

综述与专论 ·

制备色谱操作条件的优化

Optimization of the Operational Conditions in Preparative Liquid Chromatography

李伟 欧阳藩

Li Wei Ouyang Fan

中国科学院化工冶金研究所生化工程国家重点实验室,北京 100080

State Key Lab of Biochemical Engineering, Inst. Chem. Metall., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘 要: 色谱优化是蛋白质生产制备工艺开发中必不可少的一步。本文讨论了不同的优化目标,介绍了目前常见的优化方法,特别是实际应用中的原则及实验方法,对涉及优化的基本概念也做了说明。

关键词: 制备色谱;优化

Abstract: Optimization is a key and indispensable step in process design for protein production. Starting from different optimization functions, the commonly used methods are discussed, with special concentration on practical rules and experimental techniques. Related concepts and definitions are briefly introduced.

Key words: Preparative chromatography; optimization

1 前言

目前的蛋白质色谱分离,就其应用,一般可分成实验室制备和生产制备。前者通常是为了获得一定数量的纯品,用于进一步的实验工作,如测定蛋白的物理/化学参数,研究其生物学、药理学、毒理学性质等。因用量不是太大,一般为了快速获得纯品,过程很少或仅做初步优化。成本在此阶段不是主要的考虑因素。

用于生产的色谱制备与此完全不同。生产过程必须考虑成本与产率,且工艺需对上游的变动,如原料的组成波动有相当的适应,故工艺必须经过优化。由于生产管理上的要求(如 GMP 等),条件一旦确定,很难再做变动,故优化需在过程开发阶段确定下来。

一个特定产品的分离,往往涉及多个步骤,多种方法。方法的选定和步骤的衔接以及每步方法中条件参数的初步确立,均需以优化思想为设计指导原则^[1,2],但本文重点不在于此。本文中的优化指在以上工作完成后,针对具体色谱工艺操作条件的优化。当然,由于联系密切,整体设计及初步实验在个别地方也稍有涉及。

色谱优化首先要明确优化目标,如产率、比产率确立参数及各参数间的关系,通过模拟或实验,确定最佳点或范围,即优化条件。

下面介绍几个与制备色谱优化有关的概念。

2 基本概念

2.1 色谱指标^[3,4]

2.1.1 处理量(through put) 指柱子在单位时间内处理样品的数量,即处理量 = 处理数量(sample size)/处理时间。

2.1.2 产率(productivity, production rate) 产率指单位时间内样品转变成产品(一定纯度)的量。也有定义为单位时间内单位体积的填料分离出的产品量^[5]。后者比前者多一个填料体积项。产率与处理量通过得率(回收率,见下一概念)联系在一起,即产率 = 处理量 × 得率。

2.1.3 得率(回收率, yield, recovery yield) 某组分纯化后所得的量与样品中该组分的量之比。蛋白得率应通过测活确定。

2.1.4 纯度(purity) 某组分的纯度,指组分在总量中纯品所占的比例。一般通过电泳等方法确定。

2.1.5 上样量(sample size) 一次色谱所加样品

量。

2.1.6 比产量(specific production) 色谱过程中消耗单位数量的试剂(流动相)所得到的产品数。

2.1.7 循环时间(cycle time) 指两次上样之间的时间。

2.2 经济指标^[6]

生产总费用(production cost) 色谱生产的费用由三部分组成:固定费用、操作费用、原料费用。

2.2.1 固定费用(fixed cost) 指色谱及相关设备的购置、安装、房屋投资。色谱及相关配套设备一般包括空柱、泵、罐、管及阀控制设备等。

2.2.2 操作费用(operational cost) 包括人员工资、填料试剂、能源消耗、设备的维修保养等。此项与生产规模成正比,考虑到生产规模扩大在一定程度上几乎与人员数目无关,故有人建议将人员费用归入固定费用项^[3]。

2.2.3 原料费用(feed cost) 原料费用大小由 3 个因素决定:原料本身的价格、得率、未完全分开的部分是否回收利用。

3 优化目标

针对不同的产品及色谱分离方式,优化目标不尽相同^[6],但基本上可分成两类:一是产率,二是比产量。

以产率为优化目标适用于两种情况:一是市场对产品的需求超过了现有的生产能力,故需提高产率。二是生产中,设备投资(固定费用)项远大于操作费用和原料成本,需在每次运转中,尽量提高产率,以发挥设备的潜力。

产率可作为唯一的优化指标,即追求产率的最大化。通常产率最大化时,蛋白质得率不会太高,如果原料样品很贵(如重组蛋白),则需附加一定的限制条件,如得率大于 90 %等。

一般说,在较低产率时,过程的费用主要是人力及固定资产折旧,当产率提高到一定程度时,试剂费用所占的比例逐渐提高。如果试剂成为主要费用项,则优化指标应选择比产量,即消耗单位试剂所能纯化蛋白数量。

在本文以下的讨论中,均以产率为优化指标,这主要因为目前蛋白的制备,特别是重组蛋白,即使是

工业生产,其规模也不是很大。在这种情况下,很少以比产量为优化指标。生产中最常见的是以产率为优化指标,以一定的得率为限制因素^[2,7]。

4 优化方法

优化方法可分成两类:模拟法和经验法。

4.1 模拟法

如果对待分离原料中的组分完全了解,有详细的热力学数据,由此可绘制吸附等温线,则可通过适当的模型,用计算机模拟各组分的色谱行为,从而进行优化。这可省去烦琐的实验,通过计算机快速找到优化点。目前这方面的文献很多^{[3,5][8,9,10,11,12]}。

这种方法目前还只能用于理论研究,因为模型得以建立的基础是吸附等温线,即组分在固定相与流动相浓度的变化关系曲线。对单组分、双组分,甚至三组分,都可找到比较符合实际的模型描述,但随着组分数的增加,各组分与固定相,以及组分间的相互作用变得异常复杂,已很难找到准确的模型加以描述^[3],而实际的蛋白样品几乎全是多组分的。事实上,很难在分离前完全用各组分的纯品做吸附等温线。但通过 2~3 种标准蛋白,混合成一个人工样品,通过模拟,研究各参数的变化对色谱行为的影响,可给实际优化以很好的参考。

现以 Gallant 的文章^[5]为例,对此方法做一介绍:

文章中选用了三种蛋白:混合成一定浓度的样品,做离子交换分离。分离采用线形梯度洗脱,顺序依次为:糜蛋白酶原 A(α -chymotrypsinogen A)、细胞色素 C(cytochrome C)、溶菌酶(lysozyme)。作者以细胞色素 C 为目标蛋白,左右为杂蛋白。3 种蛋白在固定相的表现(线性及非线性)用 SMA(steric mass action)模型能很好的加以描述。优化在此基础上进行。

优化目标是产率,将其余数据分成 3 类:1)参数类:此部分值已固定,不参与优化。包括上样浓度、固定相、pH、缓冲液及洗脱液的种类。2)变量类:优化改变量,包括进样时间(即进样量)和洗脱梯度。3)约束条件:可改变,但值是事先给定的,包括纯度、得率、分离间隔(相当于线性色谱中的分离度)等。见表 1。

表 1 优化变量^[5]

Table 1 Optimization variables^[5]

Variable	Type	Comments
产率	目标函数	纯化蛋白与完成纯化所需时间及固定相数量之比
样品组成	参数	此文中为 α -chymotrypsinogen A, Cyt C, Lys
样品浓度	参数	此文中为 0.2mM
固定相	参数	此文中为强阳离子交换填料
pH	参数	此文中为 pH 6.0
洗脱盐种类	参数	此文中为 NaCl
进样时间, 梯度斜率	优化变量	选定以获得最大产率
最高蛋白浓度	约束条件	设定在 1.0mM, 便于与未限定系统比较
纯度	约束条件	针对目标蛋白, 本文中大于 99 %
得率	约束条件	产物回收率, 本文中大于 95 %
分离间隔	约束条件	对间隔值大于零者, 认定纯度与得率均为 100 %

作者通过一个迭代程序进行优化。在此程序中, 参数与约束条件事先设定, 变量(进样时间和盐梯度)从小到大, 盐梯度在保证一定分离度的情况下选最陡梯度。计算产率, 与以前的产率比较, 如果产率提高, 则加大进样时间, 直到产率不增加为止, 此时便得到一个优化值。改变约束条件(如分离度、得率), 会得到不同的优化值, 最终得到满足一定条件的最优值。

由此可见, 计算机模拟无须收集、测量组分, 快捷方便, 可减少昂贵的、费时的、繁重的实验室工作。并且某些限制条件, 如分离度为 1.5, 模拟中只是一个设定值, 而在实验中则很难准确地实现。

此方法的另一大优点是可以研究非线性问题^[3], 即柱超载情况下的表现。单纯用实验方法往往难以找到规律性的东西。

4.2 经验法

实际的蛋白质色谱分离过程优化绝大多数无法通过模拟, 而只能采用经验法实现。具体过程随产品种类及色谱方法的不同而不同, 需区别对待, 但有

一些一般原则:

4.2.1 列出相关因素 每种色谱均有以下相关因素: 固定相, 包括种类及颗粒大小; 流动相; 柱尺寸; 流速; 洗脱方式等, 应首先列出。

4.2.2 列出限制因素^[6, 13] 优化前需要获得一些参数, 如年产量、纯度、原料价格、设备的操作指标等。例如泵的流速、压力, 这些可能是限制因素。也可能泵的流速允许很高, 但在此流速下, 检测和收集组分都成了问题。原料如果很贵, 则分离度应大, 以保证得率。各种限制因素需事先列出。

4.2.3 做小柱分析实验 一般对吸附色谱, 如离子交换、疏水、反相、亲和等色谱, 直径 2cm 以内, 柱长 10 ~ 30cm 已足够^[3]。

4.2.4 明确优化重点 产率的增加有两个因素一是提高上样量; 二是在保证一定分离度即产品达一定纯度的基础上, 增加流速。但不同色谱有不同的重点优化参数, 其值的变化对产率有较大影响, 也叫敏感参数^[14, 15]。见表 2, 优化应重点针对这些参数进行。

表 2 优化重点参数^[15]

Table 2 Important factors to consider in optimizing different preparative chromatographic steps^[15]

Chromatographic technique	Features	Important factors
凝胶过滤	对缓冲液组成不敏感	填料孔径及孔体积、柱床高、流速
离子交换	浓缩样品, 高上样量	梯度斜率、上样量、pH
反相	高分离度, 特别对小分子, 浓缩样品	填料骨架, 改性剂梯度斜率, 上样量
疏水	高分离度, 高上样量, 浓缩样品	疏水基团类型、盐种类浓度、梯度斜率
亲和	高特异性, 一步洗脱, 浓缩样品	亲和常数、样品滞留时间、洗脱条件

4.2.5 同时考察多个变量 如果优化参数有多个,则实验应考查其同时变化时对产率的影响,单纯研究两两对应关系,难以找到真正的优化范围。

4.2.6 灵敏度分析 对初步优化的参数做灵敏度分析,最终确定操作条件。下面以离子交换为例,讨论一下具体的优化过程。一般认为影响离子交换色谱分离效果的因素,有以下几项:

填料:至关重要,不同填料差别极大^[16]

柱子大小:柱长、柱直径

流动相组成:盐种类、缓冲液 pH 等

温度:一般采用室温

流速

上样量

洗脱梯度

对制备工艺而言,前四种因素通常在分离前期已基本确定。真正要优化的是操作条件,即后三项:流速、上样量、洗脱梯度。后两项为离子交换色谱的敏感参数。

在保证一定分离度的情况下,流速越大越好。流速的确定,受三个因素制约:一是分离度;二是填料本身性能(分离蛋白用的许多填料本身较软,无法承受太高流速);三是色谱系统,即泵的工作能力^[17]。

可能的情况下,上样量越大越好,增大上样量按两种方式进行,单纯增加上样蛋白的浓度(体积很小)叫浓度超载;保持适当浓度,只增加上样体积叫体积超载。浓度超载在制备中意义更大^[18],但受蛋白溶解度^[5]及分离度^[19]的限制,样品浓度上限需实验确定。一般实际操作中都采用一定浓度下的体积超载,超载量受分离度的制约。

洗脱梯度是离子交换色谱操作中最主要的条件之一,通过改变梯度变化的速度,即梯度斜率,可对分离度进行相当方便的调整。梯度陡,则分离度减少;反之,增大。

在确定了主要的优化变量后,可用 1~5mL 的小柱子做实验。

优化的基本顺序是流速,上样量,梯度。即先做流速对分离度及产率的影响;再增加上样量,明确样品浓度与体积对分离度与产率的影响;最后调整梯度。取值要结合实际情况:如上样量包括浓度应结

合样品情况;洗脱梯度,流速要结合填料、泵以及色谱系统的情况;三个变量都要看分离度要求。此时取值不求精细,但求分布的有代表性。一个变量有 3 点即可说明问题,3 点最好大致处于上限、下限、中间。在上述实验基础上,缩小范围,可用统计学上的方法,进行实验设计,找到相对产率最大的范围组合。

将上述参数,特别是上样量(浓度与体积)作适当调整,考察相应的产率变化是否敏感,最终确定优化参数范围。

参考文献

- 1 WF Prouty. Chromatography in Biotechnology, C Horvath and L S Ettre eds. ACS Symposium Series 529, American Chemical Society, 1993
- 2 A Jungbauer. J Chrom, 1993, 639:3~16
- 3 G Guiochon, et al. Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography. Academy Press, Boston, 1994, 595~657
- 4 S Yamamoto, K Nakanishi R Matsuno. Ion Exchange Chromatography of Proteins. Marcel Dekker, New York, 1988, 209~304
- 5 S R Gallant, S Vunnum SM Cramer. J Chrom A, 1996, 725:295~314
- 6 G B Cox. Process Scale Liquid Chromatography, G Subramanian ed. VCH, Weinheim, 1995
- 7 J C Janson T Pettersson. Preparative and Production Scale Chromatography, G Ganetsos and P E. Barker eds. Marcel Dekker, New York, 1992, 559~590
- 8 Q M Mao, I G Prince, T W Hearn. J Chrom A, 1995, 691:273~283
- 9 A Felinger G Guiochon. J Chrom, 1992, 591:31~45
- 10 S R Gallant, A Kundu, S M Cramer. Biotech and Bioeng, 1995, 47:355~372
- 11 A Jungbauer, O Kaltenbrunner. Biotech and Bioeng, 1996, 52:223~236
- 12 A Jungbauer. Proceedings of the 4th Asian - Pacific Biochemical Engineering Conference. Beijing, 1997, 824~828
- 13 D A Hill. Preparative and Process - Scale Liquid Chromatography, G. Subramanian ed. Ellis Horwood, Chichester, 1991
- 14 S Yamamoto, M Nomura, Y Sano. J Chrom, 1987, 409:101~110
- 15 G Safer, L Hagel. Handbook of Process Chromatography. Academic Press, San Diego, 1997, 58
- 16 P R Levison, et al. J Chrom A, 1997, 760:151~158
- 17 PR Levison, et al. J Chrom A, 1996, 734:137~143
- 18 J H Knox, H M Pyper. J Chrom, 1986, 363:1~30
- 19 G Vaneck, F Regnier. Anal Chem, 1980, 109:345~353