない。 u 、 I は一般的に、分離向上のために調整されるパラメータである一方、温度 T_c はこれまでは分取では深く検討されてこなかった。

そのため本章では、HETP、 R_s を指標とし、温度がクロマトグラフィー分離に与える影響を、簡単に推算する方法の開発を目指した。

2.3.2 温度の関数としての HETP

HETP はカラム効率の評価に広く用いられている[6 – 10]。HETP は次の式に従って実験データから求めることができる。

$$\text{HETP} = Z(\sigma_t/t_R)^2 = Z(W_t/t_R)/16 = Z(\sigma_V/V_R)^2 \quad (2)$$

ここで、 Z はカラム長さ、 $\sigma_v = F_v \sigma_t$ は容積 (F_v : volumetric flow-rate) での σ 値、 W はベースラインのピーク幅 V_R は保持体積である (図3)。

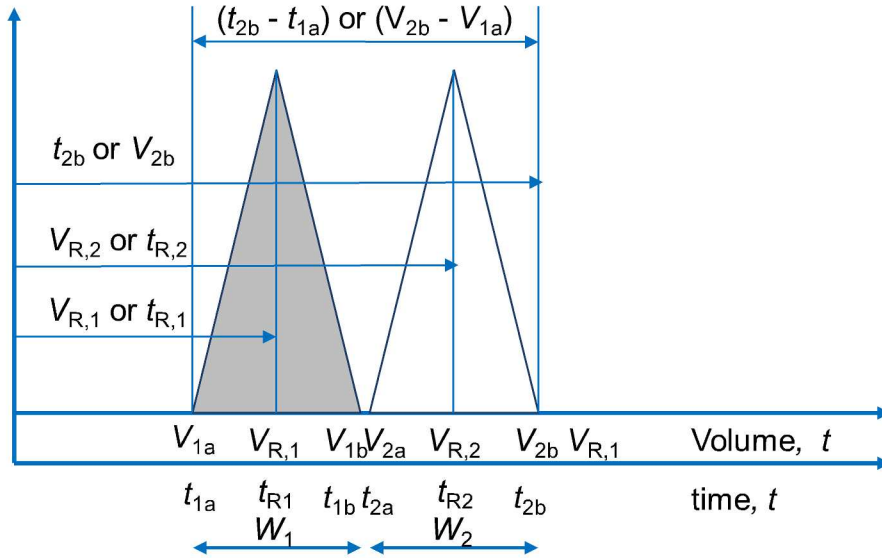


図3 $R_s = 1$ の時の2成分分離のモデルピーク

保持容積 $V_R = F_v t_R$ は(3)式のように分配係数 K に関係づけられる。

$$V_R = V_0 + (V_t - V_0)K = V_0(1 + HK) \quad (3)$$

ここで V_0 : 空隙体積、 V_t : カラム体積、 $H = (V_t - V_0)/V_0 = (1 - \epsilon_0)/\epsilon_0$ は容量の相比である。カラム空隙率 $\epsilon_0 = V_0/V_t$ は、保持がなく完全に排除される物質 (Dextran mol. Wt. 2,000,000, Fluka) のピーク保持容積から決定した。溶質 (catechin と EGCG) の保持体積 V_R から K を決定できる。

また、(4)式から固定相拡散係数 (細孔内拡散係数) D_s を求めることができる。

$$\text{HETP} = \frac{Z}{N} = A^0 + C^0 u = \frac{2D_L}{u} + \frac{HKd_p^2 u}{30D_s(1+HK)^2} \quad (4)$$

ここで、 d_p は粒子径、 D_L は axial dispersion coefficient、 $u = F/(\epsilon \pi d^2/4)$ は線流速であり、 d はカラム直径である。

温度が D_L に与える影響が極めて限定的であることは、データから明らかとなっている。以前の研究

で、我々は $(2D_L/u)$ または A^0 の値が一定であり、およそ $2-10d_p$ であることを示したが、これは温度によって変化しない[2, 3, 6]。

固定相拡散係数（細孔内拡散係数） D_s は温度によって増大する。分子拡散係数 D_m （溶液中での自由拡散係数）は一般的に以下の関係の関係式で示される。

$$D_m\eta/T = f(\text{molecular shape, molecular radius, } r_m \text{ or molecular weight, } M_w) \quad (5)$$

ここで、 η は溶液の粘度、 T は絶対温度である。 $D_m(T)$ はまた、活性化エネルギー E_D を用いて以下のように表すことができる。

$$D_m = D_{m0} \exp\left(-\frac{E_D}{R_G T}\right) = D_{m,\text{ref}} \exp\left(-\frac{E_D}{R_G} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right) \quad (6)$$

ここで、 D_{m0} は頻度因子（pre-exponential factor）、 R_G は気体定数、 $D_{m,\text{ref}}$ は T が T_{ref} の時の D_m 、そして T_{ref} は参照温度（reference temperature）である。 D_m は(6)式から計算できる。 E_D は溶液の粘度に応じた活性化エネルギーである（水の活性化エネルギー 20 kJ/mol）

$\gamma_s = D_s/D_m$ が温度 T によって変化しないと仮定すると、 D_s は(7)式のように表される。

$$D_s = D_{s0} \exp\left(-\frac{E_D}{R_G T}\right) = D_{s,\text{ref}} \exp\left(-\frac{E_D}{R_G} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right) \quad (7)$$

ここで、 D_{s0} は頻度因子、 $D_{s,\text{ref}}$ は $T=T_{\text{ref}}$ の時の D_s である。

無次元化したHETPを用いることは、 d_p や u などの様々な条件を同次元で比較できるため便利である。[6, 8, 11]. 無次元化された流速 v とHETPを用いて、(4)式は以下のように記載することができる。

$$h = A^* + C^*v \quad (8)$$

$$h = \text{HETP}/d_p \quad (9)$$

$$v = ud_p/D_m \quad (10)$$

$$A^* = 2(D_L/u)/d_p \quad (11)$$

$$C^* = HK/[30\gamma_s(1 + HK)^2] \quad (12)$$

$$\gamma_s = D_s/D_m \quad (13)$$

h は経験的に以下のようにも記述することができる

$$h = E \cdot v^n \quad (14)$$

ここで、 E^* と n はフィッティングパラメータである。

この等式は特定の流速の範囲の実験データをよく説明することができる。

典型的な溶出曲線を図 2 に示す。3 通りの移動相エタノール濃度、2 通りの温度の際の溶出曲線である。B は A よりエタノール濃度が高く、ピークの保持時間が減少している。また、C は温度が B より高く、エタノール濃度が低いにもかかわらず、ピーク保持時間が減少している。温度、移動相中エタノール濃度が上昇すると、保持体積（すなわち K ）が減少する（図 4）。

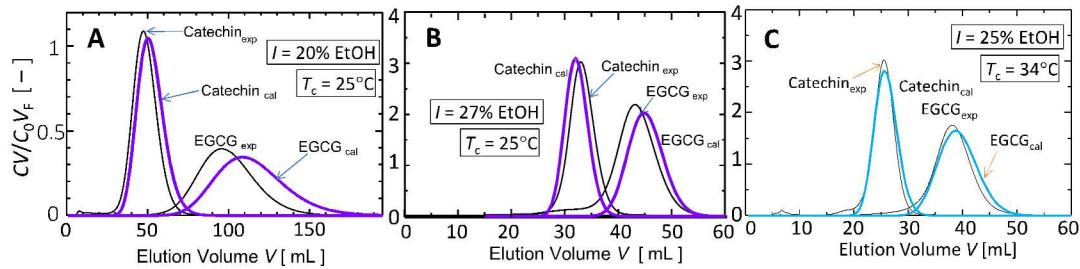


図 4 典型的な溶出曲線。異なる移動相エタノール濃度、温度における溶出曲線

実験により求めた溶出曲線と、計算によって求めた溶出曲線の両方を示している。

V_F : サンプル体積、 C_0 : サンプル濃度、

- A. $T_c = 25^\circ\text{C}$ 、エタノール濃度 $I = 20\%$ 、 $Z = 15.5 \text{ cm}$ 、 $\varepsilon = 0.44$ 、 $u = 7.8 \text{ cm/min}$
- B. $T_c = 25^\circ\text{C}$ 、エタノール濃度 $I = 27\%$ 、 $Z = 15.5 \text{ cm}$ 、 $\varepsilon = 0.41$ 、 $u = 0.75 \text{ cm/min}$
- C. $T_c = 34^\circ\text{C}$ 、エタノール濃度 $I = 25\%$ 、 $Z = 15.5 \text{ cm}$ 、 $\varepsilon = 0.38$ 、 $u = 1.98 \text{ cm/min}$

図 4A は $15\text{--}45^\circ\text{C}$ における HETP- u の相関図である。温度の上昇とともに、直線の勾配が緩やかになっているが、このことは (4) 式において、温度の上昇とともに D_s が増大することを示している。

HETP- u を $h-u$ に変換すると、図 5(B)、(C)に示すように、データは幅広い条件 ($T_c = 15-45^\circ\text{C}$ 、移動相溶媒濃度 $I=20\%$ 及び 30%) において、単一の曲線で良く相関を描くことができる。さらに、データは単一の曲線 $h=1.08v^{0.71}$ でフィッティングできる。これらの結果は、axial dispersion への温度の影響は無視でき、 D_s の温度依存性は、ほぼ D_m の温度依存性で説明が可能であることを示している。

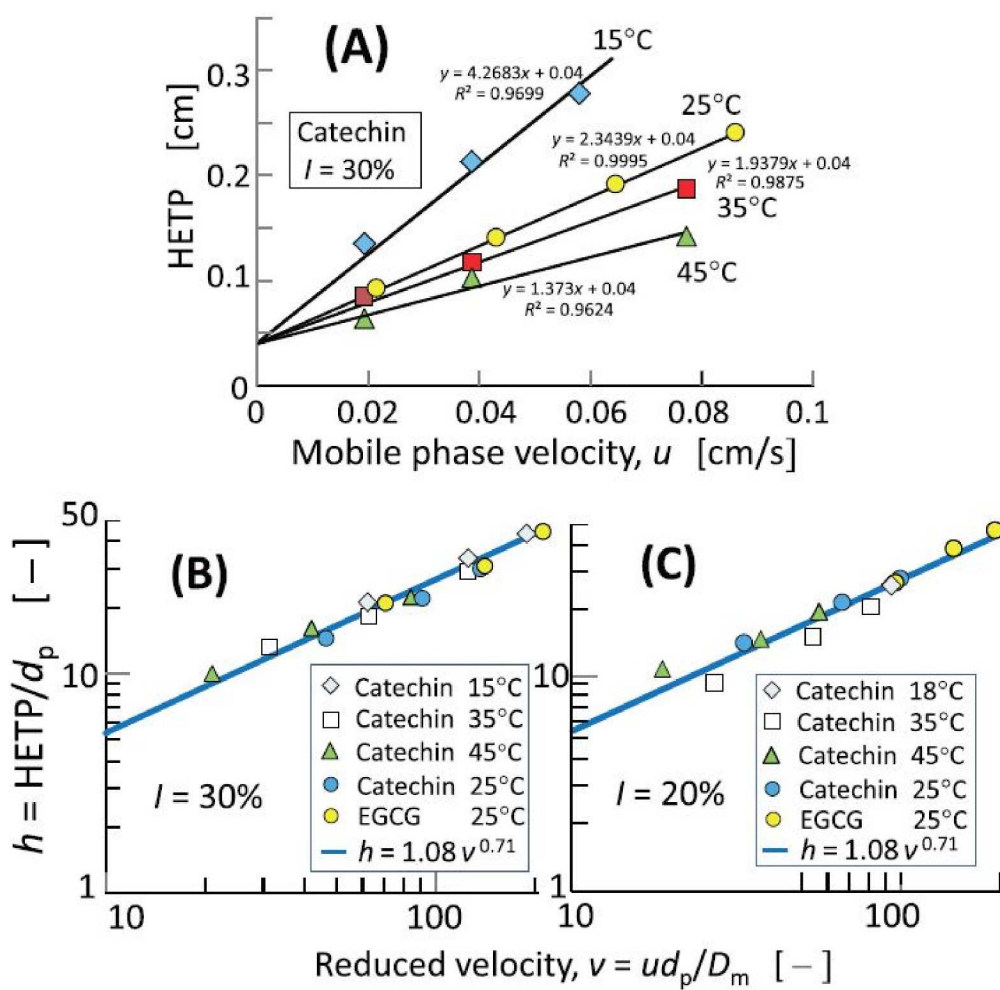


図 5 温度と移動相流速の関係

(A) $I=30\%$ における HETP- u

(B) $I=30\%$ における $h-v$

(C) $I=20\%$ における $h-v$

図 5(A)に示された直線は、切片は 25°Cの値を用い、フィッティングにより決定した。 D_m の値は既出の方法で求めた[11, 12]

2.3.3 温度の関数としての R_s

HETPに加えて、分離効率を表す指標として広く用いられているものに、 R_s がある。 R_s は(15)式として表される。2成分分離の際のモデルピーク示す(図5)

$$R_s = \frac{V_{R,2} - V_{R,1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \quad (15)$$

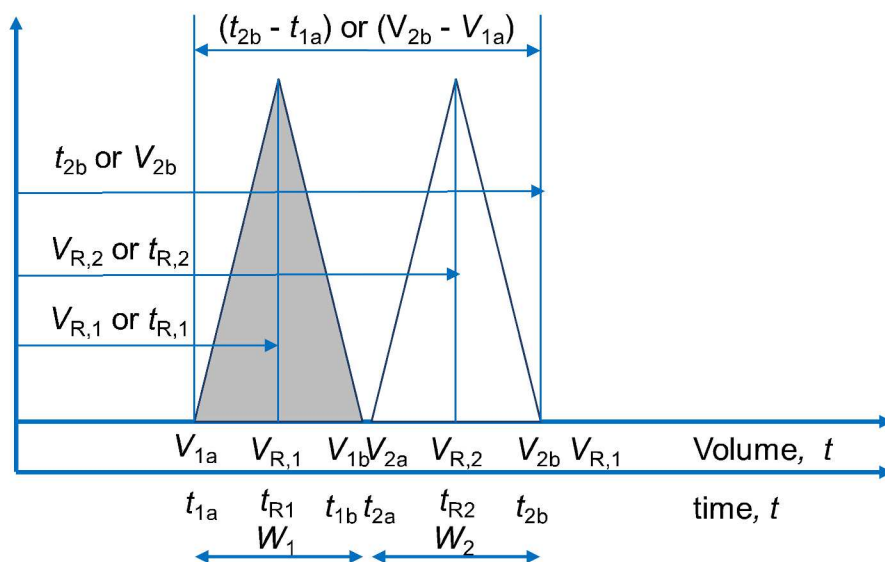


図 5 $R_s = 1$ の際の 2 成分分離のモデルピーク

数字 1、2 はそれぞれ、1 番目と 2 番目の溶出曲線の属性であることを示す。 $W = 4\sigma$ はベースラインにおけるピーク幅である。(2)、(3)式を(15)式に代入することで(16)式が得られる。

$$R_s = \frac{V_{R,2} - V_{R,1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} = \frac{\sqrt{Z}H(K_2 - K_1)}{2[(1 + HK_1)\sqrt{HETP_1} + (1 + HK_2)\sqrt{HETP_2}]} = \frac{\sqrt{Z}H(K_2 - K_1)}{2[(1 + HK_1)\sqrt{A + C_1u} + (1 + HK_2)\sqrt{A + C_2u}]} \quad (16)$$

ここで、 R_s は HETP、 K を含むことから、 u 、 d_p が一定の時、温度の関数として表されることがわかる。

R_s は HETP、 K で表現されているが、さらに簡便な形にすることが望ましい。2 ピークの高さ、幅が同一、すなわち $W_1=W_2=4\sigma_1$ である時、(3)(4)式を(16)式に代入することで、(17)式が得られる。

$$R_s = \left\{ \frac{H(K_2-K_1)}{4(1+HK_{av})} \right\} \frac{\sqrt{Z}}{\sqrt{HETP}} = \left\{ \frac{H(K_2-K_1)}{4(1+HK_{av})} \right\} \sqrt{N} \quad (17)$$

ここで、 $K_{av}=(K_1+K_2)/2$ である。この式の HETP を(14)式で変換すると、以下の(18)式が得られる。

$$R_s = \left\{ \frac{H(K_2-K_1)}{4(1+HK_{av})} \right\} \frac{\sqrt{Z}}{\sqrt{HETP}} = \left\{ \frac{H(K_2-K_1)}{4(1+HK_{av})} \right\} \{ Z^{1/2} u^{-n/2} d_p^{-(1+n)/2} D_m^{n/2} \} \quad (18)$$

(18)式は大きく 2 つの項に分かれる。前項は分配係数 (K) で、後項は物質拡散 (D_m) で表現されているといえる。 K 、 D_m とも温度依存性であるため、 R_s は温度の関数で表現されている。

サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography、SEC) のように K が温度によって変化しないとき、 R_s の温度依存性は単純に物質拡散 D_m によって支配される。

R_s の相対値、 $R_s/R_{s,ref}$ の温度依存性を、(18)式を基に計算した。SEC の場合の $R_s/R_{s,ref}$ を図 6(B)に示した。 $R_s/R_{s,ref}$ (SEC)は温度 T_c と共に増大していることがわかる。これは、サンプルとカラムが安定な限り、単純にカラム温度を上げると R_s を改善できることを示している。

しかし逆相クロマトグラフィーにおいては、 K は温度の関数、 $K(T)$ であり、 R_s は複雑になる。大部分の吸着クロマトグラフィーにおいて、 K は T の増大とともに減少する (exothermic reaction or negative enthalpy)。また、分配係数差 $\Delta K=(K_2-K_1)$ も温度共に減少する[14]。 K 、 D_m が温度の関数であることを勘案し、(18)式から R_s 比、 $R_s/R_{s,ref}$ を計算した。この時 $R_{s,ref}$ は $T_{ref}=298K$ (25°C)の時の値とした。

$I=20\%$ と 30% の時の結果を図 6 に示す。 $I=20\%$ の時の結果は図 6 (B) であり、 ΔK は減少にもかかわらず $R_s/R_{s,ref}$ は 33°C まではわずかに上昇したが、その後は温度の上昇とともに減少した。しかし、分離

に必要な体積 ($1+HK_{av}$) は減少しているのので、温度の上昇は分離時間を大幅に短縮する効果があるといえる。

$I=30\%$ の場合も同様のトレンドで、 $R_s/R_{s,ref}$ と $(1+HK_{av})$ は温度と共に減少し続ける。

プロセスの効率、経済性を考えたとき、分取クロマトグラフィーの工程では、分離時間を分離体積とともに減少させることが必要である。

最終的にはより詳細な計算が必要になるだろうが、本章で紹介したような手法は、温度が分離効率に与える影響の簡便な評価方法として有用であると考えられる。

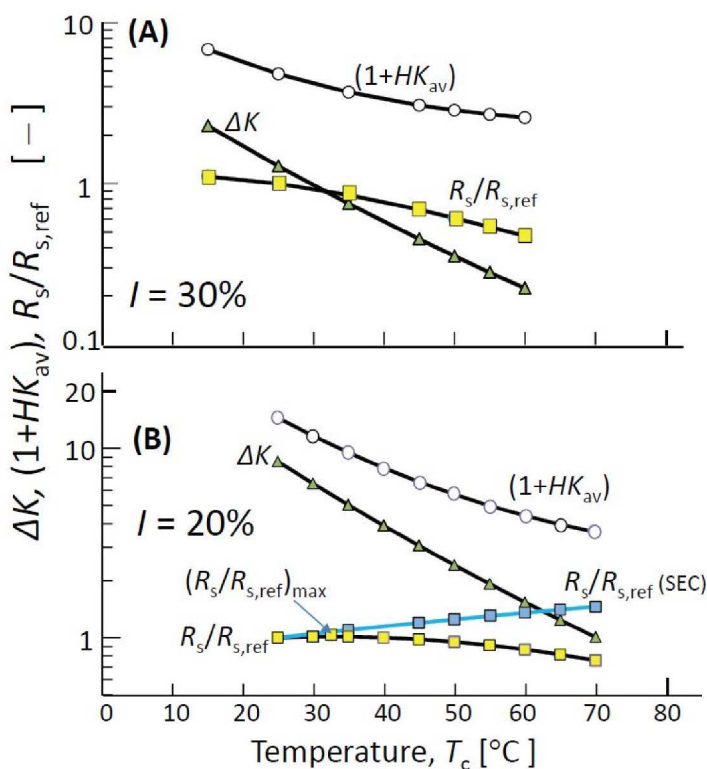


図 6. ΔK 、 $(1+HK_{av})$ および $R_s/R_{s,ref}$ の温度依存性

2.4 まとめ

ポリフェノール類をエタノール-水系の移動相で分離する等組成溶出クロマトグラフィー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。温度依存的である、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。条件によっては、最適温度が存在するが、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。一方で、高温でのクロマトグラフィーは分離体積、分離時間共に減少するため、プロセスの経済性の面でメリットがあると考えられた。

引用文献

- [1] 橋本泰明 ; 食品と開発, Vol. 53, No.1 (2018)
- [2] H. Takayanagi, J. Fukuda, E. Miyata; Downstream Processing of Natural Products. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 1996, Ch. 11
- [3] M Hosono, R. Maeda, N. Yoshimoto, S. Yamamoto; Rational Method for Designing Efficient Chromatography Processes based on Iso-Resolution Curve; Chem. Eng. Technol. (2012), 35, 1, 198-203
- [4] N. Yoshimoto, Y. Sugiyama, S. Yamamoto; A Simple Method for Calculating Productivity of Polyphenol Separation by Polymer-based Chromatography; Biosci. Biotechnol. Biochem. (2017) 81, 812-816
- [5] M. Schulte; Preparative Chromatography, Wiley, 2012
- [6] S. Yamamoto, K. Nakanishi, R. Matsuno; Ion-Exchange Chromatography of Proteins, CRC, 1988
- [7] G. Carta, A. Jungbauer; Protein Chromatography, Wiley-VCH, 2010
- [8] N. Yoshimoto, S. Yamamoto; Simplified method based on mechanistic models for understanding and designing chromatography processes for proteins and other biological products – Yamamoto Models and Yamamoto Approach – in Preparative chromatography for separation of proteins, Wiley 2017, pp.111-157
- [9] M Ladisch; Bioseparation Engineering: Principles, Practice and Economics, Wiley, 2001
- [10] R. G. Harison, P. Todd, S. Rudge, D. P. Petrides; Bioseparation Science and Engineering, Oxford University Press, 2003
- [11] S. Yamamoto, M. Nomura, Y. Sano; Factors affecting the relationship between the plate height and the linear mobile phase velocity in gel filtration chromatography of proteins. J. Chromatogr. A, 394, 363-367 (1987)

第3章 逆相クロマトグラフィーにおける最適温度の決定法

3.1 概要

第2章においては、PV-DVD ベースのレジジンによるポリフェノール類の逆相分離をモデル系として分離に最適な温度を簡便に求める方法を考案した。本章においては、第2章から検討を進め、より現実に近い、複雑な条件設定の下での分離温度の最適化を試みることにした。

第2章においては、ポリフェノールの2成分、Catechin、EGCGのピーク幅を等しいと仮定して、最適な分離温度を検討した。本章においては実際のピーク形状を考慮し、フィッティングによりモデルを作成し、より正確に最適な温度を求めることにした。また、分離の指標として広く用いられている理論段数高さ (Height Equivalent to a Theoretical Plate、HETP)、分離度 (R_s) ではなく、より産業上重要な生産性を最大化する温度を求める方法を考えることにした。生産性の定義としては、一般的に用いられている時間当たりの生産性 P のみならず、使用する有機溶媒量を考慮した生産性 P^* も導入した。有機溶媒量を削減することが可能か、作成したモデルを用いて検証した。昨今の社会情勢からより環境負荷の小さい製造プロセスの導入が強く望まれている[1]。生産性を損なうことなく使用する有機溶媒の量を低減するプロセスを簡便に決定する方法は社会的な要望でもあり、産業上、極めて有用なことであったと考えられた。

本章においてもモデル分離系として、上記、PS-DVD由来の分離剤によるポリフェノール類の分離系を用いた。移動相は水-エタノール系である。

分配係数が移動相のエタノール濃度依存的な関数として決定され、等分離条件下で生産性が最大となる移動相組成 (エタノール濃度)、流速が決定された[2, 3]。

一方で、温度に関しては、HPLC分析における温度の影響による保持時間、ピーク形状の変化の影響は評価した例があるが[4, 5]、分離、生産性といった実用面での評価は十分ではない。また、我々のグループでも過去に今回の研究と同じモデル系での検討により、レジジンと Catechin、EGCG の相互作用の温度による変化を評価したが[6, 7]、実用面での評価は今後の課題となっていた。

本章においては、まずは移動相が等組成かつ分離度 $R_s=1$ と一定の条件下で生産性を最大化する手法を決定した。実際分離曲線からフィッティングによりモデル化に必要なパラメータを決定した上で、計算により最適な温度と流速の組み合わせを決定することができた。

一方で、実製造においては、クロマトグラフィーの生産性は、移動相組成と流速、または温度と流速の2要素のみならず、移動相組成、流速、温度の3要素の組み合わせによる最大化を考えることで、より柔軟な条件設定が可能となる。本章ではさらに議論を進め、 $R_s=1$ の条件下において生産性を最大化する温度、移送相組成、流速の組み合わせを決定することを試みた。

さらに実製造において生産性を支配する要素として、カラム高さ、分離担体の粒子径も、クロマトグラフィーの生産性に影響を与える重要な要素である。今回の検討で作成したモデルを用いて、カラム高さ、粒子径が生産性に与える評価することができるか検討した。

3.2 実験方法と理論

実験は第2章に示した通りである。PV-DVBを基剤とするレジンを充填したカラムを用い、15~45°Cの条件下において、Catechin、EGCGの溶出曲線を取得した。それぞれの条件下において、ピーク保持時間 t_R 、ピーク幅（標準偏差 σ_t ）を測定した。 σ 値は、(1)修正ガウス曲線（ C_{\max} は最大ピーク濃度）と実験溶出曲線のフィッティングにより求めた。

$$C = C_{\max} \exp \left[-\frac{t_R}{2\sigma_t^2} (t - t_R)^2 \right] = C_{\max} \exp \left[-\frac{V_R}{2\sigma_V^2} (V - V_R)^2 \right] \quad (1)$$

HETP は次の式に従って実験データから求めることができる。

$$\text{HETP} = Z(\sigma_t/t_R)^2 = Z(W_t/t_R)/16 = Z(\sigma_V/V_R)^2 \quad (2)$$

ここで、 Z はカラム長さ、 $\sigma_V = F_V \sigma_t$ は容積（ F_V : volumetric flow-rate）での σ 値、 W はベースラインのピーク幅 V_R は保持体積である（図1）。

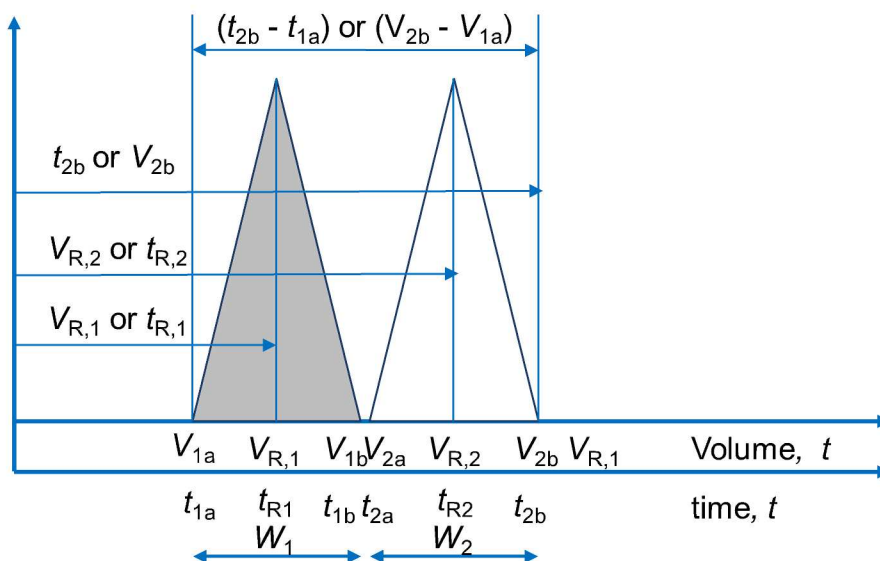


図1 分離度 $R_s=1$ の時の2成分の分離モデル

保持容積 $V_R=FV_{tR}$ は(3)式のように分配係数 K に関係づけられる。

$$V_R = V_0 + (V_t - V_0)K = V_0(1 + HK) \quad (3)$$

ここで V_0 :空隙体積、 V_t :カラム体積、 $H=(V_t-V_0)/V_0=(l-\varepsilon_0)/\varepsilon_0$ は容量の相比である。カラム空隙率 $\varepsilon_0=V_0/V_t$ は、保持がなく完全に排除される物質 (Dextran mol. Wt. 2,000,000, Fluka) のピーク保持容積から決定した。溶質 (catechin と EGCG) の保持体積 V_R から K を決定できる。

また、(4)式から固定相拡散係数 (細孔内拡散係数) D_s を求めることができる。

$$\text{HETP} = \frac{Z}{N} = A^0 + C^0u = \frac{2D_L}{u} + \frac{HKd_p^2u}{30D_s(1+HK)^2} \quad (4)$$

典型的な D_L/u の値は $1\sim 10d_p$ であり、本研究では 0.045 を用いた[2]。

3.3 結果及び考察

3.3.1 温度の関数としての拡散係数と HETP

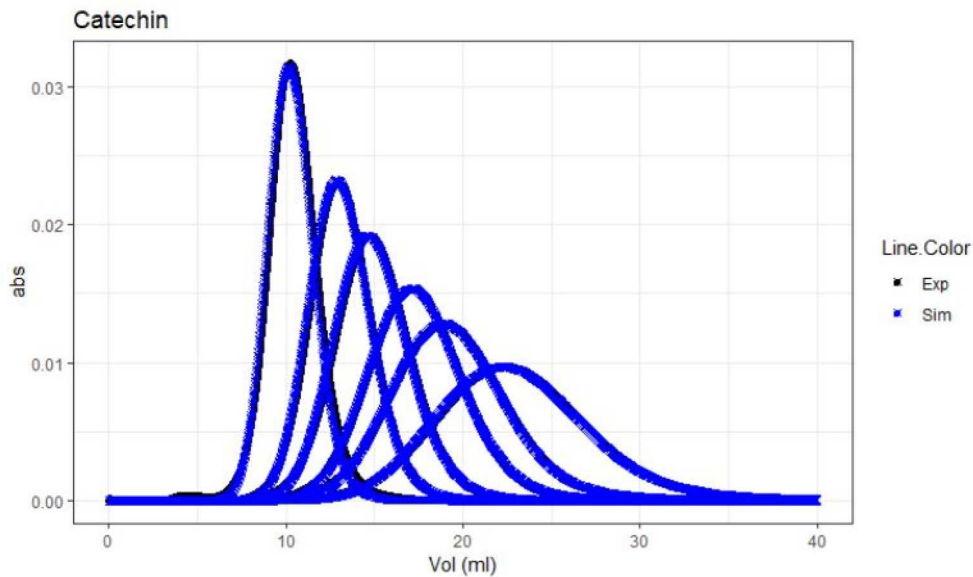
表1に示すように 15、20、25、30、35、45°Cで分離操作を実施した。

表1 実験条件

Temperature (°C)	15, 20, 25, 30, 35, 45
Z (cm)	5
d_c (cm)	1.1
Void fraction ϵ	0.38
F_v (mL/min)	1
Sample concentration (mg/mL)	1
Sample volume (mL)	0.1
Mobile Phase	20% Ethanol
Stationary phase	HP20SS (Mitsubishi Chemical)

実験データからピーク幅 σ_V 、保持体積 V_R を(1)式で示す改変 Gaussian Curve で決定した (図2)。

(3)式に代入することで K 、(4)式に代入することで D_S が計算できる。フィッティングと計算により得られたデータを表2に整理した。



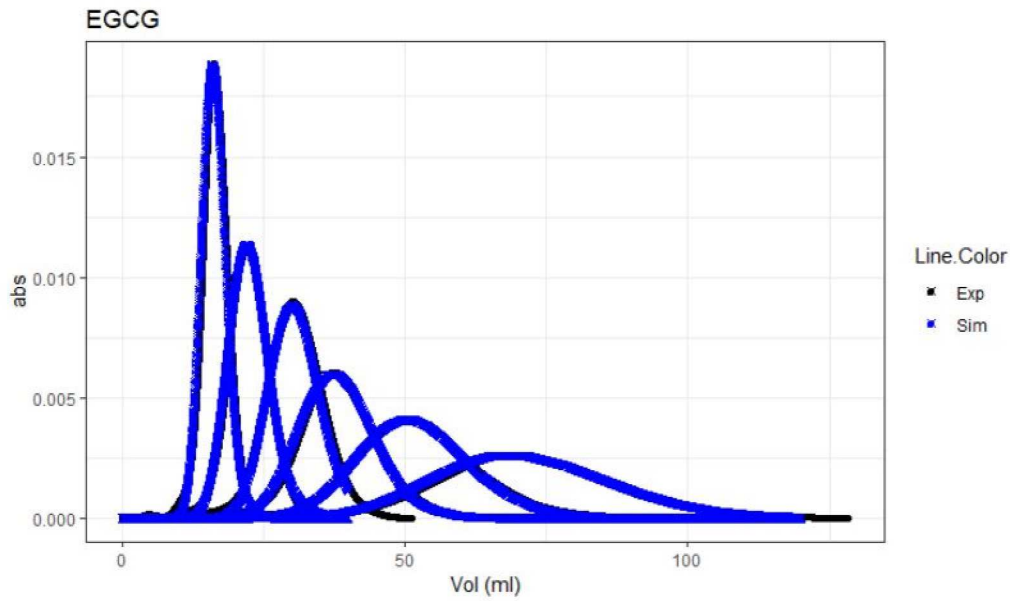


図2 各温度における Catechin、EGCG の溶出実験曲線へのフィッティング

(黒：実験曲線、青：フィッティング曲線)

表2 フィッティングの結果得られたデータ

temperature [°C]	Catechin				EGCG			
	K	HETP [cm]	N	D_s [m ² /s]	K	HETP [cm]	N	D_s [m ² /s]
15	7.3	0.169	29	3.97E-12	25.9	0.23	20	8.63E-13
20	6.05	0.137	36	6.32E-12	18.7	0.177	26	1.64E-12
25	5.4	0.117	42	8.81E-12	13.6	0.149	31	2.82E-12
30	4.52	0.102	48	1.27E-11	10.7	0.110	42	5.60E-12
35	3.9	0.089	55	1.84E-11	7.7	0.121	38	6.33E-12
45	2.94	0.078	63	3.01E-11	5.39	0.084	55	1.67E-11

以前の研究で、25°C条件下でエタノール濃度 I が K および分子拡散係数 D_m に与える影響について検討し[1,2]、式(5)、(6)のように I の関数として定義した。

$$K = AI^{-B} + K_c \quad (5)$$

$$D_m = a_1 I^2 + a_2 I + a_3 \quad (6)$$

$$D_{m,catechin} = 1.62 \times 10^{-13} I^2 - 1.51 \times 10^{-11} I + 6.33 \times 10^{-10} \quad (6-1)$$

$$D_{m,EGCG} = 1.26 \times 10^{-13} I^2 - 1.17 \times 10^{-11} I + 4.91 \times 10^{-10} \quad (6-2)$$

ここで I はエタノール濃度 (%) である。式(5)、(6)から K と D_m を用いることにより、25°Cでの D_s は

以下(7)式のように記述できる[2]。

$$D_{s,\text{ref,catechin}} = \frac{\alpha D_m}{K_{\text{ref}}} = \frac{0.07(1.62 \times 10^{-13} I^2 - 1.51 \times 10^{-11} I + 6.33 \times 10^{-10})}{AI^{-B} + K_c} \quad (7-1)$$

$$D_{s,\text{ref,EGCG}} = \frac{\alpha D_m}{K_{\text{ref}}} = \frac{0.07(1.26 \times 10^{-13} I^2 - 1.17 \times 10^{-11} I + 4.91 \times 10^{-10})}{AI^{-B} + K_c} \quad (7-2)$$

ここで、 α は 0.07 を用いた[1]。

D_s を、温度を含む形式で表現すると(8)式のようなになる[8]。

$$D_s = D_{s,\text{ref}} \exp\left[-\frac{E_D}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right] \quad (8)$$

ここで T は絶対温度、 R は気体定数 (単位: J/mol/K)、 E_D はモルあたりの活性化エネルギーである。(8)式を変換することで(9)式が得られ、本式に実験データを当てはめることにより、 E_D を求めることができる。

$$\ln \frac{D_s}{D_{\text{ref}}} = -\frac{E_D}{RT} + \frac{E_D}{RT_{\text{ref}}} \quad (9)$$

異なる温度での D_s と $1/T$ の関係をプロットすると、その近似曲線の傾きから $E_{D,\text{catechin}} = 51.6$ kJ/mol、 $E_{D,\text{EGCG}} = 73.9$ kJ/mol を求めることができた。(8)式と(9)式により、 D_s は I と T の関数として現わされる。 $D_{s,\text{ref}}$ 、 K_{ref} 、 T_{ref} は 25°C ですでに得られた値を用いることができる。

また、エタノール濃度の影響も考えると、 K は(10)式のように I と T の関数で表現できる。

$$K = K_{\text{ref}} \exp\left[-\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}}\right)\right] \quad (10)$$

ここで $K_{\text{ref}} = AI^B + K_c$ は 25°C の時に(4)式から得られる値である。 ΔH は気化熱、 R は気体定数である。実験で得られた K と温度の関係をプロット、近似直線の傾きから $\Delta H_{\text{catechin}} = -22.9$ 、 $\Delta H_{\text{EGCG}} = -37.1$ の値が得られる。

以上より、 K と D_s をエタノール濃度と温度の関数で記述できるようになった。計算に必要なパラメー

タを表3にまとめた。

表3 K と D_s の決定に必要なパラメータ

	A	B	K_c	a_1	a_2	a_3	ΔH	E_D
	(%) ^B	-	-	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\%)^{-2}$	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot (\%)^{-1}$	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
Catechin	5.34×10^4	3.1	0.69	1.62×10^{-13}	1.51×10^{-11}	6.33×10^{-10}	-22.9	51.6
EGCG	8.62×10^6	4.5	0.69	1.26×10^{-13}	1.17×10^{-11}	4.91×10^{-10}	-37.1	73.9

3.3.2 生産性を最大化する最適温度の決定

すでに等分離条件下で、合理的な分離を予測する手法を提唱した[1]。例えば一定のエタノール濃度 I の下、(11)式で示される二成分分離の分離度 R_s を実現する線流速 u を決定できるものである (図1)。

$$R_s = \frac{V_{R,2} - V_{R,1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} \quad (11)$$

分離条件下で連続的に I と u の組み合わせを計算でき、これを Iso-resolution curve concept と名付けた。本コンセプトは最適な溶媒組成の検討にもすでに応用されている[3]。例えば $R_s=1$ の時、図1のように近似的なピークでは二成分のベースラインの分離が実現するが、Gaussian Curve では、完全分離には $R_s > 1.2$ が必要となる。

(2)(3)式を(11)式に代入することで(12)式が得られる。

$$R_s = \frac{V_{R,2} - V_{R,1}}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)} = \frac{\sqrt{ZH}(K_2 - K_1)}{2[(1 + HK_1)\sqrt{HETP_1} + (1 + HK_2)\sqrt{HETP_2}]} = \frac{\sqrt{ZH}(K_2 - K_1)}{2[(1 + HK_1)\sqrt{A_1 + C_1 u} + (1 + HK_2)\sqrt{A_2 + C_2 u}]} \quad (12)$$

(12)式から、等分離条件下で、任意の温度とエタノール濃度に対応する u が得られるようになった。

ここでいよいよ最適温度の計算を試みる。分離サンプルの濃度と量が一定であれば、式(14)で決定した生産性の計算には、 t_c , V_c が必要である。サイクル体積、サイクル時間を考える前に分離体積 V_{sep} 、分離時間 t_{sep} を考えると(13)、(14)式のように流速 u 、 K 、すなわち流速と温度の関数で記述できる。

$$t_{SEP} = V_{SEP}/F_V = (Z/u)(V_{SEP}/V_0) = (Z/u_0)(V_{SEP}/V_0) \quad (13)$$

$$V_{\text{SEP}} = V_{2b} = V_0(1 + HK_2) + \frac{w_{V,2}}{2} = V_0(1 + HK_2) + \frac{2V_0(1+HK_2)\sqrt{A_2^0 + C_2^0 u}}{\sqrt{Z}} \quad (14)$$

繰り返し分離を考えると、単サイクルの時間、体積も考える必要があり、必要になる V_{1a} も式(15)のように計算可能である。

$$V_{1a} = V_0(1 + HK_1) - \frac{w_{V,1}}{2} = V_0(1 + HK_1) - \frac{2V_0(1+HK_1)\sqrt{A_1^0 + C_1^0 u}}{\sqrt{Z}} \quad (15)$$

最終的に、 V_c 、 t_c は(16)(17)式のようになり、線流速と温度の関係式となる。

$$V_c = V_{2b} - V_{1a} \quad (16)$$

$$t_c = t_{2b} - t_{1a} = (V_{2b} - V_{1a})/F_v \quad (17)$$

エタノール濃度 I が一定である条件下、等分離条件下で生産性を最大化する u と T の組み合わせが計算可能となる。ここでは $I=20$ 、 $R_s=1$ の等分離条件下での生産性を考える。

計算条件はカラム長さ $Z=15.5$ cm、カラム径 $d_c=1.1$ cm、粒子径 $d_p=67\mu\text{m}$ とした。空隙率 $\varepsilon=0.379$ 、とした $R_s=1$ のとき、ほぼ完全分離が可能となり、等組成分離の連続化を考えた場合、最も生産性が高くなる。

図5に $I=20$ 、 $R_s=1$ の時の等分離曲線を示す。青の曲線は分離体積と分離時間 (Separation time) 関係、赤の曲線は分離体積とサイクル時間 (Cycle time) の関係を示す。各温度における $R_s=1$ を実現する流速 u の計算は Microsoft Excel の Goal-seak 機能を使用した。高温条件では分離時間が長くなる一方、分離体積は減少した。分配係数、分配係数差 (K_2-K_1) が共に、温度の上昇と共に減少したためと考えられる。

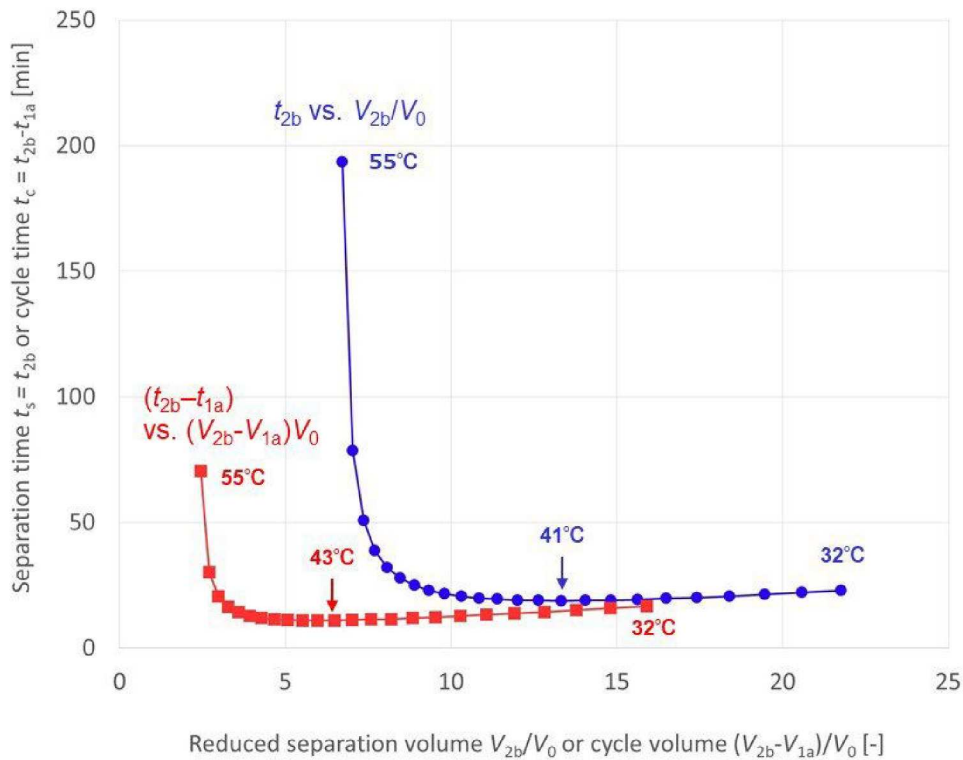


図5 $I=20(\%)$ 、 $R_s=1$ の時の等分離曲線

X 軸：無次元化された分離体積 (separation volume, [-]) またはサイクル体積 (cycle volume, [-])

Y 軸：分離時間 (separation time, [min]) またはサイクル時間 (cycle time, [min])

分離体積とサイクル時間を例に、温度による変化を考察する。43°Cでサイクル時間は最短となり、高温ではサイクル時間が増大し、低温側では特に分離時間が増大している。55°C、43°C、32°Cにおいて計算した、三角形に近似したピークを図6に示す。(2)、(4)式および(18)式から t_R 、HETP、ピーク幅 W を求め、ピーク開始時間 $t_a = t_R - W/2$ 、終了時間 $t_b = t_R + W/2$ を求めた。ピーク高さは便宜的に1とした。

$$W = 4t_R/N^{0.5} \quad (18)$$

上段は横軸を時間、下段は体積としている。55°Cにおいては分配係数の値が小さくなり分離体積が低下する一方、分離を維持するために流速が低下するため、サイクル時間は増大している。一方32°Cでは、サイクル時間は43°Cと大差はないが、分離を維持するために流速が増大し、サイクル時間は短くなって

いる。43°Cはサイクル時間、分離体積ともに低いレベルでバランスが取れている条件であると考えられた。

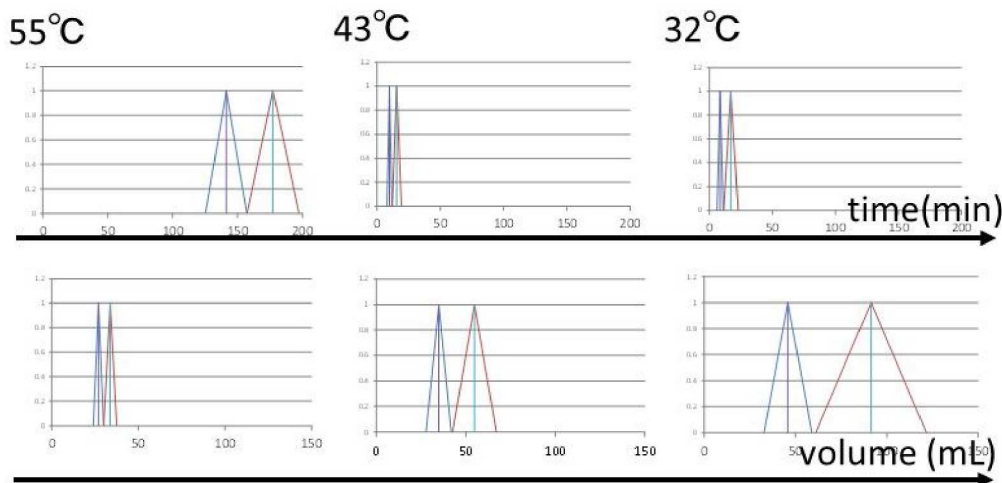


図6 55、43、32°Cにおいて計算した、三角形に近似したピーク

それでは、サイクルが短ければ工程の生産性が高いと言えるのだろうか。次に、生産性を最適化する条件を求めることとした。

本章では生産性を最大化する温度の決定を試みているが、通常、生産性 P は(19)式として定義される。

$$P = (C_0 V_F) / (V_0 t_c) = [(sample\ concentration)(sample\ volume)] \div [(column\ void\ volume)(cycle\ time)] \quad (19)$$

ここで C_0 は分離に供するサンプルの濃度、 V_F はその体積、 V_0 はカラムの空隙体積、 t_c はサイクル時間である。一方で、実生産において考慮すべき移動相の消費量を生産性の評価に加えると、以下の定義式

P_1 が(20)式のように提案されている[3]

$$P_1 = (C_0 V_F) / (V_0 t_c V_c) = P / V_c \quad (20)$$

ここで V_c はサイクル体積である。 P_1 はカラム容量、溶媒使用量及びサイクル時間あたりに得られる生産量を示す。その単位は $[(kg-product)(m^3-bed)^{-1}(m^3-solvent)^{-1}s^{-1}]$ である (m^3-bed はカラム空隙体積 m^3 -void volume of bed を示す)。吸着等温線が線形である場合、 $P^*=P/C_0$ の式が利用される。 C_0 はサンプル

濃度[$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$]を示す。すなわち、生産性は C_0 に比例し、等温線が線形であれば以下の(21)式に整理できる。

$$P^* = P/(C_0V_C) = V_F/(V_0t_CV_C)$$

$$= [\text{sample volume}] \div [(\text{column void volume})(\text{cycle time})(\text{cycle volume})] \quad (21)$$

図 7 に生産性 P^* と温度の関係の計算結果を示す。結果を現実的なものとするため、計算は $K > 1$ 、 $u < 15\text{cm}/\text{min}$ の範囲で実施した。なお、この範囲は本研究では一貫して設定した。 P^* を最大化する流速 u の計算にも MicroSoft Excel の Goal-seak 機能を使用した。

P^* の最大値は、 $T = 50$ 、 $K_1 = 2.65$ 、 $K_2 = 3.86$ 、 $K_2 - K_1 = 1.21$ 、流速 $u = 4.7\text{ m}/\text{min}$ 、 $t_c = 12.9\text{ min}$ 、 $t_s = 27.8\text{ min}$ 、 $V_0/V_0 = 3.9$ の時に最大となることが示された。ここで、逆相分離の系において、生産性を最大化する最適温度が存在することが明らかとなった。

t_s 、 t_c はそれぞれ 41 、 43°C で最小化するが、 P^* はそれぞれ 50°C で最大化することが明らかになった。この温度を超えると分子拡散係数 D_s が急激に上昇し、 $R_s = 1$ を維持するために流速 u を急激に低下させる必要があるため、生産性は低下したと考えられる (表 4)。

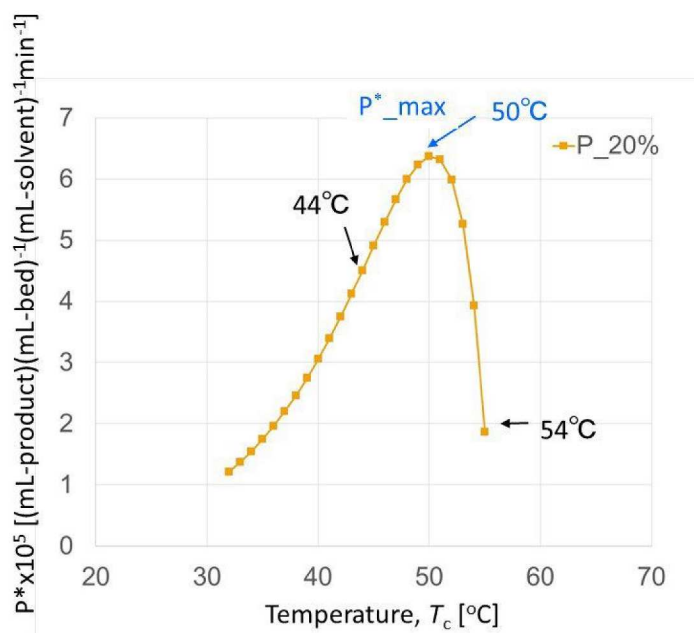


図 7. 温度 (T) の関数としての生産性 P^* 、 $K_2 - K_1$

表4 50°C付近で計算した K 、 D_s 、 u

temperature [°C]	Catechin		EGCG		u [m/s]
	K	D_s [m ² /s]	K	D_s [m ² /s]	
40	5.44	2.2E-11	13.6	1.05E-11	1.92E-03
45	3.03	3.0E-11	4.89	1.64E-11	1.41E-03
50	2.65	4.1E-11	3.86	2.52E-11	7.88E-04
55	2.33	5.4E-11	3.07	3.83E-11	8.95E-05

図8に移動相組成が変化した時の生産性 P^* と分配係数差 (K_2-K_1) と温度の関係を示す。移動相組成が変化すると、最適温度も変化することが明らかとなった。移動相組成、温度、流速の最適な組み合わせを求めることができる。装置的な制約に応じて、自由な計算が可能となった。

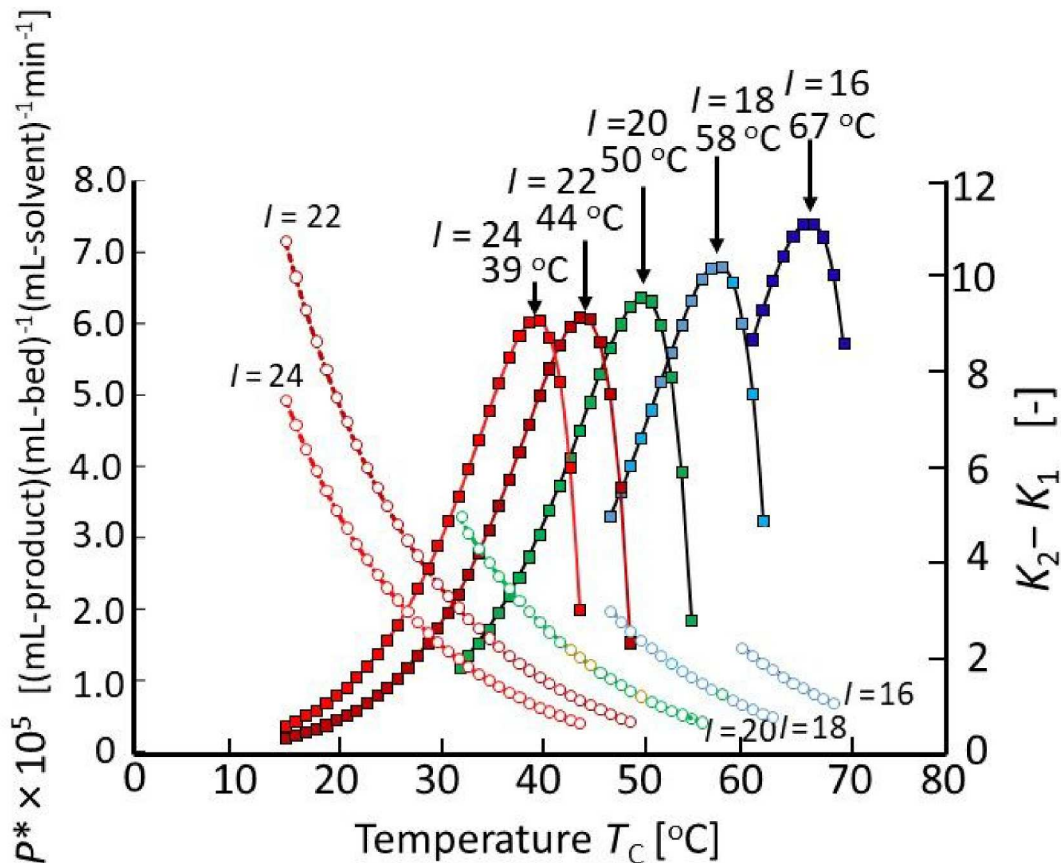


図7. 様々な移動相エタノール濃度 I [%] における温度 (T) の関数としての生産性 P^* 、 K_2-K_1

本計算が妥当であることを示すため、(1)式を基に溶出曲線を計算により求めた。計算は表3で求めた値を用いた。簡単化のため、ピーク高さはすべて1とした。計算の結果、図8に示すように、実験曲線と同等の曲線を計算により作成することができた。

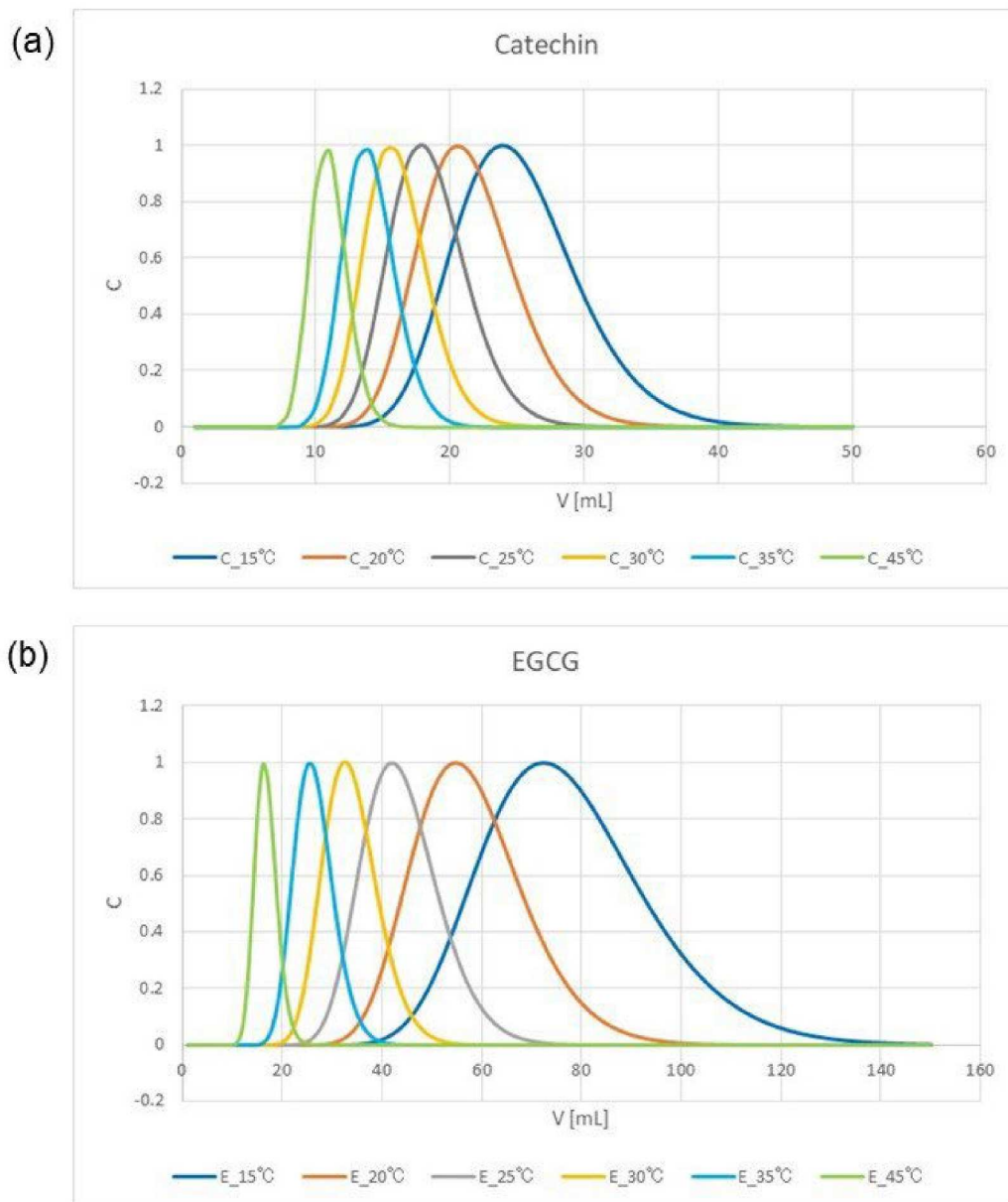


図 8. 様々な温度における計算で求めた溶出曲線

(a) Catechin、(b) EGCG、 $I=20\%$ 、 $F_v=1\text{mL/min}$

3.3.3 生産性を最大化する温度、溶媒組成、流速の組み合わせ

3.3.2 において、エタノール濃度 I が一定の条件下で生産性を最大にする u 、 T の組み合わせを求めた。

異なる I の下で生産性を最大化する u 、 T の組み合わせが存在することが明らかになった。そこで次に、 I を連続的に変化させた場合に生産性を最大化する u 、 T 、 I の組み合わせを求めることを試みた。

3.3.2 と同様な計算で、 I を変化させてそれぞれのエタノール濃度での生産性が最大となる流速を求めた。

P の変動は Fig.5 のようになり、最大値は $I = 15$ [%], $T = 69$ [°C] の時であった。一方、溶媒消費量に注目した生産性 P^* は $I = 40$ [%], $T = 29$ [°C] の時であった (Fig. 6)。どちらの生産性を重視するかで選択は変わってくるだろう。装置による制限条件でも選択は決定するだろうが、このような分布は分離工程の条件設定上、有用なものであると考える。

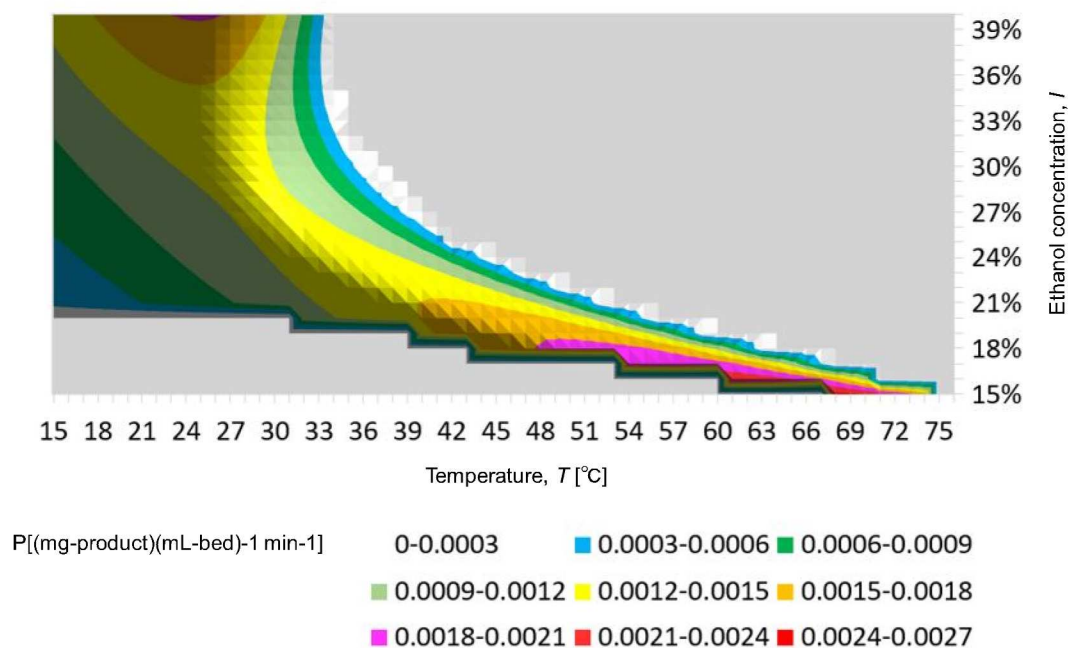


図9 $R_s = 1$ の等分離条件下で温度、エタノール濃度、流速を変動させたときの生産性 P

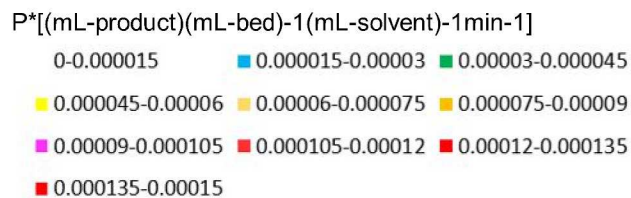
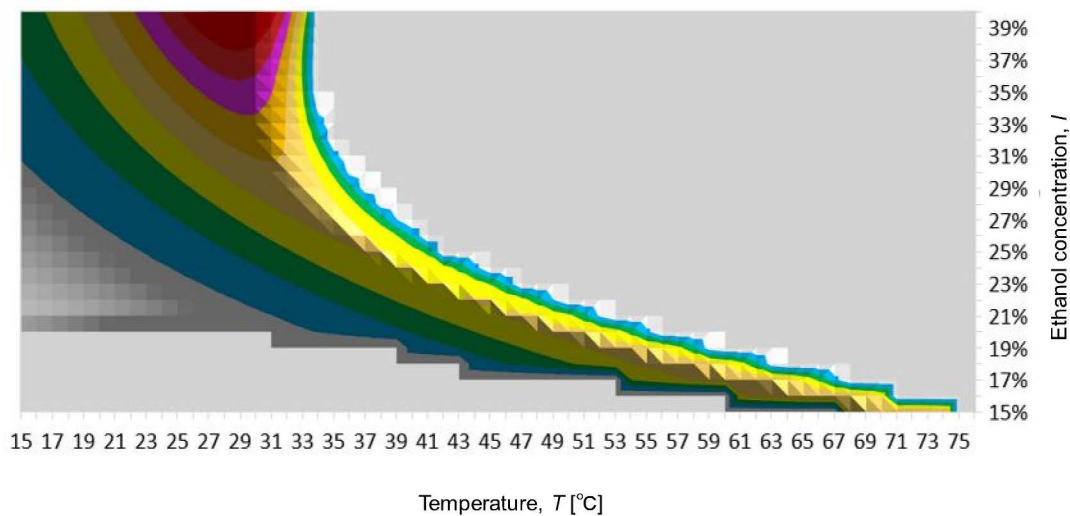


図 10 $R_s = 1$ の等分離条件下で温度、エタノール濃度、流速を変動させたときの生産性 P^*

3.3.4 カラム層高が生産性に与える影響

分離プロセスを構築するにあたり、カラムの設計は重要である。カラム体積 V_0 が一定の条件下での、最適なカラム内径 (d_c)、層高 (Z) を考える。エタノール濃度 I が一定である条件下、 $R_s = 1$ の等分離条件下で生産性を最大化する d_c と Z の組み合わせが計算可能となる。なおここでは V_0 が一定の条件下での最適化を試みるため、 Z が決まれば d_c は自動的に決定する。

生産性 P は(4)式のように定義されている。($P = (C_0 V_F) / (V_0 t_c)$)

また、 $t_c = V_0 / F_v$ である。

$R_s = 1$ の条件下では以下の(22)式[1]より、 Z と線流速 u が比例することがわかる。

$$R_s = \frac{\sqrt{Z}}{2} \frac{H(K_2 - K_1)}{(1 + HK_1) \sqrt{A_1^0 + C_1^0 u} + (1 + HK_2) \sqrt{A_2^0 + C_2^0 u}} \quad (22)$$

ここで V_c は(23)式のように表現され、 Z と u が十分に大きければ、一定の値に収束していくことが分かる。

$$V_c = V_{2b} - V_{1a} = W_{v1} - W_{v2} = \frac{4V_0(1 + HK_1)\sqrt{A_1 + C_1u}}{\sqrt{Z}} + \frac{4V_0(1 + HK_2)\sqrt{A_2 + C_2u}}{\sqrt{Z}}$$

$$= \frac{4}{\sqrt{Z}}V_0[(1 + HK_1)\sqrt{A_1 + C_1u} + (1 + HK_2)\sqrt{A_2 + C_2u}] \quad (23)$$

一方、体積流速 F_v [mL/min] は(24)式のように u [m/s]、 Z [cm] で表現できる、こちらも Z と u が十分に大きければ、一定の値に収束していくことがわかる。

$$F_v = 6000\pi\epsilon u \left(\frac{d_c}{2}\right)^2 = \frac{6000\epsilon V_0 u}{Z} \quad (24)$$

以上より、 $t_c = V_c/F_v$ は減少しつつ一定の値に収束していくと考えられ、逆に $P = (C_0 V_F)/(V_0 t_c)$ は増大しつつ一定の値に収束していくと考えられる。 P^* も同様の挙動を示すと考えられる。

実際に、カラム長さと流速のみ変動する条件下で計算すると図 11 のようになり、一定以上のカラム長さでは生産性が向上しないことが示された。

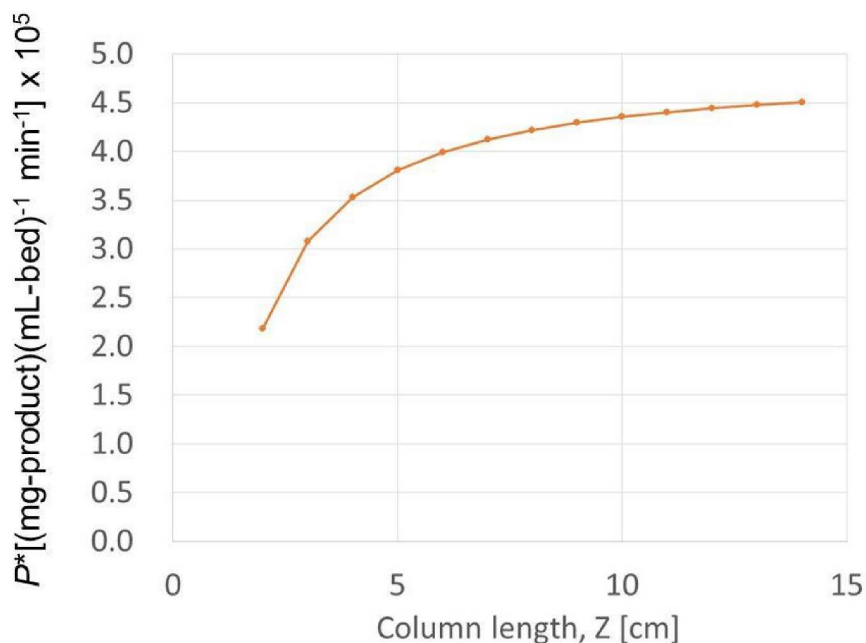


図 11 カラムの長さが生産性 P^* に与える影響

3.3.5 粒子径が生産性に与える影響

粒子径以外の要素が一定である時、 $R_s=1$ とすると、(10)式より(25)式のようになり、左辺は一定となる。

$$(1 + HK_1)\sqrt{A_1^0 + C_1^0 u} + (1 + HK_2)\sqrt{A_2^0 + C_2^0 u} = \frac{2}{\sqrt{2H(K_2 - K_1)}} \quad (25)$$

このとき、[2]より、HETP は式(26)のように表記できる。

$$\text{HETP} = \frac{Z}{N} = A^0 + C^0 u = 2 \left(\frac{D_L}{u} \right) + \frac{d_p^2}{30D_s} \frac{HK}{(1+HK)^2} u \quad (26)$$

である。 d_p は分離剤の粒子径であり、一般的に

$$A^0 = 2 \left(\frac{D_L}{u} \right) = 2 \sim 8 d_p$$

となることが知られており、

$$A^0 = 0.045 = 7d_p \quad (d_p = 67 \text{ um})$$

となる。

すなわち、HETP は(27)式のようになる。

$$\text{HETP} = \frac{Z}{N} = A^0 + C^0 u = 7d_p + \frac{d_p^2}{30D_s} \frac{HK}{(1+HK)^2} u \quad (27)$$

(25)式の左辺が一定であることおよび(27)式より、 d_p^2 と u が反比例する。すなわち、 d_p の増大とともに、 u の値は指数関数的に減少し、(24)式より F_v 値も同様に減少する。さらに(11)式より d_p 値の増大とともに P 値は低下すると考えられる。

(19)~(21)式より P^* も P と同様の挙動を示すと考えられる。すなわち、粒子径の増大とともに生産性 P^* は低下すると考えられる。

実際に、粒子径 d_p と流速 u のみ変動する条件下で計算すると図 12 のようになり、粒子径の増大共に減少した。粒子径の低下とともに計算上の生産性は向上するが、圧力損失が限界に到達するため、生産

性の向上には流速 u が律速となることが計算的に示された。線流速の上限を 900 cm/h とすると、計算した 5、10、20、30、40、50、60、80、100、200、500 μm では 60 μm で上限に到達することが明らかになった。HP20SS の粒子径が 67 μm であり、ほぼ下限に到達していることが示唆された。

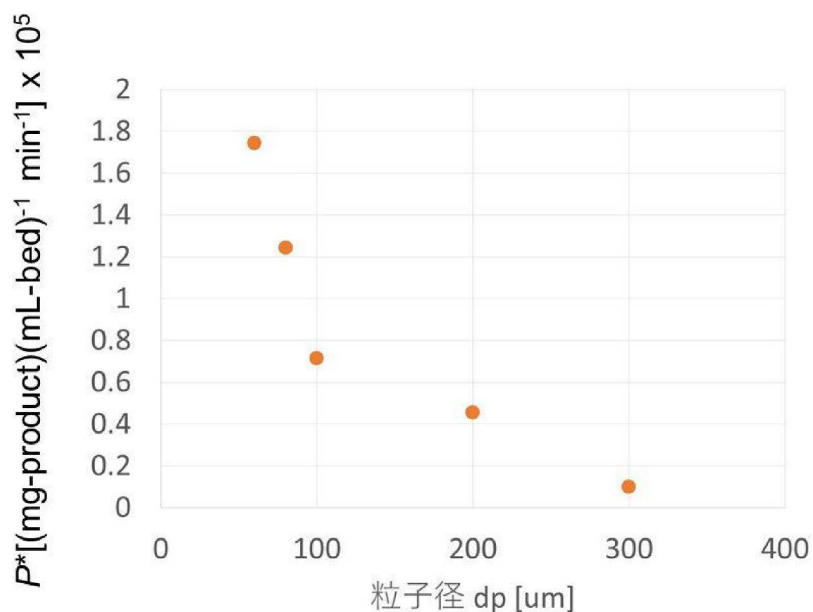


図 12 粒子径 d_p が生産性 P 、 P^* に与える影響

3.3.6 リニアグラジエント溶出条件下での温度最適化

以上の検討は、等組成溶出条件下で行われたものである。等組成溶出条件下では、本研究で作成したモデルにより、生産性を最大化する温度、溶媒組成、流速の組み合わせを決定する手法を作成し、加えて、実際の製造における分取クロマトグラフィーにおいて重要な、カラム高さ、レジンの粒子径の影響も評価することができた。これは、等組成溶出条件下においては、二成分の分子拡散係数、固定相拡散係数が変化しないために可能であったと考えられる。

一方で、グラジエント溶出条件下では現象は複雑になる。移動相組成の増大により、リニア（線形）グラジエント溶出条件下においても、非線形的等温線が形成するため、リニアグラジエント溶出実験の結果だけから、現象を予測するモデルを作成することは困難であると考えられる[9]。それにもかかわら

ず、 A や B などのパラメータをリニアグラジエント実験によって決定し、その後追加実験によって非線形的項目を測定するのが一般的と考えられている[10]。

リニアグラジエント溶出実験によって A や B を決定する方法では、移動相モジュレーター（今回の場合はエタノール）が溶質よりもはるかに速く固定相に出入りするを前提としている。エタノール（分子量 46）とカテキン（分子量 290）及び EGCG（分子量 458）の拡散係数を考えた時、この前提は有効であると考えられる。しかし、この手法は、非常に勾配の大きなモジュレーター分子の場合は機能しない可能性がある。

本研究で開発した手法の計算手順を図 13 にまとめる。

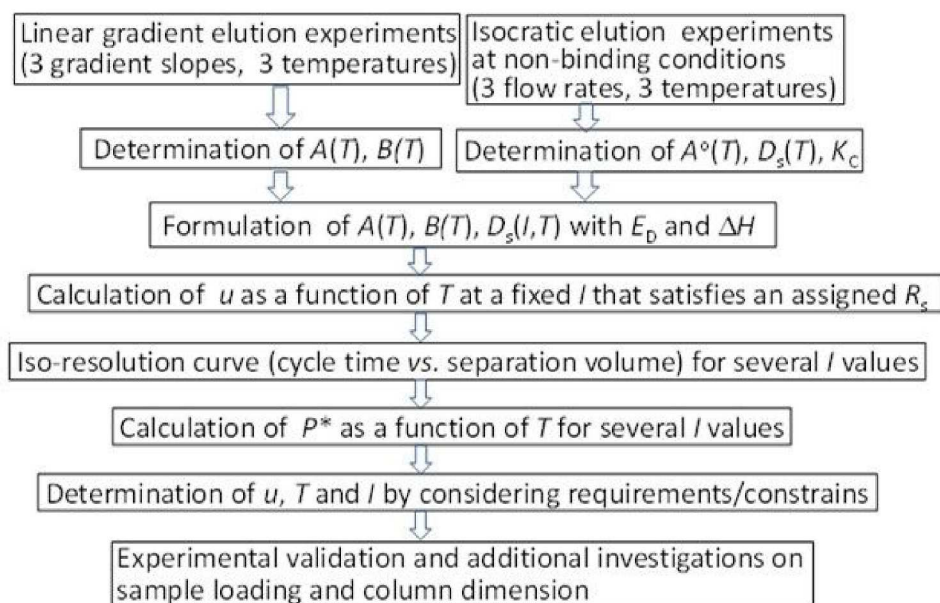


図 13 本研究で開発した手法の計算手順

3.4 まとめ

逆相分離における最適温度の決定法を開発した。モデル化合物としてポリフェノールを使用し、PS-DVB を基材とするレジンを固定相として、水-エタノール混合物を移動相として用いた。分配係数 K がエタノール濃度 l 、温度 T の関数として決定された。 K 、 T 、および移動相線速度 u を基に等分離曲線を決定した。等分離曲線から、生産性が l 、 T 、 u の関数として計算できるようになり、生産性が最大とな

る最適な温度が存在することが明らかになった。実際分離曲線を基に作成したモデルを用いた計算手法であり、産業上も有用であると考えられる。

また、同じモデルを用いて、カラム長さ Z 、分離剤粒子径 d_p が生産性に及ぼす影響についても計算する手法を開発した。 Z は一定以上で生産性はほぼ一定となり、生産性がカラム長さに依存しないことが示された。粒子径 d_p が小さくなるほど理論上は生産性が向上するが、同時に圧力損失が上昇するため、プロセス圧力の上限により最大生産性での運転ができない場合があることも示唆された。

引用文献

- [1] 吉田有哉; グリーン・ケミストリーと化学産業の競争力強化, みずほ情報総研レポート, (2013), 6, 2-15
- [2] M. Hosono, R. Maeda, N. Yoshimoto, S. Yamamoto; Rational Method for Designing Efficient Chromatography Processes Based on the Iso-Resolution Curve. *Chem. Eng. Technol.* (2012), 35, 1, 198-203
- [3] N. Yoshimoto, Y. Sugiyama, S. Yamamoto; A Simple Method for Calculating Productivity of Polyphenol Separation by Polymer-based Chromatography. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2017) 81, 812-816
- [4] F. Fang, M. Aguilar, M. Hearn; Influence of Temperature on the Retention behavior of Proteins in Cation-exchange Chromatography, *J. Chromatogr. A*, 729 (1996) 49-66
- [5] T. Greibrokk, T. Andersen; High-temperature Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1000, (2003) 743-755
- [6] J. Cardoso, N. Yoshimoto, S. Yamamoto; Thermodynamic Analysis of Polyphenols Retention in Polymer Resin Chromatography by Van't Plot and Isothermal Titration Calorimetry; *J. Chromatogr. A*, 1608 (2019) 460405
- [7] J. Cardoso, N. Yoshimoto, S. Yamamoto; Method for Thermodynamic Analysis of Temperature Dependence of Distribution Coefficient in Chromatography Separations. *日本食品工学会誌*, (2019) 20, 3, 99-105
- [8] P. Martos, A. Saraullo, J. Pawliszyn; Estimation of Air/Coating Distribution Coefficient for Solid Phase Capillary Gas Chromatography. Application to the Sampling and Analysis of Total Petroleum Hydrocarbons in Air. *Analy. Chem.* (1997), 69, 402-408
- [9] A. Creasy, J. Reck, T. Pabst, A. Hunter, G. Barker, G. Carta; Systematic interpolation method predicts antibody monomer-dimer separation by gradient elution chromatography at high protein loads *Biotechnol. J.* (2019) 14
- [10] Y. C. Chen, S. J. Yao, D. Q. Lin; Parameter-by-parameter method for steric mass action model of ion exchange chromatography: Theoretical considerations and experimental verification. *J. Chromatogr. A*, (2022), 1680

第4章 結言

クロマトグラフィー分離は、バイオ医薬品、機能性食品の製造工程ではその品質に影響を与える重要な工程として位置づけられている。一方で、クロマトグラフィー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、精密分取クロマトグラフィーでは数多くの報告があるが、製造用の分取クロマトグラフィーでの温度の最適化の報告はほとんどない。これまで、分取クロマトグラフィーは、分離性能に悪影響を及ぼさない程度の消極的なコントロールがなされてきたと考えられる。分取クロマトグラフィーで温度コントロールを試みた例としては、食品製造においてクロマトグラフィーの溶媒や溶質の粘度を低下させる目的で実施されている例もあるが、非常に限られている。しかし温度条件が物質移動、移動相、基質の粘度などに影響を与える可能性は高く、クロマトグラフィー分離の温度条件、特に生産性を最大化する最適な温度を考えることは、産業利用上も極めて有用であると考えられた。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) 由来のレジンによるポリフェノール類の分離系を用い、温度最適化の検討を実施した。その際、産業上の利用も考え、複雑な手法ではなく、温度の影響を簡便に推定する手法の開発を目指した。

第2章では、ポリフェノール類をエタノール-水系の移動相で分離する等組成溶出クロマトグラフィー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。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。条件によっては最適温度が存在するが、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。一方で、高温でのクロマトグラフィーは分離体積、分離時間共に減少するため、プロセスの経済性の面でメリットがあると考えられた。

第3章では、ポリフェノール類をエタノール-水系の移動相で分離する等組成溶出クロマトグラフィーにおいて、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、分離、生産性を温度の関数として決定した。求めた分離度が一定の場合の等分離曲線から分離時間を最小化する温度と流速の組み合わせを決定した。さらに、クロマトグラフィー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した。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。

本研究の成果として、逆相クロマトグラフィーにおける温度の影響を評価し、計算によってクロマトグラフィーの分離度、生産性を推算することが可能となった。定組成溶出逆相クロマトグラフィーにおいては、高温で実施することで分離度、生産性が大幅に向上することが明らかとなった。ただし、より高温であれば良いということではなく、多くの場合にベストな分離度、生産性を実現するための最適温度が存在した。また、本研究で検討した計算方法は、温度のみならず、流速、カラム長さなど、様々な分離パラメータの最適な組み合わせを検討することが可能であることが示された。本研究で提案した方法を用いて、逆相クロマトグラフィーに限らず、より広い産業上の分析、分取の場面で温度をクロマトグラフィー分離に積極的に活用していくことが期待される。

Nomenclature

A	constant	[-]
B	constant	[-]
C_{\max}	maximum peak concentration	[mg · mL ⁻¹]
C_0	sample concentration	[mg · mL ⁻¹]
D_L	axial dispersion coefficient	[m ² · s ⁻¹]
D_m	molecular diffusion coefficient	[m ² · s ⁻¹]
D_p	pore diffusion coefficient	[m ² · s ⁻¹]
D_s	stationary phase diffusion coefficient	[m ² · s ⁻¹]
F	volumetric flow rate	[mL · min ⁻¹]
H	volumetric phase ratio $(= (V_T - V_0)/V_0 = (1 - \epsilon)/\epsilon)$	[-]
HETP	height equivalent to a theoretical plate	[m]
I	ethanol concentration	[%]
K	distribution coefficient	[-]
N	theoretical plate number	[-]
$P = (C_0 V_F)/(V_0 t_C)$	amount of product obtained per bed volume per cycle time	[mg · mL ⁻¹ · min ⁻¹]
$P_1 = P/V_C$	amount of product obtained per bed volume per cycle time per cycle volume	[mg · mL ⁻² · min ⁻¹]
$P^* = P_1/C_0$	sample volume per bed volume per cycle time per cycle volume	[mL ⁻¹ · min ⁻¹]
R_s	resolution	[-]
t	time	[min]
t_C	cycle time	[min]
t_R	retention time	[min]
t_{SEP}	separation time	[min]
u	mobile phase velocity	[mL · min ⁻¹]
V_C	cycle volume	[mL]
V_F	sample volume	[mL]
V_R	retention volume	[mL]
V_{SEP}	separation volume	[mL]
V_t	column bed volume	[mL]
V_0	column void volume $(=\epsilon V_t)$	[mL]
W	peak width at the base line $(=4\sigma_t)$	[min]
Z	column height	[cm]

Greek

ε void fraction ($=V_0/V_1$)

σ standard deviation

Subscripts

a start position of elution curve

b end position of elution curve

・ 発表論文リスト

(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 : Volume 22, No.2, Page 53-57

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

発行年月 : 2021 年

(本文との関連 : 主に本論文の第 2 章と関連)

(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 : Volume 25, No.1, Page 53-57

発行年月 : 2024 年

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

(本文との関連 : 主に本論文の第 3 章と関連)

(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 : 13-17

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

発行年月 : 2022 年

(本文との関連：主に本論文の第 3 章と関連)

謝辞

本研究にあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました山口大学大学院創成科学研究科准教授、吉本則子先生に深く感謝申し上げます。吉本則子先生には、終始一貫して懇切、丁寧なご指導を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また、本論文を作成するにあたり、山口大学大学院創成科学研究科ライフサイエンス系専攻 山本修一教授には有益なご助言を賜りました。謹んで御礼申し上げます。

本研究の機会を与えていただいた三菱ケミカル株式会社 杉尾成俊氏、畚野信剛氏、大熊喜之氏、磯部英二氏、足立正氏、小野薬品工業株式会社 高田章氏、鳴瀧壮二氏には多大なるご支援を頂戴いたしました。心より感謝申し上げます。

また、本研究に協力、援助していただきました Chyi-Shin Chen 氏、Joao Cardoso 氏、前田亮氏、水口和信氏、鴻池史憲氏を始めとする山口大学大学院創成科学研究科ライフサイエンス系専攻の諸先輩、同輩、ならびに在校生の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、博士課程に進学するにあたり、協力、応援してくれた家族に深く感謝します。

2024年4月

野崎晋也