報 文

ミセル動電クロマトグラフィーにおける擬似固定相としての生合成界面活性剤アルスロファクチンの評価

加藤 尚志^{®*}, 斎藤 紘一^{*}, 今中 忠行^{**}

Evaluation of biosynthesized surfactant arthrofactin as a pseudostationary phase in micellar electrokinetic chromatography

Hisashi KATO, Koichi SAITOH^{*} and Tadayuki IMANAKA^{**}

^{*}Research Center for Higher Education, Tohoku University, Kawauchi, Aoba-ku, Sendai 980-8576

^{**}Graduate school of Engineering, Kyoto University, Yoshidahon-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501

(Received 21 July 1998, Accepted 26 August 1998)

This report deals with an evaluation of arthrofactin (AF) as pseudostationary phase component in micellar electrokinetic chromatography (MEKC). A micellar solution of AF is invaluable for MEKC owing to the low electrophoretic mobility of the AF-micelle. However, a mixed micellar solution of AF and sodium dodecyl sulfate (SDS) is valuable. The contribution of different kinds of solute-micelle interactions to the MEKC behavior of solute compounds is discussed by using the linear solvation energy relationship (LSER) model with the AF-SDS mixed micellar system. A notable difference is found between SDS and mixed AF-SDS micellar systems in selectivity, particularly for compounds having a hydrogen-donating ability. The effect of the hydrogen-bonding ability of the solute to its retention in the micelle increases with increasing concentration of AF in a mixed micellar solution. As a consequence, a specific increase in the retention is observed for phenols and alcohols, even at such a low concentration of AF as the 0.01% level of SDS. Such a sensitive effect of AF is regarded to be caused by the presence of many hydrogen-acceptable functional groups, such as amide and carboxyl, in the hydrophilic moiety in an AF molecule.

Keywords : micellar electrokinetic chromatography; pseudo-stationary phase; biosynthesized surfactant; arthrofactin; mixed micellar.

1 緒 言

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) は、キャピ

ラリーゾーン電気泳動 (CZE) の特長を生かしながら、CZE では原理的に分離不可能な、電気的中性な化合物を分離し得る手法である。その高い分離能と、微量な物質を扱えるという利点から、開発されてから¹⁾現在までの十数年あまりの間に、アミノ酸²⁾や DNA³⁾などの生体成分の分析、金属錯体⁴⁾⁵⁾やポリフィリン⁶⁾⁷⁾、クロロフィル⁸⁾⁹⁾など様々な物質の分離に対して利用され、発展

^{*} 東北大学大学教育研究センター: 980-8576 宮城県仙台市青葉区川内

^{**} 京都大学大学院工学研究科: 606-8501 京都府京都市左京区吉田本町

してきた。CZE においては、電解質溶液を満たした中空のキャピラリーの両端に電圧を加えることにより、それぞれの溶質の表面電荷密度の違いによって生じる電気泳動移動度の差によって分離が達成される。これに対し MEKC の場合には、泳動液に臨界ミセル濃度 (cmc) 以上の界面活性剤を加えてミセルを形成させる。イオン性の界面活性剤を用いれば、生じたミセル自身が電気泳動移動度を持つために、溶質が電気泳動移動度を示さない電気的中性分子であっても、界面活性剤ミセルとの相互作用の大きさに応じて、見掛け上の電気泳動移動度を持つことになり、その移動度の違いによって分離が達成されることになる。

MEKC において泳動液中に存在するミセルは擬似固定相と呼ばれ、試料成分の分離挙動はバルク水相-ミセル二相間分配モデルによりクロマトグラフィーと同様に取り扱われ、解析されている¹⁰⁾。又、HPLC において異なった充てん剤のカラムを使うのと同様に、様々な界面活性剤が MEKC の擬似固定相として利用されてきた¹¹⁾。現在では利用における簡便性などから、硫酸ドデシルナトリウム (SDS) が広く用いられているが、溶質分子との間に特異的な選択性を示すような相互作用を持つ界面活性剤を用いてミセルを形成させれば、これまでとは異なった分離挙動が得られるものと期待される。

これまで MEKC の擬似固定相には、上記の SDS をはじめとするアルキル硫酸塩などの陰イオン界面活性剤、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB)¹²⁾等の陽イオン界面活性剤、Triton X-100¹³⁾等の非イオン界面活性剤などが用いられてきた。又、このような工業的に合成された界面活性剤のほかに、ウシ血清アルブミン¹⁴⁾や胆汁酸ミセル¹⁵⁾など界面活性を持つ生体関連化合物も用いられており、その特異的な選択性を利用した光学分割などに応用されている。これら天然に存在する界面活性を持つ化合物の中でも、微生物の細胞組織中から得られるものを特にバイオ・サーファクタント¹⁶⁾と呼ぶ場合がある。

本研究では、バイオ・サーファクタントの一種であるアルスロファクチン (AF) に注目した。AF は大腸菌により生合成され、Fig. 1 に示すように 11 個のアミノ酸が環状に結合した親水部と、炭素数 14 の直鎖炭化水素鎖からなる疎水部から成る。このため両親媒性を示し、水溶液中でミセルを形成する¹⁷⁾。

本報では、AF を MEKC に利用可能であるかどうかについて検討を行い、その場合の試料分子の保持特性についての評価を行った。

Fig. 1 Structure of AF

2 実験

2.1 アルスロファクチン¹⁷⁾

大腸菌により生合成させたものをヘキササンで抽出し、50% アセトニトリルから再結晶により精製したものを使用した。

2.2 試薬

泳動液用緩衝溶液は所定の濃度のリン酸塩緩衝液、及び塩酸-ホウ酸塩緩衝液により pH を 7~9 に調整し、これに擬似固定相の界面活性剤を加えて調製した。界面活性剤には SDS (生化学用: ナカライテスク製)、及び AF を用いた。溶液の調製には蒸留水を Milli-Q システムにより処理した精製水を用いた。

2.3 装置及び実験操作

フォトダイオードアレイ検出器付きキャピラリー電気泳動装置 (大塚電子製 CE-3000 型) に、有効長 50 cm, 全長 62.5 cm, 内径 50 μ m, 外径 375 μ m の溶融シリカ製キャピラリーを装着して用いた。

擬似固定相評価用の試料には、Table 1 に示す化合物を濃度 10^{-3} M ($1 \text{ M} = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) から 10^{-2} M のメタノール溶液として用いた。又、各試料溶液にはミセルの移動度及び、電気浸透流速を測定するためのマーカーとして、それぞれ Sudan III とメタノールを添加した。

各測定に先だって、アセトン (300 s), 水 (600 s), 2 M 水酸化ナトリウム (300 s), 水 (600 s), 泳動液 (600 s) を流し、コンディショニングを行った。試料溶液は落差法 (高低差 25 mm, 導入時間 30 s) によってキャピラリーに導入し、陰極側に検出器において両端に 10~20 kV の範囲で電圧を印加して、MEKC を行った。検出にはフォトダイオードアレイ紫外可視吸光度検出器を用い、210~280 nm の範囲で、各化合物について最適な波長において試料化合物の検出を行った。

Table 1 Solvatochromic parameters V , π , β and α , of 22 compounds²⁴⁾

	$V/100$	π	β	α
Phenylacetoneitrile	0.590	0.90	0.37	0.00
<i>p</i> -Nitrotoluene	0.729	0.97	0.31	0.00
<i>o</i> -Xylene	0.668	0.51	0.12	0.00
Anisole	0.639	0.73	0.32	0.00
Propylbenzene	0.769	0.51	0.12	0.00
Bromobenzene	0.624	0.79	0.06	0.00
Benzoaldehyde	0.606	0.92	0.30	0.00
Butylbenzene	0.867	0.49	0.12	0.00
Benzylalcohol	0.634	0.99	0.52	0.39
Phenol	0.536	0.72	0.33	0.61
Benzene	0.491	0.59	0.10	0.00
Nitrobenzene	0.631	1.01	0.30	0.00
<i>p</i> -Cresol	0.634	0.68	0.34	0.58
Acetophenone	0.690	0.90	0.49	0.04
Toluene	0.592	0.55	0.11	0.00
Chlorobenzene	0.581	0.71	0.07	0.00
Ethylbenzene	0.668	0.53	0.12	0.00
Naphthalene	0.753	0.70	0.15	0.00
<i>p</i> -Xylene	0.668	0.51	0.12	0.00
Fluorene	0.960	1.18	0.22	0.00
Pyridine	0.470	0.87	0.44	0.00
2-Naphthol	0.978	0.82	0.33	0.61

V : molar volume; π : measure of the solute dipolarity/polarizability; β : hydrogen bond acceptor ability; α : hydrogen bond donor ability

2・4 動的光散乱光度法によるミセル直径の測定

DLS-7000 動的光散乱光度計 (大塚電子) を用いて, 動的光散乱光度法により, SDS 及び AF-SDS 混合ミセル系におけるミセルの流体力学的直径を測定した。

光源には 488 nm の Ar イオンレーザー (出力 75 mW) を用い, レーザー光の入射角は 10° とした。測定に先立ち, 試料溶液を満たしたセルをセル室内 (25°C) に固定した後, ペリスタポンプを用いてミリポア製メディアプレップ HF50 (孔径 $0.04\ \mu\text{m}$) に試料溶液を 15 分間通し, 測定の妨害となる微粒子を除去した。

3 結果及び考察

3・1 AF の電気泳動移動度

AF 分子中にはアスパラギン酸構造が 2 個含まれており, 十分に高い pH 条件下では二価の陰イオンとなることが期待できる。そこで, CZE により電気泳動移動度を測定することにより, AF が電気泳動移動度を持つための条件を調べた。AF の 210 nm における吸光係数は $2.3 \times 10^4\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 程度と大きく, 十分な検出感度が期待された。

AF が強アルカリ条件下では加水分解を起こす可能性があったため, pH 7~9 の範囲での AF の電気泳動移動度を測定した。電気浸透流のマーカーであるメタノールの検出時間から得られた電気浸透流の検出時間 t_0 (s) と, AF の検出時間 t (s), 及びキャピラリーの全長 L (cm), 有効長 l (cm), 印加電圧 E (V) を式 (1) に代入して計算した結果, ホウ酸塩緩衝液 (pH 9) 20 mM, 印加電圧 15 kV の条件における電気泳動移動度 (μ_{ep}) は $2.33 \times 10^{-4}\ \text{cm}^2/\text{Vs}$ であった。

$$\mu_{\text{ep}} = \frac{L \cdot l}{E} \cdot \frac{(t - t_0)}{t \cdot t_0} \quad (1)$$

AF のピークはこの条件下において, 電気浸透流のマーカーであるメタノールのピークと 200 秒以上に検出されており, AF の電気泳動移動度は十分に大きいと判断された。この泳動液の条件下で, AF ミセルが同等の電気泳動移動度を持つことができれば, MEKC に用いた場合においても分離に十分なウィンドウを確保できることが期待された。

3・2 AF による MEKC

泳動液に AF のミセル溶液を用いた MEKC の可能性について検討した。

界面張力法により求められた純水中の AF の cmc は $1.0 \times 10^{-3}\ \text{M}$ と報告されている¹⁷⁾。pH 9 ホウ酸塩緩衝溶液 (20 mM) 中において, AF は $10^{-3}\ \text{M}$ 以上の濃度で白濁することが観察されたため, AF 濃度が $1 \times 10^{-3} \sim 10^{-5}\ \text{M}$ の範囲内になるように泳動液を調製した。MEKC で分離に利用できるウィンドウ幅を測定するため, 電気浸透流とミセルの検出時間のマーカーとしてメタノールと SudanIII を用いた。その結果, 印加電圧を 5~30 kV, pH を 7~9 の範囲での実験条件において, ミセルと電気浸透流の検出時間に差は見られなかった。AF の構造から判断すると, 電荷を持つアスパラギン酸は疎水基に近い位置にあり, 球状ミセルを形成した場合には電荷を持つと期待されるカルボキシル基が, ミセル内部の比較的疎水的な領域に位置して, 有効な電荷を持つことができないと考えられた。そのために, AF ミセルの電気泳動移動度は, このような小さい値を示すのではないかと考えた。この結果, AF ミセル溶液は MEKC 用の泳動液には不適當であると判断した。

3・3 光散乱光度法によるミセル直径の測定

AF ミセルでの MEKC が困難であったため, 陰イオン

界面活性剤である SDS との混合ミセルの系について検討を行った。これまでも Brij35 などの非イオン界面活性剤¹⁸⁾や胆汁酸¹⁹⁾などを SDS と共存させて混合ミセルを形成させた溶液を泳動液として用い、MEKC を行うことによって、SDS ミセル単独の場合とは異なった分離挙動を示すことが報告されている。そこで、まず最初に SDS 及び AF-SDS 混合溶液系において混合ミセルが生成しているのかどうかを確かめるために、光散乱光度法による流体力学的なミセル直径の測定を行った。

pH 9 (10 mM ホウ酸塩緩衝液) の条件下において、SDS 10 mM を含む溶液における流体力学的ミセル直径は 4.47 ± 0.15 nm であったのに対し、AF 0.01 mM-SDS 10 mM を含む溶液での流体力学的ミセル直径は 4.86 ± 0.20 nm へと増大が見られた。この結果から、AF-SDS 混合溶液系において混合ミセルが形成されていると考えられた。

3.4 AF-SDS 混合ミセル系による MEKC

SDS 濃度を 10 mM に固定し、AF を 0.01 ~ 0.5 mM の範囲の濃度になるように加えて混合ミセルを形成させ、この溶液を泳動液として MEKC を行い、Table 1 に示す化合物についての検出時間を測定した。各化合物の検出は、210 から 350 nm の範囲についてフォトダイオードアレイ検出器による多波長測定を行い、AF 自身の持つ紫外吸収の影響がなるべく小さくなるような最適波長に設定した。AF 濃度増加に伴い、電気浸透流速に変化は見られなかったが、ミセルの見掛けの移動速度が減少する傾向が見られた。

3.5 LSER 法による擬似固定相の解析

擬似固定相として AF-SDS 混合ミセルを用いた場合と SDS ミセルを用いた場合で、MEKC における溶質の保持特性の評価を行った。

ミセルに溶質分子が可溶化される場合、溶質がミセル中に完全にに取り込まれ、ミセル中心部のコアの部分の油滴状の部分に存在するような場合と、親水基が存在しているミセル-水界面近傍の領域に存在する場合、そしてミセルの表面部分に吸着のような形で存在している場合の 3 種類の場合が考えられる。コアの部分に溶質が存在している場合のミセルと溶質間の相互作用は主に疎水性相互作用であると考えられる。同様に、親水基が支配する領域では、溶質の極性が支配するような相互作用や、水素結合などの特殊な相互作用などの関与が考えられる。これまで、MEKC における分離機構を解明する際のアプローチとして、分配モデルを考慮して、そのエ

ンタルピーやエントロピー変化などの熱力学量に基づいた解析を行う方法¹⁰⁾や、保持指標を利用した解析²⁰⁾などが行われてきたが、これらの手法はミセル-溶質間に生じる相互作用全体についての議論であり、実際にミセル-水間に生じている複数の相互作用のそれぞれの寄与についての情報は得るのは容易ではなかった。これらの相互作用をここに独立したものとして扱い、評価しようとするアプローチの一つに linear solvation energy relationship (LSER) 法²¹⁾の MEKC への適用²²⁾がある。

LSER 法の基本的な式は式(2)のように表される²³⁾。

$$SP = SP_0 + \frac{mV}{100} + s\pi + b\beta + a\alpha \quad (2)$$

ここで SP は実験により得られる溶質の特性値であり、MEKC の場合では保持係数 (retention factor) k の対数がこれに当たる。 SP_0 は回帰定数、 V 、 π 、 β 、 α は今回試料に用いた各溶質についての溶媒和変色パラメーターで、それぞれ溶質の持つモル体積、分極率、水素結合受容性と供与性を評価した値である。本研究で用いた溶質について、各パラメーターの値を Table 1 に示す²³⁾。MEKC に適合するように式(2)を書き換えたのが、式(3)である²²⁾。

$$\log k = \log k_0 + \frac{mV}{100} + s\pi + b\beta + a\alpha \quad (3)$$

実験値 $\log k$ などの値を代入し、重回帰分析を行うことにより式(3)の各項の係数 m 、 s 、 b 、 a を求め、それぞれのパラメーターが $\log k$ に対してどの程度影響を与えているかについて調べた。得られた回帰係数を比較することにより、溶質のモル体積、分極率、水素結合受容性と供与性が保持にどのような影響を与えるかが考察できる。

保持係数 k は、実験により得られた溶質の検出時間 t_r 、電気浸透流とミセルの検出時間 t_0 、 t_{mc} をそれぞれ測定し、式(4)に基づいて算出した。

$$k = \frac{t_{mc} - t_0}{t_0(1 - (t_r/t_{mc}))} \quad (4)$$

得られた k の値から $\log k$ を算出し、式(3)により重回帰分析を行った。得られた各標準回帰係数を Fig. 2 に示す。0.01 mM の AF を混合した系で、既に各パラメーターの値に変化が見られた。ほかのパラメーターが保

Fig. 2 Dependence of standard regression coefficients, $b(\nabla)$, $a(\diamond)$, $m(\triangle)$ and $s(\square)$, on concentration of AF

SDS concentration: 10 mM, $\log k(\bigcirc)$

持が一定,あるいは保持が減少する方向に変化しているのに対して,溶質の水素供与性に関するパラメーター α の係数である a だけは,AF 添加量の増加に伴って保持が増大するような傾向を示している.このことはアルコール類やフェノール類といった強い水素供与性を持つような化合物の保持だけを,ほかの化合物の保持挙動を変化させることなく選択的に増加させ得ることが期待できることを示唆している.

3・6 AF-SDS 混合ミセル溶液による MEKC

AF-SDS 混合ミセル溶液と SDS ミセル溶液を泳動液に用いた場合に得られたエレクトロフェログラムをそれぞれ Fig. 3 に示す. LSER 法による解析結果からの予想どおり,ほかの化合物の検出時間はほとんど変化していないにもかかわらず,水素結合の水素供与性の大きなフェノールだけが保持を増加させており,ベンゼンとの間でピーク位置が逆転している.同様の選択的な保持の増加はベンジルアルコールでも観察された.

これまで報告されてきた混合ミセル系における MEKC では,SDS にほかの界面活性剤を等量あるいはそれ以上の割合で混合しないと選択性に変化が見られない場合が多かった¹⁸⁾²⁴⁾のに対し,本研究で取り上げた AF-SDS 混合ミセル系では,SDS の全濃度に対して 1/1000 程度の割合で AF を混合させただけで,分離挙動を変化させることが可能であった.これは,AF 分子の持つ 11 個のアミノ酸環状構造により,水素結合性の

Fig. 3 Separation of a mixture of test compounds by MEKC with SDS micellar solution (A) and SDS-AF mixed micellar solution (B)

Running solution: (A), 10 mM SDS, 10 mM borate (pH 9); (B), 10 mM SDS, 0.01 mM arthrofactin, 10 mM borate (pH 9); Capillary: 62.5 cm $\times$ 50 μ m i.d., effective length 50 cm; Applied voltage: 15 kV; Temperature: 25°C; Peaks: (a), phenol; (b), benzene; (c), nitrobenzene; (d), acetophenone; (e), *p*-cresol; (f), toluene; (g), chlorobenzene. Detection at 210 nm.

サイトが数多く提供されていることに起因していると考えられる.

以上のように,MEKC において AF-SDS 混合ミセルを擬固定相として用いた系では,混合する AF の量が少ない領域から,ほかの化合物の分離挙動にほとんど影響を与えることなくフェノール類やアルコール類などの分離挙動のみを選択的に変化させようという特徴を持つことが明らかとなった.このような特徴は,同様の構造を持つバイオ・サーファクタントにおいても期待できる.そのため溶質との間に,より特異的な相互作用を示すような置換基を持つバイオ・サーファクタントを利用することで,さらに広い範囲での応用も期待される.

文 献

- 1) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando: *Anal. Chem.*, **56**, 111 (1984).
- 2) K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando: *J. Chromatogr.*, **332**, 219 (1985).
- 3) A. S. Cohen, S. Terabe, J. A. Smith, B. L. Karger: *Anal. Chem.*, **59**, 1021 (1987).
- 4) K. Saitoh, C. Kiyohara, N. Suzuki: *Anal. Sci.*, **7**,

- 269 (1991).
- 5) K. Saitoh, C. Kiyohara, N. Suzuki: *J. High Resolut. Chromatogr.*, **14**, 245 (1991).
- 6) C. Kiyohara, K. Saitoh, N. Suzuki: *J. Chromatogr.*, **646**, 397 (1993).
- 7) E. N. L. Chan, D. M. Goodall: *J. Chromatogr.*, **636**, 171 (1993).
- 8) K. Saitoh, H. Kato, N. Teramae: *J. Chromatogr. A*, **687**, 149 (1994).
- 9) H. Kato, K. Saitoh, N. Teramae: *Chem. Lett.*, **1995**, 547.
- 10) S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando: *Anal. Chem.*, **57**, 834 (1985).
- 11) P. G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe: *J. Chromatogr. A*, **780**, 41 (1997).
- 12) C. Bjergegaard, S. Michaelsen, K. Mortensen, H. Sorensen: *J. Chromatogr. A*, **652**, 477 (1993).
- 13) S. Crobels, W. Bayens, C. Dewale, C. Van Petegham: *J. Chromatogr. A*, **673**, 267 (1994).
- 14) N. Wu, G. E. Barker, C. W. Huie: *J. Chromatogr. A*, **659**, 435 (1994).
- 15) H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, S. Terabe: *J. Chromatogr.*, **513**, 279 (1990).
- 16) D. G. Cooper, J. E. Zajic: *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**, 229 (1980).
- 17) M. Morikawa, H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, T. Imanaka: *J. Bacteriol.*, **175**, 6459 (1993).
- 18) E. S. Ahuja, K. R. Nielsen, J. P. Foley, E. L. Little: *Anal. Chem.*, **67**, 26 (1995).
- 19) S. Boonkerd, M. Lauwers, M. R. Detaevernier, Y. Michotte: *J. Chromatogr. A*, **695**, 97 (1995).
- 20) P. G. H. M. Muijselaar, H. A. Claessens, C. A. Cramers: *Anal. Chem.*, **66**, 635 (1994).
- 21) M. J. Kamlet, R. W. Taft: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1979**, 337.
- 22) P. G. Muijselaar, H. A. Claessens, C. A. Cramers: *Anal. Chem.*, **69**, 1184 (1997).
- 23) M. J. Kamlet, R. M. Doherry, M. H. Abraham, Y. Marcus, R. W. Taft: *J. Phys. Chem.*, **92**, 5244 (1988).
- 24) E. S. Ahuja, J. P. Foley: *Analyst (London)*, **119**, 353 (1994).

要 旨

大腸菌を利用して生合成した界面活性剤アルスロファクチン (AF) についてミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) における擬似固定相としての有用性を検討した。AF と硫酸ドデシルナトリウム (SDS) の混合ミセルを擬似固定相として用いた MEKC において化学構造の異なる化合物群の保持挙動をそれぞれ調べ、linear solvation energy relationship (LSER) 法による解析を行った。その結果、AF-SDS 混合ミセルを擬似固定相とすると、SDS ミセルを用いた系に比べて、保持に対する溶質の水素供与性の寄与の増加が見られることを見いだした。又、実際に SDS に対して 1/1000 程度の AF を存在させることによりフェノール類やアルコール類の保持だけを選択的に増大させることができた。