報 文

未修飾溶融シリカを用いるキャピラリーゾーン電気泳動
による芳香族アミンの分離小 泉 均^{®*}, 笹本喜久男^{*}, 鈴木 義仁^{*}Separation of aromatic amines by capillary zone electrophoresis
using untreated fused silica tubingHitoshi KOIZUMI, Kikuo SASAMOTO and Yoshihito SUZUKI^{*}

^{*}Department of Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering, Yamanashi University,
4-3-11, Takeda, Kofu-shi, Yamanashi 400

(Received 28 February 1996, Accepted 23 March 1996)

The optimum separation conditions for five aromatic amines by capillary zone electrophoresis was described. Citrate/phosphate buffer solution was used as the running buffer. The operational conditions were optimized for five aromatic amines as follows: capillary, 700 mm (effective length: 500 mm) $\times$ 50 μ m i.d. fused silica capillary; buffer solution, 25×10^{-3} mol l⁻¹ citrate/phosphate buffer (pH 4.5); applied voltage, 10 kV (142 Vcm⁻¹); capillary temperature, 40°C; detection wavelength, 205 nm. Five aromatic amines could be completely separated within 12 min. In general, better resolution by CZE is obtained with a higher applied voltage. In this experiment, the resolution of aromatic amines was increased when a lower voltage was applied. For this reason, it is concluded that incomplete replacement of sample bands was caused by both increased electroosmotic flow and suppressed dissociation. The repeatability ($n=5$) of the migration time and the peak area for aromatic amines was better than 0.6% and 9.0% as RSD, respectively.

Keywords : separation of aromatic amines; capillary zone electrophoresis; incomplete replacement; resolution; electroosmotic flow.

1 緒 言

キャピラリーゾーン電気泳動 (capillary zone electrophoresis, CZE) は、非常に高い分解能 ($10^5 \sim 10^6$ 段/m) を持つ優れた分離技術であり、無機イオン¹⁾, 有機酸²⁾, 染料³⁾, ペプチドやタンパク質⁴⁾⁵⁾, 糖質⁶⁾, 等数多くの化合物の分析に広く応用されている。

CZE で用いられるキャピラリーは内径が細いため内

容積に比べ表面積が大きく、特に強塩基性化合物の分析に対してはキャピラリー内壁面への吸着が大きな問題となる。そのため、キャピラリー内壁面の表面電荷を減少させる必要があり、泳動緩衝液のイオン強度の増加、酸性 pH 緩衝液の使用、中性親水性ポリマーを緩衝液に添加しキャピラリー内壁面をコーティングする⁷⁾, 化学結合型キャピラリーを用いる⁸⁾, 等の方法が報告されている。しかし、これらの方法では泳動緩衝液の粘性の増加により電気浸透流 (electroosmotic flow, EOF) が抑制されるため分析時間が増加する、キャピラリー内壁面だ

^{*} 山梨大学工学部化学生物工学科: 400 山梨県甲府市武田 4-3-11

けでなく試料も添加剤の影響を受ける、キャピラリー内壁面に再現性ある状態に保つために平衡時間が必要になる、使用 pH 範囲が狭い、等の問題点がある。

本研究では、内面未処理型キャピラリーを用いた CZE による強塩基性物質への適用性についての検討を行った。試料には、紫外吸収を持ち検出が容易である芳香族アミン類 5 種（アニリン、*N*-メチルアニリン、*N,N*-ジメチルアニリン、ベンジルアミン及び 2-アミノエチルベンゼン）を用いた。通常 CZE では印加電圧を高くすると分離度や分析時間の点で有利¹¹⁾とされているが、印加電圧を高くすると分離度が減少するという逆の結果が得られた。そこで、この原因についても併せて検討を行った。

2 実験

2.1 装置

キャピラリー電気泳動装置は日本分光製 890-CE、検出器は同社製 875-CE を用いた。キャピラリーはジーエルサイエンス製、内径 50 μm 、外径 375 μm の内面未処理型溶融シリカキャピラリー（全長：700 mm、有効長：500 mm）を用いた。又、キャピラリーは自作の恒温槽により約 40°C に保温した。システムへの試料導入は陽極側から落下法（10 cm, 30 s）により行い、試料の検出は 205 nm で行った。又、キャピラリーは試料導入ごとに 0.1 mol l⁻¹ 水酸化ナトリウムを 2 分間、次いで泳動緩衝液を 3 分間吸引法で通液し洗浄した。

2.2 試薬

ベンジルアミンはナカライテスク製試薬特級を、他の芳香族アミン類は東京化成製試薬特級を用いた。これらの芳香族アミン類を各々 50 mg l⁻¹ となるように水で調製し分析試料とした。その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。泳動緩衝液にはクエン酸-リン酸水素二ナトリウム緩衝液を用いた。泳動緩衝液は各等濃度のクエン酸及びリン酸水素二ナトリウム溶液を混合し調製した。試料溶液及び緩衝液の調製には蒸留水を日本ミリボア製の Milli Q II システムで精製した水を用いた。

3 結果と考察

3.1 芳香族アミン類の相互分離

3.1.1 緩衝液濃度の影響 はじめに、芳香族アミン類の泳動挙動に対する緩衝液濃度の影響を検討した。クエン酸とリン酸水素二ナトリウム溶液を体積比 2 : 3 の割合（pH 4.5）で混合し、水で目的濃度に希釈し泳動緩衝液とした。各緩衝液濃度と芳香族アミン類の泳動時

Fig. 1 Effect of buffer concentration on migration time

■: benzylamine; ●: 2-aminoethylbenzene; ▲: *N,N*-dimethylaniline; ◆: *N*-methylaniline; ▼: aniline

Fig. 2 Effect of buffer concentration on resolution/migration time

R_s: 2-aminoethylbenzene/benzylamine; Migration time: 2-aminoethylbenzene

間との関係を Fig. 1 に、緩衝液濃度が移動時間当たりの分離度に及ぼす影響を Fig. 2 に示す。Fig. 1 より、緩衝液濃度の増加に伴い芳香族アミン類の泳動時間は増

加し, 分離は改善される傾向を示した. これは緩衝液濃度, つまり緩衝液のイオン強度の増加とともにゼータ電位が減少し, EOF 速度が減少するためと考えられる. 又, Fig. 2 に示したベンジルアミンと 2-アミノエチルベンゼンの分離において, 緩衝液濃度が $30 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ 以上では分析時間の増加に見合うだけの分離度の向上が得られていないことが分かった. 以上の結果より, 緩衝液濃度は $25 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ を最適とした.

3・1・2 緩衝液 pH の影響 次に, 芳香族アミン類の泳動挙動に対する緩衝液の pH の影響を検討した. 各 $25 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ クエン酸, リン酸水素二ナトリウム溶液の混合比率を変化させることで, 緩衝液の pH を変化させた. 得られた結果を Fig. 3 に示す. pH 4.2~5.0 の泳動緩衝液を用いたときに, 5 種のアミン類を十分に分離することができた. pH の増加に伴いベンジルアミン及び 2-アミノエチルベンゼンの泳動時間は減少した. 一方, アニリン類の泳動時間は pH 4.5 まではあまり変化しなかったが, その後 pH の増加に伴い減少した. ベンジルアミン及び 2-アミノエチルベンゼンの pK_a 値は 10 付近であり, 検討した pH 範囲では完全解離している. 従って, 泳動時間の減少は pH の増加, すなわち EOF 速度の増加によるものと考えられる. 又, ベンジルアミンと 2-アミノエチルベンゼンの分離はイオン半径の違いによるものであると推定され

る. 一方, アニリン類の pK_a 値は 4.8 付近であるため, イオン性の変化と EOF 速度の変化により泳動時間が決定されているものと推定できる. これらの結果から, 芳香族アミン類の泳動順序はそれらの pK_a 値に依存していると結論づけられる. 以上の結果から, 緩衝液の最適 pH は 4.5 とし以後の検討を行った.

3・1・3 印加電圧の影響 次に, 芳香族アミン類の泳動挙動に対する印加電圧の影響を検討した. Fig. 4 には印加電圧と泳動時間との関係を, Fig. 5 には印加電圧と分離度との関係を示す. Fig. 4 で分かるように印加電圧の増加に伴い泳動時間は減少した. しかし, Fig. 5 で示したように印加電圧の増加に伴い各溶質間の分離度も低下した. そのため, ピーク面積及び分析時間を考慮し印加電圧は 10 kV を最適することとした. 得られた最適条件を Table 1 に示す. この条件で得られた 5 種の芳香族アミン類のエレクトロフェログラムを Fig. 6 に示す. CZE では印加電圧が高いほど移動時間, 分離度の点で有利であることが知られている¹¹⁾. しかし, 本研究では高電圧を印加することによって, 分離度は逆に減少した. この原因としては, 高印加電圧下では EOF 速度が大き過ぎ, 試料バンド内での試料成分の置き代わり¹²⁾¹³⁾が制限されたためと推定される. この原因を解明するため, まず 10 kV で一定時間印加した後, 印加電圧を 30 kV に上昇させ泳動を行った. 得られた結果

Fig. 3 Effect of buffer pH on migration time

■: benzylamine; ●: 2-aminoethylbenzene; ▲: *N,N*-dimethylaniline; ◆: *N*-methylaniline; ▼: aniline

Fig. 4 Effect of applied voltage on migration time

■: benzylamine; ●: 2-aminoethylbenzene; ▲: *N,N*-dimethylaniline; ◆: *N*-methylaniline; ▼: aniline

Fig. 5 Effect of applied voltage on resolution

□: benzylamine/2-aminoethylbenzene; ○: 2-aminoethylbenzene/*N,N*-dimethylaniline; △: *N,N*-dimethylaniline/*N*-methylaniline; ▽: *N*-methylaniline/aniline

Table 1 Optimum analytical conditions

Capillary	fused silica; 50 μm i.d. $\times$ 700 mm (effective length: 500 mm)
Run buffer	$25 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ citric acid/phosphate buffer (pH 4.5)
Applied voltage	10 kV
Injection	hydrodynamic (10 cm, 30 s)
Water bath temp.	40°C
Detection	205 nm

を Table 2 に示す。10 kV の印加時間を増加させることにより分離度は改善された。逆に 30 kV で 10 秒間印加した後、印加電圧 10 kV で泳動を行ったところ、分離度は減少した。この結果は高印加電圧下では試料バン

Fig. 6 Electropherogram of five aromatic amines

1: benzylamine; 2: 2-aminoethylbenzene; 3: *N,N*-dimethylaniline; 4: *N*-methylaniline; 5: aniline. For analytical conditions, see Table 1

ド内での芳香族アミン類の置き代わりが制限されているという推定を裏付けられる。次に、芳香族アミン類を泳動緩衝液又は水に溶解した 2 種類の試料溶液を用いて、印加電圧を i) 30 kV 一定、ii) 10 kV で 10 秒間印加後 30 kV に増加させる (以下、10~30 kV と表記)、及び iii) 10 kV 一定、の 3 種のパターンで泳動を行い、試料調製溶液の違いにおける各印加電圧条件での分離度を調べた。結果を Table 3 に示す。印加電圧条件が 30 kV 一定のときでは、水溶解試料に比べて緩衝液溶解試料のほうが良好な分離度を示した。又、緩衝液溶解試料の分離度は、印加電圧が 10~30 kV より 30 kV 一定のときのほうが良好であり、逆に水に溶解した

Table 2 Resolution of aromatic amines obtained at 30 kV after preapplication at 10 kV

Compound	Applied time at 10 kV/s				
	0	10	30	60	300
Benzylamine/2-aminoethylbenzene	0.86	0.89	0.97	0.93	0.91
2-Aminoethylbenzene/ <i>N,N</i> -dimethylaniline	2.52	3.32	3.56	3.22	3.19
<i>N,N</i> -Dimethylaniline/ <i>N</i> -methylaniline	2.03	2.60	2.82	2.61	2.59
<i>N</i> -Methylaniline/aniline	2.30	2.14	2.41	2.29	2.22

Table 3 Effect of applied voltage on the resolution

Compound	Applied voltage/kV					
	Buffer sample			Water sample		
	30	10~30	10	30	10~30	10
Benzylamine/2-aminoethylbenzene	0.92	0.84	1.40	0.80	0.86	1.63
2-Aminoethylbenzene/ <i>N,N</i> -dimethylaniline	2.74	2.63	3.60	2.37	2.54	4.28
<i>N,N</i> -Dimethylaniline/ <i>N</i> -methylaniline	2.40	2.31	3.11	1.88	2.26	3.57
<i>N</i> -Methylaniline/aniline	2.18	2.13	2.64	1.76	2.05	2.97

試料の分離度は 10~30 kV のときのほうが良好であった。水溶解試料では、試料バンド内でイオン化の自己抑制が生じており、試料バンド内での個々の試料成分の置き代わりに時間を要しているものと考えられる。そのため、高印加電圧では試料成分の置き代わりが完了する前に試料バンドの泳動が開始される。結果として、ピークの広がりが生じているものと考えられる。一方、緩衝液溶解試料中では芳香族アミン類は十分に解離した状態であり、個々の試料バンドの置き代わりはスムーズに行われ、高電圧下でも分離度の低下は生じない。又、緩衝液溶解試料では、印加電圧条件が 10~30 kV のときでは、電圧切替時での試料の拡散¹⁴⁾等によって水溶解試料に比べて分離度が低下するものと考えられる。更に、緩衝液溶解試料では試料溶液と泳動緩衝液とのイオン強度の差がほとんどないため、スタッキング効果を得ることはできない。一方、水溶解試料ではイオン強度の差は明確にあるため、スタッキング効果により印加電圧が 10 kV 一定のときでも十分な分離度が得られるものと考えられる。芳香族アミン類の自己解離抑制による試料バンド内での試料成分の不完全な置き代わりが分離度に大きく関与していることが判明した。しかし、印加電圧条件が 10 kV 一定のときの分離度が、30 kV 一定や 10~30 kV のときよりはるかに高い値を示した理由は、自己解離抑制による不完全な置き代わりだけでは説明することはできない。特に、水溶解試料では分離度の差は大きく、30 kV 一定のときの分離度は緩衝液溶解のときより低い。このことから、高印加電圧下での EOF 速度の急激な増加が大きく寄与している、つまり、EOF 速度の急激な増加により試料バンド内での試料成分の置き代わりが不完全なまま泳動され検出されたものと考えられる。以上の結果より、印加電圧が高くなるに伴い芳香族アミン類の分離度が低下した原因は、EOF 速度の増加と自己解離抑制の二つの効果による試料バンド内での芳香族アミン類の置き代わりが不完全となったものと結論

Table 4 Detection limits and reproducibilities of aromatic amines

Compound	Detection limit/mg l ⁻¹ (<i>S/N</i> =3)	RSD, % (<i>n</i> = 5)	
		Migration time	Peak area
Benzylamine	0.25	0.55	2.34
2-Aminoethylbenzene	0.25	0.49	1.70
<i>N,N</i> -Dimethylaniline	0.50	0.44	8.93
<i>N</i> -Methylaniline	0.25	0.37	4.15
Aniline	0.25	0.40	3.67

づけられた。

3・2 検出下限及び再現性

本法における各芳香族アミン類の検出下限及び再現性について検討した。Table 1 に示した条件で測定したエレクトロフェログラムから、*S/N*=3 として各試料の検出下限を求めた。又、泳動時間及びピーク面積の再現性は各 50 mg l⁻¹ の試料を導入して得られたエレクトロフェログラムを 5 回測定した値から求めた。結果を Table 4 に示す。

検出下限については、*N,N*-ジメチルアニリンを除き 0.25 mg l⁻¹ とかなり良好な結果が得られた。泳動時間の再現性については非常に良好であったが、ピーク面積の再現性についてはあまり良好ではなかった。特に、*N,N*-ジメチルアニリンの再現性は、8.9% と非常に悪かった。この原因としては、検出下限が高く、又若干テイリングしたピーク形状であったためと考えられる。

文 献

- 1) P. J. Oefuer: *Electrophoresis*, **16**, 46 (1995).
- 2) Y. M. Liu, S. J. Shea: *J. Chromatogr. A*, **663**, 239 (1994).

- 3) S. M. Burkinshaw, D. Hinks, D. M. Lewis: *J. Chromatogr.*, **640**, 413 (1993).
- 4) M. Gilges, M. H. Kleemiss, G. Schomburg: *Anal. Chem.*, **66**, 2038 (1994).
- 5) J. K. Towns, F. E. Regnier: *Anal. Chem.*, **63**, 1126 (1991).
- 6) S. H. Kuhn, A. Paulus, E. Gassmann, H. M. Widmer: *Anal. Chem.*, **63**, 1541 (1991).
- 7) S. A. Swedberg: *Anal. Biochem.*, **185**, 51 (1990).
- 8) Y. -F. Maa, K. J. Hyver, S. A. Swedberg: *J. High Resolut. Chromatogr.*, **14**, 65 (1991).
- 9) W. J. Lambert, D. L. Middleton: *Anal. Chem.*, **62**, 1585 (1990).
- 10) T. L. Huang: *Chromatographia*, **35**, 395 (1993).
- 11) 本田 進, 寺部 茂編: “キャピラリー電気泳動—基礎と実際—”, (1994) (講談社).
- 12) F. Foret, V. Sustacek, P. Bocek: *J. Microcol. Sep.*, **2**, 229 (1990).
- 13) R. Szücs, J. Vindevogel, P. Sandra, L. C. Verhagen: *Chromatographia*, **36**, 323 (1993).
- 14) Y. J. Yao, S. F. Y. Li: *J. Chromatogr. Sci.*, **32**, 117 (1994).

要 旨

キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) を用いた 5 種の芳香族アミン類の最適分離条件について検討した。クエン酸-リン酸緩衝液を用いた 5 種の芳香族アミン類に対する分離条件は以下のように最適化された; キャピラリー, 内径 50 μm , 長さ 700 mm (有効長: 500 mm) の内面未処理型溶融シリカキャピラリー; 緩衝液, $25 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.5); 印加電圧 10 kV (142 V cm^{-1}); キャピラリー温度, 40°C ; 検出波長, 205 nm。5 種の芳香族アミン類は 12 分以内に完全に分離された。一般に CZE では, 印加電圧が高いほど高い分離度が得られる。しかし本法においては, 芳香族アミン類の分離度は印加電圧が低くなるに伴い増加した。この原因は電気浸透流 (EOF) 速度の増加と自己解離抑制の二つの効果による試料バンド内での芳香族アミン類の置き代わりが不完全となったものと結論づけられた。芳香族アミン類の泳動時間とピーク面積の再現性 ($n=5$) について調べた結果, 相対標準偏差 (RSD) はそれぞれ 0.6% 及び 9.0% 以下であった。