

総合論文

圧力差流を用いる電気クロマトグラフィーにおける 電場の制御による分離性能の向上

北川 慎也^{®1}

圧力差流を併用するキャピラリー電気クロマトグラフィー (pCEC) は、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。pCEC の送液は主として圧力差流であり、正・負いずれの電圧印加を行っても、試料成分をカラムから溶出させることが可能である。この特徴を利用し、クロマトグラフィー分離に、適切な方向及び大きさの電気泳動を組み合わせることで、分離選択性の簡便なコントロールや分離を損なわずに分析時間を短縮することが可能であることを示した。これらの目的に対しては、移動相組成と印加電圧の両者の動的なコントロール (デュアルグラジエント) が効果的であった。また、ペプチド分離のように比較的複雑な試料を対象とした場合、二つの機構を併用していることが分離に対して有効であり、印加電圧に応じて分離性能が向上した。更に、移動相組成のグラジエントを行った際に発生する、カラム軸方向の移動相組成及び電位勾配の不均一性を利用することで、試料成分のピーク幅の低減が可能であることを示した。

1 緒 言

現在、プロテオーム解析やメタボローム解析のような、網羅的分析手法が重要視されている研究分野が急速に発展している¹⁾²⁾。個々の成分ではなく“系”全体の物質動態を解析の対象とする網羅的分析には、分離分析手法が欠かすことができない。一方、多種多様な試料成分を分離するためには、二次元ゲル電気泳動のように複数の分離手法 (分離機構) の利用が不可欠である。液体クロマトグラフィー (LC) 分離では、異なった分離機構を組み合わせた二次元 (多次元) クロマトグラフィー (LC-LC, LCⁿ) が汎用されている³⁾。

一方、キャピラリー電気クロマトグラフィー (capillary electrochromatography, CEC) は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) とキャピラリー電気泳動法 (CE) を組み合わせた分析手法である^{4)~11)}。二次元ゲル電気泳動や LCⁿ では、個々の機構による分離が独立して行われるが、CEC の場合は異なった分離メカニズムが同時に働き、分離が達成される。HPLC 分離は、試料成分と固定相間の相互作用 (保持) の大きさの差異により分離が行われ、他方、CE では電場下における試料成分の電気泳動速度の差異に基づいて分離が行われる。したがって、CEC では試料保持と電気泳動速度の両者の差異の組み合わせにより、試料成分の分離が行われる。

CEC は、圧力差流を用いない電気浸透流送液型の CEC と圧力差流を併用する CEC (pCEC) に大別される。電気浸透流送液型 CEC では、電気浸透流速度と電気泳動速度を合算した速度で個々の試料成分が移動相内を流れていくが、pCEC ではこれに更に圧力差流速度が加わる。次式は、アイソクラティック溶離及び定電圧印加時における試料成分の pCEC での溶出時間に関する式である。

$$t_R = \frac{L}{v_{\text{pres}} + (\mu_{\text{osm}} + \mu_{\text{eph}})E} (k+1) \quad (1)$$

式(1)の t_R , L , v_{pres} , μ_{osm} , μ_{eph} , E , k は、それぞれ溶出時間、カラム (充填) 長、圧力差流速度、電気浸透流移動度、電気泳動移動度、電位勾配、試料の保持比である。式(1)から明らかなように、試料成分の保持比が同一であっても、電気泳動移動度に差があれば CEC では分離可能である。CEC の大きな特徴として、HPLC では移動相中における試料成分の移動速度は等しいが、CEC では試料成分の電気泳動速度に依存し、個別の移動速度を有していることが挙げられる。

一般的に CEC といった場合は、電気浸透流送液型 CEC を指すことが多い。これは、電気浸透流のフロープロファイルが栓流であるため¹²⁾¹³⁾、カラム内での試料成分の広がり低減され、高い分離効率を得ることが可能であるからである。実際に、著者らは充填長 15 mm の極めて短いカチオン交換カラムで理論段数 1400 段 (78000 段/m) を達

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

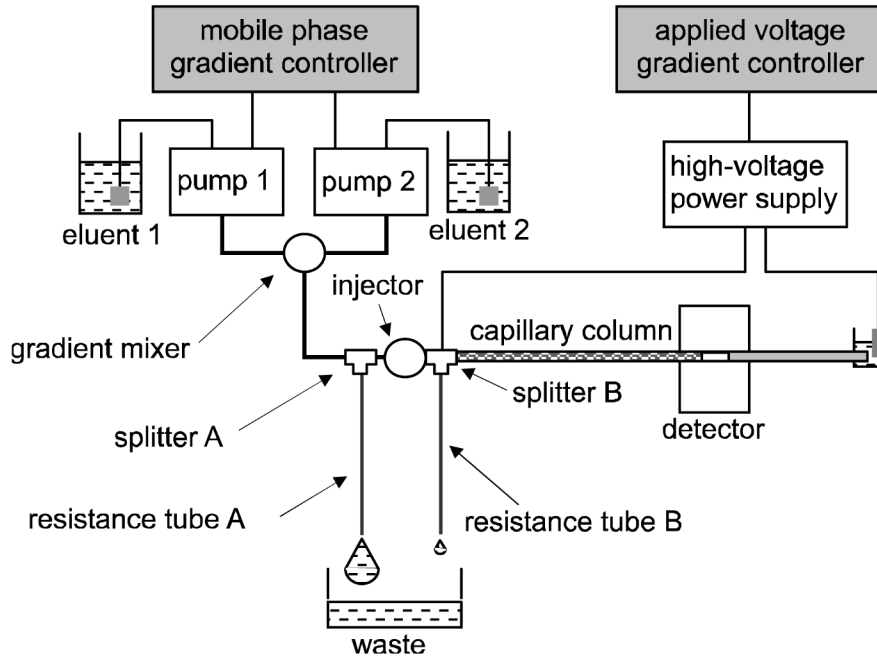


Fig. 1 Schematic diagram of pressurized flow driven capillary electrochromatography (pCEC)

成している¹⁴⁾。電気浸透流送液型 CEC の制限としては、印加電圧に対する自由度が小さいということが挙げられる。すなわち、試料をカラム出口方向へ移動させるためには、正もしくは負の電圧の一方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が、電気泳動による分離により打ち消され、全体的な分離が阻害される場合もある。

他方、pCEC では圧力差流を用いているため栓流という利点は失われるが、電圧印加に対する自由度は極めて高い。すなわち、圧力差流速度が電気泳動速度と比較して十分に大きい場合〔式(1)の分母が正の値を持つ場合〕、正・負のどちらの電圧を印加しても試料成分はカラム出口へ流れていく。また、電気浸透流送液型 CEC では分析時間の短縮のため、ある程度大きな電圧を印加する必要があるが、pCEC では分離改善に必要な任意の大きさの電圧を印加するだけでよい。すなわち、pCEC では、任意の電圧を印加することで分離選択性を容易にコントロールすることが可能である。

CEC における電圧印加の目的は、上述のとおり試料成分の電気泳動及び電気浸透流を発生させることであるが、著者らは試料の保持、すなわち式(1)における k にも影響を与えていることを見だし、紹介している¹⁵⁾。本総合論文では、電圧印加による保持変化には触れず、試料成分の電気泳動を積極的に利用することで、分離の高性能化を図った事例について報告する。すなわち、電気泳動を利用した分離の改善や分析時間の短縮、移動相組成のグラジエントが行われている不均一な分離場における試料成分の電気泳動のみならず分離性能向上など、移動相送液と電気泳

動挙動を独立にコントロールすることが可能である pCEC の特長を生かした分離の高性能化について、著者らの行ってきた一連の研究を紹介する。

2 圧力差流を用いるキャピラリー電気クロマトグラフ

Fig. 1 に、本研究で使用している pCEC の概略図の一例を示した¹⁶⁾。この装置は、グラジエント溶離を行うための 2 台の液体クロマトグラフポンプ、ミキサー、インジェクター、キャピラリーカラム、紫外可視吸光検出器、高電圧電源、二つのスプリッターで構成されている。CEC やキャピラリー LC では、カラム内径が極めて小さくなるため、カラム内の流量が極めて小さくなる。例えば、内径 0.15 mm のカラムを用いる場合、一般的に用いられる内径 4.6 mm カラムで 1 mL/min に相当する流量は、約 1 μ L/min である。更に内径の小さな 0.05 mm のカラムでは、約 0.1 μ L/min になる。そのため、ミキサーからカラム入口までの配管のデッドボリューム（死容量、遅延容量）による、ミキサー内でグラジエントが始まってからそれが実際にカラム入口までに到達するまでの時間遅れを無視することができない。ポンプ送液流量を大きくし、グラジエント溶離の時間遅れを低減するために、スプリットフロー (splitter A) を用いている。pCEC は電圧印加部を除いてキャピラリー HPLC とほぼ同等の装置構成であり、キャピラリー HPLC の問題点などについては Nogya らによるレビューが詳しい¹⁷⁾。なお、現在は微小流量を取り扱うことが可能であるグラジエントシステムが市販されており、それらの装置を用いるスプリットを用いない装置構成も可能である。

電圧はカラム出口側のリザーバーとインジェクター直後

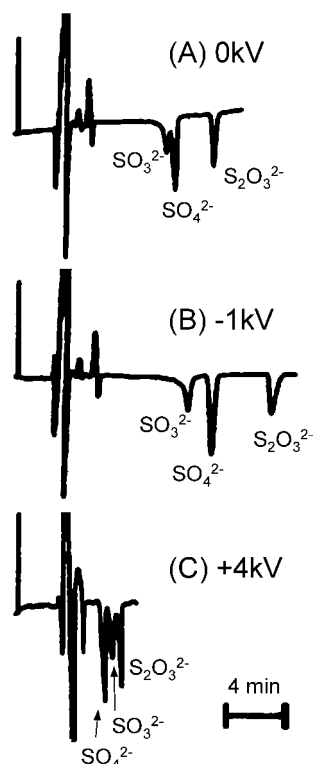


Fig. 2 Effect of applied voltage on the separation of sulfite, sulfate, and thiosulfate ions

Applied voltage : (A) 0 kV, (B) -1 kV, (C) +4 kV, Column : i.d. 50 μm , packed length 220 mm, capillary length 304 mm, packed with IC-ANION-SW (dp. 5 μm). Mobile phase : methanol/aqueous solution containing 5 mM phthalic acid, 5 mM hexamethylenediamine, and 0.15% HEPES {4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid} (pH 6.8) (10/90). Detection : UV 210 nm

の splitter (splitter B) 間に印加している。通常は、安全な操作を行うため入口側を接地し、出口側リザーバーに正又は負の高電圧を印加する。なお、インジェクターの試料容量 (0.5 μL) はキャピラリーカラムへの負荷量としては大きすぎるため、試料注入にはスプリットインジェクション法を用いているが、ナノインジェクターを用いることでスプリットインジェクションを行わない装置構成も可能である¹⁸⁾。splitter B には、試料注入量の低減のほかに、電圧印加時に発生する電極反応物がカラム内に流れ込み分離に影響を与えることを抑制する効果もある。入口側電極 (splitter B) での電気分解により発生する気泡は、圧力差流送液に伴う背圧により移動相へ溶解し、そのほとんどは splitter を通して排出される。したがって、本論文で述べているほとんどの分離例ではスプリットインジェクション法を採用している。

キャピラリーカラムは、内径 0.05~0.15 mm の溶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) 修飾シリカゲル、イ

オン交換、親水性相互作用充填剤など} をスラリー充填し調製している。熱揮散性のよいキャピラリーカラムを用いることで電圧印加時の Joule 熱によるカラム内温度の上昇を抑制しているが、必要に応じてカラムに対して送風を行い、空冷を行った。充填部直後のポリイミドコーティングを鋭利なナイフではがすことにより検出窓を作製している。オンキャピラリーで吸光検出を行っているため、内径の大きなキャピラリーカラムを用いると検出感度は有利になる。

アイソクラティック溶離を行う場合は、単一ポンプによる定圧送液を行った。グラジエント溶離の際には定流量送液を行っているが、その際のカラム内の移動相流速については後述する。

3 電気泳動を利用した分離の高性能化

3.1 アイソクラティック条件における電気泳動を利用した溶出時間のコントロール

圧力差流を併用する CEC の利点は、先にも述べたように、印加する電圧に対する自由度が極めて高いことである。そのため、カラム出口に対して正もしくは負の電圧を印加し、電気泳動挙動を加えることで、LC 分離とは異なった分離選択性を簡便に得ることが可能である。Fig. 2 に陰イオン交換カラム及びフタル酸-ヘキサメチレンジアミンを含む溶離液を用いた、硫酸イオン、亜硫酸イオン、チオ硫酸イオンのアイソクラティック条件下での pCEC 分離を示す¹⁹⁾。この分離条件では、フタル酸を吸光試薬とする間接吸光法 {紫外 (UV) 210 nm} を用いているため、無機陰イオンの溶出は吸光度の減少として観測されている。

Fig. 2A に示すように、電圧印加を行っていない条件 (LC 分離) では、亜硫酸イオンと硫酸イオンの分離が不十分である。Fig. 2 で用いている移動相条件下では、試料の電気泳動移動度は、亜硫酸イオン < 硫酸イオン < チオ硫酸イオンの順に大きくなる。したがって、カラム出口側に負の電圧を印加した場合、溶出時間の遅いイオンほどより大きな入口側へ向かう電気泳動速度を得ることになる。すなわち、溶出時間の遅い試料ほどより減速効果が大きいことになる。この現象を利用すると、-1 kV の電圧を印加するだけで、Fig. 2B に示すように亜硫酸イオンと硫酸イオンの分離を簡単に改善することが可能である。ただし、負電圧を印加しカラム入口への電気泳動を行ったため、全体的に陰イオン成分の溶出時間が遅れることになる。

逆に正の電圧を印加した場合は、Fig. 2C に示すように、全体的に溶出時間を短縮することが可能である。ただし、この場合、移動相内での試料の移動速度はチオ硫酸イオンが最も大きく、亜硫酸イオンが最も小さい。そのため、+1~+2 kV の電圧を印加した際には、亜硫酸イオンと硫

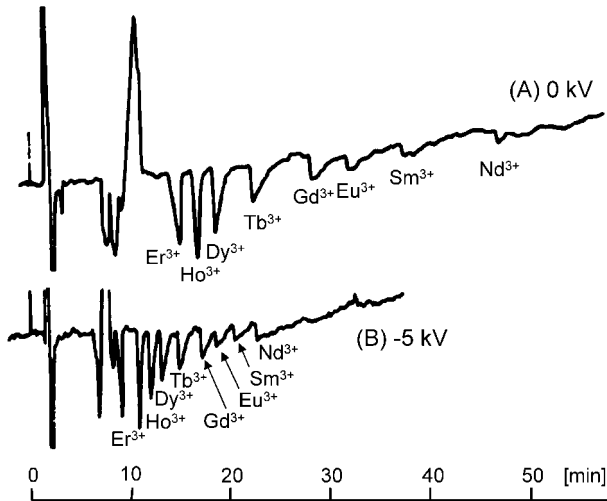


Fig. 3 Electrophoretic acceleration of the elution of lanthanoid ions

Applied voltage: (A) 0 kV, (B) -5 kV. Column: i.d. 75 μ m, packed length 220 mm, capillary length 320 mm, packed with IC-CATION-SW (dp. 5 μ m). Mobile phase: aqueous solution containing 10 mM cupric chloride, 10 mM α -hydroxyisobutyric acid, and 5.1 mM ethylenediamine (pH 4.0). Detection: UV 210 nm

酸イオンの溶出ピークが重なってしまう。更に大きな+4 kVを印加すると、硫酸イオンは亜硫酸イオンを追い越し、溶出順序を変更することが可能である (Fig. 2C)。このように、イオンを対象とする pCEC では、電圧印加により分離選択性を容易にコントロールすることが可能である。

CEC では、移動相は固定相に対する試料成分の保持だけではなく、移動相中の電気泳動移動度もコントロールしている。実際に Fig. 2 の分離条件では、移動相中のヘキサメチレンジアミンと試料成分の相互作用が、保持及び電気泳動移動度を決定する上で重要な役割を担っている。一般的な傾向として、イオン交換クロマトグラフィーでは、保持の大きな試料ほど電気泳動速度が大きい。この現象を利用することで、適切な大きさの電圧を印加するだけで、試料の分離効率を簡便に高めることが可能である。Fig. 3 は、陽イオン交換カラム及び移動相として 10 mM α -ヒドロキシイソ酪酸-5.1 mM エチレンジアミン (pH 4.0) を用いたランタノイドイオンの分離である¹⁹⁾。Fig. 2 と同様に間接吸光法を用いているため、各ランタノイドイオンの溶出ピークは吸光度の減少として観測されている。ランタノイドイオンは移動相中で α -ヒドロキシイソ酪酸と錯体を形成している。原子番号の大きなランタノイドイオンのほうがランタニド収縮により、錯形成の安定度定数が大きくなるため、固定相の陽イオン交換基との静電相互作用が小さくなる。そのため、Fig. 3 に示すように、原子番号の大きな元素ほど溶出が早くなる。一方、 α -ヒドロキ

シイソ酪酸と錯形成が行われることでランタノイドイオンの正電荷が相対的に減少し、電気泳動移動度は小さくなる。したがって、保持の小さな原子番号の大きなランタノイド元素ほど電気泳動移動度が小さい。カラム出口側に負電圧を印加すると、保持の大きい原子番号の小さな元素ほど、より大きな電気泳動移動速度で溶出が加速される。

電圧印加を行っていない Fig. 3A では、Er³⁺ から Nd³⁺ イオンまでの 8 種のランタノイド元素の分離には約 45 分の分析時間が必要であった。カラム出口に負の電圧印加 (-5 kV) を行うと、電気泳動により移動相中の試料の線流速が増大し、溶出時間の短縮が行われる。Fig. 3B に示すように、Nd³⁺ イオンは約 22 分程度で溶出されている。全体的に溶出時間が早くなっているが、それぞれのランタノイド元素の分離は阻害されていない。これは、早い時間帯に溶出されているランタノイド元素の電気泳動移動度が小さなため、溶出時間の変化量 ($t_{0\text{kV}} - t_{-5\text{kV}}$) が相対的に小さなためである。実際に、Er³⁺ イオンと Nd³⁺ イオンの溶出時間の変化量は、それぞれ約 2 分と 22 分である。このように、イオン交換カラムに対して電圧印加を行うことで、分離を阻害することなく分析時間の短縮を行うことが可能である。保持の大きな試料の溶出を選択的に早めることが可能である本手法は、移動相組成のグラジエントによる分離効率の向上と類似の効果を、電気泳動を利用することで得られることを示している。

3.2 スプリットを用いるグラジエント pCEC の圧力差流速特性評価とペプチド分離への適用

LC では、分離性能向上のため移動相組成のグラジエント手法がしばしば用いられる。移動相組成のグラジエント手法として、有機溶媒濃度、塩濃度、pH を変化させる手法やそれらの組み合わせなど、種々の手法が報告されている。CEC においても分離の高性能化のためにグラジエント溶離手法は用いられている。電気浸透流送液型 CEC では、入口側リザーバー内に新たな移動相を添加することで組成を変化させる簡便な方法から、複数のリザーバーから移動相を電気浸透流で送液し、それぞれのリザーバーに印加する電圧を変化させることでグラジエントを行う手法などが報告されている²⁰⁾。他方、pCEC は、Fig. 1 に示すように、原則としてキャピラリー LC と類似の構造であり、HPLC と同等のグラジエント溶離を行うことが可能である。近年、キャピラリー HPLC の発展に伴い、マイクロ/ナノ流量ポンプや微小流量用ミキサーなどが開発されているが、本件で用いている装置は Fig. 1 に示すように、スプリットフローを用いている。スプリットを用いる HPLC システムでは、Nogya らのレビューにあるように、グラジエント挙動について通常の HPLC では考慮しなくてもよい問題が発生する¹⁷⁾。まず、スプリットフローを用いた

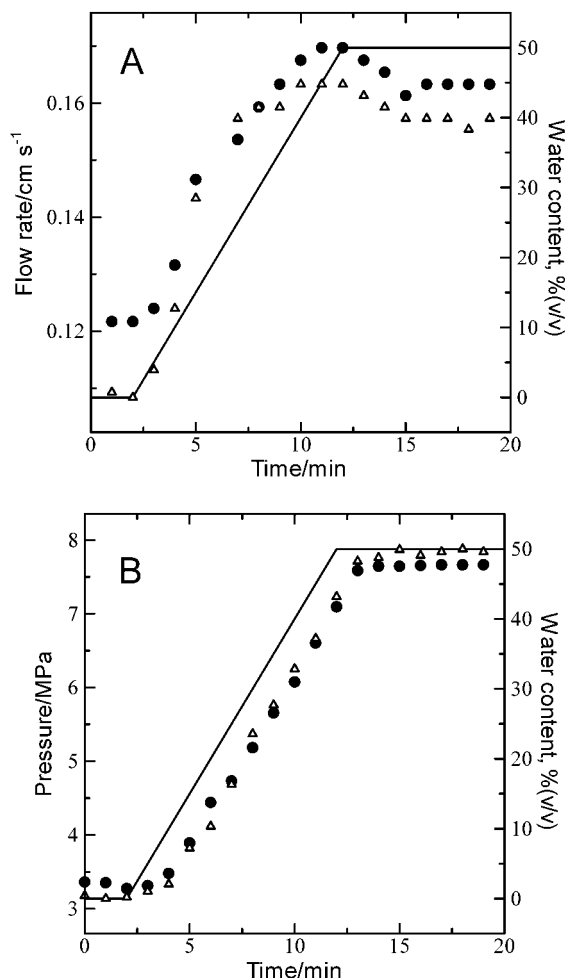


Fig. 4 Variations of (A) flow rate and (B) the pressure at the column inlet under the gradient elution

Applied voltage : 0 kV (△), +5 kV (●). Column : i.d. 0.15 mm, packed length 129 mm, whole length 211 mm, packed with TSK gel Amide-80 (dp. 5 μm). Mobile phase : (I) acetonitrile containing 0.01% TFA, (II) 50% acetonitrile containing 0.01% TFA. Gradient program : 100% (I) in 2 min, 0~100% (v/v) (II) in 10 min, 100% (II) in 8 min. Sample : thiourea (*t*₀ marker); Detection : UV 210 nm

pCECにおけるグラジエント溶離の移動相流速について基礎検討を行った。

3・1で紹介したアイソクラティック溶離条件でのCEC分離では定圧送液を用いているが、グラジエント溶離は定流量送液(今回の例では二つのポンプからの合算流量が一定)を用いた。親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)用充填剤を充填した内径0.15 mmのキャピラリーカラム、移動相に0.01% トリフルオロ酢酸(TFA)を含むアセトニトリル-水混合溶液を用い、グラジエント溶離時における流速及びカラム入口圧の測定を行った¹⁸⁾。Fig. 4Aに移動相組成のグラジエントを行った際の、キャピラリーカラム内の線流速変化を示した。ポンプ1とポンプ2の合算流量が一定であるにもかかわらず、流速が変化していること

が分かる。また、カラム入口圧もFig. 4Bに示すようにグラジエント溶離中に変化した。

キャピラリーカラムに流れる移動相流速は、スプリット比(カラム流路抵抗とスプリット管流路抵抗の比)、合算流量など種々の因子に基づいて定められるが、直接的にはカラム入口圧と移動相の粘性率に支配されている。Fig. 4のグラジエント条件では、アセトニトリル-水混合溶媒中の水含有量がしだいに大きくなるため、粘性率も増大する²¹⁾。そのため、Fig. 4Bに示すように、カラム入口圧の上昇が生じ、それに伴いカラム内の圧力差流速度も上昇する。スプリット抵抗管内の移動相粘性率の上昇とカラム内の移動相粘性率の変化が同期していないため、カラム内の圧力差流速度は、三段階で変動している¹⁸⁾。流速がこのように一定ではないため、リニアグラジエントプログラムを用いてもカラム内での移動相組成変化は直線的ではない。Fig. 4の場合、グラジエントに伴い圧力差流が早くなるため、全体的な傾向としては、通常のHPLCで凸型のグラジエントプログラムを行った条件に類似した移動相組成のグラジエントとなる。

カラム入口圧は、電圧印加を行っていない条件(△)と+5 kVを印加している条件(●)でほぼ同じ値であるが、カラム内圧力差流速度には明らかな違いが観測される。これは、アミド基のプロトン化に伴い正極へと向かう電気浸透流の発生、及びJoule熱による移動相の粘性率変化によるものである。流速変動は印加する電圧に依存するため、スプリッターを用いたpCECでは、通常のHPLCと比較してグラジエント条件の精密なコントロールが困難であることが分かる。ただし、圧力や粘性率変動の影響を受けにくいスプリッターや、ナノLC用のポンプシステムを用いることで、この問題を解決することは可能である。

グラジエントpCECの一例として、ペプチド分離を行った¹⁸⁾。分離カラムには親水性相互作用クロマトグラフィー用充填剤(Amido-80, 東ソー, 東京)を用い、移動相中の水の割合を増加させるグラジエント溶離を行った。なお、移動相中には0.01%のTFAを添加しているため、ペプチド試料は移動相中で正電荷を有している。牛血清アルブミン(BSA)のトリプシン分解物をペプチド試料として分離を行ったところ、Fig. 5Aに示すように、電圧印加を行っていないLC分離では、約30のピークが観測された。これに対して、+10 kVの電圧を印加すると約45のピークを得ることができた(Fig. 5B)。観測されるピーク数は、30ピーク(0 kV)、35ピーク(+5 kV)、40ピーク(+8 kV)、45ピーク(+10 kV)と、印加電圧に従って増加した。すなわち、LCでは不十分であった分離が、電気泳動効果を加えることで改善されていることが明らかである。親水性相互作用による分離と電気泳動分離の分離モードが比較的異なっている(直交している)ため、二つの分離メカニズ

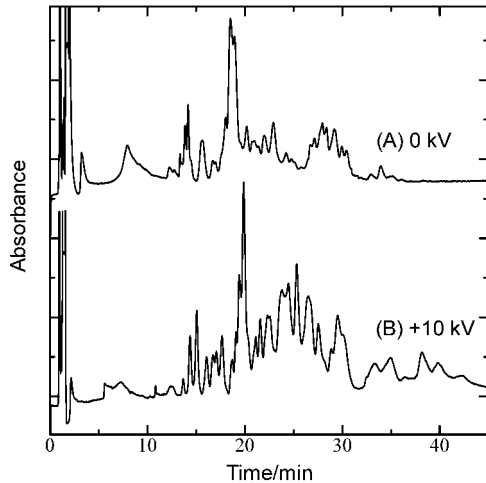


Fig. 5 Electrophoretic enhancement in separation of tryptic digests of bovine serum albumin

Column: i.d. 0.15 mm, packed length 140 mm, whole length 222 mm, packed with Amide-80. Mobile phase: (I) acetonitrile containing 0.01% TFA, (II) water containing 0.01% TFA. Gradient program: 100% (I) in 2 min, 0~30% (v/v) (II) in 30 min, 30% (ii) in 13 min. Detection: UV 210 nm

ムを同時に用いることが複雑な試料成分の分離に有効であったと考えられる。

疎水性相互作用分離と電気泳動分離の組み合わせでも、同様な分離の改善を得ることができた。4フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン (ABD-F)²²⁾で蛍光ラベル化を行った α -キモトリプシン分解物の逆相グラジエント分離(固定相: ODS, 移動相: 0.01% TFAを含むアセトニトリル/水)でも、電圧印加は観測されるピーク数の増加に有効であった。

複雑な成分を含む試料の分離にはグラジエント溶離が不可欠であるが、グラジエント溶離と電気泳動分離を組み合わせることで、分離能力の向上を図ることが可能であることが示された。

3.3 デュアルグラジエントキャピラリー電気クロマトグラフィー

LCでは、“グラジエント”は移動相組成のグラジエント手法を意味することが多いが、別の種類のグラジエントも存在する。近年、モノリスカラムの開発が盛んに行われており、その流路抵抗が小さく高流量送液が可能という特長を生かした、流量グラジエント手法が報告されている²³⁾²⁴⁾。この手法では、分離を行っている最中に、移動相流量を積極的に大きくすることで、保持の大きな試料の溶出を加速する。一方、CECでは、印加電圧のコントロールによる試料線流速(電気浸透流速及び電気泳動速度)のグラジエント手法が報告されている²⁵⁾²⁶⁾。圧力差流速のコ

ントロールでは、移動相中の試料の移動速度変化は試料成分によらず一定である。他方、電圧印加による電気泳動速度の変化の場合、その変化量は個々の試料成分の電気泳動移動度に依存する。したがって、印加電圧のグラジエントでは、原理的には移動相中における試料の泳動速度を、より高度にコントロールすることが可能である。

CECにおける試料の溶出時間 t_R は、既に述べているように、式(1)で与えられる。一般的なCECにおいて、印加電圧は分析中一定であり、アイソクラティック条件下では μ_{osm} と μ_{eph} は一定であるため、見掛けの電気泳動速度 $\{v_{ac} = (\mu_{osm} + \mu_{eph})E\}$ も変化しない。これに対して、印加電圧のグラジエントを行うと、電位勾配 E は時間の関数 $E(t)$ となり、溶出時間が t_R である試料成分の平均電位勾配 \bar{E} は式(2)で与えられる。

$$\bar{E} = \frac{\int_0^{t_R} E(t) dt}{t_R} \quad (2)$$

すなわち、印加電圧のグラジエントを行った場合、平均電位勾配 \bar{E} は試料成分の溶出時間に依存する。また、カラム内での試料の移動速度 v は、時間の関数 $v(t)$ として表される。

$$v(t) = \frac{v_{pres} + (\mu_{osm} + \mu_{eph})E(t)}{k+1} \quad (3)$$

一方、移動相組成のグラジエントを適用すると分離挙動は急激に複雑になる。移動相組成のグラジエントを用いると、移動相組成 M は時間 t とカラム軸方向の位置 x の両者の関数 $M(t,x)$ となる。 $M(t,x)$ は理想的には次式で与えられる。

$$M(t,x) = M\left(t - \frac{x}{v_{pres}}, 0\right) \equiv M_{x_0}\left(t - \frac{x}{v_{pres}}\right) \quad (4)$$

M_{x_0} はカラムの入口における移動相組成であり、時間 t のみに依存する。CECにおいて、試料成分の保持比 k と見掛けの電気泳動移動度 μ_{ac} は共に移動相の組成(性質)に依存するので、それらは移動相組成 M の関数となる。したがって、 k と μ_{ac} も、時間 t とカラム軸方向の位置 x の関数となる。また、混合する二つの溶液の電気伝導度が等しくない場合、移動相の電気伝導度はその混合比率に依存し、それに伴い電位勾配 E も x と t の両者の関数 $E(t,x)$ となる。更に、著者らのpCECシステムのように、スプリットシステムを用いて移動相組成のグラジエントを行うと、圧力差流速は時間の関数となる。したがって、試料成分のカラム軸方向の移動速度 v は次式で与えられる。

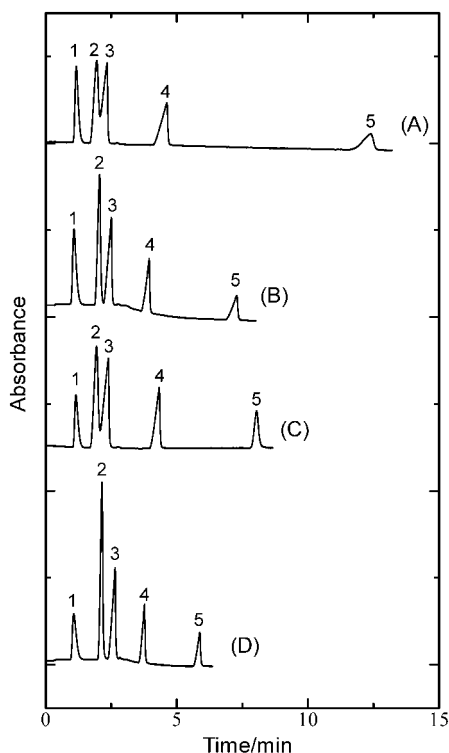


Fig. 6 Separation of anilines with various gradients

Column : i.d. 0.15 mm, packed length 130 mm, total length 210 mm, packed with ODS (dp. 5 μ m). Mobile phase : (I) acetonitrile/10 mM phosphate buffer (pH 3.3) (45/55), (II) acetonitrile/10 mM phosphate buffer (pH 2.4) (45/55). Linear gradient for (C, D): 0 to 7 min, 0% (I) to 100% (II). Voltage gradient for (B, D): from +10 to -10 kV in 3 min then maintained constantly at -10 kV. Detection : UV 210 nm. Samples : (1) uracil, (2) aniline, (3) *p*-ethylaniline, (4) *p*-*n*-butylaniline, (5) *p*-*n*-hexylaniline. (A) Without gradient using eluent (I), (B) with voltage gradient using eluent (I), (C) with eluent composition gradient without applied voltage, (D) with dual gradient

$$v(t, x) = \frac{v_{\text{pres}}(t) + \mu_{\text{ac}}(t, x)E(t, x)}{k(t, x) + 1} \quad (5)$$

移動相組成のグラジエントによる試料の保持及び電気泳動移動度のコントロールと、印加電圧のグラジエントを適切に組み合わせることで、カラム内の試料成分の移動速度を選択的にコントロールし、分離性能の向上が得られると考えられる。なお、前節で述べた一定電圧を印加しているグラジエント溶離 CEC においても、移動相の電気伝導度の不均一性から電位勾配は時間と場所の関数となるため、試料成分の移動速度は式(5)で与えられる。

本節では、移動相組成と印加電圧の両者をコントロールするデュアルグラジエントキャピラリー電気クロマトグラフィーの基本性能、特に分離能の向上と分析時間の短縮についての検討を述べる¹⁶⁾。

様々なグラジエント条件化でのアニリン類(アニリン、エチルアニリン、*p*-*n*-ブチルアニリン、*p*-*n*-ヘキシルアニリン)の分離を Fig. 6 に示した。Fig. 6A は、グラジエントを行っていないイソクラティック溶離条件でのアニリン類の LC 分離である。アニリン(2)とエチルアニリン(3)の分離が不十分であり、更に *p*-*n*-ヘキシルアニリン(5)の溶出に比較的長時間が必要であることが分かる。まず、Fig. 6A に印加電圧のグラジエントを適用することで分離の改善を行った。Fig. 6 の分析条件ではアニリン類はすべてプラスの電荷を有しており、また、アニリンよりもエチルアニリンの電気泳動移動度のほうが大きい。したがって、カラム出口への正の高電圧印加がアニリン・エチルアニリンの分離改善に有効である。一方、*p*-*n*-ヘキシルアニリンの溶出時間の短縮には負の高電圧印加が有効である。したがって、印加電圧のグラジエントとしては、正の高電圧印加から負の高電圧印加へ変化する印加電圧のグラジエントが有効であると予測される。Fig. 6B に示すように、+10 kV から -10 kV へ変化する電圧を印加したところアニリンとエチルアニリンの分離は改善され、*p*-*n*-ヘキシルアニリンの溶出時間も短縮された。

Fig. 6B の印加電圧と組み合わせる移動相組成のグラジエントとして、pH グラジエントを採用した。移動相をより酸性側へシフト(pH 3.3 から pH 2.4 へ)させることで、アニリン類のプロトン化が促進され、電気泳動移動度が増加し、更に ODS 固定相への保持が低下する。実際に移動相 pH のグラジエントを行いアニリン類の分離を行ったところ、Fig. 6C に示すように、*p*-*n*-ヘキシルアニリンの保持の減少が確認された。印加電圧及び移動相 pH のグラジエントを組み合わせると、デュアルグラジエント条件での分離を行ったところ、Fig. 6D に示すように、アニリン及びエチルアニリンでベースライン分離が得られ、*p*-*n*-ヘキシルアニリンの溶出時間を最も短縮(Fig. 6A の半分以下)することができた。デュアルグラジエント CEC には、電気泳動移動度のコントロールのため、移動相の pH を変化させるグラジエント溶離が有効であると思われる。デュアルグラジエント条件化における溶出時間の相対標準偏差は、4.8% (アニリン)、8.6% (エチルアニリン)、6.8% (*p*-*n*-ブチルアニリン)、3.7% (*p*-*n*-ヘキシルアニリン)であった($n = 3$)。分析精度の向上には更なる検討が必要であるが、アニリン・エチルアニリンで見られる分離の向上や、*p*-*n*-ヘキシルアニリンに顕著な分析時間の短縮は、デュアルグラジエントを行うことで簡便に再現よく得ることができた。

別の試料成分へのデュアルグラジエントの適用例として、オルトフタルアルデヒド(OPA)標識アミノ酸の分離を行った¹⁶⁾。OPA 標識アミノ酸は、カルボキシル基の解離により、負電荷を持つことが可能である²⁷⁾。したがって、

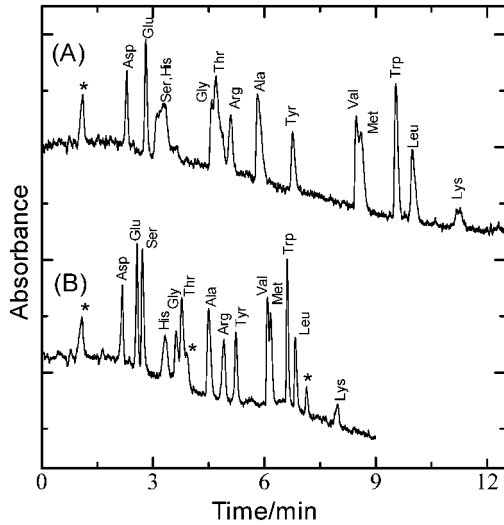


Fig. 7 Separation of fourteen OPA-labeled amino acids by (A) single gradient CEC in eluent composition alone and (B) DG-CEC in both the applied voltage and the eluent composition

Peaks marked with an asterisk (*) are unknowns. Mobile phase: (I) acetonitrile/10 mM phosphate buffer (pH 4.8) (10/90), (II) acetonitrile/10 mM phosphate buffer (pH 7.8) (30/70). Linear gradient for (A, B): 0% (II) to 100% (II) in 8 min. Voltage gradient for (B): from +2 to +4 kV in the initial 3.5 min, to 6 kV from 3.5 to 5.0 min, to +10 kV from 5.0 to 6.7 min, and then maintained at +10 kV. Detection: UV 280 nm. The other conditions are the same as those in Fig. 6.

pH グラジエントとしては、酸性から塩基性へのグラジエントを行いカルボキシル基の解離を促進した。なお、カルボキシル基の解離だけでは ODS 固定相への保持を十分に小さくすることが困難であったため、pH グラジエントとともにアセトニトリル濃度を増加させるグラジエント溶離も同時に用いた。印加電圧のグラジエント手法として、今回は、カラム出口への試料成分の電気泳動を引き起こす、正の高電圧を多段階で増加させるグラジエント手法を用いた。

Fig. 7に、(A) 移動相組成のグラジエント及び (B) 移動相組成・印加電圧のデュアルグラジエントを用いた 14 種類の OPA 標識アミノ酸の分離を示した。Fig. 7A ではほとんどのアミノ酸成分が分離されているが、Ser/His、Gly/Thr、Val/Met の分離が不十分である。これに対して電圧印加も行ったデュアルグラジエントモードでの分離 (Fig. 7B) では Ser/His はベースライン分離が達成され、Gly/Thr、Val/Met も分離が改善されている。更に全体的な分離時間も短縮することができた。

Fig. 8 にシングル (移動相組成) グラジエント時とデュアルグラジエント時の場合の各アミノ酸の溶出時間の関係を示した。なお、双方の分離においてピーク半値幅を測定

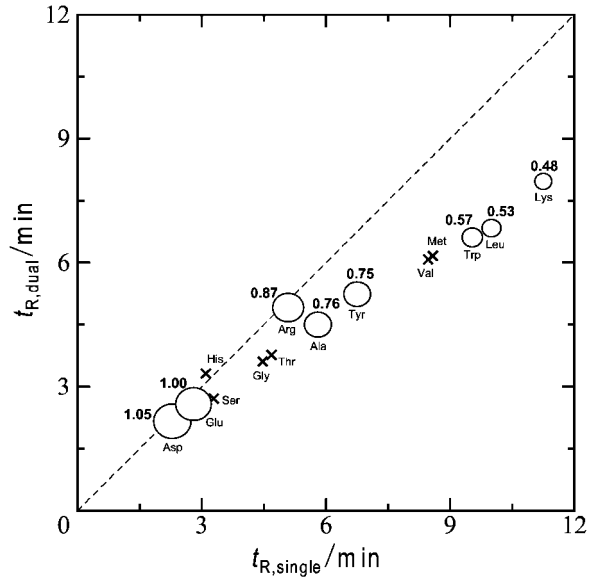


Fig. 8 Relationship between the elution time of amino acids with single and dual gradient

The size of the circle represents the relative half width ($w_{1/2,dual}/w_{1/2,single}$), the values of which are given alongside the circle. The cross mark was used when either one or both half widths were not measured. The chromatographic conditions are the same as those in Fig. 7.

することができた場合は、相対半値幅 ($w_{1/2,dual}/w_{1/2,single}$) を円マークの大ききで示し、その横にその値を記載した。Fig. 8に示すように、溶出時間の短縮割合 ($y = x$ の破線からのずれ) は、溶出時間が大きくなるにつれて増加している。これは、後半に溶出される試料ほど印加電圧が大きくなり、更にカルボキシル基の解離により電位泳動移動度も増大するため、相乗的に溶出が加速されたためである。更に、溶出時間が遅いアミノ酸ほど相対半値幅が小さくなっている。初期に溶出する Asp、Glu では電圧印加は、相対半値幅に影響を与えていないが、最後に溶出される Trp、Leu、Lys ではピーク幅は約半分 (相対半値幅: 0.57 ~ 0.48) になっている。一方、Trp、Lue、Lys の溶出時間の比 ($t_{R,dual}/t_{R,single}$) は 0.7 程度であり、溶出時間の減少率よりもピーク幅の減少率が明らかに大きい。すなわち、デュアルグラジエント分離ではピークキャパシティーが増大している。ピーク幅の先鋭化については、次節で更なる検討を行うが、移動相組成のグラジエントにより与えられる不均一場が重要な役割を有している。

以上のように、移動相組成及び印加電圧のデュアルグラジエントを行うことで、不十分な分離の改善、分析時間の短縮、ピーク先鋭化を得ることが可能であった。

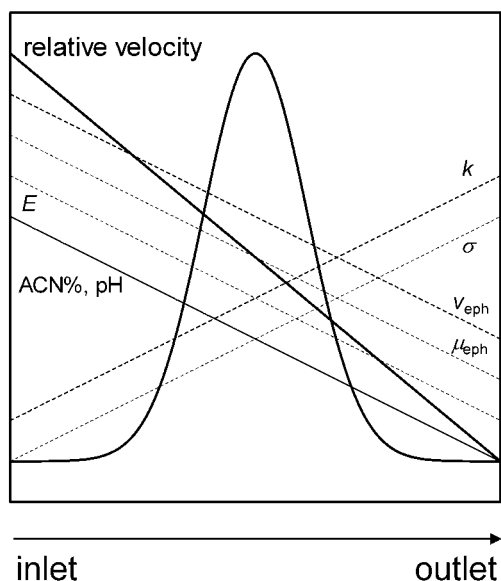


Fig. 9 Relationships between longitudinal position and various parameters related with electrochromatographic behavior (k : retention factor, σ : conductivity, E : potential gradient, μ_{eph} : electrophoretic mobility, v_{eph} : electrophoretic velocity) under the heterogeneous separation field produced by a gradient elution (acetonitrile content and pH)

3.4 不均一場における電気泳動を利用したピークの先鋭化

前節で述べたように、デュアルグラジエントモードで分離を行うと、試料ピークの先鋭化が得られた。一方、Fig. 3の Ho^{3+} と Gd^{3+} について電圧未印加時と印加時の溶出時間の比と相対半値幅を調べてみると、それぞれ0.71/0.70と0.61/0.59(溶出時間比/相対半値幅)であり、分離性能の向上(理論段数の増大)は見られなかった。すなわち、アイソクラティック溶離・定電圧印加条件では、特異的なピークの先鋭化が得られていない。

一般的にクロマトグラフィー分離においては、試料成分のピーク幅は保持の増大に伴い増加し、溶出の遅いピークほどピーク幅が大きい。移動相組成のグラジエントは、試料成分の保持を低下させ溶出時間の短縮を行うとともに、ピーク幅の増大も抑制している。グラジエント溶離を行った場合、カラム入口に近い移動相ほど溶出力が強くなり、カラム内では出口に向かうほど保持が大きくなる。したがって、電圧印加により試料成分を強制的にカラム出口方向へ電気泳動させ溶出時間を早めた場合、保持の増加のみを考慮すると、ピーク幅は相対的に増大すると考えられる。しかしながら、Fig. 8に示したように、カラム出口方向への電気泳動速度が大きくなるに従い、逆にピーク幅は相対的に小さくなっている。

電圧印加によるピークの先鋭化は以下のメカニズムに基づいていると予測される。Fig. 7の分析条件では、移動相

組成のグラジエントが行われているため、カラム内が不均一な分離場となっている。具体的には、Fig. 9に示すように、カラム出口側のアセトニトリル濃度が低く、pHも酸性側へシフトしている。したがって、カラム出口側に近づくにつれ保持が大きくなり、電気泳動移動度が小さくなる。更にアセトニトリル濃度が異なるため、緩衝液濃度の大きなカラム出口側の電気伝導度が高く、電気勾配が相対的に小さくなる。この結果、カラム入口側よりも出口側での電気泳動速度が小さくなる。すなわち、カラム出口側へ向かうほど固定相に対する試料の保持が増大し、更に電気泳動速度が低下するため、試料のカラム内を移動する速度は相乗的に小さくなる。そのため、試料成分の移動に対してプレーキ効果が働き、スタッキング的に試料ゾーンは先鋭化する。CEにおけるスタッキング等のオンライン濃縮法²⁸⁾は不連続な場を利用して試料濃縮を行うが、連続的な不均一場(傾斜場)を用いて試料ゾーンの先鋭化を行う本手法は、どちらかというところ焦点化²⁹⁾に近い手法とも言えるかもしれない。

移動相組成グラジエントによる不均一場を利用した試料ゾーンの先鋭化の試みとして、ペプチド(アンジオテンシンI~III, バシトラシン, インシュリンB鎖)を試料としたpCEC分離を行った³⁰⁾。Fig. 9に示した不均一性の勾配をより明確に発生させるため、移動相(I)から移動相(II)へ2分間で変化させるリニアグラジエントを用いた。移動相(I)にアセトニトリル/10 mM 胃酸緩衝液[pH 5.0] (5/95)、移動相(II)にアセトニトリル/10 mM 胃酸水溶液[pH 3.0] (70/30)を用いた際のペプチド分離をFig. 10に示した。移動相(II)のpHがより酸性であるため、ペプチドのプロトン化が促進され、入口側に存在するペプチド試料の電気泳動移動度が大きくなる。また、アセトニトリル濃度も移動相(II)のほうが高く電気伝導度が低いいため、入口側の電位勾配は大きくなる。Fig. 10におけるベースライン変動はグラジエントによる移動相組成の変化に対応している。すなわち、試料成分であるペプチドがベースラインの変動している時間帯に溶出しているということは、不均一場の成立している時間帯にペプチドが溶出されていることを意味している。

電圧印加を行っていないFig. 10Aとカラム出口側に-15 kVを印加したFig. 10Bを比較すると、明らかにFig. 10Bで鋭いピークが得られている。すなわち、不均一場と電気泳動を組み合わせることで試料ゾーンの先鋭化が可能であることが示された。Table 1に移動相条件による先鋭化効果の違いについて記載した。なお、Table 1に記載されているデータは、すべての条件で半値幅を測定することが可能であったアンジオテンシンIについてのデータである。また、電圧印加を行っていない際のアンジオテンシンIの溶出時間が3.33~3.38分とほぼ一定であったことか

ら、アセトニトリル濃度が固定相への保持の主たる支配因子であると考えられる。4種類の移動相条件すべてにおいてピーク先鋭化を確認することができたが、その度合い(相対半値幅)は条件によって大きく異なっている。全体的な傾向として、アンジオテンシンIの電気泳動が大きい分析条件、すなわち溶出時間の減少が大きな移動相条件ほどピーク幅の減少効果が大きい。また、移動相の電気伝導度の変化が大きな条件ほどピーク幅の減少効果が大きいことも示された。電気伝導度だけでなくpH条件のコント

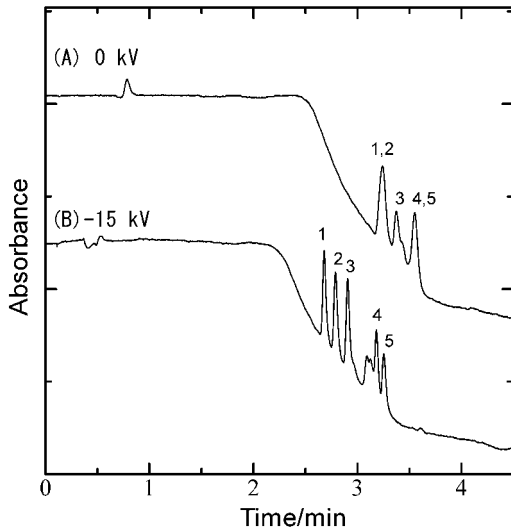


Fig. 10 Electric field-induced peak zone sharpening of peptides under the gradient elution

Applied voltage : (A) 0 kV, (B) -15 kV. Column : i.d. 0.15 mm, packed length 130 mm, total length 210 mm, packed with ODS. Mobile phase : (I) acetonitrile/10 mM formic buffer (pH 5.0) 5/95, (II) acetonitrile/10 mM formate acid (pH 3.0) 70/30. Gradient program : 0% to 100% (II) in 2 min then held 100% (II) in 1 min. Detection : UV 210 nm. Samples—1 : angiotensin III, 2 : angiotensin II, 3 : angiotensin I, 4 : bacitracin, 5 : insulin b chain, oxidized

ロールも行った移動相条件4 (Fig. 10の条件)では、電気伝導度の変化が同一である移動相条件3よりも、溶出時間の減少率が小さいにもかかわらず、より大きなピーク幅の減少を得ることができた。移動相のpHにより試料成分自体の電気泳動移動度が変わるため、移動速度に対するブレーキ効果が最も大きくなるためであると考えられる。

4 ま と め

pCECの印加電圧を任意にコントロールすることが可能である特徴を利用し、クロマトグラフィー分離に対して意図的に電気泳動現象を組み合わせることで、分離選択性のコントロールや、分離を損なわない分析時間の短縮などを簡便に達成することができた。また、CECが複数の分離機構を同時に利用していることを生かして、LCでは分離が不十分であったペプチドを、電気泳動分離することが可能であることも示した。更に、移動相組成のグラジエントを行った際に発生する、カラム軸方向の分離場の不均一性と試料成分の電気泳動を利用することで、試料成分のピーク幅を低減することが可能であることを示した。今回紹介した研究成果以外にも、著者らは親水性相互作用電気クロマトグラフィーにおいて、電圧印加によりペプチド分離のピーク幅を著しく減少させる方法についても研究を行っている³¹⁾。ピーク先鋭化は分離性能(ピークキャパシティー)や感度の向上に極めて有効である。圧力差流を併用する電気クロマトグラフィーは、動的な不均一場(傾斜場)を簡便に構築し、試料成分に適切な電気泳動速度を与えるための適切な手法である。複数の分離機構、更に不均一場を利用し試料成分のピーク幅先鋭化を行うことで、複雑な試料成分の網羅的分析に適した分離手法を構築していきたい。

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(南)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。

Table 1 Voltage-induced zone sharpening for angiotensin I under the linear gradient with various mobile phases

#	Mobile phases	$\frac{d\sigma}{dt}$ [mScm ⁻¹ min ⁻¹] ^{a)}	$\frac{t_{R,-15kV}}{t_{R,0kV}}$	$\frac{w_{1/2,-15kV}}{w_{1/2,0kV}}$
1	(I) acetonitrile/10 mM acetate buffer [pH 4.0] 5/95 (II) acetonitrile/10 mM acetate buffer [pH 4.0] 70/30	-0.06	0.95	0.77
2	(I) acetonitrile/10 mM formate buffer [pH 4.0] 5/95 (II) acetonitrile/10 mM formate buffer [pH 4.0] 70/30	-0.25	0.87	0.64
3	(I) acetonitrile/20 mM formate buffer [pH 4.0] 5/95 (II) acetonitrile/20 mM formate buffer [pH 4.0] 70/30	-0.49	0.82	0.57
4	(I) acetonitrile/10 mM formate buffer [pH 5.0] 5/95 (II) acetonitrile/10 mM formate acid [pH 3.0] 70/30	-0.49	0.86	0.54

The separation conditions, except mobile phases, are the same as those in Fig. 10. a) Variation in conductivity of mobile phase with linear gradient from 0% (II) to 100% (II) in 2 min

文 献

- 1) B. C. S. Liu, J. R. Ehrlich (Eds.): "Tissue Proteomics: Pathways, Biomarkers, and Drug Discovery", (2008), (Humana Press, Totowa).
 - 2) W. Weckwerth (Ed.): "Metabolomics", (2007), (Humana Press, Totowa).
 - 3) F. David, G. Vanhoenacker, B. Tienpont, I. Francois, P. Sandra: *LC-GC Europe*, **20**, 154 (2007).
 - 4) T. Tsuda: *Anal. Chem.*, **59**, 521 (1987).
 - 5) J. H. Knox, I. H. Grant: *Chromatographia*, **32**, 317 (1991).
 - 6) T. Tsuda (Ed.): "Electric Field Application in Chromatography, Industrial and Chemical Processes", (1995), (VCH, Weinheim).
 - 7) F. Steiner, B. Scherer: *J. Chromatogr. A*, **887**, 55 (2000).
 - 8) I. S. Krull, A. Sebag, R. Stevenson: *J. Chromatogr. A*, **887**, 137 (2000).
 - 9) S. Eeltink, G. P. Rozing, W. T. Kok: *Electrophoresis*, **24**, 3935 (2003).
 - 10) F. Svec (ed.): *J. Chromatogr. A* (Special issue for electrochromatography), **1044**, (2004).
 - 11) J. M. Cintron, L. A. Colon: *J. Chromatogr. A*, **1106**, 256 (2006).
 - 12) 津田孝雄, 北川慎也, R. Dadoo, R. N. Zare: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 409 (1997).
 - 13) S. Kitagawa, K. Mitsuya, C. Chaiyasut, T. Tsuda: *J. Sep. Sci.*, **26**, 1169 (2003).
 - 14) T. Sakaki, S. Kitagawa, T. Tsuda: *Electrophoresis*, **21**, 3088 (2000).
 - 15) 北川慎也, 中川浩行: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **56**, 617 (2007).
 - 16) T. Sakai, H. Nakagawa, S. Kitagawa, H. Ohtani: *Anal. Sci.*, **24**, 735 (2008).
 - 17) M. Nogya, F. Sucharski, P. Suder, J. Silberring: *J. Sep. Sci.*, **30**, 2179 (2007).
 - 18) R. Nakashima, S. Kitagawa, T. Yoshida, T. Tsuda: *J. Chromatogr. A*, **1044**, 305 (2004).
 - 19) S. Kitagawa, A. Tsuji, H. Watanabe, M. Nakashima, T. Tsuda: *J. Microcol. Sep.*, **9**, 347 (1997).
 - 20) C. A. Rimmer, S. M. Piraino, J. G. Dorsey: *J. Chromatogr. A*, **887**, 115 (2000).
 - 21) H. Coin, J. Caarlos, D. Misa, G. Guiochon, T. Czajkowska, I. Miedziak: *J. Chromatogr.*, **167**, 41 (1978).
 - 22) T. Toyo'oka, K. Imai: *Anal. Chem.*, **56**, 2461 (1984).
 - 23) Y. Ueki, T. Umemura, J. Li, T. Odake, K. Tsunoda: *Anal. Chem.*, **76**, 7007 (2004).
 - 24) P. N. Nesterenko, M. A. Rybalko: *J. Anal. Chem.*, **60**, 349 (2005).
 - 25) B. Xin, M. L. Lee: *J. Microcol. Sep.*, **11**, 271 (1999).
 - 26) E. F. Hilder, C. W. Klampfl, P. R. Haddad: *J. Chromatogr. A*, **890**, 337 (2000).
 - 27) P. Lindroth, K. Mopper: *Anal. Chem.*, **51**, 1667 (1979).
 - 28) 福土恵一, 竹田さほり: *ぶんせき (Bunseki)*, **2006**, 56.
 - 29) 志村清仁: *ぶんせき (Bunseki)*, **2007**, 659.
 - 30) 坂井友晴, 中川浩行, 北川慎也, 大谷 肇: 第68回分析化学討論会要旨集, p. 68 (2007).
 - 31) 坂部晃一, 中川浩行, 北川慎也, 大谷 肇: 第69回分析化学討論会要旨集, p. 36 (2008).
-

Enhancement in Separation Efficiency by Control in Electric Field on Pressurized-Flow Driven Capillary Electrochromatography

Shinya KITAGAWA¹

¹ Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokisocho, Showa-ku, Nagoya-shi, Aichi 466-8555

(Received 19 July 2008, Accepted 5 September 2008)

Pressurized-flow driven capillary electrochromatography (pCEC) is a hybrid separation method of liquid chromatography and capillary electrophoresis, in which an application of either positive or negative voltage, *i.e.*, the electrophoretic migration of analytes toward either inlet or outlet, can be utilized to enhance the separation performance. By using intentional electrophoresis of analytes, an alteration of the separation selectivity and a reduction of the separation period through selective acceleration were achieved. The dual-gradient pCEC by varying the mobile phase composition, including a shift in the pH of the eluent and the applied voltage was effective to increase the separation performance. The combination of two different separation mechanisms of chromatography and electrophoresis in CEC was effective for comprehensive separation, and the separation efficiency was enhanced with an increase in the applied voltage. Furthermore, the electrophoresis of the analyte in a heterogeneous separation field under a gradient elution was effective to reduce the peak widths, *i.e.*, zone sharpening.

Keywords : capillary electrochromatography ; electrophoresis ; enhancement of separation performance ; gradient ; zone sharpening.