

## マイクロ流れ系における電気化学検出

後藤正志

岐阜薬科大学薬品分析化学教室・〒502-8585 岐阜市三田洞東5-6-1

## Electrochemical Detection in Micro Flow System

Masashi GOTO

*Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1, Mitahora-Higashi, Gifu-shi, 502-8585, Japan*

Recent advances in the design and application of electrochemical detection (EC) systems in micro flow analysis, capillary electrophoresis (CE), are reviewed, with the objective of providing with the picture of CEEC instrumentation and an overview of the primary analytes and samples for which the technique is best suited. In particular, instrument innovations designed to aid in decoupling the CE and EC systems electrically and in aligning them physically are described in detail. In addition, CEEC applications are summarized for four specific analyte groups: catecholamines, thiols and disulfides, amino acids, and carbohydrates.

## 1. はじめに

流速が  $1\mu\text{l}/\text{min}$  以下であるようなマイクロ流れを用いる分析法は、省資源及び環境保全の観点から、望ましい分析法として社会的に期待されている。このようなマイクロ流れを用いる分析法として、キャピラリー電気泳動 (CE) が注目されている。CE は 1981 年 Jorgenson と Lukacs<sup>1)</sup> によって報告されて以来、複雑な混合物の分離分析に適した分析技法として急速に発展してきた<sup>2-4)</sup>。CE は比較的簡単な装置で短時間に非常に高い分離効率を得られるという特長がある。これらの利点は主に内径  $0.1\text{mm}$  以下のキャピラリーの使用により、熱分散性がよく高い分離電圧が使用できることに起因する。その上必要な

試料注入力積は  $\text{nL}$  から  $\text{pL}$  の範囲であるので、CE は単一細胞分析<sup>5)</sup> のような貴重な試料の分析に適している。さらに、CE はキャピラリー体積が小さく、電気泳動液の流速が非常に低いため、経済面及び環境面からも理想的な流れ分析法であると言える。

これらの利点を生かすためには CE のキャピラリーに適合した検出システムが必要である。光学検出は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に広く利用されているが、CE ではセル体積を小さくする必要があり、光路長が短くなり不利である。一方、電気化学検出 (EC) はセル体積が小さくなくても感度が犠牲になることはないので、CE の検出に適している。1987 年 Ewing のグループ<sup>6,7)</sup>は

CE を EC に最初に利用した。以下、電気化学検出-キャピラリー電気泳動を CEEC と記すことにする。彼らは個々の細胞中の神経伝達物質カテコールアミンの CEEC による定量について検討した。その後、ECCE の装置及び応用についての報告がなされ<sup>8-10)</sup>、EC は CE においても HPLC におけると同様に高感度及び高選択性があり、CE においてその長がより生かされることが実証された。

EC を CE に利用する上で次のような問題点がある。第 1 は EC 電位及び電流を CE の高電圧及び高電流からいかに分離するかであり、第 2 はキャピラリーと電極をいかに簡単に再現性よく配置するかであり、第 3 は分析の応用範囲を広げるために炭素以外にいかに多くの電極を開発するかである。

CEEC において利用される EC モードの大部分はアンペロメトリーである。作用電極に印加する電位を制御することにより、この電位で分析物質の酸化又は還元の結果流れる電解電流を測定する。作用電極電位は通常 CE 実験を通じて一定に保たれる。特別な場合には、それはある電位幅を連続的に掃引される（ボルタンメトリー、VOD）か、ある電位から他の電位まで不連続的にジャンプされる（パルスドアンペロメトリー、PAD）。アンペロメトリーに加えるに、電位差<sup>11-13)</sup>又は電導度<sup>14-16)</sup>測定に基づくものがある。ここでは、Vogel と Baldwin の総説<sup>3)</sup>に準じて、EC モードのうちアンペロメトリーを中心に最近の進歩について概説する。

## 2. CEEC 装置<sup>3)</sup>

典型的な CEEC 装置は Fig.1 に示すように 3 つの主要な部分：CE 高電圧電源、キャピラリー、及び EC 検出ユニットから構成される。EC 検出ユニットは検出電極類と電位制御及び電流測定のための電子回路からなる。

電極類、電場の分離、及び電極とキャピラリーの配列のために必要な要素以外の装置は他の CE や EC のための装置となら変わらない。EC 電子回路は HPLC 用にすでに開発されているポテンシostat であり、多くのメーカーから容易に入手できる。もちろん、CEEC に使用される作用電極が小さいため、ポテンシostat は 10~100pA レンジの電流が測定できなければならない。

ECCE に特有な装置設計上の 2 つの要素はキャピラリーと電極の電場分離と配置に関するものである。Zhong と Lunte<sup>17)</sup> は電場分離を行って検出する方式をオフカラム（off-column）検出、電場分離を行わないで検出する方式をエンドカラム（end-column）検出と名づけた。また、キャピラリーと電極の配置を特徴づけるために、オンキャピラリー（on-capillary）、インキャピラリー（in-capillary）、及びウォールジェット（wall-jet）電極という名称を使うことにする。

### 2.1 キャピラリーと電極の電場分離

CEEC を成功させるためには、5~30 kV の CE 電場の中に置かれた検出電極で 1V 又はそれ以下のオーダにおいて EC 電圧を正確に維持し、 $\mu\text{A}$  レベルのバックグラウンド CE 電流の存在下で pA レベルの CE 電流を記録することが必要である。ある場合には、Fig.1A に示すようにキャピラリー先端近くの溶液中に CE 電極を単に配置する（エンドカラム検出）ことによって、目的を達成することができる。多くの場合には、Fig.1B に示すように CE と EC 機能を電氣的に分離することが必要である。このようなオフカラム検出の場合にも、EC 電極はキャピラリー先端に配置するが、CE 電圧と電流から完全に分離されている。

### 2.1.1 オフカラム検出

大抵の場合には CE と EC の電氣的分離は、Fig.2B に示すように液出口の前約 1cm の位置でキャピラリー壁に割れ目を創ることによってなされる。これはキャピラリーを実質的に 2 つの部分に分割することになる。すなわち、割れ目より前の部分は分離キャピラリーとして、後ろの部分は検出キャピラリーとして機能する。割れ目を適当な物質で被覆すれば、キャピラリー中の試料及び泳動液の大部分を外に出すことなく、キャピラリーの中と外の間電氣的導通を得ることができる。Wallingford と Ewing<sup>9)</sup> は被覆剤として多孔性ガラスを用いた良好な分離と検出を達成した。しかし、多孔性ガラスは入手及び組み立てともに難しく、電場分離部(デカプラー)が壊れやすい。その結果、多数の多孔性ガラスに代わる物質の使用が試みられている。例えば、Nafion 管<sup>18)</sup>、Nafion 膜<sup>19)</sup>、Teflon 管<sup>20)</sup>、多孔性炭素付 Teflon 管<sup>21)</sup>、多孔性ガラス付 Nafion<sup>22)</sup>、酢酸セルロース<sup>23)</sup>、Pd 管<sup>24)</sup> などがある。最近では Nafion が入手し易く比較的高い電気伝導性を持っているため、デカプラーに最もよく使われている。

より完全な電場分離をするため、Lunte のグループは Fig.2C に示すような長さが約 2mm の酢酸セルロース<sup>25)</sup> 及び Nafion 膜<sup>26)</sup> からなるデカプラーを開発した。これを利用すれば CE 電流が 30  $\mu$ A までは EC にほとんど影響を及ぼさないことが分かった。また、この Nafion 膜からなるデカプラーを 1N HCl 中に浸すことにより、フェノール酸類の最適分離を与える pH 6.1 のリン酸緩衝液の酸性度はオンラインでこれらの化合物の EC 検出に最適である pH 1.8 まで小さくすることができた<sup>26)</sup>。同様な Nafion 膜を分離キャピラリーの先端部に形成させた Fig.2D に示すようなデカプラー<sup>27,28)</sup> が報告されている。

この配置では検出キャピラリーが不要である特長がある。最近、Hu ら<sup>29)</sup> は Fig.2E に示すようにキャピラリー壁をフッ化水素酸で 3mm の長さだけエッチングすることによって簡単にデカプラーを作製する方法を提案している。

### 2.1.2 エンドカラム検出

Fig.2A に示すようなエンドカラム検出は、1991 年に Huang ら<sup>30)</sup> によって提案された。彼らは内径 5  $\mu$ m のキャピラリー先端に対向して直径 10  $\mu$ m のカーボンファイバー(CF)電極を設置することによってカテコール類を CE の高電圧からの実質的なノイズなしに高感度に検出できることを明らかにした。キャピラリー内径が小さくなると、キャピラリー内の電気抵抗は急速に増大する。その結果、CE 分離に付随するバックグラウンド電流は減少し、CE 電圧による電場はキャピラリー出口で急激に降下する。Lu と Cassidy<sup>20)</sup> は種々の電極材料、電解液組成、電極とキャピラリーのサイズについて検討し、内径 25  $\mu$ m 以下のキャピラリーを用いれば、溶液中への CE 電場はほとんどなく、EC に影響を及ぼさないことを立証した。Wallenborg ら<sup>31)</sup> はエンドカラム検出において分離電圧、CE 緩衝液、及びキャピラリーと電極間距離のハイドロダイナミックボルタモグラムに及ぼす影響について、ドーパミン及びカテコールを試料として詳細に検討している。

### 2.2 キャピラリーと電極の配置

CEEC において最適検出感度を得るためには、キャピラリー出口と検出電極を溶液中で適切に配置し、この配置を全分析時間に渡って維持しなければならない。CE において使用されるキャピラリーの内径が 5~100

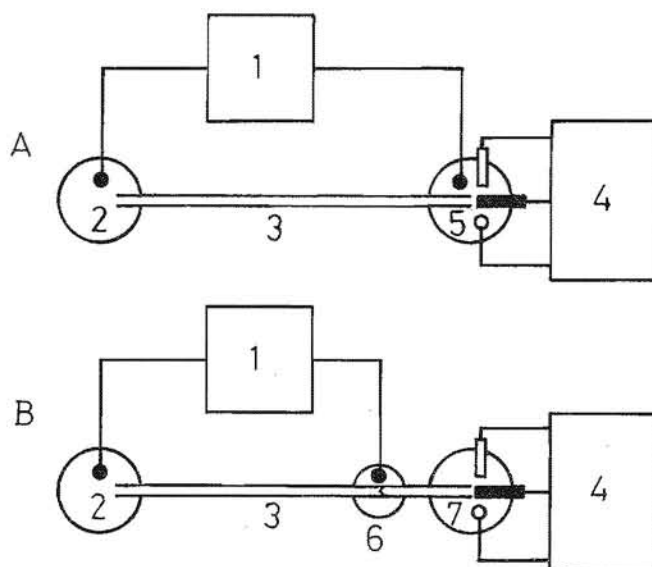


Fig. 1 CEEC systems: (A) end-column configuration, (B) off-column configuration. (1) High voltage power supply, (2) buffer reservoir (includes CE electrode), (3) fused silica capillary, (4) potentiostat, (5) cell for end-column electrochemical detection (includes CE electrode, capillary outlet, and working, reference, and auxiliary electrodes), (6) CE electrode reservoir for decoupled system (includes CE electrode and decoupler), (7) cell for decoupled electrochemical detection (includes detection capillary outlet and working, reference, and auxiliary electrodes). From 3), with modification.

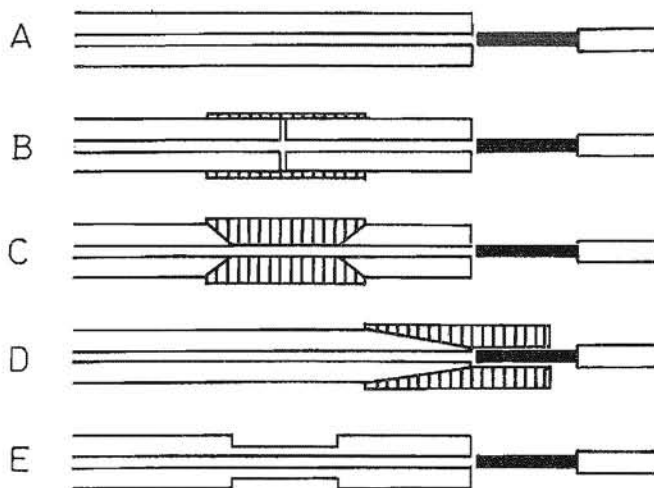


Fig. 2 CE decoupling methods: (A) end-column (no decoupling), (B) covered fracture (porous glass, Nafion tubing, Nafion film etc.), (C) long cast cellulose acetate or Nafion decoupler, (D) cast Nafion end-column decoupler, (E) etched decoupler. From 3), with modification.

$\mu\text{m}$  であり、CEEC において一般に使用される電極が直径  $10\sim 50\mu\text{m}$  のカーボンファイバー又は金属線等であることを考えると、この要求は簡単なものでない。この操作は  $x,y,z$  マイクロポジショナー上に電極を固定し、マイクロスコープを通じて観察しながら電極先端をキャピラリー出口にできるだけ近づけるように移動して行う。この操作はかなりの熟練を要する。この困難さをできるだけ避けるため、Fig.3 に示すような種々のキャピラリーと電極の配置法が報告されている。

### 2.2.1 インキャピラリー電極 (ICE)

第1の配置法は Fig.3A に示すように EC 電極をキャピラリーの中へ短い距離だけ物理的に挿入する方式であり、インキャピラリー電極と呼ぶ。この方法は Wallingford と Ewing<sup>6)</sup> によって最初に採用されたものであり、マイクロスコープとマイクロポジショナーを使用して達成された。この場合、電極の設定はかなり難しいが、一度設定されると繰り返し試料注入に対して 5%以下の再現性を得ている。直径  $1\mu\text{m}$  の電極が内径  $2\mu\text{m}$  のキャピラリー中に挿入された例が報告されている<sup>7)</sup>。なお、インキャピラリー電極は一般にデカプラーとともに用いなければならない。Sloss と Ewing<sup>32)</sup> はこの点を改良して Fig.3B に示すような電極配置法 (O-ICE) を考案した。すなわち、キャピラリー先端部を化学的にエッチングすることによって内径を広げ、電極の挿入を容易にした。この場合には、キャピラリーの内径が広がったことにより、その部分での抵抗が小さくなり、EC 電極は CE 電圧の影響をほとんど受けないので、デカプラーなしにエンドカラム検出が可能である。

### 2.2.2 ウォールジェット電極 (WJE)

ウォールジェット電極配置法は Fig.3C に示すように検出電極のサイズを大きくすることによって、キャピラリーと電極の配置操作を容易にしようとするものである。これは円筒形の線やファイバー電極の代わりに平面を持つ円盤電極を使用する。最初にウォールジェット電極を CE に用いたのは Ye と Baldwin<sup>33)</sup> であり、直径  $127\mu\text{m}$  の Cu 円盤を内径  $25\mu\text{m}$  のキャピラリーに対して使用した。長さが  $300\sim 400\mu\text{m}$  で直径が  $25\mu\text{m}$  の Cu 線電極と比べて、ウォールジェット電極は分離効率が若干劣るが、より高い検出感度が得られた。その後、内径  $75\mu\text{m}$  のキャピラリーに対して直径  $500\mu\text{m}$  の電極<sup>34)</sup>、内径  $13\mu\text{m}$  のキャピラリーに対して直径  $90\mu\text{m}$  の電極を使った CEEC 実験によって、ウォールジェット電極の設定の容易さが実証された<sup>35)</sup>。

マイクロスコープやマイクロポジショナーを用いない電極配置法として、種々のキャピラリーと電極のホルダーを用いる方法<sup>35-40)</sup> が報告されている。一般に電極は分離キャピラリーと同じサイズの空のガラスキャピラリー中へ 1 本の金属線又はカーボンファイバーを封入して作製した円盤で、ウォールジェット電極方式で使用される。Fermier ら<sup>35)</sup> によって設計されたものは 2 つの Plexiglas 板からなり、それぞれにキャピラリーと電極を装着するための小さな溝が掘ってあり、キャピラリーと電極を所定の場所に設定したのち、2 つの板をねじによって上下から固定して使用する。最近、Durgbanshi と Kok<sup>41)</sup> は HPLC 用の薄層電解セルが、その作用電極を直径  $1\text{mm}$  のグラシーカーボン (GC) に代えることによって CE にも利用できることを明らかにした。

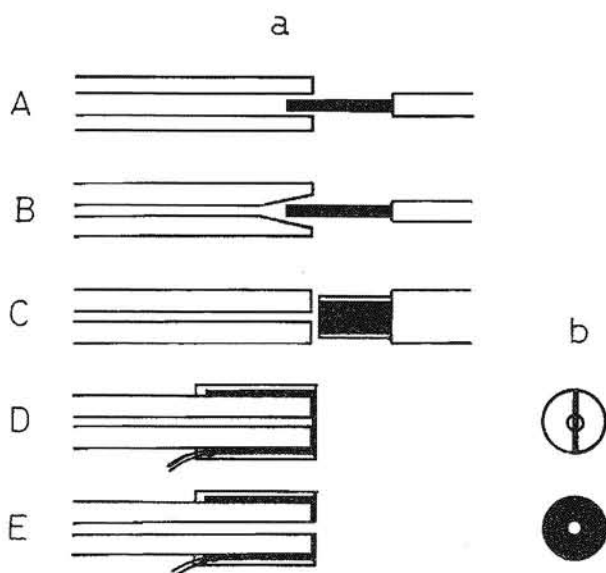


Fig. 3 Alignment methods used in CEEC: (a) Side view, (b) top view of electrodes. (A) in-capillary, (B) optimized in-capillary, (C) wall-jet, (D) on-capillary (metal wire across), (E) on-capillary (conductive metal coating) configurations. From 3), with modification.

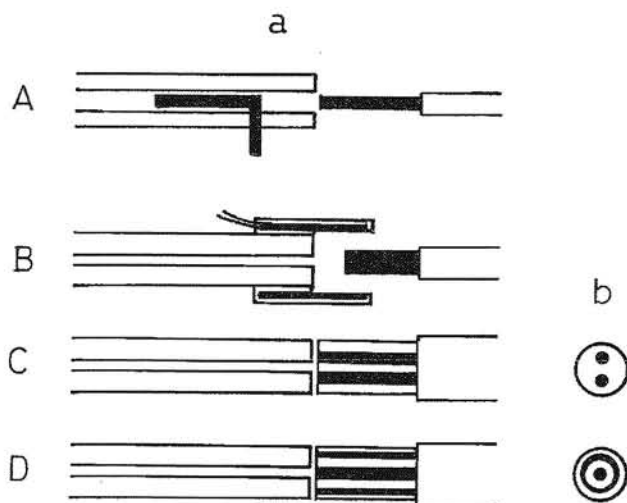


Fig. 4 Dual-electrode CEEC systems: (a) Side view, (b) top view of electrodes. (A) series (wire-wire), (B) series (tube-wire), (C) parallel (disk-disk), (D) series (ring-disk) configurations.

### 2.2.3 オンキャピラリー電極 (OCE)

キャピラリーと電極を Fig.3D,E に示すように一体化する配置法、すなわちオンキャピラリー電極が 2 つのグループによって報告されている。Zhong と Lunte<sup>17)</sup> は内径 50  $\mu\text{m}$  のキャピラリー出口を横切って直径 25  $\mu\text{m}$  の Au 線を張る方法を提案し (Fig.3D)、カテコールアミン及びグルコサミン試料の分析に利用した。これは Au 線をキャピラリー先端の一方の側に接着し、キャピラリー出口の中央部を塞ぐように横切って Au 線を曲げキャピラリーの他の側に接着することによって簡単に作製される。Vogel と Baldwin<sup>42-43)</sup> は通常の金属蒸着装置を用いて、キャピラリー出口に Au、Pt、又は Cu を蒸着させ、これを電極として利用することを試みた (Fig.3E)。この電極をエンドカラム検出に使用した結果、ドーパミンやカテコールに対して  $\mu\text{M}$  の検出限界を得、繰り返し試料注入に対して 2~4% の相対標準偏差を得た。この種のオンキャピラリー電極は一度に多数作製することが可能である。

## 3 CEEC 応用<sup>3)</sup>

### 3.1 カテコール化合物

神経伝達物質であるカテコールアミン類及びカテコール類の分析に CEEC が Table 1 に示すように最初から広く応用されている。この際の電極材料としては炭素が最もよく使用されている。炭素は Pt や Au に比べてバックグラウンド電流が小さく、安定で、劣化し難いという点で優れている。炭素電極でのカテコール化合物の検出限界は一般に 0.01 ~ 1  $\mu\text{M}$  であると報告されている。pH 6 のリン酸ナトリウム又はモルフィリノエタンスルホン酸のような緩衝液が大抵のカテコール類及びカテコールアミン類の分離のための

泳動液として使用されている。中性のカテコール化合物の分離にはミセル動電クロマトグラフィーが利用されている。Ewing のグループは蛇の脳細胞中のセロトニン、ドーパミン、及び DOPAC の分析にカーボンファイバー電極を用いて CEEC を応用した<sup>5,7,44)</sup>。試料を直接キャピラリー中に採取することによって、細胞内液中にこれらの化合物が  $\mu\text{M}$  レベルに含まれていることを明らかにした。Hadwiger ら<sup>45)</sup> はラットにカテコールアミンイソプロテレノールを静脈注射して CEEC によって薬理的なデータを得た。マイクロダイアリシスによって採取された試料はシクロデキストリンを含む CE 緩衝液中で分離され、イソプロテレノールの 2 つの異性体について分析された。

### 3.2 チオール類及び二硫化物類

イオウを含む化合物、特にチオール類と二硫化物類は Table 2 に示すように CEEC による分析対象になっている。チオール類は炭素電極で酸化されるが、二硫化物類は酸化されない。したがって、これらの化合物を分析するためには新しい電極の開発が必要である。O'Shea と Lunte<sup>53)</sup> は直径 50  $\mu\text{m}$  の Au 線を Hg に浸すことによってアマルガム電極 (Au/Hg) を作製し、チオールを含む薬物類の分析、並びにシステイン及びグルタチオンの定量に応用した。この電極での検出は、チオール類の存在下で水銀表面が触媒的に酸化されることに基づき、+0.1V vs Ag/AgCl の低電位で達成される。二硫化物類は水銀とは反応しないので、Lin ら<sup>54)</sup> は 2 作用電極 EC を用いた。すなわち、Fig.4A に示すように第 2 の Au/Hg 線電極をデカプラーとキャピラリー出口の間に穴を開けて、その中に挿入した。この配置において、上流の電極はシステインをシステインに還元するのに十分な負

Table 1. CEEC of catechol compounds\*

Analyte type	Electrode	Alignment	Decoupling	Reference
Catechols	CF	ICE	None	49)
Catecholamines	CF	ICE	Porous glass	48)
	CF	WJE	None	35)
	CF	ICE	Cast Nafion end-column	45)
	CF	ICE	Etched capillary wall	29)
	GC	WJE	Palladium tubing	41)
	Au(SWD)	WJE	None	40)
Catechols and catecholamines	CF	ICE	Porous glass	44, 46, 47)
	CF	ICE	Cellulose acetate	23)
	CF	0-ICE	None	32)
	CF	WJE	Cast cellulose acetate	25)
	Pt	WJE	Teflon end-column	38)
	Au	ICE	Nafion tubing	17)
	Au	OCE	Nafion tubing	17)
	Au	OCE	None	42)
Catechols and phenolic acids	CF	ICE	Nafion tubing	18)
	CF	ICE	Palladium tubing	24)
Catecholamines and phenolic acids	CF	ICE	None	7)
	CF		None	51)
Catechols, catecholamines, and phenolic acids	CF		None	30)
	Cu	ICE	Porous glass	52)
	CF	ICE	Cast Nafion	26)
	CF	ICE	Cast Nafion end-column	27)
	CF (Dual)	WJE	Bare fracture	50)
Phenolic acids	CF	ICE	Nafion film	28)
	CF	ICE	Cast Nafion	94)

\* From 3), with modification.

の電位に設定し、下流の電極で検出した。この方式でシステインは  $5 \mu\text{M}$ 、シスチンは  $100 \mu\text{M}$  まで検出できた。最近、Zhong と

Lunte<sup>55)</sup> は Fig.4B に示すような管-線電極 (T-W) からなる 2 作用電極を用いて同様な実験を行い、システインに対して  $0.5 \mu\text{M}$  の



Table 2. CEEC of thiols and disulfides\*

Analyte type	Electrode	Alignment	Decoupling	Reference
Disulfides	RuCN/CF	ICE	Cast cellulose acetate	25)
	Au/Hg	ICE	None	53)
	CoPC/CP	WJE	Nafion tubing	57)
	CoPC/CCC	WJE	Palladium tubing	58)
	Au(PAD)	O-ICE	Nafion film	59)
Thiols and disulfides	Au/Hg(Dual)	ICE	Paradium tubing	54)
	RuCN/CF	WJE	None	56)
	Au/Hg(Dual)	T-W	Bare fracture	55)

\* From 3), with modification.

検出限界を得ている。混合原子価のシアン化ルテニウム膜をカーボンファイバーに化学修飾した電極 (RuCN/CF)<sup>56)</sup> はチオール類と二硫化物類共に触媒的に電気酸化できるので、1本の電極で両者の検出が可能である。O'SheaとLunte<sup>57)</sup> 及びHuangとKok<sup>58)</sup> はそれぞれ独立にコバルトフタロシアニン (CoPc) を電気触媒物質として用いた。前者はカーボンペースト (CP) に、後者は導電性カーボンセメント (CCC) にCoPcを練り込んで電極とした。この種の電極ではCoPcがチオール類だけを触媒するので、二硫化物は検出されない。

### 3.3 アミノ酸類

Lunteのグループはカーボンファイバー電極でチロシン及びトリプトファンが直接酸化されることを利用して、ロイシン及びメチオニンエンケファリンの定量<sup>25)</sup> 並びにラットに服用させたトリプトファンの代謝による分解過程のモニターにCEECを応用した<sup>60)</sup>。CEECにおけるアミノ酸の検出は、Table 3に示すようにカーボンファイバー電極での間接検出、炭素電極での電気活性誘導体の検出、

及び金属電極での酸化による直接検出によって達成されている。アミノ酸のプレカラム誘導体として、シアノベンゾイソインドール<sup>18,61)</sup> 又はジニトロフェニル<sup>62)</sup> 誘導体が報告されている。前者はラット脳から採取された試料中のアラニン、グルタミン酸塩、及びアスパラギン酸塩の分析に利用されている。LunteのグループはCE緩衝液中にCuSO<sub>4</sub>を添加することによってペプチドの電気化学的に活性なCu(II)錯体を形成させるオンライン誘導体化法を提案した<sup>63)</sup>。最も有望なアミノ酸化合物の検出は金属銅電極を使用することによって誘導体化することなく達成される<sup>37,52,64-66)</sup>。弱アルカリ性緩衝液中では酸化は銅表面との錯体形成によって起こる<sup>52,64)</sup>。一方、強アルカリ性のNaOH液中ではアミノ酸は触媒的に電気酸化される<sup>37,65,66)</sup>。この方法によってすべてのアミノ酸を $\mu\text{M}$ かそれ以下の濃度で検出できる。

### 3.4 炭水化物類

炭水化物類は炭素電極では活性でないので、Au、Cu、及びNiのような金属電極を使用しなければならない。金属電極を用い

Table 3. CEEC of amino acids\*

Analyte type	Electrode	Alignment	Decoupling	Reference
Amino acids	CF	ICE	Nafion tubing	18, 61, 62)
	GC	WJE	Palladium tubing	41)
	AAO/CP	WJE	Cast cellulose acetate	25)
	Cu	WJE	None	37)
	CF	ICE	Nafion tubing	60)
	Cu	ICE	Bare fracture	64)
	CF		None	51)
	Cu	WJE	None	66, 76)
Amino acids and peptides	CF	ICE	Porous glass	67)
	Cu	ICE	Porous glass	52)
	Cu	WJE	None	65)
Peptides	CF	ICE	Nafion tubing	63)
			Cast cellulose acetate	25)

\* From 3), with modification.

れば強アルカリ性 (例えば 0.1M NaOH) で炭水化物類は陰イオンになると同時に触媒的に電気酸化される。Au 電極では、安定な再現性のある結果を得るために、検出にパルスドアンペロメトリー (PAD) モードが要求される<sup>19,68,69)</sup>。この方法は炭水化物類の酸化生成物による電極表面の劣化を防ぐことができる。Cu 及び Ni 電極では、電位のパルスは必要とされない<sup>33,35,70-72)</sup>。この方法は従来の定電位アンペロメトリーであり、より高感度が得られる。Table 4 に示すように、金属電極特に Au と Cu は種々の試料中の種々の炭水化物類の定量に利用されている。後藤ら<sup>72)</sup> は Cu 電極を用い、糖類及びその関連物質を迅速分離するために、陽イオン性界面活性剤を含む強アルカリ溶液を泳動液として用いる CEEC について検討し、清涼飲料水中の糖類分析に応用した。Ye と Baldwin<sup>73)</sup> はグルコース、グルシトル、

グルコン酸、グルカル酸、及びグルクロン酸が強アルカリ中でそれぞれ異なった程度にイオン化し、CEEC で容易に分離定量できることを示した。Zhou と Baldwin<sup>74)</sup> はでん粉及びデキストランの酵素分解生成物であるマルトヘプタオースまでのマルトースを含む複雑な多糖類の CEEC 分離定量を達成した。この際、電気浸透流を逆転させるため、泳動液中に CTAB を添加した。Fu ら<sup>75)</sup> らは Cu 電極を用い糖類及び有機酸類の同時分離定量に CEEC を応用した。血中グルコースは O'Shea ら<sup>19)</sup> 及び Roberts ら<sup>69)</sup> によって Au 電極を用いる PAD で定量されている。Hong と Baldwin<sup>76)</sup> は Cu 電極を用い、尿中のグルコース、ガラクトース、クレアチニン、及び尿酸を CEEC によって定量した。Weber らのグループ<sup>77,78)</sup> は糖タンパク質の酵素分解によって生成した糖ペプチドのキャラクターリデーションに Au 電極を用いる PAD を応

Table 4. CEEC of carbohydrates\*

Analyte type	Electrode	Alignment	Decoupling	Reference
Simple sugars	Cu	WJE	None	33)
	Cu	ICE	None	70)
	GOD/DMFc/CP	WJE	Nafion tubing	57)
	Cu <sub>2</sub> O/CCC	WJE	Palladium tubing	34)
	Ni	WJE	None	35)
	Cu	WJE	None	35)
	GOD/Pt	OCE	None	42)
Simple sugars and sugar derivatives	Au (PAD)	ICE	Nafion film	19)
	Au (PAD)		None	68)
	Cu	WJE	None	73)
	Au (PAD)	O-ICE	Cellulose acetate film	69)
	Cu	WJE	None	66)
	Au (PAD)	O-ICE	Nafion film	59)
	Cu/Au	OCE	None	42)
	Cu	WJE	None	72, 76)
Sugar derivatives	Au (PAD)	OCE	Nafion tubing	17)
Sugars and organic acids	Cu	WJE	None	75)
Polysaccharides	Cu	WJE	None	74)
Sugar conjugates	Au (PAD)	ICE	Nafion tubing	77)
	CoPC/CP	WJE	Cast cellulose acetate	24)
	Au (PAD)	ICE	Nafion tubing	78)
	Ni	WJE	None	71)
	Cu	OCE	None	42)

\* From 3), with modification.

用した。

### 3.5 その他の化合物

CEEC のその他の化合物分析への応用例を Table 5 に示す。フェノール、ジフェノール<sup>29)</sup>、インドール<sup>39)</sup>、プリン塩基、リボヌクレオシド、リボヌクレオシド<sup>79)</sup>、NAD/NADH、芳香族ニトロ化合物<sup>80)</sup>、スル

ホンアミド<sup>81)</sup>、牛血清アルブミン<sup>82)</sup> のような有機化合物及びヒドラジンや種々の金属イオンのような無機化合物の分析に応用されている。Matysik<sup>83)</sup> は非水溶媒中で CEEC を行い、染料の分離定量に応用した。Fang<sup>84)</sup> は 2 つのアミン誘導体の異性体の分離定量に CEEC を応用した。Cassidy のグループ<sup>49)</sup> は EC 検出に還元モードを利用して

Table 5. Other CEEC applications\*

Analyte type	Electrode	Alignment	Decoupling	Reference
Aminophenols	CF	ICE	Cellulose acetate film	23)
Phenols	CF	ICE	Bare fracture	89)
Diphenols	CF	ICE	Etched capillary wall	29)
Chlorophenols	GC	WJE	Palladium tubing	41)
Indoles	CF	WJE	None	39)
Aminopyrines	CF	ICE	Nafion tubing	87)
Anthraquinones	CF	ICE	Nafion tubing	62)
NAD <sup>+</sup> /NADH	CF(Dual)	WJE	Bare fracture	50)
Purine bases	CF	WJE	None	86)
Prine bases, ribonucleosides, and ribonucleotides				
	Cu	WJE	None	79)
Creatinine and uric acid	Cu	WJE	None	76)
Vitamin B <sub>2</sub>	CF(Dual)	WJE	Bare fracture	50)
Vitamin B <sub>6</sub>	CF	ICE	PTFE/graphite	21)
Amine derivatives	Cu	WJE	None	84)
Sulfonamides	CF	WJE	None	81)
Cholic acids	CD/Au			94)
Nitroaromatic compounds	Ag/Au	WJE	None	80)
Dye compounds	Pt	WJE	None	83)
Albmin	CFA	WJE	None	82)
Cytochrome C	Cy/Au	WJE	None	93)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	CF	ICE	None	49)
Metal ions				
	Au/Hg	ICE	None	49, 85)
	Au(PAD)		None	90)
	Pt(PAD)		None	90)
	Au(VOD)	WJE	None	96)
Ferrocenes	Pt	ICE	Nafion/porous glass	22)
Hydrazines				
	Pt/CF	ICE	Nafion tubing	88)
	Pd/CFA	WJE	Nafion tubing	91)
Hydroxylamines	Pd/CFA	WJE	Nafion tubing	92)

\* From 3), with modification.

金属イオンを分析した。

#### 4. おわりに

CE 検出は光学活性でない化合物の検出に特に有効である。CEEC のための装置はまだメーカーから市販されていないが、丈夫で作製し易いデカプラーの開発、内径の小さなキャピラリーの利用、オンキャピラリー電極の利用等により、一般の研究室でも CEEC 装置の組み立てが可能になりつつある。

CEEC をさらに発展させるためには、第 1 に新しい電極の開発が必須である。炭素電極、Au や Cu 電極、及びチオール類や二硫化物類の検出のための化学修飾電極<sup>56-58)</sup>はすでに開発されている。Pd 修飾カーボンファイバー束電極 (Pd/CFA)<sup>91,92)</sup>によるヒドラジン類、システイン修飾 Au 電極 (Cy/Au)<sup>93)</sup>によるアルブミン、及びシクロデキストリン修飾 Au 電極 (CD/Au)<sup>94)</sup>によるコール酸類の検出などの例がある。さらに有望なものとして酵素修飾電極がある。例えば、グルコースオキシダーゼ (GOD) 修飾によるグルコースの検出<sup>42,57)</sup>及びアミノ酸オキシダーゼ (AAO) 修飾によるアミノ酸の検出<sup>25)</sup>などである。

第 2 に選択的検出のための 2 作用電極 EC の利用である。例えば、Fig.4A 及び Fig.4B に示されるような直列型による、2 つの Au/Hg 電極を用いるチオール類及び二硫化物類の同時検出<sup>54,55)</sup>がある。Zhong ら<sup>50)</sup>は Fig.4C に示すように並列に配置した 2 つのカーボンファイバー円盤電極に異なる電位を印加することによって NADH と NAD を

同時検出 (並列型) し、また、Fig.4D に示すようなリング-ディスク電極を用いてアスコルビン酸のような電気化学的に非可逆な物質中のカテコールアミンの選択検出 (直列型) を行っている。

第 3 に同定能力を上げるための電位掃引 EC の利用である。Park ら<sup>95)</sup>はフェノール酸類を試料として、Gerhardt ら<sup>40)</sup>はドーパミンを試料として、それぞれ通常のボルタンメトリー及び矩形波ボルタンメトリー (SWD) によってより正確な定性情報を得ている。Cassidy のグループ<sup>96,97)</sup>はサイクリックボルタンメトリーを採用して、CE で分離されずに泳動する金属イオンの同時定量を行っている。Ewing のグループ<sup>98)</sup>は 1 つの神経細胞から放出されるドーパミンをボルタンメトリーによって同定することに成功している。

第 4 に CEEC 装置のマイクロ化である。Zhong と Lunte<sup>17)</sup>は長さ 5cm のキャピラリーにオンキャピラリー Au 電極を作製し、ドーパミンとヒドロキノンとの分離検出が 20 秒以内で達成できることを実証している。

以上の CEEC に関する技術は、省資源及び環境にやさしい FIA 特に FIA のマイクロ化に大いに役立つものと期待される。

#### 文献

- 1) J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
- 2) 本田 進, 寺部 茂, “キャピラリー電気泳動”, (1995), (講談社).
- 3) P. D. Vogel, R. P. Baldwin, *Electrophoresis*, **18**, 2267 (1997).
- 4) S. C. Beale, *Anal. Chem.*, **70**, 279R (1998).
- 5) A. G. Ewing, R. A. Wallingford, T. M. Olefirowicz, *Anal. Chem.*, **61**, 293A (1989).

- 6) R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **59**, 1762, (1987).
- 7) T. M. Olefirowicz, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **62**, 1872 (1990).
- 8) P. D. Curry Jr., C. E. Engstrom-Silverman, A. G. Ewing, *Electroanalysis*, **3**, 587, (1991).
- 9) A. G. Ewing, J. M. Mesaros, P. F. Gavin, *Anal. Chem.*, **66**, 527A (1994).
- 10) S. M. Lunte, T. J. O'Shea, *Electrophoresis*, **15**, 79 (1994).
- 11) C. Harber, W. R. Jones, J. Soglia, M. A. Surve, M. McGlynn, A. Caplan, J. R. Reinneck, C. Krstanovic, *J. Cap. Elec.*, **3**, 1 (1996).
- 12) T. Kappes, P. Schnierle, P. C. Hauser, *Anal. Chim. Acta*, **350**, 141, (1997).
- 13) B. L. DeBacker, L. J. Nagels, *Anal. Chem.*, **68**, 4441 (1996).
- 14) A. Nann, I. Silvestri, W. Simon, *Anal. Chem.*, **65**, 1662, (1993).
- 15) D. Mueller, I. Jelinek, F. Opekar, K. Stulik, *Electroanalysis*, **8**, 722 (1996).
- 16) M. Harrold, J. Stillian, L. Bao, R. Rocklin, N. Avdalovic, *J. Chromatogr. A*, **717**, 371 (1995).
- 17) M. Zhong, S. M. Lunte, *Anal. Chem.*, **68**, 2488 (1996).
- 18) T. J. O'Shea, R. D. Greenhagen, S. M. Lunte, C. E. Lunte, M. R. Smyth, D. M. Radzik, N. Watanabe, *J. Chromatogr.*, **593**, 305 (1992).
- 19) T. J. O'Shea, S. M. Lunte, W. R. LaCourse, *Anal. Chem.*, **65**, 948 (1993).
- 20) W. Lu, R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, **66**, 200, (1994).
- 21) Y. F. Yik, H. K. Lee, S. F. Li, S. B. Khoo, *J. Chromatogr.*, **585**, 139 (1991).
- 22) F.-M. Matysik, A. Meister, G. Werner, *Anal. Chim. Acta*, **305**, 114 (1995).
- 23) I. Chen, C.-W. Whang, *J. Chromatogr.*, **644**, 208 (1993).
- 24) W. T. Kok, Y. Sahin, *Anal. Chem.*, **65**, 2497 (1993).
- 25) J. Zhou, S. M. Lunte, *Anal. Chem.*, **67**, 13 (1995).
- 26) S. Park, S. M. Lunte, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, **67**, 911 (1995).
- 27) S. Park, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, **67**, 4366, (1995).
- 28) S. Moane, S. Park, C. E. Lunte, M. R. Smyth, *Analyst*, **123**, 1931 (1998).
- 29) S. Hu, Z.-L. Wang, P.-B. Li, J.-K. Cheng, *Anal. Chem.*, **69**, 264 (1997).
- 30) X. Huang, R. N. Zare, S. Sloss, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **63**, 189 (1991).
- 31) S. R. Wallenborg, L. Nyholm, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, **71**, 544 (1999).
- 32) S. Sloss, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **65**, 577, (1993).
- 33) J. Ye, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **65**, 3525 (1993).
- 34) X. Huang, W. T. Kok, *J. Chromatogr. A*, **707**, 335 (1995).
- 35) A. M. Fermier, M. L. Gostkowski, L. A. Colon, *Anal. Chem.*, **68**, 1661 (1996).
- 36) A. J. Tudos, M. M. C. Van Dyck, H. Poppe, W. T. Kok, *Chromatographia*, **37**, 79 (1993).
- 37) Y. Guo, L. A. Colon, R. Dadoo, R. N. Zare, *Electrophoresis*, **16**, 493, (1995).
- 38) M.-C. Chen, H.-J. Huang, *Anal. Chem.*, **67**, 4010 (1995).
- 39) J. C. Olsson, P. E. Andersson, B. Karlberg, A.-C. Nordstrom, *J. Chromatogr. A*, **775**, 289 (1996).

- 40) G. C. Gerhardt, R. M. Cassidy, A. S. Baranski, *Anal. Chem.*, **70**, 2167 (1998).
- 41) A. Durgbanshi, W. T. Kok, *J. Chromatogr. A*, **798**, 289 (1998).
- 42) P. D. Voegel, W. Zhou, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **69**, 951 (1997).
- 43) P. D. Voegel, R. P. Baldwin, *Electroanalysis*, **9**, 1145 (1997).
- 44) R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **60**, 1972 (1988).
- 45) M. E. Hadwiger, S. R. Torchia, S. Park, M. E. Biggin, C. E. Lunte, *J. Chromatogr. B*, **681**, 241 (1996).
- 46) R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **60**, 258 (1988).
- 47) R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *J. Chromatogr.*, **441**, 299 (1988).
- 48) A. G. Ewing, R. A. Wallingford, *Anal. Chem.*, **61**, 98 (1989).
- 49) W. Lu, R. M. Cassidy, A. S. Baranski, *J. Chromatogr.*, **640**, 433 (1993).
- 50) M. Zhong, J. Zhou, S. M. Lunte, G. Zhao, D. M. Giolando, J. R. Kirchoff, *Anal. Chem.*, **68**, 203 (1996).
- 51) F.-M. Matysik, *J. Chromatogr. A*, **742**, 229 (1996).
- 52) C. E. Engstrom-Silverman, A. G. Ewing, *J. Microcol. Sep.*, **3**, 141 (1991).
- 53) T. J. O'Shea, S. M. Lunte, *Anal. Chem.*, **65**, 247 (1993).
- 54) B. L. Lin, L. A. Colon, R. M. Zare, *J. Chromatogr. A*, **680**, 263 (1994).
- 55) M. Zhong, S. M. Lunte, *Anal. Chem.*, **71**, 251, (1999).
- 56) J. Zhou, T. J. O'Shea, S. M. Lunte, *J. Chromatogr. A*, **680**, 271 (1994).
- 57) T. J. O'Shea, S. M. Lunte, *Anal. Chem.*, **66**, 307 (1994).
- 58) X. Huang, W. T. Kok, *J. Chromatogr. A*, **716**, 347 (1995).
- 59) W. R. LaCourse, G. S. Owens, *Electrophoresis*, **17**, 310 (1996).
- 60) M. A. Malone, H. Zou, S. M. Lunte, M. R. Smyth, *J. Chromatogr. A*, **700**, 73, (1995).
- 61) T. J. O'Shea, P. L. Weber, B. P. Bammel, C. E. Lunte, S. M. Lunte, M. R. Smyth, *J. Chromatogr.*, **608**, 189 (1992).
- 62) M. A. Malone, P. L. Weber, M. R. Smyth, S. M. Lunte, *Anal. Chem.*, **66**, 3782 (1994).
- 63) M. Deacon, T. J. O'Shea, S. M. Lunte, M. R. Smyth, *J. Chromatogr. A*, **652**, 377 (1993).
- 64) J. Zhou, S. M. Lunte, *Electrophoresis*, **16**, 498 (1995).
- 65) J. Ye, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **66**, 2669 (1994).
- 66) P. D. Voegel, R. P. Baldwin, *Amer. Lab.*, **28**, 39 (1996).
- 67) T. M. Olefirowicz, A. G. Ewing, *J. Chromatogr.*, **499**, 713 (1990).
- 68) W. Lu, R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, **65**, 2878 (1993).
- 69) R. E. Roberts, D. C. Johnson, *Electroanalysis*, **7**, 1015 (1995).
- 70) L. A. Colon, R. Dadoo, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, **65**, 476 (1993).
- 71) X. Fang, J. Ye, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **329**, 49 (1996).
- 72) 後藤正志, 田中一哉, 江坂幸宏, 宇野文二, *分析化学*, **46**, 95 (1997).
- 73) J. Ye, R. P. Baldwin, *J. Chromatogr. A*, **687**, 141 (1994).
- 74) W. Zhou, R. P. Baldwin,

- Electrophoresis*, **17**, 319 (1996).
- 75) C. Fu, L. Song, Y. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **371**, 81 (1998).
- 76) J. Hong, R. P. Baldwin, *J. Capillary Electrophor.*, **4**, 65 (1997).
- 77) P. L. Weber, T. Kornfelt, N. K. Klausen, S. M. Lunte, *Anal. Biochem.*, **225**, 135 (1995).
- 78) P. L. Weber, S. M. Lunte, *Electrophoresis*, **17**, 302 (1996).
- 79) H. Lin, D.-K. Xu, H.-Y. Chen, *J. Chromatogr. A*, **760**, 227 (1997).
- 80) A. Hilmi, J. H. T. Luong, A.-L. Nguen, *Anal. Chem.*, **71**, 873 (1999).
- 81) T. You, X. Yang, E. Wang, *Analyst*, **123**, 2357 (1998).
- 82) W. Jin, Q. Weng, J. Wu, *Anal. Chim. Acta*, **342**, 67 (1997).
- 83) F.-M. Matysik, *J. Chromatogr. A*, **802**, 349 (1998).
- 84) X. Fang, F. Gong, Y. Fang, *Anal. Chem.*, **70**, 4030, (1998).
- 85) W. Lu, R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, **65**, 1649 (1993).
- 86) D.-K. Xu, L. Hua, H.-Y. Chen, *Anal. Chim. Acta*, **335**, 95 (1996).
- 87) W. Zhou, J. Liu, E. Wang, *J. Chromatogr. A*, **715**, 355 (1995).
- 88) W. Zhou, L. Xu, M. Wu, L. Xu, E. Wang, *Anal. Chim. Acta*, **299**, 189 (1994).
- 89) C. D. Gaitonde, R. V. Pathak, *J. Chromatogr.*, **514**, 389 (1990).
- 90) J. Wen, R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, **68**, 1047 (1996).
- 91) J. Liu, W. Zhou, T. You, F. Li, E. Wang, S. Dong, *Anal. Chem.*, **68**, 3350 (1996).
- 92) T. You, M. Wu, E. Wang, *Anal. Lett.*, **30**, 1025 (1997).
- 93) W. Jin, Q. Weng, J. Wu, *Anal. Lett.*, **30**, 753 (1997).
- 94) P. He, J. Ye, Y. Fang, I. Suzuki, T. Osa, *Anal. Chim. Acta*, **337**, 217 (1997).
- 95) S. Park, M. J. McGrath, M. R. Smyth, D. Diamond, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, **69**, 2994 (1997).
- 96) J. Wen, A. Baranski, R. Cassidy, *Anal. Chem.*, **70**, 2504 (1998).
- 97) J. Wen, R. M. Cassidy, A. S. Baranski, *J. Chromatogr. A*, **811**, 181 (1998).
- 98) F. D. Swanek, G. Chen, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **68**, 3912 (1996).

(Received May, 27)

