

論文内容の要旨

Novel and Functional Stationary Phase for Capillary Electrochromatography

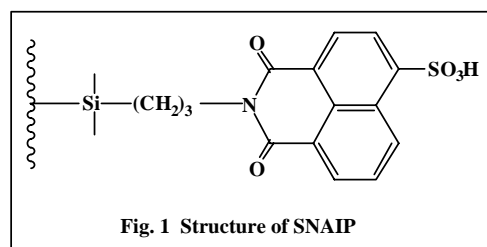
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻

大山 要

[目的]

現在、分離分析法として最も汎用性の高い高速液体クロマトグラフィー (HPLC) はこれまで数多くの分析に適用されてきた。しかし、圧力送液を利用する HPLC では分離の高速化や分離能の向上に限界のあることが指摘されてきた。そこで近年、多成分の一斉分離を高速化する手段として、キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) が注目されている。CEC は内径 100 μm 以下のキャピラリーに充填剤を充填して分離を行うことから、キャピラリー電気泳動 (CE) と HPLC の長所を融合した技法として位置づけられる。CEC の特筆すべき長所は、CE と同様にサンプルゾーンの拡散を抑制できる電気浸透流 (EOF) を送液に利用するため、HPLC に比べ圧倒的に高い分離能と迅速性が得られるという点である。しかし、CEC はその潜在能力の高さにもかかわらず、実用的な分離分析法として広く認知されるに至っていない。この原因としては、1) CEC の特性に適した CEC 専用充填剤の開発が進捗していない、2) HPLC などの分析法に比べ、実試料分析への適用性が十分に実証されていない、などが考えられる。特に、これまでの CEC ではオクタデシルシリカ (ODS) などの HPLC 用充填剤を転用する例がほとんどであり、この場合、酸性条件下で分離に長時間を要する点やイオン性物質の保持が困難であるという点が問題視されてきた。

本研究では、上記の問題点を解決する目的で、新たに CEC 用充填剤を開発し、その性能評価を行った。また、CEC が迅速な実用分析法として有用であることを生体試料分析において確認した。



[結果・考察]

CEC 用新規充填剤の開発¹⁻⁴

3-(4-sulfo-1,8-naphthalimido)propyl-modified silyl silica gel (SNAIP) の評価

従来のシリカ系充填剤を用いた場合に酸性条件下で分離時間が延長する

のは、キャピラリー内壁及び充填剤表面のシラノール基の解離が抑制され、EOF が著しく低下するためである。そこで、低 pH でも解離の起きるスルホン酸基を備えた CEC 用新規充填剤 SNAIP (Fig. 1) を調製した。まず、SNAIP を用いた際の EOF 特性について調べたところ、酸性条件下でも十分な EOF を確保することができた。さらに、実際の分離でも SNAIP の迅速性が発揮され、5 種類のバルビツール酸類が 3 分以内で分離

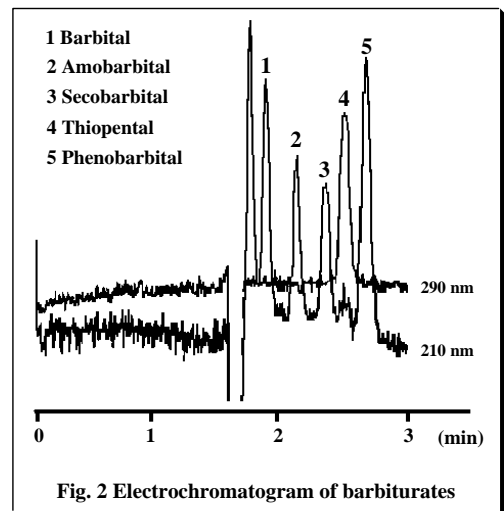


Fig. 2 Electrochromatogram of barbiturates

可能となり (Fig. 2), ODS に比べ分離時間の大幅な短縮が達成できた。次に、SNAIP の保持機構について調べた結果、複数の相互作用 (疎水性相互作用、静電気相互作用及び電子相互作用) が期待通り保持機構に関与することが明らかとなった。

SNAIP の複数の相互作用は、これまで中性物質などに限られてきた CEC の適用範囲をイオン性物質を含む広範囲な物質に拡大するために有用であると考えられた。そこで、SNAIP を 8 種類のペプチドの一斉分離に適用したところ、ODS カラムでは分離が困難なペプチドを良好に分離することができた。ペプチド分離を指向した CEC において、陽イオン交換型充填剤は保持が静電気相互作用のみに依存するため、塩基性ペプチドの保持が強く溶出しにくいことが報告されている。これに対し、SNAIP は静電気相互作用が比較的弱く、塩基性ペプチドの溶出が容易であるという特長を示した (Fig. 3)。一方、極性が高く、逆相分配モードでの分離が困難とされる核酸及びヌクレオシドの分離においても、高極性な移動相の使用により良好な分離が得られた。

以上の結果から、SNAIP が CEC の特性に合致し、CEC の適用範囲を拡大する有用な充填剤であることが証明された。

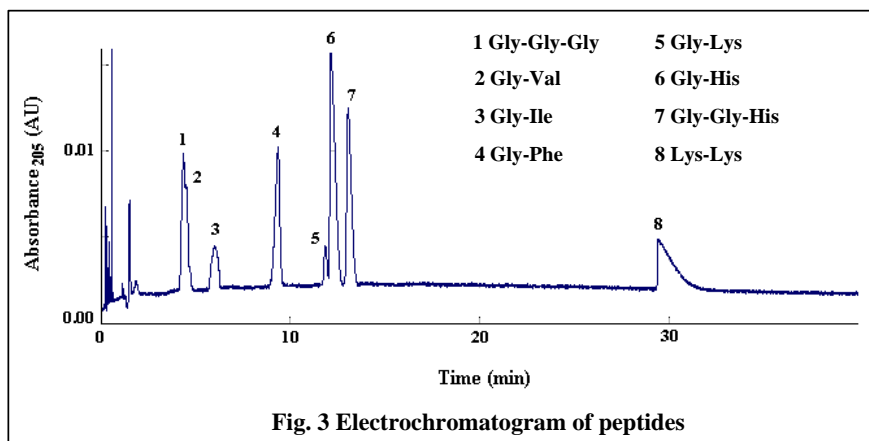


Fig. 3 Electrochromatogram of peptides

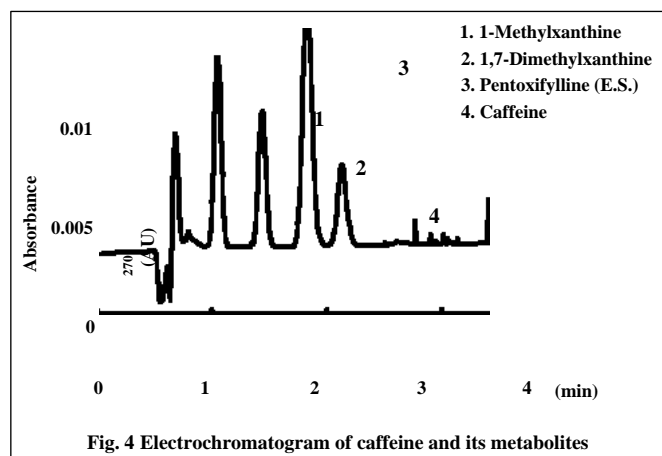
CEC の実試料分析への応用⁵⁻⁷

ヒト血清中バルビツール酸類の定量

鎮静薬、催眠薬として広く使用されるバルビツール酸類は自殺や殺人目的に使用される事例があるため、バルビツール酸類の迅速な同定は重要である。そこで血清試料の前処理後、充填剤 3-(1,8-naphthalimido)propyl-modified silyl silica gel を用いて CEC 分析を行ったところ、4 種類のバルビツール酸類を約 4 分で分離できた。これは HPLC の分離時間と比較して 1/4 という短時間であった。さらに、キャピラリーカラムの耐久性の評価として血清試料を連続測定 (56 回) する前後の保持時間の比較を行った。その結果、EOF の僅かな減少は見られたが、連続測定による保持及び分離への大きな影響は見られず、実試料分析においても十分な耐久性を有することが実証できた。

ラット脳中カフェイン及びその代謝物の測定

脳内に移行する薬物の定量ではマイクロダイアリシス法 (MD) による脳透析液の HPLC 分析等が広く用いられている。しかしながら、HPLC を分析手段とすると、必要な試料量の確保及び分離に長時間を要する。そこで、カフェイン静注後のラット脳透析液中に含まれるカフェイン及びその代謝物の CEC 定量を行った。その結果、カフェインと 2 種類の代謝物を約 3 分で分離することが可能となり (Fig. 4), HPLC と比較して大幅な分離時間の短縮が得られた。この検討により、CEC が MD 試料の詳細な解析手段として有用であることを示すことができた。



[文献]

1. K. Ohyama et al., *J. Chromatogr. A*, **1042**, 189-195 (2004).
2. K. Ohyama et al., *Electrophoresis*, **25**, 3224-3230 (2004).
3. K. Ohyama et al., *J. Chromatogr. A*, **1064**, 255-259 (2005).
4. K. Ohyama et al., *J. Sep. Sci.*, **28**, 767-773 (2005).
5. K. Ohyama et al., *Electrophoresis*, **25**, 594-599 (2004).
6. K. Ohyama et al., *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 396-399 (2004).
7. K. Ohyama et al., *Electrophoresis*, **26**, 812-817 (2005).