

*Proceedings of the 14th Symposium on
Capillary Electrophoresis*

SCE'94

第14回 キャピラリー電気泳動シンポジウム

講演要旨集



つばき(初雁)、澁川 鑑 画

主催 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

共催 日本薬学会、日本化学会、日本生化学会、日本電気泳動学会
クロマトグラフィー科学会

会期 平成6年12月6日(火)～8日(木)

会場 京都教育文化センター

第14回 キャピラリー電気泳動シンポジウム

と き 1994年12月6日(火)～8日(木)

と ころ 京都教育文化センター

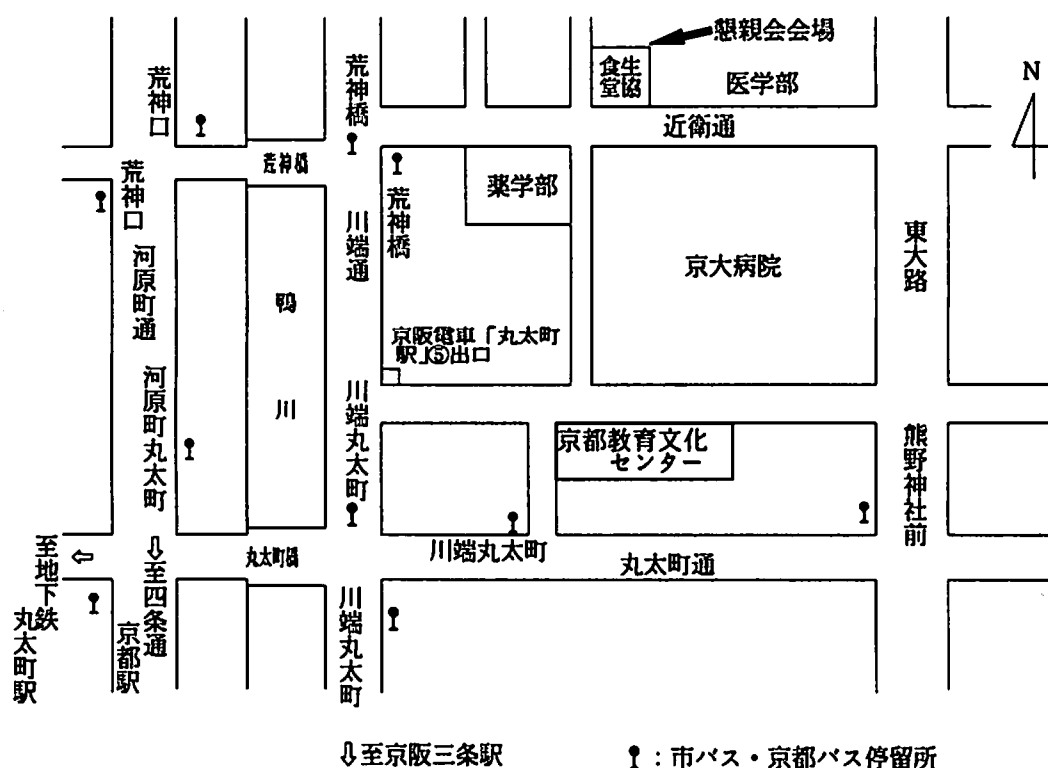
京都市左京区聖護院川原町4-13

TEL 075-771-4221

FAX 075-771-4224

主 催 分析化学会電気泳動分析研究懇談会

共 催 薬学会, 化学会, 生化学会, 電気泳動学会, クロマトグラフィー科学会



【交通】

・JR「京都」駅より：

(i) 市バスA2のりば⑤「熊野神社前」下車西へ徒歩3分(約30分)

(ii) 地下鉄「北山」行乗車「丸太町」駅下車し市バス⑤③②①に乘換えて「川端丸太町」下車北へ徒歩2分(約20分)

・阪急電車「河原町」駅(地下)より：

徒歩四条大橋東詰京阪電車「四条」駅(地下)にて「出町柳」行き乗車「丸太町」駅(地下)下車(特急は止まらないので注意)(約10分)

・京阪電車「丸太町」駅(地下)より：

⑤番出口より東へ徒歩3分

注意：会場には駐車場がありませんので、車での来場はご遠慮下さい。

第14回 キャピラリー電気泳動シンポジウム 発表者および参加者の皆様へ

参加者

シンポジウムへの参加は参加登録された方に限ります。会場では必ず名札をお付け下さい。

参加登録：会場受付にて参加登録申込書と共に参加費6000円を納め、講演要旨集およびネームカードをお受け取り下さい。

懇親会：12月7日（水）午後6時より京大生協南部食堂（別紙地図参照）で行います。会場を予告場所から変更致しましたのでご注意下さい。参加費4000円をシンポジウム参加登録申込時にお納め下さい。

発表者

発表はすべて口頭発表で行います。各発表の発表時間は最終プログラム（雑誌などで予告したものと1部異なる）を御覧下さい。発表題名の変更は認めません。発表の取消し、演者の変更などとはできるだけ早く会場受付までご連絡下さい。講演時間は1題当り20分（質問時間を含む）です。時間を厳守して下さい。発表はスライド使用に限ります

スライドを講演開始時間の40分前（早朝は15分前）までにスライド受付にお渡し下さい。枚数は制限しませんが、スライド裏面に映写順通し番号、発表番号、講演者氏名をご記入下さい。また、同じスライドを繰り返し使用する場合は、その枚数だけご用意下さい。講演終了後お忘れなきよう御確認の上スライドをお受け取り下さい。

次演者

講演開始時間の20分前（早朝は10分前）までに次演者席に御着席下さい。

座長

予定時刻の20分前（早朝は10分前）までに会場受付にお越し下さい。

座長一覧

第1日(12月6日)	第2日(12月7日)	第3日(12月8日)
9:20~10:40 津田 孝雄	9:00~10:20 松田 りえ子	9:00~10:20 本田 進
11:00~12:20 中村 洋	10:40~12:00 福士 恵一	10:40~12:20 小林 英三郎
13:20~14:40 高木 俊夫	13:00~13:30 中川 照眞	13:20~14:40 馬場 嘉信
14:55~16:15 広川 健	13:35~14:55 渡会 仁	14:55~15:55 真鍋 敬
16:30~17:30 寺部 茂	15:10~16:10 木曾 義之	16:10~17:10 加納 航治
	16:25~17:25 赤田 良信	

プログラム

第1日 12月6日

9:15~9:20 開会の挨拶

9:20~10:40 座長 津田 孝雄

1. キャピラリー中における電気浸透流発生過程のシュミレーション
(兵庫県立工業技術センター¹⁾・千葉大理²⁾・阪大蛋白研³⁾) ○阪本英男¹⁾、
大須賀敏明²⁾、藤村 庄¹⁾、高木俊夫³⁾
2. ミセル動電クロマトグラフィーにおける内面修飾キャピラリーの利用
(阪府高専¹⁾・姫路工大理²⁾) ○大塚浩二¹⁾、東森光雄¹⁾、寺部 茂²⁾
3. EKC用擬似固定相の担体としてのスターバーストデンドリマー
(京工繊大繊維¹⁾・Centers for Disease Control²⁾) 田中信男¹⁾、○福留 健¹⁾、
木全一博¹⁾、細矢 憲¹⁾、荒木長男¹⁾、Zaiyou Liu²⁾、Donald G. Patterson²⁾
4. キラルな界面活性剤を用いたMEKCによる光学異性体の分離
(東理大薬) ○佐野 明、渡辺久美子、中村 洋

10:40~11:00 (休憩)

11:00~12:20 座長 中村 洋

5. アニオン型シクロデキストリン誘導体を用いる動電クロマトグラフィーによる
光学異性体の分離
(日本ベーリンガーインゲルハイム¹⁾・姫路工大理²⁾) ○田中喜秀¹⁾、
柳川由美²⁾、寺部 茂²⁾
6. 低分子溶液-キャピラリー電気泳動: SDS-蛋白質複合体
(阪大蛋白研) ○M. R. Karim、高木俊夫
7. 電気クロマトグラフィー及び細胞の電気マニピュレーション
(名工大工¹⁾・理研名古屋²⁾) ○津田孝雄¹⁾、渡辺弘和¹⁾、中島真邦¹⁾、
北川慎也¹⁾、木内一壽²⁾、橋本 修²⁾
8. キャピラリー電気泳動分離のシュミレーション(I)
(広大工¹⁾・比治山女子短大²⁾) ○廣川 健¹⁾、木曾義之²⁾

12:20~13:20 (休憩)

13:20~14:40 座長 高木 俊夫

9. キャピラリー電気泳動を用いた液相内超微量錯体形成反応と検出
(東大工) ○川西宏昌、北森武彦、澤田嗣郎
10. 高分子界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィー:
擬似固定相の部分充填法の検討
(カネカテクノリサーチ¹⁾・姫路工大理²⁾・日立中研³⁾) ○尾崎祐人¹⁾、
伊藤典孝²⁾、寺部 茂²⁾、高田安章³⁾、坂入 実³⁾、小泉英明³⁾
11. 電気インジェクション法の直線性およびインジェクション量の関係について(II)
(日本ウォーターズ・リミテッド) ○佐々木秀輝、米久保 淳、高橋孝行
12. キャピラリー電気泳動の不確定性構造とオブジェクトを指向した最適化(I)
測定精度とベースラインの1/fゆらぎの関係について
(国立衛生試験所) ○林 譲、ラッセル B. ポウ、松田りえ子

14:40~14:55 (休憩)

14:55~16:15 座長 廣川 健

13. キャピラリー電気泳動の不確定性構造とオブジェクトを指向した最適化(Ⅱ)
検出限界について
(国立衛生試験所) ○松田りえ子、林 譲、ラッセル B. ポウ、佐々木久美子、
斉藤行生
14. キャピラリー電気泳動の不確定性構造とオブジェクトを指向した最適化(Ⅲ)
ベースラインゆらぎの確率論的性質に基づいた測定波長の最適化
(国立衛生試験所) ○ラッセル B. ポウ、松田りえ子、林 譲
15. 高感度キャピラリーセルおよび差フェログラムを用いた可視部キャピラリー
電気泳動のS/N向上
(大塚製薬¹⁾・大塚電子²⁾) ○葛城肅典¹⁾、木下盛敏¹⁾、山田浩美²⁾、
水口 勉²⁾、小野真澄²⁾、新田哲士²⁾、北岸恵子²⁾
16. キャピラリー等電点電気泳動法の開発
(パーキンエルマージャパン) ○小畑義充、平沼秀記、田中 博、白根義治、
Shiaw-Min Chen、John E. Wiktorowicz

16:15~16:30 (休憩)

16:30~17:30 座長 寺部 茂

17. ワンステップキャピラリー等電点電気泳動
(ベックマン¹⁾・Beckman Instruments Inc. ²⁾) 鷹井 宏¹⁾、安生綾子¹⁾、
○新井悦郎¹⁾、Tomas J. Pritchett²⁾
18. CE/APCI-MSの開発
(日立中研) ○高田安章、坂入 実、小泉英明
19. キャピラリー電気泳動/MS(CE/MS)による糖、ペプチド、タンパク質の解析
(宝酒造バイオプロダクツ開発センター) ○橋爪克仁、宮城 大、綱澤 進

第2日 (12月7日)

9:00~10:20 座長 松田 りえ子

20. キャピラリー電気泳動による排水中のアミン類の分析
(東芝研究開発センター) ○富岡由喜、岡田 章
21. 第4級アンモニウム塩を用いた細管式等速電気泳動法による臭化物イオンと
ヨウ化物イオンの分離定量
(神戸商船大船貨輸送研¹⁾・神戸女子短大²⁾) ○福士恵一¹⁾、日色和夫²⁾
22. 混合希土類金属イオンの電気泳動連続分離
(阪大基礎工) ○平田雄志、小西嘉雄、坂本 透
23. キャピラリー電気泳動法による希土類イオンの分析
(広大工¹⁾・香川県警²⁾・比治山女子短大³⁾) ○廣川 健¹⁾、芝山貴幸²⁾、
木曾義之³⁾

10:20~10:40 (休憩)

10:40~12:00 座長 福士 恵一

24. キャピラリー電気泳動法における鉄イオンの分離挙動
(広大工) ○西本和弘、西山文隆、廣川 健
25. キャピラリー電気泳動による食品中の亜硝酸、硝酸イオンの分析
(日本ウォーターズ・リミテッド) ○鈴木政明、米久保 淳、佐々木秀輝
26. 森林化学分野におけるキャピラリーイオン分析の応用(Ⅲ)
アルキルアンモニウム系木材防腐剤の分析
(日本ウォーターズ・リミテッド¹⁾・北大農²⁾) ○米久保 淳¹⁾、佐々木秀輝¹⁾、
鈴木政明¹⁾、寺沢 実²⁾
27. キャピラリー電気泳動によるチョウセンニンジン由来ペプチドの金属結合能の
同定と解析
(農水省生物研¹⁾・University of East Anglia, UK²⁾・東大農³⁾) ○梶原英之¹⁾、
A. Hemmings²⁾、大久保 明³⁾、山崎素直³⁾、小松節子¹⁾、平野 久¹⁾

12:00~13:00 (休憩)

13:00~13:30 座長 中川 照眞

特別講演

張 玉奎 教授 (Prof. Zhang Yukui) 中国科学院大連化学物理研究所、中国色譜
学会副会長

"Optimization of The Performance of Capillary Gel and Capillary
Step-Gradient Gel Electrophoresis"

13:30~13:35 (休憩)

13:35~14:55 座長 渡会 仁

28. キャピラリー電気泳動によるエルカトニンの分析
(大塚電子¹⁾・国立衛生試験所大阪支所²⁾) ○新田哲士¹⁾、笹川秀男¹⁾、
四方田千佳子²⁾、岡田敏史²⁾
29. ミセル動電クロマトグラフィーによるベンゾジアゼピン系抗てんかん薬と
その脱メチル型活性代謝産物の相互分離の条件について
(国立精神神経センター神経研) ○今澤正興
30. キャピラリーゾーン電気泳動による精神・神経疾患の患者髄液中の尿酸の定量
(杏林大保¹⁾・杏林大医²⁾・国立千葉病院神経科³⁾) ○平岡 厚¹⁾、高淵貴徳¹⁾、
小林麻美¹⁾、赤井淳一郎¹⁾、荒戸照世²⁾、富永 格³⁾
31. キャピラリー電気泳動を用いる光学活性薬物の立体選択的タンパク結合研究
(京大薬) ○小原敏夫、澁川明正、中川照眞

14:55~15:10 (休憩)

15:10~16:10 座長 木曾 義之

32. キャピラリー電気泳動法による遊離型および抱合型ステロイド分析の基礎と
臨床応用
(神戸薬科大) ○松井 淳、小林吉晴、渡邊富久子
33. キャピラリー電気泳動による酵素消化のリアルタイムモニタリング
(パーキンエルマージャパン) ○平沼秀記、小畑義充、田中 博、仙石陽二、
白根義治

34. キャピラリー電気泳動による食用天然色素の分析
(ヤエガキ発酵技研¹⁾・姫路工大理²⁾) ○渡辺敏郎¹⁾、琴川直樹¹⁾、山本 明¹⁾、
寺部 茂²⁾

16:10~16:25 (休憩)

16:25~17:25 座長 赤田 良信

35. O/W型マイクロエマルジョンを溶媒とするキャピラリー電気泳動法による
有機リン系殺虫剤の分離
(阪大理) ○福本敬夫、渡会 仁
36. キャピラリー電気泳動におけるアミノ酸誘導体
(共立女子短大) ○津田淑江、渡辺多津子、蓮見知子
37. キャピラリー電気泳動によるラット肝臓灌流液のケトン体分析
(岡山県立大保健福祉・日本ウォーターズ・リミテッド) ○鈴木和彦、
山下広美、金行孝雄、田川邦夫、丸山敏彦

18:00 懇親会(京大生協南部食堂)

第3日 (12月8日)

9:00~10:20 座長 本田 進

38. 水素結合能を持つマトリックス中における置換安息香酸の電気泳動
(岐阜薬大¹⁾・京大農²⁾・名大工³⁾) ○江坂幸宏³⁾、木村宏幸²⁾、加納健司¹⁾、
後藤正志¹⁾、原口紘矢³⁾
39. キャピラリー電気泳動によるオキシ酸、金属オキシ酸の分析
(横河アナリティカルシステムズ) ○曾我朋義、井上嘉則
40. キャピラリー電気泳動による陰イオンの迅速検出
(パーキンエルマージャパン・Parkin-Elmer Corp.) ○佐藤栄司、小畑義充、
白根義治、泉国辰、William, E. Werner、John, E. Wiktorwicz
41. キャピラリー電気泳動法の医薬品分析への応用(第14報)
黄連解毒湯の分析における分離モードの検討
(徳島文理大薬) ○石井信之、黒木まり、赤田良信

10:20~10:40 (休憩)

10:40~12:20 座長 小林 英三郎

42. CZEを利用したオリゴ糖の分子認識に関する研究
(同志社大工) ○加納航治、小寺政人、堀口和美、松井善民、真木 孝
43. 薬物-糖タンパク相互作用の立体選択性における糖鎖の影響
(京大薬) ○塩野浩光、澁川明正、小原敏夫、中川照眞
44. 多糖マトリックスを用いるオリゴ糖のサイズ排除キャピラリー電気泳動
(近大薬) ○本田 進、金子友佳、南埜裕貴子、多賀 淳
45. 光学活性 N-dodecoxycarbonylvaline を用いる単糖 PMP 誘導体エピマーの分離
(近大薬¹⁾・Chem. Product Div., Waters Corp. ²⁾) ○三好 亮¹⁾、
小谷ますみ¹⁾、本田 進¹⁾、Edward R. Grover²⁾

46. 糖鎖リガンドを試料とし、タンパク質を泳動液に添加した系を用いる
糖鎖-タンパク質相互作用の研究
(近大薬) ○多賀 淳、薮譜幸子、本田 進
12:20~13:20 (休憩)
13:20~14:40 座長 馬場 嘉信
47. 無担体電気泳動によるDNAの分離(5) スペースシャトル-コロムビアでの
電気泳動
(城西大理¹⁾・東海大医²⁾) ○小林英三郎¹⁾、山本顕吾²⁾、安田佳代²⁾、
石井直明²⁾
48. 線状ポリアクリルアミドを支持体としたキャピラリー電気泳動によるDNA塩基配列
決定の性能の予測
(姫工大¹⁾・理研化学工学²⁾) ○真鍋 敬¹⁾、陳 農¹⁾、寺部 茂¹⁾、
養王田正文²⁾、遠藤 勲²⁾
49. 非定常電場ゲル電気泳動下の長鎖DNA分子の挙動
(名大工¹⁾・名大人間情報²⁾) ○増淵雄一¹⁾、小穴英廣¹⁾、松本充弘¹⁾、
土井正男¹⁾、吉川研一²⁾
50. 低分子キャピラリー電気泳動: DNA断片とポリスチレンスルフォネート
(阪大蛋白研¹⁾・Institute of Biochemistry, Uppsala University²⁾)
○金 中朝¹⁾、Tasane Srichario²⁾、Stellan Hjerten²⁾、高木俊夫¹⁾
14:40~14:55 (休憩)
14:55~15:55 座長 真鍋 敬
51. キャピラリーゲル電気泳動法におけるDNA断片の移動度
(日立中研) ○釜堀政男
52. キャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出によるヒトゲノムの解析
(神戸薬大¹⁾・阪大細胞生体工学セ²⁾・東大医科研³⁾・日立中研⁴⁾)
○富崎理代¹⁾、馬場嘉信¹⁾、津波古充朝¹⁾、大久保公策²⁾、松原謙一²⁾、
服部正平³⁾、榊 佳之³⁾、高橋 智⁴⁾、神原秀記⁴⁾
53. キャピラリー電気泳動によるPCR生成物の分析とその遺伝子診断への応用
(昭和大薬) ○荒川秀俊、前田昌子、辻 章夫
15:55~16:10 (休憩)
16:10~17:10 座長 加納 航治
54. キャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出による成人病(アルツハイマー型
痴呆症)の遺伝子診断
(神戸薬大¹⁾・阪大医²⁾・大塚電子³⁾) ○角田ちぬよ¹⁾、馬場嘉信¹⁾、
津波古充朝¹⁾、三木哲郎²⁾、萩原俊男²⁾、辻尾典男³⁾、新田哲士³⁾、笹川秀男³⁾
55. キャピラリーアフィニティーゲル電気泳動によるがん抑制遺伝子の変異点検出
(神戸薬大¹⁾・鹿児島大工²⁾) ○井上秀子¹⁾、馬場嘉信¹⁾、津波古充朝¹⁾、
明石 満²⁾
56. キャピラリー電気泳動を用いたGenetic Instabilityの解析および癌の遺伝子診断
への応用
(東京テクニカルカレッジバイオ¹⁾・東京医科歯科大医²⁾・日本バイオラッド³⁾)
○大藤道衛¹⁾、²⁾、末広 健³⁾、秋山好光²⁾、湯浅保仁²⁾

次回開催の案内 (広大・工) 廣川 健

第14回 キャピラリー電気泳動シンポジウム

特 別 講 演

Invited Lecture

OPTIMIZATION OF THE PERFORMANCE OF CAPILLARY GEL AND CAPILLARY STEP-GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS

Yukui Zhang

National Chromatographic Research and Analysis Center, Dalian
Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences,
Dalian 116011, China

A major challenge of the Human Genome Initiative is the development of rapid, efficient and high sensitive DNA sequencing technology. Capillary gel electrophoresis (CGE) demonstrated a promising technique to separate DNA sequencing reactions at speeds up to 25 times as great as conventional slab gel electrophoresis. Electrophoretic optimization in CGE requires a systematic investigation on the performance of CGE which will facilitate the understanding of separation mechanism involved in CGE. In the present report, systematic investigation on the optimization of the performance of CGE and capillary step-gradient gel electrophoresis was made. Capillary step-gradient gel electrophoresis is a kind of step-gradient system where gel concentration is not constant throughout the capillary column. The strategy for the method development of step-gradient gel columns for the manipulation of separation and on-column concentration will be presented. By carefully design of the step-gradient gel column at the injection end, on-column concentration can be realized by using this gradient gel system. The comparative study on CGE and capillary step-gradient gel electrophoresis was also made.

In CGE, it is important to consider how quickly the resolution (R_s) is generated under the experimental conditions. Shorter analysis times are particularly attractive for method development of DNA sequencing. Therefore, resolution per unit time was proposed in CGE and capillary step-gradient gel electrophoresis systems, and the resolution per unit time (R_s / t_m) can be optimized with respect to migration, gel concentration and applied voltage. The pattern of these plots can be exploited to study the separation mechanism in CGE.

A parameter measuring the sieving power of the gel network was proposed and evaluated as the function of gel concentration, applied voltage. The performance of CGE and capillary step-gradient gel electrophoresis was examined and optimized in terms of peak spacing, peak width at half height and resolution per unit time. The rule of peak width at half height in CGE was derived and found to be generally observed in CGE. The performance of capillary gel columns was also exploited by different capillary coatings.

In the last part of the report, we will demonstrate that the whole process involved in the preparation of CGE column including capillary coating, gel packing can be quantitatively controlled and fully automatic. Gel-filled capillary columns prepared by this approach show higher stability and reproducibility.

第14回 キャピラリー電気泳動シンポジウム

一般講演

1 キャピラリー中における 電気浸透流発生過程のシミュレーション

(兵庫県立工技センター*) (千葉大理**) (阪大蛋白研***)

○*阪本英男、**大須賀敏明、*藤村庄、***高木俊夫

SIMULATION OF THE GENERATION PROCESS OF ELECTROOSMOTIC FLOW IN A CAPILLARY.

Hideo Sakamoto*, Toshiaki Oosuga**, Taira Fujimura*, Toshio Takagi***

*Hyogo Prefectural Institute of Industrial Research, **Department of Physics, Chiba University, ***Institute for Protein Research, Osaka University.

Total process of generation of electroosmotic flow in a capillary could be simulated using Navier-Stokes equation, starting from the moment of application of electrical field to the final formation of plug flow.

Difficulty in setting the initial value was overcome by introduction of the implicit method.

1. 緒言

キャピラリー電気泳動では、電気泳動と同時に電気浸透流（以下「EOF」と略す）が発生するが、EOFは動電クロマトグラフィーにおいては積極的に利用されるなどその存在はキャピラリー電気泳動の活用において無視できないので、その流動状況の把握が重要である。EOFの理論的な解析に関して、定常状態について行われた例はいくつか報告されているが¹⁾、EOFの発生過程における、非定常状態の流れの解析はまだ試みられていない。

そこで非定常な流れを解析する上で時間発展計算が行い易い「陰解法」を用いて、EOFの非定常な流れのシミュレーションを行い、EOFの発生から完成までの全過程の描像を得た。

2. シミュレーション

(1) 流体駆動力の導出

EOFを形成する流体駆動力は、キャピラリー壁面に生ずる電気二重層に起因している。従って、この部分における電荷密度から流体駆動力を導くことができる。

キャピラリー壁面は水溶液のpHに対応して電離し、負に帯電するので、水溶液中よ

リカチオンを優先的に集めて電気二重層を形成する。

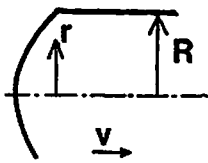
水溶液中の静電位と電荷密度はポアソンの式により関係付けられるが、界面の電位はゼーター電位と呼ばれ、その値から電荷密度分布を得ることができる。

今回のシミュレーションにおいては、C. Schwerらにより報告されたゼーター電位の測定結果を用いた²⁾。

電荷密度はキャピラリーの径方向に分布があるので、印加する外部電場に対して異なる電氣的駆動力を生ずる。この駆動力の違いは水溶液の粘性により時間とともに全体的に緩和され、その結果定常状態においては栓状の速度分布を形成する。

(2) 非定常なE O Fの速度特性を与える流れの方程式。

キャピラリー電気泳動の系に、水溶液等の流れの一般的な支配方程式であるNavier-Stokes方程式を適用することで式①を得る。



$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} = \mu \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial v}{\partial r} \right) + \rho_e \cdot E \quad \text{①}$$

v : 流速、 μ : 粘度、 ρ : 水溶液の密度
 ρ_e : 電荷密度

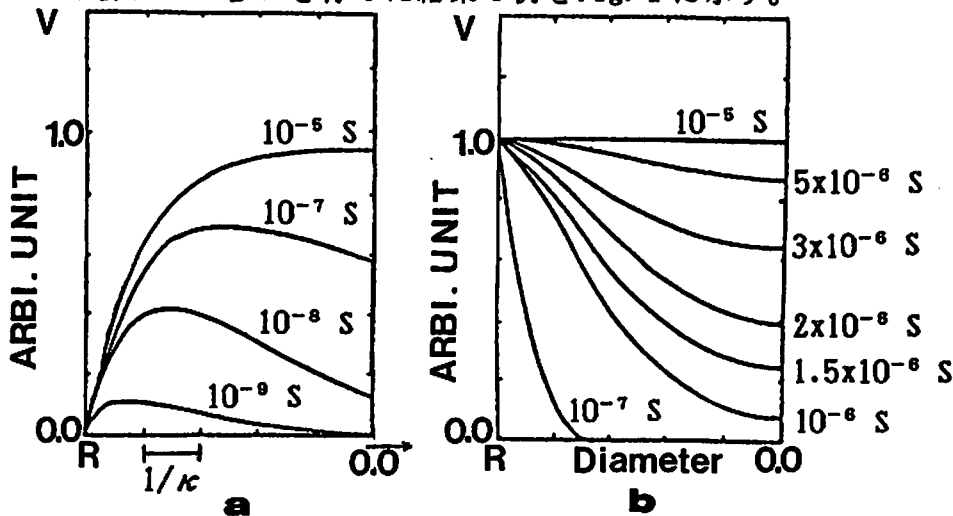
(3) 数値計算について

(1)式について数値計算により時間発展計算を行うと、最終的に栓流を形成するに至る全過程を解析できる。しかし、流速が著しく変化することに起因する数値計算の不安定を招くため、安定した結果を得るには莫大な計算時間を必要とする。

今回この難点を回避するため、筒状の一定体積で運動量を積分した上で力の釣合を求めることを試みた。また時間発展計算について、計算回数を減らすため時間間隔を大きくしても安定した計算を行える陰解法を用いた。

(4) 解析結果の例

シミュレーションを行った結果の例をFig. 1に示す。



(a) はごく初期における電気二重層近傍の結果を拡大したものであり、(b) は終期におけるキャピラリー全体についての結果である。

Fig.1 Velocity profiles on each time

[参考文献] 1) G. Guiochon et al., Anal. Chem. (1984) 56, 614

2) C. Chver, E. Kenndler, Anal. Chem. (1991) 63, 1801

ミセル動電クロマトグラフィーにおける 内面修飾キャピラリーの利用

(阪府高専) ○大塚 浩二、東森 光雄
(姫工大理) 寺部 茂

USE OF COATED CAPILLARIES IN MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Koji Otsuka, Mitsuo Higashimori, and Shigeru Terabe[†]

*Department of Industrial Chemistry, Osaka Prefectural College of Technology
Saiwai-cho, Neyagawa, Osaka 572 (Japan)*

*[†]Department of Material Science, Faculty of Science
Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12 (Japan)*

ABSTRACT

Capillary electrophoresis is usually performed with an untreated fused-silica capillary and hence, the electroosmotic flow can occur, except at the low pH. In micellar electrokinetic chromatography (MEKC), the same situation is observed: the migration velocity of the micelle is represented by the sum of the electrophoretic velocity of the micelle and the electroosmotic velocity. Recently, various coated capillaries has been developed to manipulate the electroosmosis as well as to suppress the interaction between the solutes and the inner wall of the capillary. In this study, two types of coated capillaries were used in MEKC to investigate the behavior of the electroosmotic flow and migration of the micelle.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) では、内面未処理のフューズドシリカキャピラリーが分離用に使われることが多い。そのため泳動溶液が強い酸性である場合を除き、電気浸透流が発生する。これはミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) の場合でも同様であり、通常、ミセルの移動速度は、ミセルの電気泳動速度と電気浸透流速との和となる。

近年、電気浸透流の制御、およびタンパク質等の内面への吸着抑制を目的として、内面を処理したキャピラリーが広く市販されるようになり、それらを利用したCEによる種々の分析例も報告されている。ここでは、MEKCにおいて2種類の内面コーティングキャピラリーの利用を試み、従来の内面未処理のキャピラリーとの差異について検討した結果を報告する。

2. 実験

使用した内面コーティングキャピラリーは、中性の親水性ポリマーをコーティングしたeCAPニュートラルキャピラリー (内径 50 μm) およびポリアミンをコーティングしたeCAPアミンキャピラリー (内径 75 μm) で、いずれもBeckman社より提供されたものである。また、内面未処理のキャピラリーは、Polymicro Technologies社製 (内径 52 μm) のものを使用した。

ミセル溶液は、硫酸ドデシルナトリウム (SDS) を適当なpHに調節したリン酸塩-ホウ酸塩緩衝液に溶解して調製した。装置にはBeckman P/ACE System 2000を用いた。

3. 結果・考察

Fig. 1に、ニュートラルキャピラリーを用いた場合(a)、および内面未処理のキャピラリーを用いた場合(b)のMEKC分離例を示す。試料は*p*-ヒドロキシ安息香酸アルキルエステル類、分離溶液は50 mM SDS (pH 7.0)である。(a)では印加電圧の極性は、試料注入側が負、検出側が正になっており、SDSミセルは負極から正極の向き(電気浸透流と逆向き)に移動していることが分かる。(b)ではこの逆であり、SDSミセルは電気浸透流と同じ向きに移動している。従来、ミセルを(a)のように移動させるためには溶液のpHを下げて電気浸透流を抑えることが必要であった[1]が、このニュートラルキャピラリーを使用することにより、中性付近でもそのような移動が可能となる。

一方、アミンキャピラリーは、溶液のpHおよびイオン強度によって内面の帯電状態が変化するとされている。ここでは、特にpHの影響についての検討結果を述べる。

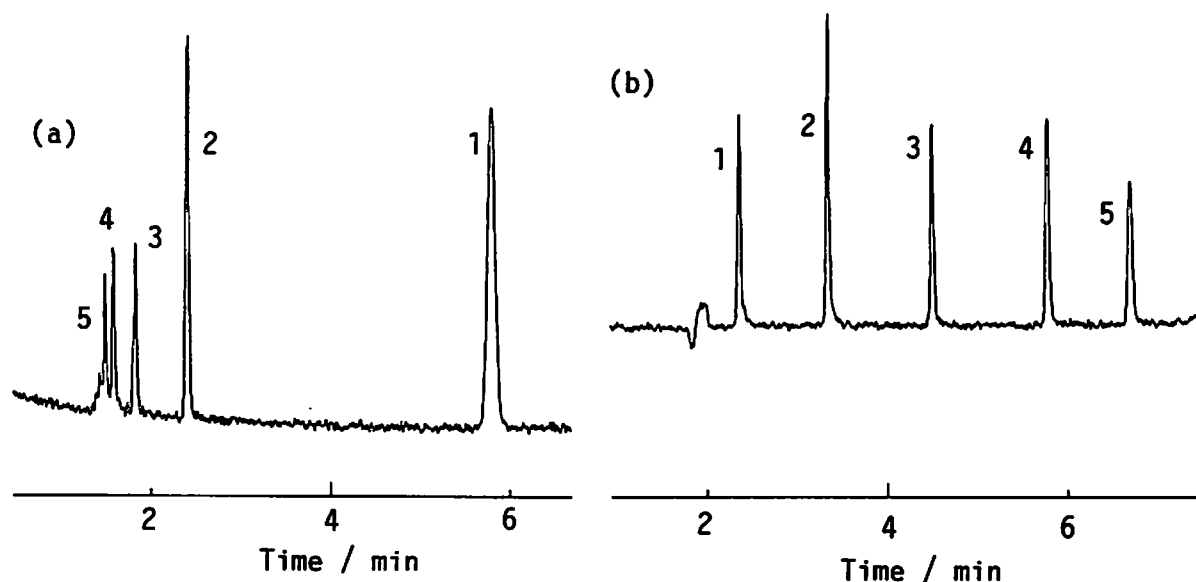


Fig. 1. MEKC separation of some test solutes with a (a)coated and (b)untreated capillaries: 1 = phenol, 2 = methyl *p*-hydroxybenzoate, 3 = ethyl *p*-hydroxybenzoate, 4 = propyl *p*-hydroxybenzoate, 5 = butyl *p*-hydroxybenzoate. Micellar solution, 50 mM SDS, pH 7.0; separation capillary, (a) eCAP neutral, 50 μ m i.d. $\times$ 200 mm, (b) untreated, 52 μ m i.d. $\times$ 300 mm; applied voltage, 20 kV; detection wavelength, 200 nm; temperature, 30 $^{\circ}$ C.

[1] Otsuka, K.; Terabe, S. *J. Microcol. Sep.*, 1989, 1, 150-154.

3 E K C 用 擬 似 固 定 相 の 担 体 と し て の ス タ ー バ ー ス ト デ ン ド リ マ ー

(京工織大繊維) 田中信男、○福留 健、木全一博、細矢 憲、
荒木長男

(Centers for Disease Control) Zaiyou Liu, Donald G. Patterson

STARBURST DENDRIMERS AS SUPPORT OF PSEUDOSTATIONARY PHASE IN EKC

Nobuo Tanaka, Takeshi Fukutome, Kazuhiro Kimata, Ken Hosoya and Takeo Araki

Department of Polymer Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606.

Zaiyou Liu, Donald G. Patterson

Centers for Disease Control, Toxicology Branch, 4770 Buford Hwy, NE, Atlanta, GA 30341, U.S.A.

Starburst dendrimers (SBDs) were used as a pseudostationary phase in electrokinetic chromatography (EKC). The selectivity of SBD-mediated EKC (SBD-EKC) was different from those in micellar EKC (MEKC) systems, in spite of the apparent structural resemblance between micelles and SBDs. The SBDs provided similar selectivity as polymer gel packing materials in reversed-phase liquid chromatography (RPLC), showing little selectivity for alkyl groups and clear preference for aromatic compounds, especially for rigid, planar polynuclear aromatic hydrocarbons.

The alkylation of SBDs resulted in the increased retention and hydrophobic selectivity while maintaining the preference toward rigid, planar compounds. These SBDs can be used in a full range of methanol-water mixtures, showing the retention decrease with the increase in methanol content as in RPLC. The results suggest that SBDs can make a support for various pseudostationary phases for EKC.

緒言 ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) は、幅広い応用性を持つ高性能分離技術である。MEKCは元来比較的疎水性の低い化合物を対象とするが、高い疎水性を持つ化合物の分析のために、現在様々な最適化が試みられている。

ミセルに類似した構造を持つスターバーストデンドリマー (SBD) は EKC の擬似固定相として機能する。SBD は多くの官能基を持ち、それらを修飾することにより分離対象がさらに拡大されるものと期待される。今回は SBD を担体として合成した EKC 用擬似固定相の分離特性について報告する。

実験 *p*-キシリレンジアミンを開始コアとして、アクリル酸メチルを用いたマイケル付加反応とエチレンジアミンを用いたアミド化反応の繰り返しにより SBD(X) を合成し、 $G=3.5$ において *n*-オクチルアミンと反応させ、末端基に疎水性置換基を導入した。残存末端エステル基をカルボキシレートとした後、EKC における擬似固定相としての適用を検討した。

結果 塩基性 pH における SDS、SBD(X)-C₈、SBD(X) を用いた Alkyl phenyl ketone の分離結果を Fig.1 に示す。SDS ミセル系においてはメチレン基の増加に伴い保持時間が増加するが、疎水性の高い化合物の溶出時間はミセルの溶出時間に収束する傾向を示す。一方 SBD(X) と比較して SBD(X)-C₈ は良好な分離を可能とし、アルキル基に対する分離能が増加したことを示す。SBD(X)-C₈ は、SBD(X) のもつ剛性が高く平面的な多環芳香族炭化水素を優先的に保持するという RPLC におけるポリマーゲル固定相と類似した選択性をアルキル化後も維持し、ピーク広がりなどその他の性能についても向上を示した。一般的に SBD(X)-C₈ は SBD(X) と SDS ミセル系との中間的な分離特性を示し、置換基と同時に骨格も識別することができる。また SBD(X)-C₈ 系においては、SDS ミセル系より電気浸透流速速度が小さく SBD(X)-C₈ の溶出時間が長いため、疎水性化合物に対する分離時間範囲が SDS ミセル系に比べて広い。

SDS ミセル系において疎水性物質のための分離時間範囲が狭い場合、有機溶媒を添加することなどによって改善が図られる。MEKC 系における有機溶媒の添加は浸透流速速度の減少、分配係数の変化、さらにキャリアー濃度の変化などをもたらし、それによる分離パターンの変化は単純でない場合がある。これに対して SBD(X)-C₈ 系は単分子キャリアーの特性として、有機溶媒を添加した場合にもキャリアー濃度が不変であり、また電気浸透流速速度の変化が分離パターンに与える効果が小さいので、有機溶媒の添加効果は主に分配係数の変化となり、結果の理解と条件設定において RPLC 的取り扱いが可能であるなどの特徴を有するものと考えられる。

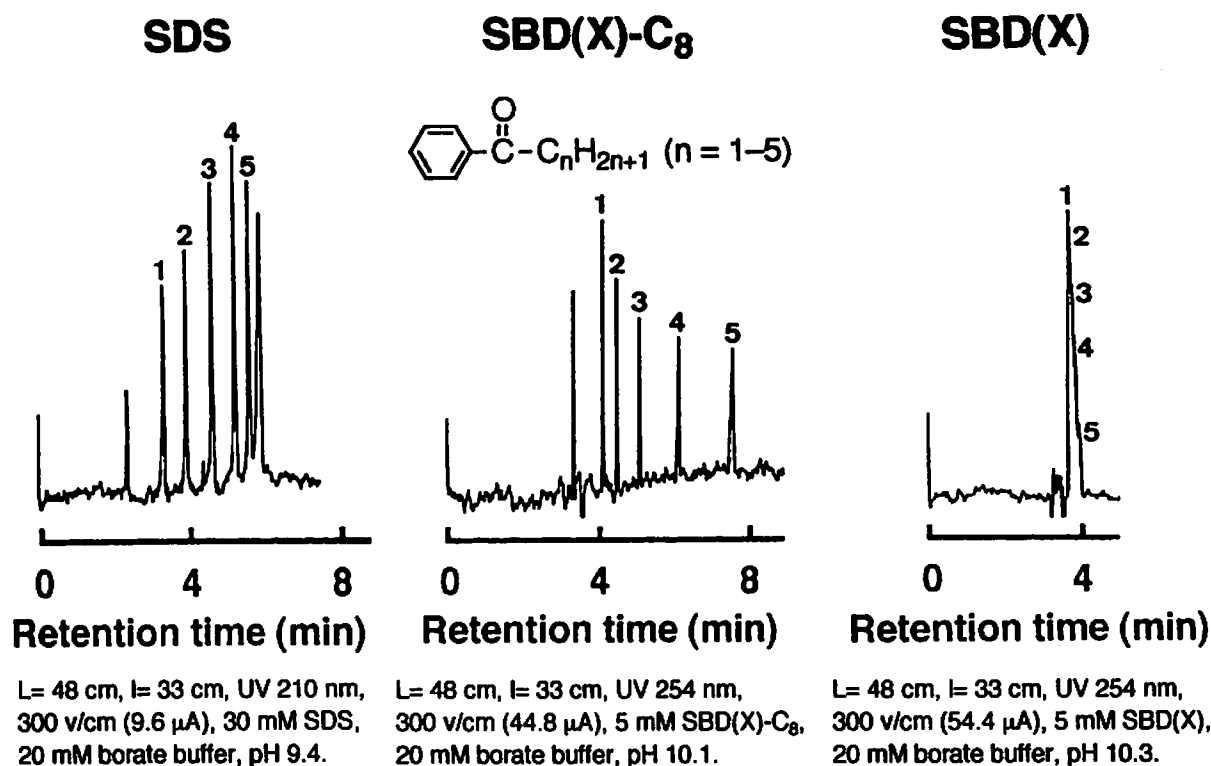


Fig.1. Separation of alkyl phenyl ketone with SDS, SBD(X)-C₈ and SBD(X).

キラルな界面活性剤を用いた MEKCによる光学異性体の分離

(東理大・薬) ○佐野 明、渡辺久美子、中村 洋

SEPARATION OF OPTICAL ISOMERS BY MEKC USING CHIRAL SURFACTANTS

Akira SANO, Kumiko WATANABE and Hiroshi NAKAMURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science

University of Tokyo

Spiculisporic acid (S-acid), an optically active biosurfactant produced by *Penicillium* species, was examined as a chiral selector for the optical resolution of enantiomeric compounds by capillary MEKC. When sulpiride was tested as a model drug, its racemate was resolved with 100 mM S-acid in borate buffers at pH 5.4-9.1, indicating the potential of S-acid MEKC in chiral separation.

【緒言】 キャピラリー電気泳動 (CE) によるキラル分離法は既に多数報告されている。キラルなミセルを用いたMEKCモードによる分離も提案されているが、分離効率やピーク形状改善のために添加剤 (SDSや有機溶媒) を必要としたり、使用できるpH域に制約がある例が多く、より優れたミセル素材が求められている。本研究では糸状菌由来のバイオサーファクタントの一種である、スピクリスポール酸 (S-酸、Fig. 1) が光学活性を有することに着目し、これより調製したミセルを用いたMEKCによる光学異性体分離の可能性を検討した。

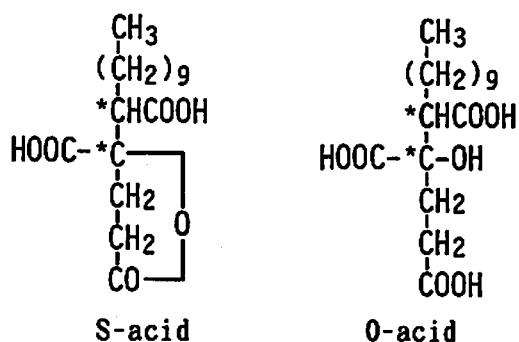


Fig. 1. Chemical structures of S-acid and its open-ring acid (O-acid).

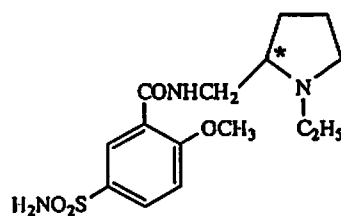


Fig. 2. Chemical structure of sulpiride.

【実験】 CE装置、CE-800（日本分光）；キャピラリー、フューズドシリカ管（内径 $50\mu\text{m}$ 、有効長、 50cm ）；分離溶液、 100mM S-酸（和光純薬）を含むホウ酸塩溶液（ $\text{pH } 5.4\text{--}10.4$ ）；注入法、陽極側より電氣的に注入（ 5 kV 、 5 秒 ）；印加電圧、 13 または 15 kV ；温度、室温；検出、 $\text{UV } 225\text{ nm}$ ；モデル試料、 1 mM スルピリド水溶液（Fig. 2）。

【結果・考察】 S-酸は多塩基型の界面活性剤であり、その界面活性は 1 Na 塩が最大で（CMC: 3.9 mM ）、次いで 2 Na 塩（CMC: 61 mM ）となり、S-酸中のラクトン環が開環したO-酸 3 Na 塩（Fig. 1、CMC: 170 mM ）ではかなり弱いことが知られている。本研究では、キラル分離を目的としたMEKC用ミセルとしてのS-酸の有効性を確認するため、はじめにスルピリドのラセミ体をモデルとする実験を試みた。S-酸濃度 100 mM 、 $\text{pH } 5.4\text{--}10.4$ （ホウ砂- NaOH ）の分離溶液を用いて得られた結果をFig. 3に示した。不十分ではあるが $\text{pH } 5.4$ 、 8.9 、 9.1 の各条件では分離が確認でき、S-酸が光学認識能を持つことが示された。またS-酸が酸性から塩基性の pH 条件下で使用可能であることは、実用上の利点といえる。詳細については現在さらに検討中である。

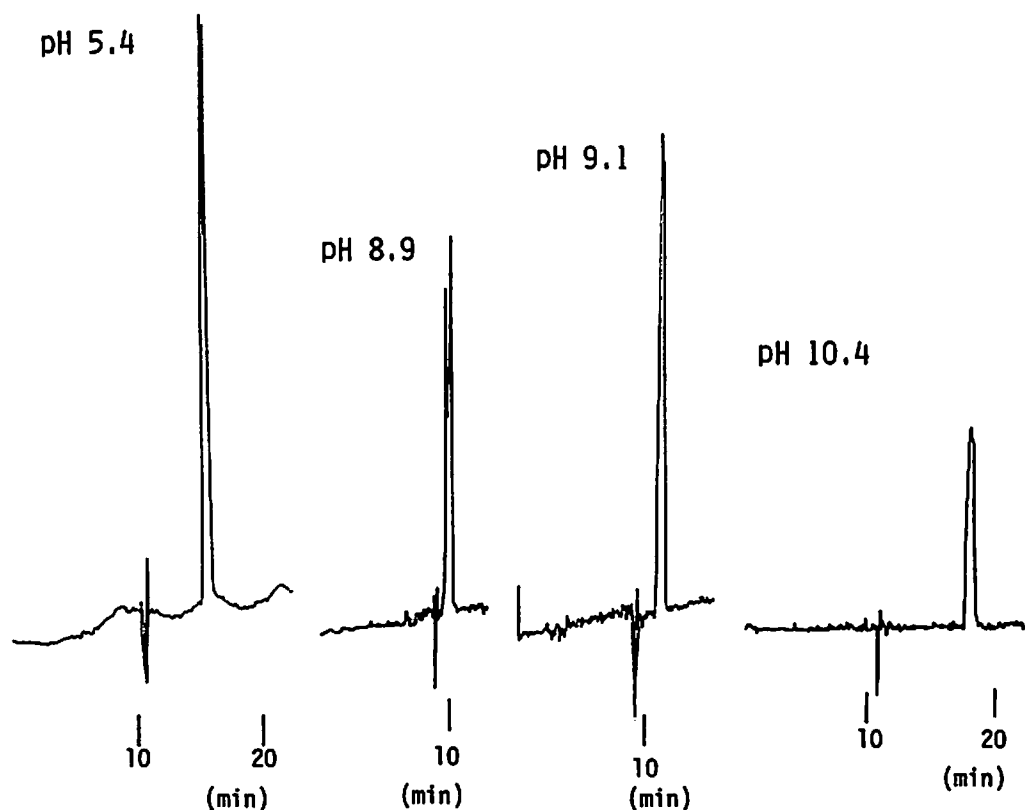


Fig. 3. Chiral separation of sulpiride by MEKC with 100 mM S-acid. Applied potential: 13 kV ($\text{pH } 10.4$) or 15 kV ($\text{pH } 5.4\text{--}9.1$).

アニオン型シクロデキストリン誘導体を用いる動電クロマトグラフィーによる光学分割

(日本ベーリンガーインゲルハイム) ○田中喜秀

(姫路工大・理)

柳川眞由美, 寺部 茂

SEPARATION OF ENANTIOMERS BY ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY USING ANIONIC CYCLODEXTRIN DERIVATIVES

Yoshihide Tanaka¹⁾, Mayumi Yanagawa²⁾ and Sigeru Terabe²⁾

1) Nippon Boehringer Ingelheim Co. Ltd.

2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

In order to separate cationic enantiomers, commercially available anionic cyclodextrin (CD) derivatives, β -CD phosphate sodium salt and β -CD sulfobutyl ether (IV) sodium salt, were employed as chiral selectors. High enantioselectivity was obtained with low concentrations of these CDs because the CDs had a strong electrostatic attraction to the cationic analytes besides hydrophobic and hydrogen bonding interactions. Since a coated capillary was used, the migration direction of the analytes depended on the relative velocity of the analytes and the CD-analyte complexes and on the binding constant to the CD. Therefore, some of analytes migrated toward the anode. In this paper, many successful separations of basic racemic drugs are listed.

1. 緒言

近年、薬学の分野では光学異性体を分離分析することが極めて重要な課題となっており、HPLCを始め、数多くの手法が利用されている。そのなかでも、キャピラリー電気泳動は比較的新しい方法で、高速、高分離能という点で注目を浴びている。キャピラリー電気泳動で光学異性体を分離する場合、泳動液にキラル識別剤を添加して行う必要があるが、シクロデキストリン (CD) 及びその誘導体が多く化合物に対して優れた光学識別能を有しており、現在のところ最もよく利用されている。しかし、これらの CD は電気的に中性であり、塩基性化合物を分離する場合は、キラル識別剤として負電荷を持つものを利用したほうが効果的である。そこで、陰イオン型の CD 誘導体を用いて様々な塩基性ラセミ医薬品に対して検討したところ、数多くの光学異性体を分離することができたので報告する。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は Bio-Rad 製 BioFocus 3000 system, キャピラリーは Polymicro 製のフューズドシリカキャピラリー (内径 50 μm , 長さ 36 cm, 有効長 31.5 cm) をポリアクリルアミドでコーティング処理したものを用いた。印加電圧は 12.0 kV, 検出波長は 210 nm, キャピラリーの温度は 20 °C で行った。泳動液は pH 5.0 ~ 7.0 の 50 mM リン酸塩緩衝液に陰イオン型 CD 誘導体を溶解して用いた。 β -CD phosphate sodium salt は CycloLab Laboratory

(Budapest, Hungary) から購入し、 β -CD sulfobutyl ether (IV) sodium salt は The University of Kansas Higuchi Bioscience Center for Drug Delivery Research (Lawrence, KS, USA) より提供を受けた。

3. 原理

Fig. 1 に分離原理を示した。内壁をコーティング処理したキャピラリーを用いているので、電気浸透流は抑制されている。すなわち、正の電荷を持つ塩基性試料は陰極側に移動し、CD に包接されると陽極側に移動する。実際の試料の泳動方向は遊離型及び結合型の試料の移動速度並びに CD との結合定数の大きさに依存し、一部の試料については陽極側で検出された。

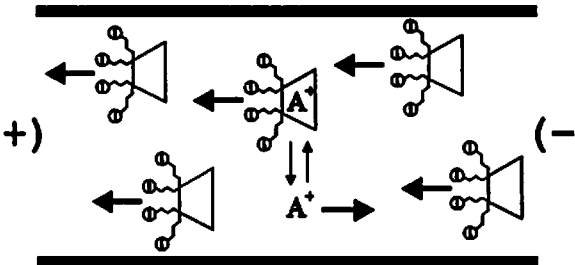


Fig.1 Schematic illustration of the separation principle of a cationic analyte by electrokinetic chromatography using an anionic CD derivative.

4. 結果

40 種類の塩基性ラセミ医薬品について検討したところ、Table 1 に示すように 23 種類の光学異性体を完全分離することができた。また、従来の中性の CD を用いた場合に比べると、疎水的相互作用と水素結合相互作用の他に強い静電引力相互作用が加わり、比較的低濃度のキラル識別剤の添加で光学異性体を分離することができた。

Table 1 Separation of basic racemic drugs by electrokinetic chromatography using anionic CD derivatives

Enantiomers	Anionic CD ^a	[CD]/mM	Buffer (pH)	Migration direction ^b
Clorprenaline, Imazalil Pindolol	β -CD phos	0.5	50mM phosphate (5.0)	+
Azelastine, Verapamil	β -CD phos	1	50mM phosphate (7.0)	+
Bunitrolol	β -CD phos	5	50mM phosphate (5.0)	+
Primaquine	β -CD phos	5	50mM phosphate (5.0)	-
Terbutaline, Trimetoquinol	β -CD SBE-IV	0.5	50mM phosphate (5.0)	+
Clorprenaline, Denopamine	β -CD SBE-IV	1	50mM phosphate (5.0)	+
Phenylefrine, Sulpiride				
Etilefrine	β -CD SBE-IV	1	50mM phosphate (7.0)	+
Mexiletine	β -CD SBE-IV	2	50mM phosphate (5.0)	+
Eperisone, Fenoterol	β -CD SBE-IV	5	50mM phosphate (5.0)	-
Imazalil, Sulconazole				
Oxyphencyclimine				
Promethazine, Meclizine				
Trimipramine, Verapamil				
Thioridazine				

^a β -CD phos = β -CD phosphate sodium salt; β -CD SBE-IV = β -CD sulfobutyl ether (IV) sodium salt. ^b +, toward the cathode; -, toward the anode.

Low Molecular Weight-Solution Capillary Electrophoresis: SDS-Protein Complexes *
Mohammad Rezaul Karim, Toshio Takagi (Institute for Protein Research, Osaka University)

Capillary electrophoresis using a polymer solution as the sieving medium is attracting interest. At least for size-dependent separation of proteins in the presence of sodium dodecyl sulfate, an alternative was found to exist under a condition of extreme opposite. Namely a concentrated solution of a dextran preparation with molecular weight a little higher than thousand can be used as a practical medium for size-dependent separation.

1. Introduction: In the field of capillary electrophoresis, polymer solutions with higher molecular weight are often used for size-dependent separation of proteins. We have been engaged in the use of dextran for separation of proteins. Our study features the use of several dextran preparations with defined molecular weights and very narrow molecular weight distributions. We also used commercial ordinary dextrans as references. It was found that a 10% solution of such a dextran with weight-average molecular weight of only 1,270 is efficient as a medium for size-dependent separation. The performance of the solution was so efficient as to make us confident that the approach is of practical use.

2. Materials and methods: All electrophoreses were carried out using a CAPI-3000 capillary electrophoresis system (Otsuka Electronics, Hirakata, Japan). Fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) were 100 or 50 μ m in i.d. and 375 μ m in o.d. They were about 50 cm in total length and about 38 cm in effective length. Internal surface of the capillary was coated with polyacrylamide.

All proteins analyzed in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The dextrans of average molecular weight 70,000, 500,000, and 2,000,000 designated as T70, T500, and T2000 were obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden). This group of dextrans have wide molecular weight distribution. Another group of dextrans were obtained from Pharmacosmos (Viby Sj., Denmark) designated as Dextran 1 (MW 1,270), Dextran 5 (MW 5,220), Dextran 25 (MW 23,800), Dextran 410 (MW 409,800), and Dextran 670 (MW 667,800) each having weight-average molecular weight in the parentheses. The dextrans of the latter group featured very narrow molecular weight distribution, and included those with rather low molecular weight down to nearly 1,000 which may be categorized not as a polymers but an oligomers.

A 10% (w/v) solution of dextran for each was made in 100 mM Tris-2(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (CHES), pH 8.8, containing 0.1% SDS. The buffer of protein samples contained 50 mM Tris-HCl, pH 6.6, together with SDS and dithiothreitol. The samples were injected electrophoretically into the capillary from the cathodic end by applying 10 kV for 5-10 sec. The capillary was maintained at 30 °C. The separations were monitored at 214 nm.

3. Results and discussion: The separation of proteins attained using Pharmacia dextran of different molecular weights are compared in Fig.1. Full separation of the four proteins was achieved within 23 min using dextran of MW 2,000,00 (Fig.1A). Base line separation was not observed for bovine serum albumin and Phosphorylase *b* in the case of dextran of MW 500,000 (Fig.1B). However, for the dextran of MW 70,000, the two proteins bovine serum albumin and Phosphorylase *b* failed to be separated (Fig.1C).

The results of capillary electrophoresis runs of proteins using Pharmacosmos dextrans of different molecular weights are shown in Fig.2. As was expected, full separation was also achieved within 30 min using the dextran of MW 667,800 (Fig.2A). Separation of bovine serum albumin and phosphorylase *b*

* The content of this presentation will be published in a recent issue of "Electrophoresis".

was not good when the dextran of MW 409,800 was used. In this case the peak of phosphorylase *b* is overlapped with the tail of that of bovine serum albumin (Fig.2B). The two proteins comigrated when the dextran of MW 23,800 was used (Fig.2C). The higher molecular weight dextran polymer may form a network that acts as a molecular sieve. The results with higher molecular weight dextrans of both groups clearly indicate that the efficiency of separation decrease with lowering in their molecular weight. Thus it was studied further wheather the presence of the dextran preparations in lower molecular weight could have any effect on the mode of separation. We only expected that the lower molecular weight dextrans must failed to separate proteins and, therefore, the test mixture of proteins will be appear as a broad single peak. Unexpectedly, we found that a 10% concentrated solution of dextran with a molecular weight of only 5,220 and 1,270 gave a good separation within 19 min and 16 min, respectively, as shown in Fig.2D and 2E. The dextran in MW 5,220 was found less efficient in resulting the separation comparable to that observed for dextran in MW 1,270. Apparently peak tailing for phosphorylase *b* was more significant in the case of dextran in MW 5,270 than 1,270.

We wish to emphasize the finding of the separation efficiency in presence of the oligomeric dextran with a molecular weight of only 1,270, since 10% solutions of such dextrans are not so viscous to make introduction into a capillary quite easy. The mechanism of separation must be quite different from that for a concentrated solutions of higher molecular weight dextrans. Ferguson plot for oligomer dextran failed to give straight lines. It is also hard to imagine the presence of any network structure in an oligomer solution. Electrophoretic behavior of proteins denatured and complexed with SDS is interpretable interms of the free-drainage model, namely their mobilities are insensitive to their molecular weights in a non-sieving medium. Presence of the oligomeric dextran in a high concentration seems to shake the basic premise on which size-dependent separation of proteins in the presence of SDS stands and to open an entirely new mode of separation. We are now making efforts to to make clear the basic mechanism play a role of separation in the oligomer dextran.

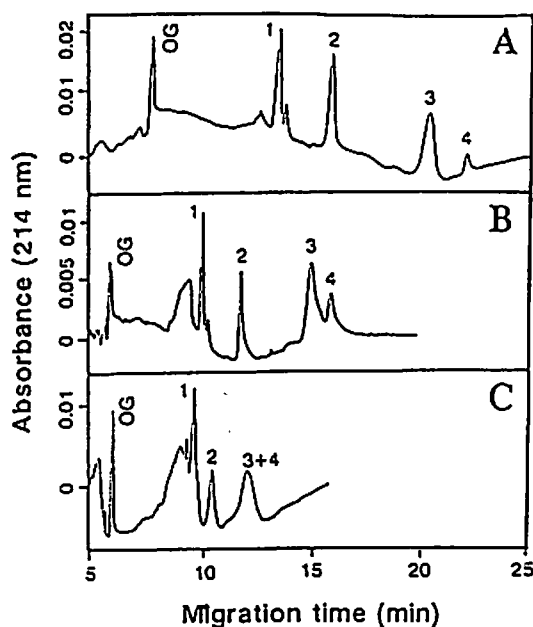


Figure 1. Separation of proteins using 10% (w/v) dextrans with different average molecular weight from Pharmacia. Weight-average molecular weights: A, 2,000,000; B, 500,000; C, 70,000. Peaks: 1, myoglobin (MW 17,800); 2, carbonic anhydrase (MW 30,000); 3, bovine serum albumin (MW 66,250); 4, phosphorylase *b* (MW 97,400). Orange G (OG) was added to the samples as an internal standard. Conditions: capillary 100 μ m i.d.; electric field, 400 V/cm; current 48-50 μ A.

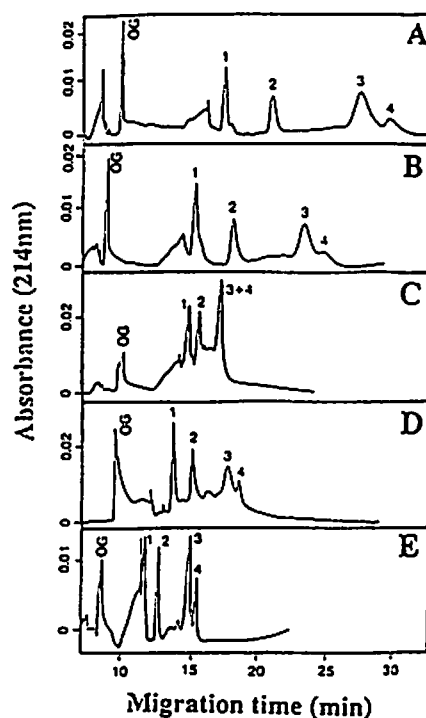


Figure 2. Separation of proteins using 10% (w/v) dextrans with different average molecular weight obtained from Pharmacosmos. Weight-average molecular weights: A, 667,800; B, 409,800; C, 23,800; D, 5,220; E, 1,270. Conditions: electric field, 300V/cm; current, 28-31 μ A for 100 μ m i.d. capillary (Fig. 2A,B,C, and E) and 9-10 μ A for 50 μ m i.d. capillary (Fig.2D). Other conditions as well as designation of the peaks are the same as in Fig.1.

7

電気クロマトグラフィー、及び 細胞の電気マニピュレーション

(名工大・工) ○津田孝雄、渡辺弘和、中島真邦、北川慎也
(理研・名古屋) 木内一壽、橋本 修

ELECTROCHROMATOGRAPHY AND ELECTRO-MANIPULATION

Takao TSUDA, Hirokazu WATANABE, Masakuni NAKASHIMA, Shinya KITAGAWA
Nagoya Institute of Technology, Department of Applied Chemistry
and

Kazuhiro KIUCHI, Osamu HASHIMOTO

Inst. of Phy. & Chem. Res., Bio-mimetic Control Reserch Center

Electrochromatography Electrochromatography with pressurized flow is demonstrated using 50 μ m i.d. capillary columns packed anion exchange resins. The separations of cations are performed mostly by the difference of their electrophoretic mobilities, and the separation of anions both electrophoretic mobilities and partitions with anion exchange resins. The typical examples of electrochromatography are demonstrated by using the mixtures of alkali cations and inorganic acids.

Electro-Manipulation of a Single Cell We develop a very unique method for manipulation by using a narrow capillary tubing and an electric field. Under leading out a controlled electroosmotic flow into a vial, a single cell is forced to migrate into the capillary against the flow, and is trapped in the capillary. Then, by the application of a reverse electro voltage, the cell can lead into the other vial. Namely a single cell can be transferred without any contamination of an original medium.

1. 電気クロマトグラフィー

我々はこれまでに電気クロマトグラフィーにおける溶出挙動の変化について報告してきた。電気クロマトグラフィーの長所の一つに、「電圧を変化することによって溶出時間を変えることができる」ということがある。そこで、一般の液体クロマトグラフィーにおいて溶出時間を変化させる因子である溶離液濃度と圧力差流の流速とを考慮しながら溶出挙動と電気クロマトグラフィーの電圧印加による変化とを比較した。

結果 カラムは内径50 μ mのフューズドシリカキャピラリー (G-L Science) にアニオン交換充填剤 (TSKgel IC-Anion SW) を充填して使用した。電圧はカラム軸方向にカラム入り口を接地した。Fig.1に5mMフタル酸+5mMヘキサメチレンジアミン (pH6.8, 10%MeOH) 緩衝溶液において、A)100Kgf/cm²、B)70Kgf/cm²の定圧モードで4kVの電圧

を印加したときのクロマトグラムを示す。試料として、 Cl^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 I^- 、 SO_4^{2-} 、 ClO_4^- の混合試料を用いた。この結果、圧力差流を遅くすることに伴って各物質の溶出が全般に遅くなるため、電圧下にある時間が相対的に長くなり、より明らかに電圧の影響が認められる。特に充填剤に保持されない物質、とりわけカラム入り口方向に電気泳動する陽イオンについては、その電気移動度差による影響が顕著に現れる。従って、小さな圧力差流のもとでは陽イオン、陰イオンの同時分離に有利である。さらに、電気移動度差が観測されるのでイオン種の推測に役立つ。

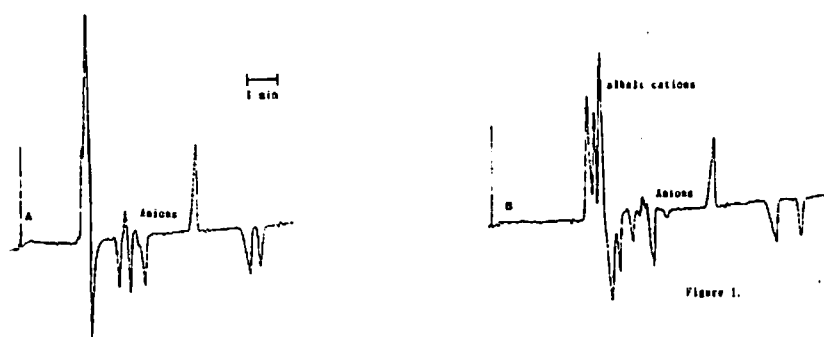


Figure 1.

A) 100Kgf/cm²

B) 70Kgf/cm²

2. 一細胞のマニピュレーション

細胞の表面は負の電荷を持っており、細胞を静電場に置くと細胞は自らの負電荷により電気移動度を得、陽極へ向かって泳動する。本報ではこの現象を細胞のマニピュレーションに利用した。

マニピュレーションを行うにあたって用いた細胞は、PC12h等である。細胞のキャピラリーカラム内への導入の手順を以下に示す。顕微鏡ステージに取り付けられたマニピュレーターに0.09%食塩水を滴たしたキャピラリーカラム（内径25 μm 、長さ3cm）を接続し、その一端を透明電極上の培地に浸す。キャピラリーカラムの他端は0.09%食塩水を滴たしたリザーバー中に浸してある。細胞が浮遊するリザーバーを陰極、他方を陽極として300Vの電圧を印加する。これにより電気浸透流が発生し、陽極から陰極に向かい食塩水が流れる。顕微鏡下でマニピュレーターを操作し、浮遊している細胞とキャピラリーカラムがほぼ同一の高さになる様になると、キャピラリー先端付近の細胞は徐々に速度を上げ、キャピラリー内に導入される。細胞を一旦キャピラリーカラム内にトラップする。ついで別の容器へ逆電圧を印加することにより細胞を導出する。我々が考案した電気マニピュレーションは一個の細胞を培地の汚染なく移行できる特性を持つ。

細胞内液の分離分析においては、その分析系に培地が混入することは好ましくない。しかしながら本法では電気浸透流に逆らうかたちで細胞が導入されるため、0.09%食塩水による細胞の洗浄も同時に行われる。従って培地による汚染は少なく微量成分の分析に好ましい手法だと思われる。

COMPUTER SIMULATION OF CAPILLARY ELECTROPHORETIC SEPARATION (I)

Takeshi Hirokawa and Yoshiyuki Kiso

Hiroshima Univ., Hijiya Women's College.

Factors affecting effective mobilities were discussed and a simulation program developed for separation optimization was briefly introduced. The program used a database of absolute mobilities and dissociation constants compiling 500 samples. Separation optimization utilizing computer simulation method was described for lanthanide ions.

1. 緒言 キャピラリー等速電気泳動法およびキャピラリーゾーン電気泳動法における分離は共に分離の場が自由溶液系であり、分離を支配する実効移動度が比較的容易にシミュレートできるのでコンピューターによる分離最適化が可能である。演者らは既に等速電気泳動法の実用的なシミュレーションを可能にしているが、最近CZEへの応用も試みている。ここでは実効移動度計算の基礎、開発中のソフトウェアおよび移動度・pKaデータベースについて概略を述べる。希土類イオンについて、両方法の実測結果とシミュレーションの対応について検討したので、分離最適化への応用・定性分析への応用も含めて報告する。

2. 実効移動度の計算 電気泳動における各ゾーンの移動速度 v は電気浸透流速 (v_{eo}) とイオンの泳動速度 (v_{ii}) の和である。定量原理の要請により、ITPで $v_{eo}=0$ とするのが望ましいのに対して、CZEでは迅速分析のためある程度 v_{eo} が大きい領域で分析が行われる違いがある。分離に影響する因子は v_{ii} であり、それは実効移動度 m と電位勾配 E の積で表される。 E は装置に関する因子であるから、問題にすべき因子は m であり、この m の正確な評価が最適化計算の最も重要な点となる。

イオンの実効移動度は、無限希釈(イオン強度0)における完全解離状態の移動度を絶対移動度 (m_0) から計算する。 m_0 の値は25℃で通常 $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオーダーである。 m_0 に影響する因子は、イオンの電荷・サイズ・分子量などのイオン固有の性質である。一方実効移動度はイオンの存在する雰囲気すなわち溶媒の誘電率・温度・イオン強度・pH・錯形成剤の有無などにより影響を受ける。電気泳動分離を行なうにあたっては成分イオンの実効移動度が異なるよう、適切な分離用電解液を調製することが最も重要となる。実効移動度はイオン強度の影響により常に絶対移動度より小さな値になるが、さらに弱電解質の場合は解離度 α の影響を受ける。ある試料イオンの m は全イオン種について存在率を考慮し総和をとる。

ゾーン電気泳動法では支持電解質のpHやイオン強度、電位勾配を一定とみなしてよいので、ジュール熱の影響や電気浸透流の問題を除けば極めて単純な電気泳動系である。A、Bイオンの実効移動度を $m_A > m_B$ とすると、 t 秒後の泳動距離の差 Δd は $(m_A - m_B) E t$ となりゾーン幅に応じて適当な Δd で分離が終了したとみなす。一方等速電気泳動法では試料イオンはリーディング電解液とターミナル電解液に挟まれた状態で泳動し分離される。ゾーン電気泳動とは違って試料の実効移動度、濃度、pH、イオン強度などはリーディング電解液に制御されるためゾーン毎に異なっており、より複雑な系で等速電気泳動条件を満足するような制約の上で計算を行う。いずれにせよ移動度やpKaが基本的に重要なデータであり、実効移動度を用いる最適化計算の実用性を決める。我々は10年間以上にわたりデータの集積を行ってきたが、

特に最近は測定される事が少ないため必ずしもまとまったデータが得にくいという問題がある。現在使用中のデータベースに収納している試料の数は500程度である。

3. 希土類イオンの実効移動度の実測とシミュレーション 希土類イオン等金属イオンの分離には錯体効果の利用が不可欠である。計算には通常必要な移動度・pKaの他、錯体の安定度定数が必要となる。これらに付いては膨大な資料があるが、予測計算に使用可能なものはさほど多くはない。この場合錯イオンの移動度の欠如が問題になる事が多く、逆に電気泳動法で求める事が多い。

ランタニドイオンの電気泳動分離にあたっては添加する α -ヒドロキシイソ酪酸の濃度を変化させて移動度が十分異なるような条件を求める。この場合次のような式で実効移動度が表される。

$$\bar{m}_{La} = \frac{(m_1 + m_2 \cdot \beta_1 [HIB^-] + m_3 \cdot \beta_2 [HIB^-]^2 + m_4 \cdot \beta_3 [HIB^-]^3 + m_5 \cdot \beta_4 [AcO^-] + m_6 \cdot \beta_5 [AcO^-]^2 + m_7 \cdot \beta_6 [AcO^-]^3 + m_8 \cdot \beta_7 [HIB^-][AcO^-])}{(1 + \beta_1 [HIB^-] + \beta_2 [HIB^-]^2 + \beta_3 [HIB^-]^3 + \beta_4 [AcO^-] + \beta_5 [AcO^-]^2 + \beta_6 [AcO^-]^3 + \beta_7 [HIB^-][AcO^-])}$$

ここで β_1 、 β_2 、 β_3 はHIBと希土類の錯安定度定数、 β_4 、 β_5 、 β_6 は酢酸との安定度定数、 β_7 はHIBと酢酸の混合錯体の安定度定数である。

図1にHIB濃度を1mMから7mMまで変化したCZEのフェログラムを、図2に実効移動度の計算結果を示した。安定度定数は二組の別の研究者による値を利用した。実測した移動度に対して図2のような結果が得られた。実測とのズレは僅かではあるが逆に実測値にもっとも良く一致するよう安定度定数を決定し得る事も図から明らかである。これらの実効移動度を求めるにあたっては浸透流の補正が必要であるが、詳細に付いては講演で報告する。

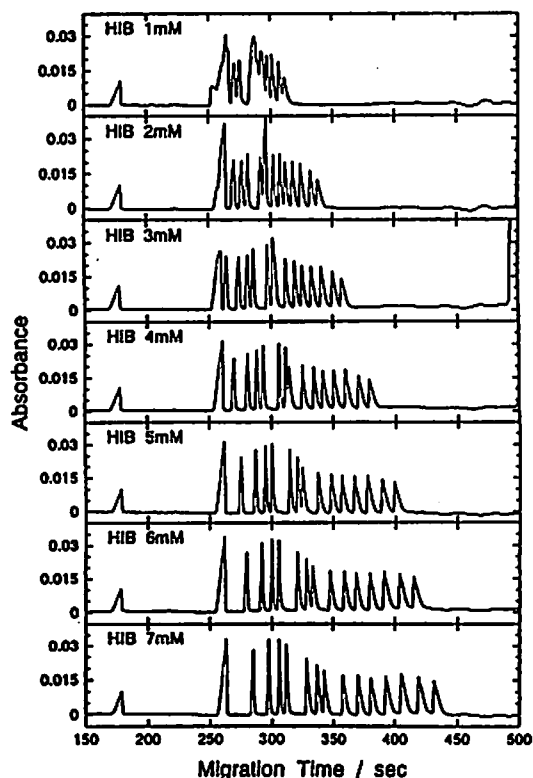


Fig.1 Observed pherograms (CZE)
30mM creatinine, pH=4.8(acetic acid)

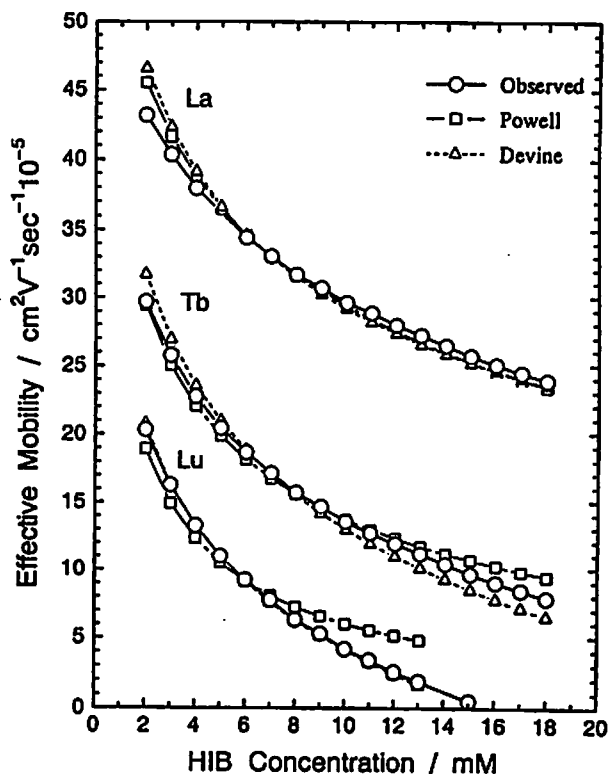


Fig.2 Observed and simulated
effective mobilities of lanthanide ions

キャピラリー電気泳動を用いた 液相内超微量錯体形成反応と検出

(東大・工) ○川西 宏昌 北森 武彦 澤田 嗣郎

COMPLEXING REACTION AND DETECTION OF ULTRAMICRO
AMOUNTS IN SOLUTION USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS
Hiroaki KAWANISHI, Takehiko KITAMORI and Tsuguo SAWADA
Faculty of Engineering, The University of Tokyo

We succeeded to react, separate and detect sub-femto mole chelating reaction of Cu^{2+} ion and porphyrin using capillary zone electrophoresis. The reaction scheme was as follows; Tetraphenylporphyrin Tetrasulfonic Acid (TPPS) solution was introduced, and then, Cu^{2+} ion solution was introduced. Because the electrophoretic mobility of Cu^{2+} ion is larger than that of TPPS, reaction was occurred when the Cu^{2+} ion band passed the TPPS band. The mixed components of reagent, analyte and reactant in the overlapping band were separated and detected individually. We tried to apply this scheme of on-column reaction for the basis of capillary flow injection analysis. We could determine femto mole amounts of Cu^{2+} ion, and discussed on particular characteristics of reaction in ultrasmall volume, affected by local pH value and wall effect.

【緒言】 我々は、キャピラリーゾーン電気泳動法を、分離分析手段としてだけでなく、キャピラリー内の数十nL程度の微小空間におけるfmol以下の超微量液相内化学反応系の反応場に用いることを提案した¹⁾。泳動緩衝液に反応物を溶かしておく一般のオンカラム反応とは違い、この反応は、先に導入した分子を後から導入した泳動速度のより速い分子が追い抜く間に起こす系である。。この方法は、超微量の反応・分離・検出をオンカラムで行うキャピラリーフローインジェクション分析 (CFIA) への応用が期待される。これまで Cu^{2+} と Tetraphenylporphyrin Tetrasulfonic Acid (TPPS) の錯体形成反応をこの反応系に適用し sub-fmol レベルでのオンカラム反応と分離・検出を確認した。今回、対イオンの影響及び mL レベルの容積で行う通常バルク反応と比較し、キャピラリー内の微小空間という特殊な条件が与える反応への影響について検討した。

【実験】 リン酸緩衝溶液 (pH=11) で満たしたキャピラリー (長さ100cm×内径50 μm) にTPPSリン酸緩衝溶液 ($5 \times 10^{-6}\text{M}$) を38fmol電気的に導入し、次に、より泳動速度の速い $\text{Cu}^{2+}(\text{SO}_4^{2-})$ 水溶液 ($5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-3}\text{M}$, pH=5~6) を濃度を変えて8.6nL導入した。20kVの電圧を印加しオンカラムで反応・分離させ、波長413nmの光で吸光検出した。対イオンを変えた Cu^{2+} (Cl^- , OCOCH_3^-) 水溶液に対し同様な実験を行った。また、バルク反応としては、TPPSリン酸緩衝溶液 ($5 \times 10^{-6}\text{M}$) 10mlと濃度を変化させた $\text{Cu}^{2+}(\text{SO}_4^{2-})$ 水溶液 ($5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-3}\text{M}$) 20mlを3分間反応させ、その混合溶液をオンカラムと同条件で分離・検出し、また同時に光度滴定法によりスペクトル変化から錯体形成反応を確認した²⁾。

【結果と考察】 オンカラム反応で得られた電気泳動図をFig.1に示す。 Cu^{2+} の導入量に対

するピークの高さの変化から、2つのピークはそれぞれ未反応TPPSとCu-TPPS錯体のピークに同定でき、オンカラム反応と分離・検出を確認できた。Cu-TPPSの生成量は、 Cu^{2+} の導入量に対し比例関係を示した。TPPS溶液の濃度を $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $\text{Cu}^{2+}(\text{SO}_4^{2-})$ 水溶液の濃度を $8 \times 10^{-4} \text{M}$ とし、有効長120cmのキャピラリーを用いそれぞれ2.6fmol、3.2pmol導入し反応させると630amolのCu-TPPSが分離・検出され、これより検出限界(S/N=2)は250amolであった。

また、対イオンを Cl^- 、 OCOCH_3^- に変えたところ SO_4^{2-} と同様な結果を示した。生成定数は、 SO_4^{2-} で $9.1 \times 10^2 [\text{mol}^{-1} \text{dm}^3]$ 、 Cl^- で $2.1 \times 10^2 [\text{mol}^{-1} \text{dm}^3]$ 、 OCOCH_3^- で $2.2 \times 10^2 [\text{mol}^{-1} \text{dm}^3]$ であり、反応への対イオンの影響が見られた。Fig.2に、オンカラム反応における Cu^{2+} 導入量に対する未反応TPPS及びCu-TPPSの検出量の変化を示す。Cu-TPPSが分離・検出されない Cu^{2+} 導入超微量域でTPPSの導入量が一定であるにもかかわらず、TPPSの検出量が増加した。これらの影響に対する反応因子としては、反応分子数が少数でありかつ反応が微小空間の試料バンド間で起こるためによる、反応領域の局所的なpH分布や内壁電荷の影響などが考えられる。

次に、同じ反応条件でバルク反応させた溶液に対する、TPPSの517nm、Cu-TPPSの540nmでの光の吸収を利用した光度滴定法の結果をFig.3に示す。オンカラム反応と同様な濃度比においてCu-TPPSの検出が確認された。また、この溶液を同じ泳動条件で電気泳動させたが、反応が起こっているにもかかわらず、どの Cu^{2+} 導入量に対してもピークは一つのみでTPPSとCu-TPPSの分離・検出は確認されなかった。さらに、バルク反応の生成定数は $2.3 \times 10^3 [\text{mol}^{-1} \text{dm}^3]$ で、オンカラム反応より約2倍大きかった。この結果から、オンカラム反応には、バルク反応にない反応因子(試料バンド内のpH分布)があると考えられる。

以上の結果より、オンカラム反応を利用したCFIAへの発展が期待できる。今後、光熱変換測定などのより高感度な計測³⁾による、さらに微量の検出及びオンカラム反応の特殊性について詳細に検討を進める。

- 1) 小林学ら：日本分析化学会第42年会講演要旨集p33 (1993) 2) J.Itoh, et al.: Anal. Chim. Acta., 74, 53 (1975) 3) T.Odake, et al.: Anal. Chem., 64, 2870 (1992)

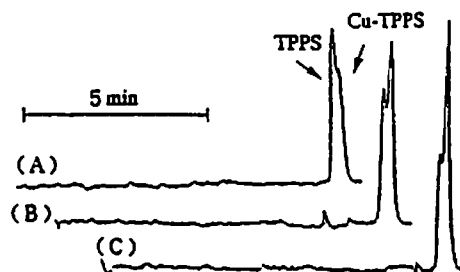


Fig.1 Electropherograms of TPPS and Cu-TPPS reacted in a capillary (50cm length): TPPS was injected by 80 fmol constantly; and then Cu^{2+} ion was done by (A) 10.4pmol, (B)15.6pmol, (C)20.8pmol.

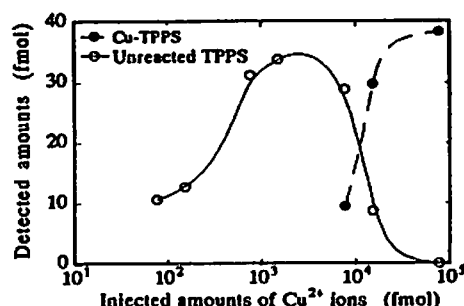


Fig.2 Relationship between detected and injected amounts of Cu^{2+} ions

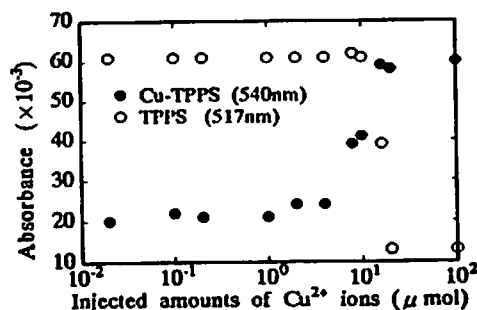


Fig.3 Photometric titration of TPPS and Cu-TPPS reacted in bulk phase reaction

10 高分子界面活性剤を用いるMEKC：擬似固定相の部分充填法の検討

(カネカテクノリサーチ) ○尾崎祐人、(姫路工大理) 伊藤典孝、寺部茂、
(日立中研) 高田安章、坂入実、小泉英明

MEKC USING HIGH-MOLECULAR SURFACTANTS: STUDY OF THE PARTIALLY FILLING OF THE PSEUDO-STATIONARY PHASE.

Hiroto Ozaki¹, Sigeru Terabe², Noritaka Ito², Yasuaki Takada³, Minoru Sakairi³ and Hideaki Koizumi³

¹Kaneka Techno Research Co.Ltd., ²Faculty of Science, Himeji Institute of Technology and ³Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

Partially filling of the pseudo-stationary phase in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was studied with a high-molecular surfactant, butyl acrylate/butyl methacrylate/methacrylic acid copolymer (BBMA). Six naphthalene derivatives were separated successfully with 5% BBMA (pH 7) introduced at 50 mbar for 30 s before the pseudo-stationary phase zone passed through the detector. Their capacity factors increased with an increase in the pressurization time of BBMA. Another high-molecular surfactant with strong UV absorbance was utilized in MEKC with UV detection. The partially filling method was applied to MEKC-MS.

1) はじめに

MEKCを含めた動電クロマトグラフィーでは、キャピラリー全体に擬似固定相を満たし、検出部には常に擬似固定相が存在する状態で分析を行う。この場合検出波長に強い吸収を有する擬似固定相は使用できない。キャピラリーの一部にのみ擬似固定相ゾーンを形成させて分離を行うことができれば、検出部に擬似固定相を入れずに試料のみを検出でき非常に有用と考えられる。田中等は、タンパク質を擬似固定相として使用したアフィニティ動電クロマトグラフィーでこの方法について報告している¹⁾。陰イオン界面活性剤を使用し、部分充填法を用いて電氣的に中性な試料をMEKC分離する場合を模式的にFig.1に示す。この場合、擬似固定相ゾーンの広がり が分離に大きく影響すると考えられ、単分子の安定なミセルを形成する高分子界面活性剤²⁾の利用が適している。本研究では、陰イオン高分子界面活性剤であるアクリル酸ブチル/メタクリル酸ブチル/メタクリル酸共重合体(BBMA)を用いて基礎的検討を行い、さらに、強いバックグラウンド吸収を有するナフthalen-1-ol-2-sulfonic acidナリ縮合物を擬似固定相に用いてのUV検出への応用、およびBBMA系のMS検出への応用を試みた。

2) 実験と結果

MEKCは、装置にHP-3DCE (ヒューレットパッカート)を使用し、内径50 μ m、有効長40 cmのフリストシリカキャピラリー、定電圧20 kV、キャピラリー温度30 $^{\circ}$ C、検出波長210nm

の条件で実施した。分離溶液は100mMホウ酸塩-50mMリン酸塩緩衝液を用いて調製した。部分充填法の手順をTable-1に示す。MEKC-MS測定は、日立製M1000型LC/API/MSに自作のエレクトロスプレーイター-フェイスを接続し、既報³⁾と同様に行った。BBMAは第一工業製薬製、ナフトルスはソル酸ナリソ縮合物は共栄社化学製を使用した。BBMAの充填量を変えた場合の標準試料の分離をFig.2に示す。検討の結果、5%BBMAを圧力50mbarで30秒間充填することにより、BBMAゾーンが検出部に到達するまでの時間内で、ナフトル誘導体6成分をほぼ完全に分離できた。充填時間増大とともにいずれの成分も容量比の増大が認められた。これは通常のMEKCと同様、ミセル相体積の増大によるものと考えられる。擬似固定相充填は圧力法でも電気泳動法でも可能であった。同様の方法を用いて、ナフトルスはソル酸ナリソ縮合物を擬似固定相に用いたMEKC、およびBBMAを用いたMEKC-MSにおいて、バックグラウンドを低減させることができた。

1) 田中、寺部、第55回分析化学討論会講演要旨集、p. 399 (1994)。

2) H. Ozaki, S. Terabe and A. Ichihara, *J. Chromatogr.*, 680(1994)117.

3) 尾崎、伊藤、寺部、高田、坂入、小泉、日本分析化学会43年会講演要旨集、p. 20 (1994)

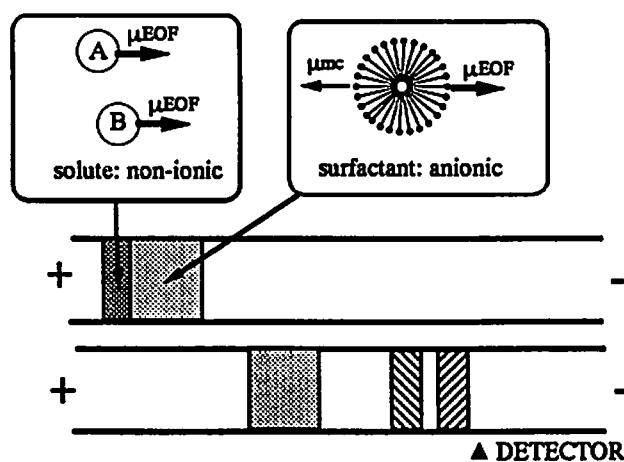


Fig. 1 Schematic illustration of partially filling in MEKC.

Table 1 Partially filling method.

NO	Condition
1	flush: 1N NaOH 2 min
2	flush: water 2 min
3	flush: buffer 2 min
4	injection: 5% BBMA, 50 mbar 30 s
5	injection: solute, 50 mbar 2 s
6	injection: buffer, 50mbar 2 s
7	start run

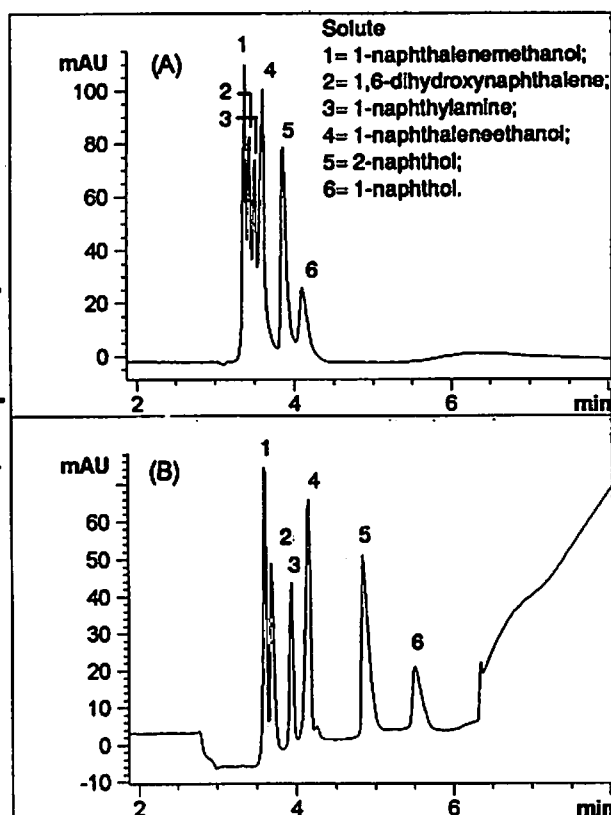


Fig. 2 Separation with partially filling of BBMA.

Capillary, 50 μ m i.d. 48 cm (40 cm to the detector); Separation solution, 5% BBMA introduced by pressurization at 50 mbar 10 s (A) and 30 s (B) from the inlet side of the capillary; running buffer, 50 mM phosphate-100 mM borate buffer (pH 7.0); applied voltage, 20kV; detection wavelength, 210nm.

11 電気インジェクション法の直線性及び インジェクション量の関係について2

(日本ウォーターズ・リミテッド)

○佐々木 秀輝、米久保 淳、鈴木 政明、高橋 孝行

The relationship of Linearity and Total Amount Introduced by Electromigration

HIDEKI SASAKI, JUN YONEKUBO, MASA AKI SUZUKI, YOSIYUKI TAKAHASHI
(Nihon Waters LTD.)

There are two type of methods that introduce sample into capillary in performing Capillary Electrophoresis. One is Hydrostatic method, and another is the Electromigrative method. In this report, the influence of coexisting ion to objecting ion was observed. To eliminate this influence it is effective to add same materials that increase equivalent conductance, and take standard adding method.

目的及び背景：

キャピラリー電気泳動のインジェクション法には、大きく分けて、圧力を利用する方法と、電気的な力を利用する方法、即ち電気インジェクション法との2つの方法がある。

電気インジェクション法を用いた場合、その注入量を変化させるパラメータとして、電圧・注入時間・サンプルの伝導度などがある。

前回、低分子イオンの分析を対象として、これらのパラメータと、実際に得られるレスポンスとの関係について報告したが、今回、共存するイオンがレスポンスに及ぼす影響について検討したので報告する。

実験：

[用いた機器] CIA Analyzer (キャピラリー電気泳動システム; Waters)、Millennium 2010 (データ処理; Waters)

[分析条件] キャピラリー：75 μ m $\times$ 60cm、検出：Inirect UV at 254nm、電圧：20KV, Negative Polarity、泳動バッファー：5mM-Sodium Chromate, 2.5%-OFM anion BT (Waters)、温度：25 $^{\circ}$ C

実験は上記条件下で、イオンクロマト用スタンダード (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , F^-) を適宜希釈し、その組成比を変えて分析を行った。また、サンプルは、電気インジェクション法で 1KV, 15sec. あるいは 5KV, 30sec. の注入を行った。

結果及び考察：

Fig.1. は Cl^- を 1ppm に固定し、 NO_3^- の濃度を変化させ、そのレスポンスの変化を見たものである。図から明らかなように、 NO_3^- の濃度変化と共に Cl^- のレスポンスが変化することが確認された。これは式 (1)、(2) に於いて、 μ_{Sampling} の値がサン

プル溶液のモル導電率に反比例した値であることに由来するものと考えられる。

$$Q = (\mu_{\text{Sampleing}} + \mu_{\text{EOF}}) \pi r^2 V_{\text{iti}} C_i / L \dots \dots \dots (1)$$

$$\mu_{\text{Sampleing}} = \lambda_i / (\Lambda_{\text{eq}} F) \dots \dots \dots (2)$$

また、NO₃⁻のレスポンスが曲線になるのは、 $\mu_{\text{Sampleing}}$ がCの分数関数($\Lambda_{\text{eq}} = \sum C_i \lambda_i$)になっているためと考えられる。一方、この曲線を低濃度側で微視的に見ると、別の関数で近似できるようになる。これは λ_i (及び Λ_{eq})がKohlrauschの経験式 (あるいはOnsagerの理論式) に従って変化することに由来するものと考えられる。ただし、この式は0.001mol/lが適用可能な上限とされており、Fig.1.における高濃度側ではこの領域をはずれており、この式を適用することは出来ない。

$$\Lambda = \Lambda^\infty - A\sqrt{C} \dots \dots \dots (\text{Kohlrauschの経験式})$$

図3はSO₄²⁻を100ppmで固定し、Cl⁻の濃度を変化させたものである。この場合では、 $\lambda_i / \Lambda_{\text{eq}}$ の値が十分に小さいため、Cl⁻の濃度変化に伴う λ_i (及び Λ_{eq}) の変化が極めて少ないため、ほぼ直線で近似できるものとなる。

以上の結果から、電気インジェクション法を用いて分析を行う場合には、試料溶液のモル電導率を測定成分に対して十分に高くするような物質を必要に応じて加え、標準添加法を用いて定量する必要があると考えられた。

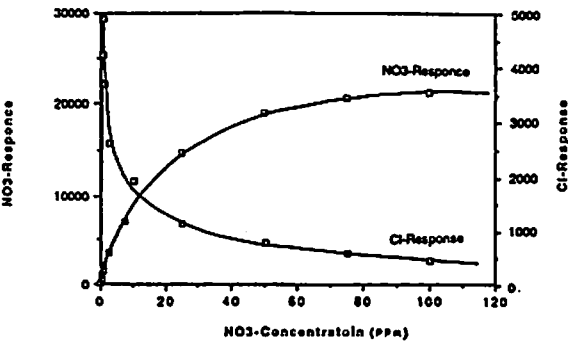


Fig.1 Influence of coexisting ion

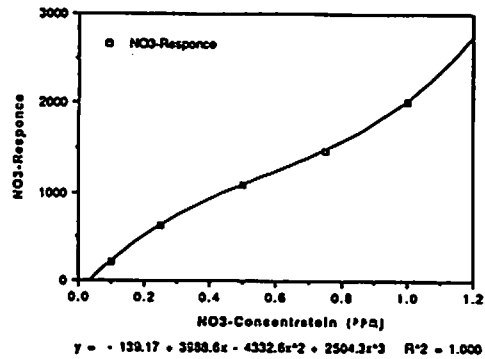


Fig.2 Zoom up Fig.1.

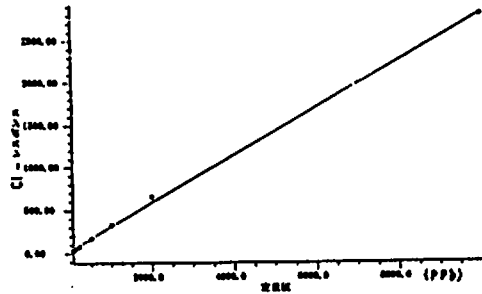


Fig.3. Calibration curve of Chloride in 100ppm Sulphate

参考文献

- 1) H.SASAKI, et. al. 第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集, p17
- 2) D.J.Rose and J.W.Jorgenson, Anal.Chem.60,642(1988)
- 3) X.Huang, M.J.Gordon, and R.N.Zare, Anal.Chem.60,377(1988)
- 4) L.Onsager, Phys.Z., 28,277(1927)
- 5) T.Shedlovesky, A.S.Brown, D.A.MacInnes, Trans.Electrochem.Soc., 66,165(1934)

キャピラリー電気泳動の不確定性構造と オブジェクトを指向した最適化

I. 測定精度とベースラインの $1/f$ ゆらぎの関係について

(国立衛生試験所) ○林 譲、ラッセル B. ポウ、松田りえ子

Uncertainty Structure and Object-Oriented Optimization (OOOP) of Capillary Electrophoresis

I. Mathematical Relationship between Measurement Precision and
 $1/f$ Fluctuation of Baseline Drift

Yuzuru Hayashi, Russell B. Poe, Rieko Matsuda

This presentation briefly explains a mathematical method for predicting the relative standard deviation of measurements in CE from the signal shape and stochastic properties of baseline drift. The direct applications of this method include the determination of LOD (limit of detection), optimal integration domain, etc. The optimization of CE analysis is also feasible based on the predicted RSD of measurements instead of separation degree which has been a commonly used criterion. This optimization is termed object-oriented optimization, because it is evaluated with the analytical purpose (precision or RSD) as a criterion.

スペクトロスコピーでは、測定装置の評価、最適な装置の設計を S/N 比を基準にして行うのが一般的である。分離系と分光学的検出系から成るクロマトグラフィやキャピラリー電気泳動では、その分析的特徴と重要性から、分離を最適化の基準にすることが多い。しかし、最近の ISO や GMP では実際の分析値の信頼性を基準にして、分析法の評価を行っている。これは、全ての分析法を共通の基準で評価するという意味である。そこで、キャピラリー電気泳動における測定値の信頼性におけるベースラインの揺らぎの影響を検討した。信頼性という概念には、真度（真の値からのずれ）と精密度（バラツキの程度）が含まれるが、ここでは精密度のみを扱う。この発表のねらいは S/N 比をより広い意味で定義することである。

精密度は繰り返し測定から得られる測定値の RSD で表される。これはシグナルの形とベースラインノイズの確率論的性質に大きく依存する。我々はこの2つの要因の数学的性質から、実際に繰り返し測定を行わずに定量精度を予測する理論を確立した。この理論を用いれば、精度という分析目的（オブジェクト）を基準に最適化できる。この最適化法は、従来の分離分析で行われている分離の最適化とは異なるので、オブジェクト指向の最適化（Object-Oriented Optimization）と呼ぶことにする。

【 $1/f$ 揺らぎと定量精度】Fig. 1にベースラインの一部を示す。このパワースペクトルがFig. 2である。Fig. 1のベースラインは大塚電子製 CAPI8000を使用し、波長は25

0 nmで測定した。データの取り込み間隔は50 msとした。フォトダイオードの検出器の例を示したが、光電子増倍管あるいはマススペクトルの電子管検出器でも同じ様な形のパワースペクトルを与える。このパターンは $1/f$ 揺らぎによく似ている。このパターンはホワイトノイズとMarkov過程の和のモデルで良く近似でき、最小2乗法を用いてMarkov過程の標準偏差 m と保存率 ρ 、およびホワイトノイズの標準偏差 w を求めることが出来る。これらのパラメータを用いて、ベースラインが起こす測定誤差 s_b を計算することが出来る。

【オブジェクトを指向した最適化】分離分析法を開発する時点においては、分離を基準にしてその分析方法を評価、最適化するのは簡便である。しかし、分離分析以外の方法と比較を行うときは、分離は共通の基準とはならない。例えば、CEとFIAを比較することを考えてみれば、明らかである。そこで、精密度(RSD)を基準にした一般的評価・最適化法が必要である。

Figure 1

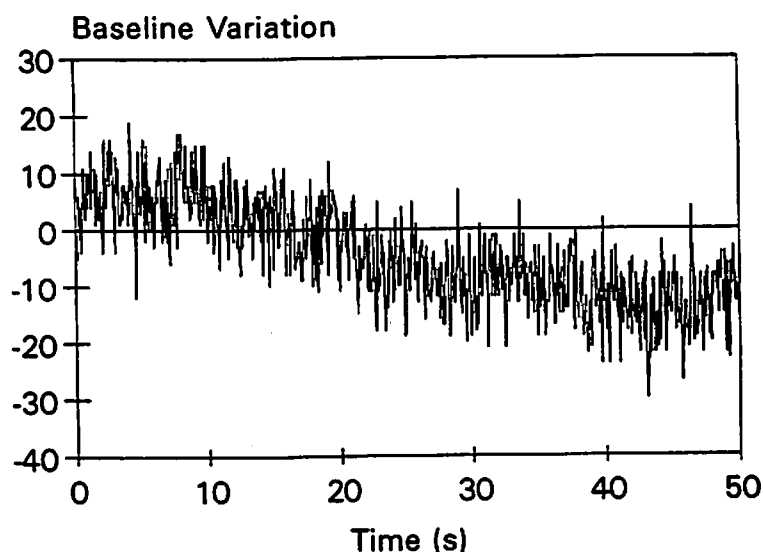
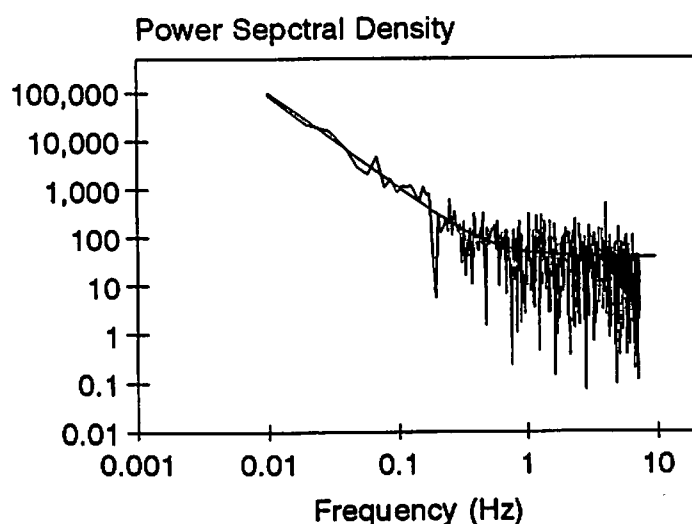


Figure 2



キャピラリー電気泳動の不確定性構造と オブジェクトを指向した最適化

II. 検出限界について

(国立衛生試験所) ○松田りえ子、林 譲、ラッセル B. ポウ、
佐々木久美子、斎藤行生

Uncertainty Structure and Object-Oriented Optimization (OOP) of Capillary Electrophoresis

II. Limit of detection

Rieko Matsuda, Yuzuru Hayashi, Russell B. Poe, Kumiko Sasaki and Yukio Saito

The limit of detection (LOD) of capillary electrophoresis was determined based on the $1/f$ fluctuation of the baseline. The standard deviation of blank signal, σ_b , was estimated with use of $1/f$ fluctuation parameters, and LOD was defined as $3\sigma_b$. The RSD of measurements was predicted from the peak area of an analyte and σ_b and predicted RSDs of measurement agreed with the measured values over the wide range of wavelength.

測定装置の検出限界を明確に定義することは、ある分析による対象物質の検出限界濃度を求めるための基本である。この検出限界濃度を明確に定めることは、科学的な観点から興味深いだけでなく、分析機器の相互比較あるいは化学物質の曝露量を推定するような実際的な問題の解決においても重要である。

IUPACでは検出限界 (LOD, limit of detection) を $LOD = k\sigma_b$ と定義している。 σ_b は対象物質が存在しないとき、つまりブランクの信号の標準偏差である。LOD 付近の信号の標準偏差が σ_b と等しいと仮定すれば、係数 $k = 3$ ではブランクを測定対象物質の信号とみなす確率つまり、第1種の過誤 α を 0.13% とすることになる。逆から見れば、LOD で得られる信号強度の相対標準偏差は 33% となる。この定義は非常に明解ではあるが、まず σ_b の大きさを見積もる必要がある。しかし、クロマトグラフィあるいはキャピラリー電気泳動のような測定では、未だに明確な σ_b の定義が与えられないため、これを実験的に求めることも困難である。そこで、我々は先の発表で示したベースラインノイズの構造を考慮して σ_b を定義するとともに、ベースラインの解析から σ_b を推定することを試みた。この理論に基づいて液体クロマトグラフィでの LOD について検討した結果を先の分析化学会で報告した。今回は、この方法をキャピラリー電気泳動に応用するとともに、フォトダイオー

ドアレイ検出器を用いたときの最適な波長の選択について、精度に基づいて考察する。

【実験】泳動液は、50mMSDSを含むpH8.1ほう酸緩衝液(50mM)を用い、電圧20kVで泳動した。

装置は大塚電子製 CAPI8000を使用し、220-310nmの範囲を10nmの間隔で測定した。データの取り込み間隔は50msとした。7種類の溶質濃度1-1000μg/mlの範囲の溶液をそれぞれ8回測定しRSDを求めた。

【結果】Table 1に各波長で求めた、パラメータm (Markov過程の標準偏差)、ρ (保存率)、w (ホワイトノイズの標準偏差) 及びσ_Bの値を示す。σ_B各波長でこれらのパラメータが変化しており、波長によってσ_Bが異なっていることがわかる。フェナセチン20μg/ml溶液の各波長でのピーク面積と、相対標準偏差の予測値及び実測値をFig. 1に示す。予測と実測はよく一致した。Fig. 2にはLODに相当するピークを示した。

Table 1 Effect of wavelength on m, ρ, w, and σ_B

wavelength	m	ρ	w	σ _B (150)
220 nm	0.8487	0.99825	12.786	837
230	0.1687	0.99994	8.25	206
240	0.5614	0.99805	6.231	544
250	1.0349	0.99887	7.274	1227
260	1.204	0.99915	7.274	1335
270	1.3787	0.99833	7.558	1345
280	1.1129	0.99830	8.590	1086
300	0.8601	0.99862	7.928	856
310	0.8816	0.99831	7.547	862

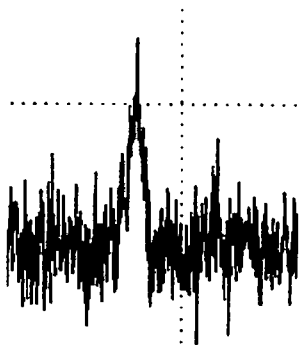


Figure 2 Peak at LOD

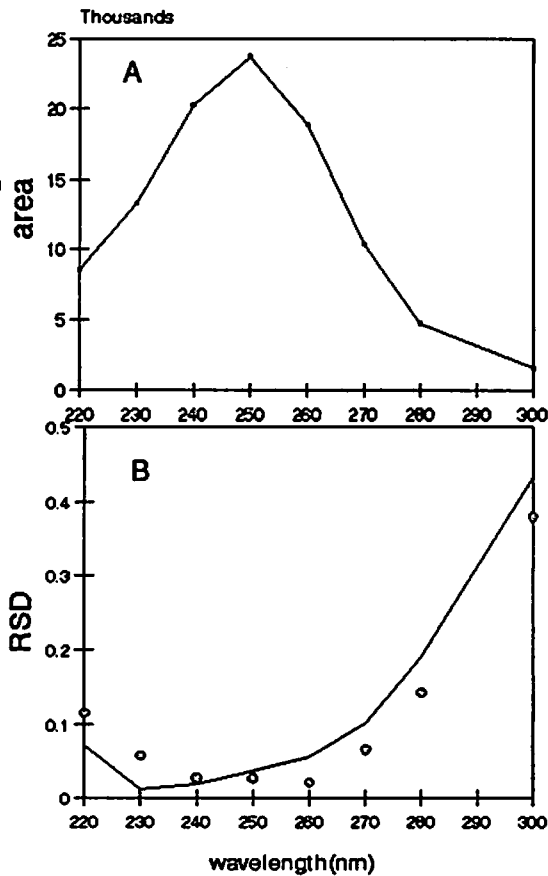


Figure 1 Area, predicted and observed RSD of phenacetin peak

キャピラリー電気泳動の不確定性構造と オブジェクトを指向した最適化

III. ベースラインゆらぎの確率論的性質に基づいた測定波長の最適化

(国立衛生試験所) ○ラッセル B. ポウ、松田りえ子、林 譲

Uncertainty Structure and Object-Oriented Optimization (OOOP) of Capillary Electrophoresis

III. The Optimization of Bandwidth in Capillary Electrophoresis Diode Array Analysis Based on the Stochastic Properties of the Baseline Drift

Russell B. Poe, Reiko Matsuda, and Yuzuru Hayashi

キャピラリー電気泳動分析において、精度を最大にする最適な測定波長幅を選択する方法について検討した。ダイオードアレイ検出器のベースラインの揺らぎを高周波のホワイトノイズと低周波のMarkov過程の和として表すと、ホワイトノイズの標準偏差 w はMarkov過程の標準偏差 m よりも大きくなった。しかし、実際は m が精度へ大きく影響するので、 S/N 比を最大にする波長を予測するためには m が重要である。

広い波長範囲にわたって検出波長幅を変化させると、検出波長幅が大きくなると共に w は相対的に減少し、 m は増加した。この結果から、検出波長幅を増加させたときには、正確なベースライン補正が重要になることが示された。

This work describes the selection of the optimal bandwidth to maximize the precision of the CE analysis. The baseline noise is approximated by a combination of white noise and of the Markov Process. The white noise is characteristic of the high frequency noise in the baseline and the Markov process is related to the low frequency noise in the baseline. For UV diode array detection in CE, the standard deviation of white noise is higher than the standard deviation of the Markov process. However, white noise has little effect on the precision of integration due to the likelihood that the high frequency noise will cancel out. The noise associated with the Markov process (low frequency noise) affects the precision of integration the most. Therefore, the quantitative

understanding of the low frequency noise is critical in predicting which wavelengths have the maximum signal to noise ratio over the integration domain.

With the quantitative understanding of the low frequency noise, the wavelengths with the higher signal to noise ratios can be determined by using the absorption spectrum and the integration domain. This information is used to determine the single best optimal wavelength. The optimal bandwidth is calculated with an iterative approach of determining the noise parameters for varying size bandwidths over different wavelengths. As the bandwidths become larger, the standard deviation of the white noise becomes smaller (relatively) and the standard deviation of the Markov process becomes larger. This suggests that accurate baseline correction methods become more important as the bandwidth increases.

高感度キャピラリーセル及び差フ ェログラムを用いた可視部キャピ ラリー電気泳動のS/N向上

(大塚製薬(株)) ○葛城肅典、木下盛敏

(大塚電子(株)) 山田浩美、水口勉、小野真澄、新田哲士、北岸恵子

THE S/N RATIO IMPROVEMENT OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE VISIBLE REGION
WITH A HIGH-SENSITIVITY CAPILLARY CELL AND A DIFFERENT ELECTROPHEROGRAM

Kiyonori KATSURAGI(*1), Moritoshi KINOSHITA(*1), Hiromi YAMADA(*2), Tsutomu
MIZUGUCHI(*2), Masumi ONO(*2), Satoshi NITTA(*2), & Keiko KITAGISHI(*2)

(*1) Otsuka Pharmaceutical Co.,Ltd. (*2) Otsuka Electronics Co.,Ltd.

Instrumental and analytical modifications enabled us to improve the S/N ratio of the capillary electropherogram in visible region, i.e., (1)high-sensitivity capillary cell with an extended light path, (2)different electropherogram between two wavelengths, (3)optimization of sample injection, and (4)accumulation of data points both for the time interval and for the wavelength resolution.

【はじめに】

ペプチド、タンパク質、糖、核酸などの生体高分子の分析では、可視吸収を有する色素でラベルすることが広く行われている。キャピラリー電気泳動においては、検出部の光路長が短いので、高い検出感度の得られるUV域の吸収で検出することが多く、可視吸収色素でラベルして分析した例は少ない。我々はアミノ酸のラベル剤として知られる dabsyl (4-(dimethylamino)azobenzene-4'-sulfonyl) を用いて、キャピラリー電気泳動した時の可視部のS/N比を上げるために、いくつかの試みを行った。

【測定】

キャピラリー電気泳動装置としては、大塚電子CAPI-3000を用い、光源として12V、20Wのハロゲンランプを接続した。可視部の光量を平滑化するために、light balancing フィルターを通した。

キャピラリーは、合成石英製内径75 μ mのキャピラリーの内壁をHjertén⁽¹⁾の方法によりポリアクリルアミドでコーティングした。キャピラリーの全長は500mm、検出器までの有効長は378mmである。

サンプルは、dabsylでラベルしたオリゴヌクレオチドの11ng/ μ l (1.4 μ M) の溶液を用いた。0.1M Tris-borate緩衝液 pH8.5 (2mM EDTAを含む) を泳動溶媒として、-20kVの電圧を印加し、450nm~650nmの波長域で検出した。

【結果・考察】

図1にdabsylの構造、図2に吸収スペクトルを示す。図3は、dabsylの吸収極大である480nmで検出した泳動のフェログラムである。S/Nを向上させるために、以下の対策を行った。

- (1) キャピラリーの検出部の光路長を約3倍にした高感度キャピラリーセルを製作する。→シグナルの増加
 - (2) 480nmとdabsylが吸収をもたない600nmとの差フェログラムをとる。→ノイズの減少
 - (3) 注入法を落差法から加圧法に変えて、再現性のよい最適注入条件を探す。→シグナルの増加。
 - (4) 同じ時間分解能の泳動において、サンプリングタイムを小さく（光源の出力を大きくする）、積算回数を増やす。→S/Nの増加
 - (5) 波長分解能を低くして波長方向での積算効果を計る。→S/Nの増加
- (1)～(5)の試みによって、図4のようなフェログラムが得られ、S/Nが3.6→152と著しく向上した。

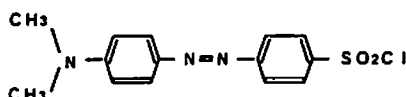


Fig.1. Structure of dabsyl chloride.

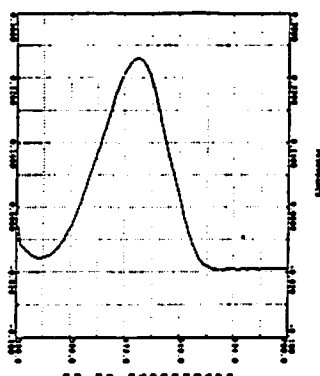


Fig.2. Absorption spectrum of dabsyl oligonucleotide.

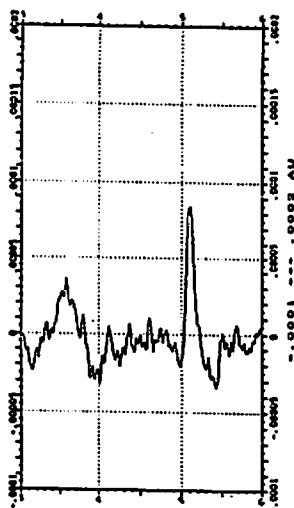


Fig.3. Electropherogram of dabsyl-oligomer at 480nm.
Hydrostatic injection of $\Delta h=25\text{mm}$ for 150s.
 $L=50\text{cm}$, $ID=75\mu\text{m}$ capillary.
sampling time: 30ms
accumulation: 8times
wavelength resolution: 5nm

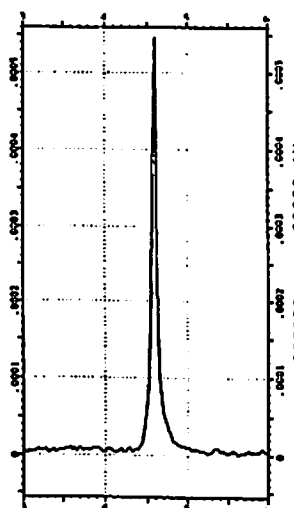


Fig.4. Different electropherogram of dabsyl-oligomer between 480nm and 600nm.
Hydrodynamic injection with $0.03\text{kgf}/\text{cm}^2$ N_2 for 10s.
 $L=50\text{cm}$, $ID=75\mu\text{m}$ with $3\times$ extended pathlength detection cell.
sampling time: 21ms
accumulation: 12times
wavelength resolution: 20nm

【文献】(1)S. Hjertén; J. Chromatogr., 347, 191-198(1985)

(パーキン エルマー ジャパン) ○ 小畑 義充、平沼 秀記、田中 博、白根 義治

(パーキン エルマー アプライドバイオシステムズ) Shiaw-Min Chen, John Wiktorowicz

High Resolution Full-Range Isoelectric Focusing in Capillary Electrophoresis

Yoshimitsu Obata, Hideki Hiranuma, Hiroshi Tanaka, Yoshiharu Sirane
(Perkin-Elmer Japan Co.,Ltd.)

Shiaw-Min Chen, John Wiktorowicz
(Perkin-Elmer Applied Biosystems Division)

ABSTRACT

A Capillary isoelectric focusing method with good reproducibility, wide linear range and high resolution was developed for the analysis of proteins and peptides. This was accomplished by applying accurately controlled vacuum and high voltage simultaneously during the mobilization step of the IEF procedure. Characterization of various acidic (pI=2.9) and alkaline (pI=9.0) proteins was achieved from a single analysis; linearity was obtained over the entire range of pH 2.5-10.0. Base-line resolution of proteins with a 0.2pH unit difference was achieved, even at the extreme limits of the pH gradient. The reproducibility of the pI determination was found to be <3% RSD.

【はじめに】

ポリアクリルアミドゲルをもちいた従来の等電点電気泳動法は、タンパク質の等電点(pI)に基づく分離法として広く普及している。しかしながらこの手法には、極端なpHではタンパク質を収束できないことや、染色の工程を必要とする低い定量性、そしてペプチドの様な低分子には適用が出来ないことなどいくつかの限界がある。今回我々は種々の条件を検討することにより再現性及び定量性の高い等電点電気泳動法を自動化されたキャピラリー電気泳動装置上で行なう方法を開発した。

具体的にどのような条件を検討し最適化を図ったか、またpH勾配のリニアリティーについても検討したので報告する。

【実験】

装置はパーキン エルマー製 Model 270A-HTを用いた。

キャピラリー等電点電気泳動(CE-IEF)は内径50 μ mのDB-1コーティングキャピラリー(J&W Scientific製)中で行なった。

どのような操作でCE-IEFを行なったかをFig.1に示す。

なお、フォーカシングしたタンパク質を検出器まで移動させるステップ(図中の最下段)では、移動の際のバンド拡散を防ぐため高電圧を印加したまま、精密な陰圧を適用した。

【結果及び考察】

分離条件を検討したところ、陰極槽液として20mM NaOH、陽極槽液として100mM H₃PO₄を用いた場合に最も良好な結果を示した。そこで、数種類のRNaseと、carbonic anhydrase, β -lactoglobulin A, CCK-flanking peptideを用いて上記の条件でCE-IEFを行なったところ、pH2.75からpH9.5の範囲で直線的なpHグラジエントが形成され、これらのタンパク質、ペプチドが同時分析可能であった(Fig.2)。また、0.2pH unit の違いでタンパク質をベースライン分離可能なことも確認された。

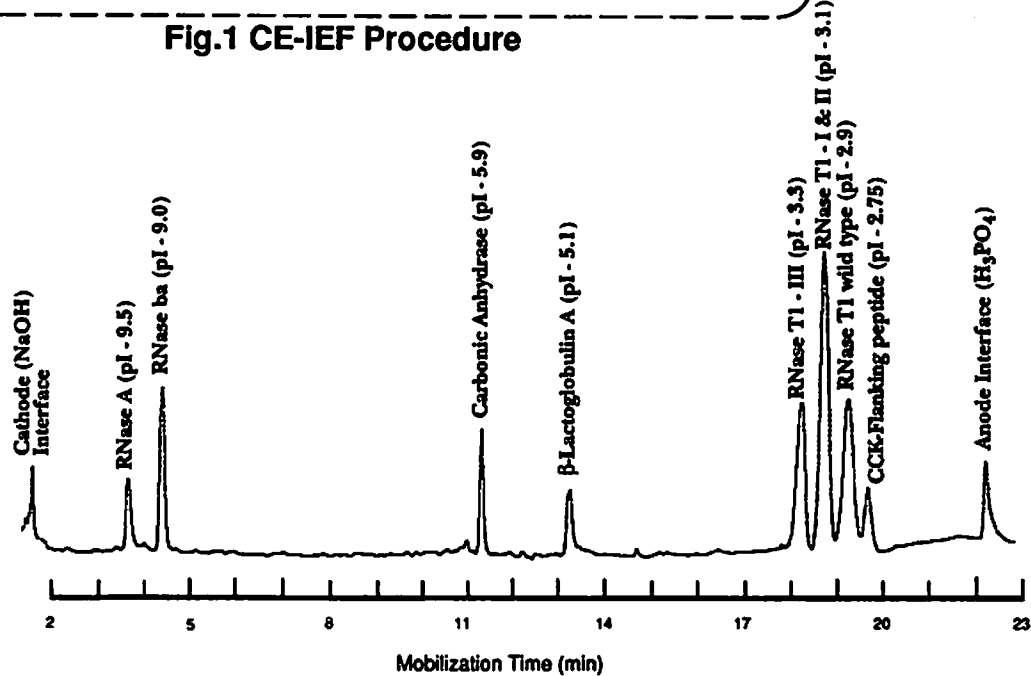
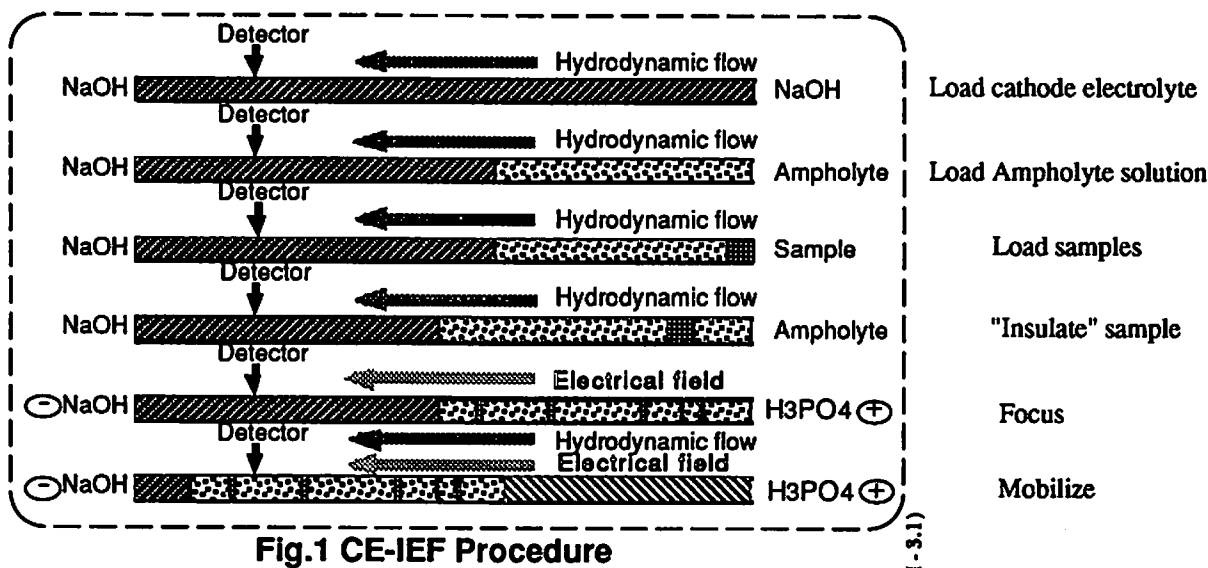


Fig.2 CE-IEF electropherogram of proteins and peptides

ワンステップキャピラリー 等電点電気泳動

(ベックマン) 鷹井 宏、安生綾子、○新井悦郎、Thomas J. Pritchett

One-Step Capillary Isoelectric Focusing

Hiroshi Takai, Ayako Anjyo, Etsuo Arai

(BECKMAN INSTRUMENTS (JAPAN) LTD.)

Thomas J. Pritchett

(BECKMAN INSTRUMENTS INC.)

One-step capillary isoelectric focusing was performed using a capillary where the inner wall is coated with a neutral polymer. Nearly the entire capillary was filled with a protein sample, which was focused into a small zone after applying voltage. The focused proteins migrated past the detector due to the residual electroosmotic flow remaining in the coated capillary and were detected in 20 min. The migration time reproducibility of this technique was better than 0.5 % RSD, and differences in pI value of less than 0.1 could be resolved. One-step capillary isoelectric focusing offers direct on-line detection, and is easily automated which provides significant advantages over traditional slab gel methods.

はじめに

キャピラリー電気泳動における蛋白質・ペプチドの分析においては、リニアポリマを用いてのサイズセパレーションを含め、種々の手法が用いられている。これらに加えてその応用の拡大が待たれている手法に等電点電気泳動法がある。今回我々は、発生する電気浸透流を未処理シリカキャピラリーの5%前後に抑えるよう中性ポリマでコーティングされたキャピラリーを用いての、ワンステップ等電点電気泳動について検討した。この手法では、分析途中の泳動バッファ交換やキャピラリーへの加圧等により試料バンドを移動させる必要がなく、試料はキャピラリー内をゆっくりと移動しながら等電点フォーカシングされ、そのまま検出された。

実験方法

装置：キャピラリー電気泳動装置はベックマン社のP/ACE システム 5010 を用いた。キャピラリーはベックマン社供給による内径 50 μ m、全長 37 cm の内面処理ヒューズドシリカキャピラリー（商品名：eCAP ニュートラルキャピラリー）を用いた。検出器は陽極側キャピラリー端より 7 cm の位置に設置した。データ処理はベックマン社のゴールドワ

ークステーションソフトウェアを用いた。

試薬：標準蛋白質はシグマ社より、等電点マーカは第一化学薬品社より購入した。ファルマライト（3～10）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）及びTEMED（N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine）はシグマ社より購入した。

実験：標準蛋白質は脱イオン水に溶解し、調整した。第一化学薬品の等電点マーカはバイアルあたり脱イオン水 50 μ l を加えて溶解した。HPMC 及び TEMED を含む 10 % v/v ファルマライト溶液と試料溶液を 1 : 1 で混合した液を 5 psi の窒素ガスによる加圧でキャピラリー内に充填した。陽極電解液は 10 mM リン酸、陰極電解液は 20 mM 水酸化ナトリウム溶液を用いた。泳動電圧は 7.4 kV 一定で行った。検出は 280 nm で行った。

結果及び考察

ファルマライト溶液に含まれる TEMED により試料をキャピラリー内の検出器と陽極側端の間で等電点フォーカシングさせ、ゆるやかな電気浸透流で移動させることにより pI が 5.1～9.4 の標準蛋白質が 20 分以内に検出できた（Figure 1）。

これらの標準蛋白質のミグレーションタイムの再現性は 0.5 % RSD 以下で、pI とミグレーションタイムの相関係数は 0.984 だった。pI の分解能については、5.1～7.1 の範囲に 13 個の成分を持つ等電点マーカにより、この範囲で 0.1 の pI 差が確実に分離されることが示された。このマーカの各ピーク面積比率の再現性は 5.3 % RSD 以下であった。試料濃度とピーク面積の相関は、20～300 μ g/ml の範囲で十分な定量性が得られた。

以上のことから、本手法によるキャピラリー等電点電気泳動が従来のゲルを用いての方法を置き換えうる、蛋白質及びペプチドの分析において有効な手法であることが示唆された。

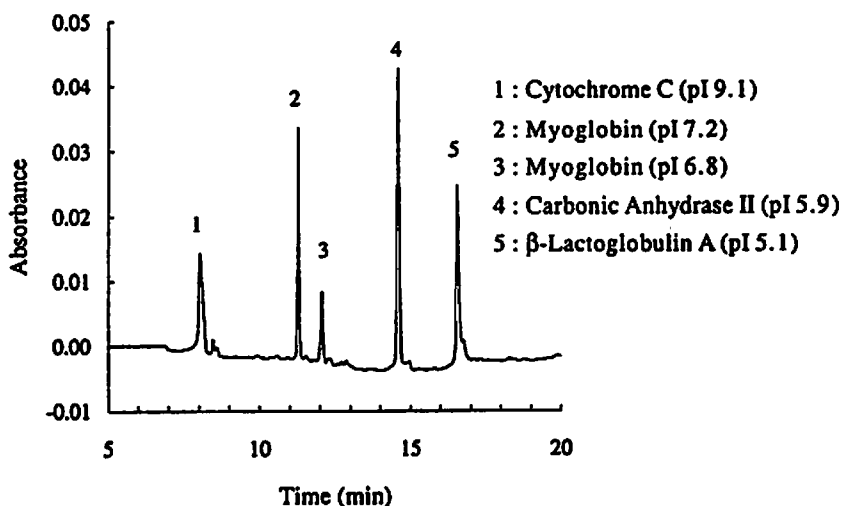


Figure 1 : Separation of standard proteins

キャピラリー電気泳動／大気圧化学イオン化質量分析法の開発

(日立中研) : ○高田安章、坂入実、小泉英明

CAPILLARY ELECTROPHORESIS/ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY

Yasuaki Takada, Minoru Sakairi, Hideaki Koizumi,
Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

Abstract: Capillary electrophoresis/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (CE/APCI-MS) has been developed. The interface between CE and MS consists of an electrospray-type nebulizer, a vaporizer, and an atmospheric pressure chemical ionization source using a needle electrode. In this system, the solution is nebulized by electrospray, and vaporized samples are ionized by corona discharge followed by ion/molecule reactions. This CE/APCI-MS is a very promising technique because the APCI process is not heavily affected by salts in CE buffers, allowing the use of a variety of CE buffers in CE/MS analysis.

緒言

CEの検出器として質量分析計(MS)を用いるCE/MSは極微量混合試料の分離分析に威力を発揮するものと期待されている。溶液中の試料を分離するCEと真空中のイオンを分析するMSとをオンラインで結合するためには、イオン源を含めたインタフェース部分の開発が重要な課題となる。これまでに、エレクトロスプレー(ESI)と高速粒子衝撃(FAB)をベースとしたインタフェースが開発された¹。特にESIでは、ペプチド類に対しamolレベルの感度が達成されている。しかしながら、CEの分析対象となる全ての物質を効率良くイオン化できる方法はなく、CE/MSの適応範囲を拡大するためには様々なイオン生成機構に基づくインタフェースの開発が不可欠である。

大気圧下にイオン源を配置する大気圧イオン化法(API)は、種々のイオン化モードを類似した装置構造により実現できることが知られている²。そこで、APIのモードの一つである大気圧化学イオン化(APCI)を用いたCE/MSの可能性について検討した。今回、本手法の特徴について、従来のESIとの比較を中心に報告する。

実験装置

MSは日立M-1000型を独自に改造し使用した。インタフェースの概略をFig. 1に示す。LC用のAPCIイオン源では溶液を加熱噴霧するが、溶液の流量が少ない

CEでは安定に加熱噴霧を持続することは困難であると考え、溶液の微粒化には静電噴霧を用いた。静電噴霧部の構造は文献〔3〕と同一である。キャピラリーは内径50 μ m、長さ40cmのフューズシリカ製を使用した。シースフローは50%メタノール溶液(1 μ l/min)、バッファ溶液は15mM酢酸アンモニウム(50%アセトニトリル)を用いた。電気泳動電圧は正味10kVとした。噴霧で得られた液滴は脱溶媒室に導入され、気化される。イオン源には針状電極が設けられており、この電極に高電圧を印加することによりコロナ放電を発生させる。試料分子は放電で得られたイオン(一次イオン)と反応し、試料分子に関する擬似分子イオンが生成される。イオンは細孔、差動排気部を通して高真空中に導入され、質量分析される。差動排気部では、細孔間に数十Vのドリフト電圧を印加し、スキマーCIDにより溶媒和クラスターイオンの脱溶媒を行った。

結果および考察

バッファ溶液とシースフローだけをインタフェースに導入し、ESIとAPCIで観測されるバックグラウンドの質量スペクトルを比較した。ESIではバッファ中の塩に由来するアンモニウムイオンが強く観測されるが、APCIでは主により極性の低い有機溶媒(メタノールやアセトニトリル)のプロトン付加擬似分子イオンが観測された。また、実際に試料を泳動させて感度を評価した結果、CaffeineはESIよりも感度が良いことが明らかとなった。本手法において、塩に由来するイオンの強度が弱い理由は明らかではないが、これらの物質は静電噴霧するだけでガス状のイオンに変換されてしまうので、針電極に印加される電圧により軌道を曲げられイオン導入細孔まで到達できないか、金属ブロックで構成される脱溶媒室に捕獲されるためと考えられる。

以上の結果から、今回開発したAPCIをベースとしたCE/MSは、従来のESIに比べ、1) バッファ中の塩の影響を受けにくいことが示唆され、CE/MSにおけるバッファ溶液の制限を緩和できる可能性があることや、2) 物質によりESIよりも高い感度を得られることが明らかとなった。

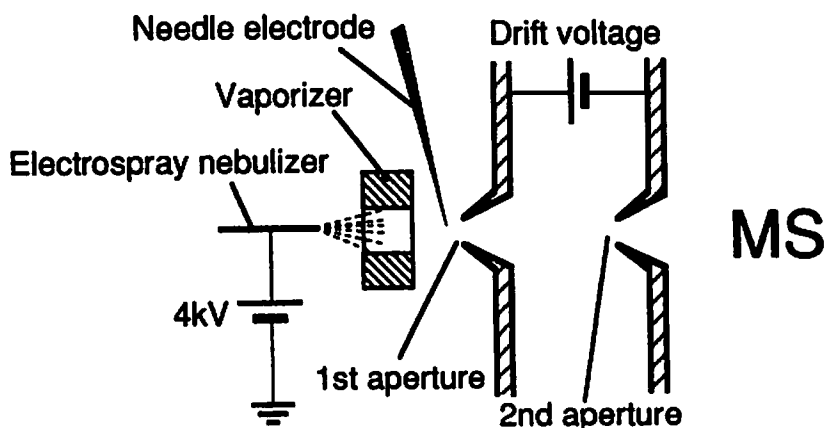


Figure 1. Schematic diagram of the CE/APCI-MS interface.

- 1) W. M. A. Niessen et al., J. Chromatogr., 636, 3 (1993).
- 2) M. Sakairi et al., Rapid Commun. Mass Spectrom., 5, 354 (1991).
- 3) Y. Takada et al., Anal. Sci., in press.

19 キャピラリー電気泳動/MS(CE/MS)による糖、 ペプチドの解析

(宝酒造、バイオプロダクツ開発センター)

○橋爪克仁、宮城大、網澤進

HIGH SENSITIVE ANALYSIS OF PEPTIDES AND SUGARS BY MASS SPECTROMETRY
CONNECTED TO CAPILLARY ELECTROPHORESIS (CE/MS)

Katsuhito Hashizume , Masaru Miyagi , Susumu Tsunasawa

Takara Shuzou CO., LTD. Bioproducts Development Center

CE/MS , which is coupling of capillary electrophoresis (CE) with mass spectrometry (MS) has been expected to be efficient method for structural analysis of proteins, peptides, sugars, drugs and so on. Using CE/MS, fragmental peptides of cytochrome c obtained by digestion with lysylendopeptidase were detected with high resolution at 1.5 pmol. In the analysis of PA(pyridylamino)-sugar chain mixture, each PA-sugar chain is separated and detected successfully by CE/MS at 225 fmol with selected ion monitoring mode. Our results present that CE/MS is a useful method in structural analysis for a very small quantity sample.

はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) は、極微量の試料で高分解能、短時間分析が可能なことから、その応用範囲は幅広い分野に広がっている。現在、CE の検出器としては UV 検出器がもっぱら用いられているが、CE の検出器として質量分析装置を用いることにより、より多くの構造に関する情報を一挙に得ることができる。そこで今回は、キャピラリー電気泳動装置とイオンスプレー質量分析装置を接続し (CE/MS) 、糖、ペプチドの構造解析に応用したので報告する。

実験方法

質量分析装置には Perkin-Elmer Sciex 社の API III を、キャピラリー電気泳動装置には BECKMAN 社の P/ACE SYSTEM 2200 を用いた。API III のイオンスプレープローブを CE/MS のインターフェースとしてそのまま利用して CE と MS を接続し、以下の条件で分析を行った。なお、フューズドシリカキャピラリーは、その内壁をポリブレンでコーティングして使用した。また、CE の流速は 100nl/min 以下と非常に遅く、MS 測定には不十分なので make up liquid (0.2% ギ酸、25% メタノール) を流し、イオンスプレーネブライザーで必要とされる流量を補充した。

分析条件

フューズドシリカキャピラリー：50 μ m I.D. X 110cm (ポリブレンでコーティング)

CEバッファー：0.1N ギ酸 (ペプチド) 2N ギ酸 (糖)

電圧：30KV (CE: -25KV、MS: +5KV)

Make up liquid：0.2% ギ酸、25% メタノール 流速：7 μ l/min

1. Cytochrome c のリジルエンドペプチダーゼ消化物の CE/MS 分析

Cytochrome c (ウマ心臓) のリジルエンドペプチダーゼ (API) 消化物をプレッシャーインジェクション法によって注入し (約30nl、絶対インジェクション量 1.5 pmol)、CE/MS 分析を行った。m/z: 300~1200の範囲でモニターして解析した。

2. PA化糖混合物の CE/MS 分析

4種類のPA化糖の混合物をプレッシャーインジェクション法により (約30nl、絶対インジェクション量 各 225 fmol) 注入し、2価イオンおよび1価イオンをモニターする選択イオンモニター (SIM) で CE/MS 分析を行った。

結果

Cytochrome c のリジルエンドペプチダーゼ消化物の CE/MS 分析の結果、1.5pmol という微量の試料でも高い理論段数を示すトータルイオンクロマトグラムが得られた (Fig.1)。また、各ピークのマススペクトルから、酵素消化断片を帰属することができた。

4種類のPA化糖混合物の場合でも、選択イオンモニターにより、225fmol という極微量の試料で良い分離を示す CE/MS クロマトグラムを得た。

考察

今回の結果から、分離の理論段数が非常に高い CE と 質量分析計とを組み合わせた CE/MS は構造解析を行う上で優れた分析技術であると言える。今回は、ペプチドや糖類についての CE/MS の分析例について紹介したが、薬物や核酸の分析にも応用できるものと考えられる。また、タンデム質量分析計を接続し、CE/MS/MS 分析を行うことにより、より詳細な構造情報を得こともできる。今後は、より微量での構造解析に CE/MS が威力を発揮することが期待される。

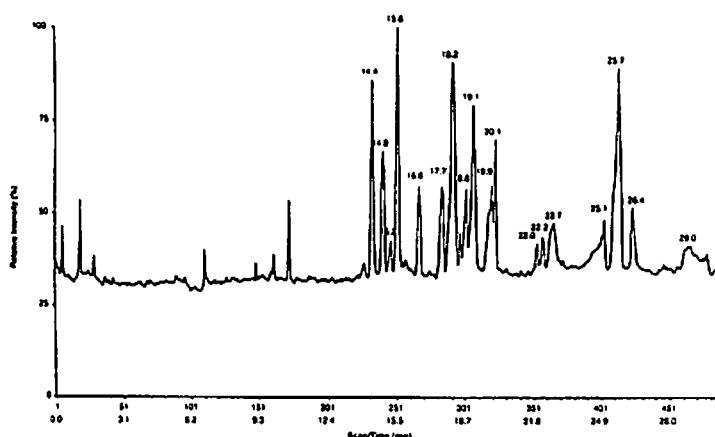


Fig.1 CE/MS Chromatogram of Lys-C Digest of Cytochrome c

キャピラリー電気泳動による排水中の アミン類の分析

(株)東芝 RDC 環境技術研究所 ○富岡 由喜、岡田 章

ENVIRONMENTAL ANALYSIS OF AMINE IN WASTE WATER USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Yuki Tomioka*, Akira Okada

Environmental Engineering Laboratory, Research and Development Center, Toshiba Corporation, 8,
Shinsugita, Isogo, Yokohama, Kanagawa 235 (Japan)

ABSTRACT

In waste water analysis, development of rapid analysis methods is needed. In this paper, we examined the rapid analysis of amine in waste water using capillary electrophoresis (CE) and ion chromatography (IC).

The IC method was not used to directly measure samples of waste water, because direct measurement results in column deterioration and reduced capacity. The samples, therefore, required a lot of pre-treatment. The CE method, however, could be used to measure amine directly, because the CE method provides highly sensitive separation. These results suggest that CE is a useful method for the analysis of amine in waste water due to its speed.

1) はじめに

キャピラリー電気泳動（以下CEと略）は、非常に高い分離能を有していることが特徴であるが、その他にも高濃度マトリックス中の微量成分の分析が可能となり前処理操作の省略による迅速分析等の応用範囲の拡大も特徴のひとつとして挙げられる。一方、工場からの排水は処理が進につれて中和処理剤や凝集沈澱剤の混入があり目的成分の希釈、マトリックスの増大が問題となってくる。従来、排水中のジメチルアミンやトリメチルアミン等の低級アミンは水溶液中でイオン解離しているためイオンクロマトグラフィー（以下IC法と略）によって分析が行われてきた。しかし夾雑物（マトリックス）がカラムやサプレッサーの劣化を引き起こし直接分析は困難であった。そこで今回アミン類の分析についてCE法を採用し、IC法と比較検討を行ったので報告する。

2) 実験

CE測定装置はCES-I (Dionex)、データ処理装置はAI-450 (Dionex)を用いた。

キャピラリーは内径75 μ m×全長60cm、注入は重力法で100mm×30sec、検出はUV検出で波長215nm、印加電圧は20kVとして極性は試料注入側が陽極、検出器側を陰極とした。バッファ溶液には紫外吸収を持つp-メチルベンジルアミンにヒドロキシソ酪酸をキレート剤として添加し調整し、測定毎に泳動溶液の交換を行った。

IC測定には4545i (Dionex)、電気伝導度検出器ICA-3030 (TOA)を用いた。分離カラムはIocPac CS14、ガードカラムはIonPac CG14、サプレッサーにはCSRS-I (全てDionex)、溶離液に7.5mM メタンスルホン酸/2.0% アセトニトリルの混合溶液を再生液には純水を使用した。試料は50 μ l 注入し、レンジは3~30 μ S/cmで測定した。

3) 結果と考察

CE法とIC法でのアミン類、陽イオンを分析した各々の結果をFig. 1、Fig. 2に示す。Fig. の様にIC法ではジメチルアミンとカリウム、コリンとテトラメチルアンモニウムの分離が不十分であったが、CE法では十分分離することができた。実際に凝集沈澱槽内の上澄み液について分析を行ったところ半導体製造時に現像液として用いられる水酸化テトラメチルアンモニウムをナトリウム、カルシウム等の夾雑物(マトリックス)の混入にも関らず前処理無しに分析することが可能であった。

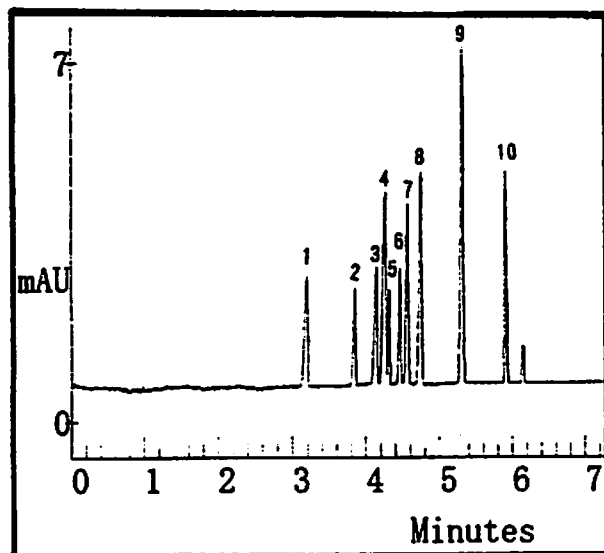


Fig.1 Electrophoregram:

(1)NH₄, (2)methylamine, (3)Ca, (4)dimethylamine, (5)Na, (6)Mg, (7)trimethylamine, (8)tetramethyammonium, (9)choline, (10)triethylamine.

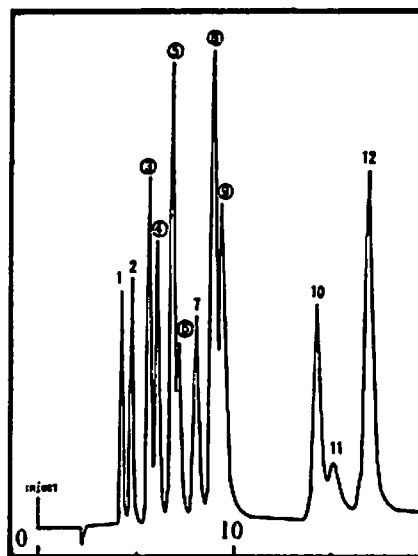


Fig.2 Ion chromatogram:

(1)Li, (2)Na, (3)methylamine, (4)NH₄, (5)dimethylamine, (6)K, (7)trimethylamine, (8)choline, (9)tetramethyammonium, (10)Mg, (11)triethylamine, (12)Ca.

参考文献

- 1) 寺部 茂：化学総論、9、188、1990。

第4級アンモニウム塩を用いた細管式等速電気泳動法による臭化物イオンとヨウ化物イオンの分離定量

(神戸商船大・船貨輸送研究施設) ○福士 恵一
(神戸女子短大) 日色 和夫

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF BROMIDE AND IODIDE IONS BY
CAPILLARY ISOTACHOPHORESIS USING QUATERNARY AMMONIUM
SALTS

KEIICHI FUKUSHI

Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile
Marine

and

KAZUO HIIRO

Kobe Women's Junior College

The effects of quaternary ammonium salts on the PU values of bromide and iodide ions in capillary isotachopheresis were studied. The PU values of these anions increased by the addition of some quaternary ammonium salts to a leading electrolyte. The most suitable quaternary ammonium salt was tetradecyldimethylbenzylammonium chloride for the simultaneous determination of bromide and iodide ions. The optimum concentration of the tetradecyldimethylbenzylammonium chloride was 1.5mM and the most appropriate pH of the leading electrolyte was 5.0. Calibration graphs of bromide and iodide ions were linear up to 5.0 and 50mM, respectively. Low concentrations (0.050–0.25mM) of these anions could be determined by injecting 75 μ l of sample solutions. The error was less than $\pm 6.0\%$. The relative standard deviations of the zone length for both anions were 0.9% when the mixture of 0.15mM bromide ion and 0.15mM iodide ion was analysed. Those of the PU values for bromide and iodide ions were 7.8 and 3.9%, respectively.

1. 緒 言

塩化物、臭化物及びヨウ化物イオンは移動度が互いに近接しているため、通常の水溶液系電解液を用いた細管式等速電気泳動法によりこれらイオンを分離することは困難である。従来これらイオンの分離には、カドミウムイオンとの錯形成やメタノール系電解液が用いられてきた。最近、Kaniansky¹⁾は多量のポリビニルピロリドンを用い、これらイオンの移動度が減少することを示している。一方、吉田ら²⁾は少量の第4級アンモニウム塩をリーディング液に添加することにより、モリブデン酸、タングステン酸及びバナジン酸イオンの移動度が減少することを示した。また日根ら³⁾も脂肪酸の移動度に対する第4級アンモニウム塩の影響について検討している。そこで

リーディングイオンを塩化物イオンとし、第4級アンモニウム塩を用い、細管式等速電気泳動法による臭化物及びヨウ化物イオンの分離定量を試みたので報告する。

2. 実 験

島津細管式等速電気泳動分析装置IP-2A型を使用した。泳動管は内径1.0mm、長さ15あるいは20cmのPTFE製チューブに、内径0.5mm、長さ15cmのFEP製チューブを接続したものである。検出器は電位勾配検出器を用いた。リーディング液は、一定量の第4級アンモニウム塩と0.01%ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) とを含む5mM塩酸にヒスチジンを加えpHを調整したものである。ターミナル液は、10mMヘキサナ酸ナトリウムである。泳動電流は、最初の10~15分間200 μ Aとし、50 μ Aに切り換えた。

3. 結 果

第4級アンモニウム塩の種類及び濃度、リーディング液のpHなどについて検討した。その結果、塩化テトラデシルジメチルベンジルアンモニウム (Zeph-Cl) を1.5mM添加し、pHを5.0に調整したリーディング液を用いれば、臭化物イオンとヨウ化物イオンとが互いに塩化物イオンから分離されることがわかった。また両イオンについて直線性のよい検量線が得られ、1.0~5.0mMの臭化物イオンとヨウ化物イオンとを各種割合で含む混合溶液を分析したところ、約 $\pm 10\%$ の誤差範囲内で分離定量できた。さらに低濃度 (0.05~0.25mM) のこれらイオンの分離定量を可能にするために、試料導入量について検討した。その結果Fig.1に示すように、臭化物及びヨウ化物イオンのゾーン長は75 μ lまで導入量に比例して増加した。100 μ lでは高電圧のため、安定に泳動を続けることが困難であった。試料導入量を75 μ lとすれば、これら低濃度のイオンが $\pm 6.0\%$ の誤差範囲内で分離定量できることがわかった。

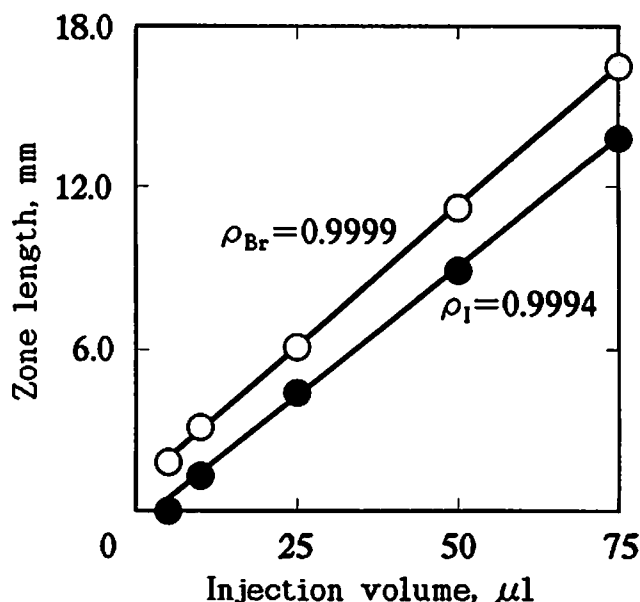


Fig. 1. Effect of injection volume on zone length for bromide and iodide ions. ○, 0.10mM Br⁻; ●, 0.10mM I⁻.

文 献

- 1) V. Madajová, E. Turcelová and D. Kaniánsky, J. Chromatogr., 589, 329 (1992).
- 2) H. Yoshida, M. Hida and M. Taga, J. Chromatogr., 325, 179 (1985).
- 3) 日根 隆, 八木 孝夫, 第11回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集, p.5 (1991).

(大阪大学 基礎工学部) ○平田雄志、小西嘉雄、坂本透

CONTINUOUS ELECTROPHORETIC SEPARATION OF MIXED RARE-EARTH METAL IONS

Yushi Hirata, Yoshio Konishi and Tohru Sakamoto
Department of Chemical Engineering, Osaka University

The principle of electrophoretic zone separation of rare-earth metal ions is described by combining the ion transport equation with the equilibrium relation of EDTA complexing reactions. Experiments for continuous separation of mixed ions of La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} and Nd^{3+} were conducted using an electrophoretic cell of two dimensional thin packed bed. It has been confirmed theoretically and experimentally that high-level separation of mixed rare-earth metal ions can be attained under the condition of a relatively short residence time and a moderate strength of the applied electric field.

【緒言】

希土類金属イオンは、通常3価のイオンであり化学的性質が似通っているために、その相互分離ならびに高純度化は困難である。本研究では、錯形成反応を利用して希土類イオンの有効電荷を変化させることができる電気泳動法¹⁾に着目し、この方法による混合希土類の高度連続分離の可能性を理論と実験の両面から検討した。

【泳動帯の濃度分布】

希土類金属イオンとEDTAの錯形成反応は次式のように表わされる。



反応速度が速い場合には、金属イオンと錯体イオンは一つの希土類イオンとして泳動、拡散すると考えられ、見かけの移動度 U_i は次式で表わされる。

$$\begin{aligned} U_i / \omega F &= (3C_{\text{Mi}} - C_{\text{MiL}}) / (C_{\text{Mi}} + C_{\text{MiL}}) \\ &= (3 - K_{\text{Mi}} C_{\text{L}}) / (1 + K_{\text{Mi}} C_{\text{L}}) \end{aligned} \quad (2)$$

移動度 U_i は配位子濃度 C_{L} とともに変化する。また、複数の希土類金属イオンが共存し、錯安定度定数 K_{Mi} が異なる場合には、Fig. 1に示すように錯生成量に応じて各イオンの移動度の間に相対差が生じ、相互分離が可能となる。

Fig. 2に示すように泳動液が z 方向に一様な速度 v_z で流れ、それと直角の x 方向に一定の電位勾配 $d\phi/dx$ が設定されてい

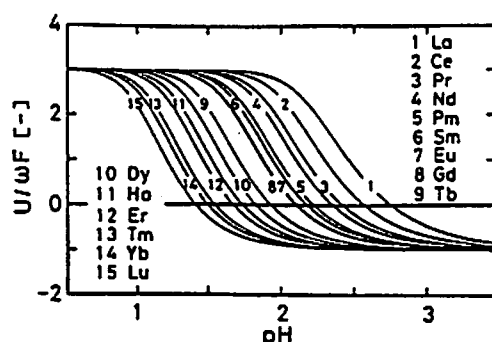


Fig. 1 Variations of mobilities of the rare-earth ions with pH ($C_{\text{E0}} = 5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$, $C_{\text{M0}} = 5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$)

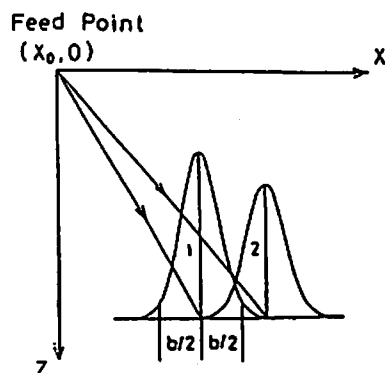


Fig. 2 Migration trajectories of rare-earth ions fed at the point ($x=x_0, z=0$)

る2次元泳動場で $x=x_0, z=0$ から供給されたイオン種 i の無次元濃度分布 C_i^* は次式のガウス分布で表わされる。

$$C_i^* = C_i / C_{i \max} = \exp \left\{ - (x - x_0 - v_{ix} t)^2 / 4 D_i t \right\} \quad (3)$$

ここで C_i は濃度分布、 $C_{i \max}$ は分布の中心における最大濃度、 t は泳動時間である。また、泳動液 pH は一定、各希土類イオンの移動度、分子拡散係数も一定とした。

【充填層型電気泳動槽による連続分離実験】

Fig.3に示した間隙 2 mm、幅 90 mm、長さ 200 mm の2次元薄槽に径 0.08 mm のガラス球を充填したものを泳動槽とし、混合軽希土 (La-Ce-Pr-Nd) の分離実験を行った。実験条件は金属濃度が各 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ 、泳動液中の EDTA 濃度が $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ 、滞留時間が $8.8 \times 10^2 \text{ s}$ 、電位勾配が $d\phi/dx = 1.0 \times 10^3 \text{ V/m}$ である。泳動液 pH は Pr と Nd の移動度の差が最大となる pH=2.0 に設定した。金属濃度は ICP 発光分析器によって測定した。

【結果と考察】

〔濃度分布〕濃度分布を式(3)と比較するために次式で定義される累積濃度 $F(x)$ を求め、正規確率紙上にプロットした (Fig.4)。

$$F(x) = \frac{\int_{-\infty}^x C^* dx}{\int_{-\infty}^{\infty} C^* dx} \quad (4)$$

実験データはいずれも傾きの等しい直線にのっており、濃度分布は同じ標準偏差 σ を持つガウス分布で表わされることを示している。この標準偏差より求めた拡散係数 ($\sigma^2/2t$) は希土類金属イオンの分子拡散係数より大きかった。これは濃度分布の広がりの主因が充填層粒子間を流通する際の液の分流であることを示している。

〔分離の評価〕電気泳動法の分離能力を評価するために分離指数 α を導入する。主成分1の最大濃度位置を中心として幅 b で分取する場合の第2成分の濃度比 α_b は次式で表わされる。

$$\alpha_b = \frac{\int_{-b/2}^{b/2} C_2^* dx / \int_{-b/2}^{b/2} C_1^* dx}{\int_{-b/2}^{b/2} \exp(-\xi^2/2) d\xi} = \frac{\int_{-b/2}^{b/2} \left\{ -(\xi - \Delta v t / \sigma_1)^2 / 2 (\sigma_2 / \sigma_1) \right\} d\xi}{\int_{-b/2}^{b/2} \exp(-\xi^2/2) d\xi} \quad (5)$$

ここで $\xi = (x - x_0 - v_{ix} t) / \sigma_1$ 、 $\beta = b / \sigma_1$ 、 Δv = 成分1と2の相対泳動速度である。実験結果より金属濃度が最大となった分取位置での α_b を求めると、移動度の相対差の小さい Pr-Nd では分離状態が良くなかったが、移動度の相対差の大きな La-Ce では第2成分濃度は主成分濃度の 0.01 以下となり高度な分離が可能となることが確かめられた。

〔引用文献〕 1) 木曾義之：ゾーン電気泳動，南江堂，p. 137(1972)

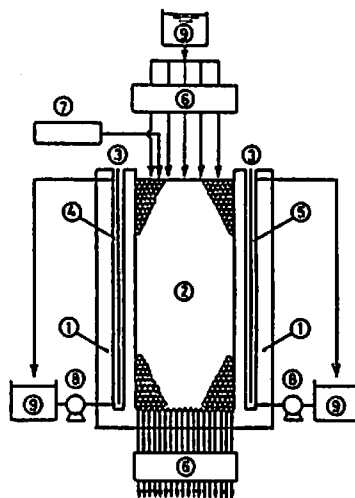


Fig.3 Electrophoretic separator of two-dimensional thin packed bed

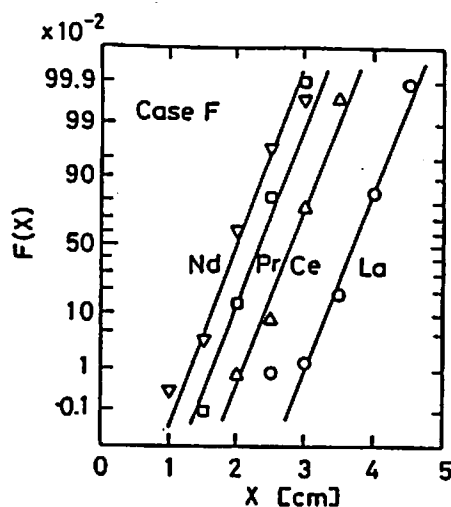


Fig.4 Cumulative concentration profiles of La, Ce, Pr and Nd

(広島大工、香川県警、比治山女子短大) ○廣川 健・芝山貴幸・木曾義之

ANALYSIS OF RARE EARTH IONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Takeshi Hirokawa, Takayuki Shibayama and Yoshiyuki Kiso

Hiroshima Univ., Kagawa Pref. Police H.Q., Hijiya Women's College.

Analysis of rare earth ions was studied by using capillary electrophoresis. The electrophoretic modes used were isotachopheresis and capillary zone electrophoresis. The separability of Dy and Y was improved by the addition of tartaric acid to the conventional operational electrolyte system containing α -hydroxyisobutyric acid as the complex-forming agent. The electrolyte system developed was applied to the separation of a rare earth ore sample containing Y as one of major components.

1. 緒言 希土類元素の分析、特に希土類マトリックス中の微量希土類の高精度な分析はどのような分析法を使用したとしても容易ではない。例えば14種のランタニドおよびイットリウムを含む希土類鉱石中の微量成分を分析する場合、用いた方法本来の欠点(例えばAESでは分光干渉、MSでは同位体の干渉、X線分析ではマトリックス効果など)により高精度な分析が妨害される事が多い。この様な試料に対しては分離分析が有効であるが、なかでもキャピラリー電気泳動法(CE法)は迅速・簡便な方法である。

希土類イオンは絶対移動度が類似しているため、例えば α -ヒドロキシイソ酪酸(HIB)を錯形成剤として使用し、安定度定数の相違により実効移動度に差を生じさせ分離を達成する。しかし全希土類(ランタニド元素14種、スカンジウムおよびイットリウム)の分離分析となると、特にDyとYの分離が困難である事が知られており、現在まで全希土類イオンを一度に電気泳動分離可能な電解液系は知られていない。我々はこのような電解液系の開発を試みているが、最近HIB系に酒石酸を添加するとDyとYが分離できる事を見いだした。本講演ではCE法における希土類イオンの分離挙動および希土類鉱石の分析への応用について報告する。

2. 実験 使用したCE法は、等速電気泳動法(ITP)およびゾーン電気泳動法(CZE)である。等速電気泳動装置の検出器は高周波非接触電導度検出器で、LABECO(スロバキア)のZKI-001型等速電気泳動装置の分離ユニットと組み合わせて使用した。ターミナルゾーン検出までの電気量はブランク泳動で0.27Cであった。高電圧電源としては島津IP-2Aのものを使用した。CZE装置は大塚電子CAPI-3100で、分離管は内径75 μ m・有効長50cmのフューズドシリカ管である。恒温槽温度は25 $^{\circ}$ Cに設定した。分析に使用した電解液系は表1にまとめて示した。イオン吸着型鉱石試料は日本鉱業から入手した精鉱を塩酸で溶解して調製した(2g/l)。等モル混合試料は塩化物から調製した。

3. 結果と考察 HIB電解液系におけるY³⁺とDy³⁺の低分離能はHIB錯イオンの絶対移動度および安定度定数が類似しているためである。従ってこれらのイオンの効果的な分離は、錯形成剤としてHIBのみを使用している限り不可能である。HIBは一価オキシカルボン酸であるため全く異なる錯形成挙動を期待して二価の酒石酸を添加した電解液系を開発した。それは錯形成剤として0.5mMの酒石酸および8mMのHIBを含む20mMのアンモニア水で、酢酸を添加してpH4.8に調整したものである(HIB-Tar系)。

図1に15種希土類イオンの等モル混合物のイソタコフログラムを示した。図より明らかに酒石酸の添加によりY³⁺とDy³⁺の分離の代わりに、Eu³⁺とGd³⁺の分離が不可能になった。HIB系では隣あったランタニドイオンの間の分離能は一定ではなく、周期的に4つの異なるサブグループを形成し(テトラド効果)、27nmol/C(Eu-Gd対)から309nmol/C(Gd-Tb対)まで変化する[1]。酒石酸の添加は中および重ランタニドイオンの分離能をHIB系の約2/3に低下させることが明らかになった。なお軽希土につい

ては酒石酸の添加による分離能の低下は見られなかった。

CZEでも酒石酸の添加が効果的と推測されたが、図2 bに示したように、YとDyに対してベースライン分離は達成できなかった。この事は各成分ゾーンのpHおよびイオン強度がCZEでは同じであるが等速電気泳動ではゾーン毎に異なっている事と密接な関係があると考えられる。なおEu³⁺とGd³⁺が分離しにくい点においてはITPと同じであった。

開発した電解液を鉍石試料に適用したところ、存在率が%オーダーまでの成分については良好な分析結果が得られる事がわかった。表2にイオン吸着型鉍石のITP、ITP-PIXE(等速電気泳動分離-粒子励起X線分析法)の結果を比較して示した。ITP分析には30分程度の時間が必要であるが、数百ナノモル程度の試料も扱えるため分取向きである。CZE分析の迅速性は特筆すべきであるが、マトリックス中の微量成分の分析には解決すべき問題がある。その他、分離の原理やITP-PIXE分析の詳細、実測した実効移動度より算出した安定度定数等については講演で報告する。

Table 1 Operational electrolyte system
ITP

Leading electrolyte : 20mM ammonia soln.	
Complexing agent	
(1)8.0mM α -hydroxyisobutyric acid	
(2)0.5mM Tartaric acid	
pH buffer	acetic acid, pH=4.80
Additive	0.1% Hydroxypropylcellulose
Terminating	10mM Carnitine hydrochloride

CZE

30mM Creatinine
5mM HIB
pH=4.80(acetic acid buffer)

Table 2 Analytical result of
ion-adsorption type ore

REE	ITP		ITP-PIXE	
	HIB-Tar		HIB	
	10 μ l		14 μ l	
	μ g	%	μ g	%
La	5.539	36.68	7.425	35.96
Ce	0.300	1.98	0.431	2.09
Pr	1.211	8.02	1.747	8.46
Nd	4.725	31.29	6.465	31.31
Sm	0.710	4.70	1.001	4.85
Eu	-	-	0.145	0.70
Gd	0.649	4.30	0.674	3.26
Tb	-	-	0.104	0.50
Dy	0.302	2.00	0.405	1.96
Ho	0.052	0.34	0.073	0.35
Er	0.134	0.89	0.164	0.79
Tm	-	-	0.040	0.19
Yb	0.131	0.87	0.135	0.65
Lu	-	-	0.021	0.10
Y	1.347	8.92	1.820	8.81
Total	15.100 μ g		20.650 μ g	

1) J. Hu, T. Hirokawa, F. Nishiyama and Y. Kiso, J. Chromatogr., 589, 339-345 (1992).

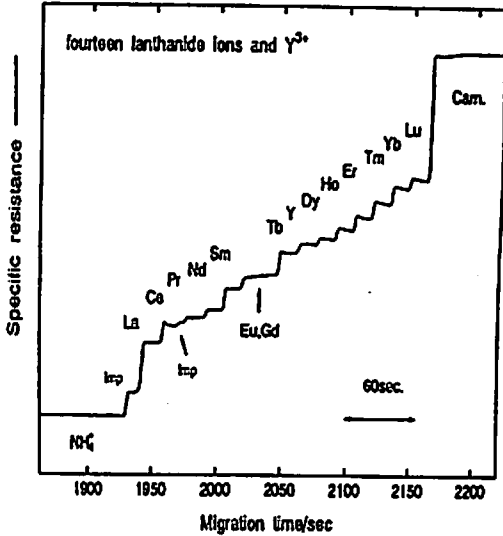


Fig. 1. Isotachopheretic separation
of fifteen rare earth ions

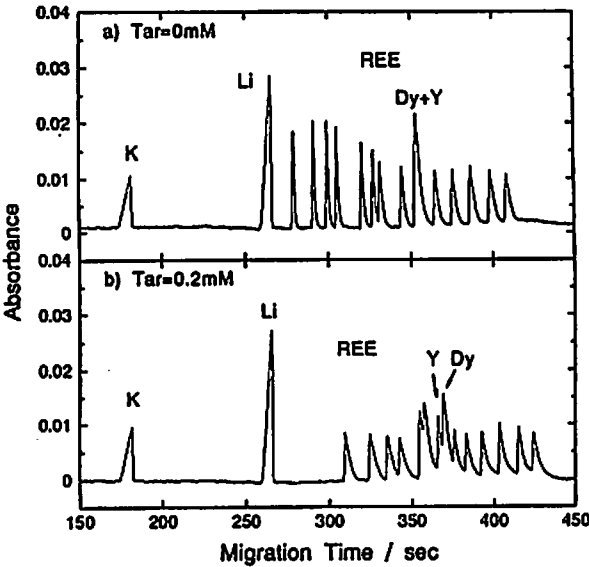


Fig. 2. CZE separation of fifteen
rare earth ions

キャピラリー電気泳動法における 鉄イオンの分離挙動

(広島大工) ○西本和弘、西山文隆、廣川 健

SEPARATION BEHAVIOR OF IRON IONS IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Kazuhiro Nishimoto, Fumitaka Nishiyama and Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima Univ.

An operational electrolyte system suitable for the simultaneous analysis of Fe(II) and Fe(III) ions was developed by using 1,10-Phenanthroline as a chelating agent. The separation behavior of these chelates was studied by using capillary isotachophoresis (CITP) and capillary zone electrophoresis (CZE). The isotachophoretic separation behavior was analyzed in detail by the result of ITP-PIXE (Particle Induced X-ray Emission).

1. はじめに 鉄イオンは水溶液中では水酸化物錯体を形成し易く、電気泳動分析には不適当な試料と考えられてきた。しかし、我々は先に鉄イオンに対しキレート化剤として1,10-フェナントロリンを用いれば、細管式等速電気泳動法(CITP)によって水酸化物錯体の形成を抑えて電気泳動させ得ることを確認した。更にFe(III)イオンも比較的安定な錯イオンを形成し、Fe(II)イオンと分離可能であることを明らかにした[1]。

本研究ではこれらの泳動挙動をさらに詳しく検討するためにITP法によって分離後、ゾーンを分取して高感度分析法であるPIXE法で定量を行った(ITP-PIXE)。また同試料のキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)による分離は現在不可能であるが、その原因を探る研究を行ったので併せて報告する。

2. 実験 本実験での試薬として、市販されている特級試薬で硫酸第一鉄アンモニウム(Mohr's salt)[Fe(II)], 塩化第二鉄[Fe(III)]をそれぞれ用い、酸を添加してpHを2.0とした。1,10-フェナントロリン試薬には塩化1,10-フェナントロリニウム一水和物を用い褐色瓶に保存した。次に実験装置をTable 1に、使用した電解液をTable 2に示す。

Table 1 Apparatus

CITP	CZE
Compartment : ZKI-001 (LABECO, Slovakia)	Main part : CAPI-3100 (Otsuka)
Detector : HFCCD	Detector : PDA 512ch
Separation tube : PTFE 0.25mm I.D.	Separation tube : FSC 75 μ mX700mm
Power supply : IP-2A (Shimadzu)	Injection : Gravity
Migration current : 50~125 μ A	Migration voltage : 10kV

Table 2 Electrolyte System

C I T P	C Z E
Leading : 20mM ammonia solution pH=4.8(acetic acid)	Acetic acid/sodium acetate buffer 20mM ①pH=4.4
Terminating : 20mM HCl pH=3.6(β -alanine)	②pH=4.8 ③pH=5.2

3. 結果と考察 Fe(Ⅱ)2mM, Fe(Ⅲ)2mM, phen16mM (1:1:8)を混合した模擬試料を分離して得られたイソタコフェログラムをFig. 1に、またゾーン分取後の定量結果をFig. 2に示す。

その結果、各イオンの泳動順はFe(Ⅲ), Fe(Ⅱ), phenで、それぞれの配位数はFe(Ⅱ)が3配位であるのに対してFe(Ⅲ)は3配位未満であった。またキレートのゾーン長はFe(Ⅲ)の方がFe(Ⅱ)に比べて約半分であり、PIXEによる定量ではFe(Ⅲ)ゾーンの濃度プロファイルがFe(Ⅱ)よりも約1.5倍高いことが明らかになった。以上の結果はFe(Ⅲ)キレートの実効電荷がFe(Ⅱ)よりも小さいことを示している。これらの分離挙動は鉄イオンとフェナントロリンの配位数が関係していると考えられる。

次にFe(Ⅱ)とFe(Ⅲ)が混在する実試料への応用を考慮してFe(Ⅲ)の還元剤であるヒドロキシルアミンの添加効果について検討した。その結果、Fe(Ⅲ)キレートを全て安定なFe(Ⅱ)キレートに変えることができ非常に有用であることがわかった。

また上記の模擬試料を緩衝液で10倍に希釈したものをCZE(支持電解液のpH=4.8)によって分析するとFig. 3に示すエレクトロフェログラムが得られた。それによると全体で2本のピークしか現れず、ITPのようにFe(Ⅱ), Fe(Ⅲ), phenを分離することは不可能であった。なおこの原因については現在検討中であり、キレートの泳動順など詳細については講演で報告する。

[1] 西本, 西山, 竹味, 廣川, 日本分析化学会第43年会講演要旨集 1A09(1994)

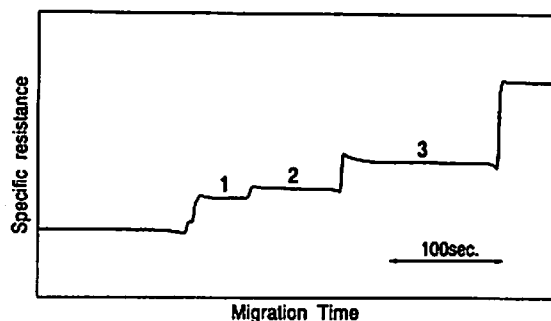


Fig. 1 Isotachopherogram of a test mixture
1. Fe(Ⅲ)-phen 2. Fe(Ⅱ)-phen 3. phen

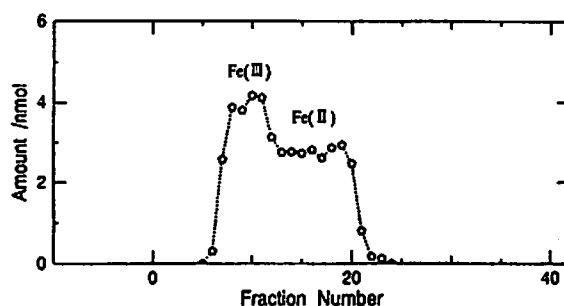


Fig. 2 Result of ITP-PIXE

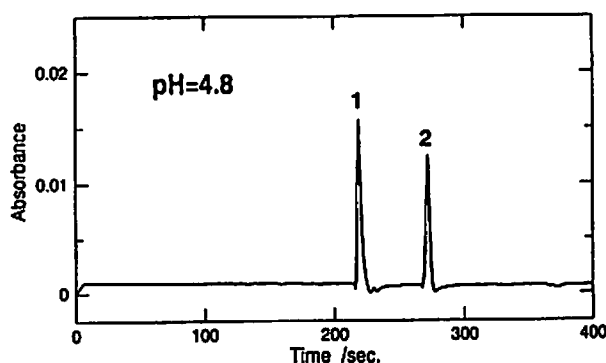


Fig. 3 Electropherogram of a test mixture

キャピラリー電気泳動による 食品中の亜硝酸、硝酸イオンの分析

(日本ウォーターズ・リミテッド)

○鈴木 政明、米久保 淳、佐々木 秀輝

Analysis of Nitrate and Nitrite in Food by Capillary Electrophoresis

Masaaki Suzuki, Jun Yonekubo, Sasaki Hideki
Nihon Waters LTD.

Abstract

A method for the determination of nitrite and nitrate in pickles, processed foods by capillary electrophoresis (CE) was developed. In the case of determination of nitrite and nitrate in food containing more than 3% sodium chloride by ion Chromatography (IC), the salt was eliminated from the extracts by using an On Guard-Ag cartridge. On the one hand, the present method is simple, and enable directly determination without solid phase extraction.

【はじめに】

加工食品や漬物などの食品中には発色剤、防腐剤として、亜硝酸塩等が使用されている。また、これらは発癌性を有するN-ニトロソ化合物の前駆物質になりうる物質として知られており、これらのモニターが必要となる。従来、硝酸根 (NO_3^-) や亜硝酸根 (NO_2^-) の定量する方法としてはジアゾ化して測定する比色法¹⁾、種々の誘導体化によるガスクロマトグラフィー²⁾、及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC)³⁾、による方法が報告されている。

近年、イオンクロマトグラフィー (IC)⁴⁾による方法も報告されているが、食品中に含まれる大量のクロライド (Cl^-) の影響のため、イオン交換カラムのキャパシティーや分離状態からAgカートリッジ等を使用して、ある程度クロライドを除去する必要があるなど、いずれも複雑な前処理が必要となる。

今回、これらの前処理を行うことなく、キャピラリー電気泳動により簡便な分析方法を検討したので報告する。

【実験】

各スタンダードとなるイオンは、イオンクロマトグラフィー用、和光純薬社製の物を使用し、硝酸、亜硝酸イオン共に10ppmに調整した。装置は、ウォーターズ製キャピラリーイオンアナリシスシステムを使用した。キャピラリーは、Waters AccSep Capillary 75 μm (i.d.) $\times$ 60cm (有効長52.5cm) 及びLC PACKINGS社製のZ-Cell 100 μm (i.d.) $\times$ 60cm (有効長52.5cm) を使用した。泳動バッファーは、カチオン性の界面活性剤 (CIA-Pak OFM BT溶液) をベースに塩化ナトリウムの濃度を段階的に変化させ各種イオンの挙動の変化等を検索した。また、温度25℃、定電圧20KV、214nmで分析を行った。

【結果と考察】

硝酸、亜硝酸イオンを測定する場合、昨年同シンポジウムにより報告したCIA法により、これらアニオンの分析は可能である。しかし、大量に塩化ナトリウム由来のクロライドを含むような食品の場合、これらの影響により、硝酸、亜硝酸イオンとの分離は困難である。そこで今回は、この影響を回避するためバッファー中に導電率の高いクロライドを大量に存在させ抵抗を増大させることでResolutionの増加を図った。また、試料中のクロライドにより引き起こされるベースラインの変動を解消することができた。

(Fig.3)

さらに、泳動バッファー中の塩化ナトリウムの濃度を段階的に変化させMobility, Peak Areaの関係をFig.1, 2に示めた。濃度の増加と共にMobilityは減少し、Peak Areaは、直線的に増加した。これは、キャピラリー内で試料がスタッキング効果により濃縮されレスポンスが増加したためであることが知られている。

このように開発した方法は、分離の改善のみならず、感度の増加も期待でき有用な方法であるといえる。

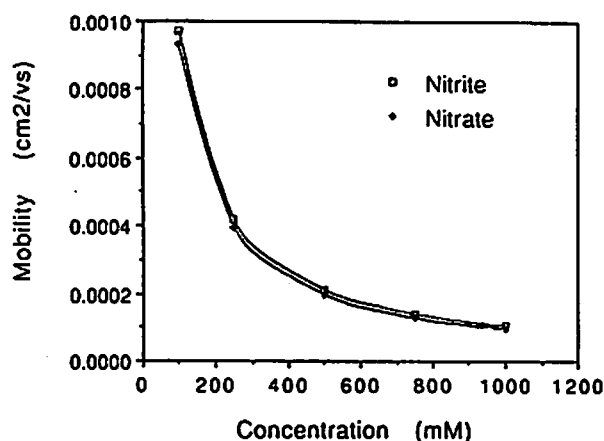


Fig.1 Relationship between concentration of sodium chloride and mobility

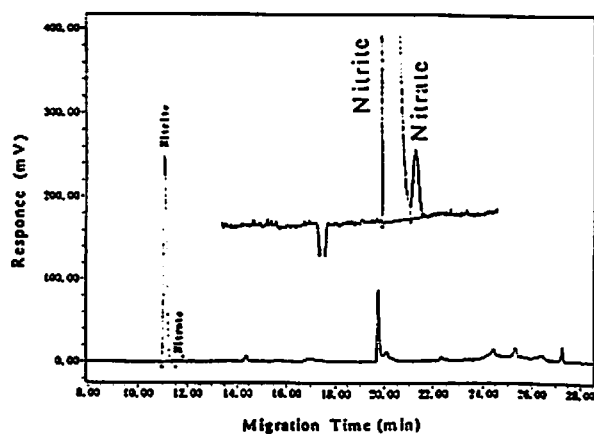


Fig.3 Electropherogram of pickles (nozawana)

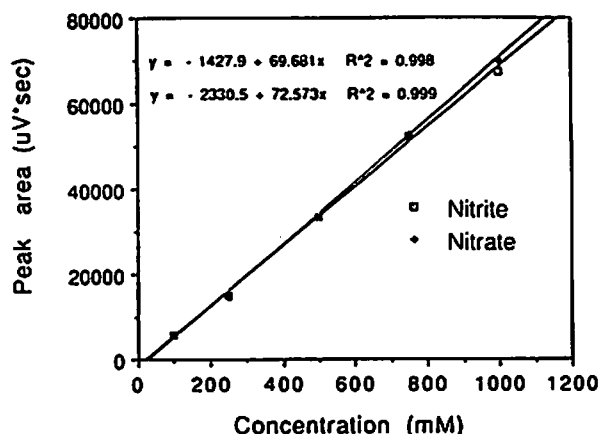


Fig.2 Relationship between concentration of sodium chloride and peak area

【参考文献】

- 1) 厚生省生活衛生局監修：『食品衛生検査指針—食品中の食品添加物分析法—』 p122~130 (1989)、日本食品衛生協会
- 2) 田中章男、能勢憲英、渡部昭宣：食衛誌. 22, 14~21(1981)
- 3) 功刀 彰、薦田 裕、呉地博夫：同上 24, 324~328(1983)
- 4) 辻 澄子、柴田 正、江崎真澄：同上 34, 161~167(1993)

森林化学分野におけるキャピラリーイオン分析の応用 (III) — アルキルアンモニウム化合物の分析 —

(日本ウォーターズ・リミテッド 分析研究部) O 米久保 淳、佐々木 秀輝、鈴木政明
(北海道立林業試験場 耐久性能科) 森 満範
(北海道大学 農学部 森林化学講座) 寺沢 実

CAPILLARY ION ANALYSIS APPLIED FOR FOREST CHEMISTRY (III) — Analysis of Antiseptics —

(Nihon Waters Ltd. Applied Technology)	Jun Yonekubo, Hideki Sasaki, Masaaki Suzuki
(Hokkaido Forest Products Research Institute)	Mitunori Mori
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University)	Minoru Terazawa

Many kind of Antiseptics and Preservatives are injected or impregnated into the wood materials to improve their characteristics. Titration and Spectroscopy have acquired for the quantitative and qualitative analysis of these reagents. However, a lot of compounds used for these reagents has high Watersolubility and Toxicity, although QC level test for the amount of these compounds doesn't perform completely for these data from that methods indicate instable reproductivity.

Optimum electrolyte condition for the separation and quantitative analysis of Short Chain Quaternary Ammonium salts is established by CIA™.

The USP tailing factor from both Wall Coated and Non Coated Capillary were measured for the evaluation of peak shapes. Wall Coated Capillary is better separation than Non Coated one under the electrolyte system containing organic solvents. Real Antiseptics reagents and Extractives from Wood are analyzed by the same CIA method.

1. はじめに

建築用材料としての木材は入手や加工の容易さ、木材そのものの有する環境適応性や美観と言った数々の利点を有する反面、菌や虫害による腐朽、劣化や燃焼しやすい点などの欠点があげられる。これら木材の劣化作用を弱め、木材資源をより有効に利用する為、さまざまな木材保存・防腐処理液が開発され、注入されている。これら処理剤の一部は高い水溶性と毒性を持つ物にも関わらず、従来これらの化合物の定量・定性には滴定法や各種分光光度計が用いられており、その操作が比較的煩雑で精度のバラツキも大きいため、その薬液管理が充分になされていない場合も見受けられる。

今回、演者等は木材に注入されたアルキルアンモニウム化合物系防腐剤の分離・定量を最終目的とし、CIA™ (キャピラリーイオン分析法) によるこれら化合物群の最適分析条件について検討し、若干の知見が得られたので報告する。

2. 実験

装置はCIAシステム (Waters) を、データ処理はMax 805 (Waters) を用いた。キャピラリーは、内壁面シラノール基未処理のAccuSep (Waters) 75umX60cm 及び親水基でコーティング処理されたCElect P175 (SUPELCO) 75umX60cm を使用し、254nm 間接吸光法で検出した。

防腐剤は、市販製品及び木材よりJIS A 9108 に準拠し調製したものを、その他の標準品、試薬は市販品特級を使用した。

3. 結果及び考察

まず、標準試料として短鎖の4級アンモニウム塩をトリメチル、トリエチル、トリブチル基を有するベンジルアンモニウムを泳動バッファーとして分離条件を検討したところ、内壁面シラール基未処理の AccuSep では C1~7 までの、親水基でコーティング処理された CElect P 175 では C1~6 までの4級アンモニウム塩の分離が可能であった。この時のニュートラルマーカによる μ EOF は、処理タイプに対し、未処理タイプのそれは約 1/3 に減少しており、長鎖7種とニュートラルの間隔差が分離に影響するものと考えられる。又、この現象は泳動バッファーや試料の未処理シラール基へのマスク作用を示唆するものである。そこでアセトリルブタールの混合有機溶媒を添加したところ、各4級アンモニウム塩の μ_e の増加と USP テーリングファクターを指標としたピーク形状の改善が認められたのに対し、 μ EOF の増加は見られなかった。この結果よりマスク作用は主として泳動バッファーによるものである事が明らかとなった。

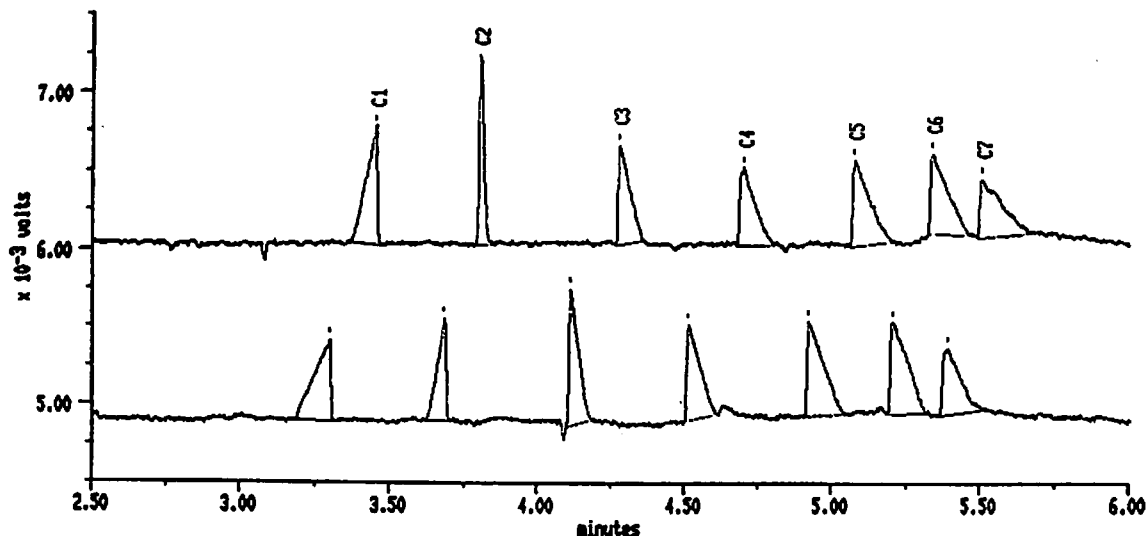


Fig.1 Electropherograms of Short Chain Quaternary Ammonium salts

次に未処理タイプ比べ、泳動バッファーによるマスク作用の影響を受けないコーティングタイプを使用して、長鎖7種とニュートラルの分離改善を検討したところ、先のアセトリルブタール混合溶媒の添加が有効であった。この混合溶媒の添加により、今回検討した全ての泳動バッファー系で C1~7 までの4級アンモニウム塩の分離が可能であり、泳動バッファーのアルキル鎖を選択する事でフェロラム上でのニュートラルマーカに対する各ピークの泳動位置 (μ EOF / μ obs) を変える事無く、ある程度のピーク形状の調整が可能であった。Fig.1 にフェロトリメチル及びトリエチルアンモニウムを泳動バッファーとした時のフェロラムを、Fig.2 にベンジルトリメチル、エチル、ブチルアンモニウムを泳動バッファーとした時の各ピークの泳動位置を示した。

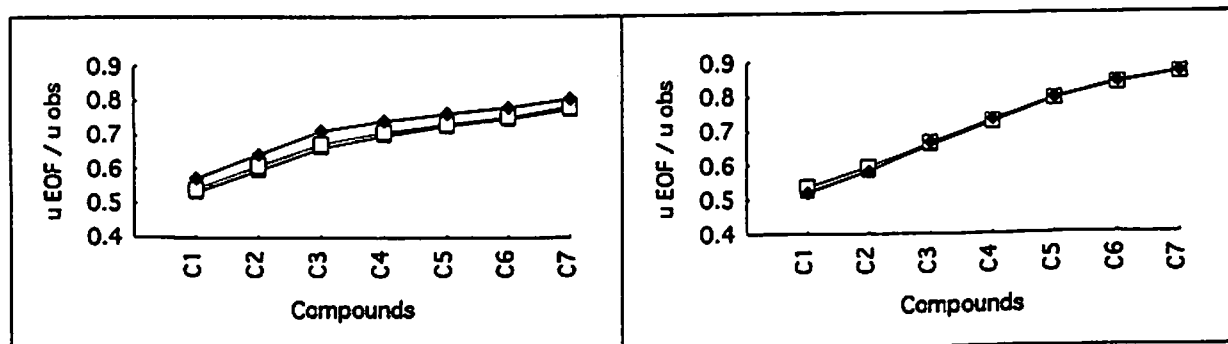


Fig.2 Effect of Organic Solvents addition for Migration Ratio

○梶原英之（農水省生物研）、A. M. Hemmings（University of East Anglia, UK）、大久保明（東大農）、山崎素直（東大農）、小松節子（農水省生物研）、平野久（農水省生物研）

ANALYSIS OF METAL BINDING ACTIVITIES OF GINSENG POLYPEPTIDE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Hideyuki kajiwara¹, Andrew M. Hemmings², Akira Ookubo³, Sunao Yamasaki³, Setsuko Komatsu¹, Hisashi Hirano¹

1; National Institute of Agrobiological Resources, 2; University of East Anglia, 3; University of Tokyo

A tetradecapeptide from ginseng (*Panax ginseng*) root showing anti-lipolytic activity in an isolated rat fat cell assay was chemically synthesized for analysis of metal binding activities *in vitro*. Binding activities against several metal ions were analyzed by measuring mobility shifts during capillary zone electrophoresis (CZE) experiments. The ginseng polypeptide (GPP) showed greatest increase in effective electrophoretic mobility in the presence of Mg^{2+} . Mobility was also effected in the presence of La^{3+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , and Zn^{2+} ions. Analysis with the dye Stains-all revealed that GPP possesses a cation binding site similar to those in Ca^{2+} -binding proteins. GPP thus appears to be a metal binding peptide. The results of this analysis suggested that GPP may perform its anti-lipolytic activities through an ability to modulate the level of free cellular Mg^{2+} and Mn^{2+} ions.

[緒言]

チョウセンニンジンで見いだされたペプチド（GPP）は、ラットにおいアドレナリンによって誘導される脂質分解を阻害することが報告されているが、その阻害機構は不明であった。このペプチドの一次構造は金属結合サイトであるEFハンド構造と類似性があることから、二価金属イオンがこのペプチドに結合するのではないかと考えられた。そこで、当シンポジウムで以前報告した金属結合タンパク質におけるキャピラリー電気泳動法を用いた結合シフトアッセイ法を用いてGPPの金属結合能を解析したので報告する。

[実験]

ペプチド合成機（アプライドバイオシステム社、431A）を用いて、FastMoc法にてGPPを合成した。合成したペプチドはTFAを用いて脱保護し、ジエチルエーテルを用いて沈澱させることによって洗浄した。

キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) においては、0.1Mトリストリン緩衝液に種々の金属イオンを加えて解析した。ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) においては、種々の濃度のSDSを加えて解析した。内径50 μ mのフューズドシリカキャピラリーチューブは、0.1M水酸化ナトリウムにて洗浄し、さらに電気泳動緩衝液で洗った後に使用した。サンプルのキャピラリーチューブへの取り込みは1秒間吸引することによって行った。キャピラリー電気泳動装置はアプライドバイオシステム社470HTを用い、200nmにおける吸光度の変化によってポリペプチドの検出をした。

[結果]

CZEにおいて、金属イオンの有無によるGPPの泳動パターンの違いを比べたところ、二価金属イオンが存在すると明らかな電気泳動速度の増加が認められた。この際、電気泳動速度の増加量はマグネシウムイオンの存在下において最も大きかった。

MEKCでもマグネシウムイオンの有無によるGPPの明らかな泳動パターンの差異が観察された。そのキャパシティーファクターをメタノールおよびスダンIIIをマーカーに用いて計算したところ、マグネシウムイオンが存在すると存在しない場合に比べて大きな値を示した。また、GPPの臨界ミセル濃度を求めるためにSDS濃度に対してキャパシティーファクターをプロットしたところ、右下がりの曲線が得られ、トルエンなどの場合のようにSDS濃度の増加とキャパシティーファクターの間に比例関係は得られなかった。マグネシウムイオンの有無によるGPPのキャパシティーファクターの違いはSDS濃度が増加するに従い、減少する傾向にあった。

ステインズオールやCDスペクトルを用いた解析でも、CZEによる解析結果を裏付ける結果が得られ、GPPの性質が金属の有無によって変化することが観察された。

[考察]

CZEおよびMEKCの両方においてGPPの金属イオンの有無による泳動パターンの違いが認められた。CZEの場合、ペプチドの持つ総電荷量およびストース半径の変化に起因すると考えられた。また、MEKCの場合、GPPはマグネシウムイオンの有無によって、キャパシティーファクターに差が見られた。しかし、その差はSDS濃度が増加するに従い、減少する傾向にあった。また、SDS濃度に対してキャパシティーファクターをプロットすると、トルエン等の有機化合物の場合ようにキャパシティーファクターが直線的に増加せず、右下がりの曲線が得られた。このような曲線が得られた原因は不明であるが、ペプチドの持つ立体的な構造が高濃度のSDSによって破壊されたためとも考えられた。

GPPにマグネシウムなどの金属イオンが結合することにより、GPPによる脂質の分解の阻害作用は、そのシグナル伝達系中のマグネシウムまたはマンガンを必須とするアデニレートサイクラーゼを阻害したことによるのではないかと推察された。

(大塚電子)

○新田哲士、 笹川秀男

(国立衛生試験所 大阪支所)

四方田千佳子、 岡田敏史

Analysis of Elcatonin by Capillary Electrophoresis

Satoshi Nitta¹, Hideo Sasagawa¹, Chikako Yomota², Satoshi Okada²¹Otsuka Electronics Co., LTD, ²National Institute of Hygienic Sciences, Osaka

Elcatonin, a derivative of Calcitonin, has a diethylene bond instead of a disulfide bond of Calcitonine to chemically stabilize the peptide chain. This peptide hormone consisting of 31 amino acids, is used as an effective remedy in the treatment of osteoporosis, hypercalcemia, etc. As Elcatonin is highly adsorptive, the standard product for bioassay contains so much of BSA and other stabilizer that it is liable to deteriorate columns in HPLC.

The present study deals with the analytical optimization, the quantitative determination and the identification test of Elcatonin carried out by the capillary electrophoresis method.

【はじめに】

エルカトニンはカルシトニンの誘導体であり、カルシトニン中に存在するジスフィルド結合をジエチレン結合に変換することにより、ペプチドの化学的安定化を図ったものである。このペプチドは31個のアミノ酸よりなるカルシウム代謝に係るペプチド性ホルモんで、骨粗鬆病や高カルシウム血症などに有効な治療薬として繁用されている。エルカトニンは吸着性が強く、バイオアッセイ用エルカトニン標準品中には吸着防止のためにBSA等の安定化剤が多量に含まれているために、HPLCではカラムの劣化を招き寿命を短くする。

そこで本研究ではキャピラリー電気泳動によるエルカトニンの分析条件の確立と定量性および確認試験について検討したので報告する。

【実 験】

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子社製CAPI-3000を用いた。キャピラリーは内径50 μ m、全長500mm、有効長375mmのものを使用した。試料注入は落差法で20mm、50secでおこなった。印加電圧は10kV (200V/cm) キャピラリー部の温調制御は25 $^{\circ}$ Cでおこなった。検出はホトダイオード アレイで200~300nmの範囲でおこなった。

エルカトニン候補標準品は旭化成工業社製を、HPCE法による定量用標準物質として、

旭化成工業社製HPLC用エルカトニン標準品 (13.32 μ g/Amp)を用いた。試料の溶解には0.02% Tween含有0.9% 塩化ナトリウムを用いた。

泳動緩衝溶液として150mM リン酸緩衝溶液 (pH5.5~8.0),1M α -Zwitter を用いた。

【結果と考察】

ウナギ エルカトニンの等電点はpI6.5~6.6であり、pH5.5~8.0の緩衝溶液で検討した。その結果、pH6の緩衝溶液がエルカトニンとBSAを分離するのに適していた (Fig.1) 。 このとき、エルカトニンは正電荷を持ち、キャピラリーに吸着するために緩衝溶液中に両性イオンを添加することで、エルカトニンによるキャピラリーへの吸着を防ぐことができた。

HPLC用エルカトニンを用いた検量線は相関係数0.999で良好な直線性を示し (Fig.2) 、HPCEによるエルカトニン候補標準品の定量値はHPLCによる値と良く一致しており、再現性も良好であった。 また、HPLCでは25min要した分析時間を約10minに短縮することができた。

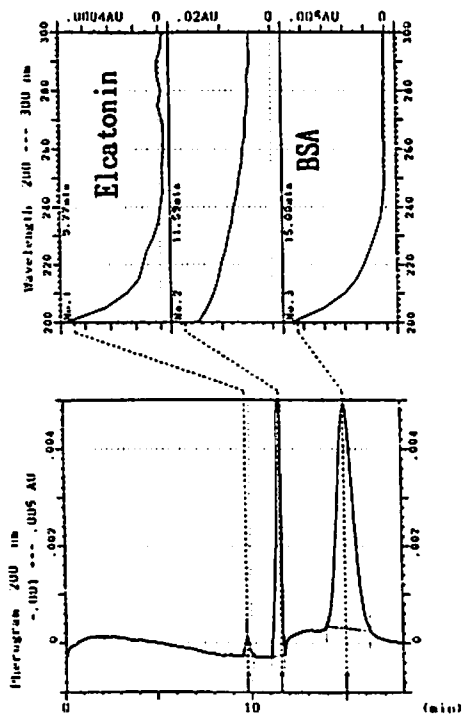


Fig.1 Phorogram of Elcatonin
BUFFER : 150mM Na₂HPO₄-NaH₂PO₄
1M α -Zwitter(pH6)
Applied Voltage : 10kV
Capillary size : ID50 μ m $\times$ 500mm

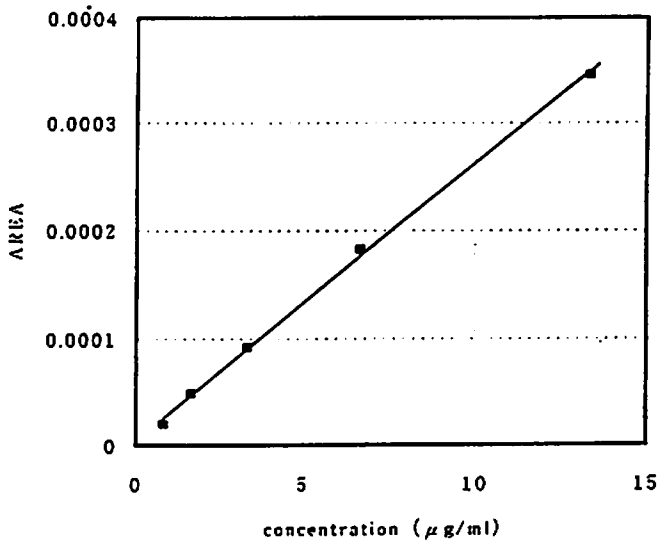


Fig.2 standard curve of Elcatonin

ミセル動電クロマトグラフィーによるベンゾジアゼピン系抗てんかん薬とその脱メチル型活性代謝産物の相互分離の条件について

(国立精神神経センター神経研究所) ○今澤正興

SEPARATION OF SOME BENZODIAZEPINE ANTIEPILEPTICS AND THEIR DESMETHYLATED ACTIVE METABOLITES BY MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY WITH ORGANIC MODIFIERS

Masaoki Imazawa

National Institute of Neuroscience, NCNP

Clobazam, diazepam (benzodiazepine antiepileptics) and their desmethylated active metabolites, were separated by micellar electrokinetic capillary chromatography with organic modifiers. The addition of acetonitrile or ethylene glycol diethyl ether to the mobile phase containing lithium dodecyl sulfate (LDS) and a buffer, was shown to extend the elution range and thus enabled complete separation of these compounds. CHAPS (zwitterionic detergent) and γ -cyclodextrin (γ -CD) were also found to be useful additives to the mobile phase. The separation of four benzodiazepine antiepileptics, including nitrazepam and clonazepam, and two desmethylated metabolites was achieved with aqueous-organic micellar solutions containing CHAPS or γ -CD.

1. はじめに

演者らは、昨年ミセル動電クロマトグラフィーによる血清中ベンゾジアゼピン系抗てんかん薬の分析について報告したが、その際、ジアゼパム (DZP) およびクロバザムとそれらの脱メチル化された活性代謝産物、デスメチルジアゼパム (DMD)、デスメチルクロバザムとの相互の分離が困難であった。その原因としては、これらのメチル体、脱メチル体の構造類似性と比較的高い疎水性が考えられる。ここでは、これら薬物の分離改善におよぼす、有機溶媒、サイクロデキストリン (CD)、両性イオン型界面活性剤の、分離溶液への添加効果について検討した結果を報告する。

2. 実験

Beckman P/ACE 5500 キャピラリー電気泳動システムを用い、キャピラリーには内径 $75\mu\text{m}$ 、有効長 50cm のフューズドシリカ管を用いた。分離溶液としては、 18mM ドデシル硫酸リチウム (LDS) を含むほう酸緩衝液 (pH 9.5) に有機溶媒と、場合により、CD または両性イオン型界面活性剤を加えて使用した。検出波長には、通常、 220nm 、分離溶液にアミド系化合物が含まれる場合には 240nm を選択した。キャピラリー温度、 25°C 、電圧、 23kV にて分析を行った。試料は、水で希釈した分離溶液に溶解し、窒素圧下、5秒間注入した。

3. 結果および考察

LDSを用いたミセル動電クロマトグラフィーでは、DZPとDMDがまったく分離せず、クロバザムとデスメチルクロバザムの分離も不十分であった (Fig. 1A)。分離溶液に12-15%程度のアセトニトリルまたはエチレングリコールジエチルエーテル (EGDEE) を添加することにより、4種の薬物が完全に分離した (Fig. 1B, 1C)。有機溶媒の添加により、各薬物ごとのミセルへの分配率の差が増大したと考えられる。アセトニトリルを用いた場合には、脱メチル体の移動時間のほうがメチル体に比べ短く、EGDEEの場合は、この関係が逆となっていることは興味深い。検討した有機溶媒では、アセトニトリル型が、フォルムアミド、メタノール、プロピオニトリルなどで、EGDEE型は、エチレングリコールジメチルエーテル、ジエチレングリコールジエチルエーテル、ジエチレングリコールジメチルエーテルなどであった。このほか、これら薬物の分離向上にほとんど寄与しない有機溶媒も認められた。

分離溶液中の上述の有機溶媒の存在による分離効率の上昇は、CDおよび両性イオン型界面活性剤、CHAPS、CHAPSOなどの添加により、さらに促進された。一方、両性イオン型界面活性剤でも、SB-12、SB-14では、このような効果は認められなかった。分離溶液への、アセトニトリルと γ CD、または、EGDEEとCHAPSの同時添加により、いずれの場合も、DZP、クロバザムに加え、ニトラゼパム、クロナゼパムを含む4種のベンゾジアゼピン系抗てんかん薬と2種の脱メチル化代謝産物の良好な分離が可能であった。

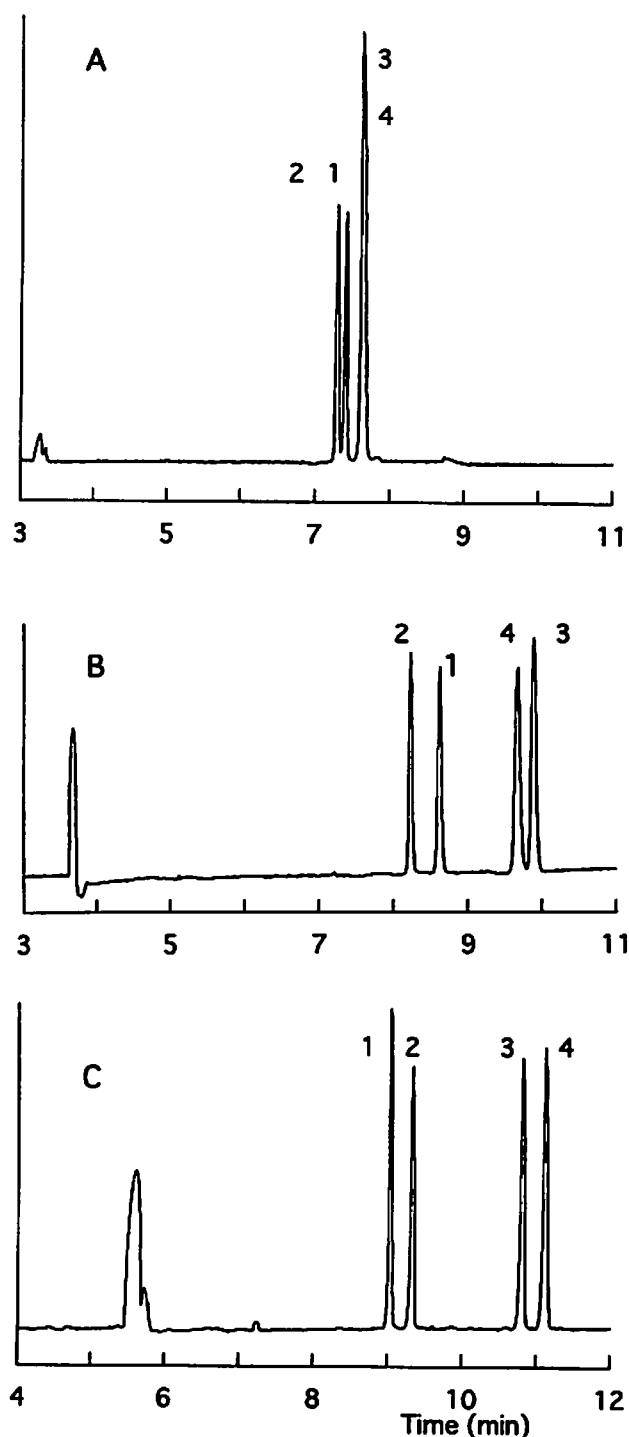


Fig. 1. Separation of benzodiazepine antiepileptics and their desmethylated metabolites: (1)clobazam, (2)desmethyloclobazam, (3)diazepam, (4)desmethyldiazepam. Micellar solutions: (A)18 mM LDS in borate buffer (pH 9.5) with no organic modifier; (B) with 12% acetonitrile (v/v); (C)with 14% ethylene glycol diethyl ether (v/v).

キャピラリーゾーン電気泳動による精神神経疾患の患者髄液中尿酸の定量

○平岡 厚, 小林 麻美, 高淵 貴徳, 赤井 淳一郎 (杏林大・保健),
荒戸 照世 (杏林大・医・生化), 富永 格 (国立千葉病院・神経科)

CAPILLARY-ZONE ELECTROPHORETIC DETERMINATION OF URIC ACID IN CEREBROSPINAL FLUID FROM PATIENTS WITH NEUROPSYCHIATRIC DISORDERS

Atsushi Hiraoka, Mami Kobayashi, Takanori Takabuchi, Junichiro Akai, Teruyo Arato* and Itaru Tominaga**

Kyorin University School of Health Sciences, Hachioji, Tokyo 192, Japan,

*Department of Biochemistry, School of Medicine, Kyorin University

**Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital

Capillary-zone electrophoresis (CZE) was applied to detection and determination of uric acid (UA) in cerebrospinal fluid (CSF) from patients with various neuropsychiatric disorders. Under the conditions employed, UA in ultrafiltrated CSF and the concurrent sera was detected as a single peak on the electropherograms, and the UA concentration in every sample could be calculated from the peak area ratios against the standard sample. No significant correlation was observed as a whole between the CSF UA levels (generally $0.5-5 \mu\text{g/ml}$) and serum free UA levels ($20-50 \mu\text{g/ml}$) so far examined. The results also suggested that the CSF UA levels were elevated in acute-phased cerebral infarction and reduced in Parkinson's disease and depressive illness. The present CZE system seemed to be useful as an aid in examining pathological changes in purine metabolism in brain using CSF.

はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) は、種々のイオン性物質、特に低分子化合物の迅速で再現性のある簡便な微量分析の系として、近年注目を集めつつある。

尿酸は、プリン塩基代謝の最終産物であり、その血清中濃度の異常高値は痛風の臨床生化学的指標としてよく知られているが、髄液中にも、血清中より1桁以上低い濃度で存在しており、その変動は中枢神経系内の病態を反映しうると考えられる。

今回我々は、CZEにより髄液の尿酸を定量する系を開発し、種々の精神・神経疾患の患者髄液に適用した。

対象及び方法

対象： 国立千葉病院・神経科を受診し、髄液の検査を施行された種々の精神・神経疾患の患者（94年9月末現在で50余例）を対象とし、余分な髄液を検査前に分け取って、同時採血で得た血清と共に -20°C で凍結保存した。

方法： ベックマンP/ACE2000型を使用し、内径 $75\mu\text{m}$ 実長 50cm の溶融シリカのキャピラリーに、遠心限外ろ過で除蛋白した試料を20秒間注入して 100mM ホウ酸緩衝液（ $\text{pH } 8.3$ ）を電解液として 20kV で泳動し、検出は 280nm で行なった。又、血清についてのみ、臨床検査用キット（ウリカーゼ法を使用）にて尿酸総濃度を定量した（髄液は、蛋白質濃度が極めて低いので、尿酸のような低分子成分の蛋白結合は無視出来ると見なした）。

結果及び考察

髄液及び血清の限外ろ液のエレクトロフェログラム上の主要なピークは、Migration Time が約6分の尿酸と8-9分のアスコルビン酸であり（同定は標品との混合分析による）、 280nm に吸収を有する物質は他に不在なため、いずれもシングルピークとなった。 280nm の吸収を用いての検出限界は $0.1\mu\text{g/ml}$ であり $100\mu\text{g/ml}$ までの範囲でピーク面積と尿酸濃度との間に直線性が認められた。そこで、検量線より髄液と血清の限外ろ液中の尿酸濃度を求めると、髄液は $0.5-5\mu\text{g/ml}$ 、血清は $20-50\mu\text{g/ml}$ がほとんどであった。一方、ウリカーゼ法による血清尿酸総濃度は、CZEによって測定された遊離型より平均して20-30%高い値となった。髄液尿酸濃度は、血清の遊離型濃度とも総濃度とも相関しておらず、主として中枢神経系内部に由来していると考えられた。疾患別集計では、脳梗塞において特にその急生期に高い値を、又、パーキンソン病及びうつ病において低い値を示した。脳・髄膜の炎症において観察された血液脳関門機能の変調（髄液蛋白質の増加）及び髄液の細胞増多は、髄液尿酸レベルの上昇とは結びついていなかった。

脳梗塞の急生期における髄液中尿酸の増加は、虚血時における急激なATP分解の結果であろうと考えられた（これは、酵素免疫測定法により別に測定されたサイクリックAMPの低値によって裏付けられた）。又、パーキンソン病及びうつ病での髄液尿酸濃度の低下は、病態と結びついているフリーラジカルを除去する過程で消費された可能性がある（フリーラジカルがパーキンソン病の発症に関与していることは知られており、又、うつ病と関係の深い脳内モノアミンオキシダーゼはフリーラジカルのもとである過酸化水素を発生させる）。

以上より、髄液の尿酸レベルは、中枢神経系内部の種々の病態を反映して変動しており、上記のCZEの系はそれを検出する上で有用と思われる。

キャピラリー電気泳動を用いる光学活性薬物の
立体選択的タンパク結合研究

(京大・薬) ○小原敏夫、渋谷明正、中川照眞

ENANTIOSELECTIVE PROTEIN BINDING STUDY OF A CHIRAL
DRUG BY USING CAPILLARY ELECTROPHORESISToshio Ohara, Akimasa Shibukawa, Terumichi Nakagawa
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

A simple HPCE method using a chiral selector was developed for the determination of unbound concentration of verapamil enantiomers in the protein binding equilibrium. Electrokinetic injection of the sample solution allowed only unbound verapamil bearing positive charge to enter the capillary, while neither negatively charged albumin nor bound verapamil was introduced. Verapamil was eluted as two zonal peaks with plateau, and enantiomeric ratio of the unbound verapamil concentration was determined by the ratio of the peak heights due to respective enantiomers. The unbound concentration of each verapamil enantiomer was calculated by deviding the total unbound verapamil concentration determined by a achiral HPCE/FA method in this enantiomeric ratio.

(緒言) 薬物は血漿中でアルブミンや α_1 -酸性糖タンパク質等の血漿タンパク質と結合し、結合型薬物と非結合型薬物は平衡状態にある。非結合型薬物だけが血管壁を透過し、標的部位に到達できるので、血中の総薬物濃度よりも非結合型薬物濃度の方が薬理効果や副作用と良い相関関係を示すことが知られている。従って、有効かつ安全な薬物の開発と臨床使用のためにはタンパク結合の研究が不可欠であり、そのためには非結合型薬物濃度の測定が必要である。また、現在使用されている薬物の約半数は光学活性中心を有するが、その半数がラセミ体として利用されている。光学活性な薬物では光学異性体間で血漿タンパク質との相互作用が異なる場合があるので、光学異性体ごとに非結合型薬物濃度を測定する必要がある。

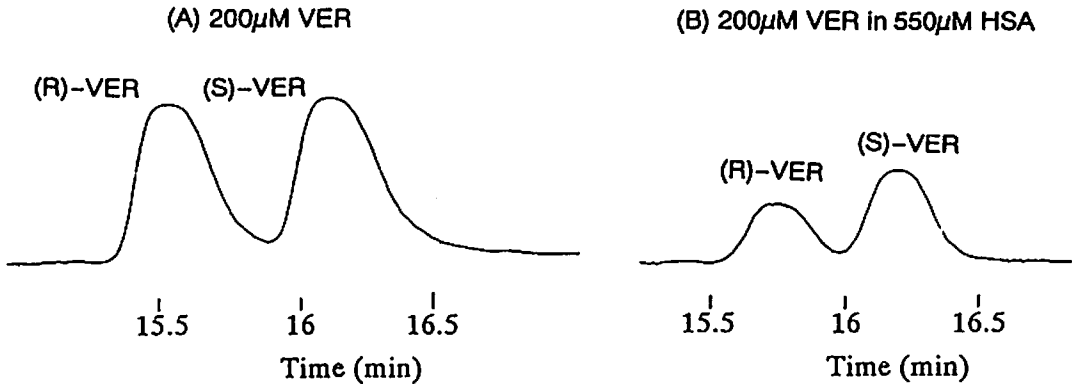
一方、血漿タンパク質などの生体高分子の中には貴重で入手困難なものが多く、また、マウス等の実験小動物から採取する試料血液量は少量であることが望ましいので、微量試料による分析法の開発が有効である。我々はキャピラリー電気泳動装置を用いて先端分析を行うことにより、非タンパク結合薬物濃度の超微量測定法(HPCE/FA法)を開発した。¹⁾ 今回はこの方法を発展させて、キラルセクターを添加した光学分離HPCE法を用いて光学異性体薬物のタンパク結合を立体選択的に評価する方法を開発した。

(実験条件) HPCE装置、大塚電子社製CAPI-3000。泳動緩衝液、リン酸緩衝液(pH 2.5、

40mM トリメチル-β-シクロデキストリン(TM-β-CD)を含む)。印加電圧、+15kV。検出、200nm。温度、25℃。試料、ベラパミル (VER、カルシウムチャンネルブロッカー) とヒト血清アルブミン (HSA) をリン酸緩衝液 (pH 7.4, イオン強度0.17) に溶解して調製した。

(結果と考察) ラセミ体のVER (300μM, 200μM) とHSA (550μM) の混合試料を電気的方法 (+15kV, 30sec) によりキャピラリー (内径75μm、有効長40cm、全長53cm、素管) 内に導入した。試料溶液中 (pH 7.4) ではHSAは負に帯電しているためキャピラリー内に導入されず、正に帯電した非結合型VERのみが導入された。ところが、生体中でのタンパク結合研究の解析のためには試料溶液を生理的条件であるpH7.4に保つ必要があり、一方、最適分離を与える泳動用緩衝液のpHは2.5である。従って、試料溶液を直接pHの低い泳動用緩衝液に接触させると生理的平衡が保てなくなり、正しい分析値が得られなかった。そこで、試料溶液の導入に先立って、試料溶液と同じpHを持つ少量のバッファーを3秒間吸引注入後、電氣的に試料の導入を30秒間行うことによりこの問題を解決した。キャピラリー内に導入された非結合型VERは、泳動用緩衝液中にキラルセクターとして含まれているTM-β-CDにより光学分離され、2つのプラトーピークとして検出された (下図)。このピーク高さから光学異性体ごとの非結合型薬物濃度の測定を試みたが、良好な再現性が得られなかった (CV>30%, n=3)。しかし、異性体間のピーク高さの比は良好な再現性を与えた (CV<2%, n=3)。そこで、既報の光学分離を伴わないHPCE/FA法によって非結合型薬物の全濃度を別途測定し、今回測定した異性体間のピーク高さを用いて比例配分することにより、光学異性体ごとの非結合型薬物濃度を計算した。これらの値は従来用いられている限外濾過後、光学分離HPLC分析を行うことにより別途測定した値と良好に一致した。しかしこれらの従来法では、本法の試料注入量 (約100nL) の約1000倍量の試料が必要であった。以上より、本法により光学活性な薬物の立体選択的な非結合型薬物濃度の超微量分析が可能となった。

文献 1) Akimasa Sibukawa et. al., J. Pharm. Sci. 1994, 83, 616-619



Electropherogram of (A) 200μM VER and (B) 200μM VER – 550μM HSA
Running buffer, 50mM sodium phosphate (pH2.5 adjusted by phosphoric acid) containing 20mM TM-β-CD. Capillary, 40 + 13cm, 75μm I.D.. +15kV. 25C. UV200nm.

32 キャピラリー電気泳動法による遊離型および 抱合型ステロイド分析の基礎と臨床応用

(神戸薬科大学・臨床化学研究室) ○松井 淳, 小林 吉晴, 渡邊 富久子

FUNDAMENTAL STUDIES ON THE ANALYSIS OF FREE AND CONJUGATED STEROIDS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS, AND ITS CLINICAL APPLICATION

Jun Matsui, Yoshiharu Kobayashi, Fukuko Watanabe

Kobe Pharmaceutical University, Clinical Chemistry Laboratory

We have developed a method for the simultaneous analysis of free and conjugated steroids by capillary electrophoresis (Micellar electrokinetic capillary chromatography). Free steroids (cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), 16 α -OH-DHEA, pregnenolone, 16 α -OH-pregnenolone, 17-OH-pregnenolone) and conjugated steroids (DHEA 3-glucuronide, DHEA 3-sulfate, pregnenolone 3-glucuronide, pregnenolone 3-sulfate) were separated successfully under the following conditions: Equipment, Ohtsuka Electronic Model CAPI-3000 with photodiode array detector; Capillary, fused silica 75 μ m I.D. (375mm to the detector); Running mode, constant current 60 μ A, 25°C; Running buffer, 20mM NaH₂PO₄, 20mM Na₂B₄O₇, 50mM SDS, 16% CH₃CN.

Clinical application of the present method was also reported.

【はじめに】

未熟児や正常新生児血中には遊離型ステロイドに加えて多くの抱合型ステロイドが存在している。我々は、これらのステロイドを溶媒抽出やカラムクロマトグラフィーによりあらかじめ遊離型と抱合型に分画した後、HPLCやGC/MSなどにより分析し、新生児期のステロイドの生合成代謝について検討を行ってきている。今回、我々は従来の煩雑な方法に代えてキャピラリー電気泳動法（ミセル動電クロマトグラフィー）による遊離型および抱合型ステロイドの一斉分析のための基礎的検討を行い、さらに臨床応用を試みた。

【実験方法】

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子社製 CAPI-3000を用いた。キャピラリーは、内径 75 μ m、長さ 500mm、検出器までの有効長 375mmのものを用いた。測定温度は、25°Cで行い、検出は 200～300nmをスキャンした。電気泳動溶媒は 20mM Na₂B₄O₇、20mM NaH₂PO₄、50mM SDS、16% CH₃CN、pH 8.8に調製して用いた。サンプルは圧力法で注入し、泳動は定電圧 60 μ Aで行った。標準ステロイドは、SIGMA社および STERALOIDS社から市販されているものを用いた。血清からのステロイドの抽出は、M&S社の ASPEC pak カラム (tC18, 300mg) を用いて行った。

【結果および考察】

まず、ステロイドの分析条件を決定するために基礎検討を行い、その結果をもとに、上記の条件を決定した。標準ステロイド 12 種混合物を電気泳動溶媒に溶解し、上記条件に従って分析した。12 種のステロイドは Fig.1(A)に示すように良好に分離することができた。次に活性炭吸着法にてステロイドフリー血清を作製し、これに標準ステロイド 12 種混合物を溶解した後、ASPEC pak カラムを用いて抽出したステロイドを電気泳動溶媒に溶解し分析した。結果は Fig.1(B)に示すように血清の影響を受けることなく良好に分離することができた。

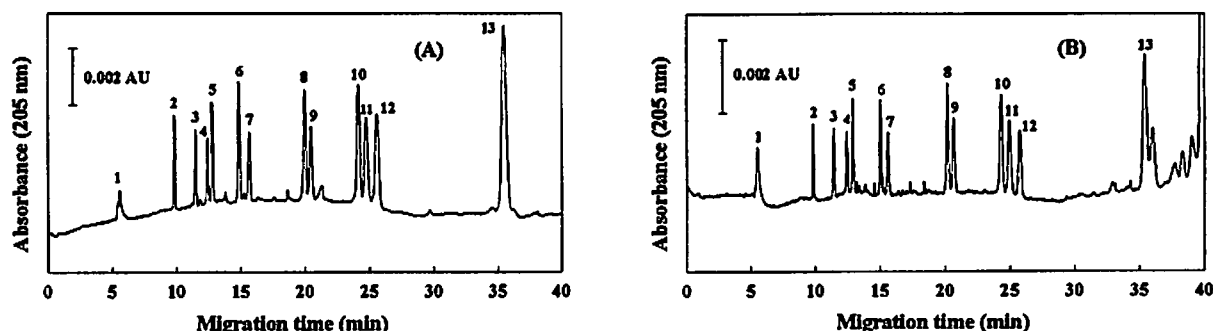


Fig.1. MEKC profiles of free and conjugated steroids in running buffer (A) and free serum (B).

Peak identification: 1. EOF, 2. DHEA 3-G, 3. DHEA 3-S, 4. Pregnenolone 3-G, 5. Cortisol, 6. 16 α -OH-DHEA, 7. Pregnenolone 3-S, 8. 16 α -OH-Pregnenolone, 9. 19-Nortestosterone, 10. DHEA, 11. 17-OH-Progesterone, 12. 17-OH-Pregnenolone, 13. Pregnenolone

また、臨床応用への試みとして、血中コルチゾール濃度の著増しているクッシング症候群の患者の血清（RIA で 80 μ g/dl 以上）を用いて、コルチゾールの分析を行った。患者血清から ASPEC pak カラムを用いて抽出したステロイドを電気泳動溶媒に溶解し分析した。その結果、Fig.2 に示すようにコルチゾールを検出することができ、実際の検体中に含まれるステロイドが血清の影響を受けることなく測定できることが示された。今後、さらに測定対象を広げ臨床応用への可能性を検討する。

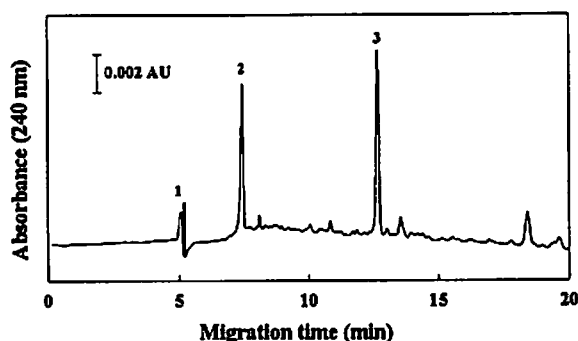


Fig. 2. Analysis of serum from patient with Cushing syndrome by MEKC.

Peak identification: 1. EOF; 2. Unknown; 3. Cortisol

33 キャピラリー電気泳動による酵素消化のリアルタイムモニタリング

(パーキンエルマージャパン) ○平沼 秀記、小畑 義充、田中 博、仙石 陽二、
白根 義治

Capillary Electrophoretic Real-Time Monitoring of Enzymatic Digestion for Internal Sequencing

Hidenori Hiranuma, Yoshimitu Obata, Hiroshi Tanaka, Youji Sengoku, Yoshiharu Sirane
(Perkin-Elmer Japan Co.,Ltd.)

Sample consumption in optimizing digestion is a limiting factor for internal sequencing at low pico-mole level. This report proved the effectiveness of automatic and real-time monitoring of enzymatic digestion with capillary electrophoresis for this purpose.

【はじめに】

タンパク質の中央のアミノ酸配列を分析する場合にはタンパク質を適当な酵素で消化し、HPLCで分離分取することが必要である。

現在ではアミノ酸配列の分析に供される試料自体が微量となり、酵素消化の条件検討を行うことは難しくなっている。

しかし、分析に用いるタンパク質によっては消化に時間がかかったり、収率が悪かったりする場合があり、酵素消化の進行をモニタリングすることは重要である。

キャピラリー電気泳動は実際に分析に用いる量が数ナノリットルと試料の損失が非常に少なく、微量の分析に適している。

今回、試料として α -ラクトアルブミン、酵素としてタンパク質のリジンのC末端側で切断するリシルエンドペプチダーゼを用い、キャピラリー電気泳動装置のオートサンプラー内でタンパク質の酵素消化を行いつつ、経時的かつ自動的に分析を行い、リアルタイムで消化のモニタリングを行った。

【実験】

装置はパーキンエルマー社製Model 270A-HTをもちい、オートサンプラー内を37℃に保持した。

試料として α -ラクトアルブミン 2 μ gを 5mM Tri- Hcl 緩衝液 (pH 8.6) 100 μ lに溶解し、酵素としてリシルエンドペプチダーゼ (100 μ g/ml D.W.) を1 μ l (基質: 酵素比で20: 1) 加えた。

混合液をキャピラリー電気泳動装置の 37℃に保持したオートサンプラーにセットし、タンパク質の酵素消化を行いつつ、経時的 (30 分ごと) かつ自動的に分析を行い、リアルタイムで消化のモニタリングを行った。

エレクトロフェログラムから消化の終了を判定した後、キャピラリー電気泳動装置から取り出し、HPLCで分離分取を行った。

得られたフラグメントはプロテインシーケンサでのアミノ酸配列分析に供した。

【結果および考察】

Fig. 1 に消化のペプチドマッピングを示す。

1/1000 以下の試料損失で、微量試料の酵素消化を自動的に、条件検討できることが検証された。この手法により、Internal Sequencing の高感度化が効率化するものと考えられる。

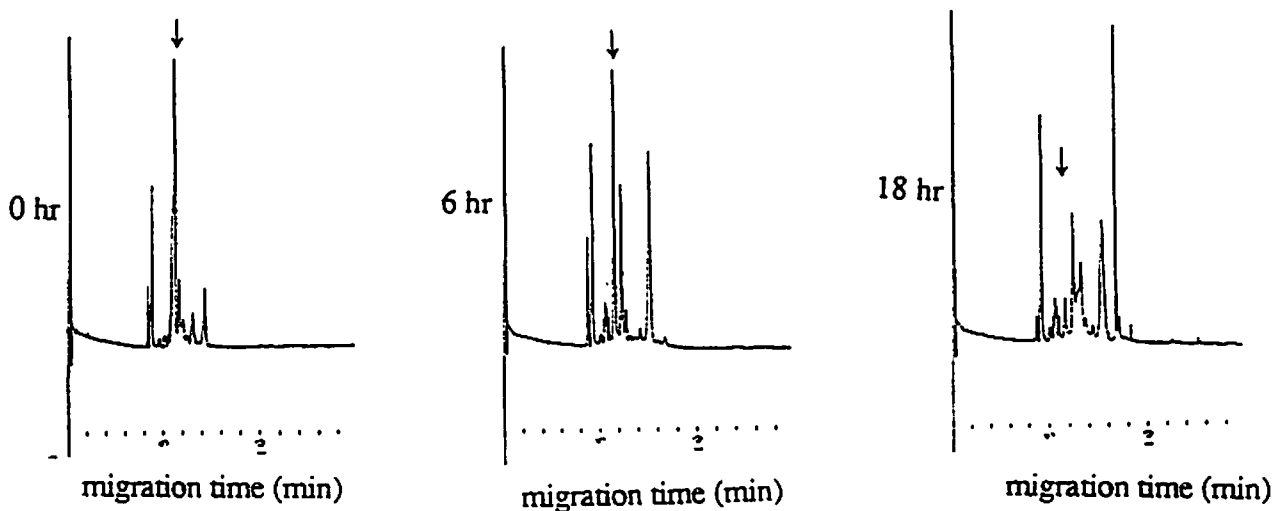


Fig. 1 The Capillary Electrophoresis Mapping of Lysyl-Endpeptidase-digested α -Lactalbumin. The CE carrier was 40 mM Sodium Borate/Phosphate Buffer(pH 8.0)-10% ethylene Glycol .

キャピラリー電気泳動による 食用天然色素の分析

(ヤエガキ醸酵技研¹、姫路工大・理²)

○渡辺敏郎¹、琴川直樹¹、山本 明¹、寺部 茂²

SEPARATION OF NATURAL PIGMENTS FOR FOOD BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Toshiro Watanabe¹, Naoki Kotokawa¹, Akira Yamamoto¹, Shigeru Terabe²

¹ Yaegaki Zymotechnics, Inc.

² Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Capillary electrophoresis methods have been developed for the analysis of natural pigments for food. Carthamus yellow pigments were separated by capillary zone electrophoresis (CZE) as borate complexes. Gardenia and Monascus yellow pigments were separated by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with sodium dodecyl sulfate.

1. はじめに

近年、食用合成色素に代わり天然色素は安全な色素として、その需要は年々増加している。しかし、これら天然色素は、天然界より抽出・分離したもののなので純粋なものではなく粗精製なものがほとんどである。

本研究においてはキャピラリー電気泳動 (CE) を用いてこれら天然色素成分について分析・検討したので報告する。

2. 実験

ベニバナ黄色色素については泳動液に300 mMホウ酸塩緩衝液(pH9.0)を、クチナシ黄色色素およびモナスカス黄色色素については、20 mM 硫酸ドデシルナトリウム (SDS) の50 mMリン酸塩緩衝液(pH7.0)-アセトニトリル(20% V/V)混合溶液を用いた。CE装置には日本分光製CE-800 (検出器はCE-970を使用) 及びバイオラッド製のBioFocus 3000 CE System、キャピラリーはバイオラッド製カートリッジ (内径50 μ m、長さ50cm、コーティングなし) を用いた。検出はそれぞれの色素の最大吸収波長で行った。

3. 結果と考察

ベニバナ黄色色素の主成分の構造は、Fig. 1に示すとおりで、構造上ホウ酸塩錯体を形成する事が示唆された。そこで、泳動液にホウ酸塩緩衝液を用いると分離することができた。多数のピークが認められたが、一番大きいピークが主成分であり、HPLCでの分離パターンともよく似ていた。また、HPLCにて分取した主成分はCEで分離した主成分と一致した。このベニバナ黄色色素を含有したジュースを作成し、それから色素成分を抽出した後、CEにて分析した結果、色素の分離パターンは元のそれとそれほど変わらなかった。

クチナシ黄色色素は中性物質なのでミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)により分離した。これもベニバナ黄色色素と同様に主成分以外のピークが検出された。色素成分にはクロシンとクロセチンの両方が存在するが、いずれも同じ条件で分離することができた。

モナスカス黄色色素も中性物質なので、MEKCにより分離した。この色素は主として2成分から成り、その構成比は約3：2である。このモナスカス黄色色素を含有したキャンディーを作成し、それから色素成分を抽出した後、CEにて分析した結果、ベニバナ黄色色素の時と同様、色素の分離パターンは元のそれとそれほど変わらなかった。

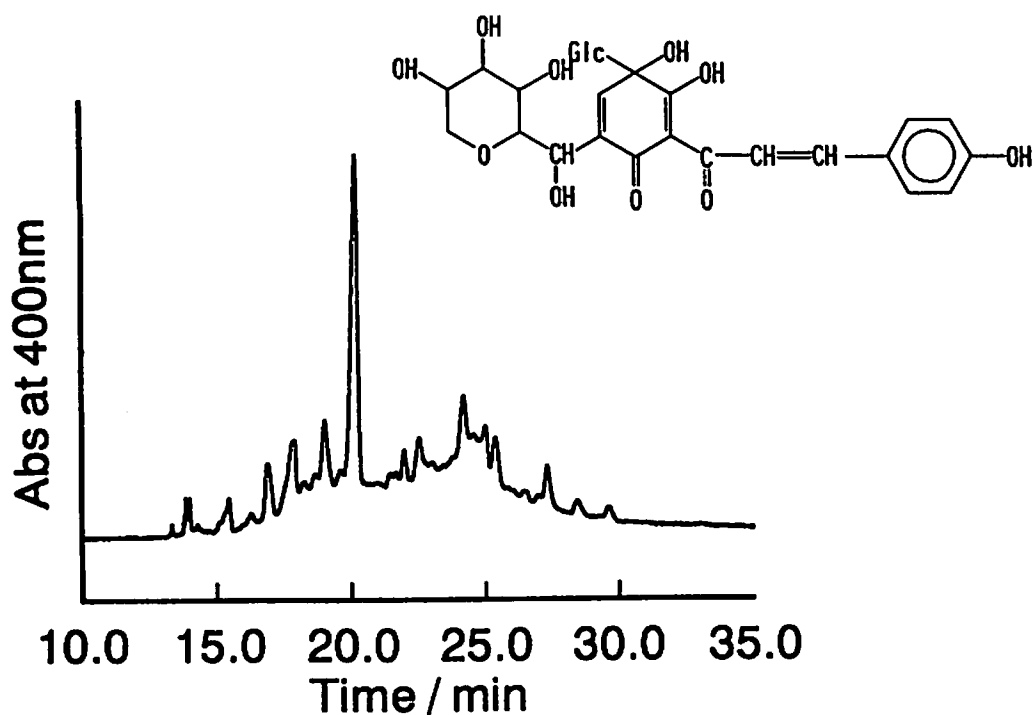


Fig.1 Electropherogram of Carthamus yellow pigment

(阪大理) ○福本敬夫・渡会 仁

SEPARATION OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS
WITH O/W MICROEMULSIONS

Takao FUKUMOTO and Hitoshi WATARAI

Department of Chemistry, Faculty of Science, Osaka University

It was tried to separate some organophosphorus pesticides by the capillary zone electrophoresis with o/w microemulsions(μ E-CZE). This technique was more effective for the separation of these species than the micellar electrokinetic chromatography(MEKC), and for each species a linear relationship was found between the concentration of the species and its relative peak intensity. In addition, to examine the separation mechanism in μ E-CZE ^{31}P -NMR measurement was carried out. A good relationship was obtained between the elution order of species and the solubility into the organic phase in the microemulsion droplets. Thus, the partition of these pesticides was suggested as a primary factor governing the separation mechanism.

はじめに 熱力学的に安定で、光学的にも透明な液滴分散状態であるマイクロエマルジョン溶液は、ミセル溶液に比べてより大きな可溶化能を示す微視的不均一溶媒である。そのため、ミセル溶液を用いたミセル動電クロマトグラフィ(MEKC)と比較して、マイクロエマルジョンを溶媒とするキャピラリー電気泳動法(μ E-CZE)はMEKCとは異なった分離機構を示すことが期待される。演者らはこれまで試料として数種のケトンを用いて、 μ E-CZEによる分離・泳動挙動に及ぼすマイクロエマルジョンの種類、組成などの影響について検討を行った¹⁾。今回演者らは、 μ E-CZEによる有機リン系殺虫剤の分析を試みると共に、分離・泳動挙動とo/w型マイクロエマルジョンへの分配機構との関係を調べるために、各溶液について ^{31}P -NMR測定を行った。

実験 キャピラリー電気泳動装置は、高電圧直流電源、UV検出器、熔融シリカキャピラリー(内径50 μm 、外径200 μm 、全長42cm、有効長24cm)を用いて組み立て、検出は222nmでの吸光度の測定により行った。o/w型マイクロエマルジョンは、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1-ブタノール、ヘプタン、炭酸ナトリウム緩衝溶液を混合溶解して調製した。

^{31}P -NMR測定は日本電子製JNM-GSX400を使用し、共鳴周波数は161.70MHzに調整した。ケミカルシフトの大きさを比較するため、外部基準とし

て重水で希釈した正リン酸を用いた。

有機リン系殺虫剤の試料溶液は、市販されている残留農薬試験用標準品（マラソン、エチオン、ホルモチオン、MEP、IBP）をエタノールに溶かして調製した。 μ E-CZE測定にはこれらをマイクロエマルジョンで希釈したものを用いた。

結果及び考察 各殺虫剤試料溶液のエレクトロフェログラムをとったところ、それぞれ異なる泳動時間を与えた。これらを混合して測定しても、Fig. 1-bにみられるように、溶出順序及び泳動時間はほとんど変化なかった。この条件下において、各試料は20分以内で良好な分離を示し、そのピーク強度と試料濃度との間には良好な直線関係が得られた。本方法での検出限界は0.5 ppm程であった。

また、一部の試料の溶出順序は、既に報告されているガスクロマトグラフィの結果²⁾と同一であった。マイクロエマルジョン溶液とミセル溶液を比較するために、同濃度のSDSと炭酸ナトリウム緩衝溶液を含むミセル溶液を調製し、MEKCによる分離を試みたところ、 μ E-CZEに比べて分離の悪いエレクトロフェログラムが得られた (Fig. 1-a)。

マラソン、MEP、エチオンの三つの試料について、ミセル、マイクロエマルジョン、有機溶媒（1-ブタノール+ヘプタン混合溶液）それぞれの溶液中での³¹P-NMR測定を行った。その結果、三つの試料について各溶液中でのケミカルシフト (δ) の大きさを比較すると、共に有機溶媒>マイクロエマルジョン>ミセルと

いう順で低磁場側にシフトした。また、面積強度より求めた各溶液への溶解度を比較すると、泳動時間の短いものほどミセルに対する溶解度が大きく、逆に有機溶媒に対する溶解度が大きいものは泳動時間も長くなるという結果が得られた。各試料はマイクロエマルジョン溶液中において、試料に固有の割合でマイクロエマルジョン液滴中に取り込まれており、その際の分配の大きさの違いによってミセル溶液とは異なった選択性が生じ、各試料の分離が行われていると思われる。

<参考文献>

1) H. Watarai, Chem. Lett., 1991, 391.

2) M. C. Bowman and M. Beroza, J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 1970, 53, 499.

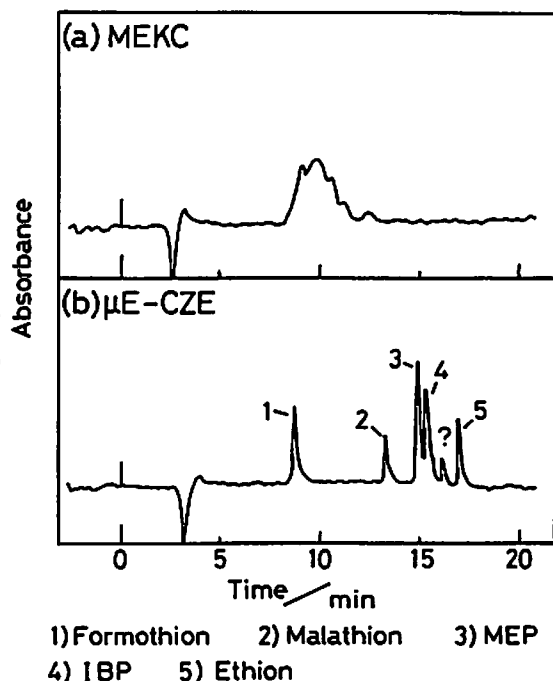


Fig. 1 Comparison of electropherograms of (a) MEKC and (b) μ E-CZE

μ E soln.: $\text{Na}_2\text{CO}_3 (5.08 \times 10^{-3} \text{ M})$
buffer soln. 89.3/ SDS 3.3/
1-butanol 6.6/ heptane 0.8
(wt%)

$E_a = 10 \text{ kV}$, $i = 25 \text{ } \mu\text{A}$, $\lambda: 222 \text{ nm}$

36 キャピラリー電気泳動におけるアミノ酸誘導体

(共立女子短期大学) ○津田淑江、渡辺多津子、蓮見知子

The behavior of Amino Acids

by Chemical Derivatization in I.P. and CE

Toshie Tsuda, Tazuko Watanabe and Tomoko Hasumi

Kyouritsu Women's University

Analysis without derivatization is simple and easy. In food samples, they have not only amino acids but vitamins, minerals and organic acids. Chemical derivatization is useful method for specified amino acids in food sample. We studied about comparison of applicability of I.P. and CE systems in analysis of free principal amino acids and phenylthiohydantoin (PTH) derivative of amino acids. The qualitative index (R_E) in I.P. system and migration time in CE system were influenced by modifying the composition of the buffer and pH in both methods. In I.P. free Leu, Ileu and Pro did not separate at pH 8.9 leading electrolyte, PTH-Leu, PTH-Ileu and PTH-Pro could separate at the same condition. In CE the pH 9.38 of electrolyte varied migration time of PTH-Leu, PTH-Ileu and PTH-Pro. The results suggest that CE can be applied expectation in PTH derivative of amino acids.

(緒言) 小麦粉のドウから採取されるグルテンの量は、小麦粉調理製品に与える影響が大きいことはすでに多くの報告がある。演者らは各種天然食物繊維を用いてファイバーブレッドを作成し、その製品の膨化性、弾力性、粘着性などへの影響を検討してきた。その結果使用する食物繊維の量が増すに従い、膨化性が低くなることが明らかとなった。グルテンは小麦粉に水分を加え攪拌することにより小麦粉中の蛋白質グリアジンとグルテニンから形成される粘質の高い物質である。この形成されるグルテンの量および特質ができ上がったパンの状態に関係したと思われた。本研究ではグルテンの特質を知る一手段としてグルテンのアミノ酸組成との関係を検討している。

食品を試料とする場合、食品中にはビタミン、ミネラル、有機酸などアミノ酸以外の成分が多量に存在している。抽出して得られたものを直接分析に用いることは容易いが、得られたピークを一検出器のみで測定する場合アミノ酸と特定することが困難な場合がある。

アミノ酸を誘導化し測定することは特定化に有効な手段と考えられる。アミノ酸のフェニルチオヒダントイン(PTH)誘導体化は蛋白質の構造を解析するのに古くから用いられてきた方法である。演者

らはアミノ酸をPTH誘導体化することにより、I.P.およびCEの泳動にどのように影響するか、また実際の食品中のアミノ酸分析に応用できるかどうか検討を行うことを目的とした。

（実験方法）

試料；製パンには松下電器産業K.K.ホームベーカリーを用いた。基準パンの配合割合はホームベーカリーの配合で行った。ファイバーブレッドは一食で食物繊維3.5g摂取を目標に凍結乾燥おからを添加した。

分析条件；（1）細管式等速電気泳動（島津製作所）、Capillary tube 0.5 mm ϕ , 20cm、泳動条件は0.01NHCl-*β*-alanine(pH3.6)、0.02NHistidine-HCl(pH4.1)、0.01NHistidine-HCl(pH6.2)、0.01NHistidine-HCl(pH8.9)、0.005MBa(OH)₂(pH9.9)、検出にはUV254nmおよび電位勾配を用いた。

（2）クオンタ4000Eキャピラリー電気泳動システム（ウオーターズ社）、Fused Silica Capillary 50 μ m $\times$ 60cm、試料注入 Hydrostatic 10cm $\times$ 10sec、電圧 7KV、Buffer 0.25mM Sodium phosphate(pH7.0、8.1)、0.1mMSodium tetraborate(pH9.38)、検出はUV254nmを用いた。

（結果）

I.P.を用いてFreeアミノ酸とPTHアミノ酸を比較した結果酸性側のリーディング液(pH3.6)ではFreeのGlu、AspのR_F値はPTH-Aspより大きくなった。またアルカリ側 (pH8.9)ではLeu、Ileu、Proの泳動パターンは得られなかったがPTH-Leu、PTH-Ileu、PTH-ProのR_F値は得ることができた。

CEの結果はBufferをpH7.0から8.1に変えることによりPTH-Asp、PTH-Gluの泳動時間は短くなった。中性アミノ酸、塩基性アミノ酸のPTH誘導体の泳動時間の変化は小さかった。BufferをpH9.38に変えるといずれのPTH誘導体の泳動時間は長くなり、特に中性アミノ酸PTHの変動は大きかった。

アミノ酸を誘導化した場合CEを用いてアミノ酸分析が可能であった。以上のことから食品中の他の含有成分からアミノ酸を特定分析しようとするとき誘導化はCE分析に有効に活用できると思われた。

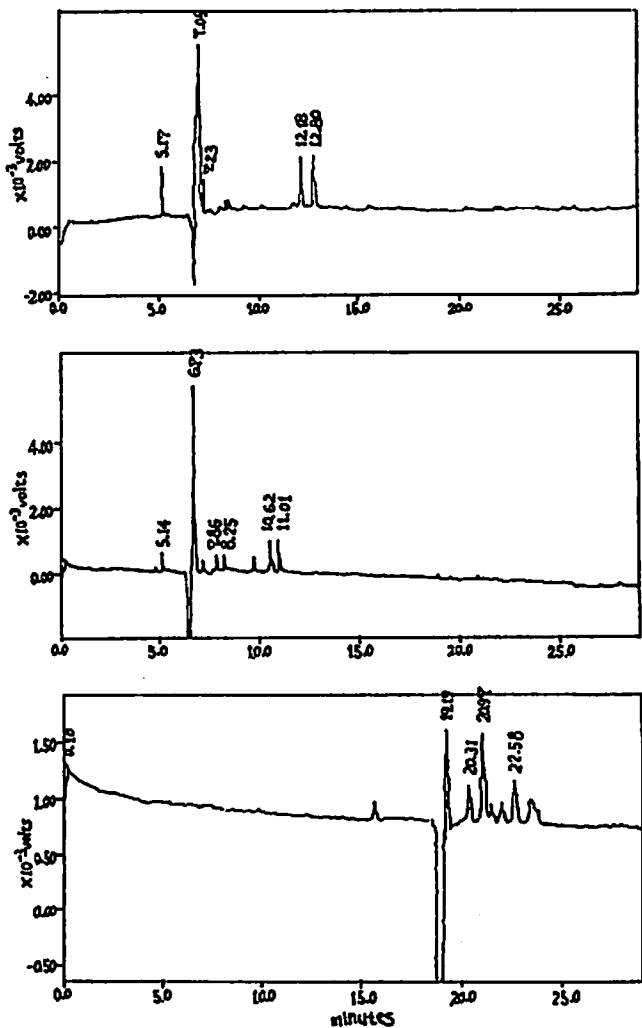


Fig.1 Influence of pH for migration time of PTH-amino acids

キャピラリー電気泳動による ラット肝臓灌流液のケトン体分析

岡山県立大・保健福祉学部・栄養学科、

日本ウォーターズ・リミテッド*

○鈴木和彦・山下広美・金行孝雄・丸山敏彦*・田川邦夫

Determination of Acetoacetate and β -Hydroxybutyrate in the
Perfusate of Rat Liver by the Capillary Electrophoresis.

Kazuhiko Suzuki, Hiromi Yamashita, Takao Kaneyuki,
Toshihiko Maruyama* and Kunio Tagawa .

Acetoacetate(AA) and β -hydroxybutyrate(3-OHB) in the perfusate of rat liver were determined by the capillary electrophoresis. Electrolyte was 5mM borax, pH9.3. Capillary column was 75 μ X 60 cm or 70 cm. The calibration curve showed a linear relationship for AA or 3-OHB concentration from 8 to 800 μ M ($r=0.999$). After the peak of nonion, 3-OHB, AA and acetate peaks were detected in the pherogram of the perfusate within 15 min.

【緒言】

血中ケトン体の分析は従来酵素法により行われてきた。しかしラット肝臓灌流液中に分泌される β -hydroxybutyrate (3-OHB) やacetoacetate(AA)量は血液中の約1/10以下で酵素法の測定限界付近となる。そこで酵素法より簡便でより測定感度の高いキャピラリー電気泳動法(CE法)での標品及びラット肝臓灌流液のケトン体の分離・定量について種々検討を行なったので報告する。

【方法】

ウォーターズのクオンタ4000CEシステムを用い、キャピラリーは75 μ X 60cmまたは70cmを使用し20KV (Positive)で泳動し、185 nmのダイレクトUV検出で行った。泳動bufferは主に四ほう酸ナトリウムを用い20分間泳動を行った。なお標品の β -hydroxybutyrateNa塩は、カネカ社、acetoacetateのLi塩はシグマ社のものを用いた。ラット肝臓灌流液はウルトラフリーC3,CL (日本ミリポア社) またはウルトラフリーC3 (日本ミリポア社) で遠心濾過しその濾液を分析に用いた。

【結果】

標品を用いた場合には3-OHBとAAの分離は比較的容易であった。AAは3-OHBにくらべ感度が1.7倍高く検出され同じ濃度でも高いピークとなった。また泳動の順番はどのpHでもAAの先に3-OHBが約1分早く検出された。3-OHBとAAの検量線は8 μ Mから800 μ Mまではほぼ直線性がえられ検出限界は酵素法の約10倍であった。

目的とするラット肝臓灌流液のケトン体分析はノニオンの泳動の後、アニオンの分離が始まる。3-OHBは約9分で泳動され、AAは約10分で泳動された。3-OHBより先のピークは未同定であるが、AAの後に溶出されるピークは酢酸と判断され、その後のテーリングしたピークは重炭酸と判定した。これらは標品を同時に泳動した時のピークの増加から決定した。ウルトラフリーC3、CLとC3による除蛋白による分析パターンには大差はなく、ややC3を用いた場合の方がベースラインの乱れが小さかった。

【考察】

血中ケトン体比3-OHB/AAは肝臓の機能を表す臨床的な指標として注目されている。ケトン体の分析は主に酵素法で行われている。しかしラット肝臓灌流液中のケトン体分析には酵素法は検出感度が低く、より感度の高い方法が要求される。そこでHPLC法やCE法を検討したが、HPLC法は分離能が低く分離能の高いCE法を採用した。酵素法に比べると、CE法は1回に1検体しかできないため全体としては、測定時間は長くなる。しかしCE法はオートサンプラー方式のためその欠点は十分補うことができた。さらに酵素法では3-OHBまたはAAだけしか測定できないがCE法では他の代謝産物の動きまで知ることができた。たとえばエタノールを灌流液中に添加するとAAの分泌が急激に減少し、酢酸の分泌が上昇するという代謝変動を確実にとらえることが可能となった。現在ラット肝臓灌流液のフェログラムの後部に見られる重炭酸と思われるテーリングしたピークについて検討中である。重炭酸はクレブス・リンガー液中に25mM含まれるため常に分析を妨害する。このテーリングしたピークを除去できれば、さらに他の有機酸の動きを知ることができるのでCE法によるケトン体分析は、代謝の全体像も同時につかむことができ、より有用な方法となる。

【参考文献】

- 1) Williamson, D.H., Mellanby, J., Krebs, H.A.: Enzymatic determination of D[-] β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. Biochem. J., 82, 90, 1962.
- 2) 小澤和恵, 田中明: 活性酸素と病態, 井上正康編著, pp417~427, (1993), 学会出版センター, 東京.

(岐阜薬大) ○江坂幸宏・木村宏幸・後藤正志

(京大農) 加納健司 (名大工) 原口紘丞

SEPARATION OF SUBSTITUTED AND UNSUBSTITUTED BENZOIC ACIDS IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS USING POLYMERS AS MATRICES WITH HYDROGEN-BONDING ACTIVITY

Esaka, Yukihiro¹; Kano, Kenji²; Kiumura, Hiroyuki¹; Goto, Masashi¹ and Haraguchi, Hiroki³
(Gifu Pharmaceutical University¹, Faculty of Agriculture, Kyoto University² and Faculty of Engineering, Nagoya University³)

Addition of poly(ethylene glycol) (PEG) as a free matrix was found to be a novel separation parameter in capillary zone electrophoresis. In the separation of substituted and unsubstituted benzoic acids used as model analytes, attractive interaction with PEG was observed for the analytes with hydroxyl, amide or amine groups. This interaction is attributable to hydrogen bond formation. The concentration and the polymer length of PEG can control the net strength of interaction and then the observed separation. The temperature during the separation and addition of organic modifiers also had effects on the interaction. A NMR study suggested hydrogen-bond formation between hydroxy groups of analytes and PEG.

〔緒言〕新しい分離様式を得るための一つの戦略は対象物質と分離媒体間におこる相互作用を見だし、利用することと考える。ポリエーテル（ポリエチレングリコール、PEG）含有マトリックス中での置換安息香酸類の電気泳動挙動は置換基の水素ドナー能を反映したものであった。ポリエーテル濃度と鎖長及び分離温度の影響、有機溶媒の添加効果、NMR法による相互作用の観察等を報告する。また、ポリビニルアルコールをマトリックスに使った場合をPEGを用いた場合と比較する。

〔実験〕試料の安息香酸類は *p*-acetamidobenzoic acid(AA), *p*-acetoxybenzoic acid(AO), *p*-hydroxybenzoic acid(HO), *p*-toluic acid(TO), *p*-aminobenzoic acid(AM), terephthalaldehydic acid(TP), *o*-phthalaldehydic acid(OP) salicylic acid(SA), benzoic acid(BA)の9種を用いた。また、用いたPEGは平均分子量400(PEG400), 4000(PEG4000), 20000(PEG20000)の三種であった。

〔結果と考察〕PEGは浸透流によって流れるので、溶質との相互作用は溶質の電気泳動速度の遅れとして観察される。室温条件での相互作用の強さの順はAA≈HO>SA>TO>AM>AO>TP>BA>OPであった。水酸、アミド、アミノ基といっ

た、水素ドナー能のある置換基を有する安息香酸類は、一般に他のものより強くPEGと相互作用し、水素結合に基づく分離様式の存在が示唆された。HO>SAはSAの分子内水素結合の存在によるものと思われ、また、AA>AMはアミドのプロトンの酸性度がアミノのそれより高いことが理由の一つと思われる。ただし、水素結合能のないTOについて比較的大きな作用が働くことから、この系には疎水性相互作用による分離様式も働いていることが予想される。

PEGの添加効果は、PEG濃度及び鎖長の増加に従い増大する。また、キャピラリーの分離部分の60%を水冷あるいは水熱する方法で、温度の効果を検討したところ、温度上昇に従い相互作用の減少が示され、これは水素結合の性質と一致する。

有機溶媒（アセトニトリル、アセトン、メタノール、ジオキサン）の添加効果について検討した。効果として特徴的であったのは、HOについては相互作用の増加が見られたのに対し、そのオルト異性体であるSAに対する相互作用が減少すること、また、AMの相互作用が増大し、TOへの相互作用が減少した結果、溶出位置の逆転が見られたことであった。基本的には環境の疎水性が高まり、水素結合は強化されてよく、HO、AMの例はこれに当たるとと思われる。一方、SAのPEGとの相互作用の減少は、距離の近い分子内のカルボニル基の酸素との水素結合の強化と考えられる。TOの相互作用の減少はTOの相互作用が、主に疎水性相互作用よることを支持する。

NMR法を用いて、溶液中のPEGとフェノールの相互作用を観察した。重水素化クロロホルム中でフェノールの水酸基のプロトンがPEGの濃度上昇と共に低磁場へ顕著にシフトすることが観測された (Fig. 1)。これはエーテル酸素がプロトンを引き寄せた結果水酸基のO-Hの結合が延びたため、結果的にプロトン上の電子密度が低下し起こったことと判断される。また、SAとPEGの場合には、SAの水酸基のプロトンシグナルがPEGの濃度上昇と共に、わずかに低磁場にシフトしながら、ブロードになり、消失していくことが観測された。これは、分子内水素結合とPEGとの分子間水素結合の競合を示すものと思われる。

ポリビニルアルコール (PVA, 平均分子量20000) はその構造から、水素ドナー、アクセプター両方の働きをすることが期待される。結果は、これらの試料についてPEG同様のアクセプターとしてよく働き、ドナーとしての性質は少しだけ観察された。この理由の一つとして、PVA分子内の水素結合の存在が考えられる。

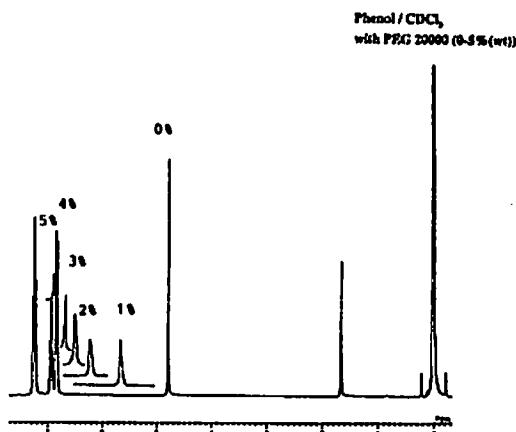


Fig.1 NMR Spectra of Phenol with PEG

キャピラリー電気泳動によるオキシ酸、金属オキシ酸の分析

(横河アナリティカルシステムズ) ○曾我朋義、井上嘉則

ANALYSIS OF OXYHALIDES AND METAL OXOACIDS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Tomoyoshi Soga, Yoshinori Inoue

Yokogawa Analytical Systems Inc., Customer Support Center.

A rapid and simple method for simultaneous determination of oxyhalides and metal oxoacids by capillary electrophoresis was developed. Electroosmotic flow was suppressed more than 40 times and the separation of inorganic anions was accomplished by using polyethyleneglycol coated capillary. Anion elution was dependent only on their mobility and detection was directly carried out with a diode-array detector. The R.S.D. values were better than 0.6 % for migration time and between 1.0 % and 3.4 % for peak area. The minimum detectable level for anions ranged from 0.5 to 11 mg l⁻¹.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動で、陰イオンを分析する場合、陰イオンは電気浸透流と反対方向に泳動するため、陰イオンの分析は長時間を必要とするか、あるいは検出されないという問題があった。これを解決するため、泳動緩衝液に4級アミン型の界面活性剤(セチルトリメチルアンモニウムブロマイドなど)を加えて、電気浸透流を反転させる方法や、Triton X-100などの粘性の高い物質を加えて電気浸透流を抑制する方法が用いられた。しかしこれらの方法は泳動緩衝液が複雑になり、また電気浸透流が泳動緩衝液のpHや濃度の影響を受けやすい。ここでは、ポリマーでコーティングされたキャピラリーを用いて電気浸透流を抑制し、ハロゲン化物、オキシ酸、金属オキシ酸を分析する方法について検討した。

2. 実験

装置は、ダイオードアレイ検出器を内蔵した HP^{3D} キャピラリー電気泳動システム (Hewlett-Packard) を用いた。ポリマーコーティング型のキャピラリーとして、ポリエチレングリコール (DB-WAX), ジメチルポリシロキサン (DB-1) および 50 % シアノプロピルフェニルメチルポリシロキサン (DB-225) の3種を用いた。キャピラリーのサイズはすべて内径 50 mm、全長 64.5 cm、有効長 56 cm のものを使用した。泳動緩衝液には、20 mM のリン酸緩衝液を用い、温度 20 °C、印可電圧 -15 kV で測定した。試料の注入は加圧法を用い、50 mbar, 4 sec で行った。検出はダイオードアレイ検出器を用い、200 nm で直接検出した。

3. 結果及び考察

3種類のコーティング型キャピラリーを用いて、11種類の無機陰イオンを分離したところ、陰イオンの泳動挙動は同じであった。このことより、キャピラリー内表面のポリマーと無機イオンの相互作用はほとんどないことが確認された。感度と再現性についてはDB-WAXを用いた場合が良好であった。中性物質であるベンジルアルコールを用いて電気浸透流を測定したが、ベンジルアルコールは、5時間以上たっても検出されなかった。このことより、電気浸透流は $0.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以下と計算され、通常のフューズドシリカを用いた場合に比べ、1/40以下に抑制された。

泳動緩衝液のpH、濃度、印可電圧、温度を変化させ、分離条件を検討した。基本的には陰イオンの泳動時間は、極限当量イオン導電率と良好な相関関係を示した (Fig. 1)。最適条件でのハロゲン化物、オキシ酸、金属オキシ酸各 50 mg l^{-1} 標準液の測定例を Fig. 2 に示す。標準液の繰り返し再現性は、マイグレーションタイムが0.6%以内、ピーク面積は1.0から3.4%であった。また検量線の直線性も良好であった。検出下限は0.5から11 mg l^{-1} であった。

ポリマーコーティング型のキャピラリーを用いることで、再現性良く陰イオンを分析することができた。この理由は、ポリマーコーティング型のキャピラリーではシラノール基が被覆されているため、電気浸透流の変動などの影響を受けることなく陰イオン固有の移動度の差で分離が行なわれるからと思われる。

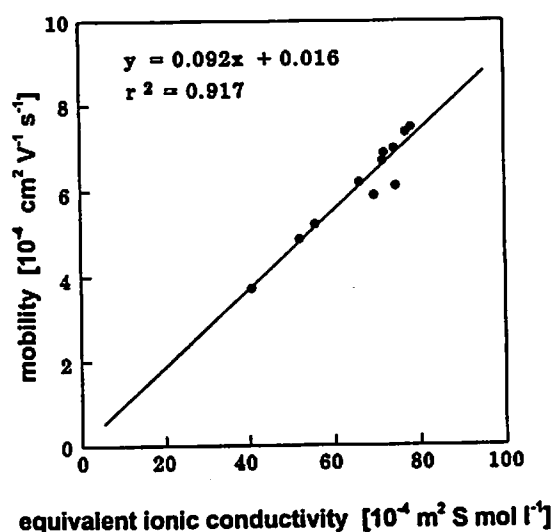


Fig. 1 Relationship between equivalent ionic conductivity and electrophoretic mobility.

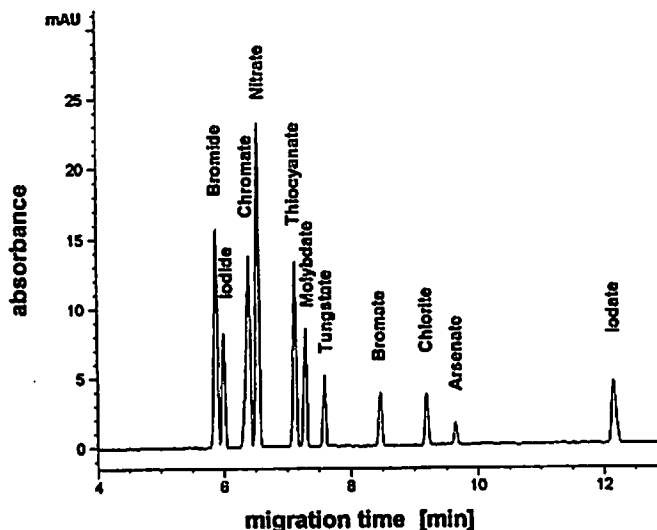


Fig. 2 Electropherogram of 50 mg l^{-1} each of inorganic anions.

14,7p-のめひ:元:争

キャピラリー電気泳動による 陰イオンの迅速検出

(パーキン エルマー ジャパン¹⁾)(Perkin-Elmer Corp. ²⁾)○佐藤栄司¹⁾・白根義治¹⁾・恩田宣彦¹⁾・泉 国辰¹⁾・小畑義充¹⁾・William E. Werner²⁾・John E. Wiktorowicz²⁾

RAPID DETECTION OF ANIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS.

Eiji Sato¹⁾, Yoshiharu Shirane¹⁾, Nobuhiko Onda¹⁾, Kunitatu Izumi¹⁾,Yoshimitu Obata¹⁾, William E. Werner²⁾, John E. Wiktorowicz²⁾(Perkin-Elmer Japan¹⁾)(Perkin-Elmer Corp. ²⁾)

The wide range of mobilities displayed by anions has made their analysis by a general method problematic. Some inorganic anions possess mobilities great enough to allow them to overcome the endosmotic flow typically observed in naked capillaries. In order to develop general methods for the analysis of a wide class of anions, the endosmotic flow in the capillary must be abolished (through the use of coatings) or reversed with dynamic coating agents. In this study anion separations were investigated employing a capillary coated with a cationic polymer that reversed the charge on the capillary surface. This reagent was used for the separation of inorganic anions and organic acids. Examples from both drinking water and wine will be presented.

(はじめに)

いくつかの無機陰イオンは、未処理のキャピラリー管内で一般に生じる陽極から陰極への電気浸透流に打ち勝つのに十分な大きさの電気泳動移動度をもっているが、広範囲な陰イオン性物質を分析するためには、キャピラリー管内の電気浸透流をなくするか、電気浸透流を逆転させ、全ての陰イオンが陽極に到達する条件下で泳動させる必要がある。

これまでは泳動用バッファーを調整して電気浸透流を逆転させ、分離する方法が用いられていたが、本研究では、陽イオン性ポリマーをあらかじめキャピラリー内壁にダイナミックコーティングすることにより電気浸透流を逆にして、陰イオンの分離を達成した。飲料水とワイン中の陰イオンの分析に応用した結果を報告する。

1.0 H₂O 20
0.1 " 5
H₂O 5
→ 20 H₂O 20
P₂O₅ 5
1.0 H₂O 20

(実験方法)

装置はパーキンエルマー製270A-HTを用い、キャピラリーは50 μ m (i. d.) $\times$ 72 cm (有効長50 cm)のフェーズドシリカ素管を使用した。キャピラリーはあらかじめ20 inchHgに吸引しながら1 N 水酸化ナトリウム液で20分、0.1 N 水酸化ナトリウム液で5分、さらに蒸留水で5分洗浄後、パーキンエルマー製マイクロコート™試薬を20分間流し内壁の修飾を行い、パーキンエルマー製アニトロン陰イオン分析バッファーを5分間流してから使用した。試料注入は吸引法—5 inchHg、4秒間により行った。印加電圧は−30.0kv、キャピラリー温度は30℃とした。検出波長は間接法により230nmで行い、インテグレーターへの入力を逆にして各成分を検出した信号をプラス側へのピークとして表示した。

(結果及び考察)

Fig. 1に無機陰イオン成分をキャピラリー電気泳動法により測定したフェログラムを示す。Fig. 2に無機陰イオン成分をイオンクロマトグラフィー法により測定したクロマトグラムを示す。Fig. 3に水道水を測定したフェログラムを示す。Fig. 4にワインを測定したフェログラムを示す。

マイクロコート試薬を用い、陽イオン性のポリマーをキャピラリーにコーティングすることにより、キャピラリー表面の電荷を逆転させ無機陰イオンから有機酸までの分離を達成できた。

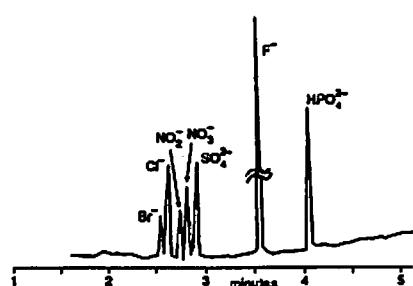


Fig. 1 Electropherogram of inorganic anions

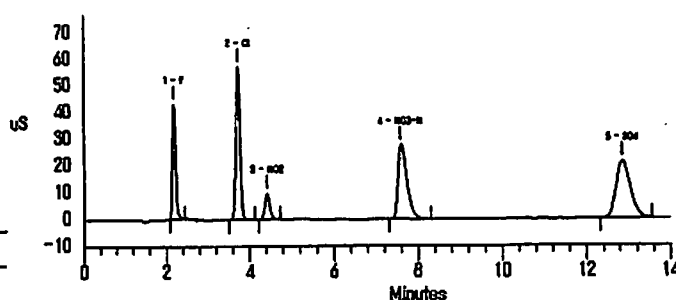


Fig. 2 Ion chromatogram of inorganic anions

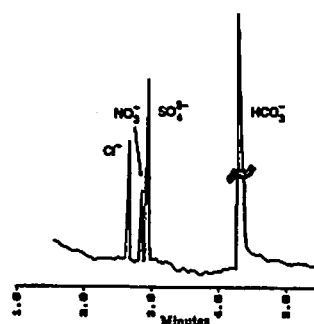


Fig. 3 Electropherogram of drinking water

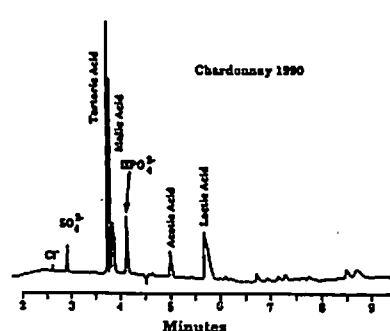


Fig. 4 Electropherogram of Wine

キャピラリー電気泳動法の医薬品 分析への応用（第14報） 黄連解毒湯の分析における分離 モードの検討

（徳島文理大・薬）○石井信之，黒木まり，赤田良信

APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS TO PHARMACEUTICAL ANALYSIS (XIV)

STUDY OF SEPARATION MODE ON OHRENGEDOKU-THO ANALYSIS.

Nobuyuki ISHII, Mari KUROGI and Yoshinobu AKADA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 180, Nishihamabouji,
Yamashiro-cho, Tokushima-shi, Tokushima 770

Free zone capillary electrophoresis (FZCE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) were compared for the determination of berberine, palmatine, coptisine, baicalin and geniposide in the oriental pharmaceutical preparation Ohrengedoku-Tho. Optimum electrolyte conditions for FZCE use 100mM phosphate buffer at pH 8.5, and for MEKC use 20mM phosphate buffer at pH 6.0 containing 50mM sodium dodesyl sulfate (SDS). Berberine, palmatine and coptisine were separated respectively by FZCE, but not separated by MEKC. Geniposide and baicalin were separated completely with other compounds in the Ohrengedoku-tho by MEKC, but not separated with other constituents by FZCE.

1. 緒言

漢方薬のような天然由来の医薬品は、多種多様な成分を含む複雑なマトリックス持つため、汎用性の高い分析法の確立が困難な試料の一つである。従って、その理化学的な品質評価を行うためには、単に指標成分の性質だけでなく、共存物質の性質や組成を考慮し、分析法の選択を行う必要がある。現在広く用いられている分析法としてはHPLC法がある。最近、分離能、操作の簡便さ、ランニングコストの軽減などに優れた分離分析法としてキャピラリー電気泳動法が急速な進歩を遂げ、ポストHPLC法として注目を集めている。演者らは、黄連、黄柏及び黄連解毒湯中のアルカロイドの分析に、フリーゾーンキャピラリー電気泳動法 (FZCE) の適用を試み、煎液及びエキス剤中のベルベリン型アルカロイドが満足のいく精度で分離定量出来ることを報告した。今回、ベルベリン型アルカロイドと共に黄連解毒湯の指標成分であるゲンポシドやバイカリンに着目し、FZCE及びミセル動電クロマトグラフ法 (MEKC) による分析を行い、分析法の選択という観点からFZCEとMEKCの比較を試

みた。

2. 実験

装置は、Waters Quanta 4000 System を用い、キャピラリーは、75 mm x 60 cm (有効長 53 cm) の Waters 製アキュセップキャピラリーを使用した。検出は、本体に内蔵の紫外吸収検出器を用い、オンカラム検出法により行い、254 nm を検出波長とした。注入は、落差法(10秒)で行った。FZCE では、pH を 8.5 に調整した 100 mM のリン酸緩衝液を用い、泳動電圧は+7 KV とした。MEKC モードでは、50 mM になるようにドデシル硫酸ナトリウムを添加した pH 6.0 の 20 mM リン酸緩衝液を用い、泳動電圧は 15 KV とした。黄連解毒湯方剤及びオウレン、オウバク、サンシシ及びオウゴンの煎液は、常法に従って、水で半量煎じし、ガーゼろ過し、水で定容とした後、遠心分離して調整した。市販のエキス剤は、その一定量を精密に量り、50% メタノールを加えて超音波抽出し、遠心分離して得られた上澄液を試料液とした。

3. 結果及び考察

演者ら設定した FZCE と MEKC の両モードで黄連解毒湯煎液及びエキス剤を分析し、試料中に含まれる各指標成分の分離状態を比較したところ、FZCE モードでは、塩基性成分であるベルベリン、パルマチン及びコプチシンなどのベルベリン型アルカロイドが、良好なベース分離したシグナルとして短時間に泳動されるのに対し、MEKC モードでは、各アルカロイドは分離せず、ブロードなシグナルとなることが分かった。一方、ゲニポシドやバイカリンは、FZCE では、ニュートラルマーカ付近に不分離な状態で泳動されるのに対し、MEKC モードでは、各成分が高い理論段数をもつシャープなシグナルとして泳動された。従って、汎用的な分析条件では、アルカロイドのような塩基成分の分析には FZCE が、また、配糖体であるゲニポシドのような中性物質やフラボノイドであるバイカリンのような微弱イオン性成分の分析には、MEKC が適していると考えられる。

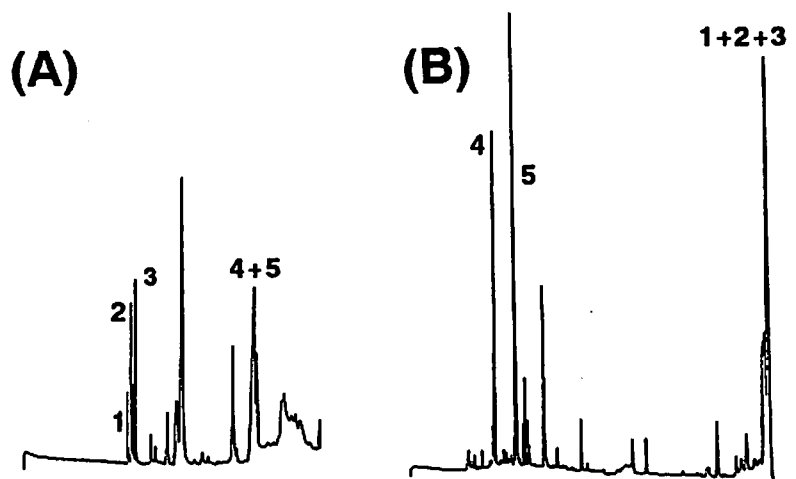


Fig. 1 Electropherograms of Ohrengedoku-tho decoction by FZCE and MEKC

Peaks : 1 = coptisine; 2 = berberine; 3 = palmatine; 4 = geniposide; 5 = baicalin. (A) : FZCE condition, 100 mM phosphate buffer at pH 8.5; (B) : MEKC condition, 20 mM phosphate buffer at pH 6.0, containing 50 mM SDS.

4 2 CZEを利用したオリゴ糖の分子認識に関する研究

(同志社大工) ○加納航治、小寺政人、堀口和美、
松井善民、真木 孝

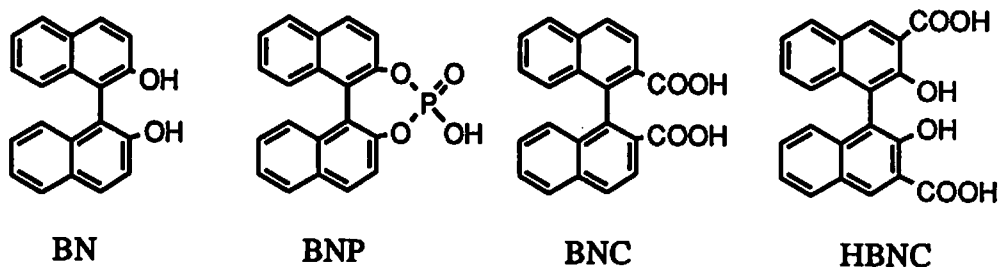
STUDIES ON MOLECULAR RECOGNITION BY OLIGOSACCHARIDES USING CZE

KOJI KANO, MASAHIITO KODERA, KAZUMI HORIGUCHI, YOSHIHITO MATSUI,
AND TAKASHI MAKI

Department of Molecular Science and Technology, Doshisha University

The enantiomers of the binaphthyl derivatives such as 1,1'-bi-2-naphthol (BN), 1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogen phosphate (BNP), 1,1'-binaphthyl-2,2'-dicarboxylic acid (BNC), and 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaphthyl-3,3'-dicarboxylic acid (HBNC) are separated by CZE using permethylated β -cyclodextrin as a separating agent. Although CZE using cyclodextrins is powerful tool for chiral separation of the binaphthyls having an axial chirality, it is hardly used to separate the enantiomers of the compounds having chiral center such as amino acids and mandelic acid. CZE have revealed for the first time that noncyclic oligosaccharides (maltose, maltotriose, maltoheptaose, etc) can also discriminate the chiralities of some binaphthyl derivatives.

緒言 我々はこれまで環状オリゴ糖であるシクロデキストリン(CD_x)の分子認識機構、特に不斉認識機構につき研究してきた。未修飾CD_xはピレン、ビリルビン、パモン酸といった化合物に対して、鍵と鍵穴機構および三点相互作用機構により不斉を誘起する。一方、BN、BNP、BNC、HBNCなどの軸不斉を有するビナフチル類の不斉は



β -CD_xの全ての水酸基をOCH₃に変換したTMe- β -CD_xにより有効に認識される。しかしアミノ酸のような中心キラリティーを有する化合物に対しては、CD_x類が不斉認識するという証拠は紫外・可視吸収スペクトルや蛍光スペクトルなどの簡便な分光法では得られなかった。そこで我々は高感度でかつ簡便な不斉認識研究手段として、CD_xを不斉認識用試薬とするCZE法を用いることにした。

結果および考察 BN、BNP、BNC、およびHBNCはいずれもTMe- β -CDxを分離剤とするCZEにより100%光学分割することができた。勿論BNは高いpH領域とし、水酸基の一部を解離させておく必要がある。これらのビナフチル類については、電子スペクトルによる不斉認識の検討が可能な程度のエナンチオ選択的錯形成が進行するため、これらの分光学による結果とCZEの結果とを容易に比較できた。すなわちこれらアニオン性被分離試薬については、より選択的に包接錯体を形成するエナンチオマーほど電気泳動しにくく、その保持時間はもう一方のエナンチオマーのそれよりも短かった。保持時間の比較からCDxの不斉認識能を容易に知ることができる。

次に、中心キラリティーを有するマンデル酸について検討した。CramerとDietsche (*Chem. Ber.*, 92, 378 (1959))は、マンデル酸エステルおよびその誘導体を β -CDx飽和水溶液に加えることによる沈殿生成により部分光学分割に成功している。しかしマンデル酸そのものの光学異性体をCZEにより分離することは非常に困難であった。TMe- α -CDxを不斉分離剤とし、緩衝溶液のpHを3.3-3.4付近に選び、電解質としてさらに0.01 MのNaClを添加し、印加電圧を25 kVとしたときに光学分割が可能であった。この条件の内の1つでも変化させると分離できなくなった。保持時間の結果からD-マンデル酸がL-体比べてより選択的にTMe- α -CDxと錯体を形成するものと思われるが、通常の分光法ではこのようなわずかな不斉選択性は検知できない。

Lipokowitzら (*J. Am. Chem. Soc.*, 114, 1554 (1992))は、化学計算とNMRの結果から、 α -CDxによるトリプトファン (Try)の不斉認識について検討し、D-TryがL-体よりも強く包接されると報告している。しかし α -CDxを分離剤とするCZEではTryの光学異性体の分離はできなかった。アセチル化されたTryについては非常に限られた条件下において各エナンチオマーを分離することができた。

次に、不斉認識におけるホスト分子についての検討を行った。単純な非環状オリゴ糖の不斉認識についてはほとんど研究されていない。そこで、BNCを被分離試薬とし、マルトース (G2) からマルトヘプタオース (G7) までの非環状オリゴ糖によるCZEを行った。その結果、興味あることにG2-G4までの糖は(R)-BNCとより選択的に錯体を形成し、G6,G7の糖は逆に(S)-BNCより強く結合することがわかった。しかしこれらの不斉認識はCZEを用いてはじめて明らかになったことであり、通常の分光学的手法では研究は不可能であろう。

以上の手法では、非分離試薬が電荷を持つ必要があった。そこでCDxの一級水酸基の全てをNH₂に変えたアミノ化CDxを正電荷をもつ分離剤とするCZEを試みた。アミノ基の一部がプロトン化されている条件において、たとえばナフトールの位置異性体がきれいに分離できた。

今回は、これまでに得られた結果 (一部既報) をまとめて報告する。

薬物-糖タンパク質相互作用の立体選択性における糖鎖の影響

(京大・薬) ○塩野浩光、渋川明正、小原敏夫、中川照真

EFFECT OF OLIGOSACCHARIDE CHAINS ON THE STEREOSELECTIVITY
OF DRUG - GLYCOPROTEIN INTERACTIONHiromitsu Shiono, Akimasa Shibukawa, Toshio Ohara, Terumichi Nakagawa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

The effect of the sialic acid residues of human $\alpha 1$ -acid glycoprotein (AGP) on the enantioselective interaction between AGP and a basic drug has been investigated using frontal analysis (FA) method achieved in high-performance capillary electrophoresis (HPCE). A $30 \mu\text{M}$ portion of racemic verapamil (VER), a calcium channel blocker, in $40 \mu\text{M}$ native or asialo AGP solution (pH7.4) was analyzed by HPCE/FA, and the unbound concentration of each VER enantiomer was determined using a small sample volume (ca. 100nL). R-VER was bound to native AGP more strongly than S-VER. The bindability and the enantioselectivity remained almost unchanged even after the enzymatic elimination of the sialic acid residues from AGP. This suggests that the elimination of sialic acid residues may not play an important role in the enantioselective binding of AGP with VER.

【緒言】 薬物のタンパク結合は薬理効果や副作用の発現、体内動態に影響を与える。また、タンパク質自身がキラルな高分子であるので、光学活性な薬物のタンパク結合は光学異性体間で異なることが多い。従って、有効かつ安全な薬物の開発と臨床使用のためにはタンパク結合の立体選択性の研究が不可欠である。 $\alpha 1$ -酸性糖タンパク (AGP) は塩基性薬物のタンパク結合に深く関与する血漿タンパク質である。AGP (分子量4.4万) の糖含量は約40%であり、糖鎖の末端にはシアル酸残基が存在する。AGPの糖鎖構造は生体中でミクロな不均一性を示すことが知られており、AGPのタンパク結合における糖鎖構造の影響を調べることは意義深い。しかしながら、AGPのタンパク結合における糖鎖の影響はほとんど知られていない。一方、我々は先端分析法をキャピラリー電気泳動に組み込んだHPCE/FA法を開発して、薬物のタンパク結合を超微量分析することに成功した¹⁾。更に、キラルセクターを添加した光学分離HPCE法を開発して光学異性体薬物のタンパク結合を立体選択的に評価する超微量分析法を開発した²⁾。今回は、このHPCE法を用いてAGPと塩基性薬物verapamil (VER、カルシウムチャンネル遮断薬) とのタンパク結合における糖鎖末端シアル酸残基の影響を立体選択的かつ定量的に調べた。

【実験条件】 モデル試料溶液として $30 \mu\text{M}$ racemic VERと $40 \mu\text{M}$ の未処理のAGP (native AGP) 又はシアル酸残基を切断したAGP (asialo AGP) 混合溶液 (pH7.4) を用いた。シアル酸残基の切

断はノイラミニダーゼ（Clostridium perfringens由来、Sigma社）を用いて酵素的に行った。HPCE装置はABI社製270Aを用いた。検出は200nm、温度は25℃で行った。

【結果・考察】HPCE/FA法による非結合型VER濃度の測定 モデル試料の溶媒と同一組成のりん酸緩衝液（pH7.4、I=0.17）を泳動用緩衝液に使用した。リニアポリアクリルアミドで内面処理したヒューズドシリカキャピラリー（内径75μm、全長41cm、有効長22cm）に試料溶液を吸引法（3秒）により導入後、電圧（+5kV）を印加した。電気浸透流が発生しないので非結合型VERだけが検出側に泳動されて、プラトー部分を有する帯状ピークが得られた。先端分析の原理に基づいて、このプラトー高さから非結合型VERの全濃度（R体とS体の和）を求めた。

VER異性体間の非結合型濃度比の測定 キラルセクターとして20mMのトリメチルβシクロデキストリンを含むりん酸緩衝液（pH2.5）を泳動用緩衝液に用いた。試料を電気的方法（+15kV、40秒）により内面未処理のヒューズドシリカキャピラリー（内径75μm、全長59cm、有効長40cm）内に導入した。正に帯電した非結合型VERのみが導入された。この時、試料溶液と泳動緩衝液の組成が異なるために、生理的条件の試料溶液を直接pHの低い泳動用緩衝液に接触させると生理的平衡が保てなくなり、正しい分析値が得られなかった。そこで、試料溶液の導入に先立って、試料溶液と同じpHを持つ少量のりん酸緩衝液（pH7.4、I=0.17）を15秒間吸引注入後、電氣的に試料導入を行うことによりこの問題を解決した。キャピラリー内に導入された非結合型VERは光学分離されて2つのピークとして検出された。このピーク高さの比から光学異性体間の非結合型濃度比を求めた。

今回得られた測定結果を下表に示した。Cu(R+S)がHPCE/FA法により求めた非結合型VERの全濃度、Cu(S)/Cu(R)はVER光学異性体間の非結合型濃度比（S体／R体）を示す。また、非結合型VERの全濃度を光学異性体間の濃度比で比例配分することにより、各光学異性体ごとの非結合型薬物濃度Cu(R)、Cu(S)を求めた。native AGP溶液中のVERのタンパク結合率はR体が68.3%、S体が51.0%であり、native AGPはS体よりもR体のVERと強く結合した。一方、asialo AGP溶液中のVERのタンパク結合率はR体が66.4%、S体が47.6%であり、酵素処理前とほぼ同じ結果が得られた。このことより、AGP糖鎖のシアル酸残基はVERのタンパク結合並びにその立体選択性に影響しないことが判明した。本分析法の試料注入量は、従来法である限外ろ過－HPLC法よりも3桁程度低い100nLである。生体中に微量しか存在しない種々の糖タンパク質と薬物との相互作用における糖鎖の役割を立体選択的に検討する上で、本法は有用な分析法といえる。

【文献】1) J. Pharm. Sci., 83, 616-619(1994). 2) 本シンポジウム要旨集、演題番号31。

Table. Unbound VER concentration and its enantiomeric ratio.

	Cu(R+S)	Cu(S)/Cu(R)	Cu(R)	Cu(S)
native AGP	12.1 ± 0.04 μM	1.55 ± 0.021	4.75 μM	7.35 μM
asialo AGP	12.9 ± 0.38 μM	1.56 ± 0.116	5.04 μM	7.86 μM
Mean ± S.D. (n=3)				

多糖マトリックスを用いるオリゴ糖の サイズ排除キャピラリー電気泳動

(近畿大薬) ○本田 進、金子友佳、南埜裕貴子、多賀 淳

SIZE-EXCLUSION CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF OLIGOSACCHARIDES IN POLYSACCHARIDE MATRICES

Susumu Honda, Yuka Kaneko, Yukiko Minamino and Atsushi Taga
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

SUMMARY Basic observations and discussions are presented for the separation of carbohydrates by size exclusion mode of capillary electrophoresis. Use of linear and branched polysaccharides as size exclusion matrices are explored, using pullulan and agarose, respectively, as models. Both polymers showed enhanced separation due to size exclusion.

【はじめに】

糖質のキャピラリー電気泳動 (CE) においては、これまでのところ、a) 直接的ゾーン電気泳動 (酸性糖質の場合)、b) プレまたはインキャピラリー誘導体化によりイオン性誘導体とした上でのゾーン電気泳動 (中性糖質の場合)、c) 疎水性誘導体としてのミセル動電クロマトグラフィーなどが用いられてきた¹⁾。

ところでゾーン電気泳動を中心とするキャピラリー電気泳動は溶出クロマトグラフィーのかたちで行われる液体クロマトグラフィー (LC) とよく対比されるが、これによる糖質分離では、① 疎水性誘導体としての順相分配、② そのまゝあるいは無〜弱疎水性誘導体としての逆相分配、③ 直接的イオン交換 (イオン性糖質の場合)、④ ホウ酸錯体などイオン性錯体としてのイオン交換 (中性糖質の場合)、⑤ 配位子交換、⑥ サイズ排除などの分離モードなどがあげられる。CE における上述の分離モードのうち a) および b) はいずれも CE 独自のものであり、c) は LC の ② に相当する。したがって、LC の分離モードのうちわずかに ② のみが CE にも適用されていると云える。

当研究室では LC の他の分離モードをも糖質分離へ適用して分離モードを拡張するべく研究を続けているが、今回は LC の ⑥ 番目のモード (サイズ排除) について基礎検討を行った結果を紹介する。このモードは既にタンパク質や核酸関連物質の分析に用いられて、その有用性が明らかにされているが、糖類の分離へ適用された例は少ない。

【実験】 CE 日本分光工業 CE-800 型装置を使用した。直鎖多糖を用いる分析においては内径 50 μm のフューズドシリカ管をそのまま使用し、分岐多糖を用いる分析では内壁を glycidoxypropyltrimethylsilane を用いてグリセリンで被覆したのち使用した。**オリゴ糖試料** イソマルトオリゴ糖 (重合度 $\sim$ 20) 混合物を Jackson の方法²⁾ により 8-amino-naphthalene-1,3,6-trisulfonate (ANTS) で還元的にアミノ化するか、または Honda らの方法³⁾ により 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) と縮合させてイソマルトオリゴ糖誘導体の混合物とした試料を用いた。

【結果】直鎖多糖の使用 Pullulan をモデルとし、これの絡み合いを利用したサイズ排除モードについて検討した。この多糖はグルコースが $\alpha 1\rightarrow 4$ および $\alpha 1\rightarrow 6$ 結合で重合した直鎖構造をもつ。これを 50 mM リン酸緩衝液 (pH 9.0) に 0 $\sim$ 4.5% 濃度に溶かし、吸引方式によりキャピラリー素管に充填した。この条件下では電気浸透流はかなりの速度で陽極から陰極へ向かっており、イソマルトオリゴ糖の PMP 誘導体混合物はピラズロン環内のケト基から生じたエノール基の解離により陽極へ引き戻されながらゾーン電気泳動モ-

ドでキャピラリー内を陰極へ移動する。Pullulan は濃度の上昇とともに密に絡み合い、動的状態でサイズ排除効果を示すものと期待された。各重合度のオリゴ糖の PMP 誘導体の電気泳動移動度 (μ_{ep})、ピークの理論段数 (N) および隣接した2つのオリゴ糖誘導体の分離度 (Rs) の変化を pullulan 濃度に対してプロットしたところ、 μ_{ep} は pullulan 濃度とともに漸減したが、N と Rs は漸増すると云う結果が得られた。 μ_{ep} の低下はキャリアの粘性率の増加によるものと考えられるが、N や Rs の増加はサイズ排除効果が効いている可能性を強く示唆する。なお、pullulan 濃度が 4.5% を超えると粘性が極端に高くなり、吸引方式ではキャピラリーへの充填が困難であった。

分岐多糖の使用 分岐多糖のモデルとしては agarose を用いた。この多糖の立体構造の中には細孔が分布し、静的状態においてもサイズ排除が起こるものと考えられる。しかし、agarose は 1.0% 濃度でも粘性率が高く、また温度による粘性率の変化が激しいため、熱時加圧方式で充填した。また、この多糖ゲルをフーズドシリカ素管に充填した場合には、電圧印加時に電気浸透流が残存してこのゲルが陰極から流れ出すため、キャピラリー内壁をグリセロールで被覆し、電気浸透流を抑制したところ、ゲル流出の問題は緩和された。Fig. 1a にイソマルトースの ANTS 誘導体混合物を分離した例を示す。アガロースを充填しない場合にはイソマルトオリゴ糖の ANTS 誘導体は陽極へ引き戻されながら電気浸透流によって重合度の高いものから順に陰極へ移動するが、内面修飾キャピラリーに agarose を充填した場合電気浸透流はほとんど無視できる程度であり、イソマルトオリゴ糖の ANTS 誘導体は陰極端から導入するとほとんど電気泳動のみによって重合度の低いものから順に陽極へ移動する。比較のため Fig. 1b には agarose は添加せずかわりに polyvinylpyrrolidone を添加して電気浸透流を抑制した場合の電気泳動図を示す。この場合も移動方向、移動順序とも agarose を充填した場合と同様である。両図は対照的な違いをみせ、agarose 充填による明かなサイズ排除効果の寄与が認められる。Agarose 充填キャピラリーでは N 値、Rs 値ともに重合度とともに増加する傾向を示した。

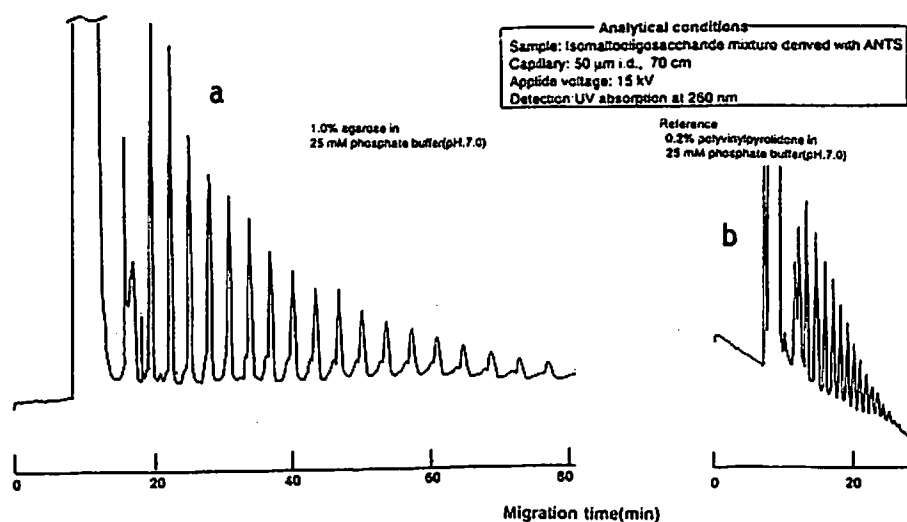


Fig. 1. Separation of ANTS derivatives of isomaltooligosaccharides having different d.p.s in an agarose-packed capillary (a) and a capillary filled with a phosphate buffer containing polyvinylpyrrolidone (b).

文献

- 1) S. Honda, J. Chromatogr., in press.
- 2) P. Jackson, Biochem. J., 270 (1990) 705.
- 3) S. Honda et al., Anal. Biochem., 180 (1989) 351.

45 光学活性 dodecoxycarbonylvaline を用いる 単糖 PMP 誘導体 エピマー の分離

(近畿大薬) ○三好 亮、小谷ますみ、本田 進
(Chem. Product Div., Waters Corp.) Edward E. Grover

SEPARATION OF THE EPIMERS OF MONOSACCHARIDE PMP DERIVATIVES BY USE OF OPTICALLY ACTIVE N-DODECOXYCARBONYLVALINE

Akira Miyoshi, Masumi Kotani and Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
Edward R. Grover
Chemical Product Division, Waters Corporation

Summary Addition of (R)- or (S)-N-dodecoxycarbonylvaline (DCV), a detergent having an optically active group, in a neutral carrier allowed baseline separation of the 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatives of D- and L-glucoses, presumably due to interaction of the two CO-NH groups in DCV and the PMP moiety of the sugar derivatives. The epimeric pairs of the C-2 and C-3 positions in pentose showed abnormally high separation, but this was found to be based on the different magnitude of solubilization to the hydrophobic alkyl portions.

【はじめに】 糖質は一般に電気的に中性であり、キャピラリー電気泳動の対象とするためには何らかの方法によりイオン性を賦与する必要がある。演者らはこのためプレキャピラリーまたはインキャピラリー誘導体化を基本としたいくつかの方法を提案してきた。そしてそれらの中で疎水性の大きい誘導体に変換する方法においては、ミセル動電クロマトグラフィーも有効な分離を与えるモードであることを明らかにした。しかし、このモードは基本的に選択性や特異性の低い分離モードであり、糖質のように構造の酷似した異性体や同族体を含む物質群を分離対象とする場合には、立体選択性の高い分離モードも有効であると考えられる。

本研究においては光学活性アミノ酸誘導体をアルキル鎖につけた (R)- または (S)-N-dodecoxycarbonylvaline (DCV, Fig. 1) をモデル物質として、これの添加による単糖分離への効果について検討した結果を述べる。

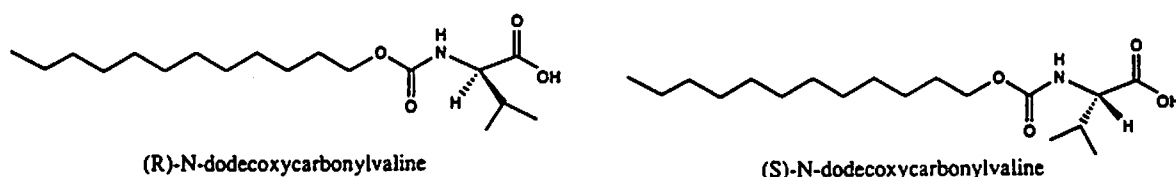


Fig. 1. Structures of DCV enantiomers.

【実験】 キャピラリー電気泳動 Waters Quanta 4000 装置を用い、内径 50 μm のフューズドシリカ素管を用いて行った。検出は 245 nm における吸収によった。(R)- および (S)-DCV Waters 社から提供されたものを使用した。糖質の誘導体化 還元的ピリジルアミノ化 (PA 化) は Hase ら¹⁾の方法、1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone との縮合 (PMP 化) は Honda ら²⁾の方法によった。

【結果】 誘導体の種類と分離 DCV を含む 50 mM リン酸緩衝液を用いて D-および L-glucose の上記両誘導体の分離について検討したところ、PA 誘導体では分離が起こらなかったが、PMP 誘導体では良好な分離が観察される場合があった。他の単糖についても同様な結果が得られた。

分離の pH 依存性 DCV における valine 部分のアミノ基はカルボニル基と結合しカルバモイル型になっているが、カルボキシル基は結合に関与せず遊離状態にある。したがって高 pH キャリアー中では DCV は解離して高い移動度を与え、糖誘導体の移動時間は短くなる。一方、DCV と糖誘導体との相互作用の大きさは主として DCV のアミド結合の状態によって決定されるものと考えられるが、D- および L-glucose の PMP 誘導体の分離について検討したところ、pH の上昇とともに分離度は若干低下する傾向がみられた。酸性キャリアー中では DCV の溶解性が悪いという問題があった。

PMP 誘導体としての単糖エピマーの分離 Fig. 1a は 最適条件で D-および L-glucose PMP 誘導体の混合物を分析した結果を示している。この条件で両エピマーはベースライン分離されている。しかし、これらのエピマーは DCV を含まない系では全く分離されず一本の融合ピークを与えた (Fig. 1b)。また、比較のため DCV の代わりに SDS を同一濃度 (50 mM) で添加したところ、分離は DCV 無添加の場合と同様に全く起こらなかった (図は省略)。したがってこの分離が DCV のアルキル鎖以外の部分との相互作用によって起こることは明白である。相互作用の機構解明には今後の検討を必要とするが、光学活性アミノ酸誘導体の一般的性質から考えてアミド結合が関与している可能性は高い。一方、試料側については、PA 誘導体のような他の誘導体では分離がみられなかったことから、PMP 部分、とくにラクタム構造が関わっているものと推察される。上述の結果に基づき Fig. 1a の条件で、ペントース類のすべての異性体 (8 種) を対象にして、各位置のエピマーの組合せにつき PMP 誘導体の分離を比較したところ、2 位および 3 位のエピマー間では著しい分離 (R_s 15~33) が観察されたが、4 位のエピマーでは分離はきわめて悪かった ($R_s \sim 1$)。しかしながら、2 位および 3 位エピマーの著しい分離は、DCV の代わりに SDS を添加した系においても観察されたことから、これらの高分離は主としてミセル内のアルキル鎖への可溶化の程度の違いによって引き起こされたものであり、DCV のアミノ酸部分との相互作用の寄与はあるにしても副次的でしかないことが明らかであった。また、ヘキソースの 5 位エピマーである D-および L-glucose では非アルキル鎖部分との相互作用によるかなりの分離が観察されたのに対してペントースの 4 位エピマーで分離がみられなかったことは、このような相互作用に糖部分の水酸基も影響していることを示すものである。

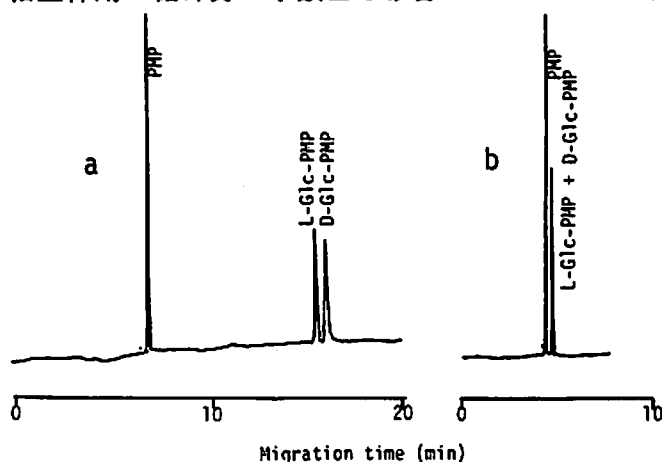


Fig. 2. Separation of the PMP derivatives of D- and L-glucoses in the presence (a) and absence (b) of (R)-DCV. Capillary, fused silica 50 μ m i.d., 75 cm); carrier, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 (b), the same buffer containing (R)-DCV (50 mM) (a); applied voltage, 20 kV; detection, UV absorption at 245 nm.

文献

- 1) S. Hase, et al., J. Biochem. (Tokyo), 85 (1979) 217.
- 2) S. Honda et al., Anal. Biochem., 180 (1989) 351.

(近畿大・薬) ○多賀 淳・薮崎幸子・本田 進

STUDY OF CARBOHYDRATE-PROTEIN INTERACTION USING CARBOHYDRATE SAMPLES AND PROTEIN-CONTAINING CARRIERS

Atsusi Taga, Sachiko Yabusako, and Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

SUMMARY Protein-carbohydrate interaction was observed in a reverse system (carbohydrate as sample - protein in carrier). The ANTS derivatives of carbohydrates showed appropriate lengths of migration time in a linear polyacrylamide-coated capillary tube with a considerable magnitude of reproducibility, hence proved appropriate for the estimation of binding constant. The PMP derivatives were useful for mutual separation of carbohydrates rather than binding constant estimation.

【はじめに】

演者らの研究室では、糖鎖-タンパク質間の結合定数を高性能キャピラリー電気泳動により測定する方法について種々の検討を行ってきたが、これまでのところ対象としてきたのは泳動液に糖鎖リガンドを添加しタンパク質試料を分析する系によるものであった。これはフューズドシリカ素管を用い高濃度のタンパク質を泳動液に添加した場合にはタンパク質がキャピラリーへ吸着されて電気浸透流の再現性が著しく損なわれ、分析上大きな支障が生じるためであった。そこで今回は、内面を処理したフューズドシリカ管を用い、タンパク質を含むキャリアー中で糖鎖を分析する系について基礎検討を行った。

【実験方法】

糖鎖の誘導体化 糖鎖モデルとしてラクトースを用い、これを 8-アミノ-1, 3, 6-ナフタレントリスルホン酸塩 (ANTS)¹⁾ および 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン (PMP)²⁾ により標識した。
キャピラリー電気泳動 アプライドバイオシステムズ 270A 型装置を用い、キャピラリーにはリニア-ポリアクリルアミドで内面被覆したフューズドシリカキャピラリー³⁾ (内径 50 μm , 全長 50 cm あるいは 72 cm) を使用した。泳動液: 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) およびこれに 0.2 mg/ml ~ 1.0 mg/ml の濃度でレクチンを溶かした溶液を用いた。

【結果と考察】

ANTS 誘導体の利用 RCA₆₀ を含む泳動液でラクトースの ANTS 誘導体 (Lac-ANTS) を電気泳動させるとタンパク質を含まない場合に比べてわずかではあるが移動時間の遅延が観察された。

Lac-ANTS の移動時間 (t) をタンパク質濃度に対してプロットしたところ、泳動液中に含まれる RCA₆₀ の濃度に依存して t は大きくなりやがてプラトーに達した。演者らがすでに明らかにしたように⁴⁾、タンパク質を含まない泳動液中で電気泳動させたときの移動時間を t_i とし、タンパク質濃度の逆数に対して 1/(t - t_i) をプロットして得られる直線 (Fig. 1) の傾きを A、Y 軸切片を B とすると、糖鎖-タンパク質間の結合定数 (K_a) は、この結合が 1 価である場合 (1) 式で与えられるが、

$$K_a = (B \cdot t_i + 1) / A \cdot t_i \quad \text{-----} \quad (1)$$

本実験においては t_i = 9.64、A = 6.69 × 10⁵、B = 5.85 となり、Lac-ANTS-RCA₆₀ 間の結合定数 K_a として 8.89 × 10⁴ (M⁻¹) (30°C) という値を得ることができた。この値は MES-Lac を含む逆の系で RCA₆₀ を泳動させた際に得られた値 (2.45 × 10³ M⁻¹) とは幾分違っていたが置換基の違いを考慮すれば妥当な値と考えられる。

PMP 誘導体の利用 RCA₆₀ を含む泳動液中で Lac-PMP を電気泳動させた場合、中性領域ではタンパク質の濃度に依存して非常に大きい移動時間の遅延が見られたが、移動時間が極めて遅く十分な再現性が得られなかった。高 pH キャリヤー中で結合実験ができる場合には移動時間も短くなり、結合定数測定の信頼性が高まると考えられるが、被覆の耐久性が保証されないという問題点がある。一方、PMP 誘導体ではレクチンとの結合によるピークの遅延が大きいためこれを利用すれば糖鎖の相互分離が容易である。Fig. 2 は RCA₆₀ 存在下 Lac-PMP と Mal-PMP を相互分離した例である。これは糖鎖分離にアフィニティーキャピラリー電気泳動を適用した例として評価できる。

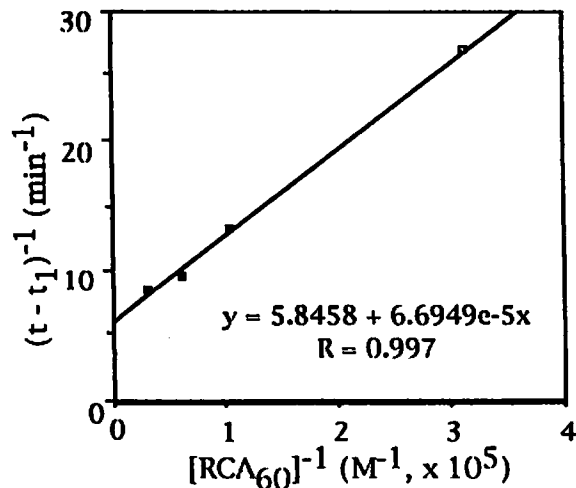


Fig. 1 Plot of reciprocal migration time vs reciprocal RCA₆₀ concentration.

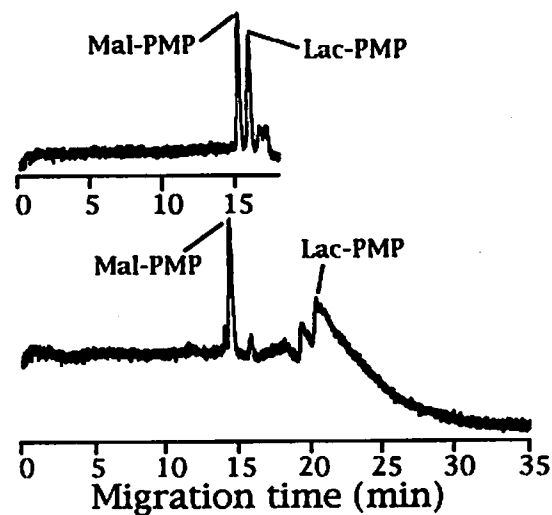


Fig. 2 Separation of Mal-PMP and Lac-PMP in the absence (upper chart) and presence (lower chart) of RCA₆₀ in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8)

文献
 1) P. Jackson et al., Biochem. J., 270 (1990) 705. 2) S. Honda et al., Anal. Biochem., 180 (1989) 351. 3) Y. Baba et al., J. Chromatogr., 653 (1993) 329. 4) S. Honda et al., J. Chromatogr., 597 (1992) 377.

47 無担体電気泳動による DNA の分離

5. スペースシャトル - コロンビアでの電気泳動

○小林英三郎¹⁾、山本顕吾²⁾、安田佳代²⁾、石井直明²⁾、長岡俊治³⁾

1) 城西大学理学部化学科、2) 東海大学医学部分子生命科学、3) 宇宙開発事業団

Separation of DNA on Free Flow Electrophoresis.

5. Electrophoresis on SPACE SHUTTLE STS65/COLOMBIA.

Hidesaburo Kobayashi¹⁾, Kengo Yamamoto²⁾, Kayo Yasuda²⁾, Naoaki Ishii²⁾ and Syunji Nagaoka³⁾

1) Faculty of Science, JOSAI University, Keyakidai, SAKADO-SHI 350-02

2) School of Medicine, TOKAI University, Bohseidai, ISEHARA-SHI 259-11

3) NASDA, 1-1, Sengen 2-chome, TSUKUBA-SHI 305

Abstract: An electrophoresis experiment of nematode *C. elegans* DNA by using FFEU (Free flow electrophoresis unit) has been done on the spacelab of space shuttle STS65/Colombia. The time for experiments on space were reduced to one third of the planned experiments because IFM (in flight maintenance) were carried out to remove the bubbles which had stayed inside of FFEU's cooling water system. Furthermore the bubbles had also stayed inside of the separation chamber of FFEU so big in size that the effective electrophoretic area of chamber was limited to 20 % in width.

Real time down link data from space shuttle of the experiment, nevertheless, showed a good electrophoretic result compared to the case on the ground. The 3DEP (three dimensional electropherogram) of the markers, NADP and adenosine which were used for judging separation tendency of DNA, on the experiment provide stable moving of samples without thermal convection which are easily caused under one gravity. The study of separation profile of *C. elegans* DNA has been undergoing with PCR and hybridization of the recovered electrophoresis sample after landing of space shuttle Colombia.

はじめに

無担体電気泳動は FFE (Free Flow Electrophoresis) と呼ばれており、分離槽に充填剤を使わないので高分子、超分子さらには顆粒や細胞などを分離する目的に使用することが出来る。また分離目的のサンプルを連続的に分離槽に導入できるので CFFE (Continuous Free Flow Electrophoresis) と呼ばれ、小型な分離槽でも大きなサンプル処理能力を持っている。このように本来充填剤を使用せずに泳動を行うので、ゲル電気泳動や HPLC などでは不可能な巨大サイズの物質分離に適し、さらに連続的にサンプルを注入できる特性はオンライン可能な装置として設計することができる。FFE は単に分

離装置としてだけに留まらず、荷電粒子の移動度の解析など分析目的にも使用できるなどその応用範囲は広い。しかしながら FFE では充填剤を使用しないので高電圧をかけると熱対流が生じ、分離が乱されるため電気泳動槽の設計においてその厚さが熱交換が可能である範囲 (1mm) 以下となる。一方宇宙の微小重力下では熱対流が無いので熱的攪乱は少なく良好な分離が期待できる。

我々は本年 7 月に飛行したスペースシャトル・コロンビアで行われた IML-2 (第 2 回国際微小重力実験室) に参加し、宇宙開発事業団 (NASDA) が開発した FFEU (Free Flow Electrophoresis Unit) で線虫の DNA を分離する

実験を行った。この結果を地上における F F E Uでの泳動実験^(1,4)と比較し宇宙での微小重力が F F Eの場に適していることを報告する。

結果および考察

1. 実験装置の修理：今回の実施で大幅に実験計画の変更を余儀なくする装置の故障が起きた。一つは F F E U本体の熱交換を行うスペースラブとの間に配管された冷却水循環系である。本体の立ち上げは温度制限が設けられているので冷却水の循環がなければ全てが停る。圧力計などのモニターから冷却水中に気泡が入っていることが予測されたのでこれを除去するため軌道上での修理を行った。配管をはづすことは水がスペースラブ全体へ飛散することでもあり作業は注意深く進められ長い時間が必要であった。6回にわたり軌道上で修理を行い水は循環するようになったが、実験時間は大幅に減少し、3回行う予定の実験計画を分離サンプルを回収する実験1回のみに縮小した。

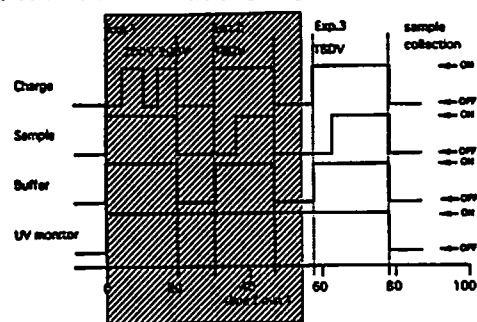


Fig. 1 Schematic operation of FFEU on space.

2. 泳動実験：電気泳動は Fig. 1 に示す Exp. 3 で 200 V の荷電で行った。FFE U の UV モニターの信号が 10 秒置きに地上に送られるのでこれを 3 D エレクトロフエログラムにし、軌道上での分離挙動を判断した。(Fig. 2) 全ての UV 吸収は直線的に変化しているが、フラクシオン番号 15 から 55 ではサンプルが泳動していない時間帯でも異常な吸収が見られた。この現象は本実験の後で行われた他の実験テーマでも見られ、気泡であると考えられる。しかしながらフラクシオン番号 10 から 14 の範囲ではマーカーである NADP および アデノシンが泳動し

ていると思われる。このデータを同じ電圧で泳動した地上実験と比較すると Fig. 3 に示すように明白な差があり、当初の予測どおり微小重力下で熱対流の影響はほとんどないと思われる。

現在回収した分離サンプルを解析中であるが、宇宙実験に用いたサンプルは地上対象のサンプルより低分子化している傾向があるので詳細な検討を継続中である。

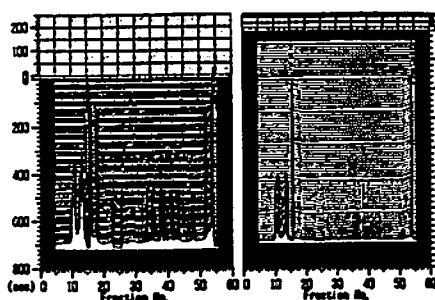


Fig. 2 Electrophoresis of *C. elegans* DNA with marker on space.

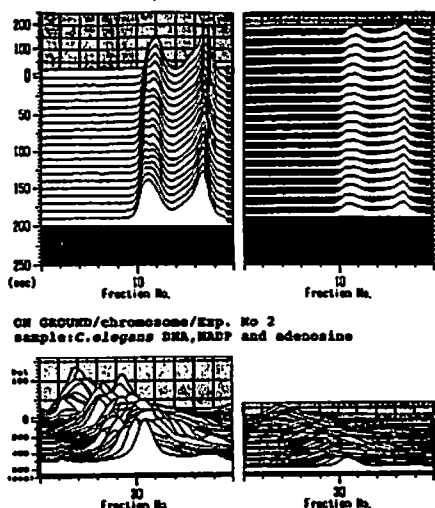


Fig. 3 Electrophoresis of *C. elegans* DNA with marker on space and on the ground.

今回の実験で F F E が微小重力下で良好な分離挙動を示すことが明白になったが、装置への気泡の混入のため十分な解析が出来ない部分もあった。今後より高い成果を上げる宇宙実験機器を開発するためにも気泡の除去方法に良いアイデアが必要である。

- 1) 第9回宇宙利用シンポジウム、東京、(1987)
- 2) 第10回宇宙利用シンポジウム、東京、(1987)
- 3) 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム、姫路、(1992)
- 4) 第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム、東京、(1993)

線状ポリアクリルアミドを支持体としたキャピラリー電気泳動によるDNA塩基配列決定の性能の予測

○真鍋 敬（愛媛大・理）、陳 農（大連物理化学研究所）、寺部 茂
（姫路工大・理）、養王田正文、遠藤 勲（理研・化学工学）

Prediction of the performance of capillary electrophoresis in DNA sequencing employing linear polyacrylamide as a sieving matrix

Takashi Manabe¹⁾, Nong Chen²⁾, Shigeru Terabe³⁾, Masafumi Yohda⁴⁾, Isao Endo⁴⁾

¹⁾Faculty of Science, Ehime University, ²⁾Dalian Institute of Chemical Physics, ³⁾Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, ⁴⁾The Institute of Physical and Chemical Research, Riken

Oligonucleotides and DNA sequencing fragments have been separated by capillary electrophoresis employing linear polyacrylamide (LPA) as a sieving matrix. The performance of the separation has been examined by changing LPA concentration, capillary length, and electric field strength. It was found that, for large DNA fragments, the migration interval between bands linearly decreases as DNA fragment size increases. Based on this finding, simple experimental equations have been proposed to predict resolution and migration times of DNA fragments separated in our system at given electrophoretic conditions.

（はじめに）

ヒト遺伝情報を解析するうえで、DNAの塩基配列決定法を高性能化することは、きわめて重要な課題である。キャピラリー電気泳動は、熱の放散効率がよいので高電圧が印加でき、泳動時間を短縮することができる。ただし、DNAのような高分子物質について高い分離能を得るためには、ゲルなどの高分子支持体を使用する必要がある。支持体として、架橋のないポリアクリルアミド（線状ポリアクリルアミド、LPA）を用い、キャピラリー電気泳動で核酸塩基ホモポリマーやDNA塩基配列決定用断片を分析し、分離に及ぼすLPA密度、キャピラリー長、電気泳動電圧の影響を調べた。その結果、我々の採用した機器と泳動条件において、キャピラリー電気泳動による塩基配列決定の性能（分離能と分析時間）とキャピラリー長との関係を予測できた。

（方法と結果）

蛍光ラベルしたオリゴヌクレオチド試料FITC-p(dT)は、姫路工大・理・生命科学科の大隅隆博士、畑 信吾博士に調製を依頼した。蛍光ラベルしたDNAシーケンサー用標準試料（大腸菌ベクターM13mp10を鋳型としたもの）は日立製作所中央研究所の神原秀記博士より恵与されたものを用いた。キャピラリー電気泳動装置はベックマン社のPACE2000（レーザー光源・蛍光検出器つき）を用いた。フューズドシリカキャピラリーは内径75 μm 、外径375 μm 、長さ（実効長）

30～100 cmを用いた。ただし付属のキャピラリーカートリッジでは、キャピラリーを小さいコイル状に巻く必要があり、これが分離能を劣化させるので、伸ばしたままキャピラリーを保持できるようカートリッジを改造した。キャピラリー内壁処理は、まずメタクリル基をもつシラン化試薬を結合させ、さらに3% T線状ポリアクリルアミドを重合させる方法を用いた。分離のための支持体は、5～9% T線状ポリアクリルアミドを用いた。緩衝液は7 M尿素を含む0.1 M トリス-ほう酸緩衝液 (pH 8.3) を用いた。

印加電圧とゲル密度を変化させて分離の程度と分離に要する時間を調べたところ、印加電圧が大きくなると、長いDNA断片は同じ移動度を示すようになり、原理的に分離できなくなることが明らかになった。例えば9% T、200 V/cmでは、塩基数約650以上のDNA断片が、また100 V/cmでは塩基数約930以上のDNA断片が、原理的に分離できない。しかし、分離の効率の点からは、印加電圧は高い方が望ましい。そこで、DNA断片どうしの分離能と、それらの検出時間とを予測する計算式を考案した。Fig. 1は予測に基づき選択した条件における分離結果の一例である。9% T、100 V/cm、実効長40 cmのキャピラリーで、約520塩基までの一塩基分離が可能であった。

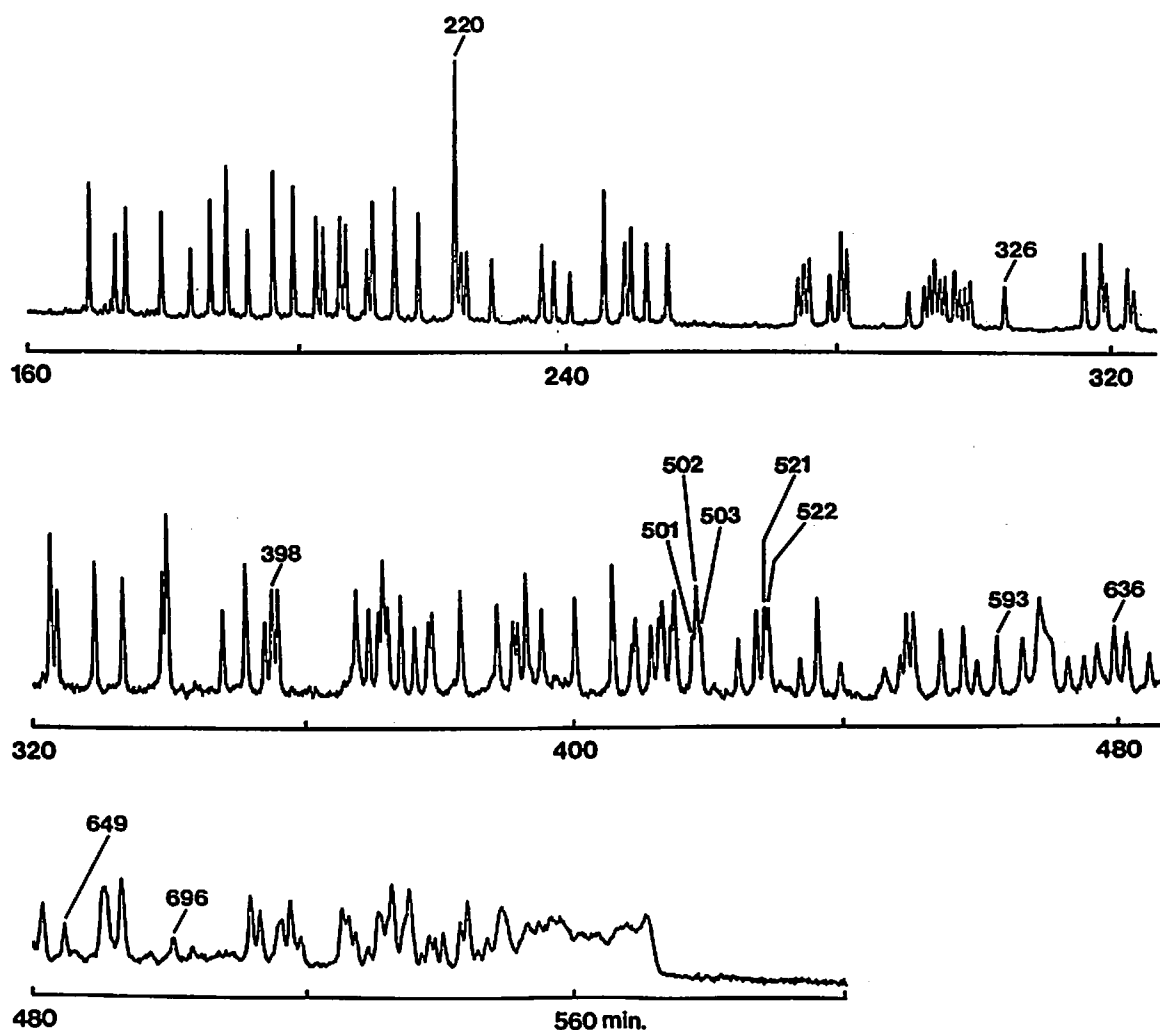


Fig. 1. Separation of FITC-M13mp10 sequencing fragments by capillary electrophoresis. Support: 9%T, 0%C polyacrylamide; Capillary: 40 cm effective length; Field: 100V/cm.

非定常電場ゲル電気泳動下の 長鎖DNA分子の挙動

(名大工) ○増淵雄一、小穴英広、松本充弘、土井正男
(名大人間情報) 吉川研一

DYNAMICS OF LARGE DNA DURING NON-STEADY FIELD GEL ELECTROPHORESIS

Yuichi Masubuchi, Hidehiro Oana, Mitsuhiro Matsumoto, Masao Doi and *Kenichi Yoshikawa

School of Engineering and *Graduate School of Human Informatics,

Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan

Phone: 81-52-789-3720 FAX: 81-52-789-3719 E-Mail: g44391a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp

In order to expose the mechanism of the anti-resonance phenomenon, direct and real time observation of DNA molecule using fluorescence microscopy was carried out near the anti-resonance condition in this study. The results show that DNA migrates with shrink-elongation motion and that the average velocity is closely related to this motion. Under the anti-resonance condition, this shrink-elongation motion is reduced due to some coupling with the field fluctuation and causes the velocity reduction. To explain these results, we contrive the 'hernias' mechanism.

(序)

定常電場ゲル電気泳動では分離できない数十kbp以上の長鎖DNAを分離するためにパルスフィールドゲル電気泳動法が広く用いられている。しかし定常電場におけるOgstonモデルやレプテーションモデルのようなDNAの泳動挙動を予見する理論はない。パルスフィールド下のDNAの泳動速度は電場の変動周波数で複雑に変化し、ある周波数の電場下では極小となることが知られている。この現象をアンチレゾナンス現象とよぶ。アンチレゾナンス現象の機構を調べるのがパルスフィールド法によるDNAの分離メカニズムを調べることになるため盛んに研究されているが、いまだよく分かっていない。

(実験方法)

我々は高分子物理の観点からDNA分子のダイナミクスを研究している。DNAは特異的に結合する蛍光色素を用いて視覚化することが可能で、水溶液中のDNA分子の一分子毎の挙動をリアルタイムで観察できる。これをもちいてアガロースゲル中で小高・四方¹⁾によって開発されたバイアス正弦電場ゲル電気泳動中のT4DNA分子(166kbp)の挙動を観察し、画像解析によって定量的に解析した。

(実験結果)

定常電場ゲル電気泳動中の巨大DNA分子は周期的に伸縮しながら泳動する様子が観察された(図1)。パルスフィールドの下ではこのDNAの伸縮と電場の変動が何らかのカップリングを起こすのではないかと考えられてきた。このことがアンチレゾナンス(反共鳴)という名前の由来である。更に委細に解析した結果、DNAの伸縮運動の周期はゲルの濃度、電場の強度に依存して変化することがわかった²⁾。電場

強度を上げるほど、ゲルの濃度を薄くするほど伸縮の周期は早くなる。この挙動にはゲルの空間構造やDNAの物性が重要なパラメーターであることは確かだが、簡単には説明できない。実験条件でのアガロースゲルの平均網目サイズは数百オングストロームと考えられており、DNAの伸縮運動のスケールに比べて非常に小さい。また、溶液中でのDNAの回転緩和時間は数十秒のオーダーで、これは運動の周期に比べて十倍程度遅い。

バイアス正弦電場ゲル電気泳動の下ではDNA分子は電場の周波数によって挙動が複雑に変化する。泳動速度が極小の、アンチレゾナンス条件のDNA分子の挙動を示す(図2)。DNA分子の定常電場の下で見られた伸縮運動が起きず、中間的な状態のまま泳動している様子が観察される。アンチレゾナンス条件よりも早い変動周期の電場をかけても、遅い変動周期の電場をかけても、DNA分子の伸縮運動は起こっている様子を観察した。

この現象は、Ogstonモデルやレプテーションモデルでは説明できない。我々は従来考えられなかったDNA上の弛みが泳動速度に影響すると考え、マルチハンギングモデルを考案した。DNA分子が多くのゲル繊維に引っかかり、たくさんの弛みが生じて、この弛みが電場で引っ張られて外れていく過程がDNAの泳動挙動であると考ええる。このモデルは定常電場におけるDNAの形態変化、および非定常電場の下でのDNAの振る舞いを定性的に説明できる。

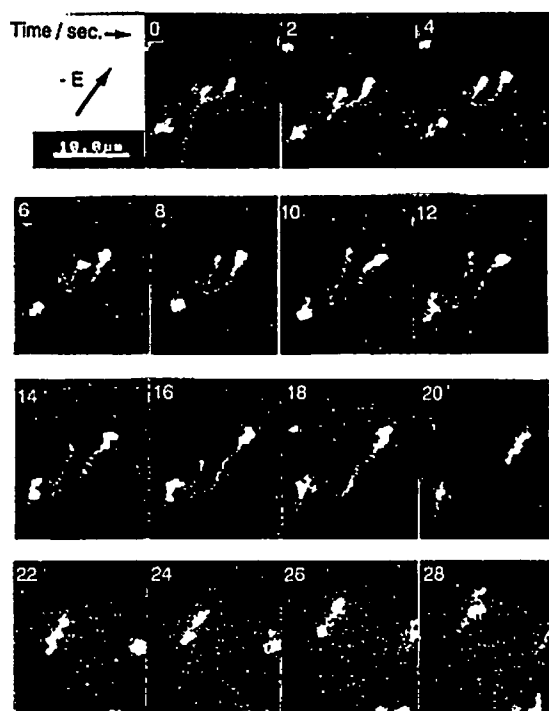


Fig.1 A series of fluorescence images of a DNA molecule during steady field gel electrophoresis.

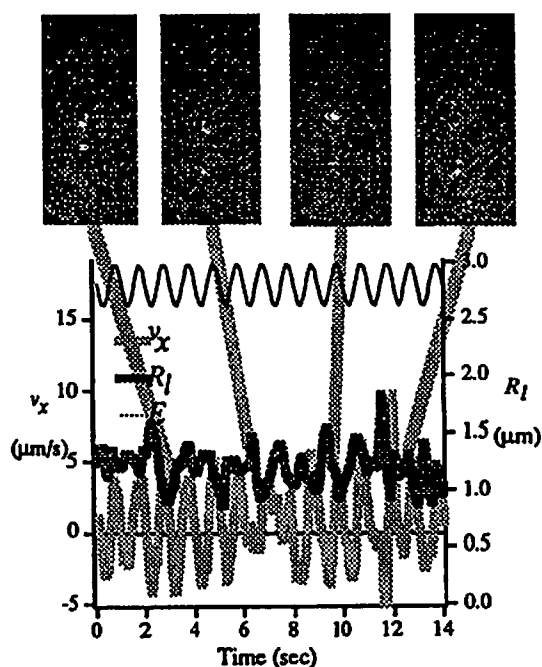


Fig.2 Dynamics of a DNA molecule during biased sinusoidal field gel electrophoresis.

参考文献

- (1) T. Shikata and T. Kotaka: *Macromolecules* Vol. 24 (1991) 4868.
- (2) Y. Masubuchi, H. Oana, K. Ono, M. Matsumoto, M. Doi, K. Minaga, Y. Matsuzawa and K. Yoshikawa: *Macromolecules* Vol. 26 (1993) 5269.

低分子キャピラリー電気泳動： DNA断片とポリスチレンスルフォネート

(大阪大学蛋白質研究所) ○金 中朝、高木 俊夫；(ウプサラ大学生化学教室)
タサニー・シーチャイヨー、シュテラン・ヤティーン

CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE PRESENCE OF OLIGOMER: DNA FRAGMENTS AND POLYSTYRENE SULFONATE

Kim Jyungio*, Tasanee Srichario**, Stellan Hjertén**, Toshio Takagi* (* Institute for Protein Research, Osaka University; ** Institute of Biochemistry, Uppsala University)

Separation efficiency of concentrated solution of dextran preparations with molecular weight of the order of thousand was studied for DNA fragments and polystyrene sulfonates with defined molecular weight and narrow distribution. Separation was observed for a DNA fragment mixture giving 10 bps ladder, but was not for that giving 1 kbps ladder. For polystyrene sulfonate, separation was again observed only for samples with small molecular weight such as 2K and 4K. The separation is thus not specific to proteins in the presence of SDS, but not so practical for the samples studied here. The mechanism of separation must be figured out taking care of such generality of the phenomenon.

【はじめに】 先立つ講演で述べたように、SDS存在下において10%程度の低分子デキストラン溶液を媒体として用いると、キャピラリー電気泳動によって蛋白質をサイズに依存して分離することができる。この分離媒体中において、本来の高分子電解質であるDNAフラグメントそしてポリスチレンスルフォン酸塩が、どのような電気泳動挙動を示すかを検討した。

【実験】 DNA断片についての実験は10bpsあるいは1Kbps DNAラダー (Life Technologies, Co.) を試料として用い (導入: 100V/cm、3秒)、10%デキストラン [D-1: MW、1,080あるいはD-5: MW、4,440] を含む89mM Tris-CHES、pH8.8、緩衝液を吸引により導入して媒体とし、大塚電子 (株) 製のCAPI-3000電気泳動装置 (キャピラリー: i.d./o.d.=100/375 μ m; 実長/有効長=45/37.5cm) を用い、電場強度 222 V/cm (16~20 μ A)、25℃で行った。検出は260nmにおける吸光度検出によった。供給原液 (10bps: 1 μ g/ μ l; 10Kbps: 0.2~1.2 μ g/ μ l) を試料とした。

ポリスチレンスルフォン酸ナトリウム (導入: 137V/cm、3秒) についての実験は狭い分子量分布を有する標準品 (American Polymer Standards Co.: 重量平均 MW、2、4、7、30、200K) を用い、上記と同一のデキストランを含む80mM Tris-CHES、pH8.6、緩衝液を媒体として、HjerténがLKB/Pharmacia 吸光度検出器を改造して製作した自家製電気泳動装置 (キャピラリー: i.d./o.d.=50/140 μ m; 実長/有効長=14.5/10.3cm) を用い、137V/cm (約1 μ A)、25℃で行った。検出は210nmにおける吸光度検出によったので、導入した試料濃度は0.1mg/mlを下回った。

【結果】 DNA断片に関しては10%デキストランは、1Kbps DNAラダーには分離能を示さなかった。しかし、10bpsラダーに関しては、試料は図1に一例を示すように、緩衝液のみの場合は1本のピークであるが、10%デキストラン(D-1)存在下では不十分であるが3本のピークを与えた。

ポリスチレンスルホン酸ナトリウム(以下、PSSと略す)については、より詳細な検討を行った。

1) PSSはデキストランを欠く媒体中においても、標品によって保持時間が異なり、分子量が低いほど電気泳動移動度が増大する傾向が認められた。この差異は恐らくスルホン化度の差異に帰因できるものではなく、低分子量域での“素抜け挙動”からの逸脱を示すものであろう。

2) 分子量が2Kと4KのPSSは、図2に示すように10%のD-1存在下において少なくとも2本の主要ピークを与えることが観察されたが、7Kでは分離の兆候のみ、さらに高分子量のものについては全く分離の兆候は認められなかった。

【考察】 上記のように、我々がSDS-蛋白質ポリペプチド複合体について見出した濃厚なオリゴマーデキストランによるサイズ依存の分離は、決して複合体にのみ見出される特殊な現象ではなく、フレキシブルな高分子電解質に一般的に認められるものであることが明らかになった。これらの対象についての検討を並行して進めることによって、この現象の起因の検討が容易になると期待される。

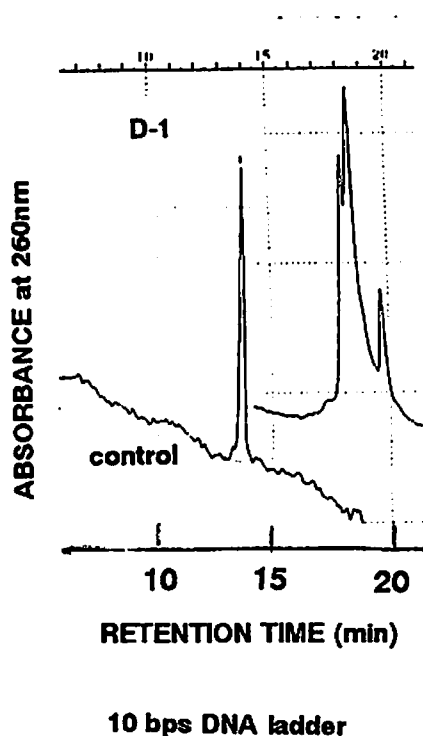
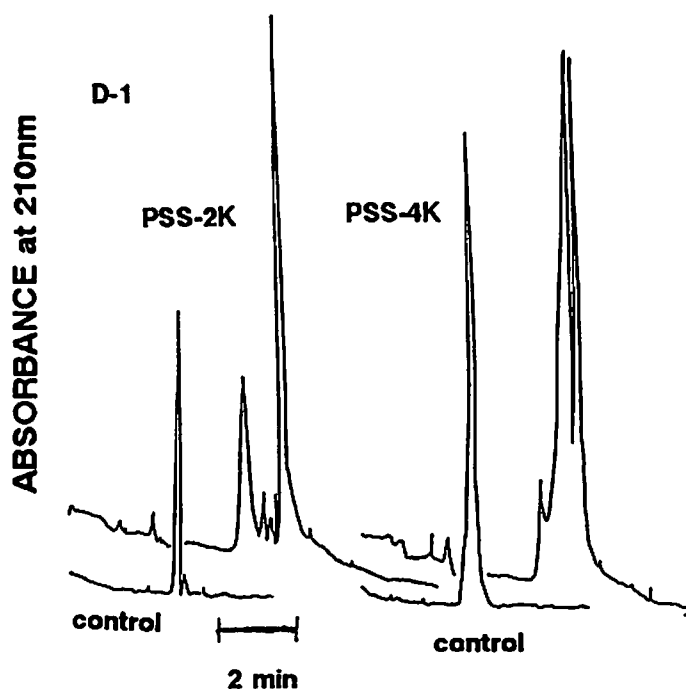


Fig.1



Polystyrene sulfonate with narrow molecular weight distribution

Fig.2

(日立中研)釜堀政男

Mobility of DNA fragments in capillary gel electrophoresis

Masao Kamahori

Central Research Laboratory, Hitachi Ltd.

Summary

The mobility of DNA fragments in capillary gel electrophoresis was studied experimentally and theoretically. Effects of etidium bromide in the gel and the cross-linker concentration (0.5-5.0%C) on the mobility were investigated. The experimental results were analyzed with the high-field biased reptation model. The predicted mobility by the theoretical equation fitted the experimental one quite well. According to the analysis, it was found that the intercalation of etidium bromide to DNA fragments resulted in 35% elongation of DNA fragments, which led to the decrease of the effective charge per pore. The decrease of %C led to the increment of the elongation effect.

＜緒言＞キャピラリーゲル電気泳動法(CGE)は、高速・高分離能の特徴を有し、DNAの分析技術として重要になってきている。しかし、CGEにおけるDNA断片の分離メカニズムは明らかではない。そこで本研究では、キャピラリーゲル電気泳動法におけるDNA断片の移動度をレプテイションモデルから導いた理論式を用いて考察した。その際、理論式に温度の項を導入しジュール熱の影響を考慮した。さらに、エチジウムブロマイド(EB)、及び架橋剤濃度(%C)の移動度への影響を本理論式を用いて解析し、DNA断片の有効電荷、及び分子配向効果(比電界強度)を定量的に求めた。

＜実験＞キャピラリーゲル電気泳動は、75 μ m I.D.(375 μ m O.D.)のフューズドシリカキャピラリーを用いた(印加電圧100-300V/cm)。EBの実験では、EB(1.0 μ g/ml)をバッファーに添加して電気泳動を行った。その際のゲル濃度は3%T、0.5-5.0%Cを用いた。サンプルは、 ϕ X174-DNAの制限酵素Hae III分解物を使用した。なお、実験結果の解析には234塩基対から1353塩基対までのデータを使用した。

＜結果・考察＞DNA断片の移動度は、EB存在下で15-20%小さくなった。また、%Cの低下(5 $\rightarrow$ 0.5%)により、移動度は約10%大きくなった。これらの実験結果は、高印加電圧の影響を考慮したレプテイションモデルから導いた理論式を用いて解析を行った。その際、理論式には温度の項を導入した(式1)。キャピラリー内の温度変化は、主に高印加電圧により発生するジュール熱によるものであり、熱伝導方程式(式2)を解くこ

とにより求めた。実験結果は、キャピラリー内の温度変化を考慮した本理論式と良く一致した(Fig.1)。

$$\mu = \mu_0(T) \left\{ \frac{\langle \ell \rangle}{N} \left(\frac{1}{E'^2} - \frac{1}{\sinh^2(E')} \right) + \left(\coth(E') - \frac{1}{E'} \right)^2 \right\} \quad (1)$$

ここで, $E' = \frac{qEa}{2k_B T}$

μ ; DNA断片の移動度, $\mu_0(T)$; 温度Tにおける溶液中のDNA断片の移動度,

$\langle \ell \rangle$; 一つのゲルポア中のDNA断片長, N ; DNAの長さにそった断片長

(単位, bps), q ; 一つのゲルポア中のDNA断片の電荷, E ; 印加電圧,

a ; ゲルポア サイズ, k_B ; ボルツマン定数, T ; 温度

$$T = \frac{Gr_1^2}{4k_1} + \frac{Gr_1^2}{2} \left\{ \frac{1}{k_2} \ln \left(\frac{r_2}{r_1} \right) + \frac{1}{k_3} \ln \left(\frac{r_3}{r_2} \right) + \frac{1}{r_3 h} \right\} + T_a \quad (2)$$

T ; ゲル中心の温度, G ; ゲル内の発熱量, k_1 ; ゲル(溶液)の熱伝導率,

k_2 ; フェーズドシリカの熱伝導率, k_3 ; ポリイミドの熱伝導率, r_1 ; キャピラ

リーの内半径, r_2 ; キャピラリーの外半径(ポリイミド無), r_3 ; キャピラリーの

外半径(ポリイミド有), h ; 熱伝達係数, T_a ; キャピラリー周囲の温度

理論解析の結果, EBによるインターカレーションは, DNA断片の伸長(約35%), 及び分子配向効果(比電界強度)の減少を伴い, 移動度を減少させていることが分かった。その際の一塩基あたりの有効電荷は, 約0.9e/bpであった。また, %Cの減少(5→0.5%)により分子配向効果(比電界強度)は増加し, DNA断片が伸長し易くなっていた。

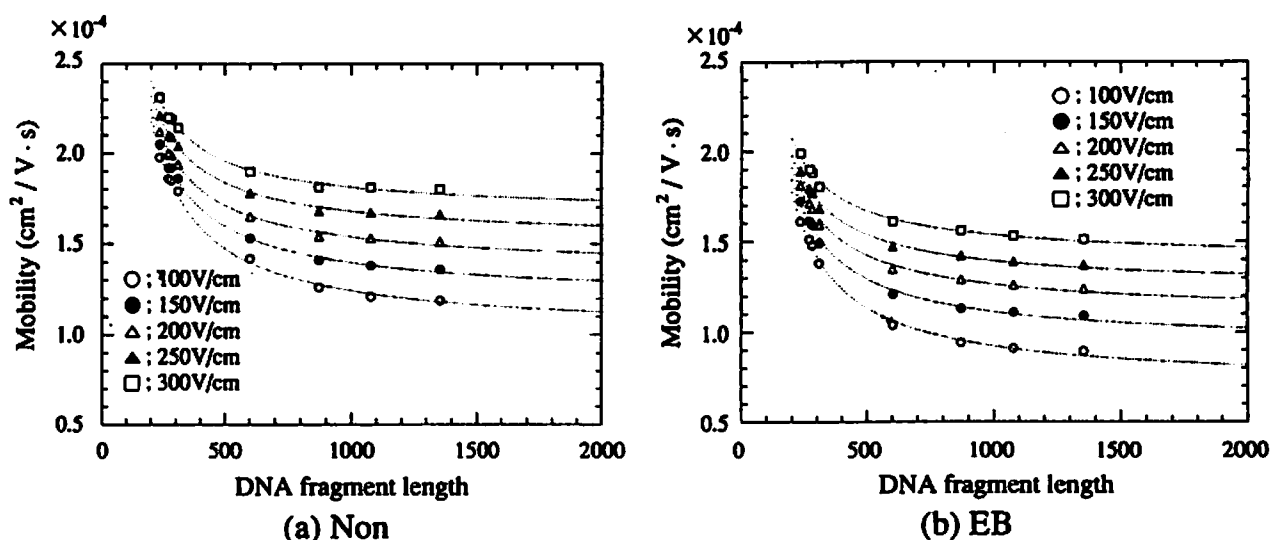


Fig.1 Mobility of DNA fragments

キャピラリー電気泳動—レーザー蛍光検出 によるヒトゲノムの解析

(神戸薬大) ○富崎理代、馬場嘉信、津波古充朝 (阪大細胞生体工学セ) 大久保公策、松原謙一 (東大医科研) 服部正平、榊佳之 (日立中研) 高橋智、神原秀記

Human Genome Analysis Using Capillary Electrophoresis Equipped with Laser-Induced Fluorescence Detector

Riyo Tomisaki¹, Yoshinobu Baba¹, Mitsutomo Tsuhako¹, Kousaku Okubo², Kenichi Matsubara², Masahira Hattori³, Yoshiyuki Sakaki³, Satoshi Takahashi⁴, and Hideki Kambara⁴

¹Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, Kobe 658, Japan and ²Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University, Yamada-oka, Suita, Osaka 565, Japan and ³Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Shirogane-dai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan and ⁴Central Research Laboratory, Hitachi Ltd., Higashi-Koigakubo, Kokubunji, Tokyo 185, Japan

The present DNA sequencing technology is insufficient to permit sequencing on the human genome, consisting of about 3 billion bases, at a reasonable speed. The Human Genome Project therefore requires the development of DNA sequencing methodologies with higher throughputs. Capillary electrophoresis (CE) is becoming an important tool for DNA sequencing with high speed and high resolution. In this study, we studied the optimization of separation conditions for high speed DNA sequencing using capillary electrophoresis equipped with laser-induced fluorescence detector.

はじめに

30億塩基対もの膨大な情報を有するヒト・ゲノムを解析するためには、現在のスラブゲル電気泳動を用いたDNAシーケンサーに替わる、より高性能な新規のDNA解析装置が必要である。キャピラリー電気泳動は、その著しい分析速度および解析能力の高さから、ヒト・ゲノム解析における高速DNAシーケンシングなどへの応用が期待されている^{1),2)}。キャピラリー電気泳動によってDNAシーケンシングの高速化を実現するためには、シーケンシング反応生成物の高速分離を達成する必要があるが、これまでに報告されたなかで最も高速化した例でも30分で300塩基程度を解析しているに過ぎず、巨大なヒトゲノムDNAの全塩基配列を決定するには不十分である。本研究では、我々の開発したキャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出装置を用いて、シーケンシング反応生成物の高速分離を達成するための条件のついて検討した³⁻⁶⁾。

実験

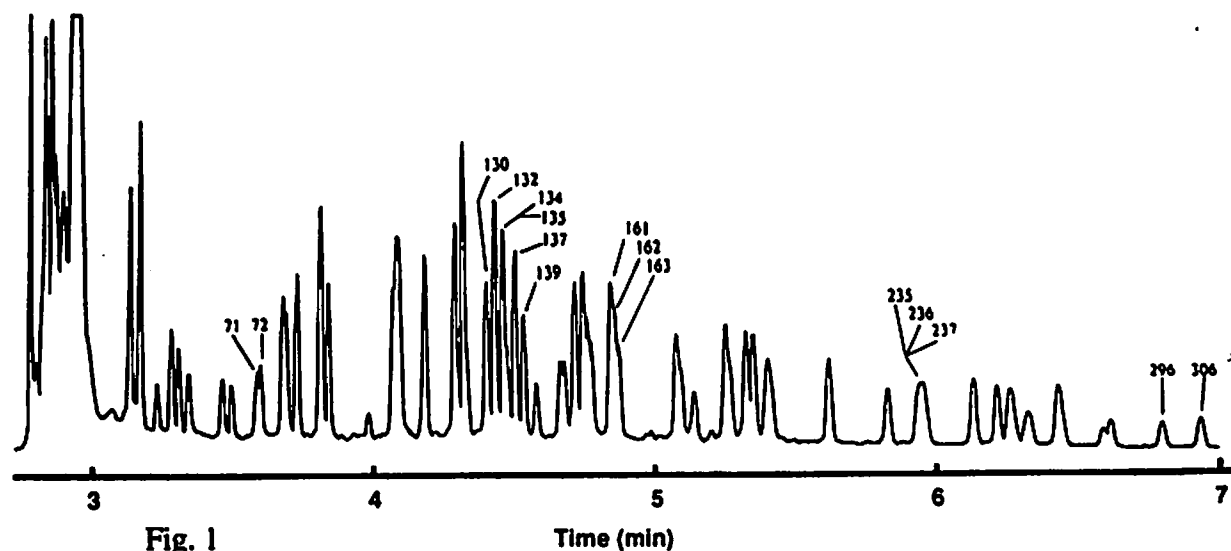
DNAシーケンシング反応生成物はM13mp18DNAをテンプレートとし、市販のDye Primer Cycle Sequencing kitにより生成したものをエタノール沈殿し、脱イオンホルムアミドに溶かして用いた。DNAの分離には、ポリアクリルアミドゲルあるいは非架橋ポリアクリルアミドを充填したキャピラリーを用いた。装置はHEWLETT PACKARD製

HP^{3D}CEおよび我々が開発したキャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出装置⁵⁾を使用し、サンプルは90℃で2分間熱変性を行った後、電気泳動的に注入した。

結果と考察

高速DNAシーケンシングを達成するために、ゲル濃度(3~6%T)、架橋度(0~5%C)、電場(200~414 V/cm)、キャピラリー有効長(15.3~36.3 cm)をそれぞれ変化させてDNAシーケンシング反応生成物の分離を行い、これらの条件が分離に及ぼす影響について検討した。Fig. 1に分離の一例を示す。これは、ゲル濃度3%T、架橋度5%C、電場414 V/cm、キャピラリー有効長15.3 cmの条件で塩基Aで終結したシーケンシング反応生成物の分離を行った時のものである。、150塩基までのDNAフラグメントをほぼ完全に分離し、しかも300塩基程度の解析が7分以内で終了した。これは従来のスラブゲル電気泳動によるシーケンシングより15~30倍、今までに報告されたキャピラリー電気泳動によるシーケンシングとの比較でも5~10倍の高速化を達成している^{1), 2), 5), 6)}。他の条件でも検討した結果、ゲル濃度が小さいほど高速化が達成できるが、分解能は低下した。また、分離速度は電場に比例し、キャピラリー有効長に反比例したが、これらのパラメータは測定範囲内で分解能にほとんど影響を及ぼさなかった。これらの検討により、分解能を低下させずにDNAシーケンシングを高速化するには、比較的高いゲル濃度を用い、高電圧で短いキャピラリーを用いる必要があることがわかった。

以上のように、分離条件の最適化によりDNAシーケンシングの大幅な高速化を実現した。



文献

- 1) 馬場嘉信、化学と工業、47, 148 (1994).
- 2) 馬場嘉信、Dojin News, 71, 8 (1994).
- 3) Y. Baba et al., Trends Anal. Chem., 11, 280 (1992).
- 4) Y. Baba et al., Anal. Chem., 64, 1221 (1992).
- 5) R. Tomisaki et al., Anal. Sci., 10, in press (1994).
- 6) 富崎理代 他、分析化学, 44, in press (1995).

キャピラリー電気泳動によるPCR生成物の分析と
その遺伝子診断への応用

(昭和大学薬学部) ○荒川秀俊 前田昌子 辻 章夫

ANALYSIS OF PCR PRODUCTS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS
AND ITS APPLICATION TO DNA DIAGNOSIS.Hidetoshi Arakawa, Masako Maeda, Akio Tsuji

School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

Capillary electrophoresis (CE) was studied for the analysis of PCR amplified sample. A low-cross linked polyacrylamide gel was used for CE. Laser induced fluorescence (LIF) detection was performed using Thiazole orange as the fluorescent intercalating dye. The highly sensitive LIF-CE was applied to detection of allele specific PCR for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency. Analysis of single strand conformation polymorphism (SSCP) by CE was also developed. The conformational change of the single strand DNA is caused by a mutation in DNA fragment. The change is detected as mobility shift on CE. The effects of acrylamide gel concentration, running-temperature and fragment size amplified by PCR were studied to develop the separation of SSCP. The results obtained in this report showed that CE is well suited for clinical DNA analysis using PCR.

【はじめに】

PCR (Polymerase chain reaction) を利用する遺伝子の点突然変異検出はプライマーの3' 末端の特異性を利用するAllele specific PCR、制限酵素の切断の有無により判定するPCR-RFLP、DNA-プローブとのhybridizationを用いたAllele specific hybridization法がある。これら分析法の検出は生成する2本鎖DNA断片の大きさから判定され、容易に変異塩基を特定することができる。一方、1本鎖DNAの高次構造多型による電気泳動の易動度の差から判定するSSCP(single strand conformation polymorphism) はPCR生成物中の変異塩基を検出することができるため、現在遺伝子のスクリーニング法として用いられている。本研究ではこれらPCRを利用する方法の検出法として、迅速で高い分離能を有するキャピラリー電気泳動の適用を検討した。

【方法】キャピラリー電気泳動装置：ABI社製270A及びBeckman 社製 P/ACE2100 と Laser Module 488を用いた。

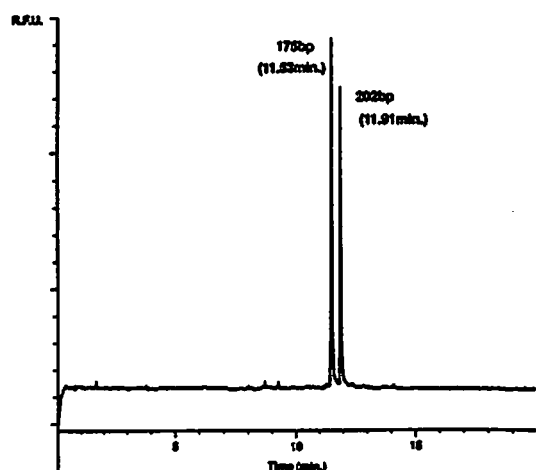
Allele specific PCR： 脂肪酸代謝異常症のひとつである中鎖アシルCoA脱水素酵素欠損症(MCAD)について検討した。MCAD遺伝子中の一塩基変異 (A⁹⁸⁵ to G⁹⁸⁵) は二つのプライマーセットのPCRにより判定される。正常遺伝子に反応するプライマーはM31 (センス側) とM34 (アンチ側) の組み合わせ (202bpの生成物)、変異遺伝子に対するプライマーはM32とM19の組み合わせを用いた (175bpの生成物)。一つの試料に対しそれぞれ正常及び変異遺伝子用のプライマーを用いてPCRを行う。次いで得られた二つのPCR生成物を合わせCEの試料とする。CEはフューズドシリカタイプ 37cm x 100μm I.D.(ジーエルサイエンス社)のキャピラリーを用い、ゲル濃

度3%T、0.5%C、泳動溶液0.1 μ g/ml Thiazole Orange を含む0.1M Tris-Borate-2mM EDTA(pH 8.3)を用いて、7.4kV、30°Cで泳動を行った。検出はレーザー蛍光検出器(Ex 488nm、Em 530nm)を用いた。

CEによるSSCPの解析：一塩基変異を有するモデルDNAとして、divE42遺伝子を用いた。PCR：一塩基変異を含むようにプライマーを設定しPCRを行い、59bpと359bpの生成物を調製した。SSCP：PCR生成物は99°Cで6分間加熱、次いで氷中で6分間冷却した後、次のCEにより解析する。ゲル濃度8%T、0%C、泳動溶液 0.1M Tris-Borate-2mM EDTA(pH 8.3)を用い、10kv、25°Cで泳動を行った。検出は260nmでの紫外吸収で行った。

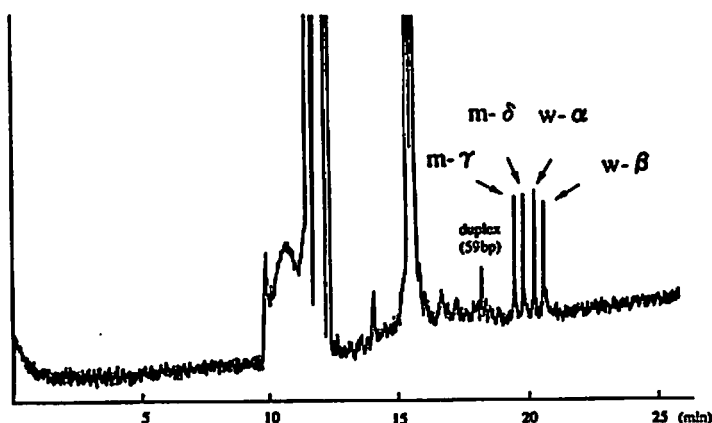
【結果と考察】PCRは短時間にかつ特異的に微量のDNAを百万倍まで増幅することが可能である。増幅された生成物は主に2本鎖DNA 60bp~1000bpであるため、まずCEにおける2本鎖DNAの分離を試みた。分離法としてはキャピラリーにポリアクリルアミドゲルを充填する方法で行った。この方法による分離は2本鎖DNA断片の数bpの差の違いも検出可能で、かつ精度(R.S.D)も0.55% (n=10) と良好であった。検出は泳動溶液にインターカレーション試薬を用いたレーザー蛍光検出で行った。この方法は紫外吸収の感度より約100倍高く、微量のヒト血液試料のPCR分析も可能であった。以上の方法はMCADの遺伝子診断の検出に応用した。Fig.1は保因者であるヘテロ接合子の検体からの結果である。正常(202bp)と変異遺伝子(175bp)を容易に鑑別できた。次に、SSCPの解析について検討した。一塩基変異の検出能におけるゲル濃度、泳動温度、さらにPCRにより生成するDNAサイズによる影響について検討した。その結果はゲル濃度8%、分離温度20°Cないし25°C、生成物のサイズ59bpで検出能は高かった。Fig.2にdivE42 gene (59bp) の正常(Wild: w- α , w- β)と変異型 (Mutant: m- γ , m- δ) の分離例を示す。その結果は一塩基変異をわずか25分で検出できた。この様にCEによるPCR生成物の解析は、従来型の電気泳動より迅速で再現性も高かつ高分解能であった。特にSSCPのような厳密な条件下高い分離能を必要とする分析には、CEがより有用であることが判った。

Fig. 1



Electropherogram of allele specific PCR product

Fig. 2



Electropherogram of SSCP (59 base)

キャピラリー電気泳動—レーザー蛍光検出による成人病（アルツハイマー型痴呆症）の遺伝子診断

（神戸薬大）○角田ちぬよ、馬場嘉信、津波古充朝（阪大医）三木哲郎、荻原俊男（大塚電子）辻尾典男、新田哲士、笹川秀男

Gene Diagnosis of Common Disease (Alzheimer's Disease) Using Capillary Electrophoresis Equipped with Laser-Induced Fluorescence Detector

Chinuyo Sumita¹, Yoshinobu Baba¹, Mitsutomo Tsuhako¹, Tetsuro Miki², Toshio Ogihara², Michio Tsujio³, Satoshi Nitta³, and Hideo Sasagawa³

¹Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, Motoyama, Kitamachi, Higashinada, Kobe 658, Japan, ²Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan and ³Otsuka Electronics Co. Ltd., Shodaitajika, Hirakata, Osaka 573, Japan

Capillary electrophoresis (CE) in entangled polymer solution have been investigated as an efficient technology for DNA analysis. In this study, we apply CE with laser-induced fluorescence detector to gene diagnosis of Alzheimer's disease through human apolipoprotein E (ApoE) genotyping. Since in general the human genetic samples are very low concentration even if it's amplified by PCR, it's necessary to improve the sensitivity of gene. We, therefore, developed multicolor detectable laser-induced fluorescence detector for capillary electrophoretic gene diagnosis.

はじめに

ヒト、ゲノム解析計画の進展に伴い様々な疾患の原因遺伝子が発見されてきている。これらの原因遺伝子を解析することは、疾患の診断だけでなく病気の予防や治療の可能性を大きく広げるものとなる。そこで本研究においてはRFLP法 (restriction fragment length polymorphism) による成人病（アルツハイマー型痴呆症）の遺伝子診断を目的とした基礎的実験を行った。アルツハイマー型痴呆症の原因遺伝子としては最近、アポリポ蛋白E (ApoE) 遺伝子が注目されている。このApoEはイソ蛋白として、E2, E3, E4 が知られており特にE4を受け継いだ場合アルツハイマー型痴呆症の発症の危険率が高くなることが報告された。そこでこのApoE 遺伝子多型を解析することにより痴呆症の診断が可能となる。分析方法としてはポリマー溶液を充填したキャピラリー電気泳動法^{(1)~(6)}を、またDNA検出法としては紫外吸収法とアルゴンレーザーを用いたレーザー誘起蛍光検出法の2種を比較検討した。

実験

キャピラリー電気泳動装置は、ABI製270Aと我々が開発したキャピラリー電気泳動—レーザー蛍光検出システムを使用した。キャピラリーはJ&W社のDB-17にセルロース誘導体溶液あるいはさらに各種インターカレートダイを加えた溶液を充填して用いた。サ

ンプルは市販のDNAマーカーおよびヒトゲノム由来のApoE遺伝子をPCR法を用いて増幅させ、制限酵素(*Hha* I)で切断したものを使用した。サンプルは電氣的に注入した。緩衝液はトリス-ホウ酸溶液を用いた。

結果と考察

ApoE遺伝子を制限酵素*Hha* I (GCGC)で切断するとApoE2, E3, E4 遺伝子がそれぞれ19～91塩基対の長さのフラグメントを生成するが、E4 の場合は特に19と72塩基対の特異な塩基対を生成する。実際には、100塩基対までのDNAフラグメントを、ほぼ10塩基対の差で分離できなければならない。この条件を満たすために、キャピラリー内に充填する溶液はトリス-ホウ酸バッファーに0.7%の割合でメチルセルロースを溶解させた液またはそれにさらにエチジウムブロマイド、TOTO-1、YOPRO-1などの各種インターカレートダイを加えた試薬を用いた。これらのインターカレートダイは分離能を上げるためとレーザー蛍光による検出を可能にするために添加した。

遺伝子診断をするには分離能だけでなく、ごく希薄なサンプルの検出が要求され、検

出感度の向上が必要となる。そこで市販のDNAマーカーをサンプルとして、今迄行ってきたDNAの紫外吸収による検出法とレーザー蛍光検出法の比較を行った。その結果、インターカレートダイとしてエチジウムブロマイドを使用した場合紫外吸収検出法よりレーザー蛍光検出の方が約2倍に希釈したサンプルでも検出が可能であり、YOPRO-1を使用した場合は紫外吸収に比べ約7倍までサンプルを希釈しても検出が可能であった。そこでヒトゲノム由来のApoE遺伝子のRFLP解析をYOPRO-1を用いて行ったところ、短時間かつ高感度で分析が可能であった。このApoE遺伝子の多型解析により、アルツハイマー型痴呆症の遺伝子診断が可能となった。

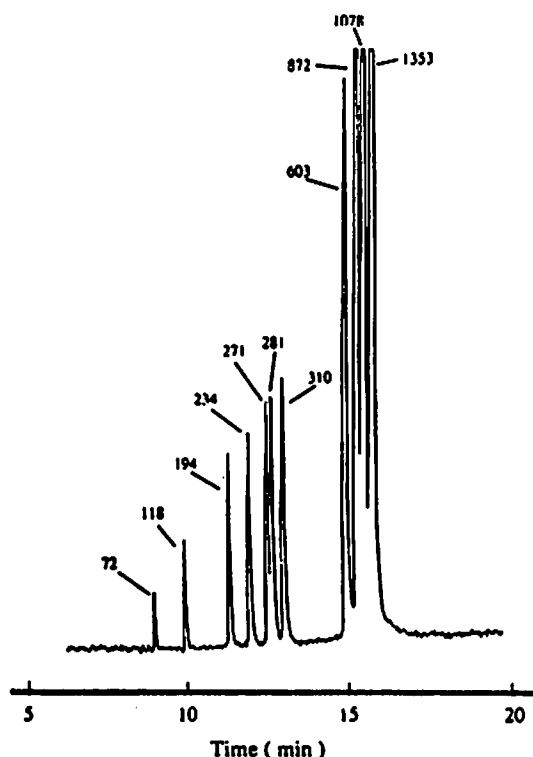


Fig.1 CE separation of ϕ X174 DNA - *Hae*III digest (1 ng/ μ L) with laser-induced fluorescence detector

文献

- 1) 馬場嘉信、臨床化学, 22, 209 (1993).
- 2) Y. Baba, *J. Chromatogr.*, 618, 41 (1993).
- 3) 馬場嘉信、蛋白質・核酸・酵素, 38, 2243 (1993).
- 4) Y. Baba et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 16, 955 (1993).
- 5) C. Sumita et al., *J. Chromatogr.*, 661, 297 (1994).

キャピラリーアフィニティーゲル電気泳動によるがん抑制遺伝子の変異点検出

(神戸薬大) ○井上秀子、馬場嘉信、津波古充朝、
(鹿児島大 工) 明石満

Direct Detection of Point Mutation on Tumor Suppressor Gene Using Capillary Affinity Gel Electrophoresis

Hideko Inoue¹, Yoshinobu Baba¹, Mitsutomo Tsuhako¹, and Mitsuru Akashi²

¹Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, Kobe 658, Japan and

²Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890, Japan

We developed capillary affinity gel electrophoresis (CAGE) by the combination of the high resolving power of CGE and high specificity of bioaffinity ligand. Biospecific separation in CAGE is based on a change in electrophoretic mobility of the analyte caused by some biospecific interaction between the analyte and the affinity ligands. In this study, we demonstrate that CAGE is effective for the direct detection of point mutation on the tumor suppressor gene with high efficiencies, as a new technology for the gene diagnosis.

はじめに

がん抑制遺伝子の発見は発がんのメカニズム解明に大いに貢献した。特にp53と呼ばれるがん抑制遺伝子は大腸がんをはじめ、ほとんどのがん細胞において変異が認められている。つまり遺伝子DNA上のたった一つの塩基が置換することによりがん抑制遺伝子が不活化し、がん化が引き起こされる。このような変異を検出することは病気の早期発見、効果的な治療という面で重要な技術となってきた。点突然変異DNAの検出としてはSSCP(single strand conformation polymorphism)法が用いられているが、当研究室においては新しくDNAの塩基配列を認識できるリガンドを利用したキャピラリーアフィニティーゲル電気泳動(CAGE)を開発した。本研究ではこのCAGEにより一塩基あるいは二塩基の変異点をもつがん抑制遺伝子の変異点を検出し、分離条件の最適化についても検討した。

実験

キャピラリー電気泳動の装置は、ウォーターズ製Quanta 4000E、ベックマン製P/ACE-2050を使用した。キャピラリーには、アフィニティーリガンドとしてポリビニルアデニンを非架橋ポリアクリルアミドに添加した溶液を充填した。サンプルは、合成オリゴデオキシヌクレオチド、ファルマシア製ホモポリヌクレオチドを用い、キャピラリー中に電気的に注入した。緩衝液は、トリス-ホウ酸を用いた。

結果と考察

アフィニティー電気泳動とは、ゲル中のリガンドと電気泳動されるサンプルとの間にある種のbiospecificな相互作用が生じるような技術である。従ってこの相互作用が物質によって異なるため分離が達成される。我々が用いたリガンドは合成核酸アナログのポリビニルアデニン(PVAd)である。PVAdはポリアデニル酸(polyA)と類似の機能を有するため、チミジル酸を有するオリゴデオキシヌクレオチドと特異的に相互作用することが容易に考えられる。変異点を有するDNAのモデルとして、塩基組成が同じで塩基配列のみが異なるシーケンスアイソマー(TTTATT, TTTTAT, TTTTAA, TTTTTT)を用い、CAGEで分離を行ったところこれら四種類のアイソマーを完全に分離することができた^{1,2)}。以上のことをふまえ、がん抑制遺伝子であるp53遺伝子の正常型と248番のコドンおよび249番コドンが一塩基あるいは二塩基置換された三種類の変異型の部分配列を有する15塩基のDNAを合成し、その解析を試みた。

Fig. 1に正常型および249番目のコドンが一塩基置換された変異型の分離を示す。PVAdを用いたCAGEによりたった一塩基の違いでも分離された。分離に影響する因子としてはキャピラリーカラムの温度³⁾、緩衝液の尿素濃度⁴⁾、アフィニティーリガンドの濃度⁵⁾が考えられる。そこで分離条件を検討したところ、尿素濃度は0.2 M、温度は25℃、リガンドの濃度は0.1%以下がよいことがわかった。また、アフィニティーリガンドとオリゴデオキシヌクレオチドとの間の見かけの会合定数を計算し、相互作用の強さを評価した⁵⁾。その結果チミジル酸(T)を多く含むものの値が大きいことがわかった。

このことは全TユニットがPVAd-オリゴヌクレオチド複合体の安定化に大きく影響することを示唆している。

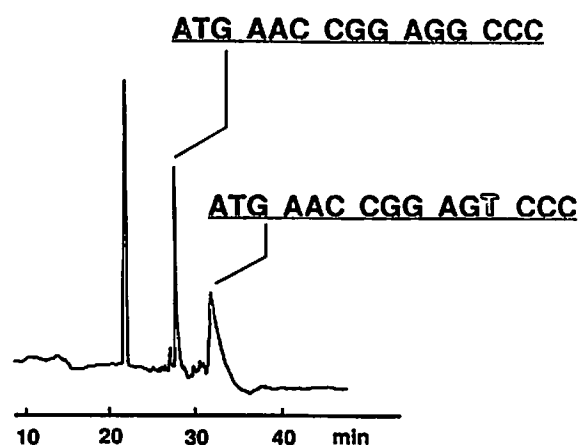


Fig. 1 Detection of point mutation on tumor suppressor gene by capillary affinity gel electrophoresis.

文献

- 1) 馬場嘉信、ぶんせき、1993(11), 861.
- 2) Y. Baba, et al., *Anal. Chem.*, 64, 1920(1992).
- 3) Y. Baba et al., *J. Chromatogr.*, 632, 137(1993).
- 4) Y. Baba et al., *J. Chromatogr.*, 652, 93 (1993).
- 5) Y. Baba et al., *Anal. Sci.*, 11, in press (1995).

Genetic Instability の解析および癌の遺伝子 診断への応用

○大藤道衛^{1,2}, 末広健³, 秋山好光², 湯浅保仁²

(¹東京テクニカレッジ・バイオ, ²東京医歯大・医・衛生,

³日本バイオラッド)

Analysis of Genetic Instability using Capillary Electrophoresis and the Application to DNA Diagnosis of Cancer

○Michiei Oto^{1,2}, Takeshi Suehiro³, Yoshimitu Akiyama², Yasuhito Yuasa²

(¹Dept. of Biotechnology, Tokyo Technical College, ²Dept of Hygiene and Oncology,
Tokyo Medical and Dental University School of Medicine, ³Nippon Bio-Rad
Laboratories)

For easy and rapid analysis of genetic instability for the diagnosis of cancer, we have developed a means of DNA diagnosis involving a modified rapid cycle PCR and non-gel sieving capillary electrophoresis (CE), and applied it to the analysis of genetic instability of colorectal cancer. The optimal running voltage and temperature for CE were determined to be 222V/cm and 30°C. By using a lower concentration of dNTP, PCR products could be subjected to CE without further purification, immediately after amplification. This technique allowed the determination of the genetic instability of colorectal cancer tissue derived from surgical specimens. This method is useful for rapid and automated DNA diagnosis.

目 的

ヒト染色体に多数存在する少数の繰り返し配列であるマイクロサテライトDNAの異常は、ミスマッチ修復系異常の指標として利用でき、遺伝性の癌や一部の遺伝病のマーカーとなりうるということが知られてきた。一方、キャピラリー電気泳動法は、ゲル電気泳動法と比較し、泳動時間が短く、分離能も高くかつ自動化できる特徴がある。我々は、遺伝性非腺腫症性大腸癌(HNPCC)の遺伝マーカーである(CA)n マイクロサテライトDNAの異常を、自動化されたキャピラリー電気泳動装置を用いて解析できるか否かを明らかにし、臨床応用の可能性を検討した。

方法と結果

キャピラリー電気泳動装置 : BioFocus 3000 (Bio-Rad Laboratories, Co. Ltd.)
カローセルを用いることにより連続して30検体を、15-40°Cの定温にて泳動できる。

泳動条件の検討 : 直鎖状アクリルアミドで内部をコーティングしたφ50mmx36cmの
キャピラリーを用い、泳動緩衝液としてポリマーを含む0.267M Tris/Borate pH8.3を

用いたNon-gel sieving法について検討したところ、電圧：222V/cm、温度：30°Cでの泳動条件が 適当であった。この条件で、測定内再現性を、調べたところ CV%は、1.0%以内と良好であった。

短時間PCR法と未精製産物の泳動：薄壁チューブを用いた短時間PCR法を行った。PCR反応液成分のdNTPの濃度を20 μ Mにて増幅した産物を、未精製のまま、0.267M Tris/Borate緩衝液にて泳動することができた。本法により、PCR反応は、1.5時間程度、キャピラリー電気泳動は、10分程度で実施できた。

(CA)n repeatsの解析：遺伝性非腺腫症性大腸癌(HNPCC) では、正常組織(N)、癌組織(T)で、第二染色体D2S123領域での(CA)n repeatsの変化がある場合がある(Fig. 1)。本法を用い、臨床検体について検討したところ、ゲル電気泳動にて (CA)n repeats に異常がある二例について、正常組織(N)と癌組織(T)で泳動パターンの違いが認められた。(Fig. 2)。また、Case Aについては、正常組織(N)、癌組織(T)のPCR産物を、混合した Double injection を行い、両者の違いを確認した。

結論と考察

- 1、キャピラリーの担体としてゲルの代わりにポリマーを用いた Non-gel sieving法により、(CA)n repeatsの変化を解析できる系を確立した。
- 2、短時間PCR法を用いることにより、増幅からキャピラリー電気泳動による解析まで約2時間程度で実施できた。
- 3、PCR反応時のdNTP濃度を20 μ Mにすることにより、PCR産物は、未精製のままキャピラリー電気泳動にて分離できた。
- 4、本法は、HNPCC臨床検体の評価に利用可能であった。

Primer design

D2S123-U: 5'-GGATGCCTGCCTTTAACAGT-3'

D2S123-L: 5'-GACTTTCCACCTATGGGACT-3'

Increase or decrease of (CA) repetitive numbers

5'[D2S123-U]-(CA)nCACACACACACACA-----3'
3'------(GT)nGTGTGTGTGTGTGT-[D2S123-L]5'

5'[D2S123-U]-(CA)nCACACACA-----3'
3'------(GT)nGTGTGTGT-[D2S123-L]5'

Fig. 1 (CA)n repeats alteration

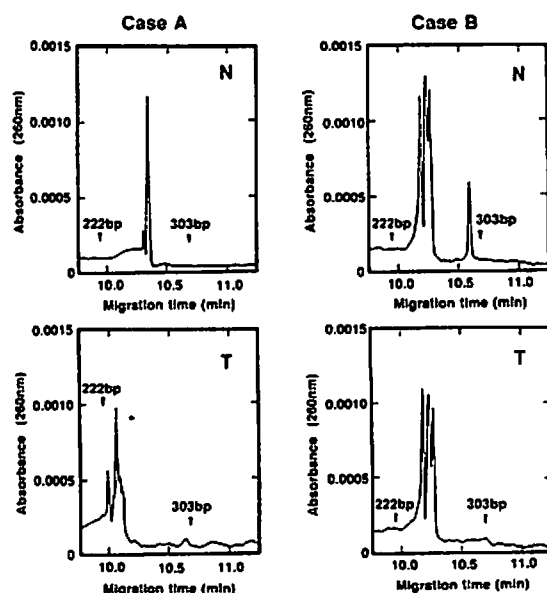


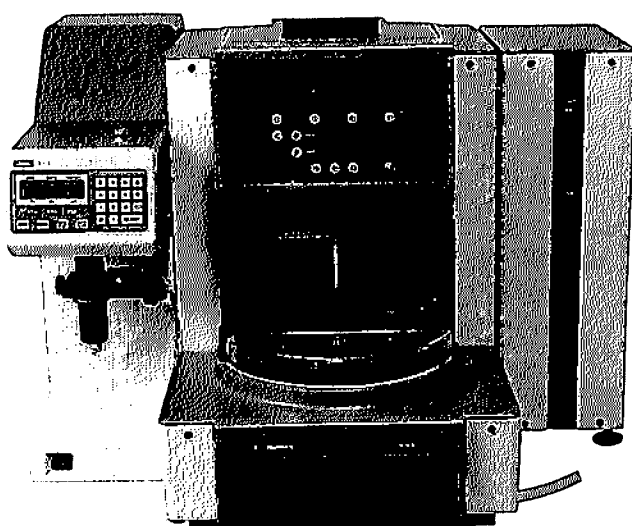
Fig. 2 Detection of (CA)n repeats alteration with capillary electrophoresis

JASCO

The modular CE!

CE-900 series

キャピラリー電気泳動システム



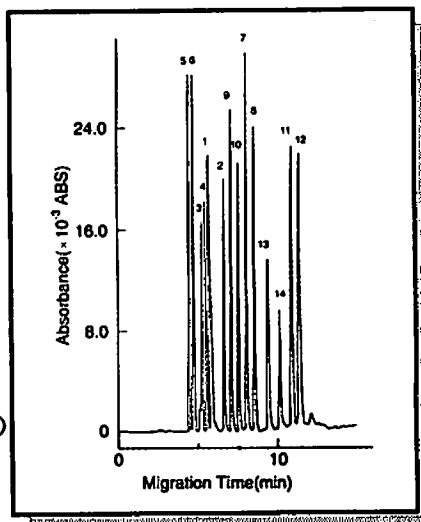
●CE-990-10

全自動キャピラリー電気泳動モジュール

拡張性に優れたモジュラタイプ、全自動システムで連続分析に対応

Capillary 50 μ mID x 50cm (effective length),
non-coated fused silica
Buffer 20mM MES-Na, 100mM DTAB, pH 6.1
Applied volt 20kV, 30 μ A
Capillary Temp Ambient
Detector UV, 254nm
Injection DCI, 15mbar, 0.5min
Sample Nucleotide STD mixture
1.0mg/ml each

1. adenine	8. ADP
2. c-AMP	9. CDP
3. GMP	10. UDP
4. AMP	11. GTP
5. CMP	12. ATP
6. UMP	13. CTP
7. GDP	14. UTP



MEKCによるヌクレオチドの分離

SDSと反対の電荷を持つ界面活性剤DTAB (Dodecyltrimethylammonium Bromide)を用いたMEKCでヌクレオチド12種を12分以内に分離しました。

この場合、電気浸透流は通常とは逆にマイナスからプラスへ流れます。

JASCOは日本分光株式会社の登録商標です

光と技術で未来を見つめる

日本分光

JASCO

日本分光株式会社

本社 192東京都八王子市石川町2967-5
TEL (0426)46-4111・代表

東京/北日本
(03)3294-0341
西東京(0426)46-7001
札幌(011)741-5285

筑波(0298)57-5721
神奈川(0427)49-1352
名古屋(052)452-2671
大阪(06)312-9173

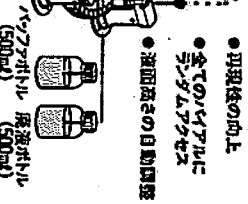
広島(082)244-5019
九州(092)474-1215

バツア交換なし



サンプルからのお願い。
 バックアップの自動交換もできない
 HPEの分析は、かたぐお断りします。

■ バッグ交換のしくみ



キャピラリー

電気泳動

CIE

豊富な分析キットが CIE分析を拡張 無機イオン分析から DNA解析まで

- 陰イオン分析キット●
- MicroCoat™タンパク分析キット●
- ProFOCUS™等電点電気泳動キット●
- ProSort™SDS-タンパク分析キット●
- MicroGel™オリゴヌクレオチド分析キット●
- DNAラジグメント分析キット●

特 長

- 豊富な専用キットで簡単操作
- 高感度・低ノイズ波長可変紫外可視
吸光検出
- 微量分析用高感度フローセル(オアシ
ヨン)
- サンプリングとキャピラリーのフレキシ
ブルな温度制御
- 高精度のマルチサンプリング注入モード
- 50サンプリングの自動分析
- 定盤計算は、Windows®を用いた
ワークステーション(オアシヨン)で
自由自在



270A-HT キャピラリー電気泳動分析装置 450万円

※本図は概略図を含みます。※仕様・外形は予告なく変更することがあります。※詳細はお問い合わせ下さい。

PERKIN ELMER

株式会社 パーキンエルマー ジャパン

分 析 機 器 事 業 部 アナライズ・バイオシステムズ事業部
〒220 横浜市西区北幸2-4-4 横浜西口 N.ビル TEL. (045) 314-8381 内 FAX. (045) 314-5142 〒279 千葉県東金市東金1-9-2 TEL. (0473) 80-5500 内 FAX. (0473) 80-5505

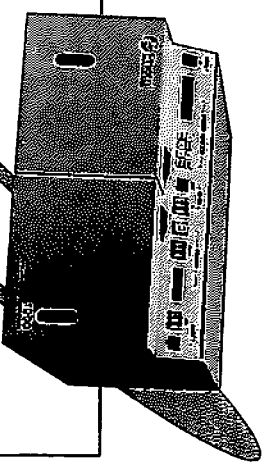
いま キヤピラリー電気泳動(HPCE)で 高分離能・短時間・微量分析

低価格・パーソナルタイプのHPCE分析装置登場

CAPL-1000

パーソナルキヤピラリー電気泳動装置

- ・パネルスイッチによる簡単な手動操作で実験がおこなえます。
- ・キヤピラリー温調や再現性の高いバキュームインジェクション方式のサンプル注入法を採用し、信頼性の高いデータを得ることができます。
- ・測定データはHPLC用インテグレーターによりレポートインク、再解析が可能です。



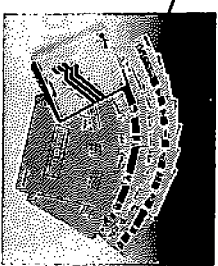
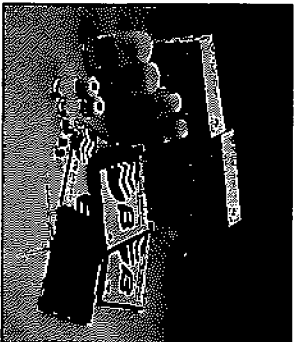
型 様

機 体 寸 法	USD (ダブルドア)
測定遊長範囲	195~600mm (390~700mm)
遊長分解能	6mm
遊長精度	±1.0mm
検 査 精 度	電水素ラドン
ノイズレベル	<5×10 ⁻⁹ ABU
インジェクション	6検体自動サンブラー
キヤピラリー温調	室温+3~49℃ (±0.5℃)
出力	インテグレーター用出力
	記録計用出力
	電圧/電流モニター用出力

接続図例

アブリケーション分析キット
ソフトウェア・モニタスクリーン

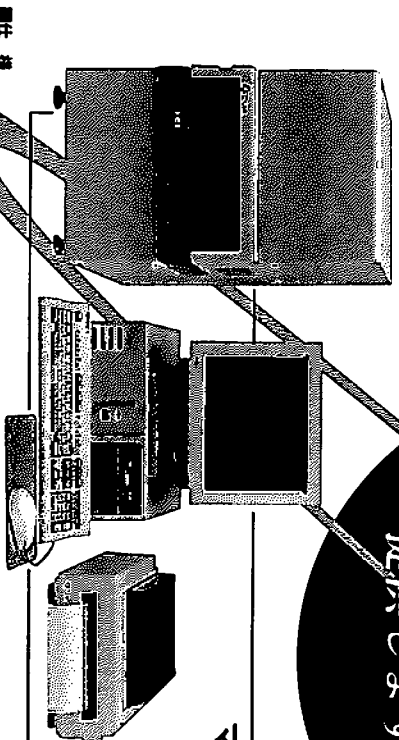
大塚電子は、
キヤピラリー電気泳動の
分析技術を
トータルサポートで
提供します。



高性能HPCE分析装置

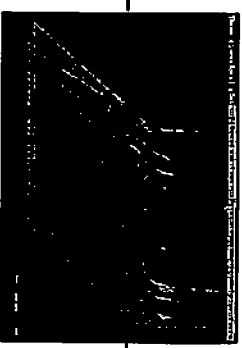
CAPL-3100

マルチチャンネルキヤピラリー電気泳動装置



型 様

機 体 寸 法	フォトダイオードアレイ512ch
測定遊長範囲	190~600mm
遊長分解能	1.3~20mm
遊長精度	±1.0mm
ノイズレベル	<6×10 ⁻⁹ ABU
オートサンブラー	48検体
キヤピラリー温調	5~45℃ (±0.2℃)
サンブリング速度	5~45℃ (オプショナル)
検 査 精 度	分定検定有



- ・定性能力をアップするフォトダイオードアレイ検出器を採用しています。
- ・多彩なデータ解析と豊富な機能 (45検体オートサンブラー、キヤピラリー温調、サンブリング速度 (オプショナル) 等) に加え自動測定・自動解析ができます。
- ・関イオン、陰イオンの連続自動測定が可能です。

大塚電子株式会社

● 本社・西日本営業部 〒573 大阪府枚方市相模田近3丁目26-3 TEL. (0720)55-8550(F) FAX. (0720)55-8557
 ● 東日本営業部 〒192 東京都八王子市東町1-6 協栄ビル2F TEL. (0426)44-4951(F) FAX. (0426)44-4961
 ● 筑波営業所 〒300 茨城県土浦市御町1丁目1-1 関鉄ビル6F TEL. (0298)43-5722(F) FAX. (0298)43-5730

HITACHI

転生

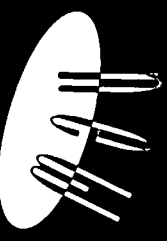


激動の時代。今、日立の高速液体クロマトグラフは新たに「転生」する。

新しいものの創造。今までのものの改良。この激動の時代において技術はさらに進歩し続けています。しかし、進歩とは常に発見と検証の連続です。信頼できる分析が伴って初めて進歩が生まれるのです。信頼性を損なわずに高性能と高品質を実現した、次世代の分析装置とは何か。それに対する日立の解答の一つが、今回「転生」した高速液体クロマトグラフ、L-7000シリーズです。ISO-9001認証に裏付けられた高品質で高性能な分析環境をクリエイトし、GLP*規格への対応や最新の32ビットOSである“Windows NT™”を採用したHPLCやネーjing、検置き、バルブアッp方式、Dライnコミュニケーションの採用など、ハード、ソフトを問わず全ての面において未来を見据えた安全性の高い分析装置として、L-7000シリーズはみなさまを強力にサポートします。

*GLP(Good Laboratory Practice) (薬品開発分野などで試験データの信頼性を求める基準)の規格です。
Windows NT™は米国マイクロソフト社の商標です。

日立高速液体 クロマトグラフ



平成6年度

(社) 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

幹 事

新井 悦郎 (ベックマン)	津田 孝雄 (名古屋工業大学)
井上 嘉則 (横河電気)	津田 淑江 (共立女子短期大学)
奥山 典生 (神奈川歯科大学)	寺部 茂 (姫路工業大学・理)
雁野 重威 (日立製作所テクノリサーチセンター)	○中川 照眞 (京都大学・薬)
◎木曾 義之 (比治山女子短期大学)	中村 洋 (東京理科大学・薬)
倉重 友三 (日本バイオラップドラボラトリーズ)	西川 清菊 (松定アレンジョン・ダイバイセズ)
児玉 裕敬 (高知医科大学)	△廣川 健 (広島大学・工)
小林英三郎 (城西大学・理)	福士 恵一 (神戸商船大学)
酒井 恒行 (日本ミリボウケイターズクロソト事業部)	本田 進 (近畿大学・薬)
笹川 秀男 (大塚電子)	△真鍋 敬 (愛媛大学・理)
千田 正昭 (日本分光)	八木 孝夫 (島津製作所)
玉谷 邦昭 (パーキンエルマー・ジャパン)	吉田 治弘 (専修大学・法)

(五十音順)

◎ 代表幹事 ○ 第14回シンポジウム世話人 △ 常任幹事

第14回 キヤピラリー電気泳動シンポジウム

平成6年12月6日発行

編集 〒606 京都市左京区吉田下阿達町
京都大学薬学部薬品分析学教室内

第14回キヤピラリー電気泳動シンポジウム事務局
編集責任者 中 川 照 眞

発行 (社) 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会
印刷 株式会社 西 村 信 天 堂

〒604 京都市中京区西ノ京樋ノ口町14
電 話 075-841-3031
FAX 075-841-1790

