

超高温水クロマトグラフィーにおけるアミノ酸の保持挙動

日大生産工(院) 鈴木 悠介
日大生産工 渋川 雅美

【緒言】

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、現在最も多用されている分離分析法の一つである。移動相として用いる水-有機溶媒混合物の組成比を変えることによって溶出力を容易に調節し、分離を最適化できることが大きな利点として挙げられ、現在タンパク質やペプチドの分離・精製にも汎用されている。しかし、HPLCの移動相として用いられる有機溶媒は、環境に負荷を与えるばかりでなく人体にも影響を及ぼすことが懸念されている。一方、当研究室では有機溶媒の代替物として高温・高圧状態の水、いわゆる“超高温水”を移動相としたHPLCである超高温水クロマトグラフィー(Superheated Water Chromatography;SWC)に関する研究を行い、SWCがHPLCの代替技術になり得ることを示した¹⁾。

本研究はSWCによる生体高分子の分離分析を目的とした。従来、タンパク質は高温条件下では変性し、アミノ酸も一部は分解することが知られている。しかし近年、小林らはアミノ酸が高温・高圧条件下においても比較的安定に存在することを示した²⁾。同様にタンパク質も比較的耐熱性を有していることが明らかとなった³⁾。そこで本研究ではまず、SWCにおけるアミノ酸の保持挙動に及ぼすpHや溶質などSWC溶離条件の影響を検討す

ることとした。

【実験】

本研究において使用したSWCシステムをFig.1に示す。

溶離液には0.01M NaCl, NaClO₄溶液および所定のpHに調整した各種緩衝液を用いた。試料化合物はIO₃⁻, Br⁻, NO₃⁻, SCN⁻, I⁻および20種類のL- α -アミノ酸を用いた。カラムオープンはガスクロマトグラフ用のものを用い、内部にプレヒートコイルおよびポリスチレン-ジビニルベンゼン(PSDVB)ゲルを充てんしたカラム(HAMILTON製PRP-1)を設置した。温度は40に設定した。検出はフォトダイオードアレイ検出器を用いて行った。

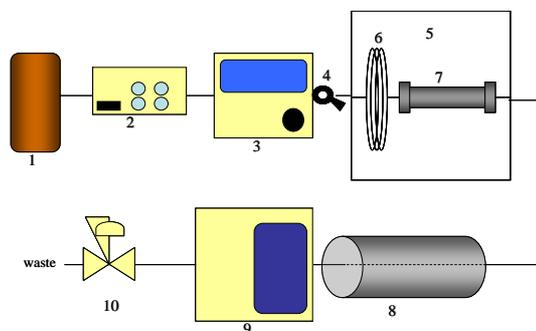


Fig.1 Schematic diagram of SWC system

1:eluent, 2:degasser, 3:pump, 4:injector, 5:oven, 6:preheating coil, 7:column, 8:cooling unit, 9:photo-diode array detector, 10:back pressure regulator

【結果および考察】

1. 溶離電解質効果法による移動相体積(V_m)の測定

HPLCにおいて分離条件の最適化などを目的として研究を行う場合、正しい V_m 値の決定

Retention Behavior of Amino Acids in Superheated Water Chromatography

Yusuke SUZUKI and Masami SHIBUKAWA

が必要不可欠となる。この値なくして分離度や保持係数などといった重要な保持パラメータを算出することはできない。これまでに当研究室では、HPLC おいてイオンの保持に及ぼす溶離電解質の効果を利用した方法⁴⁾で移動相体積を測定し、正しい V_m 値を得ることに成功している⁵⁾。この方法によれば V_m 値は式によって求められる。

$$V_m = \frac{V_A^{YX}V_B^{WZ} - V_A^{WZ}V_B^{YX}}{V_A^{YX} + V_B^{WZ} - V_A^{WZ} - V_B^{YX}} \dots$$

ここで V_A^{YX} は溶離電解質を YX としたときのイオン A の保持体積である。式に基づいて得られた V_m 値を Table 1 に示す。いずれのブローイオンの組み合わせについても良く一致 V_m 値が得られた。そこで、この値を用いて式によりアミノ酸の保持係数(k)を求めた。

$$k = \frac{V_R - V_m}{V_m} \dots$$

ここで V_R は得られた個々のアミノ酸の保持体積である。

Table1 Mobile phase volume in SWC system

Combination A/B	Retention volume (ml)				
	V_A^{NaCl}	V_B^{NaCl}	$V_A^{NaClO_4}$	$V_B^{NaClO_4}$	V_m
IO_3^- / Br^-	3.90	3.87	3.87	3.81	3.93
IO_3^- / NO_3^-	3.90	3.89	3.87	3.83	3.92
IO_3^- / I^-	3.90	3.88	3.87	3.85	4.03
IO_3^- / SCN^-	3.90	3.94	3.87	3.92	3.99
Br^- / NO_3^-	3.87	3.89	3.81	3.83	3.99
Br^- / I^-	3.87	3.88	3.81	3.85	3.89
Br^- / SCN^-	3.87	3.94	3.81	3.92	3.96
NO_3^- / I^-	3.89	3.88	3.83	3.85	3.87
NO_3^- / SCN^-	3.89	3.94	3.83	3.92	3.96
I^- / SCN^-	3.88	3.94	3.85	3.92	4.00

Average: 3.95 ± 0.05 (ml)

2. アミノ酸の保持挙動

一般に HPLC のカラム充填剤にはオクタデシルシリカ(ODS)が用いられる。しかし、これまでの研究で ODS は超高温水に対する耐久性が乏しいことが明らかとなっている⁶⁾。そこで

本研究ではカラム充填剤として PSDVB ゲルを使用した。

pH 6.0 のリン酸緩衝液を移動相として用いたときに得られた保持係数を Fig.2 に示す。大部分のアミノ酸の保持係数は 0 であることから、アミノ酸はほとんどカラムに保持されず溶出していることがわかる。これはアミノ酸が溶液中においてイオンとして存在しているため、非極性固定相との親和性が小さいためである。一方、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシンについては保持体積が V_m 値より大きな値を示した。これは、これらのアミノ酸が側鎖にフェニル基を有しているため、固定相である PSDVB との疎水性相互作用により保持されているためと考えられる。

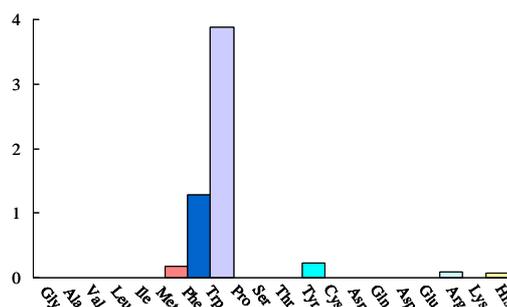


Fig.2 Retention factors of obtained in the system where phosphate buffer (pH6.0) was used as the mobile phase

【参考文献】

- 1) 中島良司, 鎗田孝, 渋川雅美, *分析化学*, **52**(2003)305.
- 2) K.Kobayashi, et.al., *Bull.chem.Soc.Jpn.*, **76**(2003) 1171.
- 3) 高野淑識, 丸茂克美, 枝澤野衣, 小林憲正, 内海真生, 浦辺徹郎, 第 65 回分析化学討論会講演要旨集, P2035(2004)282.
- 4) M.Shibukawa, N.Ohta, *Chromatographia*, **25**(1988)288.
- 5) 高澤裕司, 渋川雅美, 日本分析化学会第 52 年回講演要旨集, 1B34(2003)41.
- 6) T.Yarita, et.ai., *Anal.Sci.*, **19**(2003)269-272