

向流クロマトグラフィー

四 宮 一 総

1 はじめに

向流クロマトグラフィー (countercurrent chromatography, CCC) は、互いに混ざり合わない二液相間での物質の分配を基礎とした分配クロマトグラフィーである。2000年に開始された CCC に関する国際会議 International Conference on Countercurrent Chromatography は、2018年にドイツのブラウンシュヴァイクで開催された「CCC2018」で10回目を数え、近年では J. Chromatogr. A に総説^{1)~3)}としてこの国際会議の様子が紹介されるようになった。また、2017年には雑誌 Separations にフランスの Berthod が編集した CCC の特集号が組まれるなど、CCC への関心度は飛躍的に増加している。これまで、本誌では1994年⁴⁾と2008年⁵⁾に北爪による「進歩総説」が掲載されているので、本稿では2008~2020年までの主な進歩を辿ることとする。なお、CCC は液-液分配を分離の原理としているので、同じ原理をもつ遠心液-液分配クロマトグラフィー (centrifugal partition chromatography, CPC) も CCC の国際会議と同様に一緒に扱うものとする。因みに、CCC2018において、CCC 国際会議は International Society of Partition and Countercurrent Chromatography (SPCC) という学会組織にすることが決定された¹⁾。

2 装 置

CCC の装置開発は、発明者である米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health, NIH) の Dr. Yoichiro Ito (伊東洋一郎) の研究に負うところが大きく、2008年以降に発表された装置も多くはその延長線上に位置している。これは、CCC 装置の原理的な理解が難しく、特にコイル状カラム内での物質の分離挙動が複雑であることも一因であると思われる。アメリカの Pauli は、CCC が普及する上では装置的には “Keep it simple” であるべきと述べている²⁾が、Ito は CCC が汎用的な分析法となることを歓迎しつつも、CCC の発展にはその原

理的理解は欠かせないと述べている⁶⁾。

2.1 スパイラル CCC

Ito の開発した CCC 装置の中でも J 型 CCC はコイル状カラムの自転と公転方向が同じである簡素な回転機構をもつ。J 型 CCC はカラム内での二液相の攪拌が激しく、有機溶媒-水系二相溶媒では固定相はカラム内に保持されるが、水性二相溶媒のような界面張力の小さい二相溶媒では固定相の保持は難しかった。この問題点を解決するため、Ito ら⁷⁾は、スパイラル CCC を考案、製作した。これは1枚の平板に渦巻状の溝を内側から外側に向かって作製し、8枚程度を積層したディスクをカラムに用いる J 型 CCC である。水性二相溶媒 12.5% (w/w) ポリエチレングリコール (PEG) 1000/12.5% (w/w) K_2HPO_4 水溶液の下層を移動相としてチトクロム c、ミオグロビン、オポアルブミン及びリゾチームの良好な分離を達成した。実験条件は、カラム容量 160 mL、カラム回転速度 800 rpm、移動相流速 0.25 mL/min で、52% という水性二相溶媒としては高い固定相保持率が得られているが、分離に 20 時間を要している。

2.2 I 型 CCC

J 型 CCC とは異なり、I 型 CCC ではカラムの自転と公転方向は互いに反対となる。そのため、J 型 CCC より二液相の攪拌効率は低下する。Yang ら⁸⁾は、カラムに多層コイル、溶媒系に 1-ブタノール (1-BuOH)/酢酸 (AcOH)/水 (H_2O) (4:1:5, v/v) 及び n-ヘキサン (Hex)/酢酸エチル (EtOAc)/メタノール (MeOH)/0.1 mol/L HCl (1:1:1:1, v/v) を用い、回転速度 200 rpm でジペプチドと DNP-アミノ酸の分離を行い、装置の有効性を確認した。また、12.5% (w/w) PEG 1000/12.5% (w/w) K_2HPO_4 水溶液を用いたリゾチームとミオグロビンの分離⁹⁾は回転速度 200 rpm、流速 0.1 mL/min で達成された。筆者ら¹⁰⁾も J 型回転と I 型回転のカラムを対角線上に二つずつ配置した CCC 装置を製作し、偏心コイル eccentric coil で 2 種類の異なる糖誘導体の分離を行い、両者を比較した結果、J 型回転の方が I 型回転よりも分離効率が高かった。また、

12.5 % (w/w) PEG 1000/12.5 % (w/w) K_2HPO_4 水溶液によるタンパク質の分離¹¹⁾では、J型回転は分離が達成されたが、I型回転は固定相が全く保持されなかった。

2・3 衛星運動型 CCC

CCCを効率よく達成するには、カラム内での二液相の攪拌、分相、移動相の移動を多数回連続して行う必要がある。J型CCCではカラムに800~1000 rpmという高回転速度が要求されるが、二液相の攪拌効率を上げれば、それほどは必要ないことが考えられた。そこで、筆者ら^{12)~14)}は、太陽軸(角速度 ω_1)、惑星軸(ω_2)、衛星軸(ω_3)の3軸が同時に回転する衛星運動型CCCを考案・製作した。カラムは衛星軸の回りを自転しながら惑星軸の回りを公転し、更に太陽軸の回りを公転するので、このカラム回転運動をJ型CCCの惑星運動 planetary motionになぞらえて衛星運動 satellite motionと名付けた。また、装置もJ型CCCはcoil planet centrifugeというので、coil satellite centrifuge (CSC)と命名した。この装置の回転機構では $\omega_1 = \omega_2 + \omega_3$ としたので、送液チューブのねじれを解消しながら ω_2 と ω_3 の可変的な回転を行うことが可能である。4-メチルウンベリフェリル(MU)化糖誘導体の分離では、 $\omega_1 = 300$ rpmという低回転速度で良好な分離が達成された。CSCのカラムの加速度変化を調べてみると、良好な分離が達成される角速度の組合せでは、円軌道の中に二つのループが真向いの位置で出現しており、これが二液相の攪拌効率を増加しているものと推察された。

2・4 交軸型 CCC

交軸型CCCはカラムが縦に自転しながら横に公転する回転機構をもち、有機溶媒-水系ばかりでなく水性二相溶媒でも分離に十分な量の固定相が保持される。有機溶媒-水系では分離効率はJ型CCCに劣るが、汎用性が高い装置といえる。Zhaoら¹⁵⁾は、互いに反対方向に自転する1対のカラムを120°の位置ごとに計3対配置した交軸型CCCを開発した。水性二相溶媒を用いてウシ血清アルブミン(BSA)の溶出挙動やBSAとリゾチームの分離を行って有用性を確認している。筆者らが開発した小型交軸型CCC¹⁶⁾と装置構造が類似しているが、1対のカラムの自転軸は公転軸からの法線方向とほぼ一致している。同様なカラム配置で行った筆者らの結果¹⁷⁾では、固定相保持率は高かったものの分離度は他の配置より低下した。これは、カラムの配置が法線方向になると遠心力の方向と一致し、カラム内で二液相が容易に分相される一方で、攪拌効率が低下するためと考えられる。

2・5 スケールアップ CCC と自動化

CCCは比較的多量な粗分離に有効である。Duらは、低速度自転型CCC low-speed rotary CCC¹⁸⁾を用いて圧

搾菜種粕の粗抽出物50 gから容量22 Lのカラムで1-BuOH/アセトニトリル(ACN)/10% $(NH_4)_2SO_4$ 水溶液(1:0.5:2, v/v)により3-ブテニル-グルコシノレート0.91 gと2-ヒドロキシ-3-ブテニル-グルコシノレート3.57 gを95%以上の純度で分離¹⁹⁾、また、ヤマモモ *Myrica rubra* の果実1000 kgから6.5 kgの粗抽出物を得た後、その1.5 kgを容量40 Lのカラムで $H_2O/1-BuOH/tert$ -ブチルメチルエーテル(TBME)/ACN/トリフルオロ酢酸(TFA)(5:2:1.5:1:0.001, v/v)によりシアニジン-3-グルコシド276 gを93.2%の純度で分離した²⁰⁾。また、J型CCCを用いて茶抽出物200 gからHex/EtOAc/ H_2O (1:2.5:4, v/v)の下層を移動相として(-)-没食子酸エピカテキンを容量12 Lのカラムで35 g、容量15 Lのカラムで40 gを不純物なく分離した²¹⁾。

CCCの自動化も試みられている。Thorntonら²²⁾は、自動化したJ型CCCにより、TFAでpHを調整したTBME/1-BuOH/ACN/ H_2O (2:2:1:5, v/v)の上層を移動相としてクロスグリ(カシス)Black currantの抽出物から4種類のアントシアニン類を分離した。

2・6 検出器との結合

CCCで実試料を分離した場合、クロマトグラムで得られるピークは必ずしも単一成分であるとは限らない。その場合、質量分析計のような物質選択性の高い検出器との結合は目的成分の検出に有効である。Inoueら²³⁾は、J型CCCからの溶出液の一部をスプリッターバルブで分岐させてエレクトロスプレーイオン化質量分析計(ESI-MS)に接続する“高速CCC(High-speed CCC: HSCCC)/ESI-MSシステム”を構築し、Hex/EtOAc/MeOH/0.5%ギ酸(7:3:5:5, v/v)の下層を移動相として殺虫剤アベルメクチンB1aとB1bを分離後、それぞれのMSスペクトルを得ている。また、Thakurら²⁴⁾は、サボンソウ *Saponaria officinalis* の粗サポニン混合物をJ型CCCでTBME/1-BuOH/ACN/ H_2O (1:3:1:5, v/v)により22画分に分離し、各画分の一部を用いて細胞毒性測定と共にエレクトロスプレーイオントラップ質量分析計(ESI-IT-MS)でMSプロファイリングを行っている。ただし、この場合、J型CCCとMSは連結されていない。

2・7 装置の比較

Weiszら²⁵⁾は、親水性と疎水性の付随色素の分離を行って3種類のCCC装置の分離効率を比較した。対象としたのは、汎用多層コイルを装着したJ型CCC、スパイラルコイルを装着したJ型CCC及び多層コイルを装着した交軸型CCCで、1-BuOH/1.3 mol/L HClによる親水性色素FD&C Blue No. 2の分離では汎用多層コイルを装着したCCCとスパイラルコイルを装着したJ

型 CCC が、Hex/ACN による疎水性色素 FD&C Red No. 17 とスタン II の分離では汎用多層コイルを装着した J 型 CCC が最もよい分離を達成した。いずれも有機溶媒-水系を用いているので、これまでの多くの知見を裏付けた結果といえる。仮に、水性二相溶媒によるタンパク質分離と比較したとすると、多層コイルを装着した交軸型 CCC の分離効率が他の二つの装置より高くなるものと予想される。

3 カラム

多くのコイル状カラムの中で CCC 分離に効果的とされるのは多層コイル multilayer coil, 偏心コイル, トロイダルコイル toroidal coil 及びスパイラルコイル spiral coil の 4 種類で、中でも多層コイルは作製が容易で分離効率も高く、汎用的である。分離効率を向上させるにはカラム内での二液相の攪拌効率を上げることが重要である。筆者ら²⁶⁾は、回転式多段向流クロマトグラフ (rotation locular countercurrent chromatograph, RLCCC) の隔室 locule にヒントを得て、コイルを作るテフロンチューブを止血鉗子で一定間隔にクランプして隔室チューブ locular tubing を作製した。このチューブの多層コイルで水性二相溶媒によるタンパク質分離を行った結果、クランプしていないチューブより高い分離効率が得られた。Englert ら²⁷⁾は、テフロンチューブの上下の異なる位置に一定間隔でチューブ内に凸部 (圧搾部) を作る工具を製作して 6 種類の異なる圧搾チューブを作製し、Hex/TBME/MeOH/H₂O (5 : 2 : 5 : 3, v/v) により 6 種類の *p*-ヒドロキシベンゼンエステルの分離を行って、分離効率を比較した。その後、筆者ら²⁸⁾は、圧搾部に距離を持たせた圧搾型隔室チューブ long-pressed locular tubing や更にその隔室内にガラス製ビーズを一つずつ入れたビーズ封入圧搾型隔室チューブ bead embedded locular tubing を作製し、小型交軸型 CCC により EtOAc/1-BuOH/H₂O (3 : 2 : 5, v/v) の下層または (1 : 4 : 5, v/v) の上層を移動相として 4-MU 化糖誘導体, 12.5 % (w/w) PEG 1000/12.5 % (w/w) K₂HPO₄ 水溶液でタンパク質の分離を行った。その結果、有機溶媒-系ではビーズ封入圧搾型隔室チューブ、水性二相溶媒では圧搾型隔室チューブで高い分離効率が得られた。この他、Zhang ら²⁹⁾は、多層コイルを収納するディスクホルダーを製作し、三つを直列に連結した J 型 CCC でタンジン (丹参) *Salvia miltiorrhiza* の EtOAc 抽出物の分離を行った。このディスクの特徴は、コイル 1 巻きごとに入れる溝を割り当て、コイルを自転軸側から巻く場合、1 周した地点で 1 ターン外側の溝にチューブを入れて巻き、反対に自転軸方向に巻く場合は 1 周した地点で 1 ターン内側の溝に巻く点である。恐らく流路に変化を持たせて攪拌効果を上げようとしたものと思われる。

一方、Berthod ら³⁰⁾は、チューブ径の分離に及ぼす効果を検討し、チューブ径の小さいコイルの方が大きいコイルより分離効率が低い結果が得られたとしている。

4 二相溶媒系

CCC 分離の成否は二相溶媒系の選択に大きく依存するので、溶媒の種類や組合せ、体積比などを決定するには経験や試行錯誤を必要とすることが多かった。そのため、短時間で効率のよい二相溶媒の選択法の開発が試みられている。

4.1 溶媒系の選択

これまで、Hex/EtOAc/MeOH/H₂O 系を極性の低い組成比から極性の高い組成比まで変更する Oka らの方法³¹⁾やヘプタン (Hep)/EtOAc/MeOH/H₂O 系の組成比を決めてアルファベット A~Z (E, I, O を除く) の記号を付した 23 の溶媒系 (“アリゾナ溶媒系 Arizona system” と呼ばれる)³²⁾などが知られている。

Friesen ら³³⁾は、薄層クロマトグラフィー (TLC) で得られる R_f 値と Hex/EtOAc/MeOH/H₂O 系 (HEM-Wat), クロロホルム/MeOH/H₂O 系 (ChMWat), EtOAc/1-BuOH/H₂O 系 (EBuWat) で得られる分配係数 (K) との関係天然由来化合物 22 種を用いて調べた。その結果、相関性のあることを明らかにし、TLC の結果から CCC の最適溶媒系を選択する方法を GUESS (Generally Useful Estimate of Solvent Systems) 法と名付けた。この方法は、シリカゲルを固定相とする順相 TLC で、展開溶媒には調製した二相溶媒の有機相を用いる。したがって、極性の低い物質ほど高い R_f 値となる。CCC 分離に適するとされるのは $0.4 < K < 2.5$ で、 $K=1$ のとき $R_f=0.5$ となるので、 $0.29 < R_f < 0.71$ の範囲に入る溶媒系を選択するのがよいとしている。Friesen らはこの範囲を “sweet spot” と呼んでいる。K 値の順は必ずしも順相 TLC の R_f 値順と一致しないと考えられるが、Liu ら³⁴⁾は更に “sweet spot matching” の理論的解析を試みている。

4.2 イオン対モード

Spórna-Kucab ら³⁵⁾は、極性の高い 2 種類の二相溶媒系 TBME/1-BuOH/ACN/H₂O 及び TBME/1-BuOH/MeOH/H₂O (いずれも 2 : 2 : 1 : 5, v/v) にイオンペア剤としてヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) を 0.7 % または 1.0 % 添加して水層を移動相に用い、センニチコウ *Gomphrena globosa* の花からベタシアニンを分離した。また、アマランチン型ベタシアニンをケイトウ属の *Celosia spicata* から TBME/1-BuOH/ACN/H₂O (0.7 % HFBA を含む, 2 : 2 : 1 : 5, v/v) 及び EtOH/ACN/1-PrOH/飽和 (NH₄)₂SO₄/H₂O (0.5 : 0.5 : 0.5 : 1.2 : 1, v/v) で分離した³⁶⁾。

4.3 グラジエント溶出

グラジエント溶出は極性の異なる物質どうしを同時に分離する上で有用である。筆者ら³⁷⁾もダイズイソフラボンであるダイジンとゲニスチン及びそのアグリコンであるダイゼインとゲニステインを Hex/EtOAc/1-BuOH/MeOH/AcOH/H₂O (1:2:1:1:1:5, v/v) と (1:2:1:3:0.5:5, v/v) で MeOH と AcOH の体積比を変化させ、上層を固定相としてグラジエント溶出で分離した。グラジエント溶出では、組成比を変化させても二液相の界面張力が大きく変化しないことが固定相保持率をほぼ一定に保つ上で必要である。

Spórna-Kucab ら³⁸⁾は、砂糖大根 *Beta vulgaris* 中のベタニンとその誘導体 5 化合物を J 型 CCC により 1-BuOH/エタノール (EtOH)/NaCl 水溶液/H₂O/H₃PO₄ (1300:200:200-240:1300:700:2.5-4.5, v/v) の上層を移動相として EtOH と H₃PO₄ の体積比を変化させたグラジエント溶出により分離した。また、Ying ら³⁹⁾は、オクラの粗抽出物を J 型 CCC により EtOAc/1-BuOH/H₂O (1:1:10, v/v) を固定相とし、Hex/EtOAc (1:2), (1:4), (0:4), 1-BuOH/EtOAc (1:4), (1:2), (2:2), (2:1) を移動相として順に送液して 6 ピークに分離した。

なお、CCC の溶出モードについては、Huang ら⁴⁰⁾が総説にまとめている。

4.4 イオン液体

Bezold ら⁴¹⁾は、イミダゾリウム塩の構造をもつイオン液体 (IL) とリン酸塩 (K₂HPO₄ と KH₂PO₄) から成る水性二相溶媒及び PEG 600/リン酸塩水溶液に IL をモディファイヤーとして添加した水性二相溶媒を調製し、リソゾーム、ミオグロビン及び BSA の分配挙動を調べた。後者の溶媒系では IL の添加濃度が高くなるにつれて log *P* 値 {*P*: 分配係数, $P=C_0/C_w$, *C*₀: 有機相 (ここでは PEG 相) 中の物質濃度, *C*_w: 水相 (ここではリン酸塩水溶液相) 中の物質濃度, 対数値は一般に log *P* と表記されることが多い} が大きくなるが、CCC や CPC 分離に適用することが可能であるとしている。また、Wang らは、二相溶媒に IL を添加すると *K* 値が減少することを利用し、1-アリル-3-メチルイミダゾリウム塩化物 ([AMIM] Cl) を添加した 1-BuOH/H₂O によるアルクチン arcttin の分離⁴²⁾ や Hex/EtOAc/MeOH/10% [AMIM] Cl 水溶液 (5:5:6:4, v/v) によるタンシノン tanshinone 類の分離⁴³⁾ を行っている。

4.5 三相系溶媒

Yin ら⁴⁴⁾は、ナツヅジ属の *Pongamia pinnata* の粗抽出物から J 型 CCC により三相系溶媒 Hex/ACN/ジクロロメタン/H₂O (5:5:1:5, v/v) の下層と中間層を一定の割合でカラムに充填して固定相とし、上層を移動相

としてフラボノイド類を分離した。検討した固定相の下層と中間層の比は 1:0, 0.9:0.1, 0.7:0.3 の 3 種類で中間層の割合が大きくなるにつれて、ピーク間の分離が広がっている。また、Wu ら⁴⁵⁾は、Hex/EtOAc/ACN/H₂O (4:3:4:4, v/v) の上層 (固定相) と下層 (移動相), 上層 (固定相) と中間層 (移動相), 中間層 (固定相) と下層 (移動相) の組合せでそれぞれヨロイグサ *Angelica dahurica*, コウリョウキョウ *Alpinia officinarum*, ハナスゲ *Anemarrhena asphodeloides* の根茎抽出物の CCC 分離を行い、この三相溶媒系が有用であるとされている。

5 応用

CCC は天然物からの生理活性物質の分離・精製に幅広く利用されている⁴⁶⁾。筆者らもこれまでサネカズラ属の *Kadsura coccinea*⁴⁷⁾ や マリアアザミ *Silybum marianum*⁴⁸⁾ 中の成分分離を行って CCC が有効であることを示した。最近では、この領域の論文が飛躍的に増加し、その多くは中国から発表されている。これは、中国が天然資源に恵まれていることに加え、CCC が一般的な分離・精製法の一つとなりつつあることを示している。高価な分取用 HPLC カラムと比較してコイル状カラムは安価で耐久性が高く、有機溶媒も入手し易いので、CCC は分取レベルでの分離に適している。ここでは、特徴的な応用例を取り上げる。

5.1 pH ゾーンリファイニング CCC と pH ピークフォーカシング CCC

pH ゾーンリファイニング CCC は、二相溶媒の一方の層に酸 (または塩基), 他方の層に塩基 (または酸) を入れて CCC 分離を行うと含量の多い成分が移動相中で飽和濃度のゾーンを形成し、含量の少ない成分はその前後に小さいゾーンを形成する方法である。この方法の利点はカラム容量に比して比較的少量の試料から高純度で目的成分を精製できる点である。2013 年に開発者の Ito 自身が総説⁴⁹⁾を発表しているが、その後も応用例の報告が続いている。

Englert ら⁵⁰⁾は、ひまわり油抽出物 500 mg から Hex/ACN/MeOH/H₂O (4:7:1.4:0.5, v/v) を用いて pH ゾーンリファイニング CCC を行い、脂肪酸を分離した。上層移動相では 8 ゾーン, 下層移動相では 5 ゾーンが形成された。この場合、TFA を上層に NH₃ を下層に添加した。また、大量分取では、Fang ら⁵¹⁾は、容量 350 mL のカラムで冷葛 (やかつ) *Gelsemium elegans* の抽出物 4.5 g から 6 種類のアルカロイドを 95% 以上の純度で 300~700 mg ずつ分離した。Hex/EtOAc/MeOH/H₂O (3:7:1:9, v/v) の有機相にトリエチルアミン, 水相に HCl を添加し、水相を移動相とした。この他、IL を添加した二相溶媒⁵²⁾ や極性の高い

ACN/NaCl 水溶液⁵³⁾でアルカロイドを分離した例などが報告されている。

また、Shimizu ら⁵⁴⁾は pH ピークフォーカシング CCC により、La(III)、Ce(III)、Nd(III)、Yb(III)、Sc(III) の一斉分離を行った。

5.2 キラル分離

CCC によるキラル分離は、最近では Huang ら⁵⁵⁾⁵⁶⁾によってまとめられている。 β -シクロデキストリン誘導体や酒石酸誘導体などのキラルセクターを二相溶媒に添加して分離を行う場合が多い。Han ら⁵⁷⁾は、1-BuOH/0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH5.50) の上層にキラル配位子として *N-n*-ドデシル-L-プロリンと Cu^{2+} 、下層にヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP- β -CD) を添加して β -アミノ酸のキラル分離を行った。また、Rong ら⁵⁸⁾は、HP- β -CD を Hex/EtOAc/0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH2.5) (7 : 3 : 10, v/v) の下層に添加し、下層を移動相としてイブプロフェンを *R*-体、*S*-体の順で分離した。更に、Wang ら⁵⁹⁾は、 Cu(II) と IL の 1-ブチル 3-メチルイミダゾリウム及び L-プロリンの錯体 ($\text{Cu(II)}-[\text{BMI}] [\text{L-Pro}]$) と HP- β -CD の二重キラルセクターを Hep/EtOAc/ACN/0.2 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) の下層に添加し、上層を移動相として (+)-ナリンゲニン (NRG) と (-)-NRG を分離した。この他、pH ゾーンリファイニング CCC で β -遮断薬をキラル分離した報告⁶⁰⁾もある。

5.3 極性高分子の分離

CCC は極性高分子の分離でもその有効性を発揮できる。ここでは多糖類分離への応用例を示す。Ward ら⁶¹⁾は、甜菜パルプ sugar beet pulp の加水分解物から CPC により EtOH/DMSO/300 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液 (0.8 : 0.1 : 1.8, v/v) を用いて上昇法で L-ラムノース画分 (純度 90 % 以上)、L-アラビノース/D-ガラクトース混合画分、D-ガラクトツロン酸画分 (純度 90 % 以上) に分離した。なお、DMSO は分離を改善するモディファイヤーとして加えられている。その後、更にスケールアップ⁶²⁾も行われた。EtOH/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液は極性の高い二相溶媒で、Wu ら⁶³⁾もスピルリナ光合成細菌 *Spirulina platensis* から J 型 CCC によりグルコース、ラムノース、マンノースで構成される水溶性多糖を分離するのに用いた。一方、Yu ら⁶⁴⁾は、PEG 1000/ $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (0.5 : 1.25 : 1.25 : 7.0, w/w) の下層を移動相に用いて J 型 CCC により昆布 kelp の多糖を 2 画分に分離し、その後、ジエチルアミノエチル (DEAE)-セファロース陰イオン交換クロマトグラフィーで精製してフコイダンと硫酸化多糖を得ている。なお、フコイダンにはチロシナーゼ阻害活性があることを示した。

5.4 その他

Wang ら⁶⁵⁾は塩基性 pH 調整剤としてリジンを Hex/EtOAc/MeOH/ H_2O (5 : 5 : 4 : 6, v/v) に添加し、下層を移動相として J 型 CCC によりハス *Nelumbo nucifera* 抽出物からフェノール性アルカロイドであるイソリエシニンとネフェリンを分離した。その後、リジンはアルカロイドをジクロロメタン抽出することで除去した。通常、pH 調整には揮発性の酸、塩基が用いられることが多いが、塩基性アミノ酸のリジンを用いている点は特徴的である。また、Krause ら⁶⁶⁾は、TBME/50 mM 4-モルホリンプロパンスルホン酸 (MOPS) 緩衝液 (pH7.2) の下層に *Candida rugosa* 由来のリパーゼを添加して固定相とし、基質である 4-ニトロフェニルパルミチン酸を上層と共に移動相として CPC で加水分解を行った。CPC は通常の攪拌タンクリアクターより加水分解速度が 2 倍になったとしている。これは、CPC をリアクターとして用いた例である。

6 まとめ

CCC は装置やカラムの改良が進んで分離効率が向上し、分離に要する時間も短くなってきた。一方、J 型 CCC は HSCCC として天然物から生理活性成分を分離・精製する上で汎用的な分析法となりつつある。分離に適した二相溶媒も効率のよい選択法の開発により、経験的な試行錯誤が省力化されるようになった。しかし、CCC の応用などソフト面に関する研究が多くなる一方で、装置開発などハード面に関する研究は少なくなった。CCC を一層進歩させるには、装置を“ブラックボックス”化せず、原理的理解に関する Ito の研究を超える成果が増えることが望まれる。

文 献

- 1) G. Jerz, P. Winterhalter: *J. Chromatogr. A*, **1617**, 460698 (2020).
- 2) J. B. Friesen, J. B. McAlpine, S.-N. Chen, G. F. Pauli: *J. Chromatogr. A*, **1520**, 1 (2017).
- 3) S. Ignatova, I. Sutherland: *J. Chromatogr. A*, **1425**, 1 (2015).
- 4) 北爪英一: ぶんせき, **1994**, 711.
- 5) 北爪英一: ぶんせき, **2008**, 287.
- 6) Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1372**, 128 (2014).
- 7) Y. Ito, M. Knight, T. M. Finn: *J. Chromatogr. Sci.*, **51**, 726 (2013).
- 8) Y. Yang, J. Yang, C. Fang, D. Gu, Y. Ma, Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1541**, 47 (2018).
- 9) Y. Yang, Y. Zhang, C. Liu, Z. Ji, Y. Yin, T. Chu, J. Tian, Y. Ito: *J. Chromatogr. B*, **1100-1101**, 39 (2018).
- 10) K. Shinomiya, K. Sato, K. Yoshida, K. Tokura, H. Maruyama, K. Yanagidaira, Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1322**, 74 (2013).
- 11) K. Shinomiya, K. Yoshida, K. Tokura, E. Tsukidate, K. Yanagidaira, Y. Ito: *Anal. Sci.*, **31**, 211 (2015).
- 12) K. Shinomiya, K. Tokura, E. Kimura, M. Takai, N.

- Harikai, K. Yoshida, K. Yanagidaira, Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1392**, 48 (2015).
- 13) K. Shinomiya, K. Zaima, Y. Harada, M. Yasue, N. Harikai, K. Tokura, Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1481**, 64 (2017).
- 14) K. Shinomiya, K. Zaima, M. Yasue, R. Honda, Y. Sakuma, N. Harikai, Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1596**, 134 (2019).
- 15) Y. Zhao, X. Zhang, T. Luo, D. Zou, H. Yuan, Z. Liu, Y. Liu: *Rev. Sci. Instrum.*, **90**, 114102 (2019).
- 16) K. Shinomiya, K. Yanagidaira, Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1104**, 245 (2006).
- 17) K. Shinomiya, J.-M. Menet, H. M. Fales, Y. Ito: *J. Chromatogr.*, **644**, 215 (1993).
- 18) Q. Du, P. Wu, Y. Ito: *Anal. Chem.*, **72**, 3363 (2000).
- 19) Q. Du, J. Fang, S. Gao, Q. Zeng, C. Mo: *Sep. Pur. Tech.*, **59**, 294 (2008).
- 20) Q. Du, X. Wang: *Int. J. Appl. Res. in Nat. Prod.*, **1**, 1 (2008).
- 21) Q. Du, H. Jiang, J. Yin, Y. Xu, W. Du, B. Li, Q. Du: *J. Chromatogr. A*, **1271**, 62 (2013).
- 22) D. Thornton, L. Barton, L. Hsu: *J. Chromatogr. A*, **1575**, 66 (2018).
- 23) K. Inoue, Y. Hattori, T. Hino, H. Oka: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **34**, 2621 (2011).
- 24) M. Thakur, G. Jerz, D. Tuwalska, R. Gilibert-Oriol, S. Wybraniec, P. Winterhalter, H. Fuchs, A. Weng: *J. Chromatogr. B*, **955**, 1 (2014).
- 25) A. Weisz, Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1218**, 6156 (2011).
- 26) K. Shinomiya, Y. Ito: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **32**, 1096 (2009).
- 27) M. Englert, W. Vetter: *Anal. Chim. Acta*, **884**, 114 (2015).
- 28) K. Shinomiya, K. Zaima, N. Harikai, Y. Ito: *Separations*, **3**, 29 (2016).
- 29) L. Zhang, Y. Wang, X. Guo, S. Wu: *J. Chromatogr. A*, **1491**, 108 (2017).
- 30) A. Berthod, K. Faure: *J. Chromatogr. A*, **1390**, 71 (2015).
- 31) F. Oka, H. Oka, Y. Ito: *J. Chromatogr.*, **538**, 99 (1991).
- 32) A. Berthod, M. Hassoun, M. J. Ruiz-Angel: *Anal. Bioanal. Chem.*, **383**, 327 (2005).
- 33) J. B. Friesen, G. F. Pauli: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **28**, 2777 (2005).
- 34) Y. Liu, J. B. Friesen, E. M. Grzelak, Q. Fan, T. Tang, K. Duric, B. U. Jaki, J. B. McAlpine, S. G. Franzblau, S.-N. Chen, G. P. Pauli: *J. Chromatogr. A*, **1504**, 46 (2017).
- 35) A. Spórna-Kucab, J. Jagodzińska, S. Wybraniec: *J. Chromatogr. A*, **1489**, 51 (2017).
- 36) A. Spórna-Kucab, A. Milo, A. Kumorkiewicz, S. Wybraniec: *J. Chromatogr. B*, **1073**, 96 (2018).
- 37) K. Shinomiya, Y. Kabasawa, H. Nakazawa, Y. Ito: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **26**, 3497 (2003).
- 38) A. Spórna-Kucab, I. Garrard, S. Ignatova, S. Wybraniec: *J. Chromatogr. A*, **1380**, 29 (2015).
- 39) H. Ying, H. Jiang, H. Liu, F. Chen, Q. Du: *J. Chromatogr. A*, **1359**, 117 (2014).
- 40) X. Y. Huang, S. Ignatova, P. Hewitson, D. L. Di: *Trends Anal. Chem.*, **77**, 214 (2016).
- 41) F. Bezold, J. Goll, M. Minceva: *J. Chromatogr. A*, **1388**, 126 (2015).
- 42) Y. Wang, L. Zhang, D. Wang, X. Guo, S. Wu: *J. Chromatogr. A*, **1478**, 26 (2016).
- 43) Y. Wang, L. Zhang, X. Guo, S. Wu: *J. Chromatogr. A*, **1559**, 149 (2018).
- 44) H. Yin, S. Zhang, L. Long, H. Yin, X. Tian, X. Luo, H. Nan, S. He: *J. Chromatogr. A*, **1315**, 80 (2013).
- 45) X. Wu, Z. Chao, C. Wang, L. Yu: *J. Chromatogr. A*, **1384**, 107 (2015).
- 46) J. B. Friesen, J. B. McAlpine, S.-N. Chen, G. F. Pauli: *J. Nat. Prod.*, **78**, 1765 (2015).
- 47) K. Shinomiya, H. Li, S. Kitanaka, Y. Ito: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **32**, 2361 (2009).
- 48) K. Zaima, R. Koga, R. Motegi, H. Sato, S. Kitanaka, Y. Ito, K. Shinomiya: *Chromatography*, **41**, 91 (2020).
- 49) Y. Ito: *J. Chromatogr. A*, **1271**, 71 (2013).
- 50) M. Englert, W. Vetter: *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 5503 (2015).
- 51) L. Fang, J. Zhou, Y. Lin, X. Wang, Q. Sun, J.-L. Li, L. Huang: *J. Chromatogr. A*, **1307**, 80 (2013).
- 52) Y. Fang, Q. Li, Q. Shao, B. Wang, Y. Wei: *J. Chromatogr. A*, **1507**, 63 (2017).
- 53) D. Zou, Y. Du, J. Kuang, S. Sun, J. Ma, R. Jiang: *J. Chromatogr. A*, **1553**, 1 (2018).
- 54) K. Shimizu, H. Kuribayashi, H. Watanabe, T. Shimasaki, K. Azuma, Y. Horie, K. Saitoh, S. Saito, M. Shibukawa: *Anal. Chem.*, **85**, 978 (2013).
- 55) X.-Y. Huang, D.-L. Di: *Trends Anal. Chem.*, **67**, 128 (2015).
- 56) X.-Y. Huang, D. Pei, J.-F. Liu, D.-L. Di: *J. Chromatogr. A*, **1531**, 1 (2018).
- 57) C. Han, J. Luo, Z. Li, Y. Zhang, H. Zhao, L. Kong: *J. Sep. Sci.*, **39**, 2413 (2016).
- 58) L. Rong, Q. Liu, J. Wang, H. Zeng, H. Yang, X. Chen: *Tetrahedron*, **27**, 301 (2016).
- 59) S. Wang, C. Han, S. Wang, L. Bai, S. Li, J. Luo: *J. Chromatogr. A*, **1471**, 155 (2016).
- 60) Lv. Z. Bu, W. Sun, C. Wang, C. Xu, S. Tong: *J. Sep. Sci.*, **41**, 1433 (2018).
- 61) D. P. Ward, M. Cardenas-Fernandez, P. Hewitson, S. Ignatova, G. J. Lye: *J. Chromatogr. A*, **1411**, 84 (2015).
- 62) D. P. Ward, P. Hewitson, M. Cardenas-Fernandez, C. Hamley-Bennett, A. Diaz-Rodrigues, N. Douillet, J. P. Adams, D. J. Leak, S. Ignatova, G. J. Lye: *J. Chromatogr. A*, **1497**, 56 (2017).
- 63) X. Wu, R. Li, Y. Zhao, Y. Liu: *Carbohydrate Polymers*, **173**, 465 (2017).
- 64) P. Yu, H. Sun: *Carbohydrate Polymers*, **99**, 278 (2014).
- 65) Y. Wang, L. Zhang, H. Zhou, X. Guo, S. Wu: *J. Chromatogr. A*, **1490**, 115 (2017).
- 66) J. Krause, T. Oeldorf, G. Schembecker, J. Merz: *J. Chromatogr. A*, **1391**, 72 (2015).



四宮一総 (Kazufusa SHINOMIYA)

日本大学薬学部 (〒274-8555 千葉県船橋市習志野台7-7-1)。千葉大学大学院薬学研究科博士後期課程修了。博士(薬学)。《現在の研究テーマ》向流クロマトグラフィに関する研究。《主な著書》“Encyclopedia of Chromatography”, (共著)(Marcel Dekker, Inc.)。《趣味》史跡巡り。E-mail: shinomiya.kazufusa@nihon-u.ac.jp