

Technical Review

高速向流クロマトグラフィー

岡田 靖則

High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)

Yasunori Okada

1. はじめに

近年、高速向流クロマトグラフィー (High-speed Counter-current Chromatography: 以下 HSCCC と略) の国際会議が二年に一度盛大に開催されるようになり、2010年7月にはフランスで第6回目の会議が行われる。残念ながら、我が国内においては装置の普及が遅れているため、HSCCC はあまり積極的に利用されていない。だが、HSCCC は既存の HPLC に比べて利点が多く、精製過程が格段に簡略化できる有用なツールであるため、この技術を広く普及していくことは科学技術全般の発展にも大きく貢献できると考えている。そこで今回、HSCCC をご存知ない方にも理解しやすいように原理と装置を概説し、さらに応用事例の一部を紹介する。なお、HSCCC の詳しい解説については既報の優れた総説[1]~[3]をご参照頂きたい。

2. HSCCC の基本的な原理と特徴

HSCCC は互いに混ざり合わない「二相溶媒系」の一方の液層を固定相、他方の液層を移動相とする液々分配クロマトグラフィーである (図1参照)。分離対象成分は液体の固定相と移動相への分配比 (分配係数) のみに従って純粋に液々分離される。また、HSCCC は固体充填剤を全く使用しないため、既存の HPLC にない極めてユニークな装置の構造や分離特性を備えている。

HSCCC では液体の固定相を安定に保持させるための特殊な遠心装置が必要である (装置の詳細は次項3に記述する)。この遠心装置は通常の HPLC の「分離カラム」に相当する部分であるが、実際の装置内においては細い中空のコ

ル状チューブが実質的な「カラムホルダー」として液体を固定する。固定相が液体である為、カラムを通ることによる溶質の変性や不可逆的な吸着、損失などがなく貴重なサンプルを失うことがない。また極めて広範囲な極性 (もしくは疎水性) を有する溶質を一回のインジェクションで分離できる。さらに、固定相液体は極めて簡単に再生 (再充填) できるため、分離カラムの劣化を全く気にすることなく粗精製試料の大量注入が可能であり、結果的にランニングコストも安価に納まる利点を有している。

3. 遠心装置の仕組み

液体の固定相をコイル状チューブ内に安定保持させるために、これまでに様々なタイプの遠心装置 (コイルプラネット

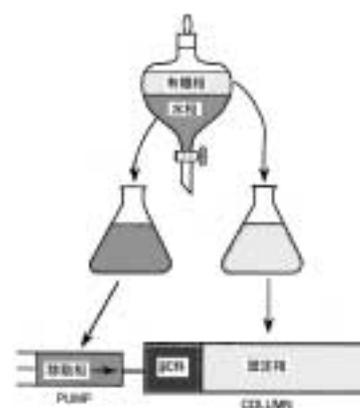


図1 HSCCC の概略図

クツワ産業株式会社

〒723-0003 広島県三原市中之町4-8-26

Tel: 0848-64-1001

Fax: 0848-64-0887

E-mail: ok@kutuwa.com

型遠心装置、以下CPCと略)が開発されているが、本稿では構造がシンプルで汎用されているJ型CPC装置について解説する。

図2に示した模式図のとおり、J型CPC装置では公転(ω)しながら自転(2ω)する回転体に中空のチューブが多層コイル状に巻いてあり、コイルの両末端は公転軸内を通過して外部(LCポンプあるいは検出器)へ接続されている。この回転体が公転1回に対し2回自転することでコイル内部の液体には強い遠心力とアルキメデスのスクリー効果(図3)が働く。これらの物理的な作用によりコイル内の二相溶媒は激しく攪拌されながら細かい液滴(図4)の状態連続的に液々分配を繰り返す。より具体的には図2と図5に示したように、コイル上のP点の挙動に注目すると、公転1回にともなう点Pの回転軌道は正円ではないことがわかる。また、図中のP点は公転軸から最も遠く、遠心力が最大のためコイル内で二相が分離した状態にある。一方、1/2公転したP点では遠心力が最小でしかも遠心ベクトルが瞬間的に大きく変化するため、コイル内では二相が激しく攪拌される。すなわちHSCCCでは回転するコイル内で二液相の攪拌と分離が連続的に行われる(1,000 rpmの時、毎秒16回)ことにより、コイル内に注入された溶質成分は二相溶媒への分配係数の差に基づいてコイル内で分離し、移動相の流れに乗ってコイルから溶出される。

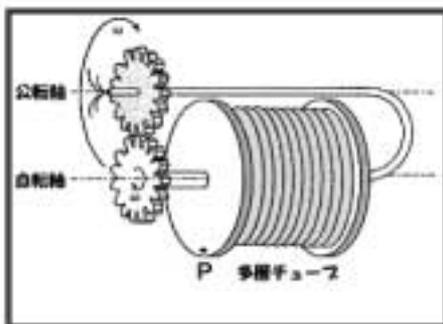


図2 J型コイルプラネット遠心装置(J型CPC)の概略図

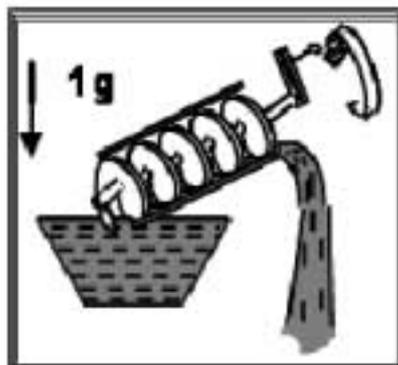


図3 アルキメデスのスクリー効果

また、コイルの回転方向が決まれば同時にスクリー効果の働く方向も決まるため、コイルの両末端に「Head」と「Tail」の向きの違いが生まれる。一般的には、スクリー効果によって固定相が移動する末端(Head)が移動相の送液口になる様にコイルを回転させることで、固定相はカラム内に安定的に保持されるが、二相溶媒系の種類により全く逆の場合もある(詳しい事例は文献1、2を参照のこと)。

4. 二相溶媒系の選択

通常のHPLCは固定相充填剤の選択が最も重要であるが、HSCCCでは分離したい試料に応じて適切な二相溶媒系を選択する必要がある(図6参照)。あらかじめ、二相溶媒系の上相と下相への試料成分の分配係数(K)を測定することで、最も適切な二相溶媒系の組成を決定することができる。HSCCCで汎用される二相溶媒系としては、ヘキサン-酢酸エチル-メタノール-(ブタノール)-水の混液や、t-ブチルメチルエーテル-(ブタノール)-アセトニトリル-

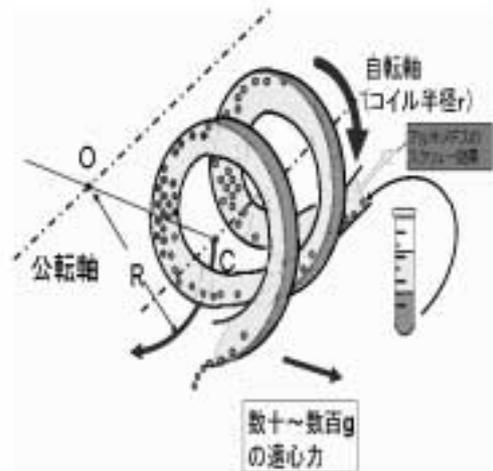


図4 カラム内部の概略図

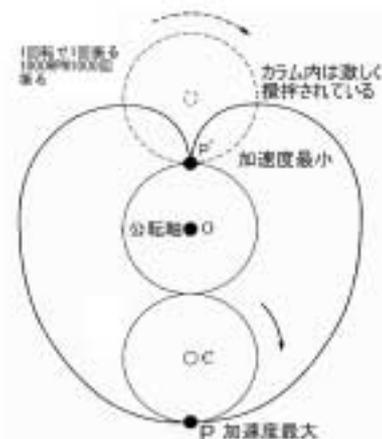


図5 回転に伴うカラムホルダーの軌道

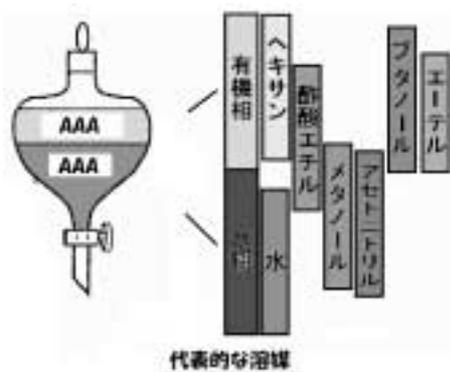


図6 二相溶媒系を構成する代表的な溶媒の組合せの例

水の混液などが汎用されているが、具体的な混合比などは既報[1]を参照されたい。HSCCCでは成分Aが上相にも下相にも同じ比率で分配していれば($K=1$)カラム(コイル状チューブ)体積に相当する溶出容量で成分Aは溶出する。したがって、どのような溶媒系を用いた場合でも分配係数が決まればHSCCCのクロマトグラム上における試料成分の溶出位置は自動的に決定する。一見当たり前のこの事実から、HSCCCは“真の”分配クロマトグラフィーであることが実感できるが、固体の充填剤を使用する一般的な順相や逆相(分配)HPLCでは「分配」以外の保持要因(疎水性相互作用や水素結合など)が働くため、事前に正確な溶出位置を予測することはできない。

効率よくHSCCCを行うためには、試料成分の分配係数が0.5~1の範囲になるように溶媒組成比を調整すると良い。一般的には、試料成分と目的成分の分配係数の差が0.1以上あれば高純度で分画が可能である。

5. 固定相が液体である利点を生かした溶出方法

HSCCCでは二相溶媒系の上相と下相のどちらでも固定相としてコイル内に保持させることができる(他方の相は移動相となる)。一般的な二相溶媒系の上相(有機溶媒相)を固定相とする場合の分離モードは「逆相分配」であり、下相(水相)を固定相とする場合は「順相分配」となる。すなわちHSCCCでは同一の試料成分に対し、逆相と順相の両分離モードを自在に選ぶことができる。实例として、ここでは東海林らによるカテキン類の分離例を紹介する[4]。図7のクロマトグラムは、*t*-ブチルメチルエーテル-アセトニトリル-水(0.1%TFA含有)(溶媒混合比2:2:3)の二相溶媒系を用いて、7種類のカテキン標準品をHSCCCで分離した結果である。上図Aは上相(有機溶媒相)を固定相とする逆相分配モード、上図Bは下相(水相)を固定相とする順相分配モードでの分離結果を示している。図を比較するとわかるように、逆相(A)における溶出順序と順相(B)における各物質の溶出順序はきれいに逆転している。既存のHPLCでは充填カラムを逆相用から順相用へ交換しても溶出

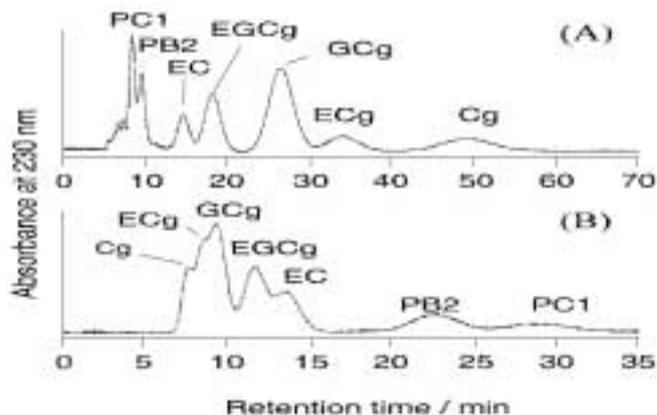


図7 逆相および順相分配HSCCCにおけるカテキン標準品のクロマトグラム

二相溶媒系：*t*-butylmethylether/acetonitrile/aq.TFA(2:2:3)、多層PTFEコイル：1.0mmI.D.×50m(40mL capacity)、回転速度：1250rpm、検出波長：UV230nm、クロマトグラムA：逆相分配モード(固定相：上相、移動相：下相、移動相流速：1ml/min)、クロマトグラムB：順相分配モード(固定相：下相、移動相：上相、移動相流速：2ml/min)

順序が逆転するとは限らないが、HSCCCではモード変更が極めて容易であるため、分析者は目的成分の分離に最もふさわしい分離モードを自由に選ぶことができる。

またHSCCCでは分離工程の途中でコイル内に充填されている固定相液体を押し出して回収することも可能である。図8に、上相を固定相とする逆相HSCCCにおける分離過程の模式図を示した。5種類の分配係数の異なる成分が共存する場合、移動相(下相)の送液に伴って、移動相に分配されやすい成分はカラム内で分離して溶出するが、固定相にしか分配されない成分はいくら移動相を流しても溶出しない。このような場合、図中の7番目から示したように、移動相を下相から上相へ切り換え、固定相と同じ溶媒を続けて送液することで、カラム内の分離状態を保ったまま、固定相に保持されて動かなかった成分を強制的に押し出して回収することができる。この場合、カラムの回転方向を変える必要はない。このような操作ができるのもまた、HSCCCの大きな特徴である。

6. 溶媒条件を検討する手順の実際

「HSCCCで試料を分離したいがどのような二相溶媒系を使用して良いかわからない」ときは、まず過去の分離事例を調べて参考にすることが一番良い(例えば文献1や3を参照のこと)。二相溶媒系を新規に検討する場合は、まず調製した二相溶媒のSettling Time(相分離時間)を調べると良い。具体的には、試験管に調製した上相と下相を同量入れてから強く攪拌・静置し、その後再び二相分離するまでの時間(秒)を計測する。この際30秒程度で二相になればJ型CPC装置

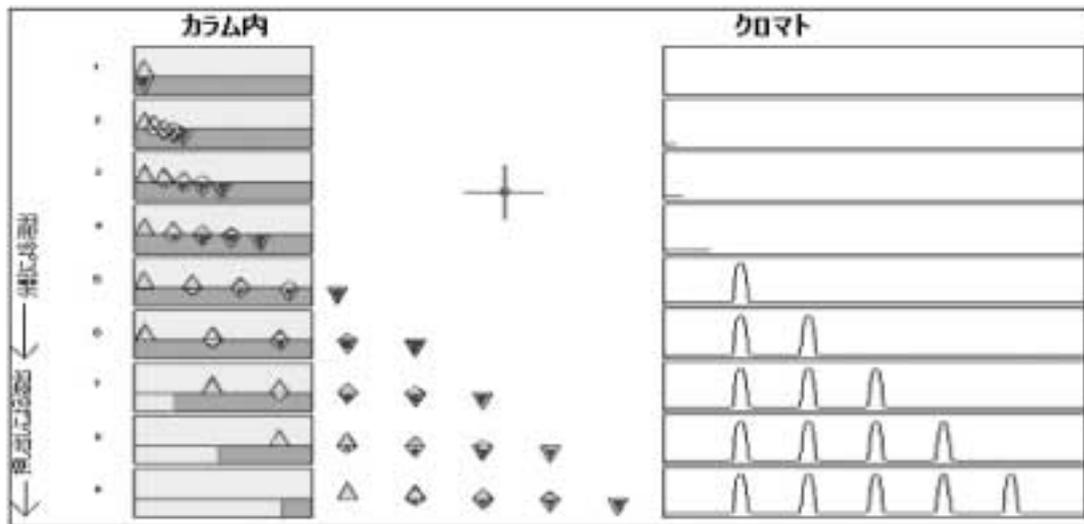


図8 逆相 HSCCC のカラム内における分離過程の模式図

においても安定した固定相の保持が期待できる。二相溶媒系のベース組成が決まれば、続いて以下の6.1、6.2のいずれかの手順でさらに適切な溶媒組成を決めることができる。

6.1 フラスコ振とう法での溶媒組成検討

目的成分の標準品がある場合は、上相と下相を同量入れた試験管（あるいは分液漏斗）へさらに試料標準品を分配させ、分光光度計で上相と下相の吸光度比から、目的成分の分配係数を予測できる（フラスコ振とう法）。

一方、目的成分の標準品がない場合、あるいは不純物を多く含む試料の場合は、上述のフラスコ振とう法を行った後、上下相中の成分をそれぞれ HPLC で分離して目的成分のピーク面積比から分配係数を予測できる。いずれにおいても、得られた分配係数値が0.4~1 前後になるように、さらに二相溶媒系の組成を絞り込む必要がある。

6.2 リサーチ用カラムを用いる HSCCC による溶媒組成検討

フラスコ振とう法を行わずに、コイル容量の小さな（25 mL）リサーチ用カラムに二相溶媒系の固定相を充填し、直接 HSCCC を行って分離挙動を確認しても良い。図9に示したように、1回の分析時間は約50分でクロマトグラムを取得できる。

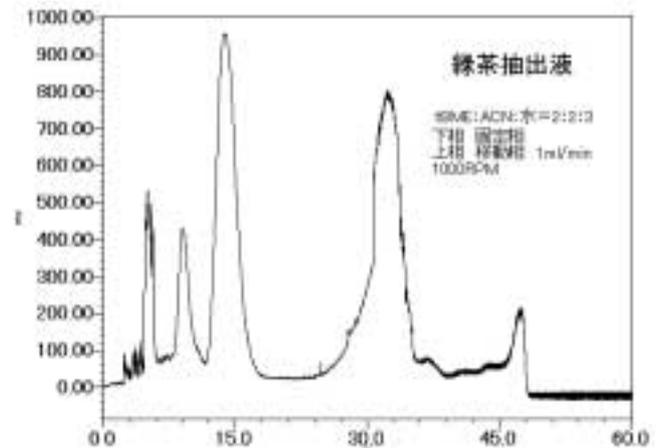


図9 リサーチ用カラムを用いた短時間分析例

して使用した。二相溶媒系はn-ブチルメチルエーテル-アセトニトリル-水（0.1%TFA含有）（溶媒混合比2：2：3）を使用し、下相（水相）を固定相として充填してから上相（有機溶媒相）を移動相として送液する（流速：5 mL）順相分配モードで試料成分の分離を行った。

図10は6種類のカテキン標準品を分離したクロマトグラムであり、各標準品は疎水性分子から親水性分子の順にカラムから溶出されている。また、図11、12はそれぞれ緑茶および紅茶の抽出液を HSCCC に注入して得られたクロマトグラムである。いずれの HSCCC 分離においても試料注入後60分で移動相を上相から下相へ切り替えている。これにより、分離当初はカラム内の固定相（下相）に強く保持されて溶出しなかった成分を、同じ下相で押し出すことにより、最終的に抽出液中の全成分をもれなく分離回収できていることがわかる。

7. HSCCC による分離の実例紹介

図10~12に、HSCCC により天然物成分（カテキン類）を分離した実例を紹介する（東京薬科大学 渋谷先生、柳田先生ご提供データ）[5]。ダイオードアレイ検出器を備えた日立製 HPLC 装置のインジェクターと検出器の間に、多層 PTFE コイル（1.6 mm I.D.、315 mL capacity）を備えた J 型 CPC 装置（EASY-PREP320、クツワ産業株式会社製）を接続

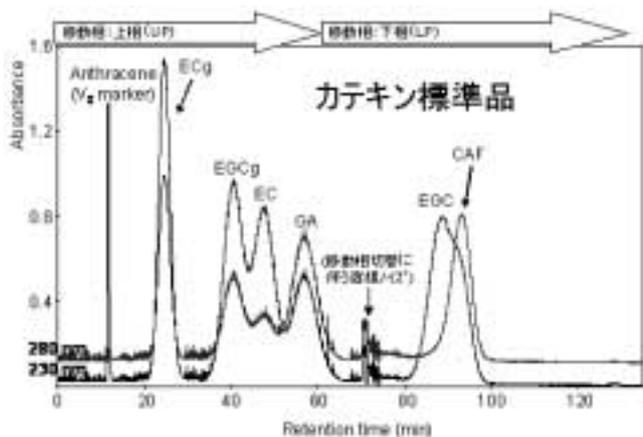


図10 順相 HSCCC によるカテキン標準品の分離例
 t-BME : CAN : 水 (0.1% TFA 含有) = 2 : 2 : 3
 固定相:下相 移動相:上相 (流速: 5 mL/min) 1,000 rpm

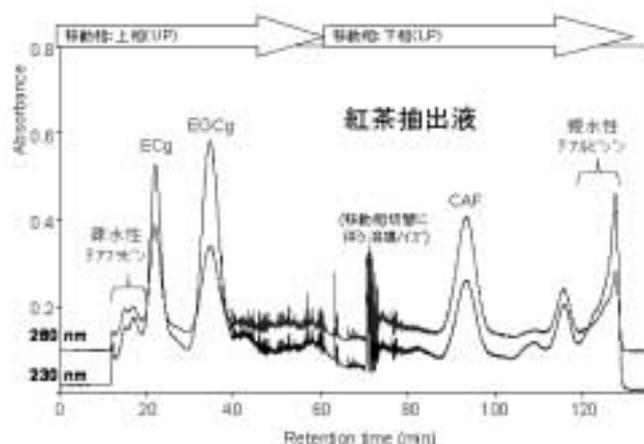


図12 順相 HSCCC による紅茶抽出物の分離例
 t-BME : CAN : 水 (0.1% TFA 含有) = 2 : 2 : 3
 固定相:下相 移動相:上相 (流速: 5 mL/min) 1,000 rpm

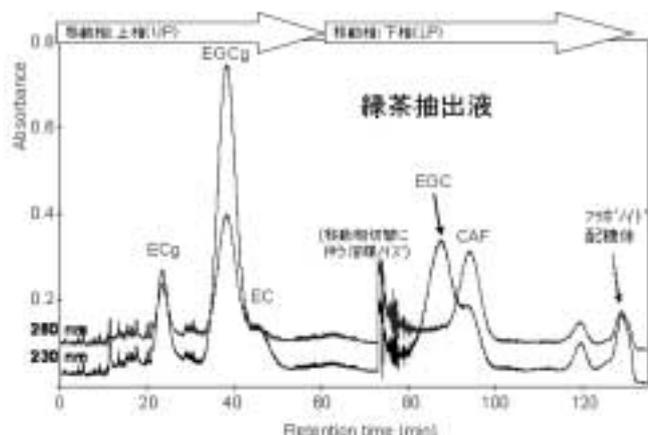


図11 順相 HSCCC による緑茶抽出物の分離例
 t-BME : CAN : 水 (0.1% TFA 含有) = 2 : 2 : 3
 固定相:下相 移動相:上相 (流速: 5 mL/min) 1,000 rpm

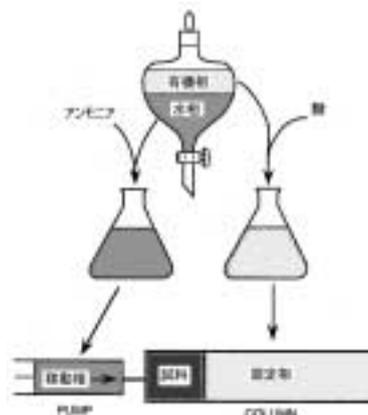


図13 pH ゾーンリファイニング法の模式図

8. その他の分離手法や分離例など

HSCCC は固定相が液体であるがゆえに、通常の HPLC では不可能な様々な分離手法が存在する。詳しい解説は既報の優れた総説[1]~[3]を参照頂きたいが、ここではそのいくつかを簡略に紹介する。

pH ゾーンリファイニング法はイオン性化合物を分取スケールで分離するために有用な手法として知られる。13に示したように、二相分液後に酸や塩基を加えてから固定相と移動相としカラム内での中和反応により分離する手法で、イオン性官能基を持つ成分を大量分取する上で有効な手法である。溶出順序は溶質成分の pKa に依存し、サンプル量は通常の液々分配の数倍の量を注入できる。

また HSCCC に水性二相溶媒系を適用することで、生体試料中のタンパク質の分離を行うこともできる。残念ながら、HSCCC で最も汎用される J 型 CPC 装置の通常コイルでは、

水性二相溶媒のような粘度が高く比重差の小さい二相溶媒系を安定的に保持平衡化することがこれまではできなかったが、近年コイル形状の見直しにより、水性二相溶媒の保持に優れるスパイラルカラムが考案された。弊社で試作したスパイラルカラムと水性二相溶媒を用いたタンパク質を分離した例を図14に示す。スパイラルカラムは通常のコイルとはチューブの巻き方が異なり、一卷毎に外側へ巻いていき外側まで行くと次の列の内側から巻き始める。固定相の保持力に優れているため、水性二相溶媒のような Settling Time が1分以上の溶媒にも利用が可能であり、今後への期待は大きい。

9. 実際の装置紹介

HSCCC の心臓部である J 型 CPC 装置は、市販の HPLC 装置一式 (ポンプ、インジェクター、検出器、フラクションコレクター等) に簡単に接続することができる。クワ産業株

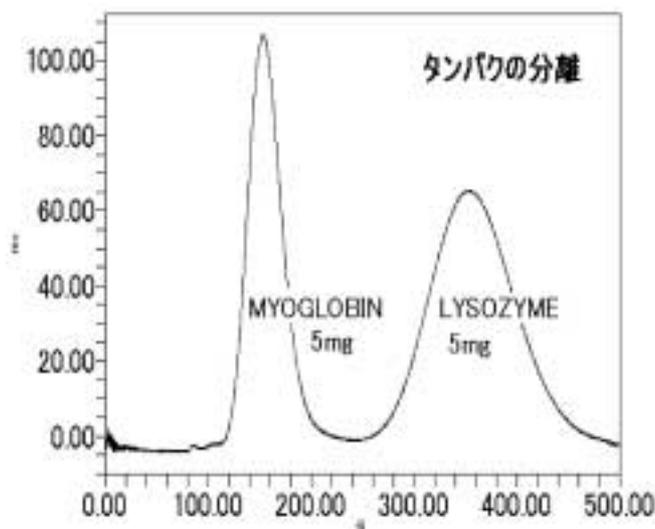


図14 スパイラルカラムによるタンパク質分離例
 INJ 1 ml (上相溶解) スパイラルカラム 108 ml
 溶媒 12.5%PEG1000 12.5% K₂HPO₄水溶液
 移動相 下相0.5 ml/min 検出 UV280 nm
 回転数 1000R.P.M 固定相保持率 87%

式会社は国内唯一の HSCCC 用 J 型 CPC 装置の製造販売会社である。最新モデルである Easy-PREP320 装置 (図15参照) は卓上型で幅約 40 cm とコンパクトであり、内蔵の PTFE 多層コイルは約 800 mL までスケールアップすることができる。1 回の注入量はカラム容量の 5% が目安であり、最大 40 mL を高濃度でインジェクションできる。ただしサンプルが高濃度でも二相を壊さないことが条件となる。

弊社の装置はトリプルローター方式、3 個のカラムを 120 度おきに配置し、比重の異なる溶媒を使用した場合でもカラムの重量バランスを考えなくて良い。さらにコンパクトで大容量が可能なデザインである。また開放部を広く取っておりメンテナンス性も重視している。コイルプラネット型カラムは、リサーチカラム (25 mL, I.D. 0.85 mm)、セミプレップカラム (320 mL, I.D. 1.6 mm)、分取用カラム (約 800 mL, I.D. 2.6 mm)、スパイラルカラム (30 mL, 70 mL, 108 mL, 210 mL) を用意している。用途に応じカラム及び装置の製作が可能である。



図15 クツワ産業(株)製 J 型 CPC 装置: Easy-PREP 320 型

10. おわりに

HSCCC は現在、欧米や中国などで非常に積極的に使用されており、特に天然物中の生理活性成分の分取などでは絶大な威力を発揮する。また、他の有機化合物や生体成分、無機成分などの分析事例も多数報告されているが、今回は初歩的な解説にとどめさせていただいた。さらに応用例や装置に興味を感じた方は、遠慮なく弊社までお問い合わせ頂きたい。この度の投稿にあたり東京薬科大学 渋沢庸一、柳田顕郎両先生の多大なご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- [1] Y. Ito, J. Chromatogr. A, 1065, 145–168, 2005.
- [2] 北爪英一, ぶんせき, 1, 28–36, 1998.
- [3] 北爪英一, ぶんせき, 6, 287–293, 2008.
- [4] 東海林敦, 柳田顕郎, 神藤平三郎, 渋沢庸一, 分析化学, 53, 953–958, 2004.
- [5] A. Yanagida, A. Shoji, Y. Shibusawa, H. Shindo, M. Tagashira, M. Ikeda, Y. Ito, J. Chromatogr. A, 1112, 195–201, 2006.