

ATPとルシフェリンのイオン対クロマトグラフィー

イオン化する化合物をHPLC分析する場合、一般的にはイオン交換クロマトグラフィーが用いられています。しかし、イオン化した化合物とそうでない化合物を同時に分離したい場合は、このイオン交換法では不可能です。そこで、逆相法で用いられるカラムを用いて、こうしたイオン化した化合物も同時に分析できる手法、イオン会合(対)クロマトグラフィー法で実際の応用例として、ATP(アデノシン3リン酸)とルシフェリンの混合物の分離例を紹介します。ルシフェリンはATP、 Mg^{2+} の存在下、触媒酵素ルシフェラーゼによる酸化反応を経て生物発光(蛍の光)します。また、ルシフェリン(Fig. 1中)はベンゼン環を有していることから逆相法では分離可能な化合物であるのに対し、ATP(Fig. 1中)はリン酸基を3つ持つイオン性の化合物で、このイオン化した電荷を利用してイオン交換法で分離されています。まず、発光後、1つの系に存在しているこの混合物を一般的な逆相法グラジエントで分離した場合をFig. 1に示します。ATPは共雑物と重なって早く溶出するため、定量は出来ません。一方、ルシフェリンは22分程度のところに溶出しています。このようにイオン化しているものとそうでないものを逆相法で単純に分離するには難があります。そこでつぎにルシフェリンの溶出位置をあまり動かさず、ATPの溶出位置をルシフェリンの付近まで動かすような分離法、すなわち、イオン対法による分離を試みました。強酸、弱酸などにはテトラブチルアンモニウム塩(TBA)のような4級アミンをイオン対(イオン会合)試薬がよく用いられています。ATPのリン酸基部分にTBAがイオン結合、見かけ上電荷を帯びないATP・TBAを生成し、これは疎水性を帯びるため、逆相の固定相に保持されます。イオン対法を行う場合には、移動相のpHやイオン対試薬の濃度に注意が必要です。イオン対試薬の濃度はおよそ5~20mMの濃度で使用されることが多いようです。

実際にイオン対法で分離した例をFig. 2に示します。10mM TBA及びpH5.4の条件下、ATPの保持時間を大幅に遅らせ、かつルシフェリンの保持時間をあまり動かさずに分離することができました。以上、イオン対法を用いることにより、イオン化しているものとそうでないものを同時に分離・定量することが可能となります。

分析条件1

カラム: TSKgel ODS-80Ts (4.6mm×15cm)
 カラム温度: 40℃
 流速: 1.0ml/min.
 検出: UV 254nm
 移動相: A; 50mM NaH_2PO_4
 B; 50mM NaH_2PO_4 / ACN = 5/5
 A 100% → A 100% (10min) → B 100% (30min)

分析条件2

カラム: TSKgel ODS-80Ts (4.6mm×15cm)
 カラム温度: 40℃
 流速: 1.0ml/min.
 検出: UV 254nm
 移動相: A; (50mM NaH_2PO_4 / ACN=1/9) + 10mM TBA
 B; (50mM NaH_2PO_4 / ACN=5/5) + 10mM TBA
 A 100% → B 100% (30min)

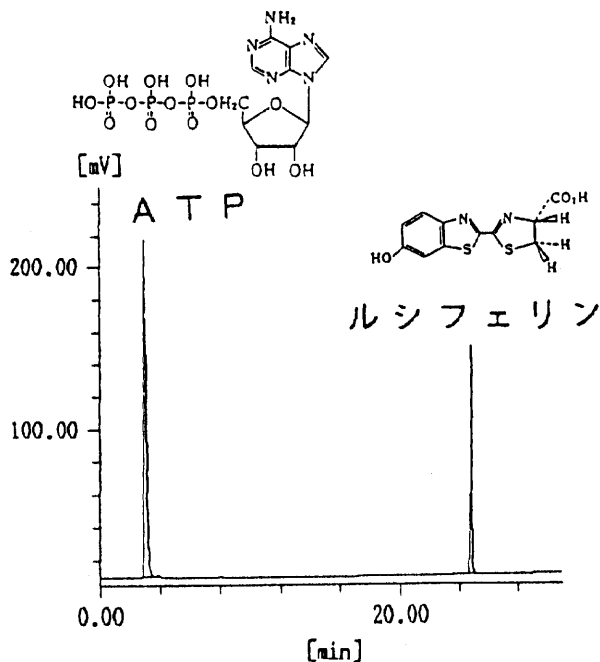


Fig. 1

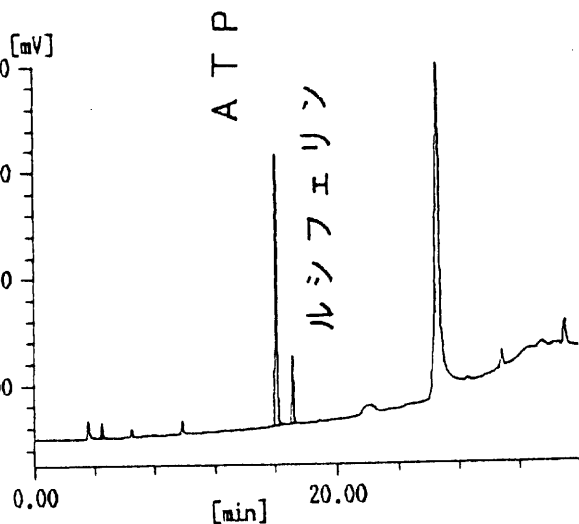


Fig. 2