

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590052

研究課題名(和文) 衛星運動型高速向流クロマトグラフ装置の開発

研究課題名(英文) Development of Newly Designed High-Speed Counter-Current Chromatograph with Satellite Motion of Coiled Separation Column

研究代表者

四宮 一総 (Shinomiya, Kazufusa)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：70215995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：衛星運動型高速向流クロマトグラフ装置を新規に考案・製作した。本装置は、カラムが太陽軸(角速度 w_1)、惑星軸(w_2)及び衛星軸(カラムの中心軸、 w_3)の周りを同時に回転するもので、 $w_1 = w_2 + w_3$ の関係が成り立つように設計した。本装置の分離効率を4-メチルウンベリフェリル糖誘導体を試料に用いて検討した結果、 $w_1=300\text{rpm}$ 、 $w_2=150\text{rpm}$ 、 $w_3=150\text{rpm}$ 付近で良好な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：High-speed counter-current chromatograph with satellite motion of coiled separation column, coil satellite centrifuge (CSC), was newly developed in our laboratory. In this apparatus, the column simultaneously rotates around the sun axis (the angular velocity, w_1), the planet axis (w_2) and the satellite axis (the central axis of the column, w_3). The rotation of each axis was regulated according to the formula: $w_1 = w_2 + w_3$. The CSC apparatus was applied to counter-current chromatographic separation of 4-methylumbelliferyl sugar derivatives with the n-hexane/ethyl acetate/1-butanol/methanol/water system. The overall results revealed that better partition efficiencies were obtained by the rotation speed at near $w_1 = 300\text{ rpm}$, $w_2 = 150\text{ rpm}$ and $w_3 = 150\text{ rpm}$.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：薬学 分析科学 分離分析法 液-液分配 クロマトグラフィー 向流クロマトグラフィー 分離精製法

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

向流クロマトグラフィー(counter-current 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の一つである。CCCは固定相、移動相共に液体であるため、固体充填剤を使用するクロマトグラフィーにおいてしばしば生じる試料物質の固体充填剤との相互作用に起因する吸着あるいは変性といった問題点が予め解決されていることが特徴である。

CCC分離を達成するためには、固定相溶媒を保持し、二液相間で攪拌により分配を促進した後分相し、更に移動相を移動させることを効果的に繰り返すことが必要となる。CCC装置はカラムが自転するだけの静的平衡系と自転と共に公転するいわゆる惑星運動(planetary motion)を行う動的平衡系に大別される。米国国立衛生研究所(National Institutes of Health : NIH)の Dr. Yoichiro Ito はコイル状カラムを惑星運動させると送液チューブにねじれを生じさせることなく高速回転させることが可能な高速向流クロマトグラフ装置(high-speed CCC : HSCCC)を発明した。

HSCCCには主にコイル状カラムが横に自転しながら更に同じ方向に公転するJ型CPC(type-J coil planet centrifuge)とカラムが縦に自転しながら横に公転する交軸型CPC(cross-axis coil planet centrifuge)があり、J型CPCが有機溶媒-水系二相溶媒を用いた分離に有効であるのに対し、交軸型CPCは更に水性二相溶媒のような界面張力の差の小さい二相溶媒の使用が可能である。この違いは、J型CPCでは自転軸と公転軸が平行であるのに対し、交軸型CPCでは両軸が直交していることに起因しており、惑星運動においてカラムに作用する力学的物理量の違いに基づくものと考えられる。

我々は、これまで、国産初の交軸型CPCを製作し、水性二相溶媒を用いたタンパク質分離を行って、その有用性を示した。また、カラムの自公転の速度と方向が互いに独立した非同同期型CPCを製作してカラムの自転と公転の方向が逆になるとタンパク質分離が改善されることを見出した。この成果を踏まえて、隣り合うカラム同士が互いに逆方向に自転するカラムを単一ラインによる送液チューブの配管機構で接続する小型交軸型CPCを製作し、良好なタンパク質分離を達成した。更に、隣り合うカラム同士が互いに逆方向に自転するJ型CPC(汎用型HSCCC)を製作した。

2. 研究の目的

J型CPCは、コイル状カラムが自転と共に公転する惑星運動を行う点で特徴的であり、中心軸とカラムの関係は太陽と地球の関係

に例えられる。HSCCCは静的平衡系に属するCCC装置と比較して格段に分離効率が向上した。しかし、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と比較すると、より一層の分離効率の向上が望まれる。そこで、カラムの回転に伴い力学的物理量の影響が大きいと予想される太陽(太陽軸)-地球(惑星軸)-月(カラム)の関係にある衛星運動(satellite motion)型HSCCC(coil satellite centrifuge : CSC)を新たに考案・製作し、その分離効率を検討した。

3. 研究の方法

(1)衛星運動型高速向流クロマトグラフ装置(CSC)の設計と製作

日本大学理工学部理工学研究所工作技術センターで設計・製作した。装置原案の模式図を図1に、製作した装置回転機構の写真を図2に示す。

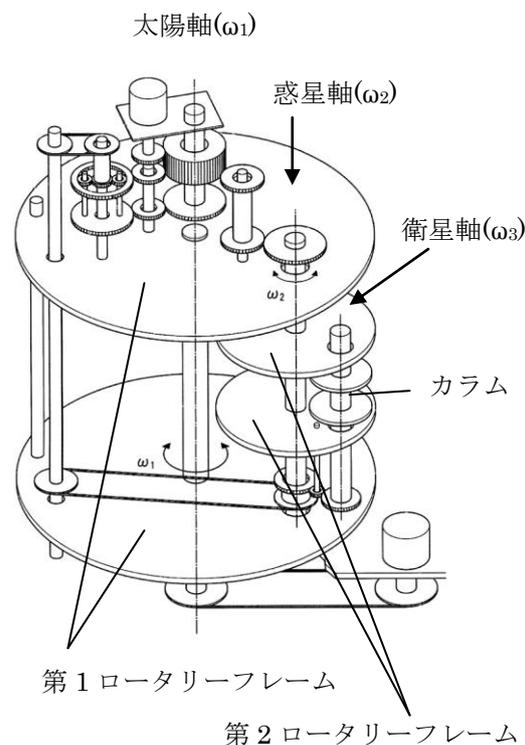


図1 衛星運動型HSCCC装置原案模式図



図2 衛星運動型HSCCC装置回転機構

図1に示したように、衛星運動型回転では第1ロータリーフレームが太陽軸を中心に角速度 ω_1 で回転し、第1ロータリーフレーム上に設置された第2ロータリーフレームが惑星軸を中心に角速度 ω_2 で回転する。更に、第2ロータリーフレーム上に設置されたカラムが衛星軸を中心に角速度 ω_3 で回転する。図2に示した装置回転機構の写真では、回転バランスを取るために対角の位置に第2ロータリーフレームとカラムを設置している。

(2)CSCの分離効率の検討

①カラム

テフロンチューブ(内径1.5 mm、外径2.5 mm)を直径1.5 cm、幅5 cmの円筒状ホルダに左巻きに3層巻き付けて多層コイル(multilayer coil)を作製してカラムとし、このカラム4個を送液チューブ(内径1 mm、外径2 mm)のテフロンチューブで直列に連結した(総容量: 57.0 mL)。

②二相溶媒

n-hexane/ethyl acetate/1-butanol/methanol/water から成る有機溶媒-水系二相溶媒を使用し、下層が移動相の場合、(0:3:2:0:5)、上層が移動相の場合、(0:1:4:0:5)の組成比で用いた。

③分離試料

4-methylumbelliferyl (MU)糖誘導体を試料とし、下層が移動相の場合、8-D-cellobioside (Cel)、8-D-glucopyranoside、 α -D-mannopyranoside、8-D-fucopyranoside、 α -L-fucopyranoside (α -L-Fuc)、上層が移動相の場合、 α -L-Fuc、8-D-galactopyranoside、Celを使用し、各1 mgずつを混合し、分離用二相溶媒約1 mL(上層0.5 mL + 下層0.5 mL)に溶解して試料溶液とした。

④分離度 R_s の算出

得られたクロマトグラムを用い、常法に従い、下記の式から算出した。

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

t_{R1} , t_{R2} : 物質1、物質2の保持時間
 W_1 , W_2 : 物質1、物質2のピーク幅

⑤固定相保持率 S_f (%)の算出

カラム体積 V_c 、固定相体積 V_s とすると、

$$S_f = \frac{V_s}{V_c} \times 100$$

から算出できる。分離実験終了後、カラム内の二相溶媒を回収し、固定相溶媒の体積を測定して計算した。

4. 研究成果

(1)衛星運動型高速向流クロマトグラフ装置 (coil satellite centrifuge: CSC)の設計と製作

上述のように、太陽軸の周りを回転する第1ロータリーフレームの端部に第2ロータリーフレーム(地球)を取り付け、この端部にカラム(月)を設置する。カラムは自転しながら惑星軸の周りを公転し更に太陽軸の周りを公転する3重回転(衛星運動)を行う。送液チューブは太陽軸→惑星軸→衛星軸の順に配管され、各角速度を $\omega_1, \omega_2, \omega_3$ (rad/sec)とすると、装置上部からS字状に導入した場合は $\omega_1 + \omega_2 + \omega_3 = 0 \dots$ (1)、装置下部からU字状に導入した場合は $-\omega_1 + \omega_2 + \omega_3 = 0 \dots$ (2)の関係が成立すると回転に伴うねじれは生じない。原理的には ω_1 の回転で生じたねじれを ω_2 と ω_3 の回転により解消することになる。従って、S字状の送液チューブの配管では、第1モータの駆動により ω_1 の回転を発生させると、(1)式から、第2モータの駆動で $\omega_2 = -(\omega_1 - \omega_A)$, $\omega_3 = -\omega_A$ (ω_A は任意の角速度)となる。

衛星運動では、遠心力場での物理的な力は複雑かつ大きくなることが予想され、カラム内での二液相の攪拌、分相の頻度が増加すると考えられる。その結果、界面張力の差の大きい有機溶媒-水系二相溶媒での分離効率の向上が期待される。また、従来の非同期型コイル・プラネット遠心機では、公転と自転の速度が関数の関係にあり、非同期の程度に限界があったが、CSCでは惑星軸の自転速度(ω_2)は太陽軸の公転速度(ω_1)に依存しないため、制限のない非同期的な回転が可能である。

(2)CSCの送液チューブねじれ解消機構

CSCにおいて、遠心力場で固定相溶媒を保持し、移動相溶媒をカラム内に導入するには、送液チューブのねじれ解消機構が必要となる。そこで、太陽軸廻り、惑星軸廻り及びカラムの各回転方向の組合せと送液チューブのねじれ解消の可否との関係について考察した。

装置上部から太陽軸に送液チューブを導入する場合は(1)式によりねじれが解消される。太陽軸→惑星軸、惑星軸→衛星軸への配管はいずれもS字状であるため、この場合をSSタイプとする(図3)。一方、装置下部から太陽軸に送液チューブを導入する場合は(2)式によりねじれが解消される。配管は、太陽軸→惑星軸がJ字状、惑星軸→衛星軸がS字状であるため、この場合をJSタイプとする(図4)。 $\omega_1, \omega_2, \omega_3$ それぞれに時計廻り(CW)、

反時計廻り (CCW) の回転方向が考えられるため、両タイプいずれも 8 通りの回転方向の組合せが考えられる。各組合せのねじれ解消の可否を検討した結果、SS タイプでは、 $CCW(\omega_1)-CCW(\omega_2)-CCW(\omega_3)$ 、 $CW(\omega_1)-CW(\omega_2)-CW(\omega_3)$ を除く 6 通り、JS タイプでは、 $CCW(\omega_1)-CW(\omega_2)-CW(\omega_3)$ 、 $CW(\omega_1)-CCW(\omega_2)-CCW(\omega_3)$ を除く 6 通りの組合せでねじれ解消が可能になることがわかった。以上の結果をもとに CSC は太陽軸上に第 2 ロータリーフレーム (地球) の回転速度を変化させる回転可能な歯車 (可動歯車) と回転不能な歯車 (固定歯車) を配置し、太陽軸を回転させることにより発生する動力で第 2 ロータリーフレーム及びカラムを回転させ、送液チューブのねじれが解消される構成とした。

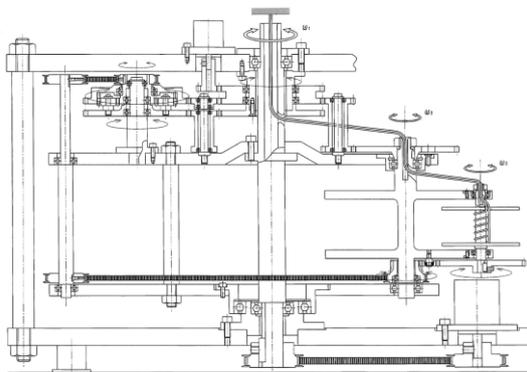


図 3 送液チューブねじれ解消機構 (SS タイプ)

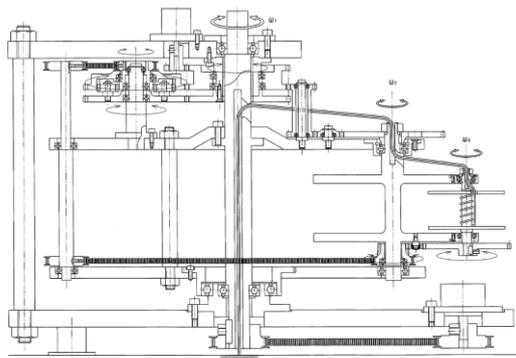


図 4 送液チューブねじれ解消機構 (JS タイプ)

SS タイプでは、太陽軸廻りの回転方向が、惑星軸廻りの回転と衛星軸廻りの回転との和における回転方向と逆方向となる関係のときにねじれを解消することができる。その結果、衛星軸廻りの自転速度と惑星軸廻りの公転速度は非同期とすることができる。一方、JS タイプでは、太陽軸廻りの回転方向が、惑星軸廻りの回転と衛星軸廻りの回転との和における回転方向と同方向となる関係のと

きにねじれを解消することができる。その結果、SS タイプと同様に、衛星軸廻りの自転速度と惑星軸廻りの公転速度は非同期とすることが可能である。図 5 にはカラム 4 つを送液チューブで直列に連結した CSC のカラム回転機構を示す。

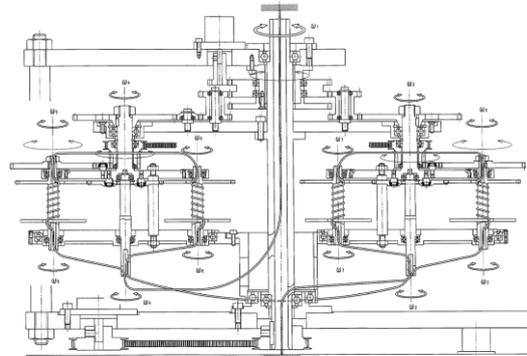


図 5 CSC カラム回転機構

(3) CSC による 4-MU 糖誘導体の分離と回転速度の違いが分離効率に及ぼす影響に関する検討

JS タイプでの CSC による 4-MU 糖誘導体の分離を検討した。カラムは multilayer coil を用い、テフロンチューブ (内径 1.5 mm、外径 2.5 mm) を円筒状カラムホルダに装置上方から見て左巻きに巻き付けて 1 層とし、カラム当たり 3 層巻き付けた。このカラムを計 4 つ作製し、送液チューブ (テフロンチューブ、内径 1 mm、外径 2 mm) で直列に連結した (カラム総量: 57.0 mL)。分離条件は既報 (K. Shinomiya, *et. al.*, Partition efficiencies of newly fabricated universal high-speed counter-current chromatograph for separation of two different types of sugar derivatives with organic-aqueous two-phase solvent systems, *J. Chromatogr. A*, 1322, 74 – 80 (2013).) に従い、有機溶媒 – 水系二相溶媒には、*n*-hexane/ethyl acetate/1-butanol/methanol/water の (0 : 3 : 2 : 0 : 5) を下層が移動相の場合に、(0 : 1 : 4 : 0 : 5) を上層が移動相の場合に用いた。また、分離試料の 4-MU 糖誘導体は、下層が移動相の場合は β -cellobioside (Cel)、 β -D-glucopyranoside (Glc)、 α -D-mannopyranoside (Man)、 β -D-fucopyranoside (β -D-Fuc)、 α -L-fucopyranoside (α -L-Fuc) の 5 種各 1 mg、上層が移動相の場合は α -L-Fuc、 β -D-galactopyranoside (Gal)、Cel の 3 種各 1 mg を分離に使用する二相溶媒の上下層 0.5 mL ずつ (計 1 mL) に溶解して調製した。溶出した画分はメタノール一定量で希釈し、波長 318 nm で吸光度を測定した。

① 下層が移動相の場合

まず、 $\omega_1 = 300$ rpm (CCW)、 $\omega_2 = 150$ rpm (CCW)、 $\omega_3 = 150$ rpm (CCW)で移動相流速 0.5 mL/min により 4-MU 糖誘導体の分離を検討した。その結果得られたクロマトグラムを図 6 に示す。

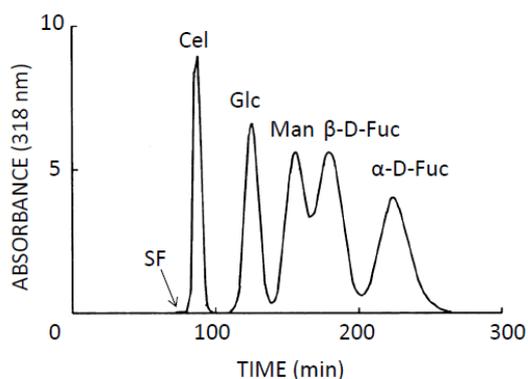


図 6 下層移動相での 4-MU 糖誘導体の分離

Cel、Glc、Man、 β -D-Fuc、 α -L-Fuc の順に分離し、Cel/Glc (R_{s1})、Glc/Man (R_{s2})、 β -D-Fuc/ α -L-Fuc (R_{s4})の分離は良好だったが、Man/ β -D-Fuc (R_{s3})は分離度 $R_s = 0.7$ であった。従来、惑星運動を行う汎用型 HSCCC では、1000 rpm の回転速度で同様の分離を行ったが、本 CSC では $\omega_1 = 300$ rpm という低い回転速度で良好な分離を達成することができた。これは、衛星運動によって低い回転速度でもカラム内における二液相の攪拌効果が増大しているためと考えられた。

そこで、以後の実験では、この 2 つの 4-MU 糖誘導体の分離度を分離の指標とした。表 1 には移動相流速の違いによる各ピーク間の分離度と固定相保持率の変化を示す。

表 1 移動相流速の違いによる分離度と固定相保持率の変化

流速 (mL/min)	分離度 (R_s)				固定相保持率 (%)
	1	2	3	4	
0.6	2.6	1.2	0.5	1.3	40.4
0.5	2.6	1.2	0.7	1.1	36.8
0.4	2.9	1.5	0.8	1.1	42.9

この結果から、固定相保持率は 40%前後で安定し、流速が遅くなるにつれて分離度が改善されることがわかった。しかし、流速が遅くなると分離に要する時間も長くなるため、以後の実験では流速 0.5 mL/min を用いることとした。

次に、 $\omega_1 = 300$ rpm (CCW)で一定とし、 ω_2 (CCW)と ω_3 (CCW)を非同期とした場合の分離度と固定相保持率の変化について検討した。その結果を表 2 に示す。

表 2 惑星軸(ω_2)と衛星軸(ω_3)の回転速度の違いによる分離度と固定相保持率の変化($\omega_1 = 300$ rpm)

回転速度 (rpm)		分離度 (R_s)				固定相 保持率(%)
ω_2	ω_3	1	2	3	4	
100	200	2.8	1.1	0.5	1.0	39.5
200	100	2.3	1.0	0.5	1.0	37.5
147	153	2.8	1.3	0.7	1.1	42.1
153	147	2.7	1.2	0.6	1.1	38.6
135	165	2.6	1.2	0.6	1.1	38.8
165	135	2.9	1.4	0.7	1.1	38.2

②上層が移動相の場合

移動相の送液方向、回転方向を下層が移動相の場合と逆にして分離を検討した。まず、回転速度を $\omega_1 = 300$ rpm (CW)、 $\omega_2 = 150$ rpm (CW)、 $\omega_3 = 150$ rpm (CW)として 4-MU 糖誘導体の分離を検討した。流速 0.2 mL/min で得られたクロマトグラムを図 7 に示す。

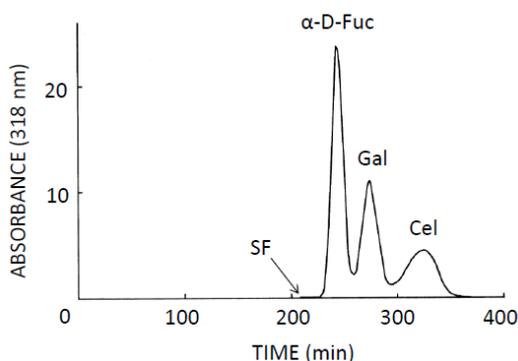


図 7 上層移動相での 4-MU 糖誘導体の分離

また、移動相流速に対する分離度 (α -D-Fuc/Gal (R_{s1}), Gal/Cel (R_{s2}))と固定相保持率の変化を検討した。その結果を表 3 に示す。

表 3 上層を移動相とした場合の流速に対する分離度と固定相保持率の変化

流速 (mL/min)	分離度 (R_s)		固定相保持率 (%)
	1	2	
0.6	----	----	----
0.4	0.6	0.8	13.3
0.2	1.4	1.4	18.3

上層を移動相とした場合の 4-MU 糖誘導体の α -L-Fuc、Gal、Cel の分離は、下層が移動相の場合とは異なり、流速 0.6 mL/min では固定相溶媒がカラム内に保持されず、分離が達成されなかった。そこで、流速を低下させたところ、表 3 に示したように固定相が保持

されるようになり、分離が改善された。そのため、以後の実験では流速 0.2 mL/min を用いることとした。

次に、 $\omega_1 = 300$ rpm (CW) で一定とし、 ω_2 (CW) と ω_3 (CW) を非同期とした場合の分離度と固定相保持率の変化について検討した。その結果を表 4 に示す。

表 4 惑星軸(ω_2)と衛星軸(ω_3)の回転速度の違いによる分離度と固定相保持率の変化($\omega_1 = 300$ rpm)

回転速度 (rpm)		分離度 (Rs)		固定相保持率(%)
ω_2	ω_3	1	2	
147	153	----	----	----
153	147	1.2	1.5	23.6

$\omega_2 = 147$ rpm、 $\omega_3 = 157$ rpm では固定相は保持されず、分離も達成されなかった。しかし、 $\omega_2 = 153$ rpm、 $\omega_3 = 147$ rpm としたところ、良好な分離が達成され、固定相保持率も $\omega_2 = 150$ rpm、 $\omega_3 = 150$ rpm の場合より改善された。

以上の結果より、CSC はわずかな回転角速度の比率の変化が固定相の保持と物質分離に大きく影響することがわかった。

(4)CSC での様々な回転軌跡及び加速度変化を伴う惑星運動及び衛星運動の考案

CSC は上述のように太陽-地球-月の関係に例えられる 3 重回転を行う装置である。本装置に新たな回転制御システムを導入すると、カラム (月) の衛星運動及び惑星運動において、多様な回転軌跡と回転中の可変的加速度変化が可能である。

$\omega_1 = \omega_2 + \omega_3$ のとき送液チューブはねじれず、 $\omega_2 = 0$ とすると惑星運動型回転となるが、惑星軸をもつ第 2 ロータリーフレーム端に設置されたカラムの静止位置を太陽軸からの軸線上の内側にすると惑星運動の公転半径は第 2 ロータリーフレームの半径分短くなり、静止位置を 180° 外側にすると公転半径は第 2 ロータリーフレームの半径分長くなる。このため、静止位置を変化させることで公転半径の異なる多様な惑星運動が可能となる。また、カラム自転中に第 2 ロータリーフレームを断続的に回転させると回転軌跡の異なる惑星運動が可能である。一方、衛星運動でも第 1 モータ及び第 2 モータの回転を個別に制御して ω_1 、 ω_2 、 ω_3 をカラム自転中に可変的に変化させることができる。

CSC は惑星運動、衛星運動の両方を同期、非同期に達成できる多様性の高い HSCCC である。新しい回転制御システムの導入により、従来の円運動に加え、形状の異なる軌跡を描く回転運動が可能である。HSCCC では、二液相の攪拌、分相及び移動相の移動の効率の

よい達成が必要であり、様々な回転軌跡と加速度付与の方法を組み合わせることにより一層の分離効率の向上が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. Kazufusa Shinomiya, Koji Tokura, Kazunori Yoshida, Emiru Kimura, Midori Takai, Naoki Harikai, Kazuhiro Yanagidaira, Yoichiro Ito, "Fabrication of Coil Satellite Centrifuge and Its Partition Efficiency on Counter-Current Chromatographic Separation of 4-Methylumbelliferyl Sugar Derivatives with Organic-Aqueous Two-Phase Solvent Systems", 第 8 回国際向流クロマトグラフィー会議 The 8th International conference on countercurrent chromatography (CCC2014, London), 2014 年 7 月 23 日～25 日 (発表予定).

2. 四宮一総, 柳平和寛, 衛星運動型高速向流クロマトグラフ装置の送液チューブねじれ解消機構, 日本分析化学会第 62 年会 (大阪), 2013 年 9 月 12 日.

3. 四宮一総, 戸倉幸治, 吉田和範, 柳平和寛, 伊東洋一郎, 衛星運動型高速向流クロマトグラフ装置への新規回転制御システムの導入, 日本薬学会第 133 年会 (東京), 2013 年 3 月 28 日.

4. 四宮一総, 柳平和寛, 衛星運動型高速向流クロマトグラフ装置の考案と設計, 日本薬学会第 132 年会 (札幌), 2012 年 3 月 30 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: カラム回転機構及び向流クロマトグラフ装置

発明者: 四宮一総, 柳平和寛

権利者: 日本大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-018522

出願年月日: 平成 24 年 1 月 31 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者 四宮一総

(Shinomiya, Kazufusa)

日本大学薬学部・教授

研究者番号: 70215995