イオン交換基を導入した高速水系ゲル汙過クロマトグラフィー用充てん剤の応用

I. 陽イオン交換クロマトグラフィー

海野 益郎[®]，小宮 克夫，渡辺 秀夫^{*}

(1980 年 3 月 17 日受理)

水系のゲル汙過剤にイオン交換基を導入したイオン交換体は、たん白などを中心に幅広く使用されているが、一般に基材が膨潤性を持つものが多い。新しく開発された高速水系ゲル汙過剤にイオン交換基を導入すれば、その担体の非吸着性と物理的安定性から、この分野の高速化に適していると思われる。このような観点から、高速水系ゲル汙過剤 (TSK-GEL G2000SW) に陽イオン交換基を導入し、カテコールアミン、トリプトファン代謝物、そしてアミノ酸など低分子化合物を中心に、その応用について基礎的検討を行い良好な結果を得た。

1 緒 言

水系のゲル汙過クロマトグラフィーでは、デキストランやアクリルアミドを架橋させた充てん剤が多く用いられているが、これにイオン交換基を導入した場合、pH、塩濃度などにより膨潤度が変化し¹⁾、高速液体クロマトグラフィー用充てん剤としては不向きである。一方、多孔性ポリスチレンゲルなどにイオン交換基を導入した場合、pH、塩濃度による膨潤度の変化は小さくなるが、芳香族系の充てん剤であるために、一般的には吸着特異性が問題である。更には、その吸着性を消去するために有機溶媒濃度を大きく変化させグラジエント溶出させる場合、充てん剤の膨潤収縮による寿命上の劣化は避けられない問題である。最近、ポアコントロールされたシリカゲル表面に化学処理を加え、吸着性をなくした高速水系ゲル汙過クロマトグラフィー用充てん剤が開発された²⁾³⁾。著者らは、この充てん剤がたん白質など水溶性化合物を吸着せず、かつ pH、塩濃度、そして添加する種の水溶性有機溶媒濃度の変化による膨潤収縮性がないことに注目して陽イオン交換基を導入し、高速イオン交換クロマトグラフィー用充てん剤を作製した。強陽イオンとしてスルホプロピル基 (以下 SP と略記) を、弱陽イオンとしてカルボキシメチル基 (以下 CM と略記)

を、それぞれ G2000SW の 1 級アルコール基に導入した。イオン交換基の導入によるゲルの膨潤収縮特性の変化は認められなかった。SP 及び CM いずれもイオン交換容量が約 0.3 meq/g のものを用い、それらの特性、応用性についてカテコールアミン、トリプトファン代謝産物、アミノ酸など低分子化合物を用いて検討を行ったので報告する。

2 試薬及び装置

2.1 試 薬

アミノ酸は味の素製の試薬アミノ酸セットを、カテコールアミン、トリプトファン代謝産物は主にシグマ製試薬を用いた。アセトニトリルは和光純薬製特級品を用いた。

2.2 装 置

高速液体クロマトグラフは東洋曹達製 HLC-803A 型に波長可変流動光度計 SF-770 を接続したものである。カラムは内径 4mm、長さ 300mm のステンレス製を使用した。充てんはメタノールを用いたスラリー法 {スラリー濃度 20% v/v、充てん圧力 (250~300)kg/cm²}で行った。

3 実験結果及び考察

3.1 陽イオン交換ゲル

高速水系ゲル汙過クロマトグラフィー用充てん剤 TSK-GEL G2000SW に SP を導入して高速用強陽イ

^{*} 東洋曹達工業(株)東京研究所：神奈川県綾瀬市早川 2743-1

オン交換ゲル IEX-530 SP を, 同様にして高速用弱陽イオン交換ゲル IEX-530 CM を作製した. IEX-510 SP の吸着について, パラヒドロキシ安息香酸類を用いて高速イオン交換クロマトグラフィー用充てん剤としては用いられているスチレン系カチオン交換ゲル TSK-GEL IEX-210 SC(SO₃Na 型)と比較した結果が Fig. 1 である. IEX-210 SC を用いた場合, パラヒドロキシ安息香酸類の溶出容量は, それらのアルキル基の長さに比例して増加している. しかし, IEX-510 SP においては, その増加がほとんど認められない. すなわち, 疎水基に対する吸着力が弱いと考えられる. 従って, 従来の高速イオン交換ゲルではその吸着性のために測定条件の選択が難しい物質の測定が容易となり, たん白などの高速イオン交換クロマトグラフィーへの応用が可能と思われる. 更に溶離液の pH, 塩濃度, そして有機溶媒濃度の変化による膨潤収縮が, Table 1 に示すようには

Fig. 1 Relationship between elution volume and alkyl chain length of *p*-hydroxyalkylbenzoates

HPLC condition—Eluent: 20% CH₃CN/0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), column: —○— IEX-210 SC,

Table 1 Relative volume change of three cation exchanger by salt and methanol

	IEX-510 SP	IEX-530 CM	IEX-210 SC
H ₂ O	1.0	1.0	1.0 ₀
0.2 M NaCl	1.0	1.0	1.0 ₅
CH ₃ OH	1.0	1.0	0.9 ₂

とんど認められない点, 高速用充てん剤として非常に好ましいと言える. 常温常圧において, 純水中での体積を 1.0 として体積の変化を相対比で示した.

3.2 カテコールアミン関連物質への応用

生体内アミンとして重要なカテコールアミン (以下 CA と略記) とその代謝産物について検討を行った. 分配吸着による分離も可能であるが⁽⁴⁾⁽⁵⁾, アミノ基に注目して陽イオン交換により, より CA が安定である酸性領域で分離を検討した. Fig. 2 に 0.1 M リン酸緩衝液 (0.1 M リン酸水素二ナトリウム水溶液に濃リン酸を加えて, PH を調整) を用いた場合の pH と溶出容量との関係を示す. アミノ酸である DOPA は CA と異なり, pH 3.5 以下になってはじめて保持されるようになる. エピネフィリン (E), メタネフィリン (M), ノルエピネフィリン (NE), 及びノルメタネフィリン (NM) の溶出容量とリン酸緩衝液 (以下 PB と略記) 濃度との関係を Fig. 3 に示す. 各成分の傾向はほぼ同じであるが, アセトニトリル濃度の影響をみると全般的にキャパシティ比は小さくなるが, その程度は成分によって異なり, これら 6 成分の組み合わせでは, アセトニトリル濃度が 9% 前後で相互分離の点で最適となる. 以上の結果から良好な分離が得られると考えられる 0.05 M PB (pH 3.0), 8.5% アセトニトリルにて測定した結果が Fig. 4 である. 同様にして IEX-530 CM でも検討を

Fig. 2 Effect of pH of eluent on elution volume of catecholamines

HPLC condition—Column: IEX-510 SP, eluent: 0.1 M phosphate buffer; Sample—1: Dopa, 2: epinephrine, 3: methanephrine, 4: normethanephrine, 5: norepinephrine, 6: dopamine

Fig. 3 Effect of concentration of phosphate buffer and acetonitrile on elution volume of catecholamines

HPLC condition—Column : IEX-510 SP, eluent : A % CH_3CN /B M phosphate buffer (pH 3.0); Sample—1 : Dopa, 2 : methanephrine, 3 : epinephrine, 4 : normethanephrine, 5 : norepinephrine, 6 : dopamine

Fig. 4 Separation of catecholamines by IEX-510 SP

HPLC condition—Column : IEX-510 SP, column size : 4 mm i.d. $\times$ 30 cm, eluent : 8.6 % CH_3CN /0.05 M phosphate buffer (pH 3.0), flow rate : 1 ml/min, detector : 280 nm; Sample—1 : Dopa, 2 : methanephrine, 3 : epinephrine, 4 : normethanephrine, 5 : norepinephrine, 6 : dopamine

行った。CM 型は弱陽イオン交換ゲルであるため、CM 基の解離状態を把握する必要がある。Fig. 5 に 0.025 M PB (pH 3.0) での分離例を示す。6 成分の同時分離の点では、IEX-510 SP のほうが適していると考えられる。

3.3 アミノ酸、トリプトファン代謝物への応用

DOPA の挙動からアミノ酸の分離には、CM 型より SP 型のほうが適していることが分かる。スチレン系の

Fig. 5 Separation of catecholamines by IEX-530 CM

HPLC condition—Column : IEX-530 CM, column size : 4 mm i.d. $\times$ 30 cm, eluent : 0.025 M phosphate buffer (pH 3.0), flow rate : 0.8 ml/min, detector : 280 nm; Sample—1 : Dopa, 2 : epinephrine, 3 : norepinephrine, 4 : dopamine

カチオン交換用充てん剤に比較して SP 型のイオン交換容量は小さいためアミノ酸の分離にとって最適と言えないが、逆に塩基性アミノ酸、ポリアミン、そして塩基性オリゴペプチドなど強塩基化合物の溶出は容易である。更にその非吸着性も合わせ、インドール骨格を有するトリプトファン代謝産物、芳香性アミノ酸に富んだオリゴペプチドにも有用と考えられるので、これらの化合物について次に検討した。前述の DOPA の溶出挙動と同様塩基性アミノ酸は、IEX-510 SP を用いた場合、pH 3.5 付近より酸性になるに従って溶出容量は急速に大きくなるのに対し、トリプトファン代謝産物は相対的にその効果は小さい。一方、アセトニトリルの添加に対しては塩基性アミノ酸が比較的影響を受けない傾向であるのに対し、芳香族系のトリプトファン代謝産物は添加量が増加するのに従って極めて大きな影響を受ける (Fig. 6)。このように pH、有機溶媒の添加によりその溶出容量は大きく変化させることができる。スチレン-ジビニルベンゼンゲルを基材としたスルホン酸型イオン交換樹脂は大きなイオン交換容量を持ち、かつ有機溶媒の大量添加が困難であることを考慮すると、セロトニンなどを溶出させるのに極めて高い濃度が必要である⁶⁾。これに対し、IEX-510 SP においては比較的容易に溶出でき、かつ溶出容量を pH、有機溶媒の添加量でコントロールしやすい特徴を持っている。一方 IEX-530 CM の場合、充てん剤自身の解離の状態が影響を受ける酸性領域では、塩基性アミノ酸、トリプトファン代謝産物とも pH の効果は小さく、溶出挙動及び順序も SP のときと比較すると極めて大きな差異がみられる (Fig. 7)。SP の場合 pH 3.5 以下で大きなキャパシティー比となる

Fig. 6 Effect of pH and acetonitrile concentration on elution volume

HPLC condition—Column : IEX-510 SP, eluent : A % CH_3CN /0.1 M phosphate buffer (pH B); Sample—1 : Indoleacetic acid, 2 : indole, 3 : tryptophan, 4 : serotonin, 5 : tryptamine, 6 : lysine, 7 : arginine

Fig. 7 Effect of pH and concentration of acetonitrile and phosphate buffer on elution volume of basic amino acids and tryptophan metabolites with IEX-530 CM

HPLC condition—Column : IEX-530 CM, eluent : A % CH_3CN /B M phosphate buffer (pH 2.5, 3.0, 3.5); Sample—1 : Arginine, 2 : tryptophan, 3 : serotonin, 4 : indoleacetic acid, 5 : 5-methoxytryptamine, 6 : tryptamine, 7 : indole

アルギニンは CM の場合ほとんど保持されていない。CM の場合インドールが特異的に保持されているが、アミノ基を有するセロトニン、トリプタミンなどは SP の

場合と同様な溶出挙動を示している。キヌレン酸、インドールピルビン酸などについてはほぼインドール酢酸と同様な挙動を示しており、いずれも、SP 及び CM での溶出挙動はインドールと同様な傾向を示している。アセトニトリルの効果は、トリプトファン代謝産物及び塩基性アミノ酸いずれも SP の場合と同様であった。このように CM と SP は挙動において差異が認められ、目的に応じ応用が可能と思われる。Fig. 8 に前述の検討の結果良好と考えられる溶離液でトリプトファン代謝産物を IEX-530 CM で測定したクロマトグラムを示す。更にペプチドの場合、これらの充てん剤は、比較的保持されやすい前述の塩基性アミノ酸あるいは芳香族系のアミノ酸を含むペプチドだけでなく中性アミノ酸で構成されるペプチドへの応用も可能であり、ジペプチドの分離を例に Fig. 9 にそのクロマトグラムを示す。

Fig. 8 Separation of tryptophan metabolites by IEX-530 CM

HPLC condition—Column : IEX-530 CM, column size : 4 mm i.d. $\times$ 30 cm, eluent : 15 % CH_3CN /0.1 M phosphate buffer (pH 3.5), flow rate : 0.8 ml/min, detector : 280 nm; Sample—1 : Tryptophan, 2 : *N*-acetyl 5-hydroxytryptamine, 3 : 5-hydroxy tryptophal, 4 : indoleacetic acid, 5 : indole pyruvic acid, 6 : serotonin, 7 : 5-methoxytryptamine, 8 : tryptamine, 9 : indole

Fig. 9 Separation of dipeptides by IEX-510 SP

HPLC condition—Column: IEX-510 SP, column size: 4 mm i.d.×30 cm, eluent: 0.05 M phosphate buffer (pH 2.85), flow rate: 0.8 ml/min, detector: 210 nm; Sample—1: Leu, 2: Leu-Ala, 3: Leu-Val, 4: Val-Leu, 5: Leu-Leu, 6: Met-Leu

4 結 語

イオン交換ゲルと試料との相互作用には種々の要因があり、試料によって pH の影響、塩濃度の効果、有機溶媒の添加効果は異なってくると考えられる。従って、これらの条件を適切に選択できることが前提となるが、今回検討した充てん剤は原基材がシリカゲルであるため pH 範囲は狭いが（一般に pH 2~9）、塩濃度、有機溶媒の添加における自在性においては優れており、これらが分離のポイントである場合は有利であろう。又、直接の基材が高速ゲル透過用充てん剤であるため吸着性が少なく溶離液を考えるうえで簡便であると同時に、更に大きい孔径を持つ充てん剤にイオン交換基を導入すればたん白などのように比較的分子サイズの大きな化合物へも適用が可能と思われる。

(1979 年 4 月, The ACS/CSJ Chemical Congress において一部発表)

文 献

- 1) A guide to ion exchange chromatography: Pharmacia Fine Chemicals.
- 2) S. Rokushika, T. Ohakawa, H. Hatano: U.S.-Japan Seminar on Advanced Techniques of Liquid Chromatography, University of Colorado (1978).

- 3) K. Fukano, K. Komiya, H. Sasaki, H. Hashimoto: *J. Chromatogr.*, **166**, 47 (1978).
- 4) L. D. Mell, Jr., A. R. Dasler, A. B. Gustafson: *J. Liq. Chromatogr.*, **1**, 261 (1978).
- 5) T. P. Davis, C. W. Gehrke, Jr., T. D. Cunningham, K. C. Kuo, K. O. Gerhardt, H. D. Johnson, C. H. Williams: *Clin. Chem.*, **24**, 1317 (1978).
- 6) 吉田久信, 中嶋暉躬: 生化学, **50**, 588 (1978).

☆

Application of ion exchangers prepared by introduction of ion exchange groups into packings for high performance aqueous gel permeation chromatography; I. Cation exchange chromatography. Masuo UMINO, Katsuo KOMIYA and Hideo WATANABE (Tokyo Research Laboratories, Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., 2743-1, Hayakawa, Ayase-shi, Kanagawa)

The elution behavior of amino acids, dipeptide, and metabolites of catecholamines or tryptophan was studied by cation exchange chromatography with new types of cation exchangers. Two kinds of cation exchangers (IEX-530 CM and IEX-510 SP) were respectively prepared by binding carboxymethyl and sulfopropyl group onto the surface of hydrophilic packings (TSK-GEL G2000SW; Toyo Soda Manufacturing Co.) for high performance aqueous gel permeation chromatography. These new types of exchangers had no adsorption of hydrophilic compounds and showed no volume change by pH and the salt or organic solvent concentrations in the same manner as the original packings which were prepared by chemical treatment of pore controlled silica support. These exchangers were applied to the separation of low molecular weight compounds. By the addition of acetonitrile to the eluent (phosphate buffer), the best separations were attained for catecholamines and their metabolites by using the exchanger IEX-510 SP and for tryptophan metabolites by the exchanger IEX-530 CM.

(Received Mar. 17, 1980)

Keywords

Catecholamines
Cation exchange chromatography
Dipeptides
High performance liquid chromatography
Tryptophan metabolites