

総合論文

キャピラリー電気クロマトグラフィーにおける 試料保持に対する電圧印加の効果とその利用

北川 慎也^{®1}, 中川 浩行¹

液体クロマトグラフィーと電気泳動を融合させた分離分析手法であるキャピラリー電気クロマトグラフィーにおいて、電気浸透流や電気泳動を発生させるために行われる電圧印加が、イオン及び中性試料の両者の保持にも影響を与えていることを新たに見いだした。微小充填カラムなどを用いて基礎検討を行い、試料の保持が充填剤の表面電位に依存して変化することや、保持変化のパターンが試料種ごとに異なることを明らかにした。また、この現象を応用し、試料溶液を連続供給したカラムに対してパルス電場を印加し、その際に起きる一時的な平衡状態の変化を利用した新しい試料注入法を開発した。更に直流電場ではなく、交流電場を印加して試料の保持をコントロールする交流電気クロマトグラフィーを新たに開発した。電場による保持挙動変化の試料依存性は、直流よりも交流電場のほうが顕著であることを明らかにし、交流電圧印加による試料保持のコントロールでは、直流電圧印加よりも高い選択性を得られる可能性を示した。

1 緒 言

キャピラリー電気クロマトグラフィー (capillary electrochromatography, CEC) は、キャピラリー液体クロマトグラフィー (cHPLC) とキャピラリー電気泳動 (CE) を組み合わせた分離分析手法であり、1980年代に開発された^{1)~8)}。クロマトグラフィーは試料成分の固定相への保持 (相互作用) の大きさの違いに基づき分離を行う手法であり、一方、キャピラリー電気泳動は電場下における溶液内での試料成分の電気泳動速度の違いにより分離を行う手法である。したがって、高速液体クロマトグラフィーにおいては、移動相における試料の移動速度はすべての試料において移動相の流れる速度に等しいが、CECでは電気泳動効果が加わるため、移動相での速度が試料によって異なる可能性がある。そのため実験条件によっては、電気的に中性でありかつ固定相に対する保持がない物質 (t_0 マーカー) よりも、保持があっても電気泳動移動度の大きな試料の溶出を早くすることが可能である。

CECにおいて、電気泳動効果及びクロマトグラフィー効果を考慮した試料の溶出時間 (t) は、次式で表すことが可能である。

$$t = \frac{L}{\nu_{\text{pres}} + \mu_{\text{osm}}\Delta E + \mu_{\text{eph}}\Delta E} (k+1) \quad (1)$$

式(1)の ν_{pres} , μ_{osm} , μ_{eph} , ΔE , L , k は、それぞれ圧力差流速、電気浸透流移動度、電気泳動移動度、電位勾配、カラム (充填) 長、保持比である。ただし、式(1)はアイソクラティック溶離条件で、印加電圧が一定である場合にのみ成立する。移動相組成のグラジエントが行われている場合は、 μ_{eph} , ΔE , k は時間と場所の両者に対する関数となり、非常に複雑な式となる。

一般的な CEC では、ポンプを使用しない ($\nu_{\text{pres}} = 0$) CE システムを用いて、中空キャピラリーの代わりに固定相を有するキャピラリーカラムを用い、その両端間に高電圧 (~30 kV) を印加し試料成分の分離を行う。この方法では、試料のカラム出口 (検出器) への輸送は、電気浸透流 (electroosmotic flow, EOF) 及び試料の電気泳動により行われる。このような電気浸透流送液型の CEC (eCEC) では、電気浸透流のフロープロファイルが栓流であるため、高い理論段数を容易に得ることが可能であるという利点がある。しかしながら、この方法では、試料をカラム出口 (検出器) の方向へ輸送するために、正もしくは負のいずれかの電圧しか印加することができない。そのため、クロマトグラフィーによる分離を電気泳動が打ち消してしまい、分離が阻害される場合もある。

一方、Fig. 1 に示される圧力差流を用いる CEC (pCEC) では、試料は圧力差流、電気浸透流、電気泳動の3つの流れによりカラム内を移動する。圧力差流を用いているためフロープロファイルは通常の液体クロマトグラフィーと同様に放物線型の Poiseuille 流となり、分離効率は eCEC よりも不利になる。しかしながら、圧力差流速が十分に

¹ 名古屋工業大学大学院工学研究科物質工学専攻: 466-8555 愛知県名古屋市昭和区御器所町

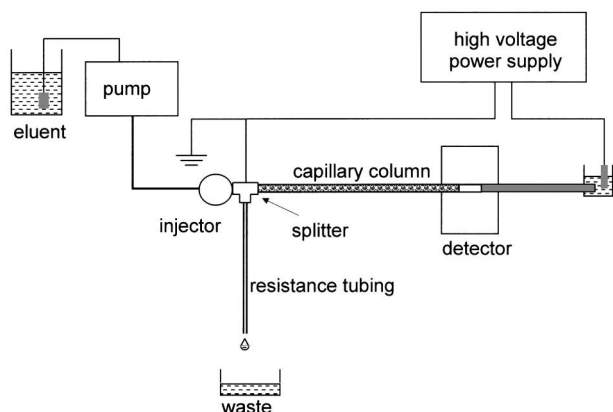


Fig. 1 Schematic diagram of pressurized flow driven capillary electrochromatography (pCEC)

大きければ、電気浸透流及び電気泳動がカラム入口方向へ向いていたとしても、試料をカラム出口へと輸送することが可能である。したがって、印加電圧の正負及び大小を任意に設定することが可能になり、クロマトグラフィーだけでは不十分な分離を、電気泳動効果を加えることで容易に改善することができる。すなわち、pCECでは、イオン性の試料のみが対象ではあるが、分離選択性を印加電圧によりコントロールすることが可能であるといえる。また、電圧を印加していない状態（液体クロマトグラフィー）でも分離を行うことが可能であるため、pCECでは電気泳動効果が分離に与えている影響を容易に把握することができる。著者らはこれまでに、pCECにおける電気泳動効果を積極的に利用し、電気泳動分離とクロマトグラフィー分離の調和による分離性能の向上について種々の検討を行ってきた⁹⁾¹⁰⁾。すなわち、電気泳動を利用した不十分な分離の改善、分離時間の短縮及び理論段数の向上などを通じてpCECの高性能化を図ってきた。

著者らは、pCECにおける電圧印加が、クロマトグラフィー分離（保持）にも影響を与えることを新たに見出した¹¹⁾¹²⁾。上述のとおり、CECにおける電圧印加の目的は、試料の電気泳動及び電気浸透流を発生させることにある。しかしながら、CECにおける電圧印加が、保持に対しても影響を与えている可能性については、TsudaやUngerらにより報告されており、彼らはCECにおいては安定した分離挙動が得られるまで電圧印加後20分もしくは4時間が必要であったと報告している¹³⁾¹⁴⁾。これは、電圧印加により充填剤表面の状態がゆっくりと変化している可能性を示唆している。他方、グラファイトなどの電導性充填剤の表面に電圧を印加し、試料の保持を変化させる手法である電気化学クロマトグラフィーも開発されている^{15)~18)}。また、Rudgeらは試料の吸着が電場に依存すると報告している¹⁹⁾。このことからCECにおける電圧印加が充填剤

の表面電位に影響を与え、それが保持変化を誘起していることが予想される。

また、電圧印加は保持変化以外にも奇妙な現象を引き起こしていることが分かっている。例えば、印加電圧と電流量の関係から、印加電圧に応じてカラムの電気抵抗が変化していることが示された²⁰⁾²¹⁾。更に、電気浸透流速度が印加電圧に対して非直線性を示すことがあることも報告されている²²⁾²³⁾。電圧印加が引き起こすこれらの奇妙な現象は、これまで一般にはあまり注目されてこなかったが、近年、TallarekらやBrombergらの研究グループが精力的に研究を行うようになってきている。例えば、Tallarekらは、電圧印加により充填剤において濃度分極（concentration polarization, CP）が発生していることを蛍光観察より確認している^{24)~26)}。また、Brombergらは、電位勾配の不連続性やイオンの電気移動度の違いにより、イオン濃度の偏りなどが発生すると述べている²⁷⁾。

この論文は、CECにおいて電圧印加が引き起こす試料保持変化に関する基礎検討と、その分離分析での利用について、著者らの行ってきた一連の研究をまとめたものである。

2 実 験

2.1 圧力差流を用いる CEC

Fig. 1に、本研究で使用したpCECの概略図を示す。この装置は、送液システム（1台もしくは複数台のポンプ）、インジェクター、キャピラリーカラム、検出器、高電圧電源で構成されている。キャピラリーカラムは、内径50~320 μm の熔融シリカキャピラリーに、市販の種々の液体クロマトグラフィー用充填剤 {octadecylsilane (ODS), イオン交換, 光学分離用充填剤など} をスラリー充填したものである。充填部の直後のポリイミドコーティングを、鋭利なナイフで剥すことにより検出窓を作製する。分離された試料成分の検出は、紫外吸光検出器を用いたオンキャピラリー検出により行われる。

インジェクター直後のスプリッターは、キャピラリーカラムへの試料注入量を削減すると同時に（スプリットインジェクション）、電圧印加時にカラム入口側の電極表面で発生する種々の反応物が、カラム内へ流れ込む移動相の組成を変化させることを防ぐためにも用いられている。

必要に応じて、キャピラリーカラムをウォータージャケットで覆い、温度をコントロールした水を連続的に供給することで、カラムの温度制御を行った。なお、ウォータージャケットを使用する際には、供給する水の温度とキャピラリーカラム内部の温度が等しいと仮定した。ウォータージャケットを用いていない条件では、カラムに対してファンを用いて送風を行い、空冷を行った。

通常、高電圧電源には直流電源を用いるが、後述のよう

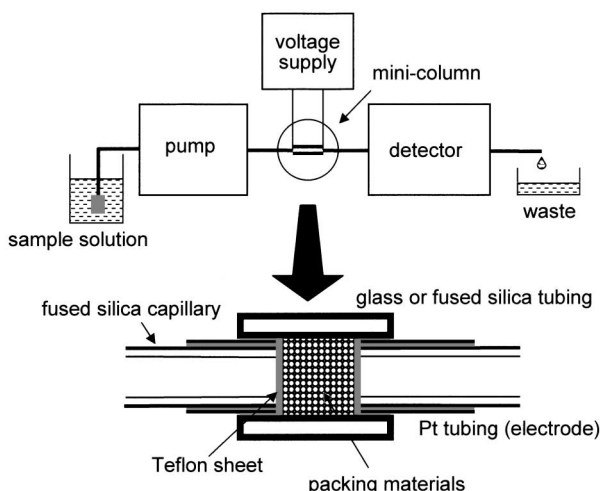


Fig. 2 Schematic diagram of mini-column system to study the voltage-induced variation in retention factor

に、交流電源を用いることも可能である。ただし、交流電圧は検出器にノイズを与えるため、Fig. 1とは異なりカラム入口側に電圧印加を行い、出口側を接地する。

2・2 微小カラムを用いた実験

Fig. 2は、試料の保持変化を吸光度変化で観測する際に用いた、微小カラムを用いた実験装置の概略図である。装置はポンプ、微小充填カラム、電圧印加装置、検出器から成る。微小充填カラムの充填部の前後には、電極（白金管）が設置してある。微小充填カラムの充填長は1~12 mmと通常のカラムよりも短い。したがって、小さな印加電圧で大きな電位勾配を得ることが可能である。また、流路抵抗が小さいため、移動相の線流速を大きくすることが可能であり、試料の電気泳動効果を相対的に小さくできる。カラムを通過する試料成分は、紫外吸収検出器又は多波長検出器により検出される。ここでは、微小カラムに試料溶液を連続的に供給しながら電圧を印加すると、試料成分の保持が変化し、固定相からの試料成分の放出もしくは固定相への試料成分の移行（吸着や分配など）が起こり、その結果生じる試料成分の濃度変化を、吸光度変化として観測する。

3 結果と考察

3・1 電圧印加による試料保持の変化

電圧印加によるイオン性試料成分の保持変化に関する検討を行った¹¹⁾¹²⁾。Fig. 3は、陰イオン交換充填剤（IC-ANION-SW, 東ソー）を充填したカラム（内径 0.05 mm, 充填長 230 mm）に対して、解離したフタル酸を含む試料溶液 {メタノールと 3 mM フタル酸, 3 mM ヘキサメチレンジアミン (pH 6.87) の混合溶液 (10/90)} を連続的に

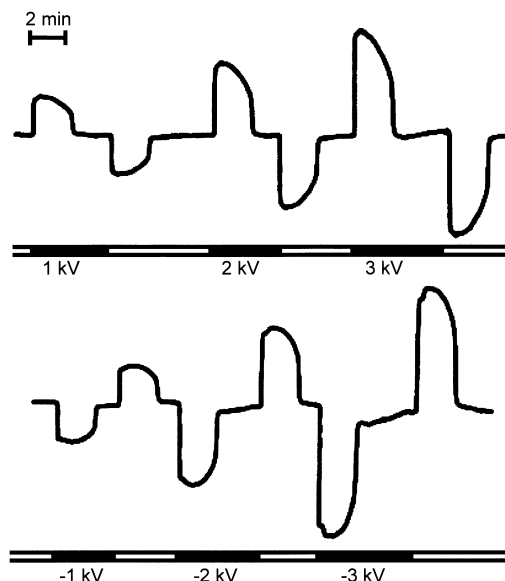


Fig. 3 Absorbance variation induced by the application and its release of voltage along a column

Column: i.d. 0.05 mm, length 230 mm, packed with IC-ANION-SW; Sample solution: mixture of methanol and 3 mM phthalic acid - 3 mM hexamethylenediamine aqueous solution (pH 6.87) (10/90, v/v)

供給し、十分に平衡が得られた状態で電圧印加を行った際の、カラムから溶出する試料溶液の吸光度変化を示したものである¹¹⁾。カラム出口側に正の電圧を印加すると直後に吸光度が上昇し、しばらくすると電圧印加前の吸光度に戻った。この状態で電圧印加を中止すると、直後に吸光度はいったん減少するが、しばらくすると再び元の吸光度に戻る。この実験条件では、紫外光を吸収している物質はフタル酸であり、電圧印加による吸光度の変化は、電圧印加によりカラムを通過する試料溶液中のフタル酸濃度が変化したことを意味している。供給する試料溶液中のフタル酸濃度は一定であるため、電圧印加により固定相（陰イオン交換充填剤）中に取り込まれていたフタル酸が移動相へと放出され、溶液中のフタル酸濃度が一時的に上昇したと考えられる。すなわち、電圧印加によりフタル酸の保持が小さくなっていると予測される。電圧印加を停止すると保持が元に戻る（相対的に大きくなる）ため、移動相中のフタル酸が固定相に取り込まれ溶液中の濃度が低下し、吸光度の減少が生じる。いずれの際にも再平衡状態に至ると、カラムに供給される試料溶液中のフタル酸濃度と等しい濃度の溶液がカラムから溶出され、電圧印加前の吸光度レベルに戻る。

カラム出口側に負の電圧を印加した場合は、正の電圧印加とは逆に試料の保持が増大し、吸光度の減少が生じた。電圧印加を停止すると取り込まれたフタル酸が放出されるため、吸光度の一時的な増大が観測される。すなわち、電

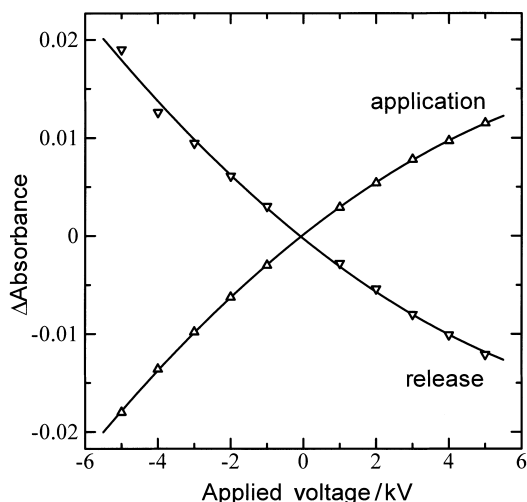


Fig. 4 Relationships between applied voltage and peak height. Other conditions are the same as in Fig. 3

圧印加による保持の変化は、印加電圧の正・負を認識している。印加電圧の正・負により挙動が異なることは、電場下におけるジュール熱の発生（カラム内温度の上昇）が原因で、保持が変化しているのではないことを示唆している。また、電圧印加による吸光度の変化（保持の変化）は、Fig. 3 に示されるように、印加電圧に応じて増加していることが分かる。吸光度変化の原因が本当にフタル酸濃度変化であるかどうかを確認するため、Fig. 2 に示した微小充填カラム（充填長 1 mm, 内径 0.7 mm）から溶出される溶液を分取し、液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、電圧印加により溶液中のフタル酸濃度が変化していることを確認することができた。

印加電圧と吸光度変化（印加時及び印加停止時）の関係を Fig. 4 に示した。電圧印加により引き起こされる保持の変化は必ずしも直線的ではなく、幾分曲線的であることが分かる。また、電圧印加による吸光度変化（application）と電圧印加停止による吸光度変化（release）は、正負が異なるだけで絶対値はほぼ同一であり、電圧印加による保持の変化が可逆的であることが分かった。

Fig. 3 に見られる吸光度の変化は、陰イオン交換能を有する固定相だけではなく、陽イオン交換充填剤においても観測された。しかしながら、その変化は陰イオン交換樹脂と逆であり、カラム出口に正の電圧を印加すると吸光度は減少（保持が増大）し、負の電圧を印加すると吸光度の増大（保持の減少）が観測された。

電圧印加が試料成分の保持を変化させる機構について考察するために、イオン交換カラムにおける試料成分の保持が、以下の単純な電気化学ポテンシャル (μ) の平衡式に従っていると仮定した。

$$\begin{aligned}\mu_m &= \mu_s \\ \mu_m &= \mu_m^\circ + RT \ln C_m + zF\phi_m \\ \mu_s &= \mu_s^\circ + RT \ln C_s + zF\phi_s\end{aligned}\quad (2)$$

式(2)中の R , T , C , z , F , ϕ は、それぞれ気体定数、温度、試料濃度、試料成分の電荷数、ファラデー定数、電位を表している。また、添え字の s , m はそれぞれ固定相、移動相を表す。

式(2)より平衡状態では

$$\ln K_0 = \ln \left(\frac{C_s}{C_m} \right) = - \frac{(\Delta\mu^\circ + zF\phi_D)}{RT}\quad (3)$$

が成立する。ただし、 $\Delta\mu^\circ = \mu_s^\circ - \mu_m^\circ$, $\phi_D = \phi_s - \phi_m$ であり、 K_0 は電圧印加が行われていないときの平衡定数である。電圧印加による保持の変化が ϕ_D に由来する $\{\phi_D(V) = \phi_D + fV\}$ と仮定すると、試料保持 (k) と印加電圧 (V) について次に示す式が得られる。

$$k(V) = k_0 \exp \left(- \frac{zFfV}{RT} \right) = K_0 \Phi \exp \left(- \frac{zFfV}{RT} \right)\quad (4)$$

ただし、 Φ , f は、それぞれ固定相と移動相の相比、印加電圧と相間電位変動に関係するパラメーターである。式(4)は、印加電圧が十分に大きくなると試料保持がほぼゼロ、もしくは無限大になるので、ある程度の電圧印加範囲でのみ適応可能な式である。

一方、段理論では各理論段に含まれる試料量 (M) は次式で表される。

$$M = C_s \nu_s + C_m \nu_m = C_m \nu_m (K\Phi + 1) = C_m \nu_m (k + 1)\quad (5)$$

ただし、 ν は各相の体積を表す。電圧印加による保持比の変化が十分すばやく M が一定であるとする、式(5)より保持変化の前後の C_m 及び k の関係が与えられ、更に式(4)と組み合わせることで、印加電圧と試料成分の濃度変化に関する次式が得られる。

$$\frac{\Delta C(V)}{C_{m0}} = \frac{k_0 + 1}{k(V) + 1} - 1 = \frac{k_0 + 1}{k_0 \exp \left(- \frac{zFfV}{RT} \right) + 1} - 1\quad (6)$$

電圧印加が試料成分の保持に与える影響を、微小充填カラム（IC-ANION-SW, 内径 0.7 mm, 充填長 1 mm）を用いて得られた結果を上式に当てはめ、検討を行った¹²⁾。微小充填カラムに対して試料溶液（0.1 mM ベンゼンスルホ

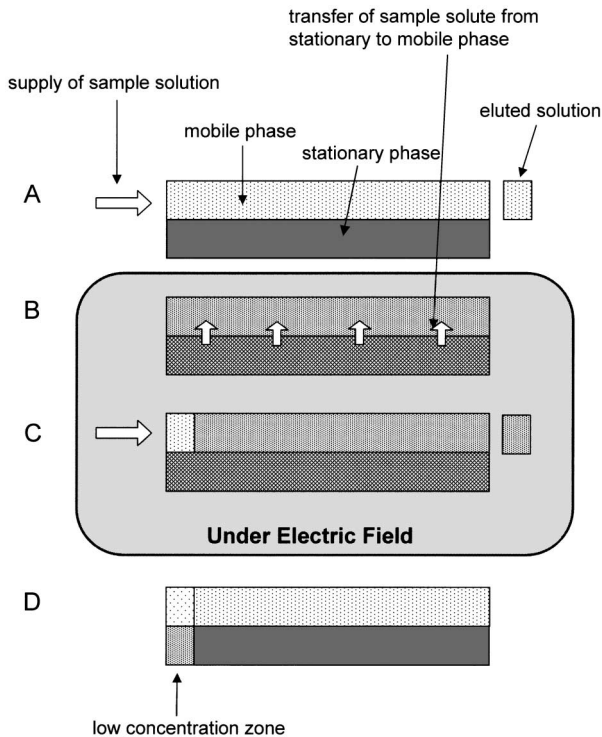


Fig. 5 Principle of pulsed voltage induced injection (A) equilibrium condition, (B) variation in retention factor under electric field, (C) supplying of new sample solution, (D) generation of low concentration zone by the release of the electric field

ン酸ナトリウム-0.01 mM 安息香酸カリウム水溶液)を連続供給し, 最大 30 V (300 V/cm) の電圧を印加した際の吸光度変化を, 多波長検出器 (SPDM-10A, 島津) を用いて測定し, ベンゼンスルホン酸と安息香酸それぞれの濃度変化をスペクトル分離することで算出したところ, 電圧印加によりカラムから溶出される試料溶液中の試料のベンゼンスルホン酸及び安息香酸濃度は共に電圧印加により増加することが分かった. すなわち, 両試料成分共に電圧印加により保持が減少している. ただし, 安息香酸の濃度増加率は 5~30 V の電圧印加において 0.2~3.1% であったが, ベンゼンスルホン酸は 0.7~7.2% であった. すなわち, ベンゼンスルホン酸のほうが保持の減少が起りやすいことが分かった. 得られたデータに対して式(6)を適用し, k_0 及び $-zFf/RT$ を算出した. 計算で得られたベンゼンスルホン酸及び安息香酸の k_0 は, それぞれ 0.26 と 0.31 であり, これは同一の実験条件におけるクロマトグラムから得られた k_0 とほぼ一致した (それぞれ 0.23 及び 0.33). 一方, 実験結果から算出したベンゼンスルホン酸及び安息香酸の $-zFf/RT$ は, それぞれ 0.015 及び 0.005 と異なった値であった. これは, 電圧印加の保持への影響はベンゼンスルホン酸のほうが安息香酸よりも大きいことを意味している. 相間電位差の変化は, ベンゼンスルホン酸及び安息

香酸で同一の値になるはずであるが, 算出された値には約 3 倍の差が生じている. このことから, 電圧印加は電位変化相間電位だけではなく, $\Delta\mu^\circ$ も変化させているのはいかと予測される. 電圧印加による $\Delta\mu^\circ$ の変化に関して $\Delta\mu^\circ(V) = \Delta\mu^\circ + \gamma V$ を仮定すると, 式(4)は次式に書き換えることができる.

$$k(V) = k_0 \exp\left(-\frac{zFf + \gamma V}{RT}\right) \quad (7)$$

式(7)において, γ は試料成分ごとに異なる値である. 電圧印加の保持への影響は, ベンゼンスルホン酸のほうが安息香酸よりも大きいことから, ベンゼンスルホン酸の γ 値が安息香酸よりも大きいと推測される. 電圧印加が $\Delta\mu^\circ$ を変化させるメカニズムはまだ不明ではあるが, 充填剤表面電位の変化が界面近傍の状態にも影響を与えているのではないかと考えられる.

3・2 パルス電圧印加を用いた試料注入法の開発

前述のとおり, イオン交換カラムに対して電圧印加を行うと, 試料保持を変化させることが可能であることが明らかになった. この現象を利用し, 新たな試料注入法の開発を行った²⁸⁾. 通常液体クロマトグラフィーにおいては, インジェクターを用いて移動相中に試料溶液をパルスの導入し, カラムへ送る. 一方, 試料溶液をカラムに連続的に供給し, 分析を行う手法も存在する. Moore らは蛍光ラベル化した試料を連続供給し, 強力なレーザー光による蛍光ラベルの分解を利用する, optical-gating injection を用いた CE を報告している²⁹⁾. この方法では, レーザー光をわずかな時間遮ることで生成する光分解されなかった蛍光成分を CE により分離している. また, クロマトグラフィーにおいては, 試料溶液を連続的にカラムに供給しながら, 試料成分を含まない溶液をパル的に注入しクロマトグラムを得る vacancy chromatography が開発されている^{30)~33)}. この方法では, 試料成分濃度の減少がピークとして観測される. 著者らが開発したパルス電場を用いる試料注入法 (pulsed voltage induced injection, PVII) においても, 試料溶液が連続的にキャピラリーカラムに供給される. このカラムに対して一時的に電圧印加を行うことで, パル的な試料注入と同等の効果を得ることが可能になる.

Fig. 5 に PVII の概略を示した. Fig. 5-A は試料溶液が連続的に供給され平衡状態となっているカラムである. 試料成分は保持比に従い移動相及び固定相に存在する. 電圧印加を行うと試料成分の保持比が変化 (Fig. 5-B では保持比の減少) し, 固定相中の試料成分が移動相へ移動する. カラムに対しては連続的に試料溶液が供給されているた

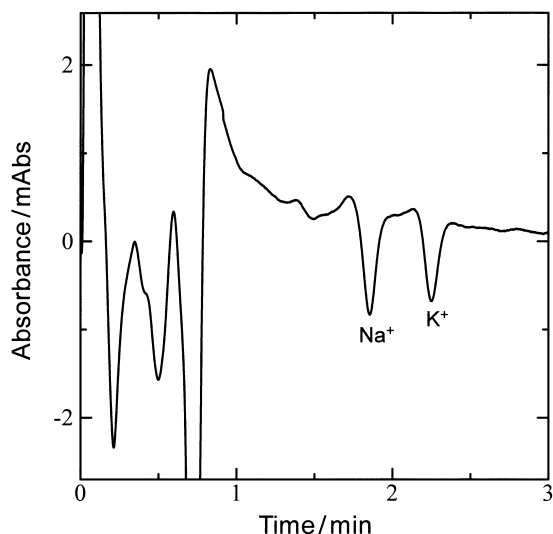


Fig. 6 Typical example of pulsed voltage induced injection

Applied voltage and its duration were -3 kV and 3 s, respectively. Sample solution: 5 mM CuCl_2 aqueous solution containing 0.4 mM NaCl and 0.4 mM KCl ; Column: i.d. 0.15 mm, packed length 136 mm, whole capillary length 203 mm, packed with TSKgel IC-CATION-SW; Detection: UV 210 nm; Flow rate: 5 $\mu\text{m}/\text{min}$

め、保持比変化により試料成分濃度が変化（増大）した溶液がカラムから押し出される。同時に、カラム入口には新たな試料溶液が供給されるが、この入口付近の移動相中の試料成分濃度は、カラムの他の部分の濃度よりも相対的に小さい（Fig. 5-C）。この状態で電圧印加を停止し試料成分の保持比を元に戻す（Fig. 5-Dでは保持の増大）と、カラム入口付近以外は電圧印加前の状態に戻るが、入口付近では試料成分量が少なくなる（Fig. 5-Cでカラムから放出された試料成分の増加分が減少している）。すなわち、連続的試料注入を行っているカラムに対して電圧印加を行い、一時的に試料成分の保持を減少させることで、希薄な試料溶液の注入と同等の効果を得ることが可能である。保持が増大するように電圧を印加すると、Fig. 5とは逆に濃度の高い試料溶液の注入（通常の試料注入）と同等の効果を得ることが可能である。

Fig. 6にPVIIにより得られたクロマトグラムを示した。ここでは陽イオン交換カラム（IC-CATION-SW、東ソー、内径 0.15 mm、充填長 136 mm）を用い、ナトリウムイオンとカリウムイオンを分析試料としている。検出方法として銅イオンを吸光剤とした間接吸光法（UV 210 nm）を用いているため、試料溶液（移動相）中にはナトリウム・カリウム・銅イオンが含まれている。間接吸光法であるためナトリウム・カリウムイオン濃度の増大は吸光度の減少として観測される。PVIIを行うため -3 kVの電圧を3秒間

印加すると、直後に吸光度の増大が観測される。これは、電圧印加に伴い銅イオンの保持が減少し固定相から移動相への移行が起きたことを意味している。一方、PVIIにより生じたカラム入口付近のナトリウム・カリウムイオン濃度の変動は、吸光度の減少という形で観測されている。すなわち、一時的な電圧印加の後、入口付近には相対的にナトリウム及びカリウムのイオン濃度が上昇した領域が発生していることが分かる（ $[\text{Na}^+]/\Sigma[\text{cation}]$ もしくは $[\text{K}^+]/\Sigma[\text{cation}]$ の上昇）。したがって、電圧印加による試料保持の減少の割合は、 Na^+ 、 $\text{K}^+ < \text{Cu}^{2+}$ であることが分かる。この結果は、連続供給している試料溶液に更にナトリウム、カリウムを添加した溶液を、インジェクターを用いて注入すると Fig. 6 とほぼ同一の溶出時間にそれぞれのピーク（吸光度の減少）が観測されたことから支持される。

連続供給されている試料溶液中のナトリウム・カリウムイオン濃度の変化が、PVIIで得られるそれぞれのピーク強度（吸光度変化）に与える影響を調べた。ナトリウム及び銅イオン濃度を一定（それぞれ 0.4 及び 5 mM）とし、カリウムイオン濃度のみが異なる試料溶液を、それぞれカラムに供給しパルス電圧を印加した。試料溶液中のカリウムイオン濃度の増大に伴い、カリウムイオンのピークは大きくなったが、同時にナトリウムイオンのピーク強度の減少が観測された。これは、ナトリウムの相対的な濃度（ $[\text{Na}^+]/\Sigma[\text{cation}]$ ）が減少したためである。すなわちPVIIにより得られるピークの強度は、共存成分の影響を受けることが分かる。しかしながら、ナトリウムとカリウムイオンのピーク強度比は、試料溶液中の両イオンの濃度比に比例することが分かった。すなわち、基準物質を試料溶液中に添加し、基準物質に対する相対ピーク強度を測定することで、PVIIにおいても検量線を作成することが可能である。

パルス電圧印加に伴う一時的な試料成分の保持変化を利用したこの試料注入法は、通常のインジェクターでは対応できない、極微小内径キャピラリーカラムにも適用できる可能性がある。

3.3 電圧印加が中性物質の保持に与える影響の検討

上述のように、電圧印加により陰陽両イオン性物質の保持をコントロールすることが可能である。これに対して、試料の保持に対する印加電圧の影響が式（4）で与えられるとすると、中性物質の保持は電圧印加に影響されないということになる。しかしながら、保持と印加電圧の関係が式（7）で与えられるように、 $\Delta\mu^\circ$ にも影響を与えている場合、中性化合物の保持も印加電圧によって変化する可能性がある。そこで、中性物質の保持に対する電圧印加の影響について検討を行った³⁴⁾。

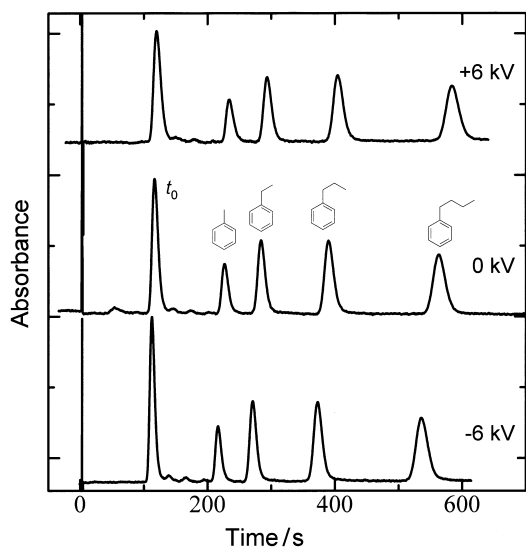


Fig. 7 Separation of alkyl benzenes in pCEC
 Column: i.d. 0.075 mm, packed length: 79 mm, packed with Develosil ODS-5; Eluent: mixture of 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) and acetonitrile (40/60, v/v); Flow rate: constant pressure mode of 7 MPa; Detection: UV 210 nm

対象試料である中性化合物として、アルキルベンゼン混合物（トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、ブチルベンゼン）を用いた。また、分離カラムには、現在最も一般的に利用されている ODS カラム（Develosil ODS-5, 野村化学, 内径 0.075 mm, 充填長 79 mm）を用いた。Fig. 7 にカラム温度 25°C におけるアルキルベンゼン類の分離を示した。電圧印加を行わない通常の HPLC 条件 (0 kV) で、トルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、ブチルベンゼンの保持比は、それぞれ 0.97, 1.47, 2.43, 3.97 であった。Fig. 7 に示されるように +6 及び -6 kV の電圧を印加することで、わずかではあるがアルキルベンゼン類、及び t_0 であるウラシルの溶出時間が変化していることが分かる。Fig. 8 に印加電圧に対するアルキルベンゼン類の相対保持を示した。ただし、相対保持は電圧印加時の保持 (k_v) と電圧印加を行っていないときの保持 (k_0) の比 (k_v/k_0) である。保持算出の際には t_0 及び中性マーカーとしてウラシルを用いた。Fig. 8 は 4% 以内ではあるが、電圧印加により中性試料の保持も微妙に変化することを示している。すなわち、二つの相間の標準化学ポテンシャルの差が、電圧印加によりわずかに変化することが分かった。ただし、ODS カラムにおける中性物質の電圧印加による保持変動は、その度合い小さいだけではなく、Fig. 3 に示したような、印加電圧の正負に対応した現象や、その大小に対する明確な相関が観測されることもなかった。このような電圧印加による保持の変動 ($\Delta\mu^\circ$ の変動) について更に詳しく検討するため、電圧印加が物

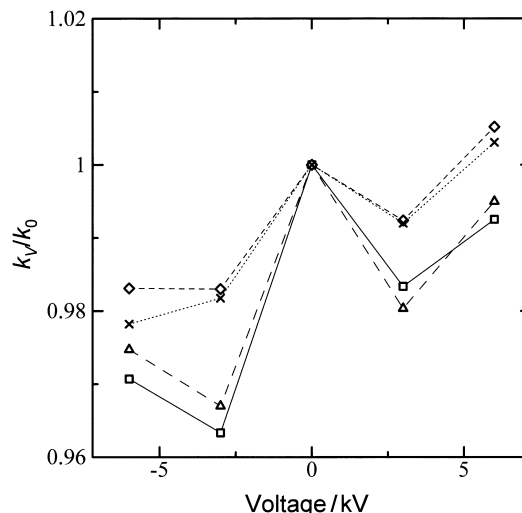


Fig. 8 Relationship between the applied voltage and relative retention factor (k/k_0) of methylbenzene (toluene) (\square), ethylbenzene (\triangle), propylbenzene (\diamond) and butylbenzene (\times)

Other conditions are the same as in Fig. 7.

質移動に関するエントロピー及びエンタルピーに与える影響に着目した。

一般的に、逆相クロマトグラフィーにおける保持比 (k) とカラム温度 (T) との関係は、van't Hoff 式と呼ばれる次式で表すことが可能である。

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi \quad (8)$$

式(8)において、 ΔH° , ΔS° , R , Φ は、それぞれ、移動相から固定相への物質移動に関するエンタルピー変化、移動相から固定相への物質移動に関するエントロピー変化、気体定数、固定相と移動相の相比である。一般的に ΔH° は正の値であるので、カラム温度が上昇すると試料の保持は低下する。実際にカラム温度 49°C におけるトルエン、エチルベンゼン、プロピルベンゼン、ブチルベンゼンの保持比はそれぞれ 0.75, 1.15, 1.84, 2.95 となり、25°C の場合と比較していずれも小さくなる。

カラム温度 27~52°C でアルキルベンゼン類の保持を測定し van't Hoff プロットを行ったところ、良い直線関係が得られた。そこでこの温度範囲における各アルキルベンゼン類の ΔH° 及び $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$ を、直線の傾き及び切片から算出した。更に、電圧印加条件においてもすべてのアルキルベンゼン類について 27~52°C で良好な直線性が得られ、 ΔH° 及び $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$ を算出することができた。Fig. 9-A, B に印加電圧と ΔH° 及び $\Delta S^\circ/R + \ln \Phi$ の関係をそれぞれ示した。この図から分かるように、電圧印加に

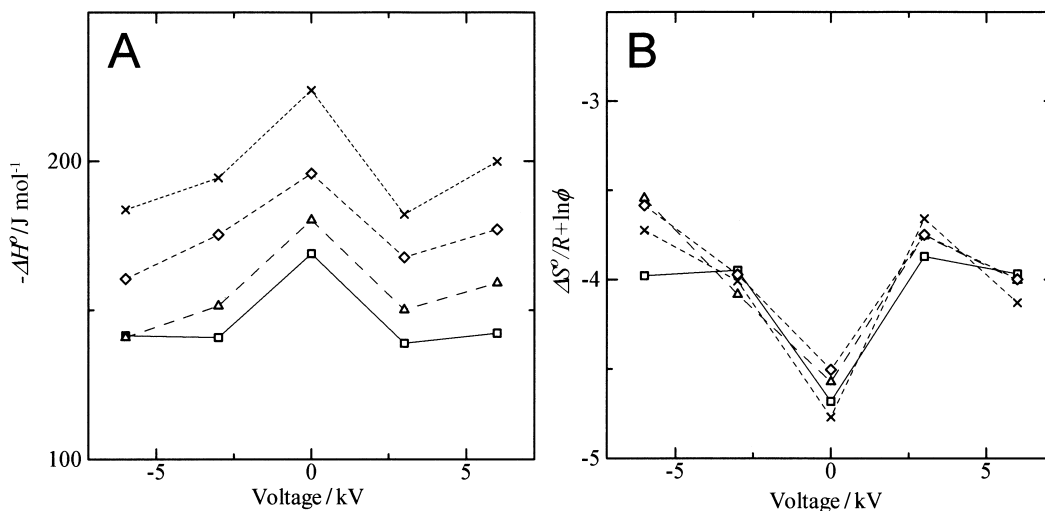


Fig. 9 Relationships between the applied voltage and (A) ΔH° and (B) $\Delta S^\circ / R + \ln \phi$ of methylbenzene (toluene) (□), ethylbenzene (△), propylbenzene (◇) and butylbenzene (×)

Other conditions are the same as in Fig. 7.

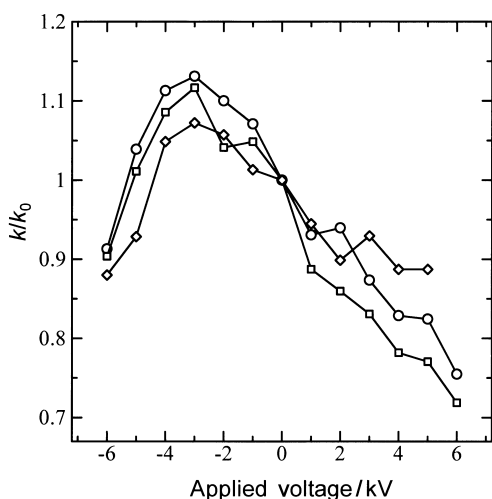


Fig. 10 Relationship between applied voltage and relative capacity factors of neutral solutes of *m*-cresol (○), *m*-nitrophenol (□), and toluene (◇)

Column: i.d. 0.15 mm, packed length 203 mm, whole length 289 mm, packed with β -CD BR. Eluent: 10% methanol aqueous solution containing 5 mM phosphate buffer (pH 5.0); Flow: constant pressure mode of 15 MPa; Detection: UV 210 nm

より ΔH° 及び $\Delta S^\circ / R + \ln \phi$ はかなり大きく変動している。これらの変化割合は 4% 以内にとどまっていた保持比の変動と比べ非常に大きく、電圧印加を行っていないときと比較すると 20% 以上の変動が認められた。なお、 ΔH° は試料種により明確な違いがあることが分かったが、 $\Delta S^\circ / R + \ln \phi$ には大きな差異は見られなかった。

ΔH° 及び $\Delta S^\circ / R + \ln \phi$ は印加電圧に対してそれぞれ変

動しているが、Fig. 9-A, B から分かるように、両者の変化の傾向は互いにほぼ逆転している。すなわち、電圧印加の正負にかかわらず、 $-\Delta H^\circ$ が減少しているときは $\Delta S^\circ / R + \ln \phi$ は増加している。これは電圧印加による熱力学的パラメーターの変動において、エンタルピー-エントロピー間に補償効果が存在することを示している。この打ち消し合いの結果、Fig. 8 に示されるように、電圧印加に対する保持比の変動はそれほど大きくならなかったものと考えられる。なお、今回使用している ODS カラムでは、Fig. 7 の t_0 (ウラシル) の溶出時間が変化していることから、残存シラノール基の解離に由来すると思われる電気浸透流が、電圧印加により発生している。しかしながら、その大きさは小さく、電圧印加による表面電位変動を確認することはできなかった。電圧印加がエントロピー及びエンタルピーに影響を与える機構及びその表面電位との関連については、更なる検討が必要である。

ODS カラムを用いた場合、Fig. 8 のアルキルベンゼン類の例のように、電圧印加が中性物質の保持にそれほど大きな影響を与えることはなかった。しかしながら、Fig. 10 に示されるように、 β -シクロデキストリン誘導体を固定相とした充填剤 (CHILAL β -CD-BR, YMC) を用いた場合は、中性物質の保持は電圧印加によりかなり大きく変化することが明らかになった³⁵⁾。そこで、この場合の保持変化と充填剤表面の電位変動の関連性について検討を行った³⁶⁾。

Fig. 11 に示すように、 β -CD-BR は第 2 級アンモニウム基を介してシリカゲル表面に固定されている。したがって、酸性条件ではプロトン付加により表面電荷は正となる。また、充填剤表面にはシラノール基が存在するため、

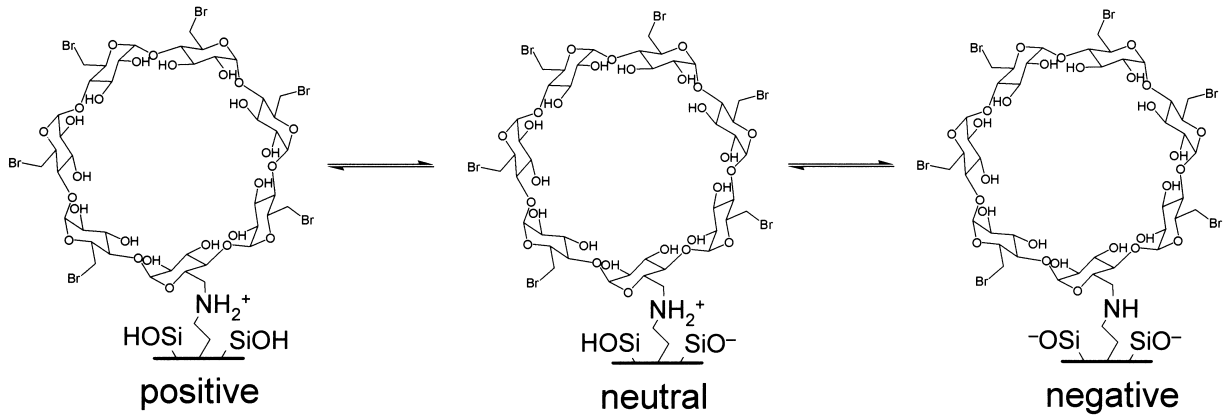


Fig. 11 Variation in the surface charge of silica gels modified with heptakis-6-bromo-6-deoxy-β-cyclodextrin (β-CD-BR)

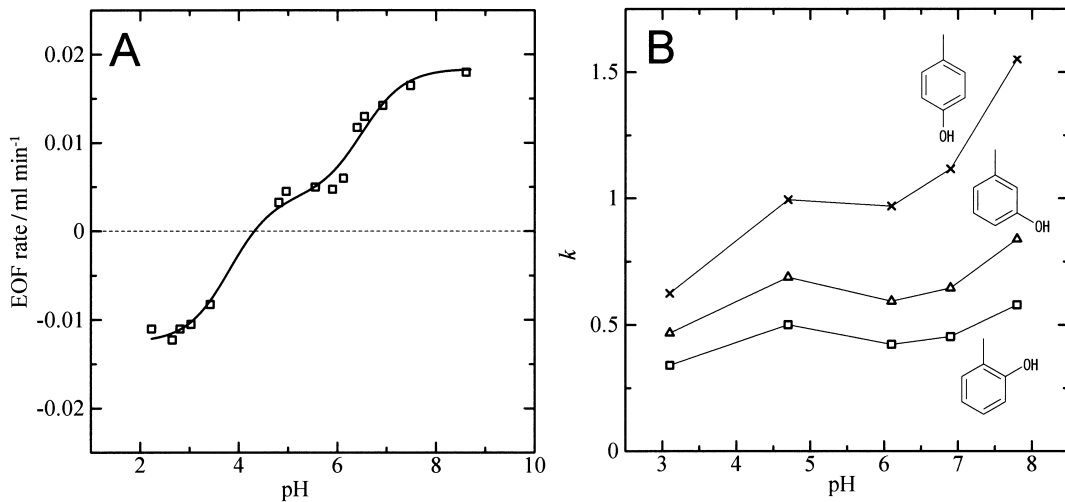


Fig. 12 Relationships between the pH of phosphate buffer in the mobile phase and (A) the EOF rate, and (B) retention factors of *o*-cresol (□), *m*-cresol (Δ), *p*-cresol (×)

(A) EOF rate was measured using the partially packed syringe system (packed length: 1 cm, applied voltage: 200 V for 10 min)³⁶. (B) Column: i.d. 0.15 mm; packed length 158 mm; packed with β-CD-BR; Eluent, mixture of 10 mM phosphate buffer and methanol (80/20, v/v); Flow, constant-pressure mode of 10 MPa

アルカリ条件ではシラノール基が解離し負の表面電荷となる。すなわち、pHを変化させることで表面電荷を正・中性・負にコントロールすることが可能である。

電気浸透流速度 (ν_{osm}) と表面電位の関係は、次式で表すことができる。

$$\nu_{\text{osm}} = \frac{\epsilon \xi}{4\pi\eta} \Delta E \quad (9)$$

ここで、 ϵ , η , ξ は、それぞれ移動相の誘電率、粘性率、ゼータ電位である。ゼータ電位は原則として表面電荷密度に比例するため、電気浸透流速度は表面電荷密度に比例し、その流れの方向は表面電位の正負より決定される。

したがって、電気浸透流速度を測定することで表面電荷状態を推測することが可能である。

Fig. 12-A に、移動相の pH と電気浸透流の関係を示した。pH 2~4 では電気浸透流は負の値（陰極から陽極へ流れる）であるが、pH 5 以上では正の値（陽極から陰極へ流れる）となっている。これは、pH 4~5 の範囲で解離状態が変化し、表面電荷が正から負へと変わったことを意味している。実際に pH 4 付近では電氣的に中性な表面となるため、十分な電気浸透流速度が得られず、測定を行うことができなかった。Fig. 12-A において、pH 4 及び 6.5 付近で電気浸透流速度が大きく変化しているのは、シラノール基及びアミノ基の解離に由来している。

次に、Fig. 12-A と同一の移動相条件で、β-CD-BR 充填

カラムを用い、*o*-, *m*-, *p*-クレゾールの分離を行った。pHと各クレゾールの保持比の関係をFig. 12-Bに示した。pHを変化させることで、各異性体の保持が明らかに変化しており、その程度は*p*-クレゾールが最も大きい。Fig. 12-AとBを比較すると、pHに対する電気浸透流速度の変化とクレゾール保持の変化パターンは類似していることが分かる。pH 6~8の領域では、pHの上昇に伴って β -CDに近接しているアミノ基が中性化することにより試料保持が増大していることから、アミノ基の電荷が β -CDと試料の包接状態を阻害（空孔内の疎水性の減少）していると考えられる。一方、pH 3~6の領域ではシラノール基の解離の影響により、わずかではあるが保持の変動が観測されている。また、電気浸透流速度から表面電荷が最もゼロに近いと考えられるpH 5において、保持がわずかではあるが極大をとることから、総合的な表面電荷が表面近傍の状態（溶媒和など）に影響を与えている可能性がある。詳細なメカニズムの解明には更なる検討が必要ではあるが、表面電荷状態と試料保持の間になんらかの相関があることが明らかになった。

他方、Fig. 10で用いられている移動相条件では、すべての条件（-6~+6 kV印加）において表面電荷がわずかに正であることが電気浸透流の挙動から確認されている。Fig. 12の結果からはpH 5では、 β -CD-BRの表面はわずかに負電荷を有していることになるが、Fig. 10とFig. 12では緩衝溶液濃度、メタノール濃度が異なるため、表面電荷の逆転が起きているのかもしれない。Fig. 10とFig. 12における表面電荷状態の違いの詳細は不明であるが、Fig. 10ではアミノ基はすべての状態において正電荷を有している。また、電気浸透流速度から判断すると、負電圧印加しているほうが充填剤の正の表面電荷密度が高い。アミノ基が原因となって正の表面電荷密度が上昇している場合は、Fig. 12に示されるように、保持が減少すると予測されるため、Fig. 10の実験条件では、負電圧印加によりシラノール基の解離が抑制されていると推測される。しかしながら、電気浸透流挙動からは、正電圧印加時においては表面電荷状態がほぼ一定であると推測され、また、同時に保持の減少が認められていることから、電圧印加は表面電荷以外にも影響を与えているものと考えられる。

3.4 交流電気クロマトグラフィーの開発

上述のように、pCECにおいて直流電場を印加することで、試料の保持をコントロールすることが可能であることが明らかになった。また、イオン交換充填剤を用いた場合には、電圧印加による保持の変化は試料成分の種類に依存し、更に正電圧と負電圧を印加した場合に異なった保持挙動変化を示すことも分かった。このことから、交流電圧を印加した際にも、保持挙動の変化を引き起こすことが可能

であると考えられる。交流電圧は、強度（振幅）、周波数、波形をコントロールすることが可能であるため、直流電圧印加よりも試料保持のコントロールの自由度が大きいことが期待できる。そこで著者らは、従来の直流電圧を用いる電気クロマトグラフィーではなく、交流電圧を用いる電気クロマトグラフィー（交流電気クロマトグラフィー）を新たに開発した³⁷⁾。交流電気クロマトグラフィーにおいて、試料は圧力差流によりカラム内を移動し、交流電圧は試料の電気泳動効果を得るためではなく、保持のコントロールを主目的として印加される。

交流電気クロマトグラフィーの開発に先立ち、交流電圧印加が保持の変化を引き起こすことの確認を、微小陰イオン交換充填カラム（IC-ANION-SW、内径0.7 mm、充填長12 mm）を用いて行った。直流電圧印加による保持変化を示したFig. 3の場合と同様に、微小カラムにフタル酸を含む溶液 {メタノールと3 mM フタル酸-3 mM ヘキサメチレンジアミン水溶液の混合溶液（pH 6.87）（10/90）}を連続的に供給し、交流電圧を印加したところ、直流電圧印加の場合と同様にカラムから溶出される溶液の吸光度の上昇が観測された。また、電圧印加を停止すると、逆に吸光度の減少が観測された。これは、交流電圧印加により試料の保持が減少し、固定相中のフタル酸が移動相へと移行したことを意味している。すなわち、交流電圧印加により、試料保持をコントロールできることが確認された。

交流電圧印加による保持変化について、微小カラムを用いて更に検討した。Fig. 13に示すように、印加する交流電圧の周波数（26~1176 Hz）と試料保持変化（交流電圧印加による吸光度の変化）の関係を調べたところ、吸光度変化の程度は交流電圧の周波数に依存していることが分かった。全体的な傾向としては、周波数が大きくなるに従い、吸光度変化は小さくなった。ただし、興味深い現象として、100 Hz前後では保持の変化（減少）は相対的に小さくなり、300 Hzを超える周波数帯の1/3程度の変化であった。更に、フタル酸を用いている今回の実験条件では、交流電圧印加により一般的には吸光度の上昇（保持の減少）が観測されているが、約270 Hzの交流電圧を印加したときのみ、保持の減少（吸光度の増大）ではなく保持の増大（吸光度の減少）が観測された。

フタル酸以外の試料溶液を用いた場合についても検討を行ったところ、Fig. 13に示されるように、試料溶液としてサリチル酸を含む溶液を用いた際の周波数に対する保持変化（吸光度変化）パターンは、フタル酸とほぼ同一であった。すなわち100 Hz前後で保持変化に伴う吸光度の上昇の特異的な抑制が観測され、270 Hz付近では吸光度の減少が観測されている。一方、フタル酸、サリチル酸とは異なり、安息香酸を試料として用いた場合、約50~270 Hzの範囲における特徴的な挙動がほとんど観測されな

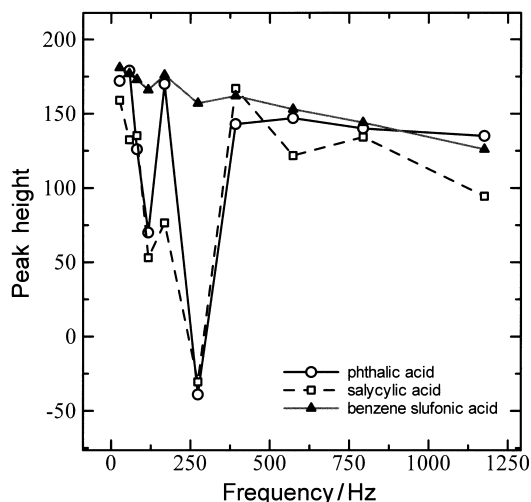


Fig. 13 Relationships between peak height induced by application of an alternating voltage and the frequency

Sample solutions: ○ = methanol/3 mM phthalic acid - 3 mM hexamethylenediamine - 0.15 mM HEPES [pH 5.6] (10/90, v/v), □ = methanol/3 mM salicylic acid [pH 2.7] (10/90), ▲ = methanol/3 mM benzoic acid [pH 3.0] (10/90); Mini-column: i.d. 0.7 mm, length 12 mm, packed with IC-ANION-SW; Applied voltage: $V_{\text{peak}} = 1$ kV; Flow: constant pressure mode of 5 MPa; Detection: 210 nm

った。すなわち、全範囲において、周波数の増大とともに吸光度変化は徐々に小さくなった。これらのことから、交流電圧による保持変化は試料種に依存することが確認された。

電圧印加による保持変化は、固定相もしくは固定相近傍の状態変化に由来すると考えられる。したがって、固定相の種類によっても保持変化の挙動は異なると考えられる。Fig. 13 で用いているイオン交換充填剤はシリカゲルを基体とするものであるため、これとは異なるポリマー基体の充填剤 (MCI gel SCA04, 三菱化学) を用いた際の保持変動について、検討を行った。試料としてフタル酸を用いたところ、ポリマー基体充填剤でもシリカゲルを基体とする充填剤と同様に、26~1176 Hz の範囲で保持の変化が観測された。しかしながら、Fig. 13 で観測された約 50~270 Hz の範囲において保持変化の特異的な抑制が観測されなかった。すなわち、充填剤の種類により保持変化のパターンが異なることが確認された。

以上のように、交流電圧を印加することで陰イオン性試料の保持が変化することが確認され、その変化には試料種依存性があり、更に印加する交流電圧の周波数により変化をコントロールできることが確認できた。この現象を応用し、交流電気クロマトグラフィーの開発を行い、その基礎挙動について検討を行った。

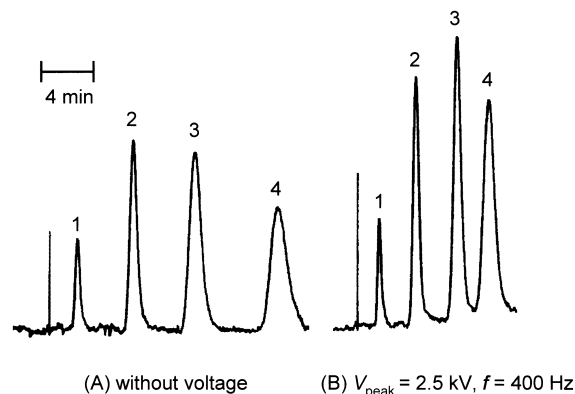


Fig. 14 Alternating voltage capillary electrochromatogram of carboxylic acids

Column: i.d. 0.32 mm, length 88 mm, packed with IC-ANION-SW; Eluent: methanol/10 mM citric acid - 5 mM hexamethylenediamine (pH 4.8) (10/90, v/v); Applied voltage: (A) without voltage, (B) $V_{\text{peak}} = 2.5$ kV, $f = 400$ Hz; Flow: constant pressure mode of 15 MPa; Detection: 254 nm; Peak identification: (1) uracil, (2) benzoic acid, (3) phthalic acid, (4) salicylic acid

交流電気クロマトグラフィーの装置構成は Fig. 1 に示されている装置とほぼ同一であり、直流電源の代わりに交流電源を用いている。この際、交流電圧印加による電位変化が検出信号に対して与える影響を取り除くため、検出部のキャピラリーが常にゼロ電位となるようにし、高電圧はカラム入口側に対して印加した。カラムには、Fig. 13 で用いているシリカゲルを基体とした陰イオン交換充填剤 (IC-ANION-SW) を用いた (内径 0.32 mm, 充填長 88 mm)。移動相にはメタノールと 10 mM クエン酸-5 mM ヘキサメチレンジアミン水溶液 (pH = 4.8) の混合溶液 (10/90) を用いた。Fig. 14A は、交流電圧を印加していないキャピラリー液体クロマトグラフィー条件での、ウラシル (t_0 及び中性マーカー)、安息香酸、フタル酸、サリチル酸の分離を示したものである。この条件で、振幅 2.5 kV, 周波数 400 Hz の交流電圧 (正弦波) をカラムに印加し得られたクロマトグラムが、Fig. 14B である。電圧印加を行っていない状態での安息香酸、フタル酸、サリチル酸の保持比は、それぞれ 1.88, 4.02, 7.02 であるが、これらは電圧印加により 1.63, 3.55, 5.08 へと減少している。すなわち、交流電圧を印加することで試料の溶出が早くなった。前述のように、微小カラムを用いた実験から、交流電圧印加は一般的に保持の減少を起こすことが示されている。したがって、溶出時間の短縮 (保持の減少) は妥当な結果であると思われる。

交流電圧の因子のひとつに振幅がある。そこで、周波数を一定にし、印加電圧の振幅を大きくした際の保持の変動について検討を行った。600 Hz の交流電圧を印加し、そ

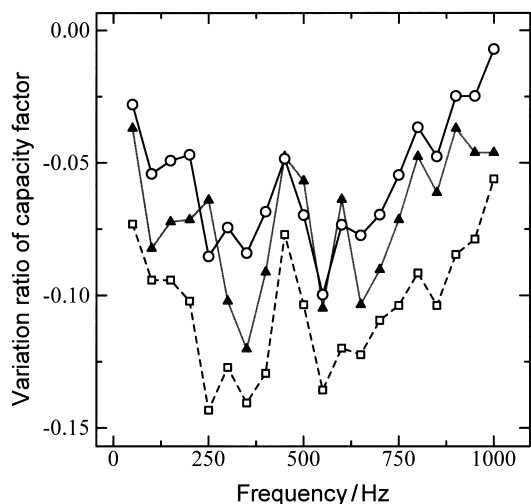


Fig. 15 Relationship between frequency of an applied alternating voltage and variation of the capacity factors of benzoic acid (\blacktriangle), phthalic acid (\circ), and salicylic acid (\square)

Applied voltage: $V_{\text{peak}} = 1.5 \text{ kV}$. Other conditions were the same as in Fig. 14.

の振幅を大きくすると、直流電圧を印加した場合と同様に安息香酸、フタル酸、サリチル酸の保持の減少は大きくなった。その振幅に対する保持の変化は直線的ではなく、更にその保持の変化は試料種によりかなり異なったものになった。

次に、Fig. 13と同様に、印加する交流電圧の周波数を変化させその保持への影響を調べた。Fig. 15に示すように、振幅 1.5 kV における保持変化に対する周波数の影響は、すべての周波数 (50~1000 Hz) において保持の減少が観測された。全体的な傾向としては、安息香酸、フタル酸、サリチル酸共に周波数 400 及び 600 Hz 付近で保持の減少率が最大となった。しかしながら、500 Hz では特異的に保持の減少が抑制された。これらは Fig. 13 の 50~250 Hz の周波数帯で観測されたものと同様の特異的現象であると思われる。なお、すべての周波数においてサリチル酸は保持の変動率は、3 試料中最も大きかった。しかしながら、安息香酸とフタル酸の保持の減少率については、全体的にはフタル酸のほうが大きいものの、周波数によっては逆転することもあり、非常に複雑な挙動を示した。

上述のように、交流電気クロマトグラフィーでは、印加する交流電圧の振幅と周波数の両者により、保持をコントロールすることが可能である。したがって、振幅と周波数の組み合わせにより、特異的な効果が得られる可能性がある。更に誘起される保持変化は試料種に依存していると思われる。そこで、振幅と周波数の両者の組み合わせと保持変化の関係について検討を行った。ポリマーを基体とした陰イオン交換充填剤 (MCI gel SCA04) を充填したカラム

(内径 0.15 mm, 充填長 94 mm) を用い、移動相にメタノールと 10 mM KCl を含む 20 mM クエン酸緩衝溶液 (pH = 4.8) の混合溶液 (20/80) を用いた。試料成分としてアセチルサリチル酸、ベンゼンスルホン酸、サリチル酸を用い、交流電圧印加によるそれぞれの保持変化を Fig. 16 に示した。Fig. 16 では、印加電圧の周波数と振幅に対する保持の相対変化率 ($\Delta k/k_0$) を示している。ここでは、交流電圧印加による保持の増大と減少割合が、それぞれ正、負の値で与えられる。

Fig. 16 から交流電圧印加による保持変化には、高い試料種依存性があることが分かる。全体的な傾向として、この条件では、アセチルサリチル酸 (Fig. 16-A) の保持が交流電圧印加により増大するのに対し、ベンゼンスルホン酸 (Fig. 16-B) の保持には顕著な変化が見られなかった。更に、サリチル酸 (Fig. 16-C) の保持は全体的に減少している。各試料成分について詳しく調べると、サリチル酸の場合、周波数及び印加電圧の増大に従い保持の減少率が大きくなっていることが分かる。一方、アセチルサリチル酸の場合、4.0 kV - 4000 Hz の交流電圧を印加したときは、保持の増大が観察されており、2.0 kV - 3000 Hz 付近では保持の減少が起きている。すなわち、アセチルサリチル酸の場合、全体的には交流電圧印加により保持は増大しているが、その変化パターンは非常に複雑であり、特定の傾向が認められない。Fig. 3 に示されるように、電圧印加により保持の増大や減少を引き起こすことが可能であるが、交流電圧印加の場合このような複雑なパターンが得られることから、電圧印加は試料成分の固定相からの脱離速度及び固定相への吸着速度にそれぞれ異なった影響を与え、更にその影響の度合いも異なっているのではないかと考えられる。

以上のように、交流電圧印加により保持が変化するメカニズムの解明は、まだ十分とはいえないが、速度論的な取り扱いを含めて更なる検討を行うことで、より高度な試料保持のコントロールが可能になると期待される。現在、混合固定相のような複数の保持機構を利用する分離場を用い、印加する交流電圧の周波数と振幅を適切に設定することで、特定の保持機構の選択的なコントロールの可能性について検討を行っている。

4 ま と め

CEC における電圧印加は、一般的には電気泳動効果を得ることが主たる目的であるが、実際にはこの稿で述べてきたように、試料の保持にも影響を与えている。加えてカラムの電気抵抗や電気浸透流速度も非線形性を示すことがあり、電圧印加がカラムの状態を変化させていることは明らかである。Tallarek ら^{24)~26)}や Bromberg ら²⁷⁾の研究成果を考慮すると、電圧印加による種々の変化は、カラムに

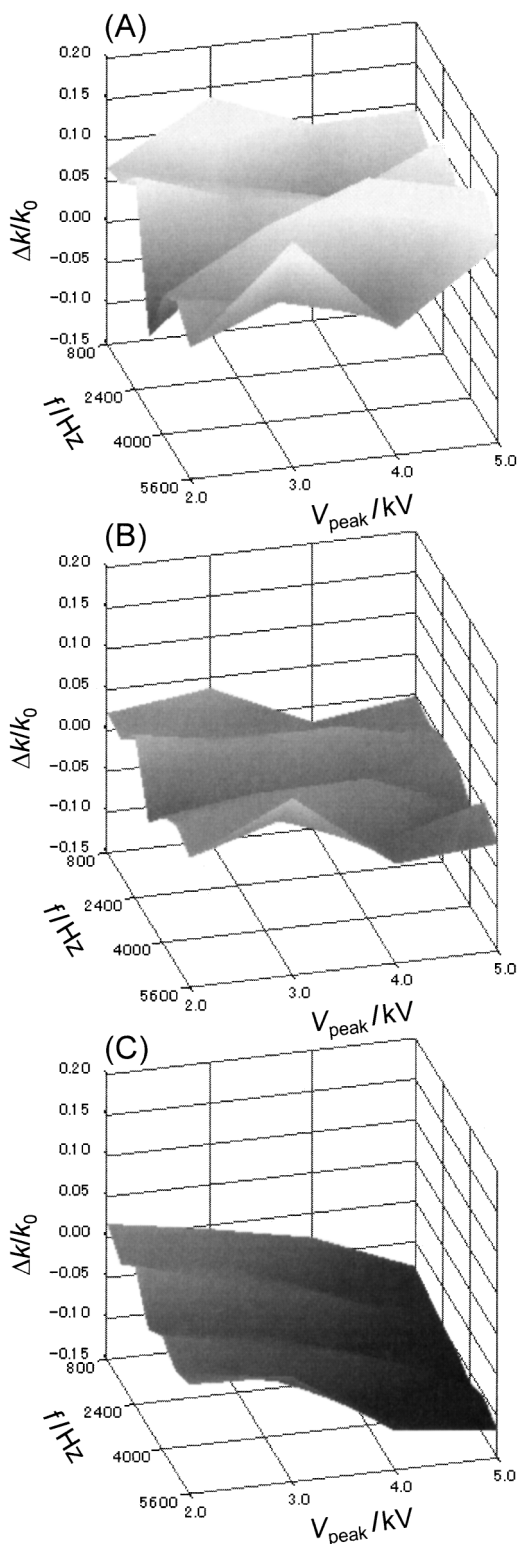


Fig. 16 Variation ratios in retention factor of (A) benzenesulfonic acid, (B) benzoic acid and (C) phthalic acid induced by application of alternating voltage

Column: i.d. 0.15 mm, packed length 94 mm, packed with MCI gel SCA04; Eluent: 20 mM citric acid, 10 mM KCl/MeOH (90/10), Flow: constant pressure mode of 14 MPa

不均一性をもたらしていると考えられる。電場下の不均一な分離場は、分離に悪影響を与えている可能性もあるが、電場が分離場に与える影響を詳細に解明すれば、CECにおける分離挙動のコントロールをより高度に行うことが可能になる。また、これまでの研究では、電圧印加による保持の変化は、最大でも数10%程度とあまり大きくない。したがって、電場による試料保持のコントロールを実用的に用いるためには、電場応答性の高い固定相の開発が不可欠であろう。

本研究を遂行するに当たり、ご指導をいただきました津田孝雄先生〔現(有)ピコデバイス〕、並びにご協力いただきました大谷肇教授(名古屋工業大学)に感謝します。また、本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金「基盤研究(B)」(1244209)、「若手研究(B)」(14740402)の支援によりなされたことを付記し、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) T. Tsuda: *Anal. Chem.*, **59**, 521 (1987).
- 2) J. H. Knox, I. H. Grant: *Chromatographia*, **32**, 317 (1991).
- 3) T. Tsuda (Ed.): “*Electric Field Application in Chromatography, Industrial and Chemical Processes*”, (1995), (VCH, Weinheim).
- 4) F. Steiner, B. Scherer: *J. Chromatogr. A*, **887**, 55 (2000).
- 5) I. S. Krull, A. Sebag, R. Stevenson: *J. Chromatogr. A*, **887**, 137 (2000).
- 6) S. Eeltink, G. P. Rozing, W. T. Kok: *Electrophoresis*, **24**, 3935 (2003).
- 7) F. Svec (Ed.): *J. Chromatogr. A* (Special issue for electrochromatography), **1044**, (2004).
- 8) J. M. Cintron, L. A. Colon: *J. Chromatogr. A*, **1106**, 256 (2006).
- 9) S. Kitagawa, A. Tsuji, H. Watanabe, M. Nakashima, T. Tsuda: *J. Microcol. Sep.*, **9**, 347 (1997).
- 10) R. Nakashima, S. Kitagawa, T. Yoshida, T. Tsuda: *J. Chromatogr. A*, **1044**, 305 (2004).
- 11) S. Kitagawa, H. Watanabe, T. Tsuda: *Electrophoresis*, **20**, 9 (1999).
- 12) S. Kitagawa, T. Tsuda: *Anal. Sci.*, **14**, 571 (1998).
- 13) T. Tsuda: *Anal. Chem.*, **60**, 1677 (1988).
- 14) T. Unger, K. K. Unger: *Trends Anal. Chem.*, **15**, 463 (1996).
- 15) W. X. Yao, C. P. Pau, G. Patonay, I. M. Warner, G. Ho, J. Ngi: *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 2751 (1988).
- 16) T. Nagoaoka, M. Fujimoto, H. Nakao, K. Kakuno, J. Yano, K. Ogura: *J. Electroanal. Chem.*, **350**, 337 (1993).
- 17) T. Nagoaoka, M. Fujimoto, H. Nakao, K. Kakuno, J. Yano, K. Ogura: *J. Electroanal. Chem.*, **364**, 179 (1994).
- 18) R. S. Deinhammer, M. D. Porter, K. Shimizu: *J. Electroanal. Chem.*, **387**, 35 (1995).
- 19) S. R. Rudge, S. K. Basak, M. R. Ladisch: *AIChE J.*, **39**, 797 (1993).
- 20) S. Kitagawa, A. Tsuji, H. Watanabe, M. Nakashima, T. Tsuda: *J. Microcol. Sep.*, **9**, 347 (1997).
- 21) C. Chaiyasut, S. Kitagawa, H. Wada, T. Tsuda: *Anal. Sci.*, **16**, 413 (2000).

- 22) C. Chaiyasut, T. Tsuda, S. Kitagawa, H. Wada, T. Monde, Y. Nakabeya: *J. Microcol. Sep.*, **11**, 590 (1999).
- 23) I. Nischang, U. Tallarek: *Electrophoresis*, **25**, 2935 (2004).
- 24) U. Tallarek, E. Rapp, H. Sann, U. Reichl, A. S.-Morgenstern: *Langmuir*, **19**, 4527 (2003).
- 25) U. Tallarek, M. Paces, E. Rapp: *Electrophoresis*, **24**, 4241 (2003).
- 26) F. C. Leinweber, U. Tallarek: *Langmuir*, **20**, 11637 (2004).
- 27) B. O. Eriksson, M. Dahl, M. B. O. Anderson, L. B. Blomberg: *Electrophoresis*, **25**, 3092 (2004).
- 28) S. Kitagawa, T. Tsuda: *J. Microcol. Sep.*, **12**, 285 (2000).
- 29) A. Moore Jr., J. W. Jorgenson: *Anal. Chem.*, **65**, 3550 (1993).
- 30) C. N. Reilley, G. P. Hildebrand, J. W. Ashely, Jr.: *Anal. Chem.*, **34**, 1198 (1962).
- 31) R. P. W. Scott, C. G. Scott, P. Kucera: *Anal. Chem.*, **44**, 100 (1972).
- 32) T. Okada, T. Kuwamoto: *Anal. Chem.*, **56**, 2073 (1984).
- 33) 高田芳矩, 伊藤正人, 伊藤三男, 岩渕 等: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **43**, 435 (1994).
- 34) H. Nakagawa, S. Kitagawa, S. Araki, H. Ohtani: *J. Chromatogr. Sci.*, **44**, 77 (2006).
- 35) M. Sato, S. Kitagawa, H. Tashita, T. Tsuda: *Chromatography*, **22**, 195, (2001).
- 36) H. Nakagawa, S. Kitagawa, H. Ohtani: *Anal. Sci.*, **22**, 737 (2006).
- 37) H. Nakagawa, M. Sato, S. Kitagawa, T. Tsuda: *Anal. Chem.*, **75**, 3512 (2003).

Investigation and Applications of Applied Voltage Effect on Retention Factor in Capillary Electrochromatography

Shinya KITAGAWA¹ and Hiroyuki NAKAGAWA¹

¹ Materials Sciences and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8555

(Received 1 February 2007, Accepted 23 April 2007)

We found a phenomenon that the application of a voltage to a capillary column can vary the retention factor of both ionic and neutral analytes in pressurized flow driven capillary electrochromatography (pCEC). Studies of this phenomenon revealed that the retention variation depended on the magnitude of the applied voltage, its sign, and the kind of analytes. The change in the surface charge under an electric field has an important role on the retention variation. In the case of separating alkyl benzenes in an ODS column, the applied voltage changed both entropy and enthalpy of transfer of an analyte from the mobile phase to the stationary phase. However, the entropy-enthalpy compensation canceled any voltage-induced variation of the retention factor. A new injection method based on a retention variation is proposed in which the pulsed voltage was applied to the column with continuous supplying a sample solution. Furthermore, we found that the application of an alternating voltage to a capillary column can also vary the retention factor of a sample solute. The alternative voltage capillary electrochromatography (AV-CEC) was developed as an application of this phenomenon to control the retention of a sample solute. The retention factor varied according to both the amplitude and frequency of an applied alternating voltage and the variation greatly depended on the kinds of sample solutes and the packing materials.

Keywords : capillary electrochromatography; retention factor variation; alternative voltage; surface charge.