

九州大学中央分析センター

24

センター
ニュース

平成元年 3 月

目 次

分析機器解説シリーズ (24)	1
(1) 高速液体クロマトグラフィー	
(2) GPC	
トピックス	13
・化学交換によるNMRスペクトルの 線形変化とそのシミュレーション解析	
お 知 ら せ	17
・高速液体クロマトグラフについて	
・超伝導核磁気共鳴吸収装置 (工学分室) 利用料金改定について	

分析機器解説シリーズ(24)

(1) 高速液体クロマトグラフィー

工学部 松下 琢

1. 高速液体クロマトグラフィーの種類

高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) は、装置、操作が簡単で分離能が高く、また処理時間も短いため、現在では生化学物質をはじめ、多くの物質の分離に広く用いられている。また、様々な原理に基づく分離を行うことができ、その原理の違いから大きく次の4つに分けられている。

(a) 順相(吸着)クロマトグラフィー

固定相として用いられる固体の表面あるいは内部の、物理的または化学的に吸着する吸着力の大小(吸着係数の大小)により分離が行われる。代表的な吸着充填剤としてシリカゲルがある。シリカゲルの表面の吸着点はシラノール基 ($-\text{Si}-\text{OH}$) で、このシラノール基と溶質分子の官能基 (OH , $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ など) との水素結合が吸着の主要な力とされている。シリカゲルでは固定相が極性で、溶離液にヘキサンのような非極性の溶媒を用いるので、順相クロマトグラフィーと呼ばれている。

(b) 逆相(分配)クロマトグラフィー

固定相として用いられる固体表面に保持された液相への溶質分子の溶解度と、溶離液への溶質分子の溶解度の大小(分配係数の大小)により分離が行われる。液相を保持する固体の担体としてはシリカゲルが最も広く用いられ、液相を化学結合でこの担体に保持した化学結合型充填剤が主流となっている。液相としてはオクタデシル基 (ODS , C_{18}) や、オクチル基 (C_8) などが多く用いられている。固定相が非極性で溶離液にメタノール/水の混合溶媒のような極性溶媒が用いられているので逆相(分配)クロマトグラフィー (Reverse Phase Chromatography , RPC) と呼ばれる。この充填剤は応用範囲が広く、現在最も多く使用されている。

(c) イオン交換クロマトグラフィー

固定相としてイオン交換樹脂のようなイオン交換体を用いられ、溶質分子とイオン交換体との間のイオン交換能の大小(イオン交換係数の大小)により分離が行われる。イオン交換体には陽イオン交換体と陰イオン交換体とがある。イオンに解離する試料の分離に適用でき、この方法をイオン交換クロマトグラフィー (Ion Exchange Chromatography , IEC) という。

(d) ゲル浸透クロマトグラフィー

立体的な網目構造を有する多孔性の固定相の孔(網目)に対して、溶質分子はその大小により孔に浸透できたり、浸透できなかつたりする(排除)。この浸透または排除の程度(浸透係数の大小)により分子がふるい分けられて分離される。分子の大きさに差があればこの方法で分離でき、この方法

をゲル浸透クロマトグラフィー（Gel Permeation Chromatography , GPC）と称する。

目的とする混合試料を分離するには、固定相(充填剤)に何を選ぶか、移動相(溶離液)に何を選ぶかが重要なポイントとなる。そこで、試料の性質をもとにした充填剤の選び方の例を図1に示した。

2．装置の構成

HPLCの装置としての基本構成は、図2に示すように、カラムの入口に試料を添加する試料注入部、溶離液をカラムに流すためのポンプ、カラムから順次分離して出てきた成分を検出する検出器、検出器の信号を記録する記録部より成る。検出器は成分の濃度（量）に比例した電気信号を発生し、記録部はあらかじめ与えられた既知濃度における信号と比較して、その濃度を算出する。

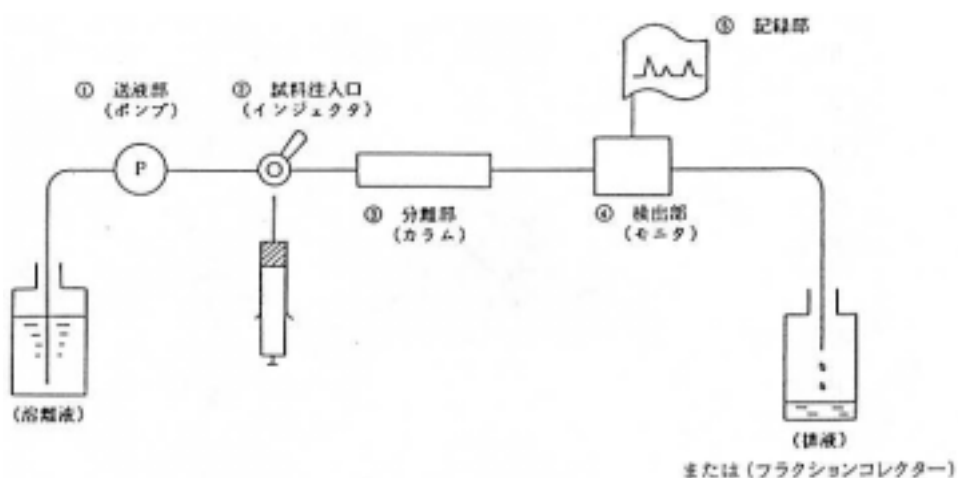


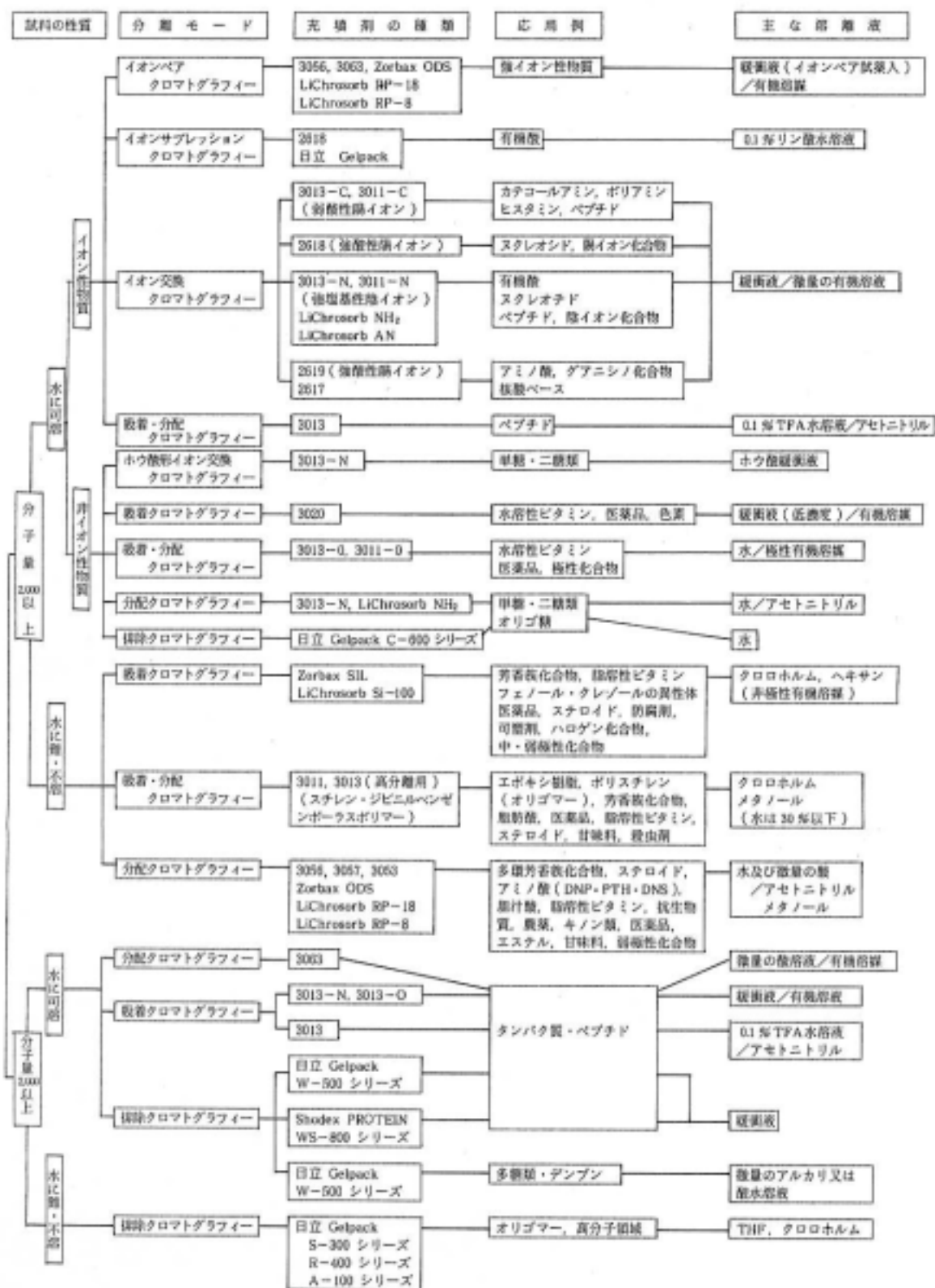
図2．HPLCの基本構成

3．保持容量・保持時間

試料をカラムに注入してから検出器に到達するまでに要した時間を保持時間（Retention time : R_t ）この間に要した溶離液の容量を保持容量（Retention Volume : V_R ）という（図3）。

保持容量 又は、充填剤の種類、溶離液の種類、溶離液の組成など分離する条件が一定であれば、同一の成分は同一の V_R を有する。また、溶解液の流量も一定であれば同一の成分は同一の保持時間 R_t を有する。このことから V_R （または R_t ）により物質を同定することができる。今日では溶離液を送液するポンプの流量の精度が極めて高くなっているため、 R_t を用いて同定されることが多い。

図1 HPLCにおける充填剤の選び方



「日立理化学機器分析データ集」より

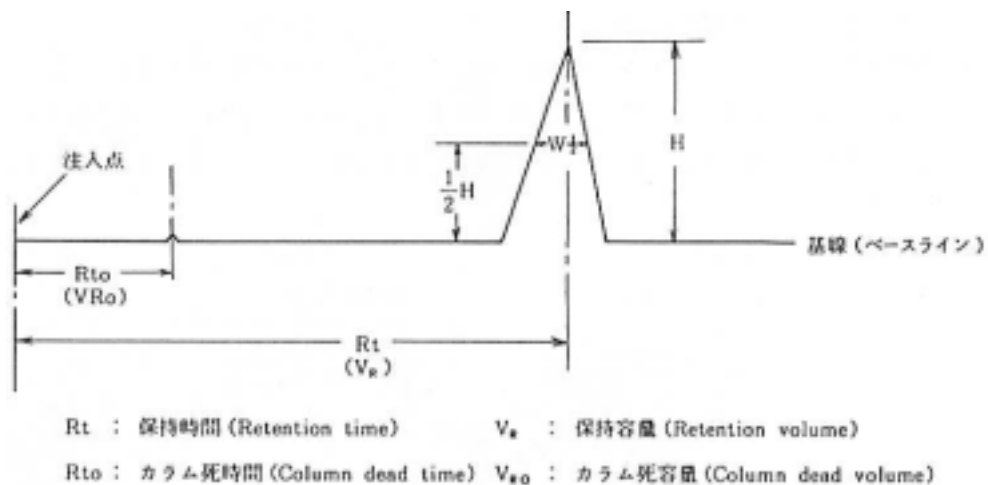


図3. 保持時間、保持容量

4. 実施例

(1) PTH アミノ酸の HPLC による分離

タンパク質やペプチドのアミノ酸配列を決定する際に、Edman 分解によって遊離してくる PTH アミノ酸の分析には、逆相クロマトグラフィーが最も適している。各 PTH アミノ酸の R_t は、浴離液の組成、PH、イオン強度、カラムの温度によって大きく左右されるので注意が必要である。図4には Zorbax ODS カラム (DuPont) を用いた PTH アミノ酸の分離例を示した。

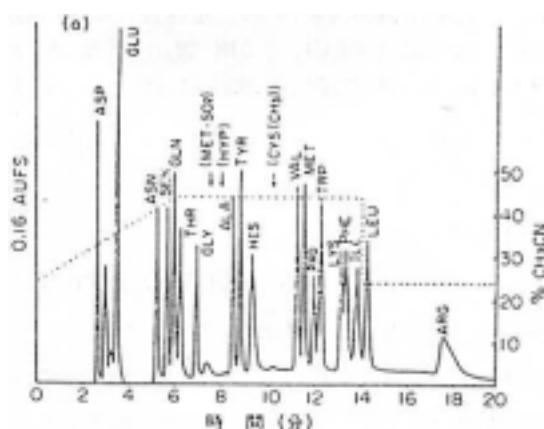


図4. ODS カラムを用いた PTH アミノ酸の RPC

グラジエント溶出 . Zorbax ODS(0.46 × 25cm). 流速 1ml/min. 温度 62 . 検出波長 254nm
 溶媒 A 0.01M 酢酸ナトリウム(pH4.5), B アセトニトリル. 試料 1~2nmol PTH アミノ酸.
 (現在、蛍光検出器を用いた OPA アミノ酸の分析では、25pmol の試料で十分である。)

化学増刊「タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー」より

(2) ヌクレオチドのHPLCによる分離

核酸の構成成分であるヌクレオチドの分離分析には、イオン交換クロマトグラフィーがよく用いられる。図5には、陰イオン交換体を充填した日立#3013-Nカラムを用いたヌクレオチドの分離例を示した。この場合は溶離液中の陰イオン濃度を上昇させることによって、ヌクレオチドの溶出を行っている。

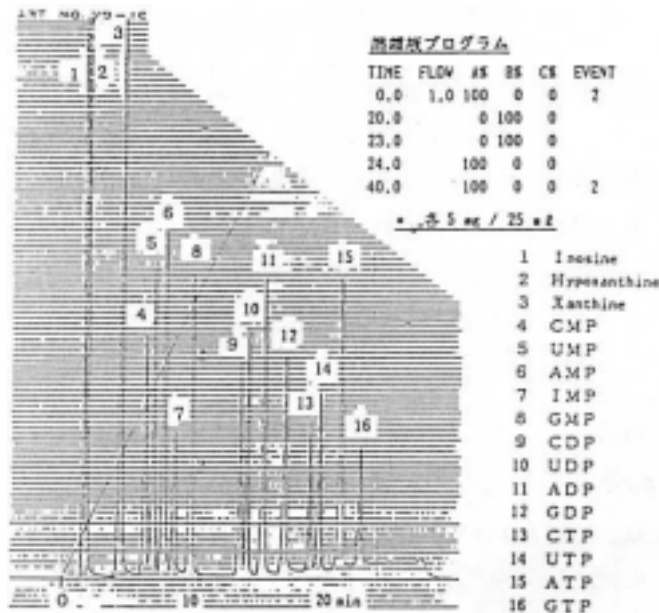


図5. IECによるヌクレオチドの分離

グラジエント溶出 . 日立 3013-N (0.4×15cm). 流速 1ml / min . 温度 69 . 検出波長 260nm .
 溶媒 A 4%(V/V)CH₃CN in 0.16M NH₄Cl, 0.01M KH₂P₄, 0.01M K₂HPO₄ .
 溶媒 B 4%(V/V)CH₃CN in 0.30M NH₄Cl, 0.05M KH₂P₄, 0.05M K₂HPO₄ .

「日立理化学機器分析データ集」より

(3) コレステロールのHPLCによる分離

コレステロールやステロイドなどの水に不溶の脂質成分の分離には、通常逆相クロマトグラフィーが用いられる。Lichrosorb RP - 8カラム (Merck) を用いたコレステロールの分離例を図6. に示す。溶出はアイソクラティック (溶離液組成の変化がない) で行っている。

また目的成分の分離が悪いときに、ピークの形状を見て判断するトラブルの原因とその対応策の例を図7 に示したので参照されたい。

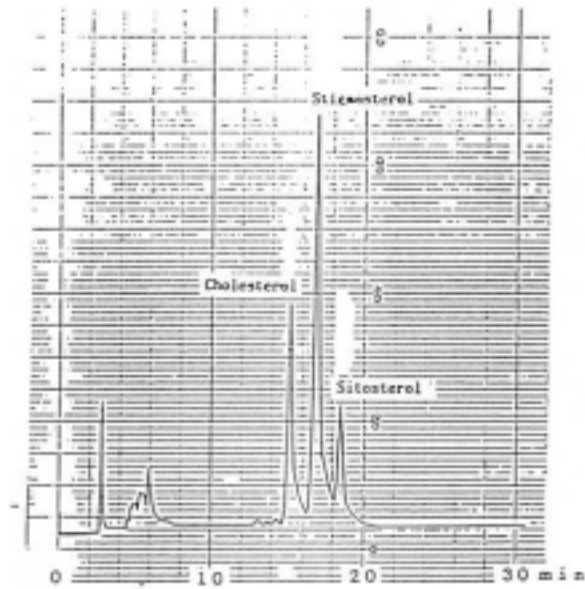
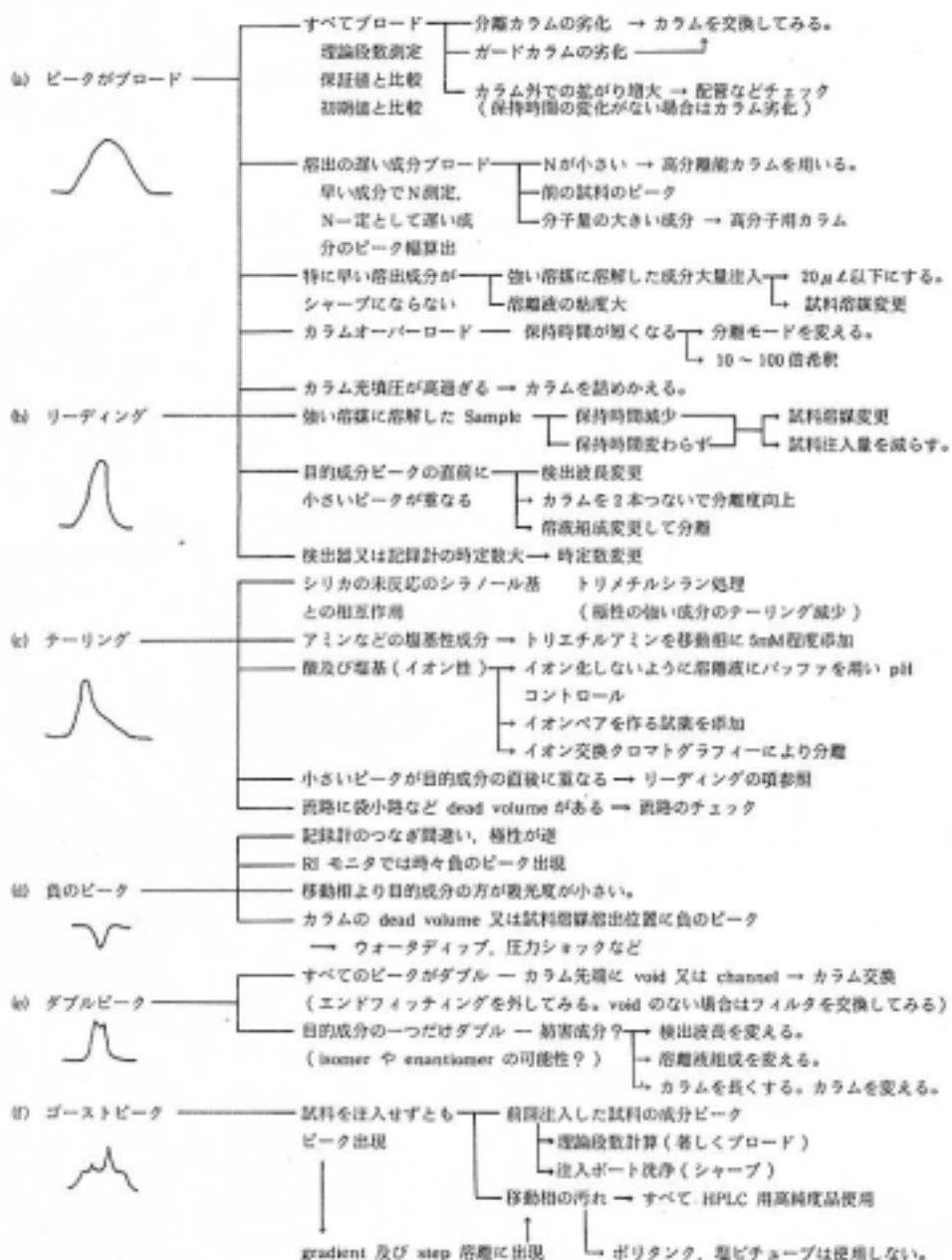


図6. R P C によるコレステロールの分離

アイソクラティック溶出. LiChrosorb RP-8(0.8×25cm). 流速 2ml/min. 温度 25 .
 検出波長 210nm. 溶媒 5% H₂O, 20% CH₃CN in CH₃OH.

「日立理化学機器分析データ集」より

図7 ビークの形状を見て判断するトラブルとその対策例



「日立理化学機器分析データ集」より

(2) GPC

工学部 菊池 裕嗣

【緒言】

GPC (Gel Permeation Chromatography) は、溶液中の溶質分子の大きさ (流体力学的体積) の差を分離パラメーターとした液体クロマトグラフィーである。高分子をはじめとする各種物質の分子量および分子量分布の測定、共重合体成分やブレンド成分の分離、組成比の分析が可能である。ここでは、おもに高分子の分子量および分子量分布の測定原理と装置について簡単に述べる。

【原理】

多孔質充填剤を充填したカラムの一方の端に試料溶液を注入し、その後、溶媒 (溶離液) を連続して流す。溶液中の溶質の大きさが、多孔質充填剤の孔径よりも十分に小さい場合には、充填剤の間隙の溶媒 (移動相) 中と充填剤内部の溶媒 (固定相) 中の溶質の濃度勾配に基づく拡散によって、溶質は移動相より固定相に浸透する。現象的には、小さな分子ほど大きな分子に比較して浸透しやすいか、あるいは浸透可能な孔の数が多いと考えられる。試料溶液帯が通過するにつれ溶質濃度が減少し、濃度勾配が逆転すれば、溶質分子は固定相より移動相へ排出されることになる。このような浸透、排出を繰り返しているうちに大きな分子と小さな分子の流路長に差が生じて、結局、大きな分子ほど小さな分子に比較して早く流出されることになる。一般に、分子の大きさと分子量 M は比例関係にあるので、以上の分子の大きさによる分別は、とりもなおさず分子量分別となる。カラムを出た溶離液の体積 V_R と M との間には、一般に $\log M = A - BV_R$ (A, B : 定数) (1) の関係がある。この式より V_R の測定を通じて分子量が求められる。従って、分子量を求めるためには前もって式 (1) の関係を求めておく必要があり、検量線として図 1 に示すような $\log M - V_R$ のプロットを作製する。一方、溶離液中における溶質濃度に比例する量を適当な方法で測定すれば、 V_R 点での濃度、従ってある分子量 M に相当する濃度がわかり、分子量分布の測定が行われることになる。 V_R は次式で得られる。

$$V_R = V_M + K_0 V_s \quad (2)$$

ここで、 V_M はカラム内の移動相の容積、 V_s は固定相の容積、 $K_0 = V_{s_i} / V_s$ で V_{s_i} は溶質 i 成分が浸透に利用した固定相容積である。カラムからの流出液から直接には V_R と濃度の曲線が得られるが、これは GPC クロマトグラム (図 2) といわれる。上述の検量線を使用してクロマトグラムを分子量分布に変換することができる。

【装置】

GPC は液体クロマトグラフィーの一つで、装置的にも一般の液体クロマトグラフィーと区別されるところが少ないので、ここではフローシステムは省略し、カラムと検出器についてのみ述べる。

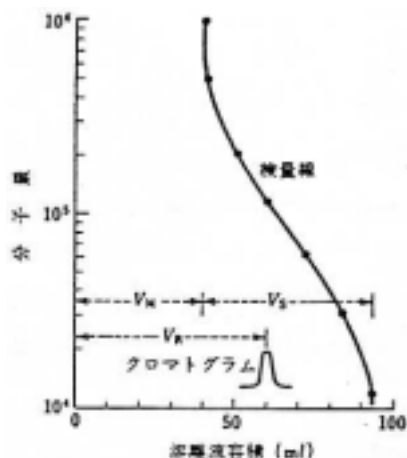


図1 GPCの検量線

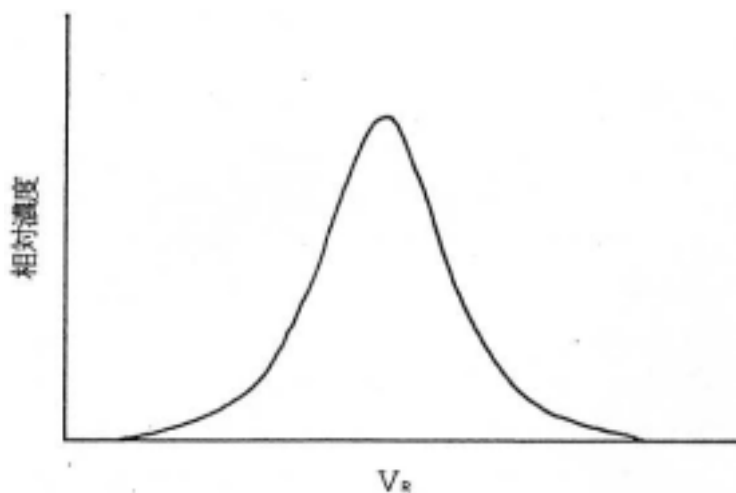


図2 GPCクロマトグラム

1) カラム：GPC用カラムは、ポリスチレン架橋ゲルを充填したものが主体である。カラムの種類は、分離の理論段数と排除限界分子量で分類されている。ポリスチレン架橋ゲルを膨潤しない溶媒（アセトンなど）を使用する場合には、硬質充填剤 シリカゲルとガラス）を使用する。

2) 検出器：クロマトグラムの検出器として高感度の示差屈折計と紫外分光光度計が主に用いられる。示差屈折計は、対称側と試料側の屈折率の差を連続的に検出するものであるが、屈折率は温度によって変化するので、恒温で使用する必要がある。紫外分光光度計は、温度や流速の変化に対して検出感度があまり変動せず、紫外吸収のある試料に対して感度が高い。

【結言】

GPCは、他の測定法に比べて、迅速、少量試料でよい、再現性がよい、応用性が広い等の優れた特徴をもつが、分子量に関して絶対測定法でなく、またクロマトグラフィーという動的な状態を取り扱うので、それに基づく複雑さも多い。その使用に際しては、機構上および装置上の問題点をよく認識した上でデータの解釈に臨むべきである。

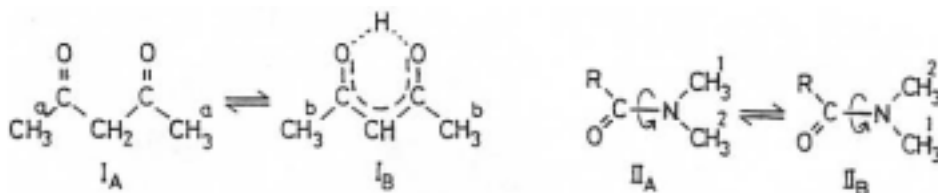
トピックス

化学交換による NMR スペクトルの線形 変化とそのシミュレーション解析

工学部 斉 藤 英

1. 化学平衡にある溶液系の NMR スペクトルの線形が化学交換によって変化することがある。それは Dynamic NMR (あるいは、温度または濃度可変 NMR) と呼ばれる分野で扱われる。最近、超伝導 FTNMR 分光計などの普及にともない、 $-100^{\circ} \sim 150$ 程度の温度範囲では日常的に精度よく NMR 測定が行えるようになった。このため種々のタイプの分子の溶液内の動特性が調べられつつある。さらに分子間化合物でも Dynamic NMR の手法が応用されつつある¹⁾。ここでは、NMR 線形解析から化学交換の速度定数を求めることを述べる。

2. 二種の化学平衡・交換系で Dynamic NMR の特徴を見よう。下図右のケト - エノール体互変異性平衡を示すアセチルアセトン溶液に微量のカルボン酸を加えて、室温で ^1H NMR を測定すると磁気的環境の異なる二種のメチル基(CH_3^a と CH_3^b)のピークが分離して共鳴スペクトル上に現われる。つぎに、かなり昇温したり、あるいは温度は一定のままカルボン酸の添加量を増やしたりして、それぞれ平衡に達したあとに再度測定するとメチル基のピークはただ一本になっている。この互変



異性はプロトンの着脱によって進行するが、昇温やプロトン触媒の増大に応じて異性化速度が増加した結果、 CH_3^a と CH_3^b の磁気的環境は化学交換による平均化を受けて同一になっている。右図のアミド基の C - N 結合のまわりの回転は二重結合性のため低温で束縛されている。このため A と B は化学的に全く等価であるが CH_3^1 は異なる磁気的環境にあることになる。したがってこのアミドもメチル基の共鳴シグナルの線形にアセチルアセトン平衡系と類似の温度変化がみられる。

3. NMR 共鳴シグナルの線形シミュレーション解析のための理論式は一般的に求められている。しかし、 ^1H や ^{13}C などの核スピンの $1/2$ でカップリングの影響のない Dynamic NMR の理論式は単純に求まる。さきの互変異性体やアミドでは化学交換サイトが A、B の二サイト系である。各サイトの複素磁化 (G_A 、 G_B) の時間変化は (1) (2) 式で与えられる²⁾。

$$dG_A/dt = - {}_A G_A - i C_A - k_A G_A + k_B G_B \quad (1)$$

$$dG_B/dt = - {}_B G_B - i C_B - k_B G_B + k_A G_A \quad (2)$$

両式の右辺の第一、第二項はBloch式の項であり、第三、第四項が化学交換（速度定数、 k_A 、 k_B ）の寄与を付加する。化学交換および磁化変化の双方の定常状態の条件のもとで全複素磁化 $G = G_A + G_B$ を求める。Gの虚数部が共鳴スペクトルの線形を与える。

$$G = - \frac{iC_0(k_A + k_B + P_A P_B + P_B P_A)}{k_B + k_A + P_A P_B}$$

ここで、存在割合 P_A 、 P_B ($P_A + P_B = 1$) として、 $k_A P_A = k_B P_B$ 、 $C_A = P_A \cdot C_0$ 、 $C_B = P_B \cdot C_0$ 、 $\omega = 1/T_2 - 2\pi(\nu_0 - \nu)$ であり、 T_2 : 横緩和時間、 ν_0 : 共鳴周波数、 ν : 振動磁場の周波数。 $T_2 = 1/W$ であり、 W : 交換の遅いピークの半値幅。

以上から、共鳴スペクトルの線形は実験をもとに確定する各サイトの存在割合、共鳴周波数および横緩和時間と未知の交換速度定数の四種の定数の関係から決まることがわかる。

4. 大雑把であるが、 $P_A = P_B = 0.5$ で $|\nu_A - \nu_B| \ll W$ の時には共鳴スペクトルの形が $r = |\nu_A - \nu_B| / k$ の値に応じて図1のように変化することが見通される³⁾。

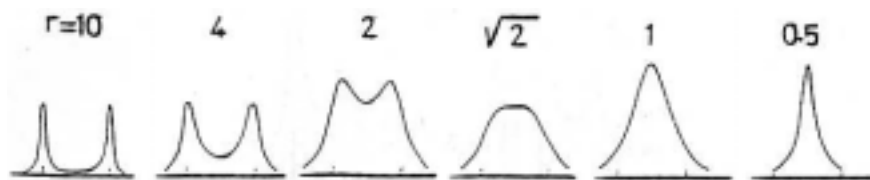


図1. 共鳴周波数差/速度定数比とNMR線形の対応

図から $r = 0.1 \sim 50$ 位の間で線形の変化がおこることがわかる。線形変化に対応する速度定数 k (sec^{-1})の範囲は $|\nu_A - \nu_B|$ (Hz) から決まるが、 $|\nu_A - \nu_B|$ は NMR 分光計の磁場の強さに比例するし、溶媒効果によっても変わることは注意が必要である。

ピーク間の極小は $r = 2$ では W 値によらずに消失する。温度可変 NMR でその消失がある最低温度を coalescence temperature (T_c) というが、その T_c では $r = 2$ すなわち $k = |\nu_A - \nu_B| / 2 \text{ sec}^{-1}$ である。シミュレーション解析なしで温度と速度定数の関係を一点だけ正しく決定できるこの方法は T_c 法とよばれる。また T_c 以下の温度域では NMR の時間尺度（タイムスケール）で交換が遅いとか化学種が長寿命であるとも言われる。

5. 図2はニトロソアミンの N-N 結合の束縛回転より生ずるニトロソ基とフェニル基のシン (S) アンチ (A) 構造異性体の四種の化学交換を示している⁴⁾。

この化学交換系の ^1H (360MHz) および ^{13}C (91MHz) NMR スペクトルは $20^\circ \sim 150^\circ$ の範囲で調べられている。 ^1H NMR はカップリングにより多重線となっているので線形シミュレーションは煩雑である。 ^{13}C NMR はプロトンデカップル下で測定されるのでそれぞれの炭素種に対して - ピークとなり解析は明瞭になる。図3の左図は 140ppm 付近のフェニル-フェニル結合をなす炭素 C-1、1' の実測温度変化である。四サイト系に対してもニサイト系と同様の扱いから線形シミュレーション

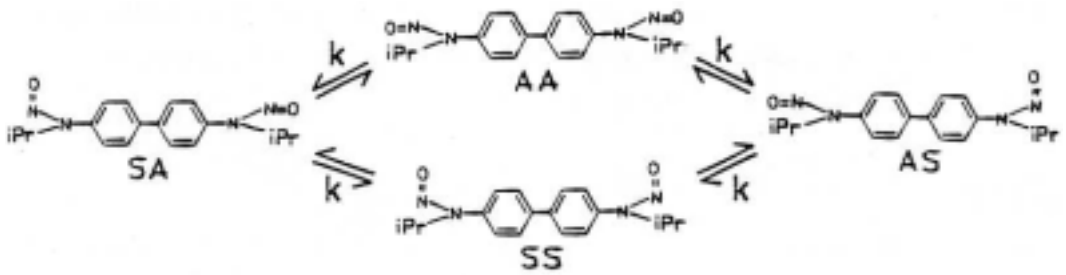


図2. 4, 4'-ジ(N-イソプロピルアミノ)ビフェニルの異性体変換

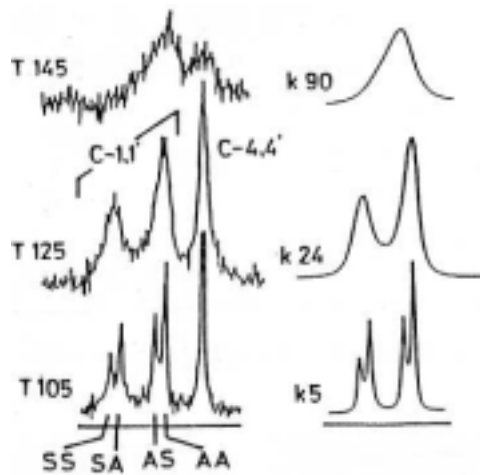


図3. C - 1, 1'の共鳴スペクトル。実測(左)、シミュレーション(右)
T: 、K : sec-1 4)。

ンの式が得られる。解析の結果、N - N結合まわりのニトロソ基の回転(アンチ - シン)速度定数は図2の四過程で同じと判断された。したがって、線形シミュレーションで求める速度定数はただ一つとなる。実測曲線と見較べることによってそれぞれの温度における最適シミュレーション曲線が図3の右図のように決った。

6 . シミュレーション解析でより正確な温度 - 速度定数の関係を得るためには実験上留意すべき点がいくつかある。

(a) サンプル作成

・測定温度域での安定性、低粘稠性。・ $|A^- B|$ や P_A/P_B の値が手こる。・一連のサンプル条件が同一。

(b) 温度測定

・表示温度とサンプル測定部位(検出コイル位置)の温度の対応づけが精度よくなされていること。

(c) NMR 測定

・ 定量精度が数%以内。　・ 、 p 、 W 値の高温域への外挿が順当。

以上に述べたことを含め、プログラムや熱力学的パラメータの導出等は成書を参照して下さい⁵⁾。

文 献

- 1) 齊藤, 米村, 中村, 松尾, 中央分析センター報告, No.6, 52(1988), H.Yonemura, H.Saito, S.Matsushima, H.Nakamura, T.Matsuo, Tetrahedron Lett. 投稿中.
- 2) McConnell, H. M., J. Chem. Phys., 28, 430 (1958).
- 3) 藤原, 中川, 清水, “高分解能核磁気共鳴” p123 (1962) 丸善.
- 4) Grindley, T.B., Lu, M.-J., Copla, J.P., Wu, S.-M., Bunsel, E., Magn, Reson. Chem., 24, 580 (1986).
- 5) Sandstrom, J., “Dynamic NMR Spectroscopy”(1982) Academic Press.

お 知 ら せ

高速液体クロマトグラフについて

昭和 63 年度機器充実費で購入予定の高速液体クロマトグラフの機種は選考の結果、(株)日立製作所製、日立高速液体クロマトグラフに決定致しました。

この装置は全体的に GPC に対する配慮がなされており、カラムを選択することにより広範囲な GPC 分析に適用できるシステムを備えています。

利用料金等の詳細は次号のセンターニュースでお知らせします。

超伝導核磁気共鳴吸収装置 (工学分室) 利用料金改訂について

(1) 単純測定 料金 2,000 円

^1H 、 ^{31}P (積分およびデカップリング可)

^{13}C (完全デカップリング)

注) ^{31}P については、まとめて測定するので 2 週間位前に予約すること。

(2) 温度変化

a) 昇温測定

- ・基本料金 2,000 円 (室温測定 + 温度変化 1 点を含む。)
- ・温度変化 1 点につき 400 円加算

b) 低温測定

- ・基本料金 2,400 円
- ・加算料金は上に同じ

注) 温度変化測定点の上限は 1 回の申込当たり 8 点とする。

(3) 長時間測定

- ・長時間を要する測定 (希薄溶液) は、原則として夜間 (20:00 - 8:00) に行い 12 時間を限度とする。但し、測定温度は室温または 30 とする。・・・・・・3,500 円
- ・昼間においては、1 時間以上を長時間測定とみなす。但し、上限を 4 時間とする。
・・・・・・3,500 円

(4) 相関二次元 NMR

- ・当分は試行期間として COSY に限って受け付ける。 料金 5,000 円