

—平成16年度 岐阜薬科大学特別研究費（一般）—

## 構造分配相グラジエント型- 複合モード動電クロマトグラフィーの開発

江坂 幸宏

### 1. 緒言

キャピラリー電気泳動法 (CE) の主分離様式の一つミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) は、中性物質から荷電物質まで広範な試料対象を持つ高機能分離手法である<sup>1</sup>。その分離機構は、分離系に導入されたミセルへの分配挙動の差が、ミセルがキャリアとして働くため、個々試料の移動速度の差として現れることによる。分離マトリックスが均一自由溶液であるため、様々なミセルを導入して、その特性を反映させた分離を行うことができる。

この MEKC の有用性をより高める意味で、分離時間短縮と分離向上を両立させるグラジエント溶出法の開発は重要と考えられる。さらに本研究で開発したミセルグラジエント溶出法は、溶液相側を変化させる機構ではなく、高次構造を有する構造相側を変化させるという点で HPLC にはない MEKC 特有の手法といえる。ここでは、荷電・中性有機分子を対象試料に、界面活性剤濃度・組成を変化させるグラジエント溶出を検討した。また、リニアグラジエント溶出を行うためのシンプルな方法も考案した。

### 2. 実験

キャピラリー(内径 0.05 mm)には、浸透流抑制を目的に poly-*N,N*-dimethylacrylamide (PDMAA) 内部コーティングを施し<sup>2</sup>、全長 50cm 有効長 30cm で用いた。界面活性剤には、陽イオン性 Cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) と非イオン性 Tween 20 を混合系か CTAC 単独系で使用した。泳動液は 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に界面活性剤を溶解し、各界面活性剤濃度の溶液の電気抵抗を、NaCl を加えて同程度に揃えて調製した。グラジエント溶出は、入口側リザーバー内組成を分離過程にステップワイスからリニアに変化させる方法で導入した。試料注入は、正極側から落差法で行った。印加電圧は 8 kV とした。

### 3. 結果・考察

有機イオンのグラジエント分離：CE の通常条件である大電気浸透流の存在下でも、キャピラリーにミセル組成・濃度が異なる溶液を順々に満たすことによって、経時的に組成・濃度が変化するミセルと溶質を相互作用させて、その分離を行うミセルグラジエント法が原理的には実行可能である。しかし、この溶液充填を溶液同士の混合無しに、かつ再現性よく行うことは非常に困難であり、全く実用的でない。一方、電気浸透流がほぼ存在しない条件下では、入口リザーバーの界面活性剤組成・濃度を経時変化させるという実用的な方法で、分離に関わるミセル相を逐次変化させられるはずである。一般に、ほとんどの他溶質よりミセルの移動度は顕著に大きく、入口リザーバー内のミセルが、分離過程の溶質と相互作用しながら追い抜いて行く。試料はミセルマーカに続いて溶出・検出される。

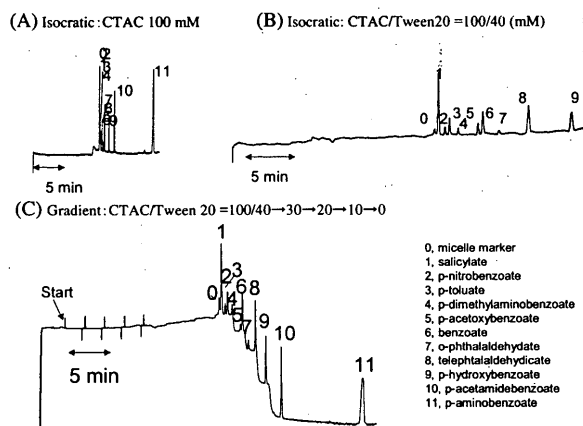


Fig.1 Stepwise Gradient Electrokinetic Separation of 11 Benzoates Using Mixed Systems of CTAC and Tween 20

Fig.1 に 11 種の置換安息香酸の分離を示す。CTAC 単独系では、有機陰イオンである試料はイオン性相互作用と疎水性相互作用の相乗効果で圧倒的にミセル相へ分配し、多くがミセルマーカ付近に共溶出する [Fig.1(A)]。一方、polyoxyethylene (POE) 鎖を親水基とする Tween 20 と CTAC の混合系では、ミセル表面への POE 鎖挿入によるイオン

性相互作用の抑制によって、分配比を適度な大きさに調節可能であり<sup>3</sup>、単独系で共溶出していた試料が完全に分離された [Fig.1(B)]。ただ、比較的低疎水性の試料は検出時間の著しい長大化が起こり、事実上検出できなくなる。分離向上と分析時間短縮の両立はミセルグラジエント法によって達成された [Fig.1(C)]。この階段状のベースライン変化は、Tween20 の濃度が 40, 30, 20, 10, 0 (CTAC 濃度は常に 100 mM) とステップワイズに変化していることを示しており、Tween 20 の高濃度領域で、高疎水性イオンの分離を完成し、低濃度領域で遅れていた比較的低疎水性の低い試料の溶出を実用時間内へと早めている。

広い疎水性範囲を持つ有機陰イオン群の分離においては、混合系組成グラジエント同様、CTAC 単独系でのミセル濃度グラジエントも有用である。ただし、各ステップ間で CTAC 濃度が大きく異なる場合、NaCl 等で各液の電気抵抗を揃えることがグラジエント溶出には必要であった。抵抗調整を行わない場合、CTAC 高濃度ゾーンの著しい電場低下によって、高濃度のミセルが分離過程に試料に追いつかず、分離に作用を及ぼすことができない。

分離向上のために出発組成でミセルとの相互作用を過度に減少させると、比較的低疎水性の試料のうちで、泳動開始時に逆方向に移動してキャピラリーから排出されるものが現れた。この場合は、キャピラリー中間までゾーン電気泳動モードで移動してからグラジエント溶出することで全試料の分離・検出が可能である。

PDMAA コーティングは通常の正から負極方向への浸透流を止めるだけでなく、CTAC を用いる際に CTAC のキャピラリー内壁への吸着によって生じる逆向きの浸透流も抑えており、これは本法の成立に不可欠な条件である。また、耐久性も高く、本法の再現性の高さを支えている。

非荷電有機分子のグラジエント分離：MEKC の本来の分析対象である非荷電分子も、当然ミセルグラジエント法が適用されるべき対象である。ただ、CTAC と Tween20 混合系での組成比によるミセル疎水性の変化は、グラジエント溶出に利用できるほど顕著でない。また、分離選択性を変化させる、ミセルの水素結合性変化に基づく取り込み選択性の変化も小さかった。そこで、分配比を変える CTAC 単独系の濃度グラジエントを用いて、置換ベンゼン類の分離を検討した。上述と同様、NaCl による溶液抵抗調節を行い、25, 100 mM と 2 段階での CTAC 濃度変化を行ったところ、Fig.2 のように前半部の高疎水性分子の領域は 25mM 条件下での分離 (A)、後半部の比較的低疎水性分子の領域は 100 mM 条件下での分離 (B) が反映されたグラジエント分離 (C) が達成された。

リニアグラジエント法の開発：細かいグラジエントプログラムの設計ではリニア法の導入が望まれる。出発組成溶液の入っている入り口に、毛細管現象を利用して最終組成溶液を経時的に混合する方法でリニア

グラジエント溶出が可能である。Fig.3 はステップワイズ法 (Fig.1) と同様の分離をリニア法で行ったものである。ベースラインの変化は Tween20 の紫外外部吸収によるが、検出波長が 254nm 程度で大体フラットになった。

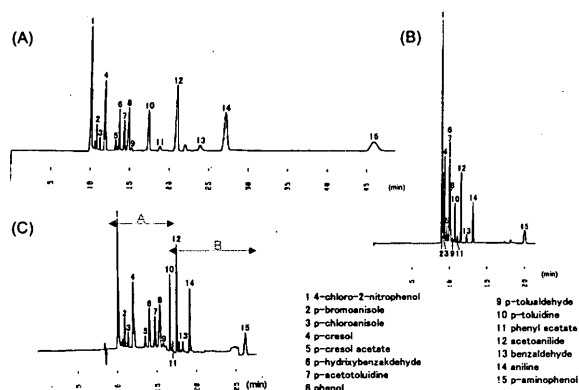


Fig.2 Stepwise Gradient Electrokinetic Separation of 15 Substituted Benzenes Using Pure CTAC Systems

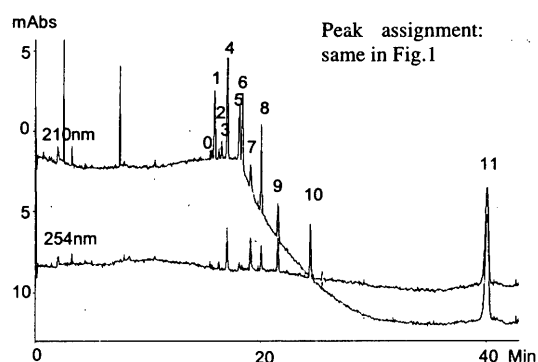


Fig.3 Linear Gradient Electrokinetic Separation of 11 Benzoates Using Mixed Systems of CTAC and Tween 20

展望：今回はミセル相分配特性の量的変化を主に利用して、広疎水性範囲試料群の分離を行う際に有用性が高いと思われる手法を示した。一方で、溶質認識の基になる溶質の配向性は一般に溶液相より構造相において強いため、本質的に本法のような構造相変化型グラジエント法において、溶媒相変化型より高選択性を発現しうるものと期待される。そして、より質的な分配特性の変化を活用することに本法の一つの独自性が生れると考える。その意味で水素結合性、キラリティー等、特性の大きく違う界面活性剤同士による混合系に興味を持たれる。さらに、ミセル以外のキャリアーの導入も含めた複数異分離モードの“たし算”でシンプルに設計される加成型複合モード EKC のプラットフォームとしての本法の活用を現在検討している。

#### 4. 引用文献

- 1) Terabe, S. *et al. Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111-112.
- 2) Wan, H. *et al. J. Chromatogr. A* **2001**, *924*, 59-70.
- 3) Esaka, Y. *et al. Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1332-1338.