〔特集：最新のキャピラリー電気泳動とチップ電気泳動〕

グラジエントミセル動電クロマトグラフィー

江坂幸宏^{1,2}・宇野文二^{1,2}

SUMMARY

A Surfactant gradient method was developed for micellar electrokinetic chromatography (MEKC). In the present method, electroosmotic flow was suppressed almost completely and thus, micelles in a running solution of the inlet vial were introduced in turn into the capillary during operations. Under such situations, we can perform surfactant gradient MEKC separations only by changing the composition of surfactants in the inlet vial during a single run. Here, we represented MEKC separations of unsubstituted benzoate and nine substituted benzoates as model organic anions using mixed systems of CTAC as a cationic surfactant and Tween 20 or Brij 35 as non-ionic surfactants possessing polyoxyethylene chains (POE-NSs). In a pure CTAC system, the synergistic influences of attractive electrostatic and hydrophobic interactions gave rise to quite large retention factors of many of the benzoate anions, resulting in their co-elution. Addition of an adequate amount of the POE-NSs to the pure CTAC system decreased the electrostatic interaction significantly to give remarkably improved separation of the analytes, but long analysis time was required. Surfactant gradient methods decreasing the concentration of POE-NSs in the mixed systems were useful to decrease analysis time and to improve separation simultaneously in both stepwise manners and continuous manners. The fundamentals of the present method were discussed in detail. We also mentioned its availability as a platform to construct highly functional separation systems.

Key words: MEKC, surfactant gradient, CTAC, Tween 20, benzoate anions.

はじめに

寺部らによって創始された動電クロマトグラフィー(EKC)は、クロマトグラフィーとしては極めて興味深い特徴を持っていた^{1,2)}。つまり、通常のクロマトグラフィーにおける固定相にあたる「高次構造を持つ側の分配相」(以降、「高次構造相」とする)が動的なことである。ただ、キャピラリー電気泳動法(CE)で通常採用される速い電気浸透流の存在条件下では、浸透流に乗った溶質(試料)群が、ゆっくりと動く高次構造相との相互作用によって移動速度を減じられながら相互に分離していくために、溶媒相が移動相で高次構造相が固定相という通常の液体クロマトグラフィー

(LC)と同様の姿で認識され、高次構造相は一般に擬似固定相と呼ばれている。また、高速の電気浸透流の採用は、分離の迅速化と陽イオン、陰イオン、中性物質すべての同時検出を可能にするため、EKC分析条件の標準となっていることは周知のことである。このように高次構造相が「自由に動けること」が意識されることは少ない。しかし、分離システムとして眺めると、著者らは“動的な”高次構造相の存在に強く魅力を感じる。

クロマトグラフィーで試料の溶出順番を支配するのは、固定相と試料間の相互作用である。移動相の交換で大きく順番が変わることは稀だろう。これは、試料は、移動相中より固定相中にいる時間が一般に長いことに加え、固定相

Gradient micellar electrokinetic chromatography.

¹ Yukihiro Esaka, Bunji Uno; 岐阜薬科大学

² Yukihiro Esaka, Bunji Uno; 岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

Correspondence address: Yukihiro Esaka; Lab. of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Department of Bio-functional Molecules, Faculty of Pharmacy, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahorahigashi, Gifu 502-8585, Japan.

Fax: +81-58-237-5979

E-mail: esaka@gifu-pu.ac.jp

(受付 2008 年 7 月 1 日, 受理 2008 年 8 月 31 日, 刊行 2008 年 9 月 15 日)

との相互作用が移動相との相互作用より遥かに高い選択性を示すからである。相互作用サイト、疎水ポケットなどを含む高次構造を有する固定相中では試料は、配向性の高い、選択的な相互作用を受けると考えられる。ここで著者らが注目したのは、このような高次構造相が動的であることは、一分離過程に、分離を支配する相互作用を、量的にも質的にも逐次変化させて、その総計として分離結果に反映させることが原理的に可能なことである。すなわち、電気浸透流が抑制された条件下では、このような動的な高次構造相（キャリア）が試料を文字通り検出器に運ぶ役割を演じるので、キャリア組成を逐次的に交換して作用させることができるはずである。以下、この観点に基づく検討について述べたい。

EKCのキャリアに荷電ミセルを用いたものがミセル動電クロマトグラフィー（MEKC）である^{1,2)}。陰イオン性のラウリル硫酸ナトリウム（SDS）、陽イオン性のセチルトリメチルアンモニウムクロリド（CTAC）などはMEKCにおいて多用される界面活性剤であり、一般的に逆相モードでの分離を可能にする。著者らは、これらの界面活性剤に親水基にポリオキシエチレン（POE）鎖を有する中性界面活性剤（POE-NS）であるBrij35やTween 20を混合させたミセルを用いるMEKCを検討してきた^{3~5)}。MEKCにおける混合ミセルの主な価値は、それが連続的に分配特性を変化可能なキャリアシステムであることと考える。たとえば、SDSと前述のPOE-NSの混合ミセルでは、その混合比によって水素結合能が有意に連続的に変化し、溶出順を変化させ、分離改善につなげることが可能である^{3,4)}。ところで、POE鎖には水素結合アクセプター能付与以外に、ミセルと溶質間のイオン性相互作用を抑制する効果がある⁴⁾。ある程度以上の脂溶性を有する有機イオンは、イオンペア相互作用と疎水性相互作用の相乗効果により、逆符号の電荷を持つミセルに圧倒的に分配される傾向がある。混合化によるPOE鎖のミセル表面への挿入は、このうちのイオンペア相互作用を顕著かつ選択的に抑制する⁴⁾。この効果を利用して、適度な濃度でのPOE-NSの荷電ミセルシステムへの添加により、有機イオンの分離を著しく改善できることがわかった^{4,5)}。

ところで、このPOE-NS添加による分離改善については、その代償として比較的に脂溶性の低いイオン試料の検出時間を著しく増大させる欠点がある。著者らは、分離の前半と後半で作用させる混合ミセル組成を変化させて、分離の向上と分離時間の短縮ができないかと考えた。そして、浸透流抑制条件下では、このミセルグラジエント溶出が可能であった⁵⁾。本稿では、陽イオン性のCTACとPOE-NSの混合系を用いた、有機アニオンである安息香酸の分離について、特に、ミセルグラジエントMEKCの方法論に焦点をあてて論じる。

実験

1. 装置

キャピラリー電気泳動装置には、松定プレジジョン製のHCZE-30PNO 高圧電源、多波長同時検出器に日本分光製MD-2010、データ解析用PCにエプソン社製Pro-720Lを構成したものを用いた。キャピラリーはGLサイエンス社製のもの（全長62 cm 有効長31 cm 内径50 μm 外径365 μm ）を、電極には白金線を用い、分離用溶液リザーバーには容積1.5 mLのエッペンドルフチューブを使用した。連続ミセル組成変化にはアズワン社製M-1 マルチスターラーとBei-Art Products 社製・微小磁気回転子（直径2 mm 長さ2 mm）を用いた。

2. 試薬

ミセル用の界面活性剤として、陽イオン性のセチルトリメチルアンモニウムクロリド（CTAC）、及び非イオン性のポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（Tween 20）及びポリオキシエチレンラウリルエーテル（Brij 35）をそれぞれ東京化成工業、キシダ化学、ナカライテスクより購入した。モデル試料の10種の有機アニオンとして、安息香酸及びサリチル酸の2種を和光純薬、4-ニトロ安息香酸、4-トルイル酸、4-ジメチルアミノ安息香酸、4-アセトキシ安息香酸、4-フタルアルデヒド酸、4-ヒドロキシ安息香酸、4-アセトアミド安息香酸の7種はナカライテスク、2-フタルアルデヒド酸は東京化成工業から購入した。浸透流を抑制するために行ったキャピラリー内壁のポリN,Nジメチルアクリルアミド（PDMA）コーティング用の試薬として、N,Nジメチルアクリルアミド及び3-(トリメトキシシリル)プロピルメタクリレート（シグマ・アルドリッチ、テトラメチルエチレンジアミン及び過硫酸アンモニウムをナカライテスクより購入した。残りの試薬は特級のものを用いた。

3. 方法

分離過程における別組成ミセルの分離系への逐次的導入は、ステップワイズ法では、導入したいミセル組成の溶液の入ったリザーバーを陽極側のリザーバーと交換することで行った。陽極側リザーバーの電位はアースに落としてあり、リザーバーの交換は、陰極側の印加電圧を落とすことなく瞬時に（<1 sec）行った。一方、連続法では陽極側リザーバー内の溶液組成を連続的に変化させた（詳しくは本文中で述べる）。出口側のリザーバー内溶液はグラジエント法実行時も初期組成のまま交換しなかった。CE測定は各条件は図の説明に示した。

結果と考察

1. 浸透流抑制下でのアイソクラテック MEKC による有機アニオンの分離挙動

本研究では EOF 抑制のためにポリジメチルアミノアクリルアミド (PDMA) による内壁修飾を行った^{5~7)}. このコーティングによって, 原則的に pH による制限なく, 本

Fig. 1. Electrokinetic separations of ten benzoates using (A) a pure 100 mM CTAC system and (B) a mixed system of 100 mM CTAC and 40 mM Tween 20. Conditions: capillary, a PDMA coated one, 50 μ m i.d. $\times$ 60 cm (effective length, 30 cm); applied potential [operating current], -10 kV [(A) 17 μ A and (B) 19 μ A], running solution, 10 mM phosphate buffer containing the surfactants (pH 7.2); injection, anodic side (siphoning, height 20 cm for 20 sec); detection, 210 nm; at room temperature.

Peak assignment: 0, anthracene (micelle maker); 1, salicylate (2OH-BA); 2, 4-nitrobenzoate (4NO₂-BA); 3, 4-toluate (4CH₃-BA); 4, 4-dimethylaminobenzoate [4(CH₃)₂N-BA]; 5, 4-acetoxybenzoate (4CH₃COO-BA); 6, benzoate (BA); 7, 4-phthalaldehyde (4CHO-BA); 8, 2-phthalaldehyde (2CHO-BA); 9, 4-hydroxybenzoate (4OH-BA); 10, 4-acetamidobenzoate (4CH₃CONH-BA).

来のシラノール基由来の浸透流及び, CTAC 使用時に CTAC 分子の無修飾壁面への吸着によって発生する逆向き (陰から陽極方向) の浸透流の双方が抑制された. 測定条件下, EOF マーカーは 2 時間は検出されなかった.

アニオンであるモデル試料は陰極から陽極向きの電気泳動移動度を有するが, 採用した 10 種の安息香酸類に関しては CTAC ミセルとの相互作用が強く, 測定した条件下での移動方向は全てが CTAC ミセルと同じ陽極から陰極への向きになり, 陰極側で検出される. Fig. 1 に CTAC 単独系と CTAC/Tween 20 混合系を用いた分離を示す. 単独系を用いた (A) では, ミセルマーカーであるアントラセンに続いて, 10 種の安息香酸類が 9.5 分から 12 分の 2.5 分間以内で検出されているが, 共溶出されている試料が多く, 不完全な分離となっている. 一方, 混合系を用いた (B) では, 19 分から 41 分の 22 分間内で全ての試料が完全に分離されている. Tween 20 は, その溶液濃度上昇, つまりミセル内の組成上昇に従って, 有機アニオン試料の溶出時間幅を広げて分離を向上させる. 簡単に言えば, 分離が完成する濃度まで Tween 20 の濃度を上昇させていけばよい. これは, 以前行った SDS/Tween 20 混合系を用いた有機カチオン (カテコールアミン類) の MEKC 分離の場合と同様である⁴⁾. しかし一方で, 今回は比較的広い脂溶性範囲を持つ試料群の分離を検討したため, 分析時間を著しく増加させることになった⁵⁾.

バルク (水) 相から CTAC ミセル相への溶質 (試料) の移動における Tween 20 の添加効果を, 移動自由エネルギーへの効果として定量的に評価するために, 試料のリテンションファクターの対数 ($\ln k$) を Tween 20 の添加濃度 ([Tween 20]) に対してプロットしたところ, すべての安息香酸類について明確な負の傾きが見られ (データ不掲載), Tween 20 の組成増加に従ってミセルへの移動をより強く抑制されていることがわかった^{3~5)}. 一方, アニソールの取り込みに対する有意な Tween 20 の添加効果は見られず, Tween 20 の添加効果は, 試料の負電荷と CTAC ミセルの陽電荷間のイオン性相互作用に対する抑制として専ら現れていた. ここで用いた安息香酸類の多くは, このイオンペア相互作用と疎水性相互作用の相乗作用で強く CTAC ミセルに取り込まれており, Tween 20 添加による分離改善効果は, 片方のイオンペア相互作用を減少させることで, 試料の分配比を良好な分離を与える適度な大きさまで減少させた結果といえる.

ところで, Tween 20 や Brij 35 の親水基を持つポリエーテル構造の性質を考慮すると, これらを混合することでミセルの水素アクセプター性が高められることが予想される. 実際, SDS に Tween 20 や Brij 35 を混合させた場合はミセルの水素アクセプター性が明確に増加し, フェノール性水酸基を有する水素ドナー性試料の分配が選択的に促進され

ることが確認されている^{3,4,8)}. この分配特性の変化を利用して, 混合ミセル組成比による分離最適化が可能であり, 特に水素結合能のバリエーションが豊かな試料群の分離に効果が高い^{3,4)}. 一方, CTAC ミセルへの Tween 20 の添加では, SDS ミセルの場合とは異なり, 元々 CTAC ミセル自体の水素アクセプター性が高いため, ミセルの水素アクセプター性に有意な変化を与えなかったと考えられる^{9~11)}. 結果として, Fig. 1 に示されたように, イオン性相互作用の減少によって分離は向上しているが, 試料置換基の水素結合能を反映した検出順の変化は生じていない.

2. ステップワイズ方式—ミセル組成グラジエント MEKC 法

CTAC 系に Tween 20 を適切な濃度で添加することで有機アニオンの良好な分離を達成できるが, 分離時間の長大化が伴う. やはり分離向上と時間短縮の両立が望まれる. ここでは浸透流を抑制しており, 電場印加中はミセルが上流の泳動液リザーバーから連続的にキャピラリー内へ導入されている. ここで, 一分離過程に上流リザーバー内のミセル組成や濃度を変化させれば, 変化後の組成・濃度のミセルが導入され, 逐次的に試料と相互作用し, その分離に関わることになる.

ここで検討している有機アニオン分離では, 初段で Fig. 1 の (B) で用いたような Tween 20 (Brij 35 でも同様) の組成が大きい溶液を用いて, 相対的に脂溶性が高い試料の分離を完成させ, 続いて, 分離を損なわない範囲で, 徐々に CTAC 単独系に近い組成まで Tween 20 濃度を下げながら試料と相互作用させるやり方が有効であると予想された. この考えに沿って上流リザーバー中のミセル組成切り替えをステップワイズ法 ($[CTAC]_{inlet}=100\text{ mM}$, $[Tween\ 20]_{inlet}=50 \rightarrow 40 \rightarrow 30 \rightarrow 20 \rightarrow 4\text{ mM}$) で行った結果を Fig. 2 に示す (ここで $[X]_{inlet}$ は上流リザーバー中の X の濃度を表す). Tween 20 は, 検出波長である 210 nm においてある程度吸収を有するため, その階段状の濃度変化をベースラインの変動が表すこととなった. そして, 組成の切り替えは予想通りに適正に行われていた. 結果として, 分離は完全に保たれたまま, ピーク検出は 18.5 分から 26.5 分までの 8 分間程度にまで短縮された. 最終組成で Tween 20 濃度を 0 mM にするとスパイク状ノイズがしばしば発生したが, Tween 20 を若干量 (4 mM) 残すことでノイズは解消された.

Tween 20 濃度変化に伴う階段状のベースライン変動は, 定量分析の観点からすると, 階段の境目にピークが検出される場合は問題となる. このベースの変動は検出波長における Tween 20 が持つ吸収に由来する. 検出波長を 254 nm にすると, ベースラインの段差を消去できるが, いくつかの試料 (1, 3, 6) についてはピークが消滅してしまう. 上述の Tween 20 の吸収は, 主としてアルキル鎖とポリエーテル鎖をつなぐ糖部位のカルボニル基に由来すると考えら

Fig. 2. Electrophoretogram of the benzoates with a stepwise gradient program of $[Tween\ 20]_{inlet}$.

Conditions: Capillary, a PDMA coated one, 50 μm i.d. $\times$ 60 cm (effective length, 30 cm); applied potential (current), -10 kV (19–27 μA), running solution, 10 mM phosphate buffer solutions (pH 7.2) containing 100 mM CTAC and 4–40 mM Tween 20.

The concentration of Tween 20 in the inlet reservoir ($[Tween\ 20]_{inlet}$) was changed from 40 mM (initial) to 30 mM (at 2 min), 20 mM (at 4 min), 10 mM (at 6 min) and 4 mM (at 8 min), while that in the outlet reservoir was fixed to 40 mM; injection, anodic side; detection, 210 nm; at room temperature. Peak assignment: same as in Fig. 1.

れた. そこで, アルキル鎖とポリエーテル鎖を直接エーテル結合でつないだ構造を持つ Brij 35 で代用した結果, 210 nm におけるベースラインの変動は解消した⁵⁾.

3. 連続方式—ミセル組成グラジエント MEKC 法

グラジエント溶出プログラムの設計上, 連続的な濃度変化を採用できることが望ましい. ここでは, 簡便で溶液必要量も小さい方法を紹介したい.

開始時, 上流リザーバーには 0.10 mL の初期組成 (たとえば $[CTAC]_{inlet}=100\text{ mM}$, $[Tween\ 20]_{inlet}=40\text{ mM}$) の分離溶液が入っている. この量はリザーバー容量に対して少量でないと混合後に目的組成に近づけることが難しくなる場合がある. 分離開始後, ここに Tween 20 を含まない CTAC 溶液 (たとえば 100 mM CTAC) を任意の速度で添加していく. 上流リザーバー底には微小回転子を置き, 常時混合させておく.

Fig. 3 は, この連続方式で行ったミセルグラジエント MEKC による安息香酸類の分離の結果である. ベースラインの変化は経時的な Tween 20 の濃度減少を表しており, 連続的な変化が成立していることを裏付けている. 分離性能もステップワイズ法と同様, 完全な分離を維持しながら時間短縮に成功している. 連続法で心配されることは, 複数の界面活性剤が混合されて直ちに安定な混合ミセルが形成するかどうかであるが, CTAC と Tween 20 の場合は分離やピーク形状に影響を与える不都合は観測されなかった.

Fig. 3. Electrokinetic separation of the ten benzoates with a continuous gradient program of $[\text{Tween } 20]_{\text{inlet}}$.

Conditions: Capillary, a PDMA coated one, 50 μm i.d. $\times$ 60 cm (effective length, 30 cm); applied potential (current), -10 kV (19–27 μA), running solution, 10 mM phosphate buffer solutions (pH 7.2) containing 100 mM CTAC and 40–3.6 mM Tween 20. The value of $[\text{Tween } 20]_{\text{inlet}}$ was fixed to 40 mM (0–2 min), then changed continuously from 40 mM to 3.6 mM (2–12 min), and fixed again to the end at 3.6 mM, while that in the outlet reservoir was fixed to 40 mM; injection, anodic side; detection, 210 nm; at room temperature. Peak assignment: same as in Fig. 1.

展 望

本報告では、有機アニオンを対象にした MEKC に基づく分析法、特に幾つかのグラジエント法の提案を行った。これらの手法は陽イオン性のミセルから陰イオン性のミセルに置き換えることで、有機カチオンの分析法に容易に拡張できるはずである。また、これらの試料とミセル間のイオンペア相互作用を POE-NS の添加で調整する手法はイオン性の試料のみに有効であるが、イオン性ミセル濃度を増減するミセル濃度グラジエント法を導入できれば、MEKC 本来の分析対象である非荷電分子を含めた広範な分子・イオンの分離において、分離向上と分析時間短縮の両立を可能にする。ただし、イオン性ミセルの濃度変化は、キャピラリー中の電場不均衡を生じ、定常的な濃度勾配形成の成立を妨げ、結果として濃度グラジエント溶出の成立を妨げる。この電場不均衡を補正する手段が別に必要となる。この検討はすでに進行中であり、近いうちに紙上で報告したい。

本研究は、ミセルへの試料の分配を、段階的に強めるやり方で分離と時間の両立を行うグラジエント溶出法を提案するものであるが、その一方で、本手法には重要なコンセプトが内包されていると考えている。そこでは分離過程にミセルの性質を変化させるために、実際は逐次的に別のミセルを送りこんでいるのであり、本稿で示した例では、その性質が段階的・連続的に違っているのである。逆に言えば、分配特性の大きく異なる複数種のミセルを組み合わ

せて、逐次的に導入することも可能である。つまり、マルチモードシステムのプラットフォームとして本法を用いることができると考えている。いままでに、MEKC に使用できる多くの著しく分配性格の異なるミセルが報告されている^{9~11)}。これらの組み合わせは、繊細で高機能的な分離システムの構築を可能にすると期待し、現在研究を進めている。

文 献

- 1) Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Ando A. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal Chem* 1984;56:111–113.
- 2) Terabe S, Otsuka K, Ando A. Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary. *Anal Chem* 1985;56:834–841.
- 3) Esaka Y, Kobayashi M, Ikeda T, Kano K. Hydrogen-bonding interaction-assisted micellar electrokinetic chromatography using mixed surfactant systems. *J Chromatogr A* 1996;736:273–280.
- 4) Esaka Y, Tanaka K, Uno B, Goto M, Kano K. Sodium dodecyl sulfate-Tween 20 mixed micellar electrokinetic chromatography for separation of hydrophobic cations: Application to adrenaline and its precursors. *Anal Chem* 1997;69:1332–1338.
- 5) Esaka Y, Sawamura M, Murakami H, Uno B. Surfactant gradient methods using mixed systems of cetyltrimethylammonium chloride and nonionic surfactants possessing polyoxyethylene chains for electrokinetic separation of benzoate anions as model analytes. *Anal Chem* 2006; 78:8142–8149.
- 6) Wan H, Ohman M, Blomberg LG. Bonded dimethylacrylamide as a permanent coating for capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2001;924:59–70.
- 7) Shimura K, Kamiya K, Matsumoto H, Kasai K. Fluorescence-labeled peptide pI markers for capillary isoelectric focusing. *Anal Chem* 2002;74:1046–1053.
- 8) Muijselaar PG, Claessens HA, Cramers CA. Characterization of pseudostationary phases in micellar electrokinetic chromatography by applying linear solvation energy relationships and retention indexes. *Anal Chem* 1997; 69: 1184–1191.
- 9) Yang S, Khaledi MG. Chemical selectivity in micellar electrokinetic chromatography: characterization of solute-micelle interactions for classification of surfactants. *Anal Chem* 1995;67:499–510.
- 10) Quina FH, Alonso EO, Farah JPS. Incorporation of nonionic solutes into aqueous micelles: A linear solvation free energy relationship analysis. *J Phys Chem* 1995;99: 11708–11714.
- 11) Yang S, Bumgarner JG, Kruk LFR, Khaledi MG. Quantitative structure-activity relationships studies with micellar electrokinetic chromatography influence of surfactant type and mixed micelles on estimation of hydrophobicity and bioavailability. *J Chromatogr A* 1996;721:323–335.