

SCE11

第11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

会期 1991年12月12日(木) - 13日(金)

会場 東京都立大学

S C E 1 1

11th Symposium
on Capillary Electrophoresis

第11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

本誌の発行に際しては、多くの方々の御協力と御愛顧を賜り、誠にありがとうございます。今後も、より良い雑誌を目指して、努力してまいります。

プログラム

1. 第1回 総論：現代社会における教育の役割と意義
2. 第2回 基礎理論：教育の歴史と変遷
3. 第3回 実践的アプローチ：授業改善と評価
4. 第4回 教育政策と制度：国・地方自治体の役割
5. 第5回 教育とテクノロジー：ICTの活用と課題
6. 第6回 教育と社会：グローバル化と多文化共生
7. 第7回 教育と経済：人材育成と産業競争力
8. 第8回 教育と文化：伝統の継承と創造
9. 第9回 教育と環境：持続可能な社会の実現
10. 第10回 総論：未来を拓く教育の展望

本プログラムは、教育の専門家や実践者、研究者、行政関係者など、幅広い層の方々に参加を呼びかけます。各セッションでは、最新の研究成果や実践事例を共有し、相互に学びを深め、教育の質の向上に貢献することを目的としています。

参加費は無料です。ただし、会場費や資料代として別途費用がかかります。申し込みは、本誌のウェブサイトから行うことができます。詳細は、本誌の裏面に掲載されています。

第11回キャピラリー電気泳動シンポジウム

1991年12月12-13日、東京都立大学

プログラム

第1日(12月12日)

10:00-10:10 開会の挨拶 (東京都立大・理) 奥山 典生

10:15-11:15 セッション I-1(等速電気泳動 I)

- 1 中枢神経系疾患の髄液中コリンのイオンペア抽出-細管式等速電気泳動法による定量
(杏林大・保健¹⁾、国立千葉病院・神経²⁾)○平岡厚¹⁾、三浦勇夫¹⁾、服部宗和²⁾、富永格²⁾
- 2 等速電気泳動法によるシアン化物めっき浴の分析
(島津製作所・応用技術部)○児嶋佳世子
- 3 界面活性剤をカウンターイオンとするキャピラリー等速電気泳動
(島津製作所・応用技術部)○日根隆、八木孝夫
- 4 等速電気泳動法によるチーズ中の成分の分析
(共立女子短期大学)○津田淑江、山田正子、中澤勇二

11:30-12:30 セッション I-2(等速電気泳動 II)

- 5 核燃料廃液中金属イオンのIP-PIXE分析(II)
(広島大・工)○広川健、吉田智、田中勇、中村謙一郎、西山文隆、木曾義之
- 6 希土類の等速電気泳動分離の最適化と分離能におけるテトラド効果
(広島大・工)○胡建英、広川健、西山文隆、木曾義之
- 7 等速電気泳動法におけるアニオン・カチオン同時分析系の解析
(広島大・工)○渡辺和彦、広川健、木曾義之
- 8 IP-CZE法による微量成分の分析
(広島大・工)○大森昭浩、広川健、木曾義之

13:45-15:00 セッション I-3(ゾーン電気泳動 I)

- 9 キャピラリー電気泳動法の医薬品分析への応用(第3報)-オウレン、オウバク中のアルカロイドの分析(徳島文理大・薬)○石井信之、中根徳人、赤田良信
- 10 HPCEによる医薬品・生体物質の分析II
(東京大・薬)○金子三智子、中村洋、中嶋暉躬
- 11 キャピラリー電気泳動を用いた尿中の陰イオン分析
(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⁾)
B.Wildman¹⁾、P.Jackson¹⁾、W.Jones¹⁾、P.Alden¹⁾、○水野隆二²⁾

- 12 キャピラリー電気泳動を用いた食品中の有機酸分析
(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⁾)
B.F.Kenney¹⁾、W.R.Jones¹⁾、○腹巻 ゆかり²⁾
- 13 キャピラリー電気泳動による水酸化サリチル酸の分析-ヒドロキシラジカル検出へ
の応用
(川崎医大・法医学教室¹⁾、川崎医大・生化学センター²⁾)
○富田 正文¹⁾、奥山 敏子¹⁾、渡辺 弘子²⁾

15:15-16:15 セッションI-4(ゾーン電気泳動 II)

- 14 オンカラム2検出器を用いるキャピラリー電気泳動におけるバンド広がりの評価 III
(京都大・工¹⁾、姫路工大・理²⁾)○柴田 理¹⁾、寺部 茂²⁾
- 15 キャピラリー電気泳動における高感度分析-185nmを用いた検出についての開発
(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⁾)
B.Karol¹⁾、○酒井 恒行²⁾
- 16 キャピラリー電気泳動を用いた高感度分析のためのオン-ライン試料濃縮
(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⁾)
M.Merion¹⁾、R.H.Aebersold¹⁾、M.Fuchs¹⁾、○酒井 恒行²⁾
- 17 キャピラリー電気泳動における電気浸透流のフローパターン
(名古屋工大・工)○津田 孝雄

16:30-17:30 セッションI-5(ゾーン電気泳動 III)

- 18 HPCEにおけるキャピラリー試料導入口での化学標識
(近畿大・薬¹⁾、近畿大・薬学総合研究所²⁾)○本田 進¹⁾²⁾、○多賀 淳¹⁾
- 19 HPCEにおけるピーク形状と試料ゾーン幅の関係についての考察
(近畿大・薬¹⁾、近畿大・薬学総合研究所²⁾)○本田 進¹⁾²⁾、大田 恭子
- 20 HPCEにおける二次元マッピングの効用
(近畿大・薬¹⁾、近畿大・薬学総合研究所²⁾)○本田 進¹⁾²⁾、鈴木 茂生¹⁾、多賀 淳¹⁾、掛樋一晃²⁾
- 21 高分子を含む溶液を用いたキャピラリー電気泳動
(東京都立大・理)○泉 友則、町田 明子、高橋 郁子、篠田 友孝、奥山 典生

第2日(12月13日)

9:30-10:30 セッションII-1(ゾーン電気泳動 IV)

- 22 キャピラリー電気泳動を用いた塩基性蛋白質分析
(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⁾)
M.Merion¹⁾、N.Astephen¹⁾、J.Petersen¹⁾、B.Bell-Alden¹⁾、T.Wheat¹⁾、○町田 祥子²⁾

23 取消

24 ペプチドの部分加水分解物のキャピラリー電気泳動による解析
(東京都立大・理)○高橋 郁子、泉 友則、奥山 典生

25 CEによる高分解能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)

○Steven W. Kirsher、萩原 佳代子、小畑 義充、田中 博、銭場 俊彦

10:45-11:45 セッションII-2(動電クロマトグラフィー)

26 動電クロマトグラフィーによる光学分割

(京大・工¹⁾、姫路工大・理²⁾○石濱 泰¹⁾、寺部 茂²⁾

27 ミセル動電クロマトグラフィーの生薬分析への応用III-人參中のジンセノサイドの分離

(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⁾

28 有機溶媒を添加した動電クロマトグラフィーによるペプチドの分離(2)

(協和醗酵・医薬研)○八島 利幸、土谷 昭浩、森田 收

29 取消

12:00-12:45 セッションII-3(ゾーン電気泳動 V)

30 無機イオンキャピラリー電気泳動の応用例

(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⁾)

J.Romano¹⁾、P.Jandik¹⁾、W.R.Jones¹⁾、P.E.Jakson¹⁾、○高橋 孝行²⁾

31 キャピラリー電気泳動法によるアルカリ土類金属イオンの分離定量

(岡山大・理)○本水 昌二、松田 伸也

32 キャピラリー電気泳動による低分子分析

(Spectra-Physics Analytical社)

Timothy D.Schlabach、Jim L.Powers

14:00-15:00

特別講演

電気泳動と共に40年(広島大・工)木曾 義之

15:15-16:15 セッションII-4(種々の電気泳動)

33 無担体電気泳動におけるDNAの分離挙動

(城西大学・理¹⁾、東海大学・医²⁾○小林 英三郎¹⁾、松田 徹¹⁾、松野 巖¹⁾、石井 直明²⁾

34 宇宙実験用無担体電気泳動装置

(三菱重工業株式会社・神戸造船所・宇宙プロジェクト部¹⁾、三菱重工業株式会社・高砂研究所・化学研究室²⁾○小林 次郎¹⁾、宮本 均²⁾

35 電気クロマトグラフィー

(名古屋工大・工)○津田 孝雄、内藤 健

36 検出器としてのエレクトロスプレー型4重極質量分析計の性能の検討

(姫路工大・理)○真鍋 敬、寺部 茂

16:30-17:45 セッションII-5(ゾーン電気泳動 VI)

37 蛋白質のキャピラリー電気泳動分離に及ぼすヘキサンスルホン酸添加の効果

(ベックマン)○船串 佳世、町田 明子、梁井 恵美、佐藤 隆

38 キャピラリー電気泳動を用いた蛋白質分析の新添加剤の開発

(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⁾)

M.Merion¹⁾、B.Bell-Alden¹⁾、Ed Grover¹⁾、U.Neue¹⁾、J.Petersen¹⁾、○丸山 敏彦²⁾

39 ペプチドシークエンシングのためのペプチド及びタンパク質の精製分取へのCZEの応用

(ベックマン¹⁾、三菱化成生命科学研²⁾)○秋山 忠雄¹⁾、大森 彬²⁾

40 ゲル充填キャピラリー電気泳動分離におけるオリゴDNA移動度の解析

(ベックマン)○佐藤 隆、町田 明子

41 核酸アナログを含むヒドロゲルを用いたキャピラリーアフニティー

電気泳動による核 酸塩基の認識

(鹿児島大・工¹⁾、名古屋大・工²⁾、神戸女子薬科大³⁾)

○澤 智裕¹⁾、八島 栄次²⁾、明石 満¹⁾、馬場 嘉信³⁾、津波古充朝³⁾

SCF11

11TH SYMPOSIUM ON CAPILLARY ELECTROPHORESIS

December 12-13, 1991, Tokyo, Japan

PROGRAM

Morning, December 12, Thursday

Opening Ceremony (10:00-10:10)

Opening address

Norio Okuyama, President of Organizing Committee

Capillary Isotachophoresis (10:15-11:15)

1 Determination of Choline in Cerebrospinal Fluid of Central Nervous System by the Iron -Pair Extraction- Capillary Isotachophoresis Method

Atsushi Hiraoka¹⁾, Isao Miura¹⁾, Munekazu Hattori²⁾ and Tominaga²⁾

1)Kyorin University School of Health Sciences and 2)Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital

2 Analysis of Cyanide Plating Baths by Isotachphoresis

Kayoko Kojima

Analytical Applications Dep., Shimadzu Co.

3 Capillary Isotachophoresis with Surfactant as Counter Ion

Takashi Hine and Takao Yagi

Shimadzu Corporation Analytical Application Department.

4 Analysis of Metabolises in Cheese by Isotachophoresis

Toshie Tsuda, Masako Yamada and Yuji Nakazawa

Kyoritsu Women's University

Capillary Isotachophoresis II (11:30-12:30)

5 ITP-PIXE Analysis of Metal Ions in a Nuclear Fuel Waste

Takeshi Hirokawa, Satoshi Yoshida, Isamu Tanaka, Ken-ichiro Nakamura,

Fumitaka Nishiyama and Yoshiyuki Kiso

Faculty of Engineering, Hiroshima University

6 Optmization of Isotachophoretic Separation of Lanthanoides and Tetrado effect on the Separation Efficiency

Jian-ying Hu, Takeshi Hirokawa, Fumitaka Nishiyama and Yoshiyuki Kiso

Faculty of Engineering, Hiroshima University

7 Bidirectional Isotachophoresis

Kazuhiko Watanabe, Takeshi Hirokawa and Yoshiyuki Kiso

Faculty of Engineering, Hiroshima University

8 Minor Component Analysis by Means of ITP-CZE On-line Combination

Akihiro Omori, Takeshi Hirokawa and Yoshiyuki Kiso

Faculty of Engineering, Hiroshima University

Afternoon, December 12, Thursday

Capillary Zone Electrophoresis I (13:45-15:00)

9 Application of Capillary Electrophoresis to Pharmaceutical Analysis III

Determination of Alkaloids in Coptis Rhizome and Phellodendron Bark

Nobuyuki Ishii, Tokuto Nakane and Yoshinobu Akada

Faculty of Pharmaceutical Science, Tokushima Bunri University

10 HPCE of Drugs and Biogenic Substances (II)

Michiko Kaneko, Hiroshi Nakamura and Terumi Nakajima

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

11 Analysis of Anion Constituents of Urine by Inorganic Capillary Electrophoresis

B.Wildman¹⁾, P.Jackson¹⁾, W.Jones¹⁾, P.Alden¹⁾ and R.Mizuno²⁾

1)Waters Chromatography Division, Millipore Corp. and 2)Water Chromatography Division, Nihon Millipore

12 Determination of Organic Acids in Food Samples by Capillary Electrophoresis

B.F.Kenney¹⁾, W.R.Jones¹⁾ and Y.Haramaki²⁾

1)Waters Chromatography Division, Millipore Corp. and 2)Water Chromatography Division, Nihon Millipore

13 Analysis of Hydroxylated Salicylic Acids by Capillary Electrophoresis:

Application to the Determination of Hydroxyl radical

Masafumi Tomita¹⁾, Toshiko Okuyama¹⁾ and Hiroko Watanabe²⁾

1)Department of Legal Medicine, Kawasaki Medical School and 2)Biochemical Research Center, Kawasaki Medical School

Capillary Zone Electrophoresis II (15:15-16:15)

14 Evaluation of Band Broadening in Capillary Electrophoresis with On-Column Twin Detectors III

Osamu Shibata¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾

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

15 New Detection Using 185nm for Capillary Electrophoresis

B.Karol¹⁾ and T.Sakai²⁾

1)Waters Chromatography Division, Millipore Corp. and 2)Water Chromatography Division, Nihon Millipore

16 The Use of On-Line Sample Concentration to Increase the Sensitivity of Capillary Electrophoresis

M.Merion¹⁾, R.H.Aebersold¹⁾, M.Fuchs¹⁾ and T.Sakai²⁾

1)Waters Chromatography Division, Millipore Corp. and 2)Water Chromatography Division, Nihon Millipore

17 Flow Pattern of Electroosmosis in Capillary Zone Electrophoresis

Takao Tsuda

Nagoya Institute of Technology

Capillary Zone Electrophoresis III (16:30-17:30)

18 Chemical Labeling at the Sample Inlet of a Capillary Tube in HPCE

Susumu Honda¹⁾²⁾ and Atsushi Taga¹⁾

1)Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University and 2)Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University

19 Observation on the Relationship between Peak Shape and Sample Zone Width in HPCE

Susumu Honda¹⁾²⁾ and Yasuko Ohta²⁾

1)Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University and 2)Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University

20 Evaluation of Two-dimensional Mapping in HPCE

Susumu Honda¹⁾²⁾, Sigeo Suzuki¹⁾, Atsushi Taga¹⁾ and Kazuki Kakehi²⁾

1)Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University and 2)Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University

21 Capillary Electrophoresis using Glucomannan Gel Filled Capillary

Tomonori Izumi, Akiko Machida, Ikuko Takahashi, Tomotaka Shinoda and Norio Okuyama

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

Morning, December 13, Friday

Capillary Zone Electrophoresis IV (9:30-10:30)

22 New Developments in the Capillary Electrophoresis of Basic Proteins

M.Merion¹⁾, N.Astepen¹⁾, J.Petersen¹⁾, B.Bell-Alden¹⁾, T.Wheat¹⁾ and S.Machida²⁾ 1)Waters

Chromatography Division, Millipore Corp. and 2)Water Chromatography Division, Nihon Millipore

23 Cancellation

24 Analysis of Partial Hydrolyzate of peptides by HPCE

Ikuko Takahashi, Tomonori Izumi and Norio Okuyama

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

25 High-resolution Peptide Mapping by Capillary Electrophoresis

Steven W.Kirsher, Kayoko Hagiwara, Yoshimitsu Obata, Hiroshi Tanaka and
Toshihiko Sen-ba
Applied Biosystems Japan, Inc.

Capillary Electrokinetic Chromatography (10:45-11:45)

26 Optical Resolution by Electrokinetic Chromatography

Yasushi Ishihama¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾

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

27 Micellar Electrakinetik Chromatography for the Analysis of Crude Drugs III.

Separation of Ginsenosides in Panax ginseng

Shozo Iwagami¹⁾, Yoshiyuki Sawabe¹⁾ and Terumichi Nakagawa²⁾

1)Osaka Prefectural Institute of Public Health and 2)Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kyoto University

28 Separation of Peptides by Electrokinetic Chromatography with Organic
Modifier(II)

Toshiyuki Yashima, Akihiro Tsuchiya and Osamu Morita

Pharmaceutical Research Laboratories Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd

29 Cancellation

Capillary Zone Electrophoresis V (12:00-12:45)

30 Optimization of Inorganic Capillary Electrophoresis for the Analysis of Anionic
Solutes in Real Samples

J.Romano¹⁾, P.Jandik¹⁾, W.R.Jones¹⁾, P.E.Jakson¹⁾ and T.Takahashi²⁾

1)Waters Chromatography Division, Millipore Corp and 2)Water Chromatography
Division, Nihon Millipore

31 Separation and Determination of Alkaline Earth Metal ions by Capillary
Electrophoresis

Shoji Motomizu and Shin-ya Matsuda

Department of Chemistry, Faculty of Science, Okayama University

32 Small Molecule Analysis by Capillary Electrophoresis

Timothy D.Schlabach and Jim L.Powers

Spectra-Physics Analytical Co.

Afternoon, December 13, Friday (14:00–15:00)

Special Lecture

Yoshiyuki Kiso

Faculty of Engineering Hiroshima University

Miscellaneous (15:15–16:15)

33 Separation behavior of DNAs in Free Flow Electrophoresis

Hidesaburo Kobayashi¹⁾, Toru Matsuda¹⁾, Iwao Matsuno¹⁾ and Naoaki Ishii²⁾

1)Department of Chemistry, Faculty of Science, Josai University and 2)School of Medicine, Tokai University

34 Free Flow Electrophoresis Equipment for Experiment in Space

Yoshio Kobayashi¹⁾ and Hitoshi Miyamoto²⁾

1)Mitsubishi Heavy Industries, LTD. Kobe Shipyard & Machinery Works Space Systems Project Department and 2)Mitsubishi Heavy Industries, LTD. Takasago Research & Development Center Chemical Laboratory

35 Electrochromatography

Takao Tsuda and Ken Naitou

Nagoya Institute of Technology

36 Electrospray-quadrupole Mass Spectrometer as a Detector of Electrophoresis

Takashi Manabe and Sigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Capillary Zone Electrophoresis VI (16:30–17:45)

37 Effects of The Addition of Hexane Sulfonate on The Protein Separation on Capillary Electrophoresis

Kayo Funakushi, Akiko Machida, Emi Yanai and Takashi Satow

Beckman Instruments (Japan) LTD., Bioanalytical Systems Group

38 Novel Zwitterions as Buffer Additives for Improving Efficiency and

Reproducibility in Capillary Electrophoresis by Minimizing Protein Adsorption

M.Merion¹⁾, B.Bell-Aldenn¹⁾, Ed Grover¹⁾, U.Neue¹⁾, J.Petersen¹⁾ and T.Maruyama²⁾

1)Waters Chromatography Division, Millipore Corp. and 2)Water Chromatography Division, Nihon Millipore

39 Purification and Preparation of Peptides and /or Proteins for Peptide Sequencing with CZE

Tadao Akiyama¹⁾ and Akira Oomori²⁾

1)Beckman Instruments Japan, Bioanalytical Systems Group and 2)Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences, Laboratory of Protein Research

40 Analysis of migration speed of heterogeneous oligo DNA separated on capillary

electrophoresis

Takashi satow and Akiko Machida

Beckman Instruments (Japan) LTD., Bioanalytical Systems Group

41 Base-Recognition on Capillary Affinity Electrophoresis by Use of Hydrogels

Containing Nucleic Acid Analogs

Tomohiro Sawa¹⁾, Eiji Yashima²⁾, Mitsuru Akashi¹⁾, Yoshinobu Baba³⁾ and

Mitsutomo Tsuwako³⁾

1)Faculty of Engineering, Kagoshima University, 2)Faculty Engineering, Nagoya

University and 3)Kobe Women's College of Pharmacy

第11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12日(木)			
開会の挨拶	10:00-10:10		奥山典生
等速電気泳動	10:15-11:15	1-4	吉田治弘
等速電気泳動	11:30-12:30	5-8	八木孝夫
ゾーン電気泳動	13:45-14:30	9-11	銭場俊彦
	14:30-15:00	12-13	佐藤 隆
ゾーン電気泳動	15:15-16:15	14-17	本田 進
ゾーン電気泳動	16:30-17:30	18-21	寺部 茂
第2日 12月13日(金)			
ゾーン電気泳動	9:30-10:30	22-25	真鍋 敬
動電クロマトグラフィー	10:45-11:45	26-29	千田正昭
ゾーン電気泳動	12:00-12:45	30-32	中村 洋
特別講演 (木曾義之)	14:00-15:00	S-1	奥山典生
種々の電気泳動	15:15-16:15	33-36	広川 健
ゾーン電気泳動	16:30-17:15	37-39	小林英三郎
	17:15-17:45	40-41	酒井恒行
閉会の辞 (木曾義之)	17:30-17:45	-	津田淑江

特別講演

電気泳動と共に40年

(広島大工) 木曾義之

40 years-walking with electrophoresis

ABSTRACT - A series of the electrophoretic studies by Kiso and coworkers from 1953 to 1991 is lectured on their experimental techniques, i. e. zone electrophoresis, focussing chromatography and isotachopheresis. And typical applications are presented briefly in relation to the rapid separation of short-lived products (separation time < 40s), the measurement of mobilities, dissociation constants and stability constants, and high-sensitive analytical method by IP-PIXE combination.

演者が電気泳動法による分離・分析に興味を覚えたのは1954年の事であったが当時はペーパークロマトグラフィーの全盛時代であった。演者もこの方法をリン酸イオンの分析に適用していたが、実験の再現性があまり思わしくなくまた時間もかかることから何か面白い方法は無いかと考えていた。電気泳動装置を自作してリン酸イオンを電気泳動分析した所うまく応用出来ることがわかり、これが演者の卒論研究となった。

演者の研究は放射性 ^{32}P で標識した各種リン酸塩のロ紙ゾーン電気泳動分離から始まり、以後希土類その他の錯形成平衡反応を利用する分離と放射化学への応用、焦点クロマトグラフ法、さらに等速電気泳動法等、電気泳動分離と分離挙動の理論的予測、さらに実測された泳動挙動から、移動度、酸解離定数及び錯安定度定数などの物理化学定数を決定する方法等に関心を持ってきた。以下簡単に研究の概要を紹介したい。

1. ゾーン電気泳動

当時イオンの実効移動度を表わす関係式としてはNernst-Einstein式の拡散係数、粘性係数、Stokesのイオン半径をパラメータとする式が使用されていたが、具体的にいざ計算するとなるとパラメータが得られず問題が多かった。そこで金属錯イオン平衡系にイオンの実効移動度に大きく影響を与える錯形成剤の酸解離定数、錯体の安定度定数、その系のpH、イオンの式量及び電荷数の関数として実用性のある関係式を誘導した。錯形成を利用するイオン種の分離分析に多くの指針を与えた。さらに各種無機リン酸、糖リン酸化合物、アミノ酸、ペプチド、ヌクレオチドなど多くの有機イオンについても、実効移動度とpH、イオンの平均荷電と水和度などの相関性を明らかにした。

次に種々のリン酸塩、テルル酸塩、有機リン化合物の (n, γ) 反応により生成する反応生成物の分離分析に電気泳動法を適用し、この方法が放射化学(ホットアトム化学)の研究にとって優れた分離分析手段であることが広く認められた。また ^{235}U の核分裂生成核種の迅速分離用にロ紙電気泳動装置を考案し、当時未報告のRb、Cs、Sr、Ba、Br、Se、Mo、Iなどの短寿命核種(6s~10 min)の単離に成功した。この方法で分離した種々の短寿命核種の核特性(半減期と γ 線エネルギー及びその相対強度比)を γ 線スペクトロメトリーで直接決定した。

2. 焦点クロマトグラフ法

本法も電気泳動法の一種で、泳動媒体（ロ紙）に錯形成剤の濃度勾配を形成させ、金属イオンを濃縮分離させる方法である。Sr、Baとランタノイド放射性核種の分離をゾーン電気泳動法と比較して幾多の知見を得、さらに応用例としてJRR-1核燃料中の ^{137}Cs の迅速分離定量法を試み、これらの試料について迅速分析が可能である事を示した。

3. 細管式等速電気泳動法（IP法）

ロ紙ゾーン電気泳動法によれば予期したようになり高精度の実験が可能であったが、吸着等の問題は不可避であり、さらに高精度な物理化学定数を得ようとする、充填剤の無いものしかない。IP法はまさにこの目的にかなった方法であった。しかしIP法での分離ゾーンのpH、イオン強度共に試料毎に異なっており、結果の解析にはコンピュータを採用したシミュレーションの手法が必要となった。このような背景に基づき無機イオン、有機イオン約500種の移動度、pKa値を登録したデータベースを作成し、pH=3~10の条件でシミュレートした定性定量の指標を表にまとめた。この数値表は多くの研究者に検証され、その計算結果の正しいことが証明されており、現在では測定装置の違いを融合させる補正用標準値として広く使用されるようになった。さらに移動度、酸解離定数、錯安定度定数を算出する方法を開発し、カルボン酸、無機リン酸、ヌクレオチド、アミノ酸、ジペプチドなどの多くの実試料に適用して本法の妥当性を確認した。またメタノール溶媒系についても60種のアニオンの移動度やpKa値を求めた。これらのデータの蓄積によりIP法で算出する方法は、移動度とpKa、logKの新しい決定法として認められるようになった。

こうして得られた物理化学定数を使用して、等速電気泳動分析における分離の最適化にコンピュータを援用する試みも行った。特に従来2成分しか解析できなかった分離過程を、32チャンネル紫外検出装置や走査型紫外検出装置などを種々の新しいタイプの検出器を製作して精密に測定し、その結果に基づき初めて3成分以上の実際的な系についても妥当なシミュレーションが可能になった。

さらにIP法の理論的取扱により錯形成平衡をシミュレートできるよう拡張し、希土類元素が分離できる理由を理論的に解明し、錯イオンの化学形を推定するとともに錯イオンの移動度や錯安定度定数を算出する方法を確立した。この方法は特に従来法では測定困難な安定度定数の小さい（ $\log K > 2$ ）不安定な錯体の錯形成平衡の知見を得るのに有用である。IP法が単なる分析法でなく、イオンの物理化学定数の有力な決定法であることや、混合化学種の溶存状態の分析法として使用できることを明らかにした。

最近ではこれらの結果をもとに分取用等速電気泳動装置を製作・使用して試料を分取後、粒子励起X線分析法（PIXE）と組み合わせて、極微量の希土類元素等を検出する新しい分析法を開発した。この組合せは特に微量元素の高精度分析に有用であるばかりでなく、等速電気泳動法の基本的な知見、すなわち泳動順や回収率に関して重要な知見を与えたばかりでなく、等速電気泳動法が希土類元素その他のレアメタルの分離精製の有力な手段となることを示した。

學年(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

一般講演

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

課程(即下學年)之課程(即高年級)之課程

1

中枢神経系疾患の髄液中コリンのイオンペア抽出—細管式等速電気泳動法による定量

(杏林大・保健,¹⁾ 国立千葉病院・神経科²⁾ 平岡 厚,¹⁾ 三浦 勇夫,¹⁾ 服部宗和,²⁾ 富永 格²⁾

DETERMINATION OF CHOLINE IN CEREBROSPINAL FLUID OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASES USING ION-PAIR EXTRACTION AND CAPILLARY-ISOTACHOPHORESIS

¹⁾Kyorin University School of Health Sciences, ²⁾Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital

Atsushi HIRAOKA,¹⁾ Isao MIURA,¹⁾ Munekazu HATTORI²⁾ and Itaru TOMINAGA²⁾

The concentrations of choline in cerebrospinal fluid of various central nervous system diseases were measured on the basis of ion-pair extraction with dipicrylamine and capillary-isotachophoresis. Under the conditions employed, choline-dipicrylamine complex was extracted with dichloromethane from samples to be examined, and in the capillary-isotachophoretic analyses of acetone solutions of the dried extracts, a clear zone of choline was detected on the isotachopherograms. The results suggested that the cerebrospinal fluid choline levels are elevated under some pathological conditions within the central nervous system including the disturbance in the functions of blood-brain barrier.

【はじめに】

アセチルコリン (A c h o) は、末梢神経系のみならず中枢神経系に於ても、神経伝達物質として重要な役割を持っており、又、アルツハイマー病の脳組織に於てその代謝系の異常が生じている、と指摘されている。一方、ヒト髄液中の A C h o 及びその前駆物質・代謝産物であるコリン (C h o) の検出・定量を試みた初期の研究者らによると、髄液の A C h o と C h o の濃度は各々 10^{-8} M 台及び 10^{-6} M 台であった。しかし、それらの定量法は、「感度は高いが共存物質の影響を受けやすい (バイオアッセイ法)」「特異性は高いが操作が煩雑で分析時間が長い (ガスクロ法)」等の長短があり、中枢神経系疾患の髄液の臨床生化学的検査において、これらの物質の測定は、比較的含量の多く安定性も良い C h o についても未だ本格的には行われていない。そこで我々は、細管式等速電気泳動法により髄液 C h o の検出・定量を試み、その際、コリン系化合物は一定の条件の下でジピクリルアミン (D P A) とイオンペアを形成して水層からジクロロメタン層に最も効率よく移行すること¹⁾を利用して、その抽出の際に濃縮も行うことにした。

[対象及び方法]

対象： 種々の中枢神経系疾患の患者58人(男27, 女31)より得られた65検体の髄液を試料とした。

方法： 試料(2.5-4.5 ml)と1M TAPS buffer (pH 8.5)を1:1 (v/v)に混合し, 更にその混合液に等量のジクロロメタン(2 mM DPAを含有)を加えミキサーでかくはんし放置後, 下(有機)層を採取して減圧乾固し, 100 μ lのアセトンに溶解し, 40 μ lを注入した。分析は島津IP-2Aを使用し, 0.5 mm X 4 cm + 1 mm X 15 cmの細管中で, 先行液として0.005 M 酢酸カリウム-酢酸(pH 4.0), 終局液として0.01 DL-カルニチン塩酸塩を各々用いて行い, 電流は初期7分間は200 μ A, 以後は100 μ Aとし, チャート速度40 mm/minで電位勾配の変化を検出した。分析系は, Oki et al.²⁾の方法と基本的に同じである。

[結果及び考察]

上記の条件下に於て得られた髄液の isotachopherogram (Fig. 1) 上のゾーンの一つが標品との混合分析によりCh oと同定された。Ach oはCh oよりPU値がやや大で標品どうしではCh oと分離したが, 含量が検出限界に達しないためか髄液では検出されなかった。一試料の分析に要する時間は20分以内であり, 定量性も良好だったので, 注入された試料中のCh oの量を検量線よりとめ, その値より原試料中のCh oの濃度を計算した。

髄液のCh oの濃度は1 μ M以下(定量は困難)から7 μ M以上までの範囲に分布し, 2-4 μ Mに最も集中していた。疾患の種類による有意な高低は認められなかったが, 血液脳関門障害の指標である蛋白量の増加はCh o高値と一致していた。

本稿の一部は第5回アジア太平洋臨床生化学会にて発表した。³⁾

[参考文献]

- 1) Karlén B et al., In: Henin I ed. Handbook of Chemical Assay Methods, New York, Reven Press, 1974, 163-179.
- 2) Oki Y et al., Jpn J Legal Med 42, 1-12 (1988)
- 3) Hiraoka A et al, Proc. 5th Asian Pacific Con Clin Biochem (Kobe, Japan, Sep 29-Oct 4, 1991), Amsterdam, Elsevier, in press.

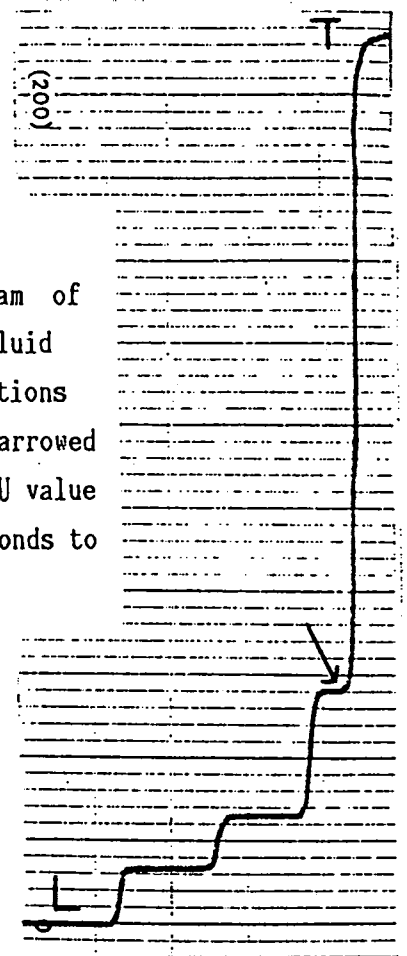


Fig.1. Isotachopherogram of cerebrospinal fluid under the conditions employed. The arrowed zone with the PU value of 0.26 corresponds to choline.

2

等速電気泳動法による シアン化物めっき浴の分析

(島津・応技) ○児嶋 佳世子

ANALYSIS OF CYANIDE PLATING
BATHS BY ISOTACHOPHORESIS
Analytical Applications Dep., Shimadzu Co.
KAYOKO KOJIMA

Analysis of metal-cyanide complex ions and other acids contained in cyanide plating baths was carried out within 20 minutes by isotachopheresis.

The concentrations of $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$, CO_3^{2-} and free CN^- in Ag plating baths obtained by isotachopheresis were virtually identical to almost the same as to those found by titration.

1. はじめに

めっき技術は近年急速に進歩・発展し、従来の装飾・防食を目的としたものから、さまざまな用途をもった機能めっきへと広がりを見せている。機能めっきでは皮膜の電気的・磁気的特性や機械的特性、光学的特性が重要となるが、皮膜特性はめっき浴の組成に大きく依存している。このため、一定品質の析出皮膜を得るためにはめっき浴構成成分のきめ細かな分析が必要となる。

本シンポジウムでも第6回、並びに第8回と等速電気泳動法によるニッケルや銅めっき浴の分析や合金皮膜の剝離液分析などについて報告してきたが、今回は一価金属とシアンの錯塩から構成されているシアン化物めっき浴の分析について検討した。

2. 実験

等速電気泳動分析装置：島津製作所製キャピラリ等速電気泳動分析装置 IP-3AD, キャピラリチューブ：0.7 φ×80mm+0.5 φ×160mm, 検出器：電位勾配検出器 PGD, リーディング電解液：塩化物イオンをリーディングイオンとし、β-アラニン, ε-ACA, ヒスチジン, アメジオールをカウンターイオンとした水溶液, もしくは水-アセトン混合液。

めっき液：金めっき浴（無電解金浴, 硬質金-コバルト合金浴, 半導体工業用金浴, 装飾用金浴）, 銀めっき浴（装飾用銀アルカリ浴, 工業用銀中性浴）, 銅めっき浴（青化銅浴, 亜鉛-銅合金浴）

3. 分析結果・考察

①金めっき液 金めっき液中の金の塩としてはヒ素等との合金めっきで用いられている亜硫酸金ナトリウムやアスコルビン酸を還元剤とする無電解めっきで用いられている塩化金ナトリウムもあるが、一般にはシアン化金カリウムの形で使用されている。いずれの塩の場合も金は錯塩を形成し、陰イオンとして存在するが、今回は無電解めっき亜リン酸浴の分析例を Fig. 1 に、硬質金-コバルト合金めっき浴の分析例を Fig. 2 に示す。

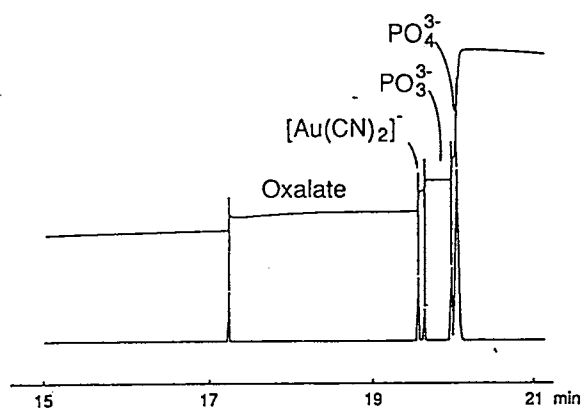


Fig. 1 無電解金めっき浴の分析例

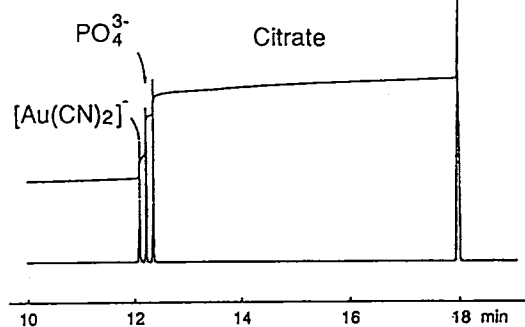


Fig. 2 硬質金-コバルトめっき浴の分析例

②銀めっき液 銀めっき液にはヨウ化カリウムを多量に含むめっき浴で硝酸銀やメタンスルホン酸銀を銀塩として用いたものも報告されているが、大部分はシアン化銀が用いられている。装飾用アルカリ浴の等速電気泳動法での定量結果を湿式分析法と比較してTable 1に示すが、両者の値はよく一致した。また、リードフレームのめっきに用いられる工業用中性銀めっき浴の分析例をFig. 3に示す。

Table 1 装飾用銀めっき浴の定量結果 (g/L)

	IP	滴定法
銀	14.2	14.1
シアン化カリウム	120.9	124.3
炭酸カリウム	101.4	108.7

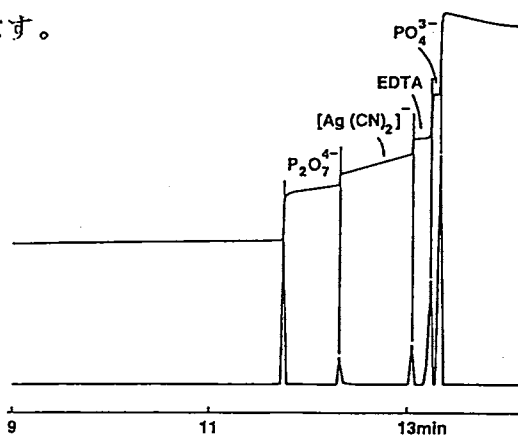


Fig. 3 銀めっき中性浴の分析例

③銅めっき浴 銅めっきは電気伝導性や熱伝導性に優れている上、柔らかく加工しやすいため、使用頻度の高いめっきで、電気めっき、無電解めっき共に広範囲に使用されている。

電気めっきとしては、ピロリン酸銅浴、酸性硫酸銅浴、ホウフッ化銅浴の他に均一電着性に優れたシアン化銅浴が使用されている。このめっき浴は銀アルカリ浴と同じ電解液を使用して、シアン化第一銅、遊離シアン化物、炭酸イオンを同時分析することができた。

4. 結論

シアン化物めっき浴構成成分の定量を等速電気泳動法を用いて検討したが、簡便かつ迅速に定量できた。また、一部の結果は湿式分析法とも比較したが、両者はよく一致した。

謝辞： 湿式分析法について御指導頂きました東京都立工業技術センター・無機化学部の齊藤様、古沢様に深く感謝致します。

3

界面活性剤をカウンターイオン

とするキャピラリー等速電気泳動

(株)島津製作所 応用技術部) ○日根 隆、八木孝夫

CAPILLARY ISOTACHOPHORESIS WITH SURFACTANT AS COUNTER ION

Takashi HINE, Takao YAGI

Shimadzu Corporation, Analytical Application Department

In capillary isotachopheresis, mobilities of some ions are controlled by a counter ion in leading electrolyte. The RE values of aliphatic, alkanol and aromatic amines with the added SDS and aliphatic carboxylic acids with the added DTMA in the leading electrolytes were investigated. The mobilities of the hydrophobic ions were influenced by the using of the anionic or the cationic surfactants as counter ions.

1. はじめに

等速電気泳動法において分析対象イオンの移動度をコントロールする手段の一つに、リーディング電解液のカウンターイオンとの相互作用を利用する方法がある。これは分析対象イオンとカウンターイオンとの錯形成、イオン対、化学反応などによるものである。すでに、錯形成を利用したモノヌクレオタイドの分析¹⁾や還元反応を利用した鉄イオンの分析²⁾などについて報告をおこなってきた。一方、界面活性剤は電位勾配検出器(PGD)における分極などによる電位の乱れや電気浸透流の軽減により、イソタコフェログラムの質を向上させる働きがあり、しばしばリーディング電解液に添加され使用されている。この場合、分析対象イオンの移動度に影響を及ぼさないノニオン系界面活性剤が用いられる。

今回、分析対象イオンと相互作用を有するカウンターイオンとしてアニオン系、ならびにカチオン系界面活性剤を選び、陽イオン分析と陰イオン分析への適用性について検討をおこなった。

2. 実験

装置は島津キャピラリー等速電気泳動装置: IP-3A型、データ処理装置: ITP-R5A型を用いた。検出器はPGDを使用し、泳動チューブには内径0.7mm、長さ80mm(PTFE製)と内径0.5mm、長さ160mm(FEP製)とを直列に接続し、①陽イオンと②陰イオンの分析について検討した。試薬はすべて市販のものを購入して使用した。

①陽イオン分析 リーディング電解液は10mM-水酸化カリウム・酢酸(pH5.0)水溶液を基にドデシル硫酸ナトリウム(以下SDSと略す)を1~10mMの範囲で添加し用いた。ターミナル電解液は10mM-塩化カルニチン水溶液を使用した。試料として6種の脂肪族アミン、3種のアルカノールアミンおよび5種の芳香族アミンを選び、検討をおこなった。

②陰イオン分析 リーディング電解液は10mM-塩酸・クレアチニン(pH4.5)水溶液を基にn-ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド(以下DTMAと略す)を1~10mMの範囲で添加し用いた。ターミナル電解液には10mM-MES・トリス(pH7.0)を使用した。試料として9種の直鎖脂肪族カルボン酸を選び、検討をおこなった。

3. 結果および考察

①陽イオン分析 検討をおこなった各種アミン類は、泳動中に SDS の影響を受けて移動度が変化する。Fig. 1 に SDS の各濃度における各種アミン類の RE 値の変化を示した。各 RE 値は Na イオンにより補正をおこなった。アルカノールアミンの RE 値の変化は少なく、脂肪族アミンおよび芳香族アミンの RE 値の変化は大きかった。6 mM 以上の SDS 添加において、各成分の移動度の変化が小さいのは、これ以上の濃度において SDS が飽和になるためと考えられる。以上のように、疎水基を有するアミン類の RE 値に及ぼす SDS の効果が観察された。

②陰イオン分析 Fig. 2 に DTMA 添加による各種直鎖脂肪族カルボン酸の RE 値の変化を示した。各 RE 値はリン酸イオンにより補正をおこなった。C-6 (n-カプロン酸) までは RE 値の変化は認められないが、C-7 (n-ヘプタン酸) 以上では急激な RE 値の増加が見られた。

このようにリーディング電解液に添加されたアニオン系、カチオン系界面活性剤は、疎水性の強いイオンの移動度に対して大きな影響を及ぼすことが観察された。

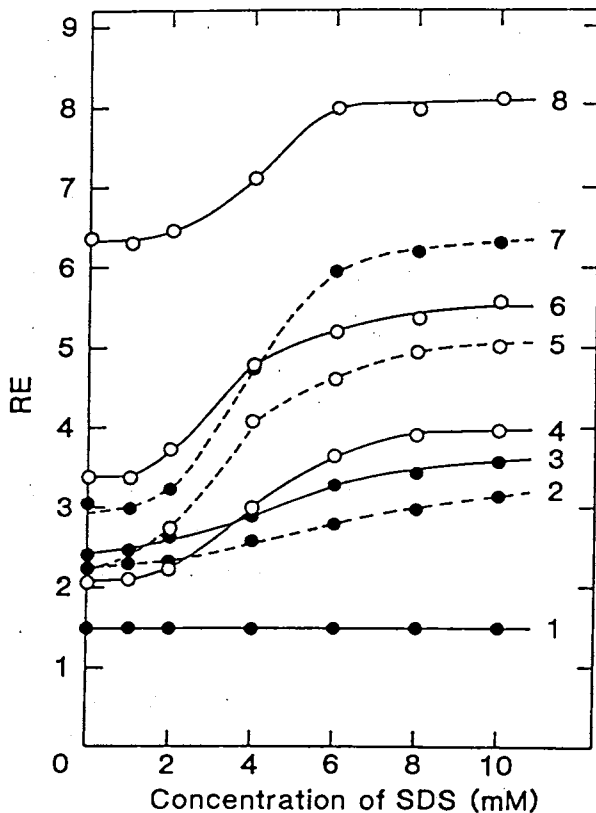


Fig. 1 The effect of SDS concentration to RE values of amines at pH 5.0.

1:Na 2:Diethanolamine 3:Triethanolamine
4:n-Butylamine 5:n-Amylamine 6:Aniline
7:N-n-Butylaniline 8:Terminal(Carnitine)

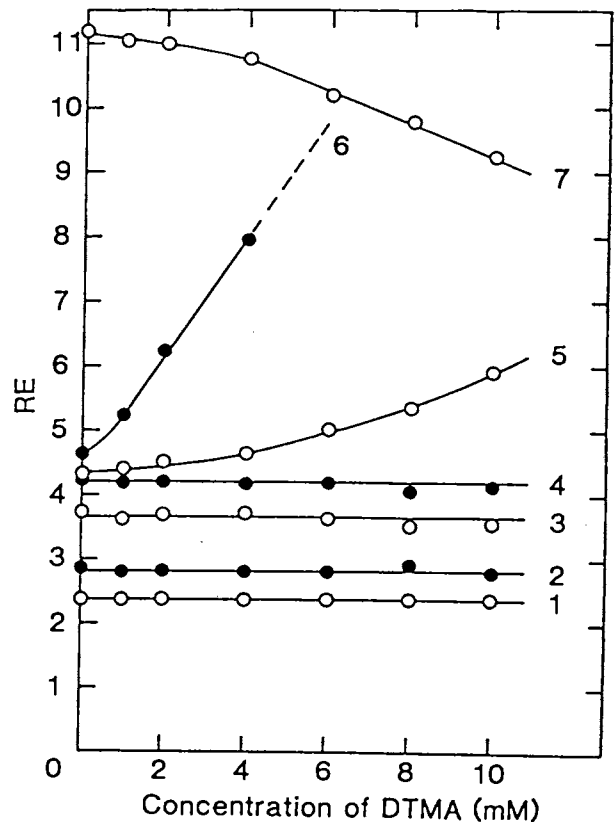


Fig. 2 The effect of DTMA concentration to RE values of carboxylic acids at pH 4.5.

1:Phosphoric acid 2:Acetic acid 3:Valeric acid
4:Caproic acid 5:Heptanoic acid
6:Caprylic acid 7:Terminal(MES)

参考文献

- 1) 八木、日根：島津評論 44、247 (1987)
- 2) 日根：第8回電気泳動シンポジウム講演要旨集 p. 25 (1988)

4

等速電気泳動法によるチーズ中の代謝物質の分析

(共立女子短大) ○津田 淑江、山田 正子、中澤 勇二

ANALYSIS OF METABOLISES IN SOME CHEESE BY ISOTACHOPHORESIS

(Kyouritsu Women's University) ○Toshie TSUDA, Masako YAMADA and Yuji NAKAZAWA

Low molecular weight peptides(LMWP) in Camembert cheese were extracted and group fractionated by application of the molecular sieving properties of Dowex-50. LMWP included the compounds with a molecular weight less than 1000.

The fractionated extracts were analysed by Isotachophoresis. The leading electrolyte systems comprised 0.01N hydrochloric acid solutions and the pH_L9.3 and 9.5 were adjusted by adding ethanolamine, respectively. The terminating electrolyte was 0.01N β -alanine, the pH being adjusted to 10 by adding barium hydroxide. β -alanine was used as the internal standard for getting precise R_E values. The main objectives of this study were to compare the effects of ripening conditions on proteolytic changes by specifying the R_E values of samples versus the simulated ones of amino acids, dipeptides, and organic acids.

良質な牛乳にスターターとレンネットを添加し、凝固したカードから作られた生チーズは、熟成させることによってはじめて風味のあるチーズとなる。熟成中においてスターターとして添加した微生物の諸酵素並びにレンネットが徐々に乳成分を分解し、さらにこれらの分解物を生存している微生物が発酵して高分子ペプチド、低分子ペプチド、アミノ酸そして低分子の有機酸などへと順次加水分解されていく。これらの分解生成物の複雑な組合せ、特にタンパク質分解は、それぞれのチーズのテクスチャー、チーズ臭などの特有の風味を生む要因となっていることが知られている。

チーズ中に存在する加水分解物のパターンを比較することは、チーズの特性と熟成過程を知る上で重要なことと考えられる。この進行状況はいくつかの方法により検討されている。例えば様々な濃度のトリクロル酢酸のような試薬で分画する方法、限外濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、種々の電気泳動がある。しかしながら、これらはチーズの熟成初期に起こるカゼイン分子のペプチド結合の加水分解を検討したり、様々なチーズ間の加水分解のパターンを比較するときに限界がある。細管式電気泳動法は電荷を持つ低分子物質を、迅速で再現性のある分析手段として注目されている。本研究においては、細管式電気泳動法を用いてチーズ中の低分子ペプチドの分離定性を行い、チーズ製造過程中的タンパク質の変化を検討した。

【実験方法】

分析装置：島津細管式電気泳動装置I.P.-3Aを用い、検出には電位勾配検出器および紫外外部吸収検出器を用いて実験をおこなった。またコンピュータシミュレーション データーバンクとしては木曾らが開発した“SIPS-1”を用い、コンピューターはNEC-PC9801-RA, NEC-N-5913L, PC-PR201-V2を用いた。

試料：市販カマンベールチーズ、及び熟成中のカマンベールチーズを試料とした。

【結果及び考察】

泳動条件： 広川らは28種類のジペプチドの泳動を M_0 及び pK_a 値を用いてコンピューターシミュレーションを行っている。そこで本研究においては広川らがシミュレーションに用いた条件で泳動を行った。すなわちリーディング液として0.01N塩酸-エタノールアミン($pH_L 9.3$ および $pH_L 9.5$)を用い、ターミナル液としては0.01N β -アラニン($pH_T 10.0$)を用いた。各物質の同定には β -アラニンをインターナルスタンダードとして、 R_E 値を計算した。試料の調製： チーズ中のタンパク質やペプチドは大きさ、溶解度、構造の点からみると非常に多様なので、窒素化合物を分析する際には、あらかじめ均一な分画に分ける必要があるとされている。そこでトリクロール酢酸を用いて抽出した試料溶液を、Dowex-50を用いた多段式カラム測定法による分子ふるい分析を行い、X-16、X-12、X-8に分画した。それぞれの分画中のトータル窒素量、アミノ態窒素量より、それぞれの重合度はX-16は1.2~2.2、X-12は3.5~4.4、X-8は5.5~7.4と推定した。この重合度別に分別された試料についてI.P.分析及びアミノ酸分析を行った。

代謝物質の同定： 等速電気泳動における定性分析では、標準試料との直接的比較により同定されることが多い。今回はコンピューターシミュレーション法の活用により、等速電気泳動分析中における分離ゾーンの定性分析を行った。すなわちデーター(REBANK)の使用により $pH_L 7.2$ 、 $pH_L 8.7$ 、 $pH_L 9.3$ 、 $pH_L 9.5$ におけるアミノ酸、ジペプチド、有機酸の R_E 値を算出した。この R_E 値と実際にチーズから抽出した各分画液を泳動分離したときに得られた R_E 値とを比較し定性を試みた。データーファイルからの R_E 値と実測値はFig.1に示す通りである。 $pH_L 9.3$ の条件時のNo.3、No.4及び $pH_L 9.5$ の条件時のNo.D、No.Eの R_E 値を示す泳動物質はX-16の分画にのみ現れた。

Fig.2はこれら各分画をアミノ酸分析機によって分析を行った結果である。X-16の分画中に特異的に多いアミノ酸はリジン、ロイシン、グルタミン酸であることが分かる。REBANKから得られたリジンの R_E 値は7.39($pH_L 9.3$)、6.69($pH_L 9.5$)であり、今回使用したターミナルイオンの β -アラニンの R_E 値より大きかった。一方、ロイシンの R_E 値はNo.4、No.Eの実測 R_E 値に近い値を示した。またロイシン-ロイシンのジペプチドの R_E 値もNo.3、No.Dの値に近かった。No.1,2及びNo.A,B,Cはセリン、グルタミン、アスパラギン、ロイシン-チロシンの R_E 値に近いものがあり、 pH_L を替え更に分解物質の定性の検討を行っていく予定である。

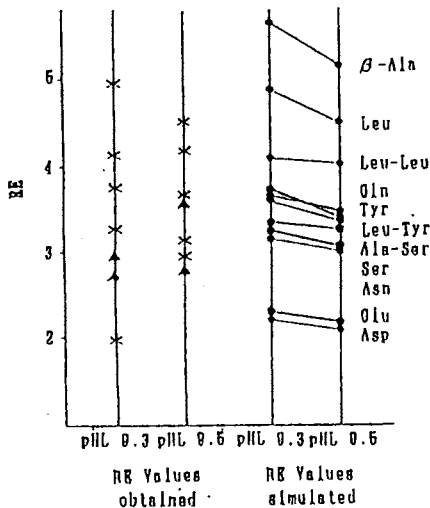


Fig.1 Isolation and identification of LHP and amino acids in Camembert cheese by isotachopheresis

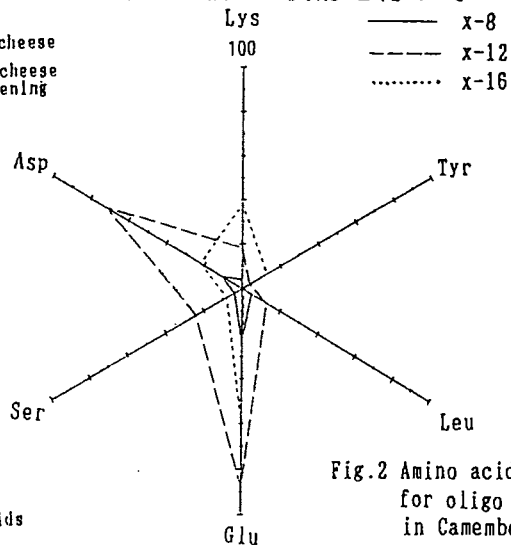


Fig.2 Amino acid analysis for oligo peptides in Camembert cheese

核燃料廃液中金属イオンの I P - P I X E 分析 (II)

(広島大工) ○広川健・吉田智・田中勇・中村謙一郎・西山文隆・木曾義之

STUDY OF ISOTACHOPHORETIC SEPARATION OF METAL IONS IN A WASTE GENERATED IN NUCLEAR FUEL CYCLE BY MEANS OF PARTICLE INDUCED X-RAY EMISSION, T. Hirokawa, S. Yoshida, I. Tanaka, K. Nakamura, F. Nishiyama and Y. Kiso
Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,
Hiroshima Univ., Higashi-hiroshima 724 Japan

ABSTRACT - In order to investigate the isotachophoretic migration behavior of a nuclear fuel waste, a model solution SW-11 from PRN was fractionated using a micro-preparative apparatus. The fractions of the separated zones were analyzed off-line by means of Particle Induced X-ray Emission (ITP-PIXE) and the migration order and the recovery was evaluated. Good separability was observed when α -hydroxyisobutyric acid was used as the complex-forming reagent, confirming the practical utility of isotachopheresis for the partitioning.

1. 電気泳動分析において、電位勾配・電気伝導度などの汎用検出器による検出法では類似の定性指標を与える物質については定性定量に際して問題を生じる事がある。このような場合に正確な分析を行うためには試料に特異的な検出法を用いる必要がある。有機物質ではUV/VISの吸収波長の相違に基づく3次元エレクトロフェログラムの利用などが考えられ実用に供されているが金属イオンが試料である場合には応用できない事が多い。このような場合に対処する方法として演者らは等速電気泳動(IP)法と粒子励起X線分析(PIXE)を組み合わせた分析法を開発し希土類を初め種々の試料中の微量成分分析に適用できることを示した。本法は等速電気泳動分離した試料ゾーンを分取し成分をオフラインでPIXE分析するもので、この組合せによりIP法の泳動挙動など基礎的な情報を精度良く得る事ができる他、単独での分析法としての欠点を相互に補って高精度の分析が可能になる。特に複雑な試料系においては非常に威力を発揮する。

昨年来分析対象としている核燃料再処理廃液模擬試料は、使用済み核燃料(U)を数年間冷却後U・Puを分離した後に残る廃液の模擬試料であって、約30種の陰陽金属イオンを異なる割合で含む。主成分はNaの他種々の希土類元素である。現在この模擬試料の等速電気泳動挙動の解明に本法を適用し、長寿命核種(Csや超ウラン元素等)の処理や有用核種の分離分取の可能性について検討している。

2. 核燃料再処理廃液の模擬試料SW-11は動力炉・核燃料開発事業団人形峠事業所より提供していただいた。少量の沈澱はあらかじめろ過してあり、ろ液を分析試料とした。Table 1に分析に供した試料の組成を示した。カチオン分析に使用したリーディング電解液は20mM NH₄OHで錯形成剤 α -ヒドロキシイソ酪酸(HIBA)を5mMおよび10mM添加後、酢酸を加えてpHを4.8とした。比較のためHIBAを添加しない系についても実験を行なった。使用したターミナル電解液は10mM塩酸カルニチンで、これらの電解液系の組合せではカチオン・アニオンの両方に対して等速電気泳動が起こる(Bidirectional Isotachopheresis, 詳細については講演7の要旨を参照)。

分取用等速電気泳動装置は我々の研究室で製作したものを使用した。分離管は内径1mm長さ46cmと内径0.5mm長さ30cmのPTFE管を接続したものである。泳動電流は150 μ Aである。分取にはリーディング電解液のカウンターフローによる方式を使用した。フラクションは約5 μ lで約10秒毎に分取される。各フラクションはニュクリポアフィル

ター（厚さ5 μm、ポアサイズ0.5 μm）上に滴下し乾燥後PIXE分析した。

3. これまで明らかになった事は次のとおりである [1]。

1) HIBの添加は分離能向上に有用であるが、試料系には重希土が存在しないためHIB無添加でも比較的良好な分離挙動が見られた。

2) 成分のうちCs、Rb、Ba、Sr、Na、Mn、Ni、La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Y等のカチオンとしての回収率はHIBの添加量に依存せず100%であった（Table 2）。ただしCs、RbはNH₄⁺リーディングイオンを追い抜いてゾーン電気泳動する。

2) その他の元素でカチオンとして泳動したものはFeをはじめコロイド化しており、その回収率は20-60%程度の範囲で変化した。またコロイド部分の回収率は実験毎に変動がみられた。このような挙動をする元素はFe、Ru、Rh、Pd、Fe、Cr、Zr、Mo、Se、Te等で第VIII族元素が主成分であった。

3) 未回収の成分はアニオンとして泳動しているものもあったが（Mo >> Zr > Fe）多くは電気泳動しない非イオン性成分と思われる。

4) 模擬試料に対する分離能は約1 μmol/Cであった。

現在以上の知見を基に、2次元電気泳動装置による連続処理の基礎的研究を行っている。なお本研究の一部は動燃の受託研究によるものである。記して感謝致します。

Table 1. 模擬廃液SW-11の組成（1/50希釈）

Z		mmol/l	Z		mmol/l	Z		mmol/l	Z		mmol/l
11	Na	19.62	37	Rb	0.0728	46	Pd	0.173	57	La	0.164
15	P	0.254	38	Sr	0.175	47	Ag	0.0068	58	Ce	1.178
24	Cr	0.079	39	Y	0.126	48	Cd	0.0092	59	Pr	0.149
25	Mn	0.262	40	Zr	0.722	50	Sn	0.0066	60	Nd	0.500
26	Fe	1.554	42	Mo	0.612	52	Te	0.0714	62	Sm	0.102
28	Ni	0.187	44	Ru	0.338	55	Cs	0.322	63	Eu	0.016
34	Se	0.011	45	Rh	0.0679	56	Ba	0.194	64	Gd	0.0078

Table 2. Bidirectional isotachopheresisにおける模擬廃液SW-11の回収率/%

Z	C	A	N	Z	C	A	N	Z	C	A	N	Z	C	A	N				
11	Na	100*	-	-	37	Rb	100*	-	-	46	Pd	17	-	83	57	La	99	-	-
15	P	-	-	-	38	Sr	100*	-	-	47	Ag	-	-	-	58	Ce	108	-	-
24	Cr	50	-	50	39	Y	102	-	-	48	Cd	-	-	-	59	Pr	110	-	-
25	Mn	98	-	2	40	Zr	56	.4	44	50	Sn	-	-	-	60	Nd	98	-	-
26	Fe	22	1	77	42	Mo	33	16	51	52	Te	45	-	55	62	Sm	97	-	-
28	Ni	104	-	-	44	Ru	61	-	39	55	Cs	100*	-	-	63	Eu	112	-	-
34	Se	42	3	55	45	Rh	51	-	49	56	Ba	100*	-	-	64	Gd	100	-	-

C : カチオンとして分取した成分の回収率、 A : アニオンの回収率

N : C、Aから推定した中性および低移動度成分の回収率

* H⁺をリーディングイオンとした系での回収率

1) T. Hirokawa, A. Ijuin, S. Yoshida, M. Ueda, F. Nishiyama and Y. Kiso, Anal. Sci., (1991) to be published.

6

希土類の等速電気泳動分離の最適化と分離能におけるテトラド効果

(広島大工) ○胡建英、広川健、西山文隆、木曾義之

OPTIMIZATION OF ISOTACHOPHORETIC SEPARATION OF RARE EARTH IONS AND THE TETRAD EFFECT IN SEPARATION EFFICIENCY, JIAN-YING HU, TAKESHI HIROKAWA, FUMITAKA NISHIYAMA AND YOSHIYUKI KISO

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima Univ., Kagamiyama 1, Higashi-hiroshima 724 Japan

ABSTRACT - Isotachophoretic separation behavior of fourteen rare earth cations coexisting with α -hydroxyisobutyric acid(HIB) was studied in relation to the separation efficiency. It was found that the separation efficiency of equimolar neighboring lanthanoids varied discontinuously but periodically forming four different groups(tetrad effect). For binary mixture of neighboring rare earth cations, the separability was almost independent from the abundance as same as the strong electrolyte case.

1. ヒドロキシイソ酪酸(HIB)を用いた錯形成の平衡を利用した14種希土類カチオンの分離は等速電気泳動の代表的な応用例である。希土類の分離にはリーディング電解質のpHとHIBの濃度が影響を与える。錯形成平衡に関連する分離の原理についてはすでに明らかになっているが、各元素の分離能についてはEuとGdが分離しにくいとの知見以外には詳細は知られていない。試料のオーバロードは分離分析法においては致命的であり、実試料の分離分析の最適化に当たって試料の分離能に関する知識は極めて重要である。我々はIP分取した試料ゾーンをPIXE分析する方法を開発しているが、試料中での微量成分の正確な定量には分離能の知見は不可欠である。そこで原子番号が隣あった二成分希土類(等モル)の分離能を正確に測定したところ分離能が原子番号によって周期的に変化する現象(テトラド効果)を初めて見いだした。試料成分数と成分比の希土類分離能への影響も等速電気泳動(ITP)と粒子励起X線分析(PIXE法)を組み合わせた分析法¹⁾により明らかにした。

2. 使用したリーディング電解質は10mM HIBを含む20mMアンモニア溶液で、pHを酢酸により4.80に調整した。ターミナル電解液は10mM塩酸カルニチンであった。電気浸透流を抑えるためリーディング及びターミナル電解質に(0.2%)HPCを添加した。等モル2成分試料の分離能の測定には島津-2Aを使用した。また微量成分の成分数と成分比の分離能への影響を調べるため本研究室で製作した分取用等速電気泳動分析装置を使用した。試料注入から分取終了まで要する時間は約50minであった。分離用細管は内径1mm(長さ16cm)と内径0.5mm(長さ30cm)のPTFE管で、分離したゾーンをリーディング電解液のカウンターフロー(30 μ l/分)により液滴(5.4 μ l)として分取した。

3. 分離能の測定のため二成分希土類カチオンの等モル混合試料についてイソタコフェログラムを測定し、混合ゾーンが形成され始める注入量と電気量から分離能を求めた。得られた結果をFig. 1に示した。一番分離しにくいEuとGdの分離能は30nmol/Cであった。Fig. 1において注目すべきは分離能は希土類元素の原子番号に従って周期性に変化するということである(テトラド効果)²⁾。二成分希土類混合試料の分離能は簡易法によると、近似計算値をFig. 1によるになると推測される。Fig. 1からEu-Gd以外の混合試料の近似計算値と測定値は良く一致している。Eu-Gdの混合試料を除いて計算すると平均偏差は13%であった。

成分数と成分比の希土類分離能への影響を調べるためLaを多量成分、他の13種等モル希土類を微量成分とする14種希土類混合試料について成分比を変化させて実験を行った。LaとCeの実効移動度の差が一番小さいので、ここで特にLaとCeの分離を注目して検討した。

とCeの実効移動度の差が一番小さいので、ここで特にLaとCeの分離を注目して検討した。Fig. 2に14種希土類を全て混合した試料について分離能の試料成分比への依存を示した。Fig. 2から試料成分比の増加に従って分離能が減少している事が分かる。徐々に成分比の影響が小さくなって、分離能は限界値に近づいた。Fig. 2に示した分離能(試料総量)から計算した混合試料中でのLaとCeの分離能をFig. 3に示した(曲線No. 2)。興味深いのは試料成分比の増加に従って、14種希土類の混合試料中でのLaとCeの分離能も増加した事である。Fig. 3にLa、Ceと共存する12種希土類カチオンの総量を示した。La、Ceの分離能は他の共存成分の割合の減少に伴って増加していると考えられる。一方、Laを多量成分とするCeとの二成分混合試料の分離能もFig. 3に示した。二成分混合試料の場合、分離能は成分比の影響を受けなかったことが分かる。

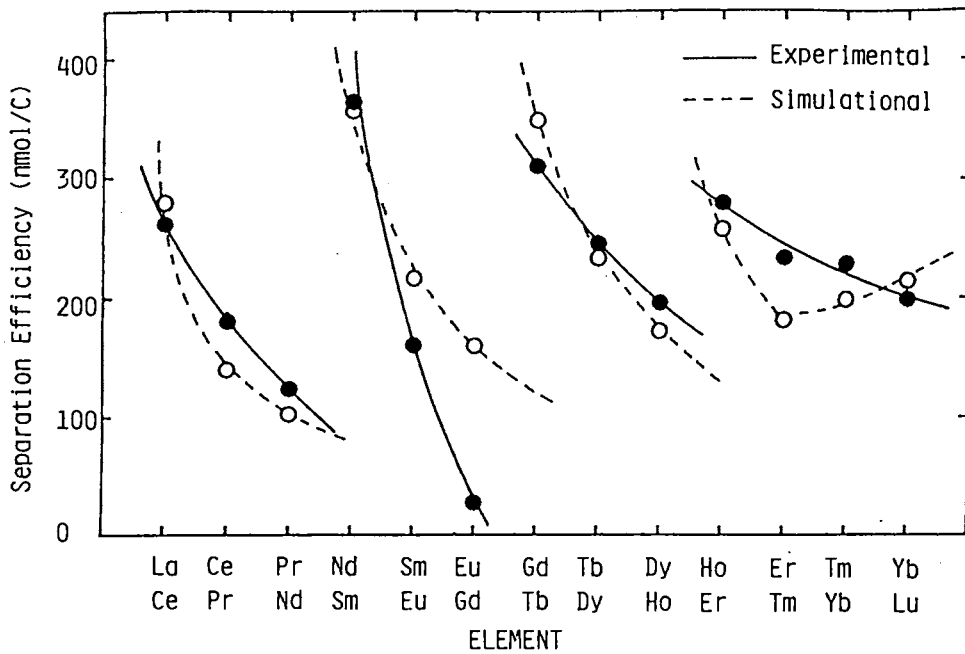


Fig.1 Experimental (solid lines) and simulational (dashed lines) separation efficiencies of binary mixtures of neighbouring rare earth ions.

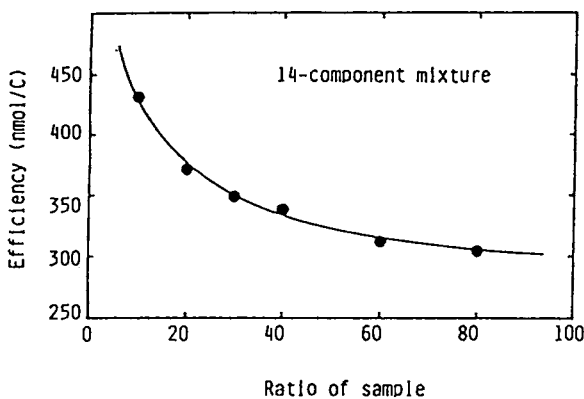


Fig. 2. Dependence of separation efficiency on the ratio of the sample components.

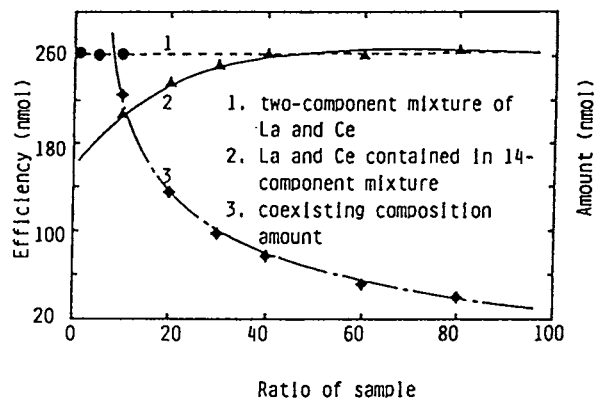


Fig. 3. Dependence of the efficiency of separation of La and Ce on the amount of coexisting component.

文献:

1. T. Hirokawa, J. Hu, S. Eguchi, F. Nishiyama and Y. Kiso, *J. Chromatogr.*, 538(1991)413.
2. J. Hu, T. Hirokawa, F. Nishiyama and Y. Kiso, *J. Chromatogr.*, in press(1991).

7

等速電気泳動法におけるアニオン・カチオン同時分析系の解析 (広島大工) ○渡辺和彦、広川健、木曾義之

STUDY OF BIDIRECTIONAL ISOTACHOPHORETIC SEPARATION,
K. Watanabe, T. Hirokawa and Y. Kiso
Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,
Hiroshima Univ., Kagamiyama 1, Higashi-Hiroshima 724 Japan

ABSTRACT - Bidirectional isotachophoretic phenomenon happened when leading and terminating electrolytes were selected appropriately. Using the scanning ultraviolet photometric detection system, the separation behavior was studied in order to confirm the bidirectional isotachopheresis.

1. 通常使用されている等速電気泳動の電解液系ではアニオンまたはカチオンのどちらかの成分が等速電気泳動する。しかしリーディング電解液とターミナル電解液をうまく選択し、適当に組み合わせることによって双方向の等速電気泳動現象が起こり、適当な検出法を適用すればある試料中のアニオン、カチオン両成分の同時分析が可能である。また高レベル再処理廃液のようにアニオン、カチオン、中性成分を含む試料を効率よく分離・分取するには双方向等速電気泳動法(双方向IP法)の使用が不可欠である(詳細は講演5の要旨を参照)。今回、モデル試料としてアニオン、カチオン染料を用い両方向への泳動状態を追跡し界面速度を解析して、等速電気泳動平衡が成立しているかどうか検討したので報告する。

2. 双方向IP法での電解液系の模式図をFig.1に示した。図では電解液1にKOHとカプロン酸を、電解液2にHClとβ-アラニンを用いている。通電後、カチオン分析のリーディング(L⁺)としてはK⁺、ターミナル(T⁺)としてはβ-アラニンが相当し、この間をカチオン性試料イオンが泳動する。逆にアニオン分析のリーディング(L⁻)にはCl⁻が、ターミナル(T⁻)にはカプロン酸が相当しこの間をアニオン性試料イオンが泳動する。ここで両方向に進むターミナルイオンは逆方向でのバッファーにもなることがわかる。そのためこれら各イオンの実効移動度、pKaを考慮して電解液系を選択する必要がある。

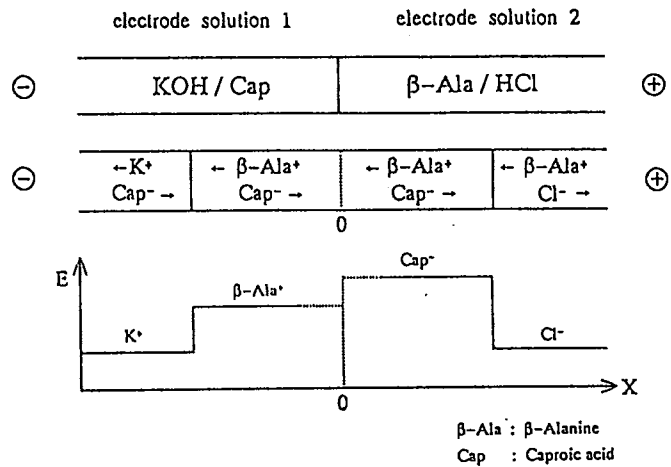


Fig.1 Bidirectional isotachopheresis の模式図

今回、使用した電解液系はTable.1のA、Bの系である。電解液Aは5 mM KOHをpH 4.8(カプロン酸)に調整し、電解液Bは5 mM HClをpH 3.6(β-アラニン)に調整し、Fig.1の模式図と同じ系で行った。また電解液A、Bともに粘性剤として0.1 wt%のヒドロキシプロピルセルロース(HPC)を添加した。

モデル試料にはアニオン成分としてSPADNS(S)、ピクリン酸(P)、モノクロ酢酸(M)を、カチオン成分にはトルイジンブルー(TB)、アストラゾンピンク

(AP)、トリス(T)を使用した。

電位勾配検出器(PGD)を用いた測定には島津1P-2Aを、分離過程の測定には走査型UV検出装置を用いた。後者は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¹⁾。分離用細管には石英チューブ(0.66mm O.D. x 0.53mm I.D.)を使用した。走査距離は320mmで1走査に要する時間は12秒で、この間5333個のデータを取り込む。UV光源に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。

3. Fig. 2 に分離管の中央から泳動させたAPとPのUVフェログラムを示した。また、Fig. 3 にそのときにPGで得られたフェログラムを示した。75nmolのAPと25nmolのPを分離管中央までターミナル液で送液後泳動させると、APは-電極側へ、Pは+電極側へ等速電気泳動のゾーンを形成し泳動していくことがわかる。またPGフェログラムにおいてもFig. 1の原理図と同じような結果となった。

実際に双方向IP挙動を行っているかを実証するためにTable. 1の電解液C、Dを用いて比較実験を行った。電解液C、Dは通常のIP法で用いる系である。これらの系(電解液A、B、C、D)で試料の界面速度を測定し比較した。試料はアニオンとして各20nmol S、M、P3成分、カチオンには各20nmol TB、T、AP3成分を用いた。その結果、アニオン成分の界面速度は約2%、カチオンについては約5%の誤差でほぼ一致した。また分離時間、試料のゾーン長についてもほぼ一致した値を得た。このことから電解液AとBを用いることによって双方向に対する等速電気泳動平衡が成立していることが確認された。

以上挙げた電解液系その他、緩衝剤を適切に選びさえすれば広範囲のpH領域で双方向IP分析を行う事が可能である。なお、応用として2次元電気泳動装置を用いたモデル試料、及びSW-11中のアニオン、カチオン、そして中性成分の分離、分取を行った結果も報告する予定である。

Table. 1 使用した電解液系

系	リーディング電解液	ターミナル電解液
A	KOH/Cap (pH4.8)	HCl/ β -Ala
B	HCl/ β -Ala (pH3.6)	Cap/KOH
C	KOH/Cap (pH4.8)	HCl
D	HCl/ β -Ala (pH3.6)	Cap

HCl:5mM KOH:5mM β -Ala:10mM Cap:10mM
HPC:0.1wt% (A, B, C, D)

A、Bの系は双方向IPで使用する電解液系
C、Dの系は通常のIPで使用する電解液系

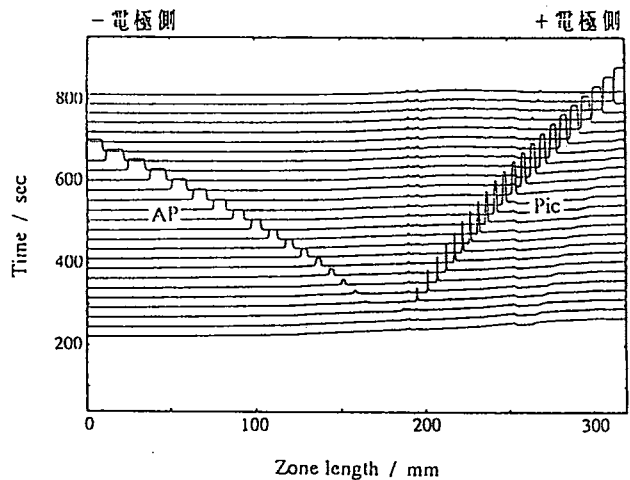


Fig. 2 Bidirectional isotachopheresis によるアストラゾンピンクとピクリン酸の実測フェログラム

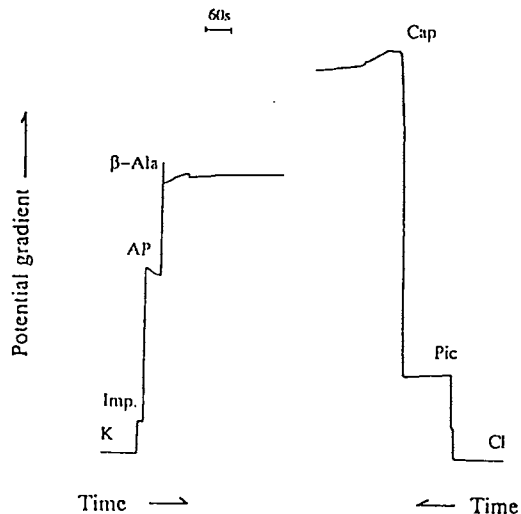


Fig. 3 Bidirectional isotachopheresis によるPGフェログラム

1) T. Hirokawa, Y. Yokota and Y. Kiso, J. Chromatogr., 538(1991)403-411.

ANALYSIS OF MINOR COMPONENTS BY MEANS OF ON-LINE IP-CZE
METHOD

AKIHIRO OMORI, TAKESHI HIROKAWA and YOSHIYUKI KISO

applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,

Hiroshima Univ., Kagamiyamal, Higashi-hiroshima 724 Japan

ABSTRACT - On-line combination of isotachopheresis(IP) and capillary zone electrophoresis(CZE) equipped with a dropwise fractionating device was studied. Isotachopheretic preseparation was effective in the subsequent CZE separation and fractionation. It was shown that this method was effective in fractionation of large amount of sample without mixing of neighboring zones.

1. 従来、本研究室では等速電気泳動法(I P法)により希土類イオン等の分離・分析・分取を行ってきた¹⁾²⁾。I P法では、試料は濃縮され実効移動度の順に並び、各ゾーンは連続である。分取に際して電流効率が良く無駄なフラクションがでない反面、分取する際に隣あったゾーンの混合を防ぐことはできない。

一方ゾーン電気泳動法(C Z E法)では試料ゾーンは不連続であり、先の問題は回避できるものと考えられるが、ある程度の量の試料を分取するには、太いキャピラリを用いて分離管の体積を増やす必要がある。この場合、試料は泳動に際して拡散する一方であり、試料を大量に分取することはできない。この点を解決するためI P法をC Z E法の前処理に用い、濃縮効果によりゾーンの拡散を最小限に抑える電気泳動法を試みた(I P - C Z E法)。

2. 試作した装置の概略図をFig. 1に示した。本装置は、I P、C Z E、分取の3ステージから構成されている。リーディング電解液(L)とターミナル電解液(T)の間にマイクロシリンジを用いて試料を注入し、E 1、E 2間に定電流を印加する(キャピラリ内径0.5mm、I Pステージ)。試料は実効移動度の差により分離され分岐部(内径0.5mm)まで泳動すると、バルブS 1とS 2を切り替え、あらかじめC Z E用の電解液を充填したキャピラリ(内径0.25mm)に流路を変更し、E 3、E 4間に定電圧を印加する(C Z Eステージ)。次に試料は分取部まで達すると、シリンジポンプから圧送された支持電解質のカウンターフローにより液滴として分取される(分取ステージ)。

3. 試料としてS P A D N S (S)、ピクリン酸(P)、2,4-ジヒドロキシ安息香酸(D)を選び、その等量混合物をモデル試料とした。Fig. 2にI Pステージの実測フェログラムを示す。リーディング電解液(L)は10 mM塩酸で、pH 3.5にβ-アラニンで調整し、ターミナル電解液(T)は10 mMコハク酸でpH 3.9(β-アラニン)とした。L、Tともに電気浸透流を防ぐためにH P C (0.1 wt%)を添加した。ここでTは、続くC Z Eステージの支持電解質と同じである。検出波長は470 nm、泳動電流100 μA、試料総量は20 nmolである。図から、各試料ゾーンは連続で鋭い界面を形成しているのがわかる。

次に、分取した各フラクションをC Z E法(C E 8 0 0; 日本分光、キャピラリ I. D.

0.05mm×30cm、 $\lambda = 210\text{ nm}$) で分析し、各フラクションごとの試料量を求めたものをFig. 3に示す。分取スピードは1フラクション/30秒で、1フラクションは $6.4\ \mu\text{l}$ である。このときの支持電解質は、分取時の条件と同じで、10 mMコハク酸pH3.9 (β -アラニン)、0.1 wt% HPCである。図から、IPにより分離された試料がCZEステージに移り、不連続ゾーンとなり、隣接するゾーンが混合することなく分取できている様子がわかる。また試料の拡散は十分抑えることができしており、IPの濃縮作用が効いていることもわかる。

なお回収率に関しては現在検討中であるが、IPステージとCZEステージの細管接続にデッドスペースは無いため、100%近いことが予想される。講演では実試料に対する適用例についても報告する予定である。

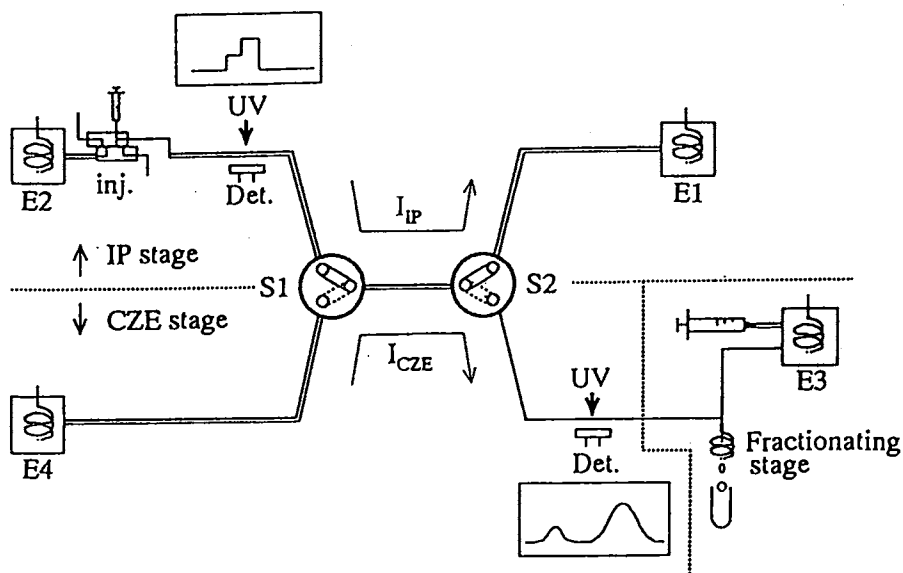


Fig. 1 Diagram of on-line IP-CZE apparatus equipped with a dropwise fractionating device

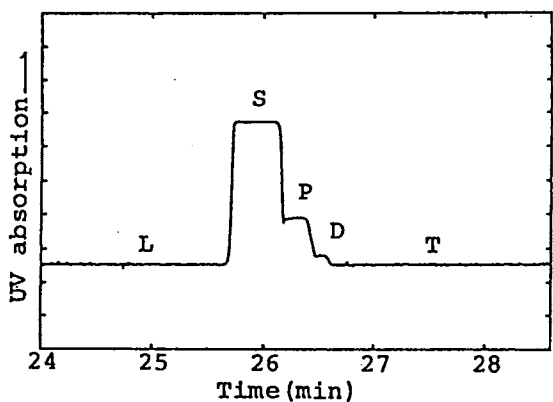


Fig. 2 Isotachopherogram of S, P, and D.

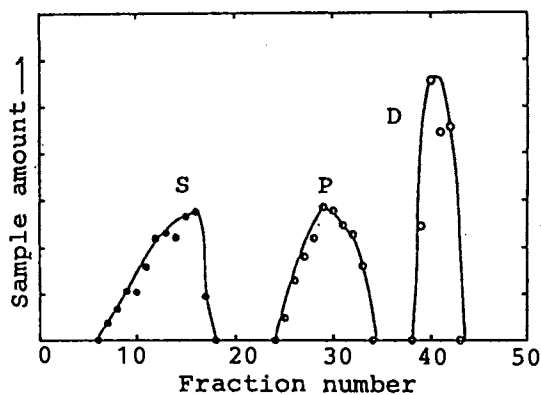


Fig. 3 Sample amount vs. fraction number

文献

- 1) T. Hirokawa, J. Hu, S. Eguchi, F. Nishiyama and Y. Kiso, *J. Chromatogr.*, **538**(1991)413.
- 2) J. Hu, T. Hirokawa, F. Nishiyama and Y. Kiso, *J. Chromatogr.*, in press(1991).

9

キャピラリー電気泳動法の医薬品
分析への応用 (第3報)
オウレン、オウバク中のアルカロ
イドの分析

(徳島文理大・薬) ○石井信之、中根徳人、赤田良信

APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS TO PHARMACEUTICAL ANALYSIS(III).
DETERMINATION OF ALKALOIDS IN COPTIS RHIZOME AND PHELLODENDRON BARK
Nobuyuki ISHI, Norihito NAKANE and Yoshinobu AKADA

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

Simultaneous determination of major alkaloids (berberine, palmatine and coptisine) in Coptis Rhizome and Phellodendron Bark were investigated by capillary electrophoresis. Free zone capillary electrophoresis with phosphate buffer at pH5.0 gave complete separation of three alkaloids within 15 min. Sample solution was introduced by hydrostatic method, and the on-column detection was performed at 214 nm. The calibration lines of each alkaloids gave good linearities over the concentration range 10-100 ug/ml. Berberine, palmatine and coptisine in various crude drug decoctions was determined with good reproducibility.

【はじめに】

漢方薬は、多くの類似成分を含む複雑なマトリックスを持つため、成分含量を中心とした理化学的な品質評価を行うためには、多岐にわたる含有成分を完全に分離する高分離能を有する分析法が要求される。一方、キャピラリー電気泳動法 (CZE, Capillary Zone Electrophoresis) は、高い分離能を持つ分離分析法として知られており、特にフリーゾーンで泳動させた場合、分析対象物質をイオン性物質に限定することができ、選択性の高い分析法と考えられる。しかし、本法による漢方薬の品質評価についてはあまり報告されていない。演者らは、従来より種々の生薬及び漢方方剤について HPLC を用いる品質評価について検討しているが、今回、CZE による生薬含有成分の分析への適用について検討した。分析対象生薬としては、多くの漢方方剤に処方されている代表的な生薬であるオウレン及びオウバクをとりあげ、その主要なアルカロイドであるコプトシン、ベルベリン及びパルマチンの同時分析について検討した。また、市販製剤中のベルベリンの定量にも本法を適用したので併せて報告する。

【実験】

装置は、Waters Quanta 4000 System を用い、分離用キャピラリーは、75 μm \times 60 cm (有効長 55cm) のウオーターズ製アキュセップキャピラリーを使用した。検出は、装置に内蔵の紫外吸収検出器を用い、オンカラム検出法により行い、214 nm を検出波長とした。緩衝液は、pH 5.0 に調製した 50 mM のリン酸緩衝液を使用した。また、泳動電圧

は、10.00 KVとした。標準溶液及び試料溶液の注入は、落差法（10 sec.）で行った。標準物質は、いずれも生薬定量用標準品を使用し、その一定量を精密に量り、水に溶かして定溶としたものを標準溶液とした。試料は、産地や市場の異なるオウレン7種、オウバク4種を用い、常法に従い水煎液を調製し、水で定溶とした後、遠心分離して得られた上澄み液を、アルカロイド含量に合わせて水で希釈し、そのまま試料溶液とした。製剤については、市販品3種を用い、粉碎後、その一定量を精密に量り、1% HCl メタノール溶液の一定量を加え、超音波抽出した後、遠心分離して得られた上澄液をそのまま試料溶液とした。

〔結果及び考察〕

分離モードは、前処理を簡略化し、試料液中のカチオン成分のみの分析を目的としているため、フリーゾーンで行った。まず、電解液について、緩衝液の種類、イオン強度、pHの検討を行った結果、pH 5.0 に調製した 50 mM のリン酸緩衝液が、演者らが分析対象とした3種のアルカロイドの分離に最も良いことがわかった。次に、泳動電流について、2 から 18 KV まで検討した結果、10 KV を最適とした。今回分析対象とした3種のアルカロイドは、演者らが設定した分析条件で、コプチシン、ベルベリン、パルマチンの順に完全にベース分離して泳動されることがわかった。標準品及びオウレンとオウバクの水煎液の一定量を注入したときのフェログラムを Fig. 1 に示した。標準溶液中の各アルカロイド濃度と得られたフェログラムのピーク高さの間には、10~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で、いずれも良好な直線関係 ($r=0.999$) が認められた。また、各ピーク高さの再現性は、変動係数が約 1% となり、満足いく精度で定量できることがわかった。演者らが設定した分析条件によるサイクルタイムは、約 15 分であった。つぎに、オウレン及びオウバクの水煎液に、各アルカロイドの一定量を添加し、回収率の検討を行ったが、ほぼ 100% の回収率が得られた。産地や市場の異なるオウレンとオウバク及びベルベリン含有の市販製剤について、本法により定量を行い、HPLC による分析結果と比較したが、両者の間には満足いく一致が認められた。

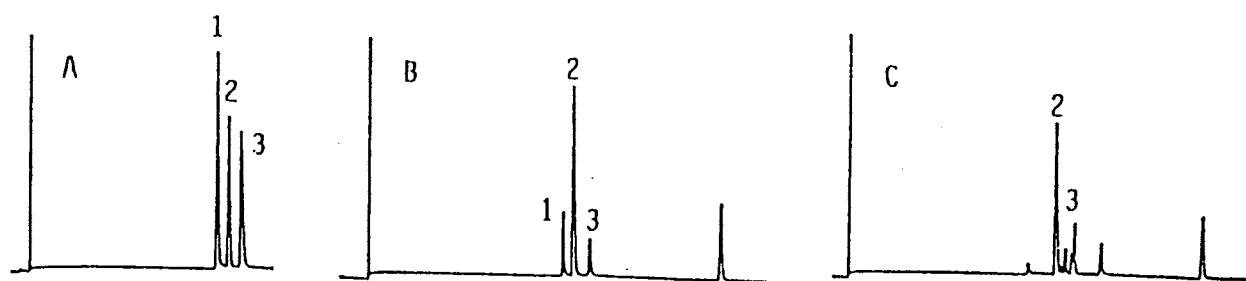


Fig. 1 Typical CZE electropherograms of standards and decoctions

A : standards B : Coptis Rhizome C : Phellodendron Bark
 1 : Coptisine 2 : Berberine 3 : Palmatine

HPCEによる医薬品・生体物質の分析(II)

カネコ ミチコ ナカムラ ヒロシ ナカジマテルミ

(東大・薬) O金子三智子、中村 洋、中嶋暉躬

Analysis of Drugs and Biogenic Substances by HPCE (II)

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Michiko Kaneko, Hiroshi Nakamura, Terumi Nakajima

The separation of prostaglandins (PGs) was investigated by high performance electrophoresis (HPCE). At first, some factors influencing on the separation of nine kinds of PGs (A_1 , B_1 , B_2 , D_2 , E_1 , E_2 , $F_1\alpha$, $F_2\alpha$ and I_2) by capillary zone electrophoresis (CZE) were examined in detail. When PGs were migrated at 30°C in Britton-Robinson buffers with various pHs ranging 3 to 8 using a fused silica capillary, they were best separated at pH 4~5. As to the concentration of the buffer, 40~50 mM was suitable. Among various organic solvents tested, the addition of 7.5% isopropanol to the buffer solution most improved the peak shape without changing the migration order. The application of electrokinetic chromatography to the separation of PGs will be also reported.

【はじめに】

プロスタグランジン類は、生体内に広く分布し、微量でありながら多彩な生理活性作用を有することが知られている。また、それらの構造はプロスタノ酸を基本骨格とし、わずかつ構造の異なる関連物質が数多く存在する。現在、それらの測定法として、RIA法、GC-MS法、HPLC法等が主要なものとして報告されているが、操作が複雑なため生体試料の分析には適してはいない。そこで今回、高分解能、高感度検出能、高速性などの特徴を有する高性能キャピ

ラリー電気泳動(HPCE)をプロスタグランジン類(Fig.1)の分離分析に適用した。まず、HPCEの基本モードであるCapillary Zone Electrophoresis(CZE)を適用した結果について報告する。

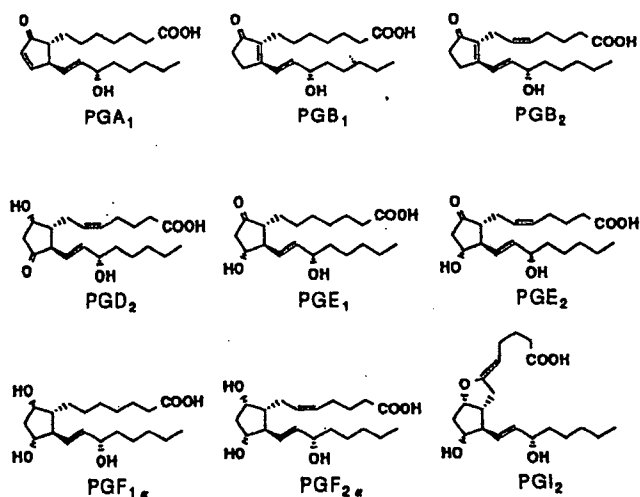


Fig. 1 structures of prostaglandins

【実験】

電気泳動装置には、Applied Biosystems社製の 270A Capillary Electrophoresis Systemを用い、分離用キャピラリーには、内径 $50\mu\text{m}$ 、全長 65.5cm （有効長 43.2cm ）のフューズドシリカ管を用いた。検出は 205nm における紫外吸収で行った。試料のプロスタグランジン類は、シグマ社より購入した A_1 、 B_1 、 B_2 、 D_2 、 E_1 、 E_2 、 $F_{1\alpha}$ 、 $F_{2\alpha}$ 、 I_2 の9種類（ $F_{2\alpha}$ はTris塩、 I_2 はNa塩）であり、 1mM のエタノール溶液として用いた。試料の注入は、バキューム法（ 0.1 秒間）により行ない、およそ 0.3nL に相当する量のサンプルで分析を行った。キャピラリーは 30.0°C の恒温槽内に設置した。

【結果及び考察】

1. pH まず、プロスタグランジン類の分離におけるpHの影響をみるため、Britton - Robison 広域緩衝液を用いてpH $3\sim 8$ の範囲で検討した。その結果、pH $4\sim 5$ において良好な結果が得られた(Fig.2)。

2. 緩衝液 クエン酸、酢酸、リン酸等を用い、pH $4\sim 5$ において種々の緩衝液を検討したところ、Britton - Robinson 緩衝液における分離が最も良かった。

3. 電解質濃度 Britton - Robinson 緩衝液（pH $4\sim 5$ ）において電解質濃度を $0.01\sim 0.05\text{M}$ の範囲で変化させたところ、 $0.04\sim 0.05\text{M}$ 付近において良好な結果を得た。

4. 添加物 Britton - Robinson 緩衝液に、CZE分離能の改善効果があるとされるホウ酸を始め、種々の物質を添加したが、この実験系においては効果が見られなかった。また、液体クロマトグラフィーの場合と同様、有機溶媒（ n -プロパノール、イソプロパノール、 2 -ブタノール、イソブタノール、 3 -ブタノール、THF、グリセロール、エチレングリコールなど）を数パーセント添加し分離の改善を試みた。この実験系においては、 7.5% イソプロパノールの添加により分離能が向上した。

以上、CZEによるプロスタグランジン類の分離を試み、7種類の分離に成功した。今後、シクロデキストリンを用いた包接動電クロマトグラフィーを適用し、検討を進めていく予定である。

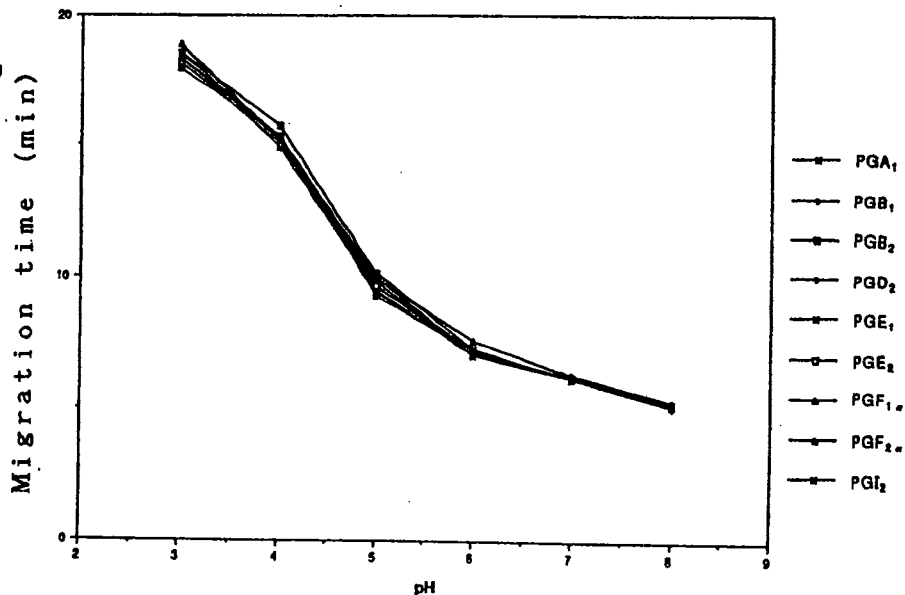


Fig. 2

キャピラリー電気泳動を用いた尿中の陰イオン分析

(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 J. Wildman¹⁾, Peter E. Jackson¹⁾, William R. Jones¹⁾ and Peter G. Alden¹⁾

○水野 隆二²⁾

Analysis of anion constituents of urine by Inorganic Capillary electrophoresis

1) Bill J. Wildman, 1) Peter E. Jackson, 1) William R. Jones and 1) Peter G. Alden

2) Ryuji Mizuno

Inorganic capillary electrophoresis (CIE) is a new separations technology which melds the technique of classical electrophoresis with the separations approach of ion chromatography. Matrices which have been difficult to deal with using ion chromatography have proven amenable to analysis by ICE. The simultaneous analysis of weak acid anions, oxalate and citrate and strong acid anions, chloride, sulfate and nitrate, in addition to phosphate and carbonate in diluted urine was achieved using ICE.

はじめに

尿中の陰イオン、特にシュウ酸、クエン酸の濃度の測定は腎臓結石の研究に重要な因子で有り、これまでにイオンクロマトを利用した分析例が報告されております。イオンクロマト法では塩素イオン、硫酸イオンなど強酸イオンにはイオン交換法、ギ酸イオンや酢酸イオンなど弱酸イオンにはイオン排斥法を用い、同時に分析する場合にはグラジエント法又はイオン交換法とイオン排斥法を組み合わせた方法が用いられて来ました。今回キャピラリー電気泳動を用いて、シュウ酸、クエン酸と同時に塩素イオン、硫酸イオン、リン酸イオンを簡便に高速で分析し満足できる結果を得られましたので報告いたします。

実験

装置：クオンタ4000 CEシステム (ウォーターズ)、データの処理は820 Jワークステーションを用いキャピラリーはアキュセップキャピラリー (クロマトグラフィー、75 μ x 60 cm) を用いました。検出は254 nmに吸収を持つ泳動バッファーを用い吸収にない物質を逆吸収として定量するインダイレクト法で行ないました。

試薬：使用した水は全てミリQ水（ミリポア）を用い、試薬は全て原子吸光用をはじめ高純度試薬を用いました。ナイスパッOMF-B T溶液はウォーターズ製を用いました。

結果

図-1はクロム酸泳動バッファーを用いた代表的な8種の陰イオンを分析したフェログラムです。従来のイオン交換クロマトグラフィーと比較して溶出されるイオンの順が異なったりまた分析時間は3.6分と非常に短時間の分析となっております。

図-2は尿中に含まれると思われる陰イオンにシュウ酸とクエン酸を加えて分析した例です。クエン酸は十分に分離されていますが、シュウ酸と硫酸イオンの分離はあまり良くありませんが、十分定量できる分離をしていると思われます。

図-3は尿を超純水で50倍希釈した分析例で高濃度の塩素イオンと低濃度の硫酸イオンが分析できています。

図-4は試料に2ppmのシュウ酸とクエン酸を添加して分析したフェログラムです。硝酸イオンがシュウ酸イオンの肩になりますが、シュウ酸イオン、クエン酸イオンそれぞれ回収率95%、94%となり満足できる結果となりました。

結論

希釈尿中の塩素、硫酸、硝酸、シュウ酸クエン酸、リン酸、炭酸イオンの分析がキャピラリー電気泳動を用いることにより可能となりました。この分離技法の特長は高速高分解能であり、弱、強陰イオンを同時に分離できることです。

Eight Anion Standard by Inorganic Capillary Electrophoresis (ICE)

ELECTROLYTE: Chromate
 CAPILLARY: 50 μ m x 60 cm
 POTENTIAL: 20 KV
 DETECTOR: UV at 254 nm
 INJECTION: Hydrostatic (60 sec, 10 cm)

1. Bromide 4 ppm
 2. Chloride 2 ppm
 3. Sulfate 4 ppm
 4. Nitrite 4 ppm
 5. Nitrate 4 ppm
 6. Fluoride 1 ppm
 7. Phosphate 4 ppm
 8. Carbonate 4 ppm

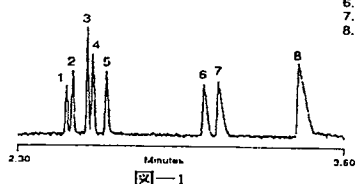


図-1

Weak and Strong Acid Anions by ICE

ELECTROLYTE: Chromate
 CAPILLARY: 50 μ m x 60 cm
 POTENTIAL: 20 KV
 DETECTOR: UV at 254 nm
 INJECTION: Hydrostatic (60 sec, 10 cm)

1. Chloride 2 ppm
 2. Sulfate 4 ppm
 3. Nitrite 4 ppm
 4. Nitrate 2 ppm
 5. Oxalate 2 ppm
 6. Citrate 2 ppm
 7. Phosphate 4 ppm
 8. Carbonate 4 ppm

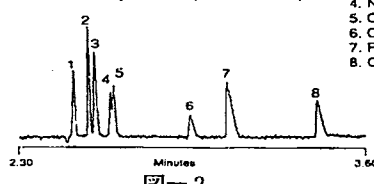


図-2

Close-up View of Urine 1:50 Dilution

ELECTROLYTE: Chromate
 CAPILLARY: 50 μ m x 60 cm
 POTENTIAL: 20 KV
 DETECTOR: UV at 254 nm
 INJECTION: Hydrostatic (60 sec, 10 cm)

Solution concentrations

1. Chloride 109 ppm
 2. Sulfate 7.9 ppm
 3. Nitrate 0.5 ppm
 4. Citrate 3.2 ppm
 5. Phosphate 16.2 ppm
 6. Carbonate 12.2 ppm

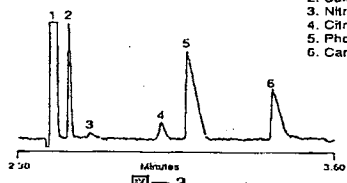


図-3

Diluted Urine (1:50) Spiked with Oxalate and Citrate

ELECTROLYTE: Chromate
 CAPILLARY: 50 μ m x 60 cm
 POTENTIAL: 20 KV
 DETECTOR: UV at 254 nm
 INJECTION: Hydrostatic (60 sec, 10 cm)

Solution Concentrations

1. Chloride 109 ppm
 2. Sulfate 7.9 ppm
 3. Nitrate 0.5 ppm
 4. Oxalate 1.9 ppm
 5. Citrate 4.9 ppm
 6. Phosphate 16.3 ppm
 7. Carbonate 9.3 ppm

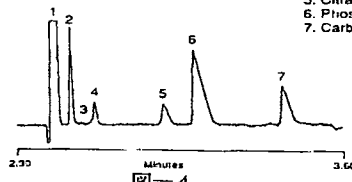


図-4

キャピラリー電気泳動を用いた食品中の有機酸分析

(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⁾
B.F.Kenney¹⁾、W.R.Jones¹⁾、○腹巻ゆかり²⁾

DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS IN FOOD SAMPLES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

¹Waters Chromatography Division, Millipore Corporation and ²Waters Chromatography Division, Nihon Millipore

B.F.Kenney¹⁾、W.R.Jones¹⁾、and Yukari Haramaki²⁾

Capillary electrophoresis and a new separation chemistry were investigated for the organic acids in food samples. Features of this approach include minimal sample preparation, excellent specificity, low cost of operation and application to a variety of food matrices. The method is quantitative, with recoveries in the range 97-103%, and linear over more than one order of magnitude, and the precision is better than 2-14% for real samples. The chemistry, with slight modifications, can be applied to other ions in many types of matrices.

【はじめに】

食品、飲料水中の有機酸を測定することは、発酵過程をモニタリングしていく点、商品の安定性をチェックする点、等の点で大変重要です。

食品中の有機酸を定量する方法は、現在ではエンザイムアッセイ法、HPLCを用いた方法、イオンクロマトグラフィー法、等があります。しかしながら、これらの方法は前処理が複雑であったり、食品中に含まれる他の物質によって分離・検出が妨害されるなど、種々の問題点を抱えています。

本報告では、キャピラリー電気泳動法を用い、迅速に、低コストで再現性よく分離する方法を検討しました。

【実験】

試料および試薬 分析に用いた水は全てミリポア製超純水装置をにより作製したのを用い、移動相、標準物質に用いた試薬はシグマ社のものを用いました。尚、移動相に用いたナイスパックはウォーターズ製を用いました。試料は、一般市販品を水で希釈し、0.45 μ のフィルターで濾過し、内部標準として酪酸を用いました。装置および分析条件 HPCE装置としてはウォーターズ・クオンタ4000CEシステムを、インテグレートはウォーターズ・820Jワークステーションを用いました。分離用キャピラリーには、内径75 μ m、全長100cmのヒューズドシリカ管を用い、インダイレクト法にて254nmで検出しました。泳動バッファーには、5mMフタル酸ナトリウムを含む0.5mMナイスパックOFM BT溶液(pH7.0)を用いました。泳動電圧は20KV分離しました。キャピラリーは分析のたびに泳動バッファーにて洗浄しました。

【結果及び考察】

分離 Fig. 1 にクエン酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸、酢酸、乳酸、酪酸の分離を示しました。分離の再現性を確認するために、Table 1 に泳動時間の再現性を示しました。Table 1 に示すように内部標準を用いて分析すると異なる日に異なる泳動バッファーを用いて分析しても、標準偏差値は1%以下と非常に良好な値を示しました。

更に、定量精度を確認するため10-167 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で濃度と面積値あるいは高さ値との直線性を検討しました結果、各相関係数は面積値で0.999,高さ値で0.962と良好でした。又、感度の面では1 $\mu\text{l/ml}$ でS/Nが3でした。**実際の試料** 実際の試料のフェログラムをFig 2、3に示します。特別な前処理をしなくても良好な分離が得られています。**回収率** 回収率をチェックするためにグレープフルーツジュースを用い今回、酒石酸とリンゴ酸との回収率を2段階にてチェックしました。Table 2 に示すように平均で103%, 97%と非常に良好でした。

以上よりナイスバックを用いたキャピラリー電気泳動法では、食品や飲料水中の有機酸を簡便かつ迅速に測定でき、しかも精度自動化、応用性において優れた方法であるため、今後広く使用されていくと考えられます。

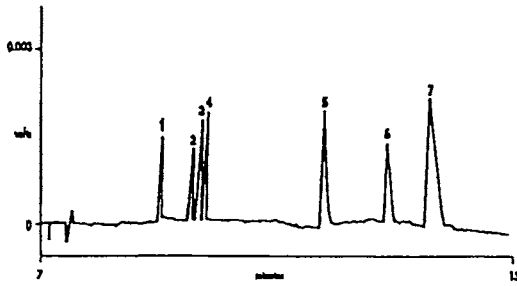


Fig.1 有機酸スタンダードのフェログラム
1.クエン酸 2.酒石酸 3.リンゴ酸 4.コハク酸 5.酢酸 6.乳酸(各20 $\mu\text{g/ml}$) 7.酪酸(内部標準物質 50 $\mu\text{g/ml}$)

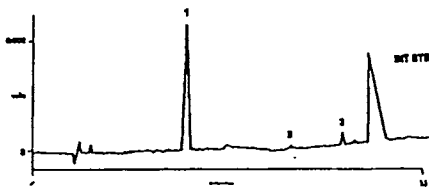


Fig.2 リンゴジュース中の有機酸のフェログラム
1.リンゴ酸 4352 $\mu\text{g/ml}$ 2.酢酸 48 $\mu\text{g/ml}$ 3.乳酸 254 $\mu\text{g/ml}$ INT STD 内部標準物質

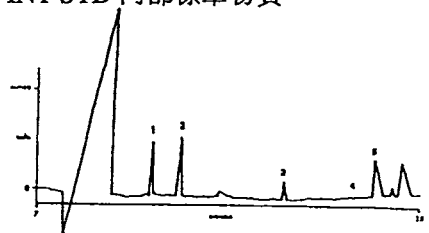


Fig.3 醤油中の有機酸のフェログラム
1.クエン酸 2.酒石酸 3.酢酸 4.乳酸 5.酪酸
酪酸の後の大きなピークはCl⁻と同一

Table 1 泳動時間の再現性

分析対象物	I.Sなし	I.S添加
方法1		
クエン酸	0.5	0.3
コハク酸	0.2	0.3
乳酸	0.1	0.1
方法2		
クエン酸	3.1	0.8
コハク酸	3.2	0.6
乳酸	3.6	0.1

方法1 同一日に同一バッファーにて分析(n=10)

方法2 5日間異なるバッファーで分析(n=5)

Table 2

ジュースからの有機酸の回収率

分析対象物	添加量 ($\mu\text{g/ml}$)	検出量 ($\mu\text{g/ml}$)	回収率 (%)
酒石酸	0	4330	-
	1160	5525	103
	2319	6703	102
リンゴ酸	0	3867	-
	1289	5153	100
	2577	6283	94

キャピラリー電気泳動による水酸化サリチル酸の分析—ヒドロキシルラジカル検出への応用

(川崎医大・法医¹、同・生化学センター²) ○富田正文¹⁾、
奥山敏子¹⁾、渡辺弘子²⁾

ANALYSIS OF THE HYDROXY SALICYLIC ACIDS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS:
APPLICATION TO THE DETERMINATION OF HYDROXYL RADICAL

¹Department of Legal Medicine and ²Biochemical Research Center, Kawasaki
Medical School

Masafumi TOMITA¹⁾, Toshiko OKUYAMA¹⁾, and Hiroko WATANABE²⁾

We have developed a sensitive assay method for determining the hydroxy salicylic acids by micellar electrokinetic chromatography with 100 mM SDS. The major products by Fenton reagents were 2,3- and 2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB). We compared our method with the DMPO spin trapping technique using ESR. With this method, we also investigated the role of $\cdot\text{OH}$ on the paraquat poisoning that has been considered to be dependent on the active oxygen radical reactions.

【はじめに】

スーパーオキシドなど活性酸素の役割については未だほとんど明らかにされていない。なかでもヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)については1) 活性酸素の中で反応性が最も高いこと2) 極微量の遷移金属イオンの存在下でスーパーオキシドからの生成機構が知られていることから特に注目されてきた。 $\cdot\text{OH}$ はサリチル酸と反応してOH-サリチル酸を生成する。われわれは、SDS存在下キャピラリー電気泳動によってこれらの化合物を分析し、スピントラップ法を用いたESRによる $\cdot\text{OH}$ 定量値と比較検討した。また本法によってパラコート中毒における $\cdot\text{OH}$ の役割についても若干の考察を加えた。

【方法】

サリチル酸、OH-サリチル酸(2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-dihydroxybenzoic acid; DHB)およびカテコールの分析はSDS存在下キャピラリー電気泳動で行った。分離用キャピラリーは内径 50 μm 、全長72 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210 nmにおける紫外部吸収を測定した。試験管内での $\cdot\text{OH}$ 生成は、 H_2O_2 と Fe^{2+} によるフェントン反応によった。すなわち H_2O_2 (80 μM)、 FeSO_4 (10-1000 μM)を含む水溶液にサリチル酸(0.5 mM)を加えて(total 1.0 mL)37°Cで5分反応後、塩酸酸性下エチルエーテルで抽出、 N_2 下で乾固したのち蒸留水0.2 mLに溶かしサンプルとした。一方、ESRによる観察は、サリチル酸の代わりに5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO; 100 mM)を加えスピントラップ法で検討した。DMPO-OH濃度は、そのピーク面積を測定して濃度既知の4-hydroxy-TMPOから計算して求めた。

一方、キサンチンオキシダーゼ-ヒポキサンチン(XO-HPX)および肝ミクロゾーム(ms)-NADPHの活性酸素発生系にサリチル酸およびパラコートを加え、 $\cdot\text{OH}$ 生成へのパラコートの影響について検討した。

【結果および考察】

100 mM SDS存在下においてサリチル酸、そのOH誘導体およびカテコールの分析条件を検討した結果、20mM phosphate-borate (pH 7.7)において最も良好な分離を示し、25 min以内にこれら化合物の分析が可能であった (Fig. 1)。ピーク面積およびピーク移動時間について繰り返し精度を検討した結果、それぞれCV=1.2-2.3%, 1.1-1.9%の再現性が得られた。塩酸酸性下エチルエーテル抽出による回収率は各化合物において86%(2,3-), 94%(2,4-), 89%(2,5-), 61%(2,6-), 51%(カテコール)であり、とくに2,3-および2,5-DHBについては、検量線はともに50 μM まで直線性を示し($r=0.99842$; 2,3- ; $r=0.99891$; 2,5-)、検出限界はともに0.1 nmol/mLであった。過酸化水素、 FeSO_4 およびサリチル酸の反応の結果、4種OH誘導体及びカテコールが検出された。その割合は2,3->2,5->カテコール>2,4-~2,6-DHBであり、生成される化合物の83.0-100%が2,3-および2,5-DHBであった。つぎに2,3-および2,5-DHBのピーク面積和で得られる $\cdot\text{OH}$ 定量値をESRによるDMPOスピントラップ法での値と比較検討した (Fig. 2)。その結果、 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+} > 1$ での $\cdot\text{OH}$ 定量値はほぼ同程度であったが、 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+} \leq 1$ の条件では本法による $\cdot\text{OH}$ 定量が有意に高値を示した。すなわちESR法では200 μM FeSO_4 にピークを持つブロードな濃度パターンを示し、高濃度 Fe^{2+} によるDMPO-OHの分解が観察されたが、本法でのDHBピーク面積は H_2O_2 一定(80 μM)条件下1000 μM FeSO_4 まで増加を示した。Mannitol, Ethanol, Thioureaなどの $\cdot\text{OH}$ scavenger(10 mM)およびDesferal(2 mM)では、85.0-100%の2,3- 2,5-DHB生成阻害が認められた。

つぎに本法を用いてXO-HPX系およびms-NADPH系についてDHB生成に対するパラコートの影響を検討した結果、両系ともに2,3- 2,5-DHBの有意な増加が認められ、in vitroでのパラコートを介した活性酸素の生成が明きらかであった。

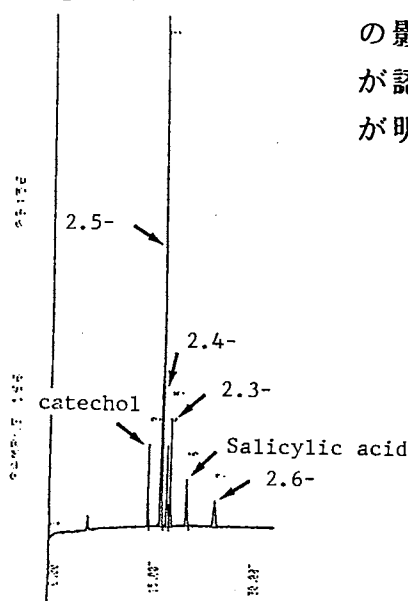


Fig.1 Separation of DHBs, salicylic acid and catechol at pH 7.7.

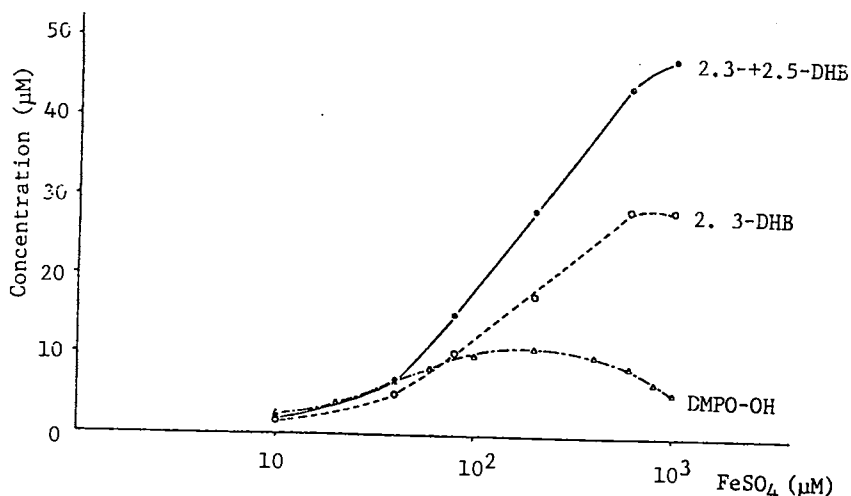


Fig.2 Effect of Fe^{2+} on the 2,3-, 2,5- and DMPO-spin adduct levels.

オンカラム2検出器を用いる キャピラリー電気泳動における バンド広がりの評価 III

京都大学工学部 ○柴田 理
姫路工業大学理学部 寺部 茂

Evaluation of Band Broadening in Capillary Electrophoresis
with On-Column Twin Detectors III

Faculty of Engineering, Kyoto University

Osamu Shibata

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Shigeru Terabe

The purpose of this study is to develop a method for precise evaluation of band broadening in capillary electrophoresis. In the on-column twin detectors system, back-and-forth electrophoresis lets zones make a round trip between the twin detectors placed at distant positions on the capillary. The system is capable of eliminating extracolumn effects and discriminating between reversible and irreversible band-broadening mechanisms. In this paper, data of ions and polymer ions will be reported.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動におけるバンド広がりの原因のうちで、微視的不均一性のみが可逆な原因である。本報の装置（オンカラム2検出器）を用いればこの可逆な原因による広がりを他の不可逆な原因による広がりとは分離することができる。今回は、いくつかのイオンとポリマーイオンについての実験を行った。

2. 理論

オンカラム2検出器の装置をFig.1に示す。試料はキャピラリーの左端に注入され右へと移動していき、検出器1で検出され、ついで検出器2で検出される。この後で電極の極性を切り替えるとサンプルは右から左へと移動し、検出器2、検出器1の順で検出される。

ここでバンドひろがりについて分散 V で考える。ピークの検出順にそれぞれの分散を V_1, V_2, V_3, V_4 とすると、分散の加成性から

$$V_1 = V_{ec} + V_{c1} \quad (1)$$

$$V_2 = V_{ec} + V_{c2} \quad (2)$$

V_{ec} はカラム外効果、 V_{c1} 及び V_{c2} は、それぞれのピークのキャピラリー内での分散の増分である。(1)と(2)から

$$V_2 - V_1 = V_{c2} - V_{c1} = V_{c(2-1)} \quad (3)$$

$V_{c(2-1)}$ はピーク1が検出されてからピーク2が検出されるまでの分散の増分である。同様の関係が V_3 と V_4 にもあてはまる。

$$V_4 - V_3 = V_{c4} - V_{c3} = V_{c(4-3)} \quad (4)$$

バンド広がりが不可逆な原因のみによるのなら $V_{c(2-1)}$ と $V_{c(4-3)}$ は等しくなる。可逆、

不可逆の両方の原因があるのなら、 V_{rc} を可逆、 V_{ic} を不可逆な原因による分散とすれば、

$$V_c = V_{rc} + V_{ic} \quad (5)$$

が成立するので、次の式が得られる。

$$V_{c(2-1)} = V_{rc(2-1)} + V_{ic(2-1)} \quad (6)$$

$$V_{c(4-3)} = V_{rc(4-3)} + V_{ic(4-3)} \quad (7)$$

試料の動く向きに関わらず検出器1と検出器2の距離は一定だから、移動速度が変わらなければ、

$$V_{rc(2-1)} = -V_{rc(4-3)} \quad (8)$$

$$V_{ic(2-1)} = V_{ic(4-3)} \quad (9)$$

$V_{rc(4-3)}$ に負号がついているのは、この項は $V_{c(4-3)}$ を小さくするからである。以上より

$$V_{ic(2-1)} = (V_2 + V_4 - V_1 - V_3) / 2 \quad (10)$$

$$V_{rc(2-1)} = (V_2 + V_3 - V_1 - V_4) / 2 \quad (11)$$

この式によって $V_{ic(2-1)}$ と $V_{rc(2-1)}$ を求めた後、拡散の式にならって、この値を検出器間の移動時間で割ったものをそれぞれ擬拡散係数 D_i 、 D_r とする。

3. 結果と考察

Table 1 は印加電圧20 kV、キャピラリー長1000 mm (200-400-400)、の条件で緩衝液成分を変えて行った塩化

ピリジニウムの実験データである。塩化ピリジニウムはカチオンである。このTableからわかるように、緩衝液成分をかえると D_i 値、 D_r 値ともに変化がみられる。この原因としては次のようなことが考えられる。定電圧で実験を行っているので、各条件間で電流値が異なっており、このためキャピラリー内部の温度が異なっていること、また成分が異なる

ために粘度が異なっていることである。粘度の上昇は D_i 、 D_r の両方を小さくし、温度の上昇は分子拡散を大きくするので、 D_i を大きくする。これらの要因のかねあいでこの様な結果がでたと思われる。

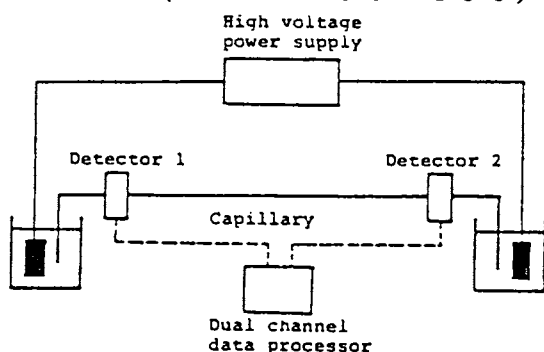


Fig.1 オンカラム2検出器装置概略図

Table 1 塩化ピリジニウムの擬拡散係数の平均値とCV値

	(回数)	D_i (CV)	D_r (CV)	I
ホウ酸-ホウ酸ナトリウム	(5)	1.63 (20)	0.42 (17)	17-18
ホウ酸-テトラエチルアンモニウムヒトキシト	(2)	1.50 (0)	0.40 (29)	11-12
ホウ酸-テトラブチルアンモニウムヒトキシト	(4)	1.02 (29)	0.18 (55)	9-10

($D / 10^{-3} \text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ $I / \mu \text{A}$)

15

キャピラリー電気泳動における高感度分析

— 185 nmを用いた検出についての開発

(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⁾)

B. Karol¹⁾ ○酒井 恒行²⁾

ULTRA UV DETECTION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

¹Waters Chromatography Div. Millipore Corp. and ²Waters Chromatography Div. Nihon Millipore

¹B.Karol and ²Tsuneyuki Sakai

One of the most important issues facing the technology of Capillary Electrophoresis is sensitivity. In general, LC is a more sensitive technique than CE. One of the major differences between the two techniques is the detector pathlength. In LC, the detector pathlength is generally 5 and 10mm. However, in CE the pathlength of the detector flow cell equals the inside diameter of the capillary. Thus, at 50-100 μ m, the detector pathlength is about 100times less than that in LC. Because absorbance is related to pathlength in a linear fashion, sensitivity can suffer greatly.

In order to compensate for this difference, we have developed a detector that is capable of performing very low UV absorbance detection.

要約

キャピラリー電気泳動が抱えている重要な問題の一つとして感度があります。一般的にHPLCの方がCEより感度は高いといえます。たとえば検出器の光路長の違いを例にあげてみます。HPLCでは1cmが標準ですし CEではキャピラリーの内径 50-100 μ mがそのままセルとして使用できます。単純に光路長の比較だけですとHPLCが約100倍長いといえます。そのためにキャピラリー電気泳動では感度を上げなければなりません。我々は低波長における吸収を検出できるようなシステムを開発いたしました。つまり185nmにおける吸光度を取れるシステムです。

装置

波長を選択できる固定波長タイプの検出器が装備されているクオンタ4000 CEシステム (ウォーターズ) を用いました。この装置で用いられている低圧水銀ランプは185 nmに強い輝線を持ちますのでこれを用いることができるよう185nm用フィルターを製作いたしました。さらにこの装置では光源と検出セルの距離が非常に短くなっていますので空気中の酸素等の吸収が問題になりません。

一般的に化合物は波長が短くなればなるほど吸収が増加します。たとえば蛋白質やペプチドの場合214 nmと比較して185 nmの吸収は5-10倍強くなります。いままでの概念では185 nmにすれば確かにピークはたかくなるけれどもノイズも多くな

る というものでした。しかしながら この装置のユニークなデザインを用いることによりノイズを極力おさえ、ピーク高さ、面積を増加させることができるようになりました。つまり検出感度を上げることができるようになりました。

実験

1) 214nmと185nmの検出の比較を試料、アンジオテンシン1 ($1 \mu\text{g/ml}$) で用いました。214nmと185nmのノイズレベルをほぼ同等とした場合185nmの検出の方が約6倍ピークが高くなりました。つまり感度は今回の場合6倍といえます。

2) 図1のフェログラムはペプターペプチドの不純物定量の例です。主成分の濃度は 1mg/ml で 不純物の濃度レベルは $1 \mu\text{g/ml}$ です。214nmでの検出限界は $1 \mu\text{g/ml}$ ですからピーク1、2、4はおよそ $1 \mu\text{g/ml}$ と思われますが定量できるレベルとは思えません。

185nmのフェログラムでは十分に不純物の定量が可能です。

図3) 図2のフェログラムは7種類のペニシリン誘導体の分離例です。全ての化合物がおおよそ6倍の感度で検出されているのがわかります。

結論

キャピラリー電気泳動を使用するとき185nmは感度を上げることに極めて有効でありペプチド/蛋白質では185nm検出において5-10倍214nmと比較して感度が上昇しました。また有機物では2-10倍感度が上昇しました。

図1

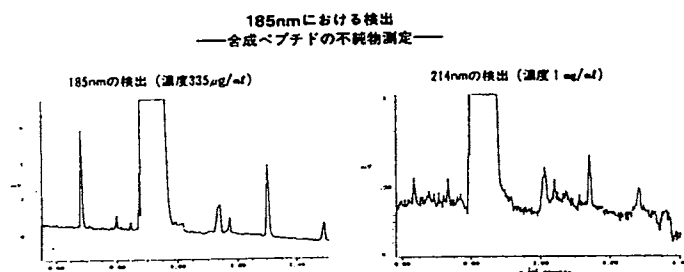
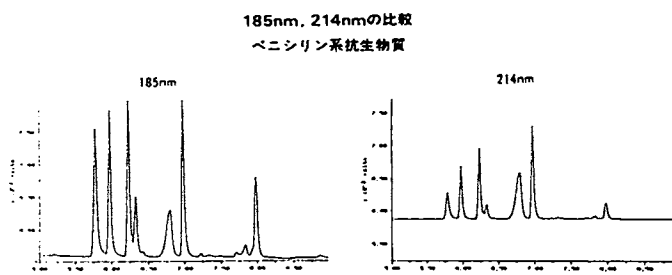


図2



キャピラリー電気泳動を用いた高感度分析のためのオンライン試料濃縮

(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⁾)

M.Merion¹⁾, R.H.Aebersold¹⁾, M.Fuchs¹⁾ ○酒井 恒行²⁾

THE USE OF ON-LINE SAMPLE CONCENTRATION TO INCREASE THE SENSITIVITY OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS

¹Waters Chromatography Div. Millipore Corp. and ²Waters Chromato. Div. Nihon Millipore

M.Merion¹⁾, R.H.Aebersold¹⁾, M.Fuchs¹⁾ and ²Tsuneyuki Sakai

One of the most important issues facing the technology of Capillary Electrophoresis is sensitivity. In general, LC is a more sensitive technique than CE. The difference between the two techniques lies in two areas. The first is detector path length. The second difference is in the ability to analyze low concentration samples. In LC, large volumes of sample at low concentrations may be loaded and concentrated at the head of the column. Sample is later eluted with a gradient giving greatly enhanced sensitivity. However, in CE, the application of large sample volumes results in broader peaks and diminishing resolution. The capillary with Concentration zone is designed to overcome the problem of low sample concentrations.

要約

キャピラリー電気泳動 (CE) は非常に高分解能分析法であるためいろいろな実験室では必要な装置となってきました。この場合一番問題となる点は試料の濃度にたいする検出感度といえます。一般的にCEとHPLCを感度で比較した場合HPLCのほうが感度が高いといえます。というのはまず 検出器の光路長の違いがあげられます。HPLCでは一般的に10mmであるのにたいしてCEの場合キャピラリーの内径となります。次にHPLCは感度が不足した場合試料を大量に注入することができます。大量に注入された試料がカラムの先端で濃縮され分析できる訳です。しかしCEの場合 大量にサンプルを注入した場合 ピークがブロードになり分離効率を損なう結果となります。我々はこの問題を解決するべく濃縮ゾーン付きキャピラリーを開発いたしましたので発表いたします。

濃縮ゾーン付きキャピラリーの概要

我々は通常の溶融シリカキャピラリーの注入側に1mmの長さのポリマーベースのC18の充填剤を詰め、濃縮ゾーンをつけることを開発いたしました。試料が保持される条件で大量の希薄な試料溶液を注入いたします。注入後 少量の有機溶媒を含む液を注入しその後通常の条件で泳動分析します。この方法を用いれば ペプチドの場合もとの試料濃度は1ng/mlのレベルまで使用できます。

実験

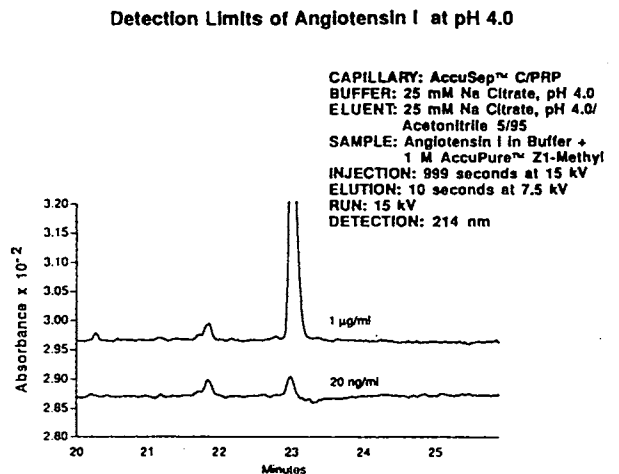
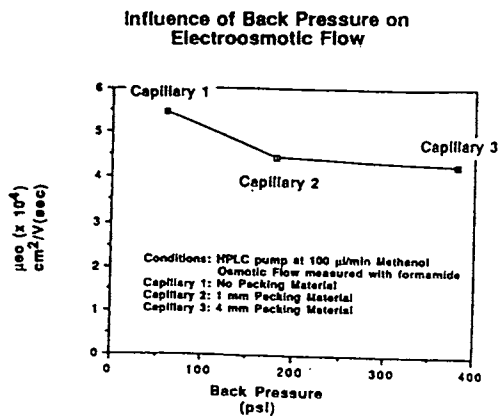
試料として1 M Z1-メチルでイオン強度を上げたアンジオテンシン1を、機器としてクオンタ4000CEシステム（ウォーターズ）を用いました。分析用の泳動バッファー以外に我々が溶出泳動バッファーと名づけたバッファー（25/75=バッファー/アセトニトリル）を使用します。濃縮と分析の流れはキャピラリーを分析用泳動バッファーで平衡化し次に泳動注入法を用いて最大1 μ Lの試料を注入します。さらに溶出泳動バッファー（約5 nL）を再度注入します。その後通常の泳動を行いません。

実験結果

- * 多少の背圧の変化でも再現性のあるオスモシスフローを得ることがわかりました。
- * S/N=3/1における濃縮ゾーン付きキャピラリーの場合の検出限界は5ng/ml（アンジオテンシン1）となりました。
- * アンジオテンシン1（1 μ g/ml）は移動時間 ピーク面積共にじゅうぶん使用できる範囲に収まり 直線性も良好な結果を得ました。

結論

濃縮ゾーン付きキャピラリーを用いてペプチド分野で高感度分析が行なえるようになりました。



(名古屋工業大学・工学部) 津田孝雄

We observed the flow profile of electroosmosis by using a microscope-CRT-video system. A rectangular glass capillary (50x1000 μ m) was used as a column. The flow profile is very near to that of a plug flow, although there is still few contribution of the poiseuille flow profile. We find that the centred part of the flow profile is retarded from the edge part. From our knowledge, it may be the first time to find this phenomenon clearly.

電気浸透流のフローパターンについてはこれまで種々検討されている。考え方は次の二通りある。①壁における電気二重層の部分は層流でそれ以外は栓流とする。②栓流と層流の混合流として取り扱い二つの流れの混合割合を実験データと比較して検討する。

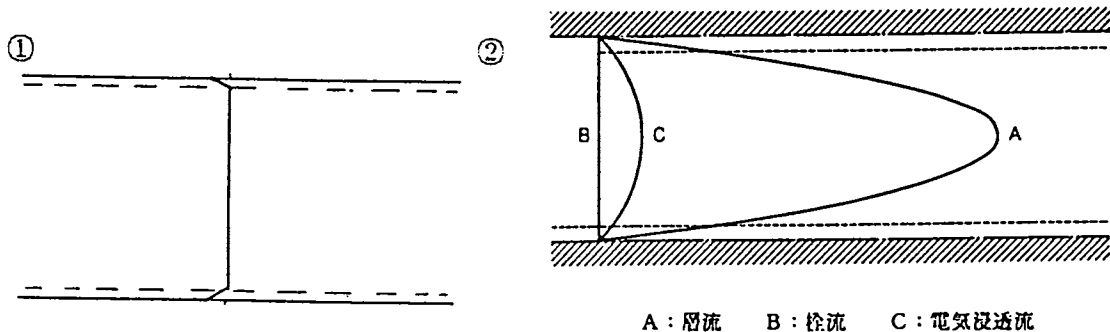


Figure 1 Assumed flow profile for electroosmosis

これまでキャピラリー電気泳動条件下でのフローパターンの直接観察はないので 試みた。

電気浸透流の直接観察

顕微鏡-TVカメラ-VHSビデオレコーダーシステムによりキャピラリー中での染料の形成するフローパターンを観察した。

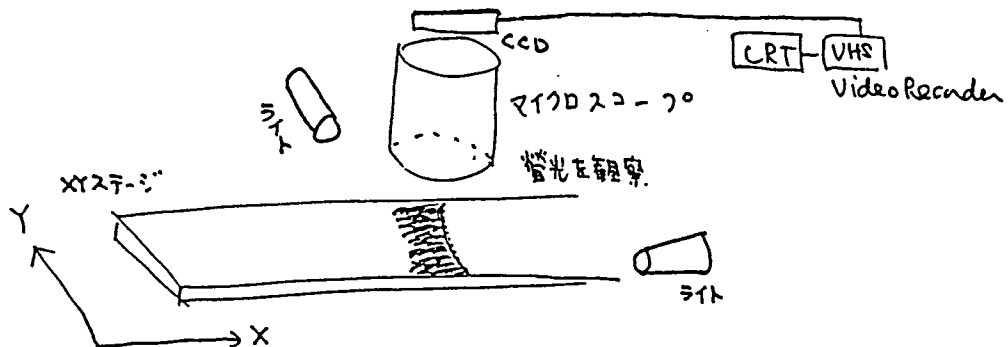


Figure 2 Schematic diagram for the observation of flow profile

染料として Rhodamine Chloride 590 を用い溶媒としてメタノールを用いた。従って、Rhodamine Chloride はメタノール中であるので分子として明らかな荷電は持たなく、中性状態であると考えられる。この試料を長方形分離カラムに注入し、その動きを観察する。キャピラリーカラム中の溶媒はメタノールである。この染料の示すフローパターンが電気浸透流のフローパターンである。

このようにして得られた映像に画像処理を加えた。本処理は株式会社ピアスの協力によりピアスのソフトを用いて行われた。その結果非常に栓流に近いことがわかった。

実験は 95 V/cm の電位勾配のもとで 0.4 mm/秒 の速度の電気浸透流が発生している。

画面を写真にとると Y 軸の両端が中央部より先に進んでいることがはっきりしている。しかしながらこの両端部が中心部より速度が早いかは明かでない。この点はさらに検討する必要がある。

以上の結果から浸透流のフローパターンは次のように図形化できよう (Figure 3)。

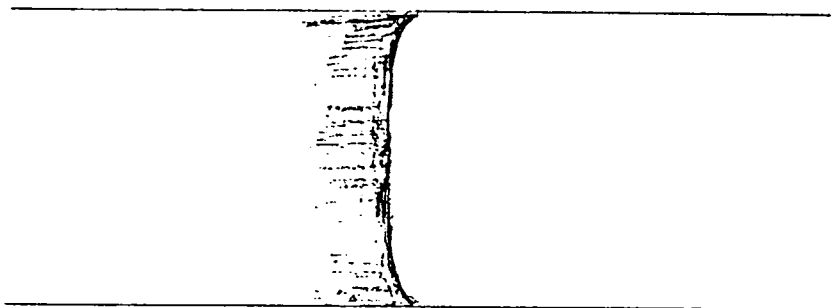


Figure 3 A real flow profile of electroosmosis → 流れの方向

これは Figure 1 の②とは異なり中央部が凹となっている。

以上より

①電気浸透流は非常に栓流に近いフローパターンを示す。

②予想されるフローパターンと異なり、中央部が進行方向に対して凹になっている。

Acknowledgment

T.T. thanks AJINOMOTO Company for the financial support, and PIAS Company for the co-operation for the analysis of the flow profile.

HPCEにおける キャピラリー試料導入口での化学標識

(近畿大・薬¹、近畿大・薬総研²) 本田 進^{1,2} ○多賀 淳¹

Chemical Labeling at the Sample Inlet of a Capillary Tube in HPCE

Susumu Honda^{1,2} and Atsushi Taga¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences and ²Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University

Introduction of a sample solution followed by a reagent solution, or *vice versa*, to a capillary tube offers a new convenient method for precolumn derivatization in high performance capillary electrophoresis. Reagent-sample-reagent sandwich mode of introduction is especially an efficient technique. The results of optimization study by using the amino acid - *o*-phthalaldehyde system is presented.

[はじめに]

電気泳動においては、液体クロマトグラフィーにおけると同様、すべての化合物に対して共通に適用できる一般性のある検出法がないため、試料成分が直接検出できない場合には分離に先だって検出可能な形に変換させる、いわゆるプレカラム標識が一つの有効な手段になる。しかし、プレカラム標識は自動化し難く、以前にわれわれの研究室においても、自動化に対する一つの試みを行ったが [Honda et al., Anal. Chem., 55, 2466 (1983)]、現在のところ繁用されるに至っていない。

キャピラリー電気泳動においてはキャピラリー内での物質の拡散は緩やかであるが、試料溶液と試液を自動的に順次層積採取することが容易にできるので、キャピラリーの導入口や内部で簡単に密閉系をつくることのできるため、このことを利用して成分をプレカラム標識できる可能性がある。本演題では、この原理による、キャピラリーの試料導入口におけるプレカラム標識について検討した結果を述べる。

[方法]

キャピラリー電気泳動装置：吸引式自動試料注入器、キャピラリー恒温槽、および紫外部吸収検出器を備えた Applied Biosystems 270A 型装置を用いた。キャピラリーには内径 50 μm 、長さ 75 cm のフューズドシリカ管を用い、キャリアーには 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) を用いた。試料の注入における吸引は低真空側で行った。試料-試液混合状態の観察：cinnamyl alcohol を 0.005% および 0.01% 濃度でキャリアーまたはアセトニトリルに溶かした溶液を用いて行った。プレカラム標識：種々のタイプのアミノ酸をモデルとして選び、これらのアミノ酸を *o*-phthalaldehyde (OPA) との反応によって標識した。検出は 230 nm における吸収を測定することによって行った。混合実験、標識実験および分析はすべて 30 $^{\circ}\text{C}$ で行った。

[結果と考察]

試料-試液混合状態の観察 試料と試液はキャリアーと同一の緩衝液中で反応させ、反応後ただちに生成物を分析するのが理想である。そこで中性である cinnamyl alcohol を低濃度 (0.005%) および高濃度 (0.01%) で キャリアーに溶かし、それらの溶液 (それぞれ L および H) を順次キャピラリー注入口から注入し層積したのち、さらにキャリアーを 5 sec 間注入して層積し、この状態でキャピラリーを種々の時間放置した。溶液 L および H はそれぞれ試料溶液および試液を想定したものであり、最後に注入したキャリアーはキャピラリー注入口から溶液 L や H が逆流して電極槽に戻ることがないようにするための対策である。なお、この際まず基礎的データを得るため溶液 L および H の注入時間は同一に保ちつゝ、種々の吸引時間をかけて両液を注入した。上述のように溶液 L および H の重層を一定時間放置して混合させたのち、キャピラリー両端

に電圧を印加して電気浸透流により移動させ、検出器で検出して両液中の cinnamyl alcohol の混合状態を観察した。

その結果注入時間が 1 sec では放置時間が 0 min でもすでにショルダーのないピークを与え、溶液 L ゾーンの約半分が溶液 H と混合されていることが示された。注入時間が 2 sec の場合は放置時間が 5 min までは立ち上がり付近にショルダーをもつピークが観察され、混合が不十分であることが示されたが、10 min 以上放置するとショルダーは消失した。注入時間 3 sec ではショルダー消失までに少なくとも 40 min を要し、注入時間 5 sec では 40 min 放置してもやはりショルダーは消失しなかった。一方、上記の H, L 両液によるサンドウィッチ方式 (H-L-H でいずれの溶液も注入時間は同じ) では、3 sec 以内では十分な放置時間をとればピークは一本化され混合効率が改善されることが示唆された。しかし、注入時間が 5 sec 以上になると 40 min 放置しても双子ピークが現れ、生成物ゾーンが複数化する可能性が示された。なお、試液のメディウムをキャリアと異なるものにせざるを得ない場合については、上述の結果から若干のずれがでることが予測されるが、例えばアセトニトリルの場合にはキャリアと同じメディウムを用いた場合と大差がなかった。

以上のように試料溶液-試液層積においては、注入時間および放置時間について条件が満たされるならば、両液の十分な混合が保証されることが示された。混合に要する時間が試料成分-試薬の反応時間を十分に上回るならば、ほぼ定量的に標識が行われるので、この方法は簡便で自動化しやすいプレカラム標識法となり得る。なお、放置時間を一定の短い値に固定すれば、試料溶液、試液の注入時間にかかわらず、試料、試液混合ゾーンの幅をほぼ一定の細い値に保つことができるが、この条件で標識する場合は標識反応が未完結のまま動的状態で分析を行わなければならない。しかし、条件が一定に保たれるならば、生成物の収率は十分に高い再現性を示す。

アミノ酸の OPA 化

上述の結果に基づき、アミノ酸を対象として、これと十分に速い速度で反応する OPA を標識試薬としてモデル実験を行った。

Fig. 1 は種々のタイプのアミノ酸の水溶液と 25 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) を 1 : 2 の体積比で混合したものを試料溶液 (S) とし、OPA をアセトニトリルに 50 mM 濃度で溶かした溶液を試液 (R) として、R (1 sec) - S (2.4 sec) - R (1 sec) - キャリア (5 sec) のサンドウィッチ方式により注入層積し、30 min 放置したのちゾーン電気泳動により分析した際の泳動図である。比較のため通常の試験管内反応により OPA 標識したアミノ酸混合物の分析結果を Fig. 2 に示す。両図のプロファイルは完全に一致し、本法の信頼性が示された。

Glycine を内部標準として他のアミノ酸の検量線を作成したところ、紫外外部吸収検出の場合は少なくとも 0.5 - 1.5 mM の範囲で吸光度と試料濃度との間に良好な直線性がみられ、信頼性の高いアミノ酸の定量が可能であることが示された。

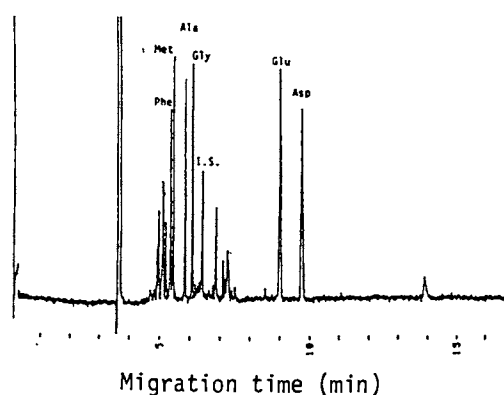


Fig. 1

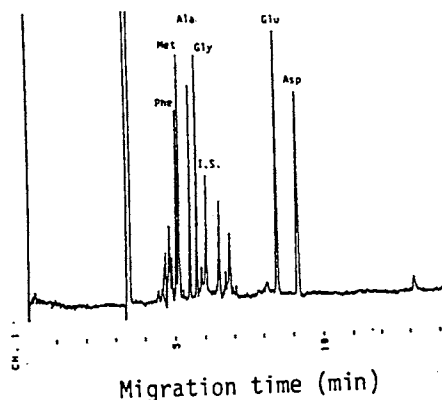


Fig. 2

Fig. 1. HPCE analysis of amino acids after in situ precolumn labeling with o-phthalaldehyde at the inlet of the capillary tube.

Fig. 2. HPCE analysis of amino acids after precolumn labeling in a test tube in a normal fashion.

HPCEにおけるピーク形状と 試料ゾーン幅の関係

(近畿大・薬¹、近畿大・薬総研²) ○本田 進^{1,2} 大田恭子¹)

Relationship between Peak Shape and Zone Width in HPCE

Susumu Honda and Yasuko Ohta

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences and ²Pharmaceutical Research and Technology Institute, Kinki University

The relationship between peak height (H) and peak width at half height ($W_{1/2}$) of a neutral compound in capillary zone electrophoresis was investigated by observing peak shape for various sample injection times. Sample zone width (δ) calculated from H and $W_{1/2}$ was then correlated to $H/W_{1/2}$ ratio. Sample volume could be easily estimated by using this δ value, i.e. simply from peak shape. Combination of this method and calibration of the amounts of sample components using authentic specimens allows convenient determination of the concentrations of individual components in a small volume of a sample such as cell fluid.

[はじめに]

キャピラリー電気泳動の主要な用途は、他の分離分析法と同様に、試料の成分を一斉分析することにあることは論をまたないが、この方法は微小体積の試料溶液をも対象にできるという長所をもっているため、単一細胞中の成分の分析や患者の体液の直接分析など魅力ある用途も期待される。

そのような微小体積試料を取り扱う際の成分定量においては、一般に用いられるような内部標準法は適用できない上、試料の体積を直接測定することも許されない。このような難問があるために、これまでのところ単一細胞の分析を試みた例はあるものの、特定の成分の同定が行われた程度にとどまっており、定量や濃度測定を行った報告はみられない。

本演題ではこのような観点から、微小体積試料の定量・濃度測定に当たって基本的な問題となるキャピラリーへの導入体積の見積り方について一つの提案をしたい。

[方法]

キャピラリー電気泳動装置：紫外部吸収検出器を搭載した日本分光 CE-800 型装置を使用した。キャピラリーには内径 50 μm 、長さ 45 cm のフューズドシリカ管を用い、室温、印加電圧 15 kV の条件で分析を行った。キャリアーには 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用い、検出は 220 nm で行った。試料：柑橘類果実の毛細胞を用いた。

[結果および考察]

キャピラリーゾーン泳動モードにおいては、中性物質は電気泳動の効果を受けず、電気浸透流によってのみ移動する。したがって試料導入口から円柱（キャピラリーの縦断面で見れば長方形ゾーン）として導入された試料溶液中の中性成分は検出部まで移動する間にキャリアー中への拡散のみによって分布状態を変え、キャピラリーの軸に沿ってガウス分布に近い状態で検出される。中性物質のモデルとして mesityl oxide (M.O.) を選び、リン酸緩衝液 (pH 6.8) をキャリアーにして M.O. を同緩衝液に溶かした溶液を試料溶液とした場合、M.O. のピーク形状が試料導入時間 (τ) とともにどのように変化するかを調べた結果を Fig. 1 に示す。

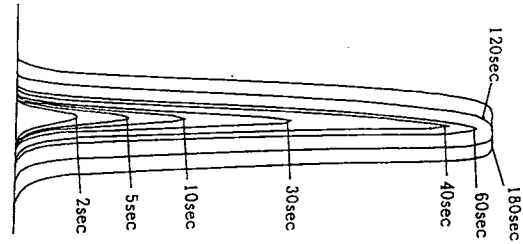


Fig. 1. Change of Peak Shape with Sample Injection Time.

この結果を基にしてピーク高さ (H) と τ の関係、およびピーク半値幅 ($W_{1/2}$) と τ の関係を図示すると、それぞれ Fig. 2a および 2b のようになる。

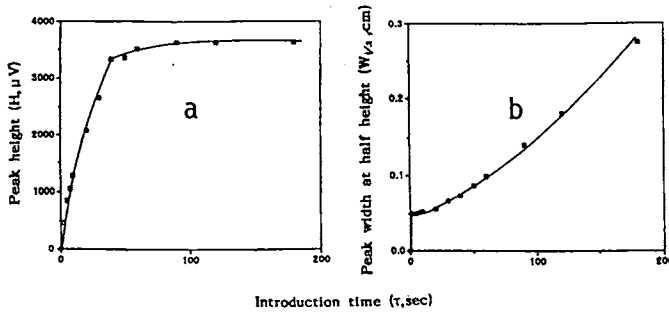


Fig. 2(a). Relationship between Peak Height and Sample Injection Time.

Fig. 2(b). Relationship between Peak Width at Half Height and Sample Injection Time.

導入された試料溶液の円柱ゾーンの高さ (長方形ゾーンの幅、 δ) は次式で与えられるので、H および $W_{1/2}$ から δ を求め、これと $W_{1/2}/H$ 比の関係をプロットすると、Fig. 3 に示した曲線が得られる。

$$\delta = \frac{H}{H_{max}} \left(\frac{L}{a \cdot t_0} \cdot W_{1/2} - d \right)$$

ただし、 H_{max} : 試料溶液ゾーンの幅が充分広い時のピーク高さ、L: キャピラリーの試料導入口から検出器までの長さ、a: チャートスピード、 t_0 : M.O. ピーク頂点が検出された時間、d: スリット幅。

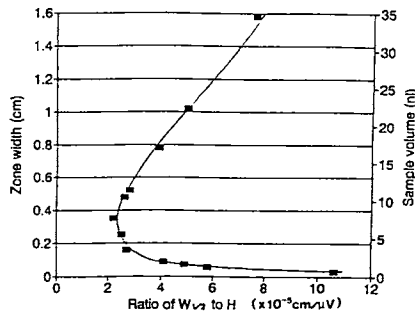


Fig. 3. Relationship between Sample Zone Width and Peak Width at Half Height / Peak Height Ratio.

試料溶液の導入体積 V は $\pi \cdot r^2 \cdot \delta$ (r : キャピラリー半径) で与えられるので、結局中性成分のピークの $W_{1/2}/H$ を測定するだけで V を知るができることになる。したがって微小体積試料の分析においては、中性成分が含まれているならばそのピークを用いて、また中性成分が含まれていないならば M.O. などの中性物質を添加したのちそのピークを用いて、 $W_{1/2}/H$ を測定すれば、試料導入体積を見積ることができることになる。

この方法は簡便であり、別途に標品を用いて作成した検量線を利用して成分導入量を測定しておけば、試料の成分濃度を求めることができる。

HPCEにおける 二次元マッピングの効用

(近畿大・薬、近畿大・薬総研) ○本田 進
(近畿大・薬) 鈴木茂生、多賀 淳、掛樋一晃

Evaluation of Two-Dimensional Mapping in HPCE

Susumu Honda^{1,2}, Shigeo Suzuki¹, Atsushi Taga¹, and Kazuaki Kakehi¹
¹Faculty of Pharmaceutical Sciences and ²Pharmaceutical Research
and Technology Institute, Kinki University

Since capillary electrophoresis allows various modes of separation simply by changing carrier, multimode analysis is easier than in other techniques of separation. We demonstrated the usefulness of two-dimensional mapping in high performance capillary electrophoresis, taking examples from analyses of drug metabolites, amino acids and carbohydrates.

【はじめに】

キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis, CE) にはゾーン泳動、等速泳動、等電点泳動、動電クロマトグラフィーなど種々の方式がある反面、少なくとも現時点では液体クロマトグラフィー (liquid chromatography, LC) におけるようにグラジエント溶出はできない。したがって一つ分離モードで分離できる成分数はグラジエント溶出で行う LC のほうに分があると言えそうである。しかしながら、CE では同一キャピラリーと検出器を使用しながらキャリアーを変えるだけで簡単に別の分離モードをつくることができる。また、このキャピラリーの交換は自動的に行うこともできる。LC では別の分離モードをつくるためには概して固定相と移動相の両方を変えなければならないことを考えると、このことは CE の利点の一つと言える。

本演題では、異性体や同族体が多い薬物代謝物、アミノ酸、糖などに対して二次元マッピングを試みて、これが有効な方法であることを立証した。

【実験方法】

キャピラリー電気泳動：試料自動注入、キャピラリーの温度制御および紫外検出ができる Applied Biosystems 270A システムを用い、キャピラリーには内径 50 μm のフューズドシリカ管を使用した。セファロsporin系抗生物質：藤沢薬品工業から入手した。アミノ酸の誘導体化：Roth の方法 (Anal. Chem., 43, 880 (1971)) により o-phthalaldehyde (OPA) で標識した。糖タンパク質オリゴ糖の調製および誘導体化：精製された種々の糖タンパク質をヒドラジンで分解して糖鎖を切り出し、Kondo らの方法 (Agric. Biol. Chem., 54, 2169 (1990)) に準じて還元ピリジリアミノ化 (PA化) した。

【結果および考察】

いずれの分析対象についても二つの分離モードを選び、それぞれのモードで各成分の相対移動度またはそれに準じたインデックスを求め、これらを両軸上にプロットして二次元マップを作成した (横軸はモード 1、縦軸はモード 2 とする)。

セファロsporin系抗生物質 セフィキシム (CX) およびその 5 種類の代謝物 (M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 および M_5) を用い、次の 2 つのモードで分離を行った。

モード 1： polybrene を 0.5 w/v% 濃度で含む 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) をキャリ

アーとするイオン交換動電クロマトグラフィー
 モード 2 : 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) をキャリアーとするゾーン泳動

Fig. 1 に二次元マップを示す。モード 1 では C_X と M₂ ならびに M₃ と M₄ の分離が良くない。またモード 2 では M₁ と M₅ の分離が不良である。しかし、二次元マップではこれらのプロットが明瞭に観察できる。

アミノ酸 OPA 化したアミノ酸について次の二つのモードで分離を行った。

- モード 1 : 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) をキャリアーとするゾーン泳動
- モード 2 : polybrene およびメタノールをそれぞれ 0.1 w/v% および 10 v/v% 濃度で含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) をキャリアーとするイオン交換動電クロマトグラフィー

Fig. 2 は代表的なアミノ酸の OPA 誘導体をこの二つのモードで分析し、各モードにおける相対移動度を二次元マッピングした結果を示す。モード 2 では分離の良くない Glu と Asp の誘導体がモード 1 では良く分離されている状態が明瞭に観察できる。

糖タンパク質中のオリゴ糖 糖タンパク質より切り出したオリゴ糖の PA 化誘導体には各々 1 個ずつのイミノ基があり、またいずれも多数の水酸基をもつため、次の異質のモードを適用した。

- モード 1 : hydroxypropylcellulose を 0.1 w/v% 濃度で含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) をキャリアーとするゾーン泳動
- モード 2 : 200 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.5) をキャリアーとするホウ酸コンプレックスとしてのゾーン泳動

Fig 3 に種々のオリゴ糖鎖の二次元マップを示す。モード 1 はサイズ (重合度) に基づく分離を、またモード 2 は非還元末端部位の単糖の構造を反映した分離を示し、両者を総合的に表した二次元マップではプロットの存在部位から高マンノース型 (上部)、ハイブリッド型 (原点を通る右 45° の直線上) および複合型 (その他の部位) が明瞭に区別できる。

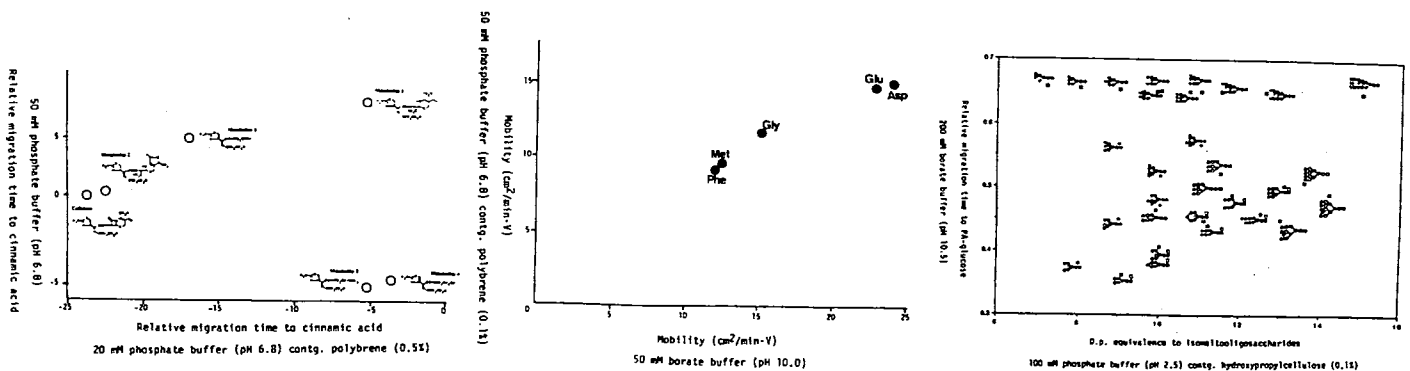


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

2-D maps of cefixime and its metabolites (Fig. 1), amino acids as OPA derivatives (Fig. 2), and oligosaccharides from glycoproteins as PA derivatives (Fig. 3).

分析対象によって使用するモードの組合せを厳選する必要はあるが、二次元マッピングは LC のようにグラジエント溶出を使えない CE の欠点を補って余りあると言える。

グルコマンナンゲルを用いたキャピラリー電気泳動

(東京都立大・理) ○泉 友則、町田明子、高橋郁子、篠田友孝、
奥山典生

CAPILLARY ELECTROPHORESIS USING GLUCOMANNAN GEL FILLED CAPILLARY
Tomonori IZUMI, Akiko MACHIDA, Ayako TAKAHASHI, Tomotaka SHINODA
and Tsuneo OKUYAMA

(Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University)

For the separation of biological macromolecules, capillary electrophoresis using glucomannan filled capillary was examined. ϕ x174 HaeIII digest containing 72-1353 bp fragments could be separated into 11 peaks and shoulders within 40 min using 0.25% glucomannan gel. This method would be applied to various biological macromolecules.

(はじめに)

タンパク質や核酸のように比較的大きな分子量のものを電気泳動的に分離するには、駆動力とともに抵抗力を制御することが有効と考えられる。近年、キャピラリー電気泳動においてはポリアクリルアミドゲルを用いた核酸やタンパク質の分析がおこなわれており、また架橋のない直鎖のポリアクリルアミドによる分離例も報告されている。今回、我々はコンニャクの主成分として知られているグルコマンナンゲルを充填したキャピラリーを用いて、DNAフラグメントの分離に関する検討を行った。

(方法と結果)

キャピラリー電気泳動装置は、CE-800 (日本分光工業) を使用した。分離キャピラリーには、シリカキャピラリー (75 μ m I.D. x 50 cm) を用いた。またグルコマンナンは、栗田工業より恵与されたものを用いた。泳動用緩衝液には、5.6M尿素、0.014M EDTAを含む0.07Mトリス-ホウ酸緩衝液 (pH8.2) を調製し、これにグルコマンナンを溶解して0.25%グルコマンナンゲルとした。シリカキャピラリーへの充填は、100°C/10分間加熱したグルコマンナンゲルをプラスチック製シリンジで圧入し、室温で40分間放置した後使用した。DNA試料 (ϕ x174 HaeIII digest (ニッポンジーン) 0.38mg/ml) は、変性剤や加熱による処理をせずに用い、試料の導入は、電気泳動的な方法で陰極側より5 kVで21秒間行った。泳動は5 kV定電圧で行い、キャピラリー陰極端から20 cmのUV検出器により260 nmで検出した。

Fig. 1a、1bに ϕ x174 HaeIII 分解物を分離した結果、すなわち3回目及び11回目の結果を示す。DNA試料は約40分間の泳動で肩を含め12個のピークに分離した。この結果は5%ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動の結果と同様のものではあった (Fig. 1a)。このうち7分のピークは、試料中の不純物と考えられ17分から35分にかけての11個のピークがそれぞれ 72、118、194、234、271、281、310、603、872、1078、1353 bpのフ

ラグメント成分に対応していると考えられる。11回目の結果 (Fig.1b) でもほぼ同様の分離がみられたが、その量及び構成比には変動がみられた。これらの分離状況や分子量範囲に対するグルコマンナン濃度などの諸条件について、さらに検討が必要である。

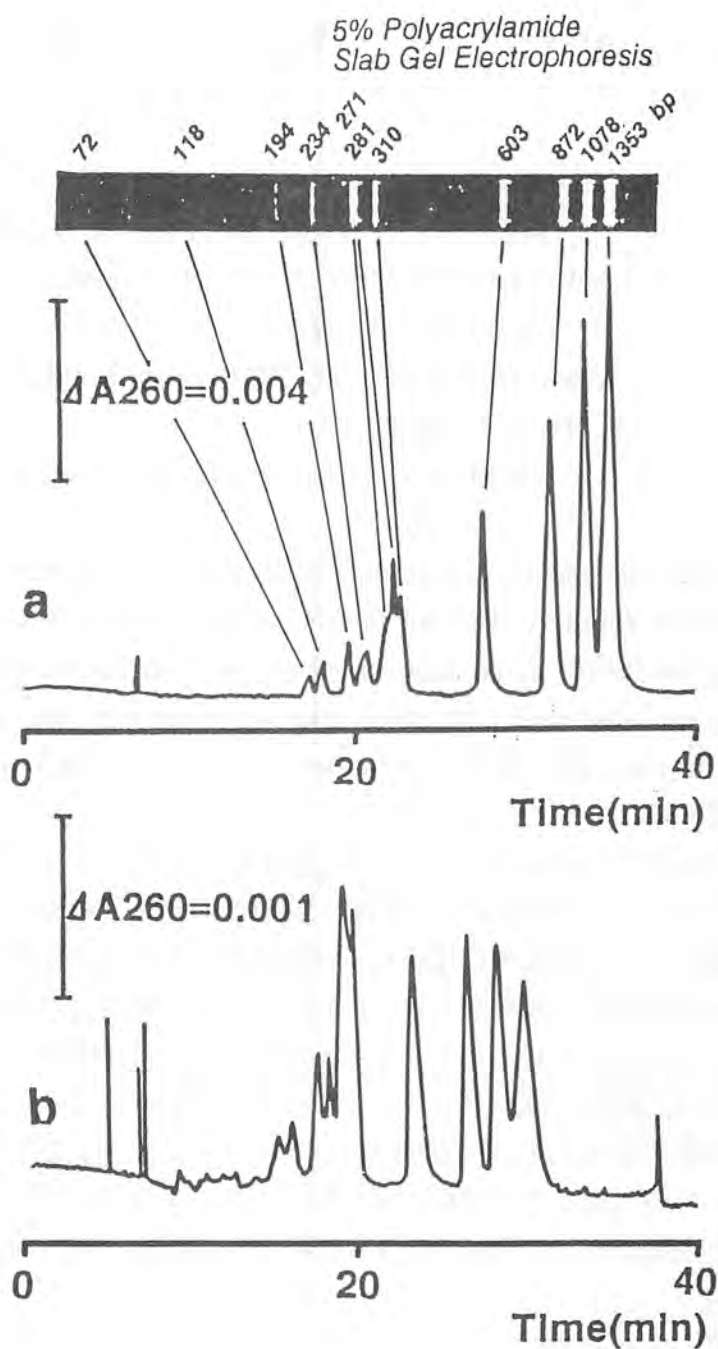


Fig.1 Separation of ϕ x174 HaeIII digest with 0.25% glucomannan gel

a : cycle 3 b : cycle 11

CONDITIONS

Electrolyte: 0.07M Tris-Boric acid/0.014M EDTA/5.6M urea (pH8.2)

Gel: 0.25% glucomannan/0.07M Tris-Boric acid/0.014M EDTA/5.6M urea (pH8.2)

Capillary: Fused silica (75 μ m I.D. x 50cm) / effective length 20cm

Sample: ϕ x174 HaeIII digest 0.38mg/ml Injection: 5kV 21s

Run: 5kV Detection: UV 260nm

キャピラリー電気泳動を用いた塩基性蛋白質分析

(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⁾)

M.Merion¹⁾, N.Astephen¹⁾, J.Petersen¹⁾, B.Bell-Alden¹⁾, T.Wheat¹⁾, ○町田祥子²⁾

NEW DEVELOPMENTS IN THE CAPILLARY ELECTROPHORESIS
OF BASIC PROTEINS

¹⁾Waters Chromatography Division of Millipore, ²⁾Waters Chromatography Division
of Nihon Millipore

¹⁾M.Merion, ¹⁾N. Astephen, ¹⁾J.Petersen, ¹⁾B.Bell-Alden, ¹⁾T.Wheat, ²⁾S.Machida

We describe the use of a buffer additive that overcomes the problem of protein adsorption to the wall of the capillary. The use of this additive allows the use of moderate ionic strength buffers throughout the pH range. Separations of crude protein mixtures, as well as very basic proteins can be accomplished with high efficiencies and short run times at neutral pH. This development will allow the full use of capillary electrophoresis in the area of protein separations.

はじめに

蛋白質分析は従来よりゲル電気泳動が用いられてきたが近年キャピラリー電気泳動を用いることによってより高速で高分解能、高感度、定量性を得ることが期待されている。しかしながら溶融シリカの表面の負電荷に正電荷を持つ蛋白質が吸着することでピーク形状、分離効率、再現性が悪化する現象がしばしば起こり、この蛋白質のキャピラリーへの吸着現象を解決することが望まれる。対応策としてキャピラリーの電荷抑制、蛋白質の電荷抑制、キャピラリー内表面の化学修飾、泳動バッファのイオン強度を上げるなどの方法が用いられているが、本研究では新規両性イオン物質を泳動バッファに添加することを検討し、ほとんどのpHの範囲において適当なイオン強度を保ちキャピラリー側壁に蛋白質が吸着されることを阻害し良好なピーク形状ならびに再現性を得られることを確認したので報告する。

実験

装置：クオンタ4000（ウオーターズ）使用。75 μ x 60 cmキャピラリーを用い、214 nmおよび185 nmで検出した。試料及び試薬：蛋白質試料として卵白、マウス腹水液、マウス肝臓液、蛇毒（sigma）を適宜調製して用いた。泳動バッファは100 mM Sodium Phosphateを用い、両性イオン物質としてZ1-Methyl（ウオーターズ）を1.0 Mになるように添加した。

結果及び考察

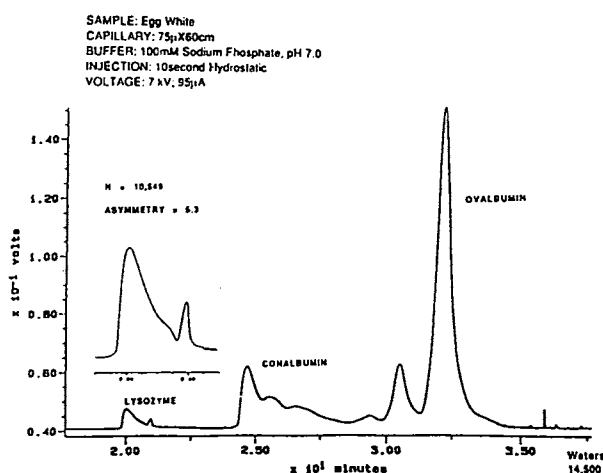
フェログラムにおける再現性の検討：卵白中の水溶性蛋白質ならびにマウス腹水蛋白質を用いてZ1-Methylの有無によるフェログラムの再現性を比較した。7回の連続分析においてZ1-Methyl無添加では泳動毎にマイグレーションタイムが遅れ、ピーク形状が悪化し

た。これはキャピラリー表面が蛋白質試料によって非可逆的に汚染されオスモシスフローの速度が遅くなった結果であると考えられた。一方Z 1-M e t h y l 添加ではマイグレーションタイムの再現性が得られ、卵白中のリゾチームのマイグレーションタイムのCV (%) は±0.06%、アルブミンは±0.16%、面積値のCV (%) はリゾチームで±1.2%、アルブミンは±1.6%であった。

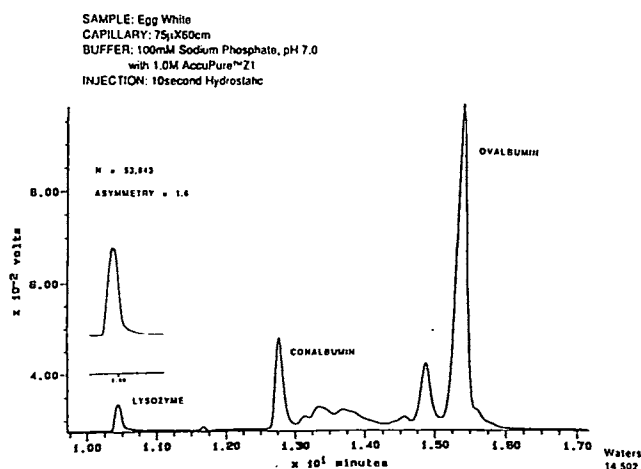
オスモシスフローの変化：ホルムアミドの移動時間を指標として生体試料分析前後のオスモシスフローの変化を追跡したところ、Z 1-M e t h y l 無添加では3回の生体試料の分析の前後でホルムアミドの移動時間は約1.5倍になり試料の吸着によってオスモシスフローが変化していると考えられた。Z 1-M e t h y l を添加した泳動バッファーを用いた場合には移動時間に変化がなく、Z 1-M e t h y l が生体成分のキャピラリー内壁への吸着を阻害していることが示唆された。

各pHにおける分析：マウス肝臓液及び蛇毒を試料としてpH 6.0から7.6の範囲でZ 1-M e t h y l 添加の有無によるフェログラムの違いを比較した。分離パターンはpHに依存したがいずれのpHにおいてもZ 1-M e t h y l の添加によってピークがシャープになり分析時間が短くなった。

吸着現象を生じた分離のフェログラム



アキュピュアー™ Z1メチル試薬を使用した卵白中の蛋白質分離のフェログラム



ペプチドの部分加水分解物のキャピラリー電気泳動による解析
ANALYSIS OF PARTIAL HYDROLYZATE OF PEPTIDES BY HPCE

(東京都立大・理) ○高橋郁子、泉友則、奥山典生
Ayako Takahashi, Tomonori Izumi and Tsuneo Okuyama
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Tokyo Metropolitan University

On capillary zone electrophoresis of peptides, the relationship between electrophoretic mobility (U) and electric charge (Z), molecular weight (M) could be represented with the following equation.

$$U_{\text{rel}} = (U_{\text{app}} - U_{\text{osm}}) = AxZxM^{-1/3} \quad (A: \text{constant})$$

Then we analyzed the partially hydrolyzed peptides with capillary zone electrophoresis, and used this equation to analysis the hydrolysis procedure.

(はじめに)

第一回及び第二回クロマトグラフィー科学会においてキャピラリーゾーン電気泳動の場合にペプチドの移動度と電荷及び分子量の間には

$$U_{\text{rel}} = (U_{\text{app}} - U_{\text{osm}}) = AxZxM^{-1/3} \quad (A: \text{constant})$$

という関係式がほぼ成り立つということについて報告した。本研究においては電気泳動の移動度に影響する諸因子に対する検討を行ったうえで、ペプチドの部分加水分解を行い、上記の関係式を用いて加水分解ペプチドの構成アミノ酸に関する情報を得ることを試みた。

(実験)

1) 試料 合成ジペプチド類はNBC社、アンジオテンシンIIはペプチド研究所(株)より購入した。グリシルアスパラギン及びアンジオテンシンIIは200mM塩酸を用いて110°Cで加水分解を行った。

2) 装置 アプライドバイオシステム社のMODEL270A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50cm(有効長50cm)のフューズドシリカ管、検出は200nmのオンカラム検出を行った。

3) 電気泳動 キャピラリーの内部を200mM水酸化ナトリウムで2カラムボリューム洗浄後、20mMのクエン酸ナトリウム緩衝液(pH2.5)で5カラムボリューム置換し、試料(最小量5 μ l)を加圧(127mmHg)式で2秒間注入し、30kVの定電圧で泳動した。

(結果)

1) 電気泳動図に影響する諸因子についての検討

試料に含まれる各種物質濃度の移動度に及ぼす影響について検討した(Fig.1)。逆相クロマトグラフィーの溶離液に含まれる約50%程度までのアセトニトリル、0.1%のTFA、あるいは加水分解に用いる塩酸で0.2Nまで、炭酸アンモニウム0.1Nまではペプチドの移動時間にほとんど影響を及ぼさなかった。

2) ペプチドの分離様式

上記の関係式についてアミノ酸残基数1-148の150種類のペプチドについてプロットしたものをFig.2に示した。一般的には $ZxM^{-1/3}$ の値が大きくなるほど移動度も大きくなる傾向にあった。また側鎖の等しいアミノ酸のポリマーでは非常に相関の高い直線が得られた。

3) グリシルアスパラギンの塩酸部分加水分解

グリシルアスパラギンを200mM塩酸を用いて加水分解した場合の経時変化をFig.3に、そのときの各物質の質量変化をFig.4に示す。グリシルアスパラギンの加水分解は途中で中間体が生成しその後グリシンとアスパラギン酸に分解することがわかった。

4) アンジオテンシンIIの塩酸部分加水分解

アソジオアソニンIIを200mM塩酸を用いて加水分解した場合の経時変化をFig. 4に示す。最初に切れた結合はFig. 2のプロット図及び280nmの紫外吸収測定より、Asp-²Arg間のペプチド結合であると思われる。検出された他のピークについては逆相クロマトグラフィーで分離精製後、アミノ酸分析を行い同定する予定である。

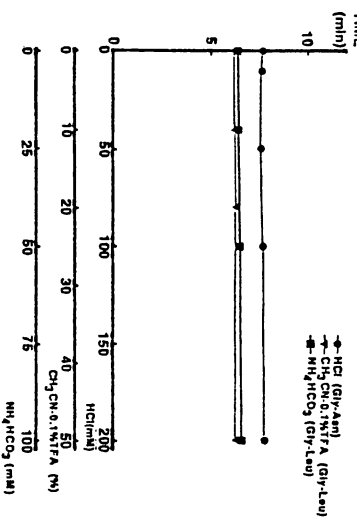


Fig. 1 Effect of sample solution

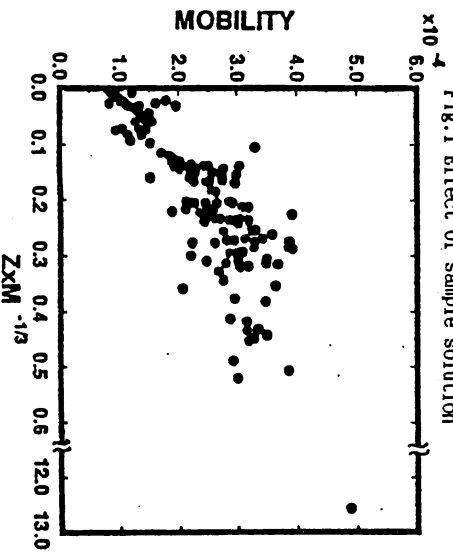


Fig. 2 Relationship between mobility(U) and $ZxH^{-1/3}$ (Z: calculated charge, H: molecular weight)

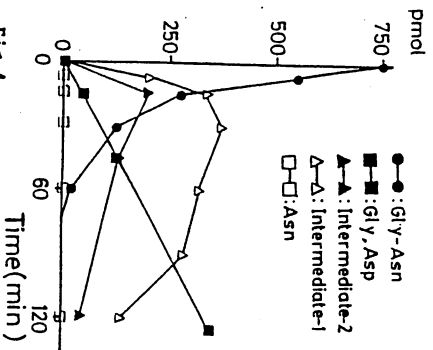


Fig. 4 Time course of hydrolyzed product of Gly-Asn

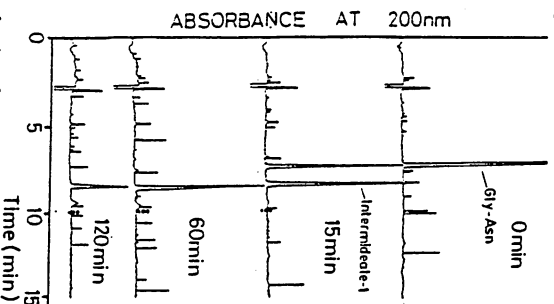


Fig. 3 Capillary electropherogram of partially hydrolyzed Gly-Asn in various intervals.

Hydrolysis : Gly-Asn 1mg in 1ml of 200mM HCl; 110°C
 Electrode solution, 20mM citrate buffer (pH2.5); fused silica capillary tube, 50um i.d. x 72cm (effective length, 50cm); voltage, 30KV; detection, absorbance at 200nm; temperature, 30°C; loading, vacuum loading, 127mmHg, 2.0sec.

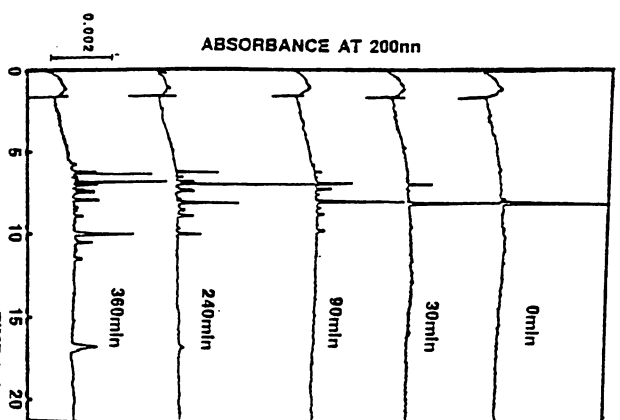


Fig. 5 Capillary electropherogram of partially hydrolyzed AngiotensinII in various intervals.

Hydrolysis : AngiotensinII 1mg in 1ml of 200mM HCl; 110°C
 Electrophoresis conditions were as in Fig. 3

CEによる高分解能ペプチド マッピング

(アプライド バイオシステムズ ジャパン)

○スティーブ カーシャー、萩原佳代子、小畑義充、田中博、銭場俊彦

HIGH-RESOLUTION PEPTIDE MAPPING BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Applied Biosystems Japan, Inc. / Steven W. KIRSHER, Kayoko HAGIWARA, Yoshimitsu OBATA, Hiroshi W. TANAKA, and Toshihiko SEMBA

Peptide mapping is an important step in the investigation of protein and/or gene structure. Many novel techniques have appeared to isolate digested peptides for microsequencing. However, it is very difficult to know the heterogeneity of aliquots before sequencing. FSCE is generally applicable technique based on free solution separation. We can easily judge the contents of a sample in the fmol range. We have compared the mapping feature of FSCE and μ RP-HPLC, and present here a typical example using a mixture of two quite similar synthetic peptides (33 and 34 amino acids each). FSCE has shown extremely high resolution in a milder condition permitting analysis in a more native form of the materials.

【はじめに】 微量蛋白質のマイクロシーケンシングは、自動エドマンシーケンサーによって定着し、広く受け入れられている。しかし、その試料の調製は現在も律速であり、特に限定分解して得たペプチドフラグメントのマッピングは、シーケンシングの成否を決定している。CEはペプチドマッピングに従来ない原理を提供し、過去の難点を解決する先駆となろう。我々はCEと、微量マッピングにおいて最も一般性のある μ RP-HPLCを比較した。CEはより高度のピーク相互分離を達成し、各フラグメントは逆相系と全く異なる移動特性を示した。

【実験】 NLS-I、II (Nuclear Localization Signal)はFmoc固相合成法にて調製した。I、IIは各33、34残基であるがIIはIのN端にCysが付加している。NLSはアミノ酸組成、配列、質量分析によって構造を確認した。 μ LC: ABI 130A、RP-300 (C8、2.1 mm I.D. \times 220mm) カラムを用いた。CE: ABI 270A-HT、50 μ m I.D. \times 68cm (有効長46cm) フェーズド・シリカ管を用いた。

【結果および考察】 ミオグロビン (Mr. 17K) のLys-Cプロテアーゼ消化物は μ LC、CE共にほぼ完全にマップ可能であるがペプチドフラグメントの相対位置は異なっている。したがって両法は別の分離原理に基づいている(H. Tanaka *et al.*, 1990)。NLS-IはNLS-IIの合成副産物として生じた。RP-HPLCにより一段精製した合成NLSは、 μ LCではFig. 1, (A) のクロマトグラムを示した。ピークbはMH⁺: 3896、3793 a.m.u. に質量シグナルが観察され、N端のCysのみ異なる2種のペプチドの混在を確認した。同分画を乾固し、蒸留水に溶解し、約3時間室温に放置すると、S-S結合形成による2量体が生じた(ピークf)。fは還元によりbに変換する。ピークeの後半に認められる肩はNLS-II由来と考えられ、NLS-Iとの若干の分離は認められるが、還元状態では識別できない

(ピーク b)。b を分取し CE にて分析すると、g、h が主ピークとして検出された (Fig. 2, 0 min)。同一バイアルから一定の時間間隔で試料を採取し、測定したところ、ピーク h の減少と i 領域に広いピークが出現する傾向が認められた (20 分以降)。40 分ではピーク h 高が約 1/2 となり i も明らかにピークとして検出することができた。80 分後には 90% の h が消失した。しかし、このシリーズでピーク g 高には顕著な変化は認められなかった (Fig. 2)。以上からピーク g、h は各々、NLS-I、II と同定できた。CE では、33 および 34 残基ペプチドの 1 アミノ酸残基 (Cys) の差を識別可能である。また Cys は分子全体の荷電への寄与は僅少であり、CE のペプチド分離は荷電のみに依存しないことを示唆する。NLS-II 2 量体は、CE と μ LC 上でなぜピークの形状が大きく異なるのか明らかではない。CE において、今回用いた移動溶液は pH6.0 (30mM リン酸ナトリウム) であり、特定の固定相を用いない free solution 分離であることを考慮にいと、NLS は天然に近い分子形を保ちキャピラリー中を移動するであろう。NLS は結合した蛋白質を細胞質から核質へ移行させる活性を有し、一定の立体構造を形成していると考えられる。NLS-II の Cys は蛋白質との複合体を人為的に作成する目的で導入したアミノ酸であり、天然にはこのような 2 量体は生じない。不自然な 2 量体形成に伴う高次構造の変化が、CE 上の振舞に反映しているのであろうか。CE によるペプチドマッピングはそのピーク分離能から、今後、純度検定の基準になるであろう。さらに CE は、ペプチドの立体構造に対する情報を簡易なマッピングを通して取得する手段として、期待が大きい。

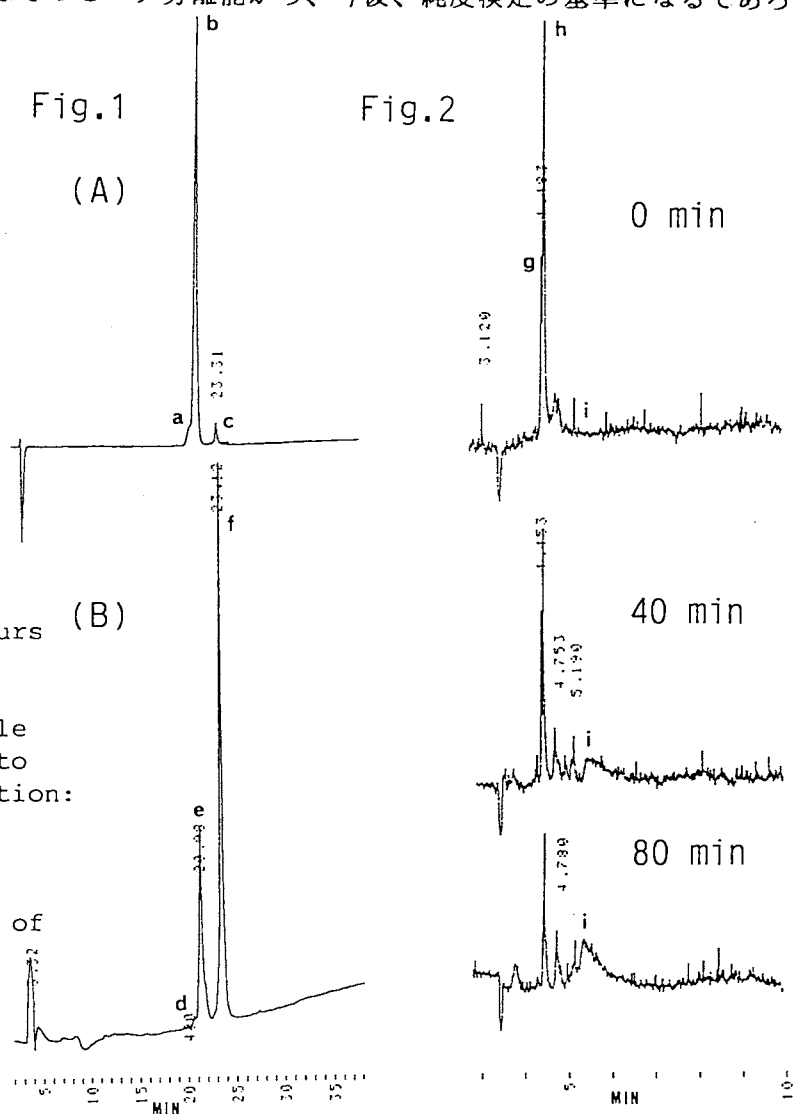


Fig. 1.
LC Profiles of One-step Purified NLS.
(A) Fresh; (B) After 3 hours

Solvent A: 0.1% TFA;
Solvent B: 70% Acetonitrile
in 0.1% TFA; Gradient: 0 to
100 %B over 45 min; Detection:
220 nm

Fig. 2.
Time Course CE Monitoring of
One-step Purified NLS.

Voltage: 30KV; Detection:
200 nm

(京大工¹、姫路工大理²) ○石濱 泰¹、寺部 茂²

OPTICAL RESOLUTION BY ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

¹Faculty of Engineering, Kyoto University²Faculty of Science, Himeji Institute of TechnologyYasushi ISHIHAMA¹ and Shigeru TERABE²

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with chiral surfactants makes it possible to separate optical isomers. Glycyrrhizic acid and β -escin (aescin), which are both triterpenoid saponins, were employed as chiral surfactants. Glycyrrhizic acid, owing to low solubility in water, were used with sodium dodecyl sulfate (SDS) and n-octyl- β -D-glucoside to form a mixed micelle. Under neutral conditions, five dancyl-DL-amino acids were optically resolved. In the use of β -escin with SDS under acidic conditions, nine PTH-DL-amino acids were separated to each enantiomer.

1. はじめに

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) 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分配の原理をとり入れた分離分析法であり、界面活性剤ミセル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。キラルな界面活性剤を用いた場合には、光学異性体の分離も可能となり、胆汁酸塩、アミノ酸誘導体、ジギトニンなどいくつかのものがすでに報告されている。今回報告するグリチルリチン酸、 β -エスシンはトリテルペノイドサポニンに属し、界面活性を持つ安価な天然物である。これらの光学分割能を調べるため数種の DL-アミノ酸誘導体を試料として実験を行った。

2. 実験

キャピラリーは有効長 30 または 50 cm、内径 52 μ m の内面無処理のものを用いた。検出はオンカラムで、 β -エスシンの系では紫外吸収検出器 (JASCO UVIDEC-100-V; 220 nm) を、またグリチルリチン酸の系では蛍光検出器 (JASCO 821-FP S; 励起波長 330 nm、検出波長 530 nm) を用いて行った。分離溶液は 0.1M ホウ酸塩-0.05M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) または 0.05M リン酸塩緩衝液 (pH 3.0) に界面活性剤を加えて調製した。

3. 結果と考察

(1) グリチルリチン酸塩ミセル

グリチルリチン酸は3つのカルボキシル基をもつ陰イオン性トリテルペノイド配糖体だが、水への溶解性が悪く (モノアンモニウム塩を使用)、単独で用いることができなかった。検討の結果、中性条件下、硫酸ドデシルナトリウム (SDS) および n-octyl- β -D-glucoside との混合ミセルを形成させることにより5種のダンシルアミノ酸に対して光学分割が可能となった (Fig.1)。移動順については例えばセリンについては D 体の方が L 体より強くミセルに取り込まれていた。

(2) β -エスシンミセル

Fig.2 のように β -エスシンを含む混合ミセルによってトリプトファンを除く 9 種の PTH-アミノ酸 が良好にキラル分離された。分離は電気浸透流の抑えられた酸性条件下で行い、この条件下では電荷を持たない β -エスシンは SDS と混合して用いた。ミセル組成において β -エスシンの割合を大きくすることで分離は向上したが、ミセルの電荷の減少にとともに、分析時間は長くなった。メタノールの添加は、 k' を減少させたが、キラル分離への効果はほとんどみられなかった。また、中性条件下では光学分割は達成できなかった。

β -Escin 25 mM
SDS 50 mM
pH 3.0

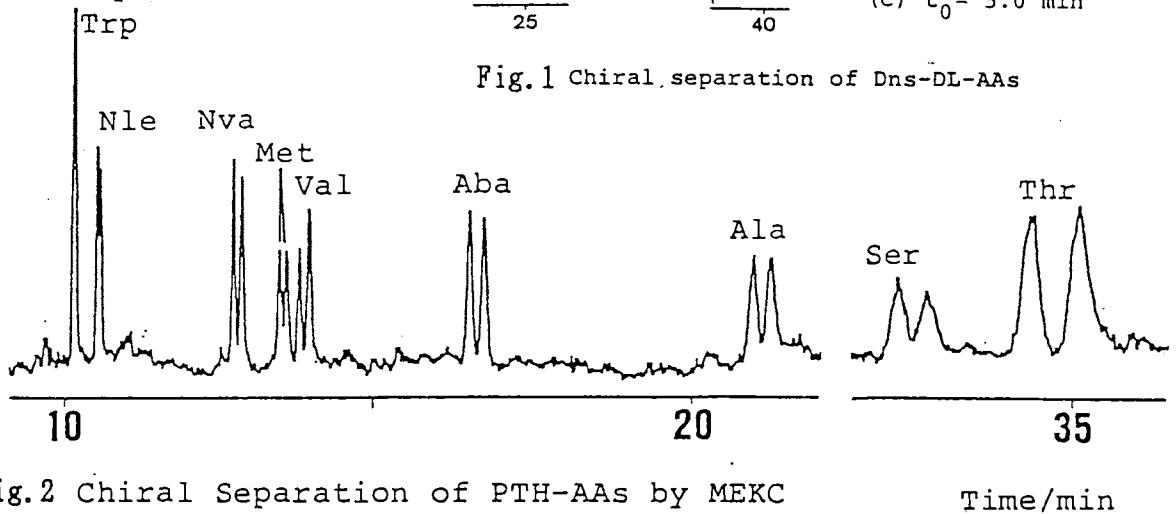
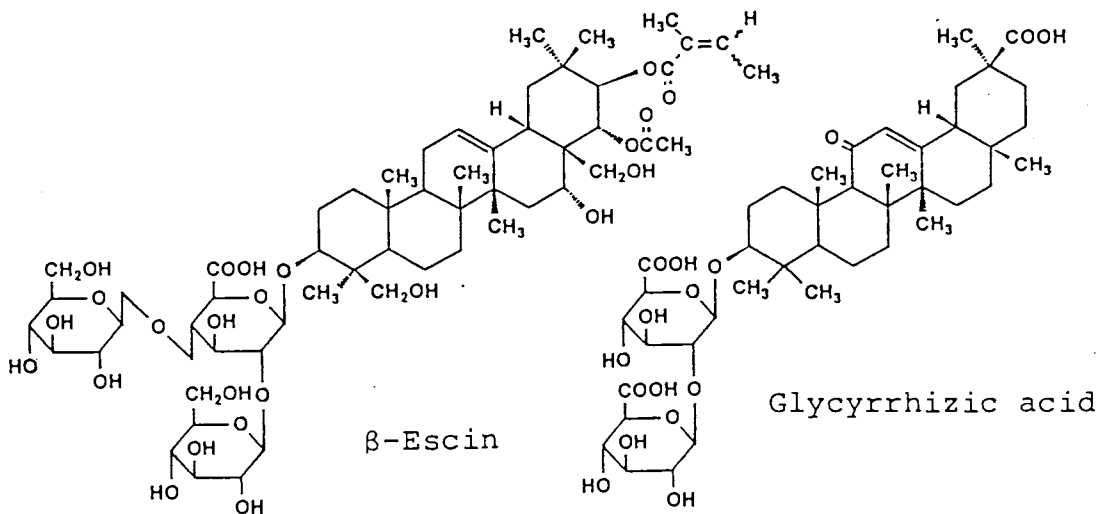


Fig.2 Chiral Separation of PTH-AAAs by MEKC

Time/min



ミセル動電クロマトグラフィーの
生薬分析への応用 III

人参中のジンセノサイドの分離

(大阪府立公衆衛生研究所¹、京都大学薬学部²)○岩上正藏¹、沢辺善之¹、中川照眞²MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY FOR THE ANALYSIS OF
CRUDE DRUGS III. SEPARATION OF GINSENOSESIDES IN PANAX GINSENGShozo IWAGAMI¹, Yoshiyuki SAWABE¹ and Terumichi NAKAGAWA²¹Osaka Prefectural Institute of Public Health and²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with a running buffer solution containing sodium cholate (CA) as an anionic carrier was applied to the separation of commercially available ginseng saponins, such as ginsenosides R_{b1}, R_{b2}, R_c, R_d, R_e, R_f and R_{g1}. The effect of cyclodextrin (CD), urea or organic solvent (methanol or acetonitrile) on the separation of ginsenosides was investigated. Separation was achieved using a 102cm × 50μm I.D. fused silica capillary tube filled with 20mM phosphate buffer solution (pH 7) containing 25% acetonitrile and 75mM CA at 30kV DC voltage. Under these condition, seven ginsenosides mentioned above were separated each other from the methanol extracts of Panax Ginseng.

[緒言]

人参は滋養強壯、健胃、鎮静などの目的で漢方処方に繁用される重要生薬であり、その主要成分であるジンセノサイド類には数多くの生物活性が認められている。人参中のジンセノサイド類の分離定量法には複雑な前処理や分析条件を必要とするものが多く、またこれらのジンセノサイド類を同時に分離することが困難である場合も少なくない。今回我々は、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) を用いて、人参中のジンセノサイド類の分析条件設定のための基礎的検討を行ない、標準品の入手が可能な7種のジンセノサイド類について、簡便な同時分析条件を見出すことができたので報告する。

[実験]

装置はアプライドバイオシステムズ社のModel 270Aを使用した。分離用のキャピラリーは内径50μm、長さ72cmあるいは102cm(有効長50cmあるいは80cm)のフューズドシリカ管を用い、200nmでオンカラム検出した。試料の注入は陽極より装置のvacuum systemを用いて1.5秒間行なった。支持電解質溶液には20mMホウ酸-リン酸緩衝液 (pH7~9) あるいは20mMリン酸緩衝液 (pH7,8) を用いた。キャリアーにはコール酸ナトリウム (CA) を使用した。キャピラリーは分析のたびに0.1N NaOH ついで泳動用緩衝液で洗浄した。実験はすべて35℃で行ない、印加電圧は20kVあるいは30kVとした。試薬類は市販品をそのまま使用した。

[結果]

CA濃度の検討 実験に用いたジンセノサイド類はすべて中性サポニンであるため、緩

衝液中にCAを含まない場合には電気浸透流とほとんど同じ位置に溶出した。CA濃度が25mMの時に protopanaxatriol系のジンセノサイド類 (R_e , R_f , R_{g1})の分離は可能であったが、protopanaxadiol系のジンセノサイド類 (R_{b1} , R_{b2} , R_c , R_d)の分離は不可能であった。CA濃度の増加につれて後者の分離は改善される傾向を示したが、前者の分離は反対に悪くなった。なお、CA濃度が同じであれば、緩衝液の種類及びpHに関係なくほぼ同じ分離パターンが得られ、CA濃度が50mMあるいは75mMの時に比較的良好な分離が得られた。しかし、いずれのCA濃度(0~150mM)においても R_{b2} と R_c の分離はできなかった。また、印加電圧を20kVから30kVに上げてても分離自体はそれほど改善されなかった。したがって、以下の実験はCA濃度50mMあるいは75mMのホウ酸-リン酸緩衝液(pH 8)を用いて印加電圧20kVで行なった。

シクロデキストリン(CD)の添加 γ -CDを15mMあるいは30mM添加することによって protopanaxadiol系のジンセノサイド類の溶出が早くなった。これは γ -CDと安定な包接化合物を形成するためと考えられる。しかし、分離はむしろ悪くなった。一方、 β -CDを25mMあるいは50mM添加した場合は protopanaxatriol系のジンセノサイド類の分離が少し改善された。

尿素の添加 尿素を3Mあるいは6M添加した場合には protopanaxatriol系のジンセノサイド類の分離は改善されたものの、protopanaxadiol系のジンセノサイド類の分離は悪くなった。

有機溶媒(MeOH or MeCN)の添加 MeOHあるいはMeCNを20%含有する緩衝液を用いた場合に、 R_{b2} と R_c が分離する傾向が認められ、有機溶媒の比率を30%にすると分離はさらに改善された。CAの濃度は50mMよりも75mMの方が両者の分離は良好で、その他のジンセノサイド類も分離可能であった。

また、CA濃度を75mM、MeOH比率を20%に固定して改めて緩衝液の種類とpHを検討したところ、pHは7が良好で、緩衝液はいずれでもよいことがわかった。

キャピラリーの長さの検討 以上の実験は72cmのキャピラリーを用いて行なったが、最後にキャピラリーを長くすることによって分離が改善されるかどうかを検討した。キャピラリーは102cmとし、印加電圧は30kVとした。また、緩衝液はpH 7のホウ酸-リン酸緩衝液とリン酸緩衝液を用い、CA濃度は75mM、有機溶媒の比率は20%あるいは30%という条件で行なった。その結果、リン酸緩衝液の方が R_{b2} と R_c の分離が良好であることがわかった。また、MeCNを用いる方がMeOHを用いるよりも分析時間が短かく、シャープなピークが得られた。MeCNの比率については R_{b1} と R_{b2} の分離も考慮して25%が適当であった。

キャピラリーの長さ102cm、印加電圧30kV、CA濃度75mM、MeCNの比率25%の20mMリン酸緩衝液(pH 7)を用いて行なった人参中のジンセノサイドの分析例を図1に示す。

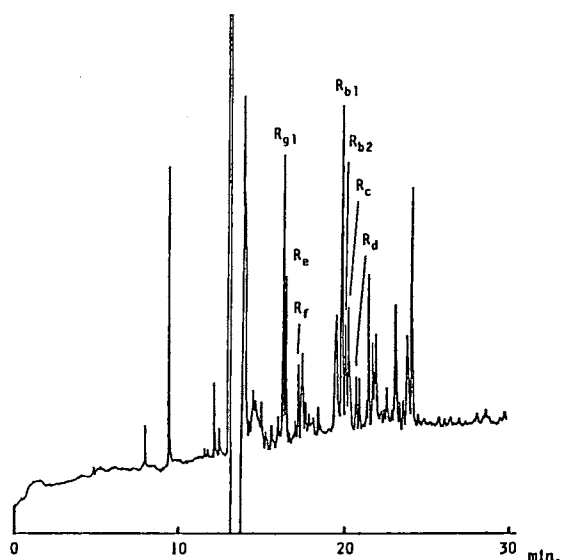


図1 人参中のジンセノサイド類の分離

有機溶媒を添加した動電クロマトグラフィーによるペプチドの分離(2)

(協和醗酵・医薬研) ○八島利幸, 土谷昭浩, 森田收

Separation of peptides by electrokinetic chromatography with organic modifier (2)

Toshiyuki Yashima, Akihiro Tsuchiya, Osamu Morita (Pharmaceutical Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

Four kinds of insulin (bovine, porcine, equine and sheep) are almost equivalent in the charge and the size. So these insulins are not separated by capillary zone electrophoresis(CZE). But by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with organic modifier, these insulins were separated completely. Cationic surfactant was used at low pH, and anionic surfactant was used at high pH. And the application range of this technic was investigated.

1. はじめに

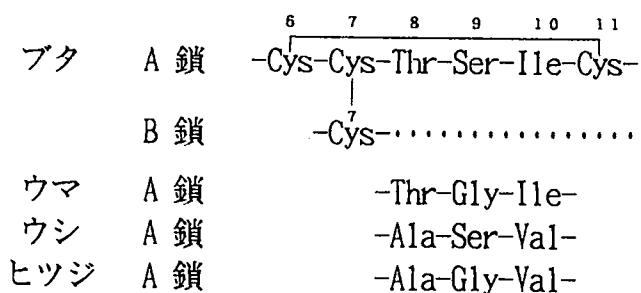
キャピラリー電気泳動(CE)は分離効率のよい新しい分離分析法として期待されているが、その中でミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)は通常のゾーン電気泳動(CZE)では分離できない中性試料や移動度の同じ試料を分離する手段として用いられている。しかしたん白質などの疎水性の大きな試料はミセルとの相互作用が強過ぎるためMEKCに適さない。我々はこの問題を解消するために、MEKCの泳動溶液に有機溶媒を添加し、たん白質あるいは大きなペプチドのミセルへの分配を抑える方法を検討している。

既にアミノ酸残基 22 個のペプチドであるモチリンの分離を報告している¹⁾が、今回はさらに分子量の大きなペプチドとしてインシュリンの分離を試みた。インシュリンはアミノ酸残基数21 個のA鎖と 30 個のB鎖が2本のS-S結合で結合されたペプチドであり、総アミノ酸残基数は51 個、分子量は5807(ヒト)、等電点は5.3~5.4である。このインシュリンの中でブタ、ウシ、ウマ、ヒツジのインシュリンはそれぞれB鎖が全く同じでA鎖の8位から10位のアミノ酸残基のみが異なる(Fig. 1)。しかも置換されたアミノ酸は全て中性アミノ酸で電荷が等しく、4種のインシュリンはほとんど同じ移動度を示すため、通常のCZEでは分離できない。

今回は酸性ではカチオンの、塩基性ではアニオンの界面活性剤を用い、さらにアセトニトリルを加えてこれらのインシュリンの分離を試みた。

また、MEKCに有機溶媒を添加して分離する方法がどの程度の大きさのペプチド、たん白質に適用できるかについても検討した。

Fig. 1 各インシュリンの部分アミノ酸配列



2. 実験

装置は前報¹⁾と同じ自作のものを用い、キャピラリーは内径 50 μm 、全長 65 cm (検出器まで 50 cm) のフューズドシリカ管を使用した。緩衝液は酸性では 50 mM 酢酸塩緩衝液、塩基性では 50 mM ホウ酸塩緩衝液を使用した。試料のインシュリン及びエンドルフィン¹⁾は市販品 (SIGMA) をそのまま使用した。

3. 結果及び考察

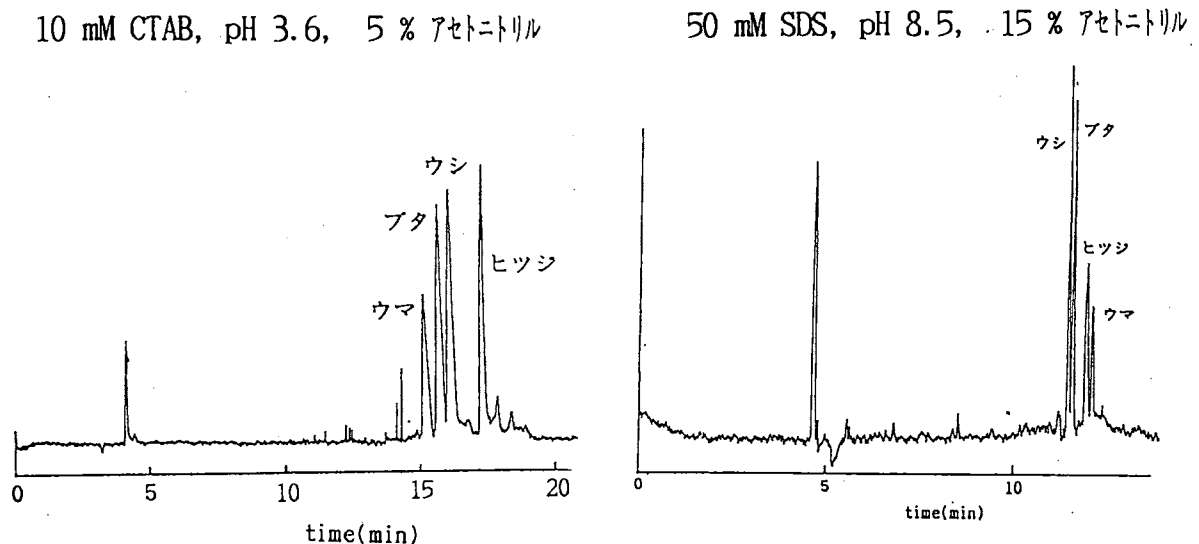
酸性条件ではカチオンの界面活性剤として臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を用いた。10 mM CTAB を含む酢酸塩緩衝液 (pH 3.6) の泳動溶液ではインシュリンは未分離であったが、アセトニトリルを加えると分離し、5 % アセトニトリルの条件で4種のインシュリンがほぼ完全分離した。また、pH 4 では5 % アセトニトリルでほとんど分離せず、15 %以上アセトニトリルを加えた場合の方が分離が良くなった。これは pH がインシュリンの等電点 (5.3 ~5.4) に近付くにつれてインシュリンの疎水性が増しミセルとの相互作用が強くなったためと考えられる。

また、塩基性の条件ではドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いたが、50 mM SDS を含む50 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.5) の泳動溶液では分離しなかったインシュリンが、アセトニトリルを加える (15 %) ことによって酸性の場合と同様にほぼ完全分離することができた。

酸性条件の場合と塩基性条件の場合を比較すると、泳動順が異なることが分かる。両方で浸透流の方向が違うため泳動方向は逆になるが、ミセルと相互作用の強いものほど泳動時間が遅くなるという点ではどちらも同じはずである。この違いの原因は pH の違いによる試料の物性の違い、界面活性剤の種類による違いなどが考えられる。

またエンドルフィン類のペプチドを用いて、どの程度の大きさのペプチドで有機溶媒の添加が必要になるかを調べた。これはアミノ酸組成や pH などの泳動条件によって異なってくるが、一般にアミノ酸残基数 10 個以下のペプチドでは有機溶媒無添加でも分離できるが、アミノ酸残基数 20 個以上のペプチドでは有機溶媒の添加が必要と思われた。

Fig. 2 4種のインシュリンの分離



1) 八島利幸、土谷昭浩、森田收、第2回クロマトグラフィー科学会要旨集、53 (1991)

(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²⁾)
 P.Jandik¹⁾ W.R.Jones¹⁾, J.Romano¹⁾, ○高橋 孝行²⁾

Application of inorganic capillary electrophoresis

¹ P.Jandik, ¹W.R.Jones, ¹J.Romano and ²Yosiyuki Takahashi

Capillary Ion Analysis is a capillary electrophoretic technique optimized for the rapid analysis of highly mobile small molecular weight ions. These ions are separated according to their mobility in Waters NICE-Pak™ chemistries (patent pending) consisting of UV absorbing background electrolytes and electroosmotic flow modifiers. Detection is based on indirect UV since the majority of anions and cations do not absorb UV energy at 214 and 254 nm. The rapid analysis of the analytes is achieved through the electroosmotic flow modifiers (OFM) for anions and electrolyte pH for cations. The result is the bulk flow of the electrolyte in the capillary to go in the same direction as the in solution.

【要約】

Capillary Ion Analysis (CIA™) は高速で電気泳動される定分子イオンをキャピラリー電気泳動で分析する技術で、陰イオンはナイスパック™ (ウォーターズ) を用いた泳動バッファーで分離される。検出は主な陰イオン、陽イオンがUV吸収 (214 nm、254 nm) を持たないためインダイレクト法を用いる。高速分析のキーとして陰イオンはオスモシスモディファイアー、陽イオンはバッファーのpH、キレートの利用がある。ともにオスモシスフローの方向とイオンが泳動される方向とが同一方向を持つことにより高速分析ができる。

【実験】

分析機器としてウォーターズクウォンタ4000キャピラリー電気泳動システムを用い、キャピラリーは75 μm x 60 cm (検出器まで52.5 cm)、検出は陰イオンに254 nm、陽イオンに214 nmを用いインダイレクト法で行なった。泳動バッファーは陰イオン用に5 mMのクロム酸、0.4 mMナイスパック™ (pH 8.0)で行なった。また陽イオン (アルカリ、アルカリ土類、遷移金属) は5 mM UVCat-1

(ウォーターズ)、6.5 mM ハイドロキシイソ酪酸 (シグマ) pH 4.4 を、希土類用に 10 mM UVCat-1、4.0 mM ハイドロキシイソ酪酸 (シグマ) pH 4.4 を用いて行なった。

【結果・考察】

Fig-1 は 36 種の陰イオン、有機酸、直鎖アルキルスルホン酸を分離したエレクトロクロマトグラムである。各イオンのイオン当量導電率の順に泳動される。これは 90% のイオンがこの法則に従う。(例外としてヨウ素、チオシアン、過塩素酸等疎水性イオン)

分離能、マイグレーションタイムは pH あるいはバッファーの種類を変えることによりコントロールすることができる。陽イオンは Fig-2、3 に示す様に分離に錯体を形成させ行なった。バッファー中に金属イオンと錯体を形成する物質 (クエン酸、酒石酸、シュウ酸、ヒドロキシイソ酪酸) を加えることにより陽イオンの移動度が影響を受ける。錯体を形成しない場合移動度は大きく、イオンが錯体を形成した時は移動度が小さくなる。各陽イオンはバッファー中でフリーと錯体との平衡状態にあり、この差により泳動速度が異なってくる。泳動電圧を上げキャピラリーの長さを短くすることにより高速分析ができた。高感度分析

の要素は数々考えられるがたとえばキャピラリーの内径が太い (75 μ)、バックグラウンドのイオンのモル吸光係数が高いこと、亜鉛ランプの 214 nm 輝線が強いことなどが考えられる。

この CIA™ 法を用いることにより短時間で、より多くのイオンを分離することができた。

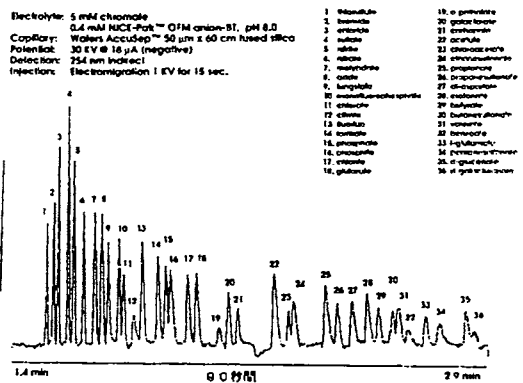


Fig-1 陰イオン 36 種の分離

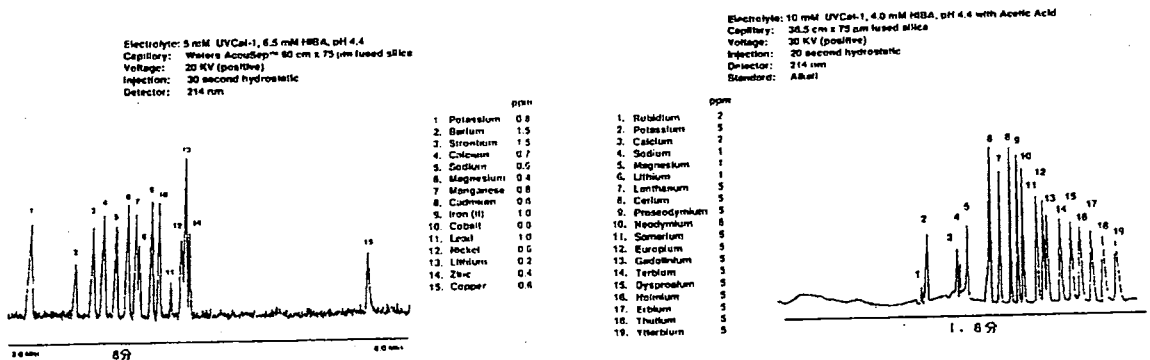


Fig-2 アルカリ、アルカリ土類、遷移金属の分離 Fig-3 アルカリ、アルカリ土類、希土類の分離

(岡山大・理) ○ 本水昌二, 松田伸也,

SEPARATION AND DETERMINATION OF ALKALINE-EARTH METAL IONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Faculty of Science, Okayama University, Tsushimanaka, Okayama 700, JAPAN
Shoji MOTOMIZU and Shin-ya MATSUDA

Capillary electrophoresis separation of alkaline-earth metal ions was examined with UV light-absorbing chelating agents. EDTA analogues were examined: they were EDTA, CyDTA, GEDTA, DTPA, NDTA and PDTA. These were added to the carrier solution. The metal chelates separated in the capillary were measured by on-column UV-absorption detection (200 nm). The order of the migration time of the chelates was: $Ba^{2+} < Sr^{2+} < Ca^{2+} < Mg^{2+}$ (Be^{2+} could not be detected). The best separation of four alkaline-earth metal ions was achieved with CyDTA. Methods with EDTA and CyDTA was applied to the determination of Ca^{2+} and Mg^{2+} in water samples. A method with PDTA was very sensitive and applicable to the determination of metal ions at concentrations of $10^{-6}M$.

1. はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動法(以下CE法と略記)は荷電物質の分離と分析のための非常に強力な手法として約10年前Mikkersらにより紹介された¹⁾。以後主に生化学, 医学, 薬学方面でタンパク質, ペプチド, アミノ酸, 糖など多くのバイオ関連物質の分離に用いられてきたが, 無機イオンに関する研究例は非常に少ない。そこで演者らはCE法の分離と検出原理の単純さ, 高分離能, 装置の自動化の容易さに着目し, 金属イオンの定量を主目的に検討を進めてきた²⁻⁴⁾。現在広く用いられている紫外吸光検出器では, キャピラリー径が通常50 μm 程度と極端に細いため光路長が短く, 濃度感度は一般に低い。しかし金属イオンを対象とする場合には, キレート形成などの手法でモル吸光係数の大きいイオン種への誘導体化により, 感度向上が可能となる。本研究では金属イオンをEDTA類縁キレート剤により陰イオンとし, 分離・定量することを検討した。さらに実際試料として天然水中の硬度(Ca^{2+} と Mg^{2+} 濃度)測定へ応用した結果について述べる。

2. 実験

試薬 キャリヤー溶液としてはEDTA類縁キレート剤(市販のEDTA, CyDTA, GEDTA, DTPA及び合成のNDTA, PDTA)を含む20mMホウ砂溶液(pH9.2)を用いた。試料溶液としては基礎検討の場合には2mMキレート剤を含むpH9.2の溶液を用いた。

装置 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製ABI Model 270Aを用いた。キャピラリーは内径50 μm , 外径375 μm のヒューズドシリカチューブで, 検出器までの長さ(L_b)25~75cmのものを用いた。

操作 測定開始前に1M NaOHで5分間洗浄し, 次に純水で5~7分間すすいだ後キャリヤー溶液を満たす。試料が通常の河川水などの場合にはキャリヤー溶液を2~3分間流すだけでよい(キャピラリー洗浄には約1.5分間を要す)。試料導入は装置付属の減圧システム(-127mmHg)を使用し, 陽極側から導入した。泳動は35 $^{\circ}C$, 20~30KVの定電圧で行った。キレートの検出は200nmで行った。なお試料水は0.2 μm のメンブランフィルターで濾過した後使用した。

3. 結果と考察

3.1. キレート剤の電気泳動移動度(μ_{ep})

Table 1に主な金属イオンの移動度 μ_{ep} を示す。いずれのキレート剤においても Be^{2+} のピークは検出されず、又NDTAではアルカリ金属イオンは検出されなかった。EDTA, CyDTA以外では検出されない金属イオンも見られる。Fig. 1にCyDTAを用いた場合のelectropherogramの例を示す。5%エチレングリコールを含むキャリアを用いることにより、4つのアルカリ土類金属が分離されている。他の二価金属のピークは Mg^{2+} よりも遅れるため、共存していても妨害とはならない。

3.2 分離及び定量の再現性

Table 2に($Ba^{2+}+Ca^{2+}+Mg^{2+}$)の混合試料を各々3回測定した平均値と平均値からの最大偏差を示す。 μ_{ep} 値は実験誤差の範囲内でよく一致している。また実際分析に必要なピーク高、ピーク面積においても、バラツキも比較的小さく、十分定量に使用できることが分かる。

3.3 実際試料分析への応用

Ca^{2+} , Mg^{2+} とEDTA, CyDTAとの安定度定数は十分大きく、キャピラリー内を泳動中にキレートを形成することができるので、試料水を、メンブランフィルターで濾過後、そのまま使用してもよい。またEDTAの場合、分析時間を短縮するために短いキャピラリー($L_D=25cm$)を使用することもでき、4分以内で Ca^{2+} と Mg^{2+} の鋭いピークが現れる。

$L_D=25cm$ のキャピラリーでは Mg^{2+} のピーク高の相対標準偏差(RSD)が若干大きい、RSDはほぼ2%以内で定量された。通常の長さのキャピラリー($L_D=50cm$)を用い20kVで操作すると、分析時間は約10分必要となるが、バックグラウンドが改善され、RSDも改善された。

4 結語

キャピラリー電気泳動法による金属イオンの定量を検討した。本研究では主にアルカリ土類金属イオンについて行ったが、他の金属イオンにも十分応用可能である。

Table 1 Ionic mobilities of metal chelates

Metal ions	$-\mu_{ep}$					
	CyDTA	EDTA	GEDTA	DTPA	PDTA	NDTA
Fe^{3+}	2.31	4.00	ND	3.60	3.28	ND
Ba^{2+}	3.04	3.13	3.06	4.28	2.88	ND
Sr^{2+}	3.07	3.18	3.19	4.27	3.39	ND
Ca^{2+}	3.09	3.19	3.34	4.33	3.39	ND
Mg^{2+}	3.17	3.39	ND	4.25	3.55	ND
Be^{2+}	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cd^{2+}	3.40	3.75	3.32	4.39	3.57	3.42
Mn^{2+}	3.43	3.86	3.27	4.30	3.59	3.50
Hg^{2+}	3.45	3.84	3.33	4.43	3.63	ND
Co^{2+}	3.56	4.02	3.50	ND	3.73	3.75
Ni^{2+}	3.61	4.02	ND	ND	3.63	3.70
Pb^{2+}	3.61	3.95	3.33	4.35	3.75	ND
Zn^{2+}	3.62	4.04	ND	ND	3.74	3.71
Pd^{2+}	3.63	4.00	3.53	ND	3.78	3.63
Cu^{2+}	3.66	4.11	ND	ND	3.80	3.77

CyDTA: 1,2-cyclohexanediaminetetraacetic acid

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

DTPA: diethylenetriaminepentaacetic acid

GEDTA: glycoetherdiaminetetraacetic acid

PDTA: 1,2-phenylenediaminetetraacetic acid

NDTA: 1,8-naphthalenediaminetetraacetic acid

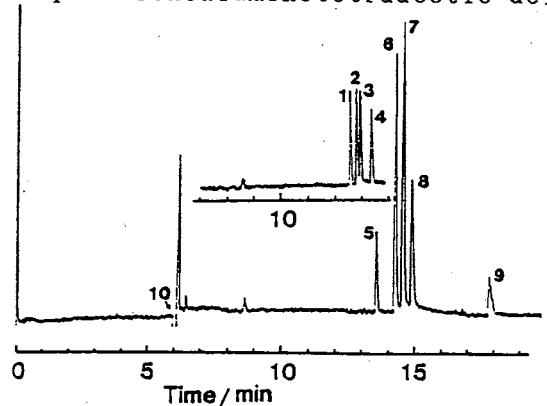


Fig. 1 Electropherograms for metal chelates
Carrier: 20mM borax + 2mM CyDTA + 5% ethylene glycol.
Samples contained 2mM CyDTA.

1 Ba^{2+} ; 2 Sr^{2+} ; 3 Ca^{2+} ; 4 Mg^{2+} ; 5 Cd^{2+} ; 6 Co^{2+} ;
7 Ni^{2+} ; 8 Cu^{2+} ; 9 CyDTA; 10 water dip.

Table 2 Results for reproducibility

Sample	t_m^{*1}	t_m^{*2}	$-\mu_{ep}^{*3}$	PH ^{*4}	PA ^{*5}
Ba^{2+}		10.61±0.01	3.12±0.01	2.99±0.06	1.40±0.06
Ca^{2+}	5.05±0.01	10.81±0.01	3.17±0.01	2.96±0.05	1.68±0.05
Mg^{2+}		11.67±0.01	3.37±0.01	2.04±0.05	1.28±0.07

*1 Time necessary for water zone of the sample to reach the detector. *2 Migration time. *3 Electrophoretic mobility.

*4 Peak height, cm. *5 Peak area, $10^4 \mu V s$.

1) F. E. P. Mikkers et al., J. Chromatogr., 169, 11 (1979). 2) 本水昌二, 西村真一: 第52回分析化学討論会講演要旨集, p369 (1991). 3) S. Motomizu, S. Nishimura, Y. Obata and H. Tanaka: IUPAC International Congress on Analytical Sciences 1991, Abstract, p190 (1991) (Makuhari-Messe). 4) S. Motomizu, S. Nishimura, Y. Obata and H. Tanaka: Anal. Sci., in press.

Timothy D. Schlabach, Jim L. Powers
Spectra-Physics Analytical

ABSTRACT

Capillary electrophoresis using indirect detection is an important alternative to traditional ion chromatographic methods. (1-3) Effective anion analysis by HPCE requires the elimination or reduction of electroosmotic flow (EOF) to prevent back flow of analytes into the electrolyte buffer. Various coatings for HPCE capillaries have been described and reviewed (4). CE coatings which use various silanes are becoming commercially available, Silane coatings are unstable over a period of several days and do not eliminate EOF sufficiently for successful anion analysis. (5) Methyl cellulose coatings offer an easy to use alternative to commercial reagents for the indirect analysis of anions.

Methyl cellulose, as a coating for electrophoretic analysis to eliminate EOF, has been used by Hjerten since 1968. (6,7) Originally, these coatings were used for the analysis of proteins, to slow the migration and to prevent analyte adsorption to the silica walls. Inorganic anions, such as thiosulfate, sulfate, chloride, carbonate and fluoride can be measured by indirect detection, if methylcellulose is used as a coating. Methyl cellulose can be applied to a capillary overnight at 60°C and will eliminate EOF and is stable for at least one month, when performing routine analysis. Because methyl cellulose is uncharged, variations in EOF due to changes in buffer pH, temperature, and concentration are eliminated.

INSTRUMENTATION:

A Spectrophoresis 1000 or Spectrophoresis 500 was used for indirect capillary anion electrophoresis analysis. The scanning mode was used to determine wavelength which gives best signal/noise levels for each analyte (210 nm) for a 10mM borate/2mM KH phthalate buffer in the single wavelength mode gave best sensitivity. Electrophoregrams were recorded and processed by Spectrophoresis software running on an IBM PS/2 PC with 6MB RAM, an Intel 387 math co-processor, and OS2 operating system, using negative peak logic to integrate negative peaks. On the SP500, an SP4400 electronic integrator was used with analog leads reversed to give positive deflections of negative peaks.

MATERIALS AND METHODS:

Reagents: All analytes were purchased analytical grade from sigma Chemical, St. Louis, MO. Methyl cellulose, viscosity 4000cp, was dissolved in cold DI water to 0.4% w/w. A stock solution of 100mM Boric acid was adjusted to pH 9.0 with 100mM NaOH. Potassium hydrogen phthalate was added to 20mM. The 20mM KHP/100mM Borate stock solution was diluted 1:10 for the running electrolyte, the pH of the resulting solution was measured at pH 8.2. Stock solutions of analytes were made to 0.1% with DI water and diluted for generation of standard curves.

Capillary treatment: Fused silica capillaries (75u I.D. x 360u O.D.) were purchased from PolyMicro Technology, Phoenix, AZ. The capillaries were threaded into a cassette and a window was burned and aligned with the on-capillary flow well before treatment. The capillary was 44cm from electrode to ground and 39cm to the detector assembly. The capillary was rinsed in distilled water and allowed to condition for 2 hrs at 40C with 1N NaOH to remove surface contaminants. A 0.4% Methyl cellulose was pulled into the capillary by vacuum: a step in the baseline indicated that the methyl cellulose has passed the detector, usually in about 1 minute. Vacuum was applied for 1 more minute and the capillary was allowed to sit in the instrument for 12 hours at 60C. The capillary was rinsed with DI water for 2 minutes and indirect analysis electrolyte for two minutes. A Solution of 100ppm Chloride was vacuum injected to determine if the coating was successful.

RESULT AND DISCUSSION:

Thiosulfate, chlorate, sulfate, fluoride and carbonate are simple anions which industrial laboratories are often asked to quantify, especially in sample matrices which are unsuitable or undesirable. The results shown are examples which indicate the capabilities of HPCE for indirect anion analysis. Standard curves are linear over a 200-fold range with a limit of detection of <500ppb. The dependence of migration times on temperature is demonstrated. The analyst must control temperature, otherwise, migration times may shift and peaks may be misidentified, especially in analyses with close separations or short analysis times. Multiple analyses can be performed, often in a fraction of the time with minimal sample preparation.

An indirect anion analysis system has been described which uses a methyl cellulose coating to eliminate electroosmotic flow. The method is easy, stable and does not require proprietary reagents.

33 無担体電気泳動におけるDNAの分離挙動

(城西大学理学部化学科¹⁾、東海大学医学部分子生物学²⁾)

○小林英三郎¹⁾、松田徹、松野巖、石井直明²⁾

Some Separation Behaviors of DNAs in Free Flow Electrophoresis

Hidesaburo KOBAYASHI, Toru MATSUDA¹⁾, Iwao MATSUNO and Naoaki ISHII²⁾

1) Department of Chemistry, Faculty of Science, Josai University and

2) School of Medicine, Tokai University

On the development of separation technology for biological and biochemical sciences, it is clear that the methods which were based on chromatography and sedimentation theories have become even more important for separating the samples in those fields. Nevertheless, methods which are based on the former theory may be not so easily applicable to separate large molecules or large size particles each other. On the other hand centrifugation methods are suitable for separating particles which have different densities and sizes. Therefore, there are "missing ring" between those methods. Electrophoresis which is based on an entirely different theory from above methods have been chaining "missing ring", for example, the separation of 1.2Mb DNA by using of pulse field electrophoresis. However, on the separation of large size DNA, free flow electrophoresis (FFE) is more advantageous method in comparison with gel electrophoresis.

We will discuss on the separation behavior of DNAs on the method of isoelectrofocussing by using a free flow electrophoresis instrument.

はじめに

細胞の構成成分や生体成分を分離する技術は長足に発展してきており、この分野におけるクロマトグラフィーと遠心分離の技術の果たしてきた役割は大きい。しかしながら、前者はその対象とすることができる分子量または粒子サイズには限界があり、巨大な分子や粒子を分離対象にすることは困難となる。また後者においては分離対象となるものは通常比較的比重差が大きく異なるものに限られている。従って、細胞の構成成分や生体成分の分離技術において、これら2つの分離技術の間には"missing ring"が存在することになる。電気泳動の原理にもとづく分離分析技術は、この"missing ring"をも刻々とつなぎながら発展してきており、最近の結果では、ゲルを支持体としたパルスフィールド電気泳動法により1.2Mbの巨大DNAをも分離した例が報告されている。しかしながら、DNAはその基本構造であるdouble helixでさえも直径2nmあり、chromatin構造を取れば数十nmから数百nm、またchromosomeでは1400nmとなり、その長さを考慮すればバクテリアのサイズに匹敵するものとなる。これらのような巨大サイズである分子または粒子を分離するためには、支持体の存在はかえって障害になり、無担体電気泳動 (FFE: free flow electrophoresis)法を使用することが有利と考えられる。

この報告では、FFE装置を用い等電点電気泳動法により、様々なサイズをもつDNAを対象としてその分離を試み、分離挙動に対する考察を行なう。

方法と結果

無担電気泳動装置 : BENDER & HOBEIN 社 Elphore Vap II

泳動槽内寸法 : W100 X H450 X T0.5 (mm)

電極 : Pt-Pt 最大供給電力 : 1500V X 660mA 分画本数 : 90 本

電極緩衝液 : トリシュー酢酸緩衝液 pH 7.2

泳動緩衝液 : 0.01%-0.5% Ampholine または Sepaline acidic fraction と
0.1-10mM Asp および Gly.

泳動槽温度 : 5C 電気泳動電流 (定電流) : 10-40mA

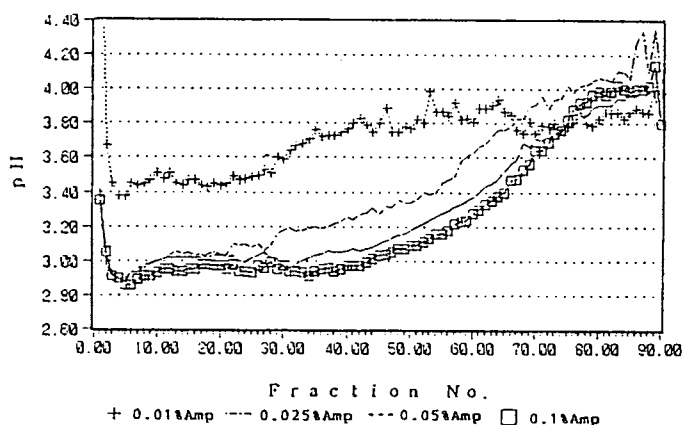


Fig.1 pH profile by using of carrier ampholites on FFE-IEF

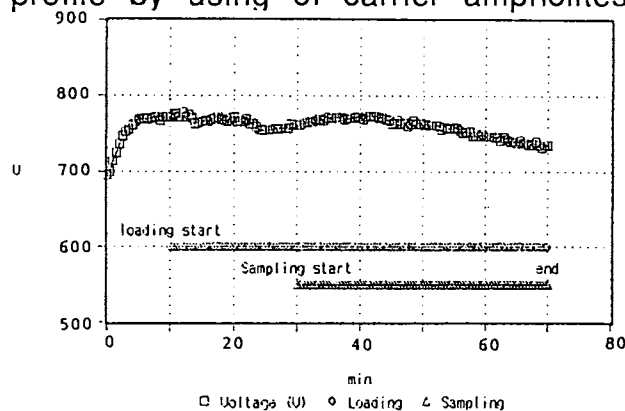


Fig.2 Profile of voltage change on FFE-IEF

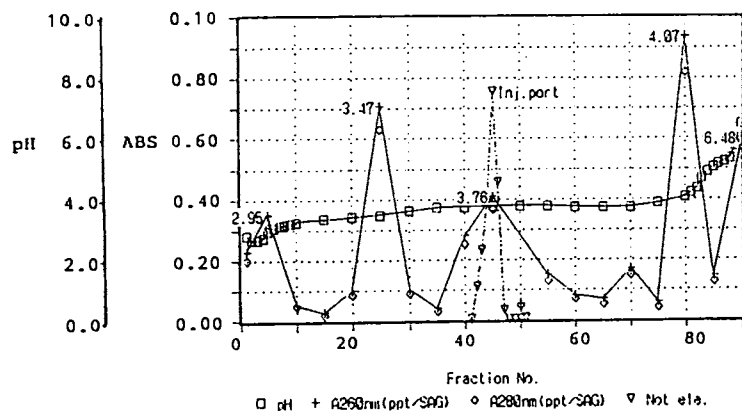


Fig.3 pH and UV absorption profiles of fractions on FFE-IEF

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 also possible to retain a solute in the column during under pressurized flow, if the velocity due to its mobility toward to the column inlet is higher than the velocity due to the pressurized flow. For instrumentation, the key factor is how to solve the heat dissipation due to Joule heating in the column. And second it is necessary to control the bubble generated. Electric field is very attractive as it is the very easy to apply on the column compared to the other fields. We will present the state of art of this separation method.

電場は磁場、重力場と異なり非常に安価に得られる”場”である。一方、私たちはかなり進歩した液体クロマトグラフィー充填剤が利用できる立場にある。この二つの組み合わせが一つの新たな手法として成立してゆく(1)。

I. 電気クロマトグラフィーの特長。

電気クロマトグラフィーは溶質の電場による電気移動度と充填されている固体相(中空キャピラリーカラムでは壁面の固定相)への溶質の分配の二つの因子を持ち、クロマトグラフィーの基本因子、流れの場で分離が進行する。アクリルアミドスラブゲル電気泳動において、例えば添加する電解質濃度を下げてゆくとゲルと試料間に吸・脱着の平衡が生じて電気クロマトグラフィーとなる。電気クロマトグラフィーを特長づける因子として①流れの場②電気移動度③相平衡④固定相と移動相の存在が挙げられる。

電気クロマトグラフィーにおける①流れの場は電場の印加による電気浸透流、ポンプ送液による圧力差流、ポンプを用いずに自然流下で生じる流れ(圧力差流)などがある。極端なものとして、これらの流れが全く無い場合も考えられる。圧力差流を用いず電気浸透流のみを用いる電気浸透流送液液体クロマトグラフィー(2)(英語ではElectro osmotic driven chromatography(3))がある。これは一種の電気クロマトグラフィーに入れるのが妥当である。

②電気移動度の存在については多数の電荷を持つものから電気的中性で電気移動度を持たない溶質までが考えられる。

移動相(固定されておらず溶媒和などは生じるが比較的小さな分子状態で試料が存在する)と固定相間の分配、吸・脱着などの③相平衡が非常に大きなものから極端なものは全く生じないものもある。固定相としていわゆる液体クロマトグラフ充填剤、中空キャピラリー液体クロマトグラフィーにおける壁面に形成された固定相や非常に軟らかい充填剤などが挙げられよう。相平衡のための④固定相と移動相が存在する。

これら①, ②, ③, ④の四つの因子を選択して用いてゆけば多用な分離形態が考えられよう。ミセル動電クロマトグラフィー (Micellar electro kinetic chromatography, MEKC) は上記の電気クロマトグラフィーの特長①, ②, ③を兼ね備えているが、④が特殊な形態になっている。すなわち、MEKCでは相平衡が移動相中に浮遊し一定方向に移動しているミセルと移動相との間の相平衡を特長としている。この手法は寺部氏がミセル動電クロマトグラフィーとしておられるので電気クロマトグラフィーに含めないのが妥当であろう。

添加物と試料間の錯形成や相互作用については等速電気泳動、スラブゲル電気泳動、ペーパーなどを担体とする電気泳動、キャピラリー電気泳動等についてよく研究されている。液体クロマトグラフィーにおいてもミセル液体クロマトグラフィー、ソープ液体クロマトグラフィー、アセチル化銅を添加する方法等、種々の手法がある。我々の研究している電気クロマトグラフィーにおいてもこれら添加物と試料間の効果は期待できよう。

II. 保持時間についての基本式。

圧力差流 $v(\text{pres})$ 、電気移動度による速度 $v(\text{mob})$ 、電気浸透流による速度 $v(\text{osm})$ となる溶質の移動相中での速度では、固定相との分配等の相平衡による保持比 k' (Capacity factor) ≥ 0 の時、溶質の見かけ速度 $v(\text{app})$ は

$$v(\text{app}) = (1 / 1 + k') \{ v(\text{pres}) + v(\text{mob}) + v(\text{osm}) \}$$

従って保持時間 R_t は

$$R_t = L / \{ R [v(\text{prev}) + v(\text{mob}) + v(\text{osm})] \}$$

但し、 L はカラム長、 R は移動速度比で $R = 1 / 1 + k'$ より求められる。

III. 電気クロマトグラフィーの装置上の問題。

(1) 高電圧からの防護 (装置、操作)。

(2) ジュール熱の処理

* 発生した熱の拡散するための工夫。(冷却、カラムデザイン)

* 電場で発生する気泡の処理。

* ジュール熱を小さくする工夫 (有機溶剤の使用、弱酸・弱塩基の使用)。

(3) 高電圧のカラム上への印加 (大きな電位勾配)。迅速分析のために必要。

IV. 電気クロマトグラフィーの応用。

電気クロマトグラフィーは現在の段階で次のような可能性が見いだされた。

① 通常の液体クロマトグラフィーと異なった分離。

② カラム内での特定成分の濃縮

非常に希釈な成分の濃縮に利用できよう。

③ 濃縮への応用。非常に微少な体積の中に試料を集めることができ、マイクロカラム液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動にも役立てることができる。

References

- 1 T. Tsuda et al. Anal. Chem. 60, 1677-1680 ('88); J. Chromatogr. 515, 645-652 ('90).
- 2 T. Tsuda Nippon Kagaku Kaishi 1986, 937-942.
- 3 J.H. Knox, I.H. Grant, Chromatographia, 24, 135-143 ('87).

(姫路工大・理) ○真鍋 敬、寺部 茂

Applicability of Electrospray-Quadrupole Mass Spectrometer As
Detector of Electrophoresis Apparatus

Takashi MANABE and Shigeru TERABE

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

The performance of a quadrupole mass spectrometer, equipped with an electrospray ionization source, was examined aiming to use it as a detector of electrophoresis apparatus. Major interest was its applicability as an on-line molecular-weight detector of proteins. As the first step, basic and low-molecular weight proteins were flow-injected and the conditions of protein ionization were examined. Detection and molecular weight estimation of the proteins were possible since the proteins appeared as polyvalence cations in the presence of acetic acid and their M/Z values, molecular weight divided by charge number, were below 1000 which is the maximum detectable M/Z of the mass spectrometer employed. The limitation of the present apparatus and the way of improvement will be discussed.

1. はじめに

電気泳動で分離した試料成分の検出器として、紫外可視吸収検出器、蛍光検出器、電位勾配検出器などが用いられている。得られる情報は、検出時間などから推定できる定性的な情報と、検出器の出力などから計算できる定量的な情報とがある。これらのうち定性的な情報をより詳細なものとするために、紫外可視吸収であればダイオードアレイ検出器でスペクトルを取るなどの工夫が行われる。しかし特にタンパク質を試料とした場合、紫外吸収スペクトルよりも等電点や分子量などの性質の方が、より有効な情報となる。一方、気相での電気泳動装置である質量分析計は、タンパク質の気相イオン化法の改良（エレクトロスプレー法）により、タンパク質の分子量決定にも利用できることが報告されている。そこで市販 LC-MS 装置を、電気泳動で分離したタンパク質試料の分子量決定用検出器として利用することを考え、その目的に対しての装置の性能を検討した。

2. 方法と結果

タンパク質試料としては、チトクロム c、ミオグロビン、アルブミンなどの市販精製タンパク質（シグマ社製）を用いた。質量分析計は日立製作所社製液体クロマトグラフ直結質量分析計（LC-MS）M-1000 を、液体クロマトグラフのカラムなしで用いた。タンパク質は 1% 酢酸に溶解し、注入用試料とした。50% メタノール-50% 水の溶液を $50 \mu\text{l}/\text{min}$ の流速で常時質量分析計イオン化室に送液しながら、タンパク質試料 $1-10 \mu\text{l}$ をインジェクションポートから注入し、注入後約 50 秒-1 分 40 秒の間に

タンパク質イオンに由来すると思われる質量分析結果（質量／電荷、 M/Z の分布図）を得た。分析システムの模式図をFig. 1に示す。また、ミオグロビンを注入したときの M/Z 分布図の例をFig. 2に示す。 M/Z 分布図中の2本以上のタンパク質 M/Z 値（同じ分子量のタンパク質が、異なる電荷をもつことにより現れる）から、タンパク質の分子量を推定するBASISICプログラムを作成した。これを用いて、分子量の値を推定するために必要なタンパク質の量をミオグロビンを例として検討した。その結果、使用した質量分析計では、注入量として200ng（0.02mg_{prot}/10 μ l）程度を要した。しかし、インジェクションポートからイオン化室までの間にタンパク質は5倍程度希釈されていると考えられるうえ、実際に検出に使用された溶液量はその希釈されたものの5分1程度であるから、試料注入の方法を改良すれば、10ng程度の量で分子量測定が可能であると推定された。しかし中酸性の等電点をもつタンパク質や分子量の大きいタンパク質については、初步的な検討結果ではイオンが検出されなかった。これは使用した装置の検出範囲（ M/Z 1000まで）内に入るだけの正電荷をタンパク質に与えることができいないためと考えられる。

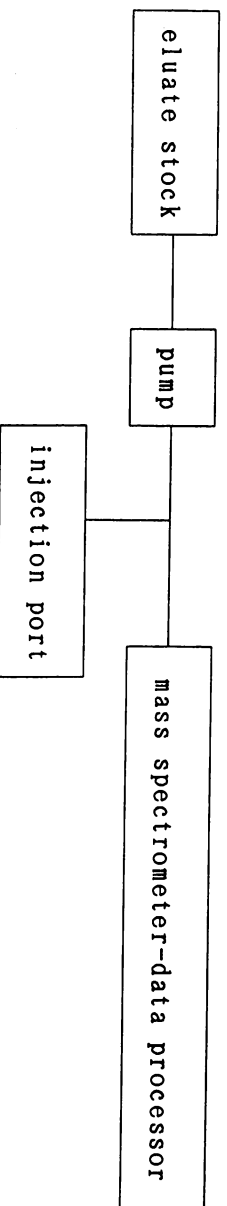


Fig. 1 Block diagram of the molecular-weight analyzing system

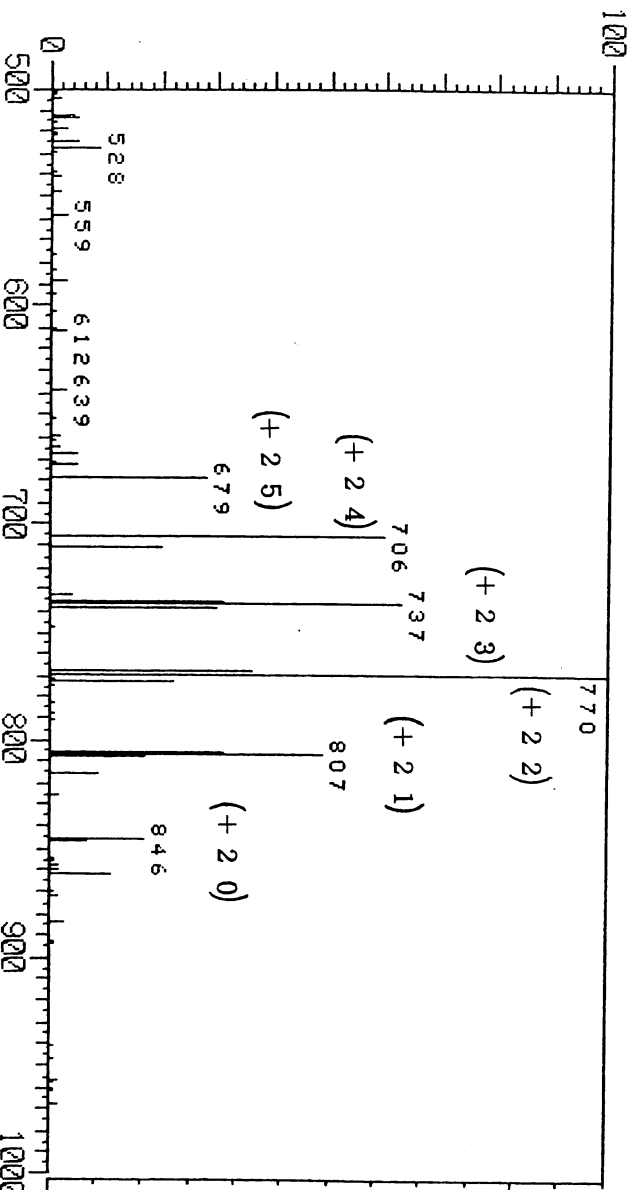


Fig. 2 An example of M/Z bar-graph of myoglobin.

蛋白質のキャピラリー電気泳動分離に及ぼすヘキサンスルホン酸添加の効果

(ベックマン (株) 科学機器事業部)

船串 佳世、○ 秋山 忠雄、梁井 恵美、佐藤 隆

Effects of the addition of Hexanesulfonic acid on the protein separation on capillary electrophoresis

Kayo FUNAKUSHI, Tadao AKIYAMA, Emi YANAI, Takashi SATOW

Beckman Instruments (Japan) Ltd., Bioanalytical Systems Group

In spite of the inherent high resolution of HPCE, protein samples are often separated poorly, due to the protein adsorption on to the inner wall of bare fused silica capillary. To overcome the difficulty, many tactics such as 1) low pH electrolyte, 2) higher pH electrolyte than pI's of proteins, 3) higher salt concentration electrolyte, and 4) capillary coating with polyamines have been developed.

In addition to above tactics, the ion pairing technique has been developed. Hexanesulfonic acid was chosen as ion pair reagent in the present experiment, and was applied to the separation of J-chains derived from IgM which could not be resolved at all by normal CZE mode on HPCE. The addition of 1mM Hexanesulfonic acid to the sample solution and to the electrolyte gave Ca. 75% resolution of two J-chain components in only 3.5min.

【はじめに】

高性能キャピラリー電気泳動法 (HPCE) は、その高分離能と高速性及び微量の試料で分析が可能なことから、蛋白質研究分野においても HPLC の補完分離技術として多大な注目をあびている。しかし fused silica 管を用いた HPCE では蛋白質のキャピラリー壁面への吸着がおこり大幅に分離能を減ずることから、ここ数年にわたり 1) 低 pH 電解液を用いてシラノールの解離をおさえる、2) 高 pH を用いて蛋白質の正味電荷を正にする、3) 高塩濃度の電解液を使用し蛋白質の吸着をおさえる、4) ポリアミン等でキャピラリー内壁をコートし吸着をおさえる等、種々の手法が研究開発されてきた。

今回、上記分離方法以外に、蛋白質の正電荷部分をマスクするためにイオンペア試薬を使用し、良好な分離結果を得たので報告する。

【実験方法】

HPCE 装置としてベックマン社から市販されている P/ACE System 2000 に fused silica キャ

ピラリ-を装着して行った。キャピラリ-の全長は57cm、一方のキャピラリ-末端から検出器までの有効長は50cmのものを使用した。分離実験中のキャピラリ-温度は30°Cに保ち、検出は200nmで行った。電解液としては、主として100mM Borate buffer pH8.0 - 10.0または100mM Phosphate bufferに1mM Hexanesulfonic acid sodium saltを添加したものを使用した。電気泳動は25kVで行った。試料注入はN₂ガス圧により2-5秒間行った。

試料としては2種類のIgM J-chain 混合物 (100μg/ml) を使用した。

【実験結果／考察】

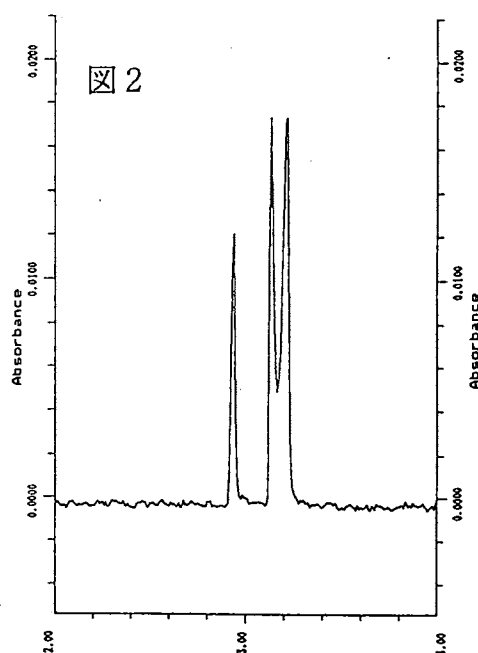
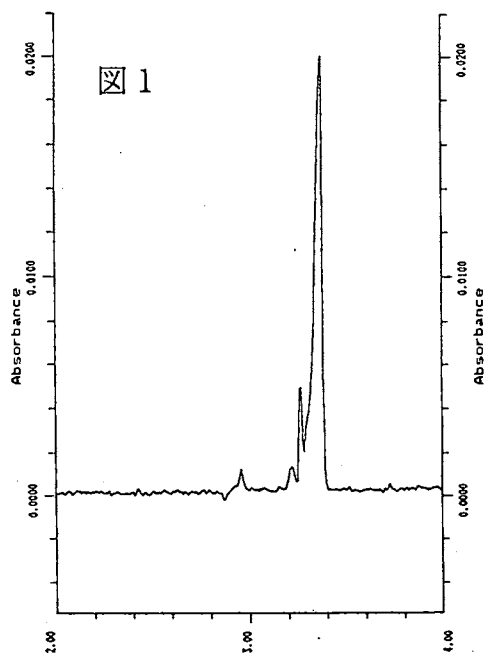
IgM J-chainは分子量約16,000、等電点はおおよそpI=4.0であり、今回実験に用いた試料には2種の分子種のJ-chain成分が含まれているものである。

まずBorate bufferおよびPhosphate buffer pH5.5-10.0を用いてCZEモードで0.3pHユニットきざみで調べたが、これら2つの成分を全く分離することができなかった(図1)。

さらにBorate bufferおよびPhosphate bufferにHexanesulfonic acidを1mMとなるよう添加し、電気泳動をおこなったところ、pH9.0で約75%の分離が得られた(図2)。

J-chainの等電点はpI=4.0付近にあり、アルカリ側ではその正味電荷はマイナスであるにもかかわらず、イオンペア試薬が分離に効果的であった。これは、正味電荷がマイナスであっても、蛋白質表面に正電荷のクラスタが存在し、Hexanesulfonic acidの非存在下ではキャピラリ-壁面と電氣的吸着をおこしているが、Hexanesulfonic acidの添加により正電荷クラスタがマスクされるために分離できるようになると推定される。

通常のCZEでは分離が困難であった蛋白質について試みたところ、同様の分離能向上が認められるものもあった。



キャピラリー電気泳動を用いた蛋白質分析の 新添加剤の開発

ミリポアコーポレイト ウォーターズクロマトグラフィー事業部、
日本ミリポアリミテッド ウォーターズクロマトグラフィー事業部CEグループ
M.Merion B.Bell-Alden Ed Grover U.Neue J.Peterson ○丸山敏彦

Novel Zwitterions as Buffer Additives for Improving Efficiency and Reproducibility in Capillary Electrophoresis by Minimizing Protein Adsorption

M.Merion B.Bell-Alden Ed Grover U.Neue J.Peterson Toshihiko Maruyama

Zwitterions comprised of sulfonic acid and quaternary amine groups were investigated as buffer additives for use in capillary electrophoresis. These zwitterions are effective in reducing the interaction of proteins with fused silica capillary surfaces under conditions of neutral pH. Over 300,000 theoretical plates were obtained in less than 15 minutes for the difficult case of lysozyme at pH7 using the trimethylammoniumpropylsulfonate zwitterion. The low conductivity of these buffers also permitted the use of 75 μ m capillaries.

■サマリー

キャピラリー電気泳動による蛋白質分離では、キャピラリー内壁面の熔融シリカの負電荷と蛋白質の正電荷による吸着という大きな問題があり、ピークのテーリングにより分離効率低下と再現性が低下する。従来法のバッファーへのNaCl添加は吸着を抑制するが、導電率が高くなり低電圧で内径の細かいキャピラリー(25 μ m, 50V/cm)でしか使用できない。(Jorgenson and Green, J.Chromatogr. 1989, 478, 63.) また両性イオンであるアミノ酸添加法ではバッファーのバックグラウンドが高くなる。25 μ mの細かいキャピラリーならば高電圧が使用でき、比較的電導率の高いバッファーを使用できるが(Jorgenson and Bushey, J.Chromatogr. 1989, 480, 301.) 検出器感度が要求される。

本研究では吸着による問題解決の方法としてスルホン酸と4級アンモニウムを持つ両性物質の添加を研究した。その結果pH7でトリメチルアンモニウムプロピルスルホン酸を用い、良好な分離が通常困難なリゾチームを15分で、30万段の高分解能を持って分析できた。またこのバッファー系は導電率が低いため内径75 μ mのキャピラリーも使用可能である。

■本研究にあたり以下の項目を設定

◇添加剤の性質：*強い両極性モーメントを持つ *広いpH範囲をカバー *高溶解性 *UV吸収が低い *pH7のバッファーでリゾチームが分析できる(リゾチームは強塩基性で中性でシラノールに吸着しやすい)卵白由来リゾチーム(MW14400; pI11.0)使用

◇装置:クオンタ4000CEシステム; 検出UV214nm; キャピラリー-75 μ m \times 60cm; 電気浸透流(EOF)が変化した場合0.5M-LiOHで洗浄

■添加剤Trimethylammoniumpropylsulfonate(Z1-CH₃; ウォーターズ 特許申請中)の性質

*強い両極性基をもつ *pH3-10の範囲で両性となる。 *高溶解性(最大3M) *低導電率[理論値は0 S/cm、実測値は10%溶液で50 μ S/cm以下, pH7の磷酸バッファーは9250 μ S/cm, 1MのZ1-CH₃を添加した場合6660 μ S/cm] *低いUV吸収である (185nm、214nmで使用可能)

■結果と考察

1) Trimethylammoniumpropylsulfonateの効果：◇pH7/100mMの磷酸バッファ(E1)ではリゾチームがキャピラリーに強く吸着され段数が低下し対称性も悪くなり中性マーカーのフォルムアミド(FA)の後に溶出。さらに非可逆的吸着がキャピラリーの表面電位を変えEOFと移動時間を変えるがため、再現性が低下し、また毎回LiOHで洗浄を行っても試料濃度が異なると移動速度が変化する。E1に1M-ZI-CH₃を加えると蛋白質の吸着が抑制され上記問題がなくなる。

2) アルキル鎖の比較：TriMETHYLammoniumpropylsulfonate, TriETHYLammoniumpropylsulfonate, Tri-n-PROPYLammoniumpropylsulfonateによるリゾチームの挙動の差 ◇EOF：アルキル鎖が長くなるにつれEOFの速度は減少。◇リゾチームの移動時間：アルキル鎖が長くなるにつれリゾチームの移動速度は低下。◇分離効率：いずれも良好な分離。

3) TriMETHYLammoniumpropylsulfonateの濃度(pH7/100mM磷酸バッファ系)の影響◇EOF: 1.0Mの添加により10%減少。2.5M以下では大きな影響なし。各種のpH条件検討の結果5~20%のEOFの減少を観察◇リゾチームの移動度: 両性イオンの増加につれ吸着が減少しリゾチームの移動は速くなる。両性イオンが無い場合は吸着が強くリゾチームが中性マーカーよりも後に溶出。◇両性イオンの増加につれリゾチームの分離効率が上がり、ピーク形状も改良。1.0Mで段数は7.5万段、対称性は1.2。

4) 磷酸バッファ(E1)の濃度の影響 (pH7.0) ◇EOF:塩濃度上昇につれEOFは増加。◇E1の濃度増加につれ吸着が減少しリゾチームの移動度は増加。一方塩濃度の増加につれEOFは遅くなり全体としてリゾチームの溶出は遅くなる。◇E1濃度の増加につれ分離効率とピーク形状は改善。しかし両性イオンがないと200mMの高塩濃度でもピークはテーリングする。

6) 両性イオンとpHの関係(100mM磷酸ナトリウムバッファ,1M-両性イオン)◇リゾチームの移動度と移動時間: pHの増加につれ吸着力が減少しリゾチームの移動度は増加。◇EOF: pH6~8の範囲ではほとんど変化なし。リゾチームの移動時間も速くなる。◇pH増加につれ分離効率とピーク形状も改良。

7) ビス両性イオン物質との比較: N,N'-bis-(sulfopropyl)-N,N,N',N'-tetramethylhexanediamineを0.5Mでtrimethylammoniumpropylsulfonate(1M)と同電荷量状態(pH7-120mM磷酸バッファ)にすると8.7万段となりリゾチームの分離効率にほとんど差はないがEOFが極端に遅くなる。(EOFは $2.8 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{Vsec}$ 、リゾチームは $4.5 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{Vsec}$)

8) 両性イオン物質を添加した場合の再現性：10回の分析においてリゾチームの移動時間は12.86分で標準偏差は0.23分(1.8%)。面積値の標準偏差も2.4%と良好。分離段数も7.5万段で標準偏差も9.5%

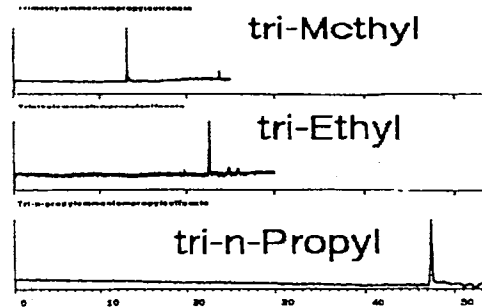
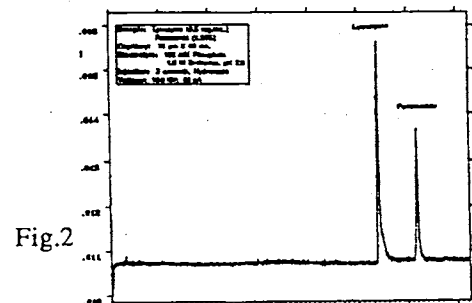
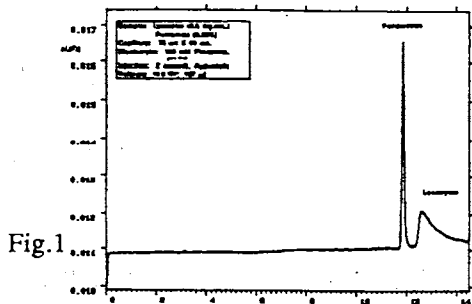


Fig.1 100mMSodiumPhosphateBuffer Formamide & Lyzocyme

Fig.2 100mMSodiumPhosphateBuffer with 1.0M Trimethylammonium-propylsulphonate Lyzocyme & Formamide

Fig.3 両性イオンのアルキル鎖の比較

ペプチドシーケンスのためのペプチド及びタンパク質
の精製分取へのCZEの応用(ベックマン (株) 科学機器事業部¹⁾、菱化生科研・蛋白質²⁾)○秋山 忠雄¹⁾、大森 彬²⁾

Purification and preparation of peptides and proteins with capillary zone electrophoresis for amino acid sequence analysis

Tadao AKIYAMA¹⁾, Akira OMORI²⁾Beckman Instruments (Japan) Ltd., Bioanalytical Systems Group¹⁾Mitsubishi-Kasei Institute of Life Science, Laboratory of Protein Research²⁾

Capillary zone electrophoresis (CZE) was utilized for the purification and fractionation of peptides and proteins to apply on sequencing analyses. Isolated peptides or proteins from a single or several runs of CZE could be successfully determined their amino acid residues more than 18 cycles from N-termini. This technique was applied to peptide mixture which could not be separated on a reverse-phase HPLC and gave excellent result. Thus, CZE is shown to be useful for the preparation of peptides and proteins for sequence analyses.

【はじめに】

キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) はペプチド、タンパク質などの生体物質の分析に応用されている。しかし、CZEは無担体電気泳動であるため、物質移動度に影響する要因が多様であり、未知試料では、得られたピークの同定は困難である。また、CZEでは分析する試料量の点から分離した物質の回収、同定が容易ではないと言われている。

本研究では物質がキャピラリーより電解液バイアル中に移動する時間に応じて、キャピラリーのアウトレット側の電解液バイアルを別のバイアルに変えることにより、特定のピークのみを回収することを試みた。さらに、回収したペプチド及びタンパク質をプロテインシーケンサーで分析し^{(1)、(2)}、アミノ酸配列の分析が可能であることが確認できた。

【実験方法】

試料及び試薬：ペプチド試料としてはアミノ酸16個の合成ペプチドを用いた。タンパク質試料としてはプロテインシーケンサーの標準試料であるβ-ラクトグロブリンを用いた。

装置：CZEのシステムはベックマン社のPACE 2000、プロテインシーケンサーはアプライドバイオシステムズ社477Aを用いた。

【CZEによる試料の回収】

CZEではキャピラリーの一定の位置でUV吸収などにより試料中の物質の移動をオンラインで検出するシステムになっている。したがって、分析チャート上の目的ピークの移動時間より試料がキャピラリーから電解液へ移動する時間を計算することができる。そこで、目的の物質がキャピラリー内を移動している間は通常の泳動を行ない、電解液バイアルへ移動する直前に電圧を止め、回収用のバイアルをキャピラリーアウトレット側に用意する。再度同じ条件で泳動することにより、目的の物質だけを回収用バイアルに移動させる。目的のピークがすべて回収用バイアルに移動したら、そこで泳動を止めキャピラリーの洗浄を行なう。必要に応じ、この操作を繰り返し、同一バイアルに目的物質を回収する。なお、このすべての操作は用いた装置に組み込んだプログラムにより自動的に行なうことが可能である。

【結果と考察】

ペプチドについては約0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の試料を42nl (7pmoles) 注入し、5回の繰り返し分取により、メインピークの部分を約60ng (35pmoles) 回収することが出来た。回収率はほぼ100%であった。分取した全量をプロテインシーケンサーで分析したところ、全てのアミノ酸配列を決定することができた (Table 1)。

タンパク質については、約1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の試料を100nl (5pmoles) 注入した。5回の繰り返し分取の試料量で20cycleまで確実に読むことができた。1回のCZEによる分取でも18cycleまで読むことができた (Table 2)。

さらに、HPLCで分離が困難であったペプチドの精製と分取に応用し、未知試料のアミノ酸配列を決定することができた。

今回の実験では配列分析の試料に含まれる塩の量を少なくするために、回収を20 μl の蒸留水に対して行ったが、電気泳動的には全く問題はなかった。また、試料と共に電解液中に溶離される塩の配列分析への影響は見られなかった。

本研究により、CZEがプロテインシーケンシングの試料の精製、及び分取の手法として充分可能であることが示された。

Table 1. CZE で精製、分取した合成ペプチドのアミノ酸配列分析

cycle	residue	recovery (pmoles)	cycle	residue	recovery (pmoles)
1	N	15.4	9	G	10.7
2	T	13.7	10	I	12.6
3	D	9.5	11	L	9.9
4	G	12.3	12	Q	5.1
5	S	6.1	13	I	10.1
6	T	8.6	14	N	4.9
7	D	3.6	15	S	3.1
8	Y	7.1	16	(R)	0.2

Table 2. CZE で精製、分取した β -ラクトグロブリンのアミノ酸配列分析

cycle	residue	recovery (pmoles)		cycle	residue	recovery (pmoles)	
		5 runs	1 run			5 runs	1 run
1	L	10.1	(2.0)*	11	D	4.5	(1.8)
2	I	9.3	1.6	12	I	3.9	1.4
3	V	5.8	0.9	13	Q	3.1	1.2
4	T	5.9	1.6	14	K	0.3	(0.3)
5	Q	5.4	1.5	15	V	2.9	0.8
6	T	5.6	1.3	16	A	3.9	1.4
7	M	4.4	0.6	17	G	4.7	(4.5)
8	K	2.8	0.8	18	T	2.4	(0.8)
9	G	9.9	6.4	19	W	1.4	-**
10	L	6.1	1.7	20	Y	1.4	-**

* : with some ambiguity

** : not identified

【参考文献】

- (1) Omori, A., Journal of Protein Chemistry, 9, 250-251 (1990)
- (2) 大森、秋山, 第64回日本生化学会発表抄録集 (生化学 63, 8, 675 (1991))

ゲル充填キャピラリー電気泳動分離におけるオリゴDNA移動度の解析

(ベックマン (株) 科学機器事業部) ○ 佐藤 隆、町田 明子

Analysis of migration speed of heterogenous oligo DNA separated on capillary electrophoresis

Takashi SATOW, Akiko MACHIDA

Beckman Instruments (Japan) Ltd., Bioanalytical Systems Group

By employing a commercially available gel filled capillary, the migration speed of heterogenous oligo DNA ranging from 20 to 61mer was examined. As the migration speed of oligo DNA is dependant on base composition, the migration coefficient of each base was directly determined by analyzing the migration time of heterogeneous oligo DNA using Gauss' least square method for the observation function. By using the coefficients obtained, most of the migration time of oligo DNA of any sequence can be estimated with an accuracy of less than 0.5 mer.

【はじめに】

高性能キャピラリー電気泳動法 (HPCE) は、その高分離能と高速性及び微量の試料で分析が可能なることから、生化学研究においても多大な注目をあびている。HPCEの重要な応用分野として合成オリゴDNAの分析が考えられ、ここ数年にわたり種々の手法によるゲル充填キャピラリーの作製方法や分離のメカニズムについて研究がなされてきた。ここではベックマン社から発売されているeCap U100Pゲル充填キャピラリーを用いてオリゴDNAを分離し、その性能を調べたので報告する。

【実験方法】

HPCE装置としてベックマン社から市販されているP/ACE System 2000にeCap U100Pゲル (尿素をふくむポリアクリルアミドゲル) キャピラリーを装着して行った。キャピラリーの全長は37cm、一方のキャピラリー末端から検出器までの有効長は30cmのものを使用した。分離実験中のキャピラリー温度は30°Cに保ち、検出は260nmで行った。電解液としてはeCap Buffer (100mM Tris, 250mM Borate, 7M Urea, pH8.3-8.4) を使用した。電気泳動は、主として定電圧モードを使用し、300V/cmを印加した。

試料注入は電気泳動的に5kV、2秒間行った。

試料は宝酒造より供給された、4種の塩基を全て含む20merから61merまでの合成オリゴDNA11種を含む混合水溶液 (各成分の濃度は0.01又は0.005 OD/ml) とPharmacia製の

Poly d(A)40-60 (合計濃度0.25 OD/ml) を使用した。

【実験結果／考察】

Pharmacia製のPoly d(A)40-60を用いて、eCap U100Pゲルキャピラリーの基本性能を確認したうえで、宝酒造より供給された合成オリゴDNA混合物を分離した。さらに各オリゴDNAの移動速度は長さに反比例すると仮定し、それぞれのピークを同定した。

これらのヘテロジニアスなオリゴDNAの移動時間には、単にその鎖長ばかりでなく、それぞれを構成する塩基の種類と数も関係するはずであるから、移動時間Mは、

$$M=X_1[A]+X_2[G]+X_3[T]+X_4[C]+K$$

X_1 : Aに起因する移動時間の係数

X_2 : Gに起因する移動時間の係数

X_3 : Tに起因する移動時間の係数

X_4 : Cに起因する移動時間の係数

K : 定数 (大きさのないオリゴDNAの検出器までの移動に要する時間)

[A], [G], [T], [C] : オリゴDNA中のA, G, T, Cの数

という関数で表されるはずである。実験的に求めたオリゴDNAの移動時間から、最小二乗法 (Gaussの方法) を用いて上記観測方程式の各係数を求めた。定性的には、どの1セットのデータからも

Cが最も速く移動する (最も小さい係数)

GとTが最も遅く移動する (最も大きい係数)

Aはほぼ中間の速度で移動する

Cの速度はGの約2倍である

ことがわかった。また20回の実験の単純平均や61merの移動時間を用いてノーマライズしたものでも観測精度をあげることができなかったのも、ゲル充填キャピラリーにおいては、繰り返し実験の持つ意味はそれほど大きくないといえよう。精度をあげるためには、実験の度にマーカーを入れ、それから求まる各塩基に対する移動係数を用いて対象となるオリゴDNAの移動速度を解析する方が好ましいだろう。

なお、今回用いた11種のオリゴDNAのうち、21/29/50/51merでは観測方程式で予測される位置からC換算で0.5mer以上のずれが生じた。この原因については不明である。

試料の注入方式は電気泳動的であることから、試料の均一な注入は期待できない。今回の実験ではこれを確認できたが、注入量 (効率) に関する知見は得られなかった。

今回の実験では、1本のキャピラリーを用いて約50回 (2,000分) の電気泳動を行ったが、顕著な分離能の低下は認められなかった。

核酸アナログを含むヒドロゲルを用いたキャピラリーアフィニティー電気泳動による核酸塩基の認識

(鹿児島大・工¹⁾、名古屋大・工²⁾、神戸女子薬科大³⁾) ○澤 智裕¹⁾
八島栄次²⁾、明石 満¹⁾、馬場嘉信³⁾、津波古充朝³⁾

Base-Recognition on Capillary Affinity Electrophoresis by use of Hydrogels
Containing Nucleic Acid Analogs

Tomohiro SAWA¹⁾, Eiji YASHIMA²⁾, Mitsuru AKASHI¹⁾, Yoshinobu BABA³⁾, and
Mitsutomo TSUHAKO³⁾

¹⁾ Faculty of Engineering, Kagoshima University ²⁾ Faculty of Engineering,
Nagoya University and ³⁾ Kobe Women's College of Pharmacy

As a water-soluble nucleic acid analog poly(9-vinyladenine) (PVAd) was first synthesized 20 years ago and some biological activities have been studied. Since PVAd forms complexes with nucleic acids with pyrimidine bases, we expect that it can be used as affinity ligand to nucleo-bases, nucleosides, nucleotides, and polynucleotides. Capillary affinity gel electrophoresis (we abbreviate it to CAGE) using PVAd-immobilized hydrogel was found to be very effective for the separation of nucleic acids. As a result, all we have to choose an appropriate condition, that is column temperature and PVAd concentration, we can obtain the base-selective separation of poly(dT)₁₅ from mixture of poly(dA)₁₂₋₁₈ and poly(dT)₁₅.

【はじめに】

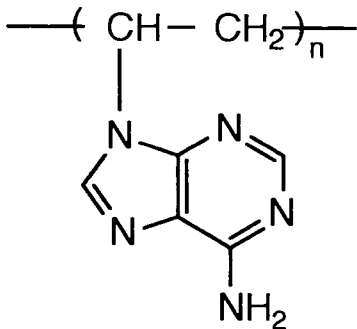
分子生物学、遺伝子工学の進歩にともない、核酸を速く正確に分離・分析する必要性が高まってきている。核酸の分離においてはこれまで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やスラブゲル電気泳動などがおもに用いられてきたが、最近では高性能キャピラリー電気泳動 (HPCE) を用いた核酸の分離が盛んに研究されている。なかでも核酸の分離においてはキャピラリーにゲルを充填したキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) が有効である¹⁾²⁾。本研究では代表的な核酸アナログであるポリ(9-ビニルアデニン) (PVAd) を含んだゲルをキャピラリーに充填しアフィニティー電気泳動 (CAGE) を行い、核酸を塩基選択的に速く、高分解能で分離することを目的とし、検討を行った。

【実験】

p(dA)₁₂₋₁₈ および p(dT)₁₂₋₁₈ はファルマシア社製のものを用いた。ゲル調製用のモノマー、開始剤はすべて電気泳動用グレードのものを用いた。またPVAdは既報³⁾にしたがい合成した分子量1-3万のものを用いた。電気泳動装置はApplied Biosystems Inc社製の270A型を用いた。キャピラリーは内径100μm、全長42cm (効果長22cm) のフューズドシリカ管を用いた。緩衝液としては、0.1M トリス-ほう酸 + 7M 尿素を用いた。サンプルは、電氣的 (5kV, 1s) に注入し、泳動は9kV (214V/cm) で行った。検出はオンカラム法によりUV260nmにて行った。また今回の実験ではゲル濃度を8%T, 5%Cとして行った。

[結果および考察]

まず通常のポリアクリルアミドを充填したキャピラリーゲル電気泳動により $p(dA)_{12-18}$ と $p(dT)_{12-18}$ およびそれらの混合物の分離を行った。 $p(dA)$, $p(dT)$ はいずれも一塩基の差でベースラインまで分離された。また $p(dA)$ と $p(dT)$ とではその泳動にわずかな差があるため、その混合試料も分離することができた。これらの結果はHPLC分離と比べ、分離時間、分解能ともに優れている。次にアクリルアミドモノマーに対しPVAdを0.03-0.2%含むキャピラリーアフィニティーゲル電気泳動(CAGE)による分離を30°Cにて行った。ゲルの調製法としては、重合前のアクリルアミド溶液に水に溶解したPVAdを加える方法を用いた。アクリルアミド重量に対し、わずか0.03%のPVAdを含んだだけで $p(dT)$ の泳動にはかなりの変化がみられた。さらにPVAd濃度を上げ0.2%になった時点で $p(dT)$ は全く泳動されなくなった。しかし $p(dA)$ はPVAd濃度にかかわらず泳動に変化はみられなかった。次にカラム温度を50°Cに上げて同じく $p(dT)$ の分離を行った。その結果はPVAdを含まないCGEの結果と似たものとなった。このことはカラム温度を上げることにより、PVAdと $p(dT)$ との間の水素結合が切れて $p(dT)$ が泳動したと考えられる。Figに $p(dA)_{12-18}$ と $p(dT)_{15}$ の混合物を通常のキャピラリーゲル電気泳動とCAGEにより分離した結果を示す。通常のCGEにより分離を行う(Fig(a))と $p(dT)_{15}$ のみを選択的に分離することができた。このようにキャピラリーゲル電気泳動にPVAdを加え核酸とのアフィニティーをもたせることにより高速、高分解能を有し、かつ塩基選択的な核酸の分離が可能となった。



Poly(9-vinyladenine) (PVAd)

[参考文献]

- 1) A. Guttman, A. S. Cohen, D. N. Heiger, and B. L. Kager; Anal. Chem., 62, 137, 1990
- 2) Y. Baba, T. Matsuura, K. Wakamoto, and M. Tshako; Chem. Lett., 1991, 371
- 3) M. Akashi, M. Yamaguchi, H. Miyata, E. Yashima, and N. Miyauchi; Chem. Lett., 1988, 1093

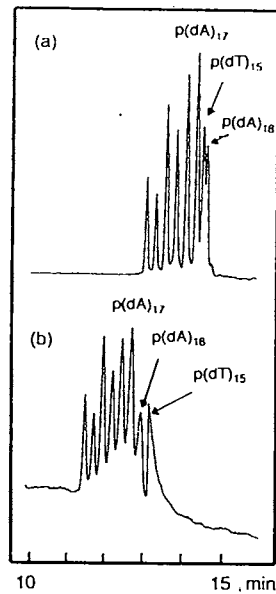


Fig CGE separation of Mixture of poly(dA)₁₂₋₁₈ and poly(dT)₁₅ using polyacrylamide(a) and PVAd conjugated gel(b).
 Caillary ; 100 μ m i.d., 375 μ m o.d., length 42cm (total), 22cm (effective). Gel ; 8%T and 5%C(a) with 0.1%PVAd(b)
 Temp ; (a)30°C (b) 50°C(0-4min) 60°C(4-24min).
 Running buffer ; 0.1M Tris-borate and 7M urea, pH 8.6.
 Field ; 214V/cm, current ; 9 μ A. Injection ; 5kV for 1s.
 Detection ; 260nm.

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。

株式会社島津製作所

日本分光工業株式会社

日本ミリポアリミテッド・ウォーターズクロマトグラフィー事業部

株式会社常陸製作所

ハックマン株式会社

横河電気株式会社

日本ダイネクス株式会社

アト-株式会社

大塚電子株式会社

平成3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) ☆	雁野重威 (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 (日本ミリボア・ウォーターズクロマト事業部)
佐藤 隆 (ベックマン)	千田正昭 (日本分光)
銭場俊彦 (アプライドイオンシステムズ)	津田孝雄 (名工大)
津田淑江 (共立女子短大) ★	寺部 茂 (姫路工大)
長堀崇重 (バイオラッドラボラトリーズ)	花岡 讓 (横河電機)
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)
真鍋 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11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3年11月25日 印刷

平成3年12月12日 発行

編集 千代田区一橋2-2-1

共立女子短大内

第11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

