

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）における 分析及び条件設定～平成 23 年度分野別研修の事例～

総合技術センター
分析・解析技術分野

佐々木 由香(Yuka Sasaki)

1. はじめに

クロマトグラフィーとは、混合試料を、試料の固定相及び移動相に対する親和性の違いを利用して分離する技術のことである。このうち、移動相が液体の場合を液体クロマトグラフィーという。そして、移動相を高圧ポンプを利用して高速で送液させ、高速・高性能な分離を可能にしたものを高速液体クロマトグラフィー(HPLC : High-performance Liquid Chromatography)という。各種試料の精製や試料分析において欠かすことのできない手法となっている。

今回は、HPLC の原理及び手法について、平成 23 年度分野別研修「高速液体クロマトグラフィー分析事業」において実施した例をもとに述べる。

2. HPLC の装置構成

HPLC は下図のように、①溶媒を送液する送液ポンプ、②試料を注入するインジェクター、③試料成分を分離するカラム、④分離した成分を検出する検出器、⑤データ処理装置から構成されている。

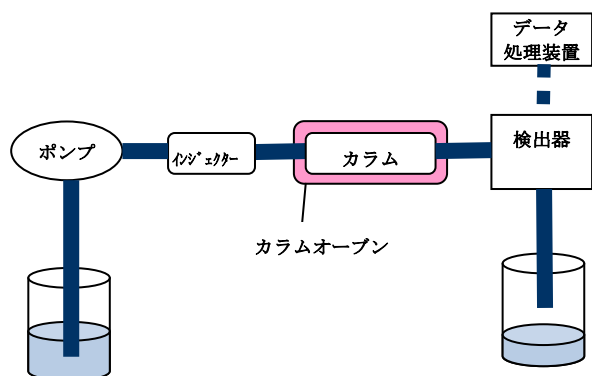


図 1 HPLC の装置構成図

3. 分析条件の設定

HPLC 分析においては、目的に応じて、一般的に下記の条件の選択が必要である。

3-1. システムの設定

1) 装置

分離・精製する試料の量に応じた装置を選ぶ必要がある。付属しているポンプの性能や装置内のラインの材質や内径により、使用できる溶媒の種類やカラムが異なってくる。そのため、分離可能なサンプルの種類や量、分離能が異なる。

2) 分離に使用するカラム

一般的には、ステンレス管の中にシリカゲルやポリマーゲル等の樹脂が充填されており、これらの樹脂には様々な化学修飾が施されている。実験目的やサンプルの違いにより、選択する必要がある。

3) 溶媒

装置やカラム及びサンプルに対する影響を考慮して選択する必要がある。水、塩類の溶液、アルコール類、アセトニトリル等が使用される。

実験の目的によって若干異なるが、基本的に純度の高いものを使用する必要がある。例えば水は超純水、試薬は HPLC グレードのものを使用することが望ましい。そのうえ、 $0.45\ \mu\text{m}$ 或いは $0.22\ \mu\text{m}$ のフィルターで濾過し、微粒子を除去しておかなければならない。

4) 検出器

主な検出器としては、UV-VIS 検出器、PDA 検出器、蛍光検出器、示差屈折率検出器等がある。

UV-VIS 検出器は、最も多く使用されている検出器であり、紫外・可視領域に吸収を持つ成分の分離に用いられる。

PDA 検出器は、光源からの光をフローセルを通過させた後、回折格子で分光し、フォトダイオードアレイ素子に当てることにより検出を行う。多波長同時分析が可能であり、「光線の強さ」と「時間」に「波長」を加えた三

次元で表示することができる。

蛍光検出器は、励起波長の光を吸収して発光する光（蛍光）を検出する。選択性が高く、高感度であり、物質に特異的な検出が可能である。

示差屈折率検出器は、光の屈折率の変化を検出する。屈折率は、物質や濃度によって変化をする。感度は低い、あらゆる物質に対して使用できる。

3-2. 分析メソッドの設定

1) 温度

室温で行う場合も多いが、カラム周辺の温度の変動によって溶出時間が安定せず再現性が悪くなる場合がある。温度調節が可能なカラムオープンが装置に付属している場合には、カラムオープンの機能やサンプルの性質に応じた温度設定が可能となり、カラム温度を一定に保つことができる。

2) 流速

使用するカラムには、使用可能な流速の範囲や至適流速が記載されているので、これを参照する。また、装置とカラムの耐圧や使用する溶媒の種類、分析温度も考慮して決める。

3) 溶媒組成及び分析時間

HPLCによりサンプルを分離する手段として、1種類の分離用バッファーを使う場合と、2種類の分離用バッファーを使用しその溶液組成を変化させながら分離する場合とがある。前者をアイソクラティック法、後者をグラジエント法と呼ぶ。1種類の溶媒を使用したときに溶出する成分のピークが、ブロードになった或いは成分がカラムから溶出されない場合、または分離が不十分である場合などは、グラジエント法を利用すると問題点が改善できる。

4. 分析事例 ～平成 23 年度分野別研修～

4-1. 分析条件

1) 使用機器

島津 Prominence (図 2 参照)

(JST 事業関連機器：産学官連携プラザ 2F 生物応用技術開発室に設置)



図 2 島津 Prominence

[仕様・特徴]

- ・流量設定範囲：0.001～10ml/min
- ・PDA 検出器：測定波長範囲 190～800nm
- ・示差屈折率検出器：測定範囲 1～1.75RIU
- ・蛍光検出器：測定波長範囲 200～750nm、ラマンピーク S/N 2000 以上
- ・オートサンプラ：注入量設定範囲 1～100 μ l
- ・カラムオープン：温度制御範囲（室温－10）～85 $^{\circ}$ C
- ・冷却機能付きフラクションコレクタ装備
- ・サンプルクーラー装備

2) 試薬及び試料

分離用溶媒

A：0.1%ギ酸 in MilliQ 水

B：0.1%ギ酸 in 95%アセトニトリル

試料

No.1：トリペレナミン塩酸塩（5nmol）、ジフェンヒドラミン塩酸塩（5nmol）の混合物

No.2：アンギオテンシン I（2.5nmol）、メチオニンエンケファリン（2.5nmol）の混合物

3) カラム

GeminiNX 5u C18 (Phenomenex 製、サイズ：150×4.6mm)を使用した。

このカラムは、逆相クロマトグラフィー用のカラムである。オクタデシルシリル(Octa Decyl Silyl) 基 (C₁₈H₃₇Si) で表面が修飾されたシリカゲルが、固定相として充填されている。化合物が持つ疎水性相互作用の違いによって分離できるため、各種 HPLC カラムのうちでも高い汎用性を持っている。

4) 検出方法

PDA (Photodiode Array) 検出器を使用した。測定波長は、分析サンプルの吸収スペク

トラムを考慮して、200~300nm とした。

5) 分析用メソッド

今回は、先に示した 2 種類の液 (A、B) を利用したグラジェント方式で行った。条件設定においては、あらかじめ予備実験を行い、分離に適切な溶媒の混合比を検討した。また、時間及び流速は、カラムの容量と仕様をもとに決定した。

詳細は表 1 のとおりである。

表 1 分析用メソッド

0min	B : 0%
3.0min	Inject (100 μ l)
10.5min	B : 0%
12.0min	B : 10%
30.0min	B : 50%
30.5min	B : 100%
38.0min	B : 100%

流速 : 1.0ml/min

カラム温度 : 室温

4 - 2 . 分析結果

1) サンプル No.1 の分析結果

クロマトグラムを図 3 に示す。トリペレナミン塩酸塩のピークの Retention time は 18.87min、Intensity は 241mAU (254nm)、629mAU (215nm) であった。一方、ジフェンヒドラミン塩酸塩のピークの Retention time は 23.71min、Intensity は 21mAU (254nm)、607mAU (215nm)、であった。波長 215nm においては 2 つとも同程度のピーク強度を示すが、254nm においてはトリペレナミン塩酸塩の方が圧倒的に高い。このような各物質による吸収波長の違いは、物質の同定に役立てることができる。

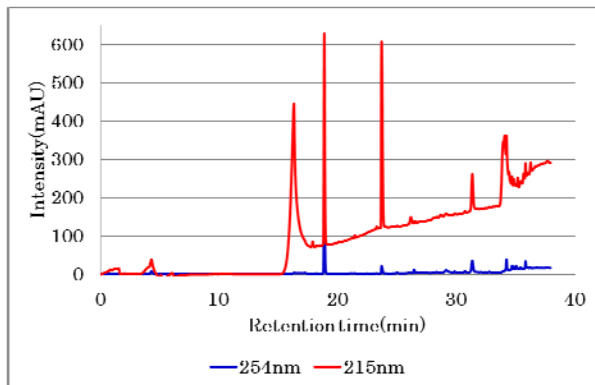


図 3 サンプル No.1 のクロマトグラム

2) サンプル No.2 の分析結果

クロマトグラムを図 4 に示す。アンギオテンシン I のピークの Retention time は 19.93min、Intensity は 624mAU (215nm)、24mAU (280nm) であった。一方、メチオニンエンケファリンのピークの Retention time は 20.97min、Intensity は 447mAU (215nm)、32mAU (280nm) であった。ちなみに、215nm 付近はタンパク質やペプチドの検出によく用いられる波長 (ペプチド結合由来) であり、280nm は芳香族アミノ酸 (チロシン、トリプトファン) に由来する。

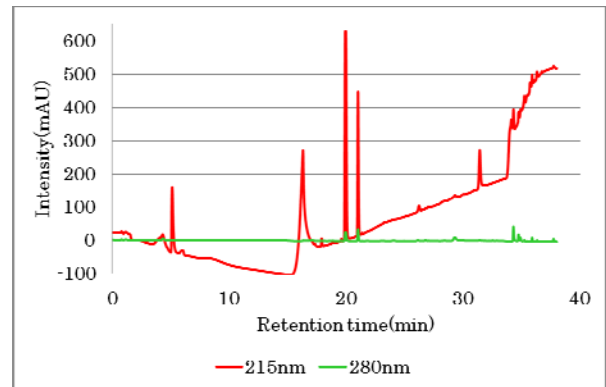


図 4 サンプル No.2 のクロマトグラム

5. まとめ

分野別研修において今回行った事例は、比較的純度の高い既知物質を混合した試料を用いたため、物質の吸収スペクトラムもわかっており純度も高いものである。そのため、分析条件の設定も比較的容易である。しかし、日常分析するサンプルは純度や含まれる物質もわからない場合も多い。このような場合は条件検討においても試行錯誤しなければならない。今後さらに研鑽を積み、あらゆる事例に対応できるようにしたい。依頼者の先生方に対して有益な助言ができるようになればと思っている。

今回は物質の吸収波長を利用した PDA 検出器をした。今後は、蛍光検出器や示差屈折率検出器を利用した分析にもチャレンジしてみたいと思っている。

6. 参考

基礎生化学実験法第 3 巻「タンパク質 I . 検出・構造解析法」(東京化学同人、日本生化学会編、2001 年)