

## 報 文

## マイクロシリンジを用いる電気濃縮法によるモデル試料としての安息香酸の濃縮

北川 慎也\*, 津田 孝雄<sup>®\*</sup>, 松本 隆利\*\*

## Proposal of electroconcentration using microsyringe and its application to benzoic acid

Shinya KITAGAWA, Takao TSUDA\* and Takatoshi MATSUMOTO\*\*

\*Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466

\*\*Nagoya Second Red Cross Hospital, Myoken-cho 2, Showa-ku, Nagoya-shi Aichi 466

(Received 16 October 1995, Accepted 7 December 1995)

In this paper, we propose a novel pre-concentration method using an electric field. After concentration enhancement in a microsyringe (in a volume of 50  $\mu\text{l}$  or 10  $\mu\text{l}$ ), the concentrated solution is injected directly to the liquid chromatography system. Because concentration and injection were done with the same syringe, there is very little loss of sample solution. For higher concentration enhancement, this microsyringe concentration method has been performed with an electrode transfer, in which a counter electrode is transferred to another electrode during the concentration process, thereby accomplishing the electroconcentration in a very short period, *i.e.* a few or several minutes. A typical example is described. By using 50  $\mu\text{l}$  microsyringe, an aqueous solution of 8  $\mu\text{M}$  benzoic acid in 2 mM L-Arginine was concentrated with an application of 300 V for a 3 min operational period. The concentration enhancement of 3.5  $\mu\text{l}$  around the electrode was 10.8 times the original solution.

**Keywords:** pre-concentration in a microsyringe; effective injection of concentrate; electrophoretic mobility; electrode transfer.

## 1 緒 言

マイクロカラム液体クロマトグラフィー<sup>1)</sup>やキャピラリー電気泳動法<sup>2)3)</sup>など微量な試料溶液を対象とするマイクロな分離分析法が発達している。これらの微少分離分析は高い絶対感度を持っているが、濃度感度においては一般的にはそう高くない。そのため、これらマイクロ

スケールに適した前濃縮法<sup>4)~10)</sup>の開発が非常に重要となる。液体クロマトグラフの充てん剤を用い試料の捕集を行う方法は高効率ではあるが、用いる試料体積は通常数 ml からサブ ml である。

微少容量試料の分析において最も注意することの一つは、前処理を含む分析操作において試料の損失をいかに少なくすることができるか、ということである。特に  $\mu\text{l}$  単位の試料溶液を取り扱う際には細心の注意が必要である。溶液が  $\mu\text{l}$  単位であれば他の容器へ移し替えるだけで試料の損失があり、一般にそれは無視しがたい大きさを持つ。従って前処理から分析装置への注入を同一

\* 名古屋工業大学工学部応用化学科: 466 愛知県名古屋市昭和区御器所町

\*\* 名古屋第二赤十字病院: 466 愛知県名古屋市昭和区妙見町 2

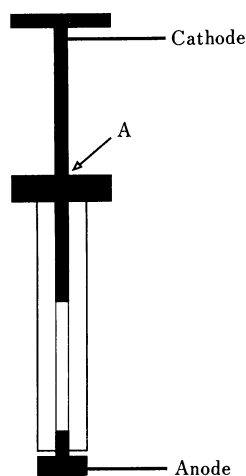


Fig. 1 Schematic diagram of an apparatus for electroconcentration by using a microsyringe

の容器内で行うことが望ましい。

著者らは電場を用いた濃縮法として向流電気濃縮法<sup>4)11)12)</sup>、電場濃縮法<sup>13)~16)</sup>などを報告してきたが今回、濃縮と注入を同一の微小容器“マイクロシリンジ”内で行う方法を考案し、その基礎性能について実験考察した。

## 2 実 験

### 2.1 装 置

濃縮に用いた装置の概略図を Fig. 1 に示す。濃縮及び試料注入に用いたマイクロシリンジは内容積 50  $\mu\text{l}$  (MSN-50, テルモ製) と 10  $\mu\text{l}$  (Microliter<sup>®</sup> # 701, Hamilton Co., USA) の 2 種とともに互換針型のものである。又、電圧印加時には試料溶液の流出を防ぐため、互換針を根本で切断し断面中央部の流路をステンレスはんだでふさいだものをセットしておく(以下キャップ電極と記す)。マイクロシリンジのプランジャー部とキャップ電極の間に直流電源装置 (R-2, 東京濾紙製) を用い電圧を印加する。

### 2.2 操 作

試料溶液をマイクロシリンジ (50, 10  $\mu\text{l}$ ) で吸い上げた後に針を取り外し、キャップ電極と付け替える。キャップ電極を下方に向け Fig. 1 のようにシリンジをセットする。濃縮試料がマイナスの電荷を帯びている場合はキャップ電極を陽極、金属のプランジャーを陰極とし電圧を印加する。流れる電流を随時モニターして、電流

値が小さくなるとプランジャーを手動で押し下げる。すなわち電極を反対電極に向かい移動させる。これにより電極間距離が短くなり、抵抗が減少し電流値を回復させることができる。又、印加電圧は一定であるためこれにより電位こう配が増大し濃縮効率を向上させることができる。著者らはこの方法を電極移動法<sup>16)</sup>と呼んでいる。

電極移動時には Fig. 1 の A から試料溶液の一部が排出される。すなわち電極 (プランジャー) 移動のための加圧がマイクロシリンジ内では非常に高圧となり、ガスタイト型ではないマイクロシリンジを用いていることから、プランジャーとシリンジ内壁のわずかなすき間を溶液が流れ出てシリンジ内から排出される。

電圧を印加した濃縮プロセス中において電極付近で気泡が発生する可能性がある。しかし電極移動のときにはシリンジ内の溶液に大きな圧力が加わる。そのためガスが発生したとしてもその溶解度は十分に高くなり、実際にガスの発生は観測されなかった。又、プランジャー電極に関してはガスが発生しても排出される溶液とともに系外 (シリンジ外) へと排出される。

試料がマイナス電荷を帯びている場合はプランジャーを陰極とするため、電極の移動速度が試料の電気泳動速度より遅ければ A 部より排出される溶液中には試料は含まれていない。適当な時間電圧を印加した後に、電圧印加を止めキャップ電極を外し、通常の針に付け替える。プランジャーを押すとキャップ電極 (陽極) 付近の試料溶液が押し出されるのでそれを分析装置へ注入・定量する。

### 2.3 分析装置

濃縮前及び濃縮後の溶液の試料の定量には液体クロマトグラフィー (LC) を用いた。ポンプ (LC-9A, 島津製作所製)、インジェクター (Model 7125, Rheodyne, Co., USA)、カラム (内径 4 mm, 長さ 35 mm, 充てん剤 Capcell C18 UG120 S-5, 資生堂製)、紫外吸収検出器 (SPD-6AV, 島津製作所製) を用いた。溶離液には 0.1% リン酸水溶液-メタノール (100/80) を用い、検出は UV 254 nm, 流量 0.5 ml/min で行った。

## 3 結果と考察

本実験は液体クロマトグラフでよく用いられるマイクロシリンジ内で、電圧を用い濃縮を行い、次いでそのマイクロシリンジ内に残された濃縮溶液を液体クロマトグラフ注入部のインジェクターへ移行させることで行う。すなわち電極移動法を用い短時間での濃縮を目指している。又、濃縮溶液を分離カラムへ注入する際に可能な限

り直接的に行うことを目指している。

マイクロシリンジを用いた電場濃縮法を確立するために、モデル試料として安息香酸を 50, 10  $\mu\text{l}$  シリンジを用いて濃縮し基礎的検討を行った。

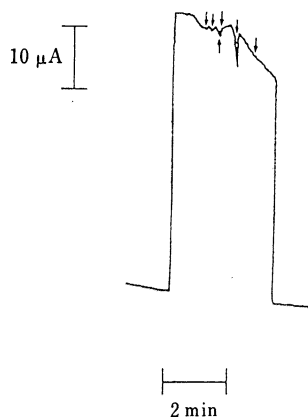
### 3・1 電極移動を用いたマイクロシリンジ電気濃縮法

濃縮試料としては 8  $\mu\text{M}$  安息香酸-2 mM L-アルギニン水溶液を用いた。濃縮に用いたマイクロシリンジは 50  $\mu\text{l}$  の MSN-50 である。試料溶液中 (pH 9) では安息香酸はマイナスの電荷を帯びている。従って電圧印加下では陽極へと電気泳動する。キャップ電極を陽極、プランジャーを陰極とし 300 V の電圧を印加した。電圧印加時間は 3 分である。濃縮中の電流変化を Fig. 2 に示す。Fig. 2 中の矢印は電極 (プランジャー) を移動させたときを示してある。電極移動は電流値を一定に保つように移動しているが、実際には Fig. 2 にあるように少しずつ減少していく。濃縮中にプランジャーの移動により Fig. 1 の A より排出された試料溶液の体積は 20  $\mu\text{l}$  である。すなわち、電極間距離は濃縮開始時の 3/5 (61 mm から 37 mm) となっている。キャップ電極 (陽極) 付近から採取した試料体積は 3.5  $\mu\text{l}$  である。濃縮後の試料 3.5  $\mu\text{l}$  と濃縮前の試料 3.5  $\mu\text{l}$  を注入して得られたクロマトグラムを Fig. 3 に示す。二つのクロマトグラムのピーク高より濃縮倍率は 10.8 倍であった。

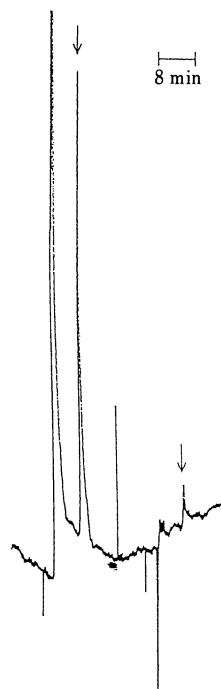
又、容積 10  $\mu\text{l}$  のマイクロシリンジを用い同様の実験を行ったところ、排出試料体積 7.6  $\mu\text{l}$ 、濃縮時間 4 分、注入試料 0.5  $\mu\text{l}$  で、7.1 倍の濃縮倍率が得られた。

Fig. 3 において分析対象物である安息香酸にはサイドピークが存在しない。又、シリンジ内の残存体積 20  $\mu\text{l}$  中陽極付近の濃縮部分 3.5  $\mu\text{l}$  を分析装置へ注入したところ、回収率が 70% を超えたことから安息香酸の分解はなかったと考えられる。しかし、Fig. 3 の濃縮後のクロマトグラムには濃縮前のクロマトグラムには存在しなかったピークが  $t_0$  の位置に見られる。これは pH 調整剤で同時に支持電解質でもあるアルギニンに起因するピークである。電極反応による分解はほとんどすべて 250 倍の存在量であるアルギニンに行われたと考えられる。実際に濃縮を行う際には希薄な試料を対象とし、対象試料を含む溶液には一般的にはそれよりはるかに高濃度である対象以外の物質が存在する。従って電極反応は対象物以外の物質が主となり、対象試料の分解・変質は無視できると考えられる。

以上より本装置において試料の濃縮が可能であることが確認された。



**Fig. 2** Electric current during electroconcentration  
Sample solution: 8  $\mu\text{M}$  benzoic acid-2 mM L-arginine aqueous solution; Applied voltage: 300 V; Operational period: 3 min; Total sample volume used: 50  $\mu\text{l}$



**Fig. 3** Chromatograms obtained with concentrated solution and original solution

The concentration enhancement is 10.8 times. Concentration condition was the same as in Fig. 2, and each injected volume in LC system was 3.5  $\mu\text{l}$ .

### 3・2 濃縮後のマイクロシリンジ中での試料分布

マイクロシリンジ内で濃縮を行った際に濃縮後のサンプル分布を以下のようにして調べた。濃縮後マイクロシリンジのプランジャーを一定体積分押し、濃縮された溶液を LC 分析装置に注入する。分析が終了したら残りの試料を続いて一定体積注入し分析する。これを繰り返すことにより濃縮後シリンジ内に存在する試料の分布及び全体量を得ることができる。

上記の手順に従い得た濃縮後の試料分布を Fig. 4 に示した。濃縮の対象としては  $8\ \mu\text{M}$  安息香酸水溶液を  $10\ \mu\text{l}$  用いた。印加電圧は  $300\ \text{V}$ 、濃縮時間は 3 分であった。又、プランジャー（陰極）の移動により排出された試料は  $6.6\ \mu\text{l}$  である。すなわち、濃縮後シリンジ内に残っている試料溶液の体積は  $3.4\ \mu\text{l}$  である。Fig. 4 においてグラフの縦軸は注入分析された各試料溶液中の安息香酸濃度を表し、横軸は注入された試料溶液の体積と陽極（キャップ電極）からの位置を示している。注入された各試料溶液の体積は Fig. 4 左より順に  $0.8, 1.0, 1.0, 0.6\ \mu\text{l}$  である。検量線より求めた濃縮倍率は左より  $7.0, 1.9, 1.1, 0.7$  倍であった。又、この四つの試料溶液に含まれている安息香酸の総量は用いた試料の 90% である。

Fig. 4 によると濃縮後の試料分布は陽極（横軸の位置として  $0\ \mu\text{l}$ ）を最大とした階段状であることが分かる。試料採取をより小さな体積で行うことにより分布は双曲線状になると思われる。

### 3・3 濃縮時間と排出体積と回収率の関係

一連の操作により得られる濃縮倍率、回収率は印加電圧、電圧印加時間、排出体積に大きく影響される。Table 1 に印加電圧を  $300\ \text{V}$  と一定にし、幾つかの電圧印加時間、残存体積（Table 1 に記載されているのはシリンジ内に残された体積）における試料の回収率を記した。一連の実験に用いた試料溶液は Fig. 4 と同じく  $8\ \mu\text{M}$  安息香酸水溶液（ $10\ \mu\text{l}$ ）である。

排出体積が全量のほぼ半分となり、残存体積  $4.6\ \mu\text{l}$  の場合は電圧印加時間が 3 分と短時間でありながらほぼ 100% の回収率を持っている。しかし、同じく電圧印加時間 3 分であっても残存体積が全体の  $1/3$  に当たる  $3.4\ \mu\text{l}$  では回収率は 90% とわずかに低下している。電圧印加時間を 4 分と長くしても残存体積  $2.7, 2.4\ \mu\text{l}$  において回収率は 80% へ低下する。しかし、電圧印加時間を更に大きく 5 分とすると、残存体積  $2.8, 2.7\ \mu\text{l}$  において回収率 82, 85% と向上が見られる。このことから残存体積を更に小さくしていても、電圧印

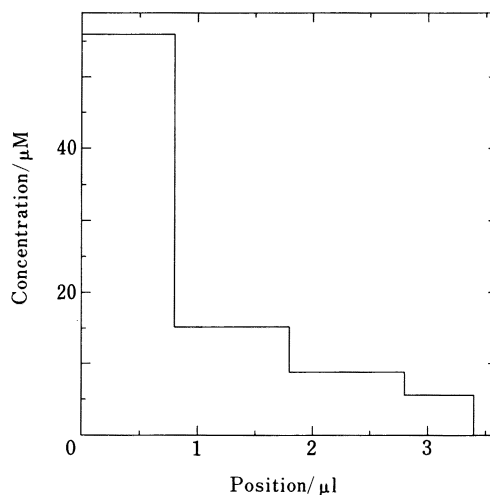


Fig. 4 Distribution profile of benzoic acid kept in a microsyringe after electroconcentration

Sample solution:  $8\ \mu\text{M}$  benzoic acid aqueous solution; Applied voltage:  $300\ \text{V}$ ; Operational period: 3 min; Volume kept in syringe:  $3.4\ \mu\text{l}$ ; Total sample volume used:  $10\ \mu\text{l}$

Table 1 Recoveries of benzoic acid obtained under various conditions applied with  $300\ \text{V}$

operational period/min	volume kept in syringe/ $\mu\text{l}$	recovery, %
3	4.6	98
3	3.4	90
4	2.7	80
4	2.4	80
5	2.8	82
5	2.7	85

加時間、印加電圧等の因子を変動させることにより、90% 以上の回収率を得ることが可能であると思われる。

本実験は(1)簡便な装置と操作で、(2)短時間で行える、(3)微量体積における溶液内濃縮を目的とし行った。対象試料として安息香酸を用いて検討したところ、これらの目的はほぼ達成された。

前濃縮で重要な濃縮倍率と回収率を向上させるために濃縮後の溶液の試料分布と、様々な条件下における回収率を調べた結果、濃縮条件を巧く設定することにより回収率を高く保ったまま濃縮倍率を向上させることが可能

であると思われる。又、電圧印加を行うことにより試料の選択的濃縮や、試料の前処理を行うことも可能である。本法は操作の単純性と濃縮から分析装置への注入を同一容器内で行うことが可能なために、微量体積からの前濃縮に適していると思われる。

本研究を行うにあたり、味の素(株)の援助に、又(株)資生堂の協力を感謝します。

## 文 献

- 1) P. Kucera (Ed.): "microcolumn high-performance liquid chromatography", (1984), (Elsevier, Amsterdam).
- 2) J. P. Landers (Ed.): "Handbook of Capillary Electrophoresis", (1994), (CRC Press, Boca Raton).
- 3) N. A. Guzman (Ed.): "Capillary Electrophoresis Technology", (1993), (Marcal Dekker, New York).
- 4) A. Hori, T. Matsumoto, Y. Nimura, M. Ikeda, H. Okada, T. Tsuda: *Anal. Chem.*, **65**, 2882 (1993).
- 5) M. Albin, P. D. Grossman, S. T. Morning: *Anal. Chem.*, **65**, 489A (1993).
- 6) H. Soini, T. Tsuda, M. V. Novotny: *J. Chromatogr.*, **559**, 547 (1991).
- 7) Z. Liu, P. Sam, S. R. Sirimanne, P. C. McClure, J. Grainger, D. G. Jr. Patterson: *J. Chromatogr. A*, **673**, 125 (1994).
- 8) S. Hjerten, J. J. Liao, R. Zhang: *J. Chromatogr. A*, **676**, 409 (1994).
- 9) J. J. Laio, R. Zhang, S. Hjerten: *J. Chromatogr. A*, **676**, 421 (1994).
- 10) D. S. Burgi, R.-L. Chien: *Anal. Chem.*, **63**, 2042 (1991).
- 11) T. Tsuda (Ed.): "Electric Field Applications in Chromatography, Industrial and Chemical Processes", (1995), (VCH, Weinheim).
- 12) H. Tanaka, S. Kitagawa, T. Tsuda: *クロマトグラフィ*, **16**, 223 (1995).
- 13) 北川慎也, 津田孝雄, 松本隆利: 第 55 回分析化学討論会講演要旨集, p. 137 (1994).
- 14) 北川慎也, 田中浩史, 津田孝雄, 松本隆利: 日本分析化学会第 43 年会講演要旨集, p. 561 (1994).
- 15) 北川慎也, 津田孝雄, 松本隆利: 日本分析化学会第 43 年会講演要旨集, p. 29 (1994).
- 16) S. Kitagawa, T. Tsuda, T. Matsumoto: in preparation.

## 要 旨

本報告では液体クロマトグラフでよく用いられるマイクロシリンジ内で、高濃縮効率を得るため電圧印加を行いながら電極を移動、一部の試料溶液を排出し、次いでそのマイクロシリンジ内に残された濃縮溶液を液体クロマトグラフ注入部のインジェクターへ移行させる濃縮法を提案している。すなわち本法では濃縮溶液を分離カラムへ注入する際に可能な限り直接的に行い、又電極を移動させながら短時間での濃縮を目指している。マイクロシリンジを用いた電場濃縮法を確立するためにモデル試料として安息香酸を用い濃縮を行ったところ濃縮時間 3 分、印加電圧 300 V で 10.8 倍の濃縮倍率が得られた。又、10  $\mu$ l シリンジを用い本法の基礎的検討を行った。