

親水性化合物分離用NH₂カラムの特性とその応用

バイオサイエンス事業部 セパレーションメディア製造部 セパレーションセンター

山崎 浩行
河合 康俊
坂田 道子
森山 弘之

1. はじめに

高速液体クロマトグラフィーにおいて最も多く使われている逆相（RPC）モードは、親水性の高い化合物が保持しにくいいため、代謝物、糖ペプチドや核酸などの親水性の高い低分子化合物の測定に不向きである。一方、充てん剤表面に高極性官能基を導入し、有機溶媒組成の高い溶離液で分離を行う親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）は、親水性の高い化合物の保持が強く、LC/MS分析での検出感度の向上が期待できることから、高性能なHILICカラムが望まれている。

今回、充てん剤表面の高極性を維持したまま、残存するシラノール基のエンドキャップを施すことにより、極性の高い化合物に対して強い保持を与え、耐久性にも優れたシリカ系アミノカラムTSKgel NH₂-100 3 μmを開発した。

本報告では、シリカ系アミノカラムであるTSKgel NH₂-100 3 μmの特性と応用例について紹介する。

2. TSKgel NH₂-100の基本特性

2.1 充てん剤の特徴

表1にカラムの仕様を示す。TSKgel NH₂-100 3 μmは、細孔径10nm、表面積450m²/gのシリカゲル表面にアミノアルキル基を導入したアミノカラムである。従来のシリカ系アミノカラムは、化学的安定性に乏しく、耐久性に問題があることが知られている。これら

の問題点を解決するため、TSKgel NH₂-100 3 μmは、図1の表面構造模式図に示すように、スパーサーを介しアミノエチル基を導入し、かつ充てん剤表面に残存する未反応のシラノール基のエンドキャップを実施することにより、従来のアミノカラムに比べ大幅に耐久性を向上した。分離特性では、図2に示すように、グルコース等のアルデヒド基を持つ糖類もアノマー分離することなく測定できる。また、表面の高極性官能基（アミノエチル基）との親水性相互作用とアミノ基によるアニオン交換性を有したマルチモードのHILICカラムとして、親水性の高い低分子化合物を分離することが可能である。

2.2 保持力

TSKgel NH₂-100 3 μmは、充てん剤表面に極性の高い官能基を有していることから、溶離液の極性を変化（有機溶媒濃度の変更）することにより、HILICモード、及びRPCモードで分離することができる。疎水度

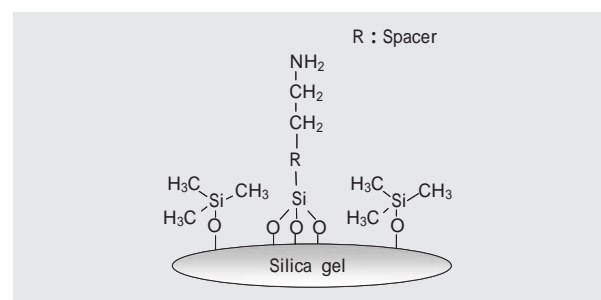


図1 TSKgel NH₂-100 3 μmの表面構造模式図

表1 TSKgel NH₂-100 3 μmカラムの仕様

基材	シリカゲル	
平均粒子径	3 μm	
細孔径（シリカゲル）	10nm	
比表面積（シリカゲル）	450m ² /g	
表面官能基	アミノアルキル基	
エンドキャップ	トリメチルシリル基	
カラムサイズ（分析）	2.0mml.D. × 5cm, 15cm	4.6mml.D. × 5cm, 15cm
カラムサイズ（ガード）	2.0mml.D. × 1cm	3.2mml.D. × 1.5cm

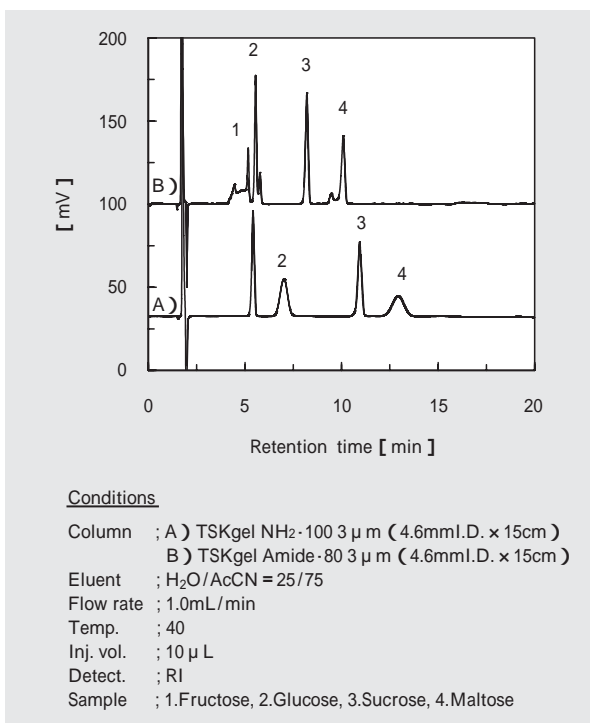


図2 TSKgel Amide-80との保持力の比較

(logP) の異なる3種類の化合物、ウラシル (logP = -0.87)、カフェイン (logP = 0.16) および、ベンゼン (logP = 1.99) を用い、溶離液中のアセトニトリル濃度の溶出時間への影響の確認を行った。図3に示すように、溶離液中のアセトニトリル濃度が50%以上では、

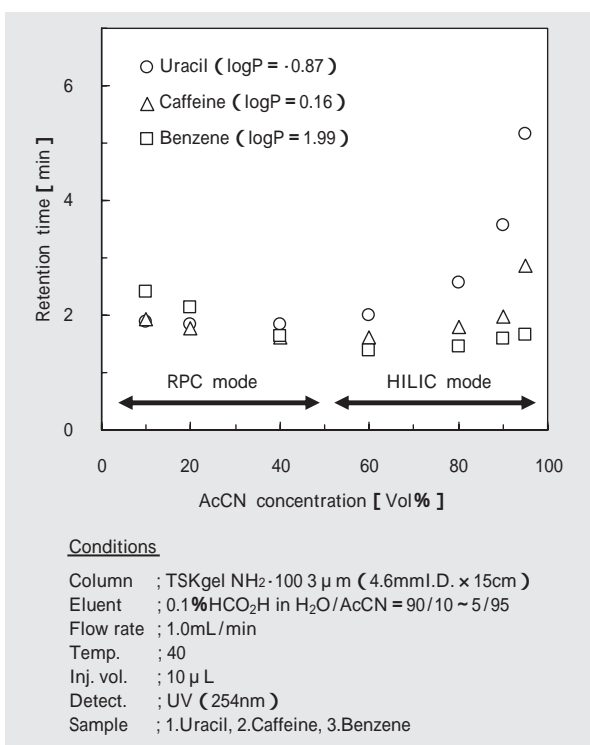


図3 アセトニトリル濃度の溶出時間への影響

表面の高極性官能基との親水性相互作用 (HILICモード) により、極性の高い化合物 (logPが小さい) の保持がより増大している。一方、アセトニトリル濃度が50%以下の場合、充てん剤表面の疎水性部位との疎水性相互作用 (RPCモード) により、疎水性の高い化合物 (logPが大きい) の保持が大きくなる。

溶離液のアセトニトリル濃度と糖類、ポリオール類の溶出時間の関係を図4に示す。溶離液中のアセトニトリル濃度が高くなるにしたがい、糖類、ポリオール類の保持力が大きくなる。また、図5に示すように TSKgel NH₂-100 3 μmは、シリカゲル表面にカルバモイル基を導入した既存の糖分析用カラム TSKgel Amide-80 3 μm に比べ、イノシトールに対し強い保持力を示し、糖類を溶解し易いより水の多い溶離液系で測定することが可能であることを示唆している。

2.3 理論段高さ (HETP) の線速度依存性

ウラシルを用いて TSKgel NH₂-100 3 μm と TSKgel Amide-80 3 μm の HETP の線速度依存性について確認した。図6に示すように、TSKgel NH₂-100 3 μm は、粒子径 3 μm の充てん剤を用いていることから、高い線速度においても HETP の上昇が小さく、高いカラム効率を維持していることがわかる。また、TSKgel Amide-80 3 μm のように充てん剤表面にカルバモイル基を多重層で導入した充てん剤に比べ、広い線速度範

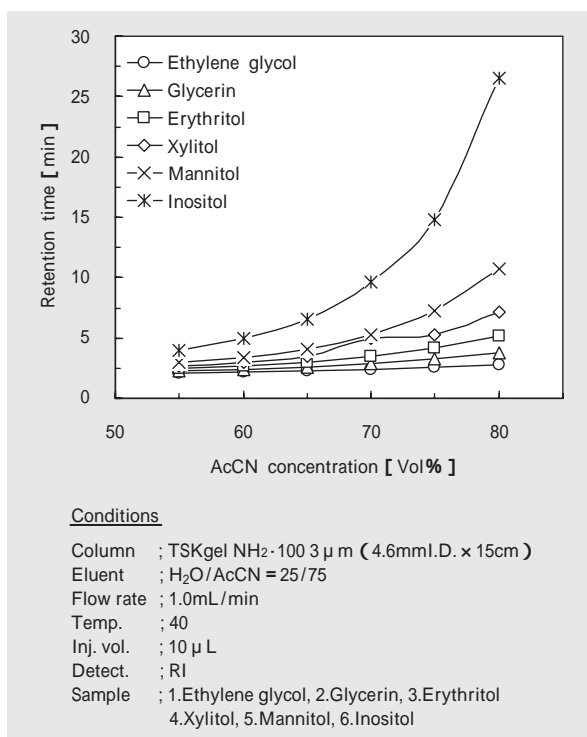


図4 アセトニトリル濃度の溶出時間への影響 (糖類, ポリオール類)

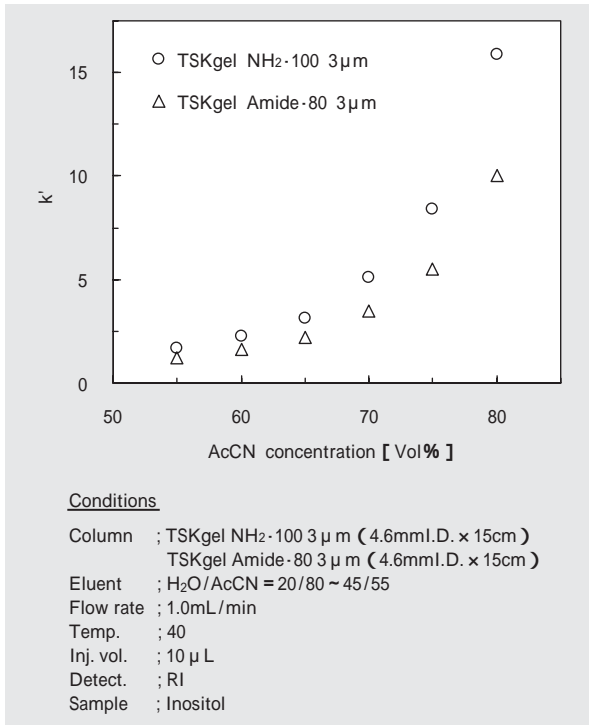


図5 TSKgel Amide-80との保持力の比較

図 (4 ~ 12 cm/min) で高いカラム効率が得られており、TSKgel NH₂-100 3 μmは、より高速で、かつ高分離な測定が可能である。

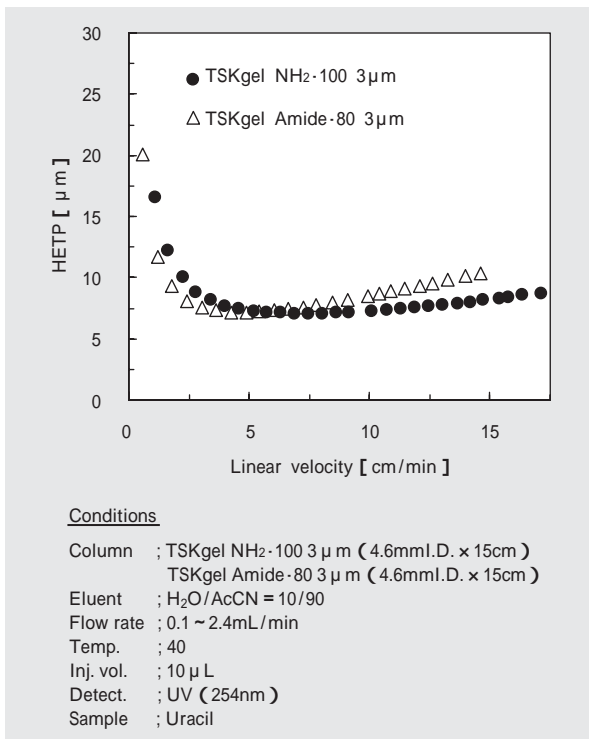


図6 理論段高さ (HETP) の線速度依存性

2.4 RPCカラム (ODS-100V) との溶出挙動の比較

HILICモードは、表面の高極性官能基 (アミノアルキル基) との親水性相互作用により、有機溶媒濃度の高い溶離液で極性化合物を保持する。一方、RPCカラムは、疎水性の固定相を有し、有機溶媒濃度の低い溶離液で疎水性化合物を保持するため、HILICカラムとは異なる溶出挙動を示す。図7に核酸塩基を用いたTSKgel NH₂-100 3 μmとTSKgel ODS-100V 3 μmとの分離の比較を示す。RPCカラムであるTSKgel ODS-100V 3 μmで極性の高い (logPの小さい) 核酸塩基から順に溶出しているのに対し、TSKgel NH₂-100 3 μmでは、一部核酸塩基で溶出順序の逆転が認められるが、極性の低い (logPの大きい) 核酸塩基から溶出している。また、図8に葉酸代謝拮抗剤のメトトレキサート (MTX) と投与されたMTXが細胞内で代謝されて末端のグルタミン酸が連鎖的に付加されたメトトレキサート-ポリグルタミン酸 (MTXPG) の分離の比較を示す。TSKgel ODS-100V 3 μmでは、グルタミン酸付加が大きいMTXPGほど早く溶出しているのに対して、TSKgel NH₂-100 3 μmでは、グルタミン酸付加が大きいMTXPGほど強い保持を示し、TSKgel ODS-100V 3 μmに比べ、良好な分離が得られている。逆相モードで分離困難な親水性試料の分析に有効である。

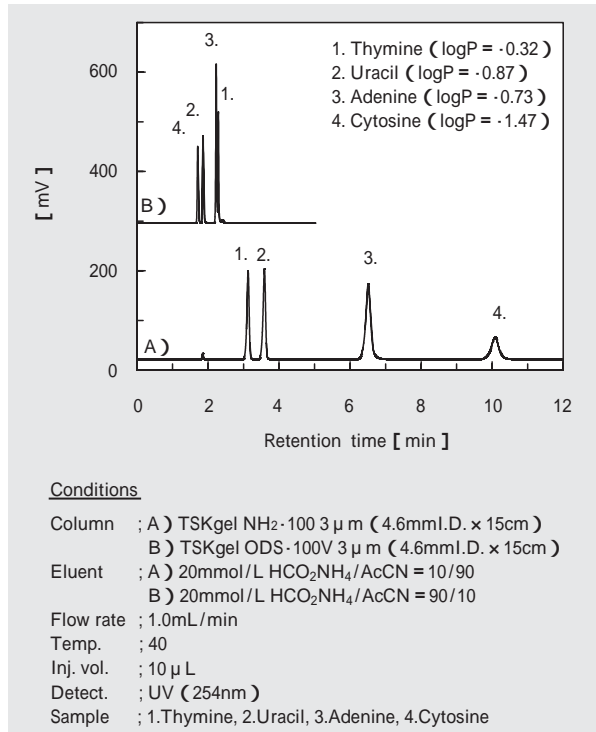


図7 核酸塩基によるODS-100Vとの分離の比較

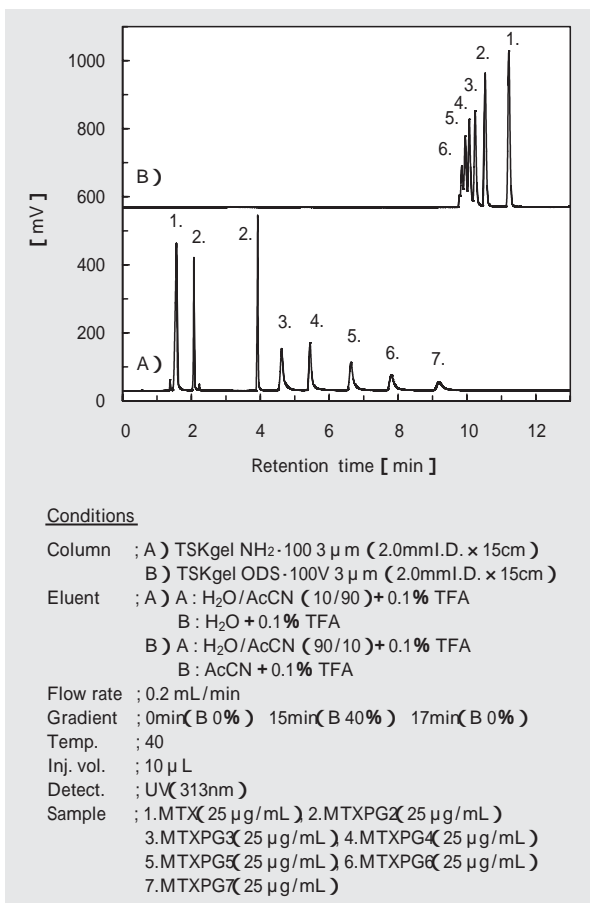


図8 ODS-100VとのMTXPG分離比較

2.5 他社HILICカラムとの比較

糖類、ポリオール類を用いて他社糖分離用カラムとの分離の比較を行った。図9に示すように、TSKgel NH₂-100 3 μmは、他社カラムに比べ強い保持力を示した。その他の糖類においても同様に、強い保持力を与えている。また、他社カラムでは、カラムへの吸着によるピーク面積の低下が認められたが、TSKgel NH₂-100 3 μmでは、他社カラムに比べ、カラムへの吸着が少なく、良好なピーク面積が得られた。

核酸塩基を用いてアミノカラムを含む、他社HILICカラムとの分離の比較を行った。図10に示すように、他社HILICカラムに比べ、保持が強く、TSKgel Amide-80 3 μmと同等の保持力を示した。また、TSKgel NH₂-100 3 μmは、他社HILICカラムと官能基が異なることから、核酸塩基との相互作用の違いによる分離選択性の差異が認められた。

2.6 耐久性

従来のシリカ系アミノカラムは、充てん剤表面に未反応の残存シラノール基が存在し高い表面極性のため、シロキサン結合の加水分解によるアミノアルキル

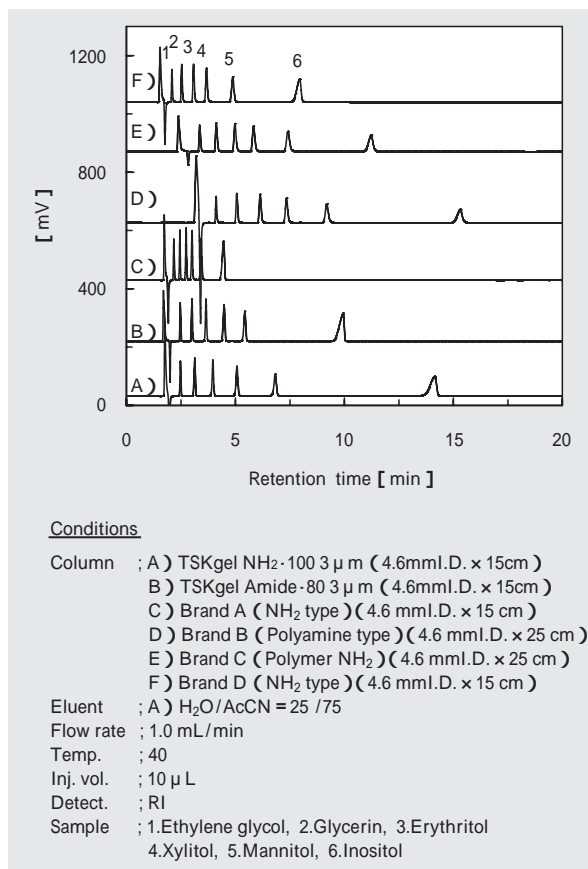


図9 糖類、ポリオール類の分離比較

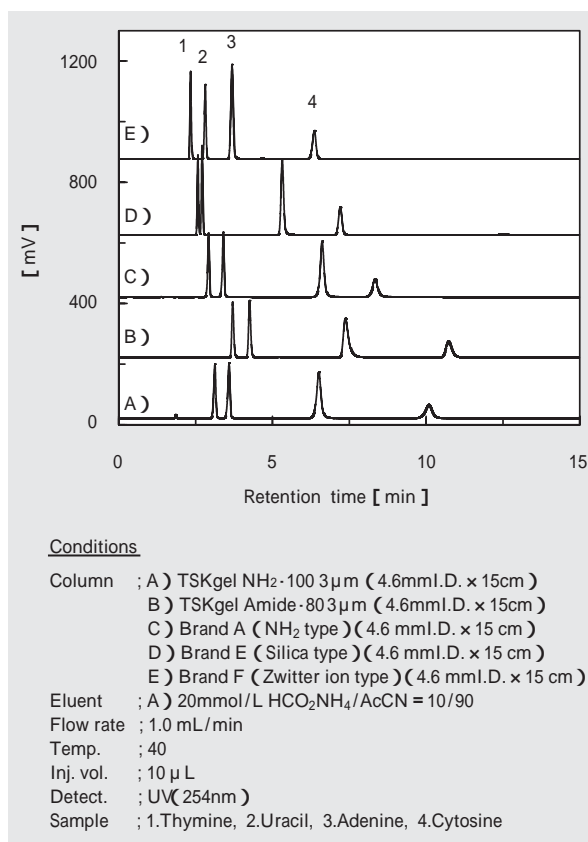


図10 核酸塩基による他社HILICカラムとの分離比較

基の脱離に起因する保持力の低下など、耐久性に問題がある。TSKgel NH₂-100 3 μmは、充てん剤表面に残存する未反応のシラノール基をトリメチルシリル基(TMS基)によりエンドキャップすることで、表面の疎水性を高め、シロキサン結合の加水分解を抑制することにより耐久性の向上を図っている。図11に示すように、既存のシリカ系アミノカラムであるTSKgel NH₂-60に比べ、高い耐久性を示している。

3. 応用分析例

3.1 ピリジリアミノ化糖(PA化糖)の分析

糖タンパク質の糖鎖解析では、酵素や化学反応により、試料から切り出した糖鎖をピリジリアミノ化(PA化)した後、ODSカラムやHILICカラムで分析され、解析が行われている。11種類の市販PA化糖を用いてTSKgel NH₂-100 3 μm、TSKgel Amide-80 3 μm、及びTSKgel ODS-100V 3 μmでの分離の比較を行った。TSKgel NH₂-100 3 μmとTSKgel ODS-100V 3 μmのクロマトグラムの比較(図12)では、HILICモード

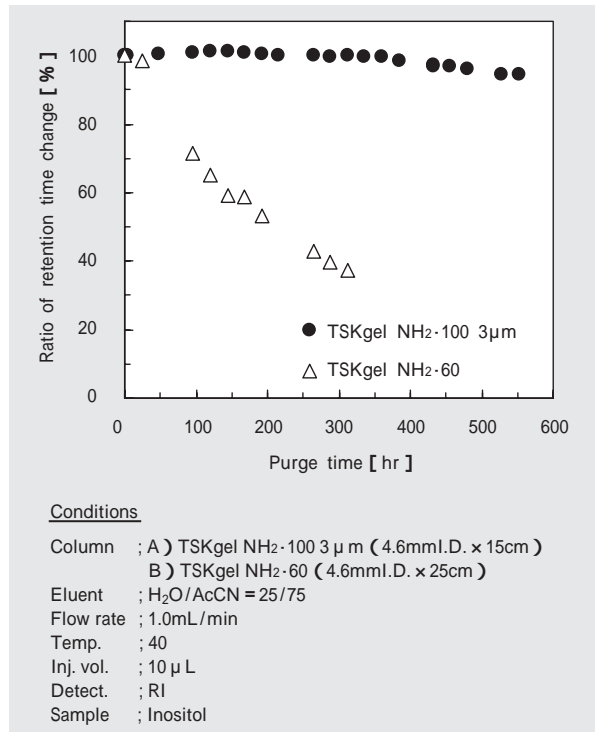
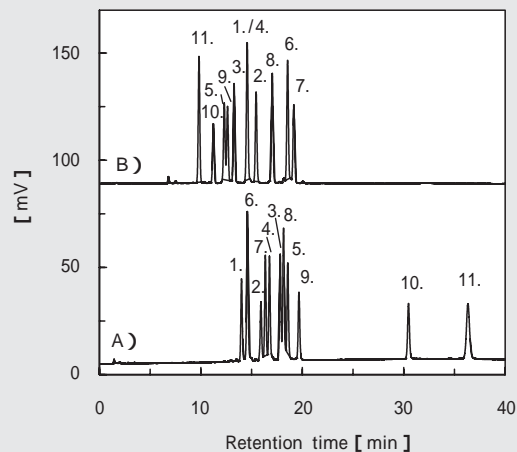


図11 シリカ系アミノカラム(NH₂-60)との耐久性比較



Conditions

Column ; A) TSKgel NH₂-100 3 μm (4.6mmI.D. × 15cm)
 B) TSKgel ODS-100V 3 μm (4.6mmI.D. × 15cm)

Eluent ; A) A : 200mmol/L Triethylamine Acetate (pH 6.5)/AcCN = 30/70
 B : 500mmol/L Triethylamine Acetate (pH 6.5)/AcCN = 60/40
 B) A : 50mmol/L HCO₂NH₄/AcCN = 98/2
 B : 50mmol/L HCO₂NH₄/AcCN = 90/10

Flow rate ; 1.0 mL/min

Gradient ; 0min(B 0%) 30min(B 100%) 45min(B 100%) 46min(B 0%)

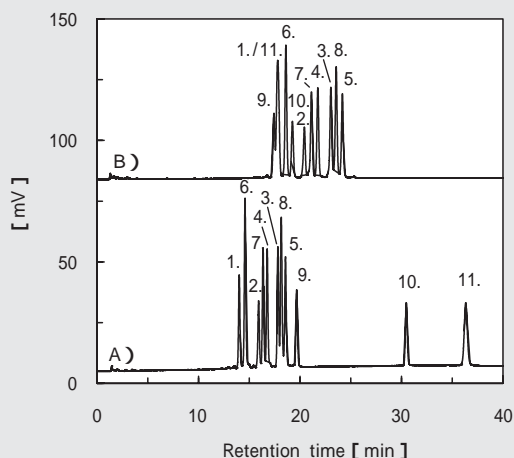
Temp. ; 40

Inj. vol. ; 10 μL

Detect. ; Fs (Ex. 315nm, Em. 380nm)

Sample ; 1. PA-Sugar Chain 001, 2. PA-Sugar Chain 002,
 3. PA-Sugar Chain 004, 4. PA-Sugar Chain 005,
 5. PA-Sugar Chain 006, 6. PA-Sugar Chain 009,
 7. PA-Sugar Chain 010, 8. PA-Sugar Chain 011,
 9. PA-Sugar Chain 022, 10. PA-Sugar Chain 024,
 11. PA-Sugar Chain 025

図12 ODS-100VとのPA化糖(11種類)の分離比較



Conditions

Column ; A) TSKgel NH₂-100 3 μm (4.6mmI.D. × 15cm)
 B) TSKgel Amide-80 3 μm (4.6mmI.D. × 15cm)
 Eluent ; A) A : 200mmol/L Triethylamine Acetate (pH 6.5) / AcCN = 30/70
 B : 500mmol/L Triethylamine Acetate (pH 6.5) / AcCN = 60/40
 B) A : 200mmol/L Triethylamine Acetate (pH 6.5) / AcCN = 26/74
 B : 200mmol/L Triethylamine Acetate (pH 6.5) / AcCN = 50/50
 Flow rate ; 1.0 mL/min
 Gradient ; 0min(B 0%) 30min(B 100%) 45min(B 100%) 46min(B 0%)
 Temp. ; 40
 Inj. vol. ; 10 μL
 Detect. ; Fs (Ex. 315nm, Em. 380nm)
 Sample ; 1. PA-Sugar Chain 001, 2. PA-Sugar Chain 002,
 3. PA-Sugar Chain 004, 4. PA-Sugar Chain 005,
 5. PA-Sugar Chain 006, 6. PA-Sugar Chain 009,
 7. PA-Sugar Chain 010, 8. PA-Sugar Chain 011,
 9. PA-Sugar Chain 022, 10. PA-Sugar Chain 024,
 11. PA-Sugar Chain 025

図13 Amide-80とのPA化糖（11種類）の分離比較

で溶出するTSKgel NH₂-100 3 μmにおいて、一部のPA化糖で溶出順序の逆転が認められるが、ODSでは溶出の遅いPA化糖ほど早く溶出している。また、図13に示すようにHILICカラムであるTSKgel Amide-80 3 μmでは、11種類のPA化糖を有機溶媒のみのグラジエントで溶出しているのに対し、TSKgel NH₂-100 3 μmでは、酸性糖がアミノ基とのイオンの相互作用を示すため、有機溶媒および塩濃度の同時グラジエントにより、11種類のPA化糖を完全に分離しており、既存のHILICカラムであるAmide-80と異なった分離選択性を示した。

4. おわりに

従来のシリカ系アミノタイプのHILICカラムは、水系溶離液において化学的安定性に乏しく、耐久性に問題を有していた。また、アミドタイプのカラムは、アルデヒド基を持つ糖類においてアノマー分離するため、使用上の制限を有していた。

今回、われわれが開発したアミノアルキル基を導入したHILICカラムは、耐久性を大幅に向上し、糖類においてカラムへの吸着が小さく、かつアノマー分離が見られないシリカ系アミノカラムである。また、親水性相互作用とアニオン交換性のマルチモードを有するHILICカラムであり、他のHILICカラムに比べ、極性の高い化合物に対して強い保持を与えることから、極性の高い代謝物などへの適用が期待される。