

[J. Ferment. Technol., Vol. 48, No. 10, p. 641~649, 1970]

 綜 説

不純希薄液からの天然成分の濃縮

滝野 慶 則

(東京教育大学農学部)

Concentration of Natural Products from Dilute Crude Solution

Yoshinori Takino

(Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education,
2-19-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo)

動植物体や発酵液などから天然物を単離する際には、種々の化合物が共存する複雑な組成の希薄水溶液から、目的物質の単離を進めなければならない場合が多い。そのためには目的物質の濃度を高めることと共存物質との分別が基本問題となる。

希薄水溶液中の天然有機成分を濃縮するには溶媒である水を除去するか、または目的物質をその揮発性、溶解性、吸着性、イオン交換性などの諸性質を利用して溶液から濃厚に捕集する方法がとられる。さらに向流分配法、種々の型のクロマトグラフィー、電気泳動法、透析法、ゲル濾過法などを併用して分別と濃縮を進める。ここでは仕上げの精製にはふれない。

1. 溶解性について

A. 水の性状^{1)~5)} 水は比熱が大、融解熱 79.7 cal/g, 蒸発潜熱 540 cal/g, 誘電率 80 である。水の分子構造については、気体状態の水分子は OH の原子間距離 0.96 Å, O の原子価角 $\angle\text{HOH}$ 105°。液体の水は氷と似た構造で、それが幾分くずれた状態と考えられる。氷の場合は鱗柱石型の酸素原子の格子をつくり、一つの水分子の O は他の 4 個の水分子の O に取囲まれている。一つの水分子の H は他の水分子の O の方に並ぶので O は直接的には 4 個の H に取巻かれて四面体構造をなし、うち 2 個は共有結合で、他の 2 個は水素結合で O に結びつく。OH の原子間距離 0.99 Å, O の原子価角 $\angle\text{HOH}$ は 109°28', 水素結合の H...O 間距離 1.77 Å, したがって O-O の原子間隔は 2.76 Å である。液体の水の場合はその融点近くでは氷に準じた構

造を持つが、O-O 間隔が少し大きくなって 2.90 Å, 液体では分子間の結合が絶えず一方では切れて、他方では形成されている。したがって液体の水は固定した永久結晶構造はとらない。温度が上昇すればそれだけ多く結合が切れるが、100°C でもこの結晶類似構造が相当の割合に保持されている。その証拠にこの温度でも気化潜熱が高い。従来このように考えられてきたが、詳細については種々の論議がある⁵⁾。いずれにしても水分子は水素原子の方に (+) の電荷が、酸素原子の方に (-) の電荷が偏った双極子をなす極性溶媒である。

B. 溶解現象⁶⁾ 溶質が溶媒に溶解する時はこれらの分子間に作用する力には静電力、双極子間力、水素結合、van der Waals 力などが関与する。

水に物質が溶解すると溶質分子またはイオンと水分子との間に親和的な相互作用が働いて、溶質分子またはイオンの周囲に溶媒分子が引きつけられてこれを取囲み、常に溶媒を伴って行動するようになる。これが溶媒和 solvation で、溶媒が水の時は水和 hydration といわれる。食塩のような電解質、アミノ酸のような両性電解質 (Zwitter ion) はイオンの水和として扱われる。蛋白質も分子内に -COO⁻, -NH₃⁺, -COOH, -NH₂, >CO, >NH, -OH, -SH などの親水性基を持つので水和をおこす。イオンが溶解するとイオンはその電荷の正負によって、それぞれ水の双極子を負または正を内側にして静電的引力によってその周囲に引きつけて水和をおこす。このように溶媒でイオンが取囲まれると静電的引力は緩和されて電解質は溶け易くな

る。

次に溶存する溶質同士の間相互作用についてみると、溶質が荷電する時はその間に働く静電的作用は Coulomb 法則により $f=q_1 \cdot q_2 / D \cdot r^2$ (f …イオン間の力; q_1, q_2 …イオンの電荷; r …イオン間距離; D …媒体の誘電率) で表わされる。 f は r の自乗に反比例するので距離が増せば力は著しく弱まるが、他の力はそれ以上に弱くなるので、少し離れた所では主として作用するのは Coulomb 力とみることができる。イオン結晶ではイオン間の空間は単位の誘電率を持つに過ぎないから force of attraction は大きい。しかしこれを水に入れると食塩のように容易に溶解する。水中では水の D が 80 という大きい値を持つので、 f を著しく弱めるためである。その上イオンの水和のために生ずる水和層が結晶における程にイオンの接近することを妨げる結果、 r が大となり、一層 f が小さくなってよく溶解する。食塩の結晶では r は約 2.8 \AA 、1M 溶液では約 10 \AA である。このほか原子や分子間には van der Waals 力が作用するが、これは距離が遠くなると急速に弱まり、 $5 \sim 10 \text{ \AA}$ ではほとんど無視される。

物質が溶解するには3つの energy change が反映する。(1)分子は固体状態においてこれを取巻く分子から凝集力に打勝って離されねばならない。(2)溶媒分

子は互に離れて溶質分子を受け入れる空所を作らねばならない。この両過程にはエネルギーの投入が必要である。(3)その埋合せは溶解する分子が溶媒中の空所を埋めること、すなわち溶媒と溶質の間の新しい force of attraction を生ずる(溶媒和)ことによって満される。このようにしてイオン結晶はイオン-イオン間力、水-水間力が大きいにも拘らず、これを補償する高度の水-イオン間力のために水に溶解する。これに反し無極性有機化合物はその分子間に作用する力(主として van der Waals 力)は総て小さいので無極性溶媒に溶解する。これが水に溶解しないのは、相当する程高い水和の力を持たないので、水-水間力を破ることができないからで、よく“like dissolves like”といわれる。

有機分子は極性基と非極性基を持ち、その割合が溶解性に関係する。分子中に炭化水素部分が増すと水に対する溶解性が減り、有機溶媒に対する溶解性が増す。有機化合物の構造と溶解性の関連については文献^{7,8)}を参照されたい。

2. 溶媒の除去 希薄水溶液中の目的物質の濃度を高める方法の1つは水の除去で、次の操作による。

A. 減圧濃縮⁹⁻¹¹⁾ 一般には simple vacuum evaporator, flash evaporator, rotary evaporator などが

Table 1. *Polyporus versicolor* 培養液からセルラーゼの採取

段 階	液 量 ml		比 活 性 unit/ml	全 活 性 unit
	混 合 前	遠 心 上 清		
原 液	7500	—	0.532	4000
第1段階				
主 画 分	7500	3045	1.245	3790
1 回 洗 液	300	300	0.400	120
2 回 洗 液	300	274	0.105	29
第2段階				
主 画 分	2930	1130	3.816	4310
1 回 洗 液	117	122	2.196	268
2 回 洗 液	117	92	0.418	39
第3段階				
主 画 分	1020	410	8.48	3480
1 回 洗 液	41	34	2.58	88
2 回 洗 液	41	31	0.46	14
3 回 洗 液	41	26	0.19	5

培養液 7.5 l, 3 っに分け、おのおの乾燥 Sephadex G-25 750 g ずつ計 2250 g 添加, 10分間かきませ膨潤, 遠心 (3000 rpm), 上清と洗液をあわせ, 同様処理, 3 回の操作時間は 4 時間以下, 活性当り 15 倍濃縮, 回収率 90% (実験化学講座 2, p. 257 より転載)

用いられる。

蛋白質（酵素など）の減圧濃縮のために工夫された装置もあるが、蛋白質は一般に熱に不安定なので加熱蒸留はあまり適当ではなく、次の方法がある¹²⁾。

B. 凍結濃縮 蛋白質溶液を凍結し、水を氷として濾別する。数回反復すればかなり濃縮される。

C. Pervaporation 試料を半透膜の袋に入れて、送風により水分を蒸発させる。

D. 限外濾過^{10,13,14)} 半透膜を濾過剤として、自重、減圧または加圧下で濾過して水を除く。同時に低分子物質も除かれる。

E. 浸透圧の利用 透析膜内に Carbowax polyethylene glycol のような水溶性高分子ポリマーを満たし、これを希薄溶液中に挿入すると浸透圧により水が膜内に浸入して溶液は濃縮される¹⁴⁾。

F. ゲル濾過剤の利用 Sephadex などの膨潤性を利用して水を除去することができる。Polyporus versicolor の培養液からセルラーゼ採取の 1 例を示すと Table 1 の通りである¹⁵⁾。また Pettersson ら¹⁶⁾ は同酵素調製の最初の段階に Sephadex 濃縮を利用し、殆んど効力の損失なしに 85 l の培養液を 315 ml に濃縮した。

このほか完全に水を除去するには噴霧乾燥、不安定な物質、蛋白質などには凍結乾燥^{10,13)}が適用される。

3. 溶剤抽出法¹⁷⁻¹⁹⁾ 水は比熱が大きく、沸点も高く留去しにくい溶媒で、殊に熱に不安定な物質の希薄溶液を取扱う時は、加熱濃縮によって大量の水を除去することは困難である。このような場合には目的物質を水と混和しない低沸点の有機溶媒に転溶して濃縮

する方が遥かに有利で、一般にこの方法が広く用いられる。その際溶媒の種類と抽出条件、特に溶液の pH を適宜に選択すれば同時に分別もできる。抽出溶媒としては炭化水素、エーテル、エステル（酢酸エチル、酢酸ブチル）、アルコール（ブタノール、アミルアルコール）、ケトン（メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン）、クロロホルムなどが用いられる。

一物質を完全には混和しない二つの溶媒に溶解する時、一定温度でその物質が両液層に分配される割合は一定である。この濃度比が分配係数 ($K=C_1/C_2$; C_1, C_2 はそれぞれ上層液、下層液中の溶質の濃度) で、この値が大きな溶媒を選べば能率よく抽出できるし、また数種の溶質が共存する時はその差を利用して分別も可能である。向流分配法や分配クロマトグラフィーはこの原理を応用したもので、分別手段として極めて効果的である。

水溶液から有機溶媒で抽出する場合に、前述の通り液の pH を適宜に調節すれば、酸性、中性、塩基性、両性物質の分別抽出ができる。これを行なうにはその物質の酸または塩基としての強さを知る必要があり、 pK_a^* がその指標となる。これはその物質の酸としての見掛けの解離指数で、値が小さい程酸性が強いことを示す。 pK_a' 値は pH メーターを用いて測定した滴定曲線から求めることができる。弱酸 HA を強塩基で半分中和（半滴定）した点では、残った酸の濃度は生じた塩の濃度に等しく、酸の濃度は不電離の酸の濃度にほとんど等しい。滴定の結果生ずる塩の濃度は陰イオンの濃度にほとんど等しいから $[HA]=[A^-]$ となり、 $K_a=[OH_3^+]$, ゆえに $pK_a=pH$ となり半滴定

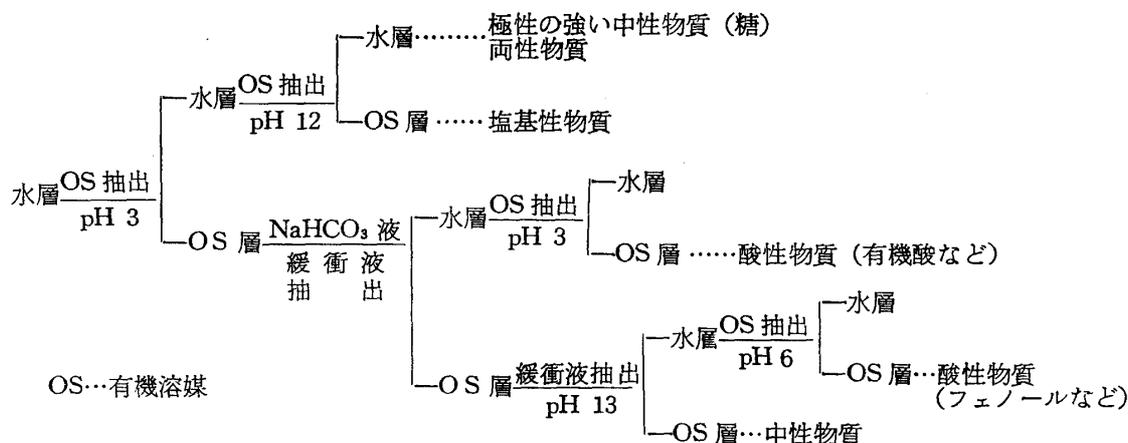


Fig. 1. 溶媒抽出法による酸性、中性、塩基性、両性物質の分別

(高橋信孝：化学と生物, 5, 40 (1967) より転載)

* 水溶液中の弱酸 HA の解離定数を K_a とする。
 $HA + H_2O \rightleftharpoons A^- + OH_3^+$, $K_a = [A^-][OH_3^+]/[HA]$,

$pK_a' = pK_a + \log(\gamma_{A^-}/\gamma_{HA})$, $\gamma_{HA}, \gamma_{A^-}$ は酸およびその共役塩基 A^- の活動度係数。

点における pH から pKa が判る。おもな化合物群の pKa' は文献²⁰⁾を参照されたい。

一般に pH 3 以下の強い酸性では大部分の酸性物質は非解離の分子, 塩基性物質はカチオンとして存在する。pH 12 以上では酸性物質はアニオン, 塩基性物質は非解離分子として存在する。フェノール類の pKa' は pH 9~11 なので, 重ソウ溶液ではほとんど解離しないが, 普通の有機酸は解離する。解離したものはイオン性を有し水に溶け易いが, 非解離分子は有機溶媒に溶け易く, この性質を利用すれば Fig. 1 のように分別抽出を行なうことができる。

有機溶媒抽出液を濃縮すれば容易に目的物質の濃縮液が得られる。ペニシリンは pH 2.5 で遊離酸として酢酸ブチルに移り, ついで中性 (pH 6.5~7.0) で塩となって水に再び転溶される。この操作を 2 回反復するとブrossの 1/700~1/1000 に濃縮される^{21, 22)}。また有機溶媒に転溶し難い物質の場合に carrier として適当な酸または塩基を加えて, 有機溶媒に転溶させることもできる。ストレプトマイシンはラウリン酸, ステアリン酸, または *p*-トルエンスルホン酸を加えて pH 6.5~7.0 でブタノールに移され, pH 3 以下で再び水に転溶される。この操作を 2, 3 回繰返して 1/100~1/1000 量に濃縮することができる²¹⁾。

Soxhlet 型連続液体抽出装置で, 低沸点有機溶媒を用いて抽出操作を行なえば, 抽出と同時に濃縮もできる。大量の培養液を処理するには混合器エジェクターと遠心器 (ドラバール, シャープレス) を組合せたり, Podbielniak のような連続向流抽出器が用いられる²¹⁾。

4. 沈殿法 溶存する物質の溶解度を下げて析出沈殿させれば, 目的物質を濃厚に捕集することができる。または同様に共存物質を除去し, 以後の分離操作を有利にすることもできる。目的物質を選択的に析出させることができれば捕集上効果的である。

用いられる試薬は物質によって区々であるが, 一般に低分子化合物の場合, 酸性基に対しては Cu, Ag, Zn, Pb, Ba, Ca などの金属塩の形成, 塩基性基に対してはピクリン酸, ピクロロン酸, フラビアン酸, ヘリアント酸などの有機酸塩または燐タングステン酸, 燐ウォルフラム酸, 燐モリブデン酸, ライネケートなどの無機酸塩の形成が利用される¹⁷⁾。沈殿物から目的物質の回収には前者の場合は硫化水素で金属を除き, 後者の場合は鉍酸で酸性としてエーテルのような有機溶媒で酸成分を除く。

多価金属イオンの組合せによる沈殿も行なわれる。オキシテトラサイクリン (Otc.) は pH 8.1~9.0 で,

Ba, Sr, Ca の組と Mg, Zn, Be, Cd, Hg の組を適当に組合せて complex として沈殿される。Ca-Mg, Ba-Mg, Ba-Zn の組合せが良い結果を与える²¹⁾。例えばブrossを硫酸で pH 2.5 とし, 菌体を濾別した後, Otc. 1 部に対し BaCl₂·2H₂O 15.5 部, MgCl₂·6H₂O 2.07 部を加えて 30 分攪拌する。10% NaOH で pH を 8.5 とし, 生じた Ba-Mg-Otc. complex を濾過助剤を加えて濾取する。これを硫酸で分解して Otc. の濃縮物が得られる²²⁾。バイオマイシンはイオン交換樹脂 IRC 50 に pH 8.0 で吸着, 0.1*n*-HCl で溶出後ヘリアンテート, フラビアン酸塩として沈殿される²¹⁾。

トリプトファンは HgSO₄ と難溶性化合物を作り, アミノ酸の選択的沈殿には potassium trioxalatochromiate (グリシン), ammonium Reineckate (プロリン, オキシプロリン, ベタイン), ammonium rhodanilate (プロリン) などの錯塩が利用される^{23, 24)}。

蛋白質は次の処理によって沈殿する¹²⁾。1) 加熱による凝固, 2) 有機酸 (ピクリン酸, トリクロル酢酸) や無機酸 (メタ燐酸, タングステン酸) による沈殿, 3) 金属塩または水酸化物 (水銀塩, 酢酸鉛, 水酸化亜鉛, 水酸化カドミウム, 水酸化銅) による沈殿, 4) 有機溶媒 (アルコール, クロロホルム-アミルアルコール混液, フェノール) による沈殿。このような処理は除蛋白に利用されるが, 金属塩や諸種の沈殿剤が蛋白質の分離精製に用いられることもある。例えば水銀塩 (エノラーゼ, 乳酸脱水素酵素), 核酸 (エノラーゼ, ジホスホグリセルアルデヒド脱水素酵素), タンニン酸 (α -アミラーゼ), ピクリン酸 (プロタミン, ペルオキシダーゼ), リバノール (α -アミラーゼ) などである²⁴⁾。

蛋白質の分離濃縮を目的とする沈殿法としては等電点沈殿と塩析の利用が効果的である。一般に蛋白質の溶解性には種々の因子が影響する^{6, 24)}。

- 1) アミノ酸組成 蛋白質構成アミノ酸にイオン性+極性アミノ酸の割合が多ければ水に対する溶解性が増し, 非極性アミノ酸の割合が多ければアルコールのような低誘電率の溶媒に対する溶解性が増す。
- 2) pH の影響 蛋白質は等電点において実効電荷は 0 となり, 水に対する溶解度は最も小さい。この性質に基づき溶液の pH を調節して蛋白質の析出を行なうのが等電点沈殿法である。
- 3) 塩濃度の影響 (塩析) 一般に蛋白質の水に対する溶解度は塩濃度が低い時はイオン強度 μ に比例して増加し, 塩溶効果が現れる ($\mu 0 \sim 1$)。塩濃度がさらに増加すると溶解度は極大点を通して減少し, 塩析効果が現われて蛋白質は析出沈殿する ($\mu 2 \sim 10$)。

塩析に対しては式 $\log S = \beta - K_S \mu$ が適用される。 S …蛋白質の溶解度, K_S …各種の塩の塩析効果を示す塩析係数, β …塩濃度 0 の時の蛋白質の仮想溶解度。塩類としては $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , MgSO_4 などが用いられる。塩析はまた低分子化合物の溶液から溶質を析出させるのにも利用される。ブタノール, アセトンなどの塩析には K_2CO_3 が, エーテル, 脂肪酸の塩析には NaCl が用いられる。また溶媒抽出の際に水層に塩を加えると抽出効果が大きくなる。

4) 有機溶媒の影響 (誘電率の低下) 蛋白質水溶液に有機溶媒を加えると媒体の誘電率が下って蛋白質の溶解性が減少する。有機溶媒は蛋白質の変性をおこし易いので, できるだけ低温で行なう。pH の調節と組合せると蛋白質混合物の分別ができる。

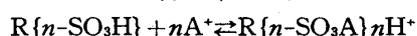
5. 吸着法 溶液中の不純物の除去, 脱色や脱臭に吸着現象が利用されているが, この方法はまた処理し難い大量の水溶液中に少量含まれる物質を取り出すのにも極めて有効な手段で, 後の分別操作に適した濃縮物が容易に得られる。種々の生理活性物質や抗生物質などの分離精製に当って, 水の多い抽出液や培養濾液から活性炭に目的物質を吸着させ, 次いで有機溶媒で溶出して分離濃縮が行なわれた例が多い^{17,18,21,22}。ストレプトマイシンの吸着法では培養濾液の pH を 7.0 ~ 8.0 に調節し, 活性炭 1% を加えて吸着濾過する。洗滌後 10 倍量の 95% メタノールを加え, 塩酸で pH 2.0 として溶出する。溶出液を pH 4.0 に調節してメタノールを留去すると濃縮液が得られる¹⁷。

吸着剤としては活性炭²³⁾のほか, シリカゲル, アルミナ, セライトなどがある。活性炭は水のような極性溶媒から溶質を吸着するのに適し, 溶出にはメタノールやアセトンが用いられる。シリカゲルやセライトは

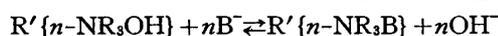
水に対する親和性が強く, 水の存在下では他の物質に対してはほとんど吸着性を示さない。

吸着現象を利用する方法としてはバッチ法のほか, 今日では吸着クロマトグラフィーが種々の物質の分離精製に広く用いられている。

6. イオン交換樹脂法^{19,26~28)} イオン交換樹脂は網目構造をした高分子化合物で, 分子内に $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ (陽イオン交換樹脂) または $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{N}^+\text{R}(\text{OH})^-$ (陰イオン交換樹脂) などの解離基を含み, これを電解質の水溶液中に浸漬すると樹脂の解離基と溶液中のイオンの間で次のように交換が行なわれてイオンの分配平衡が成立する。



陽イオン交換



陰イオン交換

水溶液中に少量含まれる酸性, 塩基性および両性などのイオン性化合物を捕えるのに有効である。

イオン交換樹脂には解離基の強弱によって強酸型, 弱酸型, 強塩基型, 弱塩基型の種類があり, Table 2 のような pKa' を有するので, この性質を利用して先の溶媒抽出の時のように酸性, 中性, 塩基性および両性物質の分画を行なうことができる (Fig. 2 参照)。

米国特許によるストレプトマイシンのイオン交換濃縮の例では²²⁾, divinyl benzene 5% を含む methacrylic acid + divinyl benzene の copolymer 樹脂を 50 g ずつ 2 本の塔につめ, 10% NaOH 液を流して Na 型にし, 水洗後 series に連結する。別に 1 ml 中 360 単位のストレプトマイシン含有プロス 64.8 l を燐酸で pH 2 として濾過, NaOH で pH 7 に中和後再濾過したものを樹脂塔に通す。ストレプトマイシンは大部分

Table 2. イオン交換樹脂の解離基と見かけの pKa 値

陽イオン交換樹脂			陰イオン交換樹脂		
	解離基	pKa		解離基	pKa
強酸型	$-\text{SO}_3\text{H}$	<2	強塩基型	\oplus $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$	>11
				\oplus $-\text{N}(\text{CH}_2\text{OH})(\text{CH}_3)_2$	>11
弱酸型	$-\text{PO}_3\text{H}$	{2~3 7~8	弱塩基型	$-\text{NH}_2$	7~9
	$-\text{COOH}$	4~6		$-\text{NH}-$	7~9
	$-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	9~10		$-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$	5~6

(鈴木昭憲: 化学と生物, 5, 162 (1967) より転載)

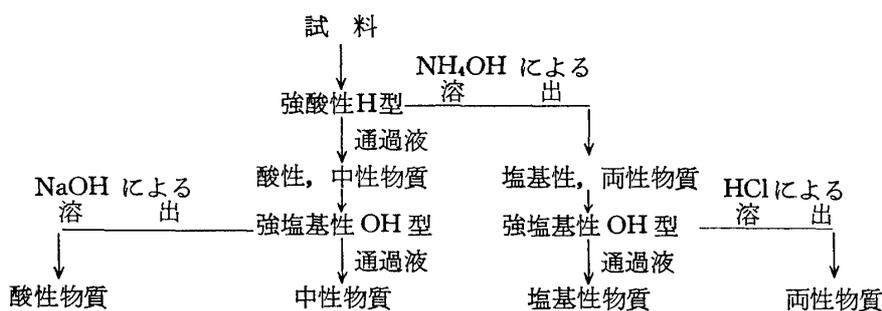


Fig. 2. イオン交換樹脂による酸性, 中性, 塩基性, 両性物質の分別
(鈴木昭憲: 化学と生物, 5, 163 (1967) より転載)

吸着される。塔を水洗後 1000 ml の 0.1N HCl で溶出すると、第1塔からは 25,000単位/ml の濃厚液が 670 ml, 第2塔からは 28,000単位/ml の濃厚液が 235 ml 得られ、ストレプトマイシンの回収率もほとんど 100%で、著しく濃縮される。

樹脂は通常塔につめて使用するが、今日ではカラム型イオン交換クロマトグラフィーとして特に近似物質間の分別に大きな効果をあげている。

7. 蒸留法^{9,11,13,19} 溶存する目的物質が揮発性物質である時は分別蒸留によってこれを濃厚に捕集することができる。比較的沸点の高い物質, 高級アルコール, 高級脂肪酸, 芳香族化合物などの分離には水蒸気蒸留, 熱に不安定な物質の精製には分子蒸留¹⁹が適用される。

8. 透析法^{13,14,26} 半透膜を利用した透析法は蛋白質, 核酸, 多糖類などの高分子物質と低分子物質の分別, 例えば蛋白質塩析後の脱塩などに利用されてきた。低分子物質が電解質の場合には電気透析も利用される。

普通の透析では浸透圧のために膜内液はかえって増加するが, 内液に加圧するか, 外液を減圧すると内液は濃縮される。また蛋白液をアルコールやアセトン水溶液に対して透析すると内液が濃縮できる¹²⁾。

このような諸種の方法を併用することによって多量の希薄水溶液から目的物質をかなり濃厚に捕集することができる。さらに異種物質との分別や類縁物質間の分別をし, 目的物質の濃縮分離を行なうには次のような分別方法が適用される。本稿は希薄溶液からの濃縮を主眼とするのでこれらについては簡略に述べたい。

9. 向流分配法^{11,13,29-31} これは2つの溶媒系に対する分配係数の差を利用して2溶媒系を順次向流的に接触させて分別操作を繰返す方法で, 比較的多い量を処理したい時は多数の分液漏斗を用いて効果をあげることもできるが, 普通には自動化された装置が用いら

れる。

この方法は条件が温和で, 従来困難であった生体成分や代謝産物中の近縁物質の分離に有効で, 比較的多量の物質の分離精製にも用いられ応用範囲が広い。アミノ酸, ホルモン, 抗生物質などペプチド, 蛋白質その他の分離精製に効果があり, 純度検定, 分子量の測定²⁹⁾にも応用される。

10. クロマトグラフィー^{13,26,30} 固定した吸着剤(固定相)に溶媒または気体をしみ込ませた分散系の一端に混合試料をおき, 溶媒または気体(展開剤または移動相)を移動させ, 試料成分の分配係数の差, 被吸着性の差, 解離性の差などによる移動速度の差を利用して分離を行なうもので, 種々の型がある。物質の分離調整に用いられるほか, 最近では分析定量への応用に著しい進歩がみられる。

A. 分配クロマトグラフィー^{19,26,30} カラムの固定相の水相とその中を移動する溶媒相との間で分配が繰返されて混合物が分離される。ペーパークロマトグラフィー, クロマトパイル, 逆相クロマトグラフィーなど種々の方式があるが, 分離精製のため比較的量をこなせるのはシリカゲルやセルロースパウダーなどを水の保持体とするカラムクロマトグラフィーで, 比較的極性が強く親水性の物質に適用される。

B. 吸着クロマトグラフィー クロマトグラフィーとしては最も早く考案されたもので, カロチノイド色素などの分別に効果をあげた。分離すべき物質を含む液を, 吸着剤をつめたカラムに流して吸着させ, 展開溶媒で展開して, 吸着剤に対する被吸着性の差を利用して分別する。比較的極性の少ない物質の分別に適する。

吸着剤の種類と吸着性, 物質の構造・置換基の種類と被吸着性の関係, 溶媒の溶出力や eluotropic solvent series については文献^{19,30,32)}を参照されたい。

C. イオン交換型クロマトグラフィー H型の強酸性樹脂のカラムに食塩溶液を流すと, 液は降下するにつれ新しい HR 層に接し, $HR + Na^+ \rightleftharpoons NaR + H^+$ の

Table 3. イオン交換セルロース

	交換体名称	交換基	pK
陽セル イオン 交換	CM (carboxymethyl)- cellulose	-O·CH ₂ COOH	4.2 ^a , 3.5 ^b
	P (phospho)-	-O·PO ₃ H ₂	6.7 ^a , 6.5 ^b
	SM (sulfomethyl)-	-O·CH ₂ SO ₃ H	2.5 ^b
	SE (sulfoethyl)-	-O·CH ₂ CH ₂ SO ₃ H	2.5
陰セル イオン 交換	PAB (<i>p</i> -aminobenzyl)-	-O·CH ₂ C ₆ H ₄ NH ₂	4.0
	AE (aminoethyl)-	-O·CH ₂ CH ₂ NH ₂	弱塩基性
	DEAE (diethylaminoethyl)-	-O·CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	
	TEAE (triethylaminoethyl)-	-O·CH ₂ CH ₂ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₃	10 ^b
	GE (guanidinoethyl)-	-O·CH ₂ CH ₂ NHC<math>\begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{NH} \end{matrix}>	強塩基性
	ECTEOLA (ecteola)-	組成不明	5.9 ^a , 7.4 ^b

(実験化学講座続 2, p. 363 より抜粋)

a は水中, b は 0.5M 食塩水中。

Table 4. イオン交換 Sephadex

Sephadex のタイプ	交換基	備考
DEAE	-C ₂ H ₄ NH ⁺ (C ₂ H ₅) ₂	pK 9.5と5.7
CM	-CH ₂ COO ⁻	pH 6 以上で完全解離
SE	-C ₂ H ₄ SO ₂ O ⁻	pH 3.5 以上で完全解離

交換平衡は右に進み、液相の Na⁺ と当量の H⁺ が液相に出てくる。樹脂層の上端は交換基が Na⁺ のみで占められ、Na⁺ の吸着帯ができる。2 種以上の陽イオンを含む液を通すと樹脂層の上端から選択係数の大きいものから小さいものの順に吸着帯ができる。これに他の比較的濃度の高い電解質溶液 (溶離剤) を通すと、樹脂層に固定されていたイオンと加えられたイオンの間で交換平衡の移動がおこって吸着帯の降下すなわち溶離がおこる。混合溶質の分別に当っては stepwise elution や gradient elution が適用される。

イオン交換体としては樹脂のほかにセルロースに種々の解離性置換基を導入したセルロースイオン交換体^{14,19,30)} (Table 3) がある。この場合は交換基はセルロース分子の表面に存在するので交換速度が速く、交換容量も大きい。蛋白質、核酸、ウィルスなど高分子物質の分離精製に適している。また最近ではゲル濾過剤の Sephadex にイオン交換基を入れたもの^{19,37)} (Table 4) もある。これはデキストランゲルに官能基を導入したもので、その作用は主にイオン交換とみられる。

イオン交換クロマトグラフィーは酸、塩基、アミノ酸、ペプチド、糖、核酸関連物質などの分別調製のほか定量分析に広く用いられている。具体例は文献^{19,28)} を参照されたい。

D. 薄層クロマトグラフィー^{19,33)} ガラス板に吸着

剤の薄い層をつけ固定相としたもので、固定相の種類によって吸着のほか分配、イオン交換型のクロマトグラフィーとしても用いられる。最近ではポリエステルフィルム上にシリカを塗布した製品も出ている。主な吸着剤はシリカ、アルミナなどであるが、フェノール成分にはポリアミドが有効である³⁴⁾。フェノール性水酸基はポリアミドのペプチド結合との間に可逆的な水素結合をつくるが、フェノールより強い水素結合をつくり易い極性溶媒で溶出される。

11. ゲル濾過法^{14,19,36-38)} 最近では分子篩という新しい原理を利用した分離法が普及した。これはデキストランをエピクロロヒドリンで架橋して三次元の網目構造をもたせたもので、商品名 Sephadex といわれ、架橋度の差により種々の網目のものがある。使用目的は広い。例えば

- 1) 高分子物質溶液の脱塩, 低分子物質との分離。
- 2) 溶液の濃縮 Sephadex は水を吸収して膨潤するが、高分子物質は取込まないので溶液の濃縮を行なうことができる (前出)。なお濃縮への応用例については文献³⁵⁾を参照。
- 3) 同族物質または混合物からの分離 蛋白質, 酵素, ペプチド, アミノ酸, ホルモン, 多糖類, オリゴ糖類, ヌクレオチド, ヌクレオシド, 核酸塩基, ビタミンなどの分離。

- 4) 薄層クロマトグラフィー Sephadex を担体として使用すると、分子篩としての機能も発揮される。
5) ゾーン電気泳動 薄層にしたゲルを担体として電気泳動を行なう。

従来の Sephadex は水性溶媒中で使用されるが、最近有機溶媒中で使用可能な Sephadex LH-20 が作られ、疎水性化合物の分別に適用される。

12. 電気泳動法^{11,14,19,26,39)} 溶質の解離性に基いたもので、電場の中で電荷をもった溶質の泳動現象を利用する。操作上(1)移動界面法 (Tiselius 型) とゾーン電気泳動法の別があり、前者は定量分析に、後者は主として分離精製に適する。ゾーン電気泳動法では適当な支持体の中で泳動を行なって分離する。簡便なのは濾紙電気泳動法であるが、支持体としてはこの他デンプン粉、Sephadex、寒天ゲル、ポリアクリルアミドなどがある。ゲル内の泳動では適当な濃度のゲルを用いると、ある程度以上の大きさの溶質がゲル内を通過しにくく、分子篩の効果がでて、移動度の差が小さくても分子の大きさに差があれば分離が可能となる。

分離を目的とした装置には次のようなものがある。

- 1) 濾紙を支持体とした連続電気泳動法²⁶⁾。
- 2) Kirkwood の electrophoresis-convection 法¹⁹⁾ 対流現象を利用したもので、上下の貯蔵槽に成分が濃縮捕集される。
- 3) Porath の垂直カラム型ゾーン電気泳動装置¹⁹⁾
エチルエステル化したセルロース粉末を支持体として泳動が行なわれる。試料数 mg から 10 g 程度まで適用できる。電気泳動終了後、新しい緩衝液で溶出を行ない、溶出液をフラクションコレクターに分取することができる。

13. その他の方法 イオン交換膜電気透析法は電解質の濃縮と脱塩に効果的であるが、イオン交換膜は糖類の脱塩、ビタミン B₁₂ の精製、アミノ酸の精製に應用される¹⁹⁾。

遠心法は比重の異なった相を含むエマルジョンの分別(牛乳の脱脂)に、超遠心法は蛋白質の分析に用いられているが、最近密度勾配遠心分画法が開発され、生体高分子、ウィルス、核酸、蛋白質、生体顆粒の分画に利用されている¹⁹⁾。

起泡分離法は気液界面を利用するもので、これに属するものとしては古くから浮遊選鉱法が知られているが、今日では可溶性物質の気泡による分離濃縮にもこの原理が応用され、界面活性な捕集剤を用いて無機イオンの捕集ができる。多量の希薄溶液の処理に適する便がある。有機イオンの時は特別な捕集剤を加えずに泡沫浮選を行なうこともできる。時には水溶液上にイ

ソアミルアルコール、オクチルアルコールなどの層において消泡と同時に浮選物質を有機溶媒中に捕集する。これが溶媒浮選で、溶媒抽出に似ているが、使用溶媒量が少なくすみ、エマルジョンが生ずる心配のない点が便利である。大規模な装置もある。起泡分離の対象になるものには染料、ピクリン酸塩、没食子酸塩、アルカロイド、抗生物質、合成洗剤などがあげられる¹⁹⁾。

ガスクロマトグラフィー^{30,40)}は微量な揮発性物質の分別に有効であるが、水酸基の多い揮発性の乏しい物質(糖類、ステロイド、フェノール性化合物)もトリメチルシリルエーテル化することによって適用可能となり、応用範囲が拡大しつつある。分取装置を取りつけると純粋な成分の分取もできる¹⁹⁾。

文 献

- 1) Edsall, J. T., Wyman, J.: *Biophysical Chemistry*, **1**, Academic Press (1958).
- 2) Snell, F. M., Shulman, S., Spencer, R. P., Moos, C.: *Biophysical Principles of Structure and Function* (1965).
- 3) 赤堀, 他編: 生化学講座 **1**, 生物物理化学, 共立出版 (1958).
- 4) Dick, D. A. T.: *Cell Water*, Butterworths (1966).
- 5) Rich, A., Davidson, N.: *Structural Chemistry and Molecular Biology*, W.H. Freeman (1967).
- 6) Fox, S. W., Foster, J. F.: *Introduction to Protein Chemistry*, John Wiley (1957).
- 7) Shrine, R. L., Fuson, R. C., Curtin, D. Y.: *The Systematic Identification of Organic Compounds*, John Wiley (1956).
- 8) 藤田: 化学実験学第Ⅱ部 3巻, 河出 (1942).
- 9) 緒方: 化学実験操作法, 上巻, 南江堂 (1965).
- 10) 緒方: 化学実験操作法, 下巻, 南江堂 (1965).
- 11) 山口: 植物成分分析法, 上巻, 南江堂 (1959).
- 12) 赤堀: 酵素研究法, 第1巻, 朝倉 (1955).
- 13) 日本化学会編: 実験化学講座 **2**, 基礎技術Ⅱ, 丸善 (1956).
- 14) Bailey, J. L.: *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier (1967).
- 15) Flodin, P., Gelotte, B., Porath, J.: *Nature*, **188**, 493 (1960).
- 16) Pettersson, G., Cowling, E. B., Porath, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 1 (1963).
- 17) 米原, 高橋, 大岳: 化学と生物, **5**, 37, 98, 162

- 223 (1967).
- 18) 鈴木：植物の化学調節, **3**, 63, 154 (1968).
- 19) 日本化学会編：実験化学講座続 **9**, 分離と精製, 丸善, (1967).
- 20) Parke, T. W., Davis, W. W.: *Anal. Chem.*, **26**, 642 (1954).
- 21) 友田, 他編：微生物工学講座 **9**, 抗生物質・医薬品, 共立出版 (1964).
- 22) 朝井：微生物工業, 朝倉 (1956).
- 23) 赤堀, 水島：蛋白質化学 I, 共立出版, (1954).
- 24) 日本化学会編：実験化学講座 **23**, 生物化学 I, 丸善 (1957).
- 25) Hassler, J. W., (織田, 江口訳)：活性炭, 共立出版 (1966).
- 26) 緒方, 野崎：化学実験操作法続編 (1), 南江堂 (1965).
- 27) 本田, 他編：イオン交換樹脂, 広川.
- 28) 垣花, 成田：最新イオン交換, 広川 (1968).
- 29) 赤堀, 他編：生化学講座 **15**, 生体成分分析法, 共立出版 (1962).
- 30) Florkin, M., Stotz, E. H.: *Comprehensive Biochemistry*, **4**, Separation Methods, Elsevier (1962).
- 31) 緒方, 野崎：化学実験操作法続編 (II), 南江堂 (1958).
- 32) Wollish, E. G., Schwall, M., Hawrylyshyn, M.: *Anal. Chem.*, **33**, 1138 (1961).
- 33) 石川, 他編：薄層クロマトグラフィー, 南山堂.
- 34) Hörhammer, L.: *Method in Polyphenol Chemistry*, p. 89, Pergamon (1964).
- 35) 守屋：ゲル濾過法, 広川 (1966).
- 36) Fischer, L.: *An Introduction to Gel Chromatography* (Work, T. S., Work, E.: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*), North-Holland (1969).
- 37) 志村, 吉田：化学と生物, **4**, 267, 324 (1966).
- 38) 加藤：化学と生物, **7**, 423, 485 (1969).
- 39) Gordon, A. H.: *Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels* (Work, T. S., Work, E.: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*), North-Holland (1969).
- 40) 日本化学会編：実験化学講座続 **9**, ガスクロマトグラフィー, 丸善 (1965).

[註] 文献はできるだけ総合的なものをあげた。これらには個々の文献, 実施例などが引用されているので, それらを参照されたい。

(昭和 45. 6. 26 受付)