
界面動電現象を利用する高性能液体クロマトグラフィーに関する基礎的研究

Fundamental study on high performance liquid chromatography based on electrokinetic migrations

代表研究者 京都大学工学部助教授 寺部 茂
Assoc. Prof., Faculty of Eng., Kyoto Univ.
Shigeru TERABE

We have adopted the term "electrokinetic chromatography" for the method described in this paper. The method is a new type of chromatography where a solution of an ionic surfactant filled in an open tubular capillary is subject to free zone electrophoresis. The solute injected distributes itself between the micelle and the aqueous phase, and the micelle and the aqueous phase are moved with different velocities in the tube by electrophoretic and electroosmotic effects. In other words, the whole solution is transported by electroosmotic flow, but the charged micelle migrates with a different velocity from that of the surrounding solution because of an electrophoresis.

We have already described the fundamental characteristics of electrokinetic chromatography with micellar solutions and have mentioned that this technique has great capacity for high resolution within a short time. Another characteristic of this technique is that retention times of neutral solutes are limited within the time-window determined by the velocities of the aqueous phase and the micelle. This range of retention times is ascribed to the migration of both phases in the tube.

In this paper, some results are presented on separations of chlorinated phenols and aromatic sulfides with micellar solutions as well as electrokinetic separation based on inclusion complex formation. All the isomers of chlorinated phenols were successfully separated within 18 min by using a 0.05 mm i. d. × 650 mm fused-silica tube with a 0.07 M sodium dodecyl sulfate (SDS) solution (pH 7.0). The retention behavior of chlorinated phenols were investigated in pH range 6.0-9.0. The capacity factor of an ionizable solute decreased with an increase of pH, whereas that of a nonionized phenol was almost constant regardless of the change in pH.

Electrokinetic chromatography was also applied to the separation of seven alkyl phenyl sulfides whose alkyl groups were methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, and *s*-butyl, and four alkyl benzyl sulfides whose alkyl groups were methyl, ethyl, propyl, and isopropyl. The ten sulfides among the eleven were separated with a 0.02 M SDS solution (pH 7.0). The use of a mixed solution of 80% of a 0.03 M SDS solution (pH 7.0) and 20% of methanol gave also successful separation of the ten aromatic sulfides among the eleven; the unresolved pair was different from that with a 0.02 M SDS solution.

A solution (pH 7.0) of a β -cyclodextrin derivative having an ionized group, 2-*O*-carboxymethyl- β -cyclodextrin, was employed instead of a micellar solution in electrokinetic chromatography. Some aromatic isomers such as cresols and xylydines were separated only through inclusion complex formation.

研究目的

クロマトグラフィーは分離分析法としては最も広く利用されているもので、その中でも液体クロ

マトグラフィーは、装置、分離技術とも最近10年程の間に急速に進歩し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) として広い分野で利用されるよう

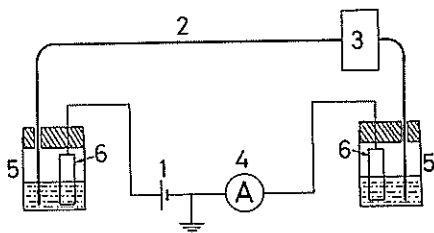


図 1. 界面動電クロマトグラフィー装置の図。
1: 高圧直流安定化電源, 2: フューズドシリカ毛細管, 3: 波長可変型紫外吸収検出器, 4: 電流計, 5: ガラス容器, 6: 白金電極。

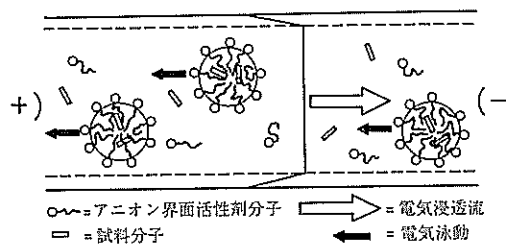


図 2. 界面動電クロマトグラフィー原理の模式図。

になった。クロマトグラフィーでは、一般に、カラム内に充てんされた固定相の空隙を通して試料が移動相によって運ばれていく間に、試料分子は固定相と移動相との間で近似的に分配平衡を繰り返す。このとき、固定相に分配される割合の多い試料分子ほどカラム内を通過するのに時間がかかるので、分配係数の違いによって分離されてカラムから溶離してくる。

我々は、従来の液体クロマトグラフィーとは異なり、カラム内に固定された相を必要とせず、また、移動相を送るための高圧定量ポンプをも必要としない新しい形式の高性能液体クロマトグラフィーを開発し、それを界面動電クロマトグラフィーと命名した。本法では、カラム内に存在する 2 相としてイオン性界面活性剤ミセルと水を、2 相間の相対的な移動に電気浸透と電気泳動の両方を利用する。これまでに、本法が HPLC よりも短時間で高い分離能を示すことを明らかにするとともに、本法の基礎的な性質を HPLC と比較検討してきた。

本研究では、これまでに得られた成果を基礎にして、分離に影響を及ぼす実験条件を検討すると同時に、各種試料の分離を試み本法の有用性を実証することを第 1 の目的とする。次に本法の原理を拡張して、カラム内の一方の相としてミセルの代りに、電荷を持つシクロデキストリン誘導体を用いて、包接作用のみを分配機構とし、均一溶液のみを用いた新しいクロマトグラフィーの可能性を示すことを第 2 の目的とする。

研究経過と成果

1. 原理・装置および方法

本法の装置は図 1 に概略を示すように毛細管ゾーン電気泳動用のものと同じである。本研究では内径 $50\ \mu\text{m}$ 、長さ 65 または 90 cm のフューズドシリカ管 2 を用い、管内に界面活性剤、またはシクロデキストリン誘導体の緩衝液溶液を満たし、2 個の容器 5 にも同じ溶液を入れる。毛細管の一端を容器 5 から取り出し試料溶液を含む容器内に移し、落差を利用して毛細管の一端に試料溶液を少量 (約 1 nL) 注入してから、その端を容器 5 に戻す。電源 1 から直流高電圧を印加すると、毛細管の一端に注入された試料は界面動電現象により他端の方へ移動する。このとき、試料成分はミセルに取り込まれる (可溶化される) 割合の違いにより移動速度が違ってくるので分離される。各成分は検出器 3 の部分を通過するときに、紫外吸収により検出される。検出は毛細管の一部の被覆樹脂を取り除き、その部分を紫外吸収セルとして使用するオンカラム法による。

電圧を印加した時の毛細管内でのミセルおよび試料分子の動きを模式的に図 2 に示す。いま、界面活性剤として硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を用いた場合を例にとり説明すると、電気浸透流は図中に大きな矢印で示すように、速度分布が非常に小さい流れとして正極から負極方向へ向かう。一方、表面に負電荷を持つ SDS ミセルは、図中に小さな矢印で示すように電気泳動により正極方向へ向かう。本実験条件下では電気浸透流の方が、ミセルの電気泳動より逆向きで大きいので、ミセルも電気浸透流よりは遅い速度で負極方向へ移動する。試料分子の一部は水相中に存在し、一

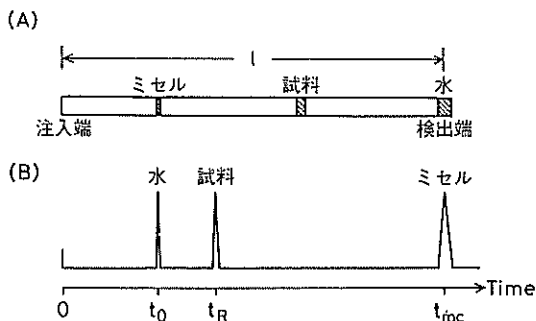


図 3. 水、ミセル、試料の毛細管内での分離 (A) およびクロマトグラム (B) の模式図。
理論段数: 14,000, 容量比: 1 を仮定。

部はミセルに取り込まれ可溶化する。ここで、ミセルの移動速度が水相のそれより遅いので、ミセルに可溶化される割合の多い試料分子ほど、管内での移動速度が遅くなる。

管内での分離の様子および検出器で観測されるクロマトグラムを模式的に図 3 に示す。ここでは、水、試料分子、ミセルの 3 種の仮想的な混合物の分離を示してある。実際には、水もミセルも毛細管内に均一に分布しており、図に示したバンド部分で他の所より濃度が高くなっていることを示す。試料分子が全くミセルに可溶化されない場合には、そのような試料は図 3 の水のピークと同じ挙動を示す。一方、水には溶解せずミセル中のみ存在するような試料は、図 3 ではミセルと同じ位置に溶離する。前者の例としてメタノール、後者の例として脂溶性色素のスダン III を挙げることができる。他の試料は、電気的に中性であれば、上記の両極端の間の速度で移動し、クロマトグラムでは水のピークとミセルのピークの間には必ず溶離することになる。このように保持時間の範囲が限定されるのは、分析時間の立場からは利点であり、分離能の点からは欠点といえる。なお、電気的に中性でない試料、すなわちイオンの場合には、上記の分離機構の他にイオン自身の電気泳動が重なってくるので、理論的取り扱いはやや複雑となる。

2. クロロフェノール異性体の分離

フェノールの塩素化物であるクロロフェノール

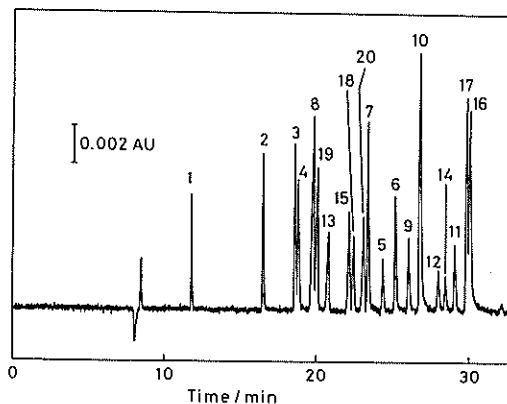


図 4. クロロフェノール類全異性体の界面動電クロマトグラム。

1: フェノール, 2: 2-クロロ, 3: 3-クロロ, 4: 4-クロロ, 5: 2,3-ジクロロ, 6: 2,4-ジクロロ, 7: 2,5-ジクロロ, 8: 2,6-ジクロロ, 9: 3,4-ジクロロ, 10: 3,5-ジクロロ, 11: 2,3,4-トリクロロ, 12: 2,3,5-トリクロロ, 13: 2,3,6-トリクロロ, 14: 2,4,5-トリクロロ, 15: 2,4,6-トリクロロ, 16: 3,4,5-トリクロロ, 17: 2,3,4,5-テトラクロロ, 18: 2,3,4,6-テトラクロロ, 19: 2,3,5,6-テトラクロロ, 20: ペンタクロロ, ミセル溶液: 0.07 M SDS, pH 7.0. 毛細管: 内径 $50\mu\text{m}$, 長さ 65 cm, 分離有効長 50 cm. 印加電圧: 10 kV, 電流: $17\mu\text{A}$. 検出: 220 nm における紫外吸収。

類の一部は、除草剤、殺菌剤として使用されているし、また染料・農薬などの合成中間体としても多く利用されている。しかし、これらのクロロフェノール類には毒性があり、環境汚染、とくに水質汚染と残留が問題となる。

クロロフェノール類には、塩素置換の数が、モノ、ジ、トリ、テトラ、ペンタのものがあり、それぞれに、3, 6, 6, 3, 1 種の異性体が存在する。これに塩素化されていないフェノールを加えて合計 20 種の異性体が存在する。これら異性体の相互分離は容易ではなく、全異性体を一度に分離した例は見当たらない。

本研究では、界面動電クロマトグラフィーによる高性能分離を実証する目的で、クロロフェノール類全異性体の一斉分離を試みた。また、クロロフェノール類は水溶液中では、フェノール性水酸基の一部が解離してイオン化するので、界面動電クロマトグラフィーにおいては、イオン化した試

表 1. 試験試料名

番号	化合物名	p <i>K</i> _a
1	フェノール	9.92
2	2-クロロフェノール	8.52
7	2,5-ジクロロフェノール	7.51
14	2,4,5-トリクロロフェノール	6.72
17	2,3,4,5-テトラクロロフェノール	5.64
20	ペンタクロロフェノール	4.74
21	イエロー OB	—

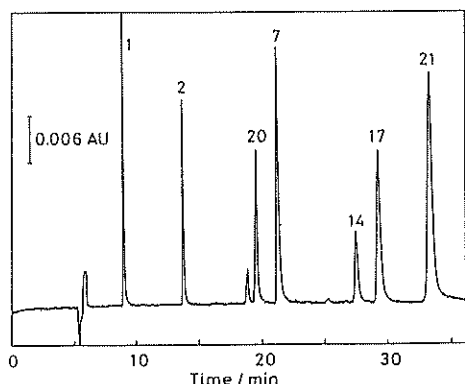


図 5. クロロフェノール類試験試料の界面動電クロマトグラム。
ピーク番号は表 1 の番号に対応。ミセル溶液：
0.1 M SDS, pH 7.0, 印加電圧：15 kV, 電流：
33 μ A. 他の条件は図 4 に同じ。

料自身の電気泳動が、前述の分離機構と同時に起こる。そこで、溶液の pH を変化させて、分離に及ぼす効果も検討した。

図 4 にクロロフェノール類全異性体混合物のクロマトグラムを示す。界面活性剤溶液として、SDS を 0.7 M 濃度に pH 7.0 のリン酸塩-ホウ酸塩緩衝液に溶解したものを用いた。図から明らかなように、分離が完全でないピーク対もあるが全異性体を分離できた。この場合分析時間は約 30 分となっているが、印加電圧を 15 kV に増すと、分離の様子はやや変化するが約 18 分で全異性体をほぼ同じ程度に分離することができた。

イオン性試料の分離に及ぼす pH の効果を調べるために、クロロフェノール類の中から表 1 に示す 6 種の化合物を選び以下の検討に使用した。表 1 には各フェノールの p*K*_a の文献値も示してあ

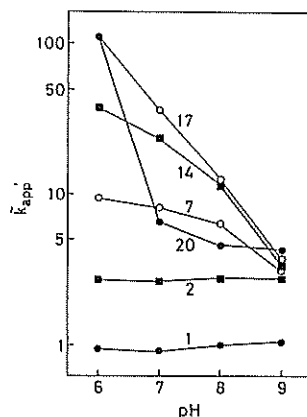


図 6. 見掛けの容量比 \tilde{k}'_{app} の pH 依存性。
番号は表 1 の試料番号に対応。条件は pH を除き図 5 に同じ。

る。また、イエロー OB はスダン III と同様に脂溶性色素であり、ミセルの挙動を見るためのトレーサーとして加えてある。pH 7.0 の 0.1 M SDS 溶液を用いて、表 1 に示すフェノール類を分離した例を図 5 に示す。

界面動電クロマトグラフィーでは、前述のように試料分子が中性であればその保持時間 t_R は、水の保持時間 t_0 (図 5 では約 6 分の位置のピークに相当) とミセルの保持時間 t_{mc} (図 5 ではピーク 21 に相当) との間に必ず入る。試料の容量比 \tilde{k}' を (1) 式に示すように、ミセルに可溶化されている試料のモル数 n_{mc} と水中に存在する試料のモル数 n_{aq} との比と定義する。

$$\tilde{k}' = n_{mc}/n_{aq} \quad (1)$$

容量比 \tilde{k}' はまた、 t_0 , t_{mc} , および t_R を用いて (2) 式のように表せるので、クロマトグラムから各試料の \tilde{k}' を求めることができる。

$$\tilde{k}' = \frac{t_R - t_0}{t_0(1 - t_R/t_{mc})} \quad (2)$$

ここで用いたクロロフェノール類は、実験条件下で一部イオン化しているものがあるので、中性試料に対して求めた (2) 式を用いて \tilde{k}' を求めるのは適当ではないが、図 5 においてどの試料のピークも t_0 と t_{mc} との間にあるので、相対的な保持の目安として見掛けの容量比 \tilde{k}'_{app} を求めることにした。SDS 溶液の pH を変化させた時の各試

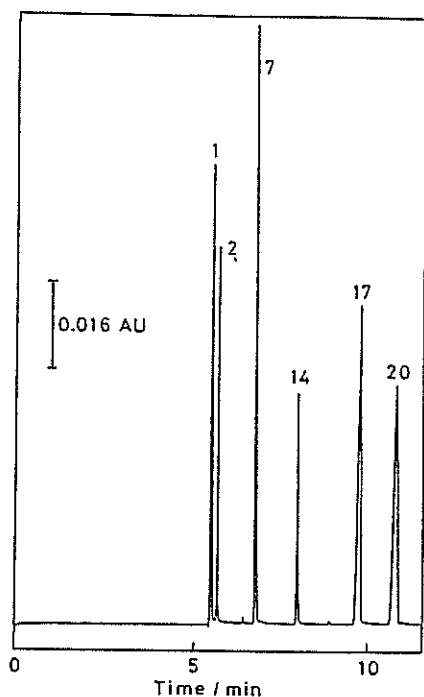


図 7. クロロフェノール類試験試料の電気泳動分離。
電気泳動溶液：リン酸塩-ホウ酸塩緩衝液，pH 7.0。電流：17 μ A。他の条件は図5に同じ。

料の \bar{k}'_{app} の変化を図6に示す。ここで、フェノールと2-クロロフェノールを除いては pH の上昇とともに \bar{k}'_{app} の減少が認められた。

次に、表1の試験用試料を SDS を加えてない緩衝液を用いて分離を試みた結果の1例を図7に示す。この場合には、分離機構として電気泳動のみが働いており、イオン化していない試料の分離は不可能である。図7の条件である pH 7.0 では、フェノールは約 0.12% しかイオン化していないが、2-クロロフェノールは約 2.9% イオン化していると計算され、実際に両者は分離された。なお、図7の条件でも電気浸透流の方が試料の電気泳動よりも速いので、イオン化の程度の低いもの程早く溶離している。

図5に示した界面動電クロマトグラムでは、図7に示した電気泳動による分離が重なって観測されていると考えられる。そこで、pH を変えて測定した電気泳動の結果と図6に示したデータを

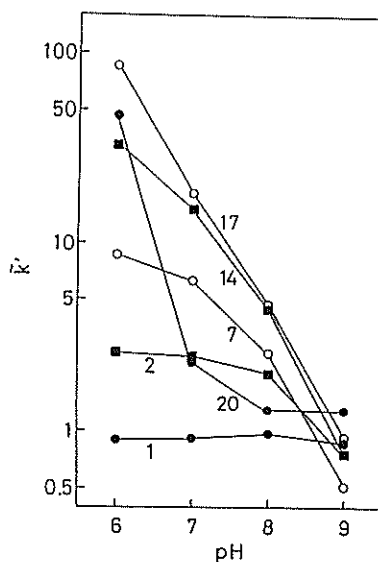


図 8. ミセル可溶化のみによる \bar{k}' の pH 依存性。番号は表1の試料番号に対応。条件は図6に同じ。

用いて、計算によりイオン化した試料の電気泳動による効果を差し引き、試料がミセルに可溶化されることによる分離を評価した結果を図8に示す。SDS ミセルは表面に負の電荷を持ち、フェノキシドイオンも負電荷を持つので、フェノール類はイオン化すると SDS ミセルには可溶化されないと考えられる。しかし、pH 9.0 での結果を見ると、10% ほどしかイオン化しないフェノールはともかく、99% 以上イオン化しているトリクロロフェノール、テトラクロロフェノール、ペンタクロロフェノールでも、 \bar{k}' が0になっていない。このことは、同じ負の電荷を持ったイオンでも SDS ミセルに一部取り込まれていることを示唆しており、ミセル可溶化の機構を考える上で興味深い。

以上、界面動電クロマトグラフィーは、クロロフェノール類の分離に非常に有効であることが明らかとなった。全異性体の一斉分離が必要でない場合には、SDS 濃度、溶液の pH を選択することにより、短時間で効率良く分離できる可能性もある。なお、本実験では定量分析を行っていないが、予備実験の結果では検出限界は注入量にして

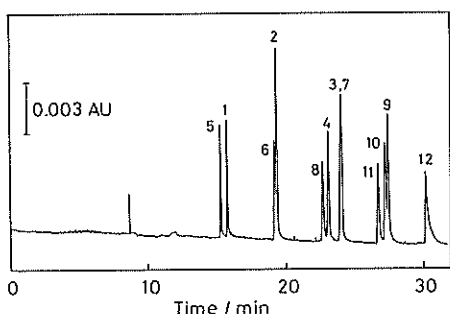


図 9. 芳香族スルフィド 11 種の界面動電クロマトグラム。

1: ベンジルメチル, 2: ベンジルエチル, 3: ベンジルプロピル, 4: ベンジルイソプロピル, 5: メチルフェニル, 6: エチルフェニル, 7: フェニルプロピル, 8: イソプロピルフェニル, 9: プチルフェニル, 10: イソプチルフェニル, 11: s-プチルフェニル, 12: スダンⅢ. ミセル溶液: 0.02 M SDS, pH 7.0. 毛細管: 内径 50 μm , 長さ 90 cm, 分離有効長 75 cm. 印加電圧: 約 21 kV, 電流: 20 μA . 検出: 210 nm における紫外吸収.

50 pg 以下であり, 検量線の直線性も HPLC と比べて悪くはないことも明らかとなったので, 今後は実際の環境分析などに本法を適用してみることが望まれる。

3. 芳香族スルフィド類の分離

界面動電クロマトグラフィーによる構造の類似した化合物の分離例の一つとして芳香族スルフィド類の分析を取り上げた。スルフィド類は一般に悪臭物質であり, 多種知られているが, これらの系統的分離例は少ない。脂肪族スルフィド類はガスクロマトグラフィーによる分離例が多い。芳香族スルフィド類は脂肪族スルフィド類に比べて分析例が少なく, 液体クロマトグラフィーによる分離の報告は見当たらない。本研究では, 芳香族スルフィド類の系統的分離を試みると同時に, 比較的水溶性の低い試料という観点から分離条件の検討を行なった。

図 9 にアルキルフェニルスルフィド 6 種とアルキルベンジルスルフィド 4 種の混合物を 0.02 M SDS 溶液と, 内径 50 μm , 分離有効長 75 cm の毛細管を用いて分離を試みたクロマトグラムを示す。ここで, フェニルプロピルスルフィ

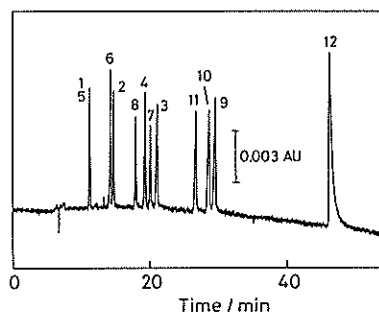


図 10. 芳香族スルフィド 11 種の界面動電クロマトグラム。

ミセル溶液: 0.03 M SDS, pH 7.0 溶液とメタノールとの 80:20 混合溶液. 毛細管: 内径 50 μm , 長さ 65 cm, 分離有効長 50 cm. 印加電圧: 約 22 kV, 電流: 20 μA . 検出, ピークの同定は図 9 参照.

ド (ピーク 7) とベンジルプロピルスルフィド (ピーク 3) とは分離しなかった。

界面動電クロマトグラフィーでは, 容量比が $\tilde{k}'_1, \tilde{k}'_2$ である隣接した二つのピーク間の分離度 R_s は, (3) 式のように書ける。

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{\tilde{k}'}{1 + \tilde{k}'} \frac{1 - t_0/t_{mc}}{1 + (t_0/t_{mc})\tilde{k}'} \quad (3)$$

ここで, $\tilde{k}' = \tilde{k}'_1 = \tilde{k}'_2$ と近似している。また, N は理論段数, α は分離係数で $\tilde{k}'_2/\tilde{k}'_1$ に等しい。図 9 の場合, t_0/t_{mc} の値は約 0.29 であり, R_s を最大にする \tilde{k}' の値は約 2 である。図 9 で分離の悪いピーク対 3 と 7, 9 と 10 では, \tilde{k}' はそれぞれ, 約 9 および 23 であり最適値 2 より著しく大きい。したがって, これらピークの \tilde{k}' を小さくすれば良好な分離が期待できる。 \tilde{k}' を小さくするためには, ミセル濃度を下げるか, 温度を上げる必要がある。図 9 では, SDS ミセル濃度はすでに 0.012 M であり, あまりミセル濃度を低くすると保持時間の再現性が悪くなる恐れがある。温度を上げることは装置上簡単ではないので, ここでは別の手段をとることにした。すなわち, \tilde{k}' を小さくするために, 水と混じり合う有機溶媒をミセル溶液に加えることにした。

図 10 に 0.03 M SDS 溶液とメタノールとの 80:20 混合溶液を用いた場合の芳香族スルフィ

ドのクロマトグラムを示す。各ピークの番号は図9のそれらに対応しており、12はスタンⅢである。この場合、溶液にメタノールが20%入ったので、スタンⅢの一部は溶液中にも存在する可能性があり、スタンⅢの保持時間が必ずしもミセルの保持時間に等しいかどうかは明らかではない。スタンⅢの移動速度がミセルの動きを示していると仮定すると、 $t_0/t_{mc}=0.143$ となり、図9の場合と比べて溶離時期の範囲がかなり広がっていることがわかる。これは、図9と比べて図10では、ピーク12が著しく遅く溶離していることから明らかである。また、図10の方が各ピークの k' が全体に小さくなっており、ピーク1と5の対を除いては分離が良くなっている。ピーク1と5の k' は0.95となり、最適値より小さくなりすぎたために分離が悪くなったと考えられる。有機溶媒を加えたために k' が小さくなったのは、試料分子のミセルに取り込まれる割合に対して液相中に存在する割合が増したことを意味しており、液相中への試料の溶解度が増した結果と解釈できる。

これまで HPLC による分離の報告が見られなかった芳香族スルフィド類は、界面動電クロマトグラフィーにより分離可能であることが明らかとなった。このような試料は水への溶解度が低いので、分離を良くするためにはミセル濃度の低い溶液を用いる必要があるが、溶液に水と混じり合う有機溶媒を加えると、ミセル濃度をあまり低くすることなく良好な分離が得られることも明らかとなった。SDS 溶液にメタノールを添加した場合には、各試料の相対的な保持にはあまり影響せず、容量比 k' を小さくする効果が大きいように思われる。しかし、ミセル溶液に有機溶媒を加えることが分離に及ぼす効果については、今後さらに系統的な検討が必要である。

4. シクロデキストリンの包接作用を利用する分離

シクロデキストリン (CD) は D (+) グルコピラノースが α -1, 4-グルコシド結合により環状につながったオリゴ糖であり、グルコース単位が6個のものを α -CD、7個のものを β -CD と呼ぶ。環状

になっている分子の空孔は疎水性で、空孔の大きさに合う化合物と特異的にホスト・ゲスト錯体 (包接錯体) を生成する。このような CD の性質に注目して広い分野で研究が行なわれている。分析化学分野での応用例の一つとして、CD 誘導体を固定化した HPLC 用充填剤があり、その特異的な分離能の有用性が多く報告されている。

本研究では、界面動電クロマトグラフィーにおいて、ミセルの代わりに CD を用い、分離機構として CD による包接錯体の生成を利用することを試みた。CD はそのままでは中性なので電気泳動により動かすことはできない。そこで、 β -CD にカルボキシル基を1個導入した 2-O-カルボキシメチル- β -シクロデキストリン (β -CMCD) を合成し、pH 7.0 の緩衝液に溶解してカルボキシル基をイオン化させ電気泳動を行なった。実験的には、前述のミセル溶液の代わりに β -CMCD 溶液を用いればよい。試料としては、 β -CD と包接錯体を生成しやすいベンゼンのジおよびトリ置換体を主として用いた。

クレゾール3種を分離したクロマトグラムを図11に、キシリジン異性体6種のクロマトグラムを図12に示す。どちらの化合物も通常の逆相 HPLC では異性体の完全な分離は困難である。両クロマトグラムとも β -CMCD を pH 7.0 のリン酸塩緩衝液に 0.025 M 濃度に溶解したものをを用いた。なお、 β -CMCD を加えていないリン酸塩緩衝液を用いた場合、または β -CMCD の代わりに α -CD を加えた場合には、これら異性体は全く分離しなかった。

実験条件の pH 7.0 では β -CMCD はイオン化しており、電気泳動により正極方向へ引張られているので、電気浸透によって負極方向へ動いている溶液全体よりは遅い速度で移動する。したがって、 β -CMCD と強く錯体を生成するもの程保持時間が長くなるはずである。図11におけるクレゾールの溶離順は、*o*-, *m*-, *p*-体の順であり、これは既に報告されている β -CD との包接錯体の生成定数の大きくなる順と一致している。本研究で用いた他の試料についても、 β -CD との包接錯体の生成しやすさのわかっているものについては、予

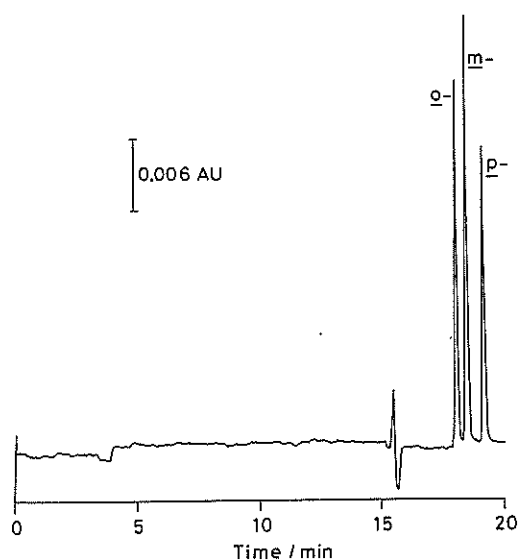


図 11. クレゾール異性体の界面動電クロマトグラム。

分離用溶液: 0.025 M β -CMCD 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 溶液。毛細管: 内径 50 μ m, 長さ 65 cm, 分離有効長 50 cm, 印加電圧: 約 12 kV, 電流: 50 μ A, 検出: 210 nm における紫外吸収。

測通りの分離順が観測された。キシリジン, キシレノールなどのトリ置換ベンゼンについては β -CD との包接錯体の生成定数は報告されていないが, 図 12 の分離順に錯体を生成しやすくなっているものと考えられる。

界面動電クロマトグラフィーにおいて容量比 k' を求めるためには, 前述のように, 全く保持されない試料の保持時間の他に, この場合だと β -CMCD の保持時間を知る必要がある。そのために, β -CMCD と非常に強く包接錯体を生成すると考えられるヨウ素をトレーサーに用いて β -CMCD の保持時間を測定することを試みたが, ヨウ素のピークは観測されなかった。実験条件が界面動電クロマトグラフィー条件とやや異なってしまうが, β -CMCD 溶液調製に用いたリン酸塩緩衝液中での β -CMCD の電気泳動速度を, 200 nm での紫外吸収で検出して直接測定した。その結果, β -CMCD の移動速度は, 電気浸透流速の 0.71 倍と推定された。保持時間の範囲にすると, 包接

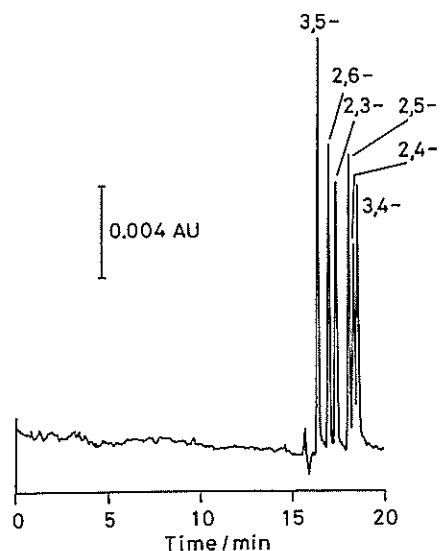


図 12. キシリジン異性体の界面動電クロマトグラム, 条件は図 11 に同じ。

錯体を全く生成しないものの保持時間とその 1.4 倍の間の極めて狭い範囲となっている。このように保持時間の範囲が狭いと, (3) 式から, 分離度が悪くなると予想される。実際に, 本実験ではいずれの場合も保持時間の範囲が狭く, 多数の化合物を一斉に分離するのは困難であった。このように保持時間の範囲が狭いのは, 電気浸透流に比較して β -CMCD の電気泳動速度が小さすぎるためである。したがって, 分離度を大きくするためには, CD 誘導体の電気泳動速度を大きくするか, または電気浸透流速を小さくする必要がある。

以上, CD の包接作用を利用した界面動電クロマトグラフィーについて初歩的な実験を行ない, 本法が特異性の高い分離分析法として有望なことを明らかにした。ミセルは界面活性剤分子が 100 個程会合した分子集合体であり, 水中に均一に分散した非常に微小な油滴になぞられることができ, ミセルを用いた界面動電クロマトグラフィーは, 一種の液-液分配型とみなすこともできたが, 上記 CD の場合には, 溶液中の CD 1 分子と試料 1 分子とが錯体を生成するので, もはや分配に関与するのは相ではなく, 溶液中の個々の分子であ

るので、クロマトグラフィーと呼ぶには適当でないかも知れない。しかし、分離法の原理はクロマトグラフィーそのものであり、クロマトグラフィーの拡張とも解釈できる。

今後の課題

本研究で計画した内容はほぼ予定通り終了することができた。これまでの研究により、界面動電クロマトグラフィーの新しいクロマトグラフィーとしての基本的な性質、原理面での展開の可能性、高性能分離法としての応用の可能性などを明らかにすることができた。

今後に残された課題は多く、装置および応用技術の両面とも、一層の進展が必要である。装置については、これまで研究目的にのみ使用してきたので、操作性の多少の不便は問題ではなかったが、本法が HPLC と同様に広い分野で利用されるようになるためには、操作性の良い装置の開発が必須である。とくに、試料注入法の改良および紫外吸収法以外の検出法の開発が強く望まれる。

応用技術の面では、本法は HPLC と電気泳動法との両分析法を結合したものとも言え、両者の応用技術の大部分は本法に適用可能であると考えられる。分離機構に限っても、本研究ではミセル可溶性現象と包接錯体の生成のみを取り上げたが、他の錯体生成、イオン交換、配位子交換などの反応も考えられる。既に、他の研究者らにより界面動電クロマトグラフィーの新しい応用技術も数報発表されている。

本法の欠点の一つは、現在の装置、方法を用いる限り試料量が分析スケールに限定されることである。しかし、目的は分析に限らず、ミセル可溶性における熱力学的関数の測定など、物理化学データの簡便な測定法としても有用である。多量の試料を取り扱うのは、中空毛细管を使用していたのでは不可能で、分取目的には、ポリアクリルアミドゲルのような不活性担体の利用が必要であろう。

界面動電クロマトグラフィーは、中川俊夫博士の提案を参考に、我々が初めて開発した分離分析法であり、これまでの研究は初歩的なものに限ら

れていた。今後のいっそうの発展のためには、この方面に興味のある多くの研究者により、広い範囲で使用されるようになることが望まれる。そのためにも市販の装置の出現が強く期待される。

謝 辞

本研究は代表者が1人で行ったものではなく、安藤貞一教授（現京都大学名誉教授）、大学院博士課程学生大塚浩二氏（現日本学術振興会特別研究員）、学部学生尾崎祐人氏（現鐘淵化学工業社員）他数人の大学院および学部学生諸氏との協同研究によるものである。本研究を始めるに当たり中川俊夫博士より有益なご助言をいただいた。また、実験技術および結果の解析等で多くの関係者のご教示をいただいた。始めたばかりの新しい研究であったが、(財)日産科学振興財団および文部省科学研究費補助金による研究助成を受けることができ、研究の進展に非常に有効であった。以上、すべての関係者に深く感謝の意を表したい。

関連発表論文

- 1) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya and T. Ando: Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries, *Anal. Chem.*, **56**, 111-113 (1984).
- 2) S. Terabe, K. Otsuka and T. Ando: Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary, *Anal. Chem.*, **57**, 834-840 (1985).
- 3) S. Terabe, H. Ozaki, K. Otsuka and T. Ando: Electrokinetic Chromatography with 2-O-Carboxymethyl- β -cyclodextrin as a Moving "Stationary" Phase, *J. Chromatogr.*, **332**, 211-217 (1985).
- 4) K. Otsuka, S. Terabe and T. Ando: Electrokinetic Chromatography with Micellar Solutions: Separation of Phenylthiohydantoin-Amino Acids, *J. Chromatogr.*, **332**, 219-226 (1985).
- 5) K. Otsuka, S. Terabe and T. Ando: Electrokinetic Chromatography with Micellar Solutions: Retention Behaviour and Separation of Chlorinated Phenols, *J. Chromatogr.*, **348**, 39-47 (1985).
- 6) 大塚浩二, 寺部 茂, 安藤貞一: ミセル溶液を用いる界面動電クロマトグラフィーによる芳香族スルフィド類の分離, *日本化学会誌*, 950-955 (1986).