

ザ・ヒストリー・オブ・クロマトグラフィー

岡澤 敦司

はじめに

編集委員会より「クロマトグラフィー・ヒストリー」というタイトルで何か書け、という課題を頂戴したので、とりあえずそのままGoogle先生に訊ねてみたところ、「History of Chromatography」というそのまんまの情報がWikipediaに掲載されていることがわかった。Wikipediaの情報は慎重に吟味するのが科学者としての正しい姿勢なので、その内容を検証しつつ、可能な限り原著論文をあたって、当時の実験を概説することでこの原稿を完成させようと思う。

さて、「chromatography」の語源を考える時、「chroma-」という言葉から、何か色に関することだろうというのは容易に想像がつく。生物学の分野では「chromatin」や「phytochrome」などの語が同じような語源であろう。はたして、Wikipediaには「chromatography」は「color writing」という意味とあるが、いまいちピンとこない。リンク先にあるOnline Etymology Dictionaryでもう少し詳しく調べると「-graphy」は「process of writing or recording」とある。したがって、「chromatography」は「色(彩)を記述、記録する作業」ということになろうか。

「クロマトグラフィー」の誕生

Wikipediaの情報を参考にしつつ、論文や解説などを調べた限り、最初にクロマトグラフィーを行ったのはイタリア生まれのロシア人植物学者Tswettのようである¹⁾。Tswettはクロロフィルには複数の成分が存在すると予測し、これらを分離するためにさまざまな手法を試みた結果、ガラス管にチョークの粉(CaCO₃)を詰め溶媒を流すというきわめて単純な操作で、植物葉由来の色素を分離できることを発見した(図1)。そこで、複数の色素が分離された様子を「クロマトグラム」、その手法を「クロマトグラフィー」と名づけた。ただし、以上の語句はロシア語で名づけられ、論文も1903年にロシア語で出版された。この時点で、クロマトグラフィーは、溶媒中の物質をその固体への吸着性の違いによって分離する手法であることが述べられており、吸着クロマトグラフィーという言葉も用いられている。すなわち、今から110年ほど前、分離手法の発見当初から、現代も使わ

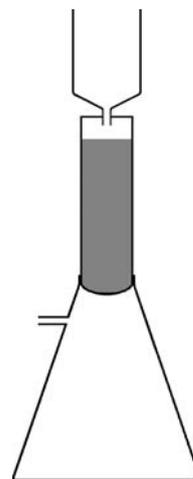


図1. 文献1)に掲載されているTswettが世界で初めて行ったクロマトグラフ装置の概略図を基に作図したもの。グレーの部分にチョークの粉を詰めたと考えられる。

れているクロマトグラフィーの基本概念は確立されていたと言える。しかし、不思議なことに、この重大な発見は、一時注目を集めたものの、その後しばらく顧みられなかったようである¹⁾。SciFinderで検索してみたところ、「chromatography」という語句が用いられている論文は、Tswettのドイツ語の論文以外、1930年代にならないと見つけられなかった。1930年代の半ばぐらいから、Tswettの方法が見直され、カロテノイドやアントシアニンなどの天然色素の分析に関する論文が出版され始める。国内では、東京帝國大学の近藤が1937年に「クロマトグラフによる有機分子化合物の分析に就て」という題の論文で、アルミナを吸着剤としたクロマトグラフィーによるさまざまな混合物の分離を報告している²⁾。したがって、このころになってようやくクロマトグラフィーという言葉が世界で広く用いられるようになったと考えられる。余談ではあるが、この頃の薬学雑誌では、論文はドイツ語と日本語の両方で掲載されていたようである。昨今、国内でグローバル化が標榜され続けているが、こういった事例をみると、戦前は今よりもグローバル化していたということが実感される。

分配クロマトグラフィー

1941年にMartinおよびSyngeによる分配クロマトグ

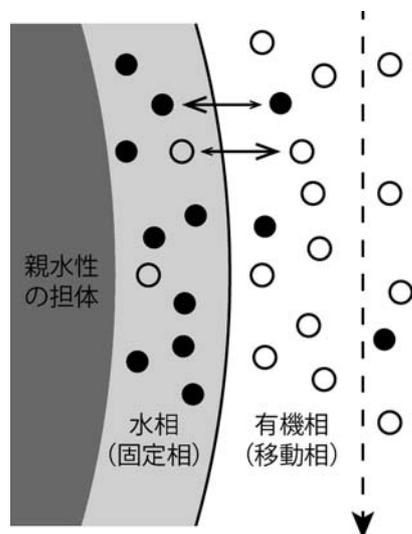


図2. 順相分配クロマトグラフィーの概略図。親水性担体の表面に固定相として水相が保持される。物質はこの水相と移動相としての有機相に分配される。黒丸で示した親水性の物質は、白丸で示した疎水性の物質よりも長く水相に止まる。便宜的に分配の度合いを矢印の大きさに示した。

ラフィーに関する論文が発表された³⁾。吸着クロマトグラフィーでは、原理的には固体担体と物質の吸着性の差が分離の決め手となる。したがって、固体担体の表面が溶媒に覆われてしまう(溶媒和)と、固体の物質性の吸着性が弱められ分離が悪くなると考えられる。それならば、担体の表面を水などで覆ってしまい(固定相)、水と混ざらない有機溶媒を流体として、クロマトグラフィーを行えばよいという考え方のもと研究が行われた。この場合、物質が担体表面の水相に保持されている時間は、その物質の水-有機溶媒間の分配係数に依存する。水に分配されやすい、すなわち、親水性の物質ほど、固定相である水相に止まる時間が長いので、遅く溶出される(図2)。この固定相に水などを用い、疎水性の有機溶媒を流体とする分離系は、順相クロマトグラフィーと呼ばれる。現在でも、シリカゲルを一般的な担体として、二種以上の溶媒系を用いた順相分配クロマトグラフィーが広く利用されているが、MartinとSyngeの論文ではシリカを濃塩酸中でボイルした後、水とエタノールで洗浄し、さらに、酸の指示薬としてメチルオレンジを吸着させて、カラムに詰めるという手の込んだ系を用いている。最終的にこの系を用いて、羊毛由来のタンパク質(30 mg)加水分解物中のアミノ酸(フェニルアラニン、ロイシンおよびイソロイシン、プロリン、バリン、および、メチオニン)を決定した³⁾。

ペーパークロマトグラフィー

次に、Martinらは上記のシリカゲルによるクロマトグラフィーでは分離できなかった親水性のアミノ酸の分

離を検討し、ろ紙を用いた二次元ペーパークロマトグラフィーを考案した⁴⁾。1944年に発表された論文では、セルロースを被った水と、有機溶媒間の分配によるクロマトグラフィーを行っている。フェノール-アンモニア(0.3%)や、ベンジルアルコール-*n*-ブタノールなどの溶媒を一次元目に用いて、二次元目にコリジン(トリメチルピリジン)を用いて45 cm × 55 cmのろ紙を担体として、各次元につき24時間から72時間(!)かけて展開することによって、羊毛に含まれる22種のアミノ酸すべてを分離することに成功している。

イオン交換クロマトグラフィー

アミノ酸の分析については、1945年にはイオン交換樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーによるヒスチジンとグルタミン酸の分離に関する論文が発表されている⁵⁾。この方法では、物質が荷電する状態における、イオン交換樹脂への静電的な強い相互作用が分離の決め手となる。樹脂から目的とする物質を溶出させるには、pHを変化させるか、イオン強度を高めてやればよい。前者では、目的とする物質の荷電状態の変化が相互作用を弱めることで、後者では、樹脂へのイオン結合を他の高濃度のイオンで拮抗させることで、目的物質を遊離させる。本手法は、現在では、特に生体分子の分離には欠かせない手法であるが、この報告はあまり注目されなかったようである。イオン交換樹脂は古くから知られており、そのクロマトグラフィーへの応用では、あまり新規性が感じられなかったのであろうか?

逆相クロマトグラフィー

Martinらの開発した方法では、親水性の液相を(多くの場合は水)担体に保持させ、有機溶媒を流体とする。この方法では、疎水性の化合物は、ほぼ常に有機溶媒に分配されるため、いわゆる素通り画分として溶出され、分離が不可能である。この問題を解決するために、有機溶媒を担体に固定相として保持させるというコンセプトで、1947年にセルロースアセテートに*n*-ブタノールを処理し、アルカリ性水溶液で溶出することでクレゾールと安息香酸の分離を達成したという報告が*Nature*に掲載された⁶⁾。早速、Martinらはシリカゲルにジクロロジメチルシランを処理することで、アセトンやパラフィン固定相に用いることのできる担体を開発し、水-メタノール-オクタン、あるいは、水-アセトン-流動パラフィンという溶媒系でC12-C18の脂肪酸の分離を達成した⁷⁾。

薄層クロマトグラフィー

1946年以降、クロマトグラフィーに関する論文が激増する。SciFinderで、“chromatography”を検索子とし

て調べたところ、1941–1945年では、ヒット数が358件であったのに対し、1946–1950年では、2174件にものぼった。

意外にも薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, TLC) に関する論文の出現は比較的遅く、1956年のStahlによるものが最初だと思われる⁸⁾。残念ながら、原著論文がドイツ語であるため、引用先の文献からの二次的な情報だが、ガラス板の上にケイ酸を薄く塗布したものをういていたと考えられる⁹⁾。これも、現在用いられているものと基本的にほとんど変わりはない。

ガスクロマトグラフィー

驚くべきことに、ガスクロマトグラフィー (gas chromatography, GC) に関する論文は、TLCに関するものよりも先に1952年に発表されている¹⁰⁾。しかも、またもやMartinらによるものである。MartinとSyngeは、1952年に分配クロマトグラフィーを開発した業績でノーベル化学賞を受賞している。その受賞した年にGCに関する論文を発表したことになる。この論文でもやはり考え方は分配クロマトグラフィーであり、“gas-liquid partition chromatography”という言葉が使われている。この論文では、セライト (珪藻土) を担体として、10%のステアリン酸を含むシリコンオイルを液相として担体に保持させている。この担体を4 mm径、1.2 mのガラス管に詰めカラムとした。移動相を窒素ガスとしてカラム温度を100°Cに設定し、C1のギ酸からC12のドデカン酸 (ラウリン酸) までの分離を達成している。この論文発表の後、わずか3年後にPerkinElmer社 (Waltham, MA) などから市販の装置が販売されたようである。

1958年にはGolayによって内側に固定相となる薄層を塗布した金属製のキャピラリーカラムが開発され、これに合わせて種々の検出法が考案された¹¹⁾。クロマトグラフィーと検出器は切っても切れない関係であるが、その解説は本稿の目的とするところではないので、ここでは触れない。検出器に関しては優れた成書が多く出版されているので、それらを参照されたい。さらに、1960年代に入ると、ガラスキャピラリーカラムの開発が精力的に進められた¹²⁾。しかし、ガラスはその性質上、折れやすく取扱いが難しいという問題があった。1979年に、現在でも汎用されているフューズドシリカキャピラリーカラムがGCに適していることがHewlette-Packard (Avondale, PA) のDandeneauとZefennerによって報告され¹³⁾、2年後には、このカラムを用いたアプリケーションの最初の論文として、Kempらによる植物ホルモンであるサイトカイニンの分析結果が報告された¹⁴⁾。フューズドシリカキャピラリーカラムは、極性の異なる種々の液相と組み合わせられたものが、現在、汎用されている。

高速液体クロマトグラフィー

現在、使われている高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) という言葉は、論文としては1970年に当時のWaters Associates (Framingham, MA) のBombaughらが執筆したものに初めて登場したようである¹⁵⁾。それ以前の1969年には、HorvathとLipskyによる論文に“high-pressure liquid chromatography”という言葉が登場している¹⁶⁾。この著者らは、核酸の研究者であり、pmolレベルの代謝物を測定するためにPicker LCS 1000 nucleic acid analyzer (Picker Nuclear, White Plains, NY) という装置を用いている。よくよく引用文献を調べてみると、1967年にHorvathらによる“fast liquid chromatography”の設計に関する論文があり¹⁷⁾、おそらくこれが現在のHPLCの原型になったものと思われる (図3)。

現在、HPLCでは逆相系のODS (octadecylsilyl) カラムが広く使われている。ODSカラムの担体は、シリカゲルの表面にC18のアルキル側鎖を結合させており、逆相でのクロマトグラフィーが行える。このカラムが文献に登場するのはDu Pont社 (Wilmington, DE) のSchmitらによる1971年の報告からのようである¹⁸⁾。1972年にはDu Pont社から販売されたPharmaphase ODSカラムを使用したアプリケーションの論文が報告されている¹⁹⁾。

その後、HPLCがカラム担体およびポンプの改良の相乗効果によって、より高速、高分解能を達成するように発展し続けていることは周知の通りである。

アフィニティークロマトグラフィー

吸着クロマトグラフィーでは、担体と物質の物理化学的な相互作用の大きさの差異によって分離が達成される。

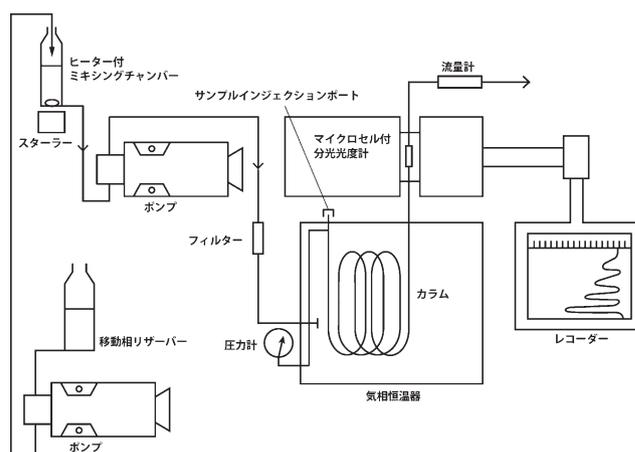


図3. 最初に文献に報告されたHPLCの構成。文献17)に掲載されている図を基に作図した。基本的には現在のHPLCの構成と同じだと考えられる。

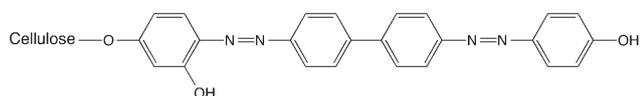


図4. Lerman によるチロシナーゼの分離に用いられた担体の一例²⁰⁾. 論文に掲載された世界初のアフィニティー・クロマトグラフィーの担体だと考えられる.

では、鍵と鍵穴の関係に例えられる基質と酵素を考えたとき、鍵である基質や、鍵を真似た拮抗阻害剤を担体とすれば、鍵穴の酵素を効率よく分離できると考えられる。1953年にLermanは*p*-アゾフェノール基を結合させたセルロースを担体として、キノコ由来のチロシナーゼの単離を行った(図4)²⁰⁾。ちなみに、このときの論文のタイトルは“A biochemically specific method for enzyme isolation”である。不思議なことに、以降しばらくこの手法はほとんど用いられず、1968年になってからようやく Cuatrecasasらによって“affinity chromatography”という手法として報告された²¹⁾。この報告では、ヌクレアーゼの阻害剤を Sepharose 4B に結合させ、*Staphylococcus aureus* 由来の細胞外分泌型ヌクレアーゼの単離を行っている。以降、この手法は一気にメジャーになり、現在では生化学、分子生物学研究で用いられる中心的な技術の一つである。新しい技術を開発した際に、適切な名前を付けることは重要なことかも知れない。

ゲルろ過クロマトグラフィー

1959年、ウプサラ大の Porath と Flodin は、架橋度の異なるデキストランゲル (Sephadex; Pharmacia, Uppsala, Sweden) によって、物質を分子サイズで篩い分けることができることを示した²²⁾。ただし、一般的な篩とは異なり、この場合は大きい分子が先に溶出される。小さな分子は架橋ゲル内に入り込む流路を通して移動するのに対し、大きい分子はゲル内に入ることができず、結果として流路が短くなるためである。この技術は、発表されてから広く利用されるようになり、ゲルの改良などによって酵素などの生体分子の精製には必要不可欠な技術となっている。

おわりに

本稿では、クロマトグラフィーの歴史を振り返り、できる限り原著論文を参照し、当時の実験の内容についても記載した。クロマトグラフィーは、原理的には非常にシンプルである。シンプルであるからこそ、強力な分離・分析手法として科学に多大な貢献を果たしてきた。その発見や開発にまつわる物語は、他の重要な発見と同様、陽があれば影もあるものであった。ある技術があつという間に世に広がることもある一方、きわめて重大な発見が何年も顧みられないことがある。その違いは何による

ものなのかを考えながら、先達の優れた論文を調べてみるのは知的好奇心がくすぐられる作業であった。さて、Wikipedia であるが、とっかかりとしては十分に機能したものの、やはり正確な情報を集めるためには SciFinder などのデータベース検索は必須であると実感した。ただし、一旦情報が得られれば、著名な論文であれば、パソコンの前に座っているだけで読むことができることも改めてわかった。大変な便利な時代になったものである。学生の皆さんには、自分が研究室で使っている技術について、是非、一度この作業をやって頂きたい。もちろん、クロマトグラフィーも発展し続けており、近年における担体、検出法、装置、あるいは、ソフトウェアなどの進歩は著しい。しかし、当然、基本原理は本稿で紹介した論文の時代から変わるものではなく、逆にこれをしっかりと理解しておけば、どんな技術の発展にもついていけると思われる。クロマトグラフィーに関する詳細な原理については、優れた成書が多く出版されているので、それらを参照されたい。本稿を、クロマトグラフィーに関するよもやま話として、記憶の片隅にとどめて頂ければ幸いである。

文 献

- 1) Sakadynsky, K.: *J. Chromatogr.*, **49**, 2 (1970).
- 2) 近藤平三郎: 薬学雑誌, **57**, 832 (1937).
- 3) Martin, A. J. P. and Synge, R. L. M.: *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941).
- 4) Consden, R. *et al.*: *Biochem. J.*, **38**, 224 (1944).
- 5) Cleaver, C. S. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1343 (1945).
- 6) Boscott, R. J.: *Nature*, **159**, 342 (1947).
- 7) Howard, G. A. and Martin, A. J. P.: *Biochem. J.*, **46**, 532 (1950).
- 8) Stahl, E.: *Pharmazie*, **11**, 633 (1956).
- 9) Morris, L. J. *et al.*: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **37**, 323 (1960).
- 10) James, A. T. and Martin, A. J. P.: *Biochem. J.*, **50**, 679 (1952).
- 11) Lovelock, J. E.: *Nature*, **182**, 1663 (1958).
- 12) Burner, F. A. and Cartoni, G. P.: *Anal. Chem.*, **36**, 1522 (1964).
- 13) Dandeneau, R. D. and Zerenner, E. H.: *J. High Res. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **2**, 351 (1979).
- 14) Kemp, T. R. and Anderson, R. A.: *J. Chromatogr.*, **209**, 467 (1981).
- 15) Bombaugh, K. J. *et al.*: *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 657 (1970).
- 16) Horvath, C. G. and Lipsky, S. R.: *Anal. Chem.*, **41**, 1227 (1969).
- 17) Horvath, C. G. *et al.*: *Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967).
- 18) Schmit, J. A. *et al.*: *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 645 (1971).
- 19) Baily, F. and Brittain, P. N.: *J. Pharm. Pharmacol.*, **24**, 425 (1972).
- 20) Lerman, L. S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **39**, 232 (1953).
- 21) Cuatrecasas, P. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 636 (1968).
- 22) Porath, J. and Flodin, P.: *Nature*, **183**, 1657 (1959).