

ステップグラジェント法を用いた生体液 試料の HPLC に関する基礎的研究

Studies on HPLC of Body Fluid Samples by Step Gradient Elution System

高橋 浩*・城野 博州**・高井 信治*
竹内 啓***・舟久保 熙康****

Hiroshi TAKAHASHI, Hirokuni SHIRONO, Nobuharu TAKAI,
Akira TAKEUCHI and Hiroyasu FUNAKUBO

はじめに

生体液中にはきわめて多くの物質の存在が知られており、未知物質まで含めると千以上にも及ぶと言われていた。

最近これらの物質に関して、短時間でできるだけ多くの成分を同時に分離分析しようとする試みが行われており、C. D. Scott らの行った十数時間から現在では、新たに我が国で開発されたマクロポーラス型のイオン交換樹脂を用いて、1時間ないし2時間で約100成分以上の分離が行えるようになってきた。

しかし、100成分以上の物質について、微量成分にまで再現性よくクロマトグラフィーを行うことはかなり困難が伴う。そこでグラジェント法より再現性がよいと言われている、ステップグラジェント法を用いて基礎的な知見を得る目的で実験を行った。

実験の結果、ステップグラジェント法は、その機械の種類により多少異なったソフトの開発を付け加えなければならぬがグラジェント法と溶離挙動がよく似ており再現性も得易いことがわかった。

実 験

実験装置は、ポンプ (LC-3A) <島津製作所> サンプルインジェクション (SIL-1A), カラムオープン (CTO-2A), 検出器 (SPD-2A) および溶媒プログラマー (SGR-1A) を用いカラム充填剤には、CDR-10 (三菱化成) 4.6φ×250 mm, 同じ充填剤を用いたプレカラム 4.6φ×20 mm を通して接続した。

また生体液モデルとしては、溶離時間の異なるもの

* 東京大学生産技術研究所 4部

** 東京理科大学

*** 東京大学農学部 畜産獣医学科

**** 東京大学工学部 精密機械工学科

うち代表的な次のものを選んだ。

ウラシル, アデノシン, テオフィリン, 尿酸, ニコチン酸, P-アミノ馬尿酸, P-アミノ安息香酸, 馬尿酸, バニリン酸, 安息香酸, 3-インドール酢酸. いずれも試薬 (和光純薬) を用いた。

これらのものは、吸光度を同じ程度に調整し、混合して試料溶液とした。したがって、生体液中に溶存する割合とは異なる。

溶離液は、6 M (pH 4.4) の酢酸アンモニウムの溶液を調製し、これを純水で 1/2 (3 M), 1/4 (1.5 M), 1/8 (0.75 M), 1/16 (0.38 M) に希釈した。したがって、溶離液は純水を含めて6種類である。

これらの溶離液は、溶媒プログラマーに付属している溶媒リザーバーにテフロン管で接続した。ステップグラジェントプログラムは、タイマーを用いて種々調整して実験を行った。すなわち予備実験において、すべてのタイマーを同一にした場合、流路などに存在する死溶液のため、(約10 ml) 同一間隔の段階のチャートは得られず、

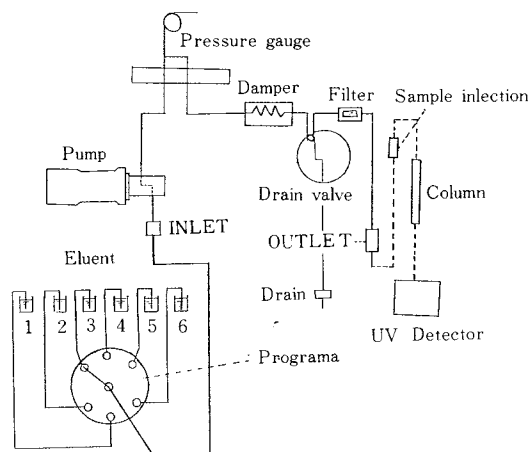


Fig. 1 System of HPLC

研究速報

純水のみ部分がきわめて長時間流れるためにタイマーを調節した。しかし、階段が同一のステップになっても分離には必ずしも良い結果を得ることができないので、次にさらに分離に適したプログラムをタイマーを調節して測定した。

装置の概要を図1に示す。

結果

まず、この装置の特性を調べる目的でタイムプログラム

ムを、2分 (OM), 2分 (0.38 M), 2分 (0.75 M), 4分 (1.5 M), 6分 (3.0 M), 35分 (6.0 M), に固定し、溶離液の線速度を種々変えて、その溶離挙動を調べた。

結果を表1 (流速: 0.8 ml/min), 表2 (流速: 1.2 ml/min), 表3 (流速: 1.6 ml/min) に示す。

これらの表から流速を変化させても、溶出順位は変わらなかった。ただし、全体として流速が大きくなるに従って、*HETP* の値は大きくなり、*N* は小さくなる。これは他の HPLC の挙動と同じである。しかし、流速を増

Table 1 *R_t*, *N*, *HETP* and *K'* in case of 0.8 ml/min step program; 2 min (OM), 2 min (0.38), 2 min (0.75 M), 4 min (1.5 M), 6 min (3.0 M), 35 min (6.0 M).

SAMPLE	<i>R_t</i> (min)	<i>N</i>	<i>HETP</i>	<i>K'</i>	<i>K_j' / K_i'</i>
Uracil	5.70	563	0.440	2.314	1.000
Adenosine	7.24	173	1.445	3.209	1.387
Theophylline	16.96	4256	0.059	8.860	3.829
Uric acid	18.62	8671	0.029	9.826	4.246
Nicotinic acid	20.52	14573	0.017	10.930	4.723
P-Aminohippuric acid	24.00	7348	0.034	12.953	5.598
P-Amino benzoic acid	27.18	15267	0.016	14.802	6.398
Hippuric	28.38	8949	0.028	15.500	6.698
Vanillic acid	30.42	8007	0.031	16.686	7.211
Benzoic acid	41.42	3136	0.080	23.081	9.975
3-Indoleacetic acid	53.00	2160	0.116	29.814	12.884

Table 2 *R_t*, *N*, *HETP* and *K'* in case of 1.2 ml/min step program is the same as Table 1.

SAMPLE	<i>R_t</i> (min)	<i>N</i>	<i>HETP</i>	<i>K'</i>	<i>K_j' / K_i'</i>
Uracil	3.66	335	0.746	2.050	1.000
Adenosine	4.76	94	2.660	2.967	1.447
Theophylline	12.76	1328	0.188	9.633	4.699
Uric acid	13.96	6362	0.039	10.633	5.184
Nicotinic acid	16.06	11466	0.022	12.383	6.040
P-Aminohippuric acid	18.28	4761	0.053	14.233	6.943
P-Amino benzoic acid	20.66	10650	0.023	16.217	7.911
Hippuric	21.56	6876	0.037	16.927	8.257
Vanillic acid	23.06	6323	0.040	18.217	8.886
Benzoic acid	30.76	2544	0.098	24.633	12.016
3-Indoleacetic acid	39.06	1418	0.169	31.550	15.390

Table 3 *R_t*, *N*, *HETP* and *K'* in case of 1.6 ml/min step program is the same as Table 1.

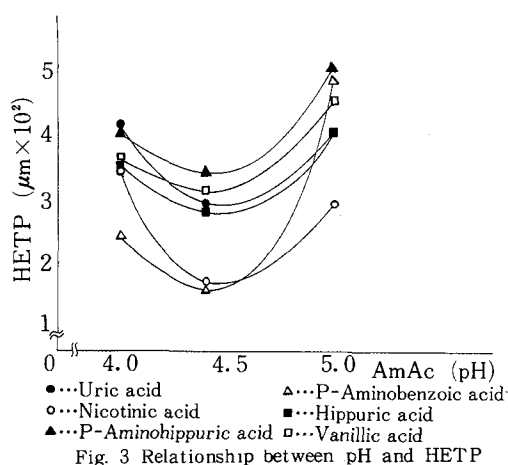
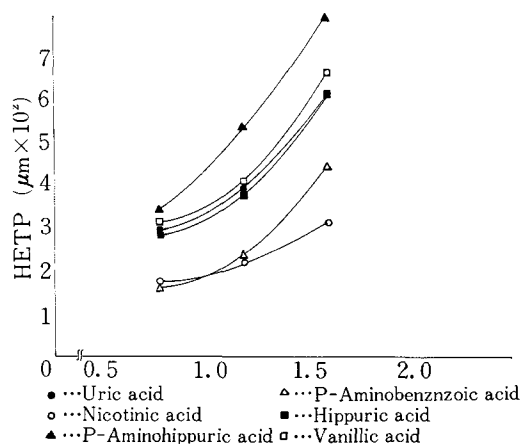
SAMPLE	<i>R_t</i> (min)	<i>N</i>	<i>HETP</i>	<i>K'</i>	<i>K_j' / K_i'</i>
Uracil	2.70	324	0.772	2.140	1.000
Adenosine	3.78	159	1.572	3.395	1.586
Theophylline	8.70	2098	0.119	9.116	4.260
Uric acid	9.60	4096	0.061	10.163	4.749
Nicotinic acid	10.70	7957	0.031	11.442	5.347
P-Aminohippuric acid	12.40	3181	0.079	13.419	6.371
P-Amino benzoic acid	14.30	5667	0.044	15.628	7.303
Hippuric acid	15.10	4127	0.061	16.558	7.737
Vanillic acid	15.40	3795	0.066	16.907	7.900
Benzoic acid	23.70	999	0.250	26.558	12.410
3-Indoleacetic acid	31.30	876	0.285	35.395	16.540

Table 4 $R_t, N, HETP$ and K' in case of pH4.0 step program is the same as Table 1.

SAMPLE	R_t (min)	N	$HETP$	K'	K'_j / K'_i
Uracil	5.46	477	0.524	1.676	1.000
Adenosine	6.76	253	0.988	2.314	1.381
Theophylline	14.26	3254	0.077	5.990	3.574
Uric acid	16.32	6040	0.041	7.000	4.177
Nicotinic acid	18.08	7410	0.034	7.863	4.692
P - Aminohippuric acid	21.66	6203	0.040	9.618	5.739
P - Amino benzoic acid	25.56	10453	0.024	11.529	6.879
Hippuric acid	26.16	7123	0.035	11.824	7.055
Vanillic acid	27.96	6962	0.036	12.706	7.581
Benzoic acid	34.36	5341	0.047	15.843	9.453
3 - Indoleacetic acid	40.48	3074	0.081	18.843	11.243

Table 5 $R_t, N, HETP$ and K' in case of pH5.0 step program is the same as Table 1.

SAMPLE	R_t (min)	N	$HETP$	K'	K'_j / K'_i
Uracil	5.20	400	0.625	1.364	1.000
Adenosine	7.70	196	1.275	2.500	1.833
Theophylline	15.80	2683	0.093	6.182	4.532
Uric acid	17.08	6311	0.040	6.764	4.959
Nicotinic acid	19.40	8538	0.029	7.818	5.732
P - Aminohippuric acid	21.20	4996	0.050	8.636	6.331
P - Amino benzoic acid	25.40	5265	0.048	10.545	7.731
Hippuric acid	28.60	6311	0.040	12.000	8.798
Vanillic acid	29.92	5595	0.045	12.600	9.238
Benzoic acid	39.00	2261	0.111	16.727	12.263
3 - Indoleacetic acid	54.80	1137	0.220	23.909	17.529



大しても、これらの成分は重なることなく完全に分離されている。

次に溶離液の pH の影響について検討を行った。溶離液は、6 M の酢酸アンモニウムで pH 4.0, pH 5.0 に調整し、実験のところで述べた方法に各々の濃度の溶離液を調整した。流速は、0.8 ml/min に固定し、ステップグラジエントプログラムは、表 1 ~ 表 3 と同じプログ

ラムを組んで実験を行った。その結果を表 4 ~ 表 5 に示す。

表 1 と表 4 ~ 表 5 を比較すると、溶出順位の変化はないが、pH の上昇と共に溶離時間が少し早くなる傾向がみられた。しかし、分離に大きな影響を持つ理論段数等は表 1 の pH 4.4 が最もよく、これより pH が大きくなって小さくても悪くなる傾向がみられた。

研究速報

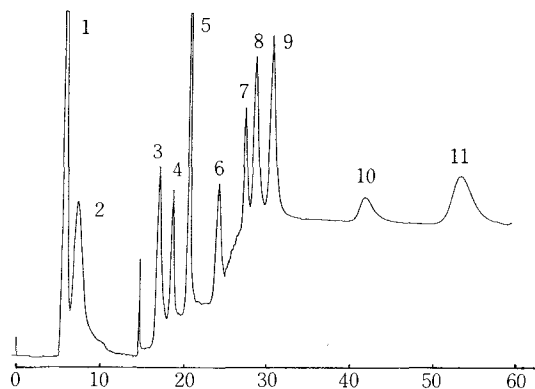


Fig. 4 Chromatograms of 11 samples by step gradient elution system.

Samples; 1. Uracil, 2. Adenosine, 3. Theophylline, 4. Uric acid, 5. Nicotinic acid, 6. p-Aminohippuric acid, 7. p-Aminobenzoic acid, 8. Hippuric acid, 9. Vanillic acid, 10. Benzoic acid, 11. 3-Indole-acetic acid.

Conditions; column Diaion CDR-10 4.6×250 mm I.D. eluent; OM-6 M (pH 4.4) AmAc step gradient, see Table 1. flow rate; 0.8 ml/min, detector; UV-254 nm (0.32 AUFS).

また、流量と HETP の関係を見ると、流量の増加と共に HETP の値は増大する。その結果を図2に示す。

次に、pH と HETP の関係を図3に示す。

そして、最後に流量 0.8 ml/min, 1.2 ml/min, 1.6 ml/min のときのクロマトグラフを図4～図6に示す。

以上のことから、ステップグラジェント法を用いて生体成分関連物質の溶離挙動を調べた結果、きわめてよい再現性を持つことが知られた。したがって装置によって多少溶離挙動が異なるが、すでにグラジェント法で行われているクロマトグラフィーをステップ法で替えることは容易であることがわかった。(1981年3月5日受理)

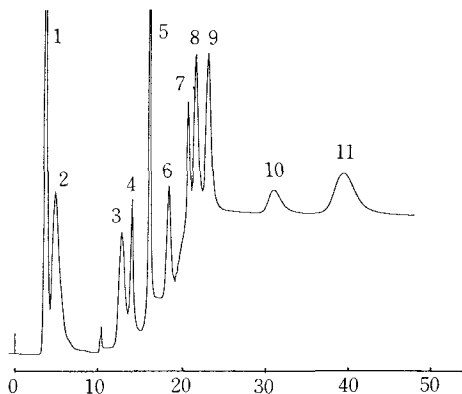


Fig. 5 Chromatograms of 11 samples by step gradient elution system.

Samples and Conditions were the same as in Fig. 4, but flow rate is 1.2 ml/min.

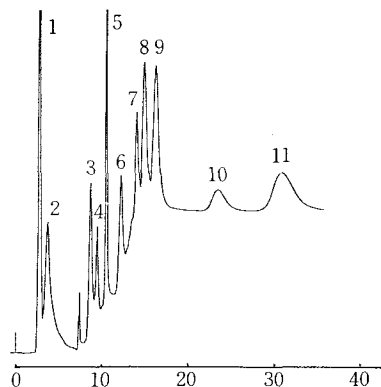


Fig. 6 Chromatograms of 11 samples by step gradient elution system.

Samples and Conditions were the same as in Fig. 4, but flow rate is 1.6 ml/min.

