ノ ー ト

キャピラリー電気泳動法によるキラル分離検出への アダマール変換法の応用

金 田 隆¹, 西田 未来¹, 今坂藤太郎^{®1}

Application of Hadamard transformation to chiral separation by capillary electrophoresis

Takashi KANETA¹, Miki NISHIDA¹ and Totaro IMASAKA¹

¹ Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812-8581

(Received 18 July 2003, Accepted 1 September 2003)

Hadamard transform capillary electrophoresis, which is a sensitive detection method using multiple sample injection, was applied to the separation of glutamic acid enantiomers labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC). A capillary was filled with a sample solution containing FITC-labeled D,L-glutamic acids, cyclodextrin, and buffer components. The sample was injected by an optically gated sample injection method, in which an intense laser beam was focused onto the capillary to convert fluorescent analyte ions to nonfluorescent ones by photodegradation. To form analyte plug, a shutter placed in the pathway of the laser beam was closed for a constant time period. In the presence of cyclodextrin, enantiomers of FITC-labeled glutamic acid could be injected by the optically gated sample injection method. Two cyclodextrins, β - and γ -cyclodextrins, were employed as chiral selectors in the capillary electrophoretic separations. For the separation of FITC-labeled glutamic acid enantiomers, γ -cyclodextrin shows a better resolution than β -cyclodextrin. The optimum concentration of γ -cyclodextrin was found to be 10 mM. Multiple sample injection was accomplished by closing or opening the shutter according to a sequence based on a Hadamard matrix. When the resulting electropherogram was transformed by the inverse Hadamard matrix, the S/N ratio in the transformed result was enhanced with no degradation in the resolution, compared to that in the electropherogram obtained by a single injection method. As a result, Hadamard transform capillary electrophoresis allows a significant improvement in the S/N ratios for FITC-labeled glutamic acid enantiomers. Therefore, the present method will be applicable to the separation and sensitive detection of enantiomers labeled with FITC.

Keywords : capillary electrophoresis; Hadamard transform; multiple injection; enantiomer; separation.

1 緒 言

キャピラリー電気泳動は優れた分離能を持つ分離分析法であるが、光学的な検出法を用いる場合、内径の小さなキャピラリー上で検出が行われるため、高速液体クロマトグラフィーと比較して低感度であることが問題点として指摘

されている。この問題を解決するために、高感度なレーザー一励起蛍光検出法の利用や種々のオンカラム濃縮法に関する研究が行われてきた¹⁾²⁾。

一方、先に著者らは数学的手法のひとつであるアダマール変換を利用するキャピラリー電気泳動法を開発した^{3)~5)}。近年、数学的な手法を電気泳動に応用した例として、相互相関法⁶⁾⁷⁾やシャーコンボリューションフーリエ変換法^{8)~12)}が報告されているが、いずれの場合もマイク

¹ 九州大学大学院工学研究院: 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

ロチップを分離場として用いるものである。著者らもまた、マイクロチップを分離場とするアダマール変換電気泳動法を報告したが¹³⁾、キャピラリー電気泳動と比較して分離能が低い、市販のマイクロチップが高価である、などの問題点があり、現段階では限定的に利用するのは困難である。一方、アダマール変換キャピラリー電気泳動は市販の装置を改造するだけで、容易に実現することができる。また、他の手法と比較して、計算も単純である。この方法ではアダマール行列と呼ばれる行列式の成分に従い、キャピラリー内に試料を多重に注入する。多重注入により得られた電気泳動図では、単一成分に対して複数のピークが観測される。この電気泳動図を逆アダマール行列により変換すると、本来の電気泳動図を表す結果に変換することができる。変換により得られた結果は S/N 比の向上した電気泳動図を表すものとなる。

本研究ではアダマール変換キャピラリー電気泳動を光学異性体の分離に適用した。キャピラリー電気泳動では光学異性体を分離するために泳動溶液にキラルセクターとなる物質を添加する必要がある。キラルセクターとして泳動溶液にシクロデキストリンを添加し、光ゲート法による試料の注入と分離条件について検討した。シクロデキストリンを用い、アダマール変換キャピラリー電気泳動により光学異性体の分離並びに S/N 比の向上が達成できることを明らかにした。

2 実 験

2.1 装 置

実験装置は先に報告したものと同様である³⁾⁴⁾。キャピラリーは GL Science 製、内径 25 μm 、外径 375 μm の溶融シリカキャピラリー（全長 46 cm、有効長 22~27 cm）を用いた。光ゲート法¹⁴⁾に基づく試料注入を行うために、アルゴンイオンレーザー（GLS3200、日本電気製）をビームスプリッター（シグマ光機製）で約 80 : 6 に分割し、それぞれを目的物質の光分解並びに蛍光検出に利用した。光分解用レーザーの光路に磁気シャッター（駿河精機製、F77-6）を置き、シャッターの開閉は磁気シャッターコントローラー（駿河精機製、F77-4）、GP-IB ボードを経て、パーソナルコンピュータ（NEC PC9801 DX、日本電気製）により制御した。蛍光検出用レーザーは干渉フィルター（シグマ光機製）により目的波長以外の光をカットした後、対物レンズによりキャピラリー上に集光した。蛍光は対物レンズ、ノッチフィルター（Kaiser Optical System 製、Holographic Notch-PlusTM Filter）を通して、光電子増倍管（浜松ホトニクス製、R3869）により検出した。光電子増倍管からの信号は増幅器（浜松ホトニクス製、C2719）、A/D 変換ボード {CONTEC AD12-8T(98)} を通した後、パーソナルコンピュータで取り込んだ。シャッターの開閉

とデータ獲得の時間間隔は 0.5 秒に設定した。用いたアダマール行列の次数は 1023 次である。電気泳動は松定プレシジョン製の高圧電源（HCZE-30PN0.25）を用いて行った。

2.2 試 薬

試料溶液並びに泳動溶液の調製は Elix3（Milipore 製）で精製した純水を用いて行った。ピリジンはキシダ化学製を用いた。その他の試薬は和光純薬製を用いた。

2.3 フルオレセインイソチオシアネートによるグルタミン酸の標識

フルオレセインイソチオシアネート（FITC）によるグルタミン酸の標識は以下のように行った。3 mM の D- 又は L-グルタミン酸を含む pH 9.3 のホウ酸緩衝溶液 3 ml にピリジン 4 μl を加え、3 mM FITC（アセトン溶液）1 ml を添加した後、室温（20℃）で 1 晩放置した。この溶液をシクロデキストリンを含む 30 mM ホウ酸緩衝溶液（pH 9.3）で適宜希釈した後、0.20 μm のフィルターで濾過して試料とした。

2.4 アダマール変換の原理

Fig. 1 にアダマール変換キャピラリー電気泳動の原理の模式図を示す。Fig. 1(A) は 1 回注入により得られる電気泳動図を表したものである。試料が単一の成分を含んでいる場合、1 度だけ試料を注入すると Fig. 1(A) のように単一のピークから成る電気泳動図が得られる。同じ試料を用いてアダマール変換した電気泳動図を得るために、アダマール行列に基づく 1 と 0 から成る疑似乱数に従って試料を多重に注入する。Fig. 1(B) は、この乱数に従って多重注入を行った場合に得られる電気泳動図の模式図である。疑似乱数の成分が 1 のときには試料を注入し、0 のときには試料を注入しない、という連続的な操作を行うことで、電気泳動図に複数のピークが観測される。この操作は数学的には以下の式で表される。

$$\eta_n = S_n \times E_n \quad (1)$$

ここで n は多重注入に用いたアダマール行列の次数である。一般にアダマール行列では全成分の約半分が 1 という成分から成っているため、試料の注入回数は約 $n/2$ 回である。 η_n は $1 \times n$ の行列であり、多重注入によって得られる電気泳動図 {Fig. 1(B) のアダマール変換電気泳動図} を表している。 E_n もまた $1 \times n$ の行列式であり、これが 1 回注入により得られる通常の電気泳動図のデータ {Fig. 1(A)} である。 η_n と E_n が $1 \times n$ の行列式であることから分かるように、 n は電気泳動図におけるデータの

Fig. 1 Schematic illustration of principle for Hadamard transform capillary electrophoresis

(A) Electropherogram obtained by a single injection method, (B) Electropherogram obtained by a multiple injection method, (C) Inverse Hadamard transform of (B)

Fig. 2 Electropherograms of FITC-labeled glutamic acid enantiomers obtained by a single injection method

Sample solution: FITC-labeled D,L-glutamic acid solution (7.5×10^{-7} M for each enantiomer) containing 10 mM CD and 30 mM borate buffer (pH 9.3); Effective length: 27 cm; (A) β -CD and (B) γ -CD; applied voltage, 13 kV, laser power, 100 mW, injection time, 0.5 s; Peak: 1 = FITC, 2 = FITC-labeled D-glutamic acid, 3 = FITC-labeled L-glutamic acid

数に相当する。実験で得られるデータは η_n であり、これを逆アダマール変換することで本来測定したい電気泳動図 {Fig. 1 (C)} に変換することができる。逆変換は以下の式で表される

$$S_n^{-1} \times \eta_n = E_n \quad (2)$$

ここで S_n^{-1} は試料の多重注入に用いたアダマール行列の逆行列であり、 η_n は Fig. 1 (B) の電気泳動図における n 番目から $2n-1$ 番目までの n 個のデータに相当する。得られた変換図 (逆アダマール変換電気泳動図) では、理論的に、1 回注入の場合と比較して $(n+1)/2n^{1/2}$ 倍の S/N 比の向上が達成される。アダマール変換並びにアダマール変換電気泳動の詳細については専門書¹⁵⁾及び著者の総説¹⁶⁾を参照されたい。

3 結果と考察

アダマール変換キャピラリー電気泳動によりアミノ酸の光学異性体を分離するためには、キラルセクターであるシクロデキストリン共存下においても、光ゲート法による注入が可能であることを確かめなければならない。そこで、 γ -シクロデキストリンを添加した試料溶液を用いて実験を行った。50 mM の γ -シクロデキストリンと 7.5×10^{-7} M の FITC 標識 D,L-グルタミン酸を含む 30 mM ホウ酸緩衝溶液 (pH 9.3) をキャピラリー並びに泳動槽に満たし、光ゲート法により注入を行ったとき、 γ -シクロデキストリン存在下においても FITC 標識グルタミン酸はゲート光により光分解され、ピークとして検出できることが分かった。また、 γ -シクロデキストリンを泳動溶液に添加することで光学異性体を分離できることも明らかとなった。

そこで、 β -及び γ -シクロデキストリンを用いた場合の分離能の比較を行った。Fig. 2は10 mMの β -シクロデキストリン (A), あるいは γ -シクロデキストリン (B) を含む 7.5×10^{-7} M の FITC 標識 D,L-グルタミン酸溶液 {30 mM ホウ酸緩衝溶液 (pH 9.3)} を試料として用いた場合の1回注入における電気泳動図である。わずかではあるが、キラルセクターとして γ -シクロデキストリンを用いた場合に、高い分離能が得られた。そこで γ -シクロデキストリンについて10, 50, 100 mMの濃度において分離能の比較を行った。シクロデキストリンの濃度と泳動時間並びに分離度とをTable 1に示す。濃度が増加するにつれて分離能は低下し、10 mMのときに最大の分離能を得ることができた。これはシクロデキストリン濃度の増加とともに錯体の分率が増加し、電気泳動移動度に差が生じにくくなることによると予想された。Jinらはシクロデキストリン修飾ミセル動電クロマトグラフィーによるFITC標識アミノ酸の光学分割において、10 mMの γ -シクロデキストリンを泳動溶液に添加することで、良好な分離

結果が得られることを報告しており¹⁷⁾、本研究においても同様の結果が得られている。上記の検討結果から、10 mMの γ -シクロデキストリンを含む 7.5×10^{-7} M の FITC 標識 D,L-グルタミン酸溶液 {30 mM ホウ酸緩衝溶液 (pH 9.3)} を試料として、アダマール変換キャピラリー電気泳動を行った。多重注入により得られた電気泳動図をFig. 3 (A), その逆アダマール変換図をFig. 3 (B) に示す。Fig. 3 (A) において検出されている多数のピークはD-, 及びL-グルタミン酸のピークが分離されながら複数回にわたり検出された結果である。このとき、試料の注入回数は512回である。この図を逆アダマール変換することでFig. 3 (B) を得た。同じ条件下での1回注入の結果であるFig. 2 (B) と比較すると、Fig. 3 (B) では明らかなS/N比の向上が確認できる。このことから、アダマール変換キャピラリー電気泳動は光学異性体のような電気泳動移動度が近接した化合物の分離においても、分離能を損なうことなくS/N比を向上できることが証明された。本実験におけるS/N比の向上率は約5倍であり、理論的な向上率と比較すると低い結果となった(理論値: 約16倍)。先に報告したフルオレセインイオンを試料として用いた結果では、1023次のアダマール行列を用いた場合、12倍のS/N比の向上が達成されており、ほぼ理論値と一致した向上率が得られていた⁵⁾。このときには、本研究で用いたものよりも高出力のレーザーを用いていた。本実験においてS/N比の向上率が理論値よりも小さい原因は明らかではないが、レーザー出力を大きくすることで、更に向上率を増大できる可能性がある。

Table 1 Dependence of migration time and resolution on the concentration of γ -cyclodextrin(CD)

Concn. of γ -CD/mM	Migration time/s		Resolution
	D	L	
10	222.5	227.0	1.28
50	239.0	242.0	1.09
100	305.5	308.0	0.77

Applied voltage: 13 kV; effective length: 22 cm

Fig. 3 Electropherogram of FITC-labeled glutamic acid enantiomers obtained by a multiple injection method and its inverse Hadamard transform

(A) Electropherogram obtained by a multiple injection method. Injection period for a single segment, 0.5 s; the order of the Hadamard matrix, 1023. (B) Inverse Hadamard transform of (A). A sequence of data points from 1023 to 2045 (corresponding to 511.5 s to 1022.5 s) was extracted from Fig. 3(A) and then transformed by the inverse Hadamard matrix. Other conditions are the same as Fig. 2.

4 結 言

アダマール変換キャピラリー電気泳動をグルタミン酸の光学異性体分離に応用した。泳動溶液（本研究では試料溶液が泳動溶液である）にシクロデキストリンを添加した場合でも、光ゲート法による試料注入が可能であった。多重注入を行い逆アダマール変換を行った結果、移動度の差がわずかな光学異性体に関しても分離能を損なうことなく、 S/N 比を向上できることが明らかとなった。シクロデキストリンを用いるアダマール変換キャピラリー電気泳動は、種々の光学異性体の分離に適用可能であり、検出感度を向上できる簡便な手法である。

文 献

- 1) P. J. Quirino, S. Terabe: *Science*, **282**, 465 (1998).
- 2) R.-L. Chien, D. S. Burgi: *Anal. Chem.*, **64**, 489A (1992).
- 3) T. Kaneta, Y. Yamaguchi, T. Imasaka: *Anal. Chem.*, **71**, 5444 (1999).
- 4) T. Kaneta: *Anal. Chem.*, **73**, 540A (2001).
- 5) T. Kaneta, K. Kosai, T. Imasaka: *Anal. Chem.*, **74**, 2257 (2002).
- 6) J. N. van der Moolen, H. Poppe, H. C. Smit: *Anal. Chem.*, **69**, 4220 (1997).
- 7) J. C. Fister, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey: *Anal. Chem.*, **71**, 4460 (1999).
- 8) H. J. Crabtree, M. U. Kopp, A. Manz: *Anal. Chem.*, **71**, 2130 (1999).
- 9) Y. C. Kwok, A. Manz: *Electrophoresis*, **22**, 222 (2001).
- 10) Y. C. Kwok, N. T. Jeffery, A. Manz: *Anal. Chem.*, **73**, 1748 (2001).
- 11) Y. C. Kwok, A. Manz: *J. Chromatogr. A*, **924**, 177 (2001).
- 12) J. A. McReynolds, P. Edirisinghe, S. A. Shippy: *Anal. Chem.*, **74**, 5063 (2002).
- 13) K. Hata, Y. Kichise, T. Kaneta, T. Imasaka: *Anal. Chem.*, **75**, 1765 (2003).
- 14) C. A. Monnig, J. W. Jorgenson: *Anal. Chem.*, **63**, 802 (1991).
- 15) M. Harwit, N. J. A. Sloane: “*Hadamard Transform Optics*”, (1979), (Academic Press, New York, San Francisco, London).
- 16) 金田 隆: “CE アドバンス”, **6**, 42 (2002), {大塚電子(株)}.
- 17) L. J. Jin, I. Rodriguez, S. F. Y. Li: *Electrophoresis*, **20**, 1538 (1999).