

# 生体成分の高速液体クロマトグラフィ

## High Speed Liquid Chromatography on Biological Substances

For high performance liquid chromatography, Hitachi has developed column packing materials, a high pressure minimal flow pump, a Wavelength Tunable UV-VIS Effluent Monitor, a gradient device, and etc. Using a new device employing this equipment, the authors separated such biological substances as steroid hormone, PTH-amino acid, and nucleotide. The separation behavior of steroid hormone using the Hitachi Gel #3010 with a methanol-water solution as the mobile phase is considered reverse phase partition chromatography, but a sizable contribution by adsorption is also apparent.

鴈野重威\* Shigetake Ganno

小島勝浩\*\* Katsuhiko Ojima

藤田一紀\*\*\* Kazunori Fujita

武内静士\*\*\* Seiji Takeuchi

### 1 緒言

液体クロマトグラフィは、1903年 Tswett がアルミナを充填したカラムに石油エーテルを溶離液として、クロロフィル、カロチンなどの天然色素を分離したのが始まりである。ガスクロマトグラフィよりその歴史は古いにもかかわらず、発展が遅れていたのは、分析に時間を要することや、操作が複雑であったことに起因していた。しかしながら、生体成分のように物理的、化学的に不安定な物質の分離分析に液体クロマトグラフィは不可欠の手段であり、地道に研究が続けられていた。このような状況下で、Spackman, Stein, Moore ら<sup>(1)</sup>によってイオン交換法によるアミノ酸自動分析法が発表され、我が国でも同じころ江頭<sup>(2)</sup>によって、紫外可視自記分光光度計を検出器とするKLF-1形日立液体クロマトグラフが完成し、液体クロマトグラフィの進歩に大いに寄与するものがあつた。この時代の分析時間は、たん白質構成アミノ酸20成分の分析に24時間を要し、1成分当たり1時間であったが、その後微量定量送液ポンプや検出器の開発など装置の自動化が進み、性能の良いカラム充填剤の開発とともに分析時間も数時間へと短縮されるに至つた<sup>(3)</sup>。

更にここ2、3年の進歩は著しく、装置の耐圧性向上による溶離液の高流速化、カラムの構造や充填剤など分離カラムに関する技術改善、検出器の高感度化などにより、分析時間もガスクロマトグラフィに近づきつつあり、高速液体クロマトグラフィ<sup>(4)</sup>として新しい分野が誕生し、装置も内外各社で製品化されるに至つた。

高速液体クロマトグラフィの生体試料への応用の多くは、尿や血液、脊髄液など生体液分析で、食物や病気による尿、血液中の成分変化、成分の相関性及び医薬品投与による代謝の影響など、生理・病理臨床検査に優れた能力を発揮するものと思われる。実際この分野でも妊産婦診断に、尿中のエストリオールの分析<sup>(5)</sup>や結腸ガン患者の尿中の紫外吸収物質の分析、尿中の核酸の分析、新生児、幼児尿中のウリジン、馬尿酸、ヒポキサンチンの量的比較など多くの報告がみられる。

ここでは、我々が開発した634形及び635形日立液体クロマトグラフを使用して、生体成分への応用を試み、核酸、ステロイドホルモン、アミノ酸などの分離の基礎的検討も行ない、我々が開発したカラム充填剤である日立ゲルの有用性を見いだしたので、装置の概要と、その応用例について報告する。

### 2 液体クロマトグラフの装置の概要

液体クロマトグラフは、図1に示したような各装置の組合せによって構成されている。液体クロマトグラフィを高速化するためには、カラムを細くして溶離液の線速度を上げて、早く溶出する方法がとられる。この場合、カラム効率を良くするために、例えば充填剤の粒度を小さくすることも必要なことであるが、また一方、カラムが細いために充填剤の容量が小さくなるので、試料の量を少なくする必要がある、そのため検出器の感度を高くしないと検出できないという問題が起こってくる。我々はこのたび  $500\text{kg}/\text{cm}^2$  の高圧に耐え得る送液ポンプ、 $200\sim 640\text{nm}$  の範囲で自由に波長を選択できる波長可変流動光度計を備えた新しい高速液体クロマトグラフを開発した。これらのうち、主要な部分についてその概要を述べる。

#### 2.1 高圧定流量送液ポンプ

最高  $500\text{kg}/\text{cm}^2$  の高圧ポンプで、デッドボリウムの極めて

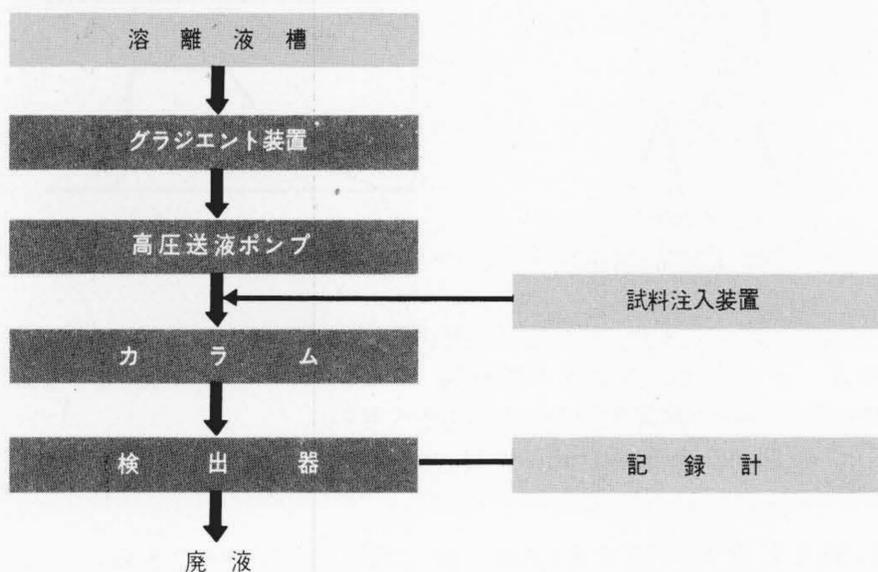


図1 液体クロマトグラフの構成 液体クロマトグラフを構成している主要部を系統図に示したものである。

Fig. 1 Functional Diagram of Liquid Chromatograph

\*日立製作所那珂工場 理学博士

\*\*日立製作所那珂工場

\*\*\*日立製作所日立研究所

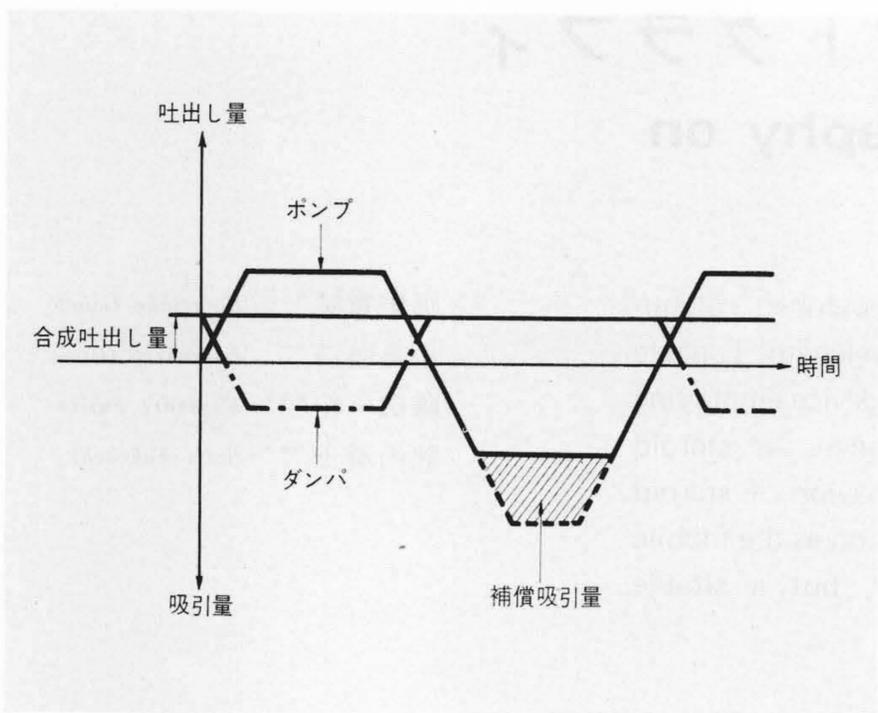


図2 高圧送液ポンプ原理図 635形日立液体クロマトグラフに用いられているポンプの原理を示したものである。

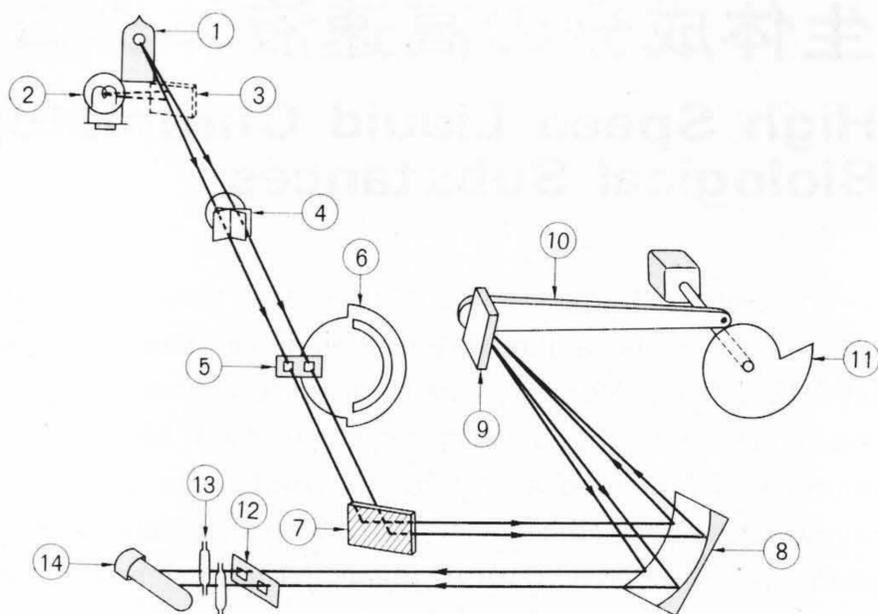
Fig. 2 Principle of High Pressure Minimal Flow Pump

小さい往復ピストン方式を採用し、無脈流方式で、常に安定した流量が得られる。しかも定流量方式のため極めて再現性の高いデータが得られる。

このポンプの動作原理は、図2に示すとおりであるが、2連の往復ピストン式ポンプで、一方がポンプの働きをし、他方は強制的に内容積を変化させてダンパの働きをする。ポンプの吐出し時にその吐出し量の一部をダンパ内に吸引し、ポンプの吸引時にダンパ内に吸引した溶離液を吐き出す。このとき同図に示したような吐出しパターンとなるように、ピストンは精密なカムによって駆動され、脈流のない流れとなって吐き出される。背圧が大きく変わった場合には液の圧縮、シールのねじれ、弁の開閉状態などが変わるため、吐出しパターンが理論パターンからずれて、わずかな脈流が生ずるようになるので、これを補償するために吸引量を増減させて正規のパターンに復帰させるための調節つまみがあり、背圧の大小によって適正值に設定できるようになっている。ポンプ全体の内容積は極めて小さく、その容積はポンプが100 $\mu$ l、ダンパが50 $\mu$ lである。吐出し量は0.1~3.0ml/min (~500kg/cm<sup>2</sup>)、0.1~6.0ml/min (~250kg/cm<sup>2</sup>)で±1%の精度で送液することができる。

### 2.2 波長可変流動光度計

高速液体クロマトグラフの検出器として現在用いられているのは、水銀灯を光源としてその253.7nmの輝線スペクトルを用いて、紫外吸収を検知し、電気的にスケールを拡大して検出記録するという方式がとられている。しかしながら、254nm近付に吸収のない物質では検出できないし、吸収の極大が254nm以外にある物質では測定波長の変えられる流動光度計を用いることによって實際上検出感度を上げることできる。本装置の光学系統図は、図3に示すとおりである。重水素放電管又はタングステンランプを光源とし、ダブルビーム分光光度計による単色光を内径1.5mm、長さ10mmのフローセルに入射して、その吸光度を最高0.02 Absorbance Unit Full Scale: 吸光度フルスケール、(以下、A U F Sと略す)までスケール拡大し、電気的に対数変換して吸光度リニアの出力として記録計に記録させるものである。測定波長は、リニアカムで任意の波長に設定され、フルスケールレンジは、0.02~



No.	名称	No.	名称
①	重水素放電管	⑧	コリメーティングミラー
②	タングステンランプ	⑨	グレーティング(回折格子)
③	ミラー	⑩	レバー
④	ビームスプリッタ	⑪	波長設定用リニアカム
⑤	スリット	⑫	スリット
⑥	チョッパ	⑬	フローセル
⑦	ミラー	⑭	光電子増倍管

図3 波長可変流動光度計光学系統 検出器の一種である波長可変流動光度計の光学系統図を示したものである。

Fig. 3 Optical Diagram of the Wavelength Tunable UV-VIS Effluent Monitor

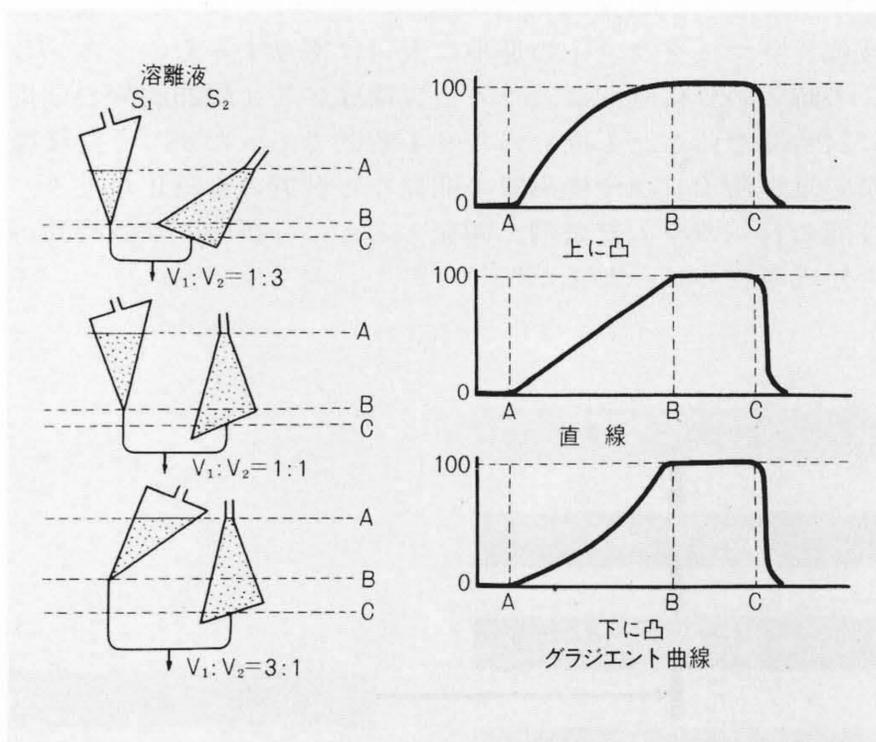


図4 グラジエント装置の原理図 三角形のチャンバ2個を用いる独特のグラジエント装置の原理を示したものである。

Fig. 4 Principle of Gradient Device

2.56 A U F S の間で8段階に切り換えることができる。

### 2.3 グラジエント装置

液体クロマトグラフィの溶離条件を選ぶ重要なものの一つに、溶離液の選択があげられる。例えば、最初の溶離液(S<sub>1</sub>)では分離はよいが分析に時間がかかって、後に溶出されるピークがなだらかとなり、逆に第2の溶離液(S<sub>2</sub>)のみで溶出すると早く溶出されるが、分離が十分となる場合には、S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>

表1 カラム充填剤 我々が開発した高速液体クロマトグラフ用カラム充填剤の一覧表で、アミノ酸、核酸、糖分析用には従来のイオン交換樹脂がある。

Table 1 Column Packing Materials

名 称	分 離 機 構	移 動 相	応 用 例
日立ゲル #3010	吸 着 分 配	有 機 溶 媒	芳香族化合物, 脂溶性ビタミン, ステロイド, 医薬品など
日立ゲル #3020	吸 着	水 溶 液	水溶性ビタミン, 核酸関連物質, 医薬品, 合成着色料など
日立ゲル #3030	"	有 機 溶 媒	多環芳香族化合物, その他#3010と同じ
日立ゲル #3040 (シリカゲル)	分 配	"	芳香族化合物, フェノール, クレゾール誘導体など
日立ゲル #3050 (ODS)*	"	"	脂肪, 芳香族化合物, ステロイド, 抗生物質など
日立イオン交換樹脂 #2610	陽イオン交換	緩 衝 液	核酸塩基, ヌクレオシドなど
日立イオン交換樹脂 #2632	陰イオン交換	"	ヌクレオチド, 食品添加色素, 医薬品など

注: \*シリカゲル(日立ゲル#3040)にODS(オクタデシルシラン)を化学結合させた充填剤

へ連続的に溶離液を変化させてやると、分離を改良しながらしかも分析時間も短縮することができる。このように、ガスクロマトグラフィの昇温分析に相当する手法を用いる方法がグラジエント溶離法である。図4は、我々が開発したグラジエント装置の原理を示すものである。二つの三角形のチャンバ1及び2に、各溶離液S<sub>1</sub>及びS<sub>2</sub>を同液位Aの位置まで入れておく。これを送液ポンプで吸引すると、両チャンバの溶離液は同液位で流出するから、AからBに達する間に混合比は溶離液S<sub>1</sub> 100%から溶離液S<sub>2</sub> 100%に連続的に変化する。各チャンバの容量V<sub>1</sub>及びV<sub>2</sub>は、チャンバの位置によって連続的に変えることができるから、最適の分析条件を選ぶことができる。またグラジエント曲線は、Convex(上に凸) Linear(直線) Concave(下に凸)の3種を基本に、三角形のチャンバの角度を変えることによって任意に設定することができる。

### 2.4 カラム充填剤

液体クロマトグラフィのカラム効率を左右する重要な要素は、いうまでもなくカラム充填剤の性能である。これは現在極めて多種類のものが開発されているが、我々が高速液体クロマトグラフィ用として開発したものを表1に掲げた。特に日立ゲル#3000シリーズのうち#3010は、応用範囲が極めて広く、吸着又は逆相クロマトグラフィとして使用することができる。使用溶媒は有機溶媒全般であるが、極性が大きくなるとゲルが膨潤するので、注意しなければならないが、カラムに充填するには、クロマトグラフィに用いる溶離液で膨潤させてからスラリー状で充填するのが最良の方法である。これらの日立ゲルは、多孔質のポリマでできているので、機械的強度が高い。また温度に対しても強いので、高压下で使用することができる。また粒子の中心までポーラスポリマでできているので、試料量は比較的大量に扱うことができるし、粒度分布も球状の粒子が細かくよくそろっていて、狭い範囲に限定されているのでカラム効率が高く、再現性の優れた分析結果を得ることができる。

## 3 応用例

### 3.1 ステロイドホルモンの分析

ステロイドホルモンは生理的に重要な物質で、例えば妊婦の尿中には卵胞ホルモンのエストリオールが通常人よりも多く、診断の一つの目安とされている。従来、ステロイドホルモンはシリルエーテル誘導体で高温ガスクロマトグラフィにより分離分析が行なわれていた。しかし、ガスクロマトグラフィは前処理操作が複雑であるため、その再現性に問題があ

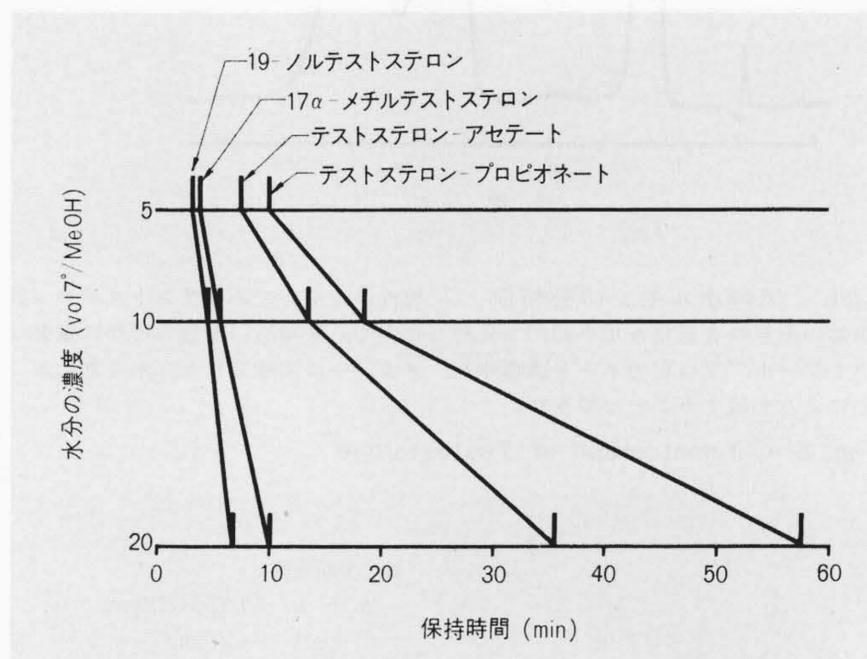


図5 男性ホルモンの分離における溶離液の水の影響 溶離液に水を加えた場合の保持時間の変化を調べた結果である。

Fig. 5 Effect of Water on Retention Time of Testosterone

り、近年直接分析のできる液体クロマトグラフィが注目されている。ここではポーラスポリマである日立ゲル#3010によるステロイドホルモン及びその誘導体の高速液体クロマトグラフィについて検討した。

日立ゲル#3010は、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体で、ステロイドホルモンの分離には水-メタノール混合溶媒を移動相に用いることにより非常に良い分離性を示す。ちなみに図5はテストステロン及びその誘導体の分離条件のうち、メタノール移動相中の水の濃度に対する選択性の一例を示したものである。水の濃度が増大するにつれて保持時間は遅れる傾向にあるが、分離は非常によく改善される。男性ホルモンであるテストステロン及びそのエステル誘導体の分析例は図6に示すとおりである。5 vol %の水-メタノール混合溶媒を移動相として、約16分で分離が可能であった。

同様に卵胞ホルモンであるエストロン及びその誘導体の分析例は図7に示すとおりである。また、ここでは移動相にメタノールを使用するのみで十分に分離が可能であった。また図8に示した卵胞ホルモンは15 vol %水-メタノール移動相のとき、約12分で完全分離ができた。副腎皮質に存在し、血液、尿中に見いだされるヒドロコルチゾン糖質代謝ホルモンとして強い作用を示し、またそのエステル形のもの、リウ

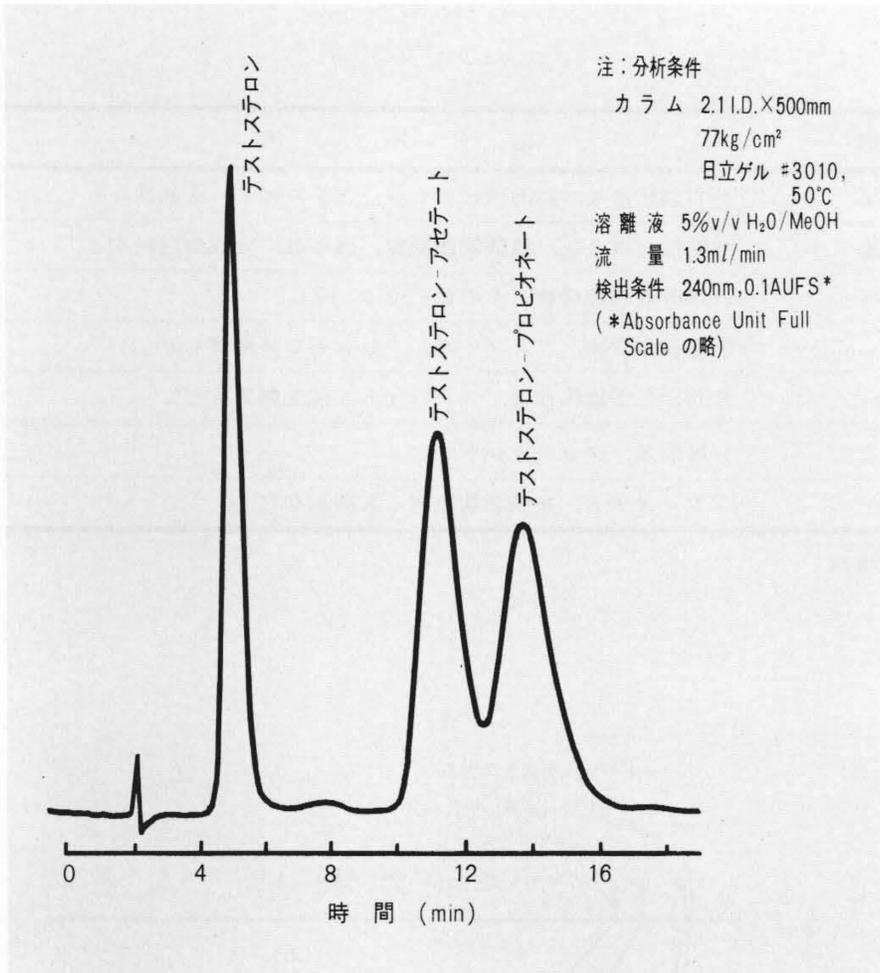


図6 男性ホルモンの分析例 男性ホルモンであるテストステロン誘導体の混合物を日立ゲル#3010で分析した例で、医薬品の製造工程中に重要なアセテート、プロピオネート誘導体を、メタノール溶離液に5%水を加えることにより分離することができた。

Fig. 6 Chromatogram of Testosterone

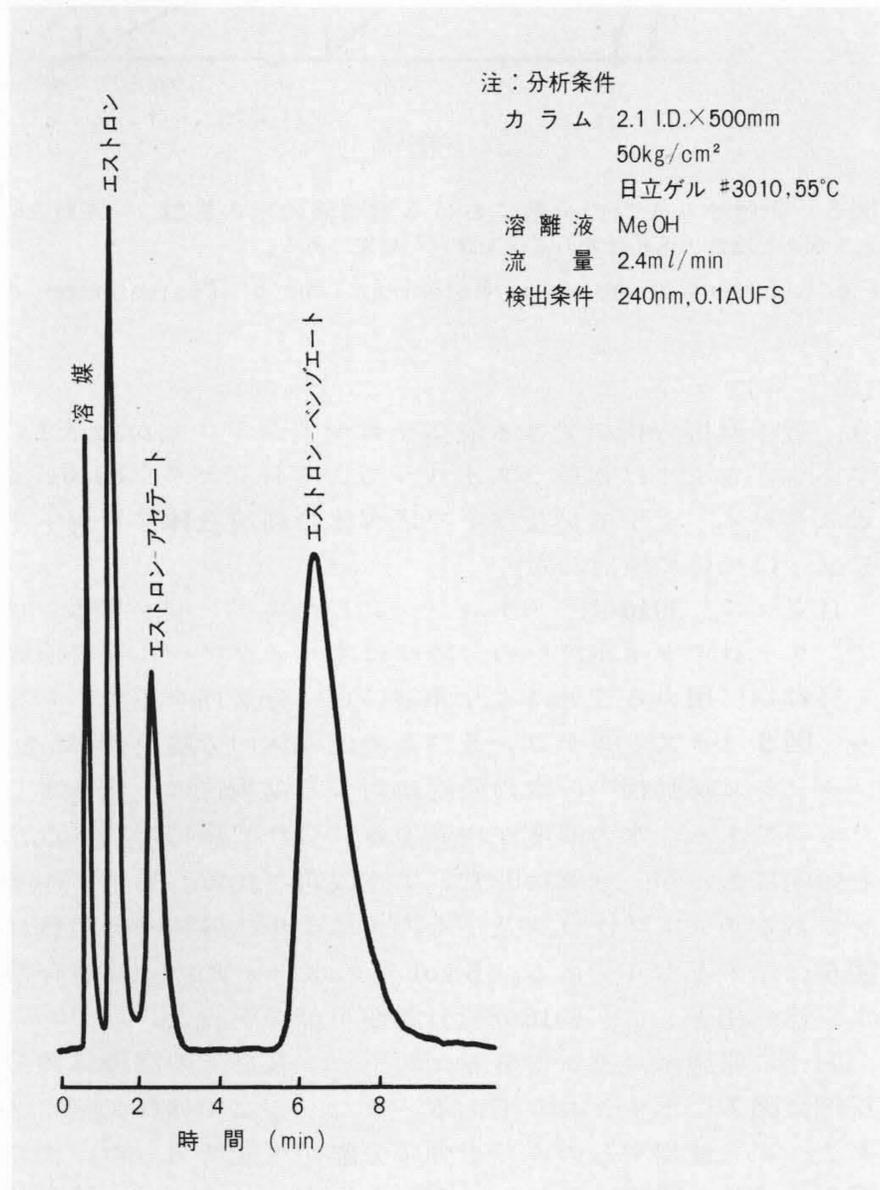


図7 エストロン誘導体の分析例 エストロン誘導体の混合物を日立ゲル#3010で分析した例で、図6と同様医薬品の製造工程中に現われるアセテート、ベンゾエート誘導体を、メタノール溶離液で分離できることが分かる。

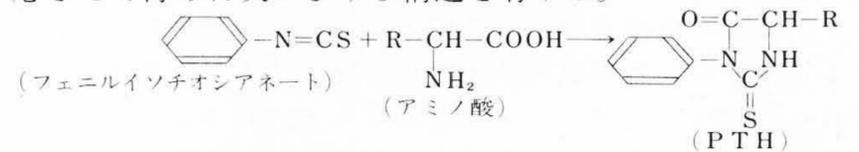
Fig. 7 Chromatogram of Estrone Derivatives

マチ、皮膚疾患、アレルギー症の治療に使用されている。副腎皮質ホルモン3成分の分離を検討した結果、図9に示すように20vol%水-メタノール移動相で、約4分で高速分離が達成された。一般にヒドロコルチゾンのように親水基を有するステロイドホルモンは、日立ゲル#3010に比較的保持されず移動相の水の濃度を増大させても溶出は速い。

### 3.2 PTH-アミノ酸の分析

たん白質の一次構造を調べるために、アミノ酸を加水分解し、そのアミノ酸誘導体を分析する方法がある。構成アミノ酸の配列は主にアミノ末端から決定され、DNP(2,4-ジニトロフェニル基)法、ダンシル法、PTH法などがある。これらの方法のうちEdmanらによって研究されたPTH(3-フェニル-2-チオヒダントイン)法は末端から順次アミノ酸の配列を決定することができ、よく使用されている。従来このPTHアミノ酸は専らペーパークロマトグラフィや薄層クロマトグラフィによって分析が行なわれていたが、定量性などに問題があった。ここではPTH-アミノ酸を日立ゲル#3010を用いた高速液体クロマトグラフィで検討した。

PTH-アミノ酸はアミノ酸とフェニルチオシアネートと反応させて得られ次のような構造を有する。



PTH-アミノ酸は紫外部に吸収があり、従来のアミノ酸自動分析計のニンヒドリン反応が不要で、そのため、これに基づく分離効率の低下がなく、良い分離性が得られるものと考えられる。

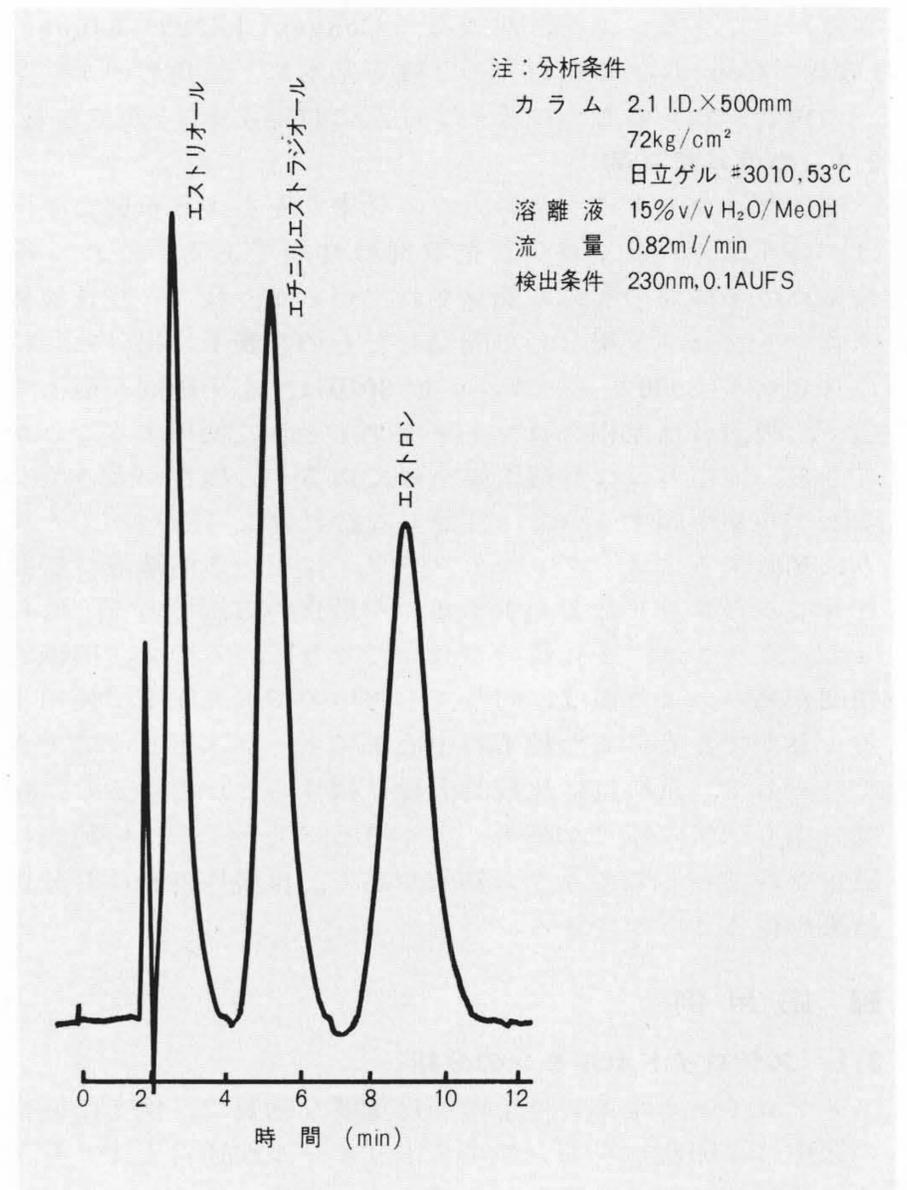


図8 卵胞ホルモンの分析例 卵胞ホルモンの混合物を日立ゲル#3010で分析した例で、図6及び図7と同様医薬品製造工程で重要な物質の分析が行なえることが分かる。

Fig. 8 Chromatogram of Estrone

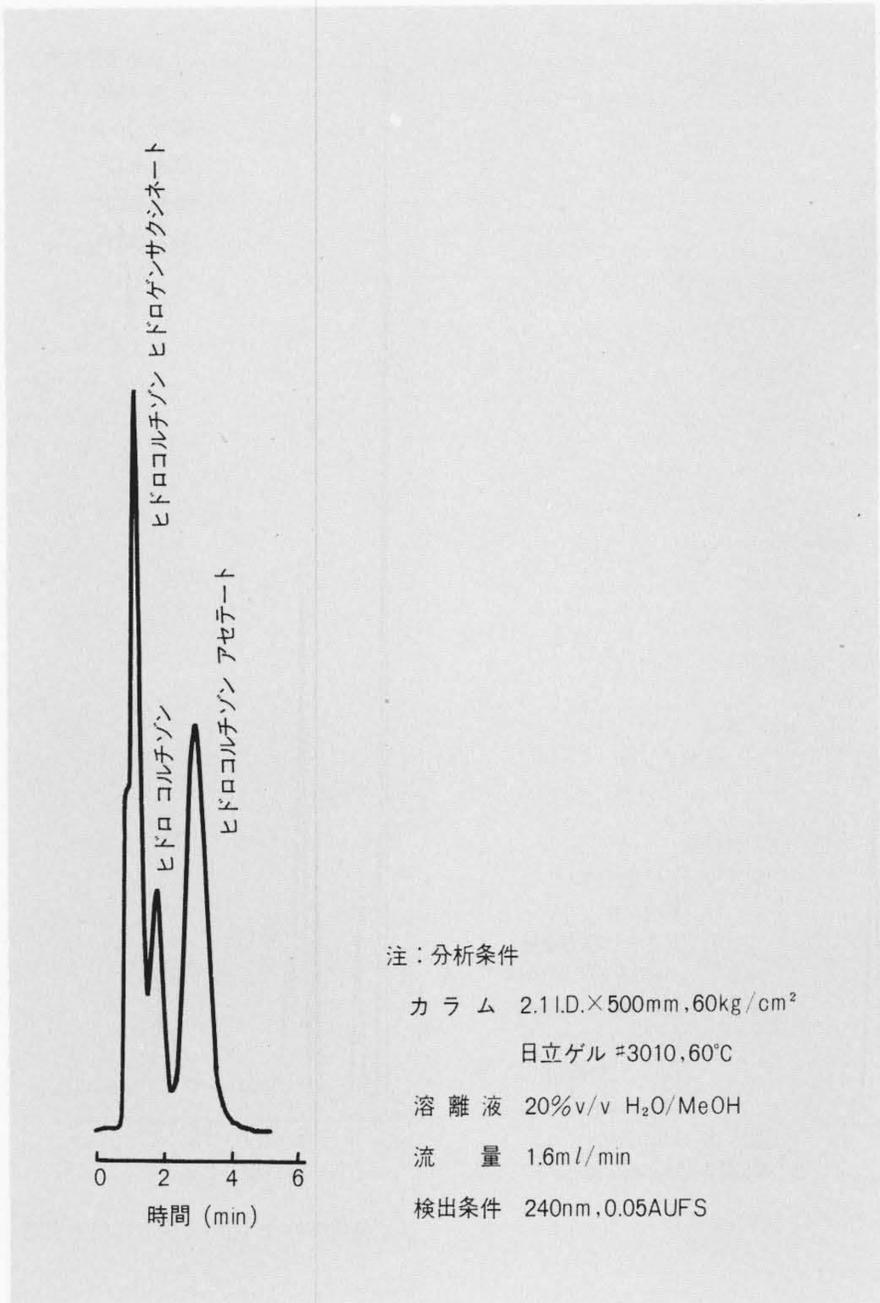


図9 副腎皮質ホルモンの分析例 副腎皮質ホルモンの混合物を日立ゲル#3010で分析した例で、ヒドロコルチゾン及びその誘導体を約5分で高速分析できることを示したものである。

Fig. 9 Chromatogram of Adrenal Cortical Hormone

日立ゲル#3010によるPTH-アミノ酸の分離もステロイドホルモンの分離の場合と同様、移動相のメタノールに水を添加することにより、保持時間は遅れる傾向を示したが、選択性の改善を図るには有効であった。PTH-アミノ酸は、それぞれ、システイン酸、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、グリシン、アラニン、プロリンの順序で溶出し、メタノール移動相の水の濃度が15vol%で、グルタミン酸、セリン、スレオニンのピークが、またグリシンとアラニンのピークが重なった。これらの分離を改善するためには選択性の改善という点で、更に移動相の水の濃度を増大させるとともにカラム効率の改善という点から、更に微粒子のゲルの適用が必要であると考えられる。

図10は、PTH-アミノ酸の分析例を示したものであるが、内径2.1mm、長さ1mのカラム、15vol%の水-メタノール移動相、流速1ml/min(カラム入口圧75kg/cm<sup>2</sup>)、カラム温度50°Cの条件で、5成分を約12分で分離することができた。

### 3.3 核酸関連物質の分析

イオン交換クロマトグラフィによる核酸構成成分の分離法に関してはCohnらの研究をはじめとして数多くの研究がなされているが、一般に分析時間が長いという欠点があった。しかし、ここ2、3年の間に薄膜形(ペリキュラ形)充填剤や微粒子(~10μm)球形イオン交換樹脂が開発され、カラム

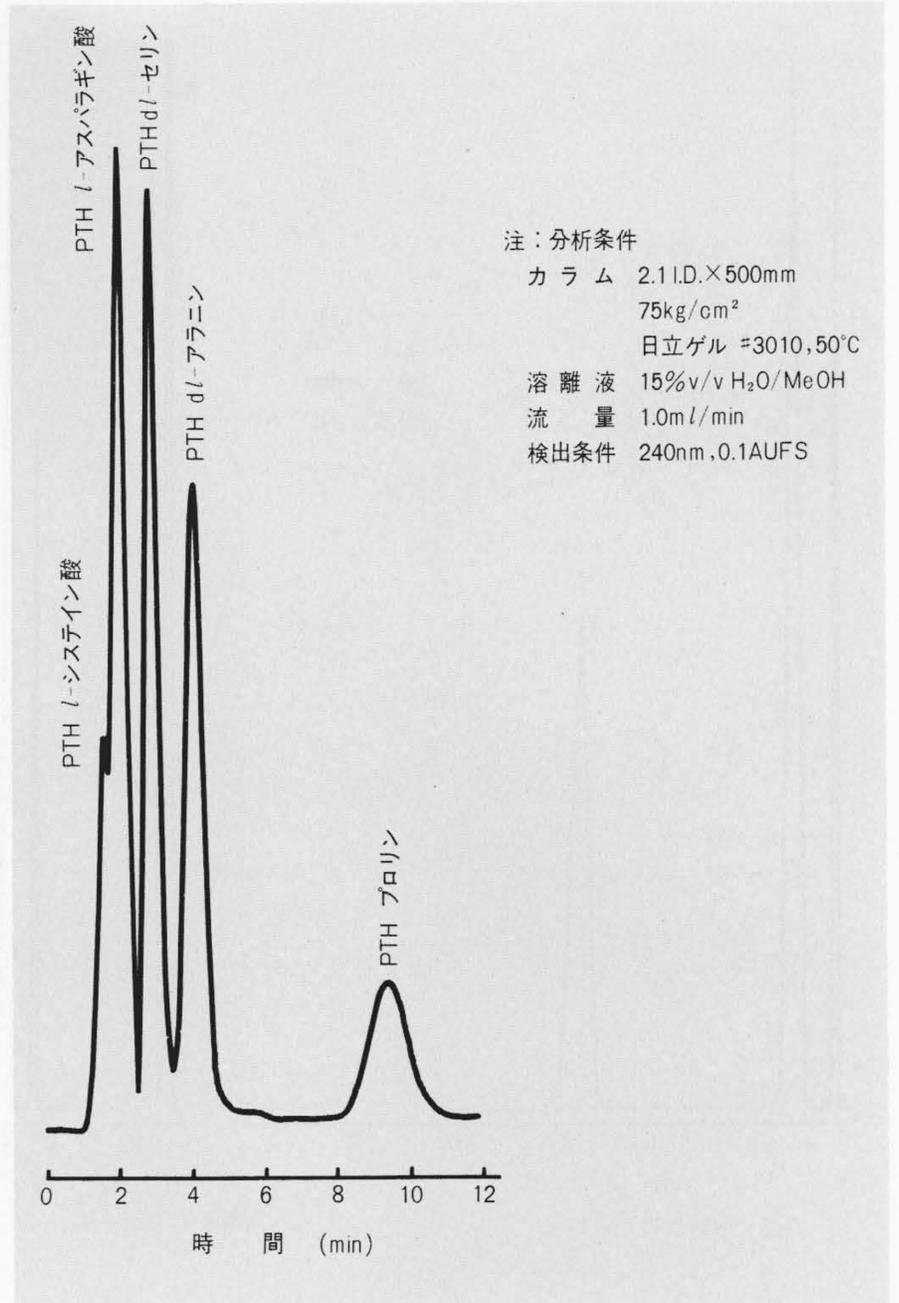


図10 PTHアミノ酸の分析例 従来アミノ酸分析にはイオン交換樹脂で分離し、ニンヒドリン反応生成物を比色定量していたが、PTH誘導体によって、日立ゲル#3010で分離し、紫外部240nmの吸収で検出できることを示した一例である。

Fig. 10 Chromatograph of PTH-Amino Acids

効率の改善とともに分析時間も大幅に短縮された。

我々は、核酸塩基の分離で従来の球形イオン交換樹脂を使用し、主として選択性の改善によって薄膜形充填剤と同等の性能をだし、且つ低圧で高速分析を可能とした。

ここでは、2個の三角容器から成るグラジエント装置を使用した、こう配溶離法によるヌクレオチドの分析結果について述べる。

図11は5'-CMP、5'-AMP、5'-UMP及び5'-GMPをそれぞれこう配溶離を行なった場合と行なわない場合の分離挙動を示したものである。(a)の食塩濃度が低い場合は、4成分は完全に分離するが、分析時間は40分と長時間を要する。また(b)の食塩濃度が高いときは溶出は促進されるが、5'-CMPと5'-AMP及び5'-UMPと5'-GMPのピークは重なり分離は良くない。ここで(a)の移動相から(b)の移動相へ直線こう配で溶離すると(c)に示すように、4成分は完全に分離でき、しかも分析時間も12分に短縮することが可能である。

このような、ヌクレオチドの分離など時間を要する分析の高速化に、こう配溶離法が非常に有効であることが分かる。

同様に図12は5'-AMP、5'-UMP、5'-IMP、5'-ADP及び5'-ATPを図11(c)と同じ直線こう配で分析した例を示したものである。6成分を約20分で高速分離することができ、従来の分析法に比較して飛躍的な進歩がうかがえる。

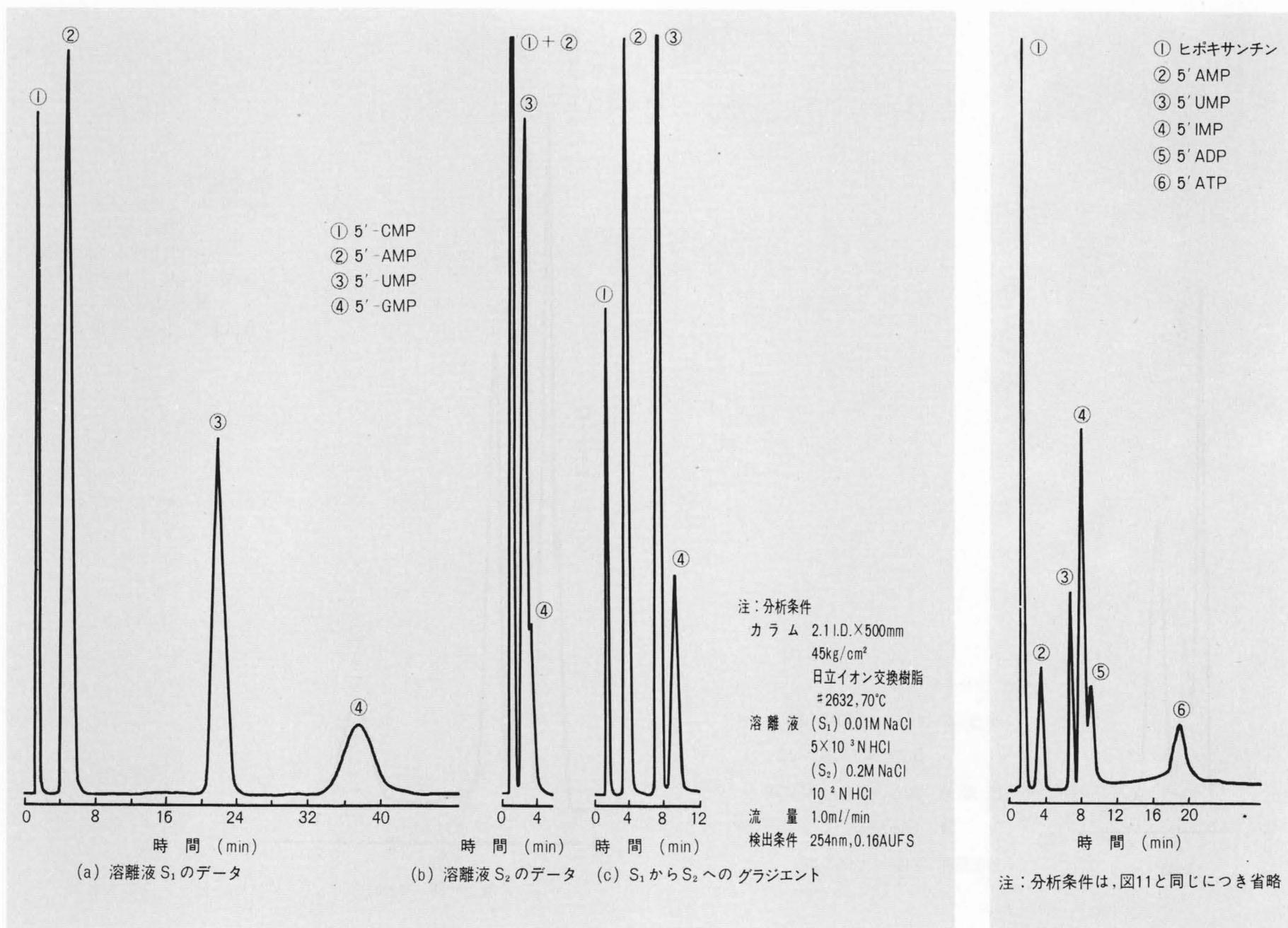


図11 一般溶離及びこう配溶離における核酸の分離挙動(a)溶離液(S<sub>1</sub>), (b)溶離液(S<sub>2</sub>), (c) (S<sub>1</sub>)から(S<sub>2</sub>)へのリニアグラジエント こう配溶離法の有効性について示した例である。すなわち, (a)では分析に時間がかかりすぎ, (b)では分析時間は短縮されるが, 分離が不十分である。(c)はこれらを一挙に解決した手法であることが分かる。

Fig. 11 Separation State of Nucleotides in One-step and Gradient Elution

図12 ヌクレオチドの分析例 図11の(c)の分析条件で示した有効な手法を用いて, 従来約1時間を要したヌクレオチド混合物を20分に短縮されたことが分かる。

Fig. 12 Chromatogram of Nucleotides

#### 4 結 言

液体クロマトグラフィは、ガスクロマトグラフィに比較して特に生体試料など不安定化合物の分析に有利で、生化学や臨床化学など、ライフサイエンスにおける研究の有力な武器となり得るものである。本稿では、これら生体成分の高速液体クロマトグラフィへの応用例として、カラム充填剤として日立ゲル#3010によるステロイドホルモンやPTHアミノ酸などの分離について検討した結果を報告した。日立ゲル#3010は、移動相のメタノールに水を添加することによって、ピークの分離を改善することができることから、ゲル上にメタノール液相が生成され、水の濃度が増大するに従って溶解度の大きいメタノール液相へ溶質が分配されやすくなり、保持時間が遅れるものと考えられる。今後は、カラム効率を更に向上させて分析時間を更に短くするため、カラムの構造や充填剤の改良、溶離条件設定の研究が続けられるべきであろう。また検出感度を上げるために、例えばけい光を発する物質の検出には、けい光光度計を用いることによって、紫外吸収法の数十倍から100倍の感度向上が期待できる。

このように液体クロマトグラフィは、高圧ポンプや高感度検出器などの開発によって、従来時間がかかるというイメージから脱してガスクロマトグラフィに近づきつつある。液体

クロマトグラフィの今一つの大きな特長は、試料の前処理が不要なこと、非破壊で調製分取が容易にできるということであり、分析用の液体クロマトグラフィと同様に大量の試料を分離できる調製分取用の高速液体クロマトグラフィの利用される日も近いものと期待される。

#### 参考文献

- (1) O. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, "Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids." *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958)
- (2) 江頭「比色方式を用いる汎用自動液体クロマトグラフ分析装置の設計と試作」*分析化学* **10**, 693 (1961)
- (3) 塚田, 藤井, 嶋田「アミノ酸分析の全自動化」*日立評論* **54**, 888 (昭47-11)
- (4) J. J. Kirkland, "Modern Practice of Liquid Chromatography" Wiley Interscience, New York (1971)  
高速液体クロマトグラフィとして最初出版された叢書で、日本語訳として、平田, 鷹野監訳「高速液体クロマトグラフィ」講談社サイエンティフィク(1972)がある。
- (5) J. F. K. Huber, J. A. R. Hulsman, "Quantitative analysis of trace amounts of Estrogenic Steroids in pregnancy urine by column liquid-liquid chromatography with UV-detector." *J. Chromatog.*, **62**, 79 (1971)