

第10回キャピラリー電気泳動シンポジウム

講演要旨集

主催 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会
共催 日本化学会、日本薬学会、日本生化学会、日本農芸化学会
電気泳動学会

日時 平成2年12月13日(木)～14日(金)
会場 近畿大学11月ホール

プログラム

第10回キャピラリー電気泳動シンポジウム

1990年12月13-14日、近畿大学

プログラム

第1日(12月13日)

10:00-10:30 開会講演

キャピラリー電気泳動シンポジウム10年の歩みと将来への展望
(東京都立大・理) 奥山典生

10:30-12:00 セッション I-1 (等速電気泳動 I)

- 1 等速電気泳動法による木材保存処理剤の分析
(島津製作所・応用技術部¹、京都大・木材研²) ○児島佳世子¹、石原茂久²
- 2 等速電気泳動の法科学的応用 - 繊維からの抽出色素の分離分析 -
(大阪府警・科捜研¹、大阪府産技総研²) ○小野広孝¹、蔵本暢浩²
- 3 細管式等速電気泳動法によるリン酸イオンおよびコラーゲン共存中のカルシウムイオンの定量
(兵庫工技センター¹、神戸大・教養²、神戸大・工³) ○松下啓¹、本岡達²、金治幸雄³、杉田正見¹
- 4 細管式等速電気泳動法の医薬品分析への応用 (第15報) 無水フタル酸を誘導体化試薬とするエタノールの分析
(徳島文理大・薬) 石井淳一、泉井理、○赤松聖子、亀山道生、赤田良信
- 5 キャピラリー電気泳動における第VIII族金属イオンの分離挙動
(広島大・工) ○伊集院旭彦、広川健、西山文隆、木曾義之
- 6 ニホンウズラの卵白・卵黄ならびに血清蛋白質の各種電気泳動法による観察
(専修大) ○吉田治弘

13:00-14:00 セッション I-2 (等速電気泳動 II)

- 7 キャピラリー等速電気泳動法による分離時間算出の高速化と分離最適化への応用
(広島大・工) ○広川健、胡建英、木曾義之
- 8 キャピラリー電気泳動法によるイオン移動度、解離定数の算出
(広島大・工¹、カレル大・理²) ○渡辺和彦¹、中西謙治¹、広川健¹、木曾義之¹、Bohuslav Gas²、Jiri Vacik²
- 9 キャピラリー電気泳動における微量成分分離の問題点
(広島大・工) ○大森昭浩、広川健、木曾義之
- 10 高レベル燃料再処理廃液 (FP) 中有効元素の電気泳動的回収の可能性
(広島大・工) ○木曾義之、広川健、西山文隆、胡建英、吉田智、上田美喜

14:00-14:45 特別講演 I

DNA Sequencing and Restriction Fragments Separations in Gel Capillary Electrophoresis

(Barnett Inst., Northeastern Univ.) Aharon S. Cohen

15:00-16:15 セッション I-3 (ゾーン電気泳動 I)

- 11 大きな長方形断面のキャピラリーカラムを用いた電気泳動
(名古屋工大¹、スタンフォード大・化²) ○津田孝雄¹、Jonathan V. Sweedler²、Richard N. Zare²
- 12 キャピラリーエレクトロクロマトグラフィーにおける試料注入法
(医理化機器¹、国際解析研²) ○安部喬¹、鶴田久生¹、花井俊彦²
- 13 キャピラリー電気泳動における試料成分の定量法
(ベックマン) ○船串佳世、町田明子、佐藤隆
- 14 キャピラリー電気泳動における試料中の塩のペプチド分離に及ぼす影響
(ベックマン) ○町田明子、船串佳世、佐藤隆
- 15 無機イオンキャピラリー電気泳動 一陰イオン分析について陽イオン界面活性剤を用いた逆電気浸透流の有用性とその応用一
(ミリポアコーポレート・ウオーターズクロマトグラフィー事業部¹、日本ミリポア・ウオーターズクロマトグラフィー事業部²) Bill Jones¹、○酒井恒行²

16:25-17:25 セッション I-4 (ゾーン電気泳動 II)

- 16 キャピラリーゾーン電気泳動によるイオン性農薬の分析について
(川崎医大・法医¹、生化センター²) ○富田正文¹、奥山敏子¹、児子弥生²
- 17 キャピラリー電気泳動法によるビタミンB₆群の分析
(日本分光・技術研¹、慈恵医大・医科研²) ○黒須泰行¹、栗岡晋²
- 18 高性能キャピラリー電気泳動による薬物代謝物の分析
(近畿大・薬¹、藤沢薬品・物性研²) 本田進¹、○多賀淳¹、掛樋一晃¹、岡本芳彦²
- 19 シクロデキストリン誘導体を用いるキャピラリーゾーン電気泳動による光学異性体の分離
(大阪大・工¹、大阪工大²) ○浅野哲¹、田中稔¹、庄野利之²

第2日(12月14日)

9:30-10:30 セッション II-1 (種々の電気泳動)

- 20 電気クロマトグラフィー
(名古屋工大) ○津田孝雄
- 21 タンパク質の2次元ゲル電気泳動法
(姫路工大・理) ○眞鍋敬、寺部茂
- 22 無担体電気泳動による線虫の染色体の分離
(東京都立大・理¹、城西大・理²、東海大・医³) ○高島宗彦¹、小林英三郎²、石井直明³、奥山典生¹
- 23 キャピラリー等電点電気泳動によるヒトポリクローナル Ig G の分離 (日本バイオラッド・ラボラトリーズ¹、東京都立大・理²) ○長堀崇重¹、泉友則²、奥山典生²

10:45-12:30 セッション II-2 (ゾーン電気泳動 III)

- 24 キャピラリー電気泳動によるヒトポリクローナル Ig G の解析
(東京都立大・理¹、日本バイオラッド・ラボラトリーズ²) ○泉友則¹、長堀崇重²、高橋郁子¹、奥山典生¹
- 25 キャピラリー電気泳動の光化学系複合タンパク質分析への応用
(日本分光・LC事業部¹、埼玉大・理²) ○千田正昭¹、佐々木徹¹、檜山哲夫²
- 26 新しい電氣的コーティング法を用いた塩基性タンパク質の自由溶液キャピラリー電気泳動
(アブライド・バイオシステムズ・ジャパン¹、アブライド・バイオシステムズ²)
○田中博¹、山田泰子¹、小畑義充¹、喜古あかね¹、銭場俊彦¹、John E. Wiktorowicz²、Joel C. Colburn²

- 27 キャピラリー電気泳動によるカルシウム結合タンパク質等の分析
(農水省・農生資研) ○梶原英之
- 28 高性能キャピラリーゾーン電気泳動による糖鎖-タンパク質結合定数の測定
(近畿大・薬) ○本田進、多賀淳、鈴木健司
- 29 疎水性相互作用キャピラリー電気泳動によるペプチドマッピング
(アブライド・バイオシステムズ・ジャパン¹、アブライド・バイオシステムズ²)
○神戸敏江¹、萩原佳代子¹、銭場俊彦¹、田中博¹、Stephen E. Morning²、
Judith A. Nolan²
- 30 キャピラリー電気泳動による生体高分子及びバイオオリゴマーの分離
(神戸女子薬大¹、アブライド・バイオシステムズ・ジャパン²、アブライド・バイオシステムズ³) ○馬場嘉信¹、津波古充朝¹、榎本滋²、A. M. Chin³、R. S. Dubrow³

13:30-14:45 セッション II-3 (ゾーン電気泳動 IV)

- 31 キャピラリーゾーン電気泳動による脳内ヌクレオチドの分析
(国立精神・神経センター) ○今澤正興、斎藤智子
- 32 タンパク質及びDNAのキャピラリーゲル電気泳動
(姫路工大・理) ○眞鍋敬、寺部茂
- 33 金属イオンとの in situ 錯体形成を利用した高性能キャピラリー電気泳動による糖の分離
(近畿大・薬) 本田進、○山本圭子、掛樋一晃
- 34 高性能キャピラリー電気泳動によるN-グリコシド結合型糖タンパク質糖鎖のマッピング
(近畿大・薬) 本田進、○鈴木茂生、牧野明子、掛樋一晃
- 35 高性能キャピラリー電気泳動によるプロテオグリカンの分析
(近畿大・薬) 本田進、○上野哲司、掛樋一晃

14:45-15:30 特別講演 II

動電クロマトグラフィー
(姫路工大・理) 寺部茂

15:45-17:30 セッション II-4 (動電クロマトグラフィー)

- 36 ミセル動電クロマトグラフィーにおける温度効果
(京大・工¹、姫路工大・理²) ○桂武久¹、寺部茂²
- 37 ミセル動電クロマトグラフィーにおける尿素及び非イオン性界面活性剤の添加効果
(京大・工¹、姫路工大・理²) ○石濱泰¹、寺部茂²
- 38 ミセル動電クロマトグラフィーによるキラル分離
(大阪府高専¹、姫路工大・理²) ○大塚浩二¹、寺部茂²
- 39 シクロデキストリン修飾ミセル動電クロマトグラフィーによる多環芳香族の分離
(京大・工¹、姫路工大・理²) ○柴田理¹、宮下陽介¹、寺部茂²
- 40 ミセル動電クロマトグラフィーにおける金属-β-ジケトナト錯体の移動度とその評価
(東北大・理) ○斎藤絃一、清原力、鈴木信男
- 41 PTH-アミノ酸のキャピラリー電気泳動
(東京都立大・理) ○高橋郁子、泉友則、奥山典生
- 42 ミセル動電クロマトグラフィーの生薬分析への応用
II 漢方製剤中のグリチルリチンとペオニフロリンの同時定量
(大阪府公衛研¹、京大・薬²) ○岩上正蔵¹、沢辺善之¹、中川照眞²

17:30-17:45 閉会の辞

(広島大・工) 木曾義之

10TH SYMPOSIUM
ON CAPILLARY ELECTROPHORESIS
December 13 - 14, Osaka, Japan

Program

M o r n i n g, D e c e m b e r 13

Opening Lecture (10:00-10:30)

One Decade of Capillary (Isotacho-)electrophoresis in Japan and Its New Horizon
Tsuneo Okuyama

Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

Capillary Isotachophoresis I (10:30-12:00)

1 Quantitative Analysis for Wood Preservatives by Isotachophoresis

Kayoko Kojima¹⁾ and Shigehisa Ishihara²⁾

¹Analytical Applications Department, Shimadzu and ²Wood Research Institute,
Kyoto University

2 Application of Isotachophoresis in Forensic Science: Analysis of the Extracted
Dyes from Some Fibres

Hirota Ono¹⁾ and Nobuhiro Kuramoto²⁾

¹Osaka Prefectural Police Headquarters Forensic Science Laboratory and ²Osaka
Prefectural Industrial Technology Research Institute

3 Determination of Calcium Ion in Presence of Phosphate Anion and Collagen by
Capillary Type Isotachophoresis

Satoru Matsushita¹⁾, Itaru Motooka²⁾, Yukio Kanaji³⁾, and Masami Sugita¹⁾

¹Technical Center for Leather, Hyogo Prefectural Institute of Industrial
Research, ²Department of Chemistry, Faculty of General Education, Kobe
University, and ³Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
Kobe University

4 Application of Capillary-Type Isotachophoresis to Pharmaceutical Analysis (XV)
Determinaiton of Ethanol Using Phthalic Anhydride as a Derivatizing Reagent

Junichi Ishii, Satoru Izui, Seiko Akamatsu, Michio Kameyama, and Yoshinobu Akada
Faculty of Pharmaceutical Science, Tokushima Bunri University

5 Separation Behavior of the Group VIII Metal Ions in Capillary Electrophoresis

Akihiko Ijyuin, Takeshi Hirokawa, Fumitaka Nishiyama, and Yoshiyuki Kiso

Faculty of Engineering, Hiroshima University

6 Electrophoretical Observation of Egg White and Serum Protein of Japanese Quail

Haruhiro Yoshida

Laboratory of Physiology, Senshu University

A f t e r n o o n, D e c e m b e r 13

Capillary Isotachophoresis II (13:00-14:00)

7 Rapid Estimation of Resolution Time of Capillary Isotachophoresis and
Application to Separation Optimization

Takeshi Hirokawa, Jian-ying Hu and Yoshiyuki Kiso

Faculty of Engineering, Hiroshima University

8 Evaluation of Ionic Mobility and Dissociation Constant by Means of Capillary
Electrophoresis

Kazuhiro Watanabe¹⁾, Kenji Nakanishi¹⁾, Takeshi Hirokawa¹⁾, Yoshiyuki Kiso¹⁾,
Bohuslav Gas²⁾, and Jiri Vacik²⁾

¹Faculty of Engineering, Hiroshima University and ²Faculty of Science, Charles
University (Czechoslovakia)

- 9 Separation of Minor Component from Matrix by Means of Capillary Electrophoresis
Akihiro Omori, Takeshi Hirokawa, and Yoshiyuki Kiso
 Faculty of Engineering, Hiroshima University
- 10 Utility of Electrophoresis in the Recovery of Useful Elements from High-level Radioactive Liquid Wastes from Fuel Reprocessing Plants
Yoshiyuki Kiso, Takeshi Hirokawa, Fumitaka Nishiyama, Jian-ying Hu, Satoru Yoshida, and Miki Ueda
 Faculty of Engineering, Hiroshima University

Special Lecture I (14:00-14:45)

- S1 DNA Sequencing and Restriction Fragments Separations in Gel Capillary Electrophoresis
Aharon S. Cohen
 Barnett Institute, Northeastern University

Capillary Zone Electrophoresis I (15:00-16:15)

- 11 Use of Rectangular Capillaries for Capillary Zone Electrophoresis
Takao Tsuda¹⁾, Jonathan V. Sweedler²⁾, and Richard N. Zare²⁾
¹Nagoya Institute of Technology and ²Department of Chemistry, Stanford University
- 12 Sample Injection Method in Capillary Electro Chromatography
Takashi Anbe¹⁾, Hisao Tsuruta¹⁾, and Toshihiko Hanai²⁾
¹Irica Instruments, Inc. and ²Int. Inst. Technol. Anal. Health Res. Found.
- 13 Quantitation of Sample Components in Capillary Electrophoresis
Kayo Funakushi, Akiko Machida, and Takashi Satow
 Beckman Instruments
- 14 The Effects of the Salts in the Sample on the Separation of Peptides in Capillary Electrophoresis
Akiko Machida, Kayo Funakushi, and Takashi Satow
 Beckman Instruments
- 15 Inorganic Capillary Electrophoresis - Reversed EOF with Cationic Surfactant for Anions
 Bill Jones¹⁾ and Tsuneyuki Sakai²⁾
¹Waters Chromatography Division, Milipore Corp. and ²Waters Chromatography Division, Nihon Milipore

Capillary Zone Electrophoresis II (16:25-17:25)

- 16 Analysis of Ionic Ingredients in Herbicides by Capillary Zone Electrophoresis
Masafumi Tomita¹⁾, Toshiko Okuyama¹⁾, and Yayoi Nigo²⁾
¹Department of Legal Medicine and ²Center of Biochemistry, Kawasaki Medical School
- 17 Separation of Vitamin B₆ Derivatives by Capillary Electrophoresis
Yasuyuki Kurosu¹⁾ and Susumu Kurioka²⁾
¹Technical Research Laboratory, Japan Spectroscopic Company and ²Institute of Medical Science, The Jikei University School of Medicine
- 18 Analysis of Drug Metabolites by High Performance Capillary Electrophoresis
 Susumu Honda¹⁾, Atsushi Taga¹⁾, Kazuaki Kakehi¹⁾, and Yoshihiko Okamoto²⁾
¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University and ²Analytical Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Company
- 19 Separation of Racemates by Capillary Zone Electrophoresis Based on Complexation with Cyclodextrin Derivatives
Satoshi Asano¹⁾, Minoru Tanaka¹⁾, and Toshiyuki Shono²⁾
¹Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka University and ²Department of Applied Chemistry, Osaka Institute of Technology

M o r n i n g , D e c e m b e r 14

Miscellaneous (9:30-10:30)

20 Electrochromatography

Takao Tsuda

Nagoya Institute of Technology

21 Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins

Takashi Manabe and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

22 Separation of Chromosomes of Neematode *C. elegans* by Free Flow Electrophoresis

Munehiko Takashima¹⁾, Hidesaburo Kobayashi²⁾, Naoaki Ishii³⁾, and

Tsuneo Okuyama¹⁾

¹Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, ²Faculty of Science, Josai University, and ³School of Medicine, Tokai University

23 Separation of Human Polyclonal Ig G by Isoelectric Focusing

Takae Nagahori¹⁾, Tomonori Izumi²⁾, and Tsuneo Okuyama²⁾

¹Biotechnology Division, Nippon Bio-Rad Laboratories and ²Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

Capillary Zone Electrophoresis III (10:45-12:30)

24 Analysis of Human Polyclonal IgG by Capillary Electrophoresis

Tomonori Izumi¹⁾, Takae Nagahori²⁾, Ayako Takahashi¹⁾, and Tsuneo Okuyama¹⁾

¹Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University and ²Biotechnology Division, Nippon Bio-Rad Laboratories

25 Application of Capillary Electrophoresis to Analysis of Photosystem Complex Proteins

Masaaki Senda¹⁾, Toru Sasaki¹⁾, and Tetsuo Hiyama²⁾

¹Japan Spectroscopic Company and ²Faculty of Science, Saitama University

26 Free Solution Capillary Electrophoresis of Basic Proteins by New Electrocoating Technique

Hiroshi Tanaka¹⁾, Yasuko Yamada¹⁾, Yoshimitsu Obata¹⁾, Akane Kiko¹⁾,

Toshihiko Semba¹⁾, John E. Wiktorowicz²⁾, and Joel C. Colburn²⁾

¹Applied Biosystems, Japan and ²Applied Biosystems, Inc.

27 Analysis of Calcium Binding Proteins by Capillary Electrophoresis

Hideyuki Kajiwara

National Institute of Agrobiological Resources

28 Estimation of Binding Constant of Carbohydrate - Protein Interaction by High Performance Capillary Zone Electrophoresis

Susumu Honda, Atsushi Taga, Kenji Suzuki, and Shigeo Suzuki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

29 Peptide Mapping by Hydrophobic Interaction Capillary Electrophoresis

Toshie Kanbe¹⁾, Kayoko Hagiwara¹⁾, Toshihiko Semba¹⁾, Hiroshi Tanaka¹⁾,

Stephen E. Morning²⁾, and Judith A. Nolan²⁾

¹Applied Biosystems, Japan, Inc. and ²Applied Biosystems, Inc.

30 High Performance Separation of Biopolymers and Biooligomers Using Capillary Electrophoresis

Yoshinobu Baba¹⁾, Mitsutomo Tshako¹⁾, Shigeru Enomoto²⁾, A. M. Chin²⁾, and R. S. Dubrow²⁾

¹Kobe Women's College of Pharmacy and ²Applied Biosystems Inc.

A f t e r n o o n , D e c e m b e r 14

Capillary Zone Electrophoresis IV (13:30-14:45)

31 Analysis of Nucleotides in the Brain by Capillary Zone Electrophoresis

Masaaki Imazawa and Tomoko Saitoh

National Institute of Neuroscience, NCNP

- 32 Capillary Gel Electrophoresis of Proteins and DNAs
Takashi Manabe and Shigeru Terabe
Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- 33 Separation of Carbohydrates by in-situ Complexation with Metal Ions in High Performance Capillary Electrophoresis
Susumu Honda, Keiko Yamamoto, and Kazuaki Kakehi
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
- 34 Mapping of N-Glycosidically Bound Oligosaccharides in Glycoproteins by High Performance Capillary Electrophoresis
Susumu Honda, Shigeo Suzuki, Akiko Makino, and Kazuaki Kakehi
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
- 35 Analysis of Proteoglycans by High Performance Capillary Electrophoresis
Susumu Honda, Tetsuji Ueno, and Kazuaki Kakehi
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
- Special Lecture II (14:45-15:30)
- S2 Electrokinetic Chromatography
Shigeru Terabe
Himeji Institute of Technology
- Capillary Electrokinetic Chromatography (15:45-15:30)
- 36 Thermal Effect in Micellar Electrokinetic Chromatography
Takehisa Katsura¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾
¹Faculty of Engineering, Kyoto University and ²Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- 37 Effect of Urea and Nonionic Surfactants on Micellar Electrokinetic Chromatography
Yasushi Ishihama¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾
¹Faculty of Engineering, Kyoto University and ²Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- 38 Chiral Separation by Micellar Electrokinetic Chromatography
Koji Otsuka¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾
¹Department of Industrial Chemistry, Osaka Prefectural College of Technology and ²Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- 39 Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Cyclodextrin Modified Micellar Electrokinetic Chromatography
Osamu Shibata¹⁾, Yosuke Miyashita¹⁾, and Shigeru Terabe²⁾
¹Faculty of Engineering, Kyoto University and ²Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- 40 Evaluation of the Micellar Electrokinetic Chromatographic Mobility of Metal β -Diketonato Complexes
Koichi Saitoh, Chikara Kiyohara, and Nobuo Suzuki
Faculty of Science, Tohoku University
- 41 Capillary Electrophoresis of PTH-Amino Acids
Ayako Takahashi, Tomonori Izumi, and Tsuneo Okuyama
Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University
- 42 Micellar Electrokinetic Chromatography for the Analysis of Crude Drugs II Simultaneous Determination of Glycyrrhizin and Paeoniflorin in Chinese Pharmaceutical Preparations
Shozo Iwagami¹⁾, Yoshiyuki Sawabe¹⁾, and Terumichi Nakagawa²⁾
¹Osaka Prefectural Institute of Public Health and ²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

第10回キャピラリー電気泳動シンポジウム
座長一覧表

セッション	時間帯	講演番号	座長等
第1日(12月13日)			
開会講演	10:00-10:30	-	本田 進
等速電気泳動 I	10:30-11:00	1 - 2	掛樋一晃
	11:00-12:00	3 - 6	真鍋 敬
等速電気泳動 II	13:00-14:00	7 - 10	吉田治弘
特別講演 I (A. S. Cohen)	14:00-14:45	S-1	奥山典生
ゾーン電気泳動 I	15:00-16:15	11 - 15	八木孝夫
ゾーン電気泳動 II	16:25-17:25	16 - 19	田中 博
表彰式	17:25-17:50	-	小林英三郎 津田孝雄
第2日(12月14日)			
種々の電気泳動	9:30-10:30	20 - 23	広川 健
ゾーン電気泳動 III	10:45-11:30	24 - 26	津田孝雄
	11:30-12:30	27 - 30	田中 稔
ゾーン電気泳動 IV	13:30-14:45	31 - 35	佐藤 隆
特別講演 II (寺部 茂)	14:45-15:30	S-2	中川照眞
動電クロマトグラフィー	15:45-16:45	36 - 39	斎藤紘一
	16:45-17:30	40 - 42	大塚浩二
閉会の辞(木曾義之)	17:30-17:45	-	本田 進

開 会 講 演

開 会 辭 演

キャピラリー電気泳動シンポジウム

10年の歩みと将来への展望

(都立大 理) 奥山典生

ONE DECADE OF CAPILLARY (ISOTACHO-)ELECTROPHORESIS IN JAPAN AND ITS NEW HORIZON.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Ct

Tokyo Metropolitan University

Tsuneo OKUYAMA

A brief history of the capillary electrophoresis symposium in Japan was described, concerning with the background of the organizing committee and activity, and also some of the development of theory, apparatus and applications .

1. 細管式等速電気泳動とイソタコ研究会

各種のイオンの移動状況について、いろいろと物理化学的に研究され1906年には Michaelisによって Electrophoresisという名称が提案された。その後、Martinらはキャピラリーを用いて電気泳動を行い Displacement electrophoresisと称した。1970年頃になって、Haglundは Isotachophoresisと言う名称を作り、この理論とキャピラリーとを用いた装置が、LKBと島津から相次いで市販された。そして、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーに次ぐ新しい分析方法として、多くの人々によって注目された。しかし、その分析データの解析法の複雑さの為に、実用的な分析方法と言うよりも、むしろ理論的な取扱に傾きがちであった。そこで、日本に於いても、このような分析手法と、その応用について議論する場として、1980年2月にイソタコ研究会が発足した。隔月に学士会館において開催されたが、この頃、同時に発足した2次元電気泳動研究会の盛会さに較べて、その歩みは遅々たるものであった。この年、ヨーロッパにおいては、Everaertらは第一回の”国際キャピラリー イソタコホレシス シンポジウム”の開催をはじめた。日本に於いても、その翌年、第一回の”細管式等速電気泳動シンポジウム”を開催することとなった。

このシンポジウムでは、必ずしも、等速電気泳動に限らず、キャピラリーを用いていればどんなモードの電気泳動でも良かったし、また、等速電気泳動であれば、どんな規模の電気泳動でもよかった。むしろ、実験上の詳細な手法についての議論が主な目的であった。

2. 電気泳動研究懇談会（日本分析化学会）・電気泳動学会・クロマトグラフィー科学会

この様な会の運営の基盤は制度的にも、経済的にも極めて弱体であったので、電気泳動学会の部会としての性格をもたせようとした。この学会は、Tiseliusの電気泳動装置の研究会から出発して、当時、既に30周年を迎えていたが、部会の制度がなかったために、この試みは不成功であった。一方、日本分析化学会の中に電気泳動研究懇談会の設置が1988年に認められたので、この会との提携・融合がおこなわれた。今回の運営母体がこれである。1989年にクロマトグラフィー科学会が設立されたが、この学会でも電気泳動気鋭動、質量分析なども含めることになっているので、将来はこの団体と共催になるかもしれない。

この間、このシンポジウムの抄録を英文にすることによって、ヨーロッパの人々にはかなり良く知られる様になっていた。しかし、この数年間に、アメリカではキャピラリーの径が一段と細くなり、Electrokinetic chromatographyなどの新しい手法の導入などが重なり合って、この領域の発展が急激に起こり始めたので、本年度のシンポジウムの名称は“第10回 キャピラリー電気泳動シンポジウム”となった。同様のうごきはEveraertの国際シンポジウムにも現れている。彼は、この数年間、シンポジウムの運営に苦慮していたが、1991年度はアメリカのCapillary Electrophoresis Symposiumと合同でSan Diegoで開催されるようである。

3. 将来への展望

この研究領域の目的は“理論と装置化”に焦点をあわせてきた。この方向はさらに続くものと考えられる。すなわち、装置の発展の方向は、キャピラリーがより細くなり（充填キャピラリーをふくめて）、電圧はより高くなる方向であり、従って、検出法はより高感度にならざるを得ない。このために、質量分析装置などとの複合化が進むものと考えられるし、また、応用方面としては、D・L異性体の分離をはじめとして逆相クロマトグラフィーの領域では非常に重要な方法と考えられるし、核酸、タンパク質等の高分子領域でもその適用法の開発がすすむものとおもわれる。

特別講演

AHARON S. COHEN, Barnett Institute, Northeastern University,
Boston, MA 02115.

DNA Sequencing and Restriction Fragments Separations in Gel
Capillary Electrophoresis

Since its emergence in the early 1980's, capillary electrophoresis or high performance capillary electrophoresis (HPCE) has become widely accepted as an ultra high resolution technique. This instrumental approach to electrophoresis can be characterized as a rapid, high efficiency analytical technique and an effective tool in the isolation of purified materials. HPCE, especially in its gel-filled capillary format, has a unique position in the field of DNA separations. The problem is a challenging one, since oligonucleotides may differ slightly from one another; for example, in base number or in sequence of the bases. Using this approach, one utilizes the combination of the difference in electrophoretic mobility of the solute and the matrix sieving to affect separation. Under appropriate conditions plate counts can exceed 10^7 plates/meter, and large restriction fragments as well as sequencing reaction products can be baseline resolved. Examples of separations of DNA fragments and DNA sequencing products with subattomole detection levels will be presented.

ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Department of Material Science, Faculty of Science,
Himeji Institute of Technology
Shigeru TERABE

Electrokinetic chromatography (EKC), which belongs to high performance capillary electrophoresis (HPCE), is capable of separating even electrically neutral compounds, although other modes of HPCE are not applicable to neutral compounds. The separation principle of EKC is similar to that of conventional chromatography but EKC can take advantages of HPCE. In this presentation, fundamental characteristics of EKC and some examples of the separation of closely related compounds will be given from the viewpoint of selectivity manipulation.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動(CE)の歴史はすでに10年以上になるが、広く関心がもたれるようになったのは、装置が市販され始めた1989年以後である。CEはまだ研究開発段階にあり、実用分析にはほとんど用いられていない。しかしその優れた分離性能はキャピラリーガスクロマトグラフィーに匹敵し、医学薬学、生化学、バイオテクノロジー等の分野では有力な分析手段になると期待されている。

電気泳動の分離原理は、電荷を持つ物質の電場の影響下での動き易さ(電気泳動移動度)の違いに基づいており、電荷を持たない試料の分離はできない。電気泳動の技法にクロマトグラフィーの分離原理を導入すると、電気泳動による中性物質の分離も可能となる。われわれは、このような方法に一般名として『動電クロマトグラフィー』(EKC)と命名し、その基本的分離特性の解明およびEKCの適用範囲の拡大を目的に1982年以来研究を続けてきた。本講演では、EKCにおける分離選択性を中心にEKCの概説的紹介を行う。

2. 分離原理

電気泳動溶液としてイオン性界面活性剤ミセルを用いてキャピラリー電気泳動を行うのがミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)であり、EKCのなかで最もよく知られている。MEKCでは、溶液全体はキャピラリー内を電気浸透流によって移動するが、ミセルは電気泳動効果も受けるので、周囲の水とは異なった速度で移動する。試料分子は、水中に存在するときとミセルに取込まれているときとは移動速度が違うので、その速度はミセルに取込まれる割合(分配係数)に依存する。ミセルは動的な状態でのみ存在するが、溶液全体としては常に一定濃度で存在する。クロマトグラフィー的見地からはミセルは固定相、水相は移動相に相当する。一方、電気泳動的には中性分子でもミセルに取込まれることにより疑似的に電気泳動移動度を持つようになると解釈できる。

ミセルの代わりにイオン性置換基を持つシクロデキストリン誘導体を用いるのがDEKCであり、ポリマーイオンを用いるのがイオン交換EKCである。

3. 分離度および分離選択性

キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)でもEKCでも分離度を大きくするためには、ピーク幅を狭くすることとピーク間隔を大きくすることが重要である。ピーク幅は理論段数によって表すことができる。CZEでもEKCでも理論段数は主として分子拡散によって支配されるので、物理的条件を変えることによって最適化できる。ピーク間隔は分離選択性で表すことができ、化学的条件に大きく依存する。CZEではpHを最適化することが最も重要である。EKCではクロマトグラフィーと同じ考え方によって取扱うことができる。

MEKCでの分離選択性は、固定相に相当するミセルにも、移動相に相当する水相にも依存する。ミセルは界面活性剤分子の集合体であるので、界面活性剤の分子構造が分離選択性に大きく影響する。一般に、界面活性剤分子の極性基の構造の方が疎水基の構造よりも支配的である。キラルな界面活性剤を用いるとキラル分離も可能である。また、ミセルは一種の界面活性剤のみから成る必要はなく、混合ミセルを用いることによっても分離選択性を大きく変えることができる。

分離選択性を増すためには、水相も多様に変化させることができる。中性試料に対してはpHは重要ではない。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で利用されている種々の移動相修飾剤の添加が効果的である場合が多い。CD、イオン対生成試薬、尿素等の添加が有用である。とくに γ -CDの添加は広範囲に適用可能で、芳香族異性体、多環芳香族炭化水素、キラル化合物等の分離に有効である。

CDEKCでは、CDの分子識別能をCD修飾MEKC(CD/EKC)よりも直接的に利用しているため、キラル分離等にはとくに有効である。イオン交換EKCでは、ナフタリンジスルホン酸異性体のような異性体イオンの分離に有用である。異性体イオンはCZEのみでは分離不可能な場合が多い。

4. 応用

MEKCはCZEの利点をほとんどそのまま利用しているため、HPLCに比べると分離効率が高い。HPLCで分離可能な試料は、MEKCを用いた方が短時間で良好な分離を与える場合が多い。MEKCは本来、中性試料の分離を目的として開発されたが、イオン性試料に対してもCZEよりも分離選択性を広範囲に変化させることができ、複雑な混合物の分離にはとくに有用である。ミセルの大きさはあまり大きくないので、MEKCはタンパク質のような高分子の分離には効果がない。

移動時間の再現性は主として電気浸透流の再現性に左右されるが、MEKCでは分配係数の温度依存性も大きいので、キャピラリー内の液温を一定に保つことが重要である。定量分析では、絶対定量法の場合には、定量精度は試料注入量精度に大きく左右される。内標準法ではHPLCとほぼ同等の精度が得られる。CZEおよびEKCでは、ピーク面積が各成分の移動速度に大きく依存することに注意する必要がある。

5. おわりに

MEKCとHPLCとは相補助というよりむしろ競合的關係にあり、HPLCが既に広く実用に供されている事実を考えると、MEKCの活用範囲は、HPLCでは分離困難な複雑な混合物や構造の類似した化合物の分離等にある。とくにキラル分離は有望な応用分野と考えられる。CZEやEKCが広く普及するには、微量試料で足りる利点を生かすために試料の前処理、注入、検出等をすべて微量で行える総合システムを開発することが望まれる。

一 般 講 演

1 等速電気泳動法による 木材保存処理剤の分析

(島津・応技) ○児嶋佳世子, (京大・木研) 石原茂久

QUANTITATIVE ANALYSIS FOR WOOD PRESERVATIVES
BY ISOTACHOPHORESIS

Analytical Applications Dep., Shimadzu Co.¹⁾ and
Wood Reserch Institute, Kyoto University²⁾
Kayoko KOJIMA¹⁾ and Shigehisa ISHIHARA²⁾

To determine formulations in an aqueous solution of inorganic wood preservatives, result of quantitative analysis by isotachophoresis were compared with result from atomic absorption spectrometry. The inorganic preservatives used were borax-boric acid mixtures, Cr-F-Cu (CFK), Cr-Cu-As (CCA) and F-Cr-As-phenols (FCAP).

Sliced veneers of sugi, hinoki, leopard wood and Indian rosewood were treated with the inorganic preservatives described above and used as leaching test specimens. Red and yellow lauan and western hemlock columns treated with commercial preservatives were also tested. Leaching properties of the preservatives from treated wood were successfully analysed quantitatively by isotachophoresis.

1. はじめに

木材が一般にもつ短所として腐朽, 虫害を受けやすいことや燃焼しやすいことがある。これら木材の劣化作用を弱め, 木材資源の有効利用と木造住宅の耐用年数を伸ばすためにさまざまな木材保存処理剤が開発されている。この中のCCAやFCAPはそれぞれJISに標準組成が定められており, これらは防腐, 防蟻効果に優れているため幅広い分野で使用されている¹⁾。

CCAやFCAPなどの定着型水溶性木材防腐剤は木材中で難水溶性物質となって固着するが, 防腐剤そのものは水溶性の毒性の高い物質²⁾で構成されているにも関わらず, 濃度管理がほとんどなされていない。そこで, イオンの簡易分析法の一つである等速電気泳動法を用いてこれら保存剤の処理液中の濃度変化や水による溶脱等について検討した。

2. 実験

等速電気泳動分析装置: 島津製キャピラリ等速電気泳動分析装置IP-3AD

注入処理薬剤: CCA, FCAP, CFK, ホウ素系防虫剤

処理試験片: スギ, ヒノキ, レオボルド, ローズウッドのスライスドベニヤ, ホウ

素系防虫剤を含有するレッドラワン並びにイエローラワンの5cm角材，CCA，CFKを注入したベイツガの10cm角材

3. 結果および考察

CCA 1号Bを用いて4種類のスライスドベニヤを処理した。時間経過に伴うヒノキスライスドベニヤの処理液中の濃度変化は図1に示すようにクロム酸や銅に比べてヒ酸の減少が著しく大きいことがわかった。その他の樹種でもイオン濃度の変化に多少の差はあるものの同様の傾向が見られた。これに対してCCA 2号では3種類の濃度減少割合がほぼ一定となり，処理液の安定性は高かった。また，このとき，定量値を原子吸光法と比較してみたが，良く一致した。

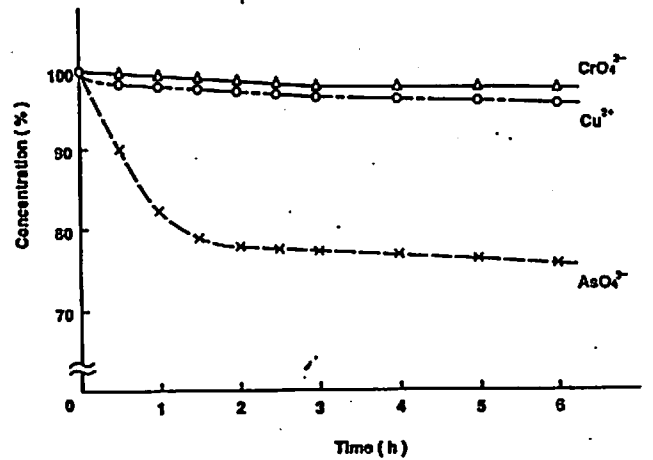


図1 CCA処理液濃度変化

ホウ酸-ホウ砂の比率を変えてpHの異なるホウ素系防虫剤を作成したが，pH 8付近のもの吸収が良好であった。市販のホウ素系防虫剤を注入したレッドラワンとイエローラワンを用いて水による溶脱試験を行ったが，この結果を図2に示す。薬剤注入量0.425%のレッドラワンでは1日で30%が溶脱し，1週間で50%となった。

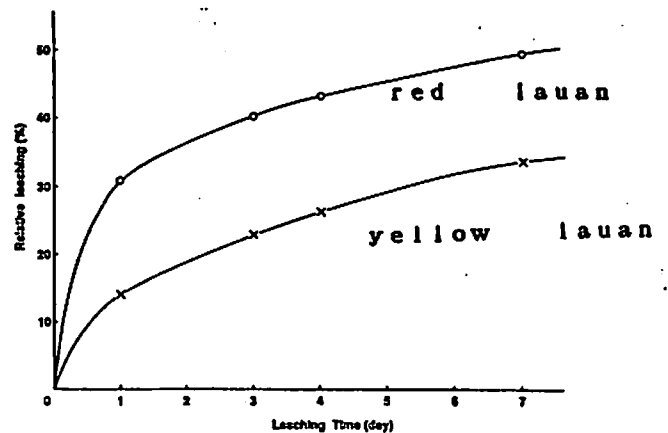


図2 ホウ酸処理材溶脱試験結果

4. 結論

木材保存処理剤の組成成分の定量を等速電気泳動法を用いて検討した。この方法によって木材保存剤水溶液中の組成成分は簡易かつ迅速に定量できた。また，定量結果は原子吸光法とも良く一致した。

保存処理剤の処理時の濃度変化や溶脱薬剤の有無を等速電気泳動法を用いて調べてみたが，次のことが明らかとなった。処理液の成分比率によって安定性や注入量に変化をもたらすことがわかった。CCAの場合，2号の方が1号Bよりも処理液濃度に変化をきたさないため，連続使用にはCCA 2号が適していると考えられる。また，ホウ酸処理材の使用は水と接触するところでは問題のあることがわかった。

等速電気泳動法は精度も良い上，前処理なしで短時間分析できることから，木材保存処理技術の開発研究の上で大変有用であることが見出せた。

文献

- 1) 農林省林産課：林産行政研究会報昭和49-61年
- 2) M.R.Folio, C.Hennigan and J.Errera: Environ Pollut. Ser. A., 29, 261 (1982)

2 等速電気泳動の法科学的応用 — 繊維からの抽出色素の分離分析 —

(大阪府警・科捜研, 大阪府産技総研) ○小野広孝, 蔵本暢浩

Application of Isotachopheresis in Forensic Science: Analysis of the extracted dyes from some Fibres

Osaka Prefectural Police Headquarters Forensic Science Laboratory and

Osaka Prefectural Industrial Technology Research Institute

Hiroataka Ono and Nobuhiro Kuramoto

In order to identify some acid dyes in forensic science, Isotachoelectrophoresis was applied. Acid dyes were analysed under four electrolyte systems. It found that electrolyte systems to contain methanol or acetone improve the separation. Acid dyes extracted from some fibres with the a mixture of pyridine and water were characterized and semi-quantified. The sensitivity of detection was about one microgram.

1 緒言

酸性染料は水溶性にするため一般にスルホン酸基やカルボキシル基が導入されており, 水溶液中ではイオン化してアニオンを生じている. このような水溶性のイオン性物質は等速電気泳動法(Isotachoelectrophoresis)で分離分析することが期待できる. 本報告では, 等速電気泳動法による酸性染料の分析を試み, その分析条件, 特に溶媒効果について検討した結果を述べる.

2 実験

分析に用いた4組のリーディング及びターミナル電解液は表1の通りである. 染料は水溶液とし, その濃度を1mg/mlに調製して, マイクロシリンジで5 μ l導入した. 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置IP-2Aを使用した. 泳動管は, 長さ4cm(内径1.0mm)ものと長さ15cm(内径0.5mm)のものを連結して用いた.

表1 電解液

	Leading electrolyte	Terminating electrolyte
I	0.01M HCl, β -Alanine, pH 3.6 0.2% Triton X-100	0.01M n-Caproic acid
II	0.01M HCl, β -Alanine 0.2% Triton X-100 30% Methanol	0.01M n-Caproic acid
III	0.01M HCl-histidine, pH 6.2 0.01M Histidine	0.01M n-Caproic acid
IV	0.01M HCl-histidine 0.01M Histidine 50% Acetone	0.01M n-Caproic acid

泳動電流は, 電解液 I, III は200 μ Aで8min通電した後100 μ Aに切り換えた. 電解液 II, IV は100 μ Aで8min通電した後50 μ Aに切り換えた. また, データ処理装置としてイソタコパックI-E1Bを使用した.

3 結果及び考察

各酸性染料について電位勾配を測定し、定性の指標であるPU値(Potential Unit value)を求めたところ、表2の通りであった。メタノール、アセトンなどの有機溶媒を加えた電解液II、IVではこれらを加えていないI、IIIに比べてPU値が異なり、溶媒効果により染料イオンの移動度が変化したことが考えられる。特に、IVの場合はその効果が顕著であり、IIIよりPU値が小さくなった。更にPU値がほぼ同一の値を示していたIIIに比べ、IVでは各染料間のPU値の差が大きくなり、分離が可能となった。

染色布の色素を分析した例として図1に緑色布片(1x1cm)から抽出した色素のイソタコフェログラムを示した。抽出法は抽出液としてピリジン水溶液(ピリジン:水=4:3)を使用して90°Cで15分間加熱した。得られた抽出液を濃縮し、マイクロシリンジで5 μ l導入した。それぞれのPU値の比較により、抽出色素はAcid Blue 45とAcid Yellow 17の2種類の色素の混合物であること、また図2に示した検量線から求めた両者の割合は1:3であることが判った。感度については色素約1 μ g程度で検出可能であった。

表2 酸性染料のPU値

	I	II	III	IV
Acid Red 18	0.13	0.11	0.38	0.16
Acid Red 27	0.11	0.10	0.37	0.14
Acid Red 52	0.51	0.39	-	0.73
Acid Blue 9	0.26	0.26	-	0.43
Acid Blue 45	0.10	0.11	0.36	0.23
Acid Blue 74	0.14	0.15	0.37	0.21
Acid Yellow 17	0.26	0.19	-	0.28
Acid Yellow 23	0.11	0.09	0.35	0.14
Acid Green 25	0.68	0.22	-	0.36
Acid Orange 10	0.18	0.14	0.59	0.20

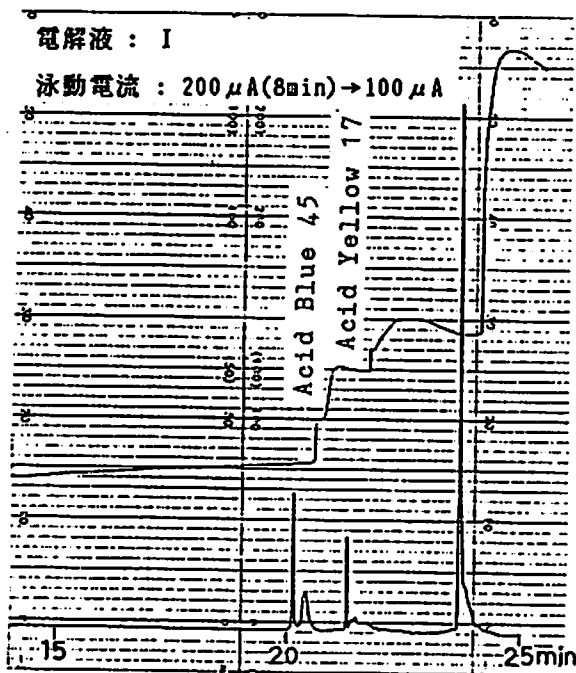


図1 緑色布片から抽出した色素のイソタコフェログラム

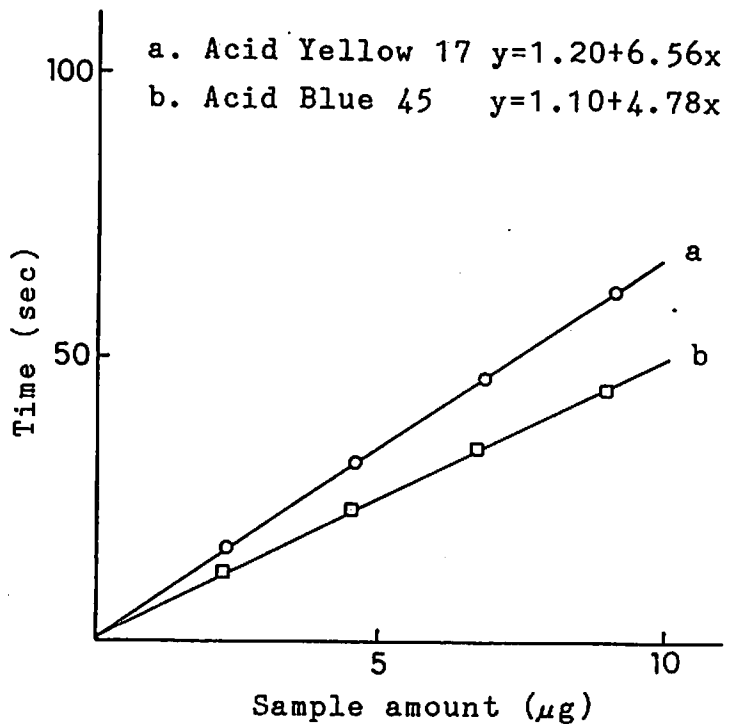


図2 検量線

細管式等速電気泳動法によるリン酸イオンおよびコラーゲン共存中のカルシウムイオンの定量

(兵庫工技センター¹⁾, 神戸大・教養²⁾, 神戸大・工³⁾)

○松下 啓¹⁾, 本岡 達²⁾, 金治幸雄³⁾, 杉田正見¹⁾

Determination of Calcium Ion in Presence of Phosphate Anion and Collagen by Capillary Type Isotachopheresis

Satoru Matsushita¹⁾, Itaru Motooka²⁾, Yukio Kanaji³⁾, and Masami Sugita¹⁾

¹⁾ Technical Center for Leather, Hyogo Prefectural Institute of Industrial Research, ²⁾ Department of Chemistry, Faculty of General Education, Kobe University, and ³⁾ Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Kobe University

New determination procedure of Ca^{2+} in presence of phosphate anion and collagen was developed with a capillary type isotachopheresis. Ca^{2+} could be determined successfully using the leading electrolyte containing 10mM potassium acetate-acetic acid (pH5.4) and the terminating electrolyte containing 10mM n-hexanoic acid in presence of collagen. Phosphate anion influenced the determination of Ca^{2+} in more than pH3, but didn't in pH2 to 3. The Ca in several calcium phosphates were determined successfully adjusting pH of sample solutions made from them between 2 and 3 with hydrochloric acid.

1. はじめに

我々はコラーゲン溶液中で α -リン酸三カルシウムの水和反応を利用して医用材料として有用と考えられる水酸アパタイト-コラーゲン複合体の湿式合成を検討している。この合成過程での Ca^{2+} の分析は共存するリン酸イオンなどの影響を受けるので、分析に際しては前処理などを必要とする。一方、細管式等速電気泳動法は優れた選択性を有しているが、リン酸カルシウム化合物中の Ca^{2+} の分析に応用されたことはない。そこで、本法をこれらの材料および湿式合成過程での Ca^{2+} の分析に適用するためにリン酸イオンおよびコラーゲン共存中の Ca^{2+} の定量について検討した。

2. 実験

装置は島津細管式等速電気泳動装置IP-2A形で、泳動管は内径1.0mm、長さ100mmのPTFE製チューブに内径0.5mm、長さ100mmのFEP製チューブを接続し、検出器は電位こう配検出器を用いた。

Ca²⁺ 溶液は試薬CaCO₃から、リン酸イオン溶液は試薬KH₂PO₄から調製し、コラーゲン溶液は髙研製ペプシン可溶化コラーゲンを1mM塩酸に低温で溶解して調製した。試料としてはCa²⁺ 溶液にリン酸イオン溶液あるいはコラーゲン溶液を添加した溶液およびリン酸カルシウム化合物を少量の塩酸に溶解した溶液2~10 μlを装置に導入した。

3. 結果と考察

分析条件として表1に示す(a)および(b)について検討した。これらのイソタコフログラムを図1に示した。(a)では(b)にくらべてPU値が大きく、また、モルレスポンスも大きい。また、(a)のターミナル液はpHが7以上のため、コラーゲンが分析中に沈殿する可能性がある。コラーゲン存在中でのCa²⁺の分析に適さない。そこで、本研究では(b)の電解液系を用いることにした。

試料溶液中のCa²⁺濃度を一定にして、コラーゲン濃度(約0.1%まで)およびリン酸イオン濃度(等モル(P/Ca=1)まで)を変化させてCa²⁺の定量を行った。コラーゲン共存の試料では、未変性および熱変性(45℃で30分間処理した)にかかわらずCa²⁺のゾーン長は一定であり、定量にコラーゲンは影響しなかった。他方、pH2~3ではリン酸イオン共存の試料もCa²⁺のゾーン長は一定であり、定量にはリン酸イオンの影響は認められなかった。しかし、P/Ca=1の試料に対して酢酸とアンモニアで溶液のpHを変化させて測定を行った場合、pH3以上になるとゾーン長が短くなり、Ca²⁺の定量にリン酸イオンの影響が現われた。さらにこれらの溶液を希塩酸でpH2~3にするとゾーン長は等しくなるので、溶液のpHを調整することによってCa²⁺の定量が可能である。

P/Ca比の異なるリン酸カルシウム化合物を少量の塩酸に溶解した試料(pH2~3)についてCa²⁺を測定してその含有量を求めると測定値は理論値とよく一致した。

Table 1 Operating conditions

	(a)	(b)
Column	1.0×100mm+0.5×100mm	
Migration current	150 μA(14min) →100 μA	200 μA(13min) →100 μA
Leading ion	10mM H ⁺	10mM K ⁺
Counter ion	Cl ⁻	CH ₃ COO ⁻
pH	2.0	5.4
Terminating ion	10mM tris ⁺	10mM H ⁺

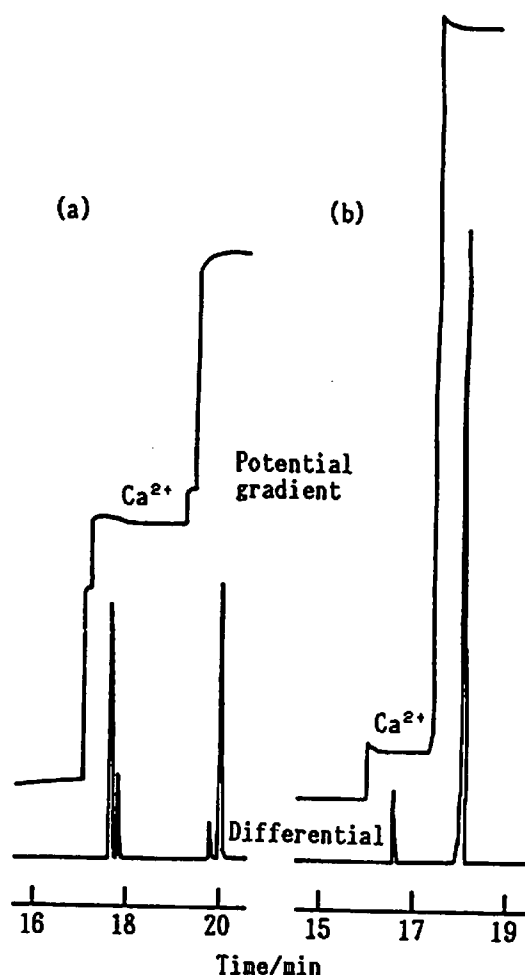


Fig. 1 Isotachopherograms of Ca²⁺

4 細管式等速電気泳動法の医薬品分析への応用 (第15報) 無水フタル酸を誘導体化試薬とするエタノールの分析

(徳島文理大・薬) 石井淳一、泉井理、○赤松聖子、亀山道生、赤田良信

APPLICATION OF CAPILLARY-TYPE ISOTACHPHORESIS TO PHARMACEUTICAL ANALYSIS (XV) DETERMINATION OF ETHANOL USING PHTHALIC ANHYDRIDE AS A DERIVATIZING REAGENT

Junichi Ishi, Satoru Izui, Seiko Akamatsu, Michio Kameyama and yoshinobu Akada

Faculty of Pharmaceutical Science, Tokushima Bunri University

An capillary-type isotachophoretic method was developed for the determination of ethanol using phthalic anhydride as derivatizing reagent. Ethanol standard and samples were diluted with anhydrous pyridine, and mixed with phthalic anhydride anhydrous pyridine solution. This mixture was heated at 100°C for 1 hr., cooling and diluted with water. 3-6 μ l of aliquot into the apparatus for analysis. A combination of a leading electrolyte at pH 3.2 using 10 mM hydrochloride β -alanine and containing 0.2 % HEC, and a terminal electrolyte, containing 10mM caproic acid, gives the best result in analysis of ethyl monophthalate. The linear relationship between zone length and the quantity of ethanol was obtained. The ethanol contents in alcoholic beverages and cosmetics were investigated.

1. 緒言

細管式等速電気泳動法(IP法)は、その適用がイオン性物質に限定され、非イオン性物質の分析には適用できない難点を持っている。一方、演者らは、無水ピリジン中でアルコール類と無水フタル酸を加熱すると、アルコール類の酸性フタル酸エステルが定量的に生成することを見出した。この反応は、生じる酸性フタル酸エステルが、カルボキシル基を持っているため、IP法のための誘導体化法として有用な方法と考えられる。今回、この誘導体化法をエタノールに適用し、IP法によるエタノールの分析のための基礎的条件を検討した。

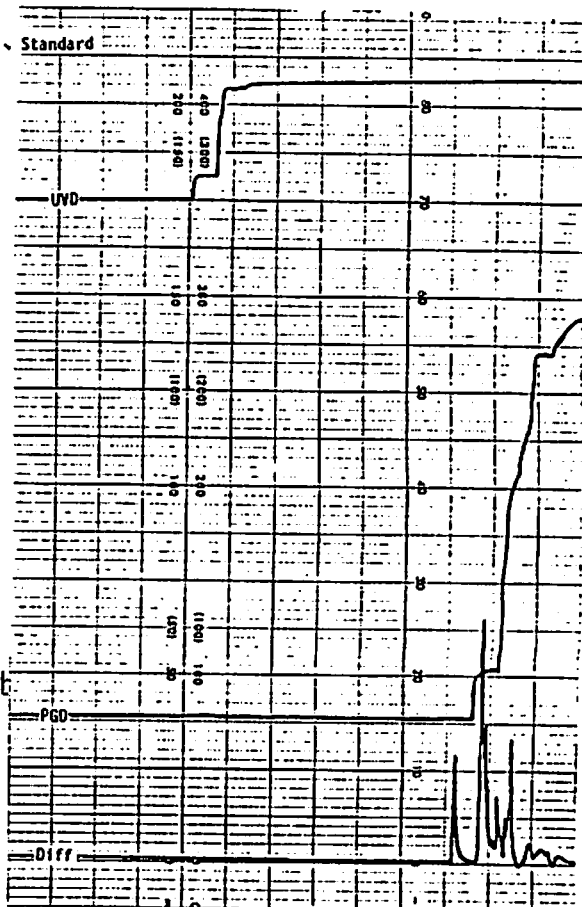
2. 実験

IP条件-装置: 島津製 IP-2A型細管式等速電気泳動装置; 検出器: PGD-2A型電位勾配検出器と UVD-10型紫外吸収検出器(254 nm)を併用した。泳動管: プレカラムとして 1.0 mm i. d. x 180 mm (PTFE製)を、分析カラムとして 0.5 mm i. d. x 80 mm

(FED)を使用した。泳動電流：250 μ A (初期電流)→ 100 μ A (分析電流)；電解液：10 mM 塩酸に β -アラニンを加えて pH 3.2 に調整し、0.2% になるように HEC を添加した液をリーディング液とした。ターミナル液は、10 mM ヘキサ酸ナトリウム水溶液を用いた。試料-酒類(ビール、日本酒、ワイン、ウイスキー、ブランデー、フィズ)及び化粧水を用いた。エタノール標準液と無水フタル酸の無水ピリジン溶液を100℃で1時間加熱し、水冷後、反応液を水で希釈し、その一定量を装置に導入した。酒類及び化粧水は、その一定量を量り、無水ピリジンで希釈した後、無水フタル酸の無水ピリジン溶液を加え、エタノール標準液と同様に処理した。

3. 結果及び考察

演者らが設定した無水ピリジンを反応溶媒とする誘導体化の条件で、エタノールは無水フタル酸と定量的に反応して酸性フタル酸エチルエステルを生成することがわかった。反応液を水で希釈し、過剰に存在する未反応の無水フタル酸をフタル酸とした後、装置に導入した。しかし、多量に生じるフタル酸のゾーンがエタノールの酸性フタル酸エステルのゾーンの前に泳動されるため、分析に長時間を要することがわかった。そこで、初期電流の通電時間を長くし、大部分のフタル酸のゾーンをカットする泳動条件を用いた。濃度の異なるエタノールの標準溶液について誘導体化を行い、本法の定量性の検討を行ったが、エタノール量とゾーン長さの間には良好な直線性が認められた。また、生成したエタノールの酸性フタル酸エステルの安定性について検討した結果、含水ピリジン中で長時間安定であることがわかった。本法の実試料への応用として、各種酒類及びエタノールを含む化粧水について分析を行った。各試料をピリジンで希釈し、無水フタル酸により誘導体化を行い、装置に導入し、エタノールの定量を行ったが、いずれの試料中にも本法を妨害する成分はなく、各試料について良好な精度でエタノール含量を求めることができた。また、各々の試料に一定量のエタノールを加え、添加回収実験を行ったところ、ほぼ100%の満足のいく回収率を持っていることがわかった。本法は、単にエタノールにカルボキシル基を簡便に導入できるIP法に適した誘導体化法であるばかりでなく、その酸性フタル酸エステルがベンゼン核を持っているため、紫外吸収を有し、選択性の高い紫外吸収検出器を使用できる利点を持っている。今回の分析に際しても、両検出器を併用し、良い一致をみた。



(広島大工) ○伊集院旭彦、広川健、西山文隆、木曾義之

1. 等速電気泳動法における回収率は原理的には100%であるが、イオン対を形成しやすい金属イオンの分離においては必ずしもそうとは言えない。特に Fe^{3+} などの第Ⅷ族元素は難溶性の水酸化物を生じて一部は沈殿物となり、回収率が非常に悪いことがある。例えば核燃料再処理液から有用元素を回収しようとする場合(講演10参照)、多量に含まれる第Ⅷ族元素の電気泳動挙動を明らかにしておくことは非常に重要となる。

昨年の第9回電気泳動シンポジウムにおいて演者らは、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} イオンを分離分取しPIXE分析して回収率などを報告した¹⁾。このような試料では、回収率が低だけでなく定量分析の再現性も良くない。従来の固定型検出器ではそれらの泳動過程が追跡できないので、泳動開始直後からの挙動を知ることができず、どの様なメカニズムで回収率が低いのか検討するための明確な情報が得られない。今回は走査型UVゾーン検出器を使用し²⁾、等速電気泳動法(IP法)、焦点電気泳動法などの電気泳動法で第Ⅷ族金属イオンの分離挙動を追跡した。そして、その結果から分離挙動、定量性について検討を行ったので報告する。

2. IP法で使用した電解液系を表-1に示した。使用した試料中、塩化第二鉄は安定性を考慮してpHを硫酸で約1.40に調整した。使用した分離過程測定装置は、UV光源と検出器を一体化したユニットをパルスモーター駆動のリニアヘッドに取り付け、分離管上を走査するものである。分離管として採用した石英チューブは、ガスクロ工業製AG83530(0.66mm O.D.×0.53mm I.D)である。分離管上の走査距離は320mmで、1走査に要する時間は7秒である。また、UV光源には重水素ランプを使用し、フィルターに $\lambda_{\text{MAX}}=330\text{nm}$ のものを用いた。

3. 図-1は走査型UVゾーン検出器で得られた FeCl_3 と $\text{Rh}(\text{NO}_3)_3$ の泳動過程のフェログラムで、この時の電解液系は表-1のAである。また、泳動電流は $125\mu\text{A}$ である。図A1は FeCl_3 の硫酸溶液50nmolをL-T界面に注入した後、ターミナル電解液で試料をUV検出できる所まで送って電圧を印加し、その直後から測定したフェログラムである。A2はA1のa-a界面(試料の先端)を揃えた図である。一方図B1は $\text{Rh}(\text{NO}_3)_3$ の水溶液50nmolをL-T界面に注入した後、電圧を印加しUV検出できる所まで泳動させてからのフェログラムで、電圧印加14分後からのフェログラムである。B2はA2のそれと同じ操作をしたものである。これらのフェログラムからRhは通常の等速電気泳動状態にあるが、Feについては一部しか等速電気泳動していないことがわかる。

図1のA1において泳動開始直後、Feは2方向に分かれて泳動しているが、泳動開始後600秒前後までの三角形の部分は、 H^+ の流出にともなうpHの上昇により水酸化物の沈殿が出来る様子を表わしているものと推測される。左側の鋭い吸収のゾーン(a-a)については、その泳動速度はB1のRhのそれと等しくL-T界面速度であり、 $\text{pH}=4.8$ でも等速電気泳動できるイオン種があることがわかる。また、800秒前後から少しづつ泳動の遅れていく部分が見られるが、これは凝集されていくうちに電荷を失って泳動不可能になった試料の一部であると推測される。なおB1において1300秒前後で泳動界面が停止しているのは電源を切った為で、試料ゾーンが拡散するか、試料ゾーンの移動が電気泳動によるものが判断できる。

いじゅういんあきひこ、ひろかわたけし、にしやまふみたか、きそよしゆき

一方、当研究室でIP-PIXE法により塩化第一鉄、第二鉄の回収率を測定したところ、 Fe^{2+} についてはほぼ100%の回収率であったのに対して、 Fe^{3+} はPIXE分析の結果、61%の回収率であり、この値は細管長によって変動する事がわかっている。今回の結果から Fe の一部はコロイド状の多核錯体を形成し全体としてわずかにチャージをもって泳動している事が確認された。講演ではその他の金属についても分取して得られた回収率などについて報告する予定である。

表-1 等速電気泳動法における電解液系

系	リーディング電解液	ターミナル電解液
A	NH_4OH pH 4.81	CARH pH 2.87
B	NH_4OH pH 4.41	CARH pH 2.87
C	NH_4OH pH 4.01	CARH pH 2.87
D	NH_4OH pH 3.79	CARH pH 2.87

注) pH緩衝剤は酢酸、CARH: 塩酸カルニチン、濃度は NH_4OH 、CARHともに20mM。

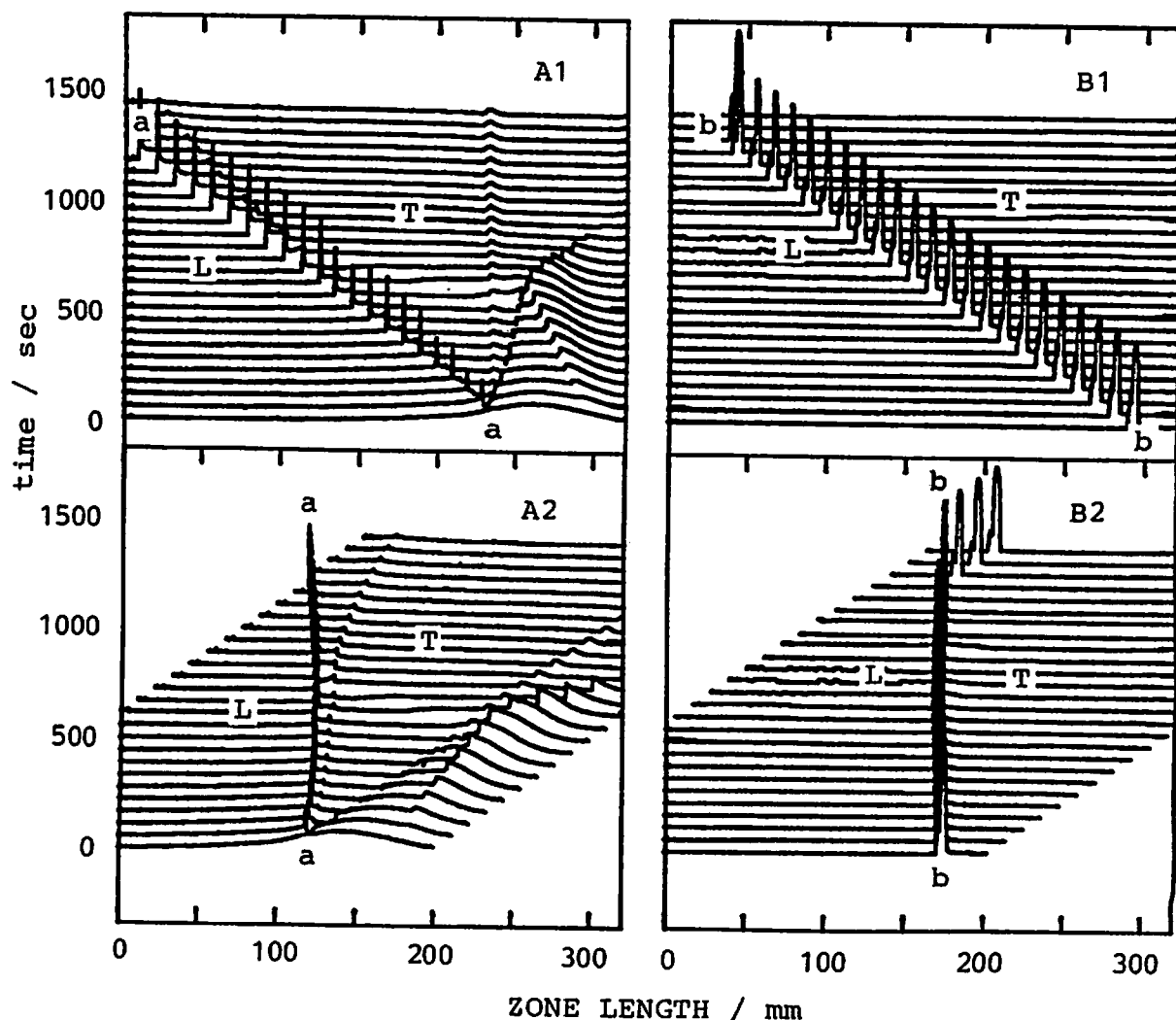


図-1 Fe^{3+} (A1)、 Rh^{3+} (B1) の分離挙動フェログラム

- 1) 第9回電気泳動シンポジウム要旨集、池田浩美、広川健、西山文隆、木曾義之(1989).
- 2) 第9回電気泳動シンポジウム要旨集、横田泰朗、広川健、西山文隆、木曾義之(1989).

ニホンウズラの卵白・卵黄ならび に血清蛋白質の各種電気泳動法に よる観察

専修大・吉田治弘

Electrophoretical Observation of Egg White, Yolk and Serum
Protein of Japanese Quail
Laboratory of Physiology, Senshu University
Haruhiro YOSHIDA

The contents of Japanese Quail egg white, yolk and serum protein were studied by means of the micro 2 dimensional (M2D)-PAGE, isoelectrofocusing (IEF)-PAGE and capillary type isotachopheresis (CITP). Results of M2D-PAGE and CITP were found fairly different between egg white and yolk, although various kinds of similar protein were discovered in yolk and serum. Protein polymorphism was observed in Pre-Tf zone of egg yolk in the pattern obtained by IEF-PAGE. Gene frequencies were calculated under the assumption of codominance and fair agreement between the expected and observed values was verified.

ニホンウズラ (*C.C.japonica*) は、小型の家禽で、飼育が容易で、産卵率も高く、かつ抗病性にも優れ、かつては愛玩用として、そして現在は実験動物として飼育されている。今回は、ウズラを用いた初期実験として、卵黄・卵白の蛋白質の電気泳動像の観察を実施し、併せて血清との比較を行った。

材料および方法

ウズラの卵は、市販のもの50卵および6羽のウズラから採卵した10個前後を使用した。まず、卵殻の気室側をカッターナイフを用いて円形に切除し、ピーカーに内容物を出し、希薄卵白をピペットで採取し、卵白として保存した。卵白は、使用に際しては、生食水で2倍に希釈して用いた。濃厚卵白を除去後、卵黄を生食水で2回洗浄し、2mlの生食水を加え、卵黄膜を破り内容液と攪拌し、試験管に採取した後、3000rpm、10分間の遠心上清を卵黄液として保存した。電気泳動は、細管式等速電気泳動は島津IP-3A型を用い、蛋白質の分析条件であるDelmotteらの方法により実施した。マイクロ2次元電気泳動 (M2D-PAGE) は、1次元目はpH3.8-8.5の等電点で、2次元目は4-17%のグラジエントゲルを用いた真鍋らの方法により実施した。等電点電気泳動 (IEF) はLKB2117マルチフォーを使用し、pH4-7などにより実施した。

実験結果

ウズラの卵白、卵黄のM2D-PAGEによる蛋白像は図1に示した様に、卵白はAlbの大きなスポットのすぐ上の小スポット、さらにAlbの上の2つのスポットおよびTfの3つのスポットが並んで検出された。卵黄はAlb付近に10個前後の蛋白質スポットとTfの2個

のスポットおよびIgG域の蛋白質が観察された。また、血清ではAlb, Pre-Tf, Tf, Ig G, IgM, α_2 Macroなどが観察された。これらの泳動像から卵白と卵黄には顕著な差異が認められ、卵黄に認められた相当数の蛋白は、血清にも見いだせた。IEFで卵白・卵黄を泳動したところ、図2に示す如くであり、卵黄はAlb域から1~10の分画に分類可能で、特に3、5域にはF型、FS型、S型の3型に分類可能な多型性が検出された。5域の2本のバンドに関して、50例を用いて出現頻度を検討したところ、F型:10例、FS型:24例、S型:16例であった。共優性遺伝子と仮定し、遺伝子頻度を算出したところ $5^F:0.44$ 、 $5^S:0.56$ となり、理論値と観察値は良く一致していた。この5域のバンドは田名部らの報告したPre-Tfと考えられる。この蛋白についてM2D-PAGEでどの位置に検出されるかについて、IEFを利用して5域を主に含有する分画を調整してM2D-PAGEで検討したところ、Albの右上方の3個のスポットの最も高分子のものと判った。CITPを用いた血清の観察は、主としてほ乳類で実施され、鳥類では余り例がなく、ここではウズラ血清の分析を実施し、Pre-Tfと思われる大きなピークをAlbの後に見だし、ほ乳類との顕著な差異を認めた。次に、卵白と卵黄のパターンではM2D-PAGEと同様に両者の顕著な差異を見いだした。これらのピークには一応番号を付け、現在例数を増して検討を続けている。

図2、卵白・卵黄のIEF泳動像

図1、卵白・卵黄および血清のM2D-PAGE像

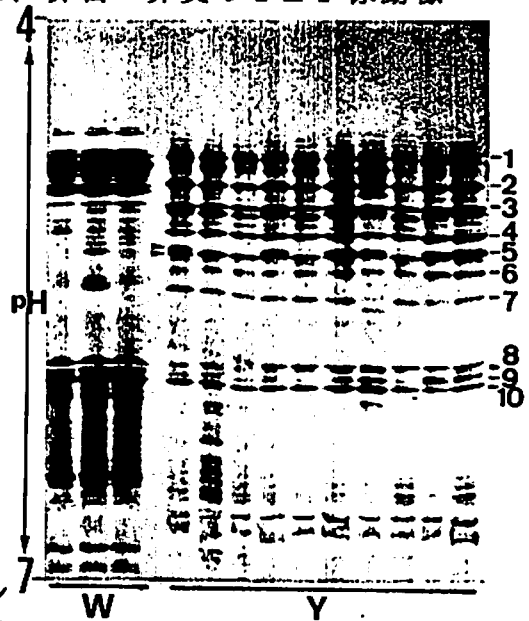
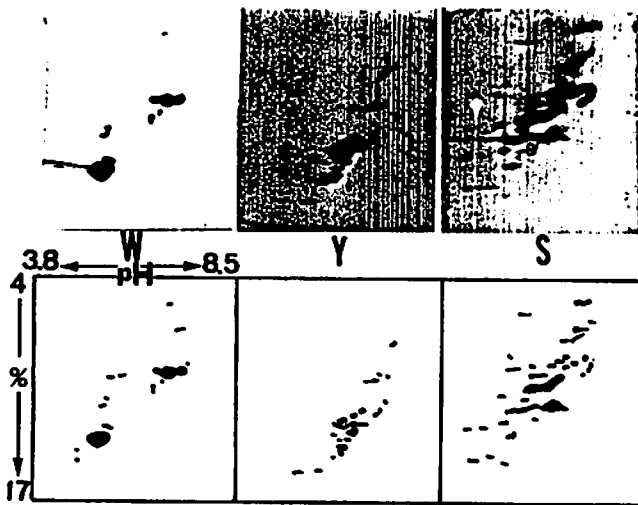
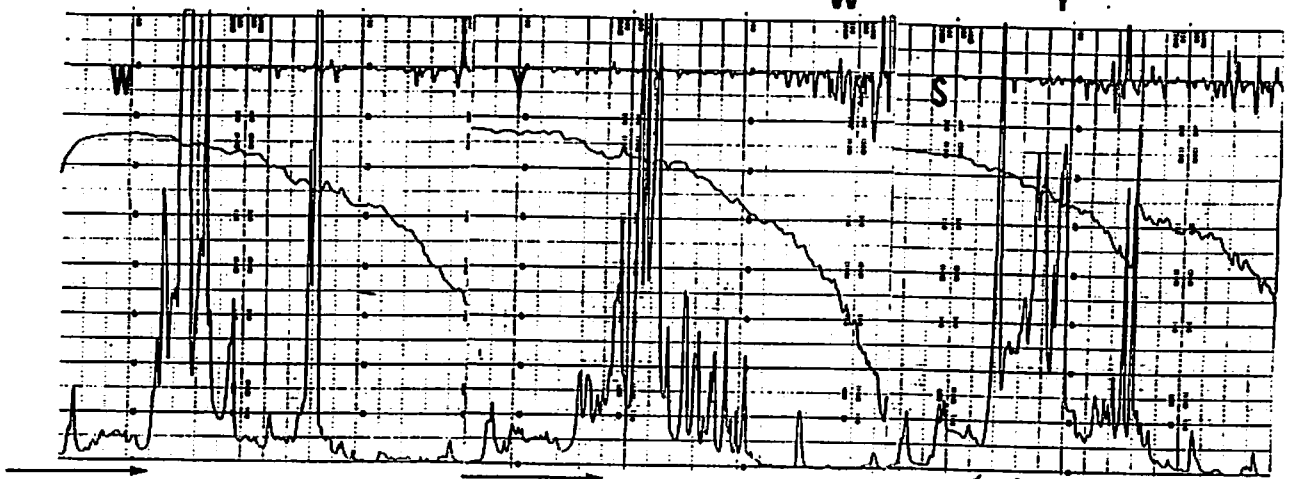


図3、卵白・卵黄および血清のCITPパターン



(広島大工) ○広川健・胡建英・木曾義之

1. 等速電気泳動法においては過渡状態および定常状態共にコンピュータシミュレーションが可能であり、その結果は分離条件の最適化に有効に利用できる。演者らは過去種々のモデルイオンや、実試料の分離過程を解析し、現在使用している分離過程モデルの妥当性を明らかにした。その結果等速電気泳動分離に影響を与える因子として電流などの他、移動度差や組成等の影響を明らかにする事ができた。

本シミュレーション法が有効に使用できるものの一例として分離に最適なpH条件の推定が挙げられる。しかし使用する分離過程モデルが厳密であるほどまた試料成分数が多いほど計算時間は長くなり、例えばMSPR (Modified Sample-Property-Reflecting) モデルを用いて6成分系試料を計算すると、一電解液条件に対して15分程度を要する (CPU: 80386-80387)。このように多くのpH条件で計算が必要な場合、より簡単で迅速な方式が必要である。2成分系モデルを隣あった試料に逐次適用する方法については既に報告したが今回は更に迅速化を計るため、定常状態に於けるゾーン長さ、実効移動度などの計算値¹⁾を使用して分離時間を算出する簡便法について報告する。

2. 2成分等モル混合試料A、Bを考える。定常状態における実効移動度の関係は $\bar{m}_A > \bar{m}_B$ とし、定常状態における Λ の時間に基づくゾーン長を t_A とする。このとき分離時間は次のような極めて簡単な式で表わすことができる。

$$t_{res. AB}(2) = \frac{\bar{m}_A + \bar{m}_B}{\bar{m}_A - \bar{m}_B} t_A \quad (1)$$

$$t_A = \frac{Fn}{i} (1 + m_0/m_A) \quad (2)$$

ここにFはファラデー定数、nは成分のモル数、iは泳動電流、 m_0 はpHバッファとして用いられるカウンターイオンの絶対移動度、 m_A は試料Aの絶対移動度である。本来1式に現われる実効移動度は混合ゾーン内の実効移動度であるが、これらを得るためには別途シミュレートする必要があり、迅速化の障害になる。代わりに定常状態の移動度で近似すると計算精度は悪くなるが、既に作成済みの定常状態の計算結果¹⁾が使用でき、ファイルからの数値読み取りと泳動順の計算をおこなうだけで良い。泳動順は次の2条件が満たされている場合A、Bの順に泳動する。

$$\bar{m}_{A, pH_A} > \bar{m}_{B, pH_A}, \quad \bar{m}_{A, pH_B} > \bar{m}_{B, pH_B} \quad (3)$$

\bar{m}_{B, pH_A} および \bar{m}_{A, pH_B} を別途計算してこの関係をチェックするのに若干の時間を要するが、 \bar{m}_{A, pH_A} 、 \bar{m}_{B, pH_B} 、 t_A は改めて計算する必要はなく、総じてきわめて短時間の間に分離順と分離時間を計算できる。

ひろかわたけし、こけんえい、きそよしゆき

3. モデル試料としてSPADNS, モノクロロ酢酸、ピクリン酸、酢酸4成分の等量混合液を使用した。図-1に55種の電解液条件について本簡便法で得られた解析結果、図-2にリーディング電解液のpHを4.4, 4.8, 6.0と変化させて得られた分離過程のフェログラムを示す。測定には我々の研究室で製作した走査型UV検出装置を使用した。測定結果と推定値の誤差は組合せにより30%程度あるが常に推定値が大きい。計算に数分程度しか要しない事を考えるとこの程度の精度でも十分実用的であるといえる。

現在約500種の試料については試料の移動度やpKaなどが既知であり、本法による分離最適化が適用可能である。

図-2 走査型UV検出装置によるSPADNS, モノクロロ酢酸、ピクリン酸、酢酸の分離過程フェログラム。L: 5mM HCl/ ϵ -aminocaproic acid(pH=4.4), creatinine(4.8), /histidine(6.0)

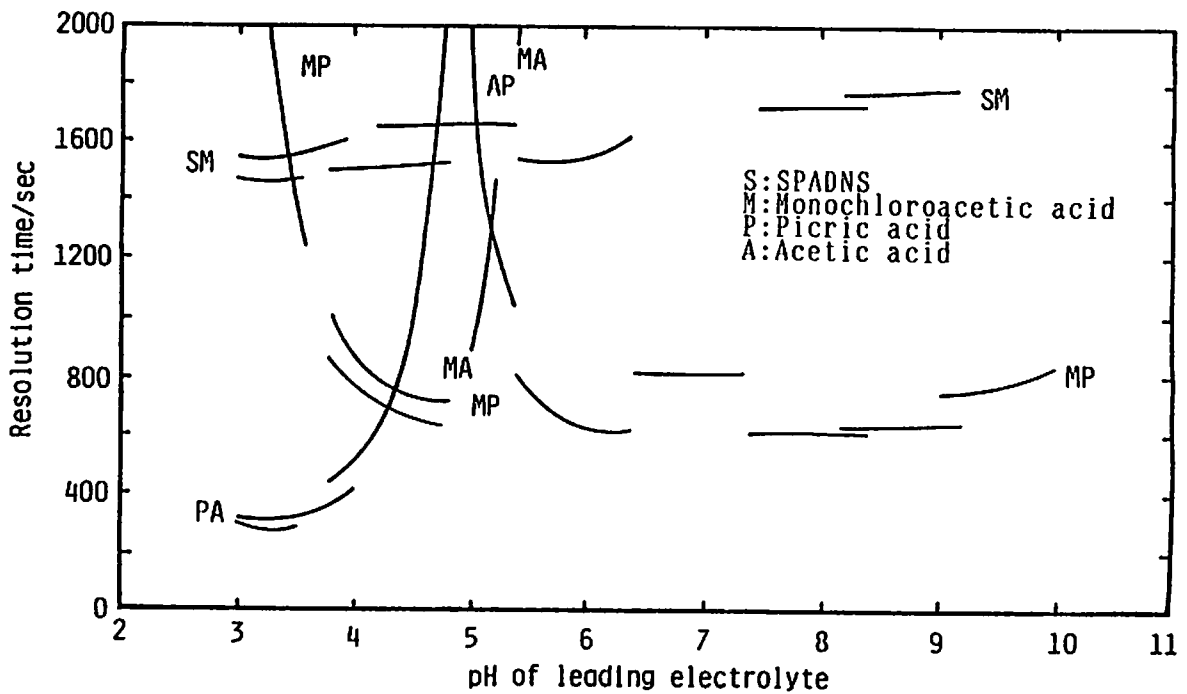
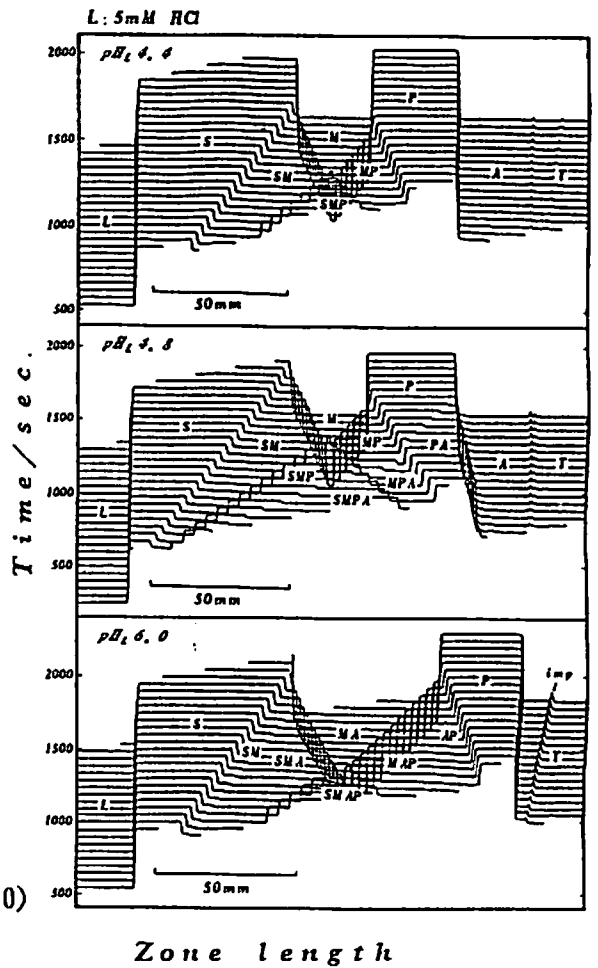


図-1 簡便法による推定分離時間 (各25nmol、泳動電流50 μ A)

1) T. Hirokawa, M. Nishino, N. Aoki, Y. Kiso, Y. Sawamoto, T. Yagi and J. Akiyama, J. Chromatogr., 271 (1983) D1-D106.

(広島大工) ○渡辺和彦、中西謙治、広川健、木曾義之

(カレル大理) Bohuslav Gaš、Jiri Vacík

1.我々は等速電気泳動法(CIP法)の定性指標をシミュレートしてイオンの移動度、解離定数を算出する方法について報告し、多くの試料についてこの方法の妥当性について確認している。キャピラリゾーン電気泳動法(CZE法)もCIP法と同様に物理化学定数の決定法として使用できるので、現在そのための実用的な解析法およびソフトウェアの作成を試みている。CZE法ではCIP法で測定困難な極端なpH条件での測定も可能になるはずである。今回CZE法を用いて移動度やpKaが既知の有機酸を試料として解析を試み、方法の妥当性について検討したので報告する。

2.CZE法では試料の注入量やpHによって泳動初期の泳動速度に微妙な変化が生じる場合がある。そのためある程度泳動した後に速度を測定する方が望ましい。今回、32個のUV検出器を約5mm間隔で分離管に沿って配列し、泳動速度一定の状態を確認できる検出装置を使用した¹⁾。光源としては重水素ランプを使用し、色ガラスフィルター(λ_{\max} : 330nm)を併用した。本装置は本来CIP用で、分離用細管はFEP製チューブ(0.5mm i.d., 1.0mm o.d.)の比較的太い管を用いている。そのためCZEでは拡散の影響が大きくやや不利である。検出感度はさほど良くないが32個のUV検出器が配列してあるため試料の泳動状態を追跡でき、それぞれの検出器の位置での泳動速度が直接測定できる利点を持つ。

実験に使用した支持電解液には1mMピクリン酸を用いたがこれはピクリン酸自体が強い吸収を持つため、吸収を持たない試料の解析に適しているからである。試料には予備実験として移動度既知のpKa 3.5~5.0の有機酸(ギ酸、酢酸、プロピオン酸、安息香酸、カブロン酸、グルクロン酸)及び次亜リン酸を各1nmol注入した。電解液条件を変えpH 4.55、pH 5.0、pH 6.0のピクリン酸とし緩衝剤にはそれぞれ、 ϵ -アミノカブロン酸、クレアチニン、ヒスチジンをを用いた。粘性剤として0.1wt%のHPCを添加した。

3.実際に得られたフェログラムを図-1に示した(泳動電圧:10kV)。試料の泳動ゾーンは支持電解液の泳動速度よりも速いか遅いかによって変化し、両者とも拡散係数の関与しないリーディング側界面を泳動速度の指標とする。

試料の実効移動度を求めるために酢酸をスタンダード試料とし、それぞれの試料の泳動速度から実効移動度を算出した結果を理論曲線上にプロットしたのが図-2であ

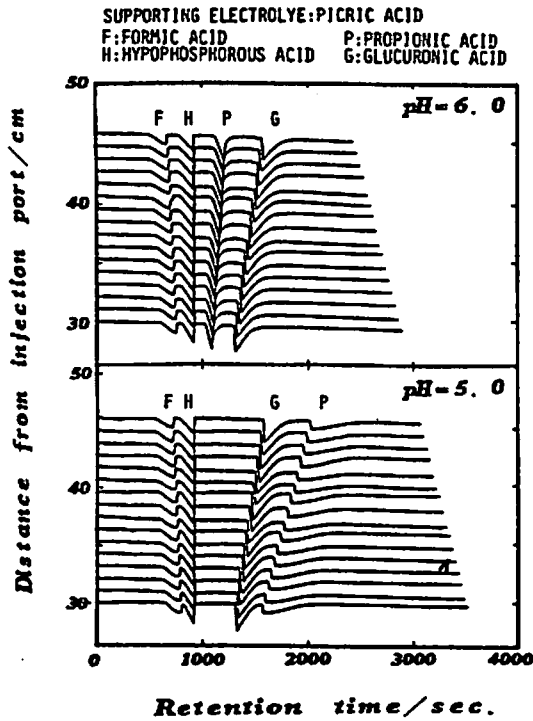


図 - 1 4種混合試料の UVスペクトル

る。これからギ酸、次亜リン酸が下方にシフトしているのに対して他の4試料はほとんど理論値と一致していることがわかる。

この原因はギ酸、次亜リン酸の移動度が支持電解質であるピクリン酸の移動度より大きく、拡散係数の寄与のない界面が明確でないためである。この次亜リン酸、ギ酸を除く4試料の絶対移動度、解離定数を算出し、表-1に示した。これから絶対移動度、解離定数ともかなりの精度で算出可能であることがいえる。

移動度、pKaともに電気泳動では最も重要なパラメータであり、理論的な取扱いには欠くことができない。現在、極端なpHでの測定が必要なアミノ酸やペプチドに関しても有機酸と同様な方法を開始している。なおCIP法でPGDを使用して得たデータをHFCLD(高周波非接触伝導度検出器)を用いて再測定し、妥当性を検討している。これらの結果についても一部報告する。

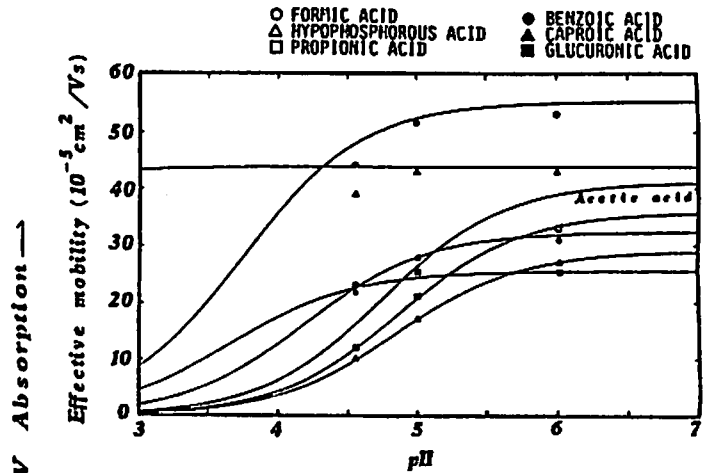


図 - 2 pH - \bar{m} 理論曲線と実測プロット

表 - 1 弱酸の m_0 、pKa 値
 Evaluated mobility and pKa

Acids	mobility (lit.) [*]	pKa (lit.)
Glucuronic	27.1 (26.7)	3.677 (Fixed)
Propionic	36.4 (37.1)	4.851 (4.874)
Benzoic	32.9 (33.6)	4.219 (4.203)
Caproic	29.8 (30.2)	4.837 (4.857)
Acetic	(42.4)	(4.756)
Picric	(31.5)	(0.762)

* $10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$

1) 中原清、広川健、木曾義之、第7回細管・電気泳動シンポジウム、(1986)。

(広島大工) ○大森昭浩、広川健、木曾義之

1. 一般にマトリックス中微量成分の分析は、ほぼ等量の混合試料の分析とは違って支障を来すことが多い。キャピラリ電気泳動においても状況は同じで、微量成分の分離過程を明らかにすることは、実試料の分離最適化にあたって極めて重要である。演者らは第9回電気泳動シンポジウムにおいて、細管式等速電気泳動法(CIP)における微量成分の分離過程についてその理論とシミュレーションの結果を報告した¹⁾。

CIPでは界面の自己保持作用があるため原理的にはいくら長い時間泳動させても分離後のゾーン長は一定であり、本質的にマトリックス中の微量成分の分析に有利であると考えられる。しかし、電位勾配検出器などの汎用検出器から得られるフェログラムでは、検出器の感度などの影響で微量成分を正確に定量するには問題点が多い。そこで今回、モデル試料を用いてCIPにおける微量成分分離の特徴と問題点を明らかにし、シミュレーションの妥当性を確認することを目的とした一連の実験を行ったので報告する。

2. モノクロ酢酸(M)、ピクリン酸(P)、SPADNS(S)の3試料を選び、それぞれMP、SMの組み合わせで成分比を1:100~100:1の範囲で変化させた2種混合物をモデル試料とした(総濃度10mM)。この試料はその成分比が極端なとき一方が他方に対して微量成分となり、UV吸収の有無でゾーンの界面を判別できるように考えたものである。リーディング電解液(L)は5mM HClで、 $pH_L = 3.6$ (β -アラニン)に調整し、粘性剤として0.1wt% HPCを添加した。ターミナル液(T)としては10mMカブロン酸を使用した。なお試料溶液のpHもリーディング液と同様に3.6に調整した。

装置は、本研究室で製作した32ch-UV検出装置²⁾とIP-2A(島津製作所)を使用した。前者は、分離管160mmの間にUV検出器が32個約5mm間隔で並べてあり試料の分離過程が追跡できるようになっている($\lambda = 330\text{nm}$)。分離管は内径0.5mm、外径1.0mmのFEP製チューブを使用している。得られたデータはA/Dコンバータを介してパーソナルコンピュータで取り込み、分離時間、界面速度、ゾーン長などのデータ処理を行った。後者については、分離管は内径0.5mm、長さ450mmのPTFE製チューブ、検出器は電位勾配検出器を用いた。

3. 図-1にM:P=10:1の試料についてIP-2Aを使用して得られたフェログラムを示す。L、M、P、Tは各電解質ゾーンを示しており、10~120nmolまで注入量を変化させた。Mのゾーン長は注入量に比例して増加しているのに対し、P

おおもりあきひろ、ひろかわたけし、きそよしゆき

のゾーン長の増加は確認しにくい。次に、このフェログラムを解析して得た検量線を図-2に示す。図のPの検量線には変曲点がみられる。これは、注入量約50nmolまでは試料は定常状態に達し分離は完了しているが、それ以上の注入量ではこの分析条件では分離不可能であることを示している。図-1のようなフェログラムを解析する際に問題となるのは、MP混合ゾーンの存在に気づかないまま定量してしまうことにある。このような試料系で生成する混合ゾーン(MP)の諸性質はマトリックス成分のゾーン(M)と酷似しているため、電位勾配検出器によるフェログラム上で定常状態になっているかどうか(混合ゾーンが解消しているかどうか)を確認しにくい。次に、図-1と同じ試料を同一の電解液条件で32ch-UV検出装置を使用して得たフェログラムを図-3に示す(試料総量35nmol)。横軸はゾーン長を、縦軸は試料注入口から検出器までの距離を表している。MPと示した三角形の部分

が混合ゾーンである。図から混合ゾーンが解消していく過程がよくわかる。本装置のような多チャンネルの検出器を使うと、UV吸収の有無や検出感度の制約はあるが、試料の分離過程が追跡できる。よって、定常状態に達したか否かが確認でき、先の問題点は回避できる。講演では32ch-UV検出装置を使用したモデル試料の分離過程解析結果を示し、シミュレーションと比較検討した結果及び、CZEによる微量成分の分離についても報告する。

文献

- 1) 第9回電気泳動シンポジウム講演要旨集、広川健、横田泰朗、木曾義之(1989)。
- 2) T.Hirokawa, K.Nakahara and Y.Kiso, J.Chromatogr.,463(1989)39.

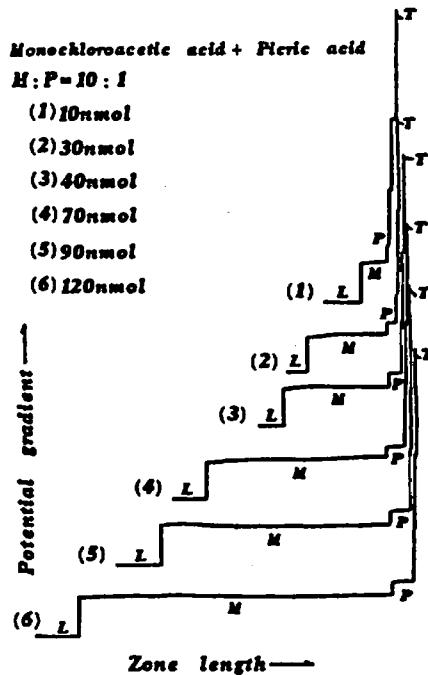


図-1 実測フェログラム (IP-2A)

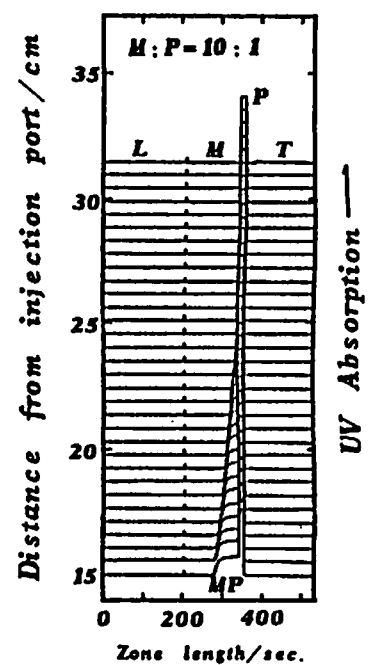


図-3 実測フェログラム (32ch-UV検出装置)

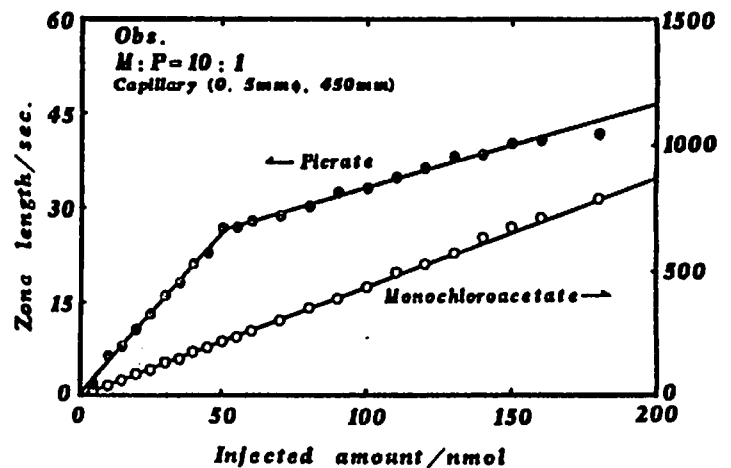


図-2 検量線 (泳動電流 = 50 μA)

(広島大工) ○木曾義之, 広川健, 西山文隆, 胡建英, 吉田智, 上田美喜

1. 現在原子力発電所で核燃料として ^{235}U が使用されている。この ^{235}U が燃焼時放出するエネルギーは発電に利用されるが、燃焼(核分裂)してもUとほぼ同量の核分裂生成物(FP)が使用済み燃料中に残留する。通常の燃料中では可燃性の ^{235}U は数%のもので、96~7%のほとんどは不燃性の ^{238}U である。この ^{238}U は燃焼中(n, γ)の捕獲反応により、Pu, Am, Cmのような長半減期の超ウラン元素を生成する。また燃料要素の被覆物として、ジルコアロイや、ステンレスなどの構成元素も、再処理廃液中に混入している。有用なRu, Rh, Pdのような希金属元素、及びLa, Ce, Pr, Nd, Pmを多量に含有しているため、まずこれら有用な元素を ^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{95}Zr のような高レベルの放射性核種の汚染なく回収することが先結問題である。ついでRu, Rh, Pdと希土類元素を回収したい。本講演では核燃料再処理液からの有効元素の電気泳動的回収に関する基本的な問題について検討する。

2. 図1は50gFP/lの濃度(使用済み燃料1年後)を示したものである。これら元素中には ^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{95}Zr , ^{106}Ru などの高レベルの放射性核種が長半減期のため共存する。このためこれらFP廃液の分離過程には放射線の防御の問題や分離に使用する試薬の放射線分解などの問題がある。このようにFP元素の種類は多く、第VIII族のように電気泳動的に興味深い元素も多く含まれている。これら全部を連続電気泳動により、能率良く

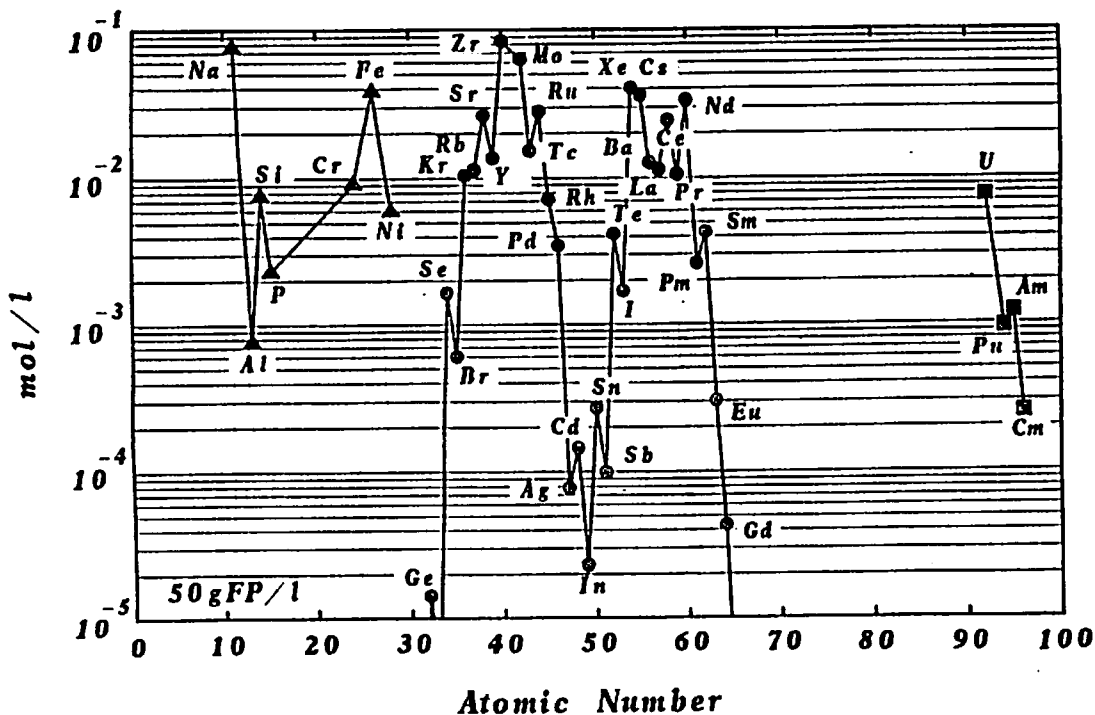


図-1 59gFP/lの濃度(使用済み燃料を1年後に再処理したもの)

きそよしゆき, ひろかわたけし, にしまふみたか, こけんえい, よしださとし, うえだみき

分取するのが最終的な目的であるが、現在のところこれら元素の化学形も、硝酸溶液中でどのようなものであるか未知のものがかなりある。表1にFP核種のカチオンとアニオン種をまとめて示した。手初めに処理廃液と同組成の希土類模擬混合液を等速電気泳動分離した。ゾーン長さで定量するにはやや組成が偏っているため、分取したフラクションをPIXE分析した(IP-PIXE)。

3. 図-2は総量150nmolの希土類模擬試料を40フラクションに分取したものである。最も多いNdで52.2nmol、Gdは1.2nmolである。使用したリーディング電解液は20mMNH₄OH、錯形成剤としてα-HIBを10mM添加後、酢酸を加えてpHを4.8とした。泳動電流は150μA、使用したCoupled columnとしては内径1mmのPTFE管を16cm、0.5mm管を25cm使用した。ゾーンの全長は時間で330秒、一フラクションは約8秒である。

現在これらの希土類にRhなどを加えた模擬試料の分取とPIXE分析を試みている。結果については講演で報告する予定である。

表-1 FP核種のカチオンとアニオン種

カチオン	1価イオン	Cs ⁺ , Rb ⁺ , (Na ⁺), Ag ⁺
	2価イオン	Sr ²⁺ , Ba ²⁺ , (Ni ²⁺), Cd ²⁺ , Sn ²⁺
	3価イオン	La ³⁺ , Ce ³⁺ , Pr ³⁺ , Nd ³⁺ , Pm ³⁺ , Sm ³⁺ , (Al ³⁺ , Fe ³⁺)
アニオン	1価イオン	I ⁻ , IO ₃ ⁻ , Br ⁻ , BrO ₃ ⁻ , SbO ₂ ⁻ , HSnO ₃ ⁻ , TeO ₄ ⁻
	2価イオン	SeO ₃ ²⁻ , SeO ₄ ³⁻ , TeO ₃ ²⁻ , MoO ₄ ²⁻ , ZnO ₂ ²⁻

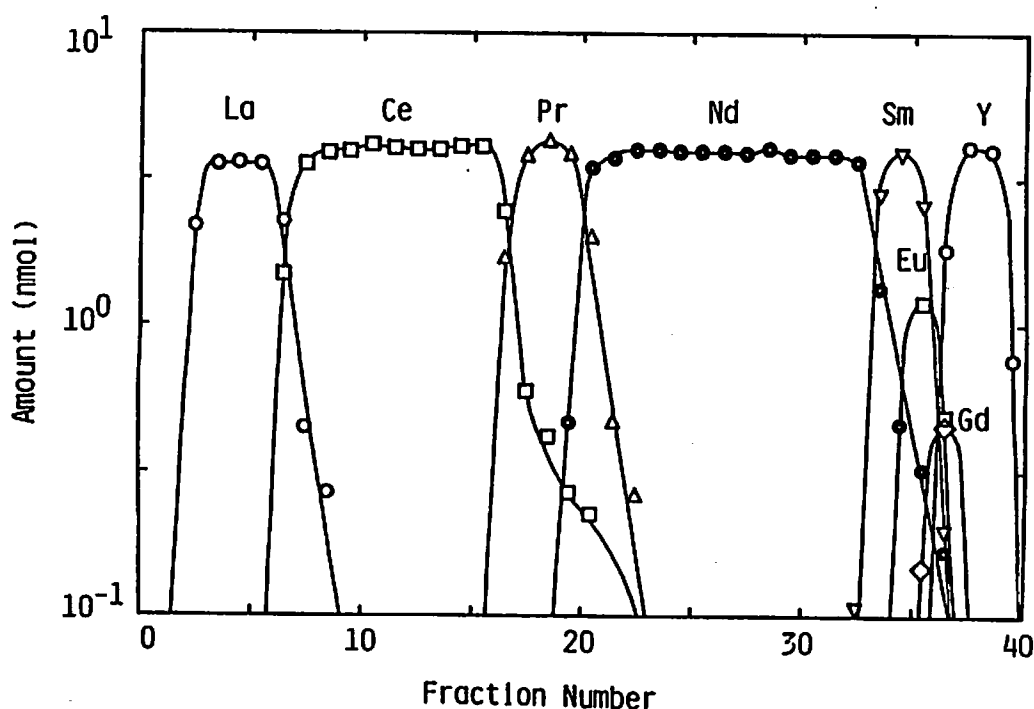


図-2 希土類模擬試料(150nmol)の分取結果

USE OF RECTANGULAR CAPILLARIES FOR CAPILLARY ZONE
ELECTROPHORESIS¹⁾

Nagoya Institute of Technology Takao Tsuda

Stanford University Jonathan V. Sweedler and Richard N. Zare

Capillaries with rectangular cross section are demonstrated to have a number of advantages compared to circular cross-sectional capillaries for capillary electrophoresis. Rectangular capillaries provide much greater heat dissipation than conventional circular capillaries; therefore, larger volume capillaries can be used while obtaining high quality separations. High resolution electrophorograms are obtained with a variety of square and rectangular borosilicate glass capillaries ranging in size from 16 by 195 μm to 50 by 1000 μm .

1) Takao Tsuda, Jonathan V. Sweedler, Richard N. Zare,

Anal. Chem., 62 (1990) 2149-2152.

キャピラリー電気泳動において従来 2-200 μm の直径の円断面をもつキャピラリーチューブがカラムとしてもちいられてきた。50 μm のカラムにおいては試料注入量は2-20 nlで非常に少ない。これは微量試料の取扱いが進めば非常に有効であるが、現在では注入法が未発達でありまた微量前処理があまり発達していないのでこの点をいやすことができていない。断面積を増せば ①: より多量の試料が注入できる。②: 検出できる最小試料濃度の限界が上げられる。などの有利な点があるが ③: 熱放出 ④: ゾーンの広がり心配される。⑤: 新しい試料注入法の開発 ⑥: 電流量の増加などの検討が必要になってくる。

長方形断面が20 x 200 μm 、30 x 300 μm 、50 x 500 μm 、50 x 1000 μm 等のキャピラリーカラムが市販されている (Wilmad)。

Joule熱の放出について円筒断面は直径が大きくなると中心よりの熱の放散には適さしてなく 中心より壁面への温度分布より熱対流が生じることが予想される。これが比較的大きな直径をもつ円断面キャピラリーカラムにおいては分離能が50-100 μm 直径に比べて劣る一つの原因となっているのであろう。

長方形断面は中心部から壁面までの距離が短く熱拡散にできている。長方形の一边が50 μm であればこれは熱放出において直径50 μm の円断面のキャピラリーカラムに劣るとしても 直径100 μm の円断面のキャピラリーカラムとほぼ同等の熱放出

ができよう。

ゾーンの広がりについては二つの方法で検討した。すなわち(1)長方形カラムを顕微鏡下に設置しゾーンの広がりを観察する(2)各種カラムを用いて得られる理論段高を測定する。(2)の結果について Fig. 1 にしめた。Fig. 1 に(A) 27x340 μm の長方形断面 (B) 52 μm 正方形の断面 (C) 51 μm の円筒断面のキャピラリーカラムを用いたときのそれぞれのピークを比較してみた。長方形断面でも充分狭いゾーンがえられることがわかる。また顕微鏡観察からゾーンのフロントの形は非常にシャープで50 x 1000 μm においても注入法が適せつであれば問題がないことがわかった。これらにより得られた分離の典型例を Fig. 2 にしめた。

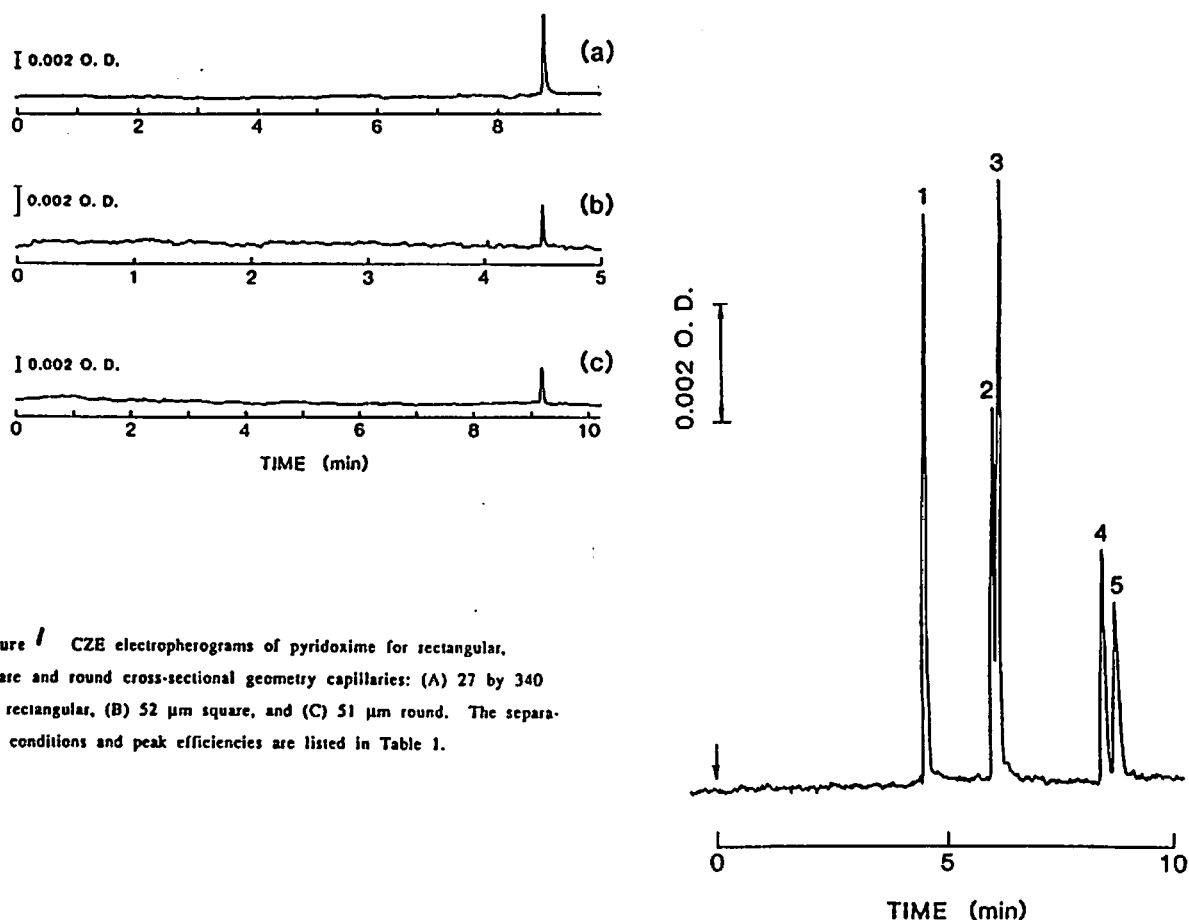


Figure 1 CZE electropherograms of pyridoxime for rectangular, square and round cross-sectional geometry capillaries: (A) 27 by 340 μm rectangular, (B) 52 μm square, and (C) 51 μm round. The separation conditions and peak efficiencies are listed in Table 1.

Figure 2 CZE electropherogram of (1) pyridoxime and (2) dansyl L-serine, each at 4.2×10^{-5} M, using two different detector arrangements of the rectangular capillary in the UV/Vis absorbance detector. In (A), the capillary was positioned so that detection was across the 50 μm axis of the capillary, and in (B) and (C), across the 1000 μm axis of the capillary. In (B), the electropherogram is recorded using the same detector sensitivity as in (A) and the peaks are off-scale, while in (C), the sensitivity has been reduced by a factor of 5.

キャピラリーエレクトロクロマトグラフィーにおける試料注入法

医理化機器、○安部 喬、鶴田 久生

(財)体質研究会、国際解析研究所、花井 俊彦

Sample Injection method in Capillary Electro Chromatography

○ Takashi Anbe and Hisao Tsuruta (IRICA Instruments Inc.,)

T. Hanai (Int. Inst. Technol. Anal., Health Res. Fond.)

The instrumentation of capillary electro chromatograph is simpler than that of capillary liquid chromatograph as there is no need for high pressure operation. The separation power is extremely better than other chromatographic systems, However, the injection method is still under developing and the further development is expected for quantitative analysis by CEC. The split and splitless injection method is developed and the system is examined for practical use.

1. はじめに

キャピラリーチューブをカラムとし、電解質を含む水溶液をキャリアー溶液として用い、そのカラムの両端に電圧をかけて電気力でキャリアーをカラムの中を流すことによって高い分離能を持つクロマトグラフィーを行なうことができるが、現在の装置では定量分析が難しいといわれている。ここでは、定量分析を精度良く行なうための基礎的な検討として試料の注入法を比較検討した。

2. 実験

直流電源、医理化モデルE11は最大電圧25kV、最大電流600 μ Aで安全制御回路付き。紫外吸収は医理化モデルE873にモデルE2704Aマイクロフローセルを付けて測定した。溶融石英キャピラリーカラムはSGE社製、内径50 μ mチューブを50cmの長さに切って作り、注入口から30cmの所をオンカラムのフローセルとした。マルチチャンネルカラムは同じ長さのチューブを束ねて作った。

キャリアーは0.05M 磷酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に5%メタノールを加えて作った。試料はダンシルアミノ酸である。

キャピラリーエレクトロクロマトグラフの模式図を図1に示す。

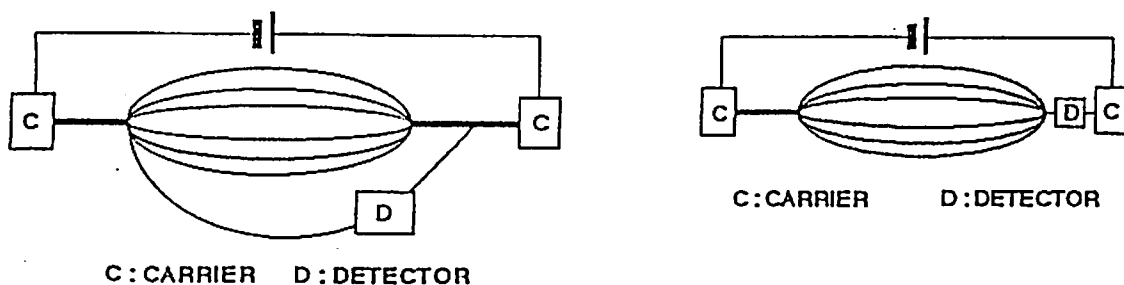


Fig. 1-A Multi-channel column CEC, A: split injections system, B: splitless injection system

3. 結果及び考察

微量の試料を注入する方法の一つとして、スプリット注入法がある。このスプリット注入法をキャピラリーエレクトロクロマトグラフィーへの適用を検討するために、マルチチャンネルカラムを作り、それを使った場合のシステムを検討した。図1-Aでは、マルチチャンネルカラムの内一本を検出器を通してからキャリア槽にいれ、図1-Bではマルチチャンネルカラムをフローセル用チューブとナノコネクタで接続して実験を行なった。キャピラリーを束ねると、キャピラリーカラム一本の場合よりマルチチャンネルの抵抗が小さくなり、 $V=IR$ の式より、電圧(V)が一定だとすると、電流(A)が高くなる。このため、どれぐらい大きなスプリット比を取れるかどうかはキャリアの組成にもよるが、直流電源の最大アンペア数にも依存する。例えば、図2に示すように、カラムを7本束ねたカラムでは275 μ Aも電流が流れた。束ねられるカラム数が多いほどインジェクターを作ることは容易ではあるが、電源の能力をどの程度に設定するのか問題である。図1-Bのスプリットレス注入法では図3のクロマトグラムに見られるように、フローセル側のチューブの断面積に合わせて作らないとピークの分離を悪くするので注意が必要である。これは、高圧送液法の液体クロマトグラフィーと違って電気力で送液する場合には試料ゾーンが拡散しないで移動するために、フローセルの細いチューブ内で試料が飽和したことによると思われる。

他方、水溶液の標準試料と蛋白質を含む実試料とでは試料溶液の粘度が違うので注入量が一定にならない等の問題点もある。

今後とも定量分析が可能な試量注入法の開発に努力したい。

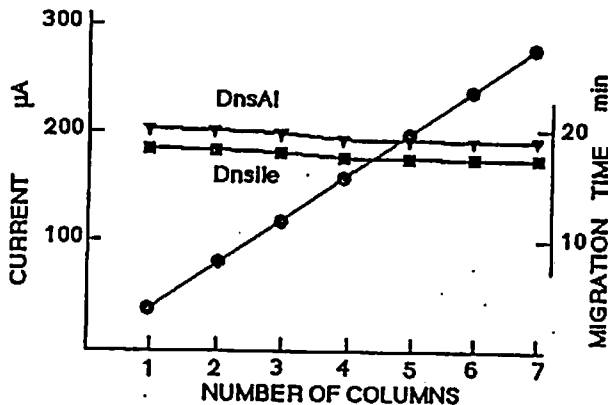


Fig. 2 Relation between current and number of columns

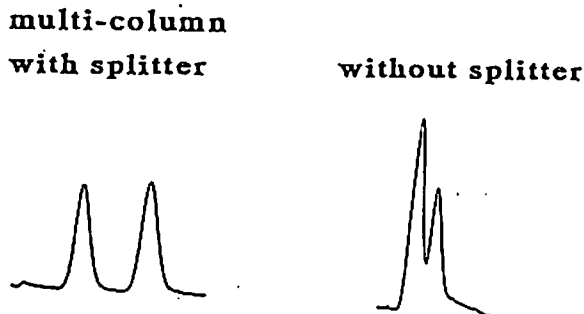


Fig. 3 chromatograms obtained by different injection methods

キャピラリー電気泳動における試料成分の定量法

(ベックマン株) ○船串佳世、町田明子、佐藤 隆

QUANTITATION OF SAMPLE COMPONENTS IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Beckman Instruments (Japan) Ltd.

Kayo Funakushi, Akiko Machida, Takashi Satow

The quantitation aspects of peptides on capillary electrophoresis were investigated. In the calibration curve method, the reproducibility of the sample injection plays the essential role, which was in the range of $CV=\pm 0.7\%$. In the internal standard method, the correction of the peak area by the migration time was theoretically expected to play the important role. The results, however, did not well meet the theory, which suggests the existence of the other factor(s) which affects the peak area.

A. はじめに

過去十年の間、多大なる研究努力が高性能キャピラリー電気泳動 (HPCE) 法の確立のために為されてきた。その結果、高速分離や高分離能、高い再現性、微量試料といった、本法固有の特徴が十分に利用できるようになってきた。また最近に至り数社から装置が市販されるようになったため、本分離法を分離メカニズムの研究ばかりでなく、実際の微量試料の分析や試料中に含まれる微量混入物の定量のために広く利用できるようになってきた。試料成分の定量のためには、通常次のような方法のいずれかが分析目的により使い分けられている。

1. 既知濃度の目的物質を用い、検量線を作成する。
2. 内/外標準を用い、これらとの相対比を求める。
3. 全試料成分に対する存在比を求める。

ところが、各装置メーカーからの繰り返し再現性のデータを除き、定量方法/定量性に関するデータはほとんど無いのが現状である。今回の報告では、上記方法のうち検量線法と内標準法を検討したので報告する。

B. 実験方法

装置：フューズドシリカ管 (ノンコートタイプ、 $75\mu\text{m}\phi \times 50\text{cm L}$) を装着したベックマン P/ACE SYSTEM 2000 全自動キャピラリー電気泳動システムを用い、オンカラム検出法で紫外吸収 (200 nm) を測定した。得られたデータはベックマンシステムゴールドソフトウェアで解析した。電解液としては 100 mM ホウ酸バッファ pH9.2 を使用 17.5kV、25°C で電気泳動を行った。試料はガス圧を用い、5 秒又は 20 秒間注入した。

試料：Bradykinin 及び Angiotensin I をそれぞれ 1mg/ml となるよう、0.1%TFA に溶解したものを用い、Bradykinin 100 μ g/ml と任意濃度の Angiotensin I を含む試料を調製した。

C. 結果及び結論

ピーク面積法を用いて、検量線法、内標準法を検討した結果、次の様な知見を得た。

1. 検量線法による定量

目的物質の純品が得られる場合には、オートサンプラを用いた自動運転と専用データ処理システムの使用により、検量線を自動的に作成し、目的物質の定量を行うことができる。この場合の測定精度は、試料注入の再現性に強く依存しており、最適な条件下で十分注意して実験を行えば、CV=±0.7% 程度の繰り返し精度を達成できる。また、本システムにおける検出限界は 50fg (0.5 μ g/ml, 100 nl: S/N>3, 図1) であった。

2. 内標準法による定量

HPCE では、HPLC 等の分析方法とは異なり、各試料成分ゾーンのディテクタ部通過速度が異なるため、直接面積比較をすることはできない。面積補正そのものは、理論的には内標と目的物質のピーク面積をそれぞれの移動時間で割り、ノーマライズしたうえで、さらに吸光度係数で割ればよい。しかし、このようにして求めた値は実際の混合比から予測される値とは大幅に異なっていた (表1)。したがって、異なる分子種の見かけの存在量を決定する未知の要因が存在すると思われる。いくつかの可能性について検討した結果を紹介する。また、純度検定においては、しばしば存在比という形の表現が用いられる。この場合も内標準法と同様の補正が必要となろう。

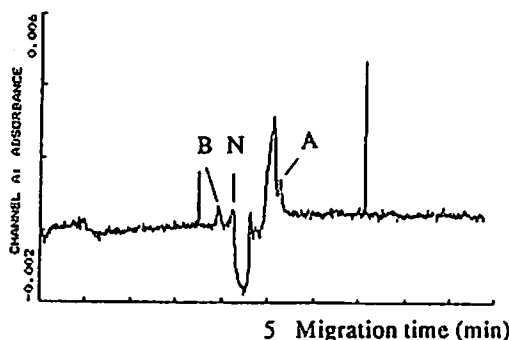


図1、ペプチドの高感度分析

Bradykinin 及び Neurotensin、Angiotensin I を各 0.5 μ g/mL 含む試料 100nL を注入し、電気泳動を行った。

B: Bradykinin、N: Neurotensin、A: Angiotensin I
Angiotensin 直前のピークは試料中の不純物。

表1、内標準物質に対する面積

実存在比	実面積値	補正值
10.0%	10.6%	8.7%
50.0%	52.3%	43.2%
100.0%	106.2%	87.1%
250.0%	258.6%	212.3%

実存在比は、Bradykinin 100 μ g/mL に対する Angiotensin I の存在比率を示す。実面積値は electropherogram より求めた実際のピーク面積、補正值は migration time と吸光度補正をしたときの面積比率をあらわす。試料注入時間は5秒。

14 キャピラリー電気泳動における試料中の塩のペプチド分離に及ぼす影響

(ベックマン株) ○町田明子、船串佳世、佐藤 隆

THE EFFECTS OF THE SALTS IN THE SAMPLE ON THE SEPARATION OF PEPTIDES IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Beckman Instruments (Japan) Ltd.

Akiko Machida, Kayo Funakushi, Takashi Satow

The effects of the salt concentration in the sample zone on the separation of peptides by HPCE were investigated. In the alkaline run conditions with 100 mM run buffer, 30 mM salts at Ca. 120 nl injection showed acceptable resolution with the highest practical sensitivity. The highest salts concentration in the sample could be altered by manipulating the concentration of run buffer.

A. はじめに

高性能キャピラリー電気泳動 (HPCE) 法による分析を行う場合には、試料溶液中に高濃度に存在する塩や緩衝液の影響により、しばしば分離度が低下したり、ピーク形状が著しく変形したりする現象が現われる。イオン交換 HPLC により分離・精製されたペプチドのような試料中には、数百 mM 以上の塩が含まれていることが多いが、試料の損失を考えると HPLC 分析のために脱塩操作を行うのは有効とは言えない。我々は、試料を脱塩せずに期待する分析結果を得る手段として、次の 2 種類の方法を検討した。

- 1) 試料を水で希釈して実質的な塩濃度を下げたのち、感度を高めるために大量に注入する。
- 2) 緩衝液の濃度を上げて泳動電解液のイオン強度を高め、電場の強さを維持する。その結果いくつかの知見を得たのでここに報告する。

B. 実験方法

装置：ヒューズドシリカ管 (ノンコートタイプ、75 μm ϕ \times 50 cmL) を装着したベックマン P/ACE SYSTEM 2000 全自動キャピラリー電気泳動システムを用い、オンカラム検出法で紫外吸収 (200 nm) を測定した。

分析条件：電解液としては 50 ~ 200 mM のホウ酸緩衝液 pH 9.2 を使用し、泳動電圧 17.5 kV、カラム温度 25 $^{\circ}\text{C}$ で電気泳動を行った。試料注入にはガス圧を用い、1 ~ 33 秒間注入した。

試料：Bradykinin、Neurotensin、Angiotensin I を含む 0.1% TFA 溶液に 0 ~ 100 mM の NaCl を添加して調製した。ペプチドの最終濃度はいずれも 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。

C. 結果

1) 試料の希釈と注入量について

電解液の濃度が 100 mM のとき、NaCl 濃度が 0 ~ 30 mM の試料を良好に分離 (Bradykinin と Neurotensin の分離度 ≥ 1) できる最大注入量は 20 秒 (約 120 μ l) であった (Fig.1)。しかし、NaCl が 60 mM 以上のときには、注入量を減らしてもピーク形状の変形が起り、分析不可能であった (Fig. 2)。これらの結果から、100 mM の電解液を用いて分析する場合は、水で試料中の塩濃度が 30 mM 以下になるように希釈した後、20 秒 (約 120 μ l) 注入することにより、良好な分離とピーク形状及び実質的最低感度が得られることが確認された (0.5 μ g/ml のペプチドで S/N > 3)。

2) 電解液のイオン強度と試料中の塩濃度との関係について

電解液濃度を 200 mM に上げると、60 mM の NaCl を含む試料でも希釈せずに良好な分離が得られることが確認された (Fig.3A)。反対に、電解液濃度が 50 mM のときには NaCl の濃度が 30 mM 以下でも良好な結果は得られなかった (Fig.3B)。これらの結果から、良好な分離とピーク形状を得るための要因として、泳動開始時に試料ゾーンにかかる電場の強さが十分強くなるよう電解液の濃度を調節することが重要であると言えよう。

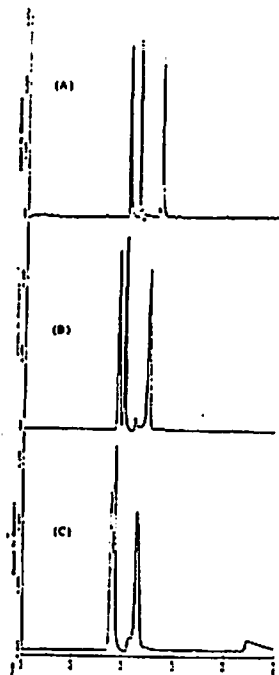


Fig.1 分離に及ばず試料注入量の効果
NaCl を含まない試料を A: 2 秒、B: 20 秒、
C: 33 秒注入。

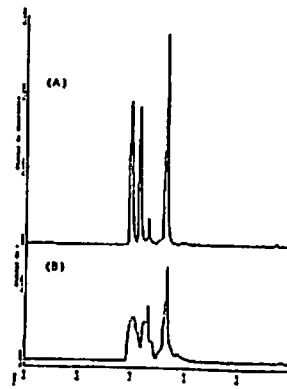


Fig.2 分離に及ばず塩濃度の効果
A: 30mM NaCl, 20 秒注入、B: 60mM NaCl,
5 秒注入。

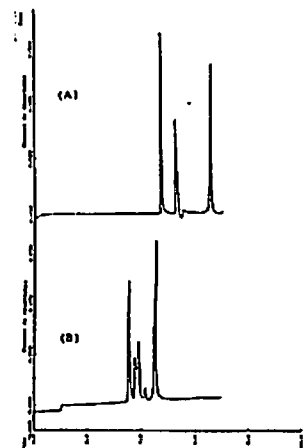


Fig.3 分離に及ばず電解液濃度の効果
A: 電解液濃度 200mM、試料中の NaCl 濃度 60mM、
B: 電解液濃度 50mM、試料中の NaCl 濃度 15mM。

無機イオンキャピラリー電気泳動

—陰イオン分析について陽イオン界面活性剤を用いた
逆電気浸透流の有用性とその応用—

ミリポアコーポレート ウォーターズクロマトグラフィー事業部¹
日本ミリポア ウォーターズクロマトグラフィー事業部²

Bill Jones¹ ○酒井恒行²

Inorganic Capillary Electrophoresis -Reversed EOF with Cationic Surfactant
for Anions

Bill Jones¹ and Tsuneyuki Sakai²

¹ Waters Chromatography division, Millipore cooperation. and

² Waters Chromatography division, Nihon Millipore

Capillary Electrophoresis is a very useful instrument to analyze anions compared with Ion Liquid Chromatography. Cationic Surfactant gives reversed EOF and fast anions can be separated within ten minutes.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) の利用分野は 蛋白質、ペプチド等のバイオ関連分野から 光学異性体、糖分析、無機イオン分析に至るまでの広範囲にわたっています。機器としても自動化が行なえる装置も発表され今後のさらなる応用が期待されますが 今回演者らは最も古典的応用分野である無機陰イオン分析を 自動化された機器を用いて 等速電気泳動法ではなくフリーゾーン電気泳動で試みました。

フリーゾーン法でのCEを用いて無機陰イオンを分析するにあたり考えられる問題点は「キャピラリーとしてフェーズドシリカを用いると電気浸透流 (EOF) の方向は正の電極から負の電極に向かって流れる。そのため弱アニオンは長い泳動時間後検出されますが無機アニオンのいくつかは正の電極に向かって引っ張られるベクトルがEOFより強いいため検出されない。」

という点があります。

演者らはこの問題点を泳動バッファー中にカチオン界面活性剤を用い 電極のポラリティを逆にして 逆電気浸透流 (Reversed Electroosmotic Flow、R-EOF) を利用することにより 高速短時間で再現性よく無機陰イオンを検出できることを確認しましたので発表します。

2. 実験

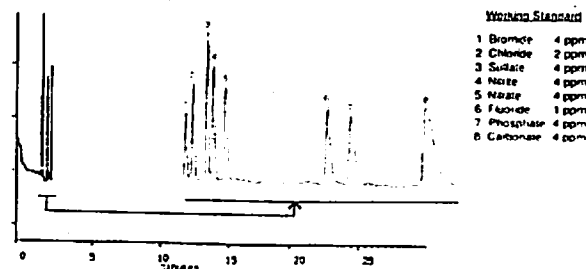
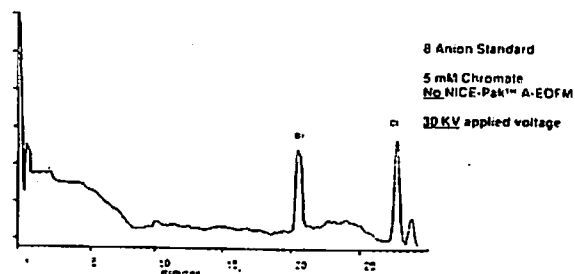
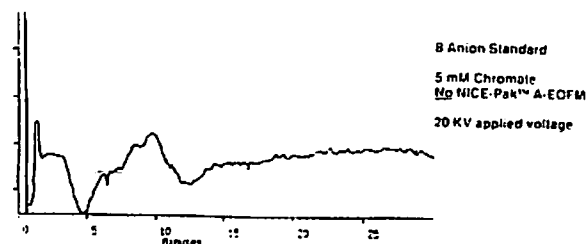
分析機器として ウォーターズ クオンタ4000 CEシステムを用い キャピラリーは75 μ m x 60 cm (検出器まで55 cm)、検出には本体に含まれるUV/VIS検出器を254 nmとしウォーターズのセミナー等で発表されているイン-ダイレクト検出法

(バックグラウンドに吸収のある液を用い吸収のない物質をネガティブピークとしてとらえる方法) をもちいました。

泳動バッファーとしてはNICE-PAK™ (テトラアルキルアンモニウム100ml溶液: ウォーターズ) 1本と1mMクロム酸ナトリウム、硫酸 (pH 8.0に調整) をミリ-Q水で1Lとしたものを用いました。

3. 結果と考察

5 mMのカチオン界面活性剤を用いることにより イオンクロマトでは容易ではない試料が図-1のように最初の5本のピークとして代表的な無機陰イオンを、つぎに有機酸のピークも合計5分で分析できました。またこの溶出順はあきらかにイオンクロマトとは異なりました。また再現性においても数ppmの濃度においてRSDが2%前後と良好な結果となりました (N=9)。また1部分において陰イオン当量導電率とイオンの溶出順の関係が類推できました。

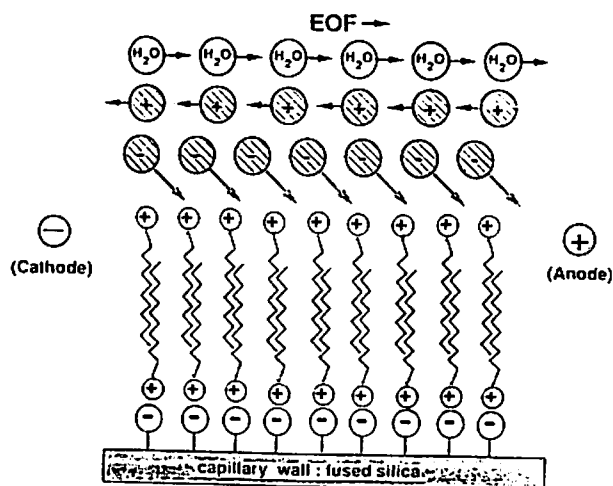


CONDITIONS

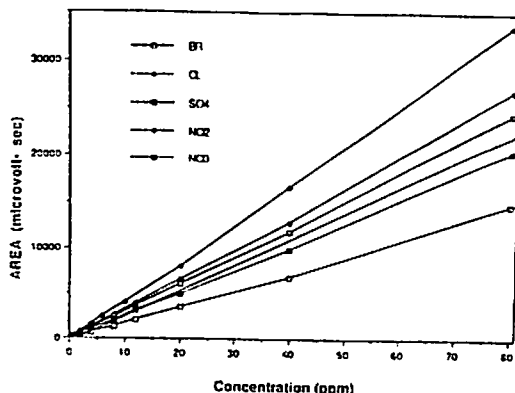
Instrument: Quanta™ 4000
 Electrolyte: Chromate with NICE-Pak™ Anion Chemistry (Patent Applied For)
 Capillary: Fused Silica (60cm X 75µm)
 Power Supply: Negative Voltage
 Applied Voltage: 20 KV
 Current: 16 µAmp
 Hydrostatic Injection: 10cm height for 30 seconds

Detection: UV at 254nm (Hg lamp)
 Range: 0.002 AU
 Detector Polarity: negative
 Temperature: Ambient
 Data: 820 Data System

0. 5 mM カチオン界面活性剤を用いた 逆電気浸透流



クオンタ4000とナイスパックを用いた 陰イオンの直線性



*Patent Applied For Waters 13,444

キャピラリーゾーン電気泳動によるイオン性農薬の分析について

(川崎医大) ○富田 正文、奥山 敏子、児子 弥生

ANALYSIS OF IONIC INGREDIENTS IN HERBICIDES BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

Department of Legal Medicine¹⁾ and Center of Biochemistry²⁾
Kawasaki Medical School, Kurashiki (Japan)

Masafumi TOMITA¹⁾, Toshiko OKUYAMA¹⁾ and Yayoi NIGO²⁾

The use of capillary zone electrophoresis for separation and detection of ionic ingredients in the two herbicides, Gramoxone[®] and Roundup[®], was investigated. Before running assay, we extracted these ingredients from fortified sera. Separation was achieved using a capillary tube (50 μ m i.d., 75 cm) of fused silica. Paraquat and diquat were completely separated in 10 min at an applied potential of 20 kV using 10 mM glycine-HCl (pH 3.0) containing 40 mM NaCl and 20% methanol as the carrier. Glyphosate and (amino-methyl)phosphonic acid were determined at an applied potential of 30 kV using 0.1 M boric acid-NaOH (pH 8.7) containing 10% methanol as the carrier.

This method is fast, sensitive and acceptable for the analysis of the ingredients of the two herbicides in biological specimens.

1. はじめに

自殺の目的で農薬を服用する事例は昨今も多くみられ、一方では緊急の分析が要求され、また他方微量分析も必要となる。今回われわれはイオン性成分を含有する農薬として毒性の強いパラコート、ジクワットの液剤(グラモキソン)と毒性が比較的弱いとされているグリホサート液剤(ラウンドアップ)をとりあげ、血清中成分の分析方法についてキャピラリーゾーン電気泳動による検討を行ったので報告する。

2. 実験

パラコート(Pq)およびジクワット(Dq)については、血清を除蛋白後Gillらの方法¹⁾に従って抽出し、グリホサート(GLYP)およびその代謝産物の一つであるアミノメチルホスホン酸(AMPA)では、同様に血清を除蛋白後p-トルエンシルホニルクロリド誘導体を作成これを硫酸酸性下において酢酸エチルで抽出し、サンプルとした。キャピラリー電気泳動は Applied Biosystems 社の Model 270A を使い、分離用キャピラリーには、内径50 μ m、全長75 cm のフューズドシリカ管を使用した。分離用電解液は、PqとDqでは最終的に40 mM NaClと20 %メタノールを含む10 mM グリシン-塩酸buffer (pH 3.0)を、またGLYPとAMPAでは10 %メタノールを含む0.1 M ホウ酸-NaOH buffer

(pH 8.7)を用い、電圧はサンプル側を陽極に各々20 kV, 30 kVとした。また検出にはオンカラム検出法で各々 200 nm (PqとDq)、240 nm (GLYPとAMPA) の吸収を測定した。

3. 結果および考察

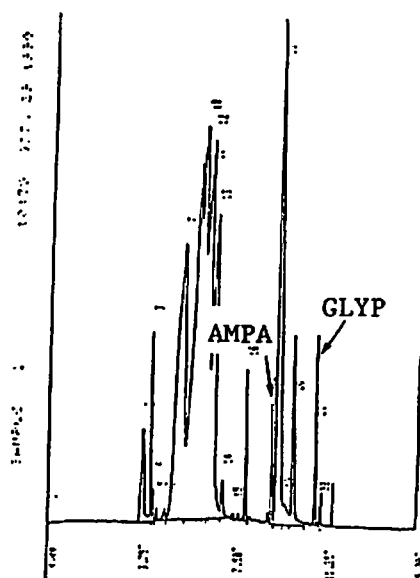
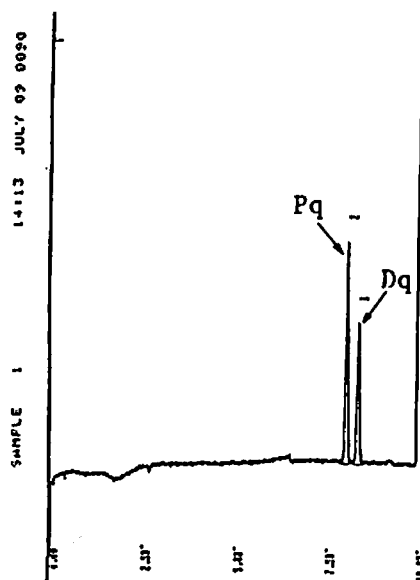
オンライン検出での紫外吸収において、PqとDqはそのままで吸収をもつが、GLYPとAMPAは、p-トルエンスルホンクロリドによる誘導体を作成する必要があった。またPq, Dq では陽性のため電気浸透流の低い酸性条件で、GLYP, AMPA 誘導体は陰性のため電気浸透流の高いアルカリ条件で泳動した。Fig. 1に血清に添加したPqとDqの泳動パターンを示した。血清中の成分分析においては、血清からの抽出とその後の電気泳動による分離条件が最も重要である。PqとDqの抽出についてはすでに報告されているSep-Pak を用いて行った。分離には種々のbufferのうち10mMグリシン-HCl (pH 3.0) を選び、これにNaClおよびメタノールを加えて検討した結果、10分以内で両物質を高感度で且つ特異的に分別定量することができた。他の妨害ピークはまったく認められず、回収率はPq, Dq とともに0.5 ~ 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で約97% であり、検出限界は0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。ただ極少量の注入量(35 nL) にもかかわらず、この抽出操作によって移動時間が延長され、ピークもややbroad になる傾向を示した。

つぎにFig. 2に血清に添加したGLYPとAMPAの電気泳動パターンを示す。pH 8.0からpH 9.6まで検討した結果、pH 8.7で両成分の分離ピークが得られた。農薬成分であるGLYPは約10.3分にシャープなピークを認め血清での検出限界は0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。しかし、代謝産物AMPAでは未だ妨害ピークが大きく、約8.8分にピークを得たものの微量定量の際にはさらに分離条件の検討を要した。

以上、生体試料(血清)中の毒物分析、イオン性農薬成分の分析にキャピラリーゾーン電気泳動の応用を試みた結果、短時間でかつ高感度な分析が可能であった。

Fig.1 (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Fig.2 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)



4. 文献

1. Gill, R., Qua, S. C. and Moffat, A. C., J. Chromatogr., 255 (1983) 483-490.

キャピラリー電気泳動法による ビタミンB₆群の分析

(日本分光工業・技術研究所) ○黒須泰行
(慈恵医大・医科研生化学) 栗岡晋

SEPARATION OF VITAMIN B₆ DERIVATIVES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

JASCO, Technical Research Laboratory
Division of Biochemistry, Institute of Medical Science,
The Jikei University School of Medicine*
Yasuyuki KUROSU and Susumu KURIOKA*

We investigated the separation of 6 vitamin B₆ derivatives by using capillary electrophoresis (CE) with fluorescent detection. The mass sensitivity by fluorescent detection in CE was approximately 10-40 times and 2-200 times, compared with that by UV detection in CE and that by fluorescent detection in high performance liquid chromatography, respectively. By using the present method, the vitamin B₆ contents in some foods were analysed.

1. はじめに

ビタミンB₆は1934年、ラットの抗皮膚炎因子として発見された。その後、ビタミンB₆が多くの酵素の補酵素として機能し、動物にとって必須栄養素であることが理解されるに従って、精度高い微量分析が要求されるようになってきた。ビタミンB₆群の動物体内での代謝を研究する場合、酵母を使用した生物学的検定法及び高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が重要な分析手段となっているが^{1,2)}、さらに分析時間の短縮化、装置・操作の簡略化、高感度分析を目標として、キャピラリー電気泳動法(CE)による検討を試みた。

2. 実験

2-1 試料

ビタミンB₆群 {ピリドキサル塩酸塩(PL)、ピリドキサル5'-リン酸(PLP)、ピリドキサミン二塩酸塩(PM)、ピリドキサミン5'-リン酸(PMP)、ピリドキシン塩酸塩(PN)、ピリドキシン5'-リン酸(PNP)、4-ピリドキシン酸5'-リン酸(PIC-P)} を使用した。

PLPは蛍光強度が低いので、KCN処理して、蛍光強度の高いPIC-Pに変換した¹⁾。

2-2 キャピラリー電気泳動法の基本的分析条件

装置：電源 890-CE (JASCO) + 検出器 821-FP (JASCO)³⁾、

キャピラリー：50 μm x 300 mm, non-coated fused silica、

電解液：クエン酸緩衝液他、注入法：サイフォン法(7 cm, 10 sec)、

泳動電圧：15 kV、温度：室温、検出：蛍光(Ex. 325 nm, Em. 400 nm)。

3. 結果と考察

3-1 検出感度

UV検出器(CE-870)と蛍光検出器を比較した結果をTable 1 に示した。UVの場合は検出波長275 nm、蛍光の場合は励起波長325 nm、検出波長430 nmで行なった。蛍光の方がUVに比べて、約8-38倍、感度が上昇したことを確認した。

HPLCとCEを比較した結果をTable 2 に示した。ともに検出には、蛍光を使用した。質量感度の比較では、CEの方が約2-209倍上昇した。

3-2 再現性(消費電力とキャピラリーの洗浄法に関して)

消費電力を変えた電気泳動を行った結果、電力の小さい(発熱量が小さい)条件ほど再現性に有利であることがわかった。また、その境界は上記の条件のもとでは約1

6 kV(432 mW)であり、その前後で移動時間の再現性に大きな違いを見出した。

さらにキャピラリーの洗浄法の違いによる影響を調べた。洗浄は以下のような方法で行った。①洗浄なし、②0.2 N NaOHを使用し、洗浄時間が一定でない、③0.2 N NaOHを使用し、洗浄時間が一定である、④0.2 N NaOH + 0.2 N HClを使用し、洗浄時間が一定である。その結果、洗浄法が再現性に大きな影響を与えていることが確認された。

3-3 分離

電解液のpH(2-7)、イオン質(リン酸Na緩衝液、クエン酸Na緩衝液、酢酸Na緩衝液等)を検討した結果、クエン酸系(pH 6-7)が良好であることがわかった。Fig. 1 にビタミンB₆の一部(PL, PM, PN, PMP)の分離例を示した。他に幾つかの応用例を紹介する。

4. まとめ

今回の検討により、HPLCで通常40分以上かかるビタミンB₆の分析をCEにより約20分以下に短縮した。また、質量感度の面では、HPLCよりも有利であった。従って、食品や薬剤中のビタミンB₆の微量分析としてはHPLC以上の分析手法になるものと期待できる。ただし、濃度感度の面では、実際の生体抽出液(例えば、血漿中のPLP濃度は2 μM 以下である)を分析するには感度的に不足している。今後、光の散乱などをさらに抑えて、光の利用率を高めるなどの工夫を行い、濃度感度を向上させたい。

Table 1 Comparison of detection limit by fluorescent detection (FL) and that by UV detection in capillary electrophoresis

Name Detection	PH	PL	PN	PMP
FL (mass.pg)	6.0	7.2	8.7	10.0
UV (mass.pg)	231	87	69	198
FL (conc..uM)	7.1	8.6	10.2	8.0
UV (conc..uM)	273	104	81.0	159

(S/N = 2)

Table 2 Comparison of detection limit by capillary electrophoresis (CE) and that by high performance liquid chromatography

Name method	PH	PL	PN	PMP
CE (mass.pg)	6.0	7.2	8.7	10.0
LC (mass.pg)	21.1	1510	1530	20.8
CE (conc..uM)	7.1	8.6	10.2	8.0
LC (conc..uM)	0.025	0.9	0.91	0.025

(S/N = 2)

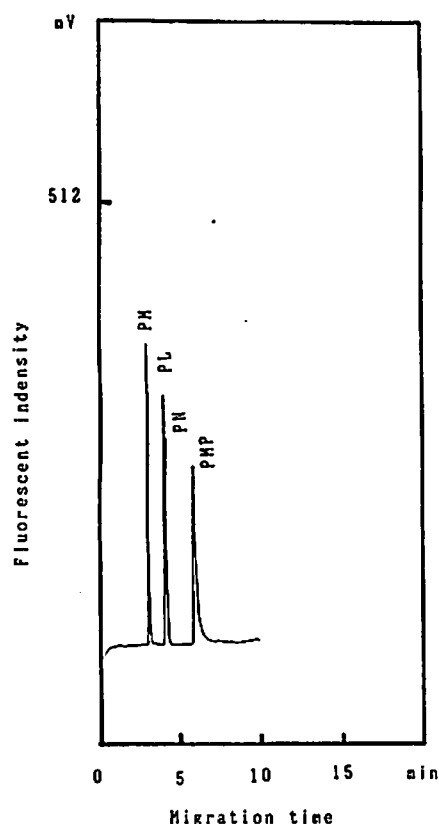


Fig. 1. Electropherogram of vitamin B₆ derivatives.

文献

- 1) H. Tsuge et al, Vitamins, 63(1989)349-360.
- 2) H. Tsuge et al, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 35(1989)171-180.
- 3) Y. Kurosu et al, 12th International Symposium on Capillary Chromatography, (1990)713-724.

高性能キャピラリー電気泳動による薬物代謝物の分析

(近畿大・薬¹、藤沢薬品・物性研²) 本田 進¹⁾、○多賀 淳¹⁾、掛樋一晃¹⁾、岡本芳彦²⁾

ANALYSIS OF DRUG METABOLITES BY HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University and ²Analytical Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Company

Susumu HONDA¹⁾, Atsushi TAGA¹⁾, Kazuaki KAKEHI¹⁾, and Yoshihiko OKAMOTO²⁾

Cefixime and its metabolites were analyzed by various modes of capillary electrophoresis. Direct zone electrophoresis at pH 6.8 allowed complete separation of all major metabolites but one of the metabolites was not separated from Cefixime. Micellar electrokinetic chromatography with SDS gave no good separation, but ion-exchange electrokinetic chromatography with polybrene realized excellent separation of major metabolites and Cefixime.

Urinary Cefixime was quantitated, with reasonable reproducibility, by separation in the zone electrophoresis mode and on-tube UV detection.

【はじめに】

体液中の薬物および代謝物の濃度の測定は医学ならびに薬学領域における一つの重要課題である。この目的には従来、高速液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーが用いられてきたが、高性能キャピラリー電気泳動 (HPCE) を利用することについては未だ十分な検討が行なわれていない。本研究では薬物モデルとしてセファロスポリン系抗生剤の一つであるセフィキシム (CX) をとりあげ、HPCEの種々のモードを用いてCXおよびその代謝物の分離を調べた。またヒト尿中のCXの定量について検討を行なった。

【実験】

試料および試薬 CXおよび消化管あるいは糞便中でCXから生成する5種類の代謝物M1、M2、M3、M4およびM5の標品はすべて藤沢薬品で調製したものを用了。装置 HPCE用装置としてはApplied Biosystems Inc製の270A型装置を用いた。分離用キャピラリーには内径50 μm、全長68 cm (有効長46 cm) のフューズドシリカ管を使用し、オンカラム検出により280 nmにおける紫外吸収を測定した。キャピラリーは分析のたびにメタノールおよび1 M 水酸化ナトリウムで洗浄し内壁の状態を更新した。

【結果および考察】

分離モードの検討 CXおよび代謝物M1～M5の標品を用い、種々のモードにより分離を検討した。**直接的ゾーン電気泳動** CXおよびM1～M5はすべてカルボキシル基をもつ酸性物質である。フューズドシリカ管を用いリン酸緩衝液 (pH 6.8) をキャリアーとした場合、電気浸透流は陽極から陰極へ向い、電気泳動はこれらの物質を陽極へ引き戻すというもっとも典型的な分離モードが得られる。Fig. 1に示すようにM1～M5は容易に完全に分離することができた。しかしCX自体はM2と重複したピークを与え、分離することが困難であった。なお、キャリアーにhydroxypropyl celluloseを添加して電気浸透流を抑え、電気泳動のみによる分離を試みたが、CXとM2の分離は改善されなかった。**SDSによるミセル動電クロマトグラフィー¹⁾** CXおよびM1～M5は疎水性の低い物質であるため、SDSミセルへの可溶化の程度は小さく、これらの物質の相互分離には効果が弱く、SDSを含まない

リン酸緩衝液を用いた場合に比べてむしろ分離は悪化した。Polybreneを用いるイオン交換動電クロマトグラフィー²⁾ 低濃度のpolybreneを添加したリン酸緩衝液を用いると、キャピラリー内壁の電荷が逆転して電気浸透流は陰極から陽極へ向い、カルボキシル基をもつこれらの試料はキャリアー中で陰極側へ一定速度で引戻されるpolybreneと結合してイオン会合体を形成し、移動速度が低下する。この結合の程度の違いにより良好な分離が行なわれ、CXおよびM2、M4、M5は完全に分離された。しかしM1とM3の分離はpolybrene濃度の最適化にもかかわらず不完全に終わった (Fig. 2)。

尿中CXの定量 キャリアーに50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いる直接的ゾーン電気泳動により、CXを添加した尿を直接分析したところ、CXは尿成分から分離され、ケイ皮酸 (CA) を内部標準とすることにより再現性よく定量することができた。検量線は少なくとも5 $\mu\text{g/ml}$ ~ 45 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で直線性を示した。これは治療時の尿中CX濃度をカバーする範囲である。25 $\mu\text{g/ml}$ においてくり返し測定 of 相対標準偏差は約3%で実用分析としては十分な再現性が示された。尿試料のくり返し分析においてはキャピラリーのコンディショニングが特に重要であったが、この点についてはメタノールおよび1 M 水酸化ナトリウムによる洗浄で効率よく回復させることができた。このようにして未処理のまま尿を分析するという簡単な方法で尿中CX濃度を簡便に測定することができた。

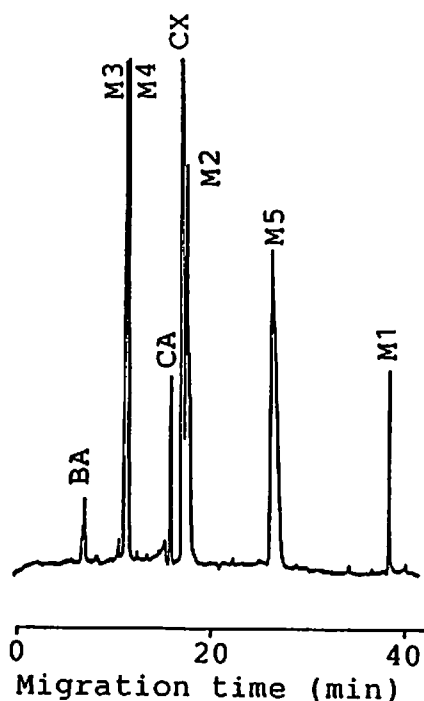


Fig. 1. Separation of CX and its metabolites by zone electrophoresis mode. Carrier, 50 mM phosphate buffer (pH 6.8); applied voltage, 15 KV.

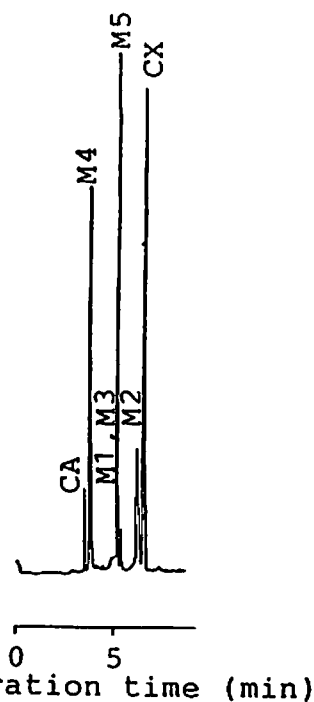


Fig. 2. Separation of CX and its metabolites by ion-exchange electrokinetic chromatography mode. Carrier, 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing polybrene (0.5%); applied voltage, 20 KV.

【文献】

- 1) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, and T. Ando: Anal. Chem., 56, 111 (1984).
- 2) S. Terabe: Trends Anal. Chem., 8, 129 (1989).

シクロデキストリン誘導体を用いるキャピラリーゾーン電気泳動による光学異性体の分離

(大阪大・工¹、大阪工大²) ○浅野 哲¹⁾、田中 稔¹⁾、庄野利之²⁾

SEPARATION OF RACEMATES BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS BASED ON COMPLEXATION WITH CYCLODEXTRIN DERIVATIVES

¹⁾ Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Osaka University

²⁾ Department of Applied Chemistry, Osaka Institute of Technology

Satoshi ASANO¹⁾, Minoru TANAKA¹⁾ and Toshiyuki SHONO²⁾

Chemically modified cyclodextrins (CDs) were used as chiral additives in separation of racemates by capillary zone electrophoresis. Unmodified β - or γ -CD exhibited good enantioselectivity for dansylamino acids. Di- or trimethylation of α -CD resulted in the appearance of the enantioselectivity. In the case of β -CD, both the modifications reduced the chiral recognition, except for the leucine- and phenylalanine-trimethylated β -CD systems. Methylation of α - or β -CD enhanced the chiral recognition for barbiturates, severely depending on their structures. Diacetylation of β -CD resulted in baseline separation of DL-alanine β -naphthylamide. These selectivity changes are ascribed to differences in the shape and size of the CD cavities and/or their hydrogen bond abilities before and after the modifications.

1、はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) は高分離能を持つ新しい分離分析法として注目を集めている。このCZEにシクロデキストリン (CD) の誘導体を分離用キャリアーとして利用する方法は既にいくつか報告されている。^{1,2)}

演者らはCDの特異的なホスト・ゲスト相互作用のHPLCへの応用を検討しており、CD固定相を化学修飾することで選択性が大きく変化することを報告した。³⁾ しかし、この場合CDだけではなくスパーサー等の影響も考えられた。

本研究ではCDのみの影響を見るため、CD及びその誘導体をCZEに用いて光学異性体の分離を行い、CDの空孔径と水酸基の化学修飾による選択性の変化について検討を行った。

2、実験

装置には Applied Biosystems 社製 Model 270Aを用いた。キャピラリーは内径 50 μ m、全長72cm (有効長50cm) のフューズドシリカ管を用い、検出はUV (220nm) により行った。

3、結果と考察

Table に未修飾及びメチル化CDを用いた7種のダンシルアミノ酸の光学分割の結

Table Enantiomeric separation of dansylamino acids.

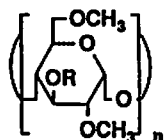
CZE Conditions : carrier solution , 0.01M CD derivative in borate - phosphate buffer (pH 9.0) ; applied voltage , 20KV ; current , 55 μ A ; Temp. , 30 $^{\circ}$ C.

Dansylamino acid	α -CD		β -CD		γ -CD		DM- α -CD		TM- α -CD		DM- β -CD		TM- β -CD	
	α	R'	α	R'	α	R'	α	R'	α	R'	α	R'	α	R'
Aspartic acid	1.01	40.1	1.06	100	1.02	91.5					1.02	45.0 ^a		
Glutamic acid			1.04	100	1.09	100								
Leucine			1.04	87.7	1.11	100	1.00	6.6 ^b	1.05	100 ^a	1.03	44.0 ^a	1.05	100 ^a
Norleucine ^c			1.03	73.8	1.06	93.8			1.04	92.2			1.04	97.7
Norvaline			1.02	67.4	1.07	100							1.03	55.6 ^a
Phenylalanine							1.03	56.2	1.06	100 ^a			1.03	87.5 ^a
Valine			1.04	87.2	1.05	98.2			1.02	56.0			1.02	50.5 ^a

^a L-Isomer migrated fast.

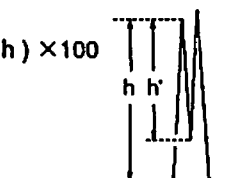
^b Two peaks were too close.

^c Neither isomer was obtained.



n	R	
6	H	DM- α -CD
7	H	DM- β -CD
6	CH ₃	TM- α -CD
7	CH ₃	TM- β -CD

$$R' = (h'/h) \times 100$$



果をまとめた。表中のR'は分離度を示し、この値が大きい程良く分離したことを示す。CDの空孔径と化学修飾の有無によって分離度が大きく変化している。また、移動順序に注目すると未修飾CDでは全てD体が先であるのに対し、メチル化CDではL体の方が先に移動しているものが増えている。水酸基のメチル化によりCDのD、L体に対する包接能が変化したと考えられる。また、Fig.にDL-アラニン β -ナフチルアミドの光学分割を行ったエレクトロフェログラムを示す。この場合はアセチル化CDを用いて良好な分離が得られた。その他、バルビツル酸についても検討した結果、同様に分離能に違いがみられた。CDの空孔径と開口部にある水酸基が不斉認識に重要な役割を果たしていることが確認された。

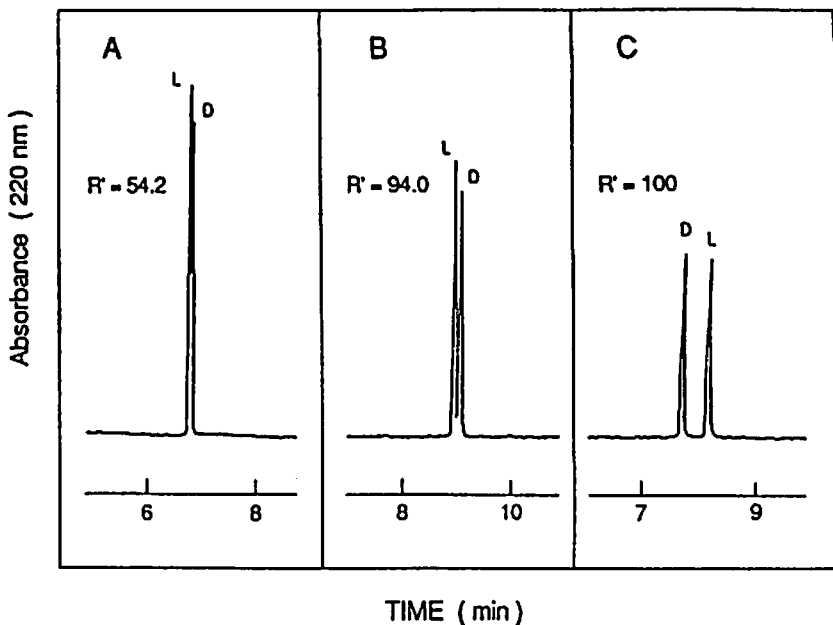
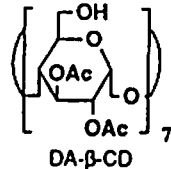


Fig. Enantiomeric separation of DL-alanine β -naphthylamide with γ -CD (A), with β -CD (B) and with DA- β -CD (C).

CZE conditions : electrophoretic solution, 0.01M CD derivative in NaOH-phosphoric acid buffer (pH 2.0) ; applied voltage, 30KV ; current, 34 μ A ; Temp., 30 $^{\circ}$ C.



- 1) S. Terabe, H. Ozaki, K. Otsuka and T. Ando, J. Chromatogr., 332, 211 (1985).
- 2) S. Fanali, ibid., 474, 441 (1989).
- 3) M. Tanaka, T. Shono, D.-Q. Zhu and Y. Kawaguchi, ibid., 469, 429 (1989).

名古屋工業大学 津田孝雄

ELECTROCHROMATOGRAPHY*

Takao Tsuda
 Nagoya Institute of Technology
 Gokiso, Showa, Nagoya 466, JAPAN

Electrochromatography, in which two functions (mobility and sorption interaction) have been used at the same time, may be highly effective method. We demonstrated electrochromatography with a high voltage along a column and obtained an effective separation in relatively short times. It is possible to retain a solute in a column during operation under pressurized flow, if the velocity due to its mobility toward to the inlet of column is higher than the velocity due to the pressurized flow toward to the outlet of column. Therefore, we can concentrate the solute in a column during a period of several injections or a long continuous injection, and then eluted out it after releasing the applied electro voltage on the column. A solute or a group of compounds could be concentrated by adjusting both an applied voltage and pressurized flow. We will demonstrate typical examples of electrochromatography of separations, concentrations of solutes, and etc.

* Takao Tsuda, Anal.Chem., 59 (1987) 521-523; *ibid.*, 60 (1988) 1677-1680; J.Chromatogr., 515 (1990) 645-652.

電気クロマトグラフィーとは 分離カラム中に充てん剤やゲルをつめて そのカラムに電場を印かする。試料の移動はでん場により生じる電気移動度により行われるが、その際 まわりの充てん物との間に液-液平衡、液-固平衡、イオン平衡などが成立する。すなわち 試料は電気移動度と分配平衡の二つにより分離されてゆく。

私は 古くからあるこの手法のモダン化に取り組んだ。またその系にポンプによる圧力差流を加えて より迅速に取りあつかえるようにした。本法の装置、分離への応用、濃縮への応用等について述べる。

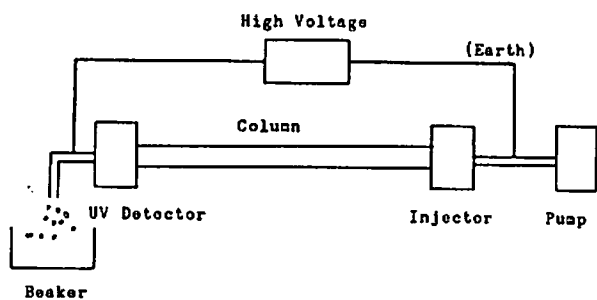


Figure 1. Schematic diagram for electrochromatography.

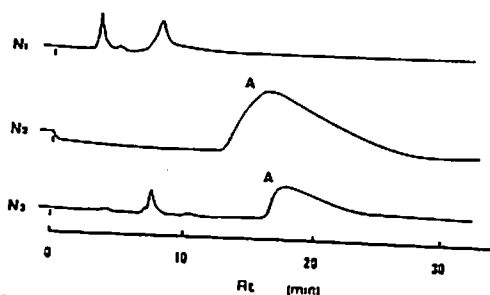
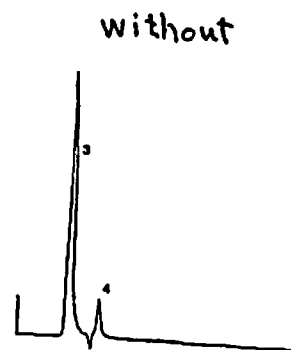


Figure 2. Retained solute in column in the condition of applied voltage. N_1 was with applied voltage; N_2 and N_3 without. N_2 was obtained just after release of applied voltage at time zero. Solute was *N*-methylphenylpyridinium perchlorate (A) and its impurities (other peaks).



with

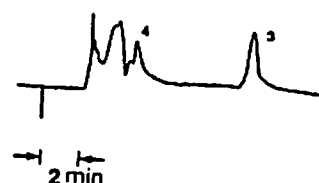


Figure 3 Chromatograms of PTH derivatives of asparagine (A) and 2-naphthalenesulfonic acid (B) with and without applied voltage. Applied voltages for A and B were 7.4 and 11.8 kV, respectively.

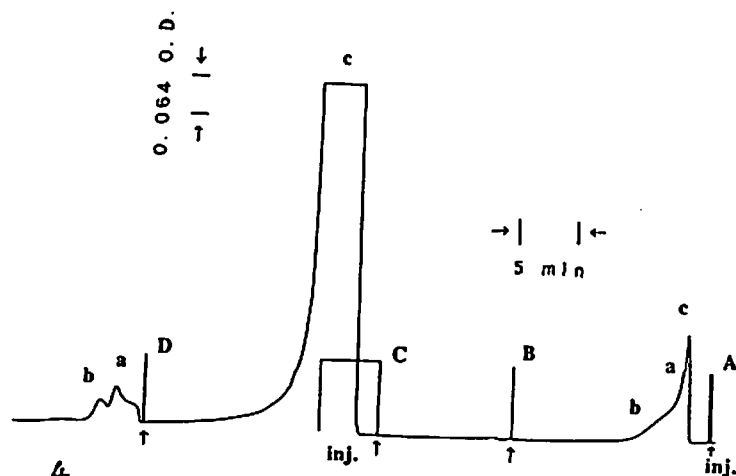


Fig. 4 Chromatogram with continuous injection of a solute having a negative charge. Sample: 10^{-2} M aqueous 1,2,6-naphthalenetrisulphonic acid solution; sample injection rate, $10 \mu\text{l}/\text{min}$; eluent, 0.1 M phosphate buffer (pH 7)-methanol (40:60); applied voltage, +5 kV ($75 \mu\text{A}$). Peaks a and b belong to the sample and peak c is the solvent peak. A, Applied voltage off, 15-s injection; B, applied voltage on, without voltage at time zero; C, applied voltage on, 5-min injection; D, chromatogram obtained just after stopping the applied voltage.

タンパク質の2次元ゲル電気泳動法

(姫路工大・理) ○眞鍋 敬、寺部 茂

Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins

Takashi MANABE and Shigeru TERABE

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Micro two-dimensional gel electrophoresis, which employ isoelectric focusing with capillary-type (I.D. 1.3mm) gel in the first dimension and pore-gradient gel electrophoresis or SDS-gel electrophoresis with micro slab-type (38mmx38mmx1mm) gel in the second dimension was applied for the analysis of proteins in physiological conditions or in denaturing conditions. The performance of the micro 2-D technique in protein separation was compared with that of capillary gel electrophoresis.

1. はじめに

生体物質の分離分析については多くの方法が開発され、改良を加えられてきている。なかでも高速液体クロマトグラフィーは、アミノ酸、糖、核酸、タンパク質などの分析に広く用いられている。しかし、分子量の大きいタンパク質や、DNAについては、ポリアクリルアミドゲルを支持体とする電気泳動法の方が、より高い分離能を持つために用いられている。タンパク質の分析法として現在のところ最も高い分離能をもつのはポリアクリルアミドゲル2次元電気泳動法であるが、その実施にあたっては多くの手操作を必要とし、時間と労力を要した。この欠点の改善のためゲルサイズのマイクロ化、ゲル作製の自動化、同時に多くの試料を泳動するなど、マイクロ2次元電気泳動法の開発を行ってきたが、依然として手操作のステップが多く、高速液体クロマトグラフィーが機器分析法として一般化しているのとは対照的である。キャピラリー電気泳動法はすでに全自動分析装置が市販されるなど、操作性の高いことが示されており、この特徴を生かしてキャピラリー中にゲルを充填し、タンパク質、DNAの分析に用いる試みが広く行われている。タンパク質のマイクロ2次元電気泳動法による分析例（生理的条件及び変性条件）を報告し、その性能（分離能及び操作性）をキャピラリーゲル電気泳動法の性能と比較する。

2. 方法と結果

タンパク質試料は生理的条件下で得られたものをそのまま電気泳動試料とする（生理的条件）か、特に水不溶性のタンパク質の分析を目的として8M尿素-1%NP40（非イオン系界面活性剤）-5%メルカプトエタノールを加えたものを用いた（変性

条件)。マイクロ2次元電気泳動法は、ポリアクリルアミド円筒ゲル(径1.3mm、長さ35mm、両性電解質混合物2.5%を含む)で等電点電気泳動を約100分行い、泳動後のゲルをガラスキャピラリーから抜き、マイクロ平板ゲル(幅38mm、高さ38mm、厚さ1mm)の上端に乗せたのち、密度勾配電気泳動する(生理的条件)か、SDS電気泳動した(変性条件)。泳動後のゲルはモールドからはがし、50%メタノール-7%酢酸-0.1%クーマシーブルーで染色し、20%メタノール-7%酢酸で脱染色した。要すればさらに銀染色を行った。タンパク質のキャピラリー電気泳動は、従来のゲル電気泳動法の条件に準じて行った。

図1Aにヒト血漿タンパク質の生理的条件でのマイクロ2次元電気泳動像を、図1Bに藍藻タンパク質を変性条件でマイクロ2次元電気泳動法した結果を示す。タンパク質の最小スポットの大きさは、生理的条件で約0.5mm×0.5mm、変性条件で約0.5mm×0.2mmであった。従ってゲル上の色素濃度を1方向に走査すると、約80-200のピークを検出しうることになる。これらマイクロ2次元電気泳動の結果と、キャピラリー電気泳動法でタンパク質を分離した初歩的な結果とを示し、操作性と分離能の点から両者を比較する。

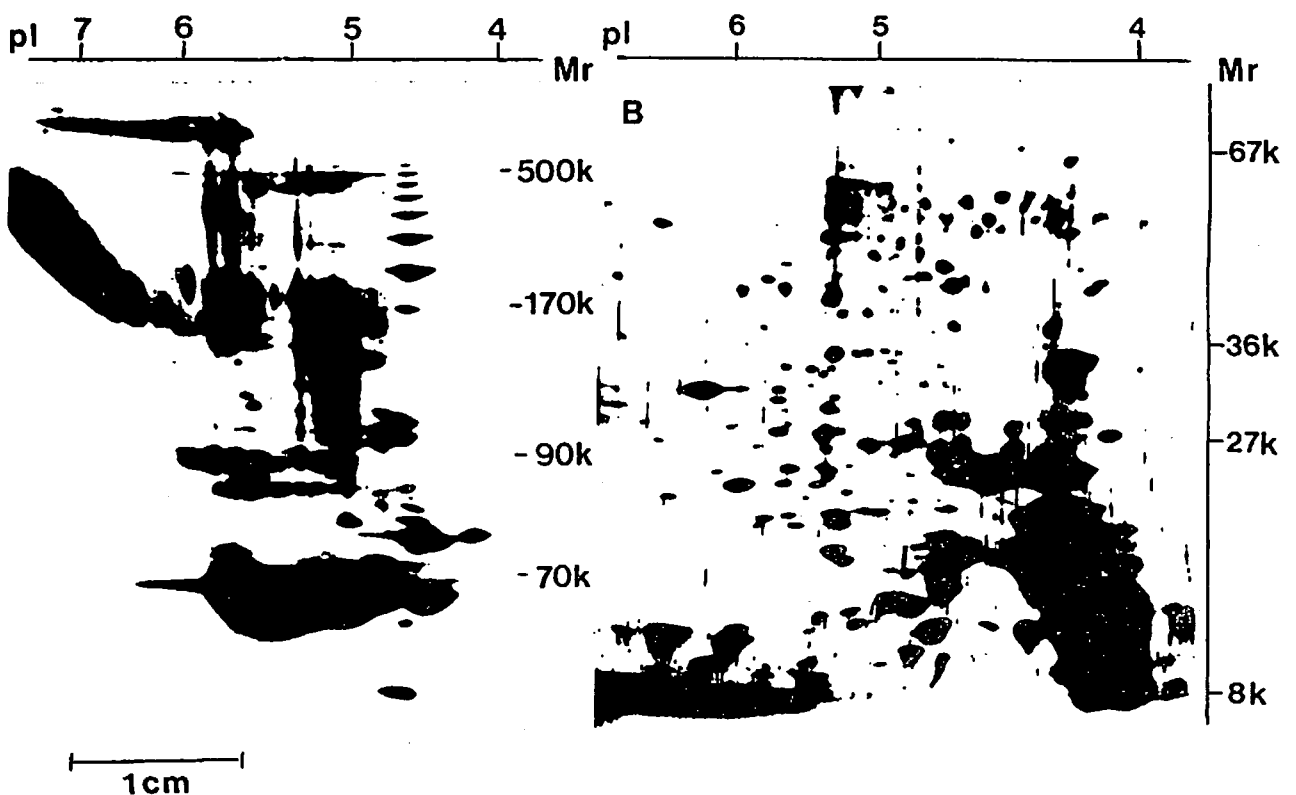


Fig. 1. Micro two-dimensional electrophoresis of proteins.

A : Human plasma proteins separated in physiological conditions.
Coomassie blue staining.

B : Proteins in blue-green alga, separated in denaturing conditions.
Silver staining.

無坦体電気泳動による線虫の染色体の分離

(東京都立大学・理¹⁾、城西大学・理²⁾、東海大学・医³⁾)○高島宗彦¹⁾、小林英三郎²⁾、石井直明³⁾、奥山典生¹⁾

近年、遺伝子操作など染色体 DNA を扱う研究が多数行われるようになった。染色体など、細胞を構成する巨大粒子を分離する場合はほとんどはセルソーターによる分離の報告である。また DNA などを分離する手段としてゲル電気泳動が多く用いられているが、核酸とタンパク質の複合生体粒子である染色体を、ゲル坦体を用いた電気泳動で分離することは困難であると思われる。今回我々は、坦体を用いず泳動後のサンプルを容易に回収できる無坦体電気泳動装置 (Free Flow Electrophoresis : FFE) を用いて染色体の分離を試みた。FFE は垂直に設置した泳動チャンバーの中を分離液とサンプルを流下させ、両側の電極により水平方向に電圧をかけ、組成成分の電気的性質に基づいて泳動し分画する電気泳動装置である。(Fig.1) FFE のサンプルとして用いる線虫は 1974 年にイギリスのブレンナーが非寄生性自由生活線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) で遺伝学を確立して以来、現在に至るまで遺伝学はもとより発生学の領域でも広く研究されている生物である。*C. elegans* の染色体は 6 本で塩基数も 100 Mbp と多細胞動物としては少ない DNA で構成されており、いくつかの遺伝子はクローニングされ、*C. elegans* の全塩基配列を決定しようとする試みもある。染色体の分離は線虫に限らず他の生物でもクローニングの迅速化、遺伝子解析などに重要であると考えられる。

本報告では、FFE を用いゾーンおよび等電点による分離原理に基づき、染色体の大きさの違いによるわずかに異なる電気泳動的性質を用いて、染色体を他の細胞構成成分から分離し、さらに個々の染色体を分離することを目的とした。さらに、FFE による一連の実験結果に基づいて 1993 年に打ち上げ予定のスペースシャトルで行われる微小重力実験 (IML-2) に登載される FFEU を用いて線虫の染色体の分離実験を計画している。

【方法】

無坦体電気泳動装置：装置は Elphor Vap11 (Bender & Hobein, Munich) を用いた。等電点型とゾーン型の 2 種類の分離原理を使って泳動を試みた。等電点型の場合、分離液にアンホラインとセパラインの酸性画分、陰陽両電極液は 20mM KCl を使用した。一方、ゾーン型で行う場合は分離液、電極液ともに 10mM

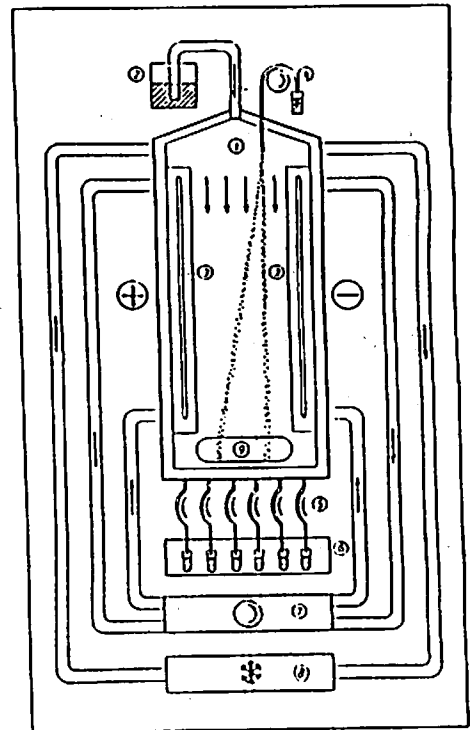


Fig.1 Construction diagram of FFE (BENDER & HOBEIN ELPHOR VAP 11)

- (1) Separation chamber (450mm X 100mm X 0.5mm)
- (2) Chamber buffer
- (3) Electrode
- (4) Sample pump
- (5) Multitube pump (90ch)
- (6) Fraction container
- (7) Electrode buffer chamber
- (8) Cooling system
- (9) Optical window

Tris-acetate pH7.2 を使用した。これらはともに定電流で行った。

サンプルの調製：線虫は卵-幼虫-成虫の過程を経て世代交代する。親虫子宮中の卵を次亜塩素酸処理によって取り出した。この卵を乳鉢上で液体窒素で凍らし、擦り潰した後、細胞残渣を除去し、粗細胞抽出液としこれを泳動サンプルとした。

アガロースゲル電気泳動： FFE 泳動前後における DNA の DNase などの作用による低分子化を調べた。装置はムービッド-3 (コスモバイオ) を用い、アガロースゲル濃度 0.4% で電気泳動した。ゲルはエチジウムブロマイド染色し紫外線照射により巨大 DNA の検出を行った。

【結果と考察】

サンプルの調製：粗細胞抽出液を光学顕微鏡で観察し、未破壊の卵のないことを確認し、濃度は FFE 後の画分の巨大 DNA をアガロースゲル電気泳動で検出するため DNA 換算で約 1mg とした。

FFE の電極液と分離液：等電点型の場合、陰陽両電極液は 20mM KCl を使用した。キャリアアンホライトは 0.1%-0.01% 濃度で泳動したところ 0.1% 濃度で pH 勾配が

安定して形成され (Fig.2)、電流を 26mA のとき電圧は 600V であった。ゾーン型の場合、電極液と分離液は 10mM Tris-acetate pH 7.2 とし、電流 40mA のとき電圧は 400V であった。

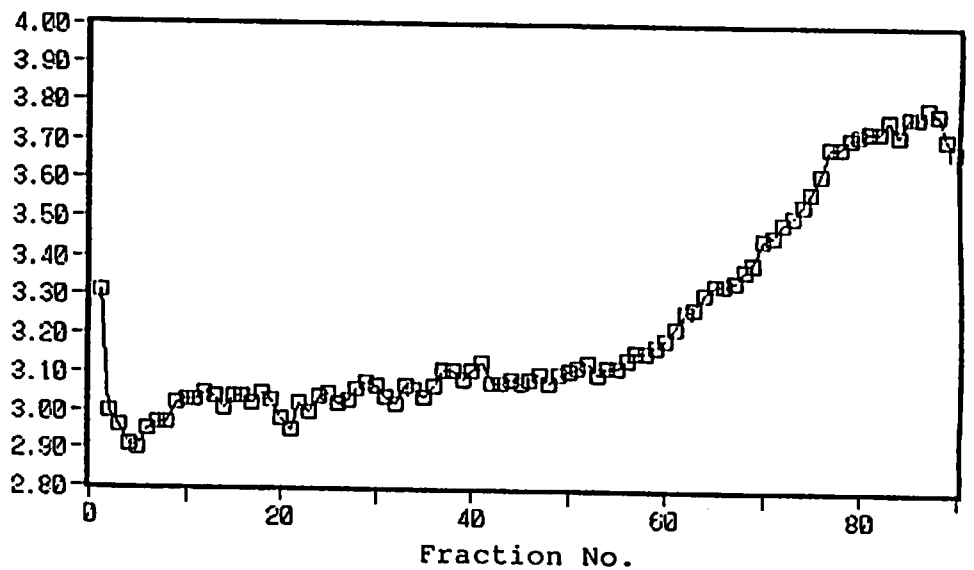


Fig. 2 pH Profile on Free Flow Electrophoresis
Separation buffer : 0.1% Ampholine (pH 2.5-4.5)

FFE 泳動後の DNA フラクシオン：アガロースゲル電気泳動によって巨大 DNA の陽極側への泳動が確認された。

今回用いた粗細胞抽出物標品は簡便ではあるが共存物の影響も考えられるため酵素処理による泳動標品の調製方法も検討中である。等電点法におけるキャリアアンホライトは 0.1% でも安定した勾配が得られ、泳動が行えた。FFE によって得られた分画を第 3 番目の染色体と X 染色体のマーカー DNA を使ってハイブリダイゼーションを行い個々の DNA および染色体の分離状態を検討中である。さらに分離条件および染色体の確認方法は現在進行中である。

参考文献

定家義人、鈴木撃之 蛋白質 核酸 酵素 Vol.34 No.4(1989) p289-292

鈴木撃之、石井直明 遺伝 1986 年 11 月臨時増刊号 (40 巻 12 号) p109 - 117

Brenner, S.: Genetics 77, 71 (1974)

キャピラリー等電点電気泳動による ヒトポリクローナルIg-Gの分離

(日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ¹, 東京都立大学理学部²)

○長堀崇重¹⁾, 泉友則²⁾, 奥山典生²⁾

Separation of Human Polyclonal Ig-G by Isoelectric Focusing
Takae NAGAHORI¹⁾, Tomonori IZUMI²⁾, Tsuneo OKUYAMA²⁾

¹Biotechnology Division, Nippon Bio-Rad Laboratories and

²Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

We attempted to analyze the immunoglobulin G on isoelectric focusing in high performance capillary electrophoresis (HPCE-IEF).

Separation mechanism of HPCE-IEF is created pH gradient by carrier ampholytes when voltage is applied. Such as proteins which have amphoteric substances are focussed to their isoelectric points.

1. 緒言

高性能キャピラリー電気泳動法は、その分離能の高さゆえに生体試料、特にタンパクの分離分析に対して期待が持たれている。筆者らは第9回の本シンポジウムにおいて、血清中に含まれる5種類のタンパクについてゾーン電気泳動法(以下CZE法)による分離検討の結果を発表した(1)。しかし、多数のサブクラスが存在する免疫グロブリンG(以下Ig-G)に対しては、それらを分離するには至らなかった。今回筆者らは分離の対象をIg-Gに絞り、電荷によって分離を行うCZE法ではなく試料の等電点によって分離してから検出をするキャピラリー等電点電気泳動法(以下HPCE-IEF法)の検討を行った。

2. 装置及び試薬

装置にはバイオ・ラッド ラボラトリーズ社のHPE-100とカートリッジ式キャピラリー(12cm×25µmID)を使用した。また、泳動時の電源のモードは定電圧として、検出波長は280nmと設定した。

両性担体溶液はpH7-9(1.8%), pH9-11(0.9%)を基本組成として、試料にはサングロボール10mg/ml(Ig-G 7.5mg/ml相当)を使用した。

3. HPCE-IEF法の分析操作

①キャピラリー中への試料の注入

試料溶液: 両性担体溶液 = 1 : 9 (v/v) として調製した試料をキャピラリーへ圧入する。

②フォーカシング

電極液に10mMリン酸(陽極)、20mM水酸化ナトリウム(陰極)を使用して、8kVで行う。(Fig. 1)

③検出

フォーカシング終了後に、陰極液を20mM水酸化ナトリウム/80mM塩化ナトリウムに交換して8kVの条件下で電気泳動を行い、②で分離した試料成分を再びイオン化して陰極方向へと移動させる。(Fig. 2)

4. 結果

①フォーカシング時間の検討

両性担体溶液のみでフォーカシング操作を行い、30秒毎に電流値の下降の状態を記録した。最初の3分間は急激な電流の下降が認められたが、5分経過時には緩やかになり10分経過後にほぼ安定を呈した。(Fig. 3)

②Ig-G試料の分析

3-①の方法によって調製したIg-G試料を3の方法によって分析してFig. 4に示した結果を得た。また、分析回数を重ねることでキャピラリー内面のコーティング処理が劣化して電気浸透現象が起こり、その影響により分離不良となったと考えられる。(Fig. 5)

③コーティングの再生

Fig. 6に示した手順によってハイドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)によるコーティング処理を施してIg-Gの分析を実施した。

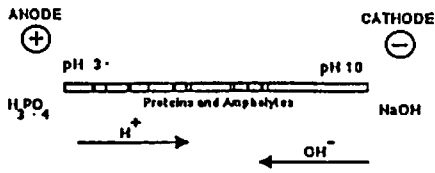


Fig. 1 フォーカシング時の状態

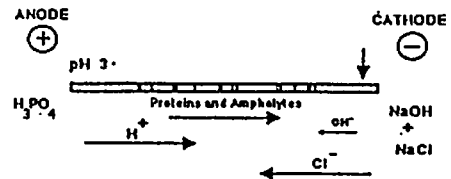


Fig. 2 検出時の状態

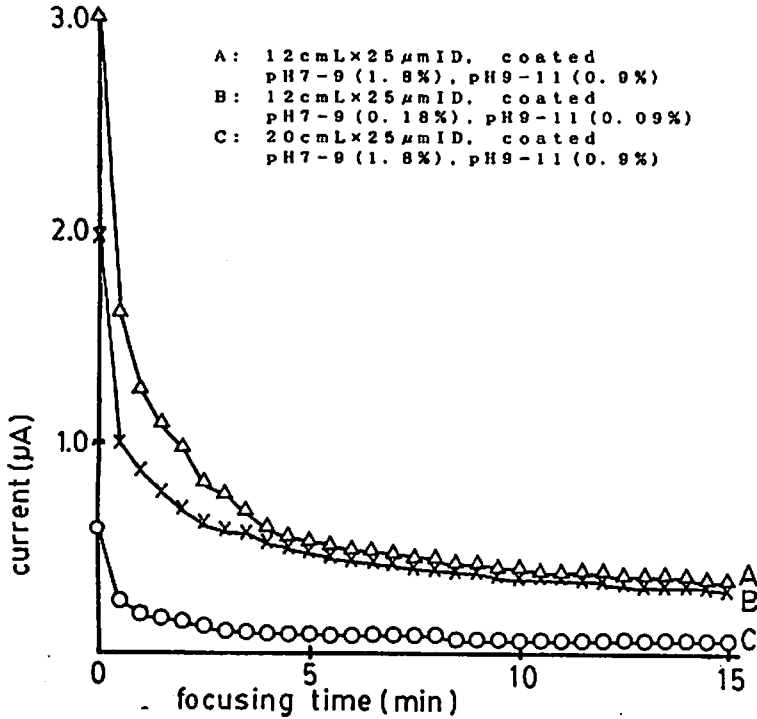


Fig. 3 フォーカシング時の電流の変化
条件: 8kV定電圧

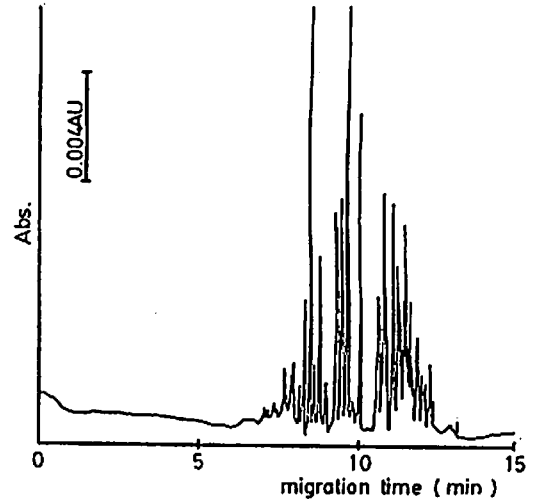


Fig. 4 HPCE-IEF法による
Ig-Gの分析結果
Capillary: 12cmLx25umID
Sample conc: 0.75mg/ml
Focusing: 8kV, 180sec.
Mobilization: 8kV

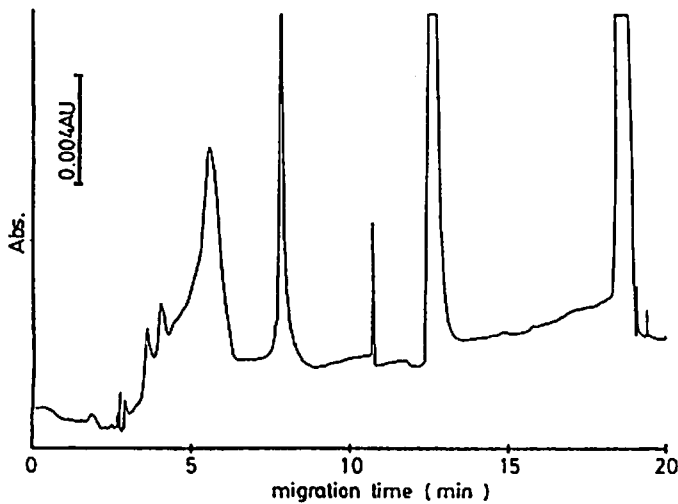


Fig. 5 コーティングが劣化したキャピラリー
による分離の不良
(条件はFig. 4と同じ)

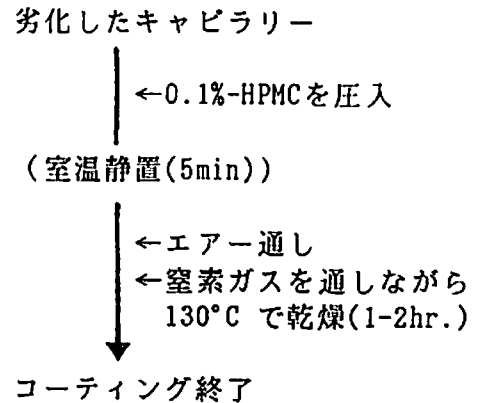


Fig. 6 HPMCによるコーティングの手順

参考文献

(1) 泉、山本、真鍋、奥山、長堀, 第9回電気泳動シンポジウム要旨集(1989), 17-18

キャピラリー電気泳動によるヒトポリクローナルIgGの解析

(東京都立大・理・化¹、日本バイオラッド・ラボラトリーズ²)
 ○泉友則¹、長堀崇重²、高橋郁子¹、奥山典生¹

Analysis of Human Polyclonal IgG by Capillary Electrophoresis
 Tomonori Izumi¹, Takae Nagahori², Ayako Takahashi¹
 and Tsuneo Okuyama¹

¹ Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

² Biotechnology Division, Nippon Bio-Rad Laboratories

Human polyclonal IgG, which is known to be constituted from various species, was separated into more than 10 spots by 2D-PAGE. To elucidate the relation between subclasses of IgG and the spots, we studied on IgG subfractions obtained from ion exchange chromatography and from protein A affinity chromatography. Limited digestion was also studied with a commercial IgG preparation for intravenous administration use.

(はじめに)

ヒトポリクローナルIgGは、多くの分子種で構成されていることが知られており、2次元電気泳動において、等電点の異なる少なくとも十数個のスポットに分離される。IgGのサブクラスと、これらのスポットを構成する分子種との関連を明らかにするために、キャピラリー電気泳動を用いて、イオン交換クロマトグラフィー及びプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによる各種IgG画分、限定消化物について分析し考察した。

(実験方法)

キャピラリー等速-等電点電気泳動

電気泳動装置は、既報のように島津IP-2Aを改変した全自動キャピラリー電気泳動装置¹⁾を用いた。陽極槽液は、5mM HCl-9.3mM 2-amino-2-methyl-1-propanol (pH9.9)を、陰極槽液は、50mM tranexamic acid-15mM potassium hydroxide (pH10.8)を用い、泳動管には、内壁をhydroxypropyl methyl celluloseで被覆したテフロンチューブ(500 μm I.D.x 230mm L.)を使用した。泳動は、50 μA 定電流で4.8分間、その後150 μAで約11分間行なった。ヒトポリクローナルIgG試料には、市販の静注用免疫グロブリン製剤(サングロボール、三共)を用い、試料IgG溶液(IgG 7.5mg/ml)20 μlに4% Ampholine-0.1% sodium azide溶液30 μl(10 μl pH7-9, 20 μl pH9-11)を加え蒸留水で400 μlとして分析に用いた。

(結果)

キャピラリー等速-等電点電気泳動によるIgGの分離

キャピラリー等速-等電点電気泳動において、ヒトポリクローナルIgGは、アンフォライン0.1%(pH7-9)-0.2%(pH9-11)の条件で大きく酸性と塩基性の2つの画分に分離し、さらにそれぞれの画分は、7個と5個に分離された(Fig.1)。UV吸収よりこのIgG標品での酸性-塩基性の比は、約3:2と見積もられ、これらの画分は、イオン交換クロマトグラフィーによる分画が可能であった。他の標品についても量比に差は見られたが同様な2つの画分に分離した。

プロテインAアフィニティークロマトグラフィーフラクションの分析

50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で平衡化したプロテインAカラムに試料IgGを負荷し、引き続き50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)、50mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH3.0)によりステップワイズで溶離した。pH 7.0、pH 5.0、pH 3.0で溶出したフラクションは、抗サブクラス抗体により、それぞれ、IgG3、IgG2、IgG1+IgG4を主に含んでいることが確認され、IgG3フラクションは、元の試料IgGに比べピーク1-3、11、12が増加し、4-9が減少した(Fig.2)。IgG2フラクションは、ピーク8、9が減少し、10、11、12はほとんど見られなかった。IgG1+IgG4フラクションは、ピーク1-3、5、7、8、が増加し、4、6、11、12が減少した。2次元電気泳動の結果を含めて考えるとIgG3は、最も塩基性寄りに、IgG2は、酸性-中性領域に幅広く、IgG1+IgG4は、酸性及び塩基性領域に分布していた(Fig.3)。これらの分布には、Howard²⁾らによるIgGH鎖についての報告との対応が見られた。

ペプシン限定消化IgG の分析

ペプシンによりIgGを限定消化しほぼ完全にF(ab')₂とpFc'に分解したIgG消化物を得た。消化物のHAPクロマトグラフィーにより得られたペプチド、F(ab')₂、pFc'フラクションの分析(Fig.4)から、F(ab')₂は、元のIgGによく似た分布、pFc'は、主に中性領域に2つのピークとしての分布を示した。

(考察)

以上の結果より、ヒトポリクローナルIgGは、大きく酸性、塩基性の2つのグループに分類できると考えられる。個々のピークの構成分子種は、プロテインAクロマトグラフィーによるサブクラスフラクションの分析から、サブクラスとの相関は、低いものと考えられる。また、限定消化により得られたF(ab')₂が元のIgGによく似たパターンで泳動されていることから、個々のピークが可変領域に於ける分子種群で構成されている可能性が示唆された。ヒトポリクローナルIgGは、キャピラリー等電点電気泳動で約50個のピークとして分離されており(Fig.5)、このような高分離能の分析手法とあわせることにより、IgG分子種に関するより詳細な解析がすすめられると考えられる。

(引用文献)

- 1.T.Manabe, H.Yamamoto and T.Okuyama, *Electrophoresis*, 10, 172 (1989).
- 2.A.Howard and G.Virella, *Protides of the Biological Fluids*, 17, 449 (1969).

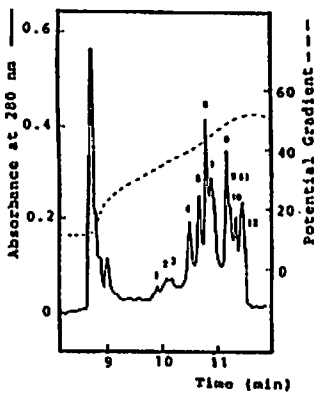


Fig.1 Standard Pattern of Polyclonal IgG
 Conditions
 Leading electrolyte solution:5mM HCl-9.3mM 2-amino-2-methyl-1-propanol(pH9.9)
 Terminating electrolyte solution:50mM tranexanic acid-15mM KOH
 Separation tubing:PFEP tubing (500μm I.D.x 230mm L.) coated with HPHC
 Electrophoresis:1st stage at 160μA constant current for 4.8min
 2nd stage at 50μA constant current for 11min
 Sample:IgG 0.37mg/ml Ampholine(pH7-9)0.1X-(pH9-11)0.2X 0.0075Xsodium azide

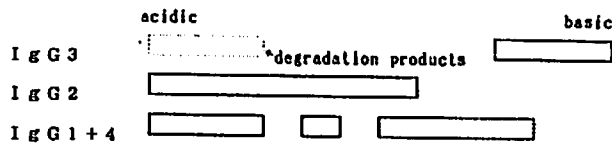


Fig.3 Distribution of IgG Subclasses

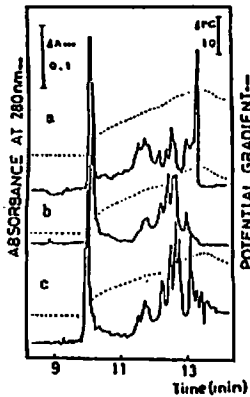


Fig.2 IgG Subfractions obtained from Protein A Affinity Chromatography
 a:IgG3 b:IgG2 c:IgG1+IgG4

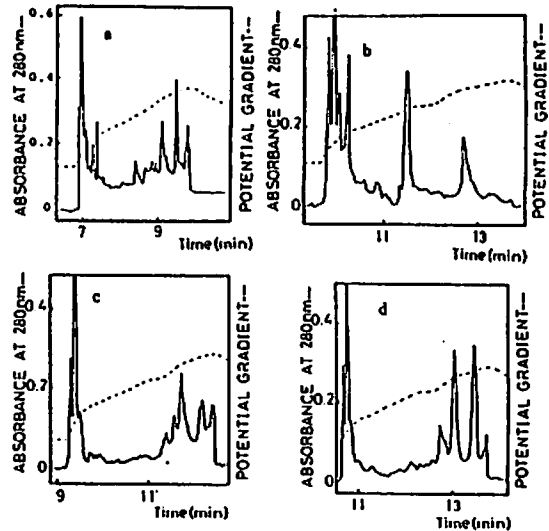


Fig.4 Limited Digestion Products of IgG
 a:digested for 1hr b:HAP peptides fraction
 c:HAP F(ab')₂ fraction d:HAP pFc' fraction

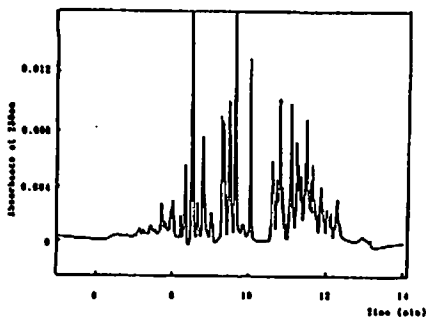


Fig.5 Capillary Isoelectric Focusing of Polyclonal IgG

Conditions
 Sample:IgG 0.75mg/ml Ampholine(pH7-9)1.8X-(pH9-11)0.9X
 Separation tubing:fused silica tubing(25μm I.D.x 120mm L.)
 Focusing:anode 10mM phosphoric acid
 cathode 20mM sodium hydroxide
 at 8kV constant voltage for 180sec
 Mobilization:anode 10mM phosphoric acid
 cathode 20mM sodium hydroxide-80mM sodium chloride
 at 8kV constant voltage for 15min

キャピラリー電気泳動の光化学系複合タンパク質分析への応用

(日本分光) ○千田正昭 佐々木徹

(埼玉大、理) 檜山哲夫

Application of Capillary Electrophoresis to Analysis of Photosystem Complex Proteins

Masaaki Senda, Toru Sasaki (Jasco)

Tetsuo Hiyama (Faculty of science, Saitama university)

Photosystem 1 (PS1), Photosystem 2 (PS2) chlorophyll complex proteins, which are membrane proteins, were prepared from fresh spinach leaves by extraction and chromatographic purification after solubilization with Triton X-100. Then, the PS1 were separated by using a Jasco CE-800 capillary electrophoresis system. We investigated the effects of pH, different ions and surfactants of electrolyte on the migration time of PS1 complex.

1. はじめに

高等植物、藻類の光合成には系1、系2の二つの光化学系反応中心が存在しいずれも葉緑体のチラコイド膜中に存在する。系1はNADPの還元、系2は水の分解、酸素発生に関与している。これらの反応中心はクロフィル蛋白質複合体であり水に不溶な膜タンパク質である。古くから種々の界面活性剤を用いて反応中心複合体を可溶化、抽出、精製する試みが行われSDS-PAGEにより大、小のサブユニットに分離することが確認されている。我々はHPLCでは分離不十分なこの膜タンパク質をSDS-PAGEに代わる分析法としてキャピラリー電気泳動（以下CE）に期待し、電解液のイオン種、pH、界面活性剤の種類と有無等の分離条件を検討し得られた知見について報告する。

2. 実験

試料：市販標準タンパク質および光化学系1複合タンパク質標品(PS1)およびPS1の大サブユニットのみからなるクロフィルa結合タンパク質（以下CP1）を使用した。PS1およびCP1はオレノ草の破碎葉緑体（チラコイド膜）をTriton X-100で可溶化し、硫酸分画、DEDE-トヨハール、DEAE-セルロースおよびハイトロキシアパタイトの五つのステップで精製されたPS1標品を得た。得られたPS1標品を更にSDS添加、セファクリル(S300HR)カラム、DE-51カラム等の処理によりCP1を精製し試料とした。

キャピラリーカラム：内径50 μm、全長70 cm（有効長50 cm）のフューストシリカ管を主に用いた。電解液：20 mM トリス塩酸緩衝液、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液を主にpH、界面活性剤の種類／有無等の条件を変え移動度の変化を確認した。

3. 装置

日本分光工業製CE-800システムを使用した。本システムは890-CE高圧電源ユニット、870/875-CEキャピラリー電気泳動用UV/VIS検出器およびスリット付キャピラリーカラム、電解液槽、試料注入機構、高電圧安全機構等を備えた保護カバーより構成されている。データ処理には807-ITインテグレートを使用した。（本システムの特徴はCE用、HPLC用に切替可能なUV検出器と容易に着脱可能なスリット付キャピラリーカラムである。試料注入にはサイホン方式と電氣的移動法を採用した。）

4. 結果および考察

界面活性剤非存在下の20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.9)、SDS存在下での20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) でのPS1、CP1を分析した結果、SDS存在下の20 mM リン酸緩衝液の方が良好な分離が得られた。リン酸濃度、SDS濃度、pH がPS1の二つのメインピークの移動時間に与える影響について検討した結果、リン酸濃度、SDS濃度の増加にともない移動時間は増大し、pHの上昇にともない移動時間が減少する傾向が観察された。

(図1、図2、図3)

またSDS-PAGEから得られたPS1の各分画を分析した結果、50 mM SDSを含む20mM リン酸ナトリウム緩衝液ではメインピークが各分画とも同一時間に観察された。(図4) すなわち本実験条件下ではPS1各サブユニットの分子量の差に基づく分離を達成するには至らなかった。

5. おわりに

SDS-PAGEと同等の分離能を期待しキャピラリー電気泳動でのPS1の分離を試みたが残念ながら目的は達成されなかった。しかし生体中のタンパク質試料を内面未修飾のフューストシリカキャピラリーでも再現性よく分析できることが解った。PS1各サブユニットの分離を目標に今後も検討を重ねたい。

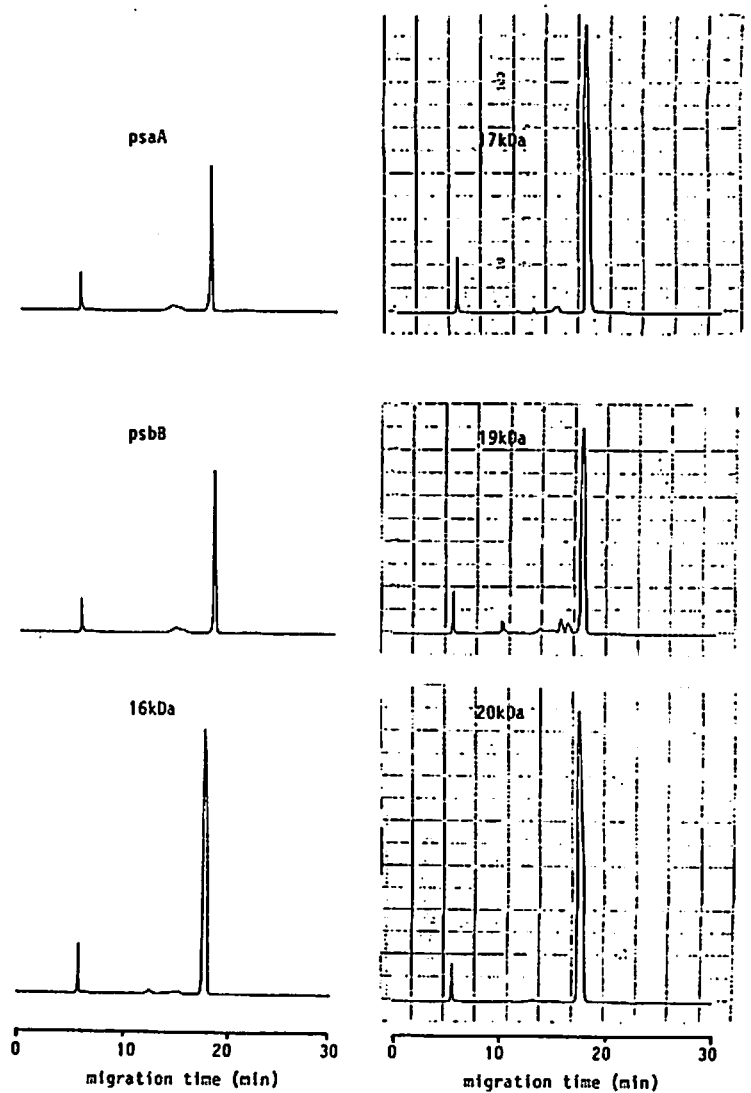
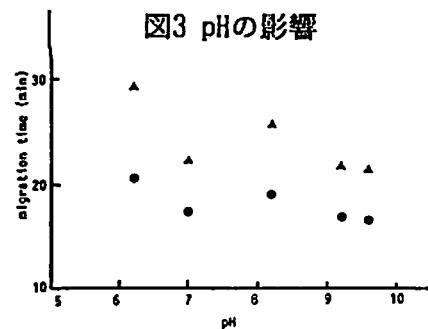
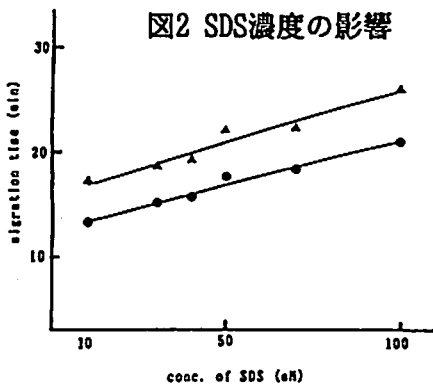
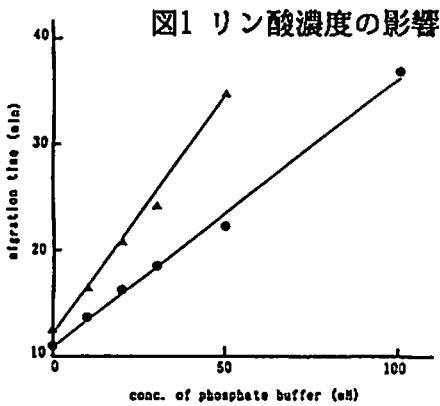


図4 PS1各サブユニットのCEによる分析

新しいチャージリバーサル法を用いた塩基性タンパク質の自由溶液電気泳動

(A B J、A B I^{*}) ○田中 博、山田泰子、小畑義充、喜古あかね、
銭場俊彦、John E. WIKTOROWICZ^{*}、Joel C. COLBURN^{*}

FREE SOLUTION CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF BASIC PROTEINS
BY NEW CHARGE REVERSAL METHOD

Applied Biosystems Japan, Inc. and Applied Biosystems, Inc.*
Hiroshi TANAKA, Yasuko YAMADA, Yoshimitsu OBATA, Akane KIKO
Toshihiko SEMBA, John E. WIKTOROWICZ* and Joel C. COLBURN*

Separations of large proteins and peptides by free solution capillary electrophoresis (FSCE) have often used extremes of pH to minimize interactions with the fused silica capillary. However, analyses requiring non-denaturing conditions, such as those involving biomolecular interactions and native structure analysis are difficult to perform.

We present here strategies applicable to FSCE which permit separations of proteins and peptides in the pH range of 2 to 10. Undesirable wall-solute interactions were stably modified or eliminated, thereby some basic proteins were demonstrated to be successfully analyzed in the native forms at neutral pHs.

1. はじめに

自由溶液電気泳動でタンパク質の分析を行なう場合、フューズドシリカキャピラリーへの吸着を抑えるために、しばしば極端なpHが用いられてきた。しかし多量体タンパクや抗原・抗体複合体などを分析するには、中性領域のバッファーを用いてその高次構造を未変性な状態に保つ必要がある。キャピラリー内壁のシラノール基を化学反応によってマスクする方法はアルカリ条件下で不安定であり、電気浸透流の活用もできない。また分離バッファー中に塩基性コーティング剤を添加するダイナミックコーティング法は、試料分子とコーティング剤との相互作用が問題点となりうる。

本研究では、塩基性タンパク質でも等電点以下の望ましいpHで分析できる可逆的なチャージリバーサル法を開発し、その応用を行なった。

2. 実験

試料および試薬 乳酸脱水素酵素 (LDH) アイソザイム (ウサギ筋由来) およびトリプシノーゲンはシグマから、またヒストンH4 (イカ睾丸由来) は P. Sautierre博士より供与されたものを使用した。ポリメリックコーティング剤はアプライドバイオシステムズ (A B I) より入手した。**装置** キャピラリー電気泳動装置はA B Iモデル270Aを使用し、内径50μmのフューズドシリカキャピラリー (ポリミクロ製) を装着した。分離はすべて30°Cで行ない、200nmでオンカラム検出した。**方法** 内壁をコーティングする前に、減圧注入法により次の手順で

キャピラリーをコンディショニングした：1N NaOH洗淨、水リンス、0.1NHCl洗淨、水リンス、最後にバッファーで平衡化。チャージリバーサルは、コーティング剤を一定時間キャピラリー中に流し、その後使用するバッファーでリンスして過剰のコーティング剤を洗い流すことにより行なった。内壁電荷の反転後は注入側を陰極として泳動した。必要に応じて中性マーカーのメシチルオキシドの泳動時間を測定し、電気浸透流の強さ、すなわちコーティング状態が一定であることを確認した。コーティングの除去は前記のコンディショニング法で容易に行なえた。

3. 結果および考察

コーティングは酸性から中性条件下で極めて安定であった。実際のラン条件下で連続運転したところ、電気浸透流の強さは10時間まで±1%RSDの範囲内で再現的であった。またpH9では緩やかにコーティングが剥がれてくるが、各ランの後に1分間コーティング剤を流すことにより再現性を保つことができた。pHに感受性の高い四次構造をネイティブな状態で分析できるか確認するために、pH7でLDHアイソザイムの分離を行なった(Fig.1)。通常の方法ではシャープなピークは観察されないが、チャージリバーサル法ではpI値の低い順、つまり筋肉型サブユニット含量の高い順からアイソザイムが分離検出された。もっとも塩基性の強いタンパク質として知られるヒストンはリジン残基の可逆的なアセチル化によりセルサイクルの調節を行なっているが、本法によりヒストンH4がそのアセチル化の程度の差で分離された(Fig.2)。タンパク質のpI値にしたがってキャピラリー内壁の電荷の正負をこのようにコントロールすることにより、未変性状態での分析や高次構造の変化を研究するための普遍的な方法になりうると思われる。

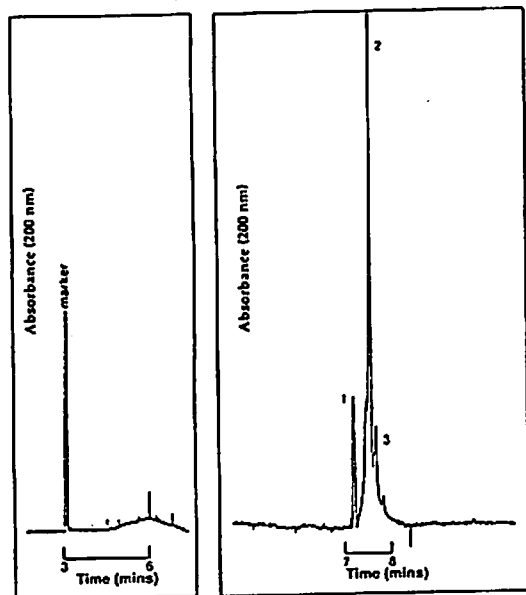


Fig.1 Separations of LDH Isoforms (500 ug/ml). Injection, vacuum 3 sec; voltage, 30 kV (400V/cm); carrier, 5mM sodium phosphate, pH 7.00. Peaks 1, 2, and 3 in B are likely isoforms, pI=8.30, 8.40, 8.50, respectively.

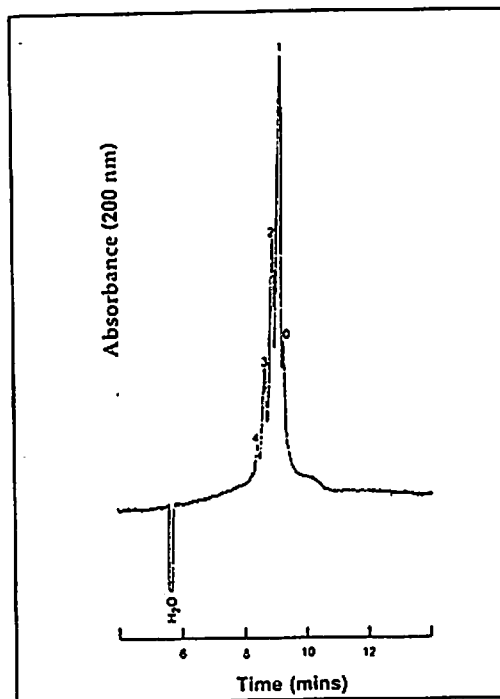


Fig.2 Multi-acetylated Histone H4 (500 ug/ml, 0-4 designates degree of acetylation). Injection, vacuum 2 sec; charge-reversed; voltage, 15 kV (300 V/cm); carrier, 10 mM sodium phosphate, pH 6.60.

文献

- 1) John E. Wiktorowicz and Joel C. Colburn: Electrophoresis, 11, 769 (1990)

キャピラリー電気泳動によるカルシウム結合タンパク質等の分析

(農水省・農生資研) ○梶原英之

ANALYSIS OF CALCIUM BINDING PROTEINS BY
CAPILLARY ELECTROPHORESIS
National Institute of Agrobiological Resources
Hideyuki KAJIWARA

Calcium binding proteins such as calmodulin and parvalbumin were analyzed by capillary electrophoresis. Migration time of these proteins was shifted by addition of CaCl_2 or EGTA in electrophoresis buffer. These shifts were caused by the changes of the net charge and Stokes radius of proteins. Zinc binding protein, carbonic anhydrase, did not show the shift by addition of CaCl_2 in the buffer, but new peaks appeared by addition of ZnCl_2 . N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide and trifluoperazine which bind to calmodulin only in the presence of calcium ions showed the shift of migration time by binding to the protein.

1、はじめに

カルモジュリンやバルブアルブミンなどのカルシウム結合タンパク質はその立体構造がカルシウムイオンの結合によって大きく変化し、他の酵素などの活性を制御していることが知られている。また、カルシウムイオンの結合に伴い疎水性試薬(カルモジュリン阻害剤)の結合する領域が現われることも知られている。ここではカルシウムイオンなどによってカルモジュリンなどのタンパク質のキャピラリー電気泳動における電気泳動移動度の変化し、疎水性試薬の結合によってもまた、電気泳動移動度の変化することを報告する。

2、実験

内径50 μm 、全長122cm(有効長100cm)のフューズドシリカ管を用い、定電圧30kV、波長200nmの吸収によって測定した(ABI, 270A)。泳動に用いた緩衝液は、50mM トリス-384mM グリシン、100mM トリス-100mM トリシン、および100mM トリス-100mM トリシン-0.1%SDS にそれぞれ2mM CaCl_2 、2mM

ZnCl₂、0.2mM EGTA、0.01mM トリフルオペラジン、0.01mM N-(6-アミノヘキシル)-5-クロロ-1-ナフタレンスルホンアミドを含むものを用いた。分析に用いたタンパク質はカルモジュリン、パルプアルブミン、カルボニックアンヒドラーゼ、ラクトグロブリン等の市販品を用いた。

3、結果および考察

トリス-トリシン緩衝液の場合、カルシウムおよびEDTAの有無にかかわらず泳動開始後約19分後にカルボニックアンヒドラーゼ、約24分後にラクトグロブリンのピークが見られたが、カルシウムイオンの存在する条件において32分後に、カルシウムイオンのキレートされた条件で44分後にカルモジュリンのピークが観察された。このようにカルシウムイオンの有無によってカルモジュリンの電気泳動移動度が増加することがわかった。また、パルプアルブミンにおいても同様なシフトが観察され、カルシウムイオンのキレートされた条件では、電気泳動移動度が遅くなることわかった。これらの現象は電気泳動基本式より導かれる下式、

$$k(q) = \frac{q(+Ca)}{q(-Ca)} = \frac{V(+Ca)}{V(-Ca)} \cdot \frac{r(+Ca)}{r(-Ca)} = \frac{t(-Ca)}{t(+Ca)} \cdot \frac{r(+Ca)}{r(-Ca)}$$

によって、 $k(q) > 1$ と計算された。つまり、タンパク質のストークス半径の変化よりも、主にカルシウムイオンの結合に伴うタンパク質の全荷電の変化によって電気泳動移動度の変化が起きていると推測された。ただし、ここで $k(q)$ はカルシウムイオン存在下と非存在下におけるタンパク質の全荷電の比、 q はタンパク質の全荷電、 V は電気泳動移動度、 r はストークス半径、 t は移動時間、 $(+Ca)$ はカルシウムイオンの存在する条件下、 $(-Ca)$ はカルシウムイオンのキレートされた条件下である。また、カルシウムイオンの有無による電気泳動移動度の変化はトリス-トリシン-SDS緩衝液を用いた実験によっても観察された。これらのピークのシフトはカルシウム結合タンパク質のみならず、カルボニックアンヒドラーゼ(Zn結合タンパク質)でも観察された。

また、トリフルオペラジンやN-(6-アミノヘキシル)-5-クロロ-1-ナフタレンスルホンアミドの疎水性試薬およびカルシウムイオンが電気泳動緩衝液中にある条件で泳動を行なうと、疎水性試薬のない場合に比べて電気泳動移動度が約2%減少することがわかった。カルシウムイオンのキレートされた条件下においては電気泳動移動度の遅延は観察されなかった。これはカルモジュリンにカルシウムイオンの結合によって生じた疎水性領域にこれらの試薬が結合したことによって電気泳動移動度が小さくなったと考えられた。

高性能キャピラリー電気泳動による 糖鎖—タンパク質結合定数の測定

(近畿大薬) ○本田 進、多賀 淳、鈴木健司

ESTIMATION OF BINDING CONSTANT OF CARBOHYDRATE TO PROTEIN
BY HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

Susumu HONDA, Atsushi TAGA, and Kenji SUZUKI
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

SUMMARY: Protein - carbohydrate interaction was studied by high performance capillary electrophoresis by using a combination of lectins and lactobionic acid as a model system. The retardation of the lectin peak was dependent on lactobionic acid concentration, and binding constant could be calculated from the retardation of migration time.

【はじめに】

高性能キャピラリー電気泳動は高い分離能とオンカラム検出を特長とする優れた分析法であり、種々の物質の分離・定量に用いられてきたが、自由溶液中での分析法であるというもう一つの特長を生かした研究も可能であると考えられる。

糖鎖構造はきわめて多様であり、糖鎖はこの多様性に基づく特異な機能をもっている。タンパク質との結合はとくに注目されている機能であり、構造—結合性相関を探ることは種々の生命現象を理解するための重要な知見を提供することになる。糖鎖—タンパク質相互作用の度合を示す結合定数の測定は最も直接的なアプローチの手段であり、これまでに種々の方法が適用されてきたが、いずれも糖鎖構造の微妙な違いを識別できるほどに正確で信頼性の高いものではなかったと言える。

本研究においては、糖を含むキャリアー中でゾーン電気泳動を行った場合にタンパク質が示す移動度の変化を精査することにより、この問題へのアプローチを試みた。

【理論】

タンパク質 (P) とリガンド (L) の反応によって生成するコンプレックス (PL) の解離定数 (K_d) は式 1 で与えられる。

$$K_d = [P] \cdot [L] \cdot [PL]^{-1} \quad (1)$$

コンプレックスのモル分率を α とすると、 $\alpha = [PL] \cdot ([P] + [PL])^{-1}$ であるから、

$$K_d \cdot [L]^{-1} + 1 = \alpha^{-1} \quad (2)$$

リガンドを含まないキャリアーおよび含むキャリアー中でゾーン電気泳動を行った場合 P の移動速度をそれぞれ V_p および V_{pL} とし、P および PL の電気泳動移動速度をそれぞれ v_p および v_{pL} とすると、

$$V_p - V_{pL} = \alpha (v_p - v_{pL}) \quad (3)$$

V_p および V_{pL} はそれぞれ $l \cdot t^{-1}$ および $l \cdot t_1^{-1}$ (ただし、 t および t_1 はそれぞれリガンド存在および不在のときの移動時間) に等しいので、 $v_{pL} - v_p = \Delta v$ とおけば、

$$(t - t_1)^{-1} = l \cdot \Delta v^{-1} \cdot t_1^{-2} \cdot K_d \cdot [L]^{-1} + l \cdot \Delta v^{-1} \cdot t_1^{-2} - t_1 \quad (4)$$

式 (4) から、 $[L]$ に対して $(t - t_1)^{-1}$ をプロットすれば、その勾配 A は

$l \cdot \Delta v^{-1} \cdot t_1^{-2} \cdot K_d$ (l はキャピラリーの有効長)で表すことができ、これによって

$$A = l \cdot \Delta v^{-1} \cdot K_d \quad (5)$$

コンプレックスの移動時間を t_2 とすると

$$A = t_1^{-1} \cdot t_2 \cdot (t_2 - t_1)^{-1} \cdot K_d \quad (6)$$

故に

$$K_d = t_1 \cdot t_2^{-1} \cdot (t_2 - t_1) \cdot A \quad (7)$$

結合定数(生成定数)はこの逆数 K_d^{-1} として求められる。

【実験】

装置 高圧電源には松定プレジジョンデバイセズ HER-301 型装置を用い、検出には日本分光 UVIDEC 100-VI 型紫外検出器を改造して使用した。**キャピラリー** Scientific Glass Engineering 製フューズドシリカ管(内径 50 μm , 長さ 85 cm, 有効長 65 cm)を用いた。**キャリア** Lactobionic acid (LA) を水酸化ナトリウムで中和したものを 50 mM リン酸緩衝液(pH 6.8)に加えて、種々の LA 濃度の溶液を調製し、これをキャリアとして用いた。

【結果】

相互作用が最大になる pH 領域においてキャリア中の LA 濃度を変えながら P (Ricinus communis agglutinin 60) のピークを観測すると、Fig. 1 に示すように移動時間は中性マーカー(mesityl oxide)に対して徐々に増加したのち定常状態に達した。

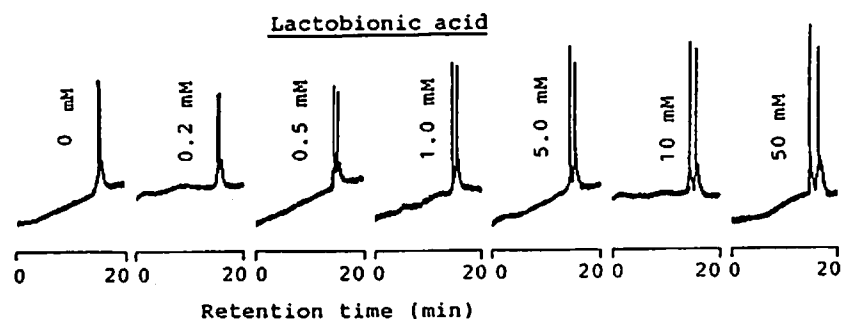


Fig. 1. Capillary zone electrophoresis of Ricinus communis agglutinin in carriers containing various concentration of lactobionic acid.

$[L]^{-1}$ に対して $(t - t_1)^{-1}$ をプロットしたところ、Fig. 2 のように良好な直線性が示され、この勾配から式(7)によって K_d を求めたところ、 3.1×10^{-4} M という値が得られた。他のレクチン類についても同様に良好な直線性が認められ、 K_d 値を算出することができた。この方法は精度ならびに再現性がよく、従来方法よりも簡便で信頼性の高い方法と言える。

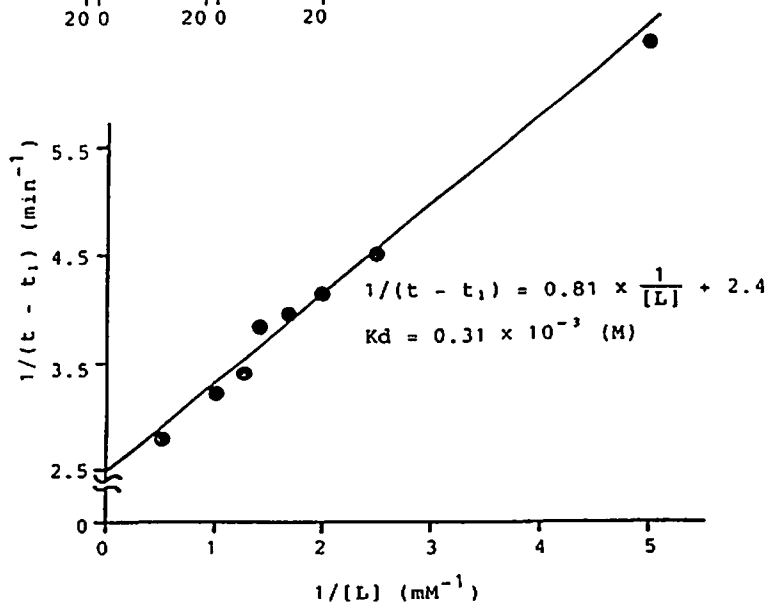


Fig. 2. $(t - t_1)^{-1}$ vs $[L]^{-1}$ plot for Ricinus communis agglutinin.

疎水性相互作用キャピラリー電気泳動によるペプチドマッピング

(アプライド・バイオシステムズ・ジャパン¹、アプライド・バイオシステムズ²)
 神戸敏江¹、萩原佳代子¹、○銭場俊彦¹、田中博¹、Stephen E. Morning²、
 Judith A. Nolan²

PEPTIDE MAPPING BY HYDROPHOBIC INTERACTION CAPILLARY ELECTROPHORESIS

¹ Applied Biosystems Japan, Inc. and ² Applied Biosystems, Inc.

Toshie KANBE¹、Kayoko HAGIWARA¹、Toshihiko SEMBA¹、Hiroshi TANAKA¹、
 Stephen E. MORNING²、and Judith A. NOLAN²

Free solution capillary electrophoresis (CE) can increase the speed and reduce the sample requirements for analysis as compared to conventional methods. This technique sometimes exhibits loss of resolution and selectivity due to fragment interaction with each other and/or the capillary wall by coulombic force. Resolution may be improved by the addition of surfactants above their critical micellar concentration (CMC) to the separation buffer. Some peptides, however, are problematic because of their strong association with the micelle. We found such peptides were well-separated in the presence of short-chain ionic surfactants below their CMC through free solution hydrophobic interaction. This separation principle in CE was examined using a series of model peptides and enzymatically digested proteins.

1. はじめに

限定分解を受けた蛋白質より得たペプチド・マッピングは一次構造の比較を容易にするため、全構造決定の基礎のみならず、遺伝子工学上重要な意義がある。キャピラリー電気泳動(CE)は微量、迅速かつ高度の分解能を有し、優れたマッピングが可能である。しかしFS(Free Solution)では多くのペプチドを逆相HPLCのような一般的条件下にて分離することは困難である。我々はCMC(critical micellar concentration)以下の濃度を容易に達成するC-8までのアルキルスルホン酸を分離用キャリアー・バッファーに加え界面活性剤の疎水基がペプチドの疎水域と直接相互作用する系を作成した。このキャリアーを用いるCEでは、分子の荷電状態が変化しFSにおいて、相互分離が改良されることを見出だした。この現象は合成ペプチドを用いて端的に示すことができた。また、性質の異なる多くのペプチドが混在する蛋白質の酵素消化物においても、効果が明らかであった。

2. 実験

界面活性剤としてのアルキルスルホン酸は、PSA(C-5)、HSA(C-6)、OSA(C-8)、DSA(C-10)、SDS(C-12)を30mMホウ酸バッファー(pH 9.5)または30mMリン酸バッファー(pH 2.5、4.0、6.0、7.0)と組み合わせキャリアーを構成した。CEはApplied Biosystems, Inc. (ABI) Model 270A、50 μ m I.D. x 70cm(有効長: 50cm)フューズド・シリカ管を使用した。泳動は、278V/cm、30°Cの条件で行った。試料は50 μ g/ μ lを2/1秒vacuum injectionし、吸光度200nmにて検出した。

3. 結果および考察

neurotensin(1.6KD)、GIP(gastric inhibitory peptide)(2.6KD)、PYY(4.2KD)、angiotensin II(1.05KD)はHSA、OSA、またはDSAがキャリアー中に50mM存在するとCMCを越えるDSAのみ相対移動度(Rf)が異なる(大きい)。この傾向は、より高分子量の蛋白質の

場合も同様であった。しかし分子量 300-1500 D の β -lactoglobulin- トリプシン消化物由来の負荷電性フラグメントでは、上記の傾向は観察されず HSA、OSA 存在下の Rf は DSA の場合よりも大きかった。CMC を境にして、ペプチドの Rf に差が生じることから、界面活性剤の疎水基と試料分子の疎水域に相互作用があることが推測される。GIP では PSA 濃度の上昇 (10 mM \rightarrow 100 mM) に伴い Rf および移動度が減少した。これは、界面活性剤の濃度が高くなるにつれ、ペプチドの正荷電性残基とチューブ内壁との相互作用が競合阻害されるためと考えられる。次に疎水性のみ異なる 5 種のペプチド (Ala-Phe-Lys-X-Lys-Asn-Gly, X: Gly; Ala; Ile; Leu; Trp) を化学合成し、100 mM HSA 添加による移動度への影響を検討した。FS (pH 9.5) ではこれらのペプチドは分離しなかったが HSA をキャリアーに加えることにより、各ペプチドの疎水性に応じ分離した。Ile と Leu は疎水性が近似しているため同一ピーク上にある (Fig. 1)。

THAS (tetramethyl ammonium sulfate) をキャリアーに加えてもこのような効果は認められず、その機序は疎水性相互作用に依存し、イオン対生成とは異なることが示唆された。

myoglobin (17 KD) の Lys-C endoproteinase 消化物を、50 mM HSA 非存在および存在において CE マッピングを行った。pH 2.5、4.0、6.0、7.0 においていずれも HSA 存在下では、より多くのピークが観察された。分離したピークは対応する 5 群に分類した (Fig. 2)。HSA 存在の場合、A 群は明らかにピーク相互が分離している。E 群は対比困難であるが、多くのピークが認められる。C、D 群はピーク高から、ピーク数は同等であるが位置が異なっている。しかしいずれの場合においても、CMC 以下の界面活性剤存在下では各ピークは高度に解像され、広範囲に相互分離した。FSCE では、pH の選択が重要な因子となるが、本法では pH の顕著な影響は認められなかった。この疎水性相互作用 CE は多くのフラグメントを含みかつその性質の予測が困難な蛋白質の CE - ペプチド・マッピングに一般法を提供する。同時に truncate peptide を多く含むと予想される、固相合成ペプチドの純度検定には最も適った方法である。

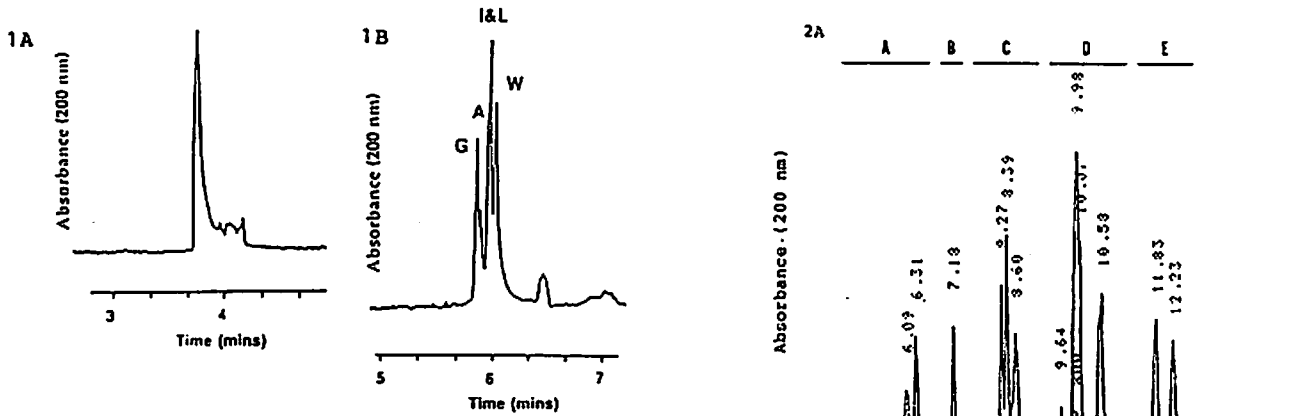
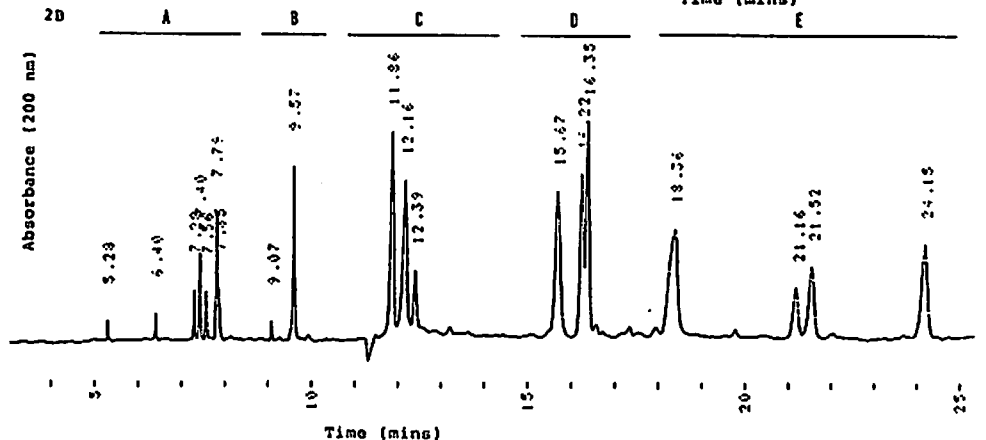


Fig. 1. FSCE of a mixture of synthetic heptapeptides with substitution of a single neutral amino acid.

A. 30 mM sodium borate, pH 9.5;
B. Buffer A with 100 mM HSA.

Fig. 2. Comparison of FSCE of myoglobin Lys-C digested peptides in A. 30 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 and B. Buffer containing 50 mM HSA.



キャピラリー電気泳動による生体高分子及びバイオオリゴマーの分離
(神戸女子薬大¹⁾・アプライドバイオシステムズ²⁾) ○馬場嘉信¹⁾、
津波古充朝¹⁾、榎本滋²⁾、A.M. Chin²⁾、R.S. Dubrow²⁾

HIGH PERFORMANCE SEPARATION OF BIOPOLYMERS AND BIOOLIGOMERS
USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Yoshinobu Baba¹⁾, Mitsutomo Tshako¹⁾, Shigeru Enomoto²⁾,
A.M. Chin²⁾, and R.S. Dubrow²⁾

¹Kobe Women's College of Pharmacy and ²Applied Biosystems Inc.

A simple method is presented for the preparation of polyacrylamide gel filled capillaries for capillary gel electrophoresis. Gel filled capillary showed ultrahigh resolution of polynucleotides. Mixture of polynucleotides in chain length from monomer to 150mer was resolved completely within 40 min.

1 はじめに

キャピラリー電気泳動法は、核酸やタンパク質などの生体高分子の分離に威力を発揮する。特に、ポリアクリルアミドなどのゲルを充填したキャピラリーを用いると、非常に高い分解能で、生体高分子を分離することができる。本研究では、新しい簡便なゲルの充填法を開発し、核酸の高分解能分離に成功した。

2 実験

サンプルとしては、オリゴデオキシアデニル酸(40-60merの混合物、ファルマシア製)及びポリアデニル酸(ヤマサ醤油製)をヌクレアーゼで分解したものをを用いた。

キャピラリー電気泳動装置は、アプライドバイオシステムズ社ABI Model 270Aを用いた。キャピラリーは内径100 μ m、外径375 μ m、長さ50cm(検出器までは30cm)である。緩衝溶液は0.1Mトリス+0.25Mほう酸+7M尿素である。アクリルアミド溶液は、アクリルアミド19gとN,N'-メチレンビスアクリルアミド1gを水に溶かし50mlにし調製した。

キャピラリーへのゲルの充填の方法は以下の通りである¹⁾。キャピラリーのコーティングを1部はがし、検出用のセル窓をあける。このキャピラリーに1MNaOHを2時間流し、洗浄する。その後、水を10分間流す。1mlのアクリルアミド溶液に緩衝溶液を7ml加え、超音波で脱気する。この溶液を5mlとり、10 μ lの10%N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)と10 μ lの10%過硫酸アンモニウムを加える。TEMEDと過硫酸アンモニウムを加えると、アクリルアミドの重合が始まるので、すぐ、キャピラリーに流し込む。その際には、ABI Model 270Aのキャピラリーの洗浄機構(バキュームインジェクション)を利用し、15分間アクリルアミド溶液をキャピラリー中に通す。

その後、重合反応を行わせるために、室温で1時間放置する。このときの、アクリルアミドのゲル濃度は5%Tであり、架橋度は5%Cとなる。

サンプルは陰極側より5kVで1秒間電気泳動し添加し、キャピラリー1cmあたり200Vの定電圧で泳動した。検出は260nmで行った。

3 結果と考察

図1にオリゴデオキシアデニル酸(40mer-60mer)を分離した例を示す。泳動を始めて19分から23分の間に、24本のピークが表れており、1塩基の違いによりオリゴデオキシアデニル酸が分離されていることがわかる。

図2にポリアデニル酸を酵素で分解した生成物を分離した例を示す。図2では、泳動後15分から42分の間に、150本以上のピークが検出された。これらのピークも1塩基の違いによりそれぞれ分離されているものと思われる。

以上のように、本研究で開発したような、簡便な方法でも、非常に分解能の高いゲル充填キャピラリーを得ることができることが明かとなった。

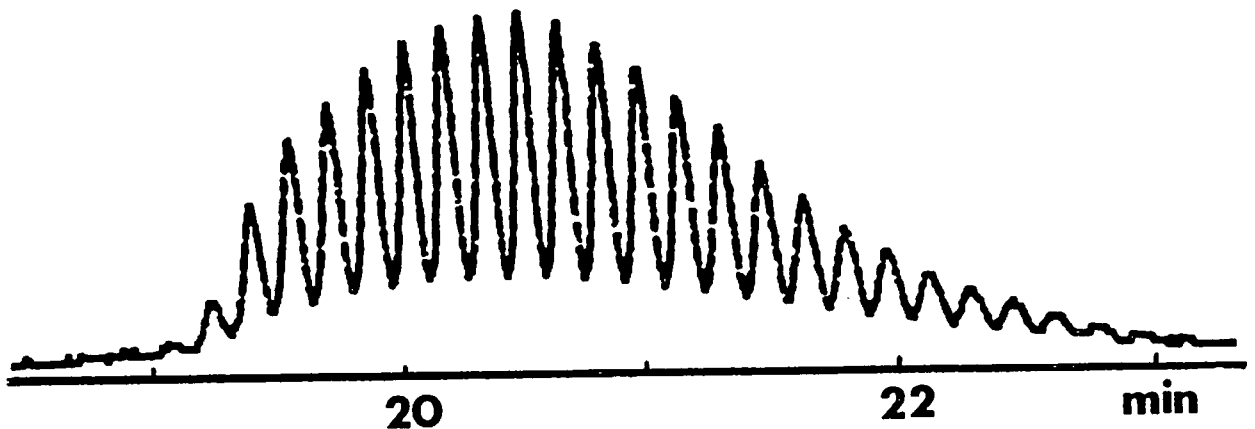


Fig. 1. Separation of oligodeoxyadenylic acids($p(dA)_{40-60}$)

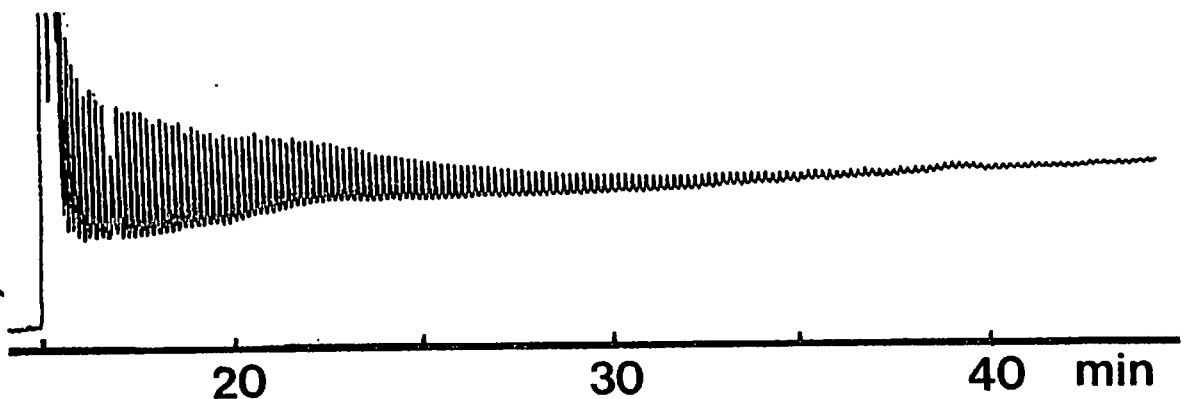


Fig. 2. Separation of enzymatic hydrolyzate of polyadenylic acids.

1) Y. Baba, T. Matsuura, K. Wakamoto, M. Tshako, Chem. Lett., submitted.

キャピラリーゾーン電気泳動による脳内ヌクレオチドの分析

(国立精神・神経センター) ○今澤 正興、斎藤 智子

ANALYSIS OF NUCLEOTIDES IN THE BRAIN BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

National Institute of Neuroscience, NCNP

Masaaki Imazawa and Tomoko Saitoh

The effect of pH on the separation of ribonucleotides by capillary zone electrophoresis in untreated fused silica capillaries has been examined. At pH4.7, pH6.1 and pH10.4, the base line separations of 12 nucleotides (AMP, GMP, CMP, UMP, ADP, GDP, CDP, UDP, ATP, GTP, CTP, UTP) were achieved using 50-100 mM of acetate buffers or Good's buffers containing EDTA. The method was successfully applied to the analysis of nucleotides in the rat brain.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動法は核酸構成成分の分析法として有用であり、ヌクレオシドの、主として動電クロマトグラフィーを用いた分析例の報告は少なくない。一方、生体組織内に、より多量に存在し、(-)荷電を有するヌクレオチドの分離には、通常のキャピラリーゾーン電気泳動も有効と考えられ、電気浸透流存在下¹⁾、および非存在(抑制)下^{2,3)}の分離例の報告がある。しかし、後者では、組織内に比較的大量にあるヌクレオシドトリリン酸が先に検出され、微量のヌクレオシドモノリン酸が遅れて現れるため、生体試料の分析に適さず、前者における泳動条件の検討も充分しつこくされたとはいえない。我々は、電気浸透流存在下におけるキャピラリーゾーン電気泳動によるヌクレオチドの分離に対するpH緩衝液の影響を検討し、至適条件を見だし、更にそれを脳組織中のヌクレオチド分析に応用することを目的とした。

2. 実験

Beckman P/ACE System 2000 キャピラリー電気泳動システムを用い、検出波長には260nmを使用した。分離用キャピラリーには、内径75 μ m、有効長50cmのフューズドシリカ管(Beckman社供給)を用いた。pH緩衝液としては、pH5.6~pH11.0の間ではGoodの緩衝液(70~100mM)を、pH4.4~pH5.5では酢酸リチウム(50mM)を用い、25 $^{\circ}$ C、20~25kVで泳動を行った。マイクロ波照射したラット(7週令、雄)の前脳を摘出後、冷却下、3倍量の0.4M HClO₄中ホモジナイズし、30,000xg、20分間遠心分離した上清を4M KOHで中和し、同様の遠心分離操作を行い、HClO₄を除いた。得られた上清をキレックス処理後、水で4倍に希釈し、電気泳動用の脳由来ヌクレオチド試料とした。

3. 結果および考察

AMP、GMP、CMP、UMP、ADP、GDP、CDP、UDP、ATP、GTP、CTP、UTPの12種類のヌクレオチド標品の混合物の分離を pH4.4~pH11.0の間で検討したところ、pH4.7±0.2(LiOAc)、pH6.1±0.1(MES-Li)、pH10.4(CAPS-Na)において11分以内にすべてのヌクレオチドが完全に分離した。pH4.7およびpH6.1では、ヌクレオシドモノリン酸、ジリン酸、トリリン酸が各グループとして泳動され、塩基による移動速度は各々のpHでC>A>G>U、G>A>C>Uの順であった。緩衝液に加えた陽イオンの移動速度に与える影響を検討すると、Li>Na>Kの順にその減少が認められ、Kを用いた場合は、Liを用いた場合の約2倍の分析時間を必要とした(pH6.1)。この結果は、K<Na<Liの順で電気浸透流の増大が予想されることと一致する。従って、pH4.7およびpH6.1における分離には分析時間短縮のため、Li塩型の緩衝液を用いるのが適当である。ただ、pH10.4ではLi塩型緩衝液では各ヌクレオチドが完全分離されないため、CA

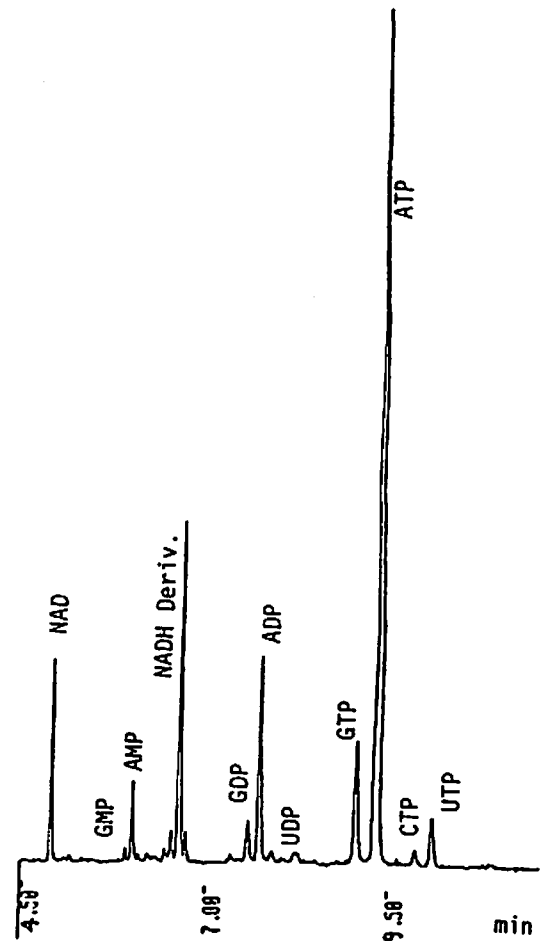


Fig. Separation of nucleotides from rat brain by capillary zone electrophoresis at pH 6.1.

PS-Naを使用することとした。次に、分離に及ぼすキレート試薬の効果を検討した。キレート試薬(EDTA)の存在はヌクレオチドの良好な分離のため不可欠であり、その非存在下では、特にヌクレオシドトリリン酸ピークに著しいリーディング認められた。通常、pH4.7、pH6.1、pH10.4において、各々3mM、1mM、100μMのEDTAを使用している。フォスフォネート型のキレート試薬、EDTPOもEDTAと同様な効果を示した。以上の基礎的な検討結果を基に、pH6.1(図示)およびpH10.4緩衝液を用いてラット脳内ヌクレオチドの分析を行うと、各々良好な分離結果が得られた。前述のヌクレオチドの他に、NADHの分解物の比較的大きなピークが認められた。適当な内部標準を用いて、これらのヌクレオチドの正確な定量を行うことは、今後の課題である。

4. 文献

- 1) T. Tsuda, K. Takagi, T. Watanabe and T. Satake, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 11 (1988) 721.
- 2) V. Dolnik, J. Liu, J.F. Banks Jr., M.V. Novotny and P. Bocek, *J. Chromatogr.*, 480 (1989) 321.
- 3) L. Gross and E.S. Yeung, *J. Chromatogr.*, 480 (1989) 169.

タンパク質及びDNAのキャピラリーゲル電気泳動

(姫路工大・理) ○眞鍋 敬、寺部 茂

Capillary Gel Electrophoresis of Proteins and DNAs

Takashi MANABE and Shigeru TERABE

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

The performance of capillary electrophoresis for the separation of proteins and polydeoxyribonucleic acids was examined using polyacrylamide gel-containing silica capillaries. Single base resolution of oligodeoxyadenylic acids was readily as expected from the results of slab gel electrophoresis. Capillaries containing linear polyacrylamide were found to be useful for the separation of DNA and proteins.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動法によるタンパク質および核酸の分析については、過去主として等速電気泳動の原理を用いた報告が先行し、本会でも多く発表されてきた。そのなかで、タンパク質の吸着を防ぐためのキャピラリー内面処理法が重要であること、タンパク質やDNAの電荷の違いによる分離のためには、両性電解質混合物を利用してキャピラリー内にpH勾配を形成させることが有効であることなどが明らかにされてきた。しかしタンパク質、DNAを分子量の違いにより分離するためには、キャピラリー中に高密度な分子の網目(マクロに見るとゲルとなる)を形成しておくことがまず考えられる。現にタンパク質の分子量による分析にはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法が、DNAの分子量による分析には高濃度尿素-ポリアクリルアミド電気泳動法が、それぞれ用いられ、大きな成果をあげている。キャピラリーゲル電気泳動法を用いれば、これらの方法と同様の分離能を期待できるだけでなく、オンラインで検出できる、自動化が容易であるなどの有利さがあるはずである。そこでまずDNAオリゴマーを用いてゲル密度、泳動条件などの検討を行い、さらにタンパク質の分離に適用した。

2. 方法と結果

DNA試料としては、主としてオリゴデオキシアデニル酸(40-60塩基のもの)の混合物、ファルマシア社製)を用いた。タンパク質試料はBDH社分子量マーカータンパク質、ヒト血漿タンパク質などを用いた。キャピラリー電気泳動装置はベックマン社製キャピラリー電気泳動システムP/A C E S Y S T E M 2 0 0 0および日本分光社製キャピラリー電気泳動システムC E - 8 0 0を用い、キャピラリーは外径

375 μm 、内径75 μm 、長さ（試料添加端から検出器まで）約6 cmから約40 cmのものを用いた。ポリアクリルアミドゲルは、アクリルアミド濃度を3%–12%程度とし、架橋剤（N, N'-メチレンビスアクリルアミド、bis）を5%または0%の濃度として、N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）と過硫酸アンモニウムでキャピラリー中で重合させた。ゲル内緩衝液はDNA試料の場合7 M尿素–0.1 Mトリス–ホウ酸（pH 8.3）を用いた。試料添加は主として陰極側よりの電気泳動添加法を用い、キャピラリー1 cm当り約200 Vの定電圧で泳動した。

図1にオリゴデオキシアデニル酸（カタログ上40 mer–60 merの混合物を長さ39 cm（全長45 cm）のキャピラリー、12% T（アクリルアミド+ bisの濃度、w/v）0% C（bis濃度/T）、すなわち架橋のない直鎖ポリアクリルアミドで泳動した結果を示す。試料は約10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のものを4 kVで1秒間電気泳動添加した。260 nmで25のピークが検出され、オリゴデオキシアデニル酸が、1塩基の長さの違いにより分離されたと考えられる。

キャピラリーの長さ、ゲル濃度及び架橋度を変化させてDNA試料を分離し、分離能の変化を調べた。また、これらの結果に基づいて、タンパク質の分離条件についても検討した。

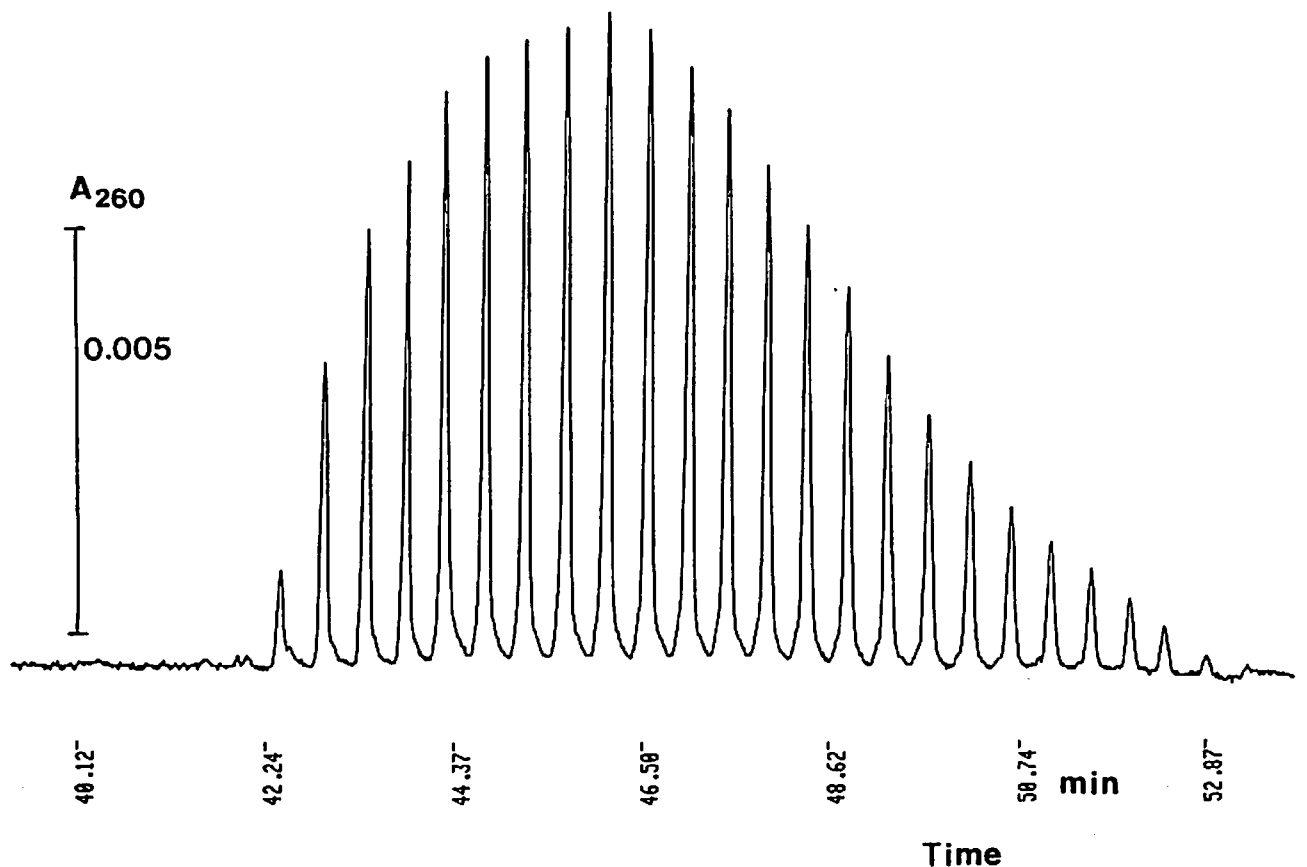


Fig. 1. Separation of oligodeoxyadenylic acids (p(dA)₄₀₋₆₀) by capillary gel electrophoresis.

金属イオンとの i n s i t u 錯体形成を利用した高性能キャピラリー電気泳動による糖の分析

(近畿大・薬) 本田進、○山本圭子、掛樋一晃

SEPARATION OF CARBOHYDRATES BY I N S I T U COMPLEXATION WITH METAL IONS IN HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
Susumu HONDA, Keiko YAMAMOTO, and Kazuaki KAKEHI

Summary: 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives of reducing carbohydrates were separated by capillary zone electrophoresis as cationic metal chelates and sensitively detected by UV absorption. When a fused silica tube filled with carrier containing a divalent metal ion was used, capillary inner wall was positively charged by binding with it, generating EOF flowing from cathode to anode. Therefore, carbohydrate derivatives introduced from the cathodic end of the tube were coupled to the metal ion, with different ease, to afford cationic complexes, which were well separated from each other between the peaks of PMP and the neutral marker. Various applications of this method are presented.

【はじめに】

キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) は高分離能をもつので、自然界や生体内に普遍的に存在し、類似構造体の多い糖類についてもこの方法が適用できれば、非常に有用であろうと思われる。しかし、糖分子は通常化学的に中性であるため、そのままでは CZE の対象とはなり得ない。当研究室ではホウ酸塩を含むキャリアーを用いて、管内で錯体を形成させることにより糖質をアニオンに変換して CZE を行うという方法によりこの問題に対する一つの解決を与えたが^{1,2)}、今回は金属イオンを用いる方法について検討した。

【実験】

試薬 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) はキシダ化学特級品を再結晶して用いた。**PMPによる還元糖の標識³⁾** 還元糖に 0.3 N NaOH (50 μ l) および新製した 0.5 M PMP メタノール溶液 (50 μ l) を加えて 70°C 30 分間加温する。反応終了後、ただちに、反応液を 0.3 N HCl (50 μ l) で中和し減圧乾固する。残留物を水 (200 μ l) に溶かし落差法によりキャピラリーに導入した。**装置** 電圧の印加は山菱電気製直流高圧定電圧定電流電源装置を用いて定電圧モードで行なった。両電極には、白金電極を使用し、これらをテフロン製電極槽 (容量約 1ml) 内のキャリアー中に挿入固定した。分離用キャピラリーには SGE 製フューズドシリカ管 (内径 50 μ m、全長 53.5 cm、有効長 36 cm) を用いた。検出には医理化機器製スペクトロフォトメーター Σ 873 を一部改造して用い、245 nm における紫外部吸収をオンカラム測定した。**キャリアー** 種々の金属の酢酸塩 (いずれも市販特級品) を用い、これらの水溶液、またはそれらを酢酸または水酸化ナトリウムで pH 調整したものをキャリアーとして用いた。

【結果および考察】

電気浸透流 フューズドシリカ管を用いた場合、ナトリウムイオンやカリウムイオンなど 1 価のイオンを含むキャリアーでは電気浸透流は陽極から陰極へ向うが、カルシウム、バリウム、ストロンチウム、マグネシウムなどの 2 価金属イオンを含むキャリアーでは、キャピラリーにキャリアーを満たした直後では 1 価イオンの場合と同様であったが、時間の経過とともに電気浸透流は減少したのち、方向が逆転して次第に定常状態になった。これはキャピラリー内壁への金属イオンの結合によりゼータ電位が逆転するた

めと考えられる。

錯体形成による分離 糖誘導体の分離を比較すると、1価金属イオン含有キャリアーでは僅かに分子サイズによる分離が観察されるに過ぎなかったが、2価金属イオンを含むキャリアーでは明らかに錯イオン形成によると考えられる顕著な分離の向上がみられた。糖誘導体のピークは中性マーカー（メシチルオキシド）のピークよりも早く、PMPによる標識の際に除ききれなかった PMP 試薬のピークよりも遅く出現した。PMP は電離してアニオンとなっているので、電気泳動により陽極へ引っ張られて中性マーカーよりも早く移動し最初に出現するためと考えられる。糖誘導体は金属イオンと反応してカチオン性錯体を形成し、陰極に引き戻されて PMP よりも遅いピークを与えるものと考えられる。しかし、錯体形成の効果は PMP 部分の電離の効果を上回ることがなく、中性マーカーよりも遅れてピークを与えることはなかった。Fig.1 にアルドペントース誘導体をカルシウムイオンを含むキャリアーを用いて分離した例を示す。比較のため Fig.1(b) にナトリウムイオン含有キャリアーを用いた場合を示す。

分離に及ぼす因子 糖誘導体と金属イオンの反応は試料である糖誘導体の濃度が一定に保たれているため、キャリアー中の金属イオンの濃度に依存する。予測通り金属イオン濃度の上昇とともに各ピークの移動度は増加し、一般に分離が改善される現象がみられた。一方錯体形成は pH によって影響されると考えられるが、6.5-8.7の pH 領域では目立った変化はなかった。

金属イオンの種類による分離の違い 種々の2価金属イオンについてアルドペントース誘導体に関する $\alpha = 1 (\mu_{00})_{\text{complex}} - (\mu_{00})_{\text{PMP}}$ を計算したところ、TABLE I に示す値が得られた。錯体形成の割合を示すこの α の値は金属イオンの種類によって若干変動したが、大きさの順序が逆転することはない。また、これらの α 値をホウ酸錯体²⁾に対する値と比較した場合、その大きさの順序は両者の間で異なることが観察された。ホウ酸錯体においては主として二個の水酸基が関与する bidentate 構造が、金属錯体においてはそれに加えて三個の水酸基が関与する tridentate 構造がとられているためと考えられる。

TABLE I Comparison of α Values among PMP Derivatives of Aldoses

Ion*	α Value			
	Rib	Lyx	Ara	Xyl
Ca ²⁺	3.0	4.9	6.2	6.7
Ba ²⁺	2.6	3.4	4.3	5.5
Sr ²⁺	3.3	4.8	5.5	6.9
Mg ²⁺	3.4	3.9	5.9	6.5
Pb ²⁺	0	0	0	0
BO ₂ ⁻	2.9	3.5	2.2	1.7

*Concentration, 100 mM each

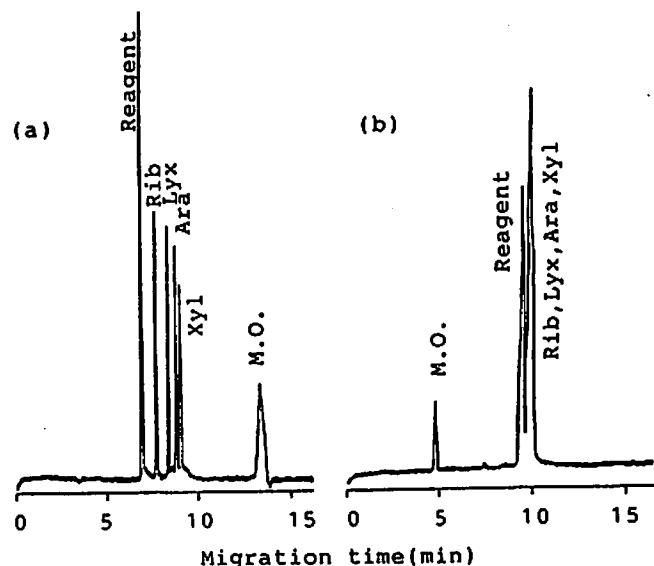


Fig. 1. Separation of PMP derivatives of aldopentoses in carriers containing Ca²⁺ (a) and Na⁺ (b). Capillary, fused silica; Carrier, 100 mM Ca(OAc)₂ (a) or 100 mM NaOAc (b); Applied voltage, 10 KV; Detection, UV₂₄₅.

【文献】

- 1) S. Honda, S. Iwase, A. Makino, and S. Fujiwara: Anal. Biochem., 176 (1989).
- 2) S. Honda, S. Suzuki, A. Nose, K. Yamamoto, and K. Kakehi: Carbohydr. Res., in press.
- 3) S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, and J. Nakamura: Anal. Biochem., 180, 351 (1989).

高性能キャピラリー電気泳動によるN-グリコシド結合型糖タンパク質糖鎖のマッピング

(近畿大・薬) 本田進、○鈴木茂生、牧野明子、掛樋一晃

MAPPING OF N-GLYCOSIDICALLY BOUND OLIGOSACCHARIDES IN GLYCOPROTEINS BY HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Susumu HONDA, Shigeo SUZUKI, Akiko MAKINO and Kazuaki KAKEHI

Oligosaccharides released from various glycoproteins by hydrazinolysis were labelled with 2-aminopyridine, and the fluorescent derivatives were analyzed by capillary zone electrophoresis. Direct CZE using acidic carrier allowed separation based on degree of polymerization, smaller oligosaccharides giving shorter migration times. On the other hand, CZE as borate complexes under strong alkaline conditions permitted separation based on hydroxyl group disposition. The combination of these two modes was effective for mapping of oligosaccharides in glycoproteins.

『緒言』

糖タンパク質は植物界、動物界を通じて広く分布しており、糖鎖構造と機能の間には規則性があることが予測されるため、この点を明らかにする必要があると思われる。そしてその研究においてはまず、糖鎖を簡便に分析・同定する方法の開発が望まれている。すでに、HPLCによる糖鎖の分析法がいくつか試みられてはいるが、グラジエント溶出を要するという欠点をもっている。今回はHPLCよりもより高い分離能をもつキャピラリー電気泳動により、蛍光標識(ピリジルアミノ化)した糖鎖の分離・同定について検討した。

『実験』

装置：電圧の印加には松定プレジジョンデバイセスHEL3-30R0.16型高圧装置を用い、分離用キャピラリーにはScientific Glass Engineering社製のフューズドシリカ管(内径50 μm、長さ60 cm、有効長30 cm)を使用した。検出器には日立蛍光光度計610-10LCのフローセル部分を改良して、オンカラム検出ができるようにしたものを用いた。試料導入：落差法と電気的導入法の両者を用いた。キャリアー：酸性の緩衝液と強アルカリ性ホウ酸緩衝液の両者を用いた。試料：下記のものを用いた。ニワトリ卵白アルブミン(混成型糖鎖と高マンノース型糖鎖)、ウシトランスフェリン、ブタチログロブリン、ウシ胎児血清フェツイン、 α_1 -酸性糖タンパク質(いずれも複合型糖鎖)、リボヌクレアーゼB(高マンノース型糖鎖)。糖タンパク質からの糖鎖の調製：糖タンパク質をTPCK-トリプシンで消化して糖ペプチドに変換した後、ヒドラジンで処理して糖鎖を遊離させた。糖鎖の蛍光標識：Haseら¹⁾の方法に準じて、還元のアミノ化により糖鎖の還元末端にピリジルアミノ基(PA)を導入した。検出は励起波長320 nm、蛍光波長390 nmで行なった。糖鎖の同定：Takahashiら²⁾の

方法に準じて順相系および逆相系 H P L C による保持時間をもとに推定した。

『結果および考察』

直接的ゾーン電気泳動 酸性の緩衝液を用い、イソマルトオリゴ糖誘導体の分離を検討したところ、重合度に基づく分離が可能であった。重合度の低いオリゴ糖から順にピークを与え、重合度20まで分離された。糖タンパク質糖鎖のPA誘導体についても主として重合度に基づく分離が達成された。分離例を Fig. 1 に示す。各オリゴ糖が1個のピリジルアミノ基をもち、同一電荷をもつため分子サイズ、したがって重合度による直接的ゾーン電気泳動が行なわれたためである。

ホウ酸錯イオンとしてのゾーン電気泳動 このモードではオリゴ糖の水酸基の配位の違いに基づく分離が行なわれる。ホウ酸緩衝液 (pH 10.5) を用いてイソマルトオリゴ糖誘導体の泳動を行なったところ、相互の分離は若干悪いものの、重合度の高いものがより高い移動度を示した。たとえば、種々のタイプの糖鎖を有する卵白アルブミンの糖鎖を用いて、その分離挙動を調べたところ、主に糖鎖の非還元末端の糖残基の種類に依存した分離が得られた (Fig. 2)。他の糖タンパク質の糖鎖の分離についても同様の現象がみられた。

これらの両モードを使用することにより糖タンパク質の糖鎖の分離・同定が可能であることが示唆された。

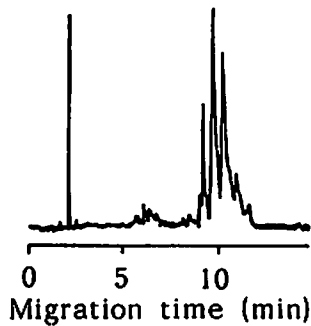


Fig. 1. Separation of PA-oligosaccharides from ovalbumin in acidic condition. Carrier; 0.1 M phosphate buffer (pH 2.5) containing 0.1% hydroxypropylcellulose, applied voltage; 20 kV, detection; 320 (ex)/390 (em) nm.

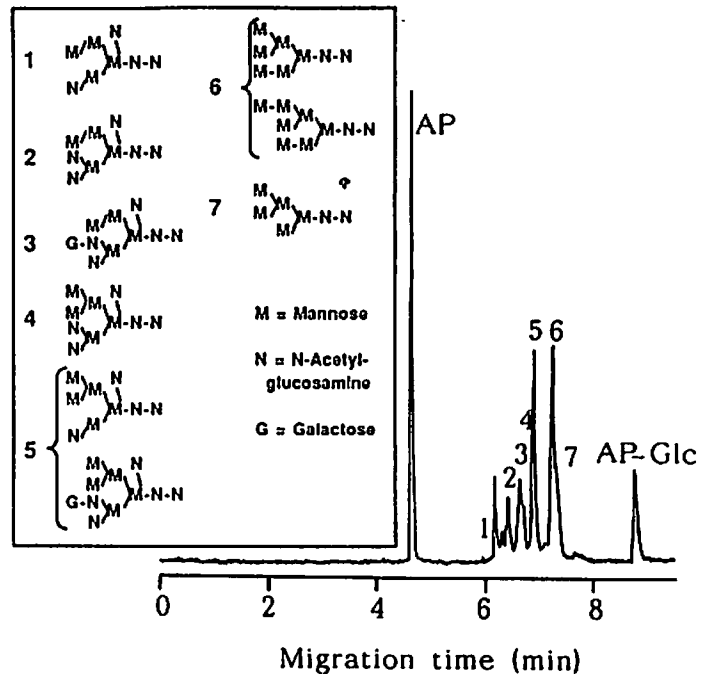


Fig. 2. Separation of PA-oligosaccharides from ovalbumin as borate complexes. Carrier; 0.2 M borate buffer (pH 10.5), applied voltage; 10 kV, detection; 320 (ex)/390 (em) nm.

『文献』

1. Y. Yamamoto, S. Hase, S. Fukuda, O. Sano, and T. Ikenaka, J. Biochem. (Tokyo), 105, 547 (1989).
2. N. Tomiya, J. Awaya, M. Kurono, S. Endo, Y. Arata and N. Takahashi, Anal. Biochem., 171, 73 (1988).

高性能キャピラリー電気泳動による プロテオグリカンの分析

(近畿大・薬) 本田進、○上野哲司、掛樋一晃

ANALYSIS OF PROTEOGLYCANS BY HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
Susumu HONDA, Tetsuji UENO, and Kazuaki KAKEHI

Summary: Various proteoglycans were efficiently separated in intact state, by capillary zone electrophoresis (CZE) in borate buffer. Isomeric chondroitin sulfates were digested with chondroitinase ABC, and the resultant oligosaccharides were separated, either directly or after derived to the 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatives, under similar conditions and detected by UV absorption. The PMP method was suited for micro quantification of these proteoglycans, as exemplified by rapid determination of urinary proteoglycans.

【はじめに】

プロテオグリカンはアミノ糖とウロン酸からなる繰り返し構造に硫酸基などが結合した長鎖の糖鎖構造をもち、加齢やある種の慢性疾患で質的、量的変動がみられるため、臨床的に注目されている物質群である。体液や組織に存在するプロテオグリカンの濃度は低く、入手できる試料量も微量であるため適切な分析法が要求される。これまでのところ主として高速液体クロマトグラフィーやセルロースアセテート膜電気泳動などが用いられてきたが、今回キャピラリー電気泳動 (HPCE) による分析を試みることにした。また、構成単糖や硫酸基の結合位置の違いを的確に把握するためには、特異性の高い分解酵素を用いてプロテオグリカンを分解し、生成した不飽和オリゴ糖を微量分析するのが有力な方法である。この方法に対してもHPCEの可能性を探った。

【実験】

標品、試薬 プロテオグリカン標品としてはコンドロイチン硫酸A (4-硫酸、鯨軟骨、生化学工業)、コンドイチン硫酸C (6-硫酸、サメ軟骨、生化学工業)、ヒアルロン酸 (ヒトさい帯、生化学工業) およびヘパリン (ブタ腸、Fluka) のいずれもナトリウム塩を用いた。コンドロイチナーゼABC (Proteus vulgaris) は生化学工業より購入した。試薬はすべて市販の特級品を用いた。 **尿中プロテオグリカンの採取**¹⁾ 早朝尿 (5.0 ml) に 2.5% セチルピリジニウムクロリド (100 μ l) を加えて混和し、4°C で1夜放置し 3,000 g で遠心分離した。上清を捨て沈渣に塩化ナトリウム飽和 95% エタノール (3.0 ml) を加えてよく混和洗浄し、遠心分離した。沈渣に再び同様の操作を2回くり返し施すことによって尿中プロテオグリカンを分離した。 **酵素分解**²⁾ プロテオグリカン標品またはその混合物、あるいは尿中プロテオグリカンの沈渣を Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0, 10 μ l) にとかし、コンドロイチナーゼABC溶液 (20 μ l, 20 mU) を加え、37°C, 15 hr, インキュベートした。分解物はそのまま、または下記の操作によりPMP誘導体としたのちHPCEにより分析した。 **PMP化**³⁾ コンドロイチナーゼABC処理により得られたプロテオグリカン分解物を乾固し、残渣に 0.3 M NaOH (30 μ l) および 0.3 M PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) メタノール溶液 (30 μ l) を加え 70°C, 30 min 反応させたのち、0.3 M HCl (30 μ l) を加えて反応液を中和し、酢酸エチル (200 μ l) と水 (200 μ l) で振とうして過剰のPMPを除いたのち水層を濃縮乾固し、残渣を水 (50 μ l) に溶かしてHPCEにより分析した。 **HPCE** Beckman P/ACE システム 2000 を使用して分析を行った。キャピラリーには内径 75 μ m、有

効長 50 cm のフューズドシリカ管を用い、自動加圧注入方式により試料を導入した。検出には 214 nm における紫外吸収を利用した。尿中クレアチニンの定量 0.1% polybrene を含む 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) をキャリアーとして原尿を分析し、6.6 min に出現するクレアチニンのピークを内部標準法 (内部標準: 安息香酸ナトリウム) を用いて定量した。

【結果】

プロテオグリカンの直接分離 プロテオグリカンはカルボキシル基や硫酸基をもつのでゾーン泳動による直接分離が期待されるが、リン酸緩衝液を用いた場合、部分的な分離しか得られなかった。しかし、ホウ酸塩を含むキャリアーを用いればホウ酸錯イオン形成により水酸基の配向の違いが強調され、分離は改善された。この条件での分析例を Fig.1 に示す。ピークの広がりはいこれらの多糖分子の不均一性を反映しているものと考えられる。

酵素分解により生成した不飽和オリゴ糖の分析 プロテオグリカンを選択的、あるいは特異的に分解して不飽和オリゴ糖を生ずる酵素がいくつか知られている。今回はコンドロイチナーゼ ABC 用いてモデル実験を行なった。この酵素はコンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C からそれぞれ Δ Di-4S, Δ Di-6S を生ずるが、これらは、ホウ酸塩含有キャリアーを用いると、互いに分離できる。しかし、214 nm における紫外吸収を測定してもそれほど感度が高くなかったため、PMP 誘導体に変換したのち同一のキャリアーで分析した。Fig.2 に示すように分離および検出感度ともに満足できる結果を与えた。

尿中プロテオグリカンの分析 上述の結果に基づき、尿中ムコ多糖をセチルピリジニウムクロリド法で沈殿採取し、コンドロイチナーゼ ABC 消化し続いて PMP 誘導体化し、前述の方法により分析した。コンドロイチン硫酸 A および C を用いて作成した検量線から尿中コンドロイチン硫酸 A および C の含量を求めたところ、たとえば次のような結果が得られた。試料 1 (23 才, 男性): A 6.2, C 2.5; 試料 2 (54 才, 男性): A 5.3, C 2.2 (単位はいずれも $\times 10^{-1} \mu\text{g}/\text{mg creatinine}$)。これらの値は報告されているコンドロイチン硫酸 A や C の尿中濃度およびクレアチニン濃度から考えて妥当なものと考えられ、この方法が尿中微量プロテオグリカンの分析に有用であることが示された。

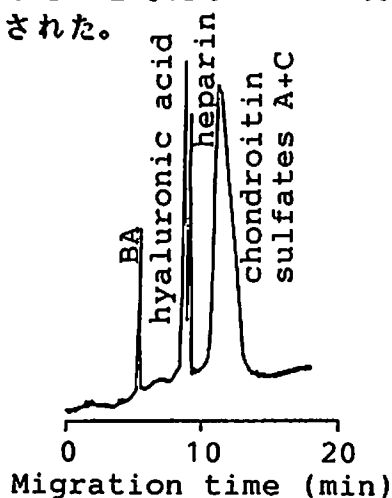


Fig.1 HPCE of a Mixture of Proteoglycans. Carrier: 20 mM borate buffer (pH 10.5). Applied voltage: 15 KV.

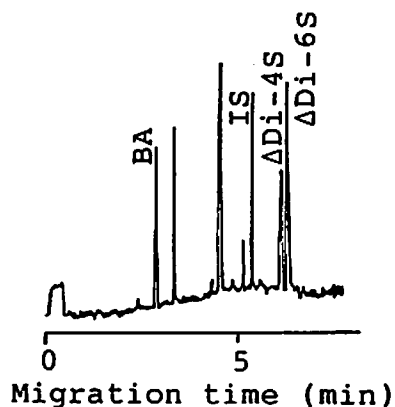


Fig.2 Analysis of the PMP Derivatives of Unsaturated Disaccharides Derived from Proteoglycans with Chondroitinase ABC. Carrier: 100 mM borate buffer (pH 9.0). Applied voltage: 25 KV.

【文献】

- 1) N. Di Ferrante, C. Rich: J. Lab. Clin. Med., 48, 491 (1956).
- 2) H. Saito, T. Yamagata, and S. Suzuki: J. Biol. Chem., 243, 1536 (1968).
- 3) S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, and J. Nakamura: Anal. Biochem., 180, 351 (1989).

(京大工¹、姫路工大²) ○桂 武久¹、寺部 茂²

THERMAL EFFECT IN MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

¹Faculty of Engineering, Kyoto University²Faculty of Science, Himeji Institute of TechnologyTakehisa KATSURA¹ and Shigeru TERABE²

Enthalpy and entropy changes in micellar solubilization of *o*-, *m*-, *p*-cresol, 2,6-, 2,3-, 3,4-, 2,4-xyleneol, *p*-propylphenol, *p*-butylphenol, and *p*-amylphenol were calculated from the temperature dependence of logarithms of the distribution coefficients on temperature. The distribution coefficients were measured by micellar electrokinetic chromatography with a 0.05M sodium dodecyl sulfate solution at pH 7.0.

1. はじめに

電気泳動にクロマトグラフィーの原理を導入することで、電気的に中性な試料を電気泳動により分離できるようにした動電クロマトグラフィーは、キャリアと称する電荷を持つ分子や分子集合体を分離溶液に加え、試料分子のキャリアとの相互作用の差を利用して分離を行う方法である。この分離用キャリアとしてイオン性界面活性剤ミセルを利用するのが、ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)である。我々は、ミセル動電クロマトグラフィーを利用して、以前に報告した方法(1)に従いミセル可溶化における熱力学量の測定を行った。

2. 装置

実験には、BECKMAN社のP/ACE System 2000を用いた。ただし、分離用キャピラリーとして、内径52 μ m、長さ57cm(有効長50cm)のフューズドシリカ管を用い、分離溶液として0.05M硫酸ドデシルナトリウム(SDS)の0.1Mホウ酸塩-0.05Mリン酸塩緩衝液(pH 7.0)を用いた。試料注入法は、加圧法(0.5 psi, 1 s)によった。検出には、214nmでの吸光度を測定した。P/ACE System 2000は、キャピラリーの温度制御に冷媒を循環させる液冷式を採用している。

3. 方法

容量比 k' を、溶質の水相中及びミセル内に存在する総モル数の比と定義すると、

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 (1 - t_R / t_{mc}) \quad (1)$$

で表される。 t_R は、溶質の移動時間である。水相、及びミセル相の移動時間である t_0 と t_{mc} の測定には、ミセルにはほとんど可溶化されず、水相中にのみ存在するメタノール、及びミセル中にほとんどすべて取り込まれた状態で存在する臭化チメピジウムを、それぞれの相のトレーサーとして用いた。 k' は、ミセル相の体積 V_{mc} 、水相の体積 V_{aq} 及び分配係数 K を用いると、

$$k' = K \cdot V_{mc} / V_{aq} \quad (2)$$

と表される。式(2)において、 V_{mc} は界面活性剤濃度 $C_{s,r}$ から臨界ミセル濃度CMCを引いて求まるミセル濃度に、部分比容 \bar{v} を乗ずることで算出でき、 V_{aq} はカラム内容積から V_{mc} を引いたものに等しく、相比は $C_{s,r}$ を用いて次式のように書ける。

$$V_{mc} / V_{aq} = \{\bar{v}(C_{s,r} - CMC)\} / \{1 - \bar{v}(C_{s,r} - CMC)\} \quad (3)$$

ミセル濃度が低い時、式(3)の右辺の分母は1に近似でき、式(2)は

$$k' = K \bar{v} (C_{s,r} - CMC) \quad (4)$$

と書ける。測定温度を変えて、各温度で式(4)により k' から決まる K を求め、絶対温度 T の逆数に対してプロットすると、van't Hoffの式

$$\ln K = -\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R \quad (R: \text{気体定数}) \quad (5)$$

により、ミセルへの試料の可溶化に伴うエンタルピー変化 ΔH° 、及びエントロピー変化 ΔS° を求めることができる。このように、MEKCは単に分離分析法としてだけではなく、熱力学的データを求める上でも有用であるといえる。

4. 結果及び考察

Fig. 1に、印加電圧を変化させて測定した時の k' の電気浸透流 v_{eo} 依存性を示す。以前に報告(1)したように、このような k' の変化はジュール熱による温度上昇に原因があるので、 v_{eo} が0の点まで外挿して得られる k' の値を設定温度における k' の値とした。各温度で求めた k' の値から、式(2)と式(3)を用いて各温度での K の値を求めることができる。Fig. 2は、 $\ln K$ をフェノール誘導体のアルキル置換基の炭素数に対してプロットしたもので、Martin則が成立している。Fig. 3に、式(5)に従い $1/T$ に対して $\ln K$ をプロットした結果を示し、これから求めた ΔH° 、 ΔS° の値をTable 1に示す。 ΔS° は正の値をとり、溶質の疎水性が大きくなるに従って、つまり、アルキル置換基の鎖長が長くなるに従って大きな値をとる。この結果より、これらの溶質のミセル可溶化は、ミセルとの相互作用というよりむしろ、水構造の変化によると考えられる。電流値を抑えるため、分離溶液としてホウ酸塩-リン酸塩緩衝液の代わりに、0.02M piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)(PIPES)-0.02M NaOH 緩衝液を用い、得られた ΔH° 、 ΔS° を比較してみたが値は同様であった。これより、熱力学量算出に当たり、分離溶液の種類は問題にならないことがわかった。

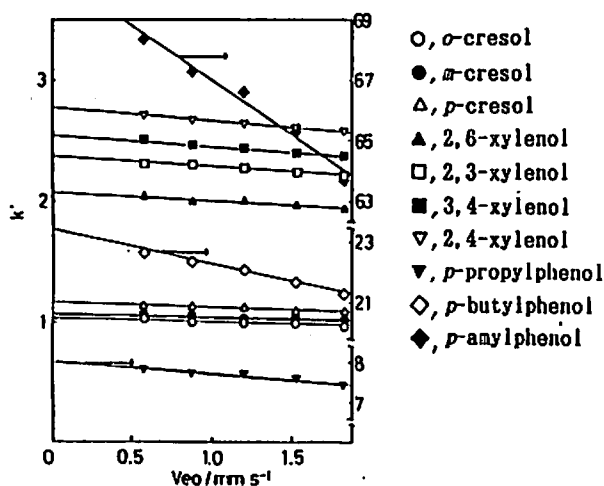


Fig. 1 Dependence of capacity factor k' on the electroosmotic velocity v_{eo} .

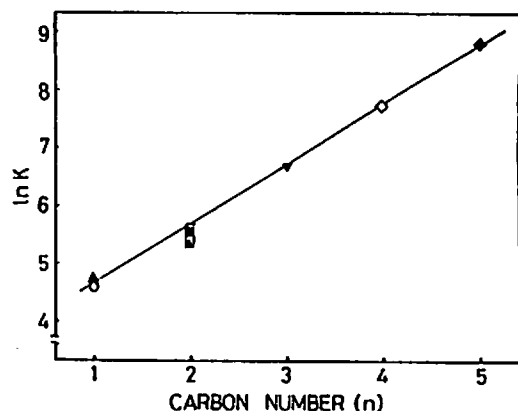


Fig. 2 Dependence of $\ln K$ on the carbon number (n) of alkyl chains of phenols.

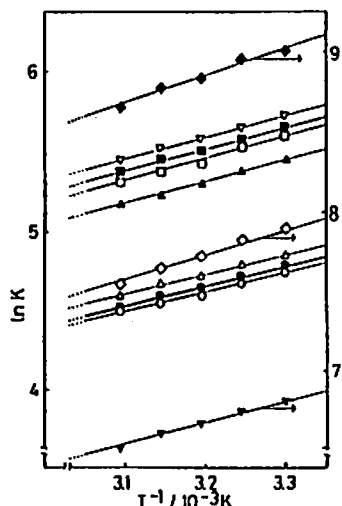


Fig. 3 Dependence of $\ln K$ on T^{-1} .

Table 1 Enthalpy, entropy, and Gibbs free energy changes in micellar solubilization with SDS solution.

solute	$\Delta H^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ/\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$	$\Delta G^\circ(40^\circ\text{C})/\text{kJ mol}^{-1}$
<i>o</i> -cresol	-10.3	5.3	-12
<i>m</i> -cresol	-10.0	6.6	-12
<i>p</i> -cresol	-10.1	6.9	-12
2,6-xyleneol	-11.6	6.9	-14
2,3-xyleneol	-12.0	7.0	-14
3,4-xyleneol	-12.0	7.6	-14
2,4-xyleneol	-11.7	9.2	-15
<i>p</i> -propylphenol	-12.3	16	-17
<i>p</i> -butylphenol	-13.7	21	-20
<i>p</i> -amylphenol	-14.3	28	-23

文献 (1) S. Terabe, K. Otsuka, and T. Ando, *Anal. Chem.*, 1985, 57, 834.

ミセル動電クロマトグラフィーにおける尿素及び非イオン性界面剤の添加効果

(京大工¹、姫路工大理²) ○石濱 泰¹、寺部 茂²

EFFECT OF UREA AND NONIONIC SURFACTANTS ON MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

¹Faculty of Engineering, Kyoto University and ²Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Yasushi ISHIHAMA¹ and Shigeru TERABE²

In micellar electrokinetic chromatography, separation selectivity depends on both the aqueous phase and the micelle. The effect of urea or nonionic surfactants addition to the separation solution was investigated. The addition of urea to a sodium dodecyl sulfate (SDS) solution caused decreases of both the capacity factor k' and the ratio t_o/t_{mc} . The addition of nonionic surfactant like Brij 35 increased the values of k' and t_o/t_{mc} . Linear relationships were observed between $\ln k'$ and the concentration of urea and nonionic surfactants. Either additive altered the migration order among some solutes.

1. 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手法に、クロマトグラフィーの原理を導入した分離分析法であり、界面活性剤ミセルなどのイオン性キャリアを分離溶液に導入することで、試料はその分配係数の違いによって分離される。キャリアとしてイオン性ミセルを用いるミセル EKC (MEKC) における分離選択性は、クロマトグラフィーの固定相に相当するミセル、及び移動相に相当する水相の性質に大きく依存する。本報告では水相の性質を変えるために尿素、ミセルの性質を変えるために非イオン性界面活性剤の添加を試みた結果について述べる。

2. 実験

分離溶液は、0.05 ~ 0.1 M SDS を 0.1 M ホウ酸塩 - 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、更に添加剤を加えて調製した。キャピラリーは 52 μm i.d. \times 50 or 70 cm のものを用いた。検出はオンカラムで紫外吸収検出器を用いて行った (210 nm)。

3. 結果及び考察

<尿素の効果>

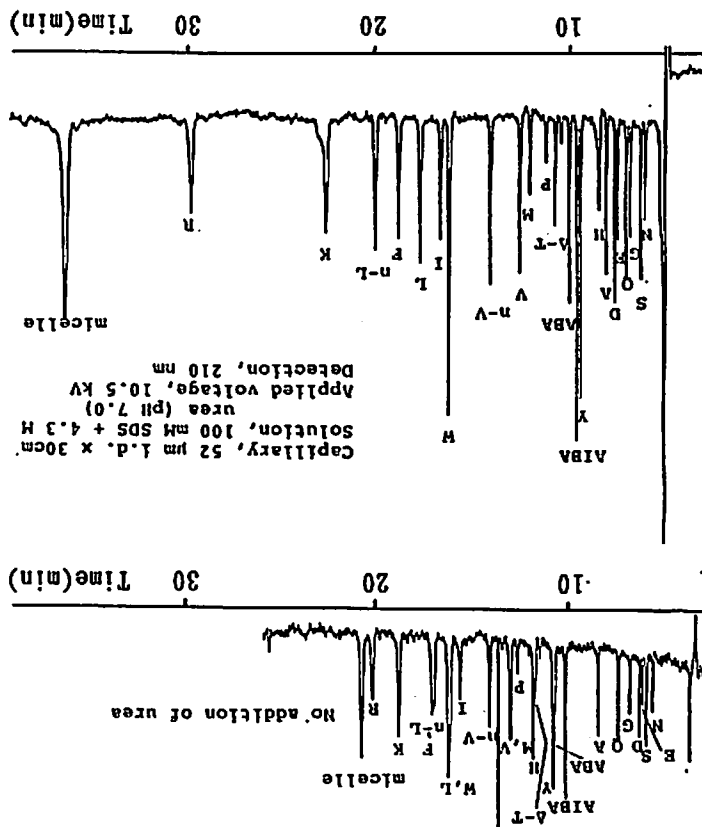
尿素濃度と k' の対数は直線関係を示し (Fig. 1)、 t_o/t_{mc} は、尿素濃度と共に減少した (Table 1)。これらの知見をもとに、PTH-アミノ酸 23 種混合物の一斉分離を行った (Fig. 2)。尿素添加による選択性の変化は明らかであり、分離も改善されている。一斉分離は尿素 4.3 M で行われた。尿素を添加しない場合に重なっていたピークは、尿素 1~2 M 添加でうまく分離できたが、他の部分で重なってしまい全部の分離には成功しなかった。

k' の減少は尿素添加にともなって、溶質の水溶液への溶解度や臨界ミセル濃度 (CMC) が増加したためである。又、 t_o/t_{mc} の減少は、ミセルの有効荷電が増加したことによる。

<非イオン性界面活性剤の効果>

SDS に非イオン性界面活性剤を加えると混合ミセルをつくりミセルの有効荷電、表面状態が変わることが予想される。Fig. 3、Table 2 には Brij 35 (ポリオキシエチレン(23)ドデシルエーテル) を添加した場合の結果を示した。尿素の場合と同様に、添加剤濃度と $\ln k'$ との間には直線関係が成立した。 t_o/t_{mc} も予想通り増加していた。これはやはり、混合ミセル形成に伴うミセルの有効荷電減少による。選択性にも若干変化がみられ、この傾向は、市販の決まった鎖長を持つポリオキシエチレンドデシルエーテル 3 種についても同様であった (Table 3)。

FIG. 2 HPLC separation of 23 PTH-amino acids



Capillary, 52 μ m i.d. x 30cm
 Solution, 100 mM SDS + 4.3 M urea (pH 7.0)
 Applied voltage, 10.5 kV
 Detection, 210 nm

Peak	n	t ₀ /t _{ac}
resorcinol	0.308	0.684
phenol	1.010	1.571
p-nitroaniline	1.818	6.164
m-nitrobenzene	2.688	3.421
2-naphthol	19.651	29.125
		38.013

Table 3 Addition of C₁₂H₂₅O(CH₂CH₂O)_nH

Micellar solution, 0.1M SDS in 0.1M borate-0.05M phosphate buffer, pH 7.0; separation tube, 52 μ m i.d. x 50cm; effective length, 30cm; applied voltage, 10.5kV; detection wavelength, 210nm.

Peak	n	t ₀ /t _{ac}
resorcinol	0	0.181
phenol	5	0.255
p-nitroaniline	10	0.330
m-nitrobenzene	20	0.553
2-naphthol	30	0.553

Table 2 Dependence of t₀/t_{ac} on concentration of Brij 35

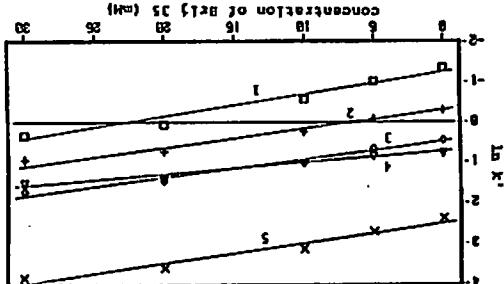


Fig. 3 Dependence of ln k' on concentration of Brij 35

Micellar solution, 0.05M SDS in 0.1M borate-0.05M phosphate buffer, pH 7.0; separation tube, 52 μ m i.d. x 70cm; length of the used for separation, 50cm; applied voltage, 20kV; detection wavelength, 210nm.

Peak	urea conc.	t ₀	t _{ac}	t ₀ /t _{ac}
resorcinol	0	3.92	14.57	0.268
phenol	2	3.82	16.1	0.243
p-nitroaniline	4	4.65	22.76	0.204
m-nitrobenzene	6	5.46	30.11	0.181
2-naphthol	8	6.38	36.45	0.175

Table 1 Dependence of t₀/t_{ac} on concentration of urea

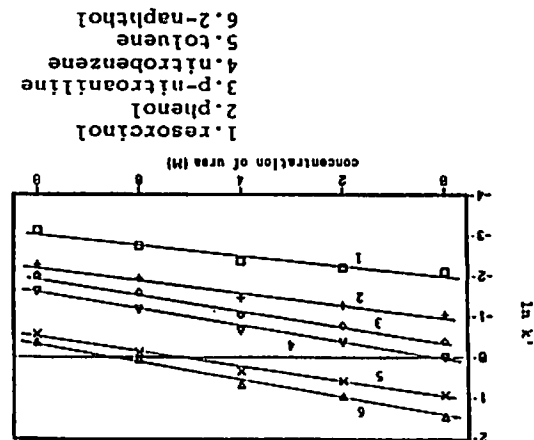


Fig. 1 Dependence of ln k' on concentration of urea

ミセル動電クロマトグラフィーによるキラル分離

(阪府高専¹、姫工大理²) ○大塚浩二¹、寺部 茂²

CHIRAL SEPARATION BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

¹*Department of Industrial Chemistry, Osaka Prefectural College of Technology*

²*Department of Material Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology*

Koji OTSUKA¹ and Shigeru TERABE²

Optical resolution by micellar electrokinetic chromatography with chiral surfactants was investigated. Six PTH-DL-amino acids were separated from each other and each pair of enantiomers was optically resolved with a 50 mM sodium N-dodecanoyl-L-valinate/30 mM sodium dodecyl sulfate/0.5 M urea (pH 9.0) containing 10% methanol. Under the same conditions, some other enantiomers such as benzoin and warfarin were also resolved. By adding urea to micellar solutions peak shapes and resolution could be improved.

1. はじめに

ミセル動電クロマトグラフィー(MEK C)は、イオン性物質だけでなく中性物質をも電気泳動で高分離能分析できる手法として近年広く利用されている。MEK Cにおいてキラルな界面活性剤を用いることにより、鏡像体試料の光学分割が可能であることがこれまでに明らかとなっている。ここでは、キラルな界面活性剤としてN-ドデカノイル-L-バリンナトリウム(SDVal)を用いた場合について、ミセル溶液への種々の添加物が光学分割能におよぼす影響について検討した結果を報告する。

2. 実験

分離用毛細管には、内径50 μ m、有効長500 mmの内面無処理のフューズドシリカ管を用いた。ミセル溶液は、SDValを50 mMリン酸塩緩衝液(pH 7.0)または50 mMホウ酸塩緩衝液(pH 9.0)に溶解し、さらに硫酸ドデシルナトリウム(SDS)、メタノール、尿素を適当量添加して調製した。試料には、主にフェニルチオヒダントイン(PTH)-DL-アミノ酸(アセトニトリル溶液)を用いた。実験は定電圧条件下、室温で行った。

3. 結果・考察

数種のPTH-DL-アミノ酸が20または25 mM SDVal(pH 7.0)で光学分割さ

れたが、ピーク形状が極めて悪かった[1]。同溶液にメタノールを添加した系ではピーク形状はかなり改善され分離選択性も向上したが、テーリング傾向は引き続き認められた[2]。ピーク形状の改善には尿素の添加が効果的であることが経験的にわかっている[3]。SDVal/メタノール系に尿素を添加したところ、ピーク形状は著しく改善されたが各ピークの容量比(k')が減少し分離は悪化した[2]。

そこで、SDValの濃度を高くすると共に尿素濃度を低くして k' の減少を抑え、さらにSDSを添加して分離選択性の改善を図った。そのため、溶液のpHは9.0とした。その結果、6種のPTH-DL-アミノ酸のキラル分離が達成された(Fig. 1a)。また、その他のいくつかの鏡像体試料の分割も達成された。一例をFig. 1bに示す。

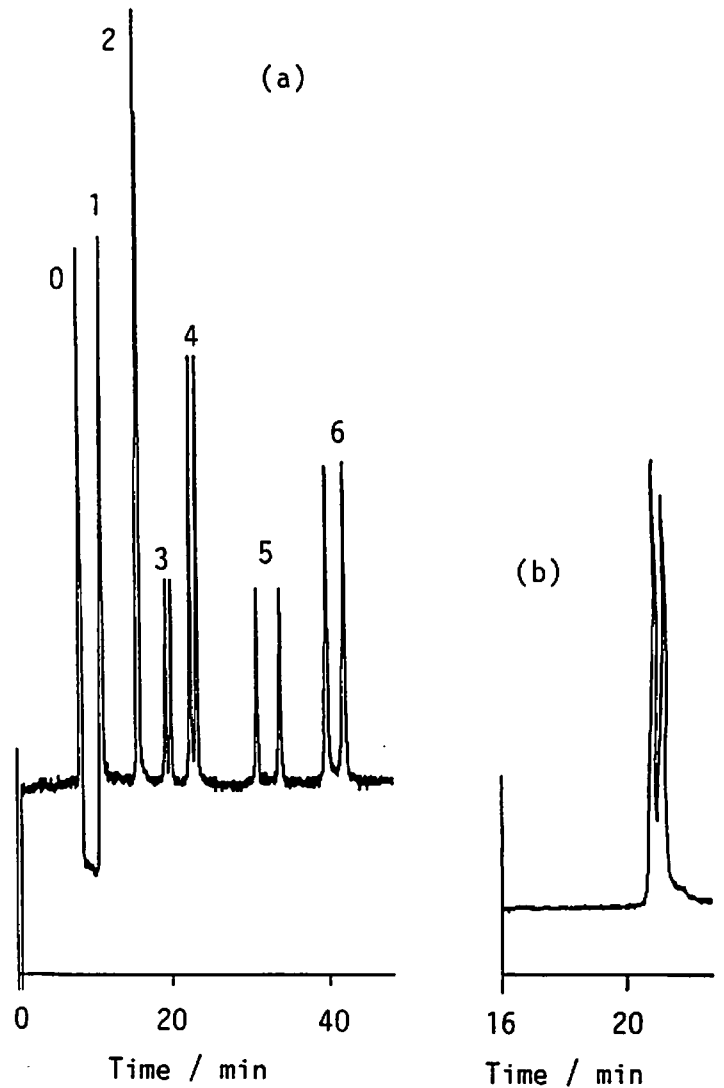


Fig. 1. Micellar electrokinetic chromatogram of (a) six PTH-DL-amino acids and (b) benzoin. (0) acetonitrile, (1) Ser, (2) Nva, (3) Val, (4) Trp, (5) Nle, (6) Aba; micellar solution, 50 mM SDVal/30 mM SDS/0.5 M urea (pH 9.0)/10% methanol; total applied voltage, 20 kV; detection, 260 nm.

SDValをご提供下さった味の素(株)の石渡昭男氏に深謝致します。

- [1] K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr.*, 515, 221 (1990).
- [2] K. Otsuka, S. Terabe, *Electrophoresis*, in press.
- [3] H. Nishi, unpublished data.

シクロデキストリン修飾ミセル 動電クロマトグラフィーによる 多環芳香族の分離

(京都大・工¹、姫路工大・理²) ○柴田理¹、宮下陽介¹、寺部茂²

Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Cyclodextrin Modified Micellar Electrokinetic Chromatography

¹Faculty of Engineering, Kyoto University

and ²Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Osamu Shibata¹, Yosuke Miyasita¹, and Sigeru Terabe²

In micellar electrokinetic chromatography (MEKC), highly hydrophobic solutes such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) are eluted at the same migration time as that of the micelle, because they are totally included into the micelle. Cyclodextrin (CD) modified MEKC (CD/MEKC), in which CD is added to the micellar solution, was applied to the separation of 16 PAH's. Fourteen among sixteen PAH's were separated with a solution including 20mM γ -CD and 100mM SDS is used.

1. はじめに

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) によって、キャピラリー電気泳動の高性能を損なわずに電氣的に中性な試料の分離が可能となった。ところがMEKCでは、疎水性の高い試料の分離は十分には行われぬ。これは、疎水性の高い試料はミセルとの相互作用が強く、ほとんどミセルの移動速度で移動するためである。この分離を達成するために、分離溶液にシクロデキストリン (CD) を加えたのがシクロデキストリン修飾ミセル動電クロマトグラフィー (CD/MEKC) である。

CD/MEKCの模式図をFig.1に示す。試料は非常に疎水性が高いので水には溶解せず、CDと包接錯体をつくっているかミセルに取り込まれているかのいずれかの状態をとる。CDの外側は親水基であり、CDがミセルに取り込まれることはないので、CDと錯体を形成している試料は電気浸透流速で、ミセルに取り込まれている試料はミセルの移動速度で移動する。MEKCでは疎水性が高いため分離されなかった試料も、CD/MEKCでは、CDと錯体を形成することによって電気浸透流速で移動する時間が増えるので分離が可能となる。

2. 実験

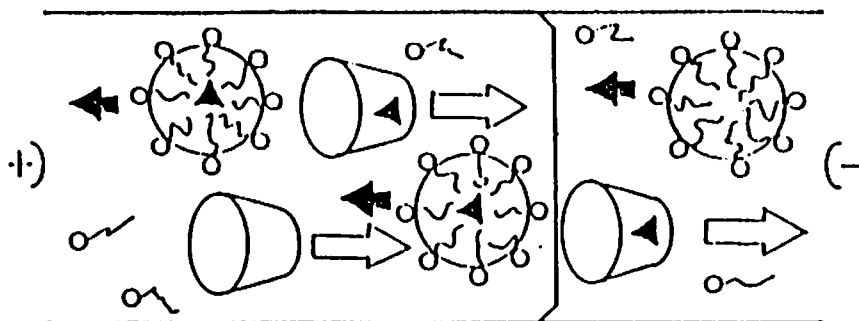
分離用キャピラリーには内径50 μ m、全長80cm (有効長60cm) のフューズドシリカ管を用いた。検出器はJasco UVIDEC-100-IVを用いて210nmで紫外吸光をオンカラムで測定した。分離溶液としては、pHを調整した100mMホウ酸塩緩衝液にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) とCDおよび尿素を溶解したものをを用いた。試料注入は落差法で行った。

3. 結果

Fig.2に16種のPAH'sを分離したクロマトグラムを示す。CDには α 、 β 、 γ の3種があるが、 α はキャピラリーの径が小さすぎて不相当だと考えられたので、 β 及び γ -CDを用いて1~6の試料を分離した結果、 γ -CDの方が優れてい

ると判断した。また SDS と CD の濃度比が分離に影響すると思われるので、Fig.2 の条件で γ -CDの濃度を、10 mM、15mM、20mM、60mM と変えてみたところ、10mM、15mMでは分析に時間がかかるうえに、ピークも広がってしまい分離はうまく行われなかった。60mMの場合は1~3のピークは分離しなかった。

Fig.2では、8と10、12と14が分離されていないが、Fig.2と同じ条件で γ -CDの代わりに β -CDを用いるとこの2組は分離できた。しかし、この場合は分析に時間がかかるため、より高濃度の β -CDを用いての分離を検討中である。

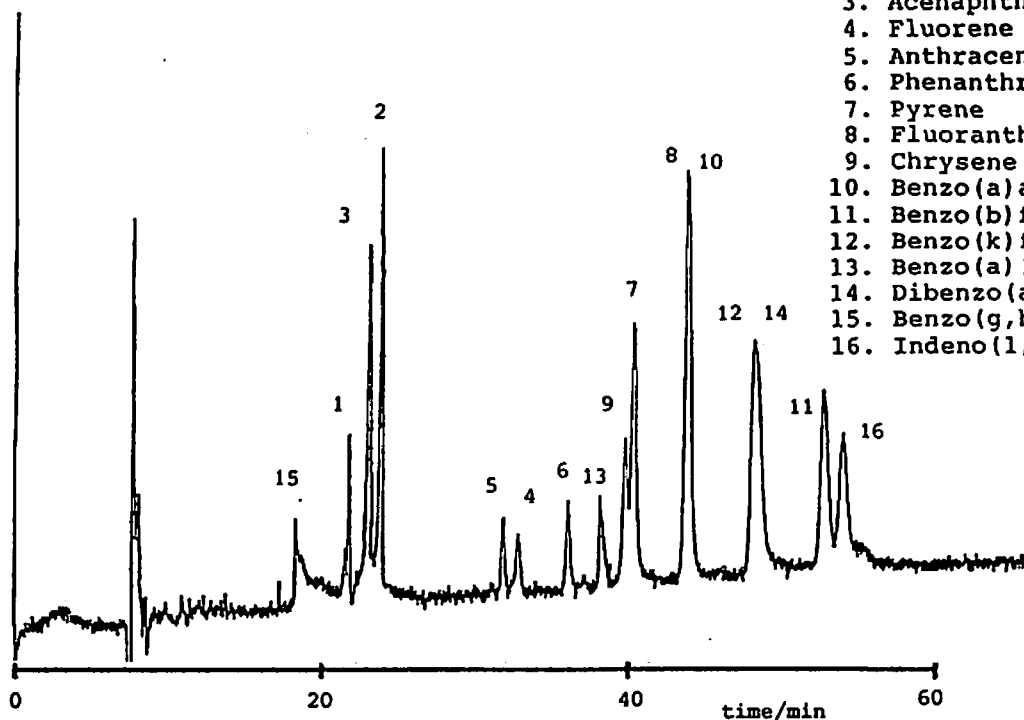


Schematic illustration of the separation principle of CD/MEKC

→: electrophoretic migration of micelles
 ⇨: electroosmotic migration of cyclodextrin

Fig.1 CD / MEKC 模式図

100 mM SDS, 20 mM γ -CD, 5 M urea in
 100 mM borate buffer (pH 9.0)
 50 μ m i.d. x 800 (600) mm, 25 kV



1. Naphthalene
2. Acenaphthene
3. Acenaphthylene
4. Fluorene
5. Anthracene
6. Phenanthrene
7. Pyrene
8. Fluoranthene
9. Chrysene
10. Benzo (a) anthracene
11. Benzo (b) fluoranthene
12. Benzo (k) fluoranthene
13. Benzo (a) pyrene
14. Dibenzo (a, h) anthracene
15. Benzo (g, h, i) perylene
16. Indeno (1, 2, 3-cd) pyrene

Fig.2 CD / MEKC による PAH's の分離

ミセル動電クロマトグラフィーにおける金属 β -ジケトナト錯体の移動度とその評価

(東北大・理) ○齋藤 紘一、清原 力、鈴木 信男

EVALUATION OF THE MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHIC MOBILITY OF METAL β -DIKETONATO COMPLEXES

Department of Chemistry, Faculty of Science,

Tohoku University

Koichi SAITOH, Chikara KIYOHARA and Nobuo SUZUKI

Electrically neutral complexes of acetylacetone or 3-methyl acetylacetone with Cr(III), Co(III), Rh(III), Pd(II) and Pt(II) can be separated successfully in an electrophoretic capillary filled with a micellar solution of sodium dodecylsulfate (SDS). The mobility of each metal complex is interpreted using a distribution concept between the SDS micelle and bulk aqueous solution. The distribution coefficient of each complex is linear to the partition between dodecane and water.

1. はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) は、nlレベルの超微量の試料溶液を対象とすることが可能な極めて効率の高い分離分析法であり、多方面で急速に関心が高まりつつある。このうち、イオン性界面活性剤溶液を用いたCZEはミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) として無電荷化学種をも分離可能にし、これによりCZEの適用範囲は大幅に拡大し無機化学領域への適用も期待される。本研究では、キレート型金属錯体への適用性を調べるとともに、MEKC系での分離機構や移動度について考察した。

2. 実験

泳動用シリカキャピラリーは、有効長500mm、内径50 μ m、外径375 μ m。支持電解質溶液はリン酸塩、ホウ酸塩によりそのpHを7-9に調節しSDSを添加して用いた。高圧安定化電源は東和製 (0-30 kV, 0.33mA max)。検出にはHPLC用紫外吸収検出器 (島津SPD-2A) をCZE用に改造して使用した。金属錯体としてはCr(III), Co(III), Rh(III), Pd(II), Pt(II) のアセチルアセトナト (acac) 錯体、および3-メチルアセチルアセトナト (maa) 錯体を用いた。試料溶液には移動度測定用内標準としてアセトンまたはイエローOBを添加し、高低差法により約3 μ lをキャピラリーに導入した。

3. 結果

SDS 濃度 10-100 mM の条件において、Co(III)、Rh(III)、Cr(III)、Pt(II) の acac 錯体は非可逆的吸着や解離などを起こす事なく、キャピラリー内をこの順で移動した。移動時間 t_s が次式のようにミセルの移動時間 t_{mc} と電気浸透流による溶液の移動時間 t_0 の関数であるとして各錯体のキャパシティーファクター (k') を求めた。

$$t_s = \frac{1 + k'}{1 + (t_0/t_{mc})k'} t_0 \quad (1)$$

各錯体の k' は、支持電解質溶液の pH や電位勾配に依存しなかった。SDS 濃度 (C_{SDS}) が臨界ミセル濃度 (cmc) 以下ではすべての錯体は電気浸透流速で移動し、 cmc 以上では k' はミセル濃度に対し直線的に増加した。この結果から、錯体の分離はミセル相-バルク水相間の分配に支配されていることが示唆される。このとき、分配係数を K 、SDS の比容 (部分モル体積) を \bar{V}_{SDS} とすると、

$$k' = K \cdot \bar{V}_{SDS} (C_{SDS} - cmc) \quad (2)$$

各錯体について k' vs. C_{SDS} のプロットの直線増加部分の勾配から求めた $K \cdot \bar{V}_{SDS}$ を、ドデカン-水間分配係数 $P_{dod/w}$ と比較したところ両者の対数間に良好な直線関係が認められた (Fig. 1)。

以上から、これらの錯体はミセルの疎水部分に分配しているものと示唆される。

他の錯体の移動度の予測への上記直線関係の応用性を調べた。 $P_{dod/w}$ が 2.08、20.0 である Cr(III) の maa 錯体と Pd(II) の acac 錯体について Fig. 1 に示す関係から $K \cdot \bar{V}_{SDS}$ の予測値として、それぞれ 102、350 が得られ、これにたいする実測結果は、それぞれ 109、380 であり、Fig. 2 に示すように分離された。

MEKC は上記以外の無電荷金属錯体の分離法としても有望であり、その移動度の予測において液-液分配係数データの適用が期待される。

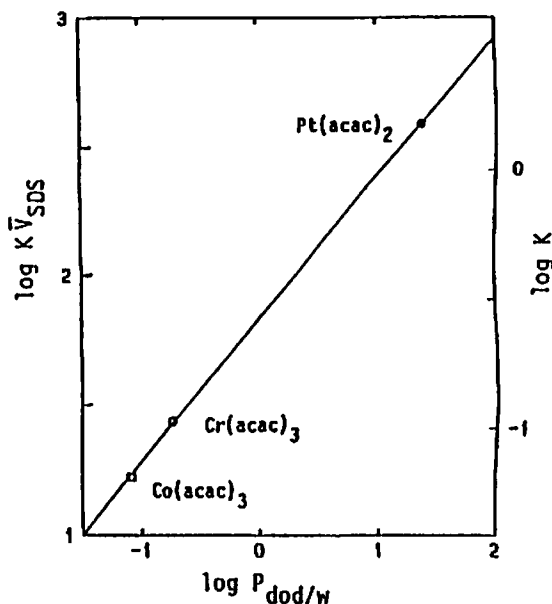


Fig. 1
Log-log plot of $K \cdot \bar{V}_{SDS}$ against $P_{dod/w}$.

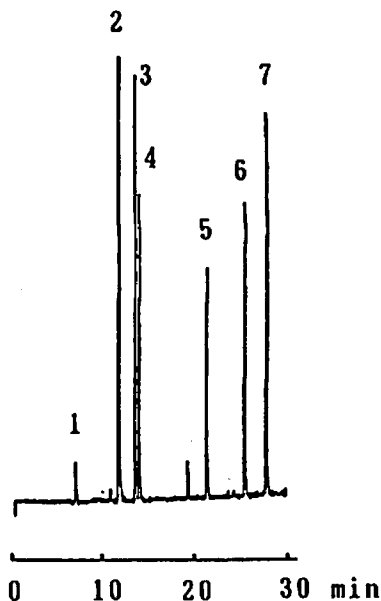


Fig. 2
MEKC separation of metal complexes.
Peaks: 1, acetone; 2, Co(acac)₃; 3, Rh(acac)₃; 4, Cr(acac)₃; 5, Cr(maa)₃; 6, Pd(acac)₂; 7, yellow OB
Solution: 100 mM SDS + 20 mM Na₂B₄O₇, pH 9.2, 230 V/cm.

都立大・理 ○高橋 郁子、泉 友則、奥山 典生
 CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF PTH-AMINO ACIDS.
 Department of Chemistry, Faculty of Science,
 Tokyo Metropolitan University
 Ayako Takahashi, Tomonori Izumi and Tsuneo Okuyama

For this purpose, micro capillary column of reversed-phase had been used routinely in this laboratory for these ten years. Recently micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has developed by Otsuka et.al. So that, we checked the various factors which effect to this method and tested the actual utility of this method for routine Edman method.

1. はじめに

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) を用いて、PTH-アミノ酸が分析できることは既に大塚らによって報告されている。¹⁾ しかしながら、実際にはアミノ酸分析のためには、いろいろの試料に混入してくる各種の物質の影響など現実的な基礎条件の検討が必要である。

本研究においては HPLC の結果と比較しながら、ミセル動電クロマトグラフィーにおける再現性について検討し、手動エドマン法で得た PTH-アミノ酸についての分析を行った。

2. 実験

〔試料〕 PTH-アミノ酸混合標品、及び PTH-アミノ酸標品は和光純薬のアミノ酸配列分析用を用いた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は和光純薬の生化学用を用いた。PTH-アミノ酸は 43% アセトニトリル-1 μ M PTH-グリシン-25mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) にそれぞれ溶解し 10pmol/ μ l を試料溶液とした。

〔装置〕 泳動には、アプライドバイオシステム社の Model 1270A キャピラリー電気泳動装置、分離用のキャピラリーは、内径 50 μ m、全長 72cm (有効長 50cm) のフューズドシリカ管、検出は、269nm オンカラム検出によって行った。

〔キャピラリーの洗浄〕 洗浄溶液として 0.2N の水酸化ナトリウムを用いキャピラリーの内壁を一定時間洗浄した。

〔電気泳動〕 試料注入は陽極より装置付属の vacuum system (127mmHg) を用いて 2 秒間 (約 7nl) 行った。泳動溶液は、50mM SDS-50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を用い、30°C で、20kV の定電圧で泳動した。

3. 結論

〔PTH-アミノ酸の分離〕 Fig.1 に HPLC での分析、Fig.2 にキャピラリー電気泳動での分析パターンを示す。すべての PTH-アミノ酸を検出するのに、内径 1mm、長さ 25cm のカラムを用いた逆相 HPLC においては 500fmol 以下の濃度では検出が困難であるがキャピラリー電気泳動においては 30fmol でも分析が可能であった。

〔再現性〕 PTH-アミノ酸の各ピークの検出時間、及び高さの再現性について検討したのが Fig.3、Fig.4 である。検出時間の再現性では、キャピラリーの洗浄方法が重要であった。ピーク高さの再現性では、試料が解放系であるため、PTH-Ala のピーク高さを基準として相対的なピーク高さを算出した。その結果、検出時間の早い PTH-Tyr よりも検出時間の遅い PTH-Lys のほうがピーク高さのずれが大きかった。

〔手動エドマン分解によって得た PTH-アミノ酸の分析〕 Fig.5 はあるタンパク質を手動エドマン分解し、それによって得た PTH-アミノ酸を分析したものである。このように、実際にエドマン分解と組み合わせて使うことが可能であった。

1) K.Otsuka et.al., J.Chromatogr., **332** 219-226, (1985)

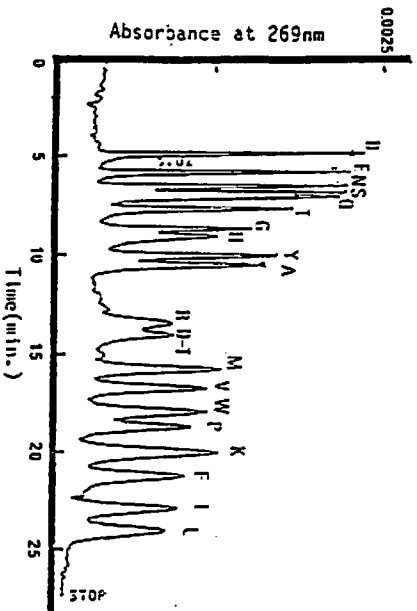


Fig.1 RP-Chromatogram of PTH-Amino Acids

Column: HIC-005 (1.0mm i.d. x 500mm)
 Elution: acetonitrile:14mM Sodium acetate buffer
 (pH4.5)-43:57, cont.1mM PTH-Gly, Isoocratic
 Column Temp.:55°C, Flow rate:45ul/min
 Detection: UV269nm, 0.005auvs

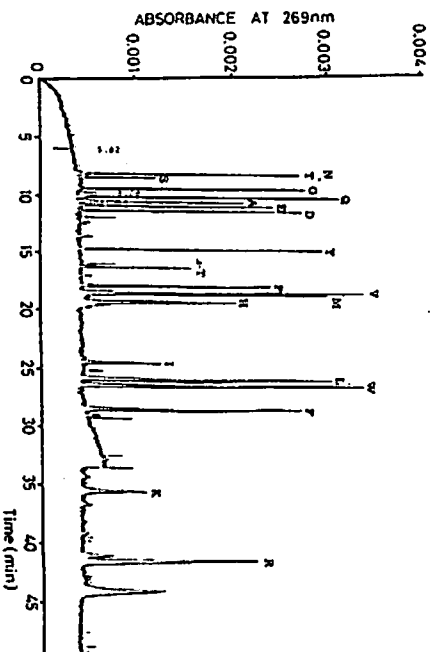


Fig.2 Capillary Electropherogram of PTH-Amino Acids

PTH-Amino Acids was dissolved in 43% acetonitrile-
 14M PTH-Gly-25mM Sodium acetate buffer(pH 4.5)
 Electrolyte solution:50mM SDS-50mM Sodium Phosphate buffer
 (pH 7.0);Capillary tubing fused silica 50um i.d.x72cm
 (effective length,50cm);Voltage,20kV;
 Detection absorbance at 269nm;Temperature,30°C;
 Loading, Vacuum loading 127mHg,2.0sec.

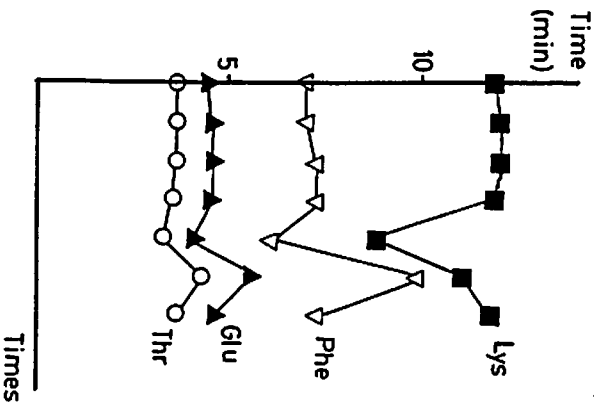


Fig.3 Reproducibility of Migration Time

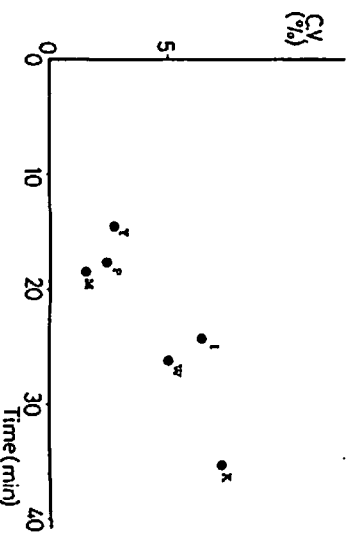


Fig.4 Reproducibility of Peak Height

Ver: C.V. of Relativity Hight(%)
 (standard:PTH-Ala)
 Hor: Migration Time

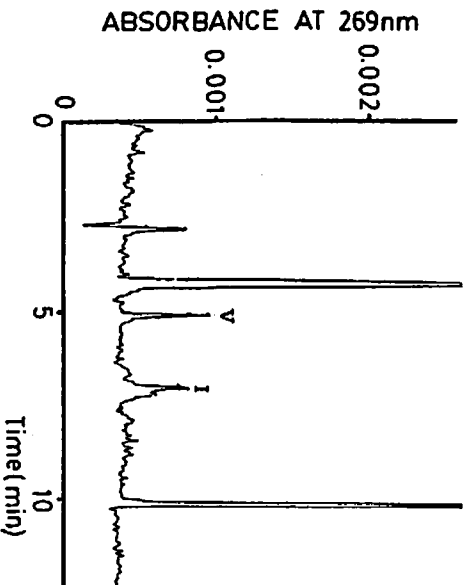


Fig.5 Electropherogram of manual Edman degradation product.
 Electrophoresis conditions were as in Fig.1

(大阪府公衛研) ○岩上正蔵・沢辺善之(京大・薬) 中川照眞

MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY FOR THE ANALYSIS
OF CRUDE DRUGSII. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF GLYCYRRHIZIN AND
PAEONIFLORIN IN CHINESE PHARMACEUTICAL PREPARATIONSOsaka Prefectural Institute of Public Health and
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto UniversityShozo IWAGAMI, Yoshiyuki SAWABE and Terumichi NAKAGAWA

Simultaneous determination of glycyrrhizin(Gly) and paeoniflorin (Pae) in Chinese pharmaceutical preparations was developed by using micellar electrokinetic chromatography with sodium dodecyl sulfate(SDS) and sodium cholate(CA) as anionic carriers. Sample was introduced by siphoning, and the on-column detection was performed at 250nm using n-butyl p-hydroxybenzoate as an internal standard. The calibration lines of Gly and Pae gave good linearities over the concentration range 100-1500ug/ml. Gly and Pae are separated from co-existing components in Kamishoyo-san and in some other Chinese pharmaceutical preparations within 20-25 min.

緒言

生薬は多くの成分を含む天然物であるために、数種の生薬を組み合わせで調製される漢方製剤では成分組成はより複雑となり、その品質管理はきわめて困難である。したがって、漢方製剤については配合生薬中の二つ以上の指標成分の含量を測定することによって品質管理を行なっているのが現状である。指標成分の分析には共存成分との分離が可能な高分離分析法が要求されるとともに、複数の指標成分の同時定量法が品質管理業務を行なう上で有用となる。今回我々は、ミセル動電クロマトグラフィーを用いて、加味逍遙散をモデルに芍薬および甘草を含有する漢方製剤中のペオニフロリン(Pae)とグリチルリチン(Gly)の簡便な同時定量法について検討した。

実験

高圧直流電源には松定プレシジョン製 HSR-25Pを用い、分離用毛細管には信和化工製の内面無処理のフューズドシリカ管(内径0.05mm、長さ700mm、有効泳動長500mm)を使用した。検出器には島津SPD-6Aをセルブロックを改造して用いた。支持電解質溶液は0.02M四ホウ酸ナトリウム溶液および0.02Mリン酸二水素ナトリウム溶液を混合

して調製し (pH 7~9)、この緩衝液中に硫酸ドデシルナトリウム (SDS) あるいはコール酸ナトリウム (CA) を濃度を変えて溶解した。試料の導入は落差法 (落差10cm、10秒) を用いて行なった。試料はその一定量を取り、50% メタノールで抽出したものを、内標準物質にはp-ヒドロキシ安息香酸ブチルを使用した。実験はすべて室温で行ない、印加電圧は15kV一定とした。

結果

緩衝液のpHはピークの形状からpH=9とした。陰イオン性界面活性剤としてSDS あるいはCAを用いた場合の、Pae 及びGly の移動度の変化をFig.1に示す。Pae の移動度はSDS を添加した場合でも、CAを添加した場合でもほぼ同様に減少したことから、Pae のSDS とCAへの可溶化は同程度であると考えられる。一方、この条件下では3個のカルボキシル基がすべて解離しているGly は、SDS には

ほとんど可溶化されないのに対して、CAを添加した場合にはその濃度の増加につれて移動度が減少した。このことはCAが構造認識能を有し、Gly を特異的に可溶化することを示唆している。これら2つの界面活性剤を用いて、加味逍遙散中のPae とGly の分離を試みたところ、SDS を用いた場合には実験した濃度範囲では共存成分との分離は不十分であった。また、CAを用いた場合ではCA濃度が125mM の時に市販の漢方エキス製剤では比較的よい分離を示したが、個々の生薬を混ぜ合わせた通常の漢方製剤ではFig.2のようにGly の分離が不十分であった。しかし、この条件下で加味逍遙散に配合される山梔子中のゲニポサイド (Gen) が同時に分離されることがわかった。そこで、SDS を25mM添加した緩衝液に、さらにCAを添加しその濃度を増加させていくと、Fig.3に示すようにCA 100mMの場合に加味逍遙散中のPae とGly が共存成分から分離され、しかもGen も分離可能となった。この条件下では加味逍遙散をはじめ数種の漢方製剤中のPae およびGly の同時分析が可能であり、その同時定量が20~25分で行な

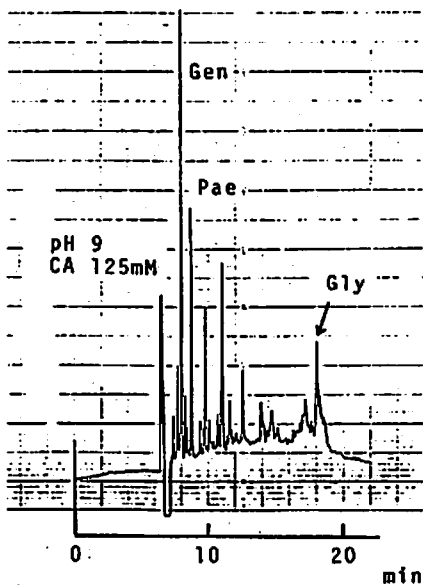


Fig.2

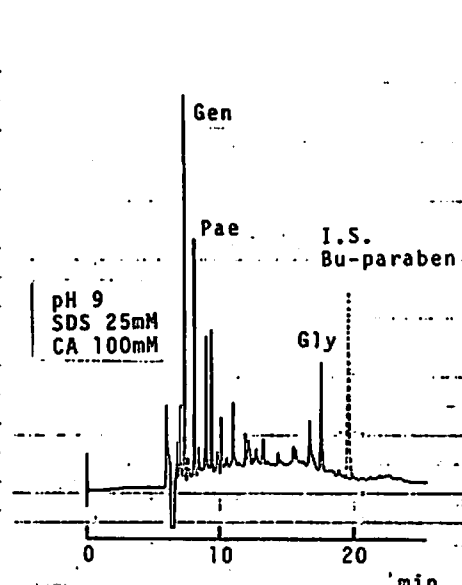


Fig.3

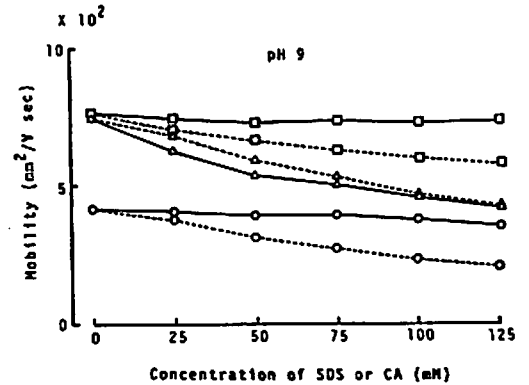


Fig.1 Effect of SDS(—) or CA(-----) Concentration on Mobility. Key: (□)MeOH; (▲)Pae; (○)Gly.

える。内標準物質としてp-ヒドロキシ安息香酸ブチルを用いて検量線を作成したところ、Pae、Gly ともに100-1500ug/ml の濃度範囲で良好な直線性が得られた。この方法を用いて行なった市販の漢方エキス製剤中のPae とGly の測定結果について述べる。

協賛企業

本シンポジウムには下記の企業からの協賛がありました。ここに厚く御礼申し上げます。

- ・アブライド・バイオシステムズ・ジャパン株式会社
- ・株式会社 島津製作所
- ・日本電子株式会社
- ・日本バイオラッド・ラボラトリーズ
- ・日本分光工業株式会社
- ・日本ミリポアリミテッド・ウオーターズクロマトグラフィー事業部
- ・株式会社 日立製作所
- ・ベックマン株式会社
- ・松定プレジジョンデバイセズ株式会社
- ・横川電機株式会社

機器展示

本シンポジウムにおいて機器を展示された企業は下記の通りです。

- ・アブライド・バイオシステムズ・ジャパン株式会社
- ・医理化機器株式会社
- ・株式会社 島津製作所
- ・日本バイオラッド・ラボラトリーズ株式会社
- ・日本分光工業株式会社
- ・日本ミリポアリミテッド・ウオーターズクロマトグラフィー事業部
- ・ベックマン株式会社
- ・松定プレジジョンデバイセズ株式会社

平成2年度

日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会
幹事

奥山典生（東京都立大・理）*	鷹野重威（日立計測エンジニアリング）
木曾義之（広島大・工）	児玉裕敬（高知医大・化）
小林英三郎（城西大・理）	酒井恒行（日本シホア・ウォーターシステム事業部）
佐藤 隆（ベックマン）	千田正昭（日本分光）
銭場俊彦（アプライドハイシステムズ）	津田孝雄（名工大）
寺部 茂（姫路工大）	長堀崇重（ハイラットシステムズ）
花岡 譲（横川電機）	広川 健（広島大・工）
福士恵一（神戸商船大）	藤下 修（九州大・病院）
本田 進（近畿大・薬）*	眞鍋 敬（姫路工大）
八木孝夫（島津製作所）	吉田治弘（専修大・法）

（五十音順）

* 代表幹事

* 第10回シンポジウム世話人

日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

平成2年11月25日 印刷

平成2年12月13日 発行

編集 東大阪市小若江3-4-1

近畿大学内

第10回キャピラリー電気泳動シンポジウム事務局

発行 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

印刷 近畿大学印刷部