

The 16th Symposium on Capillary Electrophoresis SCE'96

第16回キャピラリー・電気泳動シンポジウム

主催 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

共催 日本分析化学会中部支部・日本化学会・
日本薬学会・日本生化学会・
クロマトグラフィー科学会・
日本電気泳動学会

会期 12月9日(月)・10日(火)

会場 名古屋工業大学講堂

第16回

キャピラリー・電気泳動シンポジウム

平成8年12月9日—12月10日
名古屋工業大学

プログラム

12月9日

挨拶 実行委員長 津田孝雄 <9:55>

座長 後藤正志 <10:00-10:35>

1 招待講演 キャピラリー電気泳動の原理 —感度と再現性に関連して—
廣川 健 (広島大・工)

座長 渋谷明正、西 博行 <10:35-11:20>

2 キャピラリー電気泳動における移動指標の再現性について ○本田進, 笹岡功, 柴田史子, 多賀 淳 (近畿大・薬)

3 キャピラリー電気泳動法による遺伝子分析の再現性について ○角田ちぬよ, 馬場嘉信, 津波古充朝, 三木哲郎, 萩原俊男 (神戸薬科大, 阪大医)

4 キャピラリー電気泳動によるヒトゲノムの繰り返し配列解析の再現性 ○西村明子, 馬場嘉信, 津波古充朝, 三木哲郎, 萩原俊男 (神戸薬科大, 阪大医)

座長 本田 進、桃澤洋三 <11:35-12:35>

5 MEKCの疑似固定相としての高分子量界面活性剤とSDSとの再現性の比較 ○山口拓哉, 大塚浩二, 寺部茂 (姫路工大・理)

⑥ キャピラリー電気泳動の電気インジェクション法における直線性の検討(Ⅲ)
—各現象の数学的考察— ○佐々木秀輝, 米久保淳 (日本ウォーターズ)

⑦ キャピラリー電気泳動(CE)におけるイオンの定量分析と電氣的導入法
○佐藤康博, 笹一志, 北岸恵子, 丸山敏彦 (大塚電子(株))

8 ポリマー充填キャピラリー電気泳動によるSDS-血漿タンパク質複合体のサイズ分離 ○竹村結花, 大田英人, 真鍋敬 (愛媛大・理)

座長 田中信男 <12:35-13:05>

9 水溶液内イオン会合反応に基づく陰イオンのキャピラリー電気泳動分離とそのシミュレーション ○高柳俊夫, 和田栄子, 本水昌二 (岡山大・理)

10 キャピラリー電気泳動におけるピークプロファイルの数値シミュレーション ○育田夏樹, 廣川健 (広島大・工)

11 P 無担体分配電気泳動クロマトグラフ法

○桃澤洋三, 坂入禎宣(日大・薬)

12 P キャピラリーエレクトロクロマトグラフィーの固定相に関する検討

○藤本忠蔵, 櫻井政仁, 藤瀬裕(浜松医科大)

13 P 電気クロマトグラフィー(23) -イオン交換樹脂を用いる系について-

辻 明, 渡辺弘和, 北川慎也, 津田孝雄(名工大・工)

14 P キャピラリー電気クロマトグラフィー装置と応用

○曾我朋義, 箕浦加穂(横河アナリティカルシステムズ(株))

15 P キャピラリー電気泳動レーザー蛍光検出によるDNAシーケンシングにおける長鎖DNAフラグメントの分析条件の検討

○井上秀子, 馬場嘉信, 津波古充朝(神戸薬科大)

16 P 非架橋高分子溶液中の長鎖DNAのダイナミクス -蛍光顕微鏡による直接観察から-

上田正則¹, 小穴英廣¹, 馬場慶喜², 吉川研一¹, 土井正男¹

(¹名大, ²神戸薬科大)

17 P 人血清蛋白質のキャピラリー電気泳動 -分画分離から成分分離へ-

久保兼信(近畿大・薬)

18 P 医薬品の不純物試験へのHPLC適用は有効か? -CZEとLCの分離の一例からの考察-

千葉裕一(大塚製薬工場・製剤研)

19 P CDを用いたキャピラリー電気泳動によるNBD-アミノ酸の光学分割

角田 誠, 加藤 大, 福島 健, 三田智文, 本間浩, 今井一洋(東大・薬)

20 P シクロデキストリン修飾キャピラリー電気泳動による光学異性体の分離: ジメチル-β-シクロデキストリンの組成がキラル識別能に及ぼす効果(4)

○本田周平¹, 大塚浩二¹, 寺部茂¹, 木全一博², 田中信男²(¹姫路工大・理, ²京工繊大・繊維)

21 P 界面活性剤の構造がミセル動電クロマトグラフィーの分離挙動に及ぼす効果

○竹田さほり¹, 脇田慎一¹, 山根昌隆¹, 東国茂¹, 寺部茂²(¹大阪工業技術研, ²姫路工大・理)

22 P 非水系CEへの水素結合モードの導入

○江坂幸宏¹, 後藤正志¹, 加納健司²(¹岐阜薬大, ²京大・農)

23 P 新規界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィーによる光学異性体の分離

○杉本美香¹, 老田達生², 大塚浩二¹, 寺部茂¹(¹姫路工大・理, ²京工繊大・工芸)

24 P cIEFにおける合成pIマーカーを用いたキャリアーアンフオライトの分離能の評価

○小林英三郎, 鈴木望与, 柳沢濃志(城西大・理)

25 P キナアルカロイド類及びカイン系局所麻酔薬のキャピラリー電気泳動による分離

酒井忠雄, 真弓 聡, 仲野智博(愛知工大)

Q 26 P キャピラリー電気泳動法による鉄(Ⅱ)と鉄(Ⅲ)の分離 ○陳 秀娟
， 育田夏樹， 廣川 健(広島大・工)

Q 27 P IP-CZEによる希土類鉱石の分離分析 ○佐藤宏則， 育田夏樹， 廣
川 健(広島大・工)

Q 28 P CEを用いる物性へのアプローチ(1) 拡散係数の算出
津田孝雄， 北川慎也(名工大・工)

29 P 高分子界面活性剤のキャラクタリゼーション ○飯田幸治， C.P. Palmer
r， 大塚浩二， 寺部 茂(姫路工大・理)

座長 本水昌二、廣川 健 <15:40-16:40>

Q 30 MEKCにおける中性試料のオンカラム濃縮 ○J.P. Quirino， 寺部 茂
(姫路工大・理)

Q 31 MEKCにおけるスタッキングによるキャピラリー内試料濃縮と試料溶解
液の組成について ○今澤正興， 畑中由利子(国立精神神経センター神経研)

32 ポリアリルアミン誘導体の動電クロマトグラフィー用キャリアとしての特
性の検討 田中信男， ○中川克仁， 岩崎宏信， 細矢 憲， 荒木長男(京工繊大・
繊維)

33 変性条件におけるタンパク質のキャピラリー等電点電気泳動条件の検討
○田原義彦， 楠香 織， 真鍋敬(愛媛大・理)

座長 久保兼信、馬場嘉信 <16:55-17:55>

34 両性電解質混合物を用いた等電点電気泳動による塩基性タンパク質分析条
件の検討 ○豊田洋介， 宮本洋光， 真鍋 敬(愛媛大・理)

35 SDS-Tween20 混合ミセルを用いた陽イオン性物質のMEKC ○田
中一哉， 江坂幸宏¹， 後藤正志¹， 加納健司²(¹岐阜薬大、²京大・農)

36 ウエスタンブロット転写効率の新決定法: プロット時に用いる保持ゲルの
考案 ○相澤克則^{1,2}， E. Gantt¹(¹U. Maryland USA、²岡崎共同研・基礎研)

37 一次元PFGEにおける長鎖DNA分離の機構 ○増渕雄一， 子穴英廣，
松本充弘， 土井正男(名大・工)

懇親会 6:30-8:30 於 今池ガスビル

12月10日

座長 藤本忠蔵 <9:00-9:35>

38 招待講演 電導性高分子薄膜・固定相を用いるイオン分離法の開発
長岡勉(山口大・工)

座長 中村 洋 <9:35-10:05>

39 全希土類イオンのキャピラリー電気泳動分離 ○真鍋雄生, 育田夏樹, 廣川 健(広島大・工)

40 キャピラリー電気泳動による薬物-血漿リポタンパク質結合研究 大西貴徳, ○渋谷明正, 中川照眞(京大・薬)

座長 寺部 茂、竹田さほり <10:20-11:20>

41 キャピラリー電気泳動による、ヒアルロン酸の迅速定量及び分子量測定Ⅱー表面処理シリカ管を用いる検討ー 早瀬省三¹, 本田進², ○掛樋一晃²(¹大鵬薬品工業(株)・製剤研、²近畿大・薬)

42 蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動によるプロテアーゼ活性の高感度検出 ○志村清仁¹, 松本浩幸², 笠井献一¹(¹帝京大・薬 ²分子バイオホトニクス研)

43 キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その1 キャピラリー入口での反応による誘導体と分析の自動化 多賀淳, ○本田 進(近畿大・薬)

44 キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その2 ゾーン追越し方式による誘導体化と高速反応速度定数の測定 ○多賀 淳, 杉村真由美, 本田 進(近畿大・薬)

座長 平岡 厚 <11:35-12:05>

45 エレクトロスプレーイオン化法および大気圧化学イオン化法を用いるオンラインMEKC-MSの検討 ○尾崎裕人¹, 寺部 茂^{2,1}(株)カネカテクノロジーサーチ、²姫路工大・理)

46 CE-APCI-MSにおけるスペクトル強度に及ぼすパラメーターの検討 ○横井雅樹¹, 尾崎祐人², 大塚浩二¹, 寺部 茂¹(¹姫路工大・理、²カネカテクノロジーサーチ(株))

座長 真鍋 敬、大塚浩二 <12:05-13:05>

47 ANS標識還元糖のキャピラリー電気泳動 ○三宅徹志, 中村 洋(東京理科大・薬)

48 キャピラリー電気泳動による日本薬局方製剤の不純物分析 ○小原栄二, 中村 洋(東京理科大・薬)

49 クラウンエーテルを用いたキャピラリー電気泳動による医薬品の光学分割

○西 博行, 泉本真一, 中村耕治, 仲井英雄, 佐藤忠司(田辺製薬(株)・分析研)

50 キャピラリー電気泳動を用いたS-[2-carboxy-1-(1H-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteine 及び N-[S-[2-carboxy-1-(1H-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteinyl] glycine の各ジアステレオマーの分離測定法 絹田正裕, 清水裕雄, 産賀敏彦 (岡山大・医・生化学)

座長 酒井忠雄 <14:00-14:35>

51 招待講演 先端分析法におけるLCとECの比較 中川照眞 (京大・薬)

座長 今井一洋 <14:35-15:05>

52 キャピラリー電気泳動を用いる医薬品の迅速かつ簡便な分析法の開発 (β-ラクタム系抗生物質の分析) ○谷口祥子, 浜瀬健司, 財津 潔(九大・薬)

53 SDS 高分子溶液キャピラリー電気泳動による髄液中の低分子蛋白成分の分離・定量 平岡 厚¹, 荒戸照世², 富永 格³ (¹杏林大・保険、²杏林大・医・生化、³国立千葉病院・神経科)

座長 中川照眞、掛樋一晃 <15:15-16:05>

54 脳脊髄液(CSF)中のProstaglandinD₂(PGD₂)合成酵素のキャピラリー電気泳動による分析 ○丸山敏彦^{1,2}, 江口直美³, 織田浩司⁴, 入倉大祐¹, 裏出良博¹, 早石修¹ (¹大阪バイオサイエンス研、²現、大塚電子(株)、³新技術開発事業団、⁴マルハ中央研)

55 微細藻類の電気泳動 平田雄志, ○山端景子(大阪大・基礎工)

56 血液分析への電場の応用 ○野崎 修¹, 北川慎也², 津田孝雄² (¹近畿大・医、²名工大・工)

フリーディスカッション

於 講堂ロビー(及びカフェコンセールエウム) <16:20~18:20>

16th Symposium on capillary electrophoresis at Nagoya, December 9-10, 1996

Chairman: Takao Tsuda (Nagoya Institute of Technology)

Contents

Sensitivity and reproducibility

1. Principle of capillary electrophoresis-in relation to sensitivity and reproducibility, T.Hirokawa (1)
2. Reproducibility of migration indices in capillary electrophoresis, S.Honda, I.Sasaoka, N.Shibata, A.Tagu (2)
3. Repeatability of gene Diagnosis using capillary electrophoresis, C.Sumita, Y.Baba, M.Tsuhako, T.Miki, T.Ogihara (3)
4. Repeatability of migration in the analysis of repeated sequence on human genome by capillary electrophoresis, A.Nishimura, Y.Baba, M.Tsuhako, T.Miki, T.Ogihara (4)
5. Difference in reproducibility between high-molecular-mass surfactants and SDS as pseudo-stationary phases in MEKC, T.Yamaguchi, K.Otsuka, S.Terabe (5)

Sample introduction

1. The relation between linearity and total amount introduced by electromigration injection -theoretical study of each phenomena-, H.Sasaki, J.Yonekubo (6)
2. Quantitative analysis for inorganic anions by electrokinetic sample injection in capillary electrophoresis, Y.Sato, K.Sasa, T.Maruyama, K.Kitagawa (7)

Comparative study of HPLC and CZE

1. Is it useful to apply HPCE for impurity test of drugs substances? - Consideration from an example of the separation of CZE and LC using each thermal degradation sample, H.Chiba, H.Kobatake (18)
2. Comparison of LC and CE in high-performance frontal analysis, T.Nakagawa (51)

Sample treatment, concentration and derivatization

1. Separation and analysis of rare-earth ores by means of ITP-CZE, H.Sato, N.Ikuta, T.Hirokawa (27)

2. On-column concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography, J.P.Quirino, S.Terabe (30)
3. Sample matrix effects on sample stacking in micellar electrokinetic capillary chromatography, M.Imazawa, Y.Hatanaka (31)
4. Analytical methods utilizing a capillary for reaction and separation part 1: Derivatization at the inlet of a capillary and automation of analysis, A.Taga, S.Honda, (43), and Part 2: Derivatization by zone passing-through format and estimation of rapid rate constant, A.Taga, M.Sugimura, S.Honda, (44)

Ion association and separations of metal ions

1. Capillary electrophoretic separation of anions and its simulation based on ion association in aqueous solution, T.Takayanagi, E.Wada, S.Motomizu (9)
2. Separation of Fe (II) and Fe (III) by capillary electrophoresis, X-J Chen, N.Ikuta, T.Hirokawa (26)
3. Capillary zone electrophoretic separation of all rare-earth ions, Y.Manabe, N.Ikuta, T.Hirokawa (39)

Theoretical consideration

1. Numerical simulation of peak profiles in capillary electrophoresis, N.Ikuta, T.Hirokawa (10)
2. Estimation of diffusion coefficient by capillary electrophoresis, T.Tsuda, S.Kitagawa (28)

Electrochromatography

1. Partition electrochromatography, Y.Kabasawa, S.Sakairi (11)
2. Investigation on the stationary phases for capillary electrochromatography, C.Fujimoto, M.Sakurai, Y.Fujise (12)
3. Capillary electrochromatography (XX III) --CEC using ion exchange supports--, A.Tsuji, K.Watanabe, S.Kitagawa, T.Tsuda (13)
4. Capillary electrochromatography: Instrumentation and Application, T.Soga, K.Minoura (14)
5. Electrochemical chromatography using conducting polymer stationary phases, Nagaoka (38)

Separation modes

1. Hydrogen-bonding mode CE in non-aqueous solutions, Y.Esaka, M.Goto, K.Kano (22)
2. Pseudo-stationary phase prepared from polyallyamine for electrokinetic chromatography, N.Tanaka, K.Nakagawa, H.Iwasaki, K.Hosoya, T.Araki (32)

Isotachopheresis and its applications

1. Evaluation of pH gradient forming ability with synthesized pI marker on capillary isoelectric focusing, H.Kobayashi, M.Sizuki, A.Yanagisawa (24)
2. Condition for the analysis of proteins by capillary isoelectric focusing in the presence of denaturing agents, Y.Tahara, K.Kusu, T.Manabe (33)
3. Condition for the analysis of basic proteins by isoelectric focusing with ampholyte mixtures, Y.Toyota, H.Miyamoto, T.Manabe (34)
4. Determination of protease activity by capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection, K.Shimula, H.Matsumoto, K.Kasai (42)

Chiral separation

1. Chiral separation of NBD-amino acids by capillary electrophoresis using cyclodextrins, M.Tsunoda, M.Kato, T.Fukushima, T.Santa, H.Homma, K.Imai (19)
2. Enantiomeric separation by cyclodextrin modified capillary zone electrophoresis: effects of compositions of dimethyl- β -cyclodextrins on chiral recognition, S.Honda, K.Otsuka, S.Terabe, K.Kimata, N.Tanaka (20)
3. Enantiomeric separation by micellar electrokinetic chromatography using novel chiral surfactants, M.Sigimoto, K.Otsuka, S.Terabe, T.Oida (23)
4. Enantiomer separation of drugs by capillary electrophoresis utilizing crown ethers, H.Nishi, S.Izumoto, K.Nakamura, H.Nakai, T.Sato (49)
5. Chiral separation of respective diastereomers of by capillary electrophoresis, M.Kinuta, H.Shimizu, T.Ubuka (50)

Additives in MEKC

1. Effect of the surfactant structure on migration behavior in micellar electrokinetic chromatography, S.Takeda, S.Wakida, M.Yamane,

K.Higashi, S.Terabe (21)

2. Characterization of high molecular mass surfactants, K.Iida, C.P.Palmer, K.Otsuka, S.Terabe (29)
3. Separation of hydrophobic cations by MEKC using SDS-TWEEN20 mixed surfactant system, K.Tanaka, Y.Esaka, M.Goto, K.Kano (35)

CE/MS

1. On-line MEKC-MS with ESI and APCI interface, H.Ozaki, S.Terabe (45)
1. Effect of operating parameters on sensitivity in CE - APCI - MS, M.Yokoi, H.Ozaki, K.Otsuka, S.Terabe (46)

Medicine and sugars

1. Separation behavior of cinchon alkaloids and local anesthetics (caines) using capillary electrophoresis, T.Sakai, S.Mayumi, T.Nakano (25)
2. Study of drug - plasma lipoprotein binding using capillary electrophoresis, T.Ohnishi, A.Shibukawa, T.Nakagawa (40)
3. High performance capillary electrophoresis of Hyaluronic acid II : Its application to determination of the molecular mass by using a surface-coated capillary, S.Hayase, S.Honda, K.Kakehi (41)
4. Capillary electrophoresis of ANS - labeled reducing sugars, T.Miyake, H.Nakamura (47)
5. Development of simple and rapid method of therapeutic drugs using capillary electrophoresis, S.Taniguchi, K.Hamase, K.Zaitzu (52)

Proteins

1. Size-separation of SDS-plasma protein complexes by capillary gel (polymer) electrophoresis, Y.Takemura, H.Ohta, T.Manabe (8)
2. An alternative method to improve transfer efficiency of western blotting by using a retaining gel, K.Aizawa, E.Grantt (36)

Human serum and medical applications

1. Capillary electrophoretic separation of human proteins: from fraction separation to component separation, K.Kubo (17)
2. Analysis by sodium dodecyl sulfate polymer solution capillary electrophoresis of low molecular weight proteins in cerebrospinal fluid, A.Hiraoka, T.Arato, I.Tominaga (53)
3. Capillary electrophoresis analysis of prostaglandin D(PGD) synthase in

cerebrospinal fluid (CSF), T.Muruyama, N.Eguchi, H.Oda, D.Irikura,
Y.Urade, O.Hayashi (54)

Small cells

1. Electrophoresis of microalgae, Y.Hirata, K.Yamaberi, H.Kondo (55)
2. Noble method of blood typing with whole blood specimen by cell capillary electrophoresis, O.Nozaki, S.Kitagawa, T.Tsuda (56)

DNA and its behaviors

1. Optimization of the separation conditions for the long reading of DNA sequencing capillary electrophoresis equipped with laser-induced fluorescence detector, H.Inoue, Y.Baba, M.Tsuhako (15)
2. Conformation transition of a long DNA chain under electrophoresis in uncross linked linear polymer, M.Ueda, H.Oana, Y.Baba, K.Yoshikawa, M.Doi (16)
3. Separation mechanism of large DNA during 1-dimensional PFGE, Y.Masunobu,
H.Oana, M.Matsumoto, M.Doi (37)

キャピラリー電気泳動法の原理 - 感度と再現性に関連して -

(広島大・工) 廣川 健

Principle of Capillary Electrophoresis - in relation to sensitivity and reproducibility -

Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

The principles of electrophoretic migration were described for capillary zone electrophoresis and isotachopheresis in relation to the sensitivity and the reproducibility. Relaxation of local potential gradient in the capillary was illustrated as the principal cause affecting the reproducibility.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動法 (CE) は、絶対感度が高く (pmol~10fmol) 試料が極微量で良いこと・分析に必要な試薬量が非常に少ないことなど優れた特徴を有する分析法である。CE分離の原理は試料イオン間の実効移動度差であり、分離の場として内径100 μ m以下長さ1m程度のシリカキャピラリーが使用される。シリカキャピラリーの使用により最大30kV程度の高電圧を印加し高い電位勾配を発生させさせられるため、迅速分析が可能となる。分析目的以外にはマイクロスケールの分取にも有用であり、CE-MSに見られるように高感度分析法の前処理的用途にも使用される。しかし未だに公定分析法として認められていない事からも推測されるように、CE分析の濃度感度・再現性に関しては課題も多い。大量の溶離液を排出するイソカマトグラフィー (IC) に比べるとCEはエコロジーの点から格段に優れているが、これからの分析法として確立させるためには特に再現性を改善し分析法としての信頼性を向上させなければならない。

CEの再現性は本稿の最後にまとめたように種々の実験的要因によって影響を受けるが、本稿では諸因子のなかでもCE分離場の特性に依存する原理的な因子についてまとめた。CEには原理が異なる種々のモードがあり目的に応じて使い分ける必要があり、再現性に影響する因子もモードに依存する。以下、基本となるキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) と濃縮・希釈効果を持つ等速電気泳動 (ITP) の場合について述べる。

2. CZEの原理

CZEでは分離キャピラリーに泳動バッファー (支持電解質) を充填し、試料を導入後泳動電圧を印可し分離を行う。CZEでのイオンの泳動速度 (v_{mig}) は次式のように電気泳動速度 (v_{el}) と電気浸透流速度 (v_{os}) の和として与えられ

る。

$$\begin{aligned}v_{\text{mig}} &= v_{\text{el}} + v_{\text{os}} \\&= \bar{m} E + (\varepsilon \zeta / \eta) E \\&= (\bar{m} + \varepsilon \zeta / \eta) E\end{aligned}\quad (1)$$

ここで $\bar{m}$ はある試料成分イオンの実効移動度、 E は電位勾配、 ε 、 ζ 、 η はそれぞれ溶媒の誘電率、キャピラリー内壁のゼータ電位、溶媒の粘度である。試料はキャピラリーの末端に固定した検出器まで移動したのち検出される。エレクトロフェログラムは時間軸に対して記録され、泳動時間が定性の指標となり、ピーク面積もしくは高さで定量分析を行う。

3. C Z Eの再現性に影響する因子

C Eにおける極微量の試料のハンドリングには蒸発などの問題があるが、一定量をC E装置に導入する技術はほぼ確立されているといって良い。ここでは、試料注入に伴う誤差はないものとし、C Z E分析の再現性に影響する原理的因子について考察する。

高い泳動時間の再現性を得るためには、1式で表される泳動速度が実験ごとに一定であること、言い換えれば $\bar{m} \cdot E \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot \eta$ が一定であることが必要である。試料濃度は希薄かつ微量であればあるほど、支持電解質のみの系に近くなり、理想的なC Z E分離が達成される。しかしこのような条件は実試料の分析では満足させられない事が多い。

C Z Eによる定性および定量の精度・正確さには強い相関がある。泳動時間の再現性が良くなければ定性分析に問題を生じるだけでなく、定量分析をピーク面積で行う場合誤差の原因となる。標準物質の泳動時間や検量線を使用して分析を行う場合、特に泳動時間の再現性に注意を払う必要がある。

図1は希土類鉱石の実試料と標品(50ppm)の混合試料のエレクトロフェログラムである。極微量の重希土類イオンの分析を目的として試料負荷を高めてある。この場合、標品の泳動時間との対応で定性を行うとNdあたりまでは良く対応しているがその後一挙に対応関係が悪くなっていることがわかる。このような現象は何故起こるのだろうか。

・温度効果

移動速度を表す1式は簡単そうに見えるが、実はC Z E分離系が種々の問題を内包した系である事を示唆している。まずC Z E分離系に泳動バッファーに近い性質を持った極少量の試料が導入された場合を考えよう。このような系における泳動時間の再現性は、泳動バッファーの温度にのみ依存する。これは $\bar{m} \cdot E \cdot \varepsilon \cdot \zeta \cdot \eta$

・定電圧モード

・スキャン速度は食料の分析に用いられるようにマイクログラム

の諸量が温度により大きく変化するためである。図2は、 K^+ 、 Li^+ の移動度の温度依存性および水の誘電定数(K_ϵ 、 $\epsilon = \epsilon_0 K_\epsilon$)や粘度の温度依存性を示している。図2より明らかなように、電気泳動移動度のみならず電気浸透流移動度(ϵ/η)も温度に強く依存する。従って泳動時間について高い再現性を得るにはまず何より分離キャピラリー内部の温度を一定とすることが重要である。

CE装置では分離キャピラリーを恒温槽に納めることが多いが、これは以上のような理由によるものである。迅速分離を期待し、高い電圧をかけるとJoule熱により分離キャピラリー内の温度は相当に上昇する。この効果は恒温槽を使用した装置でも避けることはできない点に注意を要する。

$$E = V/L$$

・電位勾配の緩和効果

キャピラリー内の電位勾配 E は泳動電圧/キャピラリー全長で与えられる。CEでは定電圧でドライブされることが多いが、この場合この電位勾配はあくまで全体の平均値(E_{av})であって、局所的電位勾配(E_{loc})は、試料に依存する。このためキャピラリー内の温度が一定に保てたととしても、毎回全く同じ試料を分析する場合を別として、試料濃度や絶対量が変われば、再現性に問題を生じる原因となる。

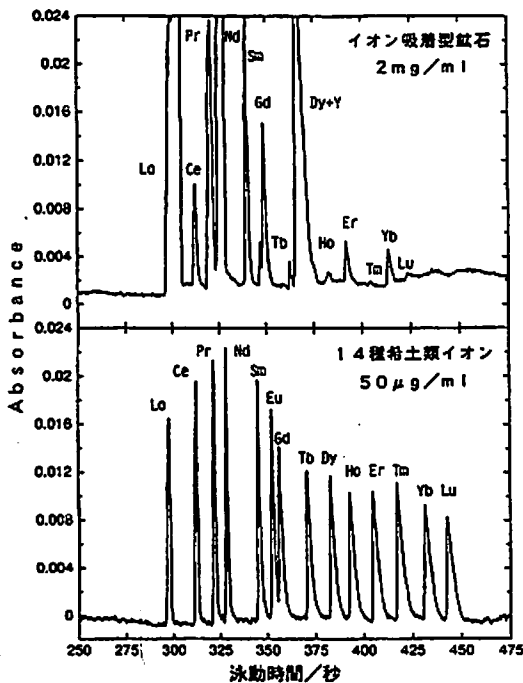


図1 イオン吸着型鉱石および希土類標品のエレクトロフェログラム、4 mM HIBA 30 mM クレアチニン、酢酸で pH=4.8

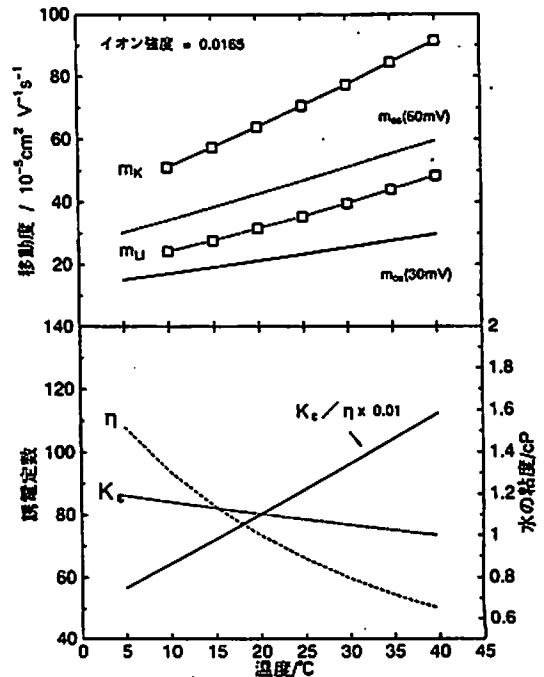


図2 K^+ 、 Li^+ の移動度、水の誘電定数、粘度の温度依存性

図3は 3mM K・0.3mM Na・0.3mM Liの混合試料をクレアチニン-酢酸バッファで分離を行う場合について、当研究室で開発したソフトウェアを使用して行ったシミュレーションの結果である。分離管長は 50cm、電源電圧は 30kV とした ($E_{av}=600V/cm$)。図3から明らかなようにこの泳動条件では泳動初期には試料プラグに電圧が集中する。この集中は次第に緩和するが緩和時間は試料プラグの電導度や組成に依存し、結果として同じ成分であっても試料によって泳動速度が変化し、泳動時間の再現性に問題を生じることになる。たとえば参照用テスト混合試料の泳動時間が実試料の泳動時間と一致しない現象はこの電位勾配の緩和過程の違いが重要な因子となる。

種々の異なる試料中の同一成分の分析や高濃度なマトリックス中の微量成分の分析などにおいて高い再現性を得るには、逆に試料プラグ部の高電圧あるいは低電圧の発生と緩和をできるだけ抑えれば良い。試料組成を泳動バッファの組成に近づけるのは一つの解決法である。図1の希土類イオンの分析では全く同じ実験条件で分析をおこなったにもかかわらず、結局、標品の分析をおこなった時の電位勾配の方が実試料を分析したときよりも低かったということになる。CE装置で定電圧モードを使用した場合、印加電圧は高精度で制御されているが、キャピラリー内部の電位勾配分布を制御できるわけではないことに注意すべきである。この点定電流モードの方が原理的に優れていることになる。

4. 等速電気泳動法 (ITP) の原理

ITPではリーディング電解液とターミナル電解液と呼ばれる2種類の電解液の間に試料を注入した後泳動させる。試料はリーディングイオンの濃度に応じて一定濃度のゾーンを形成する。定常状態における試料濃度はリーディングイオンの濃度 (C_L^0) および、リーディングイオンおよび試料イオンの実効移動度 ($\bar{m}_L > \bar{m}_A > \bar{m}_B > \bar{m}_T$) により決定される。定電流で泳動させると分離されたゾーンは連なって等速度で泳動し、分離ゾーンの界面には自己保持作用がある。言い換えると、CZEのように試料ゾーンに対する試料の影響が非常に少なく、高濃度の成分は希釈され、低濃度の成分は濃縮され、絶対量に応じた長さのゾーンを形成し、分離が終了して定常状態に到達するとその長さは変化しない。等速電気泳動の意味は、定常状態の定電流で泳動させると各ゾーンの界面速度が等しい[6]とすることである。すなわち、成分A・Bの界面速度は次式で与えられる。

$$V_{IP} = E_L \cdot \bar{m}_L = E_A \cdot \bar{m}_A = E_B \cdot \bar{m}_B = E_T \cdot \bar{m}_T \quad (2)$$

ここでEは各ゾーンの電位勾配、mは各ゾーン内でのL、A、Bイオンの実効移動度である。定性指標としては、例えばリーディングイオンに対する試料イオンの移動度の比で与えられる：

$$R_E = E_A / E_L = \bar{m}_L / \bar{m}_A \quad (3)$$

試料ゾーンの検出には電気電導度検出器やUV検出器が使用され、エレクトロフェログラムは時間軸に対して記録され、各ゾーンの長さ（検出器通過時間）が定量の指標となる。従って通常電気浸透流が存在しない状態で電気泳動を行なう。

図4はアンモニアイオンをリーディングイオン、2,4,6-トリメチルアニリンをターミナルイオンとした時のNaとLiの等速電気泳動分離のシミュレーションである。両者の混合ゾーンが次第に解消してゆき分離が完了する様子がわかる。

5. ITPの再現性に影響する因子

一般にITPの再現性は定性・定量とも非常に高い。これはITPでは試料自体の特性が定常状態に反映されにくいためである。その理由は濃度調整効果にあり、等速電気泳動するゾーン中の試料成分の濃度は注入試料の濃度には無関係に一定になるためである。ただしこの効果は無条件に期待できるわけではない。最も重要な制約はpHであり、試料のpHは3～11程度であることが望ましい。更にpHが低いと試料中の H^+ が等速電気泳動平衡を妨害することがある。

ある移動度差の試料の分離に必要な電気量は試料の量に応じて決まっている。試

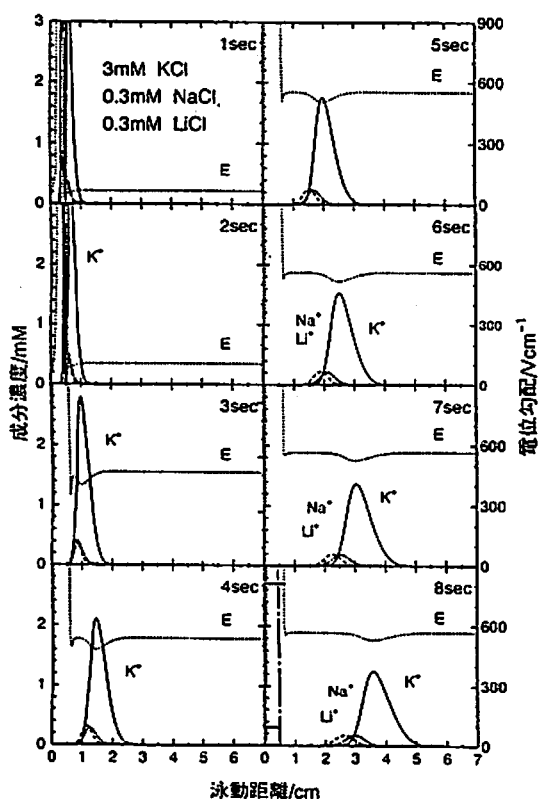


図3 K, Na, Li混合試料のCZE分離と局所的電位勾配（シミュレーション）
30mM クレアチニン-酢酸バッファ

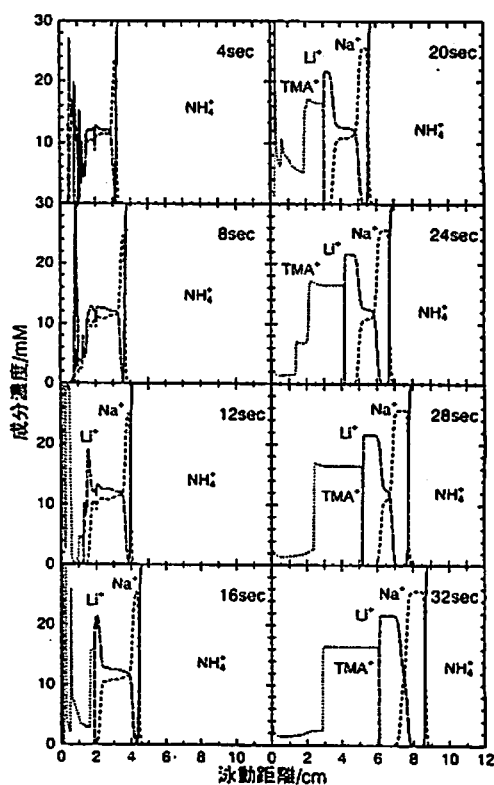


図4 Na, Liの等速電気泳動分離（シミュレーション）

料が過負荷になると不完全分離状態になり混合ゾーンが残ったまま検出器に達する。このような場合あたかも新たに別の成分が存在するかのようなフェログラムを与える事がある他、定量誤差の原因になるので注意が必要である。

図5は図1と同じイオン吸着型鉍石の溶解試料(2 g/l)のイソタコフェログラムである。図6にはゾーン通過時間の試料注入量依存性を示した。使用した検出器は高周波電導度検出器でキャピラリー内径は0.32mmである。例えば図6でPrのゾーン通過時間をみると8 μ lのあたりで急に折れ曲がっている。それに対してNdのゾーンは同じ注入量付近から直線よりはずれる傾向にある。これはPrとNdの混合ゾーンがPrゾーンと同じ階段の高さあたりに生じ区別が付きにくいことを意味している。ITPの場合絶対感度がnmolと低いので過負荷になりやすく、誤差の原因となるので注意を要する。極微量であっても分離は行われているがゾーンを形成するほど長くないものは通常の検出法では検出できない。図6には分取フラクションをオフラインでPIXE分析した結果についても示した。ゾーンとしては確認できないEu、Tb、Luなどが確認できた。

6. まとめ

試料プラグの電位勾配の緩和現象を含め、CZEの定性定量に影響する因子を表1にまとめた。定電圧モードにおける電位勾配の緩和現象はそれ以外の因子を取り去ったとしても原理的に残る因子である。ITPはもちろんのこと、CZEでも定電流駆動が通常であるべきである。表1の実験的な因子については触れなかったが、注意深い実験により最小限に抑えることが可能である。

最後に、CZEに比べITPの感度は低いが比較的高濃度の試料にはもっと使用されて良い方法である事を強調したい。ITP分析装置としては現在スロバキア製(Villa Labeco)の装置がMerckブランドで購入できる。また最近ITP-MSとして使用されはじめている点も注目される。

キャピラリー電気泳動における移動指標の再現性について

(近畿大・薬) ○本田 進、笹岡 功、柴田史子、多賀 淳

Reproducibility of Migration Indices in Capillary Electrophoresis

Susumu Honda, Isao Sasaoka, Noriko Shibata, and Atsushi Taga
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

SUMMARY: The influences of various factors on migration time, relative migration time, electrophoretic mobility, relative electrophoretic mobility, time of electrophoretic migration and relative time of electrophoretic migration in capillary electrophoresis were discussed based on obtained data. Relative time of electrophoretic migration with relevant internal standard(s) gave the smallest RSD. Expression by this index will make non-authentic specimen identification practical.

はじめに

キャピラリー電気泳動は分離および検出において他に追従を許さない高性能を示すが、移動時間の再現性に関する限り大きな問題を抱えている。言うまでもなくこの問題は電気浸透流の不安定さに起因しており、これを論ずるにはハード面とソフト面の両面から考えなければならない。キャピラリー電気泳動は最近ハード面において長足の進歩を遂げ、キャピラリー温度や印加電圧の調節による電気浸透流の制御はほぼ到達すべき点まで達したといえる。しかし、キャピラリー内面の恒常性維持の困難さや試料溶液中の共存物の影響などむしろソフト面からくる電気浸透流の変動を制御することについては未解決部分が多く、これがキャピラリー電気泳動の本質的な弱点となっている。

そこでキャピラリー電気泳動の本質的な問題として再現性の問題がシンポジウムテーマとして取り上げられたこの機会に、移動指標の再現性について基本的な考え方について討論を行いたい。

実験

キャピラリー電気泳動は種々の市販および手製の装置を併用して行った。キャピラリーには主として内径 $50\mu\text{m}$ のフューズドシリカ管を用いた。モデル物質、中性マーカーおよび内部標準にはすべて市販の特級品を用いた。試料溶液はイオン交換後ガラス容器で蒸留した水を用いて調製した。

結果・考察

移動時間に関する考察 キャピラリー電気泳動の基本分離モードであるゾーン電気泳動においては、移動速度 (v) は電気浸透流速 (v_{eo}) と狭義の電気泳動速度 (v_{ep}) の代数和であり、これらはともに電場の強さ (E)

や泳動液の粘性率 (η)、誘電率 (ϵ) などに支配される。また、 v および v_{ep} はそれぞれキャピラリー内壁/泳動液間および試料成分イオン/泳動液間のゼータ電位 (それぞれ ξ_1 および ξ_2) に依存する。さらに v_{ep} は成分イオンのサイズや形状の関数 $f(\kappa a_1)$ によっても影響される。このように成分イオンの移動速度 (v) あるいはそれと逆数関係にある移動時間 (t) は E 、 η 、 ϵ 、 ξ_1 、 ξ_2 および $f(\kappa a_1)$ によって決定されるので、 v や t の再現性はこれらの各因子の再現性にかかっている。本演題においてはこれらの各因子の再現性について得られた若干のデータを示しかつその解析を行う。

移動指標としての移動時間の限界 上述のように移動時間 (t) は種々の因子に支配されるが、電源装置の性能向上により E の相対標準偏差 (RSD) を 0.1% 以内に収めることは比較的容易であると考えられる。一方、温度が泳動液の物性に与える影響は比較的大きく、キャピラリーオープン温度の制御が表示温度の $\pm 1^\circ\text{C}$ 以内であれば、同一泳動液を用いる場合 ϵ および η の RSD は通常 0.5~1% であると推定される。

これらの因子の再現性にくらべ ξ_1 の再現性は試料溶液の導入状況によって大きく変わる。標準試料ではキャピラリー洗浄が適正であるかぎり実用分析には十分な低い RSD が得られるが、生体試料などでは RSD がきわめて大きい場合がある。移動時間を指標にするかぎりこの問題を解決することは容易でない。

その他の移動指標 移動時間 (t) に替わって標準物質に対する相対移動時間 (t_{rel}) が考えられる。標準物質に対する比であるため変動は比較的少ないが、分母分子両方が ξ_1 に依存する点では、 t と同様な原理的な問題をはらんでいる。一方、電気泳動移動度 (μ) は電気泳動本来のインデックスとして理論的な裏付けを持っている。変動の特に大きい ξ_1 を含んではないが、 η と ϵ の関数ではある。實際上 μ 値の大きな成分の μ_{ep} は低い RSD 値を与えるが、 μ の小さい成分では当然のことながら RSD 値は大きくなる。この欠点を補うには、標準物質に対する相対移動度 ($(\mu_{ep})_{rel}$) をとるとよい。この場合標準物質の μ_{ep} が目的成分の μ に近いことが望ましいことは当然のことである。 μ の小さい成分においては、標準物質の選び方が適切でないと、却って RSD が増加する場合さえ観察される。相対電気泳動移動時間 ($(t_{ep})_{rel}$) は $(\mu_{ep})_{rel}$ の裏腹になるインデックスであり、 $(\mu_{ep})_{rel}$ と同様に有用である。

無標品同定の可能性 $(t_{ep})_{rel}$ は標準物質の選択が適正であれば、他の分析法ではみられないほどのきわめて低い RSD 値を与える。このことを利用すれば、標品との比較を必要としない、データベースのみに基づく同定が可能であると考えられる。例えば、RSD が 0.1% で $t/t_0 = 5$ の場合、 t ならびに隣接ピークの分離度 (R_s) には約 0.4% の変動をもたらすことになる (例えば R_s 1.25 $\rightarrow$ 1.245)。この程度の分離の悪化は無視できる程度であり試料成分が誤同定される確率はきわめて低い。

キャピラリー電気泳動法による遺伝子分析の再現性について

○角田 ちぬよ、馬場 嘉信、津波古 充朝（神戸薬科大学）三木 哲郎、
荻原 俊男（阪大医）

Repeatability of Gene Diagnosis Using Capillary Electrophoresis

Chinuyo Sumita¹, Yoshinobu Baba¹, Mitsutomo Tsuchiko¹, Tetsuro Miki² and Toshio Oghara²

¹Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, Motoyama, Kitamachi, Higashinada, Kobe 658, Japan, and ²Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan.

We investigated repeatability of gene analysis using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector (CE-LIF) in entangled polymer solution. In this study, Apo E gene, (CA)_n repeats and PCR products (100, 105, 300, 310, 485 and 500 bp) were used as samples. RSDs of relative mobility from Apo E gene and (CA)_n repeats were 0.1-0.6%. RSD of relative migration time from PCR products was below 0.3% by rinse with ethanol between each measurement.

はじめに

最近の分子生物学的手法のめざましい発展により病気の原因となる遺伝子があいついで発見され、その遺伝子の解析による遺伝子診断も多数行われるようになってきている。そこで遺伝子解析をより早く、正確に行うことが急務となっている。従来、遺伝子の分析には薄層のスラブゲル電気泳動法が用いられてきたが、ヒトゲノムからのDNAサンプルが微量であり検出感度の改良が必要な事、より短時間で分析できる事等の点で、従来法に変わりキャピラリーを用いた電気泳動法が開発された。キャピラリー電気泳動法はサンプル濃度が希薄で少量でも分析が可能であり、また一回の分析に数分から数十分しか必要としない。キャピラリー電気泳動法によるDNA分析はそのDNAフラグメントの長さ及び長さの差により様々な測定条件が検討されており、分析法そのものは確立されてきている。そこで次の段階として分析の再現性についての検討を行った。

実験

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子(株)との共同研究により開発したキャ

ピラリ電気泳動レーザー蛍光検出システム(CE-LIF)を使用した。キャピラリーはPolymicro Technologies 社製 (375 μm o.d., 100 μm i.d.) のカラムを非架橋ポリアクリルアミドで内壁処理し、セルロース誘導体溶液にインターカレートダイとしてYO-PRO-1を加えた溶液を充填して用いた。サンプルはヒトゲノム由来のCAリピート多型、ApoE遺伝子多型及び市販のPCRキットを用いて生成させた6種類の長さのフラグメントを使用した。それぞれの分析について移動時間、移動度、相対移動度のRSDを求め、その再現性について検討した。特に、6種のフラグメントの分析については再現性の改良を目的として、測定毎にキャピラリー内をエタノールで洗浄しバッファーを充填し直した。サンプルは電氣的に注入した。緩衝液はトリスーホウ酸溶液を用いた。

結果と考察

ApoE遺伝子多型の分析では移動時間と移動度については4~7%のRSD値となり再現性は良くなかった。この分析の場合約100 bp長さまでのDNAフラグメントの分析が必要であり、4~7 bpの誤差があると長さの差が小さい場合移動時間が逆転する事がある。そこで150 bpの内部標準との相対移動度を求めた。するとRSD値は1%以下となり再現性は大きく改善された。またCAリピート多型は111,117,119 bp長さのサンプルで内部標準として100と150 bpを加えて分析を行ったところ、ApoE遺伝子の分析よりも少しRSD値の改善が見られた。さらに再現性の改善の為に、測定毎にキャピラリー内をエタノールで洗浄しバッファーを再充填し分析を行った。サンプルは100, 105, 300, 310, 485, 500 bpの6種類の長さのフラグメントをPCR法により得た。この方法での分析結果のRSD値は移動時間では0.65%以下、相対移動時間では0.26%以下となった。この事から測定毎にエタノール洗浄を行うことで再現性の改善が可能であることが明らかとなった。

DNA size (bp)	migration time (min)	RSD (%)	relative migration time	RSD (%)
100	11.74	0.48	0.875	0.26
105	11.78	0.48	0.878	0.29
300	13.41	0.65	1.000	-
310	13.48	0.63	1.005	0.10
485	14.58	0.65	1.087	0.08
500	14.65	0.65	1.092	0.09

キャピラリー電気泳動によるヒトゲノムの繰り返し配列解析の再現性

○西村明子、馬場嘉信、津波古充朝（神戸薬科大学）、三木哲郎、荻原俊男（阪大医）

Repeatability of migration time in the analysis of repeated sequence on human genome by capillary electrophoresis

Akiko Nishimura¹, Yoshinobu Baba¹, Mitsutomo Tsuhako¹, Tetsuro Miki², and Toshio Ogihara².

¹ *Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University*

² *Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School*

The apoB VNTR alleles containing larger repeat units is a risk factor for heart disease. To determine the precision of the CE system, we examined repeatability for migration times in the analysis of *APOB* and *D1S80* VNTR loci. The RSD value for migration time of *APOB* was about 2.0%, for mobility was about 3.0%, and for relative mobility was about 1.0%. These result demonstrated that CE is a useful method for precise genotyping of *APOB* and *D1S80* DNA sample.

はじめに

心臓病の原因遺伝子であるapoB遺伝子のVNTR部分の繰り返し回数を決定することにより、遺伝子診断が可能となる。繰り返し回数を決定するために、100bp DNA ladderとPCRで増幅した500bpのフラグメントを用いた。そこで両者を混合したサンプルの再現性を検討した。またapoB遺伝子のVNTR部分をPCRで増幅したものについても再現性を検討した。さらに、法医学の分野で個人識別や親子鑑定などに用いられるD1S80 DNA マーカーについても再現性を検討し、その繰り返し部分の繰り返し回数を決定した。

実験

キャピラリー電気泳動装置は、レーザー蛍光検出装置付ベックマン製P/ACE 2050, パーキン-エルマー製 Model 270A, ヒューレットパッカード製HP^{3D}CEを使用した。キャピラリーは、J&W製 DB-17 を使用し、キャピラリーにはセルロース誘導体溶液（50 mM トリスーほう酸、0.5 % メチルセルロース、0.1 μM

160-270 V/cm ② メタノールに溶解した試料の
 10-17 μA 平均値は 1.5

YO-PRO-1)を満たして用いた。サンプルは、PCR (パーキン-エルマー製 Gene Amp PCR System 2400) により増幅したDNAを用いた。PCRの際に用いるプライマーは、ミリジェン製 Cyclone Plus DNA 合成装置で合成した。測定温度は 30℃で、注入は電氣的に 150 V/cm で 30 秒行った。検出は、レーザー蛍光検出 (Ex.: 488 nm, Em.: 560 nm) で行った。

③ 分離された DNA は、100bp DNA ラダーと比較した

結果

アポリポ蛋白B(APOB)は、第2番染色体の短腕に遺伝子座位がある。この遺伝子の3'末端側に16塩基対のオリゴヌクレオチド繰り返し配列(VNTR)が存在し、高い多型性を有する。一般にAPOBのVNTR部分は、25~52回の繰り返し配列を有している。APOBの多型を解析するために、まずDNA分子量マーカーである100bp ladderとPCRで増幅した500bpを混ぜたものの再現性を検討した。セルロース濃度、電場、キャピラリー有効長などの解析条件の最適化をおこない条件を決定した後、9回測定し、平均移動時間、平均移動度、500bpに対する相対移動度を求め、それぞれの相対標準偏差(RSD)を求めた (Table 1)。さらにAPOBについても調べたところ、同様の結果が得られた。次にDNAマーカー、D1S80についても再現性を調べた。D1S80は第1番染色体の短腕に遺伝子座位が存在し、16塩基対の繰り返し配列をもち、人によって繰り返し回数が異なっているため、法医学の分野で個人識別などに用いられる。APOBの場合と同様に解析条件を検討した後、9回測定し、平均移動時間、平均移動度、500bpに対する相対移動度を求め、それぞれの相対標準偏差(RSD)を求めた。その結果、キャピラリー電気泳動によりヒト遺伝子のVNTR多型を正確に解析できることがわかった。

Table 1 Repeatability (n=9) of migration time, mobility, and relative mobility for DNA fragments of 100bp DNA ladder

DNA size (bp)	migration time (min)	RSD(%)	mobility (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	RSD(%)	relative mobility	RSD(%)
100	15.92	2.13	3.49x10 ⁻⁴	2.36	1.288	0.89
200	17.04	1.74	3.25x10 ⁻⁴	2.25	1.204	0.62
300	18.25	1.77	3.04x10 ⁻⁴	2.37	1.122	0.56
400	19.40	1.85	2.86x10 ⁻⁴	2.50	1.056	0.58
500	20.46	2.11	2.71x10 ⁻⁴	2.86	1.000	-
600	21.29	1.98	2.60x10 ⁻⁴	2.50	0.961	0.29
700	22.02	1.89	2.51x10 ⁻⁴	2.63	0.930	0.24
800	22.63	1.80	2.45x10 ⁻⁴	2.56	0.904	0.35
900	23.12	1.72	2.39x10 ⁻⁴	2.51	0.884	0.47
1000	23.53	1.65	2.35x10 ⁻⁴	2.45	0.869	0.87

MEKC の擬似固定相としての高分子量界面活性剤と SDS との再現性の比較

○山口拓哉、大塚浩二、寺部 茂
姫路工業大学理学部

Difference in Reproducibility between High-Molecular-Mass Surfactants and SDS as Pseudo-Stationary Phases in MEKC

○ Takuya Yamaguchi, Koji Otsuka, and Shigeru Terabe
Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12 Japan

The purpose of this study is to evaluate high-molecular-mass surfactant (HMMS) as the pseudo-stationary phase in MEKC from viewpoints of reproducibility of the migration time and peak area. Butyl acrylate-butyl methacrylate-methacrylic acid copolymer (BBMA) was employed as the molecular micelles and five components in cold medicine, acetaminophen, caffeine, ethenzamide, guaifenesin, and isopropylantipyrine as analytes. SDS is also employed as a pseudo-stationary phase to evaluate the difference.

1、はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) おいて、定量性の基礎となる試料の移動時間および試料のピークの面積・高さの再現性を向上させることは非常に重要な課題である。ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) では分子集合体であるミセルを擬似固定相に利用して分析を行う。従来から用いられる硫酸ドデシルナトリウム (SDS) などの低分子量界面活性剤ではミセルの正味の濃度は界面活性剤濃度から臨界ミセル濃度 (CMC) を差し引いたものに等しい。試料はミセルと水相との間で分配されるため、その移動時間はミセル濃度に依存する。CMC は溶液の温度、塩濃度、添加剤などによって変化するので、ミセル濃度はこれらの因子に依存する。MEKC において高い再現性を得るためにはミセルの濃度を一定に保つことが必須である。一方、共有結合で結ばれた高分子量界面活性剤 (HMMS) は分子ミセルを形成し、そのミセル濃度は界面活性剤濃度に等しく、溶液の温度や pH、塩濃度の変化に対してより安定である。

そこで、HMMS を用いる MEKC の性能を評価するため、HMMS 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) を擬似固定相に使い、SDS を用いる MEKC と比較して試料の移動時間及びピー

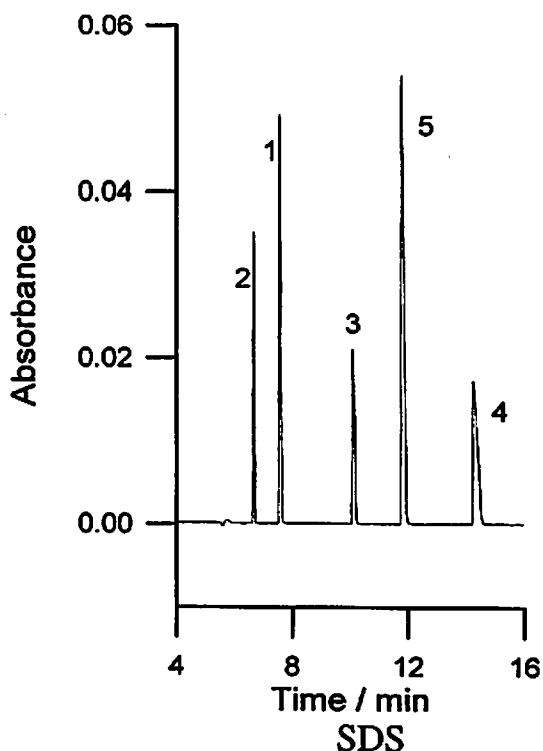
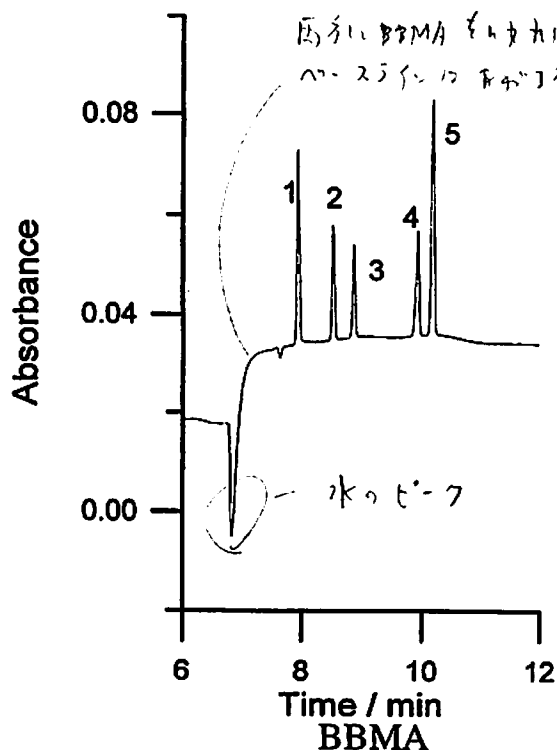
ク面積の再現性の相違について検討した。

2、実験

キャピラリー電気泳動装置には Beckman 製 P/ACE System2000、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 57 cm、有効長 50 cm) を用いた。印加電圧は 15.0 kV、検出波長は 214 nm、キャピラリーの温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ で実験を行った。泳動液は pH8.0 のホウ酸塩 - リン酸塩緩衝液に BBMA 及び SDS を溶解して用いた。試料は風邪薬成分であるカフェイン、アセトアミノフェン、グアイフェネシン、エテンザミド、イソプロピルアンチピリンをメタノール - 水に溶解して用いた。

3、結果・考察

それぞれの界面活性剤溶液において、成分濃度の異なる試料溶液を分離したときにエテンザミドに対する他の 4 種類の試料の相対ピーク面積の標準偏差 ($n=10$)、及び 5 種類の試料の相対移動時間 (t_R/t_0) の標準偏差 ($n=10$) を求めた。相対ピーク面積に関して、試料の濃度が低い場合は SDS を用いたときに良い結果が得られた。しかし、試料溶液の濃度が高い場合は、高分子量界面活性剤である BBMA を用いたときに、SDS を用いた場合と同等の結果を得ることができた。相対移動時間に関して、試料溶液の濃度の変化に関わりなく、BBMA を用いたときに、SDS を用いた場合と同等の良い結果を得ることができた。



1.Caffeine, 2.Acetaminophen, 3.Guaifenesin, 4.Isopropylantipyrine, 5.Ethenzamide

キャピラリー電気泳動の電気インジェクション法における直線性の検討 (III)

-----各現象の数学的考察-----

○佐々木秀輝、米久保淳 (日本ウォーターズ K.K マーケティング部アプリケーションラボ)

The Relationship between Linearity and Total Amount Introduced by Electromigrative Injection

-----Theoretical Study of each Phenomena-----

○HIDEKI SASAKI, JUN YONEKUBO (NIHON WATERS K.K Marketing Application-Lab)

[Summary]

The relationship between linearity and total amount introduced by electromigrative injection were theoretically studied .Every phenomena that changing the parameter (injection Voltage , sample concentration , Reputation Number from same vial , sample Volume poured a vial , and sample contents) give non-linear curve , were theoritically explained by substituting equivalent conductance of each sample solutes for the formula publishedby J.D.Rose et.al .Quantitively more collect method was established that is to add some materials that increase equivalent conductance into sample solution , and to take standard adding method .

[緒言]

キャピラリー電気泳動の試料導入法の1つである電気インジェクション法において、注入量を変化させると考えられたパラメータ、即ち注入電圧、サンプル濃度、同一バイアルからの繰り返し注入回数、サンプルボリューム、及びサンプルの組成を変化させ、それぞれ得られるレスポンスが理論式とどの様な関係を持っているのかを検討し、分析精度をより向上させる方法について検討した。即ち、サンプル溶液中に電気伝導度を引き上げる塩類などを添加し、標準添加法を用いて分析することで直線性を高めることが出来る。

[数学的考察]

式(1)は1988年ドナルト J.ローズ等によって発表された電気インジェクション法の注入量を求めるための式(1)である。

$$Q_i = (\mu_i + \mu_{EOF}) \pi r^2 V t C_i / L_i \dots \dots \dots (1)$$

Q: Amount of injected ion-i

μ_i : Electrophoretic mobility of Ion-i

μ_{EOF} : Electrophoretic mobility of carrier electrolyte

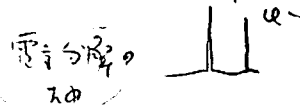
V: Applied Voltage at Injection

t: Injection time

C_i : Concentration of ion-i

L_i : Capillary length

(I) 注入電圧: Responseとは直線関係、ただし高電圧側ではサンプルの電気分解により、注入量は直線から外れて低くなる。



(II) サンプル濃度：両対数を取った後、3次の曲線で近似される。式(1)に $\mu_i = \lambda_i / \Lambda_{eq} F$ を代入することにより、 $Q_i = d / (aC_i + b)$ となることから (a, b, dは定数)、高濃度側での飽和現象が説明される。また、低濃度側ではコールラウシエの経験式： $\lambda_i = \lambda_i^\infty - a\sqrt{C_i}$ を代入することにより、 $Q_i = (a - b\sqrt{C_i}) C_i / e (aC_i + b)$ となり、 $\sqrt{C_i}$ の2分の3次式になる。さらに、弱イオンの場合では $\Lambda_{MA} / \Lambda_{MA}^\infty = \alpha$ の関係が成立するため、強イオンのものより緩やかな曲線となる。

(III) 同一バイアルからの繰り返し回数： μ_i の項の分だけ試料が薄くなって行く為、後にインジェクションしたものほどResponseは等比級数的に減少する。 μ の変化が濃度の変化に比べて非常に小さいことから、 μ を定数項扱いすると、n回目にインジェクションされるサンプルの濃度は $C_{i-n} = C_{i0}$

$(1 - \mu \pi r^2 V_i / \Lambda_i)^{n-1}$ 但し、 $\mu_{i1} = \mu_{in-1}$ となり、等比級数となる。

(IV) バイアルに入れるサンプルの量：サンプリング開始点と終了点でのサンプル濃度の差を考え、 $dQ = -a Q/V \cdot dt$ と置くと、 $V \rightarrow \infty$ のとき $Q_{TTL} = C_0 a t$ 但し、aは正の定数、となり Q_{TTL} は濃度と時間に比例した一定値に向かって、指数的に収束する関数となる。

(V) サンプル組成：他の成分の濃度は変えずに、1つの成分の濃度だけを変えた場合では、(II)の式に、 $\Lambda_{eq} = \sum C_i \lambda_i$ を代入することにより、同様な結果を得る。

(VI) サンプルの電気伝導度を引き上げるような塩類を十分に加えた場合： μ_i の項が無視できるほど小さくなるため、 $Q \Rightarrow (0 + \mu EOF) \pi r^2 V_i \mu C / \Lambda$ となり、濃度に関しての1次式となる。

[まとめ]

以上のような結果から、試料中に含まれる夾雑成分の濃度変化の影響を受ける無機アニオンのような成分を定量する場合には、試料溶液のモル導電率を引き上げ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事で定量性を高めることが可能であると考えられた。

[参考文献]

- (1) D.J.Rose and J.W.Jorgenson, Anal.Chem. 60,642(1988)
- (2) W.R.Jones and P.Jandik, J.Chromatogr.546,445(1991)
- (3) G.Bondoux, P.Jandik, and W.R.Jones, J.Chromatogr.602,79(1992)
- (4) M.Merion, R.H.Aebersold, and M.Fuchs, Poster Presentation, HPCE'91, San Diego(1991).
- (5) M.Swartz and M.Merion, Poster Presentation, HPCE'92, Amsterdam(1992)
- (6) X.Huang, M.J.Gordon, and R.N.Zare, Anal.Chem.60,377(1988)
- (7) X.Huang, T.K.Pang, M.J.Gordon, and R.N.Zare, Anal.Chem.59,2747(1987)
- (8) A.Guttman, and H.E.Schwartz, Anal.Chem.67,2279(1995)
- (9) H.Sasaki, J.Yonekubo, Y.Takahashi, SCE'93, Japan, 17(1993)
- (10) H.Sasaki, J.Yonekubo, M.Suzuki, Y.Takahashi, SCE'94, Japan, 25(1994)
- (11) H.Sasaki, J.Yonekubo, et al, J.Environm.Chem.3.2.428(1993)

キャピラリー電気泳動 (CE) における無機アニオンの 定量分析と電気的導入法について

○佐藤康博, 笹一志, 丸山敏彦, 北岸恵子 (大塚電子株式会社)

QUANTITATIVE ANALYSIS FOR INORGANIC ANIONS BY ELECTRO- KINETIC SAMPLE INJECTION IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS.

Yasuhiro Sato, Katsushi Sasa, Toshihiko Maruyama, Keiko Kitagishi
(OTSUKA ELECTRONICS CO., LTD)

Electrokinetic sample injection is the useful method for analysis of diluted inorganic anions solution as detection sensitivity can be enhanced owing to concentration effect of inorganic anions. As far as quantitative analysis is concerned, however, this concentration effect tends to be substantially changed, depending upon the components and their concentrations in sample solution, so that the relationship between inorganic anions density and peak area get complicated.

Four kinds of inorganic anions (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , NO_3^-) were measured using electrokinetic injection method in order to evaluate the concentration effect.

(緒言)

キャピラリー電気泳動では、サンプル導入法として電気泳動法を用いると、塩濃度の低いサンプルにおいてサンプルゾーンの濃縮が起こる。しかし、電気的導入法は、サンプル溶液に複数のイオン種が含まれる時、「イオン種によってその注入量が増加する」、「注入量がサンプル溶液の成分に左右される」などの点から定量性に疑問が持たれる。

今回は、4種類の無機アニオン (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , NO_3^-) について電気的導入法により測定をおこない、サンプル中に含まれる成分によって注入量がどのような影響を受けるか検討し、定量的な取扱いについても考察した。

(実験)

キャピラリー電気泳動装置は大塚電子社製 CAP1-3100 を用いた。キャピラリーは大塚電子社製の内径 $75\mu\text{m}$ 、有効長 60cm の合成シリカ製を用いた。

測定に使用した Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , NO_3^- の各標準溶液は和光純薬製を使用した。

泳動バッファ-は電気浸透流を反転させるために α -TTAB2 (大塚電子分析キット) と吸収剤であるクロム酸を添加したものを使用した。

無機アニオンの成分の検出はクロム酸の最大吸収波長である 275nm でマイナスピークとしてインダイレクトUV法によりおこなった。

$$\text{相対電荷} = \frac{\text{イオンの移動距離}}{\text{イオンの移動距離の合計}} \times 100$$

(結果) ストリーク イオン移動距離も移動距離 (F⁻と)

無機アニオン4種類 (Cl⁻, SO₄²⁻, NO₂⁻, NO₃⁻) の各10ppm混合溶液をサンプルとして落差法により測定したフェログラムを Fig.1 に、各10ppbの4種類の混合サンプルについて電気的導入法により測定したフェログラムを Fig.2 にそれぞれ示す。

電気的導入法を用いるとイオン種の濃縮効果によって10ppb程度の希薄なイオン濃度においても検出が可能となり、落差法の場合と比較するとCl⁻では最大1000倍程度に相当した。4種類のイオン種のピークエリアについてそれぞれ比較すると、電気的導入法では濃縮効果はCl⁻ > NO₂⁻ > SO₄²⁻ > NO₃⁻ と移動度の大きい順にはならなかった。この原因としては、4種類のイオン種の分離に参与している泳動バッファー中の成分が影響しているためではないかと考えられる。

この測定における4種類のイオン種についてそれぞれ検量線を作成すると、100ppb以下の希薄なイオン濃度においては良い直線性を示した。しかし、100ppb以上の濃度領域では検量線は直線で近似できなかった。100ppb~10ppmの濃度領域のサンプルについて4種類のアニオンの検量線の直線性を得るためには、5mM程度のNaOHのサンプル溶液への添加が有効であった。しかし、その反面、サンプルの濃縮効果が消失した。

さらに、各測定における注入再現性と定量性についても検討したので報告する。

アノードとカソード間の電圧

さらに、10ppbの4種類のイオン種の混合サンプルの検出限界を調べた

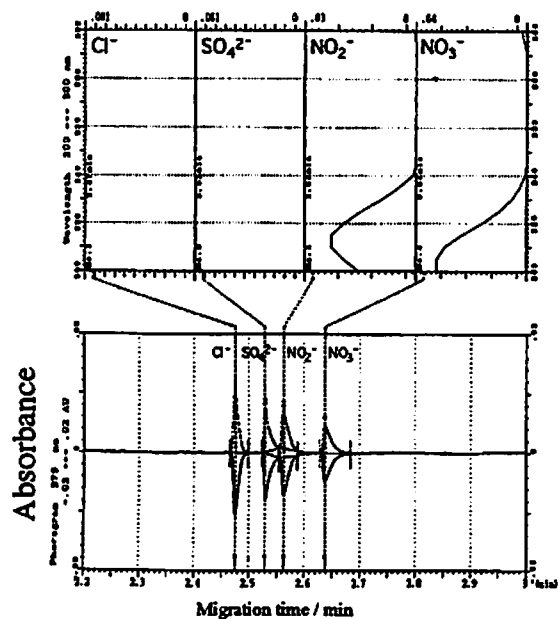


Fig.1 Electropherogram of inorganic anions (10ppm) by hydrostatic sample injection.

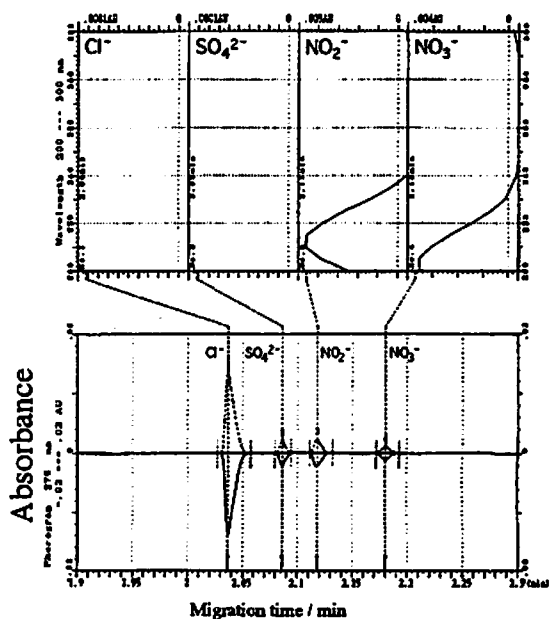


Fig.2 Electropherogram of inorganic anions (10ppb) by electrokinetic sample injection.

電圧と電流はほぼ一定で、10ppb程度の検出限界を調べた

ポリマー充填キャピラリー電気泳動による SDS-血漿タンパク質複合体のサイズ分離

○竹村 結花、大田 英人、真鍋 敬 (愛媛大・理・物質理学科)

SIZE-SEPARATION OF SDS-PLASMA PROTEIN COMPLEXES BY CAPILLARY GEL (POLYMER) ELECTROPHORESIS

Yuika TAKEMURA, Hideto OHTA, Takashi MANABE

Department of Material Science, Faculty of Science, Ehime University

ABSTRACT

Electrophoretic conditions for size-separation of human plasma proteins by linear polyacrylamide-filled capillary electrophoresis have been examined. SDS-protein complexes of normal human plasma and of myeloma patient sera were separated according to their molecular mass in Tris-Tricine buffer or in Tris-glycine buffer. Monoclonal IgG peaks were clearly recognized in the separation patterns of myeloma serum proteins.

1. はじめに

我々は、これまでキャピラリー中に線状ポリアクリルアミド(Linear Polyacrylamide; LPA)を充填し、SDSで処理したタンパク質を分子サイズの違いで分離し、その分離能を向上させる条件を検討してきた。今回は、この条件をもとにヒト血漿タンパク質、及び骨髄腫患者血清タンパク質のサイズ分離を行った。また、検出感度の向上のために内径200 μ mのキャピラリーを用いた電気泳動条件を検討した。

2. 方法

2-1 試料

①Sigma社の精製タンパク質(cytochrome c, carbonic anhydrase, ovalbumin, albumin, apo-transferrin, 及び免疫グロブリンG; IgG), ②ヒト血漿, ③骨髄腫患者血清(IgG型)をそれぞれ4mg protein/ml, 2%SDSにしたもの

2-2 電気泳動

- ・電気泳動装置: P/ACE 2100(Beckman), CAPI-1000(大塚電子)
- ・キャピラリー: 溶融シリカキャピラリー
(内壁処理は、 γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilane/Methanolで処理後、線状ポリアクリルアミドを重合させる方法をとった)
- ・緩衝溶液: 0.1%SDSを含むTris-Tricine 緩衝液またはTris-glycine 緩衝液
- ・線状ポリアクリルアミド: アクリルアミドモノマーを緩衝液に溶解し、N.N.N'.N'-Tetramethylethylenediamine(TEMED)と過硫酸アンモニウムで重合させたのち、キャピラリーにガス圧またはマイクロシリンジで注入した。

3. 結果及び考察

Figure.1はそれぞれ(A)ヒト血漿タンパク質、(B)骨髄腫患者血清を同一条件で泳動した結果である。泳動時の電位勾配は200V/cm、内径75 μ mのキャピラリーを用いて225nmで検出している。約17分でアルブミンが、21分前後でIgGがそれぞれ検出された。正常ヒト血漿の数検体を泳動しピークの再現性を確認したのち、骨髄腫患者血清と比較すると、骨髄腫患者血清のIgG量が正常量に比べて明らかに高くなっていた。

また、検出感度向上のため内径200 μ mのキャピラリーを用いたところ、分離能を保持したままで高感度化ができることがわかった。電気泳動の最適条件の検討により、さらに泳動時間の短縮と分離能の向上が可能であると考えられる。

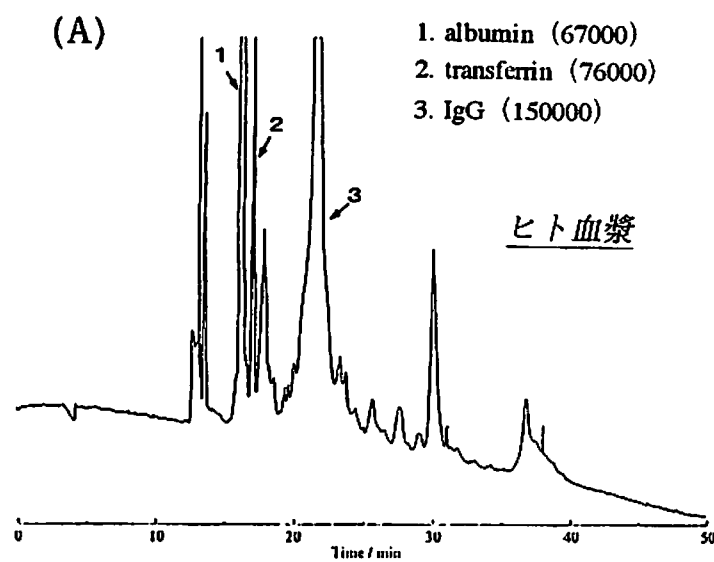


Figure. 1

Size-separation of plasma/serum proteins by LPA-filled capillary electrophoresis

(A) : SDS-human plasma

(B) : SDS-myeloma serum

Electrophoretic conditions

buffer : 0.05M Tris - 0.05M Tricine

LPA : 3.5%

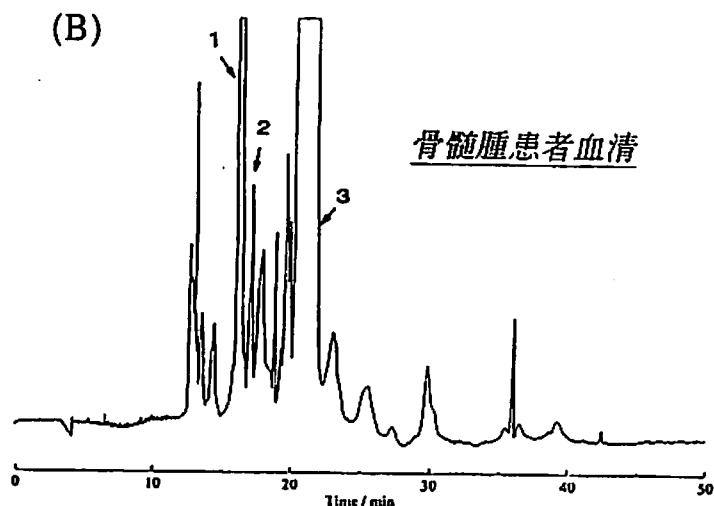
capillary : 50.0cm $\times$ 75 μ m i.d.
(30.0cm effective length)

sample : (A) human plasma
(B) myeloma serum
(4mg/ml, 2%SDS)

sampling : 200V/cm, 18sec

detector : UV (225nm)

electric field : 200V/cm



水溶液内イオン会合反応に基づく陰イオンのキャピラリー電気泳動分離とそのシミュレーション

たかなぎとしお わだ えいこ もとみずしょうじ

○高柳 俊夫・和田 栄子・本水 昌二 (岡山大学理学部)

Capillary Electrophoresis Separation of Anions and Its Simulation Based on Ion Association in Aqueous Solution

Toshio Takayanagi, Eiko Wada, and Shoji Motomizu

Faculty of Science, Okayama University

Monovalent and divalent aromatic anions were separated in capillary zone electrophoresis based on ion association reaction with quaternary ammonium ions. Ion association constants between organic cations and anions were determined by analyzing the electrophoretic mobility of the anions by a nonlinear least square method. The ion associability of divalent cations with divalent anions changed by the change in charge distance, which suggests a multipoint interaction. A simulation approach was also made to evaluate the ion association constants. The result indicates that even small difference in ion association constants can realize a significant separation of analyte anions.

1. 緒言

キャピラリー電気泳動法は一般にイオン性物質に対して非常に優れた分離性能を有する。しかし、同じ分子量・同一電荷を持つ構造異性体は移動度にあまり差がない場合が多く、それらの分離は難しい。このようなイオンに対し、水溶液内でのイオン会合反応は分離性向上の有用な手段となるが、平衡論的な考察はほとんど行われていない。本研究では、移動度の変化から非線形自乗法により芳香族陰イオンと第四級アンモニウムイオンとのイオン会合定数を決定し、さらに、官能基間の距離を解析し、会合性との関連について検討した。得られたイオン会合定数とクロマトグラフィーの理論的手法を用いて、相互分離のシミュレーションを行った。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置としては、Applied Biosystems 270A-HT を使用した。装着したキャピラリーには、シリカキャピラリー(GLサイエンス)と内壁をポリマーコーティングしたもの(CElect-N, SUPELCO)を用いた。イオン会合反応は、12種の芳香族陰イオンと、1価のテトラメチルアンモニウムイオン(TMA⁺)、テトラブチルアンモニウムイオン(TBA⁺)、2価のEt₃N⁺C_nH_{2n}N⁺Et₃(n=3,5,7)の5種の陽イオンとの間で検討した。泳動液としては、10mM リン酸緩衝液(pH 7.0)あるいは10mM ホウ酸緩衝液(pH9.2)を用い、上記の陽イオンを0~10mM添加した。電気泳動分離では、各陰イオンを1x10⁻⁵ M 含む試料をカソード側から減圧法により3秒間(約9 nl)注入し、25

kV で電気泳動を行い、230 nm で吸光検出した。電気浸透流は、3%エタノール溶液を用いて測定した。測定中、キャピラリーは 35℃ 恒温とした。各陰イオンの泳動挙動は移動度(μ_{ep})から解析した。

3. 結果および考察

(1) イオン会合反応を利用する陰イオンの電気泳動分離

イオン会合試薬として 1 価の TBA⁺ を用いたところ移動度に変化はみられたが、4 種類のナフタレンジスルホン酸、3 種類のナフタレンジカルボン酸全てを分離することはできなかった。そこで、2 価のイオン会合試薬について検討を行ったところ、良好な分離を得た。これは、電荷間の多点相互作用のためと考えられる。2 価のイオン会合試薬を用い、9 種類の陰イオンを分離した場合のフェログラムの一例を Fig. 1 に示す。

(2) イオン会合定数の決定とイオン構造との関係

陰イオンは対陽イオンとイオン会合することによって見かけの分子量が大きくなり、電荷が小さくなるため移動度は減少する。この場合、みかけの移動度 ($-\mu_{ep}'$) は以下の式(1)で表される。

$$-\mu_{ep}' = -\mu_{ep} \cdot \frac{1}{1 + K_{ass}[Q^{n+}]} - \mu_{ep} \Lambda \cdot \frac{K_{ass}[Q^{n+}]}{1 + K_{ass}[Q^{n+}]} \quad (1)$$

式(1)を適用し、非線形最小二乗法により、10 種類の 2 価陰イオンについてイオン会合定数 (K_{ass}) を求めることができた。

(3) 電気泳動分離のシミュレーション：今回得られたシグナルは対称性が良いので、正規分布に従う解析を行った。解析にあたっては、電気浸透流も考慮した。イオン会合反応を伴うイオンの移動時間 t と理論段数に基づくバンドの拡がり σ から、期待されるシグナル形状が求まる。2 種のシグナル A, B がある場合、1%の重なりを許容するには、以下の式(2)が適用される。

$$\frac{K_{ass,B}}{K_{ass,A}} = \frac{-4.66 + \sqrt{N(1-2.33/N)}[Q^{n+}]K_{ass,A}}{N(1+2.33/N)[Q^{n+}]K_{ass,A}} \quad (2)$$

解析の結果、微小なイオン会合性の差でも有意な分離が得られることが分かった (Fig.2)。

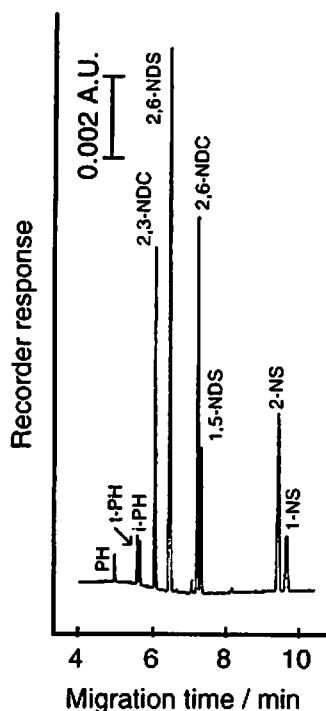


Fig.1 Electropherogram.
[Et₃N⁺C₃H₆N⁺Et₃] = 10 mM.

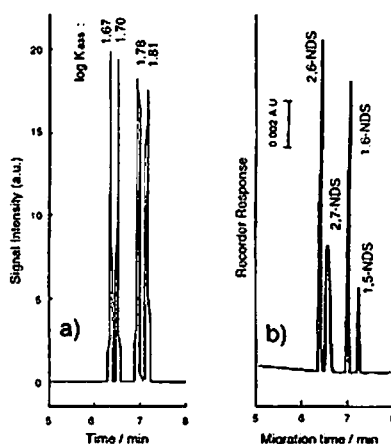


Fig. 2 Simulated and experimental pherograms.

[Et₃N⁺C₃H₆N⁺Et₃] = 10 mM.
a) Simulation; b) Experiment.

キャピラリー電気泳動におけるピークプロファイルの数値シミュレーション

○育田 夏樹、廣川 健

広島大学工学部応用理化学

Numerical simulation of peak profiles in capillary electrophoresis

Natsuki Ikuta, Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

It is the most important problem of capillary electrophoresis(CZE) that the reproducibility is much less than LC. In order to make it clear theoretically, we developed a simulation program and succeeded. The program tells that one of the reasons for less reproducibility of CZE is that potential gradient is depend on the time from start and constituents of a sample.

<緒言>

キャピラリー電気泳動法の問題とされている低い再現性は、試料の注入量、キャピラリーの内壁の性質や履歴などの問題として扱われることが多い。さらに、これらのコントロールの難しいファクターのみならず、原理的に泳動時間だけを定性指標とするには問題があるのではないかと考えられる。そこで、我々はキャピラリー電気泳動を記述する基本式から、特定のモデルを用いずにコンピュータによるシミュレーションによってピークのプロファイルを計算し、その時間変化からキャピラリー電気泳動の再現性について議論する。

<理論と計算>

1次元での電気泳動現象を考えたとき、生成・消滅がない条件では、イオン種 i の濃度分布 $C_i(x, t)$ は式(1)に従う。

$$\frac{\partial C_i(x, t)}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 C_i(x, t)}{\partial x^2} - \frac{\partial}{\partial x} \left\{ \left(\overline{m_i(x, t)} + m_{\text{eof}} \right) E(x, t) C_i(x, t) \right\} \quad (1)$$

$\overline{m_i(x, t)}$: イオン種 i の実効移動度 m_{eof} : 電気浸透流の移動度 (一定)

D_i : イオン種 i の拡散定数

また電位勾配は次の式で表される。

$$E(x) = \frac{V}{\int_L \frac{dx}{\left(\sum_i \left| \overline{m_i(x)} \right| C_i(x) + \left| m_{H^+} \right| [H^+](x) + \left| m_{OH^-} \right| [OH^-](x) \right)}} \times \frac{1}{\left(\sum_i \left| \overline{m_i(x)} \right| C_i(x) + \left| m_{H^+} \right| [H^+](x) + \left| m_{OH^-} \right| [OH^-](x) \right)} \quad (2)$$

コンピューターによるシミュレーションでは、すべての位置でのpH、実効移動度及び電位勾配を求め、式(1)に代入して差分法により数値計算を行った。一般に流れを表すための微分方程式を差分化すると数値拡散の影響を受けて、入力した拡散定数よりも大きく拡散することに注意を払わなければならない。

計算はすべてCPUにPentium 90MHzを持つIBM互換機を用い、Windows95上で動作するように言語はVisual C++ ver4.0を用いた。試料数6、計算セル数2000、泳動時間60秒を計算するのに約12時間を要する。

<結果と考察>

キャピラリーの全長40cm、印加電圧30kV、支持電解液にクレアチニン30mM、酢酸バッファーでpH4.8としたものを用い、試料としてアンモニア30mM、塩化ナトリウム3mM、塩化リチウム3mMを0.2cmのプラグ長を持つように注入した計算結果を図1に示す。(A)試料を水に溶かして注入、(B)試料を支持電解液で溶かして注入する条件での計算結果である。この結果から明らかに、試料の調製方法のみを変化させただけでも、アンモニアの泳動速度が異なっていることがわかる。これは(A)

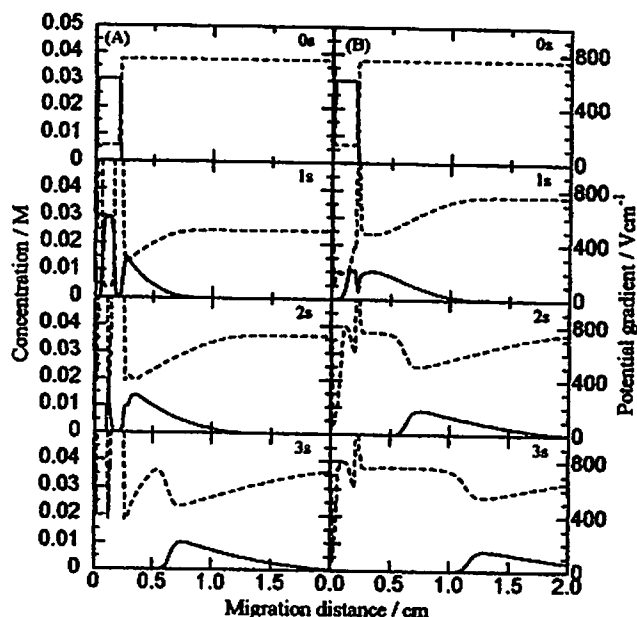


図1. アンモニア及び電位勾配の時間変化(シミュレーション)。実線はアンモニアの濃度、破線は電位勾配を示す。

では、注入したゾーンのカウンターイオンである塩化物イオンと支持電解液の酢酸イオンの移動度が異なるためその境界でのイオンの総和が減少する、従ってその数秒間注入プラグ付近の電位勾配が急激に上昇し、その他の部分の電位勾配は減少する。そのため、これまで一般的に用いられてきた泳動速度=実効移動度×電位勾配(=印加電圧/全長)と比べて泳動速度は遅くなる。一方(B)では電位勾配の上昇する領域が小さくなるために、(A)と比較して速く泳動する。しかしながら、(A)のような注入プラグ付近での濃縮効果がないためにピークの広がりが大きくなり、分離が悪くなる可能性がある。このように、我々が開発したシミュレーションプログラムにより、キャピラリー電気泳動にともなう様々な現象が容易に予測できるようになった。本講演では電位勾配の時間変化のほかに、初期濃縮効果、スタッキング効果およびシステムピークの再現性について議論する。

無担体分配電気泳動クロマトグラフ法

梶澤洋三、坂入禎宣

日本大学薬学部

Partition Electrochromatography

Yozo Kabasawa, Sadanobu Sakairi

College of Pharmacy, Nihon University

Partition electrochromatography (PEC), a new separation method based on the combination of electrophoresis effect with a counter-current partition technique, is established. PEC is performed in a horizontal rotating column. Two immiscible liquid phases are put into the separation column. When direct current voltage is applied across the column, each electrocharging substance in the column moves with a certain rate depending on its electrophoretic mobility and partition coefficient.

【緒言】本法は、分配の差を利用するだけでは分離が困難な物質に、電気泳動の差を加えてその移動度に差を付け、分離を達成しようとする。即ち、分配係数（比）と電気泳動度の相乗効果を期待して、これを調製レベルを目的として無担体で行う。分離管に上、下二液相を充填して水平に保って回転させ、両端に直流電圧をかけ電気泳動で物質を移動させながら、液・液分配のモードを組合せて実施する。

現在、基礎的な検討段階であるが、特長としては、移動させながら溶質を流出させること、担体（固体）を用いないので処理量が大きいこと、そして電荷を持つ顆粒への適用が可能なこと、などがあげられる。

第1報：分配・電気泳動クロマトグラフィーにおける酸性色素の挙動

日本化学会誌、1990, (12), p.1355～1359.

第2報：無担体分配電気泳動クロマトグラフィー

第2回クロマトグラフィーシンポジウム（名古屋）1996.6.30.

【装置】分離管；内径12mm、長さ100cmのガラス管の内側を、中央に約2mmの穴を開けたガラス板で12mm間隔に仕切り85個の隔室を作る。この管は中央と一端の隔室に試料注入口を有し、両端には内径5mm、長さ8cmの連結用ガラス管を取り付けた。分離管は水平に保った回転ローラーに乗せ、

長さ方向を軸に毎分約70回転させる。

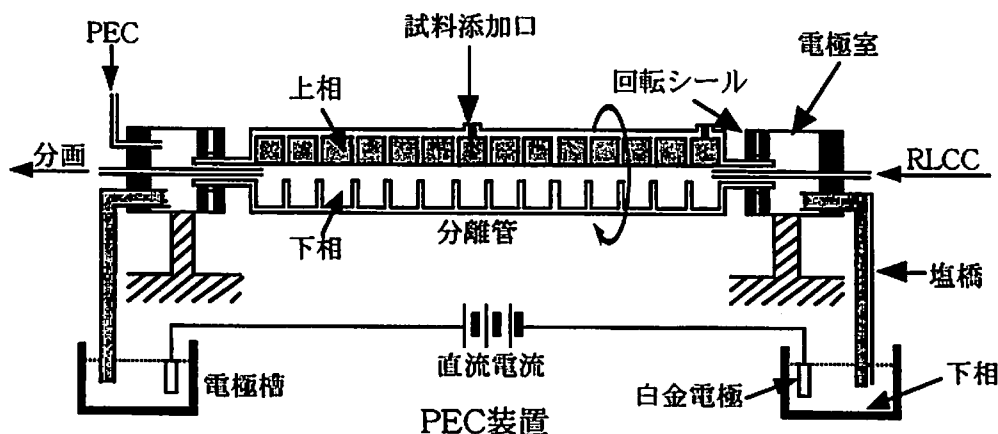
電極室；分離管の両端に、管内での気泡の発生を防ぐために回転シールを備えた電極室を取り付け、塩橋を介して加電圧装置と液絡する。外部から連結用ガラス管内に内径 1 mm、外径 2 mm のテフロンチューブを差し込み、移動してきた溶質を送り込んだ下相と共に流出させる。この電極室は固定されて回転はしない。

【実験】**液相の充填**；溶媒は1-ブタノール：緩衝液で、電極室と塩橋を取り付けた分離管を垂直に立て下端から下相を充填した後、分離管を回転ローラーに乗せる。次に一端のチューブを通して上相を送り、他端のチューブから流出するまで充填後、再び下相を同様に送液した管内の充填量は上相約34ml、下相は約50mlである。電極室および連結用ガラス管内に上相は充填されない。

分配電気泳動クロマトグラフィー (PEC)；分離管の中央に試料溶液数mlを添加し、数10mAの電流規制下で若干発熱する分離管を扇風機で空冷しながら実施する。電極槽液はpH変化を防ぐために両極槽液を混合して循環させた。陽極端の電極室に約0.2ml/分で下相を送り、同じ端のチューブからの流出液をフラクションコレクターに導き、30分/本の分画を行う。

回転ロキユラー向流クロマトグラフィー (RLCC)；加電圧装置をはずし、試料を分離管の一端に添加し、同じ端の電極室へ約0.2ml/分で下相を送り、他端のチューブから流出させて30分/本の分画を行う。

今回、酸性色素、DNP-アミノ酸およびアミノ酸の挙動について、PEC効果を考察する。



キャピラリーエレクトロクロマトグラフィーの固定相に関する検討

(浜松医科大) ○藤本忠蔵・櫻井政仁・藤瀬裕

INVESTIGATIONS ON THE STATIONARY PHASES FOR CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY

Chuzo Fujimoto*, Masahito Sakurai, and Yutaka Fujise

Department of Chemistry, Hamamatsu University School of Medicine

Monolithic columns are prepared for capillary electrochromatography. Monomer mixtures are polymerized in aqueous solution directly in a capillary to provide optically transparent gels. On the application of an electrical field, the gels generate electroosmotic flow (EOF) which transports uncharged compounds through the column. Several applications will be presented where components are separated on the basis of hydrophobic interaction. When 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid (AMPS) is introduced into the gels, the direction of EOF is toward the cathode; the direction of EOF is reversed by using [(*N,N*-dimethylamino)propyl]acrylamide or *N*-(2-acrylamidoethyl)triethylammonium iodide in the place of AMPS. Separations are compared between capillary liquid chromatography and capillary electrochromatography.

1. 緒言

キャピラリーエレクトロクロマトグラフィー（電気クロマトグラフィー，CEC）は最近になって多数の研究者の関心を呼び、飛躍的に発展してきた。CECはクロマトグラフィーと電気泳動の複合分析法と考えることができ、試料成分は分配と移動度の違いによって分離される。本来，エレクトロクロマトグラフィーは溶質が電荷をもっており，移動度が分離に寄与する場合に用いられるが，今日では電荷を有しない物質の分離も含めて，電場の中で行なうキャピラリー液体クロマトグラフィーを指すことが多い。通常の液体クロマトグラフィーに比べて高い分離性能は電気浸透流の栓流状の速度分布によるものである。これまでの研究は主として高速液体クロマトグラフィー用の充填剤をフューズドシリカキャピラリーに詰めた充填カラムを使用するものであった。本研究では，これに代わる方法として連続固定相からなるカラムを開発した。

2. 実験

装置は実験室で組み立てたもの（高圧電源，松定プレシジョンデバイセズ HCZE-30PN0.25；紫外吸光検出器，日本分光 875CE）を使用した。カラムはモノマー混合物をフューズドシリカキャピラリーカラム（GL サイエンス）内でラジカル重合することにより調製した。疎水基を有するモノマーを用い，*N,N*-メチレンビスアクリルアミドにより架橋した。電気浸透流を利用するために，2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸（AMPS），[(*N,N*-ジメチルアミノ）プロピル]アクリルアミド（tNAAm），*N*-(2-アクリルアミドエチル)トリエチルアンモニウム塩（qNAAm）のいずれかと共重合を行なった。フューズドシリカキャピラリーの内壁は重合液を導入する前に，メタクリル酸 3-(トリメトキシシリル)プロピルエステルまたは塩化チオニル/ビニルマグネシウムブロミドで処理した。試料注入は電氣的導入法により行なった。

3. 結果と考察

本研究で得られたゲルは，いずれも非粒子系の連続的な透明ヒドロゲルである。高圧液体ポンプで加圧してもキャピラリーチューブから押し出されることはなかった。しかし，高電場下で十分な電気浸透流を発生することができ，一定の電場強度の下で，その大きさは AMPS の濃度に依存した。幾つかの中性物質の混合物にこの手法を適用し，非常に高い理論段数を達成することができた。イオン性モノマーとして tNAAm や qNAAm を用いたとき，電気浸透流の方向は AMPS のときと逆になった。イオン性の試料混合物にも適用し，その分離挙動について考察した。

粒子充填カラムと比較して連続固定相カラムは次のような特徴をもっている。(1) フリット製作や充填操作が不要で，カラム作製が容易である。(2) 従来の LC では考えられなかった物質が固定相として使用できる。(3) フリットが存在しないため，カラムを任意の位置でカットできる。このため，試料中の夾雑物の吸着を洗浄操作なしに回避できる。(4) 粒子系カラムと異なり，カラムの径はいくら小さくてもよい。したがって，ウルトラマイクロ LC カラムとなり得る。(5) 粒子充填カラムの気泡の追い出しやコンデショニングに（あるいは分離にも）しばしば利用されている高圧液体ポンプが不要である。このことはカラムだけでなく，装置そのものをマイクロ化するのにも好都合である。それに伴い，ディスプレイブル高性能カラムとしての利用も可能になる。

電気クロマトグラフィー (23) イオン交換樹脂を用いる系について

辻 明, 渡辺弘和, 北川慎也, 津田孝雄 (名工大・工)

Capillary electrochromatography (23) -CEC using ion exchange supports-
Akira TSUJI, Kazyhiro WATANABE, Shinya KITAGAWA, Takao TSUDA
Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

Capillary electrochromatography using ion exchange supports under pressurized flow is demonstrated for the separation of anions and cations. Reduction and extension of elution times of ions can be attained by applying a high electric voltage of reverse or same polarities to the charged solutes at the column outlet respectively. Extension of elution time with applied voltage enhanced resolution of carboxylic acids. Reduction of elution time of Lanthanides' cations gives an effect like as gradient elution.

液体クロマトグラフィーカラムのカラム軸方向に電圧を印加すると、電気浸透流、電気泳動など電場固有の現象が生じる。これらの現象を分離因子として利用する手法が電気クロマトグラフィーである¹。電気クロマトグラフィーのクロマトグラフィック挙動における大きな特徴の一つは、移動相中での各溶質の電気移動度が異なることである。これを利用することにより通常の液体クロマトグラフィーとは異なった分離挙動が得られる。

電気泳動的効果を最大限に得るため、イオン交換樹脂を用いた電気クロマトグラフィーを行った。イオン交換クロマトグラフィーにおいて保持時間が長いということは、その試料のカラム内における実効電荷が大きいことを意味する。従って一般的に、保持時間の大きな試料ほど大きな電気移動度を持つことになる。この現象を効果的に分離に用いた例を示す。

装置：ポンプは LC-6A(SHIMADZU)を用い、検出は UV-970(Jasco)による間接吸収法で行った。また電圧の印加は HCZE-30PN(Matsusada Precision)で行った。カラムには内径 50 μ m、又は 75 μ m のヒューズドシリカキャピラリーに IC-ANION-SW(Tosoh)、IC-CATION-SW(Tosho)を当研究室で充填し使用した。インジェクションにはスプリットインジェクション法を用いた。カラム入口は常に接地されゼロ電位となっている。すなわち、以下の文章で「+3 kVを印加」と表記してある場合はカラム出口側に高電圧を印加し、カラム入口が陰極、カラム出口が陽極となっていることを表している。

結果

分離度の向上：陰イオン交換充填剤 (IC-ANION-SW, Tosoh) を用い酢酸と乳酸の分離度を向上させた例を示す。溶離液には、3mM フタル酸水溶液 (ヘキサメチレンジアミンで pH 6.8 に調製)：メタノール (90:10) を用いた。電圧印加を行っていない状態 (Fig.1-A) では酢酸 (a) と乳酸 (b) の分離は不十分である。これに対し -3kV の電圧を印加すると、酢酸と乳酸はともにカラム入口へと泳動し溶出を遅らせる。その度合いは、電圧を印加していない状態で保持の大きな乳酸の方が大きい。従って、-3kV の印加で酢酸と乳酸は完全に分離した (Fig.1-B)。

分析時間の短縮： k' の大きな試料は電気移動度も大きい。溶出を早める方向に電圧を印加すると、 k' の大きな試料ほど移動相中での移動速度が大きくなる。これは、グラジエント溶出と同様な効果を与える。

陽イオン交換充填剤 (IC-CATION-SW, Tosoh) を用い希土類イオンの分離を行ったさいの印加電圧 (電位勾配：カラム出口に負電圧を印加したときの電位勾配を正と表現) に対する各イオンの溶出時間をプロットしたものを Fig.2 に示す。溶離液には 10mM 塩化銅 - 10mM α -ヒドロキシイソ酪酸 (エチレンジアミンで pH 4.00 に調製) を用いた。保持の大きなイオンほど同一電位勾配に対する溶出時間の変動が大きなことがわかる。Tb と Pm を除く Nd から Lu までの分離では、例えばアイソクラティックな液体クロマトグラフィーで分離完了までに約1時間かかるとき、同一条件で -5 kV を印加するだけで分離を損なうことなく約20分で完了することができた。

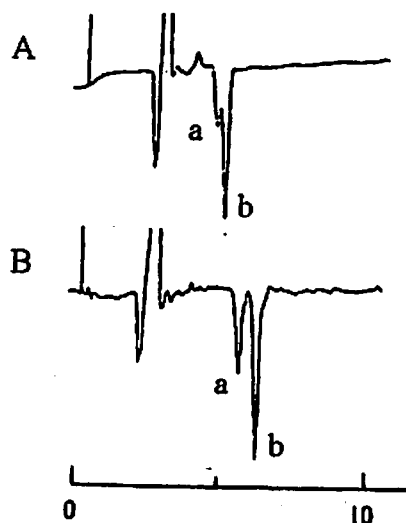


Figure 1

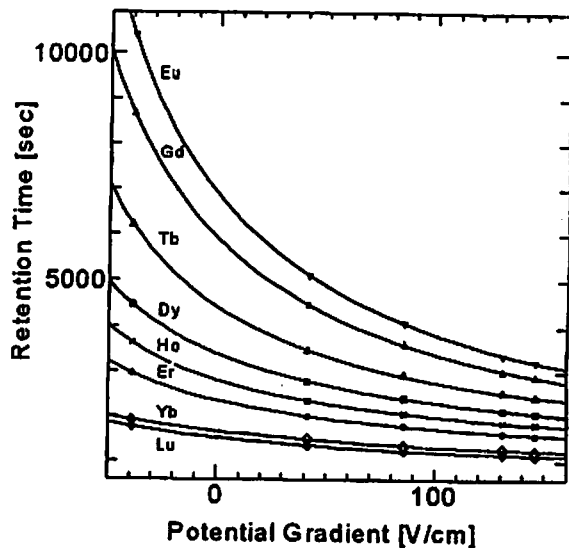


Figure 2

キャピラリー電気クロマトグラフィー：装置と応用

(横河アナリティカルシステムズ株式会社) ○曾我朋義、箕浦加穂

Capillary Electrochromatography: Instrumentation and Application

Tomoyoshi Soga and Kaho Minoura

Yokogawa Analytical Systems Inc.

Capillary electrochromatography (CEC) is a hybrid separation technique combining the stationary phase of liquid chromatography with the electrically driven mobile-phase transport of capillary electrophoresis. This study provides an overview of CEC including the instrumentation and operating conditions required to support the technique. As an example of its application, this technique was used for the analysis of parabenes in body lotion.

1. はじめに

キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に使われる固定相をフューズドシリカキャピラリー等に充填したカラムを用い、ポンプの代わりに電気浸透流によって移動相を送液する新しい分離分析手法である。高速液体クロマトグラフィーでは、使用背圧に制限があるため、充填剤の粒子径を小さくしてもカラム長を短くしなければならず、理論段数を高くすることができない。しかし CEC では、背圧の影響を受けないため、カラムを長くすることが可能であり、10 万段以上の理論段数も可能である。

Hewlett-Packard 社は市販品として初めて、一台でキャピラリー電気泳動 (CE) と CEC が行える HP^{3D} キャピラリー電気泳動システムを開発した。この装置を用いて、CEC の各パラメータが溶出時間に与える影響、各注入法による再現性、検量線の直線性等を検討した。また実試料の応用例としてボディローション中のパラベン類の測定を行った。

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 製) を使用した。CEC 用のカラムは Hewlett-Packard 製 CEC Hypersil C18、3 μ m (内径 0.1 mm、全長 335 mm、充填剤 Hypersil C18、粒子

径 3 μ m) を使用した。移動相には 25 mM Tris-HCl pH 8.0/ Acetonitrile=20/80 を用いた。

3. 結果および考察

Fig. 1 に 11 種類のパラベン類および多環芳香族標準液の測定結果を示した。Thiourea は電気浸透流のマーカーとして用いた。この 11 成分のピークの理論段数は 65000 段から 80000 段であり、HPLC に比べてはるかに高い理論段が得られた。移動時間の再現性は電氣的注入法、加圧注入法とも、0.4 % 以内、面積の再現性は電氣的注入法が 0.8-1.6 %、加圧注入法が 2.8-3.8 % であった。Fig. 2 にボディローション中のパラベン類の測定結果を示した。ピークは保持時間と UV スペクトルの一致により同定した。これらの結果より、CEC は中性物質に対して期待できる有用な分離分析手法であると思われる。

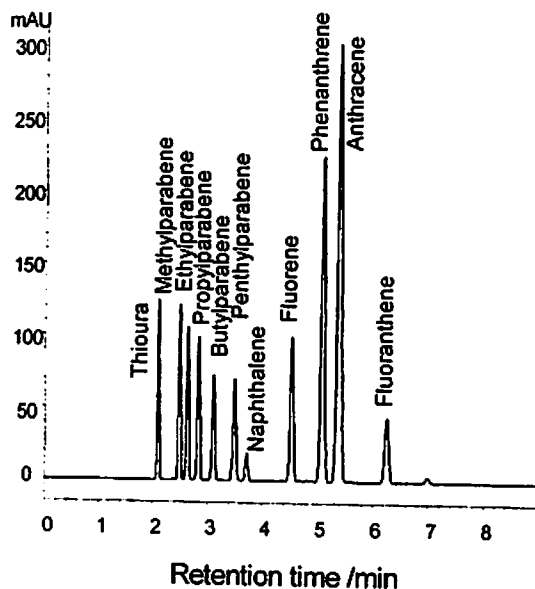


Fig. 1 Capillary electrochromatography of parabenes and polycyclic aromatic hydrocarbins.

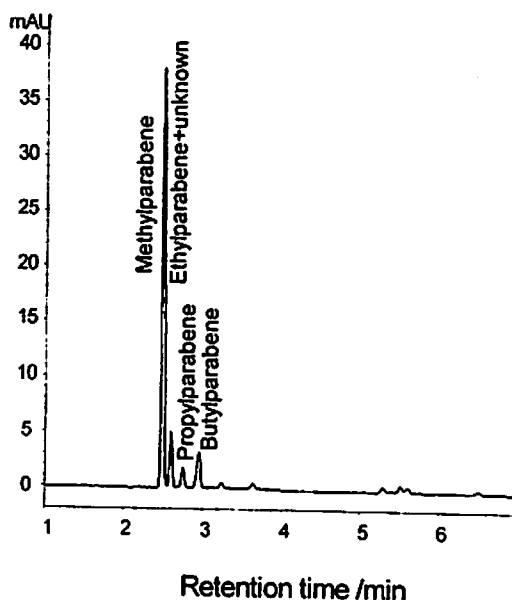


Fig. 2 Capillary electrochromatography of parabenes in body lotion.

キャピラリー電気泳動—レーザー蛍光検出によるDNAのシーケンシングにおける長鎖DNAフラグメントの分析条件の検討

○井上秀子、馬場嘉信、津波古充朝（神戸薬科大学）

Optimization of the Separation Conditions for the Long Reading of DNA Sequencing Using Capillary Electrophoresis Equipped with Laser-Induced Fluorescence Detector

Hideko Inoue, Yoshinobu Baba, Mitsutomo Tsuhako

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

We have been shown that the separation of DNA sequencing reaction products with cross-linked polyacrylamide and Hydrolink Long Ranger Gel. More recently, non-cross-linked polyacrylamide is proved to be useful medium for long DNA sequencing. We investigated the effect of the electric field strength and capillary temperature on the separation of DNA sequencing reaction products using 4 % linear polyacrylamide. Sequencing of 960 base DNA was required for 125 minutes at 74 - 100 V/cm (a shingle-step voltage gradient technique) and 30 °C.

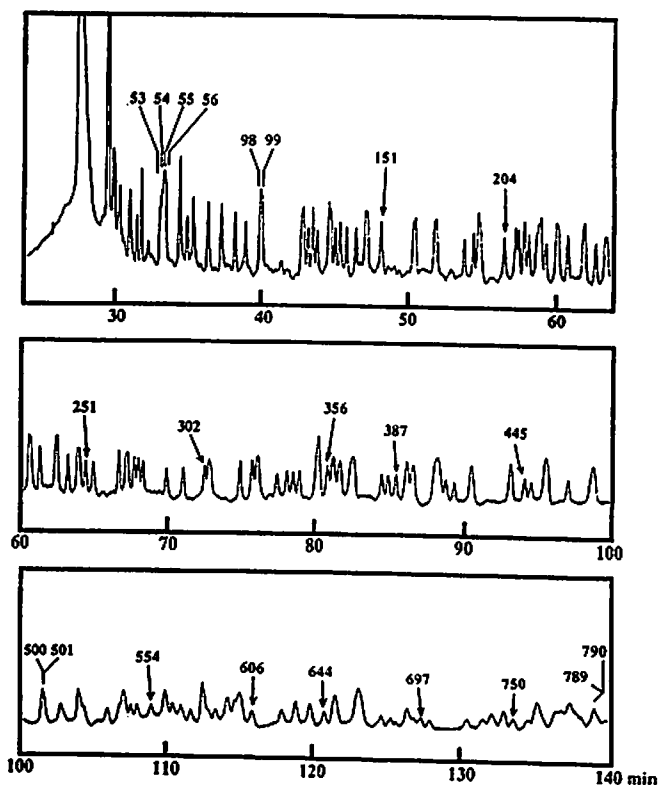
【はじめに】 ヒト・ゲノムプロジェクトの目標は30億塩基対もの膨大な情報を有するDNAの塩基配列を全て解析することである。キャピラリー電気泳動では、一般に200, 300 V/cmといった電場で迅速に解析することに主眼がおかれており、300～400塩基程度までのDNAは、高電場を用いることにより数分で解析することができるようになった。しかし、サイズの大きいDNAを解析するためには、異なる解析条件を選択しなければならない。そこで1000塩基程度のDNAをシーケンシングするための条件について検討した。

【実験】 キャピラリー電気泳動装置は、BECKMAN P/ACE System 2050 および我々が開発したキャピラリー電気泳動—レーザー蛍光検出システムを使用した。DNAシーケンシング反応生成物は、テンプレートとして市販の一本鎖DNA(M13mp18)を使用し、パーキンエルマー製の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。キャピラ

リーは架橋および非架橋ポリアクリルアミドあるいは市販のゲル（ロングレンジーハイドロリンクゲル）を充填して用いた。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。緩衝液はトリス-ホウ酸-7M尿素溶液を用いた。

〔結果と考察〕 キャピラリー電気泳動において、DNAの分離に影響を与える主要な因子としては、ゲル組成、電圧、キャピラリーのサイズ、キャピラリーのカラム温度、緩衝液組成、DNAの塩基組成などが知られている。これらの条件の中でも長鎖DNAフラグメントの分析には、ゲル濃度および電圧が最も重要な因子であることがわかった。本研究では、1000塩基程度の長鎖DNAフラグメントのシーケンシングを達成するために、ゲル濃度(4~7 %T)、架橋度(0~0.5 %C)、電場(74 ~300 V/cm)、キャピラリーのカラム温度(20 ~50℃)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条件の最適化を行った。一般的に、ゲル濃度が小さい場合は、ゲルが形成する細孔が大きくなり、大きいサイズのDNAの分離に適している。そこで4%という比較的低濃度の非架橋ポリアクリルアミドを用い、比較的低電圧で分離を行った。

右図は濃度4%の非架橋ポリアクリルアミド、電場74 V/cm、キャピラリーのカラム温度30℃の条件で、塩基Cで終結したシーケンシング反応生成物を分離した結果である。ピークの上の数字はプライマーを含む塩基数を示している。図より明らかなように、700塩基程度のDNAフラグメントは130分以内に分離できる。これはスラブゲル電気泳動と比べると数倍の高速化を達成している。さらに、分離能をそこなわず、かつ分析速度を速くするために、分析の途中で電場を高くする手法(80分間74 V/cmで分析した後100 V/cmに電圧を高くする)を用いたところ、1000塩基程度までのDNAフラグメントの解析に成功した。



Separation of FAM-labeled C-termination sequencing product of M13mp18 by capillary electrophoresis. Capillary; total length 27 cm, effective length 20 cm, Gel; 4% T Linear polyacrylamide, T; 30℃, Sample injection; 5.4 kV 10 s, run; 74 V/cm, current; 5.9 μ A

非架橋高分子溶液中の長鎖DNAのダイナミクス - 蛍光顕微鏡による直接観察から -

上田正則¹、小穴英廣¹、馬場嘉信²、吉川研一¹、土井正男¹
名古屋大学¹、神戸薬科大学²

Conformational transition of a long DNA chain under electrophoresis in uncross linked linear polymer

M. Ueda¹, H. Oana¹, Y. Baba², K. Yoshikawa¹, M. Doi¹
University of Nagoya¹, Kobe Pharmaceutical University²

Dynamics of an individual DNA during electrophoresis in linear polymer was investigated by means of fluorescence microscopy. From this, it has been found that a long DNA like T4 DNA(166kbp) shows conformational transition under electrical field as function of host polymer concentration.

蛍光顕微鏡を用いた長鎖DNAの直接観察によって、linear polyacrylamide(PA)のような非架橋高分子中を電気泳動するDNAのダイナミクスを調べた。これにより、T4 DNA (166 kbp) のような長鎖DNAは、host polymerの濃度に応じて、その泳動形態を変えることがわかった。host polymerの重なり濃度C*の数倍程度までは、DNAは両端が先頭を競い合うU字形態によって特徴付けられる複雑な運動を行う (Fig.1a))。host polymer濃度をさらに上げると、DNAは先頭の後を全体が必ず従うI字形態のまま泳動するようになる (Fig.1b))。これらの全く違う運動モード間のスイッチングは、DNAがhost polymerより十分に長いこと、host polymer自身もDNAに絡み付くことができるほど十分に長いこと、さらに外力が熱揺らぎに比べて十分に大きいという条件を満たしていれば、host polymer濃度を変えていくだけで起こる。

シンポジウムでは、このような転移現象の起こるメカニズムを議論すると同時に、長鎖DNAの泳動形態などの分子論的情報をもとに、従来の方法とは違う長鎖DNAの高速分離法の可能性について議論していく。また、ポスター会場では、ビデオウォークマンを用いてDNAの泳動の様子を見ていただけるようにする予定なので、動画を見ながらの具体的な議論が発展することを期待する。

a) U-shape motion

b) I-shape motion

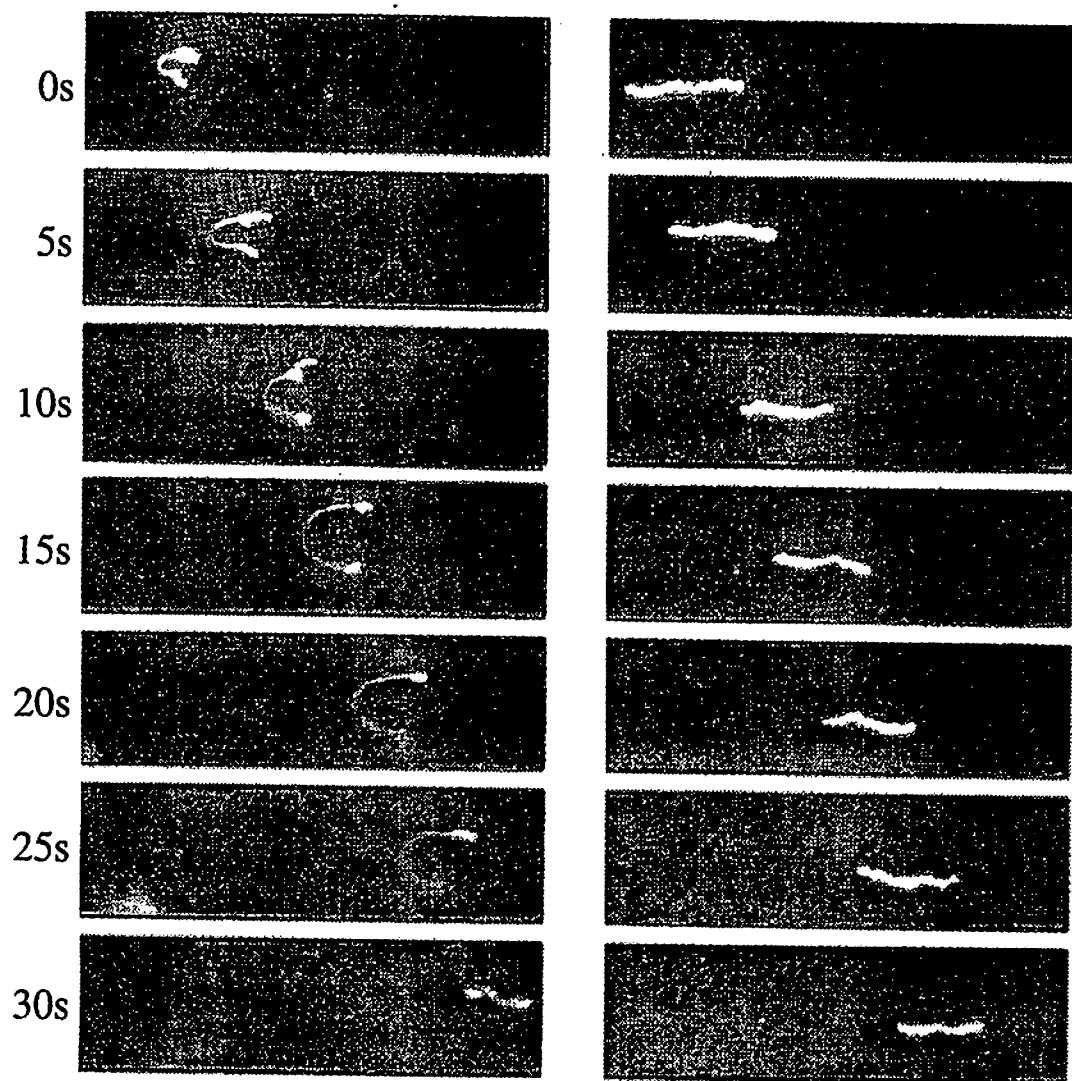


Fig. 1: linear polyacrylamide 中の可視化されたT4 DNAの泳動形態

a) PA3%, $E=10\text{V/cm}$, DNAは特徴的なU字形態を形成し、崩壊させ、これを繰り返しながら泳動していく。U字の引っかかり点が移動していくため、ゲル中より複雑な運動をする。

b) PA7%, $E=10\text{V/cm}$, DNAはもはやU字になることはなく、直線状のI字形態のまま泳動する。全体として弛んだ状態であり、架橋点に引っかかったDNAが弛緩していくときの過渡的なI字形態とは違う。

人血清蛋白質のキャピラリー電気泳動—分画分離から成分分離へ—
 久保兼信
 近畿大・薬

CAPILLARY ELECTROPHORETIC SEPARATION OF HUMAN SERUM PROTEINS: FROM FRACTIONAL SEPARATION TO COMPONENT SEPARATION

Kanenobu Kubo

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Eleven commercially available protein preparations from human serum were subjected to capillary zone electrophoresis (CZE) using a linear polyacrylamide-coated capillary at pH 7.4. Each protein was found to show an apparently different electrophoretic mobility and an intrinsic peak profile, except that low density lipoprotein showed no peaks. The migration order was, on the whole, consistent with that observed with electrophoresis using cellulose acetate, as well as an uncoated capillary. Subsequently, a mixture of five of the protein preparations was separated into individual components, as well as individual isoforms. This high resolution was not obtained with CZE using an uncoated capillary.

1. はじめに

血中での蛋白質濃度の変動あるいは異常蛋白質の検出は、疾患の診断や病態の把握に有用な情報をもたらす。セルロースアセテート膜そしてアガロースゲルを支持体とした電気泳動はこの目的に利用されている。最近、これらに代わる血清蛋白質の分離そして分析法として、迅速・簡便性を備えたキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) が注目され始めている。しかし、この手法では蛋白質の分離が未被覆キャピラリー中、比較的高 pH 領域で行われるため、これまでの電気泳動同様、血清蛋白質を 5 分画に分離するのが限度で、それを越える分離能が得られていないのが現状である。

キャピラリー内表面を中性の高分子でもって被覆すると、蛋白質の分離において高分離能をもたらすことは良く知られている。そこで被覆キャピラリーを用いた CZE によって、血清蛋白質の“分画分離”ではなく“成分分離”の可能性について検討した。個々の蛋白質成分の一斉分析が達成できれば、病態を反映している個々の蛋白質成分あるいはそれら蛋白質相互間の変動を直接そして簡便に追跡する事が可能となり、診断や治療の判定に有益な情報をもたらすと思われる。

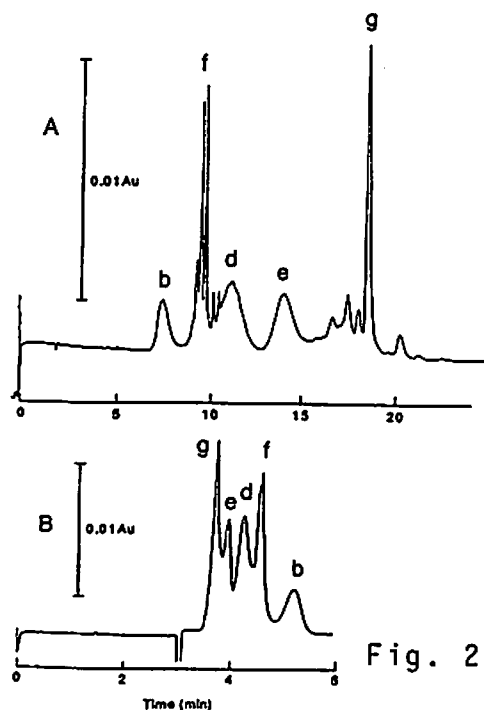
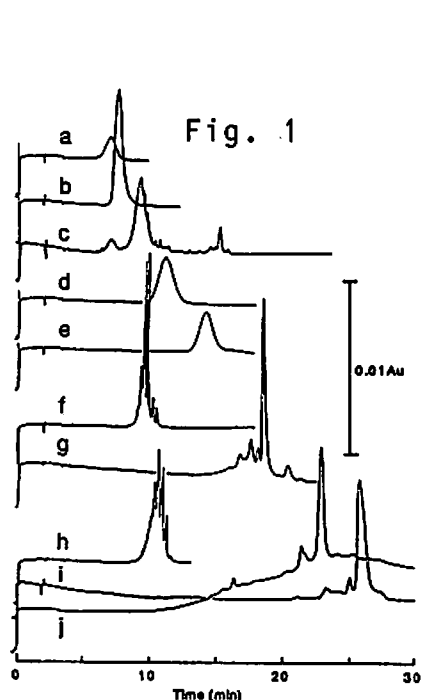
2. 実験

キャピラリー (内径 75 μ m, 有効長 25 cm, 全長 33 cm, 大塚電子) 内表面は、7

%モノアクリルアミドの重合によって被覆した (Kubo, K. (1996) Anal. Biochem. 241, 42-46.)。試料蛋白質は市販品を、血清は演者の採血より調製したものをを用いた。調製試料は落差法でキャピラリーに導入した。電気泳動緩衝液として主に 0.1 M HEPES-Tris, pH 7.4 をを用いた。電気泳動は Quanta-4000 キャピラリー電気泳動装置 (ウオターズ社) を用いて、印可電圧 10 kV, 室温下で行った。

3. 結果・考察

図1に10種の蛋白質標品について、それぞれ個々に電気泳動を行ったときに得られた泳動図を示す。それぞれの蛋白質は固有の電気泳動移動度そして固有のピーク形態をもって電気泳動されること、そして蛋白質多型の分離も達成されることが判った。また図2には5種の蛋白質混合物を試料としたときの泳動図 (A, 被覆; B, 未被覆) を示す。混合試料においても被覆キャピラリーを用いた場合、各蛋白質のピークプロファイルは別個に行った電気泳動 (図1) で得られたそれらと全く同一であった。これらの泳動図は直鎖ポリアクリルアミドで被覆したキャピラリーを用いて得られており、蛋白質の高分解能分離にはキャピラリー内表面の被覆処理が必要不可欠であることを示している。他方、未被覆キャピラリーについては十分な蛋白質の分離は認められなかった (図2 B)。(Peak labels in Fig. 1 and 2, a: prealbumin, b: alpha-1-acid-glycoprotein, c: ceruloplasmin, d: haptoglobin, e: alpha-2-macroglobulin, f: alpha-1-antitrypsin, g: transferrin, h: alpha-2-HS-glycoprotein, i: C-reactive protein, j: component C3. 上記で得られた知見をふまえて、予めアルブミンを取り除いた人血清成分について得られた結果も併せて報告する。



医薬品の不純物試験への HPCE 適用は有効な手法か？

—CZE と LC の分離の一例からの考察

千葉 裕一、小畠 秀樹

(大塚製薬工場 製剤研究所)

Is it useful to apply HPCE for impurity test of drug substances? - Consideration from an example of the separation of CZE and LC using each thermal degradation sample

Hirokazu Chiba and Hideki Kobatake

Formulation Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Factory inc.,

115 Tateiwa-Kuguhara muya-cho Naruto-city Tokushima 772, Japan

Abstract: It was argued that CZE method was useful for the evaluation of impurities in thermal degraded aqueous solution of a peptide compound as drug substance. It was estimated by the comparison between CZE and ion-pair HPLC in the separation conditions and other factors. As a result, it was thought that it was necessary to use both methods in parallel for the impurity test.

キャピラリー電気泳動(HPCE)法を医薬品の試験に適用する際に一般的に考慮されるのは光学純度や不純物の程度を求めるための試験である。実際問題として、不純物試験に HPCE 法を適用することは、LC 法とは全く異なるモードで分離が行えることから、不純物ガイドライン上においても望ましい手法の一つであると認識される。ところで、高い理論段数がクローズアップされるあまり、どのような試料でも HPCE を用いれば容易に完全な分離が得られるような錯覚に陥り易いが、果たして簡単に医薬品の不純物試験に採り入れることができるのであろうか？CZE モードでの分離を検討した医薬品素材として使用検討を試みているあるペプチドを 20%水溶液として熱虐待(105℃ 3 時間)した試料の分析を例に、ion-pair LC 法で得た分離パターンとの比較を試み、HPCE 法を適用する意義について考えた。

実験 キャピラリー電気泳動装置はダイオードアレイ検出器を搭載(測定波長は 210 nm)した Beckman 5510 型を用い、キャピラリーチューブには内径 50 μ m、長さ 77 cm (有効長: 70 cm)の無処理のフューズドシリカ管を用いた。分析時のキャピラリーチューブの温度は 23℃で制御し、試料注入量は窒素加圧法で 40 秒間行った。電解液は 40mmol/L ホウ酸、12.5mmol/L 四ホウ酸ナトリウム、2mmol/L 硫酸ナトリウムの緩衝系(pH 8.6)を用い、電圧は 30kV で 17 分間泳動を行った。実験に使用した試薬は和光純薬製のものを精製せず使用した。

結果 1.CZE での分離の至適化 電解液の検討で、リン酸塩、ホウ酸塩や四ホウ

酸塩などの緩衝液では十分な分離は達成されなかった。それは ion-pair HPLC 法で得られているクロマトグラムと比較して確かめた(Fig.1)。これに対して、ホウ酸と四ホウ酸とで緩衝系を組み合わせた際に分離の改善が確認され、それぞれ 40mmol/L、12.5mmol/L の濃度で配合したときの緩衝系では主成分のピークを含み 10 本のピークが認められた。更に、スタッキング効果を持たせて電流値の安定化を図る目的で硫酸ナトリウムを 2mmol/L の濃度で添加することにした。

2.キャピラリーチューブの洗浄手順による分離の改善 上記の条件下で分離を継続した際に、同じ分子量の不純物成分の分離(migration time として 10 分付近)が不完全であることが判明した。この原因はチューブ内の洗浄をアルカリで行っただけでは内壁への主成分等の吸着が生じ、洗浄しきれないものと推察された。この改善には分析前のチューブ洗浄時に 0.1mmol/L HCl と 0.1mmol/L NaOH の交互で洗うことが効果的であり、この操作により、ほぼ分離が達成された。その際の分離の状況は Fig.2 に示す通りであった。

3.CZE 及び ion-pair LC の比較と今後の展開 あるペプチド水溶液の熱虐待試料についての CZE 並びに ion-pair LC の比較を行ったが、両者とも試験法上において一長一短があり、検出されるピーク本数だけではその使用についての優劣をつけ難いところがあった。構造情報を得るには必然的に分取・精製作業が必要となるが、ion-pair 試薬を使用するケースでは構造解析に至るまでに多くの時間を浪費するのも致し方ない。これに対して、CE-MS の適用によっては分子量情報が簡単に手に入る可能性もあり、構造解析への一助となることから周辺技術の充実が待たれる。本ケースでは、医薬品の不純物試験として ion-pair LC 法と HPCE 法を併用の立場で適用するのが望ましいと考える。

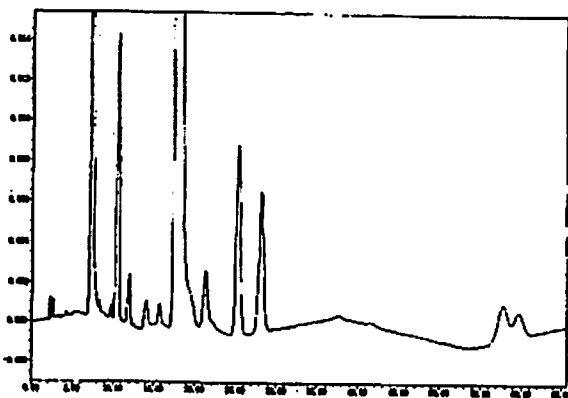


Fig.1. Chromatogram of thermal degraded sample solution (mobile phase: pH 2.6, 10mmol/L potassium phosphate buffer added sodium hexanesulfonate as 7mmol/L・methanol mixture (99:1); used ODS column)

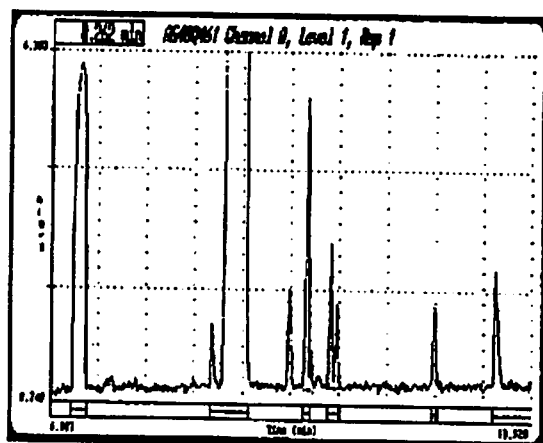


Fig.2. Electropherogram of thermal degraded sample solution

CDを用いたキャピラリー電気泳動による NBD-アミノ酸の光学分割

○角田 誠、加藤 大、福島 健、三田 智文、本間 浩、今井 一洋
(東大・薬)

Chiral separation of NBD-amino acids by capillary electrophoresis
using cyclodextrins

○Makoto Tsunoda, Masaru Kato, Takeshi Fukushima, Tomofumi Santa,
Hiroshi Homma, Kazuhiro Imai

*Department of Bio-Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, University of Tokyo*

We studied chiral separation of amino acids derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors. First, We tried in the micellar electrokinetic chromatography (MEKC) mode, but chiral separation was not achieved except NBD-Ile, -Pro. Next, in the capillary zone electrophoresis (CZE) mode, some NBD-D, L-amino acids were chirally separated.

1. 目的

我々は既に、D, L-アミノ酸の4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) による誘導体 (NBD-アミノ酸) がHPLCにおいてPirkle型キラル固定相を用いることにより光学分割されることを報告した^{1), 2)}。一方、キャピラリー電気泳動 (CE) は一般にHPLCと比べて高い分離能を有することが知られており、近年、光学異性体の分離分析法の1つとしてCEが広く用いられるようになっていく。そこで、CEによるNBD-アミノ酸の光学分割を目的として実験を行った。

2. 実験

2-1 NBD-アミノ酸の調製

5mMアミノ酸水溶液20 μ lに、50mMホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 20 μ l、20mM NBD-F (アセトニトリル溶液) 30 μ lを加え、60℃で5分間反応させた後、1% TFA溶液を130 μ l加えたものを試料溶液として用いた。

2-2 電気泳動条件

キャピラリー電気泳動装置には日本分光CE-990 systemを、検出にはCE-970 UV/VISを、分離キャピラリーには内径50 μ m、全長66cm、有効長51cmのフューズドシリカキャピラリーを用いた。泳動液には、100mMホウ酸緩衝液 (pH 8.6) にシクロデキストリン (CD) をキラルセクターとして添加したものを、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) モードにおいてはミセルとしてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を100mM加えた。また、必要に応じて尿素 (urea) を加えた。検出波長は470nm、印加電圧は25kV、分離温度は30℃で行った。

3. 結果と考察

MEKCモードにおいて β あるいは γ -CDの濃度を検討したところ、150mM γ -CD、5M ureaを泳動液に添加したとき、NBD-Ile、-Proが光学分割された。しかしながら、その他のNBD-アミノ酸については検討した濃度においては光学分割は達成されなかった。

そこで、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) モードにおいて実験を行ったところ、10mM β -CDを泳動液に添加したとき、NBD-Ala、-Glu、-Ile、-Met、-Pro、-Valなどが光学分割された。また、分析時間はMEKCモードに比べて約半分に短縮された。Fig. 1に、NBD-Ile、-Gluのエレクトロフェログラムを示した。

この結果から、NBD-アミノ酸の光学分割においてはMEKCモードよりもCZEモードのほうが有効であると推測された。現在、より詳細に条件を検討しており、その結果を含めて議論するつもりである。

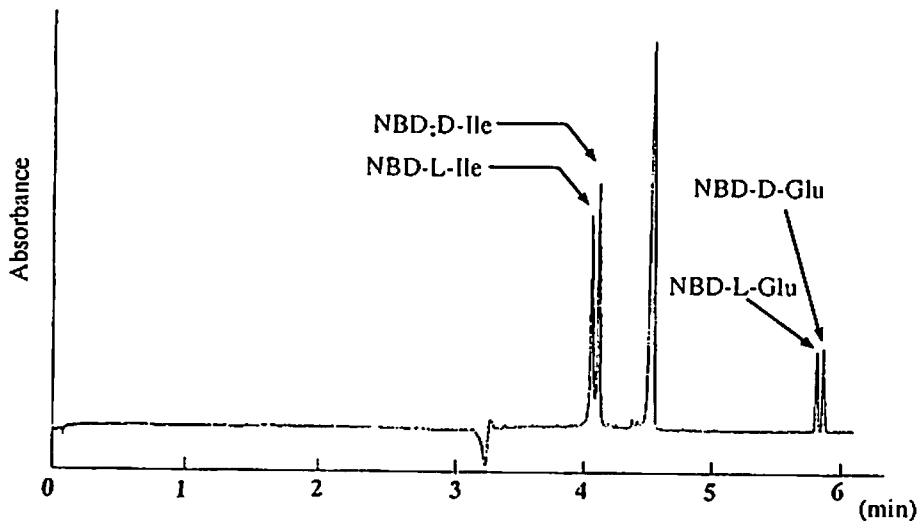


Fig.1 Electropherogram of NBD-D,L-Ile,Glu

文献

- 1) K. Imai, *et al.*, *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 177 (1993).
- 2) T. Fukushima, *et al.*, *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 10 (1995).

シクロデキストリン修飾キャピラリーゾーン電気泳動による光学異性体の分離：ジメチル- β -シクロデキストリンの組成がキラル識別能に及ぼす効果(4)

(姫路工大・理) ○本田周平、大塚浩二、寺部 茂

(京都工繊大・繊維) 木全一博、田中信男

Enantiomeric Separation by Cyclodextrin Modified Capillary Zone Electrophoresis: Effects of Compositions of Dimethyl- β -Cyclodextrins on Chiral Recognition

○Honda, Shuhei(1), Otsuka, Koji (1), Terabe, Shigeru (1), Kimata, Kazuhiro (2), and Tanaka, Nobuo (2)

(1) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12, Japan

(2) Department of Polymer Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

In cyclodextrin modified capillary zone electrophoresis (CD-CZE), various CDs are used to achieve chiral recognition. Electrically neutral dimethyl- β -CD (DM- β -CD) has been found to be effective for enantiomeric separation of various ionic drugs. However, we found that enantioselectivities achieved by using DM- β -CD obtained from five different suppliers were significantly different from each other. The reason was due to the difference in the compositions among the commercial products, which was shown by the liquid chromatographic separation of each product. We further estimated the structure of each component by NMR and mass spectrometric analysis. Effects of the substitution degree on enantioselectivity was also studied.

1. はじめに

ジメチル- β -CD (DM- β -CD) をキラル識別剤に用いるシクロデキストリン修飾キャピラリーゾーン電気泳動 (CD-CZE) による光学異性体の分離において、異なったメーカーから入手したDM- β -CDを使用した場合には試料によっては光学分割の程度に大きな差異が生じる。これはメーカーによってDM- β -CDにおけるメチル化の程度に差があるためであると考えられる。実際に5社から入手したDM- β -CDを用いて比較検討したところ、それらの組成に差があることが明らかとなった。

ここではDM- β -CDを用いたCD-CZEによるイオン性鏡像体試料の光学分割において、各社のDM- β -CDの不斉識別能の差、及びそれらのメチル化の程度や組成を比較検討した結果について報告する。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置にはP/ACE System 2000 (Beckman) を、分離キャピラリーには内径50 μ m、全長37cm、有効長30cmの内面無処理のフューズドシリカキャピラリー (Polymicro Technologies) を、分離溶液には10mM DM- β -CD (pH 2.5) を用いた。検出波長は200nm、印加電圧は22kV、温度は21℃とし、試料には種々のイオン性薬物成分を用いた。

3. 結果・考察

Fig.1にA、B、C、D及びEの5社から入手したDM- β -CDを用いたハロペリドール還元体(RHP)の光学分割例を示す。RHPはE社製のDM- β -CDを用いた場合にのみ分割され他の4社のものでは分割されていない。またTable 1に、RHPとケタミンについて、各異性体の電気泳動移動度の比から求めた分離係数(α)を示す。RHPとは対照的に、ケタミンはいずれのメーカーでも分離が行われたが、その程度には差が見られた。この他の試料についてもメーカー間によって不斉識別能の異なることが観測された。検討の結果A、B、C及びD社製のものは比較的類似した不斉識別の傾向を示すが、E社製のものは他社製のものとは大きく異なる結果を与えることが分かった。

各社のDM- β -CDをHPLCで分析したところ、A、B、C、D社製のものは主に2つのピークに分離されたのに対し、E社製のものは複雑な分離パターンを示した。

NMR及び質量分析により、D社製の分取成分のうちの1つは純粋なheptakis(2,6-di-O-methyl)- β -CD、もう1つはhexakis(2,6-di-O-methyl)-mono(2,3,6-tri-O-methyl)- β -CDであることが示唆されている。

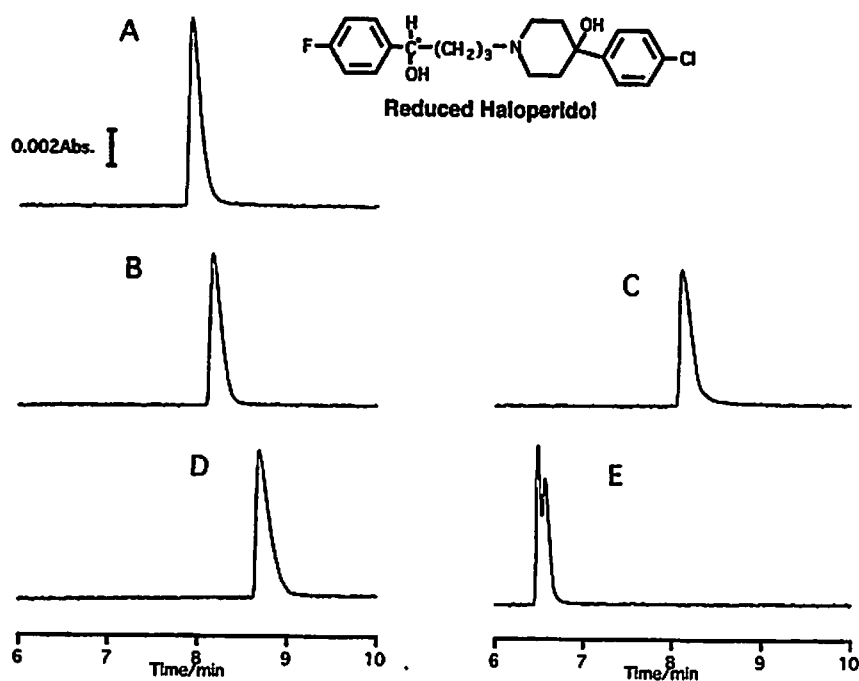


Fig.1. Optical resolution of RHP by CD-CZE with DM- β -CD

Table 1. Comparison of α values for enantiomeric separations of RHP and ketamine

Suppliers	RHP	Ketamine
A	1.000	1.015
B	1.000	1.017
C	1.000	1.018
D	1.000	1.016
E	1.017	1.009

界面活性剤の構造がミセル動電クロマトグラフィーの分離挙動に及ぼす効果

○竹田さほり¹⁾・脇田慎一¹⁾・山根昌隆¹⁾・東 国茂¹⁾・寺部 茂²⁾

¹⁾大阪工業技術研究所 ²⁾姫路工業大学理学部

Effect of the Surfactant Structure on Migration Behavior in Micellar Electrokinetic Chromatography

○Sahori Takeda¹⁾, Shin-ichi Wakida¹⁾, Masataka Yamane¹⁾, Kunishige Higashi¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾

¹⁾ Osaka National Research Institute, AIST

²⁾ Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

We have investigated the effect of the surfactant structure on migration behavior in MEKC. Three different anionic surfactants, sodium N-lauroyl-N-methyl- β -alaninate (ALE), sodium N-lauroyl-N-methyltaurate (LMT) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were used. They have carboxylate group, sulfonate group and sulfate group as the ionic group, respectively. ALE and LMT have amido linkages. The difference of the migration behavior of phenol and aniline derivatives were compared among the three surfactants in terms of the capacity factor.

1. はじめに

我々はこれまで、ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)における界面活性剤の構造と分離挙動との関連についての研究を行っている¹⁾。今回は、極性基の異なる3種類の陰イオン性界面活性剤を用い、その分離挙動について比較・検討した結果を報告する。

2. 実験

装置には、大塚電子製CAPI-3000を用いた。キャピラリーには内径50 μ m、長さ62cm(有効長50cm)のフューズドシリカ管(GL Science社製)を用いた。界面活性剤については、N-ラウロイル-N-メチル- β -アラニンナトリウム(ALE)は川研ファインケミカルより、N-ラウロイル-N-メチルタウリンナトリウム(LMT)は日光ケミカルズよりそれぞれ提供を受け、硫酸ドデシルナトリウム(SDS)はナカライテスク製の市販品を用いた。用いた界面活性剤の構造を図1に示す。分

離溶液は0.05Mの界面活性剤を0.02Mホウ酸塩-リン酸塩緩衝液(pH7.0)に溶かして調製した。測定は印加電圧20kV、温度30℃の条件下で行った。

3. 結果

計測対象物質としてフェノール類およびアニリン類を用い、それらの分離挙動について、容量比(k')を用いて比較・検討した。フェノール類では図2に示すように、アミド結合を持つALEおよびLMTを用いた場合、SDSとは異なる分離挙動を示した。また、アニリン類ではそれぞれが異なる分離挙動を示し、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

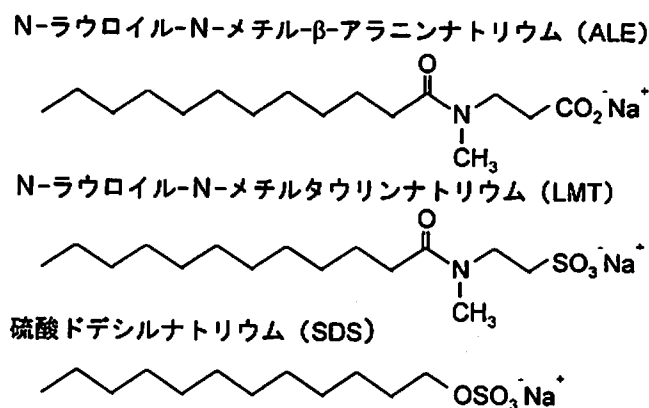


図1 用いた界面活性剤とその構造

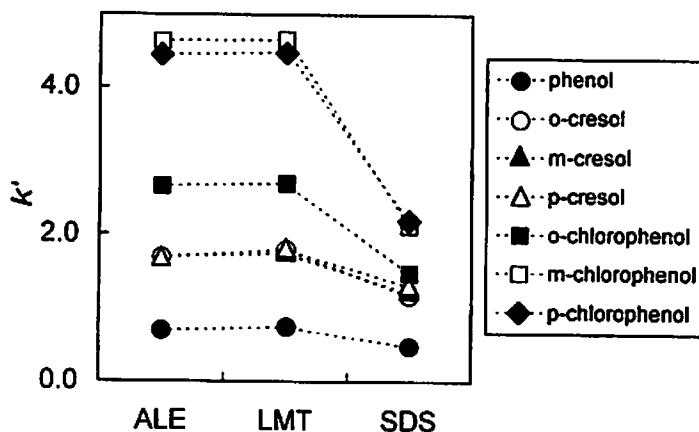


図2 フェノール類による分離挙動の比較

4. 文献

- 1) S. Takeda, et al. *J. Chromatogr.*, **1996**, 744, 135-139.

非水系 CE への水素結合モードの導入

(岐阜薬科大¹・京大農²) ○江坂幸宏¹、後藤正志¹、加納健司²

Hydrogen-bonding Mode CE in Non-aqueous Solutions

Yukihiro Esaka¹; Masashi Goto¹; Kenji Kano²

¹Gifu Pharmaceutical University; ²Faculty of Agriculture, Kyoto University

Poly(ethylene glycol)(PEG) was added to non-aqueous electrolytes solutions to make a more effective hydrogen-bonding mode CE. As expected, drastic change in separation selectivity was observed and the evaluated complex formation constants between PEG 400 and substituted benzoic acids were more than 10 times those in an aqueous solutions.

緒言 最近、様々な非水系電解液を用いたキャピラリー電気泳動法の研究が報告されている。非水系を用いることにおける大きな興味の一つは、溶媒分子を含めたマトリックス分子と溶質間の相互作用及びその泳動挙動への反映である。水系では H₂O という強い競争分子が周辺に多量に存在するため、静電的相互作用の利用は一般に不利である。しかし、適当な溶媒を選択できれば遥かに強い相互作用が分離系に導入でき、劇的な分離選択性の変化が期待できる。我々はポリエーテル化合物の水素アクセプター能を利用して、溶質との間に生ずる水素結合性相互作用に基づく分離モードを CE に導入してきた。ただし、水系の電解液を用いてきたため、その分離モードは PEG やミセルと溶質間の疎水性相互作用に補助された形で効果的に機能し得たと考えられる。しかし、アセトニトリルなどのアプロティックな溶媒中であれば、エーテル酸素との水素結合性相互作用がより直接的に泳動挙動に影響するはずである。以上の観点より、モデル試料に置換安息香酸類を用いて、PEG400 を添加したアセトニトリル系の電解液中で CZE を行なった。PEG400 の濃度変化に対する分離選択性の変化を観察すると共に、電気泳動移動度の依存性を分析して PEG-溶質間の相互作用の大きさを評価し、水系の場合と比較した。

実験 試料: benzoic acid (BA), *p*-acetoxyBA (AO), *p*-acetamideBA (AA), *p*-hydroxyBA (HO), *p*-aminoBA (AM), *p*-toluic acid (TO), terephthalaldehydic acid (TP), *o*-phthalaldehydic acid (OP) 電解液: (n-Bu)₄NClO₄ + (n-Bu)₄NOH + PEG400 (0-10%) / MeCN 検出波長: 210 nm 電圧: 15 kV, 電流: 3-5 μ A Capillary tube: 500 mm(effective length 300 mm)

結果と考察 Fig 1 に、水系(A)、非水系(B)、非水系 PEG400(3%)(C)含有の電解液を用いた電気泳動図を示す。PEG を含まない非水系では、泳動順に変化はないが水系で分離しなかった試料の大半が完全に分離している。これは、主

に溶媒和の変化によって各々のサイズの差がはっきりしたものと思われるが、酸解離の程度に差が出ている可能性もあり、今後検討する予定である。

PEG400 含有系では Fig. 1 に示されるように、大きく泳動順に変化が起きた。PEG400 は浸透流の速度で動いていると思われるので、これと相互作用の大きなものほど前に移動する。AM、HO、AA の位置が顕著に前に移動したことは、これらがよい水素ドナーであることと一致する説明される。以前行なった水系 (PEG 含有) との違いに AM が最も強く相互作用したことがあり、これは単純に水素ドナー能の強弱だけからは説明できず、現在考察中である。非水系では、水系と比較してかなり低い濃度ではっきりした PEG の添加効果 (溶出順の変化) が現れる。実際に相互作用の最も小さな OP を基準にして見積もった PEG400 との錯体形成定数は、水系に比較して約 10-30 倍の値を示した。

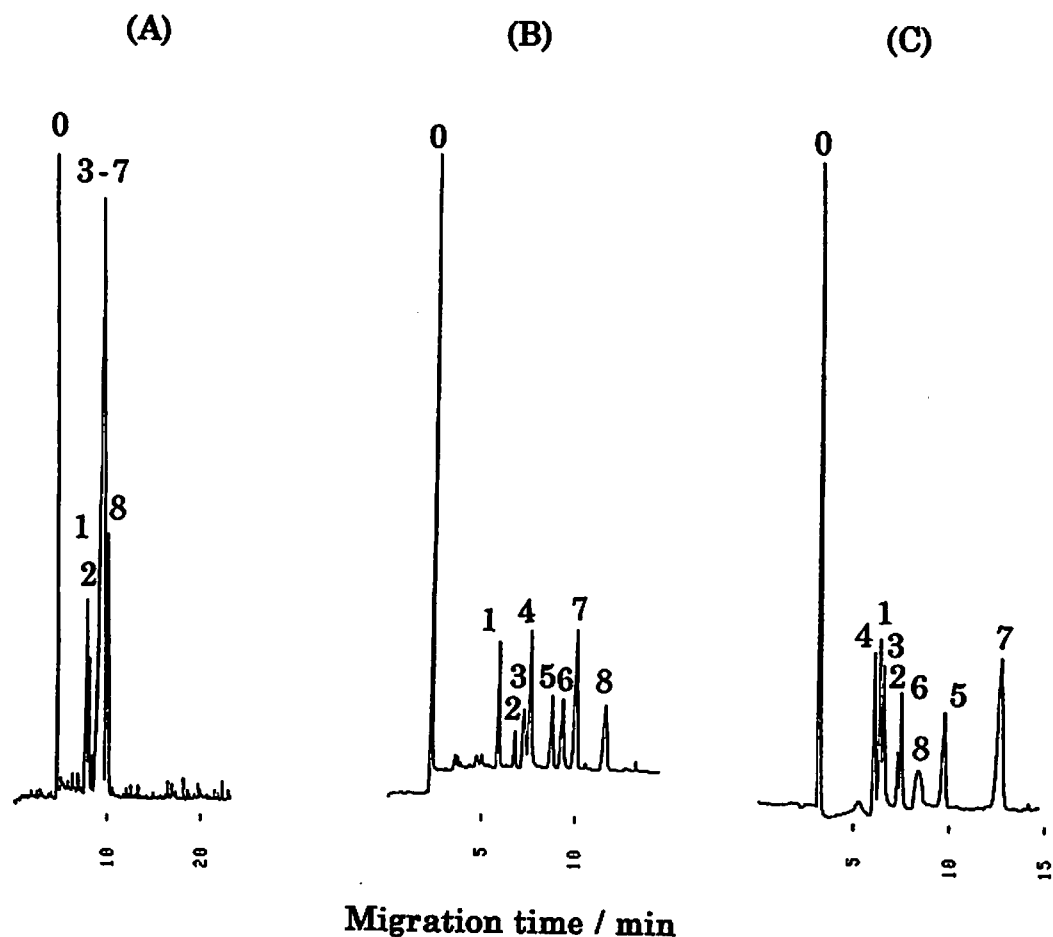


Fig 1 Electropherograms of eight substituted benzoic acids

Electrolyte solutions: (A) 10 mM phosphate buffer aqueous solution (pH 7.8); (B) the non-aqueous solution (acetonitrile); (C) added PEG400 (3%) to (B)
Peak: (0) mesityl oxide, (1)AA(2)AO(3)HO(4)AM(5)TP(6)TO(7)OP(8)BA

新規界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィーによる 光学異性体の分離

○杉本美香 (1)、大塚浩二 (1)、寺部 茂 (1)、老田達生 (2)
(1) 姫路工業大学理学部、(2) 京都工芸繊維大学工学部

Enantiomeric Separation by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Novel Chiral Surfactants

Mika Sugimoto*(1), Koji Otsuka(1), Shigeru Terabe(1), Tatsuo Oida(2)
(1) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo, 678-12 Japan
(2) Department of Chemistry and Material Technology, Faculty of Engineering and Design, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto, 606 Japan

Two kinds of chiral surfactants, those derived from tartaric acid and the others derived from glucose, were used as pseudo-stationary phases for the separation of enantiomers by micellar electrokinetic chromatography (MEKC). Among these, 2,3-dodecoxy-1,4-butylene disulfate ditriethylammonium salt gave high enantioselectivity for phenylthiohydantoin DL-amino acids.

1、はじめに

光学活性な界面活性剤ミセルを疑似固定相として用いるミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)により光学異性体の分離ができることが知られている。光学活性界面活性剤としては、これまで胆汁酸塩類、アミノ酸誘導体などが有用なことが知られている。本研究では、新規光学活性界面活性剤である酒石酸誘導体およびグルコース誘導体をMEKCの疑似固定相として用い、光学異性体の分離を検討した。

2、実験

キャピラリー電気泳動装置には、Beckman製 P/ACE System 2000及びBioRad製BioFocus 3000 Systemを、キャピラリーにはPolymicro製のフューズドシリカキャピラリーを用いた。印加電圧は20kV、検出波長は254nm、キャピラリーの温度は25℃で実験を行った。泳動液には、20mMリン酸塩緩衝液(pH7.0)、50mM トリスーリン酸塩緩衝液(pH7.0)及び30mMリン酸塩-30mMホウ酸塩緩衝液(pH7.0)を用いた。界面活性剤には、bis(N, N'-dimethyl) tartaramide から得られた 2, 3-didodecoxy-1, 4-butylene disulfateの2ナトリウム塩又は、2トリエチルアンモニウム塩 (Fig.1) 及びalkyl (C_{12s} 又はC₁₆) glucoside sulfateのナトリウム塩(Fig.2)を用いた。試料には、PTH-DL-アミノ酸及びその他のラセミ体をメタノール-水に溶解して用いた。

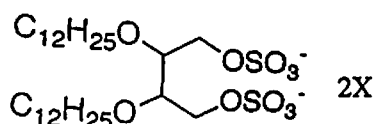
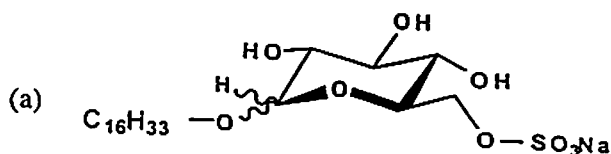
3、結果

(1) 酒石酸誘導体界面活性剤

Fig.1に示したナトリウム塩の界面活性剤15mMを20mMリン酸塩緩衝液 (pH7.0) に溶解し、トリエチルアンモニウム塩の界面活性剤15mMを50mMのトリスーリン酸塩緩衝液 (pH7.0) に溶解した。PTH-DL-アミノ酸は、トリエチルアンモニウム塩を用いた方がよりよく光学分割ができた(Fig.3)。しかし、Fig.3以外のPTH-DL-アミノ酸とDNS-DL-アミノ酸は、光学分割されなかった。

(2) グルコース誘導体界面活性剤

Fig.2に示したアルキル鎖が異なるナトリウム塩(a)30mMを30mMリン酸塩-30mMホウ酸塩緩衝液(pH7.0)に溶解し、ナトリウム塩(b)15mMを20mMリン酸塩緩衝液に溶解したものを用いた。試料に上記で用いたPTH-DL-アミノ酸を用いたところ(a)ではPTH-DL-アラニンがわずかに光学分割をした。しかし、他のPTH-DL-アミノ酸とDNS-DL-アミノ酸は、光学分割はされなかった。(b)は、どちらも光学分割しなかった。



X : Na⁺ or N⁺HEt₃

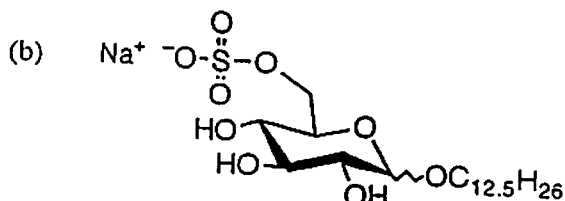


Fig.1 Chemical structure of used tartaric acid derivatives

Fig.2 Chemical structure of used glucoside derivatives

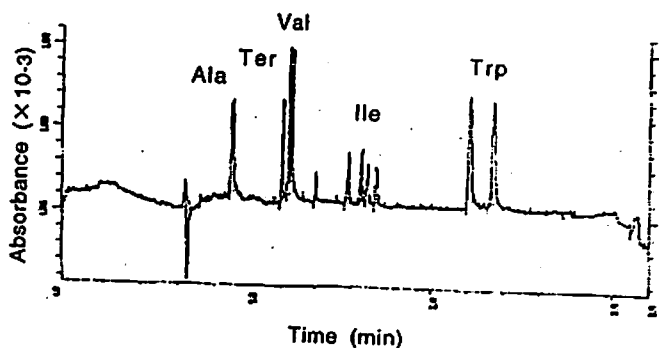


Fig.3 Separation of five PTH-DL-amino acids (Ala,Val,Thr,Trp,Ile)

Separation solution, 50mM Tris-phosphate buffer (pH7.0) containing 15mM 2,3-dodecoxy-1,4-butylenedisulfate ditriethylammonium salt. Capillary, 50 μ m i.d. $\times$ 500mm. Applied voltage, 20kV. Detection wavelength, 210nm. Temperature, 25 $^{\circ}$ C

c I E Fにおける合成p I マーカーを用いた キャリアアンフォライトの分離能の評価

○小林英三郎、鈴木 望与、柳沢 濃志

城西大学理学部化学科 350-02 坂戸市けやき台1-1

EVALUATION OF pH GRADIENT FORMING ABILITY WITH SYNTHESIZED pI MARKER ON CAPILLARY ISOELECTRIC FOCUSING

Hidesaburo Kobayashi, Miyo Suzuki and Atsushi Yanagisawa

*Department of Chemistry, Faculty of Science, JOSAI University, SAKADO 350-02,
Japan*

ABSTRACT

Capillary isoelectric focusing (cIEF) is a potent method for estimation of isoelectric point (pI) of protein. The resolution of pI measurement of protein is depend on pH gradient which is formed by carrier ampholite. We tried to evaluate commercial available carrier ampholites with DNS-derivatives from peptides, chymotryptic digest of protamine and carrier ampholites as markers.

1. はじめに

タンパク質の等電点 (pI) 測定は従来ゲル電気泳動によって行われてきたが、近年キャピラリー等電点電気泳動法 (cIEF) を用いる迅速なpIの測定法が展開されつつある。cIEFは両性電解質混合物 (キャリアアンフォライト) によりキャピラリー中でpH勾配を形成し、タンパク質を等電点まで移動する方法であるが、再現性の高い等電点を得るためには内部標準物質としてpIマーカーを使用することが必要である。また、安定したpH勾配を形成するキャリアアンフォライトを選択する評価方法も本方法を用いるとき有利となる。ペプチドのダンシル (DNS) 誘導体をpIマーカーとし、またキャリアアンフォライトのダンシル (DNS) 誘導体を用い、市販キャリアアンフォライトの比較を試みた。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置はBeckman P/ACE 5010 を用い、検出波長 280 および 320 nm を使用した。キャピラリーはコーティングカラム (eCAP neutral capillary : 内径 50mm、長さ 27 cm、有効長 20 cm) を用い、検体であるキャリアアンフォライトをリニヤーゲルおよびpIマーカーとの混合試料を加圧によりキャピラリーに注入し、電圧をかけつつ形成した等電点ゾーンを加圧によりインライン検出部まで移動する方法を用いた。設定温度は20℃にして行った。ペプチドGGHおよびGGGはダンシルクロラ

イド (DNS-C1) を用い pH 8.0 で DNS 誘導体の合成を行い、HPLC (ODS) で精製したものを用いた。各種キャリアアンフォライトも同様に DNS 化を行い、脱塩後混合し pI マーカー混合物として使用した。またプロタミンのキモトリプシン加水分解物の DNS 化を行い塩基性領域の pI マーカーおよびトリプトファン (Trp) は中性付近のマーカーとしてそれぞれ用いた。

3. 結果・考察

市販のキャリアアンフォライトは濃度表示がされているもののメーカーにより同じ pH 範囲のものであっても電気伝導度は異なり、このことは形成される pH 勾配全体あるいは局所的に pH 勾配が異なることが予測される。図 1 には種々のメーカーの pH 3-10 のものに DNS-pI マーカーを混合し等電点電気泳動を行った結果を示した。それぞれの中央の Trp のピークをはさみ移動時間が短いものと長いものの領域に差があり、キャリアアンフォライトの塩基性および酸性領域における pH 勾配を形成する両性電解質イオンの量差が反映されていると思われる。また、すべての領域で pI マーカーの分離パターンが異なることは微小範囲に存在する両性電解質イオンの組成が異なることが予測される。これらの結果は cITP 法でのキャリアアンフォライトの分析結果^{1,2,3)}とも類似していることから、等電点電気泳動を行う際のキャリアアンフォライトの選択の指標とするなりうると考えている。

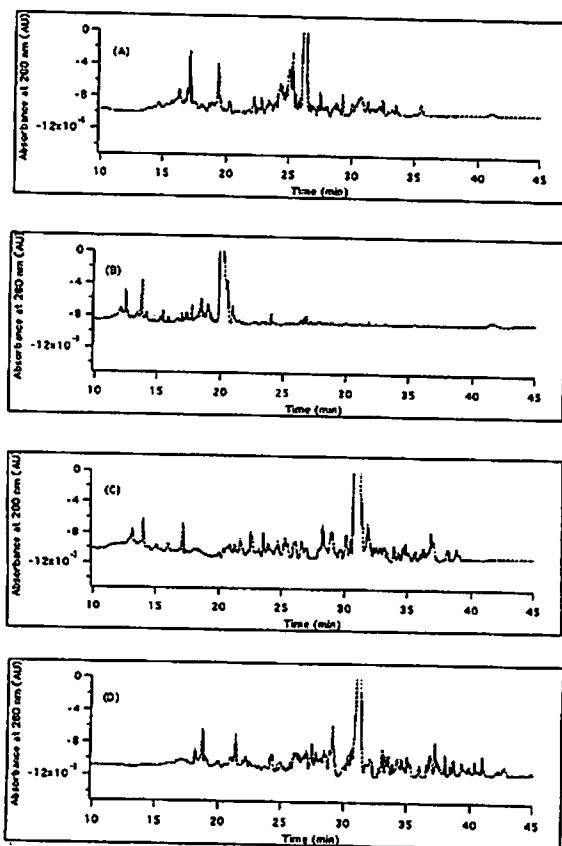


Figure 1. A cIEF electropherogram of DNS protamine peptide sample with simultaneous pressure and voltage mobilization. One μ L of DNS protamine peptide sample was mixed with 2 μ L of 3.5 % TEMED and 2 μ L of (A) cIEF 3-10 Ampholyte, (B) Pharmalyte (C) SERVLYT, or (D) Bio-Lyte and 100 μ L of cIEF GEL and was injected for 2.5 min using 20 psi pressure after pre-rinse of capillary with water for 2.5 min using same pressure. The electrophoresis voltage, 13.5 KV, was applied at 5 min followed by 2 min of focusing step and the duration of mobilization step was 54 min. The focusing step and mobilization step of the field strengths were the same 500 V/cm.

キナアルカロイド類及び カイン系局所麻酔薬のキャピ ラリー電気泳動による分離挙動

(愛知工業大学) 酒井 忠雄 ○ 眞弓 聡 仲野 智博

SEPARATION BEHAVIOUR OF CINCONAALKALOIDS AND LOCAL ANESTHETICS(CAINES) USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology,
Yachigusa, Yakusa-cho, Toyota 470-03(Japan)

Quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine have similar structures and these pK_a values are not so different. It is important to these compounds in Cinchona plants. In this work, these compounds could be separated simply and rapidly. And also, the separation behaviour of local anesthetics, such as procaine, tetracaine, lidocaine and dibucaine was investigated.

1) はじめに

キャピラリー電気泳動(CE)による各種の医薬品分析が多く試みられている。HPLCに比べ分離能が高く、分離条件が繁雑でないことから、広く利用されている。ここでは互いに光学異性の関係にあるキニーネとキニジン、シンコニンとシンコニジン及び4成分混合物について分離条件を検討した。また、リドカイン、プロカイン、ジブカイン及びテトラカインは局所麻酔薬として使われるが、類似の構造をもつこれらが分離でき、且つ医薬品として配合されるジフェンヒドラミンの影響の有無についても検討したところ、比較的単純な条件で分離できることが分かった。

2) 実験

CE測定装置はアプライドバイオシステムズ社製270Aを用いた。データ処理は日立製D-2500型クロマトデータ処理装置を用いて、ピーク高さ、ピーク面積、電気泳動移動度を求めた。キャピラリーはジーエルサイエンス社製フューズドシリカキャピラリーチューブ(50 μ m i. d., 375 μ m o. d.)を用いた。有効長は50cmとした。検出波長は200 nmを用いた。

3) 結果と考察

① UV領域における各成分の吸収スペクトルを測定した。キニーネとキニジンは207 nmと235 nm、シンコニンとシンコニジンは203 nmと227 nmに特徴的吸収を示した。ここでは207 nmを検出波長とした。またカイン系化合物についてもスペクトル測定をしたところ、テトラカインは310 nmに、プロカインは290 nmに強い吸収を示したが、他の化合物はこの付近に吸収を示さなかったため、検出波長は200 nmとした。

② pHの影響 ここで取り扱ったアミンは3級アミンで酸性領域ではプロトンが付加した状態で存在する。低いpHでは電気泳動による移動でありpHが高くなるにつれ、電気浸透流の影響が現れる。しかしアミンは分子性の種が多くなりpHの変化により移動度の違いが期待できる。まず、キニーネ系化合物について検討したところ、pH 9.2 付近で良好なピークが得られたが、分離は十分ではなかった。そこで SDSの添加をしたところ分離できることが分かった。しかし、バッファの濃度でその挙動が異なった。10 mMのSDSを添加し、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ を10 mM、20 mM、30 mMと変えたところ、Fig. 1 に示すフェログラムが得られた。従って、4成分の分離が可能であることが分かった。

また、カイン系化合物についてもpHの影響について検討したところ、pH 3.5-5.5 で分離でき安定なピークが得られた。

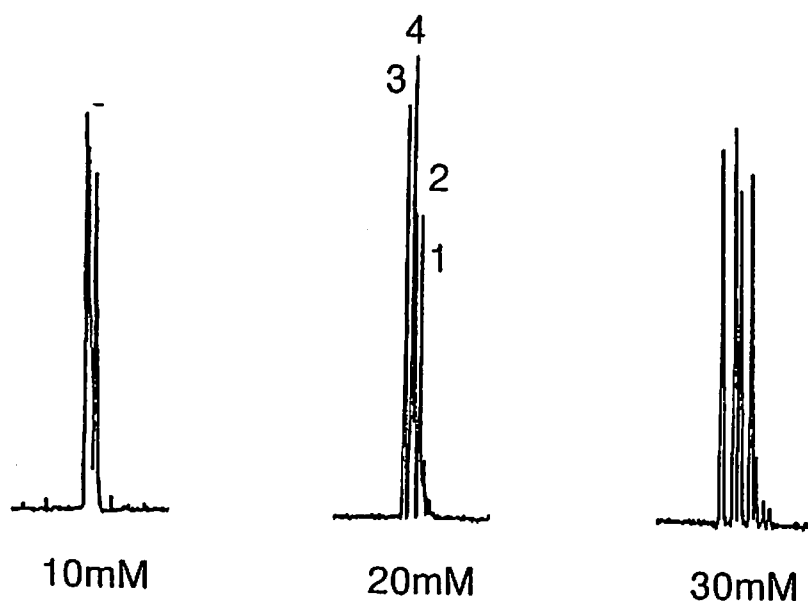


Fig.1 Electropherogram of quinine, quinidine, cinchonine and cinchonidine with different concentration of sodium borate

キャピラリー電気泳動法によるFe(II)およびFe(III)イオンの分析

(広島大・工) 陳 秀娟・育田夏樹・廣川健

Xiu-Juan Chen, Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract Separation behaviour of Fe(II) and Fe(III) ions forming $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{phen})_3^{2+}$ and $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{phen})_2^{x+}$ in a solution was studied by CZE (phen, 1,10-phenanthroline) using an acetic acid buffer (pH=4.8) and HCl solution (pH=1.5) as the supporting electrolyte. Although migration of $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{phen})_2^{x+}$ was confirmed, the separation of $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{phen})_2^{x+}$ and phen was impossible.

【緒言】 Fe(III)イオンの電気泳動移動度は、低いpH領域をのぞき、水酸化物錯体の生成により非常に小さい。そのためFeイオンの電気泳動分析は通常Fe(II)イオンについておこなわれており、電気泳動法ではFe(II)とFe(III)イオンのspeciationは困難である。最近我々は1,10-phenanthroline (phen) との錯イオンが、等速電気泳動モードであれば分離可能であることを始めて見いだした[1]。CZEモードでも分離可能なはずであるが、現在まで成功していない。本研究ではCZEモードでの $\text{Fe}^{\text{III}}\text{phen}$ 錯体の泳動挙動について検討すると共に、CZEによる溶液中のFe(II)とFe(III)イオンのspeciationを目的として、スルフォサリチル酸(ssa)やEDTA等の錯形成剤とのCZE分離を検討した結果について報告する。

【実験】 CE装置としてはCE-800 (JEOL) を使用した。CZEの分離キャピラリーは内径75 μm 、全長50.7cm、有効長30.2cm、測定吸収波長は254nm、印加電圧は10 kVであった。試料注入は落差法または電気的注入法を使用した。支持電解液としては酢酸バッファー (20mM酢酸ナトリウムに酢酸を加えてpH=4.8) の他、10 mM塩酸等を使用した。

Fe(III)イオンは $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ から20mMの溶液を調製した (硝酸を加えてpH=1.3)。Fe(II)は $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ から20mMの溶液を調製した。電気泳動前にそれぞれ一定量の錯形成剤貯蔵液と反応させた後混合し、電気泳動挙動を観察した。

【結果と考察】 図1aにFe(II)とphenの1:3混合物のエレクトロフェログラムを示した。phenの混合比を1:4まで上げると、過剰となったphenのゾーンが $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{phen})_3^{2+}$ キレートゾーンの後に観測され確かにphenは3配位していることが確認される (図1b)。一方Fe(III)とphenの錯体は等速電気泳動の実験からこのような条件下では2配位であり、残った配

座は泳動バッファーで占められていることがわかっている。図1c・1dに示したように1 : 2と1 : 3混合試料のフェログラムを見ると、 $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{phen})_2$ 錯体の生成が示唆されるが、この条件では明瞭なピークを形成するには至らず、またphenとの分離も不十分であった。

水酸化物の生成を抑えるため低pH (pH=1.5) での実験を試みたが、図1e・1fに見られるように、 $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{phen})_2$ 錯体のピークは幾分シャープになったが、やはりphenとの分離は困難であった。 $\text{Fe}(\text{III})$ イオンについては他にスルフォサリチル酸やEDTAとの錯形成を検討した。ポスターではこれらの結果についても報告する予定である。

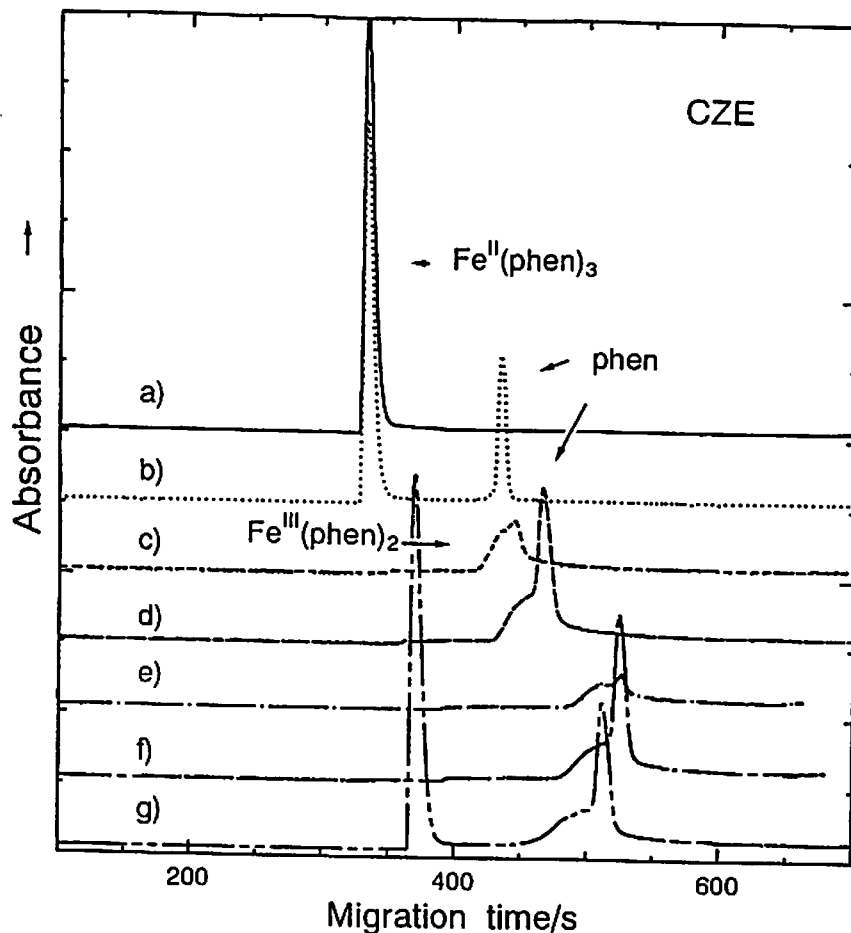


Fig. 1 $\text{Fe}(\text{II})$ および $\text{Fe}(\text{III})$ イオンのエレクトロフェログラム

a) $\text{Fe}(\text{II})$ とphen 1 : 3混合試料 ($\text{Fe}(\text{II})$ は0.3mM)、b) 1 : 4混合試料、c) e) $\text{Fe}(\text{II})$ とphen 1 : 2混合試料 ($\text{Fe}(\text{III})$ は0.3mM)、d) f) $\text{Fe}(\text{III})$ とphen 1 : 3混合試料、g) $\text{Fe}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{III})$, phen 1 : 1 : 6混合試料、検出波長は全て254nm。a, b, c, d, gは酢酸バッファー(pH=4.8)、e, fは10mM塩酸(pH=2.0)。

1. T. Hirokawa, K. Nishimoto, and F. Nishiyama, J. Chromatogr. A, 723(1996)389.

ITP-CZE による希土類鉍石の分離・分析

佐藤宏則、育田夏樹、○廣川 健（広島大工）

Separation and Analysis of rare-earth ores by means of ITP-CZE

Hironori Sato, Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract Isotachophoretic fractions of an ion-adsorption type rare-earth ore was analyzed off-line by CZE(ITP-CZE). This combination enabled the analysis of minor elements eg. Tb and Dy neighboring Y, one of the major elements in the ore. The characteristics of ITP-CZE were discussed in comparison with ITP, CZE and ITP-PIXE.

【緒言】 希土類鉍石試料中にはPmを除くランタニド元素が全て含まれている。鉍石の種類により組成が異なるが、成分元素によって存在比は2桁から4桁異なっている。我々は希土類鉍石を等速電気泳動法(ITP)やキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)などの分離分析法を使用して分析してきた。ITPの場合、1%以下の微量成分についてはよほど大電流量を通電できる装置でなければ分析が難しい。またCZEで微量分析を行おうとすると簡単に試料過負荷となり、分析精度に問題を生じる。現在の所、ITP分離した試料をマイクロスケールで分取しオフラインでPIXE分析する方法(ITP-PIXE)が最も高精度・高濃度感度であることがわかっている。しかしPIXE法は普及してきたとは言え、いまだに一般的な分析法とは言えない。本研究では、ITPフラクションをオフラインでCZE分析する方法(ITP-CZE)が希土類鉍石試料の分析にどの程度有効であるか、ITP・CZE・ITP-PIXE法と比較検討した結果について報告する。

【実験】 等速電気泳動分取には自作の装置を、CZEステージではCAPI-3100（大塚電子）を使用した。分離用電解液としては最近開発した15種希土類全分離用電解液を使用した。主錯形成剤は α -ヒドロキシイソ酪酸(HIBA)で、副錯形成剤としてマロン酸を含む。等速電気泳動の泳動電流は200 μ Aで通電量は10C、CZEの分離キャピラリーは内径75 μ m、全長50cm、有効長37.7cm、測定吸収波長は220nm、印加電圧は20kVであった。温調設定は25℃とした。分析に使用した電解液を表1に示した。分取にはリーディング電解液による押し出し法を使用し、一滴約5 μ lの液滴を8滴ずつCZE試料用のバイアルに分取した。定量にあたってはリーディング液中の NH_4^+ のピーク面積で補正した。

【結果と考察】 2g/lのイオン吸着型鉍石溶液100 μ lをITP分離し、14のフラクションとして分取した。各フラクションのCZEフェログラムの一部を図1に示した。ITP-CZE法では、CZEのみでは多量のYの存在に妨害されて分離が不十分であったTbやDyも精度良く分析できることが明らかになった。本法の特徴は、

ITP前分離により多量の試料の取り扱いを可能にすると共に、分取する事によって、過負荷になりやすいCZEの負荷を軽くし分離を向上させる点にある。一方では、解析すべきフェログラムの数が増加すること、分取時の1滴の体積が変動しやすいために定量には内部標準が必要である事、フラクションが微量のため蒸発の影響による分析誤差を生じやすい等の問題もあり、注意が必要である。

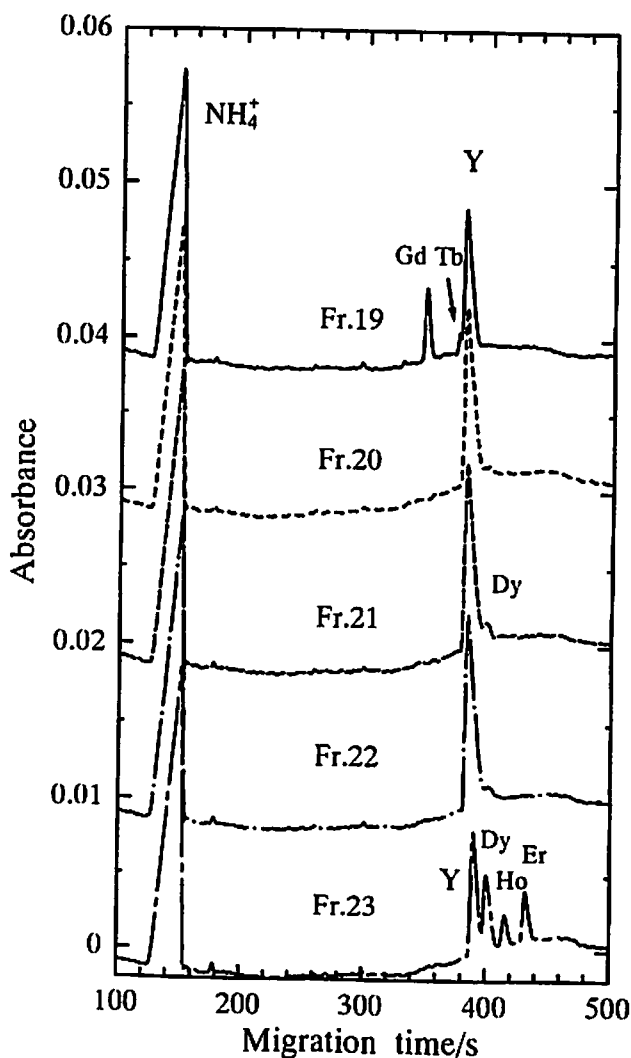
表1 電解液システム

ITP	CZE
リーディング電解液: 20mM アンモニア水溶液	泳動バッファー
錯形成剤 8.0mM HIBA, 2mMマロン酸	間接吸収剤: 30mMクレアチニン
pH 緩衝剤 2-エチル-n-酪酸 pH=4.80	錯形成剤 5mM HIBA, 0.45mM Malonic acid
添加剤 0.1% Hydroxypropylcellulose	pH 緩衝剤 2-ethyl-n-butyric acid, pH=4.80
ターミナル電解液液: 10mM 塩酸カルニチン	

表2 イオン吸着型鉱石の分析結果

	ITP-CZE		ITP-PIXE
	found/ μ g	w/%	w/%
La	21.7	26.0	25.8%
Ce	1.8	2.2	2.9
Pr	5.8	6.9	6.3
Nd	19.9	23.8	22.7
Sm	3.9	4.7	4.8
Eu	0.4	0.5	1.0
Gd	4.3	5.1	4.7
Tb	0.3	0.4	0.9
Y	19.3	23.1	22.5
Dy	3.1	3.7	3.9
Ho	0.7	0.8	0.8
Er	1.5	1.8	1.9
Tm	0.1	0.1	0.3
Yb	0.5	0.6	1.4
Lu	0.2	0.2	0.2

図1. イオン吸着型鉱石の ITP フラクションの CZE 分析 (フラクション19から23のみ)



CEを用いる物性へのアプローチ(1) 拡散係数の算出

津田孝雄、北川慎也(名工大・工)

Estimation of diffusion coefficient by capillary electrophoresis

Takao TSUDA, Shinya KITAGAWA

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

A new instrumentation for measuring of diffusion coefficient using capillary electrophoresis and a new equations to cancel the contribution of flow profile have been proposed. The presented method needs only several nano liter of sample, and the sample concentration used is less than 10mM. The estimated diffusion coefficient of cerium and copper ions are 8.46×10^{-6} and 1.48×10^{-5} cm^2/sec , respectively, in the mixture of 0.03N HCl and 0.1M KCl aqueous solution. The number of waters hydrated on the ions was also estimated by using the following assumption: $D_{1,2} \times M^{1/2} = \text{const.}$

キャピラリー電気泳動を利用した拡散係数の算出には、分析に必要な試料の必要量が極めて少なくすむ、フロープロファイルがほぼ栓流に近い流れによる試料の分散が少ないという利点がある。今回我々は電気浸透流の方向、電気泳動の方向が電位勾配の方向を変更させることで容易に逆転するという事を利用し、流れに依存した試料の分散をキャンセルする手法を開発し、銅イオン、セリウムイオンに適用した。また、得られた値よりセリウムイオンの水和状態も推測した。

理論：一般にクロマトグラフィーにおけるピークの分散(σ)は一般に $\sigma^2 = \sum \sigma_i^2$ の加算則が成立し、式1のように表される。

$$\sigma^2_{\text{apparent}} = \sigma^2_{\text{inj}} + \sigma^2_{\text{molecular diff.}} + \sigma^2_{\text{flow}} + \sigma^2_{\text{geometry}} \quad (1)$$

σ^2_{inj} は試料注入に基づく試料の栓状の広がり、 $\sigma^2_{\text{molecular diff.}}$ はカラム軸方向への分子拡散による広がり、 σ^2_{flow} はフロープロファイル(圧力差流では Poiseuille flow profile)に基づき、 $\sigma^2_{\text{geometry}}$ は装置からの諸因子を表す。キャピラリー電気泳動においては浸透流のフロープロファイルが非常に栓流に近いことが観察されているが逆パラボリックのプロファイルを持っている¹。拡散による分散、流れによる分散は、

$$\sigma^2_{\text{molecular diff.}} = 2D_{1,2}t \quad (2)$$

$$\sigma_{flow, CE}^2 = Ct \quad (3)$$

これらの式で与えられる。ただし、Cは定数である。

σ_{inj} は時間因子を持たず、また $\sigma_{geometry}$ も同様である。

以上より、

$$\sigma_{apparent}^2 = A + 2D_{1,2}t + Ct \quad (4)$$

ただし、 $A = \sigma_{inj}^2 + \sigma_{geometry}^2$ である。

もしも流れを Δt 時間ごとに正、逆、正、逆と変えて測定を行い、かつ $\Delta t \ll t_n$ では $C \Delta t \ll 2D_{1,2}t_n$ のとき (5) 式は、

$$\sigma_{apparent, n}^2 = A + 2D_{1,2}t_n \quad (5)$$

と考えても良い。従って、時間軸に対し σ^2 をプロットしその傾きより $D_{1,2}$ が推定できる。

実験：本装置は溶融シリカキャピラリー、紫外・可視検出器、高電圧電源、リザーバーより成る。溶融シリカチューブ（内径 $50 \mu m$ 、外径 $375 \mu m$ 、長さ $25.1cm$ 、試料導入側より検出器までの距離 $11.1cm$ ）の中央部に、オンカラム用のセル部を調整し、キャピラリー管の両端にリザーバーを設置する。全体を恒温槽（ 25 度）の中に設定した。

試料（ $3.6nL$ ）を導入後、電圧を印加する。試料ゾーンは電気浸透流及び電気電気泳動により検出セルを通過する。試料ゾーンを充分移動させた後電圧を記ししばらくそのまま放置し、ついで逆電圧を印加させ試料ゾーンを再びセル部を通過させる。これにより試料ゾーンは試料導入を行った入口側へ戻る。この操作を繰り返し、得られた試料ゾーンのプロファイルを記録する。得られたデータを時間-半値巾の二乗でプロットし、その傾きから $D_{1,2}$ を求める。

結果：本装置より $0.1M$ KCl を含んだ $0.03N$ HCl 中の Ce^{3+} の拡散係数 ($D_{1,2}$) は $8.46 \times 10^{-6} cm^2/sec$ が得られた。同様に Cu^{2+} イオンに関しては $1.48 \times 10^{-5} cm^2/sec$ の値が得られた。 $DM^{1/2} = const.$ の関係が成立するとし、 Cu^{2+} が 6 個の H_2O を配位したアコイオンとして存在すると仮定すれば、定数として $19.4 \times 10^{-5} [cm^2/sec]$ が得られる。これを用いて Ce^{3+} の見かけ上の H_2O の配位数を求めたところ、22 個の値が得られた。この値は Caminitiらの値、19.5に近い。

本法は、(1) 迅速な拡散係数の測定が可能、(2) 極微量試料で測定が可能、(3) 媒体系の選択が容易、などの特徴を持ち、拡散係数の算出と共に溶液内での試料の存在状態に関する情報を得る手法として有効であると思われる。

I.T.Tsuda, M.Ikeda, G.Jones, R.Dadoo, R.N.Zare, J.Chromatography, 632, 1993, 201-207.

高分子界面活性剤のキャラクタリゼーション

○飯田幸治、Christopher P. Palmer、大塚浩二、寺部 茂

姫路工業大学理学部

Characterization of High Molecular Mass Surfactants

Koji Iida*, Christopher P. Palmer, Koji Otsuka, Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12 Japan

In this study, we characterized three HMMS; SUA (sodium 10-undecylenate oligomer), SUS (sodium 10-undecenyl sulfate oligomer), and BBMA (butyl acrylate-butyl metacrylate-metacrylic acid copolymer). SUA and SUS monomers were polymerized with a radical initiator. BBMA was donated from Daiichi Kogyo Seiyaku. DLS (dynamic light scattering) of each HMMS was measured. The micellar diameter of BBMA was 17.8 nm at 90° angles. That of SUA was 40.9 nm at 90° angles. These values are significantly larger than those estimated from size exclusion chromatography. To clarify the difference between the two values, DLS was performed in organic-aqueous solution. The DLS results will be discussed relating to the interaction characteristics of HMMS.

1. はじめに

近年、ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)における擬似固定相として、高分子界面活性剤(HMMS)を用いた分離が報告されてきている。これらの化合物は臨界ミセル濃度(CMC)が零なので、ミセル濃度が界面活性剤濃度と等しく、pH、温度、イオン強度に左右されず一定である。また、有機溶媒の含有量が高くても、安定なミセルを形成するため、疎水性の高い化合物のMEKC分離ができる。

今回、MEKC用擬似固定相として3種の高分子界面活性剤(HMMS), sodium 10-undecylenate oligomer (SUA), sodium undecenyl sulfate oligomer (SUS), butyl acrylate-butyl metacrylate-metacrylic acid copolymer (BBMA)を用い、それぞれのミセルの大きさを動的光散乱(DLS)により測定し、通常のMEKC分離に用いられる硫酸ドデシルナトリウム(SDS)ミセルの場合との比較検討を行った。

2. 実験

(1). 合成

SUSモノマーは乾燥窒素下で、-5℃エーテル中において、当量のクロロスルホ

ン酸との反応により、1-ウンデセン-11-オールから合成した。できた酸を当量の水酸化ナトリウムで中和し、エーテル溶液から水で抽出した。水を蒸発後、生成物をエタノールから再結晶した。SUA, SUS共にDurairaj, Blum[1]の方法で重合した。SUSにおいては重合中の加水分解を抑えるため、水の代わりに 30 mM リン酸塩緩衝液 (pH 6.6) を用いた。

(2). DLS測定

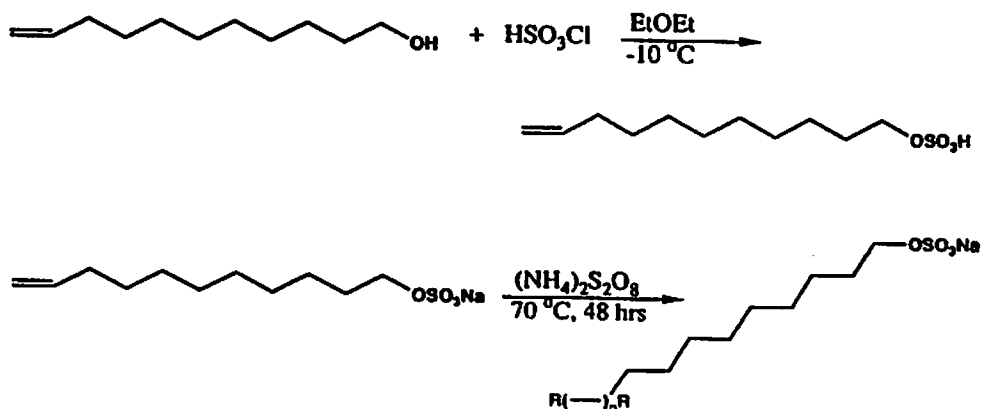
動的光散乱装置DLS-6000ALS (大塚電子社製) を用いて、動的光散乱により各HMMS ミセル及びSDS ミセルの大きさを測定した。なお、測定はすべて25℃恒温下で行った。

3. 結果

SUSモノマーの合成収率は60%以上であり、これをエタノールから再結晶した最終収率は30%であった。なおSUSの収率は25%となった。SUSの¹H-NMRスペクトルから、硫酸基のαメチレンとアルコールのαメチレンの両方が認められ、それぞれの積分値を計算することで約20%の硫酸基が重合中に加水分解したと推測できる。

DLSの測定結果は、散乱角90度においてBBMA, SUAの直径がそれぞれ17.8 nm, 40.9 nmであった。この値は、サイズ排除クロマトグラフィーで得られたSUAの分子量 (1029) を基に推測した大きさと比較してかなり大きな値となっており、実際の泳動液中ではかなりの数のミセルが凝集していると考えられる。現在、有機溶媒添加による分子集合体の大きさの変化、またMEKCの擬似固定相としての性能を検討中である。

[1] B.Durairaj and F.D.Blum, Langmuir 5, 370(1989)



Synthetic scheme for the preparation of sodium 10-undecenyl sulfate monomer and polymer.

On-column Concentration of Neutral Analytes for Micellar Electrokinetic Chromatography

Joselito P. Quirino* and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12, Japan

On-column concentration by field enhancement in the sample zone lead to one to almost two orders of magnitude improvement in concentration limits of detection for neutral analytes. Reversed electrode polarity stacking mode (REPSM) afforded higher detector response improvements than normal stacking mode (NSM) basically because of longer sample plugs that can be injected and removal of the sample matrix by electroosmotic flow. Stacking efficiencies computed using high molecular mass surfactants (HMMSs) were greater compared to a low molecular mass surfactant (LMMS), which can be explained by the formers' monomolecular micelle nature. Attempts were also made to explain theoretically and experimentally REPSM.

1. Introduction

To improve the low concentration sensitivity of MEKC, analyte focusing techniques compatible with it should be developed. On-column techniques in capillary zone electrophoresis in principle are based on field enhancement in the sample zone, done by preparing samples in a lower conductivity matrix and performing capillary electrophoresis in a high conductivity buffer (1). This causes higher velocities for charged compounds in the sample zone than in the bulk solution and eventual narrowing of bands in the concentration boundary. Stacking of neutral analytes with the same principle are strongly dependent on capacity factors because they have zero electrophoretic mobility unlike charged compounds.

In this report, we show the possibility of MEKC for trace analysis and discuss some mechanisms related to the stacking processes studied.

2. Experimental

Capillary electrophoresis experiments were performed with a Beckman PACE 5000 with Gold Software and a Hewlett Packard 3D Capillary Electrophoresis System. Butyl acrylate-butyl methacrylate-methacrylic acid copolymers sodium salt was obtained from Dai-ichi Kogyo Seiyaku and sodium 10-undecylenate was synthesized in our laboratory. Sample solutions were generally prepared in purified water unless specified. Separation buffers were prepared from pertinent solutions of sodium dihydrogen phosphate and sodium tetraborate to desired pHs.

Sample solutions were introduced hydrodynamically at different intervals in order to obtain desired sample plug lengths for NSM and REPSM. Polarities were switched from negative to positive when currents reached 97-99% of the predetermined current in REPSM.

3. Results

Figure 1 shows the sharpening of zones when the sample matrix has lower conductivity (B and C) than the run buffer, furthermore, preparing the samples in water offered simplicity. Figure 2 shows around 20 fold improvement in detector response for NSM and around 50 fold improvement for REPSM. With resorcinol as sample, almost 2 magnitudes improvement in molar concentration limit of detection for REPSM and an order of magnitude improvement for NSM were realized for HMMS compared to a 2 s injection (see table 1).

Reference:

1. Chien, R.L. And D.S. Burgi, Anal. Chem., 64,8 (1992) 489A-96A.

Table1: Detection limits of resorcinol (S/N 10)

	100mM SDS	1%SUA	1%BBMA
2 s inj.	$1.28 \times 10^{-5}M$		
40 s inj.NSM	$1.54 \times 10^{-6}M$	$2.13 \times 10^{-6}M$	$1.99 \times 10^{-6}M$
whole capillary REPSM	$3.20 \times 10^{-6}M$	$3.18 \times 10^{-7}M$	$3.20 \times 10^{-7}M$

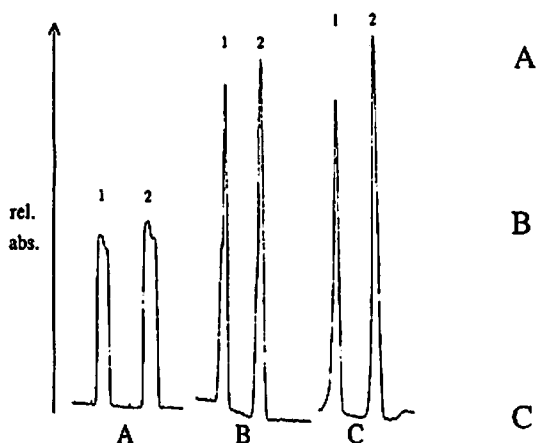


Figure 1: Non-stacking process in A and stacking process in B and C. A. Run buffer: 1% BBMA in pH 8 50mM phosphate buffer, Sample buffer: same. B. Run buffer: same as in A, Sample buffer: 0.1% BBMA in pH 8 5mM phosphate buffer. C. Run buffer: same as in A, Samples prepared in water. 20 s inj. Peak 1: 2-naphthol, peak 2: 1-naphthol

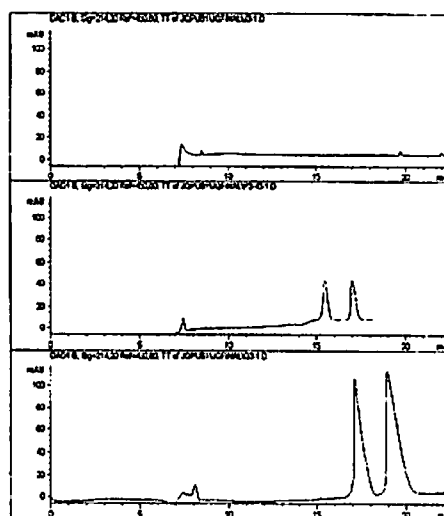


Figure 2: A - 2 s injection, B - 45 s injection NSM, and C - whole capillary filling REPSM. samples prepared in water and run buffer is similar in figure 1A peaks of samples similar to figure 1

MEKCにおけるスタッキングによるキャピラリー内試料濃縮と試料溶解液の組成について

○今澤正興、畑中由利子（国立精神神経センター）

SAMPLE MATRIX EFFECTS ON SAMPLE STACKING IN MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY

Masaoki Imazawa, Yuriko Hatanaka

National Institute of Neuroscience, NCNP

On-column concentration of neutral molecules has been previously achieved in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) by means of field-amplified sample stacking [Z. Liu et al., J. Chromatogr. A, 673, 125 (1994)]. The stacking process is accomplished by dissolving the analytes in a low-concentration micellar solution. In addition, we found that the best stacking efficiency in MEKC was obtained when the concentration of the background electrolytes was similar to that of the running buffer. The low electrical conductivity in the sample buffer resulted in the poor stacking efficiency due to peak splitting.

1. はじめに

スタッキングによるキャピラリー内試料濃縮法は、キャピラリー電気泳動の弱点である低い分析感度を補うために有用であり、MEKCによる中性物質の分離の際にも使用されることが少なくない。しかし、CZEの場合に比べその機構がやや複雑なこともあり、MEKCにおけるスタッキング効率と試料溶液の組成との関係については、実用上必要な要素が十分認識されているとは言い難い。我々は、ルーチン分析に適当な、電極の極性切り替えを伴わない方法について、感度上昇、分解能等に及ぼす試料溶液中の電解質濃度と界面活性剤濃度等の影響を、疎水性の異なる複数の化合物を用いたモデル系により検討した。

2. 実験

Beckman P/ACE 5010 キャピラリー電気泳動システムを使用し、キャピラリーには内径 50 μm 、有効長 60 cm のフューズドシリカ管を用いた。標準的な分離溶液としては、30 mM SDS を含む四ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.3, 20 mM) を使用した。キャピラリー温度 25°C、電圧は 25 kV とした。検出波長は 214 nm とし、検出スリットの長さが 200 μm のキャピラリーカセットを用いた。試料としては、phenacetin, 3,4-dimethylacetanilide, 4-ethyl-3-methylacetanilide, carbamazepin の混合物のエタノール溶液を減圧乾固したものを、Vortex ミックシングにより、37°C に加温した試料溶解液に溶かし、窒素圧下 (0.5 p. s. i.) 注入を行った。

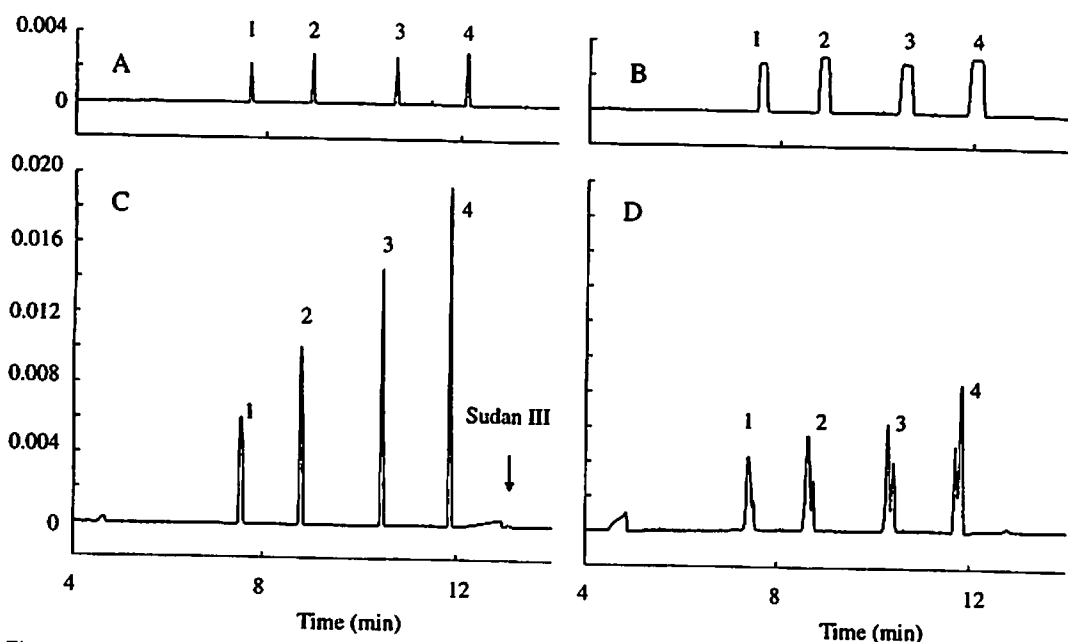


Fig.1. Effect of the sample solvent matrix on stacking efficiency. Conditions: separation buffer, 30 mM SDS in 20 mM sodium tetraborate (pH 9.3); pneumatic injection (0.5 p.s.i.), (A) for 5 s or (B, C, D) for 30 s. The sample was dissolved in (A, B) separation buffer or (C) 3 mM SDS in 20 mM sodium tetraborate or (D) 9 mM SDS in water. Peaks: 1 = phenacetin, 2 = 3,4-dimethylacetanilide, 3 = 4-ethyl-3-methylacetanilide, 4=carbamazepin.

3. 結果および考察

4種の疎水性の異なる芳香族アミド系化合物を用いて、試料溶解液の組成とスタッキング効率の関係を検討した結果の一部を Fig. 1 に示した。試料を分離溶液に溶解して 30 秒間キャピラリーに注入した場合には (Fig. 1B)、5 秒注入の場合 (Fig. 1A) に比べ、各ピーク幅の著しい増大が見られたのみであったが、3 mM SDS を含む 20 mM 四ホウ酸ナトリウム溶液に溶解し、30 秒の注入を行った時には、各ピークの高さが約 3~6 倍となり、かなりのスタッキング効果が認められた (Fig. 1C)。特に、ピーク 4 のカルバマゼピンの理論段数は 350,000 以上であり、Fig. 1A に比べ全く劣化は見られなかった。予測されるように、高いキャパシティブアクターを示す物質において、高いスタッキング効率が得られることが明らかとなった。なお、このサンプル溶解液中での SDS の臨界ミセル濃度 (CMC) は、我々の測定結果から約 2.6 mM であった。Liu らは、最高のスタッキング効率は試料溶液のミセル濃度が CMC よりわずかに高いところで見られると述べており [Z. Liu et al., J. Chromatogr. A, 673, 125 (1994)]、我々の結果もこの意味では、ほぼ一致している。しかし、彼らはその至適なサンプル溶解液として、9 mM SDS 水溶液を用いているが、我々の例では、この条件ではピークの割れが認められ (Fig. 1D)、一般的な認識とは異なり、試料溶液における低い電解質濃度は、ピーク形状劣化によるスタッキング効率の低下をもたらすことが判明した。

以上、得られた結果は、界面活性剤の種類を変えて SDS の代わりデオキシコール酸を用いてもほぼ同様であった。

ポリアリルアミン誘導体の動電クロマトグラフィー用キャリアとしての特性の検討

田中 信男、○中川 克仁、岩崎 宏信、細矢 憲、荒木 長男
京都工芸繊維大学繊維学部

Pseudo-Stationary Phase Prepared from Polyallylamine for Electrokinetic Chromatography

Nobuo TANAKA, ○ Katsuhito NAKAGAWA, Hironobu IWASAKI,
Ken HOSOYA and Takeo ARAKI

Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

We prepared alkylated polyallylamines (PAAs) as pseudo-stationary phase for electrokinetic chromatography (EKC), and examined their properties. We found that PAAs could be used as pseudo-stationary phase for EKC. Alkylated PAAs with long alkyl groups gave large capacity factors and wide migration time windows in the presence of 40-60% methanol.

はじめに

動電クロマトグラフィー (EKC) は、キャピラリー電気泳動の分離効率を維持したうえで、中性試料を分離できる有効な分離法である。しかし、疎水性の高い化合物は、ほとんどがミセルに分配されるためミセルと同じ速度で泳動し分離が達成されない。したがって、これらの化合物の分離には、ミセル溶液へのシクロデキストリンや種々の有機溶媒の添加が必要となる。しかし、シクロデキストリンの添加は、試料の溶出する順序や時間の予測を困難とする。また、大量の有機溶媒の添加は、界面活性剤ミセルの擬似固定相としての機能を損なう。高分子擬似固定相の使用により EKC 系への有機溶媒の添加が可能となれば、分離対象はさらに拡大するものと期待される。本報告ではポリアリルアミン (PAA) にアルキル基を導入した分離キャリアを合成し、その特性の検討を行った結果を報告する。

実験

[装置]

高圧電源 : Model HepII-30PO.80. (Matsusada)

検出機 : UV-8 model II (TOSOH)

データプロセッサー : Model C-R6A (Shimadzu)

フューズドシリカキャピラリー : 0.050 mm I.D. x 0.375 mm O.D. の内面未処理管。(Polymicro Technologies TSP050375)

[ポリアリルアミン (PAA) 誘導体の合成]

ポリアリルアミン塩酸塩 (MW=10000) から水酸化カリウムで PAA を遊離した後、アルキルブロミド ($C_nH_{2n+1}Br$, $n=8,10,12,16$) によりアルキル化した。得られたアルキル化 PAA にアクリル酸メチルをマイケル付加し、これを水酸化ナトリウムにより加水分解した後キャリアとして使用した。

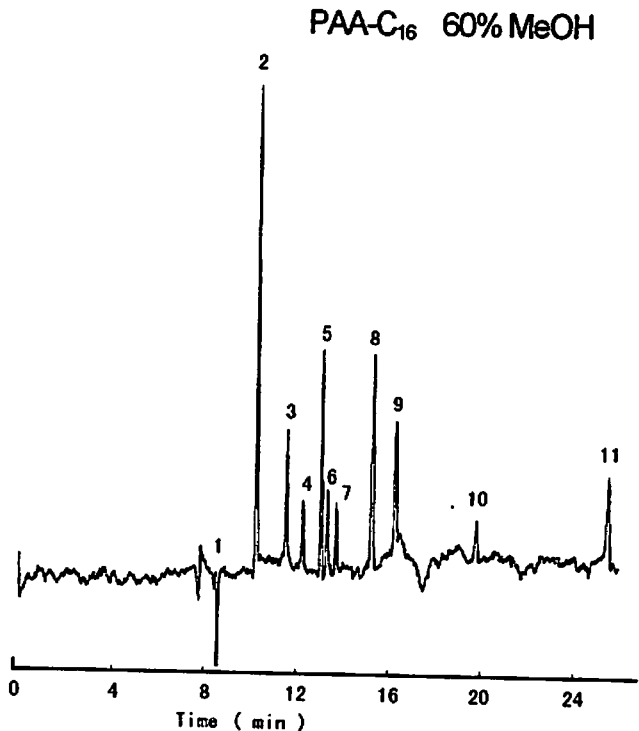
結果と考察

1) アルキル鎖長の効果

PAA- C_n ($n=8\sim12$) は緩衝液中においてキャリアとして機能し、また PAA- C_n ($n=10\sim16$) はメタノール(～60%)を添加した系においても機能した。導入したアルキル基の鎖長の増加とともに、分離選択性は SDS-MEKC のそれに近づいた。この結果は、アルキル基の疎水性とともに PAA 骨格鎖が溶質の保持に影響していることを示している。

2) 緩衝液への有機溶媒の添加

アルキル化 PAA はメタノール濃度の増加とともに広い分離ウィンドウを与えた。PAA- C_{10} および PAA- C_{12} は 40% のメタノール存在下で、また長鎖のアルキル基を導入した PAA- C_{16} は 60% のメタノール存在下で、疎水性化合物に対してアルキル基のもたらず疎水性により長い泳動時間と良好な分離を与えた(図1)。



L = 48 cm, l = 33 cm, UV = 220 nm, V = 400 V / cm,
20 mg / ml PAA- C_{16} ,
20 mM Borate buffer : MeOH = 4 : 6 (V / V), pH = 10.2
Samples : 1 = Methanol, 2 = Naphthalene,
3 = Diphenylmethane, 4 = Fluorene, 5 = Triptycene,
6 = Phenanthrene, 7 = Anthracene,
8 = o-Terphenyl, 9 = Pyrene, 10 = Triphenylene,
11 = 3,4-Benzpyrene,

図1 PAH の分離クロマトグラム

以上の結果は、PAA 誘導体の高分子擬似固定相としての有効性と、分離対象となる試料の疎水性に応じてアルキル鎖長と有機溶媒濃度を変えることにより、分離と分離時間を制御できることを示している。

変性条件におけるタンパク質の キャピラリー等電点電気泳動条件の検討

○田原義彦、楠 香織、真鍋 敬 (愛媛大・理・物質理学)

Conditions for the analysis of proteins by capillary isoelectric focusing in the presence of denaturing agents.

Yoshihiko TAHARA, Kaori KUSU, Takashi MANABE

Department of Material Science, Faculty of Science, Ehime University

ABSTRACT

Capillary isoelectric focusing(CIEF) is an electrophoretic method which separates proteins on the basis of the difference of isoelectric-points(pI) of each protein. In a focusing experiment the fused-silica capillary contains not only carrier ampholytes but also proteins. Since proteins are amphoteric, they will focus at their pI values in narrow zones in the same way as do the individual carrier ampholytes. The focused proteins can be mobilized to the direction of the detector by way of replacing cathode buffer.

In this study, we examined conditions for the analysis of proteins by CIEF in the presence of denaturing agents.

1. はじめに

タンパク質をその等電点(pI)の違いに基づき分離するキャピラリー等電点電気泳動を用いて、変性剤を用いないでタンパク質を分離する条件についてはすでに報告した。細胞タンパク質など、難溶性のタンパク質を含む試料に適用するために、変性条件下でのキャピラリー等電点電気泳動についてその泳動条件を検討した。

2. 実験装置および方法

キャピラリー電気泳動装置はスペクトラフィジックス社の波長可変分光光度計SC100にキャピラリー装着用アダプターを付けたものを、インテグレーターはJASCO社の807-ITを、高電圧電源は松定プレシジョン社のHSL-15P-L12Wを用い、電流値の変化をみるためNational社のPEN RECORDER VP-6521Aを接続した。フューズドシリカキャピラリーは内径75 μ m、外径375 μ m、全長270mm(実効長200mm)で、内壁をポリアクリルアミドでコーティングしたものをを用いた。

サンプルはSIGMA社より購入した精製タンパク質とヒト血漿を用いた。変性剤としては尿素、メルカプトエタノール、NP-40を使い、両性電解質混合物はファルマシア社のAmpholine(3.5-10)を使用した。あらかじめ変性剤を加えたタンパク質試料とAmpholineとを混合した。これをマイクロシリンジで直接キャピラリーに注入した。陽極槽液には10mM H_2PO_4 、陰極槽液には10mM NaOHを用い、電圧は10kV(370V/cm)、Ampholine濃度は1%とした。電流値が低下した時点で陰極槽液を10mM CH_3COOH に交換することによって収

束後のタンパク質を検出器側に移動させた。

3. 結果

myoglobin, apo-transferrin, carbonic anhydrase, albumin, ovalbuminの5種混合物の泳動結果をFig. 1に示す。このときの尿素の濃度は8M、メルカプトエタノールは0.2%、NP-40は0.1%である。Fig. 1におけるタンパク質の移動順序は変性条件での2次元ゲル電気泳動におけるタンパク質の等電点の順序と一致していた。変性条件での等電点ゲル電気泳動に準じて、界面活性剤としてNP-40を用いたが、NP-40の濃度を上げると分離能が悪くなることがわかった。

Fig. 2にヒト血漿タンパク質の泳動結果を示す。この場合、8M尿素、0.2%メルカプトエタノールでNP-40は加えていない。NP-40を加えない条件の分離に比べ0.1% NP-40を加えた条件のほうが分離が悪くなった。これらの結果から、キャピラリー内壁へNP-40とタンパク質の複合体が吸着している可能性があり、この点を現在検討中である。

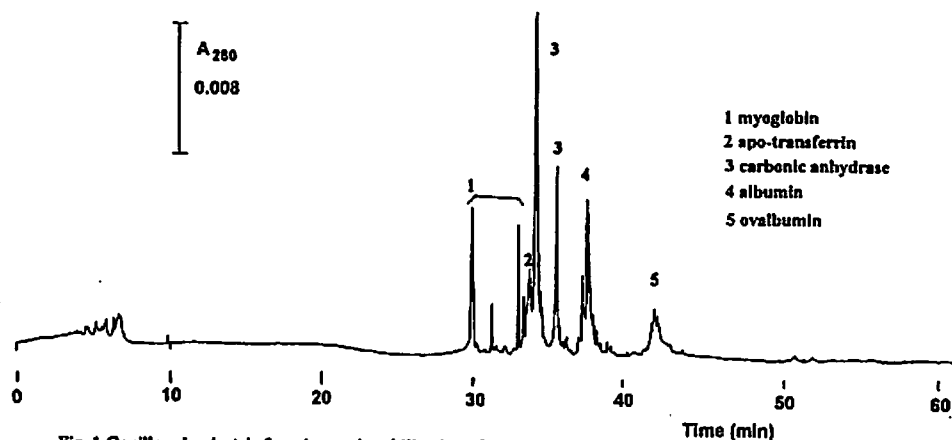


Fig. 1 Capillary isoelectric focusing and mobilization of purified proteins in the presence of 8 M urea, 0.2% mercaptoethanol, and 0.1% NP-40.

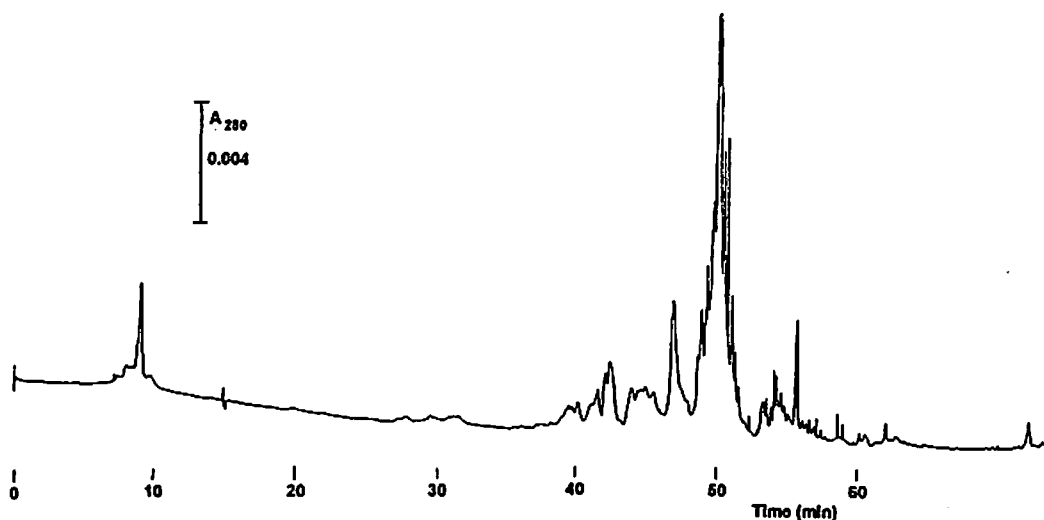


Fig. 2 Capillary isoelectric focusing and mobilization of human plasma proteins in the presence of 8 M urea and 0.2% mercaptoethanol

両性電解質混合物を用いた等電点電気泳動による 塩基性タンパク質分析条件の検討

○豊田洋介、宮本洋光、真鍋 敬 (愛媛大・理・物質理学)

Conditions for the analysis of basic proteins by isoelectric focusing with ampholyte mixtures.
Yousuke TOYOTA, Hiromitsu MIYAMOTO, Takashi MANABE
Department of Material Science, Faculty of Science, Ehime University

ABSTRACT

The conditions of isoelectric focusing for the separation of basic proteins have been examined. Basic proteins, cytochrome c (pI 10.5) and chymotrypsinogen (pI 9.6) have been successfully separated by capillary isoelectric focusing and by micro polyacrylamide gel isoelectric focusing by the addition of TEMED in the sample solution. The conditions were applied for the separation of human plasma proteins.

1. はじめに

血漿や細胞には、約3から約12の等電点のタンパク質が存在するが、従来のゲル等電点電気泳動では、等電点約3.5から約8までのものしか安定に分離できていない。最近、キャピラリー等電点電気泳動においては、塩基性タンパク質が分離できることが報告されている。今回我々は、キャピラリー等電点電気泳動における塩基性タンパク質の分離条件を検討すると共に、その条件を2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の等電点電気泳動に応用するための検討を行った。

2. 実験

2-1. 試料

精製タンパク質は、シグマ社から購入した cytochrome c, chymotrypsinogen, myoglobin, hemoglobin を用いた。正常ヒト血漿は、ヘパリン入り試験管に採血後、遠心分離し、血球を除いた後、冷凍保存したものを用いた。

2-2. 装置

キャピラリー電気泳動装置は、サーモセパレイションプロダクツ UV Spectrophotometer SC100 を使用した。キャピラリーは、内径 75 μ m、全長 270mm (実効長 200mm) で、ポリアクリルアミドで内壁処理したフューズドシリカキャピラリーを用いた。マイクロ2次元ゲル電気泳動には、マイクロ密度勾配平板ゲルの自動調製のための装置と、マイクロ2次元ゲル電気泳動用泳動槽を用いた。

2-3. 電気泳動

キャピラリー電気泳動は、タンパク質試料の希釈溶液と Ampholine (ファルマシアー LKB) の 2% 溶液を等量混合し、これをキャピラリーに注入した。陽極槽液には 0.01M H_3PO_4 、陰極槽液には 0.01M NaOH を用い、電場 370V/cm でタンパク質を収束させた後、陰極液を 0.01M

CH₃COOH 溶液に交換することでタンパク質を移動させ、280nm の紫外吸収で検出した。

ゲル等電点電気泳動では、1% Ampholine、ゲル密度 4.2% のポリアクリルアミドゲル (内径 1.3mm×35mm) でゲルの一端から試料溶液を注入後 85V/cm で収束させた。陽極槽液には 0.01M H₃PO₄、陰極槽液には 0.1M NaOH を用いた。タンパク質の検出は 2 次元目に SDS を含む電極槽液を用いる 2 次元ゲル電気泳動により行った。

3. 結果と考察

キャピラリー電気泳動において、試料に加える TEMED 濃度を変化させることにより、cytochrome c まで検出が可能であった。これは検出窓から陰極槽液までの間に TEMED のゾーンが形成されるためと考えられる。(Fig. 1)

そこでゲル等電点電気泳動において同様の効果を確かめるために、試料溶液に TEMED を加え、効果を調べたところ従来の注入法 (塩基性側から注入) では pH 範囲を広げる効果は小さいことがわかった。酸性側から注入することにより pH 範囲は 10 程度まで拡大し、cytochrome c を収束させることができた。この条件で、血漿タンパク質の 2 次元電気泳動を行うことにより血漿中には、等電点 9 以上のタンパク質はほとんど存在しないことがわかった。(Fig. 2)

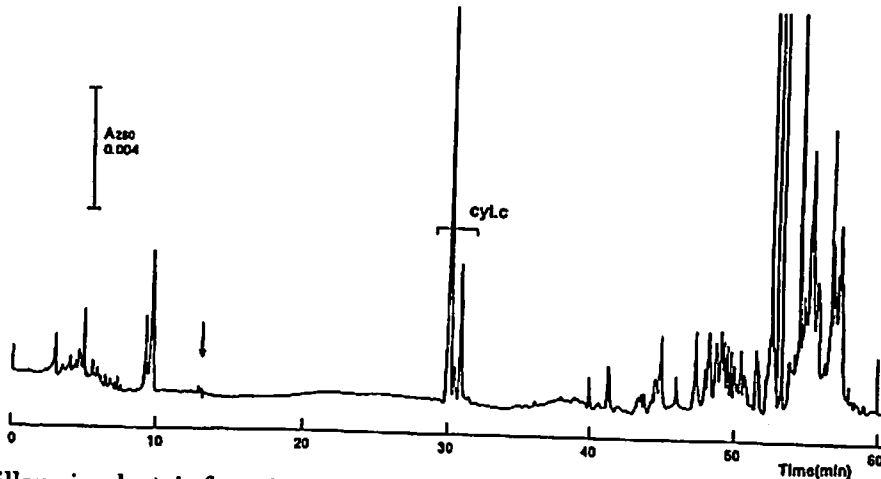


Fig.1 Capillary isoelectric focusing and mobilization of cytochrome c and plasma proteins.

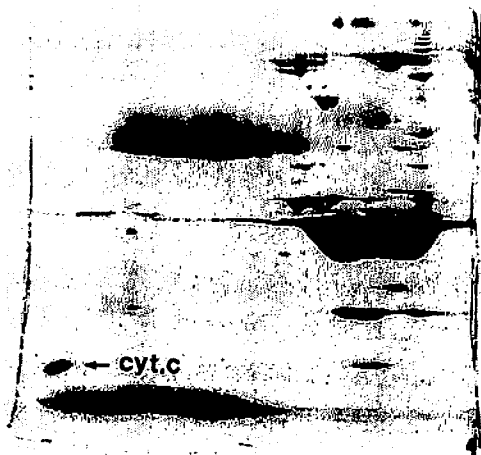


Fig.2 Separation of basic proteins and plasma proteins by micro-scale two-dimensional electrophoresis.

SDS-Tween 20 混合ミセルを用いた陽イオン性物質の MEKC

(岐阜薬科大) ○田中 一哉、江坂 幸宏、後藤 正志
(京都大・農) 加納 健司

SEPARATION OF HYDROPHOBIC CATIONS BY MEKC USING SDS-TWEEN20 MIXED SURFACTANT SYSTEM

Kazuya TANAKA¹, Yukihiro ESAKA¹, Masashi GOTO¹ and Kenji KANO²

¹Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry, Gifu Pharmaceutical Univ.

²Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agricultural, Kyoto Univ.

Separation of hydrophobic cations in capillary electrophoresis under the mixed micellar system composed of SDS and Tween 20 was investigated from the view point of thermodynamics. Hydrophobic cations interact strongly with the anionic SDS micelle and often lead to predominant dissolution of the analytes into the micellar phase, result in poor resolution. Non-ionic surfactant, Tween 20, as a component to the mixed micelle, was found to weaken the attractive ionic interactions between the cationic solutions and SDS, causing simultaneously the attractive hydrogen-bonding interaction with hydrogen-donating analytes. These two different function of Tween 20 improve the separation of hydrophobic cations remarkably.

1. 緒言 MEKC は非荷電分子に限らず荷電分子についても効果的だが、比較的疎水的である試料がミセルと反対電荷を持つ場合、疎水性相互作用にイオン性相互作用が加わることで劇的なミセルへの取り込みが生じ、分離の悪化やピーク形状の悪化等の問題が起こることが知られている。一方、分離選択性を変化させる目的から見ると、もしイオン性相互作用の強さをコントロールできればこのパラメータは魅力的である。演者らは、非イオン性界面活性剤 Tween20 の SDS ミセル中への導入(混合ミセル化)が SDS-試料間のイオン性相互作用の大きさを効果的に弱めることを見出し、同時に働く Tween20 のポリエーテル鎖と試料との間の水素結合性相互作用に基づく分離様式と併用することで、試料の分離選択性を顕著に変えることを可能にした。本講演では SDS、Tween20 の混合比を変化させ、ミセル中への取り込みがどのようにコントロールされるかを熱力学的観点から考察し、更にこの手法の応用として、血清中に添加した Adrenaline とその前駆体(7 種類)の分離について示す。
2. 実験 装置は高電圧電源に 890-CE、検出に電気泳動用 UV/VIS 検出器 870-CE、データ処理装置に 807-IT(以上 JASCO 製)を使用した。キャピラリーは GL サイエンス製フューズドシリカ管(50 μ m i.d. $\times$ 50cm、有効長 20cm)を使用した。緩衝液は 10mM リン酸緩衝液(pH2.5)を用い、電解液は緩衝液に SDS(100mM)、Tween20(40mM)を溶解させ、用時 SDS=25mM、Tween20=0~10mM となるよう調

製し、さらに超音波で混合したものを使用した。

3. 結果 まず試料として 5 種類のベンゼン誘導体を用い、pH2.5 及び 7.8 におけるキャパシティブアクターからアミノ基のイオン性相互作用によるミセルへの移動自由エネルギーへの寄与を考察した。その結果-NH₂ から-NH₃⁺への変化によって生じるイオン性相互作用の寄与は-10~-11kJ/mol と算出された。これは通常の MEKC で利用される疎水性相互作用と同じオーダーの自由エネルギーであり、イオン性相互作用が分離を効果的にコントロールする上で有望であることを示している。

次に混合ミセル系におけるミセルへの移動自由エネルギー $\Delta \mu$ を

$$\Delta \mu (= -RT \ln k') = \Delta \mu_{HP} + \Delta \mu_{IO} + k[\text{Tween20}] \quad (1)$$

で表せると仮定した(k' 、 $\Delta \mu_{HP}$ 、 $\Delta \mu_{IO}$ 、 k はそれぞれキャパシティブアクター、疎水性相互作用による成分、イオン性相互作用による成分及び Tween20 の単位濃度あたりの効果の比例定数を表す)。この k は水素結合による引力的効果(負の値)と、イオン性相互作用などを弱める斥力的効果(正の値)からなると思われる。基準物質を想定すると(1)式から

$$-RT \ln(k'/k'_0) = (\Delta \mu_{HP} - \Delta \mu_{HP,0}) + (\Delta \mu_{IO} - \Delta \mu_{IO,0}) + (k - k_0)[\text{Tween20}] \quad (2)$$

と書ける。したがって Tween20 の濃度に対し左辺をプロットするとその傾きから $k - k_0$ が得られ、Tween20 の効果が評価できる。Table1 にその結果を示す。

+1 の電荷を持つ Aniline は正の傾きを持ち、Tween20 の増加とともにイオン性相互作用が弱めらる事が示された。一方 Phenol、*p*-Ethylphenol は負の傾きを持つが、これらは分子内に-OH を持つため、混合ミセル中の Tween20 との間で水素結合性相互作用が働くことを示している。また Tyramine、*p*-Aminophenol は中間的な大きさの傾きを有するが、これは分子内に-NH₃⁺と-OH の両方を持ち合わせているということで説明される。このように各試料が様々な傾きを持つことは、Tween20 の濃度の変化によってそれらの溶出順序位置が顕著に変化したことを意味している。

この混合ミセル系を用いて血清中に添加した Adrenaline 類の分離を行ったところ良好な分離が得られ、SDS のみの系では難しかった共存タンパク質の影響をも除くことができた。これは生体試料の直接注入を可能にする方法としても興味深い。

Table1 Slopes of [Tween20] vs. $-RT \ln(k'/k'_0)$ plots

Sample	Slope(kJ/mol ²)	Charge(at pH2.5)	No. of Hydroxyl group
Aniline	296	+ 1	0
Tyramine	150	+ 1	1
<i>p</i> -Aminophenol	90	+ 1	1
<i>p</i> -Ethylphenol	-281	0	1
Phenol	-373	0	1

Buffer: 10mM phosphate buffer containing 25mM SDS(fixed) and 0~7.5mM Tween20

ウエスタンブロット転写効率の新決定法: ブロット時に用いる保持ゲルの考案
相澤 克則^{1,2}, エリサベス ガント¹ (¹メリーランド大、植物生物学、USA、²基生研、岡崎)
An alternative method to improve transfer efficiency of western blotting by using a retaining gel

Katsunori Aizawa^{1,2} & Elisabeth Gantt¹ (¹Dept. of Plant Biol., Univ. of Maryland, College Park, MD20742, USA, ²On leave from National Inst. Basic Biol., Okazaki, Japan)

[Summary] A simple method for determination of transfer efficiency of western blotting was developed. Proteins passing through the transfer membrane (PVDF) were captured by in an underlying retaining gel. A subtending high conductivity gel (2M NaCl) assured protein retention in the retaining gel. The transfer efficiency can be determined by comparison the stain patterns between these gels and the transfer membrane.

[序] ウエスタンブロットを各種の定量実験に用いる際、転写膜への蛋白質の転写効率を決定する事は不可欠となる。しかし従来の効率決定法では、転写膜を通過した蛋白質を検出できない問題があった。今回、通過蛋白質を保持ゲル(Retaining gel)にて検出する簡便法を考案したので報告する。

[方法] ラン藻 *Synechocystis* PCC6714 の可溶性蛋白質を SDS / β -メルカプトエタノール液⁽¹⁾ で処理後、Urea と LDS を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分離⁽²⁾ した。蛋白質の量は、ゲル断面 (横幅 80 mm X 厚さ 1.5 mm) 当たり 0.12 mg を用いた。PAGE 後のオリジナルのゲルを用い、特定の転写緩衝液⁽³⁾ で 2 mA/[cm² ゲル面] の電流下 90 分間ウエスタンブロットを行った。タンク式とセミドライ式の両ブロットに使った汎用保持ゲルは、一枚の透析膜上にアクリルアミドを重合し一体化させた。ブロット時のゲル等の配置は、オリジナルのゲルと転写膜を通常に重層し、さらに保持ゲルのポリアク

図1. セミドライ式用のウエスタンブロットでのゲル等の配置

cathode (-)
filter papers
original gel
PVDF membrane
retaining gel
high conductivity gel
filter papers
anode (+)

リルアミド面を転写膜の陽極側に密着させ、転写膜を通過した蛋白質の検出に用いた。セミドライ式用の簡易タイプとしては、図1の様に 2M NaCl 等の塩を含む高伝導度ゲル (high conductivity gel) を透析膜なしの保持ゲルの陽極側に密着させた。両保持ゲルのアクリルアミド組成は簡便にオリジナルの分離ゲルと同一にし、これらと濾紙は使用前に転写緩衝液にて平衡化した。ブロット後の転写膜とゲルは、主に CBB 溶液⁽⁴⁾ で染色した。

[結果と考察] 最初に、転写膜なしでオリ

ジナルゲルから保持ゲルへの蛋白質の転写を調べた。両タイプともに、オリジナルゲルに密着させた保持ゲル内には、オリジナルゲルの分離状態が転写され、そのパターンはブロット中も保持された。汎用保持ゲルの場合、透析膜を保持ゲルに密着させただけでは分離状態は保たれず、保持ゲルとしては透析膜とアクリルアミドの一体化（接着）が必要であった。PVDF 転写膜を用いた通常のウエスタンブロット中に当膜を通過した蛋白質も、両タイプの保持ゲル内に高度の分離状態で保持された。また、転写膜上の蛋白質のパターンには、保持ゲルの存否による違いは見られなかった。

これらの実験により 0.1% SDS を含む転写緩衝液⁽³⁾では、各種の蛋白質が転写膜を通過する事が明らかとなった。当転写膜 (Immobilon-P, 0.45 μm のポアサイズ) の蛋白質結合能力は、172 $\mu\text{g}/[\text{cm}^2 \text{ PVDF}]$ と報告されている⁽⁵⁾。当実験では、この 2% 以下の平均 2.3 $\mu\text{g}/[\text{cm}^2 \text{ PVDF}]$ という値でブロットした。従って、各種蛋白質の通過現象が転写膜の結合能力を越えた為のものではないと思われる。これらは、通常のドットブロット法での結果、即ち、特殊なドット操作⁽⁶⁾を行わない限り、界面活性剤入りの転写緩衝液では各種蛋白質の転写効率が悪いという観察結果⁽⁶⁾と矛盾しない。

当方法では、転写膜上の蛋白質の染色パターンその他、ウエスタンブロット前後の二種のオリジナルゲル内の蛋白質と転写膜の存否下の二種の保持ゲル内の蛋白質、計五者の染色結果を比較できる。ゲル内の蛋白質の染色性は少なくとも CBB 法では同一⁽⁴⁾である。また汎用保持ゲルの透析膜は、当色素で染色されない。従って当方法により、オリジナルのゲルからの蛋白質の溶出および転写膜への転写状態、転写膜を通過した蛋白質の存在すべてが直接観察でき、少なくとも Ball 法⁽⁴⁾で、これらを定量化できる事が判った。

当方法は簡易である上に、RI-ラベルをしていない蛋白質にも適用できる。また、保持ゲルの使用に限定されず、保持層 (retaining layer) や材質の工夫次第で、蛋白質のキャピラリーブロットその他、DNA, RNA 他のブロット時の転写効率の簡易決定にも応用できるものと期待される。少なくとも、当方法により各種の蛋白質試料における効率の良い転写条件が、より容易に見いだされるであろう。

[引用]

1. Laemmli, H. K. (1970) Nature 227: 680-685.
2. Aizawa, K. et al. (1992) Photosynthesis Res. 32: 131-138.
3. Erickson, P. F. et al. (1982) J. Immunol. Methods 51: 241-249.
4. Ball, E. H. (1986) Anal. Biochem. 155: 23-27.
5. Pluskal, M. G. et al. (1986) BioTechniques 4: 272-283.
6. Aizawa, K. & Gantt, E. (1996) 日本生化学会. 日本分子生物学会合同年会要旨

一次元PFGEにおける長鎖DNA分離の機構

(名大工) ○増淵雄一, 小穴英廣, 松本充弘, 土井正男

Separation Mechanism of large DNA during 1-dimensional PFGE

Yuichi Masubuchi, Hidehiro Oana, Mitsuhiro Matsumoto and Masao Doi

School of Engineering, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan

ABSTRACT DNA motion during 1-dimensional PFGE was investigated by fluorescence microscope experience and by Brownian dynamics computer simulation. It was observed that during PFGE, DNA shows a characteristic conformational change and that the characteristic conformation varies with the parameter of the applied field. In the optimum condition for separation, DNA migrates with W-conformation differently from V-conformation which is the characteristic conformation in the steady field gel electrophoresis. Based on the results, a simple picture for the separation mechanism was proposed.

(緒言) 非定常電場ゲル電気泳動法は数十kbp以上のDNAの分離に広く用いられている。このうち一次元非定常電場ゲル電気泳動法は電極を一組しか必要としないため、キャピラリー電気泳動でも応用例がある。しかし分離の機構は明らかでない。分離の高効率化のためにはDNAの分子運動に踏み込んだ分離機構の理解が必要である。

我々は一次元非定常電場ゲル電気泳動のひとつである、バイアス正弦電場ゲル電気泳動¹⁾における長鎖DNAの挙動を、実験と計算機シミュレーションで調べた。実験では蛍光顕微鏡法を用いて、DNA一分子毎の挙動をリアルタイムで観察した²⁾³⁾。実験結果をふまえて計算機上でDNAをモデル化し、実験で測定することが難しいDNAとゲルとの絡み合いを調べた³⁾⁴⁾。結果から、分離の機構をDNAの分子運動に基づいて考察した。温度や電場強度などのパラメーターが分離に及ぼす影響についても定性的な議論を行う。

(実験) DNAと選択的に結合する蛍光色素を用いてDNAを可視化する方法である、蛍光顕微鏡法を用いて、DNA分子の直接観察実験を行った。定常電場ゲル電気泳動下では巨大DNA分子が、V字型の伸びた形態と、糸鞠状の縮んだ形態を交互にとりながら泳動する。図1は定常電場ゲル電気泳動中のT4DNA分子(全長55 μ m)の観察例と、画像解析によって得られた分子の重心の座標 x_g と慣性半径 R_g の時間発展である。このDNAの伸縮運動はOgstonモデル、レプテーションモデルの双方からはずれている。解析の結果、DNAがこの伸縮運動をするときには、泳動速度がDNAの分子量に依存しないことが分かった。

次に電場 E を $E(t)=E_b+E_s \sin 2\pi ft$ と時間変化させる、バイアス正弦電場ゲル電気泳動での実験を行った。この方法では10kbp以上の長いDNAでは泳動速度がある周波数で極小値をとる、反共鳴現象が観察された。反共鳴周波数を境目とし

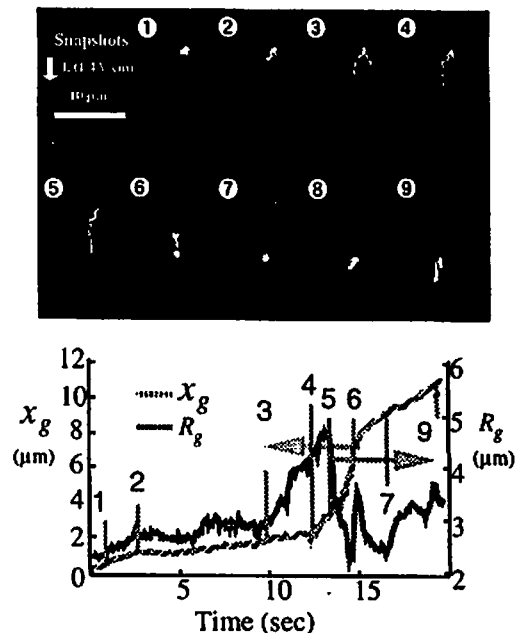


図1 定常電場ゲル電気泳動下の巨大DNAの挙動

て、1) 高周波側では定常電場と同様にV字型の進む方向は変わらない 2) 低周波側では電場方向に応じてV字型の進む方向が変わる 3) 反共鳴周波数付近では伸縮運動がおこらず、中間的な形態を保つ という3つの形態変化のモードがあることが分かった。

(シミュレーション) DNAのゲル電気泳動における複雑な挙動は、ゲルとの絡み合いによって引き起こされていると考えられる。これを詳細に解析するため計算機シミュレーションを二次元のBrownian Dynamics Simulationで行った。シミュレーションは定常電場における伸縮運動をよく再現し、泳動速度も実験に近い結果を示した。シミュレーションでDNAの形態を解析すると、電場の周波数とDNAの分子量に依存して、DNAの運動のモードは以下のような4つに分けられる。

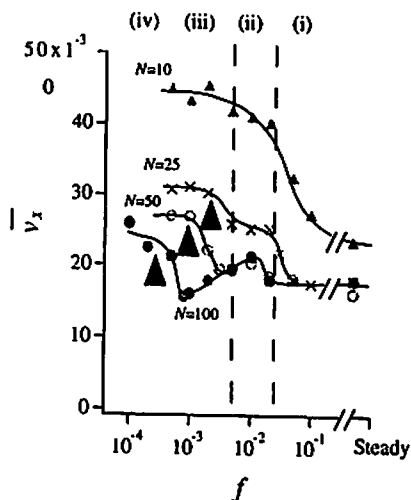


図2 計算機シミュレーションによる泳動速度の電場の周波数依存性

i) 超高周波数領域

電場の周波数が非常に高いと、DNAの泳動挙動は定常電場におけるそれと変わらず、長鎖DNAの分離はできない。この条件ではDNAの形態はV字型で特徴づけられる。

ii) 高周波数領域

電場の周波数が低くなっていくと、V字型の泳動形態が変化していき、V字型の運動モードからずれていく。このため泳動速度は定常電場下の値から変わっていくが、分離ができるほどの分子量依存性は示さない。

iii) 反共鳴領域

さらに電場の周波数が低くなると、DNAの形態はV字型から大きくずれていき、枝分かれしたV字型やW字型になる。この運動モードが起きる条件は分子量に強く依存するため、この付近の条件が最も分離に適する。

iv) 低周波数領域

電場の周波数が十分低いと、DNAの挙動はV字型が反転するモードに入る。ターゲットのDNAがすべてこのモードの運動をする条件である、超低周波の電場を用いると、本質的に定常電場と同様であるため分離できない。しかし領域iii)とiv)の境界は分子量依存性があるので、これを利用して分離することは可能である。

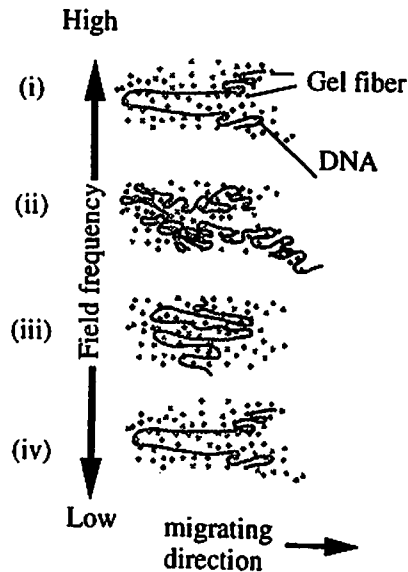


図3 バイアス正弦電場でのDNAの特徴的形態

参考文献

- 1) T. Kotaka et. al, Electrophoresis 1993, 14, 313-321
- 2) H. Oana et. al, Macromolecules 1994, 27, 6061-6067
- 3) Y. Masubuchi et. al, Electrophoresis 1996, 17, 1065-1074
- 4) Y. Masubuchi et. al, Macromolecules in print

電導性高分子薄膜・固定相を用いるイオン分離法の開発

長岡 勉

山口大学工学部

Electrochemical Chromatography using conducting polymer stationary phase

Tsutomu Nagaoka

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Yamaguchi University

Electrochemical chromatography uses an electroconductive stationary phase, which allows one to introduce stationary phase potential to control separation and retention behavior in chromatography. In this technique electric field is applied in the direction normal to the stationary phase. In the case of polyaniline-coated stationary phase, anion distribution is controlled by the working of electric potential through the redox property of the polymer.

電気化学クロマトグラフィーでは通常の電気クロマトグラフィーと異なり電場の方向が平均としてカラムの垂直方向になる。したがって、この電場によりイオン性物質の溶離挙動を制御できるが、そのためには電導性物質を固定相としなくてはならない。ここでは主に炭素粒子表面に電導性ポリマーをコートした充填剤を用いるクロマトグラフィーについて述べる。

電気化学クロマトグラフィーそのものの歴史は比較的長く、電位によるクロマトグラフ分離が電気分析化学者の一つの夢であったことがわかる[1]。しかしながら、その基本原理は試料の酸化還元による電解分離であったために、対象は金属イオンに限られていた。この方法は実際には電気分析で言うストリッピング分析に属するものである。我々は帯電させたカーボン粒子充填剤と金属イオンの間の相互作用がクロマトグラフ分離を可能にすることを見出した[2,3]。すなわち、負の電位をカーボン粉末充填剤に与えると金属イオンの保持は増大し、逆に正の電位を与えたときに

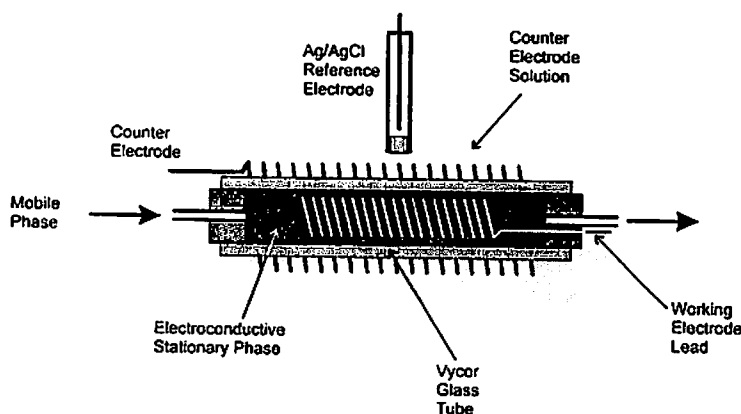


Fig. 1 Cross sectional diagram of the electrode column.

は保持は起こらなかった。この保持の電位依存性は静電相互作用に基づくものであり、酸化還元現象ではない。

1. 方法

Fig. 1 に現在我々の研究室で用いている電極カラムの原理図を示す。多孔質管の中に電導性を持つ粒子を充填し、これを作用電極カラムとする。対極として管の外側に金属線を配置し、これら二つの間に電圧をかける。移動相として 10mM 程度の無関係電解質を含む溶液を流し、またカラム自体も電解質溶液中に置くので、これら 2 つの電極の間の抵抗は小さく、数ボルト程度の電圧でも充填剤/移動相界面の電位変化はメガボルト/cm のオーダーに近いと予想される。多孔質ガラス管は Vycor を用いたが、その細孔半径は 40-70Å であり、通常の使用状態では移動相の漏れは問題にならない。カラムには外径 8mm、長さ 3cm の管を用いた。固定相の電位は実際には別に配置した参照電極に対して一定になるように、ポテンショスタットで制御している。充填剤としては日本カーボンの Microbead を用いた。実験装置はこの電極カラムを除いては通常使用されるものと同じであり、検出器として、電導度および紫外検出を用いている。

2. 原理[4]

電位制御分離を行うのであるから、固定相と試料の間に働く力は静電的なものが主となる。最も簡単なものはカーボン粒子充填剤と陽イオン、陰イオンの間の相互作用である。この場合、Capacity factor, k' は金属イオンについて $1 \text{ 価} < 2 \text{ 価} < 3 \text{ 価}$ の順に大きくなったので、基本的にはイオンは脱溶媒和されており、固定相表面と金属イオンの間の相互作用は大きいものと考えられる。カーボン表面をクラウンエーテルなどを含む油層でコートすることにより、イオンの固定相への分配をより選択的にすることができる。たとえば、dibenzo-18-crown-6 の dichloroethane 溶液でカーボン粒子をコートすると $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ の順に溶離する[5]。固定相の電位を正から負に変化させていくと移動相から油層へのイオン移動が起こる様になり、保持時間が大きくなる。次節に述べるレドックスポリマーを用いても同じような効果が期待できる。この場合、ポリマーは十分な電導性を有していることが条件となる。このようなポリマーの例として電導性ポリマーであるポリアニリンは我々がもっとも詳細に検討しているものである。

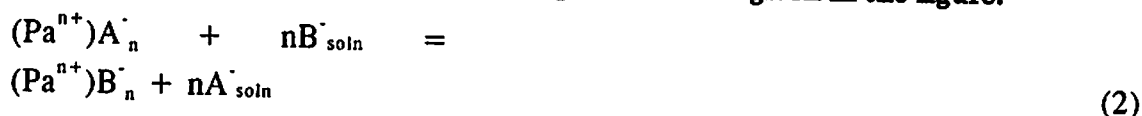
3. 固定相電位による溶離制御

ここでは電導性ポリマーであるポリアニリンを修飾した固定相を例として説明する。ポリアニリン(Pa)の酸化還元反応は簡単には次式で示される。



ここで A_{soln}^- は溶液中の陰イオンである。この式から、ポリアニリンの電気的中性を保つためにはアニオンのポリマー内への挿入が必要であることが分かる。さらに、この反応は酸化還元現象がイオン交換反応へ変換できることを示している。

(1)式の Pa^{n+} は $>\text{N}^+\text{H}$ からなるイオン交換基であり、次式によりイオン交換反応がおこる。



したがって、固定相の電位をポリアニリンの酸化電位よりも大きくすると(1)式にしたがって、イオン交換基が生成し、移動相電解質(A^-)の固定相への挿入が起こることになる。この状態で試料(B^-)が注入されると、イオン交換が(2)式にしたがって起こる。Fig. 2 にポリアニリン固定相を用いたクロマトグラムの例を示す[6]。固定相電位が負であるときにはポリアニリンは(1)式にしたがって還元状態にあるので、試料の保持は起こらない。これに対して電位を正電位にするとポリマーの酸化が起こりイオン交換基が生成する。この交換基は(2)式にしたがってイオン交換を行うのでおのこの試料に対して異なる程度の保持が起こることになる。移動相を調製するとき大事なことは A^- の選択である。このイオンはドーパントと呼ばれ、このドー

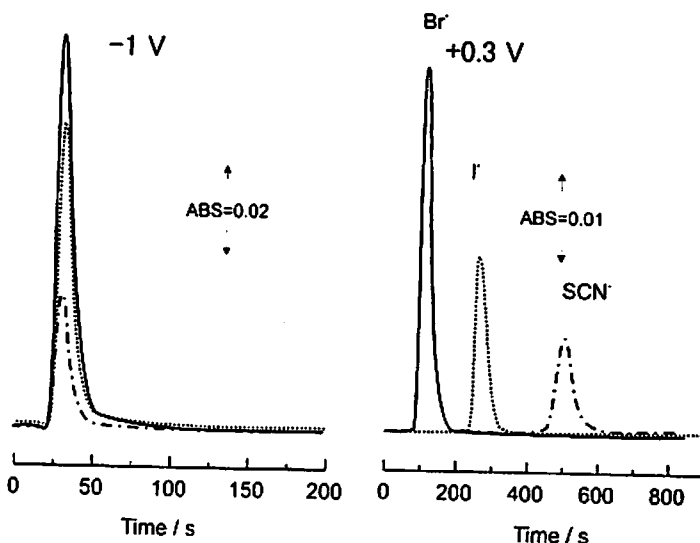


Fig. 2 Potential-controlled chromatography: Mobile phase; 10 mM TEAP + 1 mM HClO_4 . Analyte concentration is 0.1 mM. Column length; 3 cm. Stationary phase potentials are given in the figure.

パントの大きさはポリマーの種々の性質を変えることが知られている。ポリマーの多孔性はクロマトグラフ分離で最も重要な性質の一つである。

4. 電位変調と溶離制御

電気化学クロマトグラフィーにおいて、電位は溶離の間中、一定である必要はない。すなわち電位勾配を溶離中に与えることで分離の最適化を行うこともできる。このような電位制御とは別に周期的な電位関数をカラムに与えることもできる。Fig. 3にはこのような例として矩形波パルスをカラムに与えたときの保持挙動をしめす[7]。電気化学クロマトグラフにおいてこのよ

うなことが必要となるのは試料の固定相からの脱出速度がしばしば遅いためである。

したがって、そのような場合

には電場による強制的な試料の分配が必要となる。すなわち、周期的電位変調テクニックは熱的な拡散現象を電氣的に emulate するものであり、試料が固定相に強吸着をして溶離しにくいような場合に特に有効である。Fig. 3 に移動相の電解質を Cl^- としたときの保持時間を示す。 ClO_4^- が移動相電解質の場合(Fig. 2)と異なり、 Cl^- がポリマー内にドーブされるとその細孔半径は小さくなる。したがって、ここに示した無機イオンは固定相に分配されにくく、分配されても脱出しにくくなる。図に示すパルスにおいて、 +0.3 V では試料は強制的に固定相中に取り込まれる。この場合、試料のカラム方向線速度は 0 になる。 -1 V では試料は強制的に排出されるので線速度は移動相の速度に等しい。したがって、パルスの duty ratio を変化させることにより試料の線速度を強制的に制御できる。この系では 1-100Hz の間で応答が見られた。したがって、この方法では全てのイオンは同じ線速度を有するはずであるが、実際には Fig. 3 に見られるように保持時間に差が存在する。イ

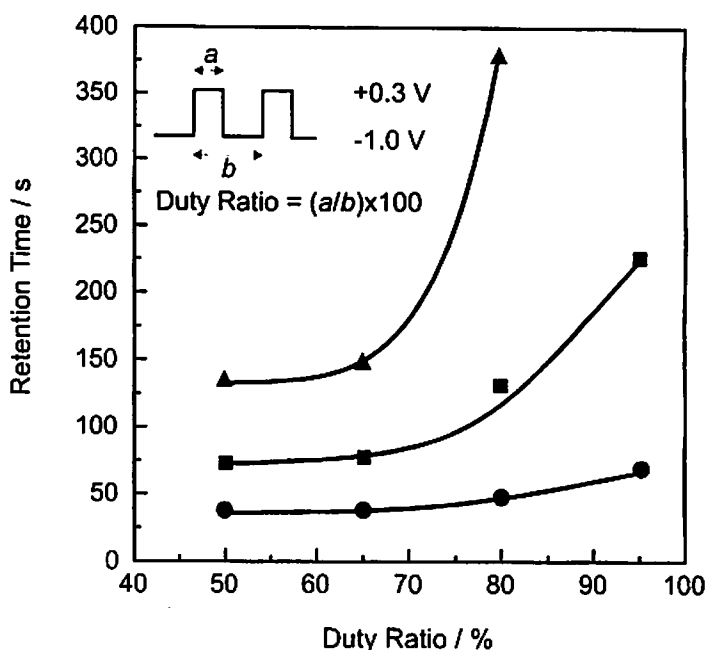


Fig. 3 Controlled retention by applying pulses during elution: (▲) SCN^- , (■) I^- , (●) Br^- . Modulation frequency; 5 Hz.

オンがパルスに応答して固定相と移動相の間を移動する速度は個々のイオンによって異なると思われる。したがって、この方法における保持の差は、通常のクロマトグラフ分離とは異なり、分配の速度によって決定されていると思われる。

5. 展望

電気化学クロマトグラフは技術的にはまだ克服すべき問題が多く、今後、実用的な立場からの研究が必要となるだろう。特に、カラム形状の複雑さから生ずるカラム効率の問題や固定相の機能性の向上は重要であると思われる。後者に関しては電導性ポリマーは機能性物質を簡単にドーピング・固定化できるので有望であると思われる。

文献

- 1) T. Fujinaga, T. Nagai, S. Okazaki, *Nippon Kagaku Zasshi*, 84, 941(1963).
- 2) T. Nagaoka, T. Fukunaga, T. Yoshino, I. Watanabe, T. Nakayama, and S. Okazaki, *Anal. Chem.*, 60, 2766, 1988.
- 3) T. Nagaoka, M. Fujimoto, H. Nakao and K. Ogura, *Bunseki Kagaku*, 40, 785, 1991.
- 4) T. Nagaoka In *Electric Field Applications in Chromatography, Industrial and Chemical Processes; Electrochromatography with radial applied voltage*; T. Tsuda, Ed.; VCH: Weinheim, 1995; Chapter 4.
- 5) T. Nagaoka, M. Fujimoto, H. Nakao and K. Ogura, *J. Electroanal. Chem.*, 336, 45(1992).
- 6) T. Nagaoka, M. Fujimoto, H. Nakao, K. Kakuno, J. Yano and K. Ogura, *J. Electroanal. Chem.*, 364, 179(1994); 368, 315(1994).
- 7) T. Nagaoka, H. Nakao, K. Tabusa, J. Yano and K. Ogura, *J. Electroanal. Chem.*, 371, 283(1994).

全希土類イオンのキャピラリー電気泳動分離

○眞鍋 雄生、育田 夏樹、廣川 健 (広島大工)

CAPILLARY ZONE ELECTROPHORETIC SEPARATION of ALL RARE-EARTH IONS

Yuuki Manabe, Natsuki Ikuta, Takeshi Hirokawa

(Applied Physics Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University)

An electrolyte system was developed for the simultaneous separation of all rare-earth ions (fourteen lanthanide, yttrium and scandium ions) by capillary zone electrophoresis. The supporting electrolyte system contained α -hydroxyisobutyric acid and malonic acid as the complex-forming agent. Optimization of the electrolyte system was studied and the separation behavior of all rare earth ions was discussed.

【緒言】希土類イオンの分離分析には通常錯形成剤を用い、安定度定数の相違から実効移動度に差を生じさせて行う。

以前に報告したように、希土類イオン 15 種の分離は α -ヒドロキシイソ酪酸 (HIBA) 系電解液にマロン酸を補助錯形成剤として添加した電解液系であった。この電解液では Tb^{3+} 、 Y^{3+} および Dy^{3+} の分離は実効移動度差が小さい。このことが鉱石実試料において大量に存在する Y^{3+} からの隣り合う 2 種イオンの分離を困難にしている。今回使用したゼノタイム模擬試料は鉱石の中でも成分の半分以上を Y^{3+} が占める鉱石である。この試料を用いて、HIBA-Malonic acid 系電解液の分離について報告する。

さらに今回報告する希土類イオン 15 種 (14 種のランタニドイオンと Y^{3+}) と Sc^{3+} を含めた全希土類イオンの一斉分離の報告については知られていない。 Sc^{3+} は pH4.0 以上では水酸化物イオンを形成しやすく、またイオン自体も小さいので安定度定数が大きくなり、カチオンとして泳動させるには pH を下げて錯形成を押さえる必要がある。この電解液系の条件を変化させることにより、一斉分離可能となったので報告する。

【実験】実験した CE モードはゾーン電気泳動である。分析には Table.1 に示した電解液を用いた。測定には大塚電子製 CAPI-3100 を用い、 $\lambda=220nm$ で UV 吸収を測定した。印加電圧は 10kV でキャピラリー全長 40cm、有効長 27.7cm であった。温調機能は 25℃ に設定した。標準試料はランタニドイオン 14 種と Y^{3+} は 50ppm、 Sc^{3+} は 7ppm に調製し、鉱石試料にはゼノタイム模擬試料を分析した。

【結果と考察】Yを含む希土類鉱石3種（イオン吸着型鉱石 I、IIとゼノタイム）のフェログラムを示す。（Fig.1）このフェログラムを見るとイオン吸着型鉱石においてはY³⁺の量が、ゼノタイムに比べて少ないためにTb³⁺の検出ができているが、ゼノタイムではできていない。講演では、Tb³⁺の他、Y³⁺、Dy³⁺の分離限界についても述べる予定である。

続いて、この電解液においてSc³⁺を加えた16種希土類イオンを泳動させたが、Sc³⁺が検出できなかった。このことの主な原因がバッファイオンである2-エチル-n-酪酸との安定度定数に原因があると考えられる。そこで、電解液をギ酸で低pHにした。そうすることで相互作用が小さくなり、水酸化物イオンの生成も押さえられた。これによって、Sc³⁺を含めた一斉分離が可能になり、この電解液系で、錯形成剤の条件最適化を行った。（Fig.2）

Table.1 Operational Electrolyte System

pH Buffer	(1)2-ethyl-n-butyric acid (2)HCl (3)formic acid
Complexing Agent	4-7mM α-hydroxyisobutyric acid
Additional Complexing Agent	0-0.7mM malonic acid
pH	4.0-4.8

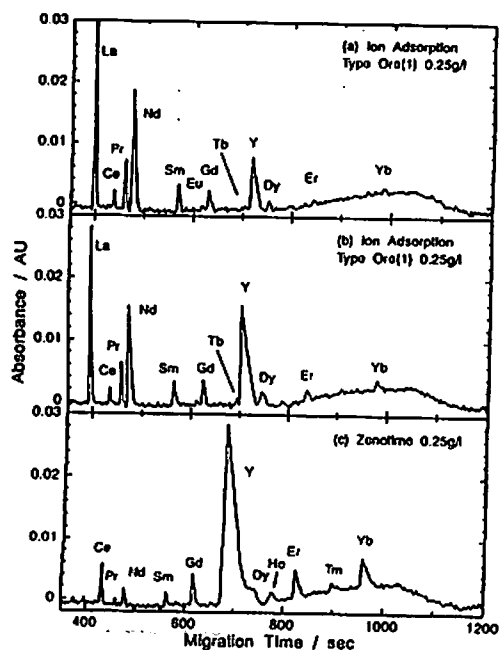


図1 各種希土類鉱石のフェログラム

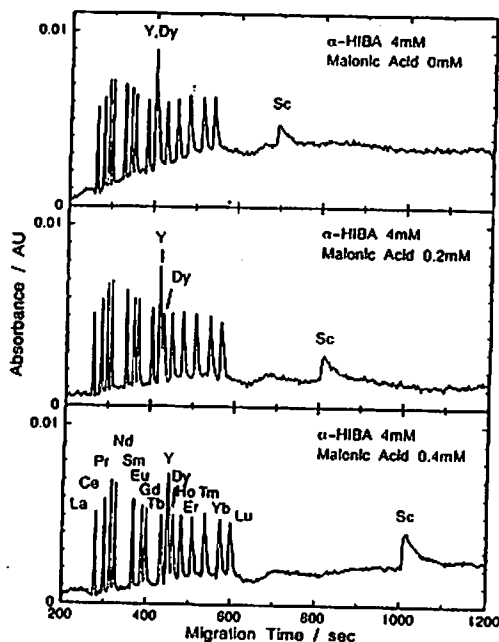


図2 全希土類イオンの分離最適化

1) 眞鍋雄生、廣川健 第15回キャピラリーシンポジウム要旨集、35-36 (1995)

キャピラリー電気泳動による薬物-血漿リポタンパク質結合研究

(京都大学 薬学部) 大西貴徳、○澁川明正、中川照眞

Study of drug - plasma lipoprotein binding using capillary electrophoresis
Takanori Ohnishi, Akimasa Shibukawa, Terumichi Nakagawa
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

High-performance capillary electrophoresis / frontal analysis (HPCE/FA) method was applied to the ultramicro binding study of lipoprotein. A small amount (ca. 80nL) of (R)- or (S)-propranolol and human high-density lipoprotein mixed solution was introduced into capillary. Propranolol migrated as a zonal peak with a plateau, and the unbound drug concentration was calculated from the plateau height. Unbound propranolol fraction was constant (74%) regardless of the total drug concentration (25-150 μ M), and no enantiomeric difference was observed in the unbound fraction.

【緒言】薬物は血漿中でタンパク質と可逆的に結合し（血漿タンパク結合）、結合型薬物濃度と非結合型薬物濃度は平衡状態にある。非結合型薬物は血中から標的部位へ容易に移動できるが結合型薬物は血管壁を透過できない。そのため、血漿タンパク結合は薬物の体内動態や薬理効果（又は副作用）の発現に大きな影響を与える。また、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可能性がある。血漿タンパク結合にはアルブミンや α 1-酸性糖タンパク質が関与するが、その他血漿リポタンパク質も寄与することが知られている。しかしながらアルブミンや α 1-酸性糖タンパク質に比べて、血漿リポタンパク質への薬物の結合性に関する研究は少なく、立体選択的研究はほとんど報告されていない。これは血漿リポタンパク質の入手が容易ではなく、微量試料を用いる結合分析法がなかったためである。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、塩基性薬物とアルブミンや α 1-酸性糖タンパク質との結合の超微量分析に成功するとともに、立体選択的タンパク結合研究に適用してきた。今回は、このHPCE/FA法を用いてプロプラノロール(PRO)の高密度リポタンパク質(HDL)への結合を光学異性体ごとに超微量結合解析した。

【実験】HPCE装置にはABI社製270Aを用いた。泳動緩衝液はリン酸緩衝液(pH7.4、イオン強度0.17)、キャピラリーには全長50cm（有効長30cm）、内径75 μ mの溶融シリカキャピラリーを使用した。検出は215nm、印加電圧は+4kV、温度は25 $^{\circ}$ Cで行った。試料溶液には25~150 μ Mの(R)-PRO又は(S)-PROと2.63g/LのHDL混合溶液(pH7.4、イオン強度0.17)を用いた。HDLは以下のように分取精製した。NaBrを添加して密度を1.063g/mLに調製したヒト血漿を38000rpm、4 $^{\circ}$ C

$\text{mean} \pm \text{S.D.}, (n=3)$

で20時間超遠心分離後、下部画分の密度をNaBr添加により1.21g/mLに調製し、再度超遠心分離(38000rpm、4℃、48時間)した。得られた上清画分をサイズ排除クロマトグラフィーで精製し、HDL画分を得た。

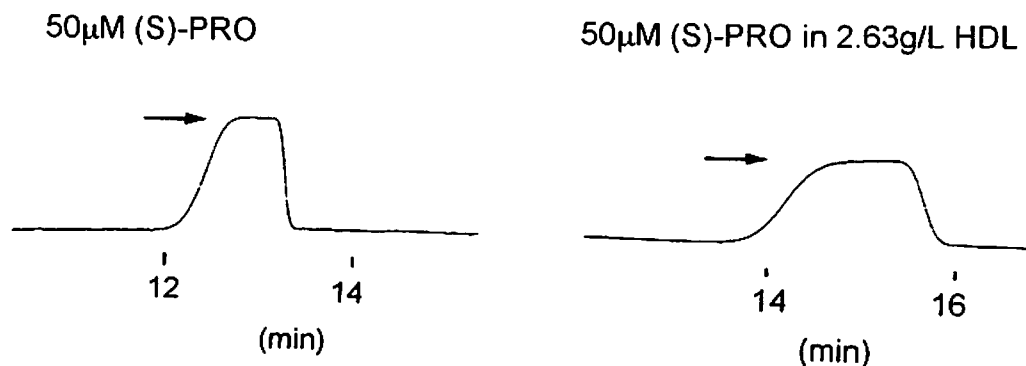
【結果・考察】PRO-HDL混合試料を吸引で3秒(約80nL)注入後、泳動を開始する。負に帯電したHDLは正極側(注入側)に電気泳動され、非結合型PROは検出側に移動する。結合型PROはHDLから解離した後、検出側に電気泳動される。PRO-HDL混合ゾーンは徐々に短くなり、最終的に総ての薬物はタンパク質から完全に分離されるが、タンパク結合は可逆的で瞬時に平衡に達する速い相互作用であるので、分離中、PRO-HDL混合ゾーン中の結合平衡は一定に保たれる。その結果、非結合型薬物のゾーンが形成され、プラトー部分をもつ帯状ピークとして検出される(下図)。このプラトー高さから非結合型PRO濃度を求めることができる。

生理的濃度(2.63g/L)のHDL溶液中の(R)-並びに(S)-PROの非タンパク結合率は薬物総濃度(25~150 μM)に依らず、約74%とほぼ一定値を示した。これは薬物-血漿リポタンパク質間の相互作用にはリピッドコアへの薬物の溶解とアポリポタンパク質との結合が考えられるが、今回の場合リピッドコアへの薬物の溶解が支配的であるためだと思われる。また、(R)-PROと(S)-PROの非結合率はほとんど同じ値であり、PROのHDLへの結合には立体選択性が見られないことが判明した。

このように、薬物と血漿リポタンパク質との相互作用の超微量解析に本法が適用できることが示された。

【文献】

- 1) A.Shibukawa, Y.Yoshimoto, T.Ohara, T.Nakagawa, *J.Pharm.Sci.*, **83**(1994) 616.
- 2) T.Ohara, A.Shibukawa, T.Nakagawa, *Anal.Chem.*, **67**(1995)3520.



Electropherogram of (S)-PRO in the absence and presence of human HDL

キャピラリー電気泳動によるヒアルロン酸の迅速定量及び分子量測定 II —表面処理シリカ管を用いる検討—

(大鵬薬品工業・製剤研究所、近畿大学・薬学部*)

早瀬 省三、*本田 進、O*掛樋 一晃

High Performamce Capillary Electrophoresis of Hyaluronic Acid II

—Its Application to Determination of the Molecular Mass by Using a Surface-coated Capillary—

Shozo Hayase, Susumu Honda* and Kazuaki Kakehi†

Pharmaceutical Research Lab. Taiho Pharmaceutical Co. Ltd.

†Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Hyaluronic acid (HA) is a macromolecular substance, which has wide dispersion in molecular weight. Capillary electrophoresis is a useful tool for the determination of the molecular weight distribution by employing a buffer containing pullulan as the material for the formation of the entangled matrix. In the present study, we examined the effect of inner-surface coating of the capillary on migration of HA samples having different molecular mass.

ヒアルロン酸(HA)は生体中に広く分布し細胞間マトリックスを構成している。また医療用として関節炎の治療や眼科手術の補助剤として広く使用されている。HA はN-アセチルグルコサミンとグルクロン酸が交互に結合した極めて規則正しい構造を有するが、顕著な分子量の不均一性を示し、その分子量分布は数万から数百万以上に及ぶといわれている。またその生理作用はHA の分子量と密接な関係があるため、HA を医薬品として使用するためにはその定量分析だけでなく分子量に関する情報も欠かすことができない。

我々はすでにフューズドシリカ素管を用いるキャピラリー電気泳動によるヒアルロン酸の高感度定量法ならびに緩衝液中に中性ポリマーとしてプルランを添加するHA の分子量分布の決定方法について検討した(1)。本報告では内面処理シリカキャピラリーを使用するヒアルロン酸の分子量分布の決定法について検討したので報告する。

「方法」装置：Waters Quanta 4000E System および Beckman P/ACE 5500 system。キャピラリー：フューズドシリカ素管（有効長、52.5 cm、内径 75 μ m）、内面処理キャピラリーとしては、CElect P-1, CElect H-1（それぞれ Supelco 製、有効長、30 cm、内径 75 μ m）およびリニアアポリアクリルアミド処理シリカ（有効長、30 cm、内径 75 μ m）。印加電圧：20 kV（シリカ素管）、10 kV（内面処理シリカ管）。分析温度、25℃。検出、185 nm および 200 nm。泳動用緩衝液、50 mM リン酸緩衝液(pH 4.0)に適宜プルランを添加。内標準物質、ナフタレントリスルホン酸 Na 塩。試料導入：落差法または加圧注入法。試料：ブタ皮膚由来（分子量 4 万～6 万）、ヒト臍帯由来（分子量 80 万～120 万）、*Streptococcus zooepidemics*

由来 (分子量 150 万~210 万)。その他市販の HA を使用した。

「結果・考察」シリカ素管と内面処理シリカキャピラリーの比較：既に報告したようにシリカ素管を用いる CE では、ヒアルロン酸はその均一な構造のために、ほとんど同じ位置に観察されるがわずかに高分子の HA が早く観察される傾向がみられた。一方、内面処理シリカでは、CElect P-1 および CElect H-1 を用いたときに分子量の小さいものから順に泳動され、その泳動時間から容易に分子量を推定することができた。一方、ポリアクリルアミドで修飾したキャピラリーを使用すると、泳動順序は CElect P-1 および CElect H-1 の場合と同様に分子量の小さいものから泳動されたが、ピークの広がる傾向が観察された。分

析例の一部を図 1 に示す。中性の親水性ポリマーを結合させた CElect P-1、疎水性のオクチル基が結合した CElect H-1 およびリニアールポリアクリルアミドが結合したキャピラリーのいずれにおいても低分子の HA が速く泳動される傾向がみられた。シリカ素管中では分子量の大きさに基づく分離がほとんど観察されなかったことから、キャピラリー内面を処理することにより、電荷に対する質量比がより明確に分離に反映されたのではないかと考えられる。

緩衝液への中性多糖の添加効果 絡み合いに基づくサイズ排除効果を引き起こすために、緩衝液にプルランを添加して、電気泳動に及ぼす効果を調査したところ、添加したプルランの分子量およびプルラン濃度に対応して分子量の異なるヒアルロン酸は興味ある泳動挙動を示し、低分子量の HA は適当な分子量のプルランを適当な濃度で使用すれば分子量の分布を求めることができることが示された。

文献 (1)早瀬、掛樋、本田；第 7 回クロマトグラフィー科学会議 (東京、1996 年)。

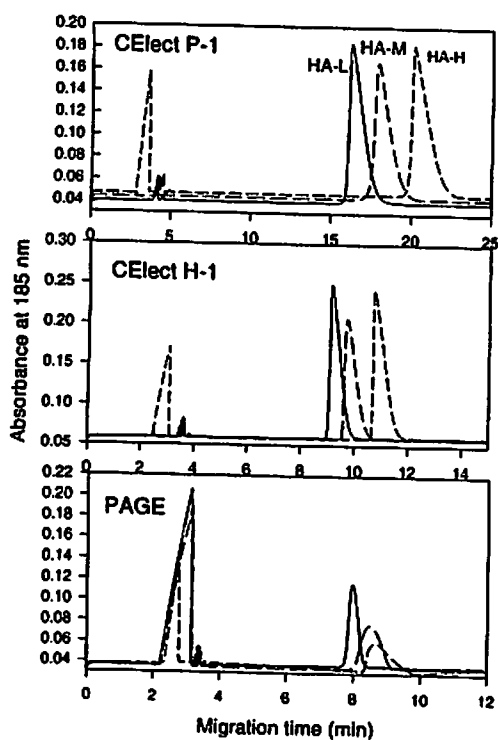


図1. Migrations of hyaluronic acid samples in surface coated capillaries. Top panel: capillary, CElect P-1(Supelco); middle panel, CElect H-1 (Supelco); bottom panel, linear polyacrylamide. Sample: HA-L (mol. mass 40000 - 60000); HA-M (mol. mass 800000 - 1200000); HA-H (mol. mass 1500000 - 2100000).

蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動によるプロテアーゼ活性の測定

Free label, sensitive detection

(帝京大・薬¹、分子バイオホトニクス²)

○志村 清仁¹、松本 浩幸²、笠井 献一¹

Determination of protease activity by capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection

Kiyohito Shimura¹, Hiroyuki Matsumoto², and Ken-ichi Kasai¹

1, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

2, Laboratory of Molecular BioPhotonics.

Capillary isoelectric focusing (cIEF) is inherently powerful for the analysis of dilute samples due to its focusing effect. Many peptides have good focusing property and such peptides, when labeled with a fluorescent dye, could be extremely sensitive reporters on the events that change their pIs when they are analyzed by cIEF with laser-induced fluorescence detection. As an example, we applied this principle for the detection of protease activity. A fluorescent peptide substrate for trypsin was prepared from a synthetic peptide, H-Gly-Cys-His-Glu-Ala-Arg-Ala-Glu-Glu-OH. The labeled peptide substrate focused at pH 4.75 and the cleavage of the Arg-Ala bond by trypsin released the dye-labeled hexapeptide that focused at pH 7.1. The product was quantified by cIEF with LIF (He-Ne laser at 543.5 nm) detection down to 3 pM. A linear response was obtained for 50 to 250 pg of trypsin after the enzyme reaction for 10 min.

【はじめに】

キャピラリー等電点電気泳動法 (cIEF) はタンパク質やペプチドの希薄試料の分析に極めて有効である。それは試料の等電点への凝縮と分離が同時に起こるために、ゾーン電気泳動法にくらべてはるかに多量の試料を分析することができるからである。検出にレーザー励起蛍光法 (LIF) を用いると、比較的簡単な検出装置で pM レベルの試料の分離定量が可能になる。この方法は蛍光標識された物質の分離検出のみならず、標識された物質に等電点の変化を起こすような現象を高感度に検出するのにも有用である。そこで蛍光標識したペプチドを基質としてプロテアーゼ活性の高感度検出を試みた。

【方法】

(1) 標識ペプチドの調製 合成ペプチド H-Gly-Cys-His-Glu-Ala-Arg-Ala-Glu-Glu-OH の Cys のチオール基にリサミンローダミン B のヨードアセチル体を反応させ、生成した標識ペプチドを逆相クロマトグラフィーで精製した。

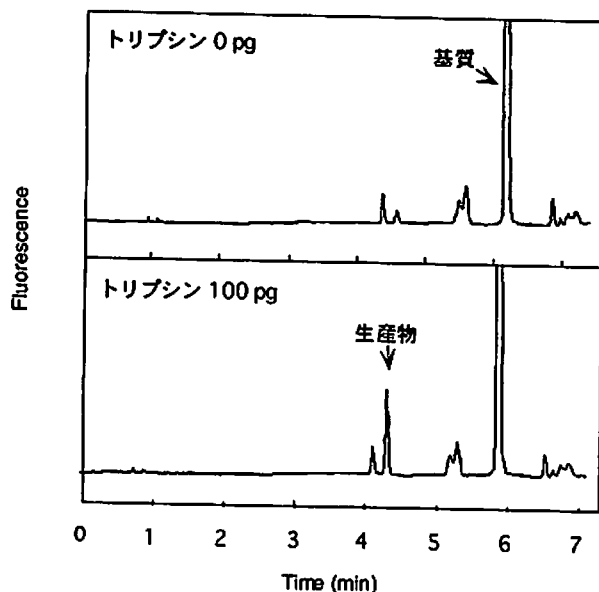
(2) キャピラリー等電点電気泳動 内壁をポリアクリルアミドで被覆した内径 50 μm、長さ 22 cm の熔融シリカキャピラリーを、1/25 倍希釈 Pharmalyte と 0.1 % Tween 20 を含む試料 (0.43 μL) で満たし、0.5 kV/cm の電圧で 5 分間焦点化した。次に、同じ電圧をかけたまま陽極側の電極液槽を 5 ~ 10 cm 上げることにより pH 勾配を陰極側へ連続的に動かした。陰極端から 2 cm の位置で、1 mW の He-Ne レーザー (543.5 nm) を光源として、590 nm の蛍光をバンドパスフィルターで取り出し、光

電子増倍管で検出した。

(3) 酵素反応 10 nM の標識ペプチド基質を含む緩衝液 (0.1 % Tween 20 を含む 1/25 倍希釈 Pharmalyte 3-10 - NaOH で pH 8.0 に調整) 10 μ l にトリプシン液 1 μ l を加え、37°C、10 分 インキュベート後、ダイズトリプシンインヒター (100 ng/ μ l) を加えて反応を停止した。この反応液をキャピラリーに満たし等電点電気泳動を行った。

【結果】

標識ペプチド基質 H-Gly-Cys*-His-Glu-Ala-Arg-Ala-Glu-Glu-OH (*: 標識) は pH = 4.75 に焦点化したのに対し、トリプシン作用の生産物ペプチド H-Gly-Cys*-His-Glu-Ala-Arg-OH は pH = 7.1 に焦点化した。生産物ペプチドを LIF 検出 cIEF で分離定量すると 3×10^{-12} M $\sim$ 3×10^{-10} M の範囲で濃度に比例したピーク面積値が得られた。トリプシン量を変えてインキュベート後、反応液中の生産物ペプチドを LIF 検出 cIEF で分離定量したところ、50 - 250 pg のトリプシンに対しほぼ比例したピーク面積が得られた。



【考察】

本法を用いることにより、50 μ g のトリプシンの活性を測定できた。酵素反応を 1 μ l で行うことができれば、さらに感度を 10 倍上げることができる。測定しようとする酵素の作用によらない、背景にある基質の加水分解産物の生成を防ぐことができれば、さらに 10 倍程度の高感度化が期待できる。分離検出には約 10 分を要したが、装置をこの目的に最適化することにより、数分に短縮することができるだろう。ペプチドのアミノ酸配列を適当に選ぶことによって、この超微量活性測定法は、配列特異性の異なるさまざまなプロテアーゼに適用できると考えられる。

【文献】

Shimura, K., and Kasai, K. (1995) *Electrophoresis* 16, 1479-1484.

キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その1 キャピラリー入り口での反応による誘導 体化と分析の自動化

(近畿大・薬) 多賀淳、○本田進

Atsushi Taga and Susumu Honda

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Amino acids were derivatized with *o*-phthalaldehyde by the at-inlet derivatization technique using the inlet portion of a capillary as a reaction vessel. This was proved quite useful for automated analysis of amino acids.

(はじめに)

最近ではキャピラリー電気泳動装置は自動化され、その性能もかなり高まってきた。また試料の導入には高性能化された自動吸引法や自動加圧法などが採用されており再現性良く試料導入が行える。このことを利用して試料の必要最小量をキャピラリー中に導入し、一定条件を保ちながら誘導体化し、直ちに分析を行うことができると考えられる。そこでアミノ基標識試薬である *o*-phthalaldehyde (OPA) をモデルにして誘導体化反応の最適化およびアミノ酸誘導体の分離条件の検討を行った。

(実験方法)

キャピラリー電気泳動装置：Applied Biosystems 270A 型装置。
キャピラリー：フューズドシリカ素管 (内径 50 μm 、72 cm)。試薬溶液には 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) と 100 mM OPA 水溶液を 1 : 1 で混合したものを使用し、試料溶液にはアミノ酸水溶液に同量の 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) を加えたものを用いた。検出波長は 230 nm、カラム温度は 30°C で誘導体化および分析を行った。

(結果と考察)

試料および試薬溶液の混合状態の観察：ケイ皮アルコールを 0.01% および 0.005% 濃度でキャリアー (50 mM ホウ酸緩衝液, pH 10.0) に溶かしたものをそれぞれ試薬溶液 (R) および試料溶液 (R) のモデルとして積層導入し、一定時間放置したのち電気泳動を行い、そのピーク形状から混合状態を調べたところ、吸引法により R(3 sec)-S(1 sec)-R(3 sec) で導入し 15 min 放置することにより両液は効率良く混合されていることがわかった。また Phe、Met、Ala および Glu の 4 種のアミノ酸について R(3 sec)-S(1 sec)-R(3 sec) の反応条件で OPA との反応の経時変化を調べたところ、20 min 以内に反応が完結していることがわかった。また、この条件での誘導体化では、同様の反応を試験管内で行った場合と同等の反応生成率が得られた。また定量性を調べるために 4 種のアミノ酸について Gly を内部標準として検量線を作成したところ、試料濃度とピークのレスポンスの間に良好な直線性が得られた。また、17 種のアミノ酸混合物を用いて分離条件を種々検討した結果、3.2 mM の濃度で CHAPS を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) をキャリアーとして用いた場合に最も良い分離が得られた。

(結論)

キャピラリー入り口において誘導体化を行うことにより、微量試料による定量的なアミノ酸分析が可能であった。また、本操作は自動化することが容易であり、プレカラム誘導体化よりもアミノ酸分析の自動化に有利であると考えられる。

文献

- A. Taga and S. Honda, J. Chromatogr. A, 742 (1996) 243.
M. Roth, Anal. Chem., 43 (1971) 880.

キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その2 ゾーン追い越し方式による誘導体化と高 速反応速度定数の測定

(近畿大・薬) ○多賀淳、杉村真由美、本田進

Atsushi Taga, Mayumi Sugimura and Susumu Honda

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Selected amino acids were derivatized with *o*-phthalaldehyde by the zone-passing mode of in-capillary derivatization technique. This technique was shown to be effective for quantitation of amino acids and kinetic study of the derivatization reaction.

(はじめに)

前報においてはキャピラリー入り口で誘導体化を行う方法を提起したが、本報においてはキャピラリー内で泳動中に誘導体化を行い、誘導体を直ちに分析する方法について検討した。また、この方法の特長を生かして誘導体化反応の動的状態を観察した。

(実験方法)

キャピラリー電気泳動装置：JASCO 890-CE 型装置。キャピラリー：フューズドシリカ素管 (50 μm i. d., 70 cm)。試薬溶液には 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) と 100 mM *o*-phthalaldehyde (OPA) 水溶液を 1 : 1 で混合したものを使用し、試料溶液にはアミノ酸水溶液に同量の 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) を加えたものを用いた。検出波長は 230 nm、カラム温度は 30°C で誘導体化および分析を行った。

(結果と考察)

泳動用キャリアーおよび反応用緩衝液であるホウ酸緩衝 (pH 10.0) 中において OPA は中性であり、アミノ酸標品として用いた Phe、Ala、

Met および Glu は負の電荷を帯びる。そこで、内部標準として cinnamic acid を添加した試料溶液を落差法により導入したのち、試薬溶液を導入して電圧を印加するという手法によりキャピラリー内で“ゾーン追い越し型”の誘導体化を行った。本法により一定条件で Ala、Met および Glu のキャピラリー中での誘導体化を行い、内部標準に対するレスポンス比を試料濃度に対してプロットしたところ、良好な直線性が得られた。また、試料溶液、試薬溶液の導入時間および印加電圧を種々変化させたところ、試薬の導入時間は長いほど、印加電圧は低いほど反応生成率は高くなった。これは試料と試薬の接触時間の長短によるものと考えられる。そこで試料溶液の導入条件は一定にして、印加電圧 5 kV で試薬の導入時間を種々変化させて誘導体化したところ、短い導入時間では反応生成率の急激な増加が見られ、導入時間が長くなるにつれてその増加は緩やかになった。得られたデータを基にして試薬の導入時間および OPA 誘導体のレスポンス比を、反応時間および OPA 誘導体濃度に換算することにより OPA/Phe の一次反応速度定数を求めることができた。

(結論)

本法によりアミノ酸を簡便に誘導体化および分析することができた。また試料、試薬の導入条件および印加電圧などの条件を一定に保つ限り、定量性のある誘導体化が可能であった。一方、本法においては試薬溶液の導入時間を変化させることにより容易に反応時間を調節することができるため、本法は誘導体化反応の動的状態の観察には利用できるものと考えられる。特に今回のモデルである OPA 試薬による誘導体化反応のような速度の速い反応の解析に有効であると思われる。

エレクトロスプレーイオン化法および大気圧化学イオン化法を用いるオンラインMEKC-MSの検討

(株式会社カネカテクノリサーチ)○尾崎祐人, (姫路工業大学理学部)寺部 茂

On-line MEKC-MS with ESI and APCI interface.

Hiroto Ozaki¹, Shigeru Terabe²

1 Kaneka Techno Research Co. Ltd.

2 Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Two methods were studied for on-line coupling between micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and mass spectrometry (MS). Electrospray ionization interface (ESI) was used with high-molecular-mass surfactants, butyl acrylate-butyl methacrylate-methacrylic acid copolymer sodium salt (BBMA) and di-2-methyl-1-propene-maleic acid copolymer sodium salt (DMA), as pseudo-stationary phase. Atmospheric pressure chemical ionization interface (APCI) was used for a conventional MEKC system using SDS.

1. 緒言

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) と質量分析計 (MS) のオンライン接続は, 化合物同定の可能な高分離分析法として期待が大きい。MEKCの場合、界面活性剤を高濃度で含む分離溶液を用いることになるが、試料のイオン化効率の極端な低下と、界面活性剤そのものの強いバックグラウンドイオンを生じるため、CE-MSシステムをそのまま用いてMEKC-MSをおこなうことは困難である。我々はこれまでに高分子界面活性剤を用いてエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を用いるMSと接続する方法¹⁾, およびSDSその他汎用される界面活性剤を用いて大気圧化学イオン化法 (APCI) を利用する方法²⁾ について検討してきた。今回、この2種類の手法の比較と、いくつかの応用例、およびこれまで検討のなされていない負イオン検出における課題について報告する。

2. 実験

検討には質量分析計に日立製M-1000を用い、ESIおよびAPCIのインターフェースはともに日立中央研究所で開発されたものを使用した。CE装置、インターフェース用ノズルは自作のものを使用した。CE電源およびAPCI噴霧用電源には松定プレジジョン製のものを使用した。キャピラリーはGLサイエンス製の内径50 μm 、外径150 μm 、長さ50~60 cmのフエルトシカピラリーをそのまま使用した。分離条件検討にはHP製3DCE1602Aを

CE - APCI - MS におけるスペクトル強度に及ぼすパラメーターの検討

○横井 雅樹 (1)、尾崎 祐人 (2)、大塚浩二 (1)、寺部 茂 (1)

(1) 姫路工業大学理学部、 (2) カネカテクノリサーチ (株)

Effect of Operating Parameters on Sensitivity in CE - APCI - MS

○ Masaki Yokoi(1), Hiroto Ozaki(2), Koji Otsuka(1), and Shigeru Terabe(1)

(1) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12 Japan

(2) Kaneka Techno Research Co. Ltd., 1-2-80, Yoshida-cho, Hyogo-ku, Kobe, 652 Japan

Although atmospheric pressure chemical ionization (APCI) has been described as a very promising interface for capillary electrophoresis - mass spectrometry (CE-MS), this interface system has not been well characterized. To establish this interface system, we examined various factors affecting ionization efficiency and spectral interference, and tried to optimize operating parameters to obtain maximum signal intensity using caffeine as a model compound. We investigated effect of ① sheath flow rate, ② drift voltage, ③ ionic surfactant concentrations and ④ desolvation temperatures on sensitivity in CE-APCI-MS.

1、はじめに

CE-MS は CE による高性能分離法と MS による定性情報を同時に得ることができる化合物の有効な分離分析同定方法として期待されている。最近、従来のエレクトロスプレー・イオン化法 (ESI) インターフェースシステム等よりもバッファ中の塩や界面活性剤の影響によるイオン化効率の低下を受けにくい大気圧化学イオン化法 (APCI) インターフェースシステムの研究開発報告がなされた [1]。しかし、このインターフェースシステムは元来 LC-API-MS 用に開発されたものを CE 用に改良を加えた物であるため、CE-MS での操作条件の最適化や MS スペクトル強度に影響を与える因子についての研究報告は少ない。本研究ではカフェインをモデル試料として4つの操作条件①シース溶液の流量、②ドリフト電圧、③イオン性界面活性剤の濃度、④脱溶媒装置の温度、を変化させカフェインの分子ピークのスペクトル強度の変位を調べ、操作条件の最適化と APCI インターフェースシステムの利点について検討した。

2、実験

電気泳動装置は日本分光 CE-990-10、質量分析計には日立 M-1000 システムを、インターフェースには日立製 [1] を使用し、オンラインで接続して実験を行った。キャピラリーは内径 50 μ m、外径 150 μ m、全長 105cm、有効長 65cm のものを用い、泳動電圧は 17kV、シース溶液は 100% メタノール、試料はカフェインを純水に 100 μ g / ml または 200 μ g / ml となるように溶かしたものを実験条件に応じてそれぞれ用い、測定はすべて SIM モードで行った。

3、結果・考察

①シース溶液の流量、②ドリフト電圧、③イオン性界面活性剤の濃度、④脱溶媒装置の温度、の影響は各パラメータを変化させたときの試料ピークの面積の変化を比較することにより検討した。シース溶液の流量変化、イオン性界面活性剤の濃度変化はカフェインの強度にはあまり影響しなかった。ドリフト電圧の変化、脱溶媒装置の温度変化については双方ともに大きく関与した。ドリフト電圧の変化と脱溶媒装置の温度変化についての結果を Fig.1、2 に示す。理由として、①シース溶液の流量の変化について。大部分のシース溶液は MS の第一細孔に導入する前に脱溶媒装置で気化されるために、試料のイオン化効率をひどく妨害しないからと考えられる。②ドリフト電圧の変化について。ドリフト電圧は分子衝突によりクラスターイオンを分解させ、一分子イオンにするための電圧であるが、電圧が高すぎると分子の衝突が過剰になり、分子イオンの第二細孔への導入効率の低下やフラグメントイオンの増加を引き起こす。逆に電場が低すぎると分子衝突が不十分になりクラスターイオンの分解が起こらないことに起因すると考えられる。本研究で用いたカフェインに関しては、50V 前後で最大スペクトル強度を得たが、試料の質量数が変わると最適値が変わると予測される。③イオン性界面活性剤の濃度の変化について。APCI では試料のイオン化はコロナ放電によるイオン・分子反応なのでイオン性界面活性剤の存在下でも ESI に比べイオン化効率が高いためと考えられる。S / N 比も界面活性剤の濃度により影響されなかった。④脱溶媒装置の温度の変化について。低い設定温度で S / N 比の悪化がみられた。低い設定温度ではシース溶液の気化が十分でなく、バックグラウンドの強度が相対的に高くなったためと思われる。なお、本研究で用いたカフェイン試料では 300 °C 前後で最大スペクトル強度を得た。以上の結果より試料のイオン化効率はドリフト電圧と脱溶媒装置の温度が大きく影響しており、ドリフト電圧については他の試料との比較が必要である。APCI では界面活性剤の濃度変化による試料のイオン化効率の妨害が起こりにくいことから、ESI よりも MEKC-MS のインターフェースとしてより有望であると期待できる。

[1] Takada, Y.; Sakairi, M.; Koizumi, H. Anal. Cham. 1995, 67, 1474

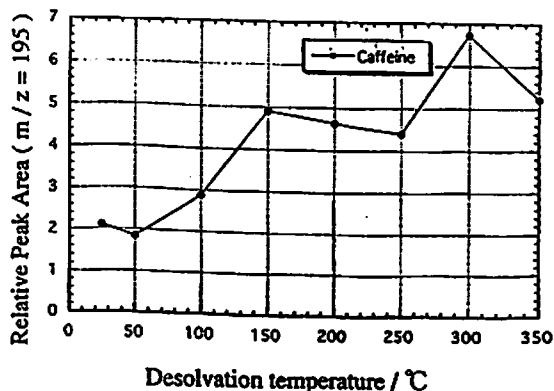
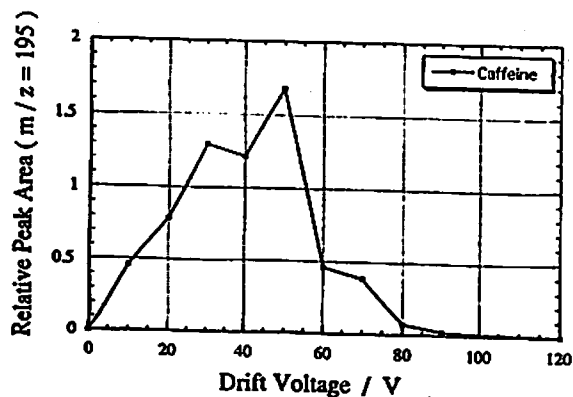


Fig.1 Effect of drift voltage on MS sensitivity

Fig.2 Effect of desolvation temperatures on MS sensitivity

ANS 標識還元糖のキャピラリー電気泳動

○三宅徹志, 中村 洋 (東理大薬)

Capillary Electrophoresis of ANS - Labeled Reducing Sugars

Tetsushi Miyake and Hiroshi Nakamura

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo

Micro - scale analysis of oligosaccharides was attempted by capillary zone electrophoresis (CZE). Reducing sugars were labeled with ANS, reduced with NaBH_4CN and detected by UV absorption. Monosaccharides (Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc and Fuc) were successfully separated in 40 mM Britton - Robinson buffer at pH 8.0.

【目的】糖鎖は細胞表面に局在し、細胞間の認識、情報伝達、細胞の分化など、生命の維持に重要な役割を果たしている。これらの機能を知るには、糖鎖構造解析が必要不可欠な手段となる。当研究室では、これまでに 8 - アミノ - 2 - ナフタレンスルホン酸 (ANS) を用いる還元糖の蛍光定量法¹⁾ ならびに糖鎖逐次配列分析法²⁾ を提案している。これらの方法は、逆相 HPLC に基づくものである。一方、分離能が高く、微量試料の高感度分析が可能なキャピラリー電気泳動 (CE) が最近注目されている。そこで本研究では、オリゴ糖の配列分析法を極微量で行う CE 系の確立を目標として、まず、ANS 誘導体化単糖の CE 分離系の検討を行った。

【実験】試薬：ANS および単糖類は、東京化成あるいはナカライテスクより購入した。ANS は 28.6 mM クエン酸 Na 緩衝液 (pH 2.4) に溶解し、80 mM 溶液として使用した。その他の試薬・溶媒は特級を用いた。CE 条件：装置, CE-800 (日本分光); キャピラリー, フューズドシリカ管 (50 μm i.d. $\times$ 70cm; 有効長, 50cm); 印加電圧, 10 あるいは 20 kV; 検出波長, 205 ~ 254 nm; 注入法, 吸引法 (陽極側より 3 秒間) あるいは落差法 (15 cm $\times$ 20 秒間); 泳動溶液, ① 50 mM リン酸 Na 緩衝液 (pH 7.0), ② 50 mM ホウ酸 Na 緩衝液 (pH 9.0), ③ Britton - Robinson 緩衝液 (pH 5 ~ 10); 試料, 70 μM ~ 1 mM ANS 標識単糖溶液を用いた。試料調製：80 mM 単糖水溶液 50 μL に 80 mM ANS 溶液 50 μL を混合し、封管チューブ中で 100 ~ 104 $^{\circ}\text{C}$, 70 分間加熱した。さらに 16

mM NaBH₃CN 水溶液 5 μ Lを加えて再び封管し, 90°C , 120分間加熱し, ANS標識単糖溶液を調製した. なお, 加熱にはアルミブロックヒーター, 反応容器には CORNING 製ディスポピペットをブンゼンバーナーで加熱細工したものをそれぞれ用いた.

【結果・考察】まず, 50 mM リン酸Na緩衝液 (pH 7.0) を泳動溶液として, ANS - Glcと ANS - Galを泳動した. その結果ピークが重なって検出された. そこで, *cis*- ジオールとのキレート生成が期待できる 50 mM ホウ酸Na緩衝液 (pH 9.0) を泳動溶液に用いてみたが, 両者は分離されなかった. しかし, 40 mM Britton - Robinson 緩衝液 (pH 5 ~ 10) を泳動溶液に用いて相互分離を検討した結果, pH 8.0 で泳動することにより5 種類の ANS - 単糖の相互分離が達成された (Fig.1). 今回の結果から, ANS誘導体化単糖がCEを用いて良好に分離できる事が判明した. その他のANS誘導体化単糖の分離, 並びにそれらの検出限界についても報告する.

- 1) S.-P.Hong, H.Nakamura and T.Nakajima, *Anal.Sci.*, 10, 647 (1994) .
- 2) S.-P.Hong, A.Sano and H.Nakamura, *Anal.Sci.*, 12, 491 (1996) .

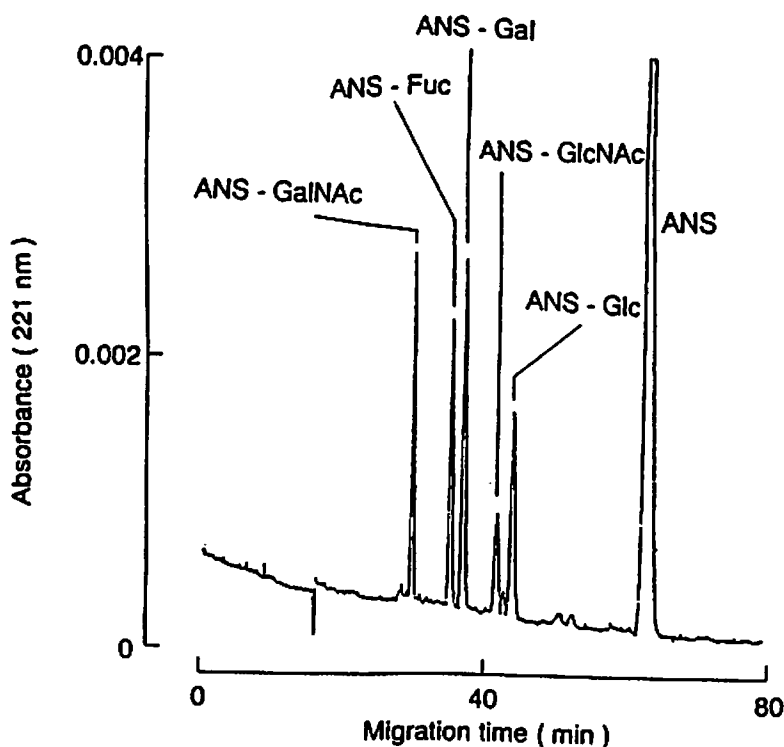


Fig.1 CZE separation of ANS - labeled monosaccharides

キャピラリー電気泳動による日本薬局方製剤の不純物分析

おばら えいじ なかむら ひろし
○小原栄二 中村 洋 (東理大薬)

IMPURITY ANALYSIS OF JAPANESE PHARMACOPOEIA PREPARATIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Eiji OBARA and Hiroshi NAKAMURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and capillary zone electrophoresis (CZE) were applied to impurity analysis of drug preparations. Using 40 mM Britton - Robinson buffer (pH 2.5) containing of 50 mM SDS, the separation of aspirin (ASP) and salicylic acid (SA) was achieved within 20 min.

【目的】日本薬局方収載品は 1292 品目にのぼるが、その純度分析は液体クロマトグラフ法と薄層クロマトグラフ法が約 45 % を占める。これらの分離分析法には有機溶媒を用いる、多量の溶媒が必要などの問題点が指摘されている。キャピラリー電気泳動 (C E) 法にはこれらの欠点がなく、また格段の高分離能を有するため近年大いに注目されている。そこで我々は、C E を用いて日本薬局方収載医薬品の不純物分析を行うことを目的として、まず日本薬局方アスピリン (A S P) とその不純物であるサリチル酸 (S A) の分離・定量を試みた。

【実験】試薬：日本薬局方 A S P は岩城製薬、S A は東京化成、S D S はナカライテスクより購入した。その他の試薬・溶媒は特級あるいは H P L C 用を用いた。C E 条件：装置、C E - 800, C E - 900 (日本分光)；キャピラリー、フューズドシリカ管 (50 μ m i. d. $\times$ 70 cm；有効長, 50 cm)；検出波長, 205 あるいは 220 nm；注入法, 落差法 (陽極側より 10 cm $\times$ 10 秒間) または加圧法 (陽極または陰極側より 10 ~ 100 mb, 0.2 分間)；印加電圧, 20 kV；泳動溶液, 40 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2.5

～10.0) をそのまま、あるいは 10 ～ 50 mM SDS を添加したものを用いた。試料溶液: 1 mM の ASP または SA のアセトニトリル溶液をそのまま、あるいは混合して用いた。

【結果・考察】まず、泳動溶液に 40 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2.5 ～ 10.0) を用い、pH の変化による泳動時間への影響を検討した。その結果 pH 6.0 ～ 10.0 では ASP と SA は分離されたものの、加水分解の進行が危惧された。そのため、加水分解を抑制できる pH 2.5 付近での条件を検討した。pH 2.5 及び 3.0 では ASP のピークは電気浸透流と重なって検出され、また SA が逆向きに泳動されていることが判明した。さらに pH 2.5 で ASP と SA を同時に検出・定量できる条件を検討した。すなわち泳動溶液に 50 mM SDS を含む 40 mM Britton-Robinson 緩衝液 (pH 2.5) を用いる系での相互分離を検討した。その結果、ASP は 12.3 分、SA は 10.5 分に泳動・分離された。このとき、泳動時間は SDS 濃度に応じて短くなった (Fig.1)。今回の実験から製剤中の不純物分析に CE を用いる方法が有効であることが示唆された。今後他の日本薬局方収載医薬品への適用を進めていく予定である。

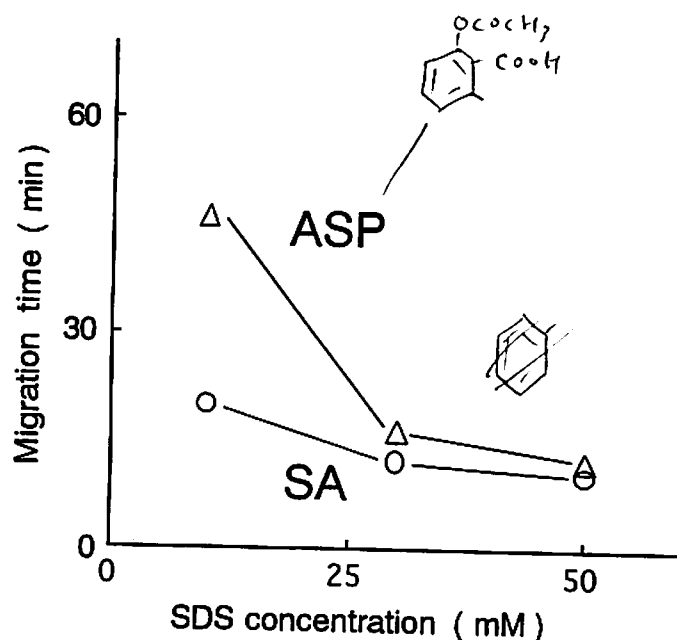


Fig.1 Effect of SDS Concentration on Migration Times of ASP and SA

クラウンエーテルを用いたキャピラリー電気泳動による医薬品の光学分割

田辺製薬(株)・分析研究所, 〒532 大阪市淀川区加島3-16-89

○西 博行, 泉本 真一, 中村 耕治, 仲井 英雄, 佐藤 忠司

Enantiomer Separation of Drugs by Capillary Electrophoresis Utilizing Crown Ethers

Hiroyuki Nishi, Shin-ichi Izumoto, Kouji Nakamura, Hideo Nakai, Tadashi Sato
Analytical Research laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Osaka 532

Separation of enantiomers and isomers of a wide variety of primary amines by capillary electrophoresis (CE) was investigated employing charged and uncharged crown ethers. Enantiomer separation of primary amines by CE was successful through the addition of a chiral crown ether, 18-crown-6 tetracarboxylic acid (18C6H4). Low pH values (pH 1.9 - 2.1) and relatively high Tris concentration (20 mM) were effective for the fast enantiomer separation. Separation of positional isomers of aromatic amino compounds such as aminophenols, aminocresols was investigated by CE with 18C6H4 and other two 18-membered crown ethers. Separation of enantiomers and isomers of the same primary amines was also investigated by HPLC with Crownpak CR(+).

1.はじめに

キャピラリー電気泳動は、高性能を持つ分離分析法であり、光学分割法として優れた手法である(1,2)。演者らは、光学分割用のキラルセクターの探索、医薬品の光学分割への適用あるいは光学認識の機構に関する研究を行っており、シクロデキストリン誘導体、イオン性の多糖類、中性多糖類がキラルセクターとして有用であることを報告した。今回は、アミノ化合物を対象とした光学異性体及び位置異性体の分離について、クラウンエーテルの利用を検討し、あわせてキラルなクラウンエーテルが固定化されているCrownpak CR(+)によるHPLC分離についても検討したので報告する。

2.実験

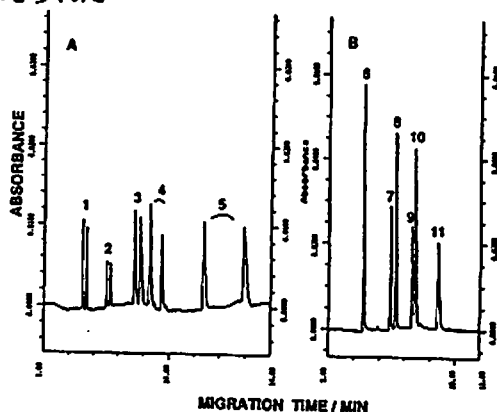
CE装置は、ベックマン製 P/ACE system 5510を、キャピラリーは同じくベックマンより購入した内径 75 μ m, 有効長さ 37 cmの未処理のフューズドシリカキャピラリーを使用した。測定は、15 kV あるいは 20 kVの一定電圧で、検出波長は 210 - 235 nm, キャピラリーの温度は 15 $^{\circ}$ Cあるいは 20 $^{\circ}$ Cで行った。試料は、褐色の試験管に約 1mg/mL になるようにメタノールで調製し、必要であれば 1M 塩酸を加えて溶解させた。緩衝液は、10 - 20 mMの Tris あるいは NaH_2PO_4 を H_3PO_4 を用いてpHを 1.9 - 2.2に調整したものを使用した。検討したクラウンエーテルは18C6H4, 18-crown-6及び dicyclohexyl-18-

crown-6の計3種類のいずれも18員環のもので、これらを10-200 mM 程度緩衝液に添加した。一方、HPLCは、島津製LC-10A一式を、カラムはダイセル製 Crownpak CR(+) を使用し、0.1 % HClO₄ (pH 1.9) とメタノールの混液を移動相として使用した。

3. CEによる光学異性体の分離

アミノ化合物17種類について、光学異性体の分離について検討したところ、18C6H₄により、13種類のものの光学分割が達成された。Kuhnらは(3,4)、泳動液の pH を 2.2以上で使用していたが、今回、pH 1.9 - 2.1とすること及び 20 mM のTris緩衝液を使用することで、迅速な光学分割が達成され、また、プリマキンやアミノグルテチミドのような不斉炭素とアミノ基との距離が離れている化合物に対しても光学認識能が認められた。分離例を図1に示す。18C6H₄の4つのカルボン酸の pKa値は 2.13, 2.84, 4.29, 4.88 であるので、分析条件下 (pH 2.1以下) では18C6H₄が非解離の状態であること及び試料のクラウンへの錯形成に Tris が競合したことが原因と考えられた。

Fig. 1. Enantiomer separation of (A) five drugs and (B) three aromatic amino compounds by CE with 18C6H₄. Buffer: 20 mM Tris-H₃PO₄ (pH 1.90) containing 10 mM 18C6H₄, column temperature: 15°C, applied voltage: 20 kV, detection: 210 nm. Samples: (A) 1=mexiletine; 2=DOPA; 3=octopamine; 4=baclofen; 5=PheG (2) 6=R(+)-BNA; 7=S(-)-BNA; 8=S(-)-NEA; 9=L-Ala-β-NA; 10=R(+)-NEA; 11=D-Ala-β-NA.



4. CEによる位置異性体の分離

アミノクレゾール、アミノフェノール及びアミノ安息香酸類の位置異性体の分離に対して、クラウンエーテルの適用を検討した。18C6H₄, 18-crown-6, dicyclohexyl-18-crown-6 いずれとも、これらの位置異性体の分離に有効であったが、後者2種類では、高い添加濃度を必要とした。すなわち、18C6H₄での分離では静電的相互作用の寄与が示唆された。

5. HPLCによる分離

アミノ化合物17種類について、Crownpak CR(+)によるHPLC光学分割についても検討した。12種類のものの光学分割が達成され、3種類のものは溶出が認められなかった。このカラムでは、キラルなクラウンエーテルがシリカにダイナミックコーティングされているため、使用できる有機溶媒 (メタノール 15 %) に制限がある。18C6H₄と比較し、キラル部分の構造が異なるが、広範囲のアミノ化合物に対して光学認識能を持ち、有用であることが判った。

- 1) H.Nishi and S.Terabe, J.Chromatography A, 694(1995)245-276.
- 2) H.Nishi, J.Chromatography A, 735(1996)57-76.
- 3) R.Kuhn, F.Erni, T.Bereuter, J.Hausler, Anal. Chem., 64(1992)2815-2820.
- 4) R.Kuhn, J.Wagner, Y.Walboehl, T.Bereuter, Electrophoresis, 15(1994)828-834.

キャピラリー電気泳動を用いた *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteine 及び *N*-[*S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteinyl]glycine の各ジアステレオマーの分離測定法

絹田正裕*, 清水裕雄, 産賀敏彦

岡山大学医学部生化学講座

Chiral separation of respective diastereomers of *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteine and *N*-[*S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteinyl]glycine by capillary electrophoresis

Masahiro KINUTA*, Hiroo SHIMIZU and Toshihiko UBUKA

Department of Biochemistry, Okayama University Medical School, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama 700, Japan

A capillary electrophoretic method for simultaneous determination of diastereomers of both *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteine (I) and *N*-[*S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteinyl]glycine (II) was developed by using hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) as a chiral recognition agent. Effects of cyclodextrin types and concentrations, pH of the running buffer and the field strength for electrophoresis on chiral separation were investigated. Respective two diastereomers of compound I and II were completely separated ($R_s \geq 3$ in each) by using a 30 cm (effective) neutral coated capillary with a running buffer, pH 6, containing 80 mM HP- β -CD at a field strength of 500 V/cm at 20 °C. Absorbance at 210 nm was measured. Under the analytical conditions, more than 10 μ l of 50 μ M and 25 μ M of compound I and II, respectively, were required as the sample.

S-[2-Carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteine (I) は正常人尿中より単離された化合物である [1, 2]。この化合物の前駆体は *N*-[*S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteinyl]glycine (II) と考えられ [3]、さらに、化合物 II は *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]glutathione (III) の酵素分解反応生成物であることが *in vitro* で証明されている [3]。したがって、これら化合物は、ヒスチジンの異化産物であるウロカニン酸にグルタチオン (γ -Glu-Cys-Gly) あるいはシステインが付加することによって始まるヒスチジンの新代謝経路 [1-7] の重要物質でもある。化合物 I 及び II の化学構造を Fig. 1 に示しているが、これら化合物は二つの不斉炭素原子 (※印) を有している。L-システイン部分の α -炭素上では *R*-配置をとるが、イミダゾールプロピオン酸基本骨格部分の β -炭素上では *R*-または *S*-配置をとり得ることから *R,R*-及び *R,S*-のジアステレオマーが存在する [6]。生化学的・生理学的特性を知る為には、これらジアステレオマーを分別測定することが必須であるが、従

来用いてきた高圧濾紙電気泳動法 [4] やアミノ酸分析法 [4, 6]、あるいはジアゾ誘導体の比色定量法 [3] では充分な測定ができず、HPLC法では条件設定が難しかった。今回、不斉炭素原子認識担体としてシクロデキストリンを含む緩衝液を充填したニュートラルコーティングキャピラリーを用いて電気泳動を行い、これら化合物の各ジアステレオマーを同時にまた誘導体にすることなく定量する微量かつ簡便

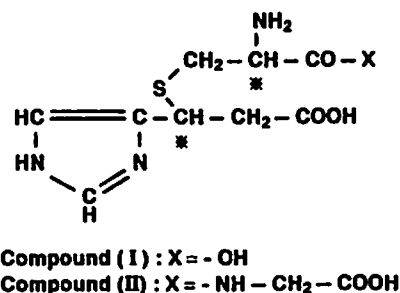


Fig. 1. Structural formulae of *S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteine (I) and *N*-[*S*-[2-carboxy-1-(1*H*-imidazol-4-yl)ethyl]-L-cysteinyl]glycine (II).

* Corresponding author. Fax : + 81-86-222-3778

な分離測定法を確立した。本シンポジウムでは化合物 I 及び II の各ジアステレオマーの分離度に対する 1) シクロデキストリンの種類・濃度、2) 泳動緩衝液の pH、3) 泳動電圧などの影響や、この方法の測定限界などを報告する。

材 料 と 方 法

化合物 I 及び II の各ジアステレオマーは既法 [1, 3] に従って化学合成した。化合物 III は既法 [3, 4] に従って化学合成した。

キャピラリー電気泳動は P/ACE diode array detector を装着した Beckman P/ACE system 5510 analyzer を用い、210 nm の吸光度を計測した。データ処理は Beckman System Gold を用いて行った。キャピラリーは neutral coated capillary (Beckman pat. no. 477441; 内径 50 μ m) 長さ 37 cm (実効長 30 cm) を高感度カートリッジに装着し、泳動中 20 $^{\circ}$ C に保持した。サンプルは色素 (>99.99 %, 5.6-6.0 kg/cm²) で 1-5 秒 pressure injection (約 5 n/sec) し、電極は inlet 側を陰極に、outlet 側を陽極にした。種々の pH をもつ泳動緩衝液は Beckman eCAP Chiral Methods Development Kit を用い、eCAP chiral methods development guide (Beckman Instruction 015-726460) に従って作製した。キット中の試薬類はシクロデキストリン: β -cyclodextrin (β -CD), γ -cyclodextrin (γ -CD), hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) 及び dimethyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD); 緩衝液作製用溶液 (使用時 2 倍希釈): eCAP Chiral Kit 低 pH buffer (pH 2.50), 高 pH buffer (pH 8.00) 及び pH 調整用 buffer (initial pH 2.50)。分離度 (R_s) は次式で求めた: $[R_s = 2(MT_2 - MT_1)/(W_1 + W_2)]$ 。MT₁ 及び MT₂ は各ジアステレオマーのミグレーションタイムを、W₁ 及び W₂ はピークのベース幅を示す。

結 果 と 考 察

1) シクロデキストリンの種類

不斉炭素原子認識担体としてのシクロデキストリンの種類を決定する目的で β -CD (3 or 15 mM), γ -CD (10 or 50 mM), HP- β -CD (10 or 100 mM) あるいは DM- β -CD (10 or 50 mM) を含む pH 8 の緩衝液を用い、1 mM 化合物 I 及び II を 1 秒注入して 500 V/cm で泳動した。その結果、 R_s 値は 1.4 (化合物 I) 及び 1.2 (化合物 II) と低かったが、100 mM HP- β -CD でのみ各ジアステレオマーは分離した。

2) 泳動緩衝液の pH

泳動緩衝液の pH を決定する目的で 100 mM HP- β -CD を含む pH 5.00, 6.00, 7.00 あるいは 8.00 の緩衝液を用い 500 V/cm で泳動した。その結果、pH 6 の緩衝液で化合物 I 及び II の各ジアステレオマーはいずれも R_s 約 2.8 で良好な分離が得られた。

3) HP- β -CD の濃度

緩衝液中の HP- β -CD 濃度を決定する目的で 30, 50, 60, 70, 80, 90 あるいは 100 mM の HP- β -CD を含む pH 6 の緩衝液を用いて泳動した。その結果、80 mM HP- β -CD を含む緩衝液で化合物 I 及び II いずれも $R_s \geq 3$ の良好な値を得た。

4) 泳動電圧

電気泳動電圧を決定する目的で 80 mM HP- β -CD を含む pH 6 の緩衝液を用い 300, 400, 450, 500, 550, 600 あるいは 700 V/cm で泳動した。その結果、450-550 V/cm で $R_s \geq 3$ の再現性ある良好な分析が可能であった。各ピークのミグレーションタイム (500 V/cm: 18.5 kV, average 26.5 μ A) は化合物 I が 21.73 及び 22.56 分、化合物 II は 16.38 及び 17.18 分であった。

5) 測定限界

本方法による測定限界は 5 秒注入で化合物 I は 50 μ M、化合物 II は 25 μ M であった。また、フタル酸 (1 mM) を内部標準物質として用い、ピーク面積比から求めた検量線では化合物 I 及び II いずれも 0.1-5 mM で直線となった。

以上の結果から、80 mM HP- β -CD を含む pH 6 の緩衝液 (20 $^{\circ}$ C) を用い 500 V/cm で泳動することによって、化合物 I 及び II の各ジアステレオマーを同時に分離測定する方法が確立された。緩衝液の pH は分離度に大きな影響を与えるファクターであったが、最適分析条件の pH 6 はイミダゾール基の pKa 値にほぼ等しいものであった。また、本方法では化合物 III の二つのジアステレオマーは全く分離されなかった。しかし、この分析条件では、化合物 III は 9.63 分にピークを示し、化合物 I や II とは充分に離れていた。したがって、本方法は化合物 I 及び II の各ジアステレオマーの測定法として、化合物 III の酵素分解反応生成物の詳細な検討や化合物 III 投与後のラット生体試料分析などに応用可能であると考えられる。

本研究は文部省科学研究費補助金 (# 08836008 for M. K.) により行われた。

文 献

- 1) Kinuta, M., Ubuka, T., Yao, K., Futani, S., Fujiwara, M. and Kurozumi, T. (1992) *Biochem. J.* 283: 39-40.
- 2) Kinuta, M., Masuoka, N., Yao, K., Ohta, J., Yoshida, S., Futani, S. and Ubuka, T. (1991) *Amino Acids (Wien)* 1: 259-262.
- 3) Kinuta, M., Ubuka, T., Yao, K., Yamada, S., Yukihiro, K. and Tomozawa, M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1157: 192-198.
- 4) Kinuta, M., Yao, K., Masuoka, N., Ohta, J., Teraoka, T. and Ubuka, T. (1991) *Biochem. J.* 275: 617-621.
- 5) Kinuta, M., Ubuka, T., Yao, W.-B., Zhao, Y.-Q. and Shimizu, H. (1994) *Biochem. J.* 297: 475-478.
- 6) Kinuta, M., Sasaki, K., Shimizu, H. and Ubuka, T. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1291: in press.
- 7) Kinuta, M., Shimizu, H., Masuoka, N., Ohta, J., Yao, W.-B. and Ubuka, T. (1996) submitted to *Amino Acids (Wien)*.

高速先端分析法におけるLCとCEの比較

中川 照眞 京都大学薬学部（〒606 京都市左京区吉田下阿達町）

COMPARISON OF LC AND CE IN HIGH-PERFORMANCE FRONTAL ANALYSIS

Terumichi Nakagawa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku
Kyoto 606 Japan.

The term "High-Performance" in High-Performance Frontal Analysis (HPFA) is due to extended advantage over conventional frontal analysis in that it requires much smaller sample amount and shorter analysis time, though on the basis of the same principle, which was enabled by use of restricted-access type HPLC phases. HPFA can be achieved in combination with HPLC or CE instrument, which is capable of determining unbound solute concentration in a very small volume of sample solution which is in an equilibrium of binding to big molecule such as protein binding of drug. The lecture will take a comparative overview of principle, method and application of HPFA combined with HPLC and CE, demonstrating utility in drug/protein binding analysis.

LCを用いる高速先端分析法(HPFA)の原理は、従来の先端分析法と同じであるが、制限進入型(Restricted-Access Type)のHPLC用固定相を用いることによって分析時間、必要試料量などが大幅に改善されて、応用範囲が広がった。さらに、キャピラリー電気泳動法(CE)との組合せによって一層有用性が増し、従来の分析法では得られなかった情報の入手が可能となった。本講演では、HPFAの原理と方法と応用について、薬物-タンパク質結合の分析を例にとって概説する。

HPFAの原理と特徴

制限進入型HPLCカラムに薬物を含むタンパク質溶液を直接注入すると、注入量が少ない時はタンパク質と結合平衡状態にある全薬物濃度(結合型と遊離型の合計)に対応する1本の鋭いピークが出現するが、注入量が多くなるにつれてピークの先端が平坦となり台形状のピークを与えるようになる。さらに注入量を増やしても平坦部分の幅が広がるだけで、

その高さは変わらない。この時、たんぱく質を含まない同じ濃度の薬物を同量注入してもこのような現象は観測されず、1本の鋭いピークを与えることから、この現象は検出飽和によるものではなく、明らかに薬物-タンパク質結合に起因するものであることが示唆される。理論的、実験的研究の結果、この平坦部分の高さはタンパク結合平衡状態の遊離型薬物濃度に、面積は全薬物濃度にそれぞれ比例することが分かった。すなわち、1つのピークから2つの独立した定量的情報が得られることを見出した。この原理は従来の先端分析法のそれと基本的に同じであり、試料注入量が少ない時には移動相による希釈にともなって結合平衡が急速に解離側に偏り、全薬物が一本のピークとして観測されるのに対して、試料量がある限界を越えて多くなると、カラム入口付近の移動相中に試料と同じ結合平衡状態を保ったゾーンが形成されるためであると考えられる。

HPLCを用いるHPFA

上記の原理を利用して、性質の異なった多くの薬物について、血清アルブミンや血清そのものと結合平衡状態にある試料に適用した結果、現在標準的遊離薬物濃度測定法として広く用いられている限外濾過/HPLC法で得られた結果と良く一致した。しかし、HPFAの必要試料量は約100分の1程度であった。また、一部の薬物（例えばカルバマゼピン）については、遊離型薬物濃度と全薬物濃度の同時定量も行った。さらに、HPFAとキラルHPLC分離とをカラムスイッチングによって結合する方法を開発し、光学異性体薬物のタンパク結合における立体選択性を明らかにするとともに、タンパク結合における薬物間相互作用の微量解析に成功した。

CEを用いるHPFA

HPFAとCEとを組合せる際、キャピラリー中への通常の試料導入方法（差圧法および電気的方法）に改良を加えることによって、極微量（<100nL）試料中の遊離型薬物濃度の直接定量が可能となった。また、キャピラリー内壁の処理や移動緩衝液の最適化などの基礎研究に基づいて、塩基性薬物の立体選択的タンパク結合の解析や立体選択的タンパク結合における糖たんぱく糖鎖の機能の解明など、極微量タンパク質の薬物結合機能の研究に端緒を開くことができた。しかし、より広範な適用を可能にするためには、検出感度や再現性の一層の向上などに今後の課題が残されている。

関連文献

1. Analysis of Werfarin-Albumin Binding by HPLC with Internal-Surface Reversed-Phase Silica Column, A. Shibukawa, T. Nakagawa, M. Miyake, H. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 36(1988)1930-1933.
2. Determination of Free Drug in Protein Binding Equilibrium by High-Performance Frontal Analysis Using Internal-Surface Reversed-Phase Silica Support, A. Shibukawa, T. Nakagawa, N. Nishimura, M. Miyake, H. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 37(1989)702-706@
3. Effect of Protein Binding on High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Drugs with an Internal-Surface Reversed-Phase Silica Column, A. Shibukawa, T. Nakagawa, M. Miyake, N. Nishimura, H. Tanaka, Chem. Pharm. Bull., 37(1989)1311-1315.
4. Simultaneous Determination of Free and Total Carbamazepine Concentrations in Human Plasma by High-Performance Frontal Analysis Using an Internal-Surface Reversed-Phase Silica Support, A. Shibukawa, N. Nishimura, K. Nomura, Y. Kuroda, T. Nakagawa, Chem. Pharm. Bull., 38(1990)443-447.
5. Stereoselective Determination of Free Warfarin Concentration in Protein Binding Equilibrium by Direct Sample Injection into On-line HPLC System, A. Shibukawa, M. Nagao, Y. Kuroda, T. Nakagawa, Anal. Chem., 62(1990)712-716,
6. High-Performance Frontal Analysis for the Determination of the Free Drug Concentration in Protein Binding Equilibrium Using Porous Polymer Stationary Phase, N. Nishimura, A. Shibukawa, T. Nakagawa, Anal. Sci., 6(1990), 355-359.
7. Development of High-Performance Frontal Analysis and its Application to the Study of the Drug-Protein Binding Sites, T. Nakagawa, A. Shibukawa, Bunseikagaku, 4-0(1991)203-214@
8. High-Performance Frontal Analysis High-Performance Liquid Chromatographic System for Stereoselective Determination of Unbound Ketoprofen Enantiomers in Plasma after Direct Sample Injection, A. Shibukawa, A. Terakita, J. He, T. Nakagawa, J. Pharm. Sci. 81(1992)710-715.
9. High-Performance Frontal Analysis / High-Performance Liquid Chromatographic System for the Enantioselective Determination of Unbound Fenoprofen Concentration in Protein Binding Equilibrium, A. Shibukawa, M. Nagao, A. Terakita, J. He, T. Nakagawa, J. Liq. Chromatogr., 16(1993)903-914.
10. Micro High-Performance Frontal Analysis for Simultaneous Determination of Unbound and Total Carbamazepine Concentrations in Protein Binding Equilibrium, A. Terakita, A. Shibukawa, T. Nakagawa, Anal. Sol., 9(1993)229-232.
11. Use of a Small-Bore Internal-Surface Reversed-Phase Silica Column for the Micro High-Performance Frontal Analysis of Carbamazepine in an Albumin Solution with a Small Sample Volume, A. Terakita, A. Shibukawa, T. Nakagawa, Anal. Sci.,

10(1994)11-15.

12.High-Performance Capillary Electrophoresis / Frontal Analysis for the Study of Protein Binding of a Basic Drug, A.Shibukawa, Y.Yoshimoto, T.Ohara, T.Nakagawa, J.Pharm.Sci., 83(1994)616-619.

13.Determination of Unbound Concentration of Hydrophobic Drugs in Albumin Solutions by High-Performance Frontal Analysis Using a Diol-Silica Column, A.Shibukawa, C.Nakao, T.Sawada, A.Terakita, N.Morokoshi, T.Nakagawa, J.Pharm.Sci., 83(1994)868-873.

14.Study of the Enantioselective Binding Between BOF-4272 and Serum Albumins by means of High-Performance Frontal Analysis, A.Shibukawa, M.Kadohara, J.He, M.Nishimura, S.Naito, T.Nakagawa, J.Chromatogr.A, 694(1995)81-89.

15.High-Performance Frontal Analysis for the Study of Protein Binding of Troglitazone (CS-045) in Albumin Solution and in Human Plasma, A.Shibukawa, T.Sawada, C.Nakao, T.Izumi, T.Nakagawa, J.Chromatogr.A, 697(1995)337-343.

16.Capillary Electrophoresis Frontal Analysis for Microanalysis of Enantioselective Protein Binding of Basic Drug, T.Ohara, A.Shibukawa, T.Nakagawa, Anal.Chem., 67(1995)3520-3525.

17.Theoretical Study of High-Performance Frontal Analysisi A Chromatographic Method for Determination of Drug-Protein Interaction, A.Shibukawa, T.Nakagawa, Anal.Chem., 68(1996) 447-454.

18.Application of capillary electrophoresis to drug-protein binding study, A.Shibukawa, T.Nakagawa, Jpn. J. Electroph., 1996, 40, 141-146.

19. Protein Binding High-Performance Frontal Analysis of (R)- and (S)Warfarin on HSA with and without Phenylbutazone, J. He, A.Shibukawa, S.Tokunaga, T.Nakagawa, J.Pharm.Sci., in press.

20.Prediction of the Human Pharmacokinetics of Troglitazone, a New and Extensively Metabolized Antidiabetic Agent, After Oral Administration, Using an Animal Scale-Up Approach, T.Izumi, S.Enomoto, K.Hosiyama, K.Sasahara, A.Shibukawa, T.Nakagawa, Y.Sugiyama, J.Pharm.Exp.Ther. in press.

キャピラリー電気泳動を用いる医薬品の迅速かつ簡便な分析法の開発 (β -ラクタム系抗生物質の分析)

○谷口祥子、浜瀬健司、財津 潔 (九大・薬)

DEVELOPMENT OF SIMPLE AND RAPID ANALYTICAL METHOD OF THERAPEUTIC DRUGS USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS (ANALYSIS OF β -LACTAM ANTIBIOTICS)

Shoko Taniguchi, Kenji Hamase and Kiyoshi Zaitso

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Simple and rapid analytical method for β -lactam antibiotics using HPCE was described. Free zone CE with 100 mM phosphate buffer at pH 8.0 gave optimum separation of six commercial β -lactams. The calibration curve of each β -lactam was linear from 0.3 to 12 ng, and each detection limit was about 50 pg.

【はじめに】

医薬品には熱、光等によって分解し本来の薬効を示さなくなるものが存在する。これらの不安定医薬品に関し、医療現場における品質検査が可能な分析法の開発は重要であり、今後の医療の安全性向上にもつながると思われる。実際の医療現場で用いる分析法には、迅速性、簡便性等が要求される。そこで本研究では、高分離能を有し迅速に多成分の分析が可能であり、分析に極めて微量の溶媒しか使用しないキャピラリー電気泳動を用いて不安定医薬品分析法の開発を試み、まず β -ラクタム系抗生物質について検討した。 β -ラクタム系抗生物質は細菌感染等に広く用いられる抗菌薬であり、不安定医薬品として品質管理の重要性が指摘されている。今回は現在医療現場で汎用される6種の β -ラクタム製剤について検討した結果について報告する。

【実験】

1) β -ラクタム系抗生物質

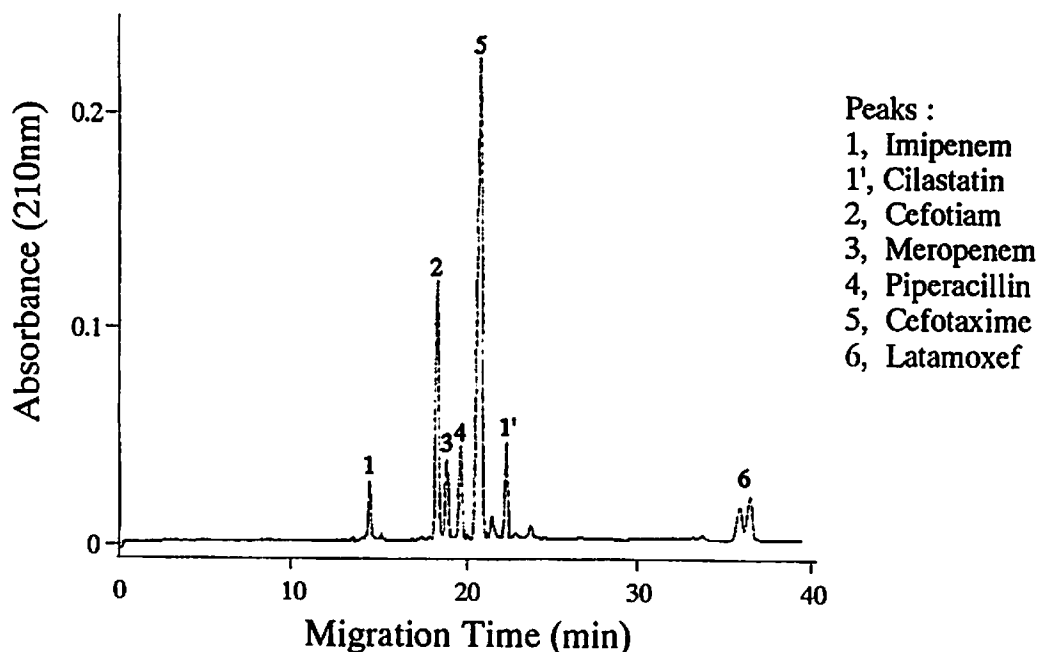
β -ラクタム系抗生物質としては、現在医薬品(注射剤)として市販されているイミペネム(チエナム®, 萬有製薬)、メロペネム(メロペン®, 住友製薬)、ラタモキシフナトリウム(シオマリノ®, 塩野義製薬)、ピペラシリンナトリウム(ペントシリン®, 三共製薬)、塩酸セフォチアム(パンスポリン®, 武田薬品)、セフォタキシムナトリウム(クラフォラン®, ヘキスト)の6種類を使用した。まずこれらを添付文書に記載された濃度に準じて生理食塩液(大塚製薬)で溶解し、注射剤として使用される濃度の溶液を調製した。各注射剤の原薬はそれぞれ製薬会社から提供を受け、同様に生理食塩液で製剤に準ずる濃度に調製した。調製した各医薬品溶液は更に泳動用緩衝液で適当な濃度に希釈し、これに10%になるようMeOHを加えて泳動用サンプルとした。

2) 電気泳動

電気泳動には、Beckman P/ACE 5510 キャピラリー電気泳動システムを用い、キャピラリーは内径75 μ m、有効長50cmのフューズドシリカ管を用いた。サンプルは加圧法を用いて5秒間注入し(ca. 30nl)、泳動は25℃、10kVで行った。検出はBeckman P/ACE Diode Array Detectorを用い210nmにおける吸光度を測定した。同時に、泳動された各ピークの吸収スペクトル(190~400nm)を測定した。

【結果・考察】

分析法の検討に際し、まず泳動用緩衝液を選択した。リン酸緩衝液とホウ酸緩衝液を用い6種類の β -ラクタム系抗生物質の分離を比較した結果、リン酸緩衝液が良好な分離を示したので以後の検討にはリン酸緩衝液を用いた。緩衝液のpHについてpH6.0~9.0で検討した結果、pH8.0で最も良い分離が得られた。緩衝液の濃度は10mMから200mMまで検討し、100mMで最も良い分離を得た。以上の結果から泳動には100mMリン酸緩衝液(pH8.0)を選択した。泳動電圧は、再現性、泳動時間等から10kVを用いた。この条件を用いて、使用した6種の β -ラクタム系抗生物質は良好に分離された。得られたエレクトロフェログラムを下図に示す。各ピークの同定は β -ラクタム各注射剤及び原薬を1種類ずつ泳動させたときの泳動時間及び吸収スペクトルにより行った。各薬物の検量線は、いずれの薬物も0.3~12ng付近で良好な直線性を示し、検出限界(S/N=5)は6種とも約50pgであった。なお製剤中に含まれる他の成分による有効成分定量への妨害は認められなかった。



Separation of β -lactam antibiotics

SDS 高分子溶液キャピラリー電気泳動による 髄液中の低分子蛋白成分の分離・定量

○平岡 厚, 荒戸 照世*, 富永 格**

杏林大・保健, 杏林大・医・生化*, 国立千葉病院・神経科**

Analysis by Sodium Dodecyl Sulfate Polymer Solution Capillary Electrophoresis of Low Molecular Weight Proteins in Cerebrospinal Fluid

Atsushi Hiraoka, Teruyo Arato* and Itaru Tominaga**

Kyorin University School of Health Sciences, *Department of Biochemistry, Kyorin University School of Medicine and **Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital

Electrophoresis in a capillary filled with a SDS-containing polymer solution was applied to the analysis of low molecular weight proteins in cerebrospinal fluid from neuropsychiatric patients. Under the conditions employed, some peaks were detected and identified on the electropherograms, and changes in their levels in associated with pathological conditions in the central nervous system were demonstrated.

〔はじめに〕 ヒトの髄液の蛋白質には、血液脳関門をこえて血中より移行した主要成分 (albumin, transferrin, IgG等) の他、中枢神経系に由来する微量成分も存在し、後者には β -trace protein (β TP, MW: 26,000) 等、蛋白質としては分子量の小さいものが多い。我々は、SDSを含む高分子溶液を充填したキャピラリーを用いるキャピラリー電気泳動 (SDS-CZE) を、髄液のその種の微量成分の分析に適用した。

〔方法〕 種々の精神・神経疾患の患者腰椎より得られた髄液 (のべ50例余) 各2.5mlより、cut off値のことなる限外ろ過膜を用いる遠心限外ろ過を組み合わせて、分子量50,000の膜は通過するが10,000の膜は通過しない画分 (低分子蛋白画分) 50 μ lを定量的に調整した。

SDS-CZEは、Beckman社のeCAP™ SDS200キットを使用し、そのマニュアルにしたがって以下のように行った。髄液の低分子蛋白画分25 μ lに、キットのgel buffer 50 μ l, front markerである0.1%Orange G(OG) 5 μ l, 2-mercaptoethanol 2.5 μ l, 脱イオン水20 μ lを加え、95℃で5分間加熱し、冷却後、一定量そのmixtureを、47cm $\times$ 100 μ mのキャピラリーに60秒間注入し、14.1kVで20分間泳動して、214nmで検出した。

〔結果及び考察〕 Electropherogram上に検出されたいくつかのピークについて、キットの分子量マーカーの位置との比較及び標品との混合分析にもとづいて同定を進め、 β_2 -microglobulin (β MG, MW: 11,700), γ -trace protein (γ TP, MW: 12,300), myelin basic protein (MBP, MW: 18,000), β TP (MW: 23,000—30,000), α_1 -acid glycoprotein (α AGP, MW: 42,000) 等の存在が確認された。それらのうち、 β TPが最も濃度が高く、分子量的に不均一であり、分子量27,000を境に大きく2つのSubfractionに分かれ、そのうちの小さい方の主成分は大阪バイオサイエンス研究所においてProstaglandin D Synthaseとして精製された試料と一致した。又、 α AGPを含むブロードピークには、 α_1 -antitrypsin (α AT, MW: 45,000—55,000)の一部も含まれていると推定された。

同定された各ピークの成分について、OGを内部標準としてそれぞれのレベルを定量し、それらの変動と疾患との関連を検討した。 β TPは、脳血管障害、脳や髄膜の炎症、変性及び脱髄疾患、てんかん等の中枢神経系の器質性疾患においてその髄液レベルが非特異的に上昇し、特に脳梗塞、多発性硬化症等の脳組織に重大な障害を与える疾患で高値となった。そうした変動は髄液の総蛋白濃度の増加とは独立的であったが、Subfractionのレベルで見ると、総蛋白濃度が正常値なのに β TPが増加している場合は、分子量的に大きな方の割合が増えている傾向が見られた。MBPも、急性期の脳梗塞及び多発性硬化症の髄液濃度が上がっていたが、器質性疾患全体では β TPの場合ほど顕著な変動はなかった。 β MGと α_1 -globulin (α AGP+ α AT)の髄液中のレベルは、主として中枢神経系の炎症性疾患において上昇した。髄液中の γ TPは、他の低分子蛋白成分とは異なる動きを示し、脳血管障害患者の一部において低値を示した。

中枢神経系内の病態を反映する上記の変動を検出する上で、SDS-CZEは有用と思われる。

脳脊髄液 (CSF) 中 Prostaglandin D 合成酵素の キャピラリー電気泳動分析

丸山 敏彦^{1,2}、江口 直美³、織田 浩司⁴、入倉 大祐¹、裏出 良博¹、
早石 修¹

1 財大阪バイオサイエンス研究所、2 現、大塚電子 (株)、3 科学技術振興事業
団、4 マルハ中央研究所

Capillary Electrophoresis Analysis of

Prostaglandin D(PGD)Synthase in Cerebrospinal Fluid(CSF)

Maruyama T.(1)(2)*, Eguchi N.(3), Oda H (4), Irikura D.(1),
Urade Y.(1) and Hayaishi O.(1)

(1)Osaka Bioscience Institute, (2)*Present;Otsuka Electronics,
(3)PRESTO, Japan Science and Technology Corporation (4)Maruha
Reserch Center

We determined the PGD synthase small level in mouse, rat, and human CSF by Capillary Electrophoresis. We assessed the accuracy and reproducibility of separation of the enzyme in a small volume of CSF samples, under various conditions of electrophoresis and by several methods for CSF sample injection. And we investigated conditions of injection to get high sensitivity.

Introduction:

Prostagrandin D₂ は内因性の睡眠誘発物質であり、その合成酵素 (PGDS) が脳脊髄液 (CSF) 中の主要蛋白質として知られていた β -Trace と同一物質であることが最近明らかにされた。その遺伝子発現についても多種類の動物の各種臓器について調べられている。現在、この遺伝子のミュータントマウスが作成され睡眠との関係が調べられている。その研究において、変異マウスの CSF 中の PGDS を測定する必要がある。

CSF の PGDS の定量は従来酵素活性の測定や E L I Z A 法が用いられている。Human の場合数 ml 程度の試料を採取することができるが、Rat 等の小動物では当然採取量が少なくなり、Mouse の脳脊髄液については熟練者でも一匹から数 μ l しか採取することができない。従って、試料の前処理も含めて分析が困難である。

今回Human, Rat 及びMouseのCSF中のPGDSの定量及び分析法をキャピラリー電気泳動を用いて検討した。

Experiments & Results

PGDS 精製標準試料

Human: 脳脊髄液よりモノクローナル抗体カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した酵素 及び 大腸菌により発現したリコンビナント酵素

Rat : 大腸菌により発現したリコンビナント酵素

Mouse: 大腸菌により発現したリコンビナント酵素

キャピラリー電気泳動装置:

大塚電子株式会社製 CAPI-3100型 (スペクトル検出型システム)

キャピラリー:

大塚電子株式会社製 ポリアクリルアミドコーティングキャピラリー

内径 $75\ \mu\text{m}$ $\times$ 50cm or 60cm

泳動溶液: 50mM-Borax pH9.4

内表面がSilanolタイプのキャピラリーを用いHuman CSFを分析した場合、PGDSと他の成分とが近接し、分離が困難であった。しかし、内表面をポリアクリルアミドコーティングしたキャピラリーを用いることにより、CSFの前処理なしに容易にPGDSを他の成分から分離することができた。抗PGDSモノクローナル抗体カラムによりPGDSを除去したHuman CSFを同条件にて分析した場合、PGDSの泳動位置にはピークは検出されなかった。この結果からPGDS以外のピークはこの位置に存在しないと判断した。またモノクローナル抗体カラムにより精製したHuman PGDSと大腸菌を用いて発現させたりコンビナントHuman PGDSとの間には泳動時間の差は観察されなかった。同様の分析をRatとMouseのRecombinant PGDSについて行った。

試料注入には落差法(Gravity)を用いた。加圧法、減圧法、落差法を用いて微量の試料を注入する場合、注入量に誤差を生じることがある。そこで採取したCSFと同容量のTyrosine溶液を混合し、これを内部標準物質としてその注入量の補正をおこなった。この操作によりPGDSはさらに低濃度となったが、注入量を増大させることにより、ができるようになりCSF中の微量PGDSを正確に検出し分析することができるようになった。

微細藻類の電気泳動

大阪大学基礎工学部

平田雄志 ○山端景子 近藤寿子

ELECTROPHORESIS OF MICROALGAE

Yushi Hirata, Keiko Yamaberi, Hisako Kondo

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering Science,
Osaka University

This study examined the electrophoretic velocity of microalgae *Chlorella* using CE. Algal peak could be detected at two waves 210nm and 680nm. It was found that algal surface charge was negative and hardly changed between pH=4 and pH=9.

1. はじめに

一般に微細藻類の藻体表面は、細胞膜もしくは細胞壁の組成に従って荷電しているとされるが、実際に藻体の表面の荷電状態を調べた例は少ない。そこで、キャピラリー電気泳動により藻体の電気泳動速度を求め、電気浸透流速度と比較することにより、藻体表面の荷電状態の検討を行った。

2. 実験

微細藻類：*Chlorella pyrenoidosa* IAM C-212 (MBM培地にて培養) 本藻は細胞径4 μm 程度の淡水性緑藻である。

泳動液：75 mg/L K_2HPO_4 、175 mg/L KH_2PO_4 (MBM培地濃度) HCl、NaOHでpH調整

電気的中性物質：0.5 M glucose

泳動装置：日本分光890-CE、フューズドシリカキャピラリーチューブ (内径50 μm 、有効長50 cm、全長70 cm)

泳動条件：印加電圧14 kV (電流1~2 μA)、検出波長200nm (グルコース) 210nm、680nm (藻体)、落差法

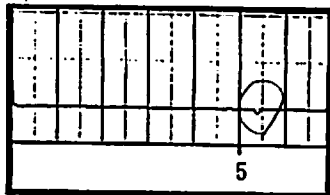
3. 結果及び考察

藻体の検出波長は吸収スペクトル分析においての最大ピークであった210nmを用いることで高感度分析が、またクロロフィルの吸収極大である680nmを用いるこ

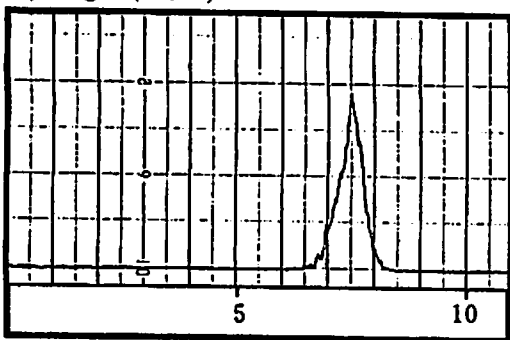
$\left\{ \begin{array}{l} \text{pH } 8 \sim 9 \text{ 藻体は負に帯電しているか} \\ \text{pH } 8 \sim 7 \text{ 藻体は正の電位を帯びているか} \end{array} \right.$

とで藻体の確認が可能と考えられる。pH=6における藻体の電気泳動図をFig. 1に示す。210nm、680nmの2波長において同じピークが得られ、このピークは藻体の泳動によるものとみなせる。電気浸透流速度と比較した結果、藻体は負に荷電し、また荷電状態に分布が存在することが認められた。藻体の荷電状態は、藻体表面の官能基等の解離に影響されると考えられ、pHを変化させることで電気泳動速度への影響を調べた。pH=4、9における電気泳動図をFig. 2に示す。pH=4においては藻体のキャピラリーへの吸着が激しく、正確なピーク位置を特定することは困難である。この原因としてはpH=4において電気浸透流速度が小さいこと、また藻体表面とキャピラリー内壁のシラノール基との電気的反発が小さくなった可能性が考えられる。pH=9において電気泳動速度がpH=6と同じであることより、pH=6において藻体表面の官能基が十分解離していると考えられる。

a) Glucose



b) Algae (210nm)



c) Algae (680nm)

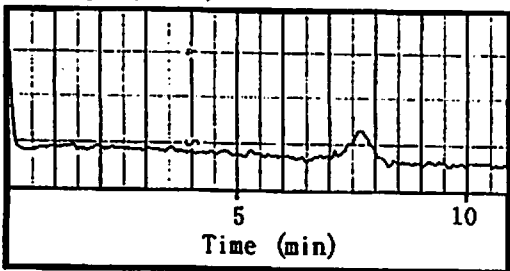


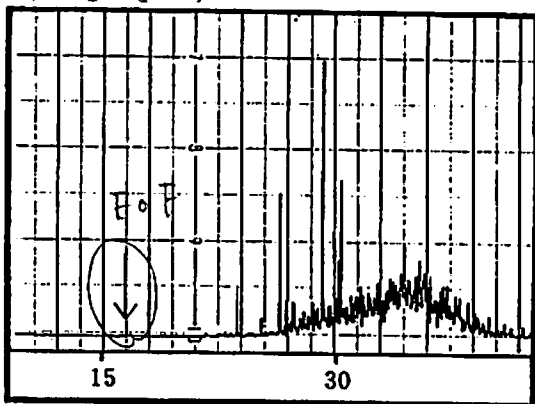
Fig. 1. Electropherogram at pH=6.

a) Glucose (200nm)

b) Algae (210nm)

c) Algae (680nm)

a) Algae (pH=4)



b) Algae (pH=9)

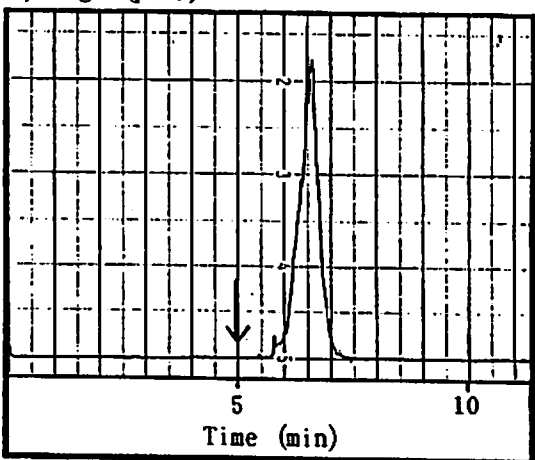


Fig. 2. Electropherogram at 210nm.

a) pH=4

b) pH=9

↓ Electroosmotic flow

血液分析への電場の応用（全血試料を用いた新たな迅速血液型検査）

野崎 修¹⁾, 北川慎也²⁾, 津田孝雄²⁾

所属：1)近畿大・医、2)名工大・工

Noble method of blood typing with hole blood specimen by cell capillary electrophoresis

Osamu Nozaki 1), Shinya Kitagawa²⁾, Takao Tsuda²⁾

1) Kinki Univ., School of Med., 2) Nagoya Institute of Tech.

The aim of this study was to enable blood typing with hole blood specimen (a few μL) by cell capillary electrophoresis. The red cells and blood typing antibodies in the hole blood specimen were separated in a fused-silica capillary tubing (50 μm i.d., 1.5 cm length) by both electrically pulling force for moving red cells and electric osmotic flow for moving antibody. Then the separated red cells or the antibodies of specimen reacted with test reagents of antibody (anti- A, -B antibody) or the test red cells (A-, B-type) in the capillary tube at room temperature, respectively. The time for capillary electrophoresis was about 3 min. Aggregation of red cells in the capillary tube was observed when types of antigen of red cells and antibodies were coincided. Aggregates of only a few number of red cells were observed with a microscope. It took a few minutes to test the blood typing, and was no need of preliminary separation and washing blood cells. In conclusion, this method enables blood typing with hole blood specimen by electric force and electric osmotic flow. This noble method is faster and more objective than the current method.

[目的] 細胞毛細管電気泳動法と電気浸透流を利用して、全血試料をそのまま用いたABO血液型判定を可能にする。

[方法] 1)原理：次の2つからなる。a)全血試料の分離：全血試料中赤血球と血液型抗体の分離：全血試料を毛細管の中に置く。直流電圧印可により、毛細管の中で赤血球（表面陰性荷電）は陽極側へ引かれ、血液型抗体は電気浸透流で陰極側に移動する。その結果、全血試料中赤血球と血液型抗体とは毛細管の中で分離する。b)毛細管内赤血球凝集反応：毛細管の中で分離した赤血球あるいは血液型抗体は、毛細管のもう一端から入ってくる検査用A/B型抗体あるいは指示A/B型血球と会合する。赤血球表面抗原と血液型抗体の種類が反応すれば、感作血球ができる。感作血球は、毛細管の中で凝集を生じる。この凝集の有無を顕微鏡-CCDカメラで観察・記録する。2)測定システム：2つの電解槽、fused-silica capillary tubing(ϕ 50 μ m, 長さ1.5 cm), 直流電圧安定化装置(70 V)、顕微鏡、CCDカメラ、ビデオモニター（ビデオテープにて記録）で構成した。

[結果] 本法でABO式血液型検査の表試験および裏試験を行い、従来法と一致する結果を得た。電気泳動時間は約3分/検体であった。被検血液量は、数 μ L(実質数nL)と現行法より格段に減量化できた。また、現行法で必要な検査前の血球と血漿の分離および血球洗浄操作は、不要であった。血球の特異凝集反応は、赤血球数個の単位で検出可能であった。血液型判定証拠をビデオテープに保存した。

[結論] 本法は、細胞毛細管電気泳動法により、毛細管の中で、全血試料中赤血球と血液型抗体の自動分離、およびABO血液型血球凝集反応を可能とした。現行法に比較して、本法は被検血液量（数 μ L）の減量、検査前血球分離・洗浄操作の不要、検査時間の短縮、血液型判定証拠の保存（ビデオテープ）を可能にした。

[文献] Manipulation of a single cell with microcapillary tubing based on its electrophoretic mobility. S.Kitagawa, C.Kawaura, O.Hashimoto, T.Takahashi, M.Naoi and T.Tsuda, Electrophoresis, 16, 1364-1368, 1995.