

機関番号：23701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度

課題番号：20550082

研究課題名 (和文) カスタム分離系プラットフォームとしての逐次キャリア置換動電クロマトグラフィ

研究課題名 (英文) Study of Sequentially Carrier-replacing Electrokinetic Chromatography as a Platform for Custom-made Separation Systems

研究代表者

江坂 幸宏 (ESAKA YUKIHIRO)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70244530

研究成果の概要 (和文)：

動電クロマトグラフィ (EKC) では、固定相に当たる高次構造相(キャリアー)が可動であることを活かし、浸透流を抑制した条件下で、一分離過程に、相比と相組成を変化させること、あるいは複数種のキャリアーを逐次作用させることを実現した。これにより各種グラジエント法が可能になり、EKC はマルチモード法のプラットフォームとなった。さらに、マルチモードの分離がシュミレーション予想できることを SDS と胆汁酸ミセルの複合系で実証した。

研究成果の概要 (英文)：

Surfactant gradient elutions and multi-mode separations in electrokinetic chromatography (EKC) were realized in the absence of electroosmotic flow. It was revealed that the multi-mode separations were predictable with simulation based on our theory though a study using a SDS micellar system and a sodium cholate system simultaneously.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：分離分析

1. 研究開始当初の背景

最近の分離分析分野におけるトピックスは、『ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクス研究の支援』というニーズを背景とした、高性能分離法と高機能検出器からなるハイフネーションシステムの著しい発展と言えます。具体的には、キャピラリー電気泳動法(CE)、マイクロチップそして、マイクロ液体クロマトグラフィー(MLC)などのマイクロ分離法にレーザー蛍光検出器や質量分析装置(MS)を結合したシステムの開発であります。ヒトゲノム解析では、CEにおける複数分離レーンの並列化により、予想を遥かに超える速度で計画が達成されました。また、生命活動で発動されるタンパク質や代謝された成分の包括的迅速解析は、MLCやCEなどによる高度な前段階分離と続く多次元MSの同定能力により着実に進行しています。

しかしながら、これらのハイフネーションシステムでは既存法の迅速化・システム化が主題であり、分離方法としての革新は見当たりません。これまで、新しい分離選択性の発現が、科学の進歩を側面から支え続けてきました。生命科学の進展とともに、より複雑なマトリックス中のより微量の成分を分析・同定する方法が必要とされており、既存の性能を超えた分離選択性を持つ分離法が求められていることは現在も変わりありません。それ自身が極めて高い分離選択性を有する多次元MSにおいてすら、現実には、前段階分離系が極めて重要であり、有用であります。さらには、MSは全ての試料・状況に対し、決して万全ではありません。分離手法の究極的な到達点の一つは、個々のサンプルに対応したカスタム分離系の実現であり、その設計と構築を可能にするプラットフォーム技術の開発は、大変重要なテーマであります。

本計画に先立ち、申請者は、ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)において、“ミセル”の組成・濃度を一分離過程に、連続・非連続で変化させるミセルグラジエント法を初めて実現しました[*Anal. Chem.* **78**, 8142–8149 (2006)]。本法は、電気浸透流をキャピラリー内部コーティング等で完全に抑制した条件下で、一分離測定中に上流側リザーバー中の泳動液のミセル濃度・組成を変化させると、その濃度・組成の荷電ミセルが分離中の試料分子と相互作用して追い越して行く現象を利用します。次々に違う濃度・組成のミセルと試料分子を相互作用させ、主として分離向上と時間短縮として分離結果に反映させることが可能です。

本法は一般的なグラジエント溶出とは一線を画す特長を有しています。溶媒相ではなく、HPLCで言えば固定相に当たる“高次構造を持つ側”の分配相(ミセル)が一分離過程

中に構造変化しています。階段状の変化だけでなく、上流リザーバー内の組成を連続変化させ、ミセル組成を連続的に変化させる「連続グラジエント」による良好な分離も達成されました。このような構造分配相を一分離過程に逐次変化させる手法は事実上前例がありません。これを可能にしているのは、ミセルが熱力学平衡によって成り立つ動的構造を有する分配相であることと、そして、キャリアと呼ばれる移動する構造分配相が用いられる動電クロマトグラフィー(EKC)の機構であります。また、前者は本法におけるミセルの重要性、後者はミセルに限らない広範な構造セクターを導入できることを意味します。高度な分子識別が、分配相側の高次構造中における溶質の配向性に深く関わることは明白であり、一分離過程に、構造分配相の構造が変化させられることや複数種の構造分配相を直列的に作用させられることは、高選択性を旨とする分離システムとして非常に大きなアドバンテージを持ちます。申請者は、本グラジエント法の原理である逐次キャリアー置換方式のEKCが、分析時間短縮のためだけでなく、目的試料に対し個々に構築できる高機能複合分離システムのプラットフォームとして極めて適していると考えました。

2. 研究の目的

本計画では、生体試料等の複雑なマトリックス中に存在する“微量の重要分子”の検出を可能にする、逐次キャリアー置換方式EKCに基づくオーダーメイド高機能分離系構築のためのプラットフォーム技術を確立し、これを実試料分析に活用することを目的とし、以下の項目の達成を目指しました。

(1) ミセル濃度・組成グラジエント方式EKCの基礎技術の確立

ミセルは、汎用性、多様な選択性、与える分離能の高さから、最も重要なEKCキャリアー群であります。ミセル組成・濃度逐次変化プログラムEKCは、本計画で活用すべき主要分離系となると考えられます。このプログラムの自由な設計を可能にするため、異なる濃度・組成の各ミセルゾーンの移動速度の制御法を確立します。特に、各ゾーンでの電位勾配の制御が重要であり、シュミレーションを併用し、制御のための理論・技術を確立します。

(2) 多種キャリアー逐次置換方式EKCへの展開・高機能複合モード分離系の構築

上記グラジエント法は、一種類の界面活性剤の濃度操作もしくは、特定の混合系の組成操作を想定した、選択性の量的な変化を導入するものですが、異なる性質・構造のキャリアー(各種ミセル、CD、錯化剤等)を逐次作用させることで、複数の分離モードを一分離過

程中に機能させるマルチ分離モードシステムへの発展を行います。

(3) 相互作用環境の逐次置換法の併用

EKCは担体のない均一溶液分離系をもつため、相互作用場において、キャリアだけでなく、環境要素であるpHや共存イオン、溶媒分子を逐次置換することも可能です。相互作用場を総合的に構築し置換するシステムの実現を目指します。

(4) 生体関連試料分析への応用と、本法の有用性の検証

本法の実試料への効果的な応用と実分析で必要な性能を本法に付与します。特に、前処理のステージを一連の過程に導入を試みます。また、本法によるMSへのキャリアー進入抑制法を確立し、汎用的EKC/MSを実現します。

3. 研究の方法

20年度から22年度の研究期間中、上記の研究目的のうち、(1)と(2)の項目まで計画が進行しました。従って、これら2項目について研究方法を述べます。

(1) ミセル濃度・組成グラジエント方式EKCの基礎技術の確立

界面活性剤としては脂肪属炭素鎖系の陽イオン性CTAC、陰イオン性SDSを用いました。

① イオン性界面活性剤濃度グラジエント法の検討

既報の方法は、陽イオン性界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムクロリド (CTAC) と非イオン性界面活性剤Tween 20の混合系でTween 20濃度を変化させるグラジエント法ですが、MEKC本来の分離対象である非荷電物質のグラジエント分離には、相比を変化させることを意味するイオン性界面活性剤の濃度変化を導入します。試料として荷電物質(有機アニオン類)及び非荷電物質(置換ベンゼン類)双方を対象に検討しました。

② キャリアー移動速度のコントロール方法の検討

キャピラリー上流側の泳動液の界面活性剤組成を逐次変化させる場合、キャピラリー内に導入される分離マトリックスゾーンごとに電気伝導度に差が現れます。特に、イオン性界面活性剤の濃度が大きく変わる場合は顕著であり、各ゾーンごとに電場勾配が大きく異なるようになり、ミセルの移動速度に大きな差が生まれます。そして、後続のミセルが試料を追い越せなくなるなど、ミセルグラジエント法を機能させる上で大きな障害になります。この問題は、何らかの電解質イオンを添加して各ゾーンの電気伝導度を調節することで原理上回避できます。ただし、分離マトリックスゾーンの電位勾配を分離時間中維持するには、添加電解質の移動速度とミセル移動速度のマッチングが必要であるため、適切な電解質の選択が必要になります。分離系では、

各ゾーン内のミセルが同様の速度で移動することが望ましいため、ミセルと同様の移動度を有し、かつ、CTACミセルとは相互作用の少ないカチオンとCTACと共通の対アニオンからなる塩を検索しました。その結果、4級アルキルアンモニウムクロライドが有望であることが判明しました。

さらに、複数の異種ミセルを導入する場合、等速電気泳動の理論を各種ミセルの移動速度制御に当てはめて考えることが極めて有効と考えられます。即ち、各種ミセルが等速で泳動する分離マトリックスを想定でき、ここで試料分子の複数モードによる分離を行います。

(2) 多種キャリアー逐次置換方式EKCへの展開・高機能複合モード分離系の構築

① 異種キャリアーの組み合わせ検討

異なる性質・構造のキャリアー(各種ミセル、CD、錯化剤等)を逐次作用させることで、複数の分離モードを一分離過程に機能させる複合分離システム(マルチ分離モードシステム)へ発展させました。キャリアー速度の制御は、前述の等速電気泳動法に基づく方法等、ミセルと同様の方法が適用できます。

例えば、疎水性相互作用のモードを担当するのはミセルグラジエント法であり、水素結合はポリエーテル化合物、混合ミセルなど、光学分割はシクロデキストリン化合物、胆汁酸ミセルなどを想定しています。今回は、SDSと陰イオン性LPFOS、SDSと陰イオン性胆汁酸であるデオキシコール酸、SDSと陰イオン性に修飾されたシクロデキストリンの組み合わせを検討しました。

② 分離挙動のシミュレーション

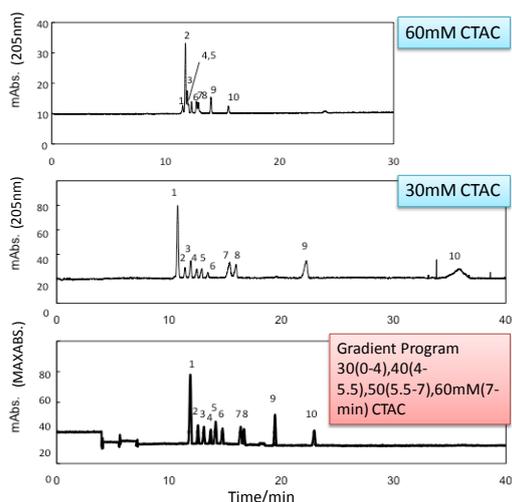
本法は、原理的には、分離結果が各キャリアーゾーンで行われる分離の“足し算”となると期待されます。ここでは、分離系設計と分離結果予想の両方の観点から、様々な条件下での分離のシミュレーションを行うための理論構築と①で検討したキャリアー組み合わせでの実践を行いました。

4. 研究成果

(1) ミセル濃度・組成グラジエント方式EKCの基礎技術の確立

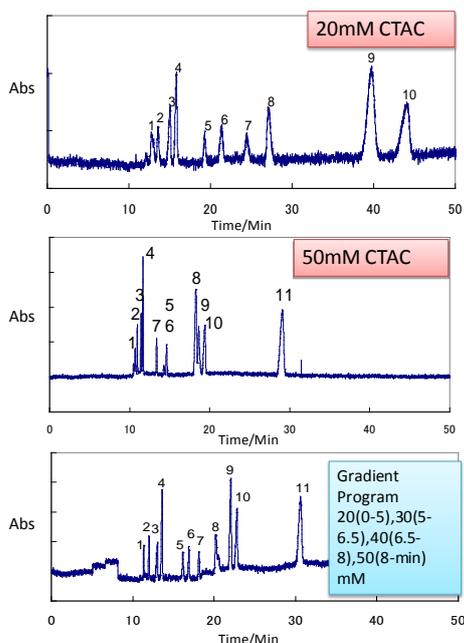
① イオン性界面活性剤濃度グラジエント法

上述にある電場調節の電解質として、テトラアルキル(メチル、エチル、プロピル及びトープチル)アンモニウムクロライドを比較したところ、CTACミセルと電気泳動移動度が近く、疎水性も低めのテトラエチルアンモニウムクロライドが、再現性と分離への影響の少なさで優れていました。これで電場調節を行い、分離向上と時間短縮を行った例を下に示します。有機アニオン、非荷電分子の分離ともに大きな効果が得られました。



有機アニオン類の濃度グラジエントMEKC分離

測定条件: キャピラリー全長60cm(有効長30cm、内径0.05mm); 印加電圧-12kV(電流17-18μA); 内壁コーティングによる浸透流抑制下、CTACに5mMリン酸緩衝液(pH7.2)を使用
Peak assignment: 1, salicylic acid; 2, p-toluic acid; 3, p-dimethylaminobenzoic acid; 4, benzenesulfonic acid; 5, p-acetoxybenzoic acid; 6, benzoic acid; 7, telephthalaldehyde acid; 8, o-phthalaldehyde acid; 9, p-hydroxybenzoic acid; 10, p-acetamidebenzoic acid



置換ベンゼン類の濃度グラジエントMEKC分離

測定条件: キャピラリー全長60cm(有効長30cm、内径0.05mm); 印加電圧-10kV(電流14-21μA); 内壁コーティングによる浸透流抑制下、CTACに50mM酢酸緩衝液(pH4.76)を使用
Peak assignment: 1, 4-chloro-2-nitrophenol; 2, 4-ethylphenol; 3, 4-nitrophenol; 4, 4-cresol; 5, 4-toluidine; 6, 4-acetotoluidine; 7, anisole; 8, aniline; 9, acetanilide; 10, hydroquinone; 11, 4-hydroacetanilide

① キャリアー移動速度のコントロール方法の検討

2種のミセル (対イオン: C は同種イオンとする) がゾーンを形成し等速電気泳動を行う条件は後に示す式になります。この式では、ターミナルイオン (T) となるミセルの濃度 (C_T) とリーディングイオン (L) となるミセル

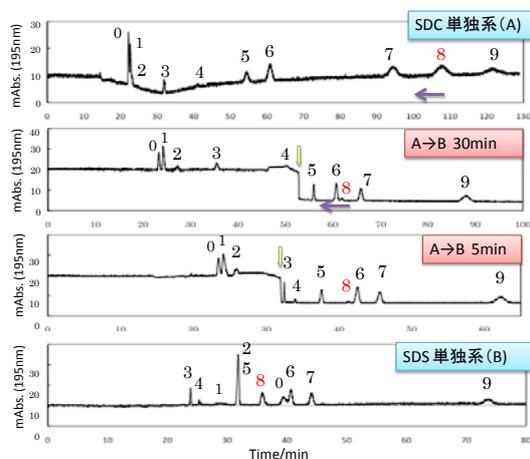
の濃度 (C_L) だけが変数であり、あとは各々の移動度 (定数) ですから、濃度比を定常状態に調整して移動度の高い順に導入すれば、測定当初から等速状態となることが期待できます。Lミセルの前に試料を注入し、複合モード分離を検討し、方法論を確立しました。成功の一例を (2) ①に示しました。

$$C_T = C_L \frac{\mu_{ep,T} (\mu_{ep,L} + \mu_{ep,C})}{\mu_{ep,L} (\mu_{ep,T} + \mu_{ep,C})}$$

(2) 多種キャリアー逐次置換方式 EKC への展開・高機能複合モード分離系の構築

② 異種キャリアーの組み合わせ検討

まず、SDS と胆汁酸 SDC のミセル同士の組み合わせを検討しました。SDC は SDS と構造が大きく異なるミセルを形成し、また水酸基による水素結合性、光学認識能を示します。上の理論式に従って SDS と SDC の濃度を調節し、ほぼ同じ速度で定常的に泳動させることに成功し、SDC の導入時間の調整で、2つのミセル系の選択性を任意の強度で合成して分離に反映させることができました (下図)。



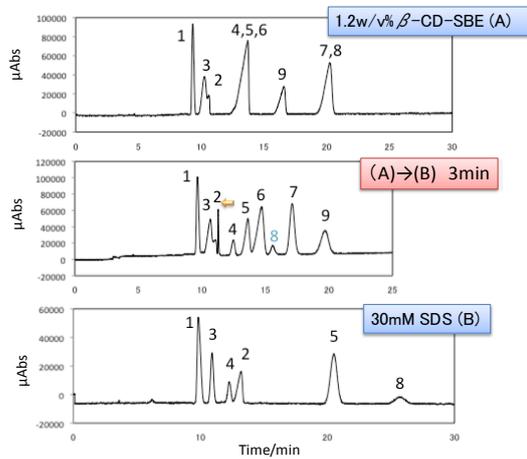
置換ベンゼン類の逐次置換MEKC分離

測定条件: キャピラリー全長 60cm (有効長30cm、内径0.05mm); 印加電流8μA(11.5-13.0kV); 内壁コーティングによる浸透流抑制下、界面活性剤[デオキシコール酸ナトリウム (SDC) 42.5 mM→SDS 50 mM]を溶解した5mMリン酸緩衝液(pH7.2)を使用
Peak assignment: 1, 4-chloro-2-nitrophenol; 2, 4-nitrophenol; 3, 4-ethylphenol; 4, 1,2-dimethoxybenzene; 5, 4-cresol; 6, 3-methoxyphenol; 7, acetanilide; 8, benzaldehyde; 9, phenol; 0, benzoic acid

SDS と LPFOS の組み合わせについての検討では、それらのミセルの水素結合活性の大きな差を反映して広い分離選択性の発現を可能にしました。共にミセルの頑強性があり、また強酸の塩であることから低 pH 条件による電気浸透流の抑制が可能であり、実用的な

組み合わせであることを示しました。

さらに、SDS ミセルと CD 荷電誘導体の組み合わせも検討し、大きな泳動順の変化を利用した、分離最適化が可能であることを示しました。(下図)

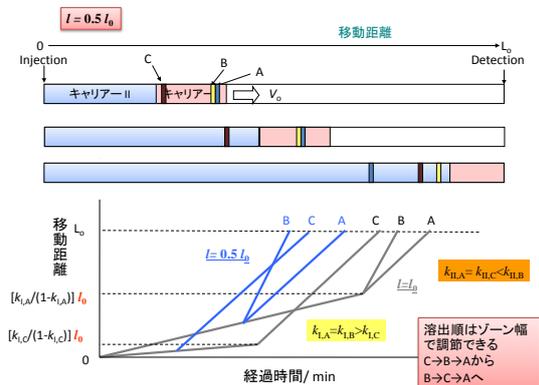


置換ベンゼン類の異種キャリアー置換EKC分離
(β-CD-SBE→SDS)

測定条件: キャピラリー全長 60cm (有効長30cm, 内径0.05mm); 印加電流8μA(電圧A 11.8; B 15.7-15.8; C 15.4-16); 内壁コーティングによる浸透流抑制下、各キャリアーを溶解した5mMリン酸緩衝液(pH7.2)を使用
Peak assignment: 1, benzoic acid; 2, 4-nitrophenol; 3, 4-ethylphenol; 4, 1,4-dimethoxybenzene; 5, 4-cresol; 6, 3-methoxyphenol; 7, acetanilide; 8, benzaldehyde; 9, phenol

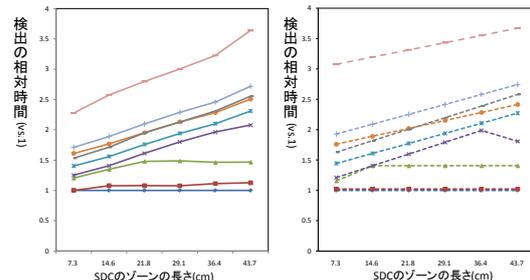
③ 分離挙動のシミュレーション

この方法は、理論上、それぞれの単独系を測定すれば、任意の切り替え時間での分離がシミュレーション可能であり、最適化が可能です。下の図に示すように、2つのキャリアーを使った場合、先のキャリアーの切り替え時間で泳動順が変化します。



この考えに基づき、SDS と SDC の組み合わせで置換有機アニオンを分離した場合について、シミュレーションした結果と実際の測定値を使った場合を次に示します。良好な一致が見られました。

実際の測定結果とシミュレーションとの比較



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) **江坂幸宏**, ミセル逐次置換方式-動電クロマトグラフィー、*CEアドバンス*, 11, 14-21 (Sep 2009) (査読無)
- 2) S. Inagaki, **Y. Esaka**, Y. Deyashiki, B. Uno, A. Hara, T. Toyooka, Human Liver Dihydrodiol Dehydrogenase 1-Catalyzed Reaction Generating 9α, 11β-Prostaglandin F₂ from Prostaglandin D₂ Followed by Micellar Electrokinetic Chromatography, *J. Sep. Sci.*, 31, 735-740 (Mar 2008). (査読有)
- 3) **江坂幸宏**, 宇野文二, グラジエントミセル動電クロマトグラフィー, *生物物理化学*, 52 (3), 161-165 (Nov 2008). (査読有)
- 4) **江坂幸宏**, 奥村典子, 宇野文二, 非水系キャピラリー電気泳動法による高反応性化学種の分離分析, *分析化学*, 57 (12), 961-968 (Dec 2008). (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) **江坂幸宏**, 自由溶液を分析場として駆使する分離分析システムの研究, 日本分析化学会 59 年会, 2010 年 9 月 (仙台).
- 2) 小林美紀, **江坂幸宏**, 宇野文二, 異種キャリアー置換動電クロマトグラフィーの研究, 第 29 回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2009 年 11 月 (東大阪)
- 3) 小林美紀, **江坂幸宏**, 宇野文二, 逐次キャリアー置換-動電クロマトグラフィーの研究, 日本薬学会 129 年会, 2009 年 3 月 (京都)
- 4) **Y. Esaka**, M. Kobayashi, B. Uno, Study of

Electrokinetic Chromatography with
“Changing Over Time” Carrier Systems,
The 8th Asia Pacific International
Symposium on Microscale Separations and
Analysis (APCE 2008), Kaohsiung, Taiwan,
Nov 2008.

- 5) **江坂幸宏**, 宇野文二, マルチモード逐次機能
型動電クロマトグラフィーの研究, 第 69 回分
析化学討論会, 2008 年 5 月(名古屋)

[図書] (計 1 件)

- 1) **江坂幸宏** (分担)、分析化学 II 機器分
析の医療薬学への応用、169-186 (電気
泳動法)、廣川書店、2010 年 2 月

[産業財産権]
現時点でなし。

[その他]
ホームページ等
<http://www.gifu-pu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江坂 幸宏
(岐阜薬科大学・薬学部・准教授)

研究者番号 : 70244530

研究分担者 連携研究者はなし。