報 文

フィールドフロー直交型電気クロマトグラフィーの開発

目方 宏明¹, 北川 慎也^{*1}, 飯國 良規¹, 大谷 肇¹

新たな分離分析手法として、流速の異なる流れ場での液体クロマトグラフィーと電気泳動を組み合わせた「フィールドフロー直交型電気クロマトグラフィー (field-flow orthogonal electrochromatography, FFOEC)」の提案を行った。FFOECでは、コントロールされた不均一な流速場を有する平板型固定相内で、流れに直交する電気泳動を行い、field-flow fractionation (FFF) と類似の機構で、試料成分間の流れ方向の分離を促進する。FFOECは平面上で複数の分離モードに基づいた分離を行い、それを一次元分離に増幅・変換しているため、通常の HPLC と同様にただ一つの検出器を用いて検出を行うことが可能となる。FFOECの有効性を理論的に検証するとともに、その実証のために、部位により光照射強度を調整することでモノリス密度がコントロールされた、不均一流速場を有する平板型ポリマーモノリス固定相の調製を行った。調製した平板型モノリス固定相を用い、圧力差流に直交する電気泳動により試料成分間の流れ方向の分離が改善されることを確認した。また、その分離改善の度合いは、印加電圧の増大に伴い向上した。

1 緒 言

分離分析は分析化学において重要な位置を占めており、その発展が求められている。現在、最も汎用されている分離分析手法としては、クロマトグラフィーと電気泳動が挙げられる。電気泳動分離の基本的な機構は単純であり、電場下における電気泳動速度の違いにより、試料成分は電気泳動方向に分離される。クロマトグラフィー分離は、試料成分の固定相との相互作用の差を利用し、試料成分の移動速度に差を生じさせ、移動相流れ方向に試料成分が分離される。これに対して、巨大高分子やナノ粒子の分離に用いられる field-flow fractionation (FFF) の分離機構は多少複雑である^{1)~3)}。FFFは壁面から離れるほど流速が大きくなる圧力差流のフロープロファイルを利用する分離手法である。圧力差流に対して直交する「場」(例えば、重力場や電場)を加えると、試料成分は、「場」に対する応答性と壁面からの分散力のつり合いにより、壁面からの距離が異なる濃度分布の狭い定常状態が得られる。壁面からの距離が異なるために、圧力差流下では試料成分により適応される流速が異なることとなり、これにより試料成分は流れ方向に分離される。すなわち、FFFにおいては、本来の分離機構の方向は圧力差流に直交しているが、位置により流速が異なる場を併用することで、流れ方向の分離を達成している。FFFは、流れ直交方向のわずかな分離を、流れ方向に増幅する手法であるとみなすことができる。

近年、当研究室では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とこれに直交する電気泳動を組み合わせた、orthogonal electrochromatography と称する二次元同時分離手法の開発を行った⁴⁾。ペーパークロマトグラフィー (PC) や薄層クロマトグラフィー (TLC) を、直交する電気泳動分離と組み合わせる手法は、古くから報告されているが^{5)~8)}、著者らの開発した手法では、平板型ポリマーモノリスを固定相として用いる HPLC と直交する電気泳動を組み合わせている⁴⁾。著者らの開発した手法では、PC や TLC と異なり送液ポンプを用いているため、通常の HPLC と同様にグラジエント溶離などを適応することが可能である。同様の手法として、Dzido らは、平板型ポリマーモノリスではなく、TLC プレートに圧力差流を供給し、直交する電気泳動分離を同時に行う手法を報告している⁹⁾。

平板型モノリスを用いる二次元同時分離手法の研究を行うなかで、著者らは二次元分離手法に FFF の原理に類似した挙動を組み合わせた、新たな分離手法を提案した (FFF では、壁面からの距離が定常状態となった試料成分の分離を行うが、本手法は FFF とは異なり定常状態ではないため、「FFF に類似した挙動」と称する)。これまでの二次元分離手法では、ろ紙、TLC プレート、及び、平板型モノリスにおける移動相流速は、流れ横断方向に関しては、位置に依存せず一定である。すなわち均一流速場が用いられる。これに対して平板状の分離場に、Fig. 1A に示すように、位置により流速が異なる不均一流速場を導入することで、不均一流速場と流れ横断方向の電気泳動の組み合わせによって、流れ方向の分離を促進することが可能となる。

これまでに報告されているクロマトグラフィーと電気泳

* E-mail: kitagawa.shinya@nitech.ac.jp

¹ 名古屋工業大学大学院工学研究科生命・応用化学専攻: 466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町

Fig. 1 (A) Principle of field-flow orthogonal electrochromatography (FFOEC) combining liquid chromatography, electrophoresis, and field-flow fractionation. (B) Simulated relationship between electric field strength and analyte elution time ($k = 1.0$, $v_0 = 1.0\ mm\ s^{-1}$, $L = 50\ mm$, $\delta_v = 0.1$ or $0.2\ s^{-1}$, $\mu_{ep} = 1.0 \times 10^{-2}$ or $1.5 \times 10^{-2}\ mm^2\ V^{-1}\ s^{-1}$). (C) Simulated relationship between the electric field strength and the separation efficiency of two analytes with different μ_{ep} ($k = 1.0$, $v_0 = 1.0\ mm\ s^{-1}$, $L = 50\ mm$, $\delta_v = 0.1$ or $0.2\ s^{-1}$, $\mu_{ep} = 1.0 \times 10^{-2}$, 1.5×10^{-2} or $2.0 \times 10^{-2}\ mm^2\ V^{-1}\ s^{-1}$).

動が直交する分析手法では、異なる分離原理を有する二つの手法を組み合わせ、二次元同時分離を行うことが目的であった。一方、今回提案する、HPLCと電気泳動、それにFFFに類似した挙動を組み合わせる分離手法では、二次元分離ではなく三つの手法を組み合わせることで、流れ方向の分離（一次元分離）を促進することを目的としている。すなわち、本手法は本質的に一次元分離手法であり、流れ横断方向の電気泳動（電気クロマトグラフィー）分離を、FFFと同様に不均一な流速場を利用することで、流れ方向の一次元分離に増幅・変換することを目的としている。二次元同時分離手法は、高い分離性能を有しているが、同時検出が必要となるため利用できる検出方法が限られてしまう。すなわち、質量分析装置のような高価な検出器を並列検出に用いることは困難である。これに対して、提案する手法は、平面上で複数の分離モードに基づいた分離を行い、それを一次元分離に還元しているため、通常のHPLCと同様にただ一つの検出器を用いて検出を行うことが可能である。すなわち、複数の分離モードを利用した高い分離性能と、自由度の高い検出方法を併せ持つ分離分析手法となることが期待できる。

本論文では、HPLCと電気泳動、それにFFFに類似した挙動を組み合わせた新たな分離分析手法である「フィールドフロー直交型電気クロマトグラフィー (field-flow orthogonal electrochromatography, FFOEC)」を提案するとともに、その有効性を実証するために、局所的にモノリス密度がコントロールされた平板型ポリマーモノリスを調製し、その分離挙動について基礎検討を行った。

2 理 論

FFOECでは、Fig. 1Aに示すように、位置により流速が異なる平板状固定相内において、流れ横断方向に電気泳動を行うことで、流れ方向の分離が促進される。平板状分離場における流速の位置依存性が $v(x)$ で表せるとし、試料成分の保持係数(k)、電気泳動移動度(μ_{ep})、電位勾配(E)は、場所に依存せず一定であると仮定する。時間 t における試料成分の圧力差流横断方向の移動距離(Δx)は、

$$\Delta x(t) = \frac{\mu_{ep}}{k+1} Et \quad (1)$$

で表される。位置 x における流速は $v(x)$ であるので、カラム長(L)と試料溶出時間(t_e)の関係は

$$L = \int_0^{t_e} \frac{1}{k+1} v(x(t)) dt \quad (2)$$

となる。単純な流速場として $v(\Delta x) = v_0 + \delta_v \Delta x$ を仮定すると、 t_e は式(3)で得られる。ただし、 v_0 は試料注入点における流速である。

$$t_e = (k+1) \frac{\sqrt{v_0^2 + 2L\delta_v\mu_{ep}E} - v_0}{\delta_v\mu_{ep}E} \quad (3)$$

式(3)を用いて, $k=1.0$, $v_0=1.0 \text{ mm s}^{-1}$, $L=50 \text{ mm}$, $\delta_v=0.1 \text{ s}^{-1}$ (10 mm の直交方向電気泳動に対して流速が 1 mm s^{-1} 変化), $\mu_{ep}=1.0 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ として t_e を算出した. 電位勾配と溶出時間の関係を Fig. 1B に示した. 試料成分は, 電気泳動に伴い高流速場へと移動するため, E の増加に伴い, 溶出時間が短縮されることがわかる. 同じ条件で, $\mu_{ep}=1.5 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ とした場合, 短縮の度合いはより大きくなる. さらに, 流速の変化率を $\delta_v=0.2 \text{ s}^{-1}$ とすると, 溶出時間の短縮効果は増大する.

二成分間の分離に対する直交方向の電気泳動効果を評価するために, 指標として相対ピーク間距離である $\Delta t_e/t_{e1}$ ($\Delta t_e = t_{e2} - t_{e1}$, t_{e1} は先に溶出する試料成分の溶出時間)を用いた. $\delta_v=0.1 \text{ s}^{-1}$ において, $\mu_{ep1}=1.0 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $\mu_{ep2}=1.5 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の試料成分 (ともに $k=1.0$ とする. すなわち $E=0$ である HPLC では流れ方向の分離はされない) の $\Delta t_e/t_{e1}$ 値を計算すると, Fig. 1C に示すように E の増大に伴い分離が改善されることがわかる. また, その改善の度合いは, 電気泳動移動度差の大きな, $\mu_{ep1}=1.0 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $\mu_{ep2}=2.0 \times 10^{-2} \text{ mm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の組み合わせで増大する. また, 流れ横断方向への電気泳動に伴う分離の改善は, 流速場の変化率に依存し, $\delta_v=0.1 \text{ s}^{-1}$ よりも $\delta_v=0.2 \text{ s}^{-1}$ の方が効果的である.

HPLC や CE では分離の改善を行うためには, 分離長の増大が有効である. しかしながら, 分離長の増大は分析時間の増大を伴う. 本手法では, 電気泳動により高流速域に移動させているため, 分析時間の増大を伴わず, 分離の改善を行うことが可能である.

3 実 験

3.1 試 薬

実験に用いた, 水酸化ナトリウム, 濃塩酸, 3-メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン (γ -MAPS), アセトン, 2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン (DMPA), 1,4-ブタンジオール, 1-ペンタノール, ニメタクリル酸エチレン (EDMA), メタクリル酸ドデシル (DMA), メタノール, アセトニトリル (ACN), トリフルオロ酢酸 (TFA), プロモフェノールブルー (BPB), ローダミン 6G, ローダミン B, アシッドレッド 52 はすべて和光純薬工業から購入した.

3.2 平板型ポリマーモノリスの調製

平板型モノリスの調製は, 既報の方法を基に行った⁴⁾. 調製方法の概要を Fig. 2A, B に示した. 2 枚のガラス板 (40×50×1 mm) を, 1 M 水酸化ナトリウム水溶液, 1 M 塩酸で処理を行ったのち, シランカップリング剤である

Fig. 2 Preparation of the monolithic polymer layer equipped with two electrodes for field-flow orthogonal electrochromatography

(A) Preparation of glass plates. (B) Preparation of a polymer monolith with the density gradient by photo-initiated polymerization. (C) Emission spectrum of the light source for polymer monolith preparation and transparency for the glass plates set (numbers of the plates are indicated in Figure).

Fig. 3 Flow velocity in the polymer monolithic layer prepared with different irradiation intensity

The upper end was irradiated with the lower intensity and the lower end for the higher intensity during the monolith preparation. Solution A: 15 % acetonitrile aqueous solution containing 0.01 % TFA and BPB. Solution B: 50 % acetonitrile aqueous solution containing 0.01 % TFA. Time indicated in the figures are the time after step gradient form solution A to B with flow rate of 0.02 mL min^{-1} .

γ -MAPS の導入を行った。金メッキを行った銅電極（厚さ 0.05 mm ）を、両端に銀ペーストを均一にスピンコート（ 7200 rpm ）した 2 枚のガラス板で挟み、熱万力プレス（MNP-001, AS ONE）を用いて、30 分間加熱圧着した。ガラス板間の隙間（ $28 \times 40 \times 0.06 \text{ mm}$, 0.06 mm は電極と銀ペーストの厚み）に、モノリス反応溶液（32 wt% DMA, 8 wt% EDMA, 26 wt% 1,4-ブタンジオール, 34 wt% 1-ペンタノール, モノマー量の 1 wt% DPMA）を注入した。ポリマーモノリスの重合には、低温下光重合法を用いた^{4)10)~15)}。すなわち、 0°C のインキュベーター内で 10 分間光照射を行い、ポリマーモノリスの調製を行った。光照射の際には、Fig. 2B に示す、積層ガラス板を用い、照射される光強度を調製することで、重合されるモノリス密度の位置によるコントロールを行った。重合後は、メタノールを用いて洗浄を行い、未反応物を除去した。

調製したモノリスには、試料注入孔を設け、自作のインターフェイスを介して、送液ポンプ（LC-20AD, Shimadzu）との接続を行った。平板型カラムには泳動用電源（Model-3810, Anatech）を用い、分離場を CCD カメラ（WAT-

250D2 W148N, Watec）を試料の分離挙動を観察した。移動相には電気浸透流の発生を抑制するため、0.01 % となるように TFA を添加した⁴⁾。

4 結果と考察

4.1 密度コントロール平板型ポリマーモノリスの調製と不均一流速場の確認

本研究で提案する FFF に類似した挙動を応用する分離手法においては、Fig. 1A に示すように、適切な流速場を構築する必要がある。本研究では、ポリマーモノリス密度の違い利用し、平板型モノリス内での流速をコントロールする方法を用いた。すなわち、高密度で流路抵抗の大きなモノリス領域では低流速となり、低密度モノリス領域では高流速となる。部位によりポリマーモノリス密度の異なる平板型モノリスの調製を行った。ポリマーモノリス密度は重合時間によっても調製が可能であるが¹⁰⁾¹²⁾¹⁵⁾¹⁶⁾、本法ではポリマーモノリス調製に光重合を用いているため、光照射強度の調製による、密度コントロールについて検討を行った。すなわち、照射強度の高い領域では高流路抵抗であり、低照射領域では低流路抵抗となる平板型ポリマーモノリスの調製を行った。

Fig. 2C に今回用いた光重合用光源の発光スペクトル、及び、光量調製に用いた積層ガラス板の透過スペクトルを示した。今回用いた重合用光源では、 $250 \sim 600 \text{ nm}$ の波長帯に水銀固有の数本の鋭い輝線が得られた。透過スペクトルを見ると、 300 nm 以下の輝線はほぼ透過していないが、 300 nm 以上の波長領域においては、積層するガラスの枚数を増加させるにつれて、透過率が減少していることが確認された。Fig. 1B に示したとおり、積層させるガラス枚数により光量の調製を行うことで、部位により光照射強度の異なる条件で、平板型ポリマーモノリスの調製を行った。

調製した平板型ポリマーモノリスにおいて不均一な流速場が形成されているかどうかを、以下の手順で確認した。まずは、BPB を含む溶液 A（0.01 % TFA 及び BPB を含む 15 % ACN 水溶液）を通液し、モノリスに均一に BPB を吸着させた。次いで、BPB を含まない溶液（0.01 % TFA を含む 50 % ACN 水溶液）をステップグラジエントでモノリスに供給を行った。Fig. 3 にステップグラジエントを行ってから 1 分後、及び 3 分後の平板型モノリスの CCD 観察結果を示した。Fig. 3 では、上方が低強度光照射で調製された領域であり、下方が高強度光照射で調製された領域である。ステップグラジエントに伴い、移動相の ACN 濃度が増加するため、カラムに吸着された BPB が脱着され、二液の境界面に BPB が濃縮される。Fig. 3 に明らかなように、A 液から B 液への移行は画面上方、すなわち、低強度照射領域から起きていることがわかる。低強度照射領域のほうが、モノリス密度（流路抵抗）が小さいため、流速が早く、

Fig. 4 Migration of Rhodamine 6G in heterogeneous polymer monolithic layer (A) without and (B) with application of 120 V

Mobile phase, 50 % acetonitrile aqueous solution containing 0.01 % TFA. Flow rate, 0.02 mL min⁻¹.

優先的に溶液の交換が起きていることがわかる。

実際に流れ直交方向に電気泳動を行った際の試料の溶出挙動を、ローダミン 6G を用いて確認を行った。Fig. 4A に示すように、電圧印加を行っていない条件では、試料成分は圧力差流に従い、直線的にカラム出口に向かい流れた。これに対して、Fig. 4B に示すように、画面上端を負、下端を正として 120 V の電圧を印加すると、陽イオンであるローダミン 6G は、上端の負極へ向かって電気泳動を行っていることが確認できる。印加電圧に対する変位量 (Δx) を Fig. 5A に示した。印加電圧 30 V 以上では、印加電圧に対して変位量は、ほぼ直線的に変化していることが確認できる。Fig. 5A には変位量 (Δx) の標準偏差が示されているが、溶出位置 (x) 自体の再現性は相対標準偏差 6 % 以内であった。

Fig. 3 に示したように、今回調製した平板型ポリマーモノリスは、上端側が低密度、下端側が高密度であり、上端部での流速が大きく、下端部での流速が小さい。したがって、負極への電気泳動は試料成分の高流速場への移動となるため、溶出時間の短縮が起きる。印加電圧に対する溶出時間（試料注入から Fig. 4 の黒線までの到達時間）の変化を Fig. 5B に示した。印加電圧が大きくなるに従い、すなわち、流速が大きくなる領域へ試料成分が移動するに従い、溶出時間が短くなることが明確に示された。以上の結果から、モノリス調製時において光重合の光量を調整する

Fig. 5 Relationships between the applied voltage and (A) the electrochromatographic migration length (Δx , see Figs. 4B) and (B) the elution time of Rhodamine 6G

ことにより、重合されるモノリス密度をコントロールし、照射量の小さな領域ほど流速が大きくなる、不均一流速場を持つ平板型モノリスの調製に成功したことが確認された。

4・2 電圧印加に伴う二成分間分離の改善

単一試料で電圧を印加したところ、不均一流速場と直交する電気泳動により試料の溶出時間が早くなることが確認された。そこで、印加電圧の大きさが分離挙動、特に $\Delta t_e / t_{e1}$ 値に与える影響について、ローダミン 6G とローダミン B を用いて検討を行った。Fig. 6A はローダミン 6G とローダミン B の非電圧印加条件での、試料注入後 150 秒後の観測結果である。この条件ではローダミン 6G とローダミン B は全く分離されず、一つのスポットとしてカラム出口方向に移動していることが確認された。一方、150 V の電圧を印加した、Fig. 6B ではローダミン 6G が顕著に画面上方の負電極へと向かって泳動していることがわかる。また、詳細は不明であるが、ローダミン B はわずかに画面下方の + 局側へと泳動している。これに伴い、高流速場へと移動したローダミン 6G のカラム出口への移動速度が増加し、流れ方向での二成分間の分離が起きていることが確認された。印加電圧と $\Delta t_e / t_{e1}$ 値との関係を Fig. 6C に示した。印

Fig. 6 Enhancement of separation of Rhodamine 6G and Rhodamine B in FFOEC

CCD observation images of (A) without and (B) with the application of 150 V at 150 s after injection. (C) relationship between applied voltage and separation efficiency.

Fig. 7 Enhancement of separation of Rhodamine 6G and acid red 52 in FFOEC

CCD observation images of (A) without and (B) with the application of 30 V at 150 s after injection. (C) relationship between the applied voltage and the separation efficiency.

加電圧が大きくなるに従い、流れ方向の分離が向上していることが明確に示された。すなわち FFOEC において、不均一流速場に直交する電気泳動が、不十分な分離の改善に有効であることを確認することができた。印加電圧を 150 V 以上では気泡がし、分析を行うことができなかった。

流速場を利用した分離をさらに効率よく行うためには、二成分の電気泳動方向が逆であることが有効であると推測できる。そこで、陽イオンであるローダミン 6G と、陰イオンであるアシッドレッド 52 を用いて検討を行った。Fig. 7A は電圧印加を行っていない状態での分離結果である。この条件では、ローダミン 6G とアシッドレッド 52 は

クロマトグラフィー的には分離されず、ほぼ同位置に試料スポットが存在していることが確認できる。Fig. 7B に示す通り、電圧印加を行うと、ローダミン 6G は画面上方の負極へと、また、アシッドレッド 52 は画面下方の正極へと泳動を行っていることがわかる。印加電圧と $\Delta t_e/t_{e1}$ の関係を Fig. 7C に示した。Fig. 6C と同様に印加電圧が大きくなるに従い、二成分間の流れ方向での分離が向上していることがわかる。Fig. 6C の場合、150 V の電圧を印加しても $\Delta t_e/t_{e1}$ 値は約 0.2 であったが、Fig. 7C では、印加電圧 30 V で $\Delta t_e/t_{e1}$ 値が約 0.35 と、相対的に大きな分離改善効果が得られた (30 V 以上の電圧ではアシッドレッド 52 が電極に到

達したため測定を行っていない). すなわち, 試料成分の泳動方向が逆であることは, 不均一流速場を用いる FFOEC において, 流れ方向分離の促進に有効であることが確認された.

上述の通り, Fig. 6 及び 7 では理論通り相対ピーク間距離 $\Delta t_e/t_{el}$ 値の向上が確認された. 分離度 (R_s) についても, 電圧印加を行っていない状態では, Fig. 6 及び 7 の二成分はほぼ同一時間に溶出するため $R_s \approx 0$ であるが, 電圧印加を行うことで, 双方とも $R_s > 1$ を達成することに成功している.

5 結 語

本論文では, 新たな分離手法として, HPLC, 電気泳動, FFF に類似した挙動を組み合わせた手法である FFOEC の提案と, モノリス密度が調製された平板型ポリマーモノリス固定相を用いた, その実装法の検討を行った. 不均一流速場とそれに直交する電気泳動を組み合わせることで, 流れ方向の分離性能を向上させることができることを理論的, 及び, 実験的に確認することができた. 今回の報告では基本原理の確認のために二成分の分離について検討を行ったが, 多成分分離においても, 本法は有効であると考えられる. また, 本論文ではピーク間距離のみを評価対象としているが, 実際の分離においてはピークの広がりも考慮する必要がある. 今回のように流速場と直交する電気泳動を用いた場合, 試料バンドは流れ方向に広がりやすく, 実際に Fig. 6 及び Fig. 7 では, 電圧印加時にピーク幅が広がっていることが確認される. ピーク幅増大の低減には, グラジエント溶離, 及びキャピラリー電気泳動法で用いられるオンキャピラリー濃縮を応用したバンド幅拡大抑制手法が有効であると考えられる^{17) 18)}. 今回の理論計算においては, E , k は平板状固定相の部位に非依存であり, また流速場は直線的に変化していると仮定しているが, 実際に調製した平板型ポリマーモノリス固定相においては, E , k は位置依存となり, さらに流速場も直線的な変化ではない. さらなる詳細な検討を行うためには, これらの因子が FFOEC 分離に与える影響も考慮する必要がある.

緒言でも述べた通り, 本手法は本質的には一次元分離手法である. すなわち, 流れ方向のクロマトグラフィー分離では十分な分離が得られない試料成分について, 直交方向

への電気泳動・電気クロマトグラフィー分離がわずかでも起こる場合に, FFF に類似した挙動を利用して, 流れ方向の分離を達成する手法である. 本論文で用いた固定相では, 疎水性相互作用が全分離場で利用されているが, 部位により異なる相互作用がデザインされた平板型固定相を用いることで, 流れ直交方向の分離効率を高め, 一次元方向分離性能を向上させることも期待できる.

文 献

- 1) J. C. Giddings : *Science*, **260** 1456 (1993).
- 2) M. E. Schimpf, K. Caldwell, J. C. Giddings (Eds.) : *Field-Flow Fractionation Handbook 1st Ed*, (2000), (Wiley-Interscience, New York).
- 3) P. Vastamäki, M. Jussila, M.-L. Riekkola : *Analyst*, **130**, 427 (2005).
- 4) H. Ito, M. Matsugi, S. Kitagawa, H. Ohtani : *Chromatography*, **37**, 73 (2016).
- 5) G. Haugaard, T. D. Kroner : *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2135 (1948).
- 6) H. H. Strain, J. C. Sullican : *Anal. Chem.*, **23**, 816 (1951).
- 7) W. J. van Ooij : *J. Chromatogr.*, **81**, 190 (1973).
- 8) P. R. Stevenson, B. E. Dunlap, P. S. Powell, B. V. Petersen, C. J. Hatch, H. Chan, G. I. Still, M. T. Fulton, J. S. McKell, D. C. Collins : *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 3085 (2013).
- 9) T. H. Dzido, E. Łopaciuk, P. Płocharz, A. Chomicki, M. Zembrzycka, H. Frank : *J. Chromatogr. A*, **1334**, 149 (2014).
- 10) T. Hirano, S. Kitagawa, H. Ohtani : *Anal. Sci.*, **25**, 1107 (2009).
- 11) M. Takahashi, T. Hirano, S. Kitagawa, H. Ohtani : *J. Chromatogr. A*, **1232**, 123 (2012).
- 12) T. Nakaza, A. Kobayashi, T. Hirano, S. Kitagawa, H. Ohtani : *Anal. Sci.*, **28**, 917 (2012).
- 13) T. Hirano, A. Kobayashi, T. Nakaza, S. Kitagawa, H. Ohtani, K. Nagayama, T. Mastumoto : *Anal. Sci.*, **29**, 205 (2013).
- 14) H. Nishimura, T. Hirano, S. Kitagawa, H. Ohtani : *Chromatography*, **35**, 87 (2014).
- 15) A. Kobayashi, T. Nakaza, T. Hirano, S. Kitagawa, H. Ohtani : *J. Sep. Sci.*, **39**, 2459 (2016).
- 16) T. Hirano, S. Kitagawa, H. Ohtani, T. Kinoshita, Y. Ishigaki, N. Shibata, S. Nii : *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 8319 (2013).
- 17) S. Kitagawa, H. Buno, K. Sakabe, H. Nakagawa, H. Ohtani : *J. Sep. Sci.*, **37**, 3181 (2014).
- 18) H. Ueda, S. Kitagawa, H. Ohtani : *Anal. Sci.*, **31**, 1151 (2015).

Development of Field-flow Orthogonal Electrochromatography

Hiroaki MEKATA¹, Shinya KITAGAWA^{*1}, Yoshinori IIGUNI¹ and Hajime OHTANI¹

^{*} E-mail : kitagawa.shinya@nitech.ac.jp

¹ Department of Life Science and Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8555

(Received July 28, 2016; Accepted October 6, 2016)

A novel separation method that combines liquid chromatography and electrophoresis in a field of heterogeneous flow velocity, named as field-flow orthogonal electrochromatography (FFOEC), is proposed. In the theory of FFOEC, the difference in the orthogonal electrochromatographic migration velocity of analytes in a planer stationary phase with pressurized flow of controlled-heterogeneous velocity can enhance the analytes separation in the flow direction as a similar manner of field-flow fractionation (FFF). Since the essence of FFOEC is a one-directional separation, the parallel detection system is not indispensable, akin to a conventional HPLC, even though a planer stationary phase is used. The polymer monolithic layer with a heterogeneous monolith density to control the flow velocity was prepared using a modulation of irradiation intensity in photo-initiated polymerization. In FFOEC using the heterogeneous density polymer monolith layer, the separation efficiency of the analytes was successfully enhanced with an increase in the applied voltage due to orthogonal electrophoresis.

Keywords: liquid chromatography; electrophoresis; field-flow fractionation; polymer monolithic layer; heterogeneous flow velocity.