

## FIA とキャピラリー電気泳動のオンライン結合

森下 富士夫

京都大学工学研究科材料化学専攻

〒606-8501 京都市左京区吉田本町

## Online Coupling of FIA with Capillary Electrophoresis

Fujio MORISHITA

Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University,  
Yoshida-Honmachi, Sakyo, Kyoto, 606-8501, Japan

Capillary electrophoresis (CE) is one of the most excellent separation methods but has some problems in the sample introduction. The online combination of FIA with CE affords a powerful analytical method, since the FI technique enables reproducible multiple introduction with simple operations and devices. Online pretreatment of samples such as dialysis, solid phase extraction, ion exchange, gas diffusion and so on, in FI-CE systems can reduce the total analytical time including sampling and lower the limit of detection of analytes. Recent advances in FI-CE technique are reviewed.

## 1. はじめに

環境分析や臨床分析では、しばしば、成分間の複合効果を考慮して、複数の成分を同時定量する必要がある。目的成分の数が限られているとき HPLC を用いるとクロマトグラム上で目的成分のピークの占有する時間の合計は僅かで、多くの無駄な時間に占められていることに気づく。この場合には FIA の方が有利である。例えば、過酸化水素や NADH のように、多くの酵素反応から共通の生成物が生ずることに基づいて、並列流路に異なる固定化酵素反応管を

取り付けた FIA を組み立てると、共通の生成物のモニターによって、複数成分に相当するピークを並べ、記録紙上に無駄な時間をなくすことができる<sup>1,2)</sup>。ところが、対象成分の数が多くなると、流路を複数にするだけでは対処が困難である。

FIA はすでに原子吸光分析法など様々な分析法と組み合わせられて、その応用分野を拡大しているが、FIA とクロマトグラフィーあるいは電気泳動との結合は少ないように思われる(ただし、LC の中でのポストカラム反応の利用は FIA と LC の結合と考えることもできる)。どちらも基本的に「流れ」を用いる方法であること、HPLC

の装置や配管部品が FIA の進歩に大いに寄与したことを考えると、このことは奇異な感じを与える。FIA は反応や検出系によって物質に対する選択性、特異性を得るのに対して、クロマトグラフィーや電気泳動の分離分析法は移動速度の違いによって選択性を獲得する。このように選択性の基礎となる原理に相違があるが、もう一つの違いが分析目的にある。FIA は対象とする目的成分が明確であることを前提にしているのに対して、HPLC や電気泳動の応用は目的成分が明確である場合に限定されない。これが両者の結合例が少ない一つの理由であろう。ところで、FIA による同時定量の項目数を多くしようとする、先に述べたように、流路と反応管の数を増すだけでは限界がある。FIA と分離分析は物質に対する選択性の原理を異にするので、両者から得られる情報の質にもかなりの違いがあるであろう。両者を組み合わせると情報量が倍加とは言えないまでも、大いに増大すると考えられる。両者を組み合わせながら、記録紙上での無駄な時間を少なくし、かつ情報量を多くするという虫のよいことを考えながら、文献調査をしていて、最近、Kuban<sup>3-9)</sup>と Fang<sup>10-16)</sup>の二つのグループが FIA とキャピラリー電気泳動 (CE) のオンライン結合について精力的に研究を進めていることを知った。上述の筆者の観点とは多少異なっていて、その意図は CE に FI という簡便で精度の高い試料導入法を提供し、また、FIA 側の立場からは CE を情報量の多い検出法にしようとするものであるが、興味深い多くの成果が報告されているので、この分野でのこれまでの成果を概観することとした。

## 2. CE における試料導入法

80 年代初めに Jorgenson<sup>17)</sup>によって創始された CE 法<sup>18,19)</sup>は、圧力送液に比べて、空間的に速度分布がより均一である電気浸透流による送液を用いるために HPLC に比べてはるかに高い分離性能を達成する。加えて、様々な分離モードが開発されたために、多くの分野で急速に応用が広がっているが、濃度表示での低い感度とともに試料の導入法にも問題を残しているように思われる。CE の主要な試料導入法は圧力による導入法と電氣的移動による導入法である。圧力導入法は分離キャピラリーの入口側の加圧、または、出口側の減圧によって、あるいはキャピラリーの両端に落差をつけることによって(重力注入法)生ずる圧力差に基づいて試料をキャピラリー内に導入するものである。電氣的導入法はキャピラリーの両端の間に印加された高電圧差によって生じる電気浸透流を用いて試料を導入するものである。電氣的導入法の操作は簡便であるが、試料の輸送には電気浸透流とともに電気泳動が寄与するために、試料中の成分の電荷の有無、大きさなどによって、注入量が成分間で異なることになる。圧力導入法にはこのような成分間での偏り効果は生じないが、加圧、減圧のための装置や操作が必要となる。また、両者とも試料容器と分離溶媒容器の取り替えを必要とするために、装置上、操作上、複雑になる。

## 3. FIA と CE のオンライン結合

上の二つの試料導入法に代わるものとして、スプリット導入法が提案されている<sup>19,20)</sup>。それは前述のスウェーデンと中国の二つのグループの報告に先立つものであるが、とりわけ、Tsuda<sup>20)</sup>の方法 (1991 年)は、

注入バルブから送られた試料溶液を分離キャピラリーにスプリット導入し、高電圧の印加を中断することなく、直ちに電気泳動分離するもので、“FIA と CE の結合”という言葉こそ使われていないが、後述する Kuban らや Fang らの方法と全く同じ原理によるものである。1997 年に Kuban ら<sup>3)</sup>は Fig. 1 に示すようなインターフェイスを介して、FIA と CE を結合する方法を提案した。Fig. 2 に彼らの FI-CE システムの流路図を示す。分離キャピラリーには 30KV の電位差が印加されて電気浸透流が流れて

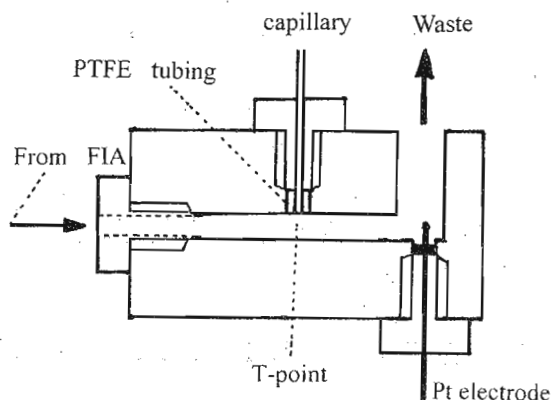


Fig. 1. Detailed scheme of the FIA-CE. From 3) with modification.

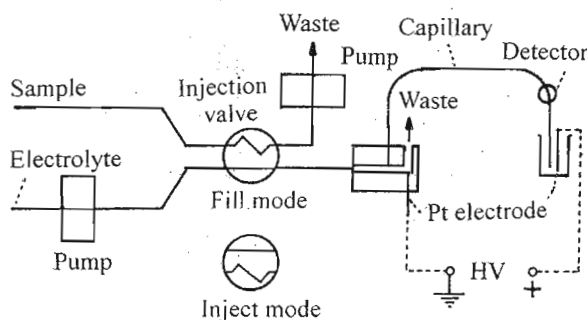


Fig. 2. Flow diagram of the complete FIA-CE system. From 3) with modification.

いる。試料注入バルブからインターフェイスに送られた試料バンドが、FIA の流れと分離キャピラリー末端が接触する点 (Fig. 1 の T 字点)を通るときに、その一部が電気浸透流によって、キャピラリーの中に吸引され、そのまま CE 分離される。注入体積は FIA からの試料バンドの時間幅によって決まる。三つの陰イオン (塩化物、硫酸、硝酸イオン、いずれも 100  $\mu\text{g/ml}$ ) を含む同一の試料を 180 検体/h の試料処理速度で連続注入したとき、これらのイオンはほぼ完全に分離され、ピーク高さの相対標準偏差は 1.2~2.3% ( $n=20$ )で、簡単な操作で高い精度と迅速性を達成していることがわかる。Fang ら<sup>10)</sup>もほぼ同じ頃に Fig. 3 に示すインターフェイスと流路系によって、同様の原理を用いて、FI-CE を実施した。彼らはクロラムフェニコール合成の中間体の光学異性体の分別定量に FI-CE を適用した<sup>11)</sup>。キラル選択性を与えるために、 $\beta$ -シクロデキストリンあるいはその誘導体を分離溶媒に添加して、基線分離を行った。従来の CE 法に比べて、5 倍速い (17 検体/h) 試料処理速度を達成している。電気的導入法には前述のように成分間の偏り効果があり、加えて、試料溶液の電導度によって注入量が変わるが、内標準法を用いた上、ピーク面積を試料の電導度で補正することによって、定量の正確さを改善することができる。Kuban ら<sup>8)</sup>は FI-CE インターフェイスでのキャピラリーへの試料導入に成分の分別効果のない圧力導入法を用いた。その目的のために、Fig. 1 のインターフェイスの排出側を開放にせず、電磁弁を取り付けた。注入バルブのループ内に採取された試料溶液が送り出されるのと同期してキャピラリーにかかる高電圧の印加が停止される。また、試料バンドがキャピラリー入口先端に

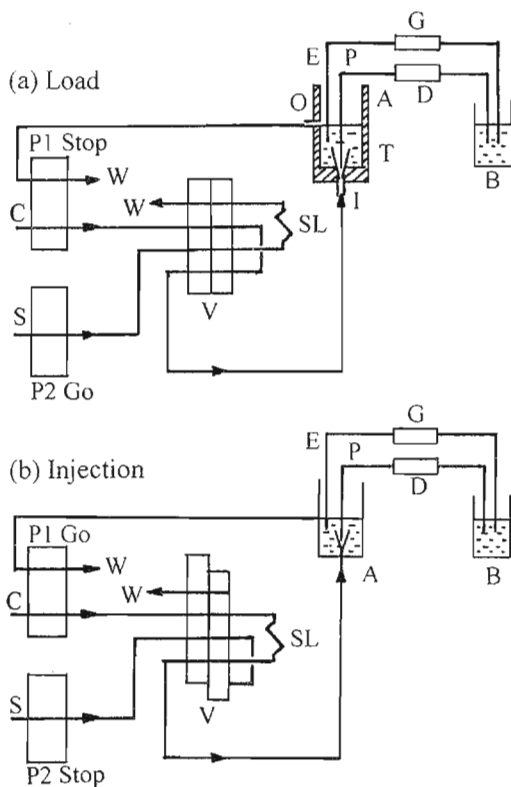


Fig. 3 FI manifold of the combined FI-CE system: (a) sample loading sequence; (b) sample injection sequence. V, injector valve; SL, sample loop; P1, P2, peristaltic pump; A, flow-through reservoir interface; T, conical pipette tip; I, inlet; O, waste solution outlet; B, waste reservoir; G, HV power supply, P, capillary; E, Pt electrode; S, sample; C, carrier; D, detector; W, waste. From 10) with modification.

到達するのに合わせて電磁弁が閉じられる。こうして、電氣的移動によらず、圧力によって試料が導入される。試料導入終了後、電磁弁が開けられ、再び高電圧が印加されCE分離が開始される。成分による偏り効果を受けないように Fang ら<sup>19)</sup>が採用した方法は電気浸透流による吸引導入法である。これは O'Shea ら<sup>22)</sup>や呉ら<sup>23)</sup>によって行われたナフィオン膜ジョイントを利用する注入法を FI-CE に採用したものである。Fig. 4

にナフィオン膜ジョイントを示す。予め引っかき傷をつけておいたキャピラリーをナフィオン膜管に通し、キャピラリーに少し力を加えて、引っかき傷に亀裂を作る。ナフィオン膜管はエポキシ接着剤とシリコンエラストマーで固定する。ナフィオン膜ジョイントは Fig. 4 に示すように、緩衝溶液を満たした容器に入れられる。Fig. 5 に FI-CE 系の流路図を示す。ナフィオン膜ジョイントを突き抜けたキャピラリーの入口先端は FI-CE インターフェイスに入れられる。注入バルブを "fill" の位置にして (a)、ループを試料溶液で満たす。バルブを "inject" の位置にする (b) と、試料バンドがインターフェイスに運ばれる。バルブの切り替えと同期して、時間リレーは位置 2 に変わるので、高電圧はキャピラリー出口とナフィオン膜ジョイントの間にかかることになる。この間で生ずる電気浸透流に引っ張られるようにして、インターフェイス内に達した試料バンドの一部がキャピラリー内に吸引される。吸引される試料量は時

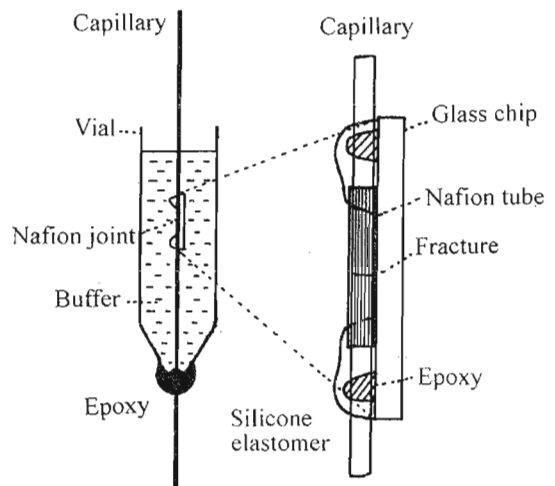


Fig. 4. Structure of the Nafion joint. From 15) with modification.



#### 4. オンラインでの試料処理を伴う FI-CE 法

単純に FIA を CE の試料注入に用いるのではなく、オンラインで前濃縮や前分離などの試料処理を行う FI-CE 法も提案されている。Chen らは固相抽出による分離、濃縮を行うために、ODS シリカを充填したマイクロカラムを注入バルブの前に挿入し (Fig. 3 の流路系を変更して)、薬物の血中濃度の変化を調べた<sup>12, 14)</sup>。経口投与された **pseudoephedrine** を含む、被験者からの血清をオフラインでの除タンパクの後、固相抽出管に送り、脱塩後、酢酸緩衝液 (pH3.5) -アセトニトリル (40/60) 混合溶媒によって溶離し、溶出バンドの濃度の最も高い部分を注入バルブのループ内に留める。誘電率の低い溶媒と CE 分離用の緩衝溶液の間での電場増幅効果を期待して加えられた水のバンドに続いて、ループ内の試料バンドを FI-CE インターフェイスに送る。この方法によって、固相抽出管を挿入せず、また、電場増幅効果がない場合と比べて、約 290 倍濃縮され、サンプリング間隔 6min で、血清中の **pseudoephedrine** について、12 $\mu$ g/l の検出下限 ( $3\sigma$ ) が得られた。**cimetidine** を内標準とする相対ピーク高さの相対標準偏差は 1.2% ( $n=10$ ) であった<sup>14)</sup>。

Arce ら<sup>2)</sup> はイオン交換カラムによる濃縮法を採用した。Fig. 2 の注入バルブの試料ループの代わりに、Amberlite IRA-410 を充填した短いカラムを取り付ける。まず、試料中の陰イオンを捕集し、バルブを切り替えて、**cetyltrimethylammonium chloride** を含む緩衝溶液によって溶離し、FI-CE インターフェイスで電気的導入法によって分離キャピラリーに導入する。この方法で 4 つの陰イオンが分離、定量された。硝酸イ

オンや亜硝酸イオンは約 5 倍濃縮され、UV 検出 (200nm) による検出下限値、約 10 ng/ml が得られている。

試料導入を FI 方式に限定しなければ、透析と CE のオンライン結合は 90 年代初めより行われている<sup>25-31)</sup>。FI 方式と同じ利点を有しているのも、FI 方式に限定せずに取り上げたい。Bao ら<sup>25)</sup> は種々の管状の半透膜からなる分離管をキャピラリーの間に挿入して、CE のためのサンプリング装置とした。半透膜として透析膜を用い、血清中の低分子量成分の CE 分離を行った。被験体にかかる負荷を考慮すると、in vivo でのマイクロ透析は試料量が少なくてすむ CE と組み合わせるのが最適である。Lunte らは、2 本の溶融シリカキャピラリーと再生セルロース透析ファイバーからなる微小な透析プローブ<sup>26)</sup> をラットの静脈に埋め込み、頸静脈から投与した抗腫瘍剤 **SR4233** を約 1 時間にわたって in vivo 測定している<sup>27)</sup>。彼らが用いたオンラインマイクロ透析-CE システムと CE への導入インターフェイス部をそれぞれ、Fig. 7、8 に示す。浸出液はポンプ 1 によって 1 $\mu$ l/min の流速でバルブのループ (容量 60nl) に集められる。ポンプ 2 によって、ループ内の被験溶液は CE への注入インターフェイスに送られる。インターフェイスの溶液だめはドデシル硫酸ナトリウムを含む CE 分離用の緩衝溶液で満たされており、その中に僅かなギャップを隔てて、分離キャピラリーと試料移送用のキャピラリーが置かれているので、移送されてきた試料バンドの一部が電気浸透流によって分離キャピラリーに注入される。対象は **SR4233** とその代謝物 **SR4317** であるのでミセル動電クロマトグラフィーのモードで分離され、LIF で検出された。両者のピークの分離に 60s を要するので、時間

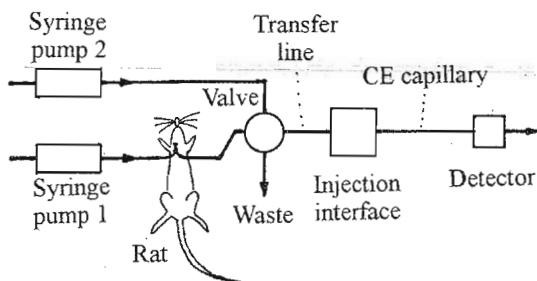


Fig. 7. Schematic of the on-line microdialysis/capillary electrophoresis system. From 27) with modification.

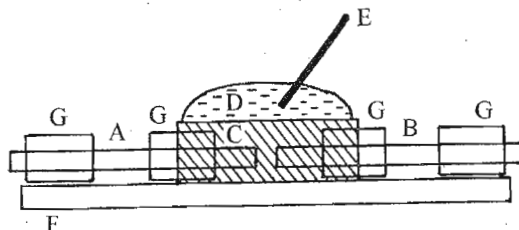


Fig. 8. Schematic of the injection interface. Components: A, transfer capillary; B, CE capillary; C, CE run buffer reservoir; D, CE run buffer; E, CE ground electrode; F, microscope slide; G, guide tubing. From 27) with modification.

分解能 90s でサンプリングを繰り返すことができる。Lunte ら<sup>31)</sup>はさらに洗練されたオンラインマイクロ透析-CE システムを構築し、電気化学検出と組み合わせて、皮膚からのニコチンの吸収過程を調べている。Kuban ら<sup>9)</sup>は Fig. 2 の試料側流路、注入バルブの上流に透析膜を置くことによって、オフラインでの前処理を必要とすることなく、水道水、泥水、ミルク、果汁などの複雑な組成のマトリックス中の陰イオンの CE 分離、定量を行った。ところで、濃度勾配に従う拡散に基づく透析に比べると、電気透析では拡散に加えて、電気泳動も物質輸送に寄与するので、より迅速で、選択的な分離が可能となる。電気透析と CE をオンライン結合し、血清中の ATP を対象とすると、20s で CE 分離、定量を行うこ

とができた。オフラインでの除タンパク後に CE 分離を行うと、5min の時間を要するので、前者の迅速性は明らかである。

前述の Bao ら<sup>25)</sup>は半透膜の種類を変えてオンラインでの試料処理を検討している。半透膜としてヘキサン中で膨潤させたシリコーンゴムを用いて、排水中の有機物の分離、定量を行い、多孔性のポリプロピレン膜を用いるガス拡散によって、気体中の微量の酸の分離、定量を行った。ガス拡散を用いる FI-CE は Kuban ら<sup>9)</sup>によっても試みられている。

## 5. おわりに

上に概観してきたように、FIA と CE のオンライン結合の研究は、簡便で、迅速かつ再現性の高い試料導入法を CE に提供し、迅速で高分離能の検出系を FIA に提供するという観点から進展してきている。濃縮や前分離のような試料処理をオンラインで行うと、サンプリングを含む全分析時間が大幅に短縮されるので、特に、CE の側から期待される点の大きい手法であるように思われる。

今後、FIA からの反応や検出に基づく選択性と CE からの移動速度に基づく選択性を組み合わせて、情報量の増大化という観点からも研究が展開していくと、興味ある応用分野が拓けるのではと期待している。

## 文献

1. Heckert, H. Zuo, C. E. M. Masoom, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, **171**, 185 (1985).
2. F. Morishita, Y. Nishikawa, T. Kojima, *Anal. Sci.*, **2**, 411 (1986).

3. P. Kuban, A. Engstrom, J. C. Olsson, G. Thorsen, R. Tryzell, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, **337**, 117 (1997).
4. P. Kuban, B. Karlberg, *Anal. Chem.*, **69**, 1169 (1997).
5. P. Kuban, B. Karlberg, *Trends Anal. Chem.*, **17**, 34 (1998).
6. P. Kuban, B. Karlberg, *Talanta*, **45**, 477 (1998).
7. P. Kuban, K. Tennberg, R. Tryzell, B. Karlberg, *J. Chromatogr. A*, **808**, 219 (1998).
8. P. Kuban, R. Pirmohammadi, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, **378**, 55 (1999).
9. L. Arce, P. Kuban, A. Rios, M. Valcarcel, B. Karlberg, *Anal. Chim. Acta*, **390**, 39 (1999).
10. Z.-L. Fang, Z.-S. Liu, Q. Shen, *Anal. Chim. Acta*, **346**, 135 (1997).
11. Z.-S. Liu, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **353**, 199 (1997).
12. H.-W. Chen, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **355**, 135 (1997).
13. H.-W. Chen, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **376**, 209 (1998).
14. H.-W. Chen, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **394**, 13 (1999).
15. Q.-S. Pu, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **398**, 65 (1999).
16. Q. Fang, F.-R. S.-L. Wang, S.-S. Liu, S.-K. Xu, Z.-L. Fang, *Anal. Chim. Acta*, **390**, 27 (1999).
17. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
18. D. R. Baker, "Capillary Electrophoresis", John Wiley, 1995.
19. 本田 進, 寺部 茂, "キャピラリー電気泳動", 講談社, 1995.
20. J. Tehrani, R. Macomber, L. Day, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **14**, 10 (1991).
21. T. Tsuda, R. N. Zare, *J. Chromatogr.*, **559**, 103 (1991).
22. 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).
23. 吳行正, 笹木幸司, 小林英吾, 保母敏行, *分析化学*, **43**, 609 (1994).
24. 馬場嘉信, *J. Flow Injection Anal.*, **14**, 131 (1997).
25. L. Bao, P. K. Dasgupta, *Anal. Chem.*, **64**, 991 (1992).
26. M. W. Telting-Diaz, D. O. Scott, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, **64**, 806 (1992).
27. B. L. Hogan, S. M. Lunte, J. F. Stobaugh, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, **66**, 596 (1994).
28. S. Y. Zhou, H. Zuo, J. F. Stobaugh, C. E. Lunte, S. M. Lunte, *Anal. Chem.*, **67**, 594 (1995).
29. M. W. Lada, G. Schaller, M. H. Carriger, T. W. Vickroy, R. T. Kennedy, *Anal. Chim. Acta*, **307**, 217 (1995).
30. B. A. P. Buscher, U. R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Chromatogr. A*, **764**, 135 (1997).
31. J. Zhou, D. H. Heckert, H. Zuo, C. E. Lunte, S. M. Lunte, *Anal. Chim. Acta*, **379**, 307 (1999).

(Received November 29, 1999)

