

キャピラリー電気泳動装置

—その仕組みと使いこなすための工夫—

新井悦郎

この度、2017年の入門講座として「分析機器の正しい使い方」を企画いたしました。

近年、各種分析装置の使い勝手がとてもよくなったことに加え、豊富なアプリケーション情報をインターネット経由で簡単に入手できるようになったことから、機器分析は多くの研究者にとってとても身近な存在になりました。一方、装置が使いやすくなるということは、測定原理等を理解していなくても装置が使えてしまうという怖さも潜んでいます。いわゆる、分析装置のブラックボックス化です。

そこで本講座では、機器分析の初心者の方や使用している分析装置について改めて勉強したい方を対象に、汎用される機器分析の原理や正しい使用方法について解説を行います。より有意義な研究・業務に役立てることを意図しております。実際に装置を使っている先生方ならではの具体的な内容となっておりますので、どうぞご期待ください。

なお、多方面の研究分野に活用されているHPLCについては事例を整理することが困難なため、今回項目としては取り上げませんでした。〔「ぶんせき」編集委員会〕

1 はじめに

1.1 キャピラリー電気泳動 (CE) 法の概要

キャピラリー電気泳動 (CE) 法は、内径 20~100 μm の溶解シリカキャピラリー管内に電解質を含む溶液を充填し、電気泳動を行う分離分析技術である。

平板ゲルではなく、極細のシリカ製キャピラリー管を泳動場として用いるこの方法では、最初はキャピラリー中に適当な (ポリマーを含まない) 緩衝液を充填したキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) 法、次いで界面活性剤添加により形成されたミセルへの分配を応用したミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) 法が普及した。その後、キャピラリー内に分子篩^{ふるい}効果を持つポリマー溶液を導入する技術が標準化され、高分子試料に特化したサイズセパレーション技術としてキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) 法、さらにタンパク質分析への対応の一環としてキャピラリー等電点電気泳動 (cIEF) 法が開発され、関連試薬キットも発売されて普及した。

分離後の検出 (cIEF法以外) は厳密には分離中の検出

Appropriate Usage of Analytical Instruments—Capillary Electrophoresis: Fundamentals and Handling.

となる) は、キャピラリー管の中途に設けられた検出窓において直接紫外/可視吸収変化、または蛍光強度変化をモニターする方法が採用され、泳動分離後の染色等の作業が不要となった。また泳動前のキャピラリー洗浄・泳動液の導入・試料導入は、複数のバイアルをキャピラリー両端にアクセスできる機構を用いることで自動化された。これらにより電気泳動法を完全自動化・標準化させることが可能となった。

1.2 キャピラリー電気泳動 (CE) 法の応用分野

(糖) タンパク質は電気泳動法による分離分析が適した試料であり、CE法も早い段階から応用された。その成果は現在革新的医薬品として注目されている IgG 抗体医薬品を中心とする生物製剤の開発・試験への応用に結実し、各国の薬局方にも取り入れられた。特に米国薬局方 (USP) では、最近、USP 39 Published General Chapter (129) Analytical Procedures for Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodiesとして IgG 抗体医薬品全般を対象とした分析手順が定められ、その中でも CGE 法による純度試験と糖鎖解析が盛り込まれている。

一方で、CZE/MEKC法は低分子の無機/有機イオン試料など幅広い分野で応用されている。また分子間インタラクション解析 (インタラクションする二つの物質の一方を泳動液に添加し、他方を泳動試料として電気泳動移動度の変化を考察する) などにも応用されている。

CE法については和文の解説書籍が出版されている^{1),2)}。またCE法の製薬開発における糖タンパク質分析に関しては、総論も発表されている³⁾。

2 キャピラリー電気泳動 (CE) 装置の機構の理解

CE法における分離はオープンチューブであるキャピラリー管において行われ、その内部での液体の移動はすべて圧力または電圧を介して制御される。したがって直接容積ベース (流速) で制御する液体クロマトグラフィー (HPLC) 法に比べると不安定な分析手法と受け取られがちな面もあるが、装置の仕組みと分離の原理を踏まえた上で適切な補正 (参照ピークや内部標準の利用) を盛

り込めば、不安定要因の多くはクリアすることができる。

泳動条件において泳動液組成は重要なポイントであるが、これは文献や目的に応じたアプリケーションキットの組成も利用できる。そこで本稿では、CE 装置の仕組みと泳動プログラムの概要について述べるとともに、泳動液などの泳動条件がある程度決まっていることを前提にして、分析プログラム設定上の注意・最適化の工夫・不安定要因への対応を装置のメンテナンスを含めて論じたい。

2・1 CE 装置の概要

泳動場として極細の熔融シリカ製キャピラリー管（毛细管）を用いる。この両端に電解液を入れたバイアルを宛てがう。バイアル中へはパワーサプライに接続された電極も同時に挿入し、この電極に電圧を印加することにより、キャピラリー内に電場を形成させ、電気泳動を行う（図1）。付帯設備として、キャピラリーの中途に設置する検出機構、オートサンプラーとしても機能するバイアル交換機構、キャピラリー温度制御機構、バイアル保冷（保温）機構、バイアルを介してキャピラリーへ作用する加圧（減圧）機構を伴い、制御及びデータ解析用ワークステーションが付属する。

2・1・1 キャピラリー

内径 50, 75 μm を中心として 20~100 μm のものが使用される。検出感度については内径が大きいほうが有利だが、小さいほうが泳動中のジュール熱発生を小さく抑えられるとともに、分離能も向上する。

長さは有効長（試料導入側末端から検出部まで）で 10~50 cm が多く、長い場合には 110 cm くらいのもので用いられる。有効長に対して全長とはキャピラリー両末端間の長さであり、泳動時の電位勾配の算出に必要である。

熔融シリカキャピラリー内壁は、シラノール基を有す

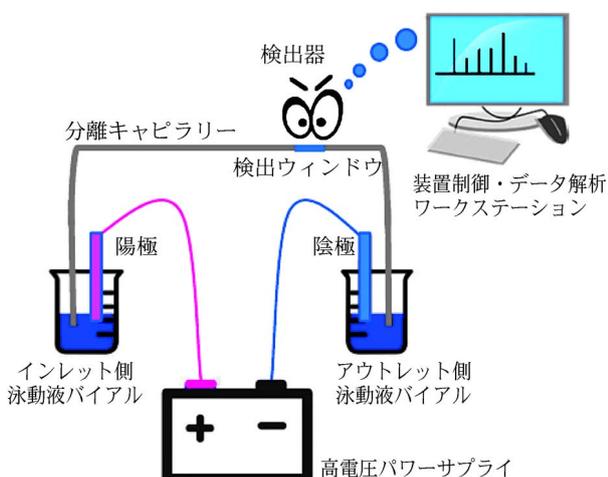


図1 キャピラリー電気泳動(CE)装置概要(泳動/検出部)

る。これが電解液（すなわち泳動液）と接触すると、陽イオンである水素イオンが解離し、内壁は負電荷を持つようになる。この電荷に基づいて、CZE 法・MEKC 法のほとんどの場合、陽極から陰極の方向へ電気浸透流が発生する。シラノール基の解離度合は電解液の組成・pH・イオン強度・試料成分の付着などに依存し、その結果、電気浸透流の流速が変化する。

内壁を化学コーティングしたキャピラリーも市販されている。中性ポリマーによりほとんど電荷を持たないようにコーティングされたもの、アミンを含むポリマーにより陽電荷を持つようにコーティングされたものなどがある。電気浸透流は前者では抑えられ、後者ではシリカキャピラリーと逆方向（陰極から陽極の方向）に発生する。高分子分析ではキャピラリー内壁と試料分子が電氣的に吸着し検出できなくなる場合があり、この回避にもコーティングキャピラリーが使用される。

2・1・2 キャピラリー温度制御機構

HPLC システムのカラムオープンに相当するが、泳動中、常にジュール熱が発生する電気泳動では、分離の場の温度上昇を抑制するだけでなく、その冷却効率によって泳動条件が制限される。送風等による冷却方式よりも液体冷媒方式の方が冷却効率が高く、より発熱する条件下でも泳動可能となる。

泳動中（すなわち発熱中）のキャピラリー内の温度を直接測定することは困難で、冷却媒体の設定温度をもってキャピラリー温度とし、泳動条件の一つとして表示している。

2・1・3 検出部

キャピラリーの適切な位置で外側のポリマー被膜を外し、紫外線/可視光線が透過できる検出ウィンドウを作成する。

HPLC 法では有機溶媒が汎用されることもあり、例えばタンパク質の検出波長は 280 nm 付近で設定されることが多い。一方、CZE 法では泳動液に有機溶媒を含まないケースが多く、タンパク質/ペプチドの検出波長には比吸光度の大きい 200 または 214 nm（ペプチド結合部分の吸収に由来する）などの低波長側がしばしば用いられる。

また、紫外線吸収を持たない無機/低分子有機物イオンの検出には、泳動液に吸収を持たせ測定対象物をネガティブピークとして検出する間接吸収法がしばしば用いられる。この場合、得られたデータは解析時に吸収変化軸（エレクトロフェログラムの縦軸）を反転させ、ポジティブピークとして表示・解析する。なお泳動液以上の吸収を持つ成分は、反転によりネガティブピークとして表示される。

蛍光検出法も CE 法で採用されている。キャピラリー

管の一部をそのまま検出セルとして使用し、励起光にはレーザービームが用いられ、レーザー誘導蛍光 (laser induced fluorescence, LIF) 検出法と称される。感度向上は誘導体化法にも依存するが、紫外可視吸光度による検出よりも通常 100 倍前後またはそれ以上である。また誘導体化された物質のみが検出され、検出選択性の向上 (すなわち見たいものだけが検出される) に貢献している。

2.1.4 バイアルアクセス/自動交換機構

バイアルトレイの動きにより、複数のバイアルがプログラムに従ってキャピラリー末端にアクセスできるようにした機構である。アクセスしたバイアルを介して密閉系を作り、ポンプによりキャピラリーに加圧及び減圧が加えられ、後述 (2.2.1) の Method (泳動 1 回分の条件設定プログラム) における洗浄・試料注入が行われる。

また電解液バイアルをアクセスさせ、その中に同時に高電圧電源に接続した電極を差し込むことにより、キャピラリーに電圧を印加し、後述の試料注入・分離を行う。必要に応じて電圧印加と加圧/減圧が同時に行える装置もある。

これらの機能で、キャピラリーへの電解液の導入・試料注入・泳動・泳動間のキャピラリー洗浄を自動プロセス化できる。またオートサンプラーとしても利用でき、自動連続分析が可能となる。

2.1.5 バイアル冷却 (保温) 機構

バイアルトレイの一部または全部が温度管理できる機構である。オートサンプラーで使用する場合には試料冷却 (保温) 機能として利用できる。なお、泳動電解液や洗浄液は組成によっては冷却で成分が沈殿する恐れがあるため、実用面では一部のバイアルのみを冷却 (保温) できる (すなわち残りのバイアルを室温に保てる) 機構が望ましい。特に、(糖) タンパク質の分析では試料溶液の冷却が必要な場合が多く、この機構がより重要となる。

2.2 泳動条件設定プログラム

CE 装置は通常アプリケーションソフトをコンピュータにインストールしたワークステーションにより、装置制御とデータ解析を行う。エービー・サイエックス社の CE システムでは、1 回の泳動条件を詳細に設定・制御するプログラム「Method」と、Method を組み合わせて連続分析を制御する「Sequence」により装置を制御する。

2.2.1 Method (泳動 1 回分の条件設定プログラム)

CE 法には、CZE 法・MEKC 法・CGE 法などの分離モードがあるが、これらは主にキャピラリーに充填した泳動液の組成により分類される (応用面から見れば分離したい測定物間で電気泳動移動度が十分異なれば良く、各モードではそのために泳動液の組成を変えている)。従ってどの分離モードでも装置の基本的な動作は同じで、試料及び泳動液に合わせて印加電圧・極性の向き・各ステップの時間・検出波長等を変えているだけであり、用いられる Method (図 2) の基本構成も同様である。その中で使われている動作機能のうち、重要なものを列記する (ただし cIEF 法は分離のメカニズムが他のモードと大きく異なるため、別のプログラムが必要となる)。

2.2.1.1 洗浄 (Rinse)

キャピラリーの洗浄に主に使用されるのでこの名称で呼ばれるが、装置の機構上は加圧 (または減圧) によりキャピラリー内の溶液を置き換える機能である。泳動前後のキャピラリー洗浄 (再生) や泳動液をキャピラリー内に充填するために使用される。

2.2.1.2 試料注入 (Injection)

泳動試料をキャピラリー末端に注入する機能である。試料バイアルをキャピラリーにアクセスさせた状態で、加圧 (または減圧) により試料溶液の一部を物理的に導入する方法と、電圧をかけることで試料溶液中のイオン成分を電気的に導入する方法がある。後者は注入過程に

| | Time (min) | Event | Value | Duration | Inlet vial | Outlet vial | Summary | Comments |
|---|------------|--------------------|----------|-----------|------------|-------------|--------------------------------|------------------|
| 1 | | Rinse - Pressure | 20.0 psi | 0.50 min | BI:D1 | BO:B1 | forward | NaOH rinse |
| 2 | | Rinse - Pressure | 20.0 psi | 0.50 min | BI:E1 | BO:B1 | forward | dd water rinse |
| 3 | | Rinse - Pressure | 20.0 psi | 1.00 min | BI:B1 | BO:B1 | forward | buffer rinse |
| 4 | | Inject - Pressure | 9.0 psi | 9.0 sec | SI:A1 | BO:A1 | Override, forward | sample injection |
| 5 | | Wait | | 0.00 min | BI:A1 | BO:A1 | | capillary rinse |
| 6 | 0.00 | Separate - Voltage | 30.0 KV | 10.00 min | BI:C1 | BO:C1 | 0.17 Min ramp, normal polarity | separation |
| 7 | 0.50 | Autozero | | | | | | autozero |
| 8 | | | | | | | | |

各動作機能 (Event) が時系列で、圧力 / 電圧値・作動時間・使用バイアルポジションなどとともに示されている。左端列 1 ~ 3 : 洗浄 (Rinse) 部分, 4, 5 : 試料注入 (Injection) 関連部分, 6, 7 : 分離 (Separation) 関連部分

図 2 Method の例 (制御ソフトウェアの表示画面)

において物質が選択されるため、CZE法・MEKC法では前者が中心である。一方でCGE法ではポリマーを含む泳動液の粘度が高いため、後者が主に用いられる。

2・2・1・3 分離 (Separation)

注入した試料を泳動・分離する最も重要な機能である。装置の機構上は、キャピラリーに電圧を印加する機能と言える。電圧/電流を一定に印加する方法のほか、グラジエントを形成させるやり方もある。また、電圧と圧力を同時に加えることもある。

この機能を作動させる時間が正味の泳動時間となる。

基本的な Method (図2) は以上三つの動作機能から構成され、洗浄については複数の洗浄液の使用、泳動液の充填のための複数のステップが組み込まれるのが普通である。このほかに検出波長 (2・1・3 参照) やキャピラリーの温度設定 (2・1・2 参照) を行うが、通常これらは分析中一定に保つだけなので、その数値をあらかじめ所定の画面に入力しておく。

3 キャピラリー電気泳動 (CE) 法を使いこなすために

CE装置を使い始める場合には、いろいろな状況が考えられる。適切に設定された既存泳動条件 (市販のアプリケーションキットを使用する場合も含む) の Method をそのまま応用する場合、文献等を参考に Method を設定する場合、必要に応じて Method の最適化を行う場合などである。以下、それぞれの場合の注意点を列記したい。なお CE 装置がキャピラリーに直接行う動作は、電圧印加と加圧 (または減圧) である。問題が発生した時はその原因がどちらの動作に関連するかを、切り分けて考えると効果的であろう。

3・1 既存泳動条件の Method をそのまま応用する場合

この場合は Method がそのままコピーされているとともに、キャピラリー・バイアル配置が指定どおりであれば正常に分析できるはずであるが、それでも不適切なメンテナンスや操作ミスに基づく問題が考えられる。この場合の対応をトラブルシューティングの形で表1にまとめたので参照されたい。

市販アプリケーションキット使用の場合は、それぞれに特有の問題事象を考慮したトラブルシューティングリストが添えられている場合が多いので、併せて参照されたい。特に高粘度ゲル泳動液を用いる CGE 法や、分離原理が他の泳動モードと異なる cIEF 法は、それぞれかなり特異的な問題が発生する可能性があるため、泳動原理の理解と合せて参照されると良い。

3・1・1 メンテナンスにおける重要事項

第一に電極およびその周辺のバイアルアクセス部分を清浄に保つことである。この部分は CE 装置本体において唯一泳動液や試料溶液が直接接触する部分で、特に汚れやすい。同時に本体から電圧及び加圧 (減圧) の作用をキャピラリーに受け渡す重要な部分である。

電解液が付着したままだと電圧印加時に電流がリークし、分離ステップ開始時に電流が流れない、または流れても不安定もしくは低くなるなどの症状が現れる。さらに結晶や異物の付着によって、この部分とバイアルとの圧着 (バイアルキャップなどのゴム系部品を介する場合が多い) が不完全になると、密閉系が作れず圧力がリークし、洗浄不良や試料注入量の精度の低下につながる。

使用 CE 装置のバイアルアクセス機構を理解し、汚れやすい部分を特定し、定期的に清掃することが重要である。関連部品が本体から簡単に外せるなら直接純水につけて超音波洗浄し、その後十分濯ぐのが簡便で効果的である。清掃/洗浄後は十分乾燥させ、本体にセットし泳動を再開する。

3・2 文献等を参考に Method を設定する場合

文献や装置メーカーの資料に基づいて泳動条件を設定する機会は、新しい分析を始める場合には特に多い。市販されている CE 装置は前述の各機構を一通り盛り込んだ一体型であり、そのため参考文献と異なる装置を使用する場合には、いくつかの変更が必要となる。これは市販アプリケーションキットの使用においてそのキットの想定と異なる装置を使用する場合も同様である。

3・2・1 キャピラリー長

キャピラリー有効長を合わせる。その結果として使用装置の構造によっては、キャピラリー全長に違いを生じる場合がある。

3・2・2 分離における電圧設定

キャピラリー単位長さあたりの電圧 (V/cm) を合わせるのが原則である。従って全長が異なる場合は比例計算で調整する。

3・2・3 洗浄における圧力/時間設定

キャピラリー長及び内径が変わった場合は、中の液体移動の抵抗が変わるため、同じ圧力では液体の移動速度が変わる。従ってキャピラリー全長が伸びる場合には洗浄時間延長/圧力増大の調整が必要となる場合がある。

3・2・4 泳動温度

前述 (2・1・2) のようにこのパラメーターはキャピラリー温度制御における冷媒の設定温度で代用され、泳動中のキャピラリー内の実際の温度ではない。実際の温度

表1 トラブルシューティング

| 問題事象 | 考えられる原因 | 一般的な対応方法 | |
|---|-----------------------------|------------------------------------|--|
| 洗浄/試料注入時に圧力が掛からない | バイアル及びバイアルキャップが正しくセットされていない | バイアル・バイアルキャップをチェック | |
| | 指定ポジションにバイアルが置かれていない | バイアルセットポジションをチェック | |
| | バイアルアクセス部の汚れ・異物 | 密閉系形成のための接触部分を清掃 | |
| | バイアルキャップの汚れ・異物 | バイアルキャップをチェック、必要に応じて清掃/交換 | |
| 分離または試料注入時に電圧がかからない、もしくは電流が流れない/分離の途中で電流が流れなくなるまたは不安定 | キャピラリーの破損/詰まり | 加圧により液の導入をチェック、必要に応じて洗浄/交換 | |
| | 泳動液の充填不良 | 当該バイアル液量をチェック、必要に応じて補充 | |
| | 過大電流による発熱、気泡発生 | 泳動液の変更、キャピラリーを細くする | |
| | 電極の異常 | 電極のセット状況をチェック、必要に応じて調整/交換 | |
| | 電極周辺部の汚れによる電流漏れ | 電極周辺部の清掃/調整 | |
| | バイアルキャップの汚れによる電流漏れ | バイアルキャップを交換 | |
| | 低イオン濃度試料溶液の過大量加圧注入 | 試料注入量の減少/試料溶液に泳動液を適宜添加 | |
| | 実験室の相対湿度が高いことによる結露 | 泳動条件（キャピラリー温度、試料冷却温度）に合わせて、湿度を下げる。 | |
| ノイズレベルが高い/ピークが小さい/オートゼロが機能しない | ランプのエネルギー低下 | ランプの使用時間チェック、必要に応じて交換 | |
| | キャピラリー検出窓が検出部から外れている | キャピラリー検出窓の位置を調整 | |
| | キャピラリー検出窓の汚れ | 検出窓部分をメタノールで湿らせたワイプで拭取り清掃 | |
| | 泳動液充填不良により検出部の吸収/屈折が大きいの | 泳動液充填の洗浄時間を延長 | |
| | 検出部の透過光測定部もしくは取込部の汚れ | 該当部分を清掃 | |
| 安定な電流値で泳動されたにもかかわらず、ピークが出ない/小さい | 加圧試料注入に関連する原因 | 指定ポジションに当該試料溶液バイアルが置かれていない | 試料溶液バイアルセットポジションをチェック |
| | | 試料溶液量が少ない | 試料溶液を追加 |
| | | 試料溶液バイアル及びバイアルキャップが正しくセットされていない | バイアル・バイアルキャップをチェック |
| | | 試料溶液バイアル中の気泡 | 気泡を除去 |
| | 電氣的試料注入に関連する原因 | 試料溶液濃度が低すぎる | 高濃度の試料溶液を注入して再泳動 |
| | | 指定ポジションに当該試料溶液バイアルが置かれていない | 試料溶液バイアルセットポジションをチェック |
| | | 試料溶液の塩濃度が高い | 塩濃度を下げる方向へ調整（脱塩処理など） |
| | | 電極周辺部の汚れによる電流漏れ | 電極周辺部の清掃/調整 |
| | | 試料溶液バイアルキャップの汚れによる電流漏れ | 当該バイアルキャップを交換 |
| | | 試料注入時の電極の極性が逆 | 適正な極性に修正 |
| | その他 | 電極とキャピラリー末端双方が試料溶液に届いていない | 試料溶液量を増やすなどの調整 |
| | | 分離時の電極の極性が逆 | 適正な極性に修正 |
| | | キャピラリー検出窓の汚れ | 検出窓部分をメタノールで湿らせたワイプで拭取り清掃 |
| | | 測定波長が正しく設定されていない | 波長を確認の上、設定条件を修正 |
| | | 他条件で使用したキャピラリーを使用 | キャピラリーを交換（キャピラリー内壁に以前の泳動液/試料溶液成分が付着し、電気浸透流の流速/方向が変化している場合がある。） |

は発熱と冷却のバランスが平衡した状態で決まるので、設定温度との差は使用する CE 装置のキャピラリー冷却効率で決まる。従って冷却効率の高い装置で設定温度を上げると、効率の低い装置と同等の性能となる場合が多い。

3・2・5 検出波長設定

基本的に文献の波長をそのまま設定する。
 なお、フォトダイオードアレイ検出器での間接吸収法では、測定波長と参照波長を入れ換えて設定（すなわち参照波長での吸収変化を基にピークを検出）している場

合があり、注意を要する。

3・3 最適化を行うにあたって

分離向上や測定対象物間の濃度比が大きい場合の対応において、泳動液の最適化は重要課題であり、pH・各成分の濃度の変更を試みることになる。しかしここではこれ以外の対応について、泳動自体の安定化も踏まえて参考になる情報を提示したい。

3・3・1 キャピラリーの変更

長いほど分離は向上するが、同時に分析時間が延びる。印加できる最高電圧は装置により決まっており、これにまだ余裕があればキャピラリーの長さ按比例させて電圧を増加させる。すでに最高電圧の場合、電位勾配が緩くなりキャピラリーを延長した比率の二乗に比例して分析時間が延びることになる。

分離向上にはキャピラリー内径を細くするのも一案である。泳動時の発熱は断面積に比例（すなわち内径の二乗に比例）するので、細いほど実際の泳動場の温度は低くなり、これも分離向上に寄与する場合がある。同時に安定面でも細いほうが、温度が低い分優位であるが、あまり細いと洗浄効率が悪くなる。逆にキャピラリー内径を太くする場合は、断面積に比例して発熱が増える点を考慮すべきである。

高分子試料の泳動では試料分子が陽電荷を帯びている場合、キャピラリー内壁の陰電荷と電氣的吸着を起こし、ピークがブロードになる・または検出されない場合がある。泳動液のpHを変えて回避しても目的の分離が得られない場合は、コーティングキャピラリーの利用を考えることになる。

3・3・2 キャピラリーの洗浄

電気浸透流が発生している泳動条件では、泳動液との平衡化度合いや試料の吸着によりキャピラリー内壁の状態が変化すると、浸透流速が変わり検出時間が不安定になる。これを回避するためには、泳動毎の洗浄条件の最適化が重要である。

逆説的だが、泳動液中の成分の一部がキャピラリー内壁に吸着・平衡化することで分離が最適化されている条件では、試料の影響が無ければ泳動液だけを置換する（すなわち泳動液以外の液をキャピラリーに通さない）のが効果的な場合が多い。これで安定しない場合には、洗浄液を考える必要がある。

シリカキャピラリーではアルカリ・酸・有機溶媒（水と混合可能なもの）のいずれもが使用でき、組み合わせで最適化されている場合も多い。一方でコーティングキャピラリーでは使用可能な液が限定される場合がある（多くの場合、高いpHの溶液は使用不可）。

いずれの場合も洗浄段階の最後は泳動液の充填となる

が、一部成分の吸着・平衡化が必要な場合は、そのための時間を設定する必要がある。キャピラリー内を通過する液量は洗浄時間と圧力値の積となるが、このような場合には液量の議論だけではなく、相応の時間を掛けることも必要となる。

市販アプリケーションキットでは、泳動液の他にキャピラリー内壁の平衡化用溶液がコーティング液などの名称で含まれている場合がある。通常は最適化されたMethod内容も一緒に提供されるが、各溶液の役割を把握しておくことも重要である。

なおこのような工夫が加えられている場合は、コーティング成分は常にある程度はキャピラリー内壁に残ったままになるので、そのキャピラリーを他の泳動条件に使用できないと考えるべきである。

3・3・3 洗浄における圧力/時間設定

前述（3・2・3）のように、キャピラリー全長または内径が変わった場合は、中の液体移動の抵抗が変わるので、キャピラリーを長く/細くした場合は、時間の延長/圧力の増大が必要となる場合がある。

同様に泳動液の変更にともない粘度が増大する場合も、洗浄時間の延長/圧力の増大を考慮する。

特に試料注入直前の、キャピラリーへの泳動液充填のための洗浄プロセスが不十分な場合は、泳動系が不均一になり分離プロセスにおいて電流が流れない、または電流値の継続的増加（または減少）を含む不安定状態が観察される場合がある。当然検出時間も不安定になる。

3・3・4 泳動温度

前述（2・1・2）のようにこのパラメーターはキャピラリー温度制御における冷媒の設定温度で代用されており、CE装置間での冷却効率の違いを考慮すべきである（3・2・4参照）。

イオンの解離は温度依存的であり、またMEKC法におけるミセルへの分配も温度に依存することから、実際の泳動温度が異なると分離が大きく変わる場合がある。場合によっては検出順序が逆転する。従って異なるCE装置間での条件の移行では、温度を変えながら分離パターンを観察し、条件設定することが必要な場合がある。

なお条件移行以外でも温度は最適分離を得るのに重要なファクターであり、検討時は設定値の $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 程度のデータも取得しておくことをお奨めする。また一般則として低温のほうが泳動液の粘度が高くなることからより良好な分離が得られる場合が多く、その点は冷却効率の高い装置が優位となる。

3・3・5 検出波長

測定対象物の組み合わせによっては、参照文献の設定が最適とは限らない。特に間接吸収法による検出では泳

動液の吸収とのバランスで各測定物の最適検出波長が変わるので、文献値周辺の別の波長の方が高感度になる場合もある。使用装置で設定できる周辺の波長を一通り試すことが推奨される。

3.3.6 低分子イオンのピーク形状

CE法においては無機イオンなど低分子イオンのピークは、図3のように左右非対称の三角定規を立てたような形状になることが多い。このようなピークは濃度の増加に伴い、図4のように斜辺が延長される形でピーク面積が増加する。従ってピークトップの時間がずれる。移動（検出）時間の安定性を評価する場合はこのことを考慮する必要がある。

また隣接するピークにおいて、斜辺側のピークが高濃度になるともう一方のピークにかぶさるので、注意が必要である。

3.3.7 参照ピーク/内部標準の利用

泳動液の組成を一律管理し、試料成分の電気泳動度を安定させても、電気浸透流速が影響するCE法においては移動（検出）時間に不安定さが残る場合は多い。この場合、不安定とは言っても各ピークの検出時間は多くの場合一定の割合で変化しており、参照（reference）ピークを用意してそれに対する相対移動（検出）時間で管理できる。参照ピークとしては、当該分析系において必ず検出される成分があるなら、それをを用いることもできる。

同様に、加圧による試料注入量が容積の直接制御ではなく圧力と加圧時間の積で制御されるCE法では、実際の注入量は試料溶液の粘度なども関連し、不均一になる場合もある。この場合でも注入される各成分の比率は一定なので、内部標準を添加することで安定性・再現性を向上させることができる。

参照ピークと内部標準は同一物質に兼ねさせることができ、汎用性向上の面では有益な方法である。

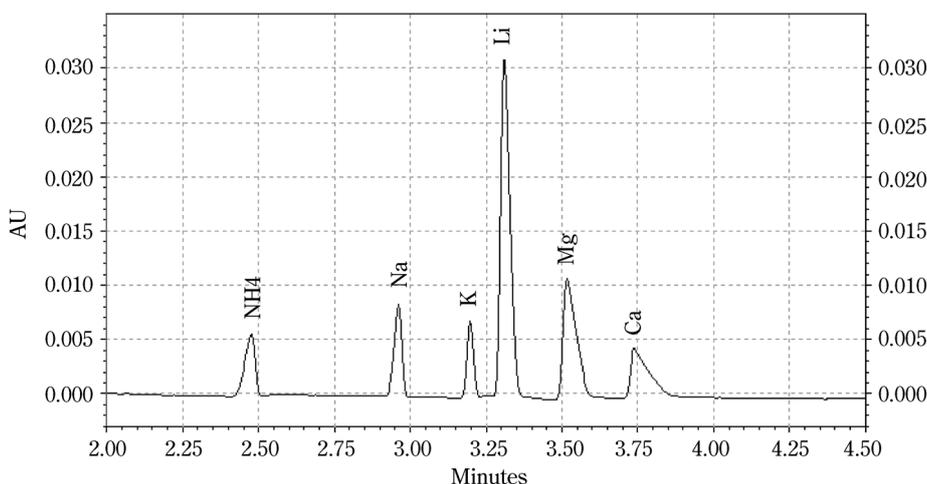


図3 低分子イオン分析例（無機陽イオンの分析結果を示す）

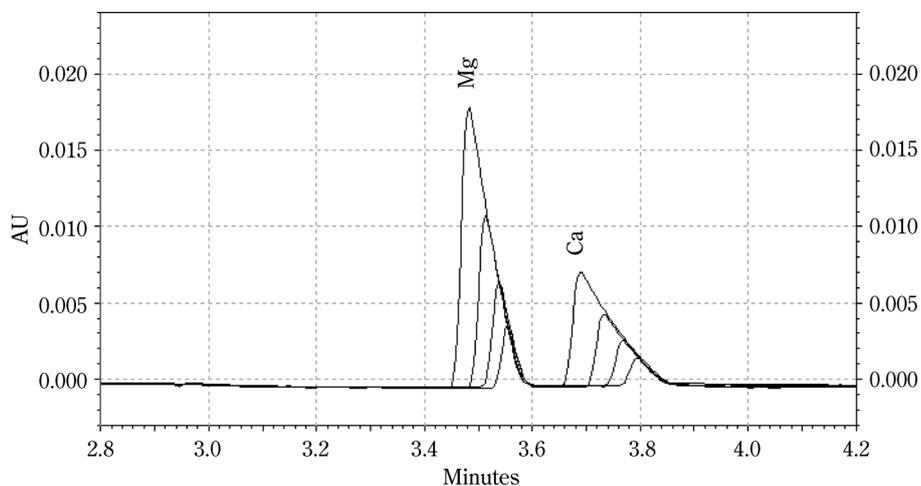


図4 低分子イオンピークにおける濃度変化（図3のMg、Caについて5、10、20、40 ppmの結果を重ねて表示した）

4 おわりに

昨今 CE 法の応用にも^{ひろ}拡がりが見られ、指定泳動条件で指定試料の分析を行うことだけが目的のユーザも増えている。しかし、いかなる文献・プロトコルにも記載されつくしていない詳細部分はあるもので、その点を踏まえていない故に分析がうまく進まないこともある。本稿では、そのような詳細部分を列記してみた。ご参考にしていただければ幸いです。

文 献

- 1) 本田 進, 寺部 茂編: “キャピラリー電気泳動—基礎と実

際—”, (1995), (講談社).

- 2) 北川文彦, 大塚浩二: “分析化学実技シリーズ 機器分析編・11 電気泳動分析”, (2010), (共立出版).

- 3) S. Kamoda, K. Kakehi: *Electrophoresis*, **27**, 2495 (2006).



新井悦郎 (Etsuro ARAI)

(株)エービー・サイエックス セパレーション事業部 (〒140-0001 東京都品川区北品川 4-7-35)

E-mail: etsuo.arai@sciex.com

日本分析化学会研究懇談会の御案内

日本分析化学会の研究懇談会に入会御希望の方は下記に照会ください。

- ① ガスクロマトグラフィー研究懇談会
- ② 高分子分析研究懇談会
- ③ X線分析研究懇談会
- ④ 液体クロマトグラフィー研究懇談会
- ⑤ 分析試薬研究懇談会 (旧有機試薬研究懇談会)
- ⑥ 有機微量分析研究懇談会
- ⑦ 溶液界面研究懇談会 (旧非水溶媒研究懇談会)
- ⑧ 化学センサー研究懇談会
- ⑨ 電気泳動分析研究懇談会
- ⑩ イオンクロマトグラフィー研究懇談会
- ⑪ フローインジェクション分析研究懇談会
- ⑫ 環境分析研究懇談会
- ⑬ 表示・起源分析技術研究懇談会
- ⑭ 熱分析研究懇談会
- ⑮ レアメタル分析研究懇談会
- ⑯ 溶液反応化学研究懇談会
- ⑰ 受託分析研究懇談会

◇照会先

- ①②④: 〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2 五反田サンハイツ 304 号 (公社)日本分析化学会 [電話: 03-3490-3351, E-mail: kondankai-hp@jsac.or.jp]
- ③: 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138 大阪市立大学大学院工学研究科 辻 幸一 [電話・FAX: 06-6605-3080, E-mail: tsuji@a-chem.eng.osaka-cu.ac.jp]
- ⑤: 〒812-8581 福岡市西区元岡 744 九州大学大学院工学研究府応用化学部門 (分子) 片山佳樹 [電話: 092-802-2850, E-mail: ykatatcm@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp]
- ⑥: 〒192-0397 東京都八王子市南大沢 1-1 首都大学東京大学院都市環境科学研究科分子応用化学域内 内山一美 [電話: 042-677-2835, FAX: 042-677-2821, E-mail: uchiyama-katsumi@tmu.ac.jp]
- ⑦: 〒560-0043 豊中市待兼山町 1-1 大阪大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室 塚原 聡

[電話: 06-6850-5411, E-mail: sxt@chem.sci.osaka-u.ac.jp]

- ⑧: 〒223-8522 横浜市港北区日吉 3-14-1 慶應義塾大学理工学部応用化学科分析化学研究室 鈴木孝治 [電話: 045-566-1568, E-mail: suzuki@applc.keio.ac.jp]

- ⑨: 〒501-1196 岐阜市大学西 1-25-4 岐阜薬科大学機能分子学大講座薬品分析化学研究室 江坂幸宏 [電話: 058-230-8100 (内線 3640), E-mail: esaka@gifu-pu.ac.jp]

- ⑩: 〒739-2116 広島県東広島市高屋うめの辺 1 近畿大学工学部 伊藤一明 [電話: 082-434-7000 (内線) 328, E-mail: itok@hiro.kindai.ac.jp]

- ⑪: 〒819-0395 福岡市西区元岡 744 番地 九州大学大学院工学研究院応用化学部門 石松亮一 [電話: 092-802-2891, FAX: 092-802-2889]

- ⑫: 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1 群馬大学大学院工学研究科 角田欣一 [電話: 0277-30-1254, E-mail: tsunoda@gunma-u.ac.jp]

- ⑬: 〒120-8551 東京都足立区千住旭町 5 東京電機大学工学部環境化学科内 保倉明子 [電話: 03-5284-5445, E-mail: hokura@mail.dendai.ac.jp]

- ⑭: 〒305-8563 つくば市梅園 1-1-1 中央第3 (国)産業技術総合研究所内 津越敬寿 [電話: 029-861-4023, E-mail: tsugoshi.takahisa@aist.go.jp]

- ⑮: 〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2 五反田サンハイツ 304 (公社)日本分析化学会事務局 [E-mail: rare_metals@jsac.or.jp]

- ⑯: 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1 福岡大学理学部化学科内 山口敏男 [E-mail: yamaguch@fukuoka-u.ac.jp]

- ⑰: 〒105-0012 東京都港区芝大門 2-4-6 豊国ビル 1F (一財)日本冷凍食品検査協会 中田邦彦 [電話: 03-3438-2811, E-mail: k_nakata@jffc.or.jp]