



TOSOH

# SEPARATION REPORT

## 高速液体クロマトグラフィによる 核酸関連化合物の測定

### —— 目 次 ——

	ページ
1. 種類	1
2. 性質	1
3. HPLCの測定条件の設定	2
3-1 GFC(ゲル濾過クロマトグラフィ)	2
3-2 IEC(イオン交換クロマトグラフィ)と RPC(逆相クロマトグラフィ)	4

## 1. 種類 (表-1)

グループ	化合物
A	核酸塩基と代謝物(アデニン、グアニン、 キサンチン、尿酸…)
B	ヌクレオシド(アデノシン、グアノシン、 シチジン…)
C	ヌクレオチド(AMP、ATP、GTP、 Cyclic AMP…)
D	ポリヌクレオチド(DNA、RNA)

## 2. 性質

左記化合物の化学的性質の中で忘れてはならないものに、解離定数 (pka) がある。すなわちpHによりカチオンあるいはアニオン性が異なる点である。従って紫外吸収スペクトルもpHにより変化する。

図1に構造とpkaの関係を、表2に解離定数を、そして、図2に紫外吸収スペクトルを示す。

Dグループは他に比較して分子量が大きくなるために同一に考えない方が好ましいであろう。

表2 各種塩基の解離定数 (pKa'で示す) ※

	$-N^+H_3$ (アミノ基)	$\begin{matrix} H & O \\   &    \\ -N- & C- \\ 1 & 6 \end{matrix} \text{ ※※}$	$\begin{matrix} H & O \\   &    \\ -N- & C- \\ 3 & 2 \end{matrix}$	$-NH-$ (イミダゾール基)
ウ ラ シ ル		9.45, 9.5		
1-メチルウラシル		9.99		
3-メチルウラシル		9.71		
チ ミ ン		9.82, 9.9		
シ ト シ ン	4.6, 4.45		12.16	
5-メチルシトシン	4.8, 4.6		12.4	
イ ソ シ ト シ ン	4.01	9.42		
ア デ ニ ン	4.15, 4.12, 4.16, 4.22			9.8
グ ア ニ ン	3.3, 3.2	9.2, 9.6, 9.36		12.3
キ サ ン チ ン		7.7		
1-メチルキサンチン			7.7	12.05
3-メチルキサンチン		8.5, 8.1		11.3
7-メチルキサンチン		8.5, 8.1		
9-メチルキサンチン		6.3, 6.25		
ヒ ポ キ サ ン チ ン		8.8, 8.7, 8.9		12

※ D. O. Jordan, "The Chemistry of Nucleic Acids," P.135, Butterworths (1960)

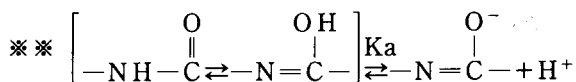


図1 核酸塩基の構造とpKa値

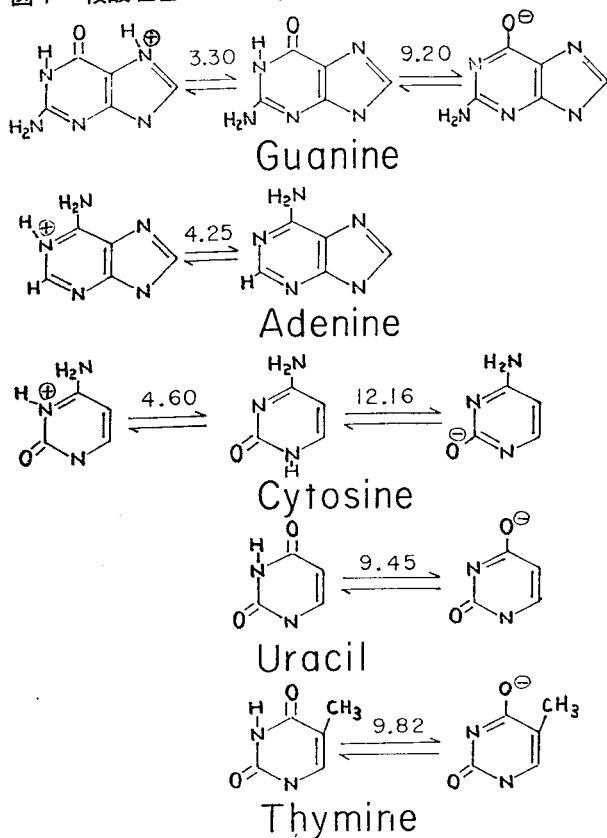
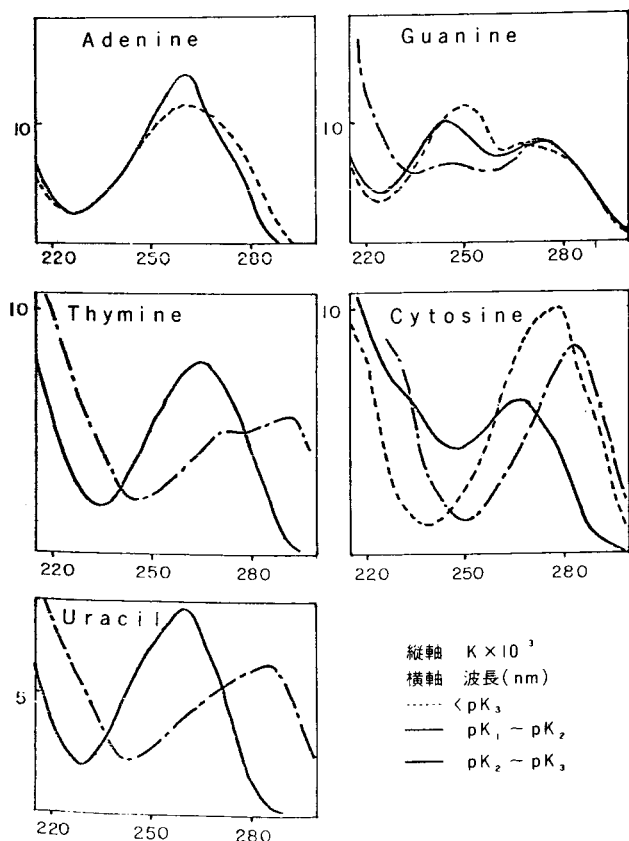


図2 核酸塩基の紫外吸収スペクトル



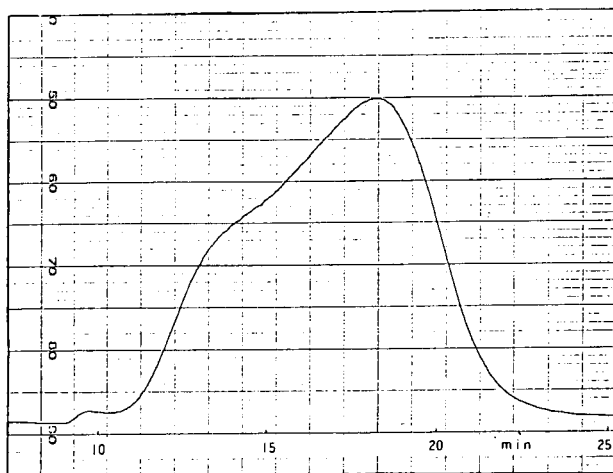
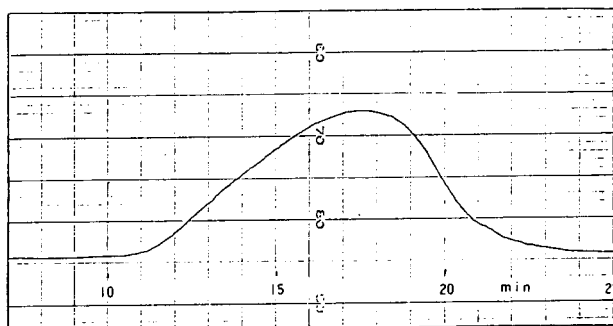
### 3. HPLCの測定条件の設定

HPLCの分離モードとしてGFC(Gel filtration chromatography)、IEC (Ion Exchange C.) そしてRPC (Reverse Phase C.) があるが、GFCは分子サイズで、IECはイオン性と極性で、そしてRPCは極性にて分離を行っていると考えてよい。従って、分離モード別に考えていくのもひとつの方法である。

#### 3-1 GFC (ゲル濾過クロマトグラフィ)

GFC用充填剤としては、TSK-GEL SWタイプ、PWタイプ、そしてトヨパールがあり、この中でトヨパールは中速液体クロマトグラフィ用のゲルであるので省くが、PWタイプとほぼ同じ性質を持つゲルである。PWタイプは、ポリマ系の充填剤でありTSKgel G2000PWからTSKgel G6000PWと分画範囲の異なるグレードが5種類

図3 市販DNA



カラム; TSKgel G5000PW

(7.5mm×60cm)

溶離液; 0.2Mクエン酸緩衝液 (pH7.0)

+0.4M NaCl

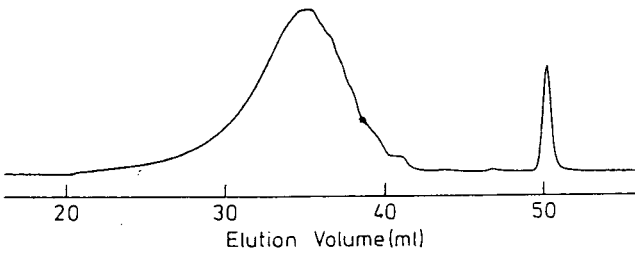
流速; 0.95ml/min

温度; 23°C

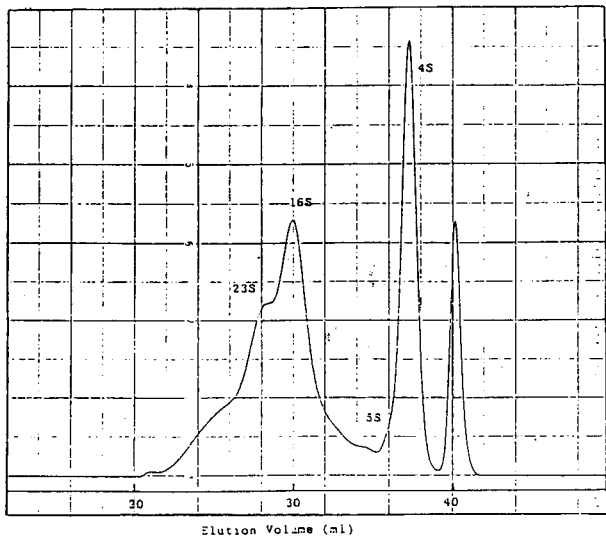
検出; UV (260nm)

あり、特に分子量の高いDNAの測定に有利である。SWタイプはシリカ系の充填剤でありTSKgel G2000SWからTSKgel G4000SWの3グレードがあり、特にRNA(DNAより分子量が低い)のように分子量の低い場合に有利である。図3に分子量の高いDNAの測定例を、図4に分子量の低いDNAの測定例を示す。

図4(1)

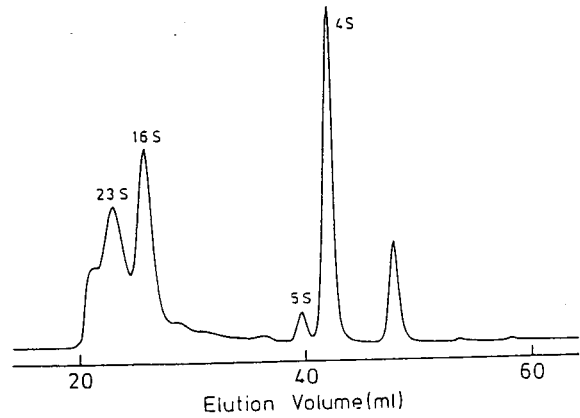


Elution curve of "DEOXYRIBONUCLEIC ACID, DEGRADED FREE ACID from HERRING SPERM Type IV" obtained by gel filtration on TSKgel G2000SW(120 x 0.75 cm I.D.) in 0.1 M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl(pH 7.0) at a flow rate of 1 ml/min at 25°C.

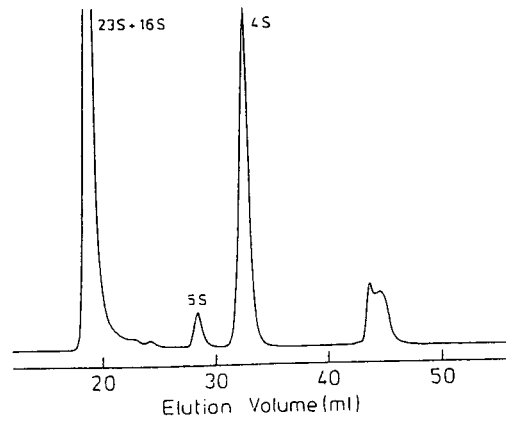


Elution curve of "TOTAL E. Coli RNA" obtained by gel filtration on TSKgel G5000PW(120 x 0.75 cm I.D.) in 0.1 M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl (pH 7.0) at a flow rate of 1 ml/min at 25°C.

図4(2)



Elution curve of "TOTAL E. Coli RNA" obtained by gel filtration on TSKgel G4000SW(120 x 0.75 cm I.D.) in 0.1 M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl(pH 7.0) at a flow rate of 1 ml/min at 25°C.

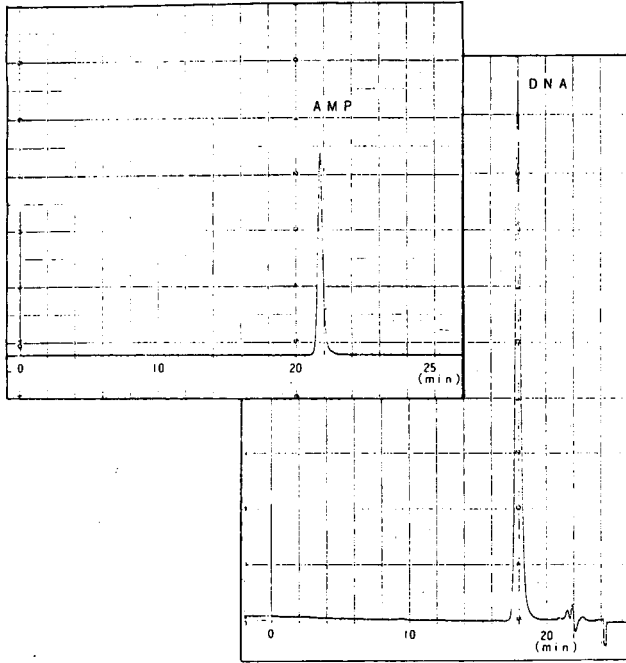


Elution curve of "TOTAL E. Coli RNA" obtained by gel filtration on TSKgel G3000SW(120 x 0.75 cm I.D.) in 0.1 M phosphate buffer containing 0.1 M NaCl(pH 7.0) at a flow rate of 1 ml/min at 25°C.

PWタイプ、SWタイプのいずれも水系のゲル透過用充填剤として開発されたもので、疎水的な吸着性あるいはイオニックな吸着性の点で優れていることが理解できる。図3において0.4M NaClを添加しているが、これはDNA自身アニオン性が強いために生じるとされる分子内でのイオン反発を抑える目的で添加している。図5にDNA(d-CCAGT CCATTC)とAMPの測定例を示す。溶離液に20%のアセトニトリルを添加しているが、溶離液の粘度が低下する方向であり、分離の面で好ましい。メタノールの場合は粘度が上昇する方向になり、このような目的にはアセトニトリルが好ましい。分取精製の点を考慮して揮発性の高いギ酸アンモニウムを使用し

ている。Cグループに属するAMPは、A、Bグループに比較して、リン酸基がある関係で親水性が高いためにTSKgel G2000SWに対し、疎水的な相互作用を示しにくい。B及びAグループの化合物は疎水的な相互作用を示す場合がある。図6に1例を示す。(薬学雑誌、98(8)、1978から引用) pH4.3での測定であるがpH5での試料の極性を把握できる。すなわちRPC用の充填剤を用いた場合、アデノシンが強く保持される傾向にありRPCの条件設定の指標になるが、以上の結果から、極性の強さの点でDグループ $\geq$ C>B $\geq$ Aグループということが言えると思われる。

図5 DNAシーケンス d-CCAGATCCATTC



カラム ; TSKgel G2000SW  
(7.5mm×60cm)

溶離液 ; 20% CH<sub>3</sub>CN in 0.3M 塩酸アンモニウム (pH6.9)

流速 ; 1.0ml/min

圧力 ; 28kg/cm<sup>2</sup>

温度 ; 23°C

検出 ; UV (260nm)

試料 ; AMP, DNA

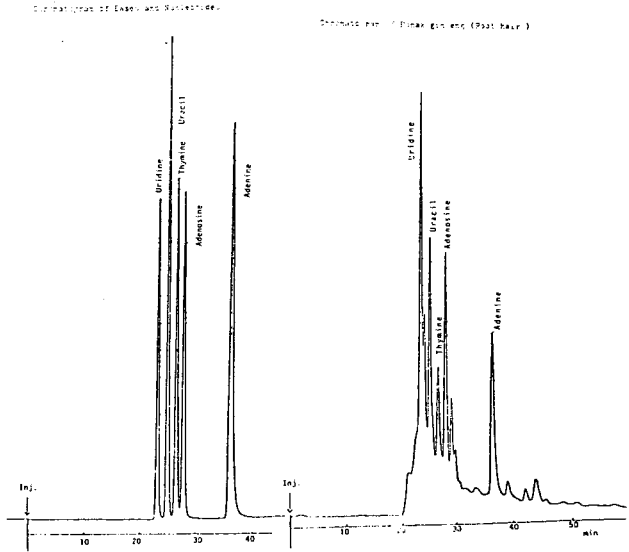
### 3-2 IEC (イオン交換クロマトグラフィ) とRPC (逆相クロマトグラフィ)

図1、表2より例えばグアニンはpH3.3以下でカチオン性を示すために、カチオン交換クロマトグラフィ(CEC)が適応可能であり、pH9.2以上でアニオン交換クロマトグラフィ(AEC)が可能である。pH3.3~pH9.2の間では、解離しないために主に分配吸着クロマトグラフィが適していると言えるであろう。

表3に、CECでのpHと溶出容量(V<sub>R</sub>)との関係を示した。TSKgel G2000SWにスルホプロピル基(SP)を導入したTSKgel SP-2SWでの結果であるが充填剤と溶質との疎水的相互作用を抑える目的と粘度を下げる目的で20%のCH<sub>3</sub>CNを添加している。表3から次のことが理解できる。

- (1) GFCのところで述べた極性の大きいCグループは保持されず、特にジホスフェート類は排除されている。

図6



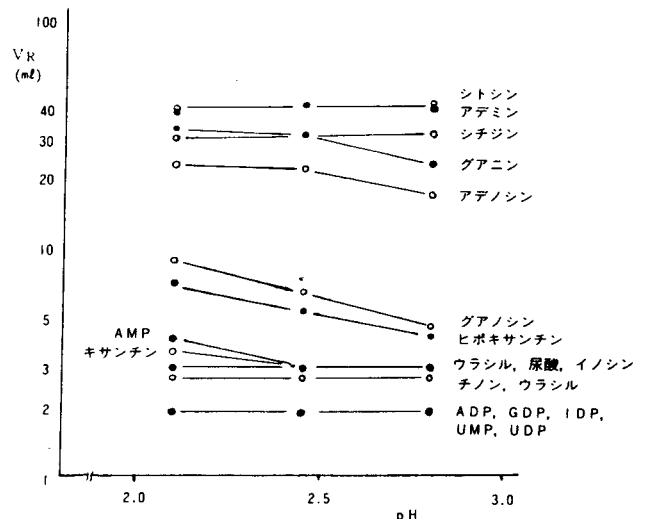
カラム ; TSKgel G2000SW  
(7.5mm×60cm)

溶離液 ; 0.3% CH<sub>3</sub>COOH  
0.3% (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N in H<sub>2</sub>O

流速 ; 0.74ml/min

検出 ; UV (260nm)

表3 pHの影響



カラム ; TSKgel SP-2SW  
(4mm×30cm)

溶離液 ; 20% CH<sub>3</sub>CN in 0.02M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

流速 ; 0.8ml/min

温度 ; 23°C

検出 ; UV (260nm)

(2) 図1においてカチオン性を示さないチミン、ウラシルは保持されない。

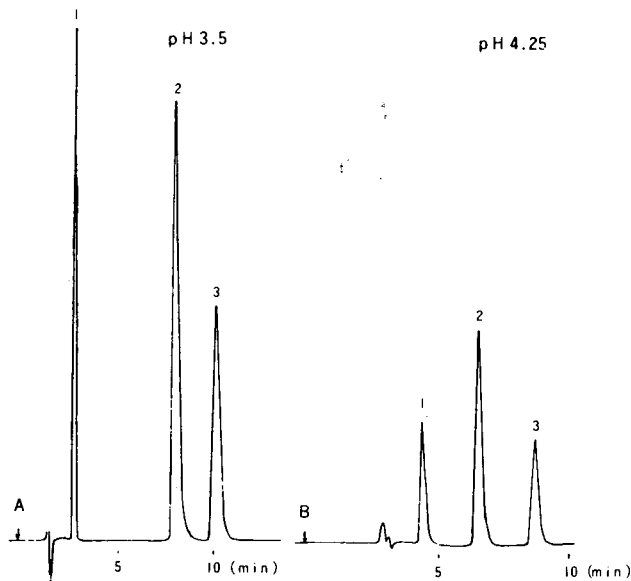
(3) 図1においてカチオン性を示すシトシン、アデニン、グアニンは保持されるとともに、そのヌクレオシド類の溶出容量はそれぞれ小さくなっている。

従ってCECは特にシトシン、アデニン、グアニンとそれぞれのヌクレオシドの測定に有用であると言える。

これらの測定例を図7、図8に示す。

以上酸性領域でのCECの結果であるが中性領域ではRPCが有用である。一般にRPCは元来汎用性が高いモードであるが、イオン対クロマトグラフィの導入により、イオン交換モードの代替も可能である。

図7



カラム；TSKgel SP-2SW  
(4mm×30cm)

溶離液；A. 0.1Nクエン酸ナトリウム+濃リン酸(pH3.5)  
B. 0.1Nクエン酸ナトリウム+濃酢酸(pH4.25)

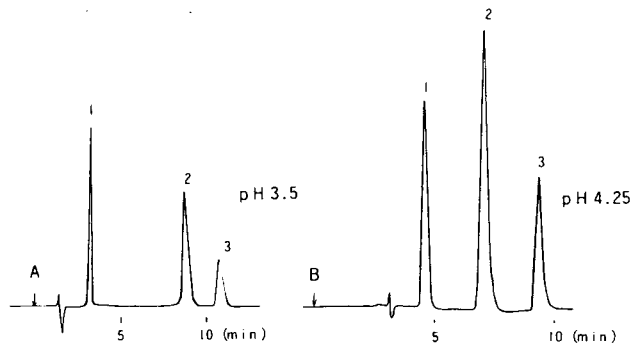
流速；0.75ml/min

温度；23°C

検出；UV (260nm)

試料；1. グアノシン  
2. シチジン  
3. アデノシン

図8



カラム；TSKgel SP-2SW  
(4mm×30cm)

溶離液；A. 0.1Nクエン酸ナトリウム+濃リン酸(pH3.5)  
B. 0.1N酢酸ナトリウム+濃酢酸 (pH4.25)

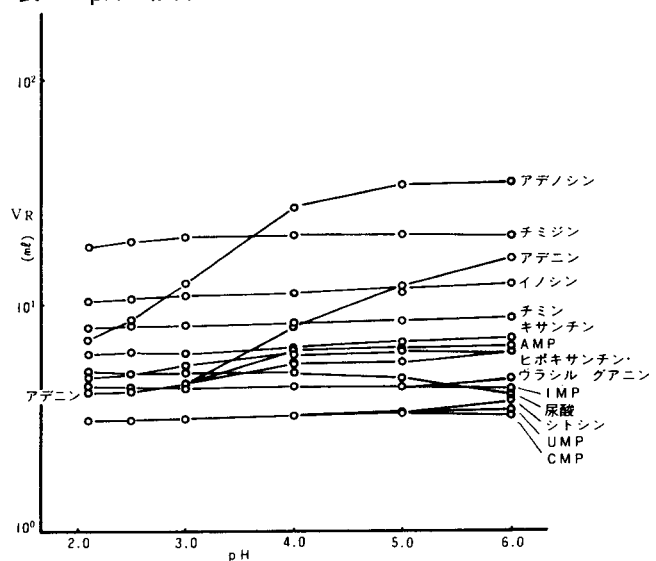
流速；0.75ml/min

温度；23°C

検出；UV (260nm)

試料；1. デオキシグアノシン  
2. デオキシアデノシン  
3. デオキシシチジン

表4 pHの影響



カラム；TSKgel ODS-120A  
(4mm×30cm)

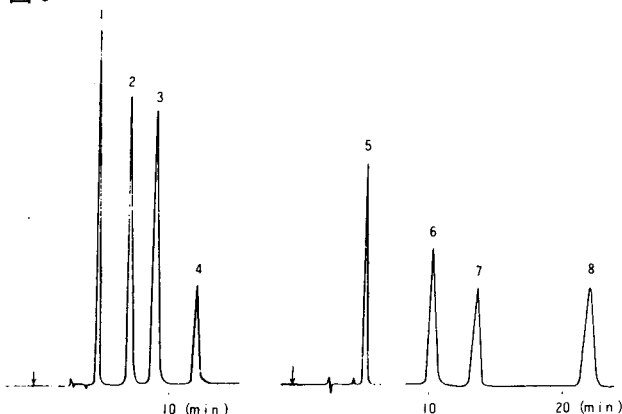
溶離液；2% CH<sub>3</sub>CN in 0.1M Phosphate Buffer  
(0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+0.1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

表4にRPC用充填剤TSKgel ODS-120Aを用いた時のpHと溶出容量( $V_R$ )の関係を示す。親水性の高いヌクレオチド類は充填剤に保持されずにはやく溶出するが、特にアデニン、アデノシンのpH依存性が顕著に理解できる。すなわち、保持力の点からは中性領域が好ましいと言える。

図9～図11に測定例を示す。

図9はpH2.5での測定例であるが成分の組み合わせにより短時間分析が可能である。図10は $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH4.2)での測定例である。

図9



カラム；TSKgel ODS-120A

(4mm×30cm)

溶離液；2%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 0.025M Phosphate Buffer

(pH2.5)

流速；0.92ml/min

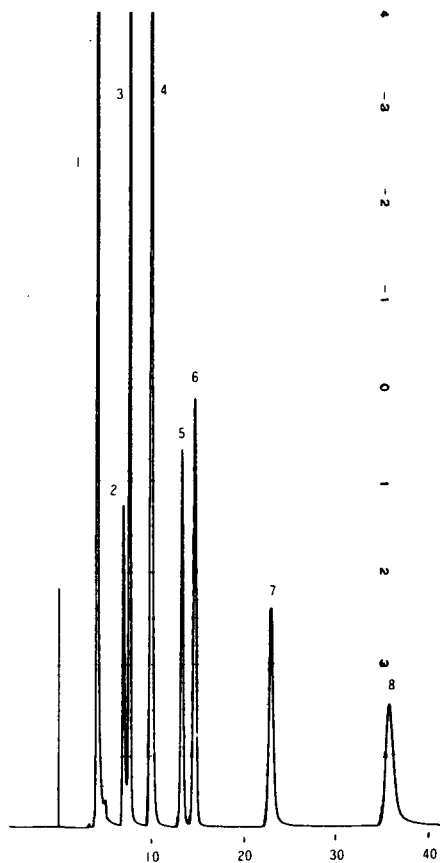
圧力；125kg/cm<sup>2</sup>

検出；UV (260nm)

サンプル；1. シチジン、2. ウリジン、3. アデノシン、4. グアノシン、5. デオキシシチジン、6. デオキシアデノシン、7. デオキシグアノシン、8. デオキシチミジン

図11にテトラブチルアンモニウム塩 (TBA) の添加効果を示した。解離している化合物は充填剤 (この場合 TSKgel ODS-120A) に保持されにくいのが、イオン対試薬の添加により尿酸、ATPがイオン対を形成し、見かけ上解離が抑えられるため強く保持されるようになっている。しかしながらヒポキサンチン、キサンチン、イノシンに対しては逆の効果 (例えばイノシン分子にテトラブチルアンモニウムイオンの疎水部が配位し、親水部が表面にでるためか) により溶出が速くなっている。従って、イオン対試薬の添加には注意が必要である。図12に同じく TBAの添加例を示す。後述するAECでも分離する組み

図10



カラム；TSKgel ODS-120A

(4mm×30cm)

溶離液；2%  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 0.1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

流速；0.8ml/min

温度；23℃

検出；UV (260nm)

サンプル；1. シトシン、2. ヒポキサンチン、3. ウリジン、4. チミン、5. イノシン、6. グアノシン、7. チミジン、8. アデノシン

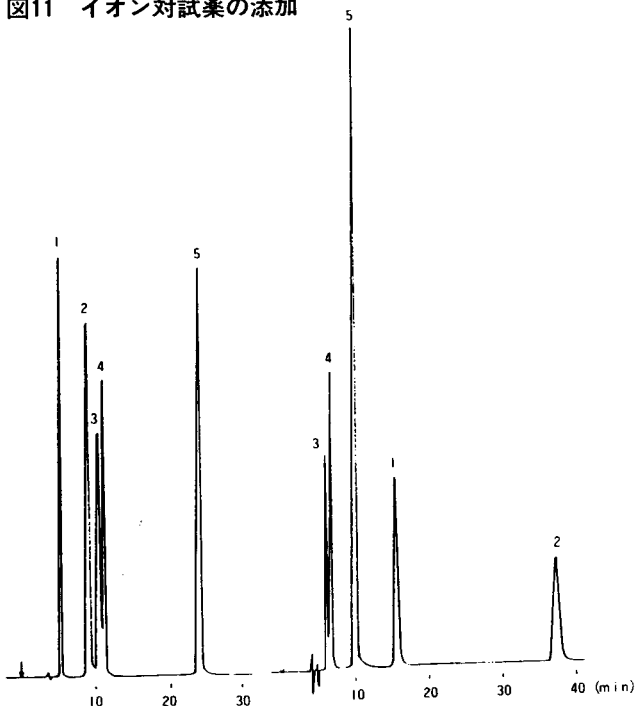
合せであるが、ODSカラムの汎用性を示す一例である。

アニオン性を示す化合物には、カチオン性のイオン対試薬 (PIC試薬、PIC: Paired Ion Chromatography) の添加を行うが、逆にカチオン性を示す化合物にはアニオン性のイオン対試薬の添加が有効である。

図13にヘキサンスルホン酸塩の添加例を示す。

pH2.5の場合表3よりCECにおいてヒポキサンチンは保持されているが尿酸及びキサンチンは保持されていない。表4よりRPCにおいては、尿酸とヒポキサンチンの分離が好ましくない。

図11 イオン対試薬の添加



カラム ; TSKgel ODS-120A

(4mm×30cm)

溶離液 ; A. 2% CH<sub>3</sub>OH in 0.05M Phosphate Buffer

(pH6.5)

B. A+5 mAテトラブチルアンモニウムホスフェート

流速 ; 0.8ml/min

圧力 ; 90kg/cm<sup>2</sup>

温度 ; 23°C

検出 ; UV (260nm)

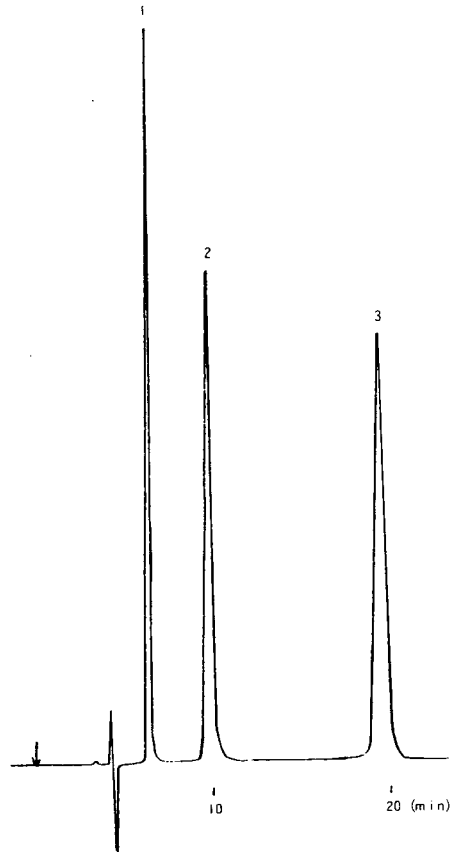
試料 ; 1. 尿酸、2. AMP、3. ヒポキサンチン、

4. キサンチン、5. イノシン

以上の結果より、上記3成分の定量条件としてはRPCでのヒポキサンチンの溶出容量の調整が容易なイオン対クロマトグラフィも考えられる。小島\*等はさらに詳細な検討を行いpH2.2においてRPCで上記3成分を含むプリン塩基代謝物の相互分離が可能であることを見出し、血清、尿中のプリン塩基代謝物の定量を行っている。

つづいてアルカリ領域での測定について述べるが、RPCに用いられているシリカ系充填剤は、アルカリ領域での寿命の問題で注意が必要である。すなわちpH 2~8が好ましいとされている関係で、特にpH 8以上での測定例は少ない。ここでは充填剤の劣化を覚悟して実験した結果を紹介するが、使用後カラムを洗浄することにより

図12



カラム ; TSKgel ODS-120A

(4mm×30cm)

溶離液 ; 10% CH<sub>3</sub>OH in 0.02M Phosphate Buffer

(pH2.5)+0.02M TBAP

試料 ; 1. d-UMP、2. TMP、3. Iodo-d-UMP

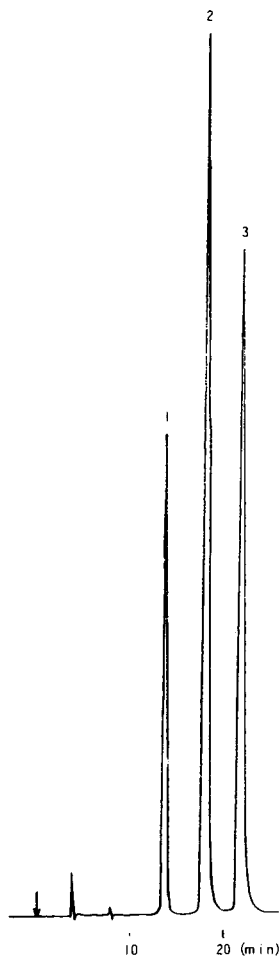
寿命の延長は期待できると考えている。表2に示したようにプリン骨格及びピリミジン骨格を持つ化合物はアルカリ領域において、アニオン性を示す。従ってアルカリ領域でカチオン性イオン対試薬を用いるPICあるいはAECの適用が可能である。

図14にpH8.5におけるイオン対試薬の種類による溶出容量の変化を示した。TBAに比較して、セチルトリメチルアンモニウム塩(CMA)は疎水部が大きいためイオン対を形成する化合物の溶出容量は増大する傾向にあり、特にヌクレオチドは顕著である。

AECでの測定例を図15に示す。この条件ではヌクレオチドの溶出に時間がかかるために省いてある。TSKgel QAE-2SWはTSKgel G2000SWに第四級アンモニウムを導入した強カチオン交換用充填剤である。シリカ系の充填剤であるので前述のように好ましいpHとは言い難いが、AECにおけるアルカリ領域で忘れてならないこと



図13



カラム ; TSKgel ODS-120A

(4mm×30cm)

溶離液 ; 1% CH<sub>3</sub>CN in 0.02M Phosphate Buffer  
(pH2.5)+0.01M Sodium Hexanesulfonate

流速 ; 0.7ml/min

温度 ; 23°C

検器 ; UV (260nm)

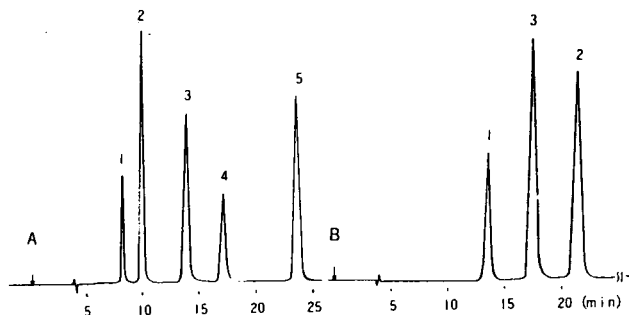
試料 ; 1. 尿酸(0.5μg)、2. キサンチン(0.25μg)、  
3. ヒポキサンチン (0.25μg)

は、充填剤の官能基の解離状態の変化である。試料はpHが高くなる程アニオン性が強くなるが、逆にイオン交換基の解離は弱くなる方向であり、配慮する必要がある。

テトラメチルジアミノプロパンは緩衝効果の点及び再現性の点(ナトリウム型のリン酸緩衝液に比較して再現性が良い)で使用している。

ヌクレオチドの測定には、AECが汎用されているがスチレン系イオン交換体はイオン交換的な相互作用の他に疎水的吸着作用が強いため、一般にピークが広がる傾向を示す。図16にシリカ系充填剤との比較例を示す。

図14



カラム ; TSKgel ODS-120A

(4mm×30cm)

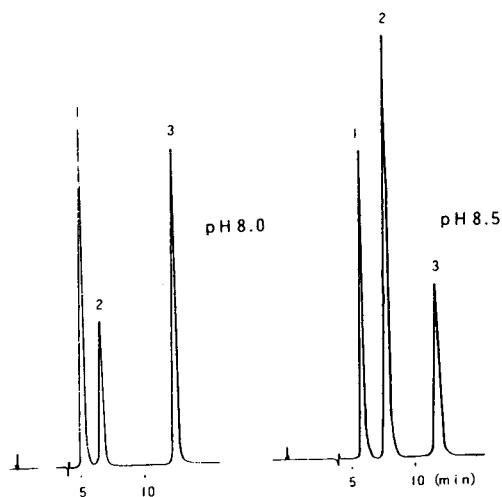
溶離液 ; 2% CH<sub>3</sub>CN in A・B

A. 0.02M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+0.02M TBA pH8.5

B. 0.02M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+0.02M CMA pH8.5

試料 ; 1. ヒポキサンチン、2. キサンチン、3. イノシン、4. IMP、5. AMP

図15



カラム ; TSKgel QAE-2SW

(4mm×30cm)

溶離液 ; 0.02M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+テトラメチルジアミノプロパン

流速 ; 0.8ml/min

圧力 ; 90kg/cm<sup>2</sup>

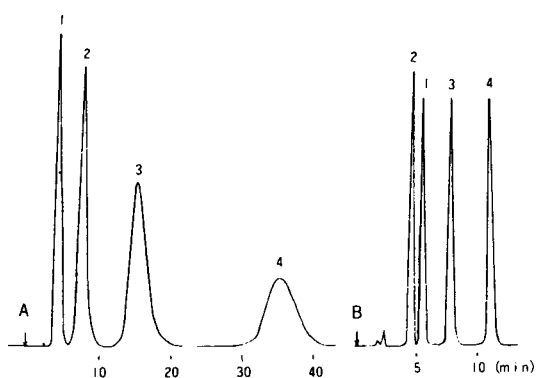
温度 ; 23°C

検出 ; UV (260nm)

試料 ; 1. イノシン、2. ヒポキサンチン、3. キサンチン

イオン交換容量は前者の方が約10倍程度大きいために0.1M NaClが添加されている。従って短時間での高分離を目的とする場合疎水的な相互作用を示さないシリカ系充填剤の方が有利である。ヌクレオチドに限定すれば、アルカリ領域で測定する利点もなく、さらにイオン交換容量が低い点使い易い充填剤と言える。図17に図12と同一試料のAECで測定例を示す。図18にヌクレオチド類の測定例を図19にDNA (d-TCGAGCATAATA) の測定例を示す。20%CH<sub>3</sub>CNを添加しているが特に図18においては溶離液の粘度の低減の効果だけでなく分離に大きく寄与している。

図16 スチレン系弱アニオン交換ゲル (TSKgel SAX)  
シリカ系弱アニオン交換ゲル (TSKgel DEAE-2SW)



溶離液；A. M/15Phosphate Buffer (pH6.9)  
+M/1cNaCl  
B. M/15Phosphate Buffer (pH6.9)

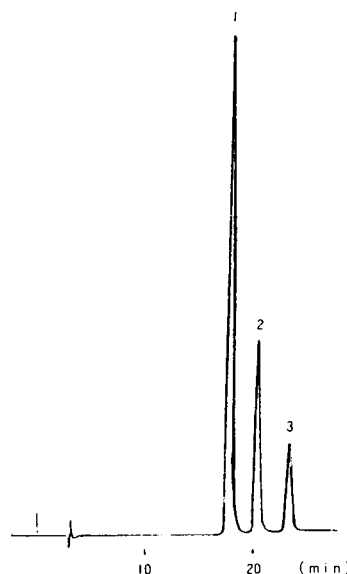
流 速；0.6ml/min

温 度；23°C

検 出；UV (254nm)

試 料；1. シトシン、2. ウラシン、3. チミン、  
4. アデニン

図17



カラム；TSKgel DEAE-2SW  
(4mm×30cm)

溶離液；20% CH<sub>3</sub>CN in 0.025M Phosphate Buffer  
(pH5.5)

流 速；1.0ml/min

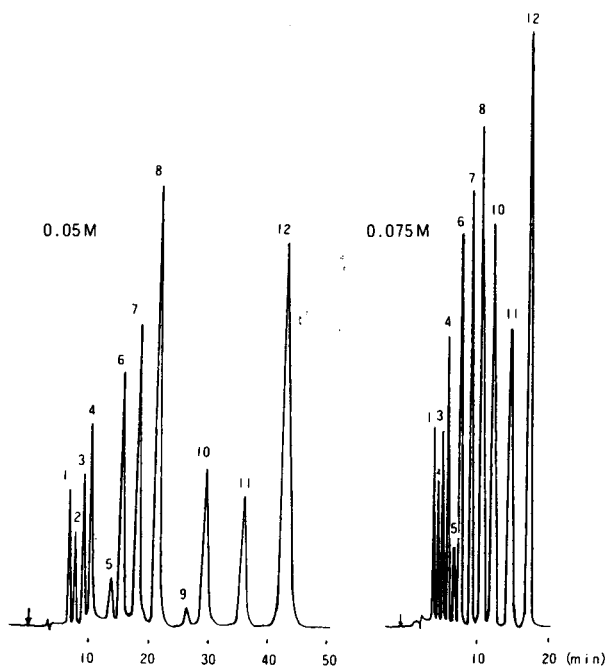
圧 力；140kg/cm<sup>2</sup>

温 度；23°C

検 出；UV (260nm)

試 料；1. TMP、2. d UMP、3. Iodo d UMP

図18



カラム；TSKgel DEAE-2SW  
(4mm×30cm)

溶離液；20%CH<sub>3</sub>CN in Phosphate Buffer (pH7.0)

流速；1.0ml/min

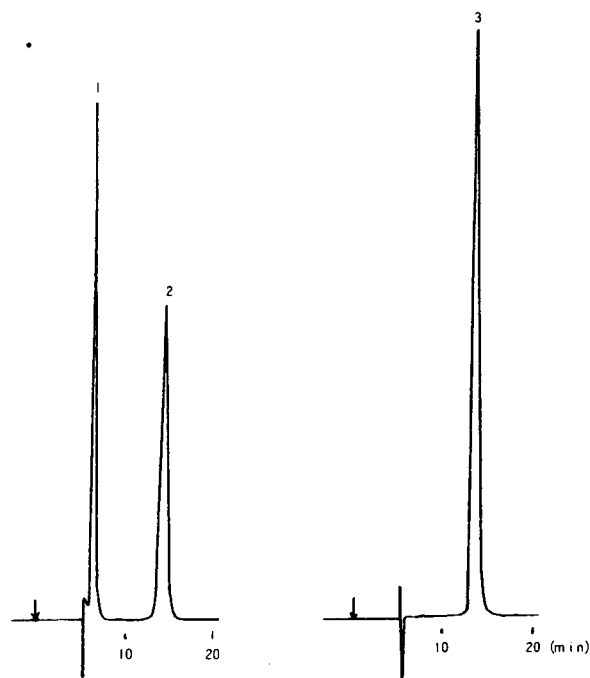
圧力；140kg/cm<sup>2</sup>

温度；23°C

検出；UV (260nm)

試料；1. TMP、2. d. CMP、3. d. AMP、  
4. d. GDP、5. TDP、6. d. CDP、  
7. d. ADP、8. d. GDP、9. TTP、  
10. d. CTP、11. d. ATP、12. d. GTP

図19



カラム；TSKgel DEAE-3SW  
(6mm×15cm)

溶離液；20%CH<sub>3</sub>CN in 0.6Mギ酸アンモニウム  
(pH7.0)

流速；0.7ml/min

温度；23°C

検出；UV (260nm)

試料；1. ATP、2. DNA(d-TCGAGCATAATA)、  
3. DNA(d-CCAGATCCATTC)