

反応型液体クロマトグラフHLC—805について

中 村 互 志, 松 本 勝 也
 石 川 治, 山 本 学
 佐 藤 孝

Post-Column Derivatization Type High Speed Liquid Chromatograph HLC-805

Hiroshi NAKAMURA

Katsuya MATSUMOTO

Osamu ISHIKAWA

Manabu YAMAMOTO

Takashi SATO

Conventional liquid chromatograph and gel permeation chromatograph detectors operate by measuring UV absorption or molecular fluorescence. However, the components which neither fluoresce nor absorb UV light cannot be detected with these systems and therefore the sample requires a suitable derivatization prior to analysis.

Post-column derivatization type liquid chromatography is a method of choice for the analysis of such samples. A component leaving the column is treated with an appropriate reagent or enzyme on the line, giving the derivative with visible UV absorption or fluorescence characteristics. Since the non-reacting components do not interfere, a particular component in the sample can be analyzed sensitively and selectively.

HLC-805 is designed for the post-column derivatization type liquid chromatography. In the present paper, we describe the details of this system and its application to the analysis of some amino acids and carbohydrates.

1. はじめに

近年、高速液体クロマトグラフィー (HLC) は急速に発展しており、ガスクロマトグラフィーとともに広範囲の化学物質の分離分析手段として広く利用されている。また最近では生体成分の分析において臨床分析としても利用されつつある。

一般の HLC は紫外検出器や、紫外—可視波長可変検出器を使用し、試料成分の検出を行なっている。しかし、紫外吸収を持たない物質、あるいは吸収があっても使用する溶離液に制約がある場合は分析が困難である。また生体試料のように多数の成分からなる試料では、全ての成分を分離することは不可能に近く、目的とする成分のみを検出する選択的検出法が望ましい。

このような検出に最適な方法は、目的とする成分の特定官能基と紫外可視、あるいはケイ光試薬と反応させる

ラベル法である。

ここではそのラベル法が行なえるよう開発した反応型高速液体クロマトグラフ HLC-805 の紹介と、それを用いたアミノ酸分析、糖分析などについて述べる。

2. 反応型高速液体クロマトグラフィー

(反応型 HLC)

反応型 HLC とは測定試料自体の検出が困難であるため、カラムで分離した後適当な反応を行なわせて (ラベル化) 検出可能な物質に変え検出を行なう HLC である。そしてその反応型 HLC の利点は次の 2 点があげられる。

- 1) 特定の成分のみを選択的に検出する。(試料中の目的物質以外は検出しないので全成分の分離を行なう必要がない。また未知物質の解析が容易になる。)
- 2) 感度が向上する。

〔1〕 ラベル方法の種類

試料のラベル方法には、カラムから溶出した後ラベルするポストラベル法と、カラムに注入する前にラベルするプレラベル法の二種類がある。HLC 装置に組み入れるのは前者で、後者は前処理法として採用されるのが一般である。Table 1 に両者の比較、特徴を示す。

Table 1 The Properties of Post-and Pre-Column Derivatization Technique

	Post-Column Deriv.	Pre-Column Deriv.
Sample Preparation	Simple	Conversome
Label Reagent	Only label reagents having no absorbance or fluorescence can be available	Various label reagents can be available
Reaction Rate	Reaction rate has to be fast	Slow reaction also can be applied
Reaction Product	Degradation products of samples can be applied	Degradation products of samples can not be applied
Stability of Product	Stable and unstable products can be available	Only stable products can be available
Separation	Eeasy	Difficult

ここで紹介する HLC-805 はポストラベル法が可能ないように設計されており、装置の死容積の影響で分離をそこなわないよう反応器には工夫がなされている。

3. 装置

Fig. 1 に HLC-805 のブロックダイアグラムを示す。通常の装置と異なる点は反応液ポンプと反応器が付加された点で、反応液ポンプから送られてくる反応液はカラムから溶出する試料と混合し、反応器により加熱反応を行ない検出部に導びかれる。また反応液ポンプおよび反応器は任意の数接続でき、二液以上の反応も可能である。

Fig. 1 には、溶媒切換バルブおよびそれを操作するシーケンスコントローラが接続されているが、これはアミノ酸分析に使用するもので反応型 HLC に不可欠のものではない。

HLC-805 は、装置を構成する機能部が各々独立して動作できるようにユニット化しており、基本構成システムへのユニットの追加や置換えにより、目的とする分析系に最も適した組合わせが行なえるよう設計されている。以下に装置を構成する各機能部について記した。

〔1〕 溶離液ポンプ部

溶離液ポンプは、カラムに溶離液を送る役目をし耐圧 350 kg/cm² のシングルプランジャーポンプを採用している。流量は最高 3 ml/min まで任意に設定可能で、安全面から圧力上限設定回路を設け、設定圧より高くなる

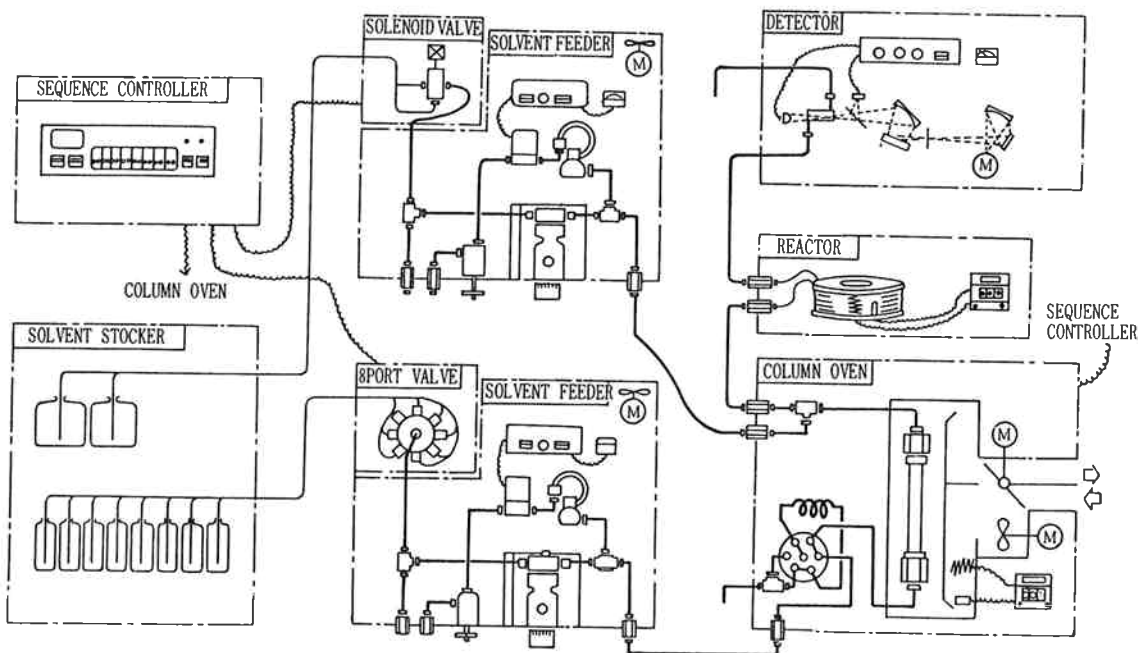


Fig. 1 The Flow Diagram of HLC-805

とポンプが停止するようになっている。またポンプ入口側には 8 方切換バルブを設け、溶離液を 8 点まで交換が可能であり、ステップワイス溶出法を行なう場合に都合が良い。

〔2〕 反応液ポンプ部

反応液ポンプは、反応液を送る役目をし、それはカラム出口で溶離液と混合され、反応器に導びかれる。ポンプ型式は溶離液ポンプと全く同一で、8 方バルブのかわりに 2 方電磁弁を採用している。装置の運転を止める時は電磁弁により反応液流路が蒸留水に置換され、反応器内の反応コイルのつまりを防ぐよう設計されている。

〔3〕 カラム恒温槽

カラム恒温槽には、外径 1/4~3/8 インチ、長さ 30 cm の通常使用するカラムが 3 本収納でき、室温から 100°C まで設定可能である。カラム温度を室温よりも高く保持することにより外気温度変化による溶出時間のずれが解消できる。また水などのように粘度の高い溶媒を用いる場合はカラム温度を高くすることにより、

- 1) 分離能が向上する。
- 2) カラムの圧損が低くなる。

などの利点がある。

試料注入部はこのカラム恒温槽部に組み入れられており、配管による死容積を最少限に抑えている。注入バルブは耐圧 500 kg/cm² の 7 ポートバルブを採用しており、最低 1 μl から任意に注入が可能である。

〔4〕 反応器

反応器はカラムから溶出した目的成分と反応液ポンプから送られてくる反応液とが加熱反応する箇所、反応コイルの標準は内径 0.25 mm、長さ 20 m のステンレスチューブを使用している。一般に反応は温度と時間に関係するため、反応温度は室温から 150°C まで任意に設定でき、また反応コイルは任意の長さのものが取り付けられるようになっている。但し反応コイルは試料を拡散し分離能を低下させる一因となるため、その拡散が無視できるような長さにする必要があろう。

〔5〕 検出器

反応型 HLC に使用される検出器は紫外可視波長可変流動光度計や、ケイ光光度計であり、検出器についての詳細な説明はすでにいろいろな成書¹⁾²⁾で紹介されているためここでは省略する。

HLC-805 に採用している検出器は可視波長可変流動光度計 (350~900 nm)、紫外可視波長可変流動光度計 (190~700 nm) および、ケイ光光度計 (励起波長 190~700 nm) の三種で、目的に適した検出器を選択するようにしている。

4. 反応型 HLC の応用

〔1〕 アミノ酸分析

アミノ酸分析は、1958年 S. Moore らによってイオン交換クロマトグラフィーによる自動分析がなされ³⁾、液体クロマトグラフが分析機器として初めて完成した。しかし、液体クロマトグラフィーは装置および充填剤の改良 (開発) により当初約 22 時間要していたアミノ酸分析 (タン白質構成アミノ酸約 20 種) も現在では 1 時間以内で分析できるようになってきた。

(1) アミノ酸の検出方法

アミノ酸の検出方法には、ニンヒドリン、o-フタルアルデヒド、フロレッサミンの反応試薬を使って反応させ、その生成物を可視、あるいはケイ光光度計で測定する三種類がある。Table 2 に各検出法の特徴を示す。

Table 2 The Detection Techniques for Amino Acid Analysis

Reagent	Nirhydrin	o-Phthalaldehyde	Fluorescamine
Detector	Visible	Fluorescence	Fluorescence
Wavelength	-NH ₂ : 570nm -NRH : 440nm	E _x : 360nm E _m : 450 nm	E _x : 390 nm E _m : 475 nm
Optimum pH	pH : 5.5 Acetate	pH : 9.7 Borate	pH : 9~10 Borate
Reaction Temp	100°C	RT~70°C	RT~60°C
Reaction Time	10~20 min	50 msec.	30 sec.
Detectable Amine	Primary and Secondary amines	Primary amines	Primary amines (Secondary amines)
Sensitivity	Poor	Good	Good
Stability of Reagent	Poor	Good	Poor

1) ニンヒドリン法⁴⁾

アミノ酸分析に広く用いられているのがニンヒドリン法で、Fig. 2 にニンヒドリンとアミノ酸の反応式を示す。

ニンヒドリンと 1 級アミン (-NH₂) の反応生成物は 570 nm に極大吸収をもつが、2 級アミン (-NRH) では 440 nm で検出される。

Fig. 3 はタン白質構成アミノ酸の測定例で、Fig. 4

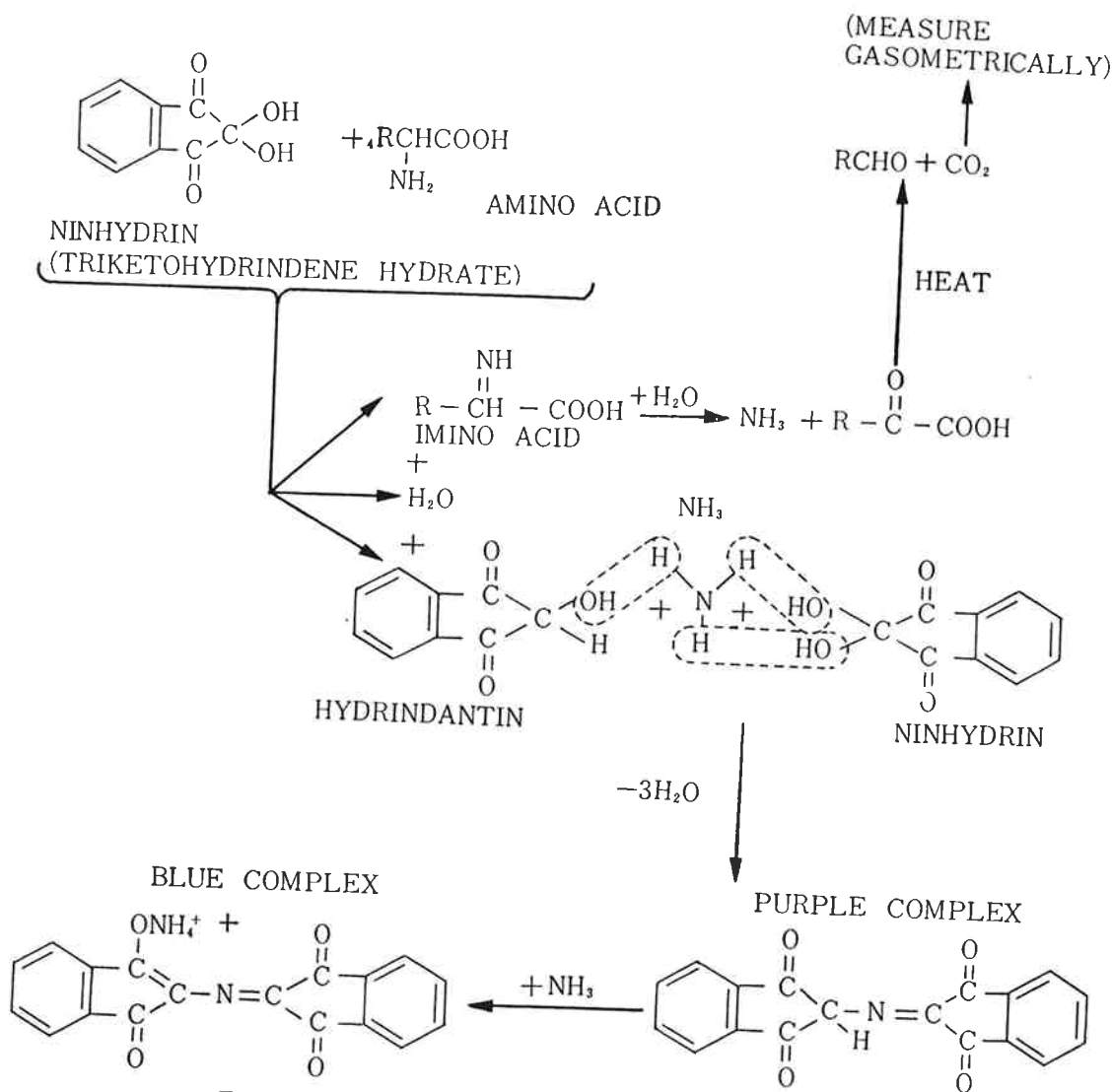


Fig. 2 The Reaction of Ninhydrin with Primary Amines

は、標準アミノ酸とヘキソサミンの分離例である。

アミノ酸分析の応用例として、酵素反応過程の酵素の定量を行なった例を紹介する。反応液中の酵素量が微量のため、酵素を塩酸で加水分解してアミノ酸とした後、酵素量を計算した。Fig. 5はサーモアゼの加水分解物のクロマトグラムである。反応液中には、多量のアスパラギン酸とフェニルアラニンが含まれているため、両者の影響を受けないアミノ酸を選択する必要がある。Fig. 6は反応液の加水分解物のクロマトグラムである。Fig. 5との比較からグリシンが定量に適していることがわかった。グリシンの定量値から酵素の量が計算できる。ニンヒドリン法でも数百ピコモルまでは充分定量可能であることがわかった。

2) o-フタルアルデヒド法⁵⁾

ニンヒドリン法にくらべて感度が高いため、臨床関係を中心に今後の発展が期待できる。反応速度が速いため

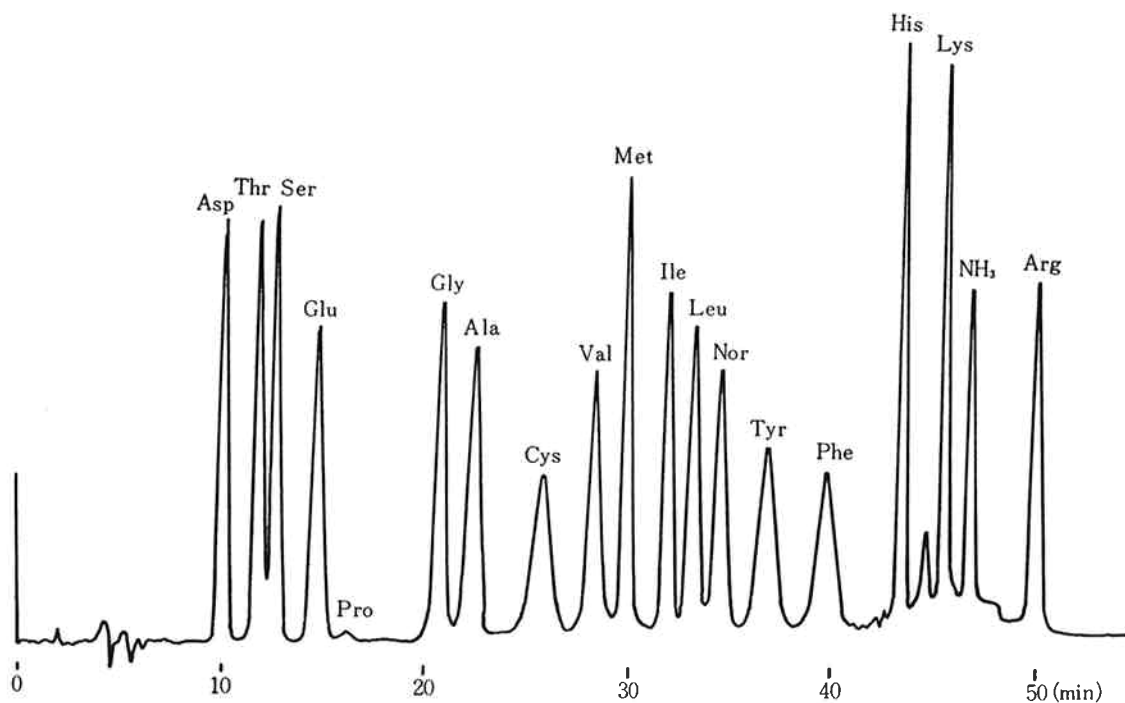
反応コイルを短くでき若干分離が向上する。HLC-805ではケイ光検出器を使用することによりただちに応用できる。応用例として、人血清の除タン白法の検討をo-フタルアルデヒド法により行なったクロマトグラムをFig. 7, 8に示す。Fig. 9にはペプチドの測定例を示す。

3) フロレッサミン法⁶⁾

フロレッサミンは水で分解されるため、三種の反応液を使用しなければならない。そのため反応液ポンプが2台必要となる。HLC-805でも採用できるが、アミノ酸分析に関しては他の二法にくらべて特にメリットは見当たらない。

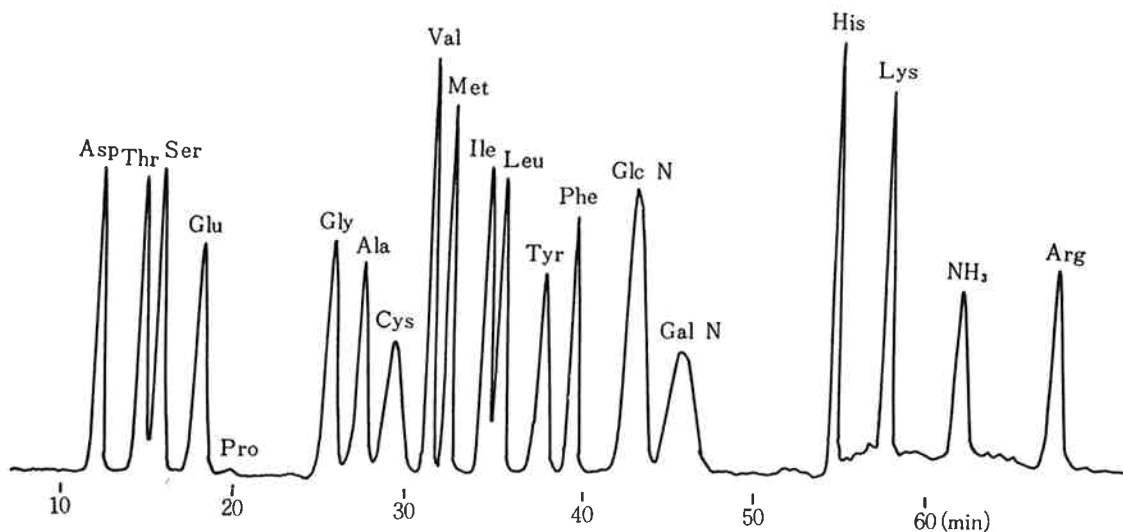
〔2〕糖の分析

糖類の分離には、古くはデンプンを使用し、水-ブタノール-プロパノールを展開液としたカラムクロマトグラフィーで分離した報告⁷⁾や、ホウ酸の錯体としイオン交換クロマトグラフィーで分離する方法⁸⁾などがある。



Column : IEX-215SC 4 mmI. D. × 15 cm
 Eluent : Citrate
 Flow Rate : 0.6 ml/min
 Detector : VIS 570 nm

Fig. 3 The Separation of Standard Amino Acids Mixture



Column : IEX-215SC 4 mmI. D. × 15 cm
 Eluent : Citrate
 Flow Rate : 0.6 ml/min
 Detector : VIS 570 nm

Fig. 4 The Separation of Amino Acids and Hexosamines

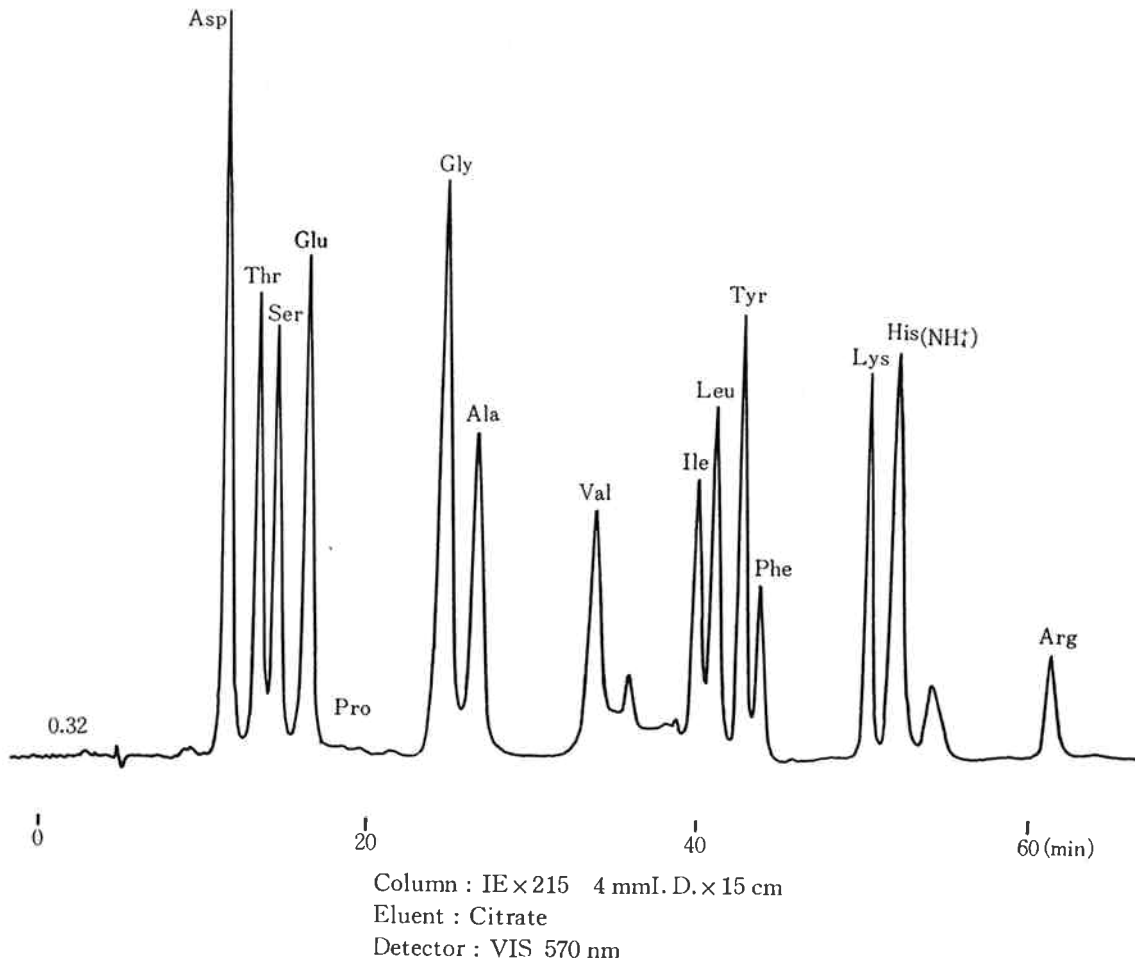
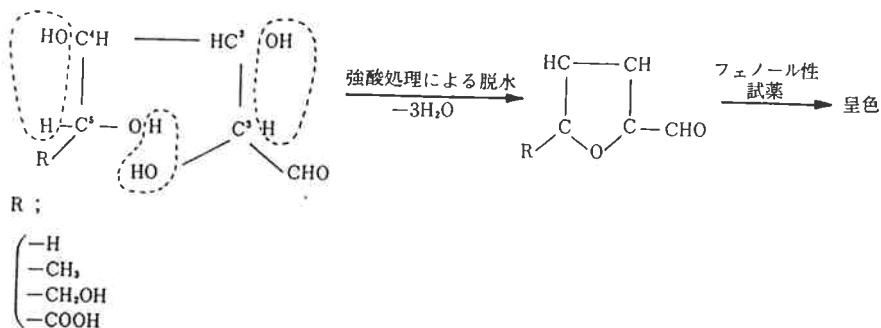


Fig. 5 The Chromatogram of the Thermoase Hydrolysate

また検出法としては糖自体を検出する方法（示差屈折計など）や反応により発色させて検出する方法があるが、ここでは HLC-805 を用い後者の方法で測定した応用例を記す。

1) 硫酸オルシン法⁹⁾
 一般原理は次の通りで、糖を強酸処理し脱水させ、フェノール性試薬を加えて呈色させる方法である。



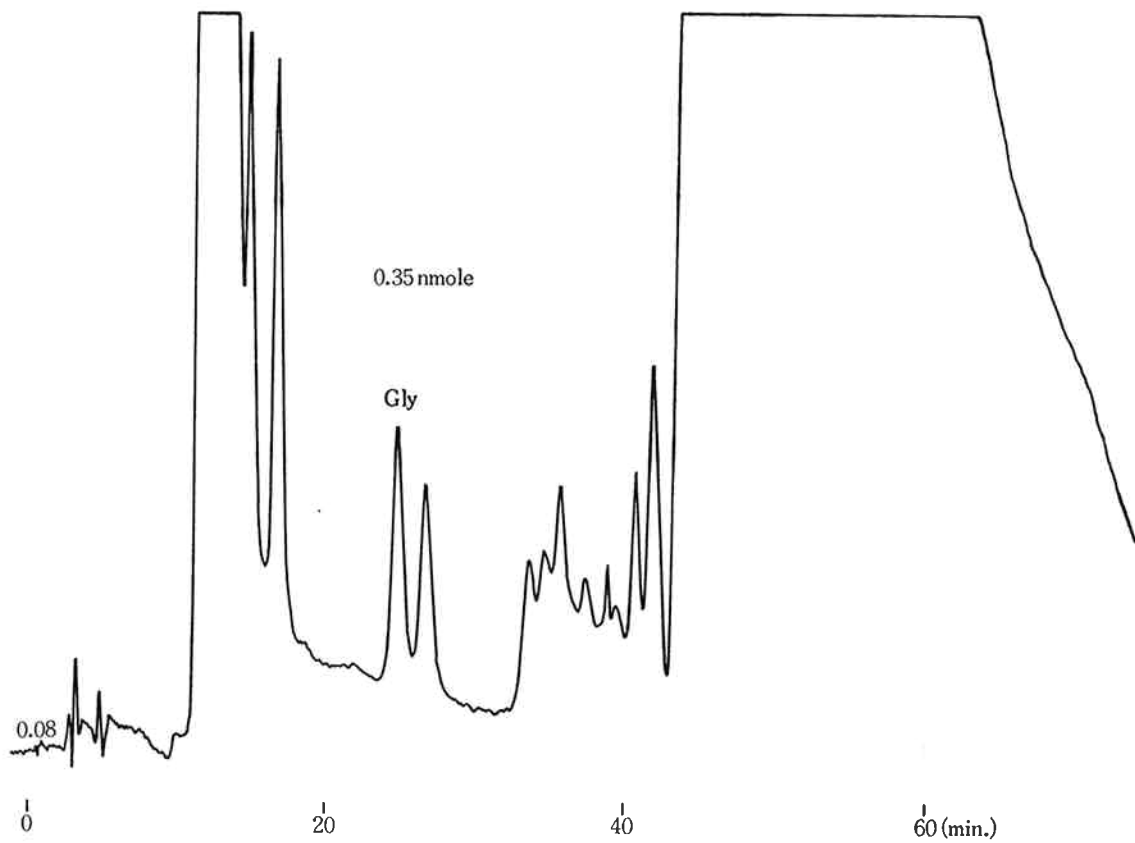
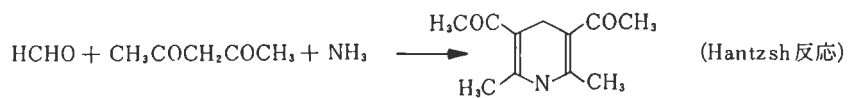


Fig. 6 The Chromatogram of the Enzyme Reaction Product
(Operating Condition is same as Fig. 5)

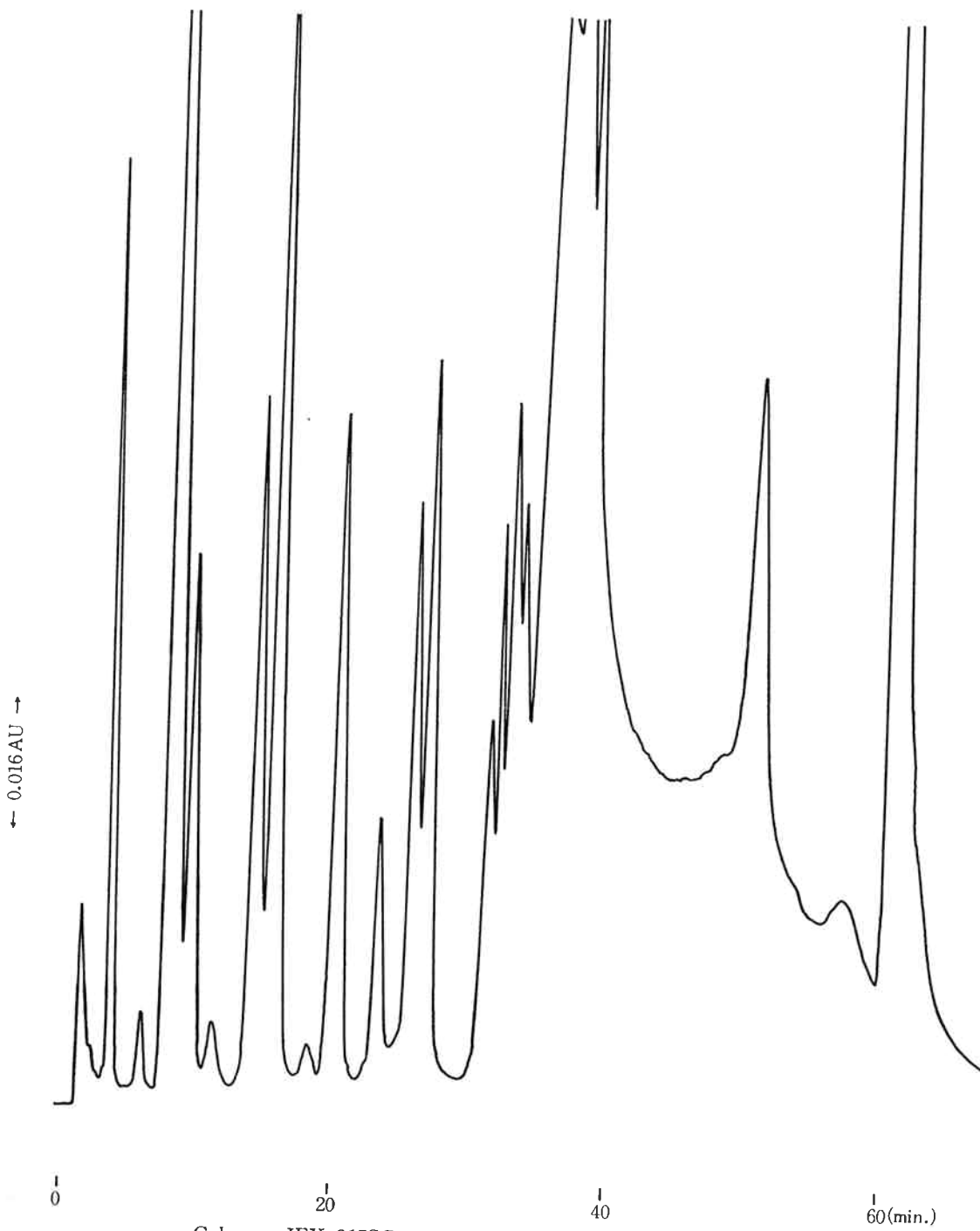
反応生成物は 425 nm に吸収極大をもつ物質となる。
この方法は濃硫酸を使用するため反応系を耐蝕性のある
ものとしなければならないため、装置は一般に高価となる。
Fig. 10 に HLC-805 で測定した単糖類および二糖
類の分離例を示す。

2) 過ヨウ素酸分解法¹⁰⁾

一般原理は次の通りで、過ヨウ素酸を加えることによ
りアルデヒドを生じるので、アルデヒドに分解する試料
においても応用できる。



$\lambda(\text{A})_{\text{max}} : 420\text{nm}$ $\lambda(\text{E})_{\text{max}} : 480\text{nm}$



Column : IEX-215SC 4 mm I. D. × 20 cm
Eluent : Citrate
Detector : Fluorescence $E_x = 360 \text{ nm}$
 $E_m \geq 420$

Fig. 7 The Chromatogram of the Serum

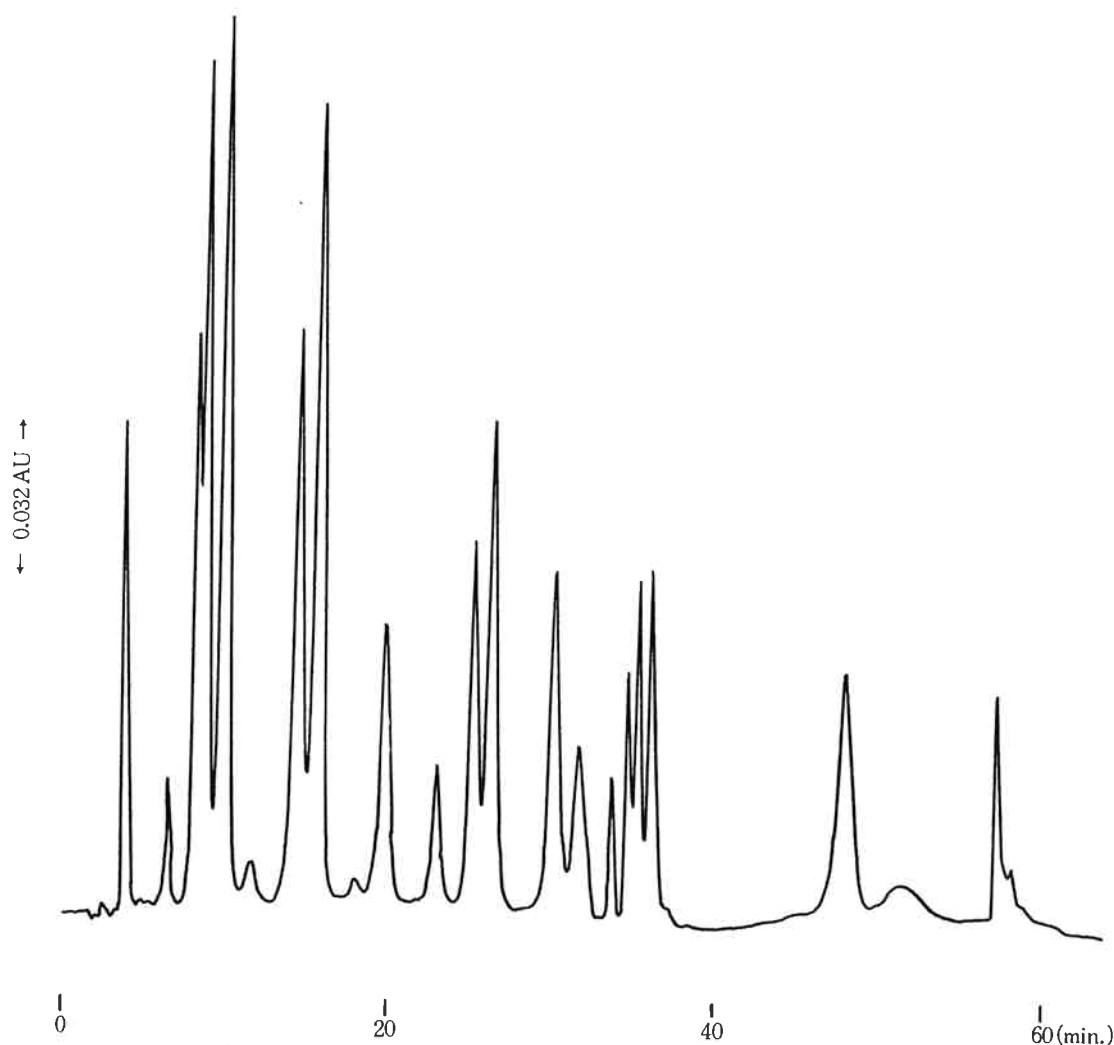


Fig. 8 The Chromatogram of the Serum Extracted with TCA
(The operating condition is the same as Fig. 7)

反応生成物はケイ光物質となる。Fig. 11 に単糖類の分離例を示す。

3) テトラゾリウムブルー法¹¹⁾

一般原理は次の通りで、テトラゾリウムブルーの環元

反応を利用するもので、糖以外の環元性物質の測定に応用できる。前述の二法は水溶液系で測定できるが、この方法では反応生成物が水に溶解しないため、溶離液に有機溶媒系を用いる必要がある。

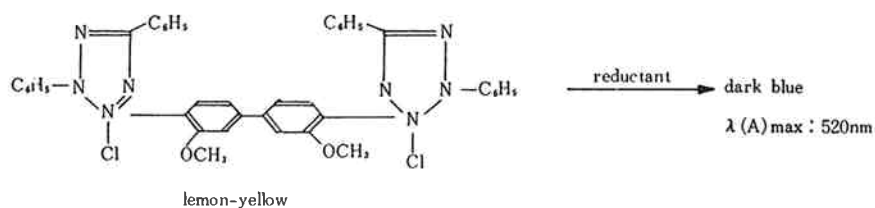
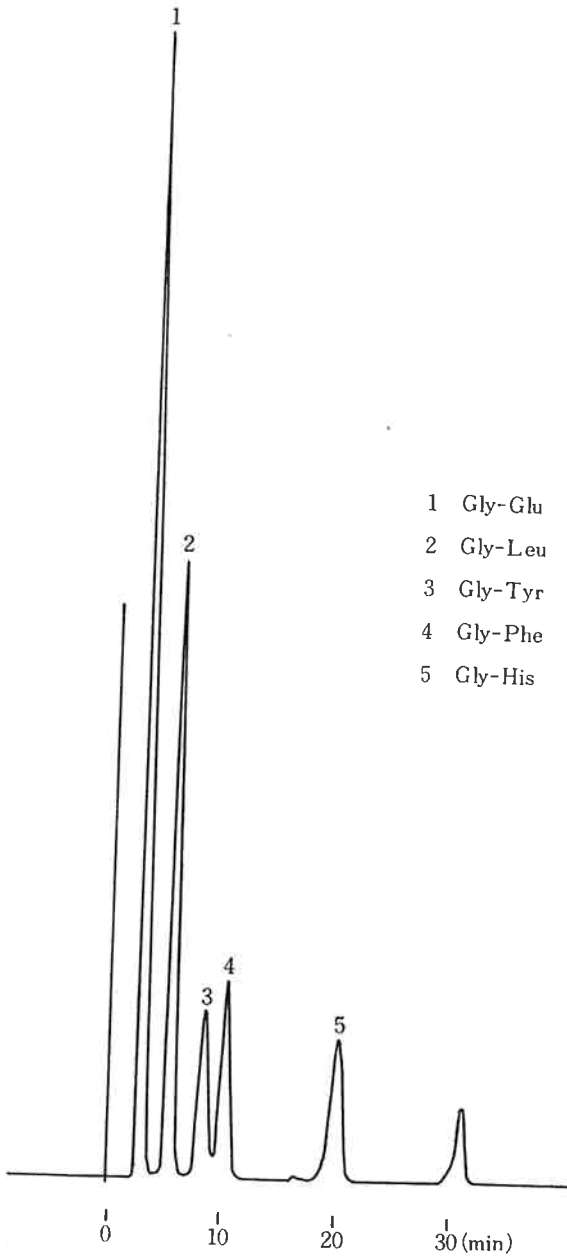


Fig. 12, 13 に単糖類およびオリゴ糖の分離例を示す。RI (示差屈折計) 検出器で糖自体を測定するより約 100 倍感度が高い。

このように糖においても反応型 HLC を反応することにより選択的検出および微量検出が行なえる。

[3] カテコールアミンの分析

HLC におけるカテコールアミンの分析は、最近、新しい検出器(電気化学検出器)¹²⁾が開発されたので、反応型はあまり重要視されないが、HLC-805 によっても検出可能である。反応法には、o-フタルアルデヒド法、THI (Nメチル3, 5, 6-トリヒドロキシインドール)法、ED (エチレンジアミン) 法があるが、ここでは o-フタ

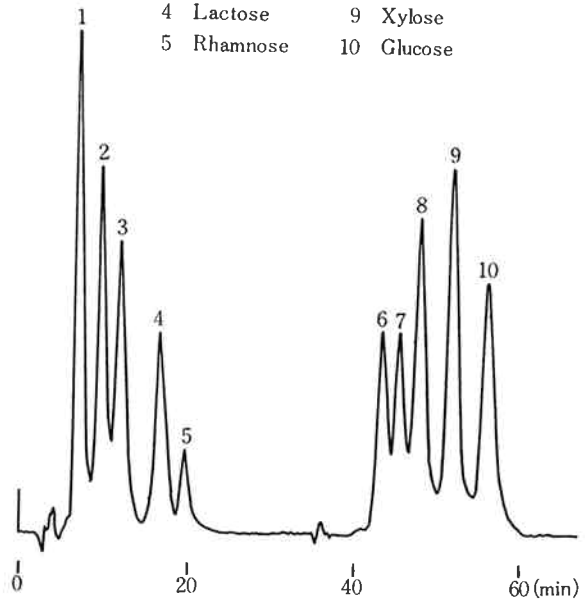


- 1 Gly-Glu
- 2 Gly-Leu
- 3 Gly-Tyr
- 4 Gly-Phe
- 5 Gly-His

Column : IEX-215 4 mmI. D. × 15 cm
 Eluent : Citrate
 Detector : Fluorescence
 $E_x = 360 \text{ nm}$ $E_m \geq 420 \text{ nm}$

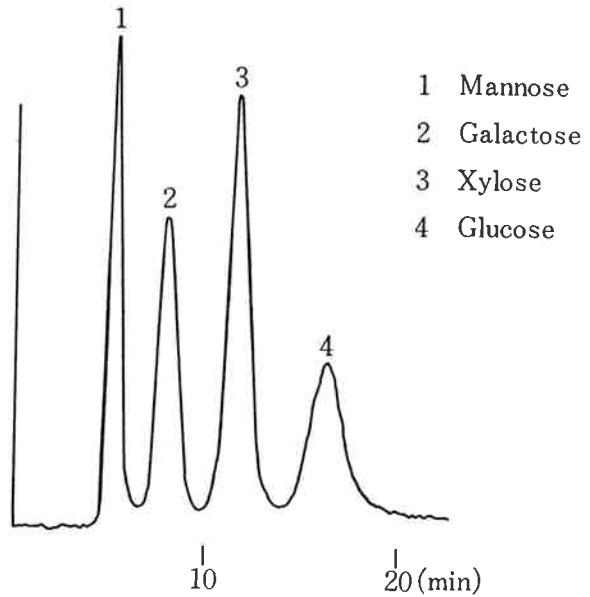
Fig. 9 The Separation of the Peptides

- 1 Sucrose
- 2 Cellobiose
- 3 Maltose
- 4 Lactose
- 5 Rhamnose
- 6 Mannose
- 7 Fructose
- 8 Galactose
- 9 Xylose
- 10 Glucose



Column : IEX-220SA 4 mmI. D. × 10 cm
 Eluent : Borate
 Detector : VIS 440 nm

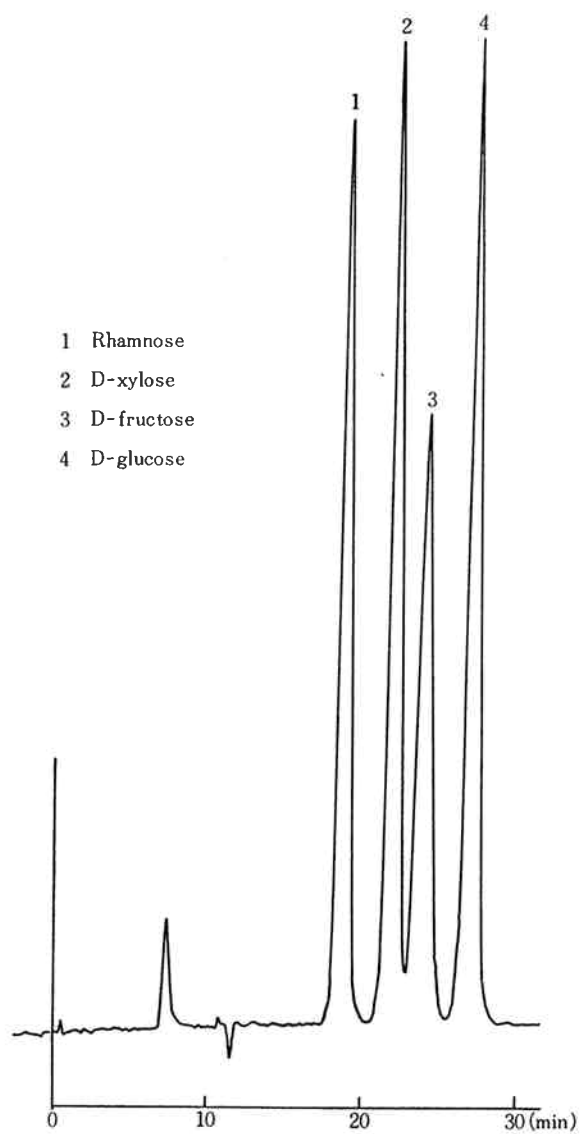
Fig. 10 The Separation of the Carbohydrates (Orcinol Method)



- 1 Mannose
- 2 Galactose
- 3 Xylose
- 4 Glucose

Column : IEX-220SA 4 mmI. D. × 15 cm
 Eluent : Borate
 Detector : VIS 410 nm

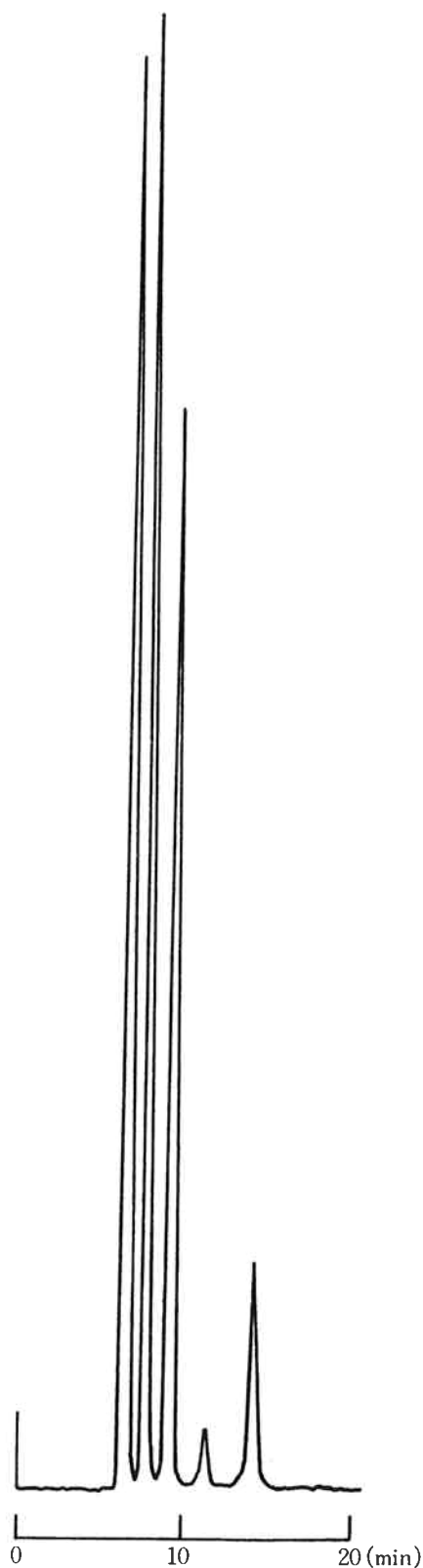
Fig. 11 The Separation of the Carbohydrates (Periodide Method)



- 1 Rhamnose
- 2 D-xylose
- 3 D-fructose
- 4 D-glucose

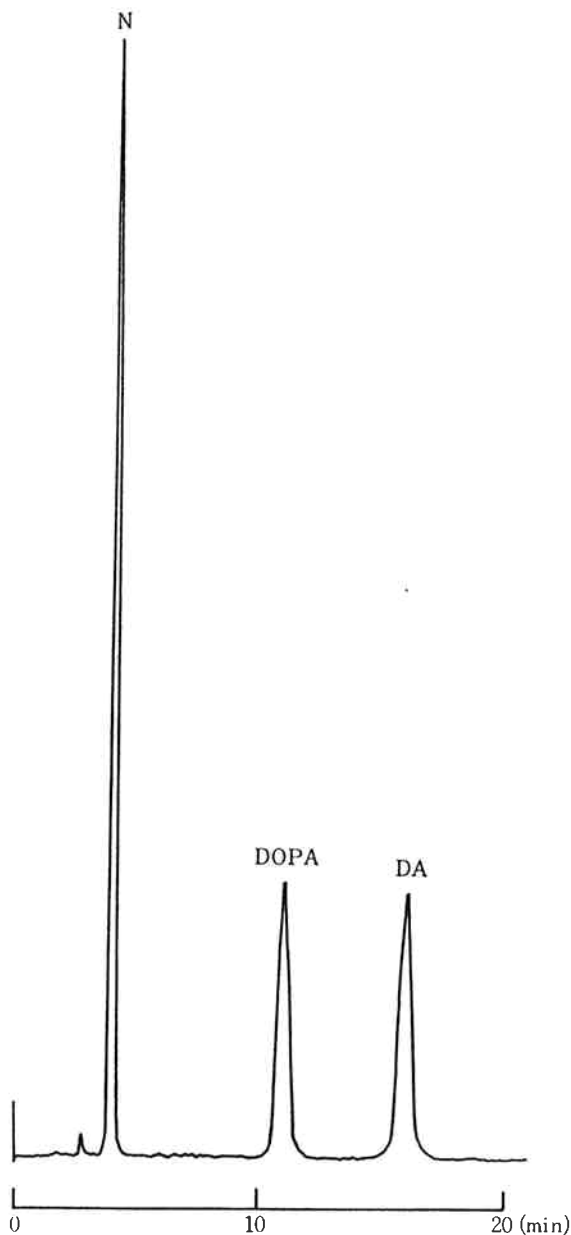
Column : LS-170STARCH 7.5 mm I. D. × 30 cm
 Eluent : Acetonitrile/H₂O : 8/2
 Flow Rate : 1.0 ml/min

Fig. 12 The Separation of the Carbohydrates (TZB Method)



Column : LS-310SIL 4 mm I. D. × 30 cm
 Detector : VIS 520 nm
 Eluent : Acetonitrile/H₂O : 8/2

Fig. 13 The Separation of the Oligosaccharide (TZB Method)



Column : LS-4100DS SIL 4 mm I. D. × 30 cm
 Eluent : Phosphate
 Detector : Fluorescence $E_x = 360 \text{ nm}$ $E_m \geq 460 \text{ nm}$

Fig. 14 The Separation of the Catecholamines

ルアルデヒド法による測定例を Fig. 14 に示す。エピネフリンは2級アミンのため検出できないが、その他のものは検出可能である。

5. おわりに

今回は、反応型 HLC 装置の開発にあたり、その製品の紹介と、応用の一部を述べたが、アミノ酸、糖分析のみならず、有機酸などについての応用も現在考えている。

反応型 HLC は、多くの成分を含む試料の中から特定の成分のみを検出するので解析が容易であり、今後適当な反応系を採用することにより、大幅に用途が伸びると期待される。

最後に本研究を遂行するにあたり装置製造元の旭計器工業(株)と、試料の提供および助言を頂いた当社第二研究室の諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 平田義正, 鷹野重威 監訳; “「高速液体クロマトグラフィー」, 講談社サイエンティフィック”, (1972).
- 2) 波多野博行編; “「応用 高速液体クロマトグラフィー」(化学の領域 増刊109)”, 南江堂, (1976).
- 3) D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore; *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
- 4) D. J. MacCaldin; *Chem. Rev.*, **60**, 39 (1960).
- 5) A. G. Georgiadis and J. W. Coffey; *Anal. Biochem.*, **56**, 121 (1973).
- 6) E. Lund, J. Thomson and K. Brunfeldt; *J. Chromatog.*, **130**, 51 (1977).
- 7) Gardell S.; *Acta. Chem. Scand.*, **7**, 201 (1953).
- 8) Y. Takata and G. Muto; *Anal. Chem.*, **45**, 1864 (1973).
- 9) J. Briickner; *Biochem. J.*, **60**, 200 (1955).
- 10) H. Cheu et al.; *Carbohydr. Res.*, **11**, 225 (1969).
- 11) K. Mopper and E. T. Degens; *Anal. Biochem.*, **45**, 147 (1972).
- 12) F. T. Kissinger et al.; *Anal. Lett.*, **6**, 465 (1973).