

微小空間内の特異的な溶媒分配挙動に基づく キャピラリークロマトグラフィーの開発

藤永 慧, 塚越 一彦*

はじめに

近年、水と有機溶媒を混合した油水混合溶液が溶解、洗浄、保存、反応溶媒等の様々な用途に使用されている。分析化学の分離の分野においては、溶媒抽出や液体クロマトグラフィーに使用されており、後者で使用される時は主に移動相に用いられている。順相クロマトグラフィーで使用されるのは主にアセトニトリルやテトラヒドロフラン等の親水性の有機溶媒と酢酸エチルや塩化メチレンといった疎水性の有機溶媒の混合溶液である。逆相クロマトグラフィーの場合はメタノール、アセトン等の親水性有機溶媒と水の混合溶液が主に使用されている。これに対し、我々は水-親水性有機溶媒-疎水性有機溶媒の三成分を混合した溶液を用いている。図1は親水性有機溶媒としてアセトニトリル、疎

水性有機溶媒として酢酸エチルを用いて混合溶液を作成した場合の相図であり、混合溶液が均一な溶液になる組成と不均一な溶液となる組成を、溶解度曲線を境界として分けて表示している。混合溶液の組成は如何なる組成であっても相図上の一点で表され、溶解度曲線の内側の組成の混合溶液は溶解度曲線上の二点で表される組成の二層に分離する。我々はこの相図の境界線上にある均一な混合溶液を層流条件下、微小空間内に送液すると、溶媒分子が管径方向に分配する現象を見出した。この現象を溶媒分子の「管径方向分配現象 (Tube Radial Distribution Phenomenon: TRDP)」と呼んでいる^{1, 2}。図2は水-アセトニトリル-酢酸エチルを体積比3:8:4で混合した溶液に二種類の蛍光試薬、疎水性のペリレン、親水性のエオシンYを溶かし、内径100 μm のマイクロチャ

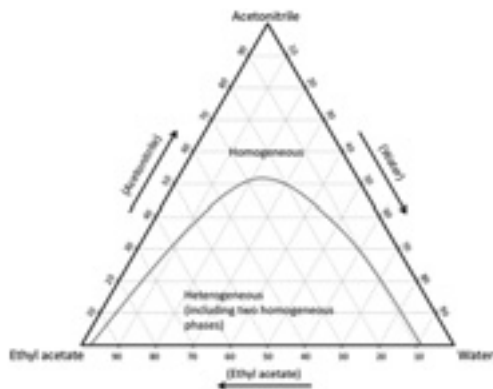


図1 水-アセトニトリル-酢酸エチル混合溶液の三成分相図

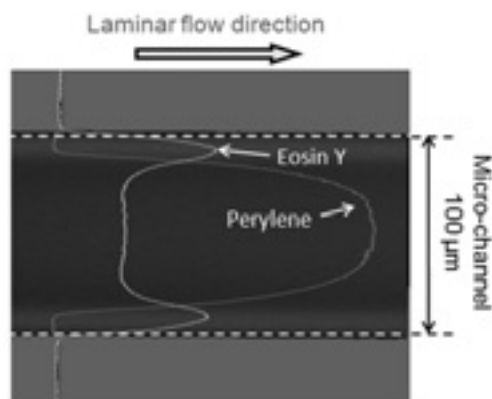


図2 マイクロチャンネル内の蛍光画像

*同志社大学理工学部化学システム創成工学科教授

第249回京都化学者クラブ例会 (平成23年3月5日) 講演

ンネルに送液したときに撮影した蛍光画像及びそれぞれの試薬の蛍光強度の分布である。

ペリレンは青，エオシン Y は緑に蛍光を発するので，この蛍光画像から溶媒分子が明らかに分配していることが分かる。このような微小空間内の特異的な溶媒分子挙動である TRDP に基づいたキャピラリークロマトグラフィー，「管径方向分配クロマトグラフィー (Tube Radial Distribution Chromatography : TRDC)」を開発した。

管径方向分配クロマトグラフィー (TRDC)^{3, 4}

TRDP は前述の通り溶媒分子が分配する現象であり，この現象は組成が大きいものが管中央の部分に分布し，組成が小さいものが管壁面近傍に分布する。つまり，混合溶液の組成が水より有機溶媒が過剰であれば管中央に有機溶媒富有相が，管壁面部に水富有層が分布する。逆に水が有機溶媒より過剰の溶液を送液した場合は管中央に水富有相が，管壁面部に有機溶媒富有層が分布する。それぞれの溶媒分子の様子を図 3 に示す。

また，この図において壁面部に分布した溶媒層が疑似固定相として働くため，親水性の強弱によって溶質の分配が起こり，試料を分離することが出来る。

実際に実験装置を用いて試料の分離を行った。実験装置の概略図を次の図 4 に示す。

装置は溶液をポンプで送液し，検出器で検出する単純なものである。キャピラリーはフェーズドシリカキャピラリー，PTFE やポリエチレンなどが使用可能であり，一部を恒温槽に沈めることで温度制御を行う。検出器については，吸光検出，蛍光検出，化学発光検出などによる分析が可能であり，このような検出手法によって有機化合物，アミノ酸，ヘムタンパク質，ヘ

ムペプチド，金属イオン，金属錯体などの分離が可能である。

親水性の試料として 2,6-ナフタレンジスルホン酸，疎水性の試薬として 1-ナフトールを用いて分析を行った結果を記す。水，アセトニトリル，酢酸エチルを容積比 3 : 8 : 4 で混合した有機溶媒が過剰の溶液と 15 : 3 : 2 で混合した水過剰の溶液のそれぞれについて混合試料のクロマトグラムを作成した。実験装置は内径 75 μm のフェーズドシリカキャピラリーを長さ 120cm，実効長 100cm に調製したものをを用いた。検出方法は吸光検出を用い，流量は 0.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ とした。この時のクロマトグラムを図 5 に示す。

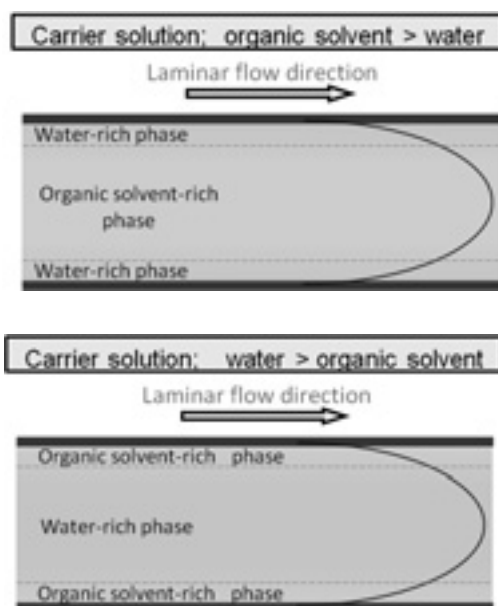


図 3 TRDP の溶媒分子の分布



図 4 実験装置図

図5より、キャリア溶液の溶媒組成比を変化させることによって溶質の検出順序を逆転させることができることが分かった。試料の検出時間はキャリア溶液の組成に関係なく、層流条件の平均線速度の時間とそれより遅い時間に検出される。また、検出時間や検出順序等の溶出挙動はキャピラリーチューブの材質に関係なく見られる。

また、上と同じ実験条件で複数成分の分離も行った⁵。キャピラリー、キャリア溶液、検出方法、流量などの条件は変えず、試料として1-ナフトール、エオシンY、1-ナフタレンスルホン酸、2,6-ナフタレンジスルホン酸、1,3,6-ナフタレントリスルホン酸の五種類の試料を二種類のキャリア溶液について流して測定を行った結果、図6のクロマトグラムが得られた。

図6から、有機溶媒が過剰なクロマトグラムでは全ての成分の分離が確認できたが、水過剰のキャリア溶液の場合は三成分の分離にとどまる結果となった。

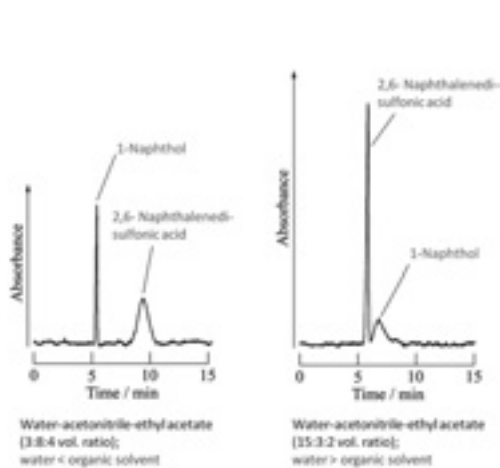


図5 二種類のキャリア溶液を用いたクロマトグラム

TRDCの応用

TRDCを応用して化学発光を応用したタンパク質の分離・検出なども可能である。図7に示すような二流路のTRDCの装置を用い、上のポンプからpH 10.8になるように調製した炭酸緩衝液10mMに過酸化水素50mMの濃度で溶かした溶液を、下のポンプから前述の実験で使用したものと同一組成のキャリア溶液二種（水の代わりにpH 7.0のリン酸緩衝液10mMを用いて調製したもの）を、図中の流量で流すこ

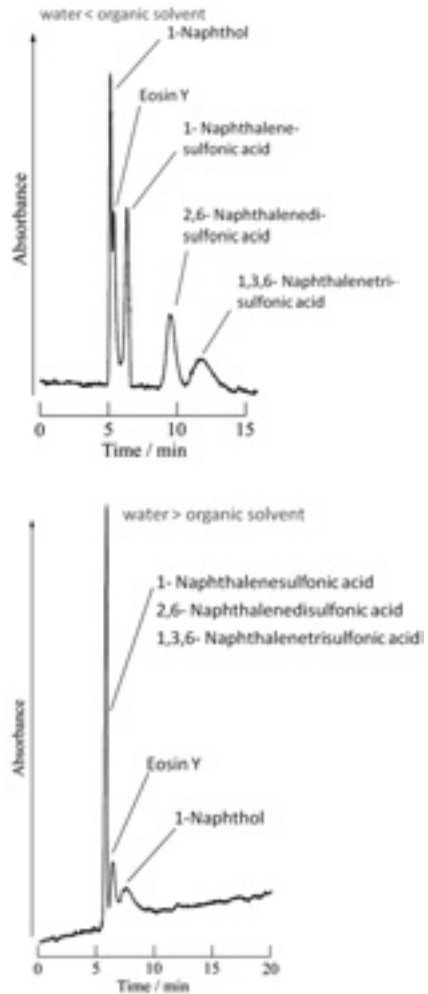


図6 五成分混合溶液のクロマトグラム

とで、T字ジョイントでキャピラリーが接続され二種のキャリアが混ざる部分で発光反応が開始され、化学発光検出を行う事が可能となる。試料はイソルミノールイソチアネート(ILITC)及びILITCで標識したタンパク質を用いる⁶。

この実験装置を用いて、複数のタンパク質混合物を有機溶媒過剰のキャリア溶液と水過剰のキャリア溶液の二種類について分離を試みた。試料はILITC及びILITCで標識されたアルコール・デヒドロゲナーゼ(ADH)、牛血清アルブミン(BSA)の三成分を混合した溶液を用いた。このときに得られたクロマトグラムを図8に示す。図8から、TRDCシステムによってILITCに標識された複数のタンパク質の分離を行うことが出来た事が分かる。

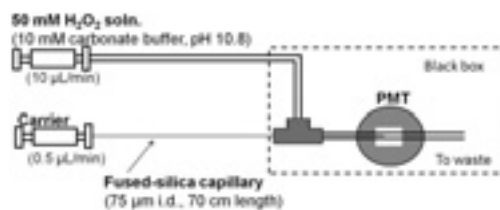


図7 化学発光の実験装置概略図

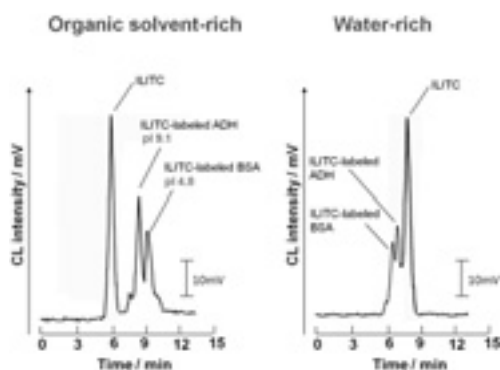


図8 複数のタンパク質の分離の実験結果

また、TRDCを利用した光学異性体の分離も可能であることも分かっている⁷。シクロデキストリンを含む溶液にエナンチオマーを加えると、D-体はシクロデキストリンのホスト-ゲスト相互反応によって親水性となり、L-体は反応せずD-体と比較して疎水性となる。よってキャリア溶液にシクロデキストリンを加えることで、エナンチオマーのD-体とL-体を分離することが可能であると思われる。この予想を確認するために実際に実験を行った。実験装置は図4のものを用いた。キャリア溶液は、シクロデキストリンが親水性であり、有機溶媒が過剰な組成の混合溶液には溶解しなかったため水過剰のキャリア溶液のみをもちいた。組成は前述の実験と同様に水、アセトニトリル、酢酸エチルを体積3:8:4で混合した溶液にシクロデキストリンを10mMの濃度で溶かして調製した。検出方法には蛍光検出を用い、励起波長を355nm、蛍光波長を520nmとした。試料はダンシルメチオニンのD-体とL-の二種が溶解しているキャリア溶液を用いた。その結果を図9に示す。図9より、ダンシルメチオニンの光学異性体を分離・検出することが出来たことが分かる。

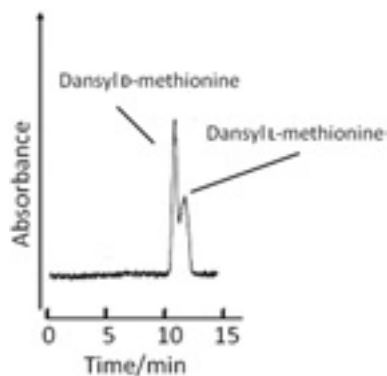


図9 光学異性体の分離の実験結果

まとめ

以上のように、検体の親水性の違いによって試料を分離することが出来る TRDC の用途を記した。TRDP の発生する原理にはまだ分かっていない事も多いが、TRDC はマイクロ流路であるために試料の使用量が少なく済み、またキャピラリーに充填剤や内壁の加工などを施す必要がないなどの利点がある。また、我々の研究室では TRDP を抽出に応用した「管径方向分配抽出 (Tube Radial Distribution Extract : TRDE)⁸」や反応場に利用する「管径方向分配反応 (Tube Radial Distribution Reaction : TRDR)⁹」等の研究も行っており、TRDP にはさらなる応用・発展の余地があると考えている。

参考論文

1. N. Jinno, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *Anal. Sci.*, **27**, 793-798 (2011).
2. N. Jinno, M. Murakami, K. Mizohata, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *Analyst*, **135**, 927-932 (2011).
3. N. Jinno, M. Itano, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *Talanta*, **79**, 1348-1353 (2009).
4. S. Fujinaga, N. Jinno, M. Itano, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *J. Sep. Sci.*, in press.
5. N. Jinno, M. Murakami, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *Anal. Sci.*, **26**, 737-742 (2010).
6. Y. Masuhara, N. Jinno, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *Chem. Lett.*, **39**, 688-689 (2010).
7. N. Jinno, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *Anal. Sci.*, **26**, 641-643 (2010).
8. N. Jinno, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *Chem. Lett.*, **40**, 654-655 (2011).
9. Y. Masuhara, N. Jinno, M. Hashimoto, K. Tsukagoshi, *Chem. Lett.*, **40**, 804-805 (2011).