

# 逆相系高速液体クロマトグラフィ用充てん剤の開発

森 山 弘 之  
佐々木 正 明  
佐々木 博 朗

## New Reversed-Phase Columns for High Speed Liquid Chromatography

Hiroyuki MORIYAMA  
Masaaki SASAKI  
Hiroo SASAKI

One of the defects of chemically-bonded packings for reversed-phase chromatography is the presence of residual silanols which are responsible for unfavorable ionic interaction and hydrogen bonding. This makes it difficult to perform satisfactory reversed-phase chromatography of polar compounds such as peptides, proteins, polynucleotides, and polyphenolic compounds by the use of simple eluent systems.

Recently, we have developed two new reversed-phase packings, TSKgel ODS-120T and TSKgel TMS-250, in which the effect of residual silanols is minimized. These packings are found to be quite useful for the separation of peptides, proteins, and oligonucleotides. As compared to the conventional reversed-phase packings, they can be used with simpler eluent systems of lower ionic strength and higher pH. This is very important for preparative uses, because the recovery of pure sample from elution fractions becomes much easier. We report herein the characteristics of these new packings and several application data.

### 1. はじめに

近年、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) の中でも特に逆相系クロマトグラフィは、その適応範囲の広さと簡便さのために最も汎用されている分離手段であり、ニーズも多い。シリカゲルを基材とした逆相充てん剤は、ポーラスポリマー系充てん剤にみられるような使用溶媒による膨潤収縮もなく、高圧下、高速でのクロマトグラフィを可能にした。

しかしながら、化学結合型シリカ充てん剤の本来有するデメリットが、前述した価値をかなり低減しているのが現状である。すなわち

- (1) 残存シラノール基によるイオン作用
- (2) 使用 pH の制限

の2点である。

残存シラノール基はイオン性試料と相互作用し、ピー

ク形状に大きな影響を与え、クロマトグラムを複雑なものにしてしまう。特に分取クロマトグラフィを検討する場合、より単純な溶離液を選択できるという利点を有した残存シラノール基の少ない充てん剤が必要とされる。

そこで今回、残存シラノール基の影響を最小限に抑えた逆相系高速液体クロマトグラフィ用充てん剤 TSKgel ODS-120T 及び、TSKgel TMS-250 を開発したので、その特徴及び応用例について述べている。

### 2. 逆相用充てん剤の特徴

現在までに長短鎖の炭化水素基をシリカゲルに化学結合した逆相充てん剤は、各メーカーから多くの製品が市販されている<sup>1)</sup>が、シリカ基材の物性、シリル化剤の種類、結合技術等の相違により、その性質は千差万別である。ユーザーは、使用目的に合致した担体を選択する必要がある。最近の使用傾向として逆相充てん剤は、特に

生化学分野で広く使用されるに至っており、ペプチド<sup>2)~5)</sup>やタンパク質<sup>6)~10)</sup>核酸<sup>11)~15)</sup>等への応用が目立っている。

このような状況下において、残存シラノール基の影響を極小に抑えることによって、試料の回収率が高く、しかも高分子量試料の分離分析に適応する逆相充てん剤の開発が要求される。

今回開発した逆相充てん剤の特徴として、

- (1) 残存シラノール基の影響が最低レベルまで抑えられている。
  - (2) 基材孔径が一般充てん剤より大きく、微小細孔が少ない。
  - (3) 固定相が厚い (TSKgel ODS-120T)。
- が挙げられる。

固定相の残存シラノール基の影響を最小限に抑えることは、次のような利点を生み出す。すなわち、

- (1) イオン性物質の吸着・排除の除去
- (2) 単純な溶離液組成の選択
- (3) 長寿命

である。

### 3. グレードについて

開発した2グレードの充てん剤は、いずれもバルク及び、パッドカラムとして供給される (Table 1)。

TSKgel ODS-120T は、TSKgel Silica-150 にオクタデシルシランを化学結合し、更にトリメチルクロロシラン (TMSCl) でエンドキャップされた充てん剤で、粒径は 5  $\mu\text{m}$  及び 10  $\mu\text{m}$  がある。又、TSKgel TMS-250

Table 1 TSKgel Reversed-phase packing list

Grade	Particle size, $\mu\text{m}$	Functional group	Column size	End capping	Solvent	Bulk
TSKgel ODS-120T (New)	5	C18 (long chain)	4.6 mm $\times$ 25 cm	○	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O 7/3	10 g
	10					10 g
TSKgel TMS-250 (New)	10	C1 (short chain)	4.6 mm $\times$ 7.5 cm	○	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O 5/5	5 g
TSKgel ODS-120A	5	C18 (long chain)	4.6 mm $\times$ 25 cm	×	CH <sub>3</sub> OH/H <sub>2</sub> O 7/3	10 g
	10					10 g

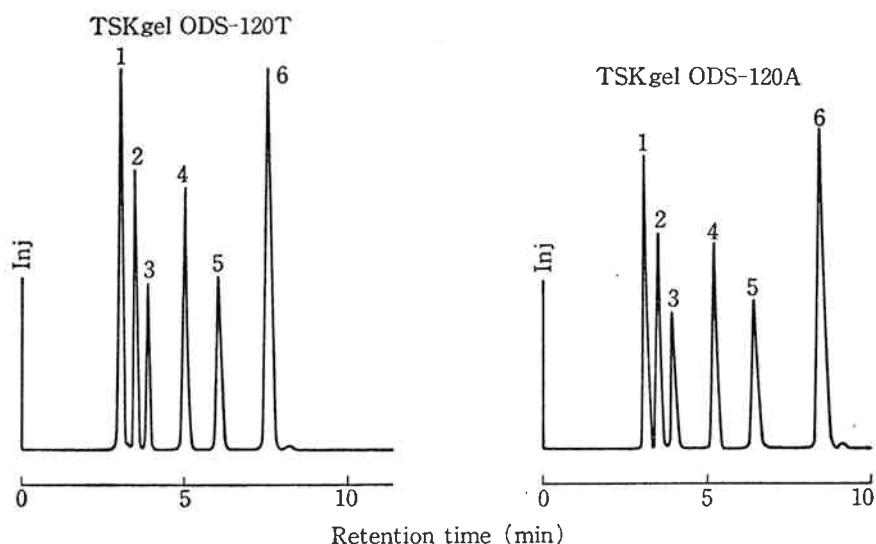


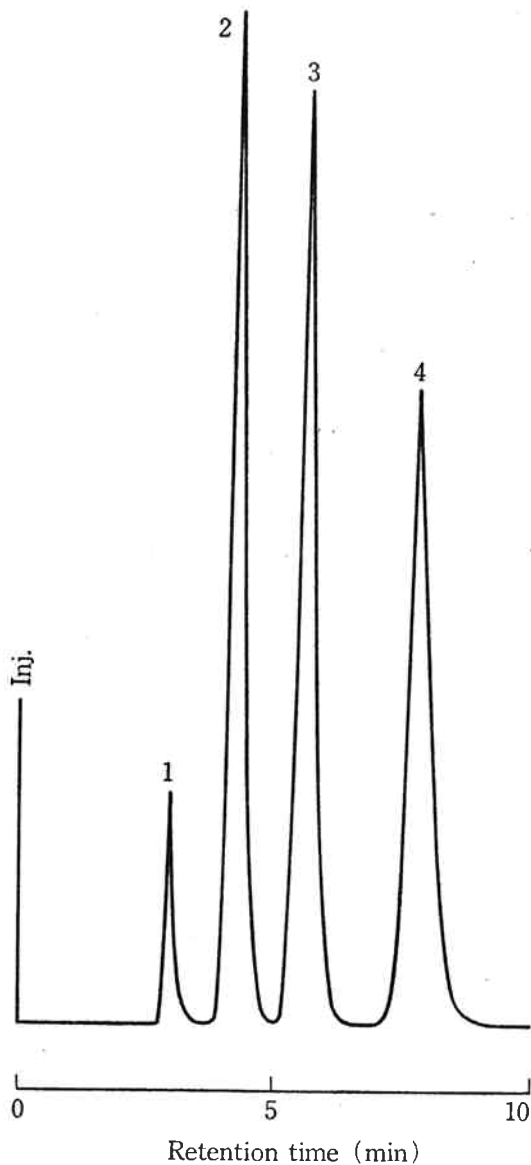
Fig. 1 Chromatogram of a mixture of aromatics  
Column: See in figure (4.6 mm  $\times$  25 cm, 5  $\mu\text{m}$ )  
Eluent: Methanol  
Flow rate: 1.0 ml/min  
Detector: UV (254 nm)  
Sample: 1. Phenol, 2. Benzene, 3. Naphtalene, 4. Anthracene,  
5. Pyrene, 6. Chrysene

は、TSKgel G3000SW の基材シリカゲルにジメチルシランを化学結合させ、更に TMSiCl でエンドキャップされた充てん剤で、粒径は  $10\ \mu\text{m}$  である。

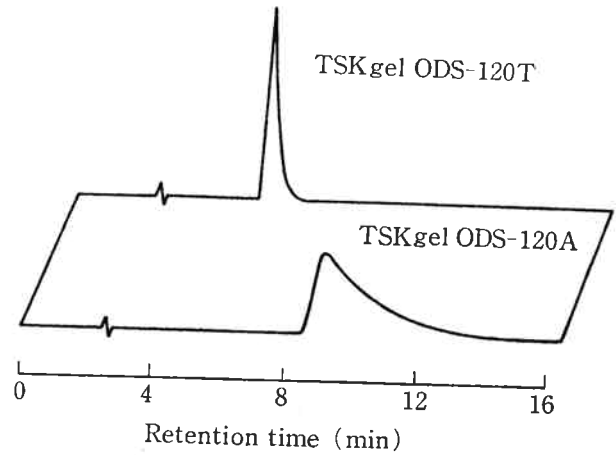
#### 4. 新規充てん剤の基本的性質

##### 〔1〕 非イオン性試料のクロマトグラフィ

非イオン性芳香化合物の TSKgel ODS-120T 及び、TSKgel ODS-120A を用いた分離例を Fig.1 に示す。いずれも同程度の分離を示しており、このような化合物



**Fig. 2** Chromatogram of p-Hydroxybenzoate  
Column: TSKgel TMS-250 (4.6 mm  $\times$  7.5 cm,  $10\ \mu\text{m}$ )  
Eluent: 50% Methanol in water  
Flow rate: 0.5 ml/min  
Detector: UV (254 nm)  
Sample: 1. phenol, 2. Ethyl p-hydroxybenzoate, 3. n-Propyl p-hydroxybenzoate, 4. n-Butyl p-hydroxybenzoate.



**Fig. 3** Chromatogram of trimethylbenzylammonium chloride on TSKgel ODS-120T and ODS-120A.

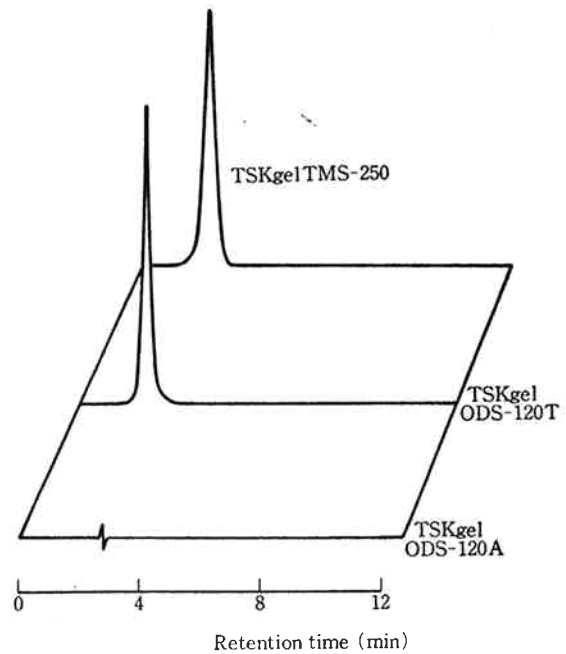
Column: TSKgel ODS-120T, ODS-120A (4.6 mm  $\times$  25 cm,  $5\ \mu\text{m}$ )

Eluent: 50 mM Phosphate buffer (pH6.0)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  = 90/10

Flow rate: 1.0 ml/min.

Detector: UV (254 nm)

Sample: Trimethylbenzylammonium chloride.

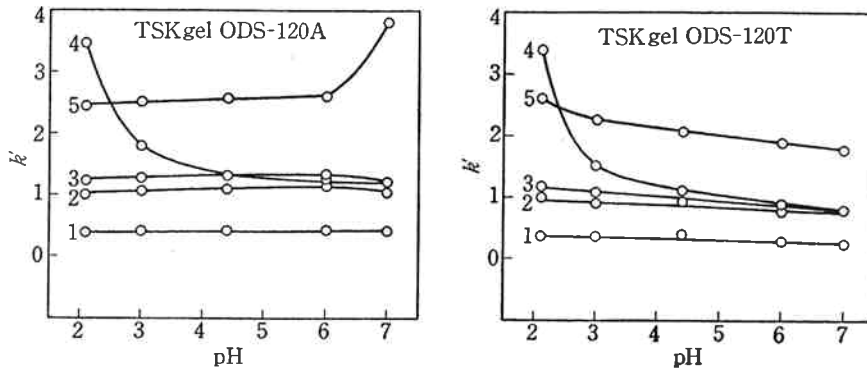


**Fig. 4** Chromatogram of 1-Methylnicotinamide chloride of TSKgel ODS-120T, ODS-120A and TSKgel TMS-250.

Eluent: 3% Methanol in water

Sample: 1-Methylnicotinamide chloride.

Other conditions as in Fig. 3.



**Fig. 5** Effect of pH of the mobile phase on the capacity factor of catecholamines.

Column: See in figure (4.6 mm × 25 cm, 5 $\mu$ )

Eluent: 0.1 M Phosphate buffer

Flow rate: 1 ml/min

Detector: UV (254 nm)

Sample: 1. Norepinephrine, 2. Epinephrine, 3. 3, 4-Dihydroxybenzylamine, 4. DL-DOPA, 5. Dopamine·HCl

の場合、充てん剤の炭素導入量が保持力を決定する。

又、TSKgel TMS-250 を用いた p-ヒドロキシ安息香酸エステル類の分離例を **Fig. 2** に示した。

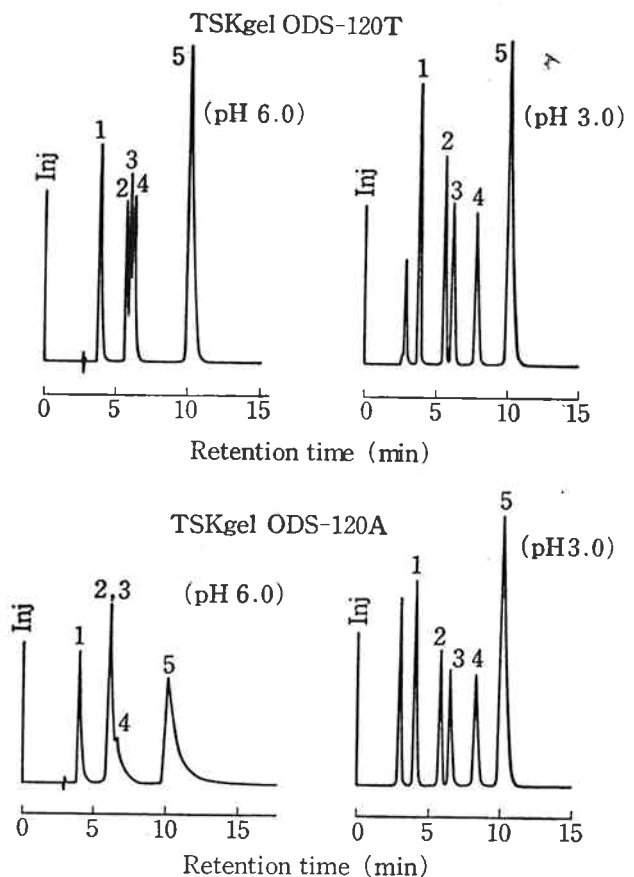
## [2] イオン性試料のクロマトグラフィ

前述したように、イオン性試料は化学結合型シリカの担体表面に残存するシラノール基のカチオン交換性のために、吸着或いはイオン排除され、歪んだピークを与える。このため、残存シラノール基の影響を最小限にする方法が提案されている<sup>(16)~(19)</sup>が、満足する結果は得られていないのが現状である。

充てん剤の残存シラノール基の量を評価する方法は未だ確立されていないが、クロマトグラムから定性的に知ることができる。**Fig. 3, 4** に示すように、陽イオン性の塩化1-メチルニコチンアミドや四級アンモニウム塩などは、残存シラノール基のために、TSKgel ODS-120A では溶出されなかったり、テーリングピークを与えることがわかる。しかし、独自の方法で最高にエンドキャップされた TSKgel ODS-120T 及び TSKgel TMS-250 では、正常ピークを与えている。ODS-120A で正常ピークを得るためには、低 pH 或いは NaCl, NaSO<sub>4</sub> 等の添加が必要であり、溶離液を複雑にする。

又、カテコールアミン類の保持係数  $k'$  の pH 変化による影響を **Fig. 5** に示した。陽イオン性のドーパミン塩酸塩のみ変化がみられるが、**Fig. 6** に示すように、TSKgel ODS-120A ではピークのテーリングが激しく、残存シラノール基の影響をうけていることがわかる。

**Fig. 7** にオリゴペプチド類の保持係数  $k'$  の pH の影響を示した。塩基性のアルギニンが Bradykinin では



**Fig. 6** Chromatogram of catecholamines under each pH on TSKgel ODS-120T and ODS-120A

Column: See in figure.

Eluent: 0.1 M Phosphate buffer (pH 6.0, 3.0)

Flow rate: 1.0 ml/min

Detector: UV (254 nm)

Sample: 1. Norepinephrine, 2. Epinephrine, 3. 3, 4-Dihydroxybenzylamine, 4. DL-DOPA, 5. Dopamine·HCl

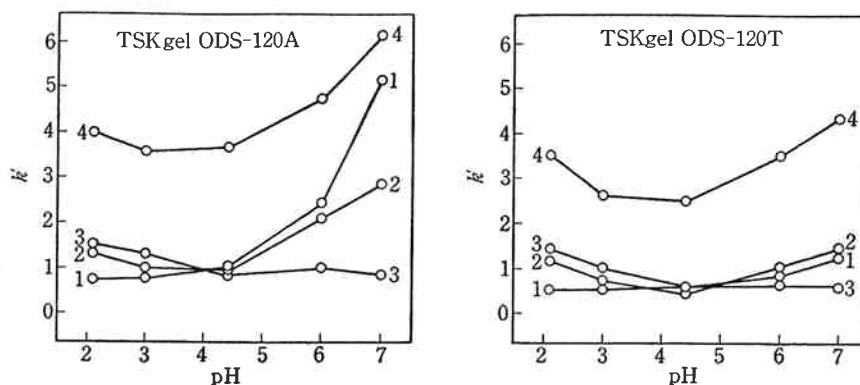


Fig. 7 Effect of pH of the mobile phase on the capacity factor of oligopeptides.

Column: TSKgel ODS-120T and ODS-120A, (4.6 mm × 25 cm)

Eluent: 50 mM Phosphate buffer/CH<sub>3</sub>CN=78/22

Flow rate: 1.0 ml/min

Detector: UV (220 nm)

Sample: 1. Bradykinin, 2. Angiotensin III, 3. Angiotensin II, 4. Angiotensin I

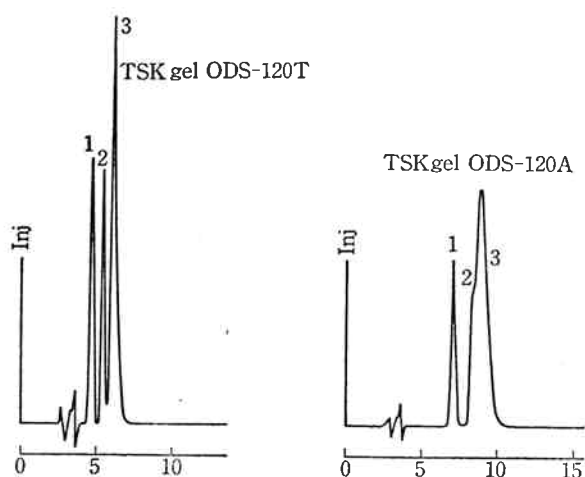


Fig. 8 Chromatogram of bradykinins

Column: See in figure.

Eluent: 0.05% TFAaq/CH<sub>3</sub>CN=8/2

Flow rate: 1.0 ml/min

Detector: UV (220 nm)

Sample: 1. Lys-Bradykinin, 2. Met-Lys-Bradykinin, 3. Bradykinin

両端に、又 Angiotensin III では片方に位置しているため、TSKgel ODS-120A では、pH に大きく依存している。Fig. 8 に示すように、Bradykinin 関連物質の分離においても、TSKgel ODS-120T では良好な結果を与えている。

##### 5. TSKgel ODS-120T と TMS-250について

TSKgel ODS-120T は、主としてペプチドや低分子量タンパク質までの分離を目的とした逆相充てん剤であるため、固定相を厚くし、かつ孔径は一般の ODS カラ

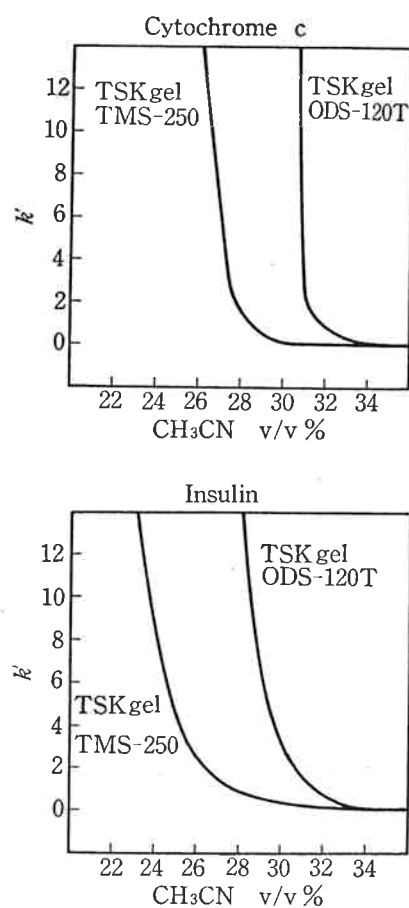


Fig. 9 Effect of Organic modifier concentration on the capacity factor of insulin and cytochrome c

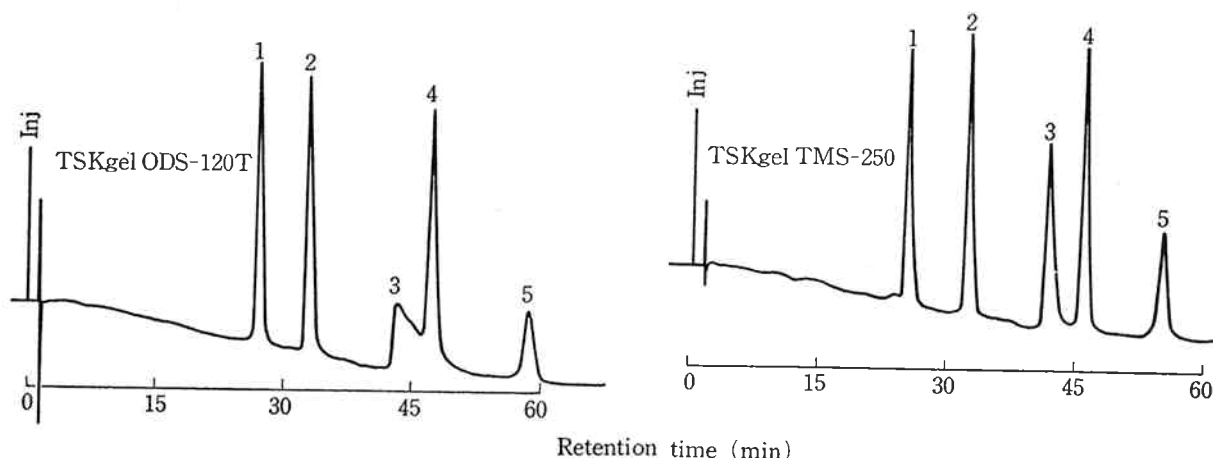
Column: See in figure

Eluent: 0.05% TFAaq/CH<sub>3</sub>CN

Flow rate: 1.0 ml/min

Detector: UV (220 nm)

Sample: See in figure each 10 μg.



**Fig.10** Comparison of elution profiles of protein mixture on TSKgel reversed-phase packings. Conditions: Column; See in Figure. (4.6 mm × 7.5 cm, 10 μm.)  
Eluent; 0.05% TFAaq (pH 2.23)/CH<sub>3</sub>CN, 90/10 → 50/50 60 min linear gradient.  
Flow rate: 1 ml/min.  
Sample; 1. Ribonuclease A, 2. Cytochrome c, 3. BSA, 4. Myoglobin, 5. Ovalbmin. Detector; UV (220 nm.).

ムに比べ大きく設計されている。しかしながら、ペプチドや特にタンパク質は有機溶媒に対して変性しやすく、可能な限り有機溶媒を減らし、かつ分離がよく、残存シラノール基の少ない逆相充填剤が必要となる。

これらの諸条件を満足する逆相カラムが、中分子量タンパク質までの分離を目的とした TSKgel TMS-250 である。Fig. 9 に、有機溶媒量変化による Insulin, Cytochrome c の保持係数  $k'$  への影響を示した。TSKgel ODS-120T と TSKgel TMS-250 を比較した場合、後者でかなり有機溶媒量を減らすことができることがわかる。

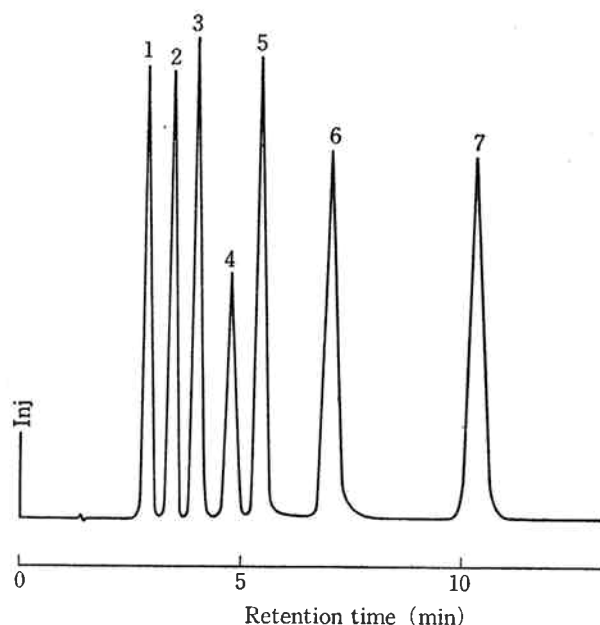
又、Fig.10 は孔径の分離に及ぼす影響を示したクロマトグラムである。TSKgel ODS-120T の場合、分子量 68,000 の牛血清アルブミンは、孔径の中に入りきれずテーリングピークを与えるのに対し、TMS-250 では正常に溶出している。

## 6. 応 用 例

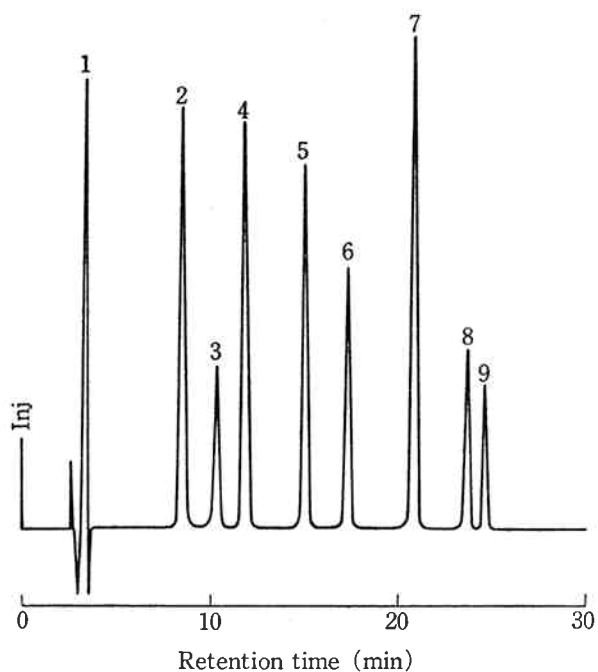
### 〔1〕 TSKgel ODS-120T

Fig.11 にジペプチド類の測定例を示した。又、オリゴペプチドからポリペプチド類のグラジエント溶出法によるクロマトグラムを Fig.12 に示した。

Fig.13 は、ステップワイズグラジエント溶出法を用いたオリゴデオキシリボ核酸の分離例である。核酸関連物質の RP-HPLC による分析例は、最近散見されるようになったもので、解析手段として期待されている。



**Fig.11** Separation of dipeptides  
Column: TSKgel ODS-120T (4.6 mm × 25 cm, 10 μm)  
Eluent: 20% Methanol in water  
Detector: UV (210 nm)  
Flow rate: 1.0 ml/min  
Sample: 1. Alanyl-valine 2. Leucyl-alanine, 3. Alanyl-leucine, 4. Alanyl-phenylalanine, 5. Phenylalanyl-glycine 6. Tyrosyl-leucine, 7. Valyl-phenylalanine



**Fig.12** Separation a mixture of peptides on TSKgel ODS-120T

Column: TSKgel ODS-120T (4.6 mm × 25 cm, 10 μm)

Eluent: (A) 20% CH<sub>3</sub>CN in 0.05% TFAaq

(B) 50% CH<sub>3</sub>CN in 0.05% TFAaq

From (A) to (B) in 60 min linear gradient

Flow rate: 1.0 ml/min.

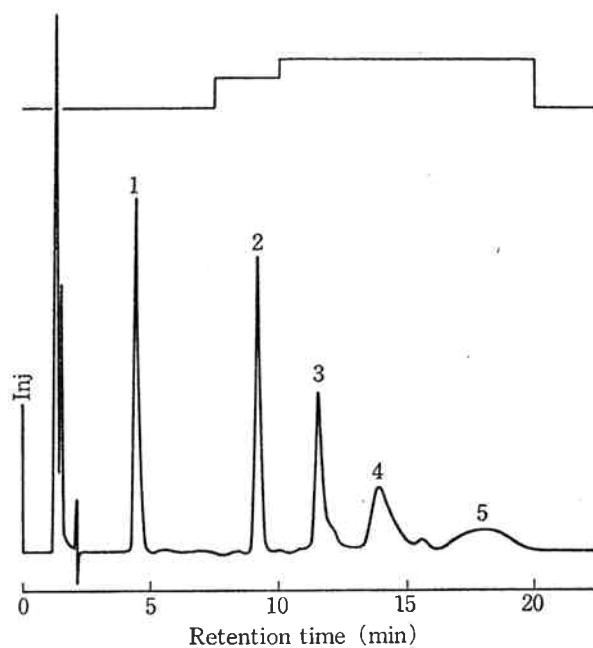
Detector: UV(220 nm)

Sample: 1. TRH 2. LH-RH 3. α-Endorphin

4. Angiotensin II 5. Angiotensin I

6. Substance P 7. Somatostatin

8. β-Endorphin 9. Human calcitonin



**Fig.13** Separation of a mixture of oligodeoxynucleotides on TSKgel ODS-120T with stepwise gradient.

Column: TSKgel ODS-120T (4.6 mm × 25 cm, 5 μm)

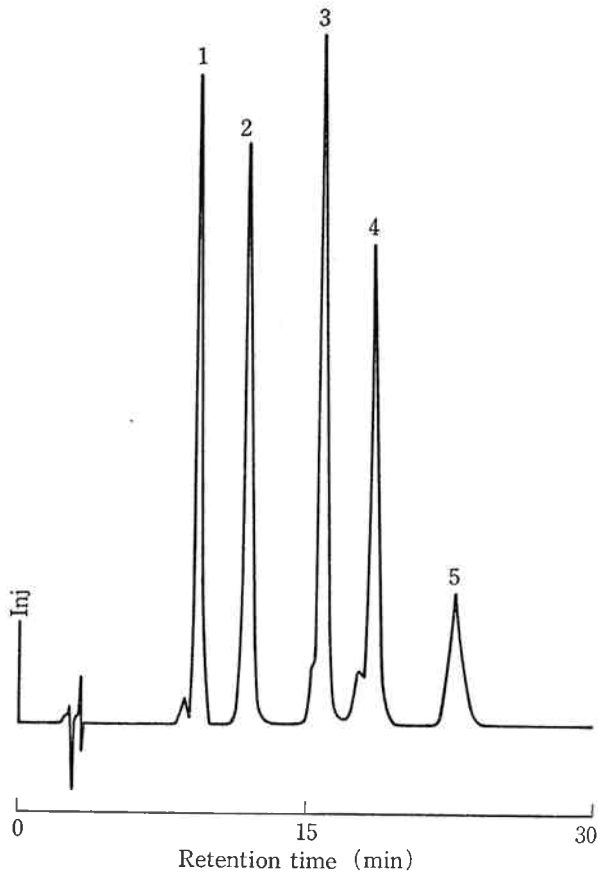
Eluent: 5% CH<sub>3</sub>CN 5 min, 6% CH<sub>3</sub>CN 8 min, 6.5% CH<sub>3</sub>CN 20 min, 5% CH<sub>3</sub>CN in 25 mM Phosphate buffer (pH 6.9)

Flow rate: 1.0 ml/min

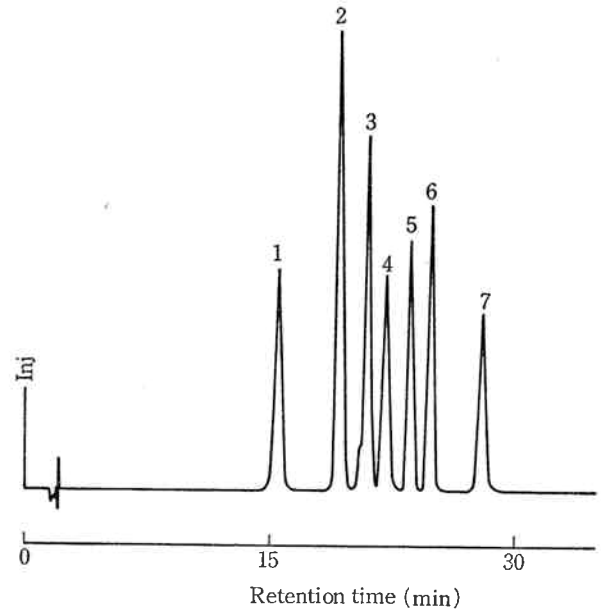
Detector: UV (260 nm)

Sample: 1. p(dA)<sub>4</sub> 2. p(dA)<sub>8</sub> 3. p(dA)<sub>12</sub>

4. p(dA)<sub>16</sub> 5. p(dA)<sub>20</sub> each ca. 1 μg



**Fig.14** Separation of protein mixture  
 Column: TSKgel ODS-120T (4.6 mm × 25 cm)  
 Eluent: (A) 20% CH<sub>3</sub>CN in 0.05% TFAaq (pH 2.22)  
 (B) 95% CH<sub>3</sub>CN in 0.05% TFAaq (pH 2.22)  
 From (A) to (B) in 50 min Linear gradient  
 Detector: UV (220 nm)  
 Flow rate: 1.20 ml/min  
 Sample: 1. Ribonuclease A, 2. Cytochrome c,  
 3. Lysozyme, 4. α-Chymotrypsinogen A,  
 5. Ovalbumin (each 5 μg)



**Fig.15** Separation of a mixture of proteins on TSKgel TMS-250.

Column: TSKgel TMS-250 (4.6 mm × 7.5 cm)

Eluent: (A) 20% CH<sub>3</sub>CN in 0.05% TFAaq

(B) 95% CH<sub>3</sub>CN in 0.05% TFAaq

From (A) to (B) in 60 min linear gradient.

Flow rate: 0.61 ml/min

Detector: UV (220 nm)

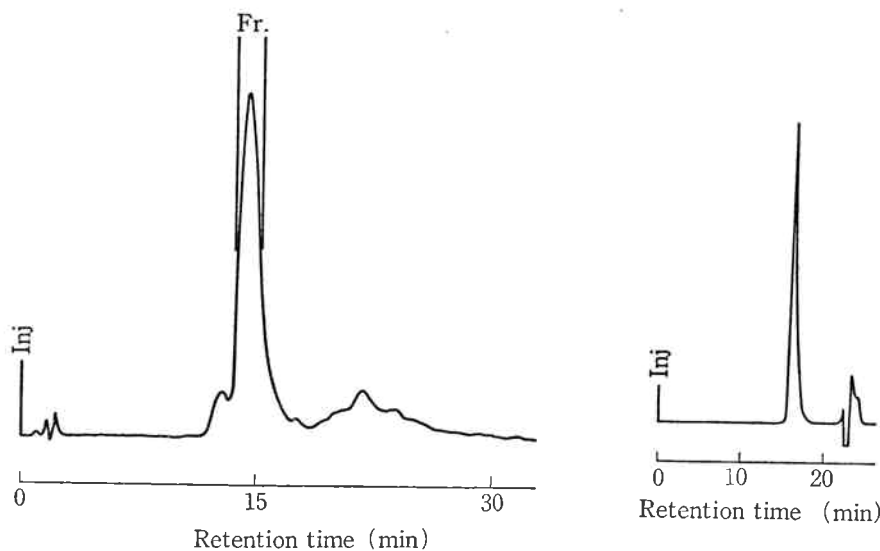
Sample: Each 5 μg. 1. Ribonuclease A

2. Cytochrome c 3. Lysozyme 4. BSA

5. Aldolase 6. Carbonic anhydrase

7. Ovalbumin





**Fig.16** Separation of human serum  
 Column: TSKgel TMS-250 (4.6 mm×7.5 cm)  
 Eluent: (A) 30% CH<sub>3</sub>CN in 0.05% TFAaq (pH 2.22)  
 (B) 95% CH<sub>3</sub>CN in 0.05% TFAaq (pH 2.22)  
 from (A) to (B) in 80 min Linear gradient  
 Flow rate: 0.61ml/min  
 Detector: UV (220 nm)  
 Injection volume: 20 μl (total protein 150 μg)

GFC of the fraction  
 column: TSKgel G3000SW (7.5mm×60cm)  
 Eluent: 20mM Acetate buffer (pH5.85)+0.15M NaCl  
 Flow rate: 0.5 ml/min  
 Detector : UV (220 nm)  
 Injection Volume: 100 μl

**Table 2** Recovery of proteins on TSKgel TMS-250

Sample loading	Cytochrome c	BSA	Ovalbumin
50 μg	93%	103%	81%
25 μg	97	103	81
10 μg	99	98	85
2 μg	99	104	86

**Conditions**

Column: TSKgel TMS-250 (4.6 mm×7.5 cm)  
 Eluent: 0.05% TFAaq/CH<sub>3</sub>CN  
 80/20→5/95 60 min Linear gradient.  
 Flow rate: 0.5 ml/min

標準タンパク質の測定例を Fig.14 に示した。

**[2] TSKgel TMS-250**

Fig.15 は、中分子量タンパク質を含む標準タンパク質の測定例である。単純な溶離液で、しかも Table 2 に示すように高いタンパク質の回収率を与えることがわかる。

人血清のクロマトグラムを Fig.15 に示した。フラクション部の TSKgel G3000SW を用いたゲルろ過クロマトグラフィの結果、アルブミンピークであることがわかった。

**7. おわりに**

新規逆相系充てん剤の特徴、及び応用例について紹介した。これらの化学結合型逆相充てん剤は、弱点である残存シラノール基のクロマトグラムへの影響を、独自のエンドキャップ技術によって極小に抑えたものである。この結果、ペプチドやタンパク質の分析に適し、高い回収率を与えるカラムであることがわかった。この様に従来の逆相カラムに比べ、その適応範囲が拡張でき、更に幅広い試料の分析を包括するグレードのラインアップが達成できた。

今後、これらの逆相充てん剤の特徴を生かした分取クロマトグラフィへの展開が期待される。

**文 献**

- 1) R. E. Majors; *J. Chromatogr. Sci.*, 18 (10), 488 (1980).
- 2) C. T. Wehr, et al; *ibid.*, 20, 114 (1982).
- 3) 奥山典生, 他; “バイオメディカルクロマトグラフィ第2集”, 南江堂, 57 (1982).
- 4) M. J. O'Hare, et al; *J. Chromatogr.*, 171, 209 (1979).
- 5) S. Terabe, et al; *ibid.*, 172, 163 (1979).

- 6) R. V. Lewis, et al; *Anal. Biochem.*, **104**, 153 (1980).
- 7) K. J. Wilson, et al; *J. Chromatogr.*, **237**, 107 (1982).
- 8) R. V. Lewis, et al; *J. Liq. Chromatogr.*, **5** (7), 1367 (1982).
- 9) W. C. Mahoney, et al; *Biochem. Biophys. Acta*, **704**, 284 (1982).
- 10) E. C. Nice, et al; *J. Chromatogr.*, **218**, 569 (1981).
- 11) L. W. Mclaughlin, et al; *Anal. Biochem.*, **124**, 37 (1982).
- 12) P. J. Cayley, et al; *J. Liq. Chromatogr.*, **5** (11), 2027 (1982).
- 13) R. W. Zumwalt, et al; *J. Liq. Chromatogr.*, **5** (11), 2041 (1982).
- 14) H. G. Khorana, et al; *Biochemistry*, **17** (7), 1257 (1978).
- 15) L. W. Mclaughlin, et al; *J. Chromatogr.*, **257**, 305 (1983).
- 16) C. Dewaele, et al; *J. HRC & CC*, **5**, 616 (1982).
- 17) N. H. C. Cooke, et al; *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 512 (1980).
- 18) M. Gazdag, et al; *ibid.*, **218**, 603 (1981).
- 19) G. Szepes, et al; *ibid.*, **218**, 597 (1981).