

ノ ー ト

ポリビニルピロリドン水溶液を泳動溶液に用いるキャピラリー
電気泳動法によるカテコール類の分離高橋 浩司*, 今任 稔彦[®]*, 浦 信夫**Separation of catechol derivatives by capillary electrophoresis using
a polyvinylpyrrolidone solution

Koji TAKAHASHI, Toshihiko IMATO* and Nobuo URA**

*Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-81

**Soma Optics Co., Ltd., Hinode-machi, Nishitama-gun, Tokyo 190-01

(Received 10 January 1997, Accepted 19 February 1997)

A poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP) solution was used as a running buffer solution of capillary electrophoresis (CE) for the separation of catechol derivatives. No improvement in the separation efficiency between the cationic catechol derivatives, such as dopamine and epinephrine, was observed when a phosphate buffer solution containing PVP was used as the running buffer. This may have been due to a weak interaction of the cationic catechol derivatives with PVP. On the other hand, the separation efficiency between anionic catechol derivatives, such as caffeic acid, DOPAC including ascorbic acid, was greatly improved by the addition of PVP to the phosphate buffer solution, compared with the buffer solution without PVP. The improvement in the separation efficiency was due to the difference in the interaction of the solutes with PVP. The mobility of the anionic solutes in the presence of PVP, which was calculated from the migration times of the solutes and a neutral marker, increased in the order caffeic acid < DOPAC < ascorbic acid. This sequence suggests that the interaction of the solutes with PVP is larger in the order ascorbic acid < DOPAC < caffeic acid. The formation constants of the PVP complex with the solutes were estimated from the relationship between the PVP concentration in the running buffer and the mobility of the solutes obtained in this work.

Keywords : capillary electrophoresis; polyvinylpyrrolidone; catechol derivatives.

1 緒 言

キャピラリー電気泳動 (CE) 法による溶質の分離に

は、主に電気浸透流速度と溶質の電気泳動速度の大小が大きな影響を与える。従って、同じ電荷数を持ち、類似の分子構造を持つ溶質種を CE 法により分離する場合には十分な分離効率が得られない場合がある。このような場合、泳動溶液に溶質間で相互作用の異なる成分 (添加剤) を添加し、分離効率を高めることができる。例えばシクロデキストリンやホウ酸などの添加剤は、光学異

* 九州大学工学部: 812-81 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

** (株)相馬光学: 190-01 東京都西多摩郡日の出町大久野 114-4

性体や糖質の分離効率向上に利用されている^{1)~4)}。これはシクロデキストリンの光学異性体の包接能の差異やホウ酸-糖の複合体形成の安定性の違いが溶質の電気泳動速度に変化を与えるためである。一方、水溶性高分子を泳動溶液に加えた CE 法も報告されている。例えばポリアクリルアミドを用いた系では、高分子鎖どうしのからみ合いにより形成される、いわゆる分子ふるいにより、分子量の異なる核酸やタンパク質の分離を行うことができる⁵⁾。又、ポリスチレンスルホン酸やポリジメチルジアリルアンモニウム塩などの高分子電解質を利用するイオン種間の CE 分離も報告されている⁶⁾。高分子を添加剤とする分離性向上の利点の一つは、低分子添加剤に比べて、生成する溶質-高分子複合体の大きな分子サイズのために、電気泳動速度の差を大きく反映でき、又 1 本の高分子鎖に幾つもの複合体形成基を有するので、低分子に比べて大きな複合体形成能を持つことである。いわゆる高分子効果と呼ばれるものである。従って、複合体形成能を持つ水溶性高分子の泳動溶液への添加は、CE 法の分離能を格段に向上するものと期待される。

水溶性の高分子の一つであるポリ(*N*-ビニル-2-ピロリドン) (PVP) は、水溶液中でカテコール類をはじめとする様々な芳香族化合物と特異的な複合体形成能を持つことが知られている⁷⁾⁸⁾。著者らはこの PVP の特性に着目し、カテコールアミン類に選択的に応答する電気化学センサーの開発を目的として、これまでにこの PVP をグラファイト電極表面に γ 線照射により架橋・修飾した電極を試作した⁹⁾¹⁰⁾。その結果、カテコールに対する応答感度が未修飾の電極と比べて増大し、アスコルビン酸の妨害を軽減することを確認した。これまでの検討の結果から、この電極の応答性の差異は、架橋した PVP 膜への溶質の分配性の差異によるものであることが分かった。又、架橋 PVP の充てんカラムを用いた液体クロマトグラフ法の研究も行われ、このカラムがフェノール誘導体の分離に有効であることが報告されている¹¹⁾。

以上の知見から、水溶性の PVP を CE の泳動溶液の添加剤とすれば、類似の構造を持つカテコール類の分離の効率を向上できるものと期待される。本報は、陰、陽イオン性のカテコール類の分離効率に及ぼす PVP の添加効果を検討するとともに、PVP 単量体の類似化合物である *N*-メチル-2-ピロリドン (MP) を添加剤とした場合の分離効率と比較検討した結果について報告する。

2 実 験

2.1 装 置

高圧電源には松定プレジジョンデバイセズ製

(HCZE-30PN 0.25) を用い、印加電圧は 15 kV とした。検出器には相馬光学製の紫外可視分光光度検出器 (S-3702) のセル部を改造して用いた。記録計は横河電機製 (3660) を用いた。

キャピラリーは内径 75 μm 、長さ 80 cm の溶融シリカキャピラリー (ジーエルサイエンス製) を用いた。キャピラリーの中央部の 40 cm の部分のポリイミド被膜を長さ約 1 mm はく離し、検出用の窓とした。キャピラリーは内部に 0.1 M ($M = \text{mol dm}^{-3}$) KOH 水溶液を一夜封液した後、イオン交換水で洗浄して用いた。実験は室温 (約 20~25°C) で行った。試料注入は落差法により陽極から 10 秒間導入した。

2.2 試薬及び溶液の調製

PVP (K-30, 平均分子量約 40000 及び K-15, 平均分子量約 10000), MP, カテコール, アスコルビン酸はキシダ化学製, エピネフリン, カフェー酸は東京化成製, 3-ヒドロキシチラミン (ドーパミン) は Sigma 製, 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) は Aldrich 製のものを用いた。

泳動溶液には、次の 3 種をそれぞれ調製して用いた。

0.02 M リン酸緩衝液: 0.1 M NaH_2PO_4 水溶液及び 0.1 M K_2HPO_4 水溶液を調製し、それぞれ 10 ml ずつを混合し、水で 100 ml に希釈した。

0.1 M PVP を含むリン酸緩衝液: PVP 11.13 g を水に溶かして 100 ml とし、モノマー単位濃度で 1 M の PVP 水溶液を調製した。この水溶液 10 ml に 0.1 M NaH_2PO_4 水溶液及び 0.1 M K_2HPO_4 水溶液をそれぞれ 10 ml ずつ混合し、水で 100 ml に希釈した。PVP 濃度の影響を調べる際には、同様に 1 M PVP 溶液の採取量を変えたリン酸緩衝液を調製した。

0.1 M MP を含むリン酸緩衝液: MP 9.6 ml を水に溶かして 100 ml とし、1 M の MP 水溶液を調製した。この MP 水溶液 10 ml に 0.1 M NaH_2PO_4 水溶液及び 0.1 M K_2HPO_4 水溶液をそれぞれ 10 ml ずつ混合し、水で 100 ml に希釈した。調製した泳動溶液の pH はいずれも 6.8 であった。

3 結果と考察

3.1 陽イオン性カテコール類の CE による分離

電気的に中性のカテコールを電気浸透流のマーカーとして含み、ドーパミン、エピネフリンの混合溶液を試料とした。ドーパミンとエピネフリンは pH 6.8 の緩衝液中ではアミノ基がプロトン化された陽イオンとして存在する。Fig. 1 は各 5 mM のドーパミン、エピネフリン

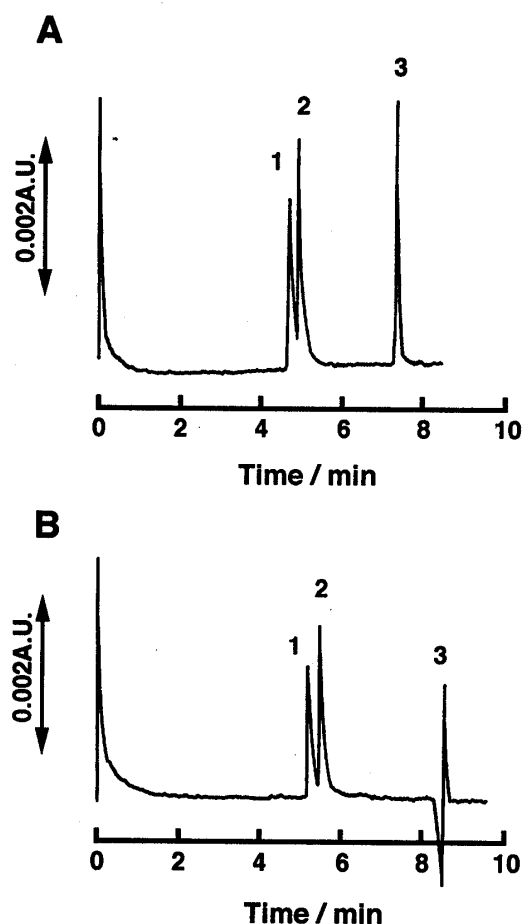


Fig. 1 Electropherograms of cationic catechol derivatives

(A): 0.02 M phosphate buffer (pH 6.8); (B): 0.1 M PVP (mean molecular weight: 40,000) + 0.02 M phosphate buffer (pH 6.8); Conditions: 80 cm \times 75 μ m fused silica capillary (40 cm to detector), 15 kV applied voltage, injection for 10 s by gravity (5 cm height), 230 nm wavelength of detector. Peak identifications: (1), dopamine; (2), epinephrine; (3), catechol

及びカテコールの混合溶液のエレクトロフェログラムである。Fig. 1(A) は泳動溶液として 0.02 M のリン酸緩衝液を用いたものであり、(B) はモノマー単位で 0.1 M の平均分子量 40000 の PVP を含む 0.02 M のリン酸緩衝液を用いた場合である。検出波長 230 nm においては泳動溶液中の PVP が光吸収するために、(B) のエレクトロフェログラムのベースラインは (A) のそれに比べて高いので、カテコールは (B) の場合は負のピークとして観測されている。

Fig. 1 から分かるように、泳動溶液への PVP の添加によりカテコールの移動時間は約 1 分長くなっている。

カテコールは電氣的に中性であるので電気浸透流のみで移動する。従って、泳動溶液の種類によらず、電気浸透流速度が同じであれば、カテコールの移動時間は同じであると考えられる。一般に、電気浸透流速度は、キャピラリー内壁のゼータ電位と泳動溶液の誘電率と粘度によって決まることが知られている¹²⁾。従って、Fig. 1 のように泳動溶液への PVP の添加によりカテコールの移動時間が長くなっているのは、PVP を含む泳動溶液の電気浸透流速度が低下したためであり、それは泳動溶液の粘度の増加、あるいは PVP のキャピラリー内壁への吸着によるキャピラリー内壁のゼータ電位の低下によるものと考えられる。一方、ドーパミン、エピネフリンの陽イオン性の溶質は、電気浸透流に加えて正の電気泳動の効果により、カテコールより移動時間は短い。二つの陽イオン性のカテコール誘導体が PVP と相互作用をすると、溶質の分子量が増大（分子サイズが増大）する効果のため、電気泳動速度は減少し、従って溶質の移動時間は PVP を添加しない場合に比べて長くなると予測される。しかし、上述のように泳動溶液への PVP の添加によって電気浸透流速度が低下しているので、溶質の移動時間の差から直接的に溶質と PVP の相互作用の有無を判断できない。そこで、溶質の移動時間から見掛けの泳動速度を算出し、中性のカテコールの移動時間から電気浸透流速度を算出し、両者の差から各溶質の電気泳動速度を算出した。その結果、ドーパミンとエピネフリンの電気泳動速度は、泳動溶液に PVP を加えた場合、それぞれ 2.71 及び $2.33 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、PVP を加えない場合、それぞれ 2.75 及び $2.35 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。すなわち、泳動溶液への PVP の添加によるドーパミンとエピネフリンの電気泳動速度には有意な差異は見られなかった。従って PVP とこれら溶質との相互作用は小さいものと推測される。このことは、著者らの架橋 PVP 樹脂を充てんしたカラムによるドーパミンとエピネフリンの液体クロマトグラフの保持挙動の予備的実験結果と一致している。

3・2 陰イオン性カテコール類及びアスコルビン酸の CE による分離

試料としてカテコールの構造を持つカフェー酸、DOPAC 及びしばしば生体中でカテコールアミン類と共存するアスコルビン酸を用いて CE 分離を行った。検出器の検出波長は 275 nm である。ほかの実験条件は Fig. 1 と同様である。Fig. 2 に 5 mM のカフェー酸、DOPAC、アスコルビン酸及びカテコールの混合溶液のエレクトロフェログラムを示す。Fig. 2(A) は泳動溶液

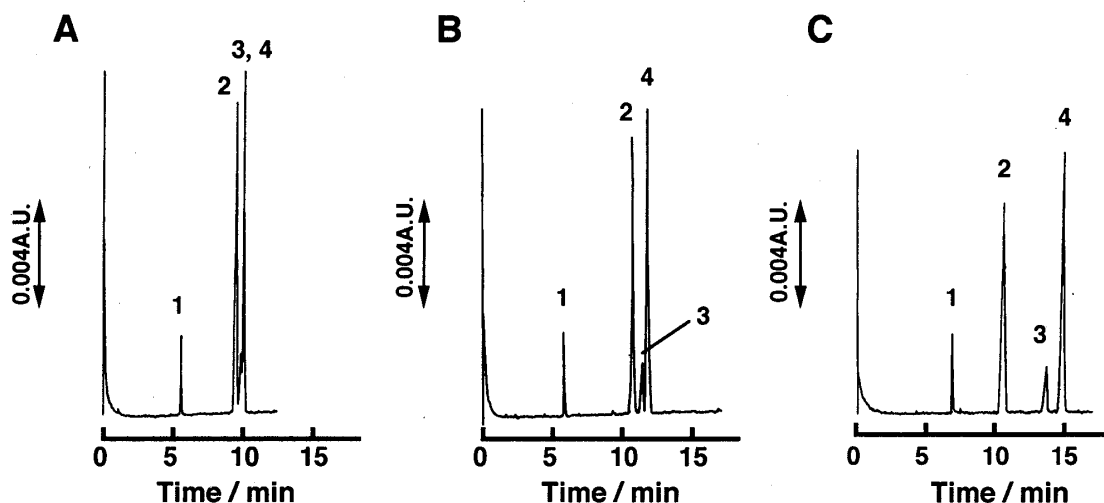


Fig. 2 Electropherograms of anionic catechol derivatives and ascorbic acid

(A): 0.02 M phosphate buffer (pH 6.8); (B): 0.1 M MP+0.02 M phosphate buffer (pH 6.8); (C): 0.1 M PVP (mean molecular weight: 40000)+0.02 M phosphate buffer (pH 6.8); Peak identifications: (1), catechol; (2), caffeic acid; (3), DOPAC; (4), ascorbic acid. Other conditions are the same as in Fig. 1, except for detector wavelength, 275 nm.

としてリン酸緩衝液のみを用いたものであり、(B)は単量体であるMPを0.1 Mの濃度で含むリン酸緩衝液、(C)はモノマー単位で0.1 Mの平均分子量40000のPVPを含むリン酸緩衝液を用いた場合である。電氣的に中性のマーカーであるカテコールの移動時間はいずれの泳動溶液においても同じであるべきであるが、特にPVPを添加した場合、移動時間がほかの二つの泳動溶液に比べて長くなっている。これはFig. 1の場合と同じ現象であり、電気浸透流速度が低下しているためである。一方、カフェー酸、DOPAC及びアスコルビン酸は、pH 6.8の緩衝液中では陰イオンとして存在するので、負の電気泳動効果のために、(A)～(C)のいずれの場合とも、各溶質の移動時間はカテコールのそれよりも長くなっている。Fig. 2(A)のように、リン酸緩衝液を泳動溶液とした場合、DOPACとアスコルビン酸は分離せず、又カフェー酸とも移動時間が極めて接近している。Fig. 2(B)から分かるように、MPの泳動溶液への添加により、三つの成分の分離性が若干向上しているものの、DOPACとアスコルビン酸の分離は十分ではない。これに対して、Fig. 2(C)に見られるように、泳動溶液へのPVPの添加により、カフェー酸、DOPAC及びアスコルビン酸の分離が完全になされている。これは各溶質のPVPに対する相互作用の大きさの違いによる

ものである。すなわち、溶質がPVPと相互作用することにより、分子サイズの大きな複合体を形成し、PVPと相互作用しない溶質に比べて負の電気泳動速度が低下するためである。3・1項で述べたように、カテコールの移動時間より算出した電気浸透流速度を考慮して各溶質の電気泳動速度を算出すると、PVPを含まない泳動溶液を用いた場合のカフェー酸、DOPAC及びアスコルビン酸の電気泳動速度はそれぞれ -2.73 、 -2.87 、 $-2.96 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である。一方、泳動溶液に0.1 M PVPを含む場合の三つの溶質の電気泳動速度はそれぞれ -1.80 、 -2.57 、 $-2.77 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である。これらの値から、泳動溶液へのPVPの添加による溶質の電気泳動速度の変化の割合は、アスコルビン酸<DOPAC<カフェー酸の順に大きい。このことは、PVPとの相互作用がアスコルビン酸<DOPAC<カフェー酸の順に大きくなることを示している。PVPとカテコール類との相互作用にはPVPの窒素や酸素原子とカテコール類の水酸基との水素結合、PVPのアミド基とカテコール類の芳香環の π 電子の電荷移動相互作用、あるいは疎水的相互作用があり、これらにより複合体を形成すると考えられている⁷⁾⁸⁾。カフェー酸はDOPACやアスコルビン酸よりも π 電子が多く、又疎水性も高いので、ほかの二つの溶質よりも相互作用が大きいもの

と推測される。一方、アスコルビン酸においては PVP とは水素結合のみの相互作用しか存在しないと考えられるので、DOPAC やカフェー酸に比べて PVP との相互作用は小さいものと推測される。各溶質の電気泳動速度の順序は以上の推測による相互作用の大小により説明することができる。

Fig. 2(C) と同じ実験条件下で平均分子量 40000 の PVP の代わりに、平均分子量 10000 の PVP を用いて各溶質の CE を行った。その結果、泳動溶液に 0.1 M PVP を含む場合のカフェー酸、DOPAC 及びアスコルビン酸の溶質の電気泳動速度はそれぞれ -2.04 , -2.71 , $-2.90 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。平均分子量が 40000 の PVP を同濃度で含む泳動溶液を用いた場合と比較すると、PVP 添加に伴う溶質の電気泳動速度の変化の割合は小さい。このことは、平均分子量がより大きい PVP のほうが溶質との相互作用が若干大きいことを、あるいは PVP-溶質複合体の分子サイズが大きいことを示唆している。

一方、等しいモノマー単位濃度の MP と PVP を含む泳動溶液について、溶質の電気泳動速度の変化の割合を比較した場合、PVP を添加した泳動溶液を用いた場合のほうが大きい。これは高分子効果により、溶質との相互作用は単量体よりも PVP 高分子のほうが大きいためであると考えられる。

3.3 電気泳動速度と泳動溶液中の PVP 濃度の関係

泳動溶液中の PVP の濃度が溶質の電気泳動速度に及ぼす影響を調べるために、PVP 濃度の異なる泳動溶液を用いて、カフェー酸、DOPAC 及びアスコルビン酸の CE を行った。PVP 濃度以外の実験条件は Fig. 2(C) と同じである。Fig. 3 はカフェー酸、DOPAC、アスコルビン酸について、前述のように電気浸透流速度を考慮して算出した各溶質の電気泳動速度を泳動溶液中の PVP 濃度に対してプロットしたものである。アスコルビン酸や DOPAC に比べてカフェー酸において電気泳動速度の変化が顕著であることが分かる。すなわち、PVP 濃度の増加に従って、カフェー酸の負の電気泳動速度が大きく低下している。このことは、3.2 項で述べたようにカフェー酸がほかの溶質に比べ、PVP との相互作用が大きいことを示している。

PVP と溶質の複合体の形成反応が次式で表されると仮定する。すなわち PVP の単量体 1 mol が溶質 (CA で表す) 1 mol と複合体 (PVP-CA) を形成するとする。

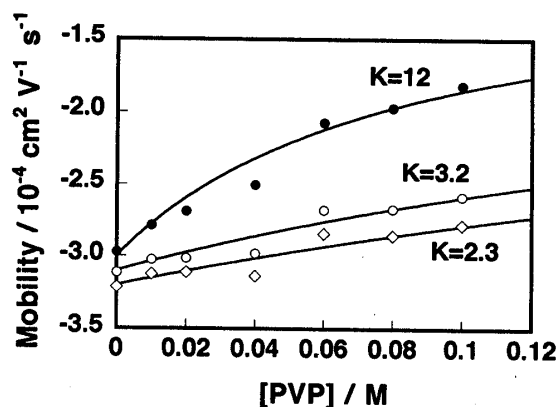


Fig. 3 Relationship between the concentration of PVP in the buffer solution and the mobility of solutes

Solutes: ●, caffeic acid; ○, DOPAC; ◇, ascorbic acid. Solid lines are calculated from equation (2) by assuming $\mu_f = 1.0 \times 10^{-4}$ and $\mu_r = -3.0 \times 10^{-4}$, -3.1×10^{-4} and $-3.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for caffeic acid, DOPAC and ascorbic acid, respectively. Values of K in the figure are the estimated formation constants of PVP complexes with solutes. Experimental conditions are the same as in Fig. 2(C) except for the PVP concentration



この平衡定数を K とすると、溶質の電気泳動速度 μ は PVP 濃度, $[\text{PVP}]$ と次の関係がある。

$$\mu = \frac{\mu_f + K [\text{PVP}] \mu_c}{1 + K [\text{PVP}]} \quad (2)$$

ここで μ_f 及び μ_c はそれぞれフリーの溶質及び PVP-CA 複合体の電気泳動速度である。Fig. 3 のカフェー酸に対するプロットを式(2)の K を変えてカーブフィットすると、 K はおよそ 12 程度となる。一方 DOPAC 及びアスコルビン酸については K の値はそれぞれ 3.2 及び 2.3 程度である。

以上、陰イオン性カテコール類及びアスコルビン酸と PVP の複合体形成の平衡定数の大きさの差異が、泳動溶液への PVP の添加による溶質の CE 分離性向上の要因であることが明らかになった。本報で得られた平衡定数の値は、式(2)の PVP を単量体として近似しているために、MP と比較して PVP の高分子効果を十分定量的に表していない。今後、電気伝導度滴定法などによる PVP や MP と溶質との複合体形成反応の平衡定数の決定を行い、CE による溶質の分離性と平衡定数との関係

を明らかにしていく予定である.

文 献

- 1) S. Fanali: *J. Chromatogr.*, **474**, 441 (1989).
- 2) B. A. Ingelse, H. C. Claessens, S. van der Wal, A. L. L. Duchateau, F. M. Everaerts: *J. Chromatogr. A*, **745**, 61 (1996).
- 3) S. Hoffstetter-Kuhn, A. Paulus, E. Gassmann, H. M. Widmer: *Anal. Chem.*, **63**, 1541 (1991).
- 4) S. Honda: *J. Chromatogr. A*, **720**, 337 (1996).
- 5) K. Ganzler, K. S. Greve, A. S. Cohen, B. L. Karger, A. Guttman, N. C. Cooke: *Anal. Chem.*, **64**, 2665 (1992).
- 6) S. Terabe, T. Isemura: *Anal. Chem.*, **62**, 650 (1990).
- 7) P. Molyneux, H. P. Frank: *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3169 (1961).
- 8) A. Carpenter, S. Siggia, S. Carter: *Anal. Chem.*, **48**, 225 (1976).
- 9) T. Imato, H. J. Johnson, G. P. Kreishman, W. R. Heineman: *Anal. Sci.*, **7** (supplement), 595 (1991).
- 10) T. Imato, H. Morioka, W. R. Heineman: *Sens. Actuators B*, **13-14**, 68 (1993).
- 11) L. Olsson, O. Samuelson: *J. Chromatogr.*, **93**, 189 (1974).
- 12) 本田 進, 寺部 茂: “キャピラリー電気泳動—基礎と実際”, p. 7 (1995), (講談社).