

*Proceedings of the 12th Symposium on
Capillary Electrophoresis*

SCE'92

第12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 姫路市
日本化学会、日本生化学会、日本薬学会、電気泳動学会、
日本農芸化学会、クロマトグラフィー科学会

会期 1992年12月2日(水)～4日(金)

会場 姫路市立日本城郭研究センター

*Proceedings of the 12th Symposium on
Capillary Electrophoresis*

SCE'92

第12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 姫路市
日本化学会、日本生化学会、日本薬学会、電気泳動学会、
日本農芸化学会、クロマトグラフィー科学会

第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム

1992年12月2日(水)～4日(金)、姫路市立日本城郭研究センター

プログラム

第1日(12月2日)

12:00～12:15 開会の挨拶

12:15～13:15 (セッションI)

1. 双方向等速電気泳動法における電解液系の選択
(広島大工¹⁾、比治山女子短大²⁾) ○広川健¹⁾、木曾義之²⁾
2. 双方向等速電気泳動法による高レベル廃液模擬試料の分離
(広島大工¹⁾、比治山女子短大²⁾) ○中村謙一郎¹⁾、広川健¹⁾、西山文隆¹⁾、木曾義之²⁾
3. 2次元無担体等速電気泳動装置の試作と高レベル核燃料再処理廃液の分離
(広島大工¹⁾、比治山女子短大²⁾) ○大田高雄¹⁾、広川健¹⁾、木曾義之²⁾
4. キャピラリー等速電気泳動における大量イオンのマスキング効果
(島津応用技術部) ○日根隆

13:15～14:30 (セッションII)

5. 電気クロマトグラフィー(X) - 圧力差流を用いた電気クロマトグラフィーの挙動について -
(名工大) ○北川慎也、早川幸伸、津田孝雄
6. 電気クロマトグラフィー(XI) - 電気浸透流送液法電気クロマトグラフィー -
(名工大) ○稲垣雅彦、津田孝雄
7. マルチキャピラリー式電気泳動装置
(日立中研) ○高橋智、村上勝彦、穴沢隆、西川哲夫、神原秀記
8. レーザー誘起蛍光検出 - ミセル動電クロマトグラフィーによる多環芳香族炭化水素の分離 -
(九大工) ○金田隆、山下哲也、今坂藤太郎
9. 共振レーザー誘起キャピラリー振動法によるCZEの高感度検出
(東大工) ○小竹玉緒、北森武彦、澤田嗣朗

14:30～14:45 (休憩)

14:45～15:45 (セッションIII)

10. 水中の微量陰イオンの分析
(ミリポアコーポレート¹⁾、日本ミリポア²⁾) G. Bondoux¹⁾、P. Jandic¹⁾、
W. R. Jones¹⁾、○高橋孝行²⁾

- 1 1. 森林化学分野におけるキャピラリーイオン分析の応用
(日本ミリポア¹⁾、北大農²⁾ ○米久保淳¹⁾、寺沢実²⁾
- 1 2. キャピラリー電気泳動法によるキレート陰イオンの分離と金属イオンの定量
(岡山大理) ○本水昌二、森本浩司
- 1 3. I P - P I X E法による希土類元素鉱石の分析
(広島大工¹⁾、比治山女子短大²⁾) ○夏文¹⁾、広川健¹⁾、西山文隆¹⁾、木曾義之²⁾

1 5 : 4 5 ~ 1 6 : 4 5 (セッションIV)

特別講演1 Professor D. Kaniansky (Comenius Univ., Czechoslovakia)
"Capillary Isotachopheresis and Its Combinations With
Capillary Electrophoresis Techniques"

第2日(12月3日)

9 : 1 5 ~ 1 0 : 4 5 (セッションV)

- 1 4. キャピラリー電気泳動を用いた食品中の有機酸の分析
(日本ミリポア) ○佐々木秀輝
- 1 5. 電気浸透流を逆転させる緩衝液の検討
(日本ダイオネクス) 関口陽子、○渡辺一夫
- 1 6. 高性能キャピラリー電気泳動におけるピーク同定のためのco-migrationに関する
考察
(近畿大薬) ○多賀淳、安枝真一、大田恭子、鈴木茂生、本田進
- 1 7. 高性能キャピラリー電気泳動におけるみかけの移動度の信頼性について
(近畿大薬) ○本田進、多賀淳、笹岡功、島谷史子、田中里佳
- 1 8. キャピラリー電気泳動システムとイオン会合現象を利用する高電荷金属錯体の新しい高
性能分離法
(東北大工) ○壺岐伸彦、星野仁、四ッ柳隆夫
- 1 9. キャピラリー電気泳動による産業用有機化合物の分析
(日本ダイオネクス) 関口陽子、○渡辺一夫

1 0 : 4 5 ~ 1 1 : 0 0 (休憩)

1 1 : 0 0 ~ 1 2 : 0 0 (セッションVI)

特別講演2 Professor J. W. Jorgenson (North Carolina Univ., U. S. A)
"Two Dimensional Separations by Combined Liquid Chromatography /
Capillary Electrophoresis"

1 2 : 0 0 ~ 1 3 : 3 0 (昼食・休憩)

1 3 : 3 0 ~ 1 5 : 0 0 (セッションVII)

20. 動電クロマトグラフィーのミセル濃度の情報理論に基づく最適化
(国立衛試) ○林讓、松田りえ子
21. 動電クロマトグラフィーによる環境汚染物質の分析 (VII) -アニン類の分離挙動について-
(阪工試) ○竹田さおり、脇田慎一、山根晶隆、川原昭宜、東国茂
22. マイクロエマルジョン動電クロマトグラフィーにおける組成の分離選択性に及ぼす効果
(京大工¹⁾、姫路工大理²⁾) ○岡田行広¹⁾、寺部茂²⁾
23. 光学活性デタージェントを用いるキャピラリーMEKCによる光学分割
(北里大薬¹⁾、国際解析研²⁾) ○二村典行¹⁾、満野千加子¹⁾、伊藤裕子¹⁾、
木下俊夫¹⁾、花井俊彦²⁾
24. キャピラリー電気泳動の光学分割への応用
(阪府高専) ○大塚浩二、柏原正典、川口恭史、小池亮、久光敏夫
25. キャピラリー電気泳動による薬物の光学分割-シクロデキストリンの利用-
(田辺分析研) ○西博行、国仙谷良男、宮本尚明、佐藤忠司

15:00~15:15 (休憩)

15:15~16:45 セッションVIII

26. キャピラリー電気泳動による尿中ニトラゼパム及びその代謝物の分析
(川崎医大法医¹⁾、川崎医療短大²⁾) ○富田正文¹⁾、奥山敏子¹⁾、佐藤彰一²⁾
27. キャピラリー電気泳動による血清中の複数の抗てんかん薬の同時定量について
(国立精神神経セ) ○今沢正興
28. キャピラリー電気泳動による食肉用抗菌剤の分析
(国立衛試) ○松田りえ子、林讓、鈴木隆、斉藤行生
29. 高性能キャピラリー電気泳動によるグリコサミノグリカンの直接分析
(近畿大薬) ○上野哲司、本田進
30. 高性能キャピラリー電気泳動による生薬中の糖類の分析
(近畿大薬¹⁾、北京市臨床薬学研²⁾) ○湯谷勝冶¹⁾、掛樋一晃¹⁾、久保道徳¹⁾、本田
進¹⁾、杜曉曦²⁾
31. 講演中止

第3日(12月4日)

9:15~10:30 (セッションIX)

32. ゲル充填キャピラリー電気泳動分析におけるDNAの塩基組成と移動度の関係
(城西大理¹⁾、ベックマン²⁾) ○歌川祐史¹⁾、小林英三郎¹⁾、秋山忠男²⁾、佐藤隆²⁾
33. 新規ゲルを用いたキャピラリーゲル電気泳動によるDNAの高速分離
(神戸女子薬¹⁾、鹿児島大工²⁾) ○馬場嘉信¹⁾、津波古充朝¹⁾、澤智裕²⁾、明石満²⁾
34. キャピラリーアフィニティーゲル電気泳動によるDNAの塩基組成および塩基配列の認識
(神戸女子薬¹⁾、鹿児島大工²⁾) ○馬場嘉信¹⁾、津波古充朝¹⁾、澤智裕²⁾、
明石満²⁾

35. DNAフラグメントのプルラン溶液中でのキャピラリー電気泳動挙動
 (阪大蛋白研) ○小暮栄一、亀山啓一、高木俊夫
36. 無担体電気泳動によるDNAの分離3. 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) 登
 載FFEUのBBMを用いた電気泳動
 (城西大理¹⁾、東海大医²⁾) ○小林英三郎¹⁾ 藤倉裕一¹⁾、目黒和良¹⁾、石井直明²⁾

10:30~10:45 (休憩)

10:45~12:15 (セッションX)

37. 低pH条件によるアミノ酸分析の添加剤の効果
 (大塚電子) ○小野真澄、新田哲士、笹川秀男
38. キャピラリー電気泳動によるペプチド、アミノ酸分離での添加剤の検討
 (日本ミリポア) ○丸山敏彦、町田祥子
39. キャピラリー電気泳動を用いたインスリンの分析
 (大塚電子¹⁾、国立衛試大阪²⁾) ○新田哲士¹⁾、笹川秀男¹⁾、四方田千佳子²⁾、
 岡田敏史²⁾
40. CZEによる酸化還元補酵素PQQのオキサゾール付加体の分離分析
 (岐阜薬大) ○江坂幸宏、山口恭生、加納健司
41. キャピラリー電気泳動法によるタンパク質の種々の分析方法
 (大塚電子) ○笹一志、笹川秀男
42. タンパク質のキャピラリー電気泳動-新しいコーティング法とその評価-
 (近畿大薬¹⁾ ウプサラ大生物医学セ²⁾) ○久保兼信¹⁾、S. Hjerten²⁾

12:15~13:30 (昼食・休憩)

13:30~15:00 (セッションXI)

43. SDS-ウシ血清アルブミン由来ポリペプチド複合体の自由溶液キャピラリー電気泳動
 (阪大蛋白研) ○M. R. Karim、品川進、高木俊夫
44. ヒト血清タンパク質のキャピラリー電気泳動
 (日本分光¹⁾、慈恵医大²⁾) ○黒須泰行¹⁾、佐藤世泰¹⁾、町田勝彦²⁾、都丸慶子²⁾
 栗岡晋²⁾
45. SDS-線状ポリアクリルアミドゲル充填キャピラリー電気泳動による蛋白質の分子量
 測定
 (日本ベーリンガーインゲルハイム¹⁾、京大薬²⁾) ○中谷学¹⁾、洪川明正²⁾、
 中川照真²⁾
46. SDSゲルキャピラリー電気泳動法による蛋白質の分子量分析
 (ベックマン) ○秋山忠男、船串佳世、佐藤隆
47. タンパク質のSDS電気泳動-キャピラリーゲルとカラム/スラブゲルの比較
 (姫路工大理) ○真鍋敬、寺部茂
48. CE/SDS-PAGEによるタンパク質分析
 (日本分光¹⁾、埼玉大²⁾) ○佐々木徹¹⁾、千田正昭¹⁾、檜山哲夫²⁾

15:00~15:15 (休憩)

15:15~16:30 (セッションXII)

49. 細管式等速電気泳動法によるヒト眼球硝子体分析
(新潟大医) ○小野政孝、山内春夫、出羽厚二
50. 髄液に特徴的な低分子蛋白成分の含量の中樞神経系疾患における変動のキャピラリー電気泳動による測定
(杏林大保健¹⁾、国立千葉病院神経科²⁾) ○平岡厚¹⁾、伊藤詠子¹⁾、三浦勇夫¹⁾、服部宗和²⁾、富永格²⁾
51. 小動物の血清タンパク質の遺伝的多型性について
(専修大¹⁾、武蔵藤沢動物病院²⁾、日本獣医畜産大³⁾) ○吉田治弘¹⁾、廣田順子²⁾、江島博康³⁾
52. プロテティング膜を用いたキャピラリー電気泳動用マイクロ分取装置の開発
(三共分析代謝研) ○紺世智徳、高橋達彦、長島潜、岩岡貞樹
53. メンブレン フラクシヨンの開発ー
(ミリポアコーポレート¹⁾、日本ミリポア²⁾) M. Merion¹⁾、Y. F. Cheng¹⁾、酒井恒行²⁾

12TH SYMPOSIUM ON CAPILLARY ELECTROPHORESIS

December 2-4, 1992, Himeji, Japan

PROGRAM

December 2, Wednesday

Opening Address (12:00-12:15)

Session I (12:15-13:15)

1. Selection of Operational Electrolyte Systems for Bidirectional Isotachopheresis
Takeshi Hirokawa¹⁾ and Yoshiyuki Kiso²⁾
1)Faculty of Engineering, Hiroshima University and 2)Hijiyama Women's College
2. Bidirectional Isotachopheretic Separation of a Model Waste of a High Level Liquid Waste
Kenichirou Nakamura¹⁾, Takeshi Hirokawa¹⁾, Fumitaka Nishiyama¹⁾ and Yoshiyuki Kiso²⁾
1)Faculty of Engineering, Hiroshima University and 2)Hijiyama Women's College
3. Trial Construction of a Free Electrophoresis Apparatus and Its Application to the Separation of a Model Waste of a High Level Liquid Waste
Takao Ohta¹⁾, Takeshi Hirokawa¹⁾ and Yoshiyuki Kiso²⁾
1)Faculty of Engineering, Hiroshima University and 2)Hijiyama Women's College
4. Masking Effects of Large Amount of Ions Capillary Isotachopheresis
Takashi Hine
Analytical Applications Department, Shimadzu Corporation

Session II (13:15-14:30)

5. Electrochromatography(X)-Pressurized Flow Driven Electrochromatography-
Shinya Kitagawa, Yukinobu Hayakawa and Takao Tsuda
Nagoya Institute of Technology
6. Electrochromatography(XI)-Electroosmotically Driven Chromatography-
Masahiko Inagaki and Takao Tsuda
Nagoya Institute of Technology
7. Installation of Multi-Capillary Electrophoresis
Satoshi Takahashi, Katsuhiko Murakami, Takashi Anazawa, Tetsuo Nishikawa and Hideki Kanbara
Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd.
8. Separation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Based on Laser Fluorescence Detection
Takashi Naneta, Tetsuya Yamashita and Totaro Imasaka
9. Highly Sensitive Detection Method for CZE by Resonant Laser-Induced capillary Vibration
Tamao Odake, Takehiko Kitamori and Tsuguo Sawada
Faculty of Engineering, The University of Tokyo

Session III (14:45–15:45)

10. The Analysis of Low Levels of Anions in Water

G. Bondoux¹⁾, W. R. Jones¹⁾, P. Jandik¹⁾ and Yoshiyuki Takahashi²⁾

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

11. Capillary Ion Analysis Applied for Forest Chemistry

Jun Yonekubo¹⁾ and Minoru Terazawa²⁾

1) Waters Chromatography Division, Nihon Millipore and 2) Faculty of Agriculture, Hokkaido University

12. Separation of Chelate Anions and Determination of Metal Ions by Capillary Zone Electrophoresis

Shoji Motomizu and Koji Morimoto

Faculty of Science, Okayama University

13. Analysis of Rare Earth Ores by ITP-PIXE

Wen Xia¹⁾, Takeshi Hirokawa¹⁾, Fumitaka Nishiyama¹⁾ and Yoshiyuki Kiso²⁾

1) Faculty of Engineering, Hiroshima University and 2) Hijiyama Women's College

Session IV (15:45–16:45) Invited Lecture 1.

Professor D. Kaniansky (Comenius Univ., Czechoslovakia)

"Capillary Isotachophoresis and Its Combinations With Capillary Electrophoresis Techniques"

December 3, Thursday

Session V (9:15–10:45)

14. Analysis of Organic Acid in Food Sample by Capillary Electrophoresis

Hideki Sasaki

Waters Chromatography Division, Nihon Millipore

15. The Examination of The Buffer Which can Reverse the Electroosmosis Flow

Yoko Sekiguchi and Kazuo Watanabe

Nippon Dionex K.K.

16. Observations on Co-migration for Peak Identification in High Performance Capillary Electrophoresis

Atsushi Taga, Shinichi Yasueda, Yasuko Ohta, Shigeo Suzuki and Susumu Honda

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

17. Reliability of Apparent Electrophoretic Mobility in High Performance Capillary Electrophoresis

Susumu Honda, Atsushi Taga, Isao Sasaoka, Noriko Shimatani and Rika Tanaka

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

18. A New Highly Effective Separation Method for Equally and highly Charged Metal Chelates by Capillary Electrophoresis System Utilizing Ion Association

Nobuhiko Iki, Hitoshi Hoshino, Takao Yotsuyanagi

Faculty of Engineering, Tohoku University

19. Analysis of Industrial Organic Compound by Capillary Electrophoresis

Yoko Sekiguchi, Kazuo Watanabe

Nippon Dionex K.K.

Session VI (11:00–12:00) Invited Lecture 2.

Professor J. W. Jorgenson (North Carolina Univ., U. S. A.)

"Two-Dimensional Separations by Combined Liquid Chromatography/Capillary Electrophoresis"

Session VII (13:30–15:00)

20. Information Theory-based Optimization of Micelle Concentration in Electrokinetic Chromatography

Yuzuru Hayashi and Rieko Matsuda

National Institute of Hygienic Sciences

21. Analysis of Environmental Pollutants by Micellar Electrokinetic Chromatography (VII)–Separation Behavior of Aniline Derivatives

Sahori Takeda, Shinichi Wakida, Masataka Yamane, Akinori Kawahara and Kunishige Higashi

Government Industrial Research Institute, Osaka

22. Effects of Microemulsion Compositions on Separation Selectivity in Microemulsion Electrokinetic Chromatography

Yukihiro Okada¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾

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

23. Optical Resolution by Capillary MEKC Using Optically Active Detergents

Noriyuki Nimura¹⁾, Chikako Mitsuno¹⁾, Hiroko Itoh¹⁾, Toshio Kinoshita¹⁾ and Toshihiko Hanai²⁾

1) School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University and 2) International Institute of Technological Analysis

24. Application of Capillary Electrophoresis to Optical Resolution

Koji Otsuka, Masanori Kashihara, Yasushi Kawaguchi, Ryo Koike and Toshio Hisamitsu

Osaka Prefectural College of Technology

25. Optical Resolution of Drugs by Capillary Electrophoresis –Use of Cyclodextrins–

Hiroyuki Nishi, Yoshio Kokusanya, Takaaki Miyamoto and Tadashi Sato

Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

Session VIII (15:15–16:45)

26. Determination of Nitrazepam and its Metabolites in Urine by Capillary Electrophoresis

Masafumi Tomita¹⁾, Toshiko Okuyama¹⁾ and Shoichi Sato²⁾

1) Department of Legal Medicine, Kawasaki Medical School and 2) Kawasaki College of Allied Health Professions

27. Simultaneous Determination of Antiepileptic Drugs in Serum by Capillary Electrophoresis
Masaoki Imazawa
National Institute of Neuroscience, NCNP
28. Capillary Zone Electrophoretic (CZE) Analysis of Antibacterials for Meat
Rieko Matsuda, Yuzuru Hayashi, Takashi Suzuki and Yukio Saito
National Institute of Hygienic Sciences
29. Analysis of Macromolecular Glycosaminoglycans by High Performance Capillary Electrophoresis
Tetsuji Ueno and Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
30. Analysis of Carbohydrates in Crude Drugs by High Performance Capillary Electrophoresis
Shoji Yutani¹⁾, Kazuaki Kakehi¹⁾, Michinori Kubo¹⁾, Susumu Honda¹⁾ and Gyohki Toh²⁾
1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University and 2) Beijing Institute of Pharmacy
31. Cancelled

December 4, Friday

Session IX (9:15–10:30)

32. A Novel Way to the Simultaneous Determination of Migration Coefficients of Each Base in Heterogeneous Oligo DNA on Gel Filled Capillary Electrophoresis
Yuushi Utagawa¹⁾, Hidesaburo Kobayashi¹⁾, Tadao Akiyama²⁾, Takashi Satow²⁾
1) Faculty of Science, Josai University and 2) Beckman Instruments(Japan)Ltd.
33. High-Speed Separation of DNA by Capillary Gel Electrophoresis Using New Gel Columns
Yoshinobu Baba¹⁾, Mitsutomo Tsuhako¹⁾, Tomohiro Sawa²⁾ and Mitsuru Akashi²⁾
1) Kobe Women's College of Pharmacy and 2) Faculty of Engineering Kagoshima University
34. Base- and Sequence-Specific Recognition of DNA by Capillary Affinity Gel Electrophoresis
Yoshinobu Baba¹⁾, Mitsutomo Tsuhako¹⁾, Tomohiro Sawa²⁾ and Mitsuru Akashi²⁾
1) Kobe Women's College of Pharmacy and 2) Faculty of Engineering Kagoshima University
35. Capillary Electrophoretic Behavior of DNA Fragments in Pullulan Solution
Eiichi Kogure, Keiichi Kameyama and Toshio Takagi
Institute for Protein Research, Osaka University
36. Separation of DNA by Free Flow Electrophoresis 3. Electrophoresis by Using a FFEU/BBM for IML-2
Hidesaburo Kobayashi¹⁾, Yuichi Fujikura¹⁾ and Kazuyoshi Meguro¹⁾ and Naoaki Ishii²⁾
1) Faculty of Science, Josai University and 2) School of Medicine, Tokai University

Session X (10:45–12:15)

37. Effect of Additives for the Analysis of Amino Acid under Low Ph Condition
Masumi Ono, Satoshi Nitta, Hideo Sasagawa
Otsuka Electronics Co., Ltd.
38. Buffer Additives for Capillary Electrophoresis of Similar Peptide and Amino Acids
Toshihiko Maruyama, Sachiko Machida
Waters Chromatography Division, Nihon Millipore
39. Analysis of Insulin by Capillary Electrophoresis
Satoshi Nitta¹⁾, Hideo Sasagawa¹⁾, Chikako Yomota²⁾ and Satoshi Okada²⁾
1) Otsuka Electronics Co., Ltd. and 2) National Institute of Hygienic Sciences, Osaka
40. Separation of Oxazole Derivatives of Redox Coenzyme PQQ by CZE
Yukihiro Esaka, Yasuo Yamaguchi and Kenji Kano
Gifu Pharmaceutical University
41. Several Analysis Method of Proteins by Capillary Electrophoresis
Katsushi Sasa and Hideo Sasagawa
Otsuka Electronics Co.
42. Capillary Zone Electrophoresis of Proteins: A New Type Coating and its Assessment
Kanenobu Kubo¹⁾ And S. Hjerten²⁾
1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University and 2) Department of Biochemistry, University of Uppsala

Session XI (13:30–15:00)

43. Behavior of the complexes Formed Between Sodium Dodecyl Sulfate and Polypeptide Derived From Bovine Serum Albumin
M. R. Karim, Susumu Shinagawa and Toshio Takagi
Institute for Protein Research, Osaka University
44. Capillary Electrophoresis of Human Serum Proteins
Yasuyuki Kurosu¹⁾, Yasuyo Satou¹⁾, Katsuhiko Machida²⁾, Keiko Tomaru³⁾ and Susumu Kurioka³⁾
1) JASCO, Technical Research Laboratory, 2) Department of Laboratory Medicine and 3) Division of Biochemistry, Institute of Medicine, the Jikei University School of Medicine
45. Sodium Dodecyl Sulfate – Linear Polyacrylamide Gel – Filled Capillary Electrophoresis for the Molecular Weight Determination of Proteins
Manabu Nakatani¹⁾, Akimasa Shibukawa²⁾ and Terumichi Nakagawa²⁾
1) Pharmaceutical Research Dept., Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd. and 2) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
46. Size Separation of Proteins with SDS Gel Capillary Electrophoresis
Tadao Akiyama, Kayo Funakushi and Takashi Satow
Beckman Instruments(Japan) Ltd.

47. SDS Electrophoresis of Proteins -- Features of Capillary Gel Electrophoresis Compared with Column/Slab Gel Electrophoresis

Takashi Manabe and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

48. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Capillary Electrophoresis of Proteins

Toru Sasaki¹⁾, Masaaki Senda¹⁾ and Tetsuo Hiyama²⁾

1) JASCO and 2) Saitama University

Session XII (15:15-16:30)

49. Application of Capillary Isotachopheresis to Analysis of Vitreous Humor

Masataka Ono, Haruo Yamauchi and Koji Dewa

Department of Legal Medicine Niigata University of Medicine

50. Capillary Electrophoretic Measurement of Changes in Central Nervous System Diseases in the Contents of a Low Molecular Weight Protein Component Characteristic to Cerebrospinal Fluid

Atsushi Hiraoka¹⁾, Eiko Ito¹⁾, Isao Miura¹⁾, Munekazu Hattori²⁾ and Itaru Tominaga²⁾

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

51. Electrophoretical Observation of Genetical Polymorphisms in Serum Protein of Dog and Cat

Haruhiko Yoshida¹⁾, Junko Hirota¹⁾ and Hiroyasu Ejima²⁾

1) Musashi-fujisawa Animal Hospital and 2) Nippon Veterinary and Zootechnical College

52. Development of Micropreparation system for Capillary Electrophoresis Blotting Membrane

Tomonori Konse, Tatsuhiko Takahashi, Hisomu Nagashima and Teiki Iwaoka

Analytical and Metabolic Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

53. Membrane Fraction Collection for Capillary Electrophoresis

Y. F. Cheng, M. D. Andrews, W. Carson and Tsuneyuki Sakai

Waters Chromatography Division, Nihon Millipore

第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム 座長一覧

セッション	時間帯	講演番号	座長
第1日 12月2日(水)			
開会の挨拶	12:00-12:15		寺部 茂
I	12:15-13:15	1-4	福士恵一
II	13:15-14:30	5-9	広川 健
III	14:45-15:45	10-13	津田孝雄
特別講演 IV (Professor D. Kaniansky)	15:45-16:45	特別講演1	木曾義之
第2日 12月3日(木)			
V	9:15-10:45	14-19	高木俊夫
特別講演 VI (Professor J. W. Jorgenson)	11:00-12:00	特別講演2	寺部 茂
VII	13:30-15:00	20-25	今坂藤太郎
VIII	15:15-16:45	26-31	中川照真
第3日 12月4日(金)			
IX	9:15-10:30	32-36	本田 進
X	10:45-12:15	37-42	馬場嘉信
XI	13:30-15:00	43-48	吉田治弘
XII	15:15-16:30	49-53	真鍋 敬

特別講演

第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム
特別講演1

Invited Lecture 1

" Capillary Isotachopheresis
and Its Combinations With Capillary
Electrophoresis Techniques"

Professor D. Kaniansky
Comenius University
Czechoslovakia

第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム
特別講演2

Invited Lecture 2

" Two-Dimensional Separation by
Combined Liquid Chromatography/
Capillary Electrophoresis "

Professor J. W. Jorgenson
North Carolina University
U. S. A.

一般講演

双方向等速電気泳動法における 電解液系の選択

(広島大・工、*比治山女子短大) ○広川健、木曾義之*

Selection of operational electrolyte systems for
bidirectional isotachopheresis
Takeshi Hirokawa and Yoshiyuki Kiso*
Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,
Hiroshima university
*Hijiyama Women's College

ABSTRACT - Bidirectional isotachopheresis can be achieved using an anionic leading electrolyte as an anolyte and a cationic leading electrolyte as a catholyte. Principle of bidirectional ITP is illustrated briefly and bidirectional electrolyte systems are tabulated. The pH difference between the anolyte and the catholyte should not be too large. If not, appropriate terminating zone cannot be generated.

1. ゾーン電気泳動法においてはアニオン・カチオン共にゾーン電気泳動する。従って試料を分離管の中央に注入し、両側に検出装置をおけば同じ試料中のアニオン・カチオンを同時に検出できる(双方向ゾーン電気泳動)。等速電気泳動の場合従来使用されてきた多くの電解液系では片方向のみ(リーディングイオンと同符号のイオンのみ)しか等速電気泳動しない。反対符号の成分はターミナルゾーン中をゾーン電気泳動する。等速電気泳動法の特徴は比較的大量の試料を扱えるという点である。双方向に等速電気泳動させる事ができればアニオン・カチオン両成分の同時分取に有効であるほか、両成分が分析対象である場合は分析時間を短縮できる。

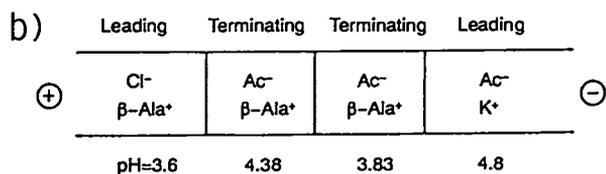
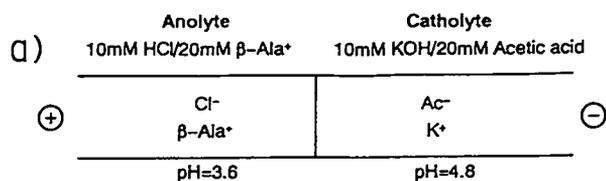
我々は昨年シンポジウム(SCE11)において、双方向等速電気泳動現象をゾーンpHの測定、走査型UV検出装置による界面泳動速度の測定によって確認し、いくつかの応用例を示した^{1,2)}。本講演では更に一般的な電解液系の選択法について報告する。

2. 双方向に等速電気泳動させるには陽極液としてアニオン用リーディング電解液を、陰極液としてカチオン用リーディング電解液を用いれば良い。両電解液のpHは各バッファーが十分なpH緩衝能を持つように $pK_a \pm 0.5$ の範囲に選んであるものとする。図-1aは双方向等速電気泳動の可能な電解液系の一例で、陽極液は10mM HCl/ β -アラニンバッファー(pH=3.6)、陰極液は10mM KOH/酢酸(pH=4.8)である。この液に通電すると図-1bに示したように各電解液中の緩衝イオンが反対電極に向かって泳動し新しくターミナルゾーンとなる。

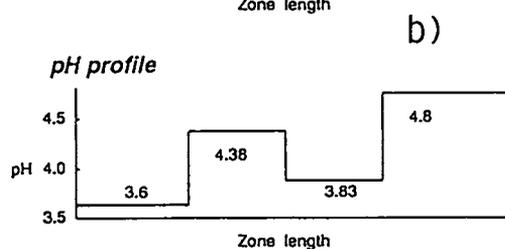
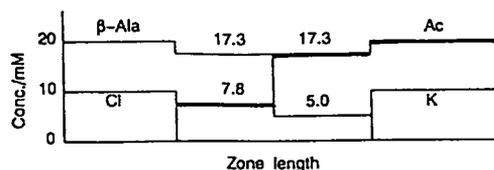
図-2にこの電解液系での濃度、pHおよび $R_E (= \bar{m}_L / \bar{m}_T = E_T / E_L, \bar{m}$;実効移動度、 E ;電位勾配)のプロファイルを示した(シミュレーション)。この系では R_E はターミナルゾーンとして適切な大きさである。

3. 表-1に陽極液(アニオン用リーディング電解液)、陰極液(カチオン用リーディング電解液)の例を示した。各表から一つの電解液を選び組み合わせる。図-2cから明らかのように、電解液の組み合わせが適当かどうかは各バッファーイオンがターミナルイオンとして適当であるかどうかにかかっている。例えばHCl/ β -アラニン(p

H = 3.6) と KOH/MES (pH = 6) の両電解液を組み合わせた場合、MES はアニオンのターミナルイオンとしては移動度が低すぎ、同様に β -アラニン はカチオンのターミナルとしては移動度が低すぎる。すなわち生じたターミナルゾーンの伝導度が小さすぎて低い電流しか流す事ができない。逆に、例えば HCl/ヒスチジン (pH = 6) と KOH/酢酸系 (pH = 4.8) を組み合わせたとすると酢酸、ヒスチジン共にターミナルイオンとして移動度が大きすぎ、等速電気泳動分析の可能な試料の移動度の範囲が狭くなる。結論として、陽極液の pH よりも陰極液の pH が少し (1~2) 高くなるように選択すれば双方向等速電気泳動分離が可能である。



Concentration profile d)



Potential gradient profile c)

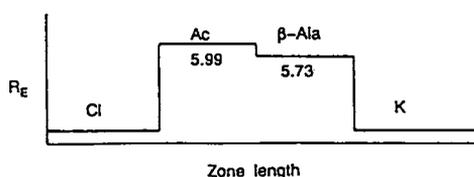


図-1 (上) 双方向等速電気泳動の模式図
図-2 (右) 濃度、pH、電位勾配のプロフィール

表-1 双方向等速電気泳動用電解液系

Anolyte : HCl + pH buffer			Catholyte : KOH + pH buffer		
Buffer	pKa	pH range	Buffer	pKa	pH range
Gly-Gly	3.140	2.6-3.6	Asp	3.900	3.6-4.4
β -Alanine	3.552	3.0-4.0	Glu	4.324	4.2-5.0
ϵ -aminocaproic acid	4.373	3.8-4.8	Ac	4.756	4.6-5.4
Creatinine	4.828	4.2-5.4	SUC	5.638	5.2-6.0
Histidine	6.040	5.4-6.4	MES	6.095	5.6-6.4
Imidazole	7.150	6.4-7.4	Cresol	7.377	7.0-7.8
TRIS	8.076	7.4-8.4	Gly-Gly	8.400	8.0-8.8
Ammediol	8.780	8.2-9.2	His	9.342	9.0-9.8
Ethanolamine	9.498	9.0-10.0	Val	9.710	9.4-10.2
			β -Ala	10.24	9.8-10.6
			Pro	10.64	10.4-11.2

1) 渡辺和彦・広川健・木曾義之、SCE11、東京(1991)

2) T.Hirokawa, K.Watanabe and Y.Kiso, J.Chromatogr, in press(1992).

2 双方向等速電気泳動法による 高レベル廃液模擬試料の分離

(広島大工、比治山女子短大*) ○中村謙一郎・広川健・西山文隆
木曾義之*

BIDIRECTIONAL ISOTACHOPHORETIC SEPARATION OF A MODEL WASTE
OF A HIGH LEVEL LIQUID WASTE
Ken-ichirou NAKAMURA, Takeshi HIROKAWA ,
Fumitaka NISHIYAMA and Yoshiyuki KISO
Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,
Hiroshima Univ., Higashi-hiroshima 724 Japan
*Hijiyama Women's College

ABSTRACT - For the isotachophoretic separation of a high level liquid waste (HLLW), various complex formers (α -hydroxy-isobutylic acid, Tartaric acid, Citric acid and Ethylenediamine-tetra-acetic acid) were added to a leading electrolyte to control the migration of the HLLW components. As a result, effective partitioning of HLLW was achieved when the selectivity of these complex formers were utilized systematically.

1. はじめに

従来の等速電気泳動法では一度の分析においてアニオンまたはカチオン成分のどちらか一方だけが分析の対象であった。しかし、電解液を適当に選択すればアニオン、カチオン双方向の等速電気泳動現象が起こり、種々の化学形をとる金属イオンを含む系の分離、分取、分析には有効となる。今回、このような双方向分離に対応する同時分取装置を使用し、核燃料再処理廃液模擬試料に適用した。原子炉で発生する使用済核燃料再処理廃液中には核分裂反応により天然には存在しない元素や、自然存在比が非常に低い元素など希少価値のある元素が数多く、且つ高濃度で存在している。これらの有用元素を等速電気泳動法を用い、用途別に4群に群分離し、各々の分野への再利用の可能性を検討する。

2. 実験

実試料としては、放射性核種を含まない模擬試料を使用し実験を行った。試料中には30種の金属イオンが含まれている。電解液の条件をTable.1に示す。

Table.1 電解液系

リーディング電解液	: 20 mM	アンモニア水溶液/酢酸	pH=4.8
ターミナル電解液	: 20 mM	カルニチン塩酸塩	
錯形成剤	: 10 mM	α -ヒドロキシイソ酪酸	
		1 mM	酒石酸
		0.5 mM	クエン酸
		0.25 mM	EDTA

リーディング電解液には錯形成剤を適量添加し、金属イオンとの錯形成反応を利用し各イオンの実効移動度を操作し、アニオン成分、カチオン成分、中性成分として群分離を行う。分取した金属イオンの検出には、高感度な粒子励起X線分析法（PIXE法）を用いて微量成分をも詳細に分析した。

B. 結果と考察

Fig. 1 に 1 mM-酒石酸系で模擬試料を分離した結果を示す。酒石酸系の特徴は、ほとんどの金属イオンはカチオン成分として泳動するが、ウランに代表される超ウラン群がアニオン成分として泳動する点である。また、錯形成剤クエン酸、EDTAであるが、これらの最適濃度を決定すべく予備実験を行った。

Fig. 2 に各イオンの回収結果に対する錯形成剤濃度の影響のグラフを示す。その結果、クエン酸はZrや希土類群に、EDTAは希土類群、遷移金属群に強い選択性を示すことが明らかになった。このような錯形成剤の選択性の研究は、核燃料再処理廃液に限らず一般に等速電気泳動により分離を行う上で重要である。詳細については講演で報告する。

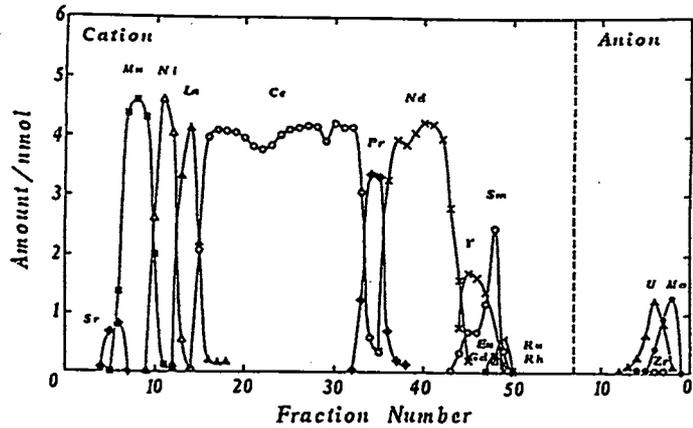


Fig. 1 1 mM-酒石酸系

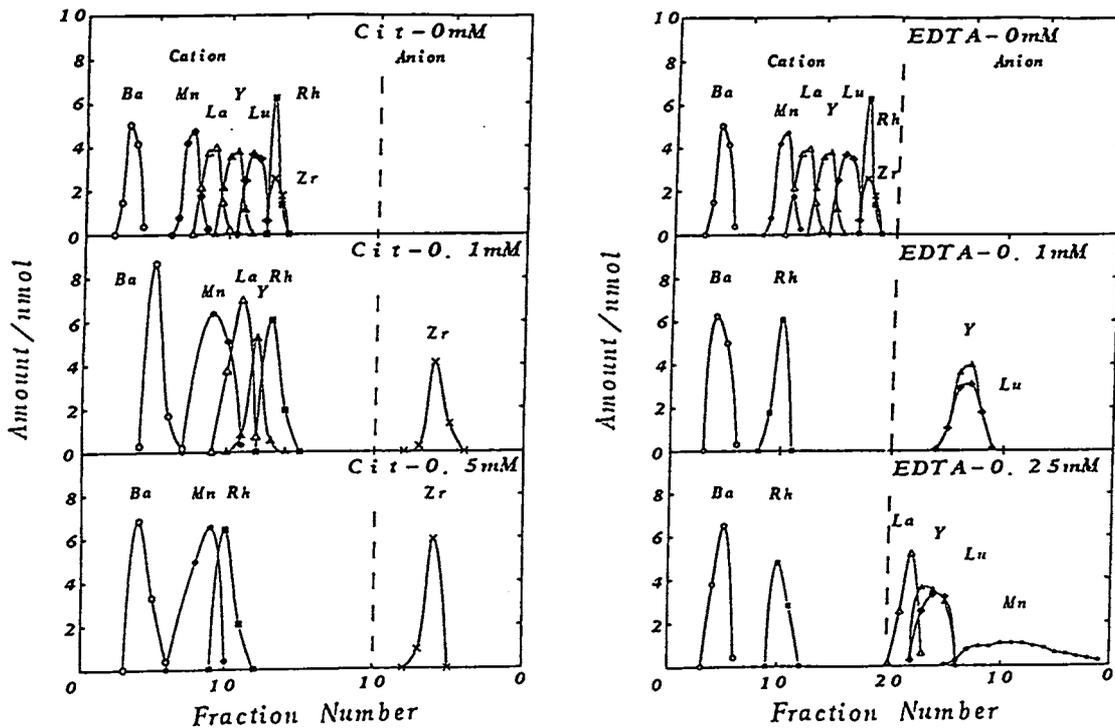


Fig. 2 錯形成剤濃度と泳動挙動

2次元無担体等速電気泳動装置の試作と高レベル核燃料再処理廃液の分離

(広島大工・比治山女子短大*) ○大田高雄・広川健・木曾義之*

TRIAL CONSTRUCTION OF A FREE FLOW ELECTROPHORESIS APPARATUS AND ITS APPLICATION TO THE SEPARATION OF A MODEL WASTE OF A HIGH LEVEL LIQUID WASTE

TAKAO OHTA, TAKESHI HIROKAWA and YOSHIYUKI KISO*

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,
Hiroshima Univ., Kagamiyama 1, Higashi-hiroshima 724 Japan
*Hijiyama Women's College

ABSTRACT - Free flow isotachopheresis was used for the partitioning of useful elements in a high level liquid waste(HLLW). The separation behavior of HLLW was studied at first by the use of a commercial apparatus with a separation chamber of 10cm(width)x50cm(height). The separation behavior was not sufficient due to the narrow width of the separation chamber. In order to obtain better result, a free flow apparatus with a wider separation chamber of 50cm(width)x50cm(height)x0.05cm(thickness) was designed and constructed.

1. 従来、本研究室では細管式等速電気泳動装置（1次元等速電気泳動装置）によって種々の金属イオンを含む高レベル核燃料再処理廃液の分離挙動について詳細に検討し、有用金属の分取に等速電気泳動法が有用であることを示した。しかし、大量の再処理廃液を連続的に処理するためには細管式等速電気泳動法ではなく、2次元等速電気泳動法を用いる必要がある。この方法を用いれば試料を連続的に分離槽に注入でき、Fig.1に示したように分離槽下端に達した試料はカチオン成分、アニオン成分、非イオン成分に分離・分取することができる。この方法で試料を分離するためには比較的幅の広い分離槽を備えた装置が必要であるが、現在、そのような大型の分離槽を備えた装置は市販されていない。そのため、本研究では市販の小型分離槽（幅10cm）を備えた2次元電気泳動装置による予備実験の結果と大型の分離槽（幅50cm）を持つ装置の設計と試作について報告する。

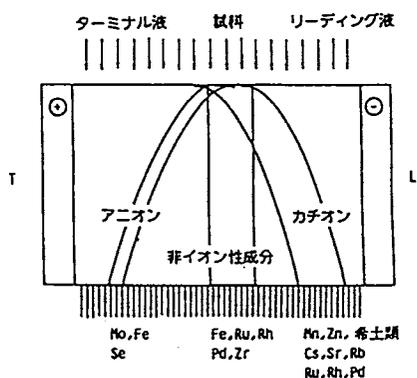


Fig.1 概念図

2. BENDER & HOBEIN社製の2次元無担体電気泳動装置（ELPHOR Vap 22）を用いて核燃料再処理廃液の分離挙動について実験を行った。本装置の分離槽の有効サイズは泳動方向（幅）10cm、分取方向50cm、厚さ0.5mmである。使用したリーディング電解液は20mM NH_4OH で錯形成剤 α -ヒドロキシイソ酪酸（HIB）を10mMを添加後、酢酸を加えてpH4.8にしたもので、ターミナル電解液は10mM塩酸カルニチンを用いた。1次元装置での実験で得られた分離能1140nmol/Cから計算して、泳動電流を30mA、試料注入量を0.123mmol/hとした。分離状態の比較のためFig.2に1次元装置での結果を、Fig.3には2次元装置による分離結果を示した。これらの結果を比較すると、同じ電気量を試料が受けていても2次元装置での分離は不十分であることがわかった。

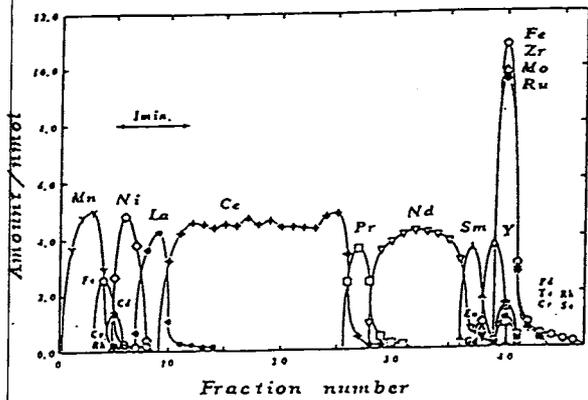


Fig. 2 分離結果 (1次元装置)

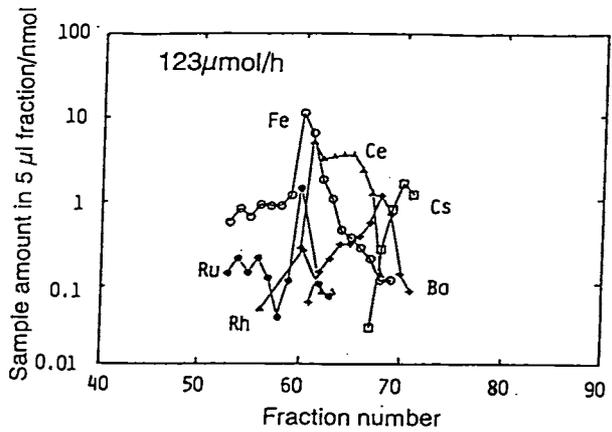


Fig. 3 分離結果1 (2次元装置)

Fig. 4は試料注入量を約半分にした条件で実験を行った結果である。この条件では分離状態がFig. 3と比べてかなり良くなっているが、試料が分離槽の限界まで泳動したにも関わらず、分離まだ不十分であった。この理由としては、本装置はもともと移動度の小さい蛋白等の生化学物質の分離分取を目的に設計された装置であり、試料が充填されて分取されるまでの長さ(縦方向)が50cmであるのに対して泳動

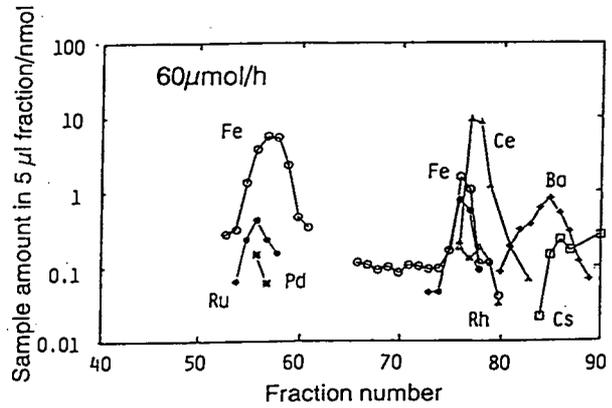


Fig. 4 分離結果2

方向(横幅)は10cmしかなく、そのため試料が分離するのに十分な泳動距離が得られなかったためではないかと考えられる。この点を改善するためには、分離槽の泳動方向をもっと大きくする必要があり、そのため今回大型の2次元等速電気泳動装置の試作を行った。

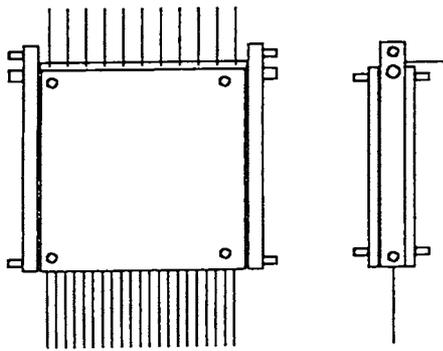


Fig. 5 全体図

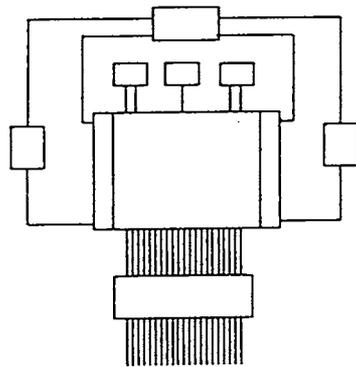


Fig. 6 電解液流路

Fig. 5、Fig. 6に今回試作した2次元等速電気泳動装置の全体図と電解液流路図を示した。分離層の有効サイズは縦50cm、横幅50cm、分離槽の厚さは0.5mmである。講演ではこの装置で得られた結果も報告する予定である。

(株)島津製作所・応用技術部) ○日根 隆

MASKING EFFECTS OF LARGE AMOUNT OF IONS IN CAPILLARY
ISOTACHOPHORESISAnalytical Applications Department, Shimadzu Corporation
Takashi HINE

In capillary isotachopheresis, sample ions are met the counter ion in leading electrolyte continuously. Separations of some ions i.e. mono-nucleotide, Fe, aliphatic amines were achieved by complex effect or ion pair etc. of counter ions. In order to determine small concentration of ions in large concentration of other ions, the usage of counter ions that can be bonded with interfering ions during migration was investigated.

1. はじめに

すでに、キャピラリー等速電気泳動におけるリーディング電解液のカウンターイオンの効果について幾つか検討を行なってきた。これら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、化学反応などを利用したものである。錯形成を利用したモノヌクレオチドの分析¹⁾、還元反応を利用した鉄イオンの分析²⁾、イオン性界面活性剤を利用した脂肪族アミンや脂肪族カルボン酸の分析³⁾などについて報告を行なってきた。

キャピラリー等速電気泳動に供される試料には高濃度のイオンが存在しており、このために微量のイオンの分析が困難なものがある。この場合、あらかじめ前処理を行ない高濃度のイオンを除去しておく必要がある。例えば海水中の微量の陰イオンを分析するとき、共沈濃縮法などが用いられている^{4) 5)}。しかし、前処理に手間と時間を要する欠点がある。そこでリーディング電解液のカウンターイオンとして、微量イオン分析の際、妨害となる高濃度イオンとイオン結合し沈殿を生成するイオンを選び、泳動中に反応させ除去する方法について検討を行なった。

2. 実験

装置は島津キャピラリー等速電気泳動装置：IP-3A型を用い、内径0.7mm、長さ80mmのPTFE製と内径0.5mm、長さ160mmのFEP製の泳動チューブをそれぞれ直列に接続して使用した。検出器は電位勾配検出器(PGD)を使用し、得られた信号をデータ処理装置：ITP-R5A型に入力し、定性定量分析を行なった。泳動電流は80~120 μ Aとし、検出を行なった。

リーディング電解液は、10mM硝酸、0.01%HPMCの水溶液に β -アラニンまたは6-アミノカプロン酸を加えてpH3.5~5.0に設定した溶液に、硝酸銀を1~10mMの範囲で加えて調製した。ターミナル電解液は10mMn-カプロン酸ナトリウム水溶液を用いた。試料は有機酸や無機陰イオンの混合溶液を調製し、これらに塩化ナトリウムを適量加えた。試薬はすべて市販の物を購入して使用した。また高濃度の食塩を含ん

だ食品を選び、本法の適用性を検討した。

3. 結果および考察

高濃度のイオンを含んだ試料として醤油を選び検討を行なった。市販の醤油をイオン交換水にて10倍に希釈を行ない、その $1\mu\text{l}$ を分析した。醤油中の塩化物イオンはリーディング電解液に添加された銀イオンと泳動中に速やかにイオン結合し除去される。Fig. 1に硝酸銀を加えないリーディング電解液での分析例を示した。このとき、分析時間は27分を要した。Fig. 2に2mM硝酸銀を添加したリーディング電解液での分析例を示した。硝酸銀無添加に比べて、分析時間は18分で9分短縮することができた。しかし、醤油中に含まれる有機酸の量が減少していることが認められた。これは有機酸と銀イオンがわずかながら結合したためと考えられる。

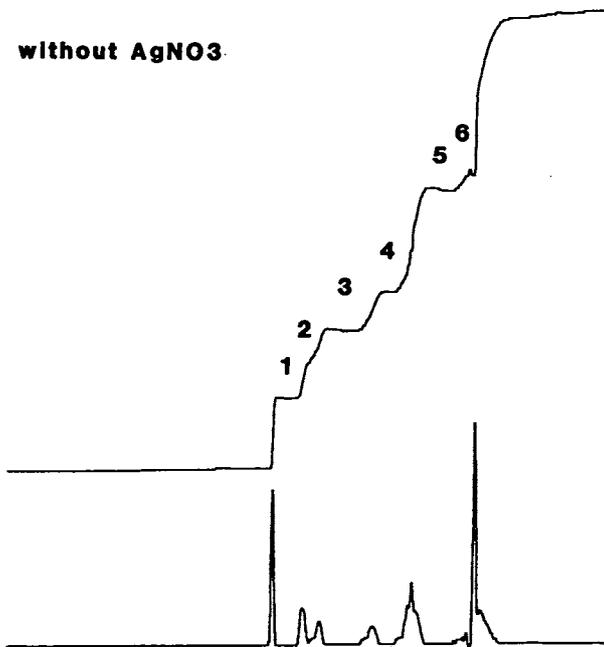


Fig.1 Isotachopherogram of organic acids in 1/10 soy sauce in leading electrolyte without AgNO₃.

1. Phosphoric acid 2. Formic acid
3. Pyroglutamic acid 4. Lactic acid
5. Glutamic acid 6. Acetic acid

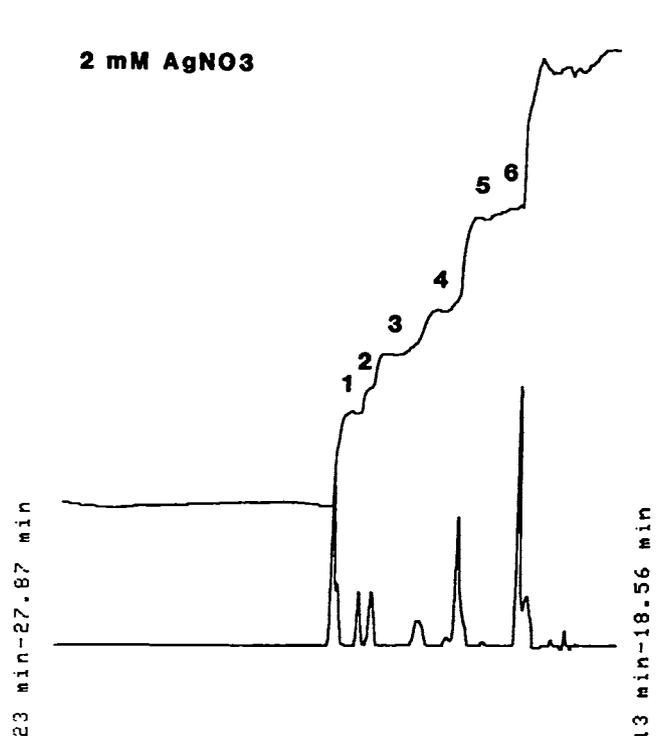


Fig.2 Isotachopherogram of organic acids in 1/10 soy sauce in leading electrolyte with 2mM AgNO₃.

1. Phosphoric acid 2. Formic acid
3. Pyroglutamic acid 4. Lactic acid
5. Glutamic acid 6. Acetic acid

◇参考文献◇

- 1) 八木孝夫、日根隆：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）
- 3) 日根：第10回電気泳動シンポジウム講演要旨集，p. 5（1991）
- 4) 福士恵一，日色和夫：分析化学，34，21（1985）
- 5) 福士恵一，日色和夫：分析化学，34，205（1985）

電気クロマトグラフィー (X)

……圧力差流を用いた電気クロマトグラフィーの挙動について……

名古屋工業大学 応用化学科 ○北川慎也, 早川幸伸, 津田孝雄

Electrochromatography (X)

…Pressurized Flow Driven Electrochromatography…

Shinya Kitagawa, Yukinobu Hayakawa and Takao Tsuda

Nagoya Institute of Technology

Electrochromatography, in which two functions (mobility and sorption interaction) have been used at same time, may be highly effective method for separation of mixture. We demonstrate electrochromatography with a high voltage along a column.

In electrochromatography, the Joule heat generated in a column should be released immediately from the column for avoiding bubble formation. Therefore an effective heat dissipation of the column is very important to obtain good separation. We use microcapillary (50 and 250 μm I.D.) and rectangular capillary (200 \times 2000 μm) columns. We will demonstrate typical examples of separation by using these columns.

※電気クロマトグラフィーにおける挙動

電気クロマトグラフィーとは、液体クロマトグラフィーカラムに電場を印加したものである。それにより、圧力差流、充填剤への脱吸着分配と言った因子の他に、電場の印加により生じた移動度による溶質の電気泳動と言ったものが加わる。

したがって、

- a) 流れの場として、圧力差流及び電場により発生する電気浸透流。
- b) 溶質に存在する電気移動度による泳動。
- c) カラム中での固定層と移動層の存在。
- d) 固定相、すなわち充填剤や壁面により形成された固定相との相平衡。

等が、電気クロマトグラフィーを特徴づける因子である。

圧力差流と電気浸透流による流れと、溶質の電気移動度の方向が同一の場合、非常に速やかな溶出が得られる。また、流れと反対方向の電気移動度による溶質の泳動が、流れよりも大きな場合には、溶質はカラム中にとどまり溶出されない。この条件下では、試料の連続注入が可能であり、これにより希薄溶液の濃縮を行うことができる。また、流れの場と印加する電圧に依存する移動度による泳動を調整することにより、溶質の選択的濃縮も可能となるのである。

※電気クロマトグラフィーでのジュール熱対策

電気浸透流や電気移動度の効果をより大きくするには、カラムに印加する電圧をより大

きくすれば良い。しかしながら、より大きな電位勾配はより大きな電流の発生を伴うので、それによるジュール熱はかなり大きなものとなる。ジュール熱により発生する気泡を抑制することは電気クロマトグラフィーにおいては、大変重要なことである。

ジュール熱を小さくする工夫としては、

- a) 有機溶媒、及び、弱酸、弱塩基の使用により電流値を小さく保つ。
- b) カラム断面積を小さくすることにより、電流値を小さくすることも行っている。
すなわち、以前は内径500 μ mであったが、現在は内径250 μ m、さらには内径50 μ mのものを使用している。

以上は、発生するジュール熱を小さくするための工夫であるが、発生したジュール熱を効率よく放出するために、

- c) 長方形断面をもつカラムを用る。
- d) 冷却の徹底化。

を、行っている。

本報告では、マイクロキャピラリーカラム、長方形断面をもつキャピラリーカラムを用いた分離例を示す。Fig.1に電圧印加にともなったピーク系の変化を示した。

文献

- 1) Tsuda, T. ; Anal. Chem. (1988), 60, 1677-1680
- 2) Tsuda, T. and Muramatu, Y. ; J. Chromatogr. (1990), 515, 645-652
- 3) Tsuda, T. ; LC · GC Interenational, 5, No. 9, 26-36

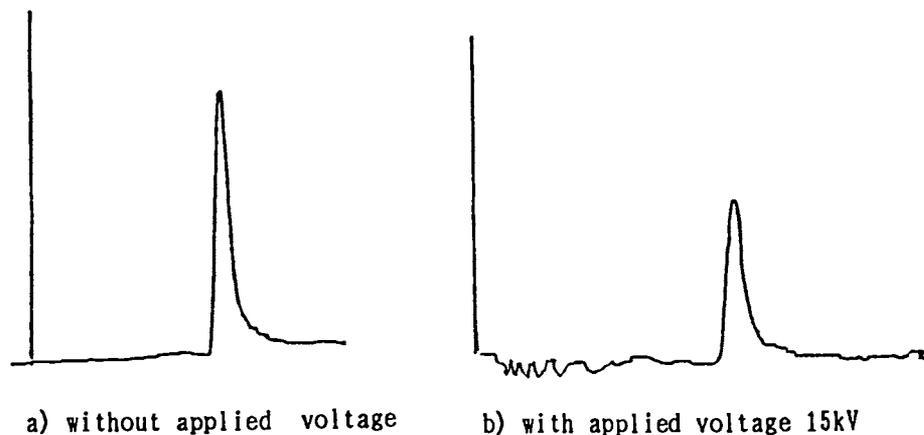


Fig.1 Chromatograms obtained pressurized flow-driven electrochromatography.

Effluent: 9 mM Malonic Acid Sodium Salt/Methanol(50/50)

Column: I.D. 50 μ m \times 12cm packed with ODS(dp 7 μ m)

Sample: 2 mg/ml 5'-GTP, 3Na

電気クロマトグラフィー (XI)

…… 電気浸透流送液法電気クロマトグラフィー ……

6

名古屋工業大学 応用化学科 ○稲垣雅彦, 津田孝雄
Electrochromatography (XI)
…… Electoroosmotically Driven Chromatography ……
Masahiko Inagaki, Takao Tsuda
Nagoya Institute of Technology

As one of the methods of electrochromatography, electroosmotically-driven chromatography has been studied using slurry-packed fused silica capillary columns (1-3).

Inner diameters of capillary columns are 50 and 200 μm , and ODS used as packing materials. We need to select an appropriate effluent which has enough high electroosmotic flow velocity and gives reasonable capacity factors for solutes.

One of the advantages of this electrochromatography is that we can use many kinds of packing materials being very stable and commercially available.

電気浸透流送液法電気クロマトグラフィー

電気浸透流送液法電気クロマトグラフィーとは、液体クロマトグラフィー用充填カラムに電場を印加し、ポンプ送液を全く用いないで電場により発生した電気浸透流のみによる送液によりクロマトグラフィーを行う方法である。

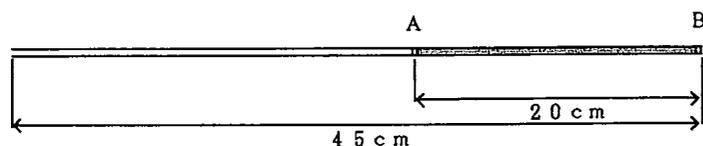
この分離機構は電荷をもつ溶質については分配と電気移動度の二つが働く。電気移動度を利用できない中性化合物については液体クロマトグラフィーと分離機構は同一になる。電気浸透流による送液法の第1の特徴はそのフローパターンが層流と著しく異なりかなり栓流に近いことになり、理想的なクロマトグラフィーの送液法と言える。また、第2の特徴として電気浸透流による送液法ではカラム内部において圧力差が生じないことから、将来的に、例えばセルロースゲル等の軟らかいものをそのまま分離カラムに用いることができる(1-3)。

本法では電気浸透流の速度が溶出時間を決めるため、カラムの電位勾配が大ききことが必要でカラムが短い方が有利である。

電気浸透流や電気移動度の効果を大きくするためカラムの電位勾配が大ききしなければならないが、それに伴う電流によりかなりのジュール熱が発生する。熱による気泡の発生は本法において致命的で、カラム断面を小さくして電流を抑えるなどの工夫が必要である。

装置

装置的にはキャピラリー電気泳動装置に若干の変更を加えて用いた。電気泳動装置 I S C O M O D E L 3 8 5 0 を用いた。カラムは内径 2 0 0 μm のフューズドシリカキャピラリーの管の端より 2 0 c m の位置にガラスフリット A を作り、7 μm の O D S 充填剤 (Capcell, Shiseido) を 1 5 0 k g のポンプ圧で超音波洗浄器を用いながら充填し、ついで末端にガラスフリット B を作り O D S 充填剤を封入したものをカラムに用いた。カラム全長は 4 5 c m にした(下図)。



同様に、全長 2 0 c m の内径 5 0 μm カラムをのフューズドシリカキャピラリー管の端より 8 c m の位置にガラスフリットを作り 5 μm の C 8 充填剤 (Develosil, 野村化学) を 1 8 0 k g のポンプ圧で超音波洗浄器を用いながら充填して調整した。

検出はフリット A の直後で 2 5 4 n m - U V にて行い、注入はフリット B の部分を試料溶液に浸し電場を印加して発生する電気浸透流により行なった。

実験結果

調整した200 μ m, 50 μ mのカラムを用いて実験を行った。送液に用いる電気浸透流の速さは印加する電圧に依存するが、用いる溶離液によってもかなり異なる。内径200 μ mカラムでの各種溶離液の浸透流速度を表1に示した。

本法では浸透流が速くかつ目的化合物の分離に有利な溶離液を見いだすことが重要である。

表1. 200 μ m充填カラムでの溶液と電気浸透流の関係

溶液	浸透流の速度(cm/min)
メタノール	1.82
エタノール	1.25
アセトニトリル	0.54
イソプロパノール**	----
10mM 磷酸水溶液-70%エタノール**	----
20mM 臭化セチルトリメチルアンモニウム-エタノール*	-0.33

標準物質としてウラシルを使用した。20kVの電圧を印加した。充填カラム部分の電位勾配は714V/cmと計算された。

* 臭化トリメチルアンモニウム溶液では浸透流の方向が逆転している。なおフリットB側を正極とした。

** 浸透流がとても遅く、ピークがでなかった。

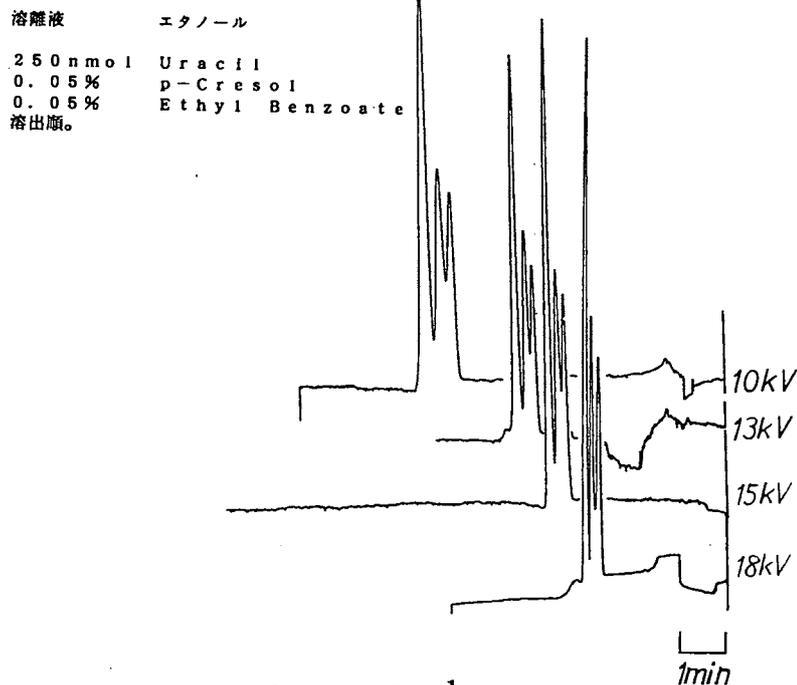
内径200 μ mのカラム, 溶離液: 20mM 臭化トリメチルアンモニウム-70%エタノール溶液の際、一つの典型例として61000段の理論段数($k'=0.16$)が得られた。

50 μ mのカラムについて電荷を持たない中性化合物の分離例をFigure1に示す。Figureより分離度と用いる電圧との間に若干の関連があると思われる。

文献

- 1) T. Tsuda, LC·GC Intl, 5 (No. 9), 26-36(1992)
- 2) T. Tsuda, K. Nomura, and G. Nakagawa, J. Chromatogr. 248, 241-247(1982)
- 3) 津田孝雄, 日化, 1986, 937-942

謝辞 株式会社日科機(ISCO MODEL 3850), 味の素株式会社の協力に感謝します。



7

マルチキャピラリー式電気泳動装置

((株)日立製作所・中央研究所)

○高橋智、村上勝彦、穴沢隆、西川哲夫、神原秀記

INSTALLATION OF MULTI-CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

Satoshi TAKAHASHI, Katsuhiko MURAKAMI, Takashi ANAZAWA,

Tetsuo NISHIKAWA, Hideki KAMBARA

We have proposed multi-capillary electrophoresis system in which multiple samples can be analyzed using capillary gel electrophoresis. In this system, each electrophoresis lane was composed of gel-filled capillary, under capillary and gap section filled with buffer between both of them, and sheath stream was formed in each gap section, and laser beam for exciting fluorescence was irradiated along the centerline between gel-filled capillary outlets and under capillary inlets. This system result in simultaneous, sensitive and independent detection of multiple samples which performed electrophoresis in each gel-filled capillary. Advantages of this system for high throughput analysis of DNA fragments are discussed.

1. はじめに

生物をDNAレベルで理解し、活用しようとする動きの活発化に伴い、DNA塩基配列を迅速に決定することが必要になってきた。現在は主に蛍光標識を用いた自動シーケンサーによりDNA塩基配列決定がなされている。これらシーケンサーでは、平板状ゲルを用いたゲル電気泳動とレーザー誘起蛍光検出法により、通常1日に10k塩基程度の塩基配列決定ができる。しかし、ヒトのDNAは 3×10^9 塩基で構成されており、塩基配列決定の高スループット化が一層望まれている。DNAシーケンサーの高スループット化には、(1)高速泳動技術、(2)多数の泳動路の同時計測技術等の技術が必要である。

近年、キャピラリー電気泳動は高速泳動に適した手法として注目されており、DNA塩基配列決定に活用する試みが多くなされている。しかし、キャピラリー電気泳動での多数本同時計測方法については、キャピラリー表面からの散乱光をいかに除去し、いかに多数のキャピラリーを同時に計測するか等の解決しなければならない課題がある。我々は独自にこの課題を解決するマルチキャピラリー電気泳動システムの開発を進めてきた。本報告では、その方式、基本特性等について報告する。

2. マルチキャピラリー電気泳動システム

多数のキャピラリーを各々泳動する試料を同時に計測することを目的に開発したマルチキャピラリー電気泳動システムの蛍光検出部をFig.1に図示する。分子量分離用ゲルキャピラリー多数本を平面状に並べ、これと1mm程度離して下部中空キャピラリーを対向して配置した。これらキャピラリーの回りは緩衝液で満たし、各々のキャピラリーのほぼ中間部をレーザー光照射する方式とした。

試料は上部ゲルキャピラリー → 緩衝液中 → 下部中空キャピラリーと電気泳動する。なお、システムでは緩衝液を上部キャピラリー周辺から下部中空キャピラリー中に流入させてシースフローを形成し、上部キャピラリーから溶出する試料をこの緩衝液流に沿って下部中空キャピラリーに流入させ、試料の緩衝液中での拡散を防止する構造とした。

レーザー光は緩衝液の満ちた空間のみを通過するので、キャピラリー界面による散乱・屈折を受けないため各分離用ゲルキャピラリーを泳動する試料を同時にレーザー励起することができ、またゲルからの背景光の無い高感度な蛍光計測を可能とした。なお、各試料からの蛍光は2次元蛍光検出器により同時に蛍光計測する方式とした。

3. 実験

上部ゲルキャピラリーには、内径 $100\mu\text{m}$ 、外径 $200\mu\text{m}$ のキャピラリーにアクリルアミドゲル(4%T、5%C、7M尿素含)を充填したものを使用した。下部中空キャピラリーには、内径 $200\mu\text{m}$ (又は $100\mu\text{m}$)、外径 $350\mu\text{m}$ (又は $200\mu\text{m}$)のキャピラリーを使用した。シースフローさせる緩衝液にはアクリルアミドゲル内の成分と同じTBE緩衝液(7M尿素含)とした。また励起光にArレーザー光(488nm)、2次元蛍光検出器にイメージインテンシファイア付TVカメラを使用し、次の評価をした。

- 1) 緩衝液中泳動路の相互分離性の評価。(泳動試料：フルオレセイン蛍光体)
- 2) DNA断片の泳動パターンの評価。(泳動試料：FITC標識 M13mp8 DNA断片)

4. 結果及び考察

Fig.2は蛍光検出部でのレーザー光軸上の蛍光強度分布の1例を示す。各ピークは各々緩衝液中での蛍光体の存在分布を示し、ピークの半値全幅がキャピラリー径以下と、微細な泳動路を構築できることを確認した。Fig.3はマルチキャピラリー状態での任意の1つのキャピラリーを泳動するDNA断片(M13mp8)の分子量分離パターンであり、ゲル中とほぼ同様の分離能、及び泳動速度をえることができた。以上より、より多くのキャピラリーをマルチ化することで高スループットの電気泳動装置を構築できることを確認した。

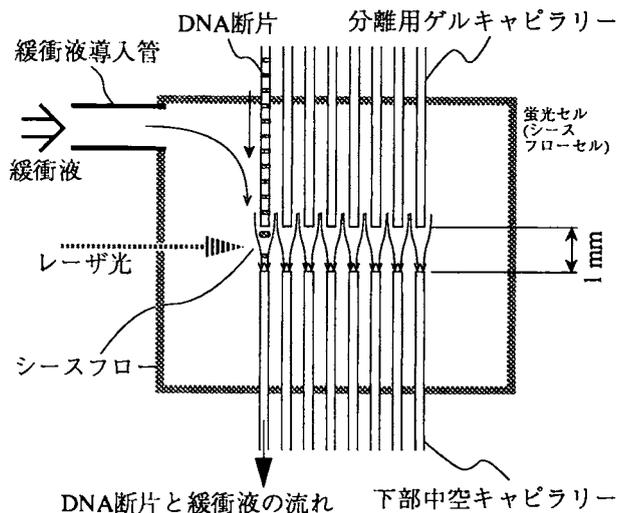


Fig.1 マルチキャピラリー電気泳動システムの蛍光検出部

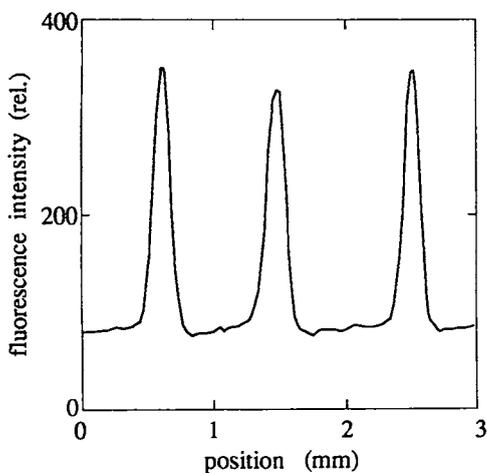


Fig.2 レーザー光照射光軸上の蛍光強度分布

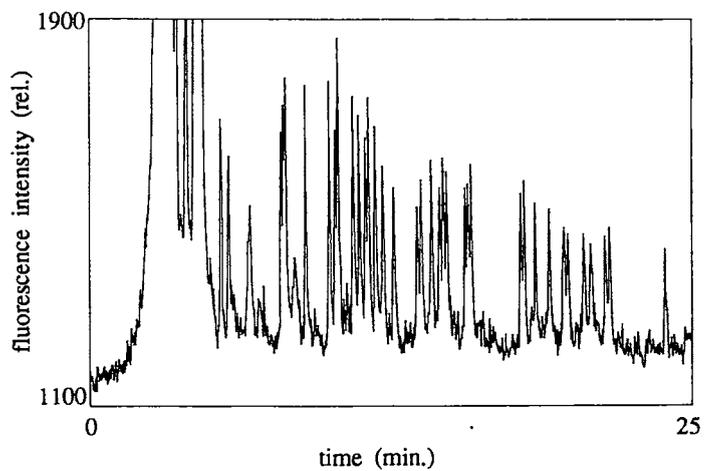


Fig.3 M13mp8 DNA断片の分離パターン

レーザー誘起蛍光検出—ミセル動電クロマトグラフィーによる多環芳香族炭化水素の分離

九大工 ○金田 隆, 山下 哲也, 今坂 藤太郎

Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by micellar electrokinetic capillary chromatography based on Laser fluorescence detection

Faculty of Engineering, Kyushu University

Takashi KANETA, Tetsuya YAMASHITA, and Totaro IMASAKA

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were separated by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) using sodium deoxycholate as a surfactant. The separation of PAHs was difficult in a preliminary study, because of their high hydrophobicity. However, addition of dimethylformamide (DMF) to the micellar solution allowed the separation of a mixture of six PAHs by decreasing their capacity factors. To determine the migration time of the micelles in water-DMF solvent, dansylated amines were utilized, and then capacity factors of PAHs were calculated. Capacity factors of PAHs were remarkably decreased with increasing the concentration of DMF.

【緒言】多環芳香族化合物は発ガン性が強く、環境科学的に重要な化合物である。ミセル動電クロマトグラフィーによる多環芳香族炭化水素の分離についてはこれまでにいくつかの報告があり^{1,2}、先に我々もシクロデキストリン修飾ミセル動電クロマトグラフィーによるアントラセン誘導体の分離について報告した^{3,4}。しかし、ピレンやペリレンのような分子量の大きな多環芳香族はシクロデキストリンの内孔に入ることができないため、十分な効果を得ることができなかった。そこで本研究では界面活性剤にデオキシコール酸ナトリウムを、また泳動溶媒に水—ジメチルフォルムアミド(DMF)混合溶媒を用い、比較的分子量の大きな多環芳香族炭化水素の分離について検討した。

【実験】キャピラリーはガスクロ工業製の内径 50 μm 、外径 375 μm のものを用い、全長を 60 cm、試料注入部から検出部までの長さを 50cm とした。蛍光検出はオンカラム法により行った。励起光源として He-Cdレーザーを用い、キャピラリーにレーザー光を照射し光電子増倍管で検出した。試料の注入は落差法により行った。泳動溶液にはデオキシコール酸ナトリウム、リン酸二水素カリウム、トリスを含むDMF 溶液を用いた。ミセルの泳動時間の測定に用いたダンシルアミンは文献にしたがって調製した⁵。Fig.1に試料として用いた多環芳香族化合物の構造を示す。

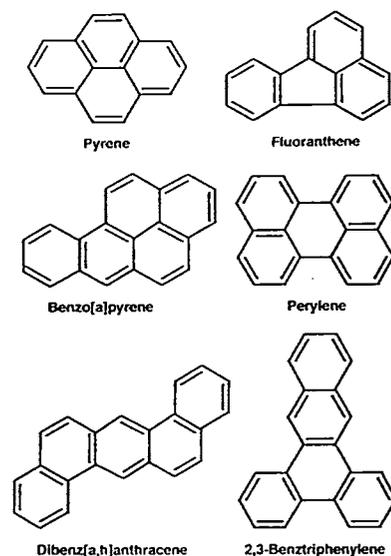


Fig.1 Structure of PAHs.

【結果と考察】

1. ミセルの泳動時間の測定

DMFのような有機溶媒を泳動溶液に添加した場合、マーカーを用いてミセルの泳動時間を測定することは困難である。そこでBusheyらによって報告された方法を改良してミセルの泳動時間の測定を行った⁶⁾。本研究ではプロピルアミン、ヘキシルアミン、オクチルアミン、デシルアミン、ドデシルアミンの5種のアミンをダンシル化したものを用いた。5種のダンシルアミンを泳動分離し、最も保持時間の長いもの（ここではドデシルアミン）の泳動時間を仮想的なミセルの泳動時間 t_{m1} とし、他のアミンの k' を計算する。計算された k' の対数値をアミンの炭素数に対してプロットし、直線を得る。この直線からドデシルアミンの k' を求め、求められた k' とドデシルアミンの保持時間からミセルの泳動時間 t_{m2} を計算する。 t_{m2} をミセルの泳動時間とし、再びドデシルアミン以外の4種のアミンの k' を計算し、同様に炭素数に対してプロットする。ドデシルアミンの k' が直線上の値と一致するまでこの操作を繰り返し、一致したときの t_m の値をミセルの泳動時間とした。

2. クロマトグラム

多環芳香族化合物は水に対する溶解度が非常に小さく、水溶液系ではミセル相に取り込まれやすいために、分離は困難であった。そこで種々の有機溶媒の添加を試みたところ、DMFの添加により良好な結果が得られた。Fig. 2に6種之多環芳香族化合物のクロマトグラムを示す。デオキシコール酸ナトリウムの濃度を70 mMとした20% DMF溶液を用いたとき、これら6種之多環芳香族炭化水素の分離が達成できた。ピレンとフルオランテン、ペリレンとベンゾ[a]ピレン、及びジベンズ[a, h]アントラセンと2, 3-ベンズトリフェニレンはそれぞれ分子量が等しく、近接した保持時間を持つ。ミセル動電クロマトグラフィーにおけるDMFの影響を調べるために多環芳香族化合物のキャパシティブクター k' の測定を行った¹⁾。

3. 多環芳香族炭化水素の保持挙動

泳動溶媒として20% DMF溶液を用いて、上記の方法により求めた多環芳香族の k' をデオキシコール酸の濃度に対してプロットしたとき、いずれの化合物においても良好な直線関係が得られた。X切片の値から求めた臨界ミセル濃度は約18 mMであり、水溶液の場合よりもかなり高い値である。デオキシコール酸濃度を70 mMとしたときの多環芳香族化合物の k' の値は2から8の範囲内にあり、水溶液系と比較してかなり減少している。DMFの添加による k' の減少は、多環芳香族のミセルへの分配係数の減少、及び臨界ミセル濃度の増加による相比の減少によるものと考えられる。これらの結果から疎水性の高い化合物の分離において、DMFが極めて効果的な添加剤であることがわかった。

1) Cole, R. O. et al., J. Chromatogr., 1991, 557, 113-123.

2) Yik, Y. F. et al., J. Chromatogr., 1992, 589, 333-338.

3) Imasaka, T. et al., Analyst, 1991, 116, 1407-1409.

4) Imasaka, T. et al., Anal. Chim. Acta, 1992, 256, 3-7.

5) Tapuhi, Y. et al., Anal. Biochem., 1981, 115, 123-129.

6) Bushey, M. M. et al., J. W., J. Microcolumn Sep., 1989, 1, 125-130.

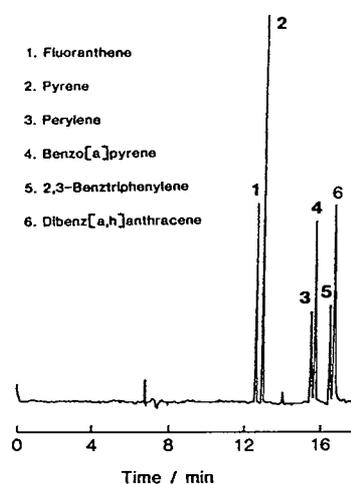


Fig. 2 Chromatogram of PAHs

共振レーザー誘起キャピラリー振動法によるCZEの高感度検出

(東大工) ○小竹 玉緒、北森 武彦、澤田 嗣郎

HIGHLY SENSITIVE DETECTION METHOD FOR CZE BY
 RESONANT LASER-INDUCED CAPILLARY VIBRATION
 Department of Industrial Chemistry, Faculty of
 Engineering, The University of Tokyo
 Tamao ODAKE, Takehiko KITAMORI and Tsuguo SAWADA

We have proposed a weak absorbance detection method for CZE: capillary vibration induced by laser (CVL). CVL measurement at the resonant frequency was used to detect samples flowing electrophoretically in the capillary tube. Controlling damping factors and using high resonant frequencies (>1kHz), stable signals at the resonance were attained. This resonant CVL method was applied to a detector for CZE. The lower limit of detection (S/N=2) was 1×10^{-4} in absorbance and 8.5 amol of amino acid.

【はじめに】 CZEのOn-column検出法として光学的な方法が用いられているが、蛍光検出はレーザーを用いることで高感度化できる一方、通常用いられている吸光検出器の感度はあまり高くない。我々は吸光に基づいた高感度検出法として光熱変換効果の一種であるレーザー誘起キャピラリー振動法(CVL法)を提案してきた。CVL法とはキャピラリー内にレーザー光を断続的に照射したとき、試料の吸光度に応じて発生する熱がキャピラリーの張力を周期的に変動させる結果、キャピラリーが弦のように振動することを利用した検出法である。CVL信号強度は試料の吸光度に依存するので、通常の吸光検出器の代替として適用範囲が広い。本法により、アミノ酸を誘導体化せずにfmolレベルまで検出可能であった¹⁾。低周波では周囲の機械的振動による雑音を拾いやすいためなるべく1kHz以上の高い励振周波数を使いたいが、CVLは一種の光熱変換効果であるため感度は励振周波数に反比例して低くなる。そこで共振を利用することが考えられるが、雑音は系の固有振動である共振点で拾うためS/Nの点からは好ましくなく、また弦の振動では鋭い共振であるため周波数安定性も悪くこれまでは共振周波数を避けていた。本研究ではこれらの相反する条件を満たすため、ダンピング因子を大きくして1kHz以上の比較的大きい周波数で安定した共振を得ることを試みた。また、検出にもプローブ光のキャピラリーによる回折パターンのCVLによる空間的変動をポジションセンサで検出する光学的により簡便な方法を開発した。

【実験】 実験装置の構成をFig. 1に示す。一定の張力をかけたキャピラリー(内径30 μ m、外径150 μ m、全長900mm、振動部分長55mm)のほぼ中央に、共振周波数で強度変調した励起レーザー光(488nm、50mW)を集光照射した。プローブ光もキャピラリーに集光し、生成した回折パターンを位置検出器上に投影した。試料には 5×10^{-5} Mダブルシル化アミノ酸(Val)を用い、電気的移動法(25kV、5sec)で導入後、25kVで電気泳動させた。バッファ

には20mMリン酸緩衝液 (pH7) を用いた。

【結果および考察】 C V L 信号の周波数特性をFig. 2に示す。1609Hzのピークが共振点である。1kHz以上では機械的振動雑音、特にパルス状の雑音が少なく、振動の支点とキャピラリー間にはさんだダンパーの効果により、共振ピークの半値幅は7.5Hzから19Hzにすることができ、その結果、周波数の変動に対しても共振点での信号強度を安定に保つことができた。Fig. 3は共振点でのC V L 信号の典型的な信号波形で、弦の固有振動に特有な正弦波が得られている。モデル試料として488nmに吸収のあるダブシル化アミノ酸 (Val) を電気泳動させ、共振C V L 法で検出した結果をFig. 4に示す。レーザーの出力が50mWと低いにもかかわらず、検出限界吸光度 (S/N=2) は 1×10^{-4} と見積もられる。Dovichira²⁾と同様に評価すると、キャピラリー内の検出体積は0.85pLであるから、検出絶対量は8.5amolであり、UV detector (検出体積7.8nl) より約4桁少ない値であった。吸光光度法では感度をかせぐために検出体積を大きくしているが、C V L では検出体積のちがいから、見かけ上の理論段数も約5倍向上した。励起光出力の向上や条件の最適化などから、いっそう高感度化できるものとする。

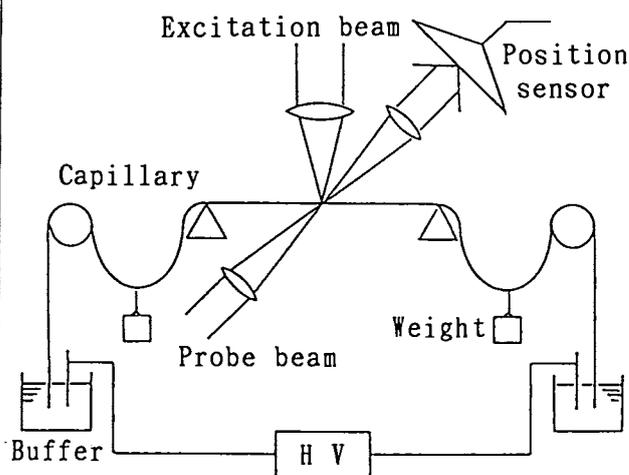


Fig. 1 Experimental arrangement of the CZE/CVL system.

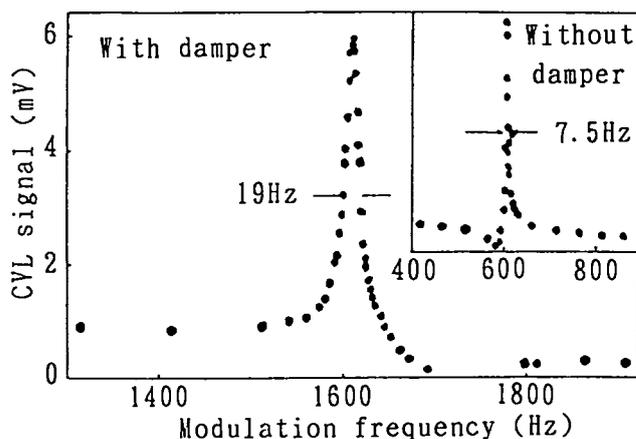


Fig. 2 Frequency characteristics of the CVL signal magnitudes.

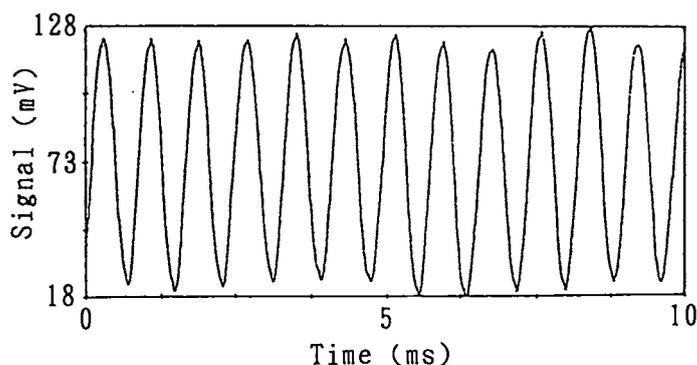


Fig. 3 Typical resonant CVL signal.

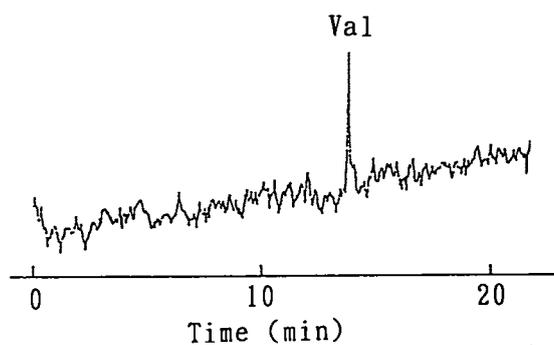


Fig. 4 Electropherogram of dabsyl-Val.

文献 1) J. Wu, T. Otake, T. Kitamori and T. Sawada, Anal. Chem. 63, 2216-2218(1991).

2) M. Yu and N. J. Dovichira, Appl. Spectrosc. 43, 196-201(1989).

(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⁾)
 G.Bondoux¹⁾・W.R.Jones¹⁾ ,P.Jandik¹⁾ ,○高橋 孝行²⁾

The analysis of low levels of anions in water.

¹ G.Bondoux,¹W.R.Jones,¹P.Jandik and ²Yosiyuki Takahashi

Optimized electromigrative sample introduction improves detection limits for anions in capillary electrophoresis. Reproducible results are achieved for micromolar and nanomolar levels of concentration. The new method offers shorter runtimes, improved resolution and greater simplicity in comparison with ion chromatography. The technique was applied to water samples from the power industry. Trace levels of anions are monitored routinely in water for steam generation in conventional and nuclear power plants. Reproducible and accurate results are presented for pure water samples containing typical concentrations of anions as well as for more specific types of samples, such as water compositions in the primary circuit of a nuclear power plant.

【はじめに】

現在、我が国に於て41機の原子力発電プラントがあり、その内4割が加圧水型炉(PWR)である。原子力発電はクリーンなエネルギーであるが、一度事故を起こせば環境に対する影響も大きい。また運転作業に伴う労働環境にも影響する。発電プラントでは過去原子力発電プラントでは冷却水の水質管理を改善しており水化学が向上している。

加圧水型発電プラントの一次冷却水はウランの核分裂によって発生する中性子を吸収して制御するため高濃度のホウ酸が添加している。またpHの制御を目的として水酸化リチウムも含まれている。従来の測定方法では、この高濃度ホウ酸イオンのため注入量に相関がなかった。キャピラリー電気泳動による分離ではホウ酸イオンが他のイオンよりマイグレーションタイムが遅く影響が少ない特徴があり、原子力発電プラント(PWR)の水質管理に応用できるか検討を行った。

【実験】

HPC装置としてウォーターズ製Quanta 4000CEシステムを用いキャピラリーは内径75 μ m、長さ60cmのフューズドシリカ製を用いた。検出は214nmのインダイレクト法で行った。電極は試料注入側が陰極、検出器側が陽極になるようにセットした。CIATMパックOFM Anion BT(ウォーターズ製)はカチオンの界面活性剤で臭酸塩となっているため、陰イオン交換樹脂(セップパックAccell QMA、ウォーターズ製)を100mM水酸化ナトリウム水溶液でOHフォームとした後、2.5mlを通し、臭素イオンを取り除きクロム酸濃縮液を加え超純水でメスアップした後1%酢酸水溶液でpHを8.0に調整する。

スタンダード、試料とも400 μ lを捕り1mMオクタンスルホン酸ナトリウム(イオンペアー用、東京化成製)を20 μ l加えオートサンプラー用カローセルにセットする。試料の注入は電気的注入法を用い注入した。

【結果及び考察】

1) 試料に添加するオクタンスルホン酸ナトリウムは、0、25、75 μ Mとなるように試料に加え電気的注入法の検討を行った。25 μ M以上のオクタンスルホン酸ナトリウムの存在で各イオンは注入され75 μ Mでも大差はなかった。しかし市販のオクタンスルホン酸ナトリウ

ムにフリーの硫酸イオンが存在するため多く添加する事をさけ、試料中に40 μ Mになるように行った。

2) 検出感度はFig-1に示した様に各イオン2 ppbを満足するものであった。

3) 検量線の直線性はイオンの電気的注入法がイオン当量導電率に影響されるため試料濃度が高くなるとコールラウシェ (Kohiraucsch) の経験式から濃度が高いほどイオン当量導電率は低くなると考えられる。従って濃度が高くなると注入量が低くなり検量線は2次関数となると思われる。

4) 再現性はTable-1,2に示した様に5回の注入に於てCV% 8から1.1の間、マイグレーションタイムはフッ素が1.05それ以外のイオンが1以下という値であった。

5) ホウ酸イオンの濃度は各イオンの注入量に影響する。ホウ酸イオン濃度と各陰イオンの注入量はイオンごとの相関があった。

分析時間の短いキャピラリー電気泳動による原子力発電プラントにおける陰イオンの測定に十分適用することができると考えられる。さらに今後二次冷却水への応用にも期待できるものと考えられる。

Table-1 マイグレーションタイムの再現性

	Bromide	Chloride	Sulfate	Nitrate	Fluoride
1	3.2992	3.3492	3.4275	3.5600	4.1508
2	3.2492	3.2983	3.3708	3.5000	4.0758
3	3.2783	3.3250	3.4008	3.5325	4.1092
4	3.2558	3.2992	3.3733	3.5000	4.0633
5	3.2408	3.2850	3.3583	3.4842	4.0408
平均	3.2647	3.3113	3.3862	3.5153	4.0880
標準偏差	0.0238	0.0256	0.0278	0.0305	0.0429
CV%	0.73	0.77	0.82	0.87	1.05

Table-2 面積の再現性

	Bromide	Chloride	Sulfate	Nitrate	Fluoride
1	680.3872	2421.4985	1859.6056	1156.6879	3011.5847
2	667.9298	2486.4082	1857.7578	1158.5356	3072.0239
3	653.6843	2773.2854	1864.1952	1142.6510	3089.9648
4	666.0224	2844.5725	1883.9839	1157.7607	3049.6721
5	648.1410	2893.5676	1827.2700	1065.7908	3013.4922
平均	663.2329	2683.8664	1858.5625	1136.2852	3047.3475
標準偏差	12.6792	215.4202	20.3650	39.9454	34.8415
CV%	1.91	8.03	1.10	3.52	1.14

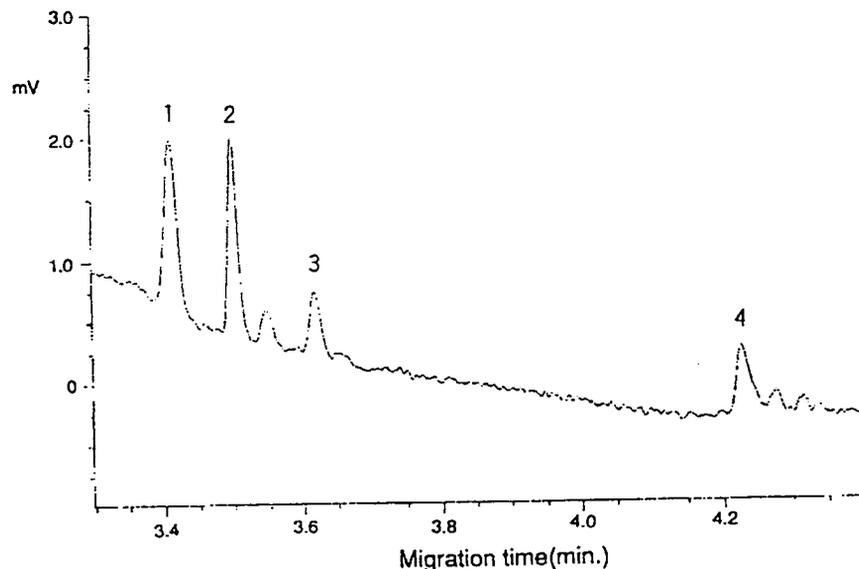


Fig-1 陰イオンのフェログラム

1 塩素、2 硫酸、3 硝酸、4 フッ素イオン、各2 ppb

森林化学分野におけるキャピラリー イオン分析の応用

(日本ミリポア ウォーターズクロマトグラフィー事業部¹⁾)
(北海道大学 農学部 森林化学講座²⁾)

○米久保 淳¹⁾、寺沢 実²⁾

CAPILLARY ION ANALYSIS APPLIED FOR FOREST CHEMISTRY

Waters Chromatography Division, Nihon Millipore¹⁾
Faculty of Agriculture, Hokkaido University²⁾

Jun Yonekubo¹⁾, Minoru Terazawa²⁾

Capillary Ion Analysis (CIA) is one of new technologies in Capillary-electrophoresis.

CIA technology is applied for monitoring of inorganic anions/cations, some organic acids in KP (Kraft Pulp) samples which are complex mixtures containing other organic compounds with an alkaline atmosphere.

The advantages of CIA are speed, simplicity, and more information per analysis with minimal reagent consumption. An advantage is suggested from these results, compared to current technologies.

Additionally, GADE (Garbage Automatic Decompose-Extinguisher) samples which contains high concentrations of various organic compounds are examined by CIA.

CIA gives useful data easily from both KP & GADE samples in Forest Chemistry.

1. はじめに

KP (クラフトパルプ) 製造工程における薬液、蒸解液は高い pH (14) 下で、木材及び分解物由来の高濃度の有機物や、薬液由来の各種無機イオンが含まれており、これらのイオンの含有量/組成の分析は、KPの品質や製造効率を管理する上で、必要不可欠な物となっている。

そこで今回、森林化学分野における CE (キャピラリー電気泳動) 法の応用例の1つとして、このKP製造工程中の試料溶液について、CIA (キャピラリーイオン分析) 法の有用性について検討した。

又、GADE (生ゴミ自動分解消滅機) による人工土壌の評価についても、本法を適用、良好な結果が得られたので併せて報告する。

2. 実験

装置は、Waters Quanta 4000 System を使用した。キャピラリーは、75 μ m X 60cm を使用した。

検出にはUV間接法を用い、泳動相/その他の条件については、Waters CIA法に準拠した。

各試料溶液の調製は、KP試料溶液については、10mMマンニトール水溶液で希釈後、0.45 μ mフィルターでろ過した物を、GADE試料については、粉体を熱水抽出後、希釈、ろ過した物をそれぞれ試料溶液とした。

3. 結果及び考察

KP試料溶液の一例として、65%固形物を含有する黒液のフェログラムを Fig. に示した。本試料溶液は、リグニン及び炭水化物の分解生成物が最も多量に混在している強アルカリ溶液だが、夾雑成分の影響を受ける事無く、KP製造工程の管理因子である水酸基、チオ硫酸、硫酸、亜硫酸イオンが塩素、炭酸イオンや有機酸類と充分に分離された。

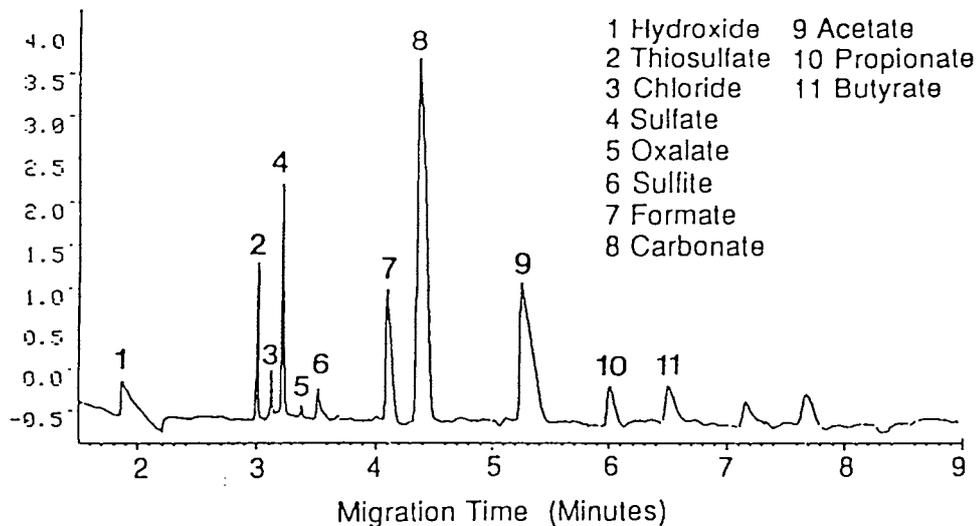


Fig. KP黒液のフェログラム

さらに生ゴミを原料の一つとして使用する事に起因して、マトリクスとして複雑でロット間でバラツキの激しいGADE試料溶液中の、人工土壌としての評価因子である窒素、リン酸、カリウム (NH_4 、 NO_2 、 NO_3 、 PO_4 、K) についても、充分に分析が可能であった。

今回、CIAによるイオン分析を、KP/GADEといった森林化学分野において、非常に複雑なマトリクスを持つ試料溶液で検討したが、いずれの分析も従来法と比較して、

- 1) 分析時間/試料及び試薬量/ランニングコストの短縮, 軽減化
- 2) 前処理の省略, 簡略化
- 3) メソッド/データ解析の簡略化

等の、利点が示唆された。

キャピラリー電気泳動法によるキレート陰イオンの分離と金属イオンの定量

(岡山大・理) ○本水 昌二・森本 浩司

Separation of chelate anions and determination of metal ions by capillary zone electrophoresis

Faculty of Science, Okayama University

Shoji MOTOMIZU and Koji MORIMOTO

Capillary electrophoresis separation of metal chelate ions was examined with UV light-absorbing chelating agents. HBED and its azo derivative (Ac-HBED) were examined. These reagents were added to a carrier solution and samples. The metal chelates separated in the capillary were measured by on-column UV-absorption detection (294 nm for HBED). The order of the mobilities (absolute values) of some chelates at pH 9.3 was: $\text{Al}^{3+} < \text{Fe}^{3+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$. The method with HBED was applied to the determination of Ca^{2+} and Mg^{2+} in serum and water samples. The methods using HBED or Ac-HBED were very sensitive and applicable to the determination of metal ions at concentrations of 10^{-5}M or less.

【1. 緒言】 キャピラリーゾーン電気泳動法(以下CZEと略記)は荷電物質の分離のための強力な手法として主に医学, 薬学, 生化学方面でタンパク質, アミノ酸, 糖, 医薬品など多くの有機イオン性物質の分離に用いられてきた。さらにイオン性界面活性剤をキャリアに加えることにより, 電荷を持たない有機化合物の分離も可能となった(ミセル動電クロマトグラフィー:MEKC)。このMEKCの手法を用いることにより, Saitohら, Yotsuyanagiらは無電荷金属キレートの分離を行っている。この他にも金属キレートの分離に関する報告は若干なされているが, CZEを積極的に金属イオンの定量に利用しようとする研究はあまり見当たらない。本研究では, CZEの分離および検出原理の単純さ, 高分離能, 装置の自動化の容易さに着目し, 多くの金属イオンと安定なキレートを形成するEDTA類縁化合物を用いて金属キレート陰イオンの分離について基礎検討を行った。その結果13種類の金属イオンのピークが得られ, また一部の金属イオンについては, 高感度定量も可能で実試料への応用も可能となった。

【2. 実験】 [試薬] キャリヤー溶液としてはキレート試薬N, N'-di(2-hydroxybenzyl)-ethylenediamine-N, N'-diacetic acid(HBED, Dojindo Lab.)を含むpH緩衝液(Boraxと KH_2PO_4 で調製)を用いた。試料溶液としては, 金属イオンとHBEDを含む溶液を用いた。なお, 溶液調製用の水は脱イオン/蒸留したものをMilli Q装置により精製したものをを用いた。 [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 $50\mu\text{m}$, 外径 $375\mu\text{m}$ のフューズドシリカキャピラリーで, 標準として検出器までの長さ(L_D) 25cm のものを用いた。データの記録および処理はシステムインストルメンツ社のSIC Labchart 180により行い, ピーク高, ピーク面積, 電気泳動移動度を求めた。 [操作] 測定開始前に減圧装置を用いて, キャリヤー溶液を3分間流してキャピラリーを洗浄し, その後満たす。この後, 試料をキャピラ

リーに導入する。試料導入は装置付属の減圧システム(-127mmHg)により、陽極側より導入した。測定波長は294nm(HBEDの場合)を用いた。サンプルには、金属イオンの溶液にキレート試薬を添加した後、0.5 μ mのメンブランフィルターでろ過したものをを用いた。

【3. 結果および考察】 [測定波長] 17種類の金属イオン(Mn²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Pd²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Ag⁺, Al³⁺および5種のアルカリ土類金属イオン)につき検討した結果、多くのキレートが290nm付近に吸収を示した。従ってこの波長を検出波長としてキレートの分離について検討した。 [金属キレートの電気泳動移動度(μ_{ep})]

Table 1にpH9.3のキャリアを用いた場合の主な金属イオンの移動度を示す。価数の違いは移動度に大きな差を生じる。しかし、Co²⁺およびMn²⁺キレートの移動度がFe³⁺やAl³⁺のキレートの移動度とほぼ

Table 1 Electrophoretic mobilities($\mu_{ep}/10^{-4}cm^2V^{-1}s^{-1}$) at pH 9.3

	Reagent	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	Fe ³⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺
- μ_{ep} (HBED)	3.40	2.64	3.25	2.12	2.15	2.10	2.05
- μ_{ep} (Ac-HBED)	3.25	2.36	2.45	1.42	1.42	2.58	2.55
	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Pd ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Pb ²⁺
- μ_{ep} (HBED)	3.25	3.10	3.38	3.49	3.21	3.20	2.64
- μ_{ep} (Ac-HBED)	2.56	2.49	2.59	—	2.59	2.28	2.78

Carrier: 20mM Borax + 2 $\times 10^{-3}$ M HBED or 1 $\times 10^{-4}$ M Ac-HBED
Sample: 1 $\times 10^{-4}$ M Metal ion + 5 $\times 10^{-4}$ M HBED or Ac-HBED

等しい値を示している、これは、生成キレート中において、これらの金属イオンが3価になっているためと考えられる。 [電気泳動移動度に及ぼすキャリアのpHの影響]

Table 2にCa²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺の移動度に及ぼすキャリアのpHの影響について調べた結果を示す。Fe³⁺のようにpH変化により移動度がほとんど変化しないものは、このpH範囲において安定なキレートを生成していることを示す。また、Ca²⁺, Mg²⁺

Table 2 Effect of pH of carriers on electrophoretic mobilities

pH	5.9	6.6	7.2	7.8	8.6	9.3	9.9	10.4
HBED	2.24	2.33	2.43	2.77	3.05	3.40	3.54	3.67
Mg ²⁺	N.P	N.P	N.P	0.86	2.74	3.25	3.43	3.50
Ca ²⁺	N.P	N.P	N.P	N.P	1.12	2.64	3.05	3.26
Fe ³⁺	2.34	2.26	2.22	2.28	2.23	2.15	2.17	2.13
Cu ²⁺	1.96	2.09	2.17	2.34	2.67	3.10	3.33	3.41
Zn ²⁺	1.66	2.08	2.30	2.84	3.13	3.38	3.46	3.51

N.P: no peak, Carrier: 20mM(Na₂B₄O₇+KH₂PO₄)+2 $\times 10^{-3}$ M HBED;
Sample: 1 $\times 10^{-4}$ M Metal ion+5 $\times 10^{-4}$ M HBED

などは安定度定数が小さいため、pHの低下に従って徐々にキレートが解離し、移動度の値が小さくなることわかる。 [キャリア溶液の検討] キャリアに加えるHBED濃度について検討した。試薬濃度が小さくなるにつれ、キレートが不安定なものほど泳動中に解離しやすくなるため、みかけの移動度が小さくなる。またピーク高、ピーク面積ともに小さくなる。pH緩衝剤として加えたホウ砂の影響を調べたところ、ホウ砂濃度を増すにつれて、電気浸透流、移動度とも徐々に小さくなった。 [Ca²⁺, Mg²⁺定量への応用] 実際試料として河川水および血清中のCa²⁺, Mg²⁺の定量に本法を適用したところ、良好な結果が得られ、十分使用できることがわかった。

【4. 結語】 本法は、キレート試薬にEDTAを用いた場合にくらべて、感度の点で10倍程度向上している。また、HBEDのフェニル基にp-アミノアセトフェノンをジアゾ化カップリングさせて合成した試薬(Ac-HBEDと表す)を用いると、可視部での測定が可能となり、さらに感度も向上した。pH 9.3における移動度をTable 1にあわせて示す。

ANALYSIS OF RARE EARTH ORES BY ITP-PIXE

Wen XIA, Takeshi HIROKAWA, Fumitaka NISHIYAMA and
Yoshiyuki KISOApplied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,
Hiroshima Univ., Kagamiyama 1, Higashi-hiroshima 724 Japan

ABSTRACT-Rare earth elements(RE) contained in an ore were analyzed by a coupled analytical method, ITP-PIXE(isotachopheresis-Particle Induced X-ray Emission): The ore powder was dissolved in HCl solution. RE in the solution were separated and fractionated by the use of a micropreparative isotachopheretic analyzer. The dropwise fractions containing nanomole RE were analyzed off-line by PIXE. By means of ITP-PIXE, the minor components in the ore were determined accurately.

1. はじめに

等速電気泳動法 (I P) はイオン性物質の分析・分取に有効な分離法である。我々はこの方法の高分離能である点や濃縮効果などの利点に注目し、試料を分離分取しフラクションを P I X E 法 (粒子励起 X 線) により分析する方法 (I P - P I X E) を開発している。本講演では希土類鉱石を I P - P I X E 法で分析した結果を報告する。

2. 実 験

I P 分離に使用したリーディング電解液は α -ヒドロキシイソ酪酸 10 mM を含む 20 mM アンモニア水溶液で、酢酸により pH を 4.8 に調整した。ターミナル電解液は 20 mM の塩酸カルニチン水溶液である。電気浸透流を抑えるためにリーディング及びターミナル電解液に 0.1% ヒドロキシプロピルセルロースを添加した。本研究室で製作した分取用等速電気泳動装置を使用した¹⁾。分離管としては内径 1 mm、長さ 38 cm の P T F E 管と内径 0.5 mm、長さ 32 cm の P T F E 管を接続して使用した。泳動電流は 300 μ A (54 min.) と 150 μ A (16 min.) である。電気量は約 1.1 C であった。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。1 フラクションは約 5 μ l で約 9 秒毎に分取される。各フラクションはニュークリポアフィルターの上に滴下し乾燥後 P I X E 分析した。

希土類鉱石を 0.200 g 称量し、高純度の 30% H C l 溶液 3 ml に溶かした。加熱し蒸発乾固してから、100 ml の水に溶かした。この処理を三回繰り返した。最終的に pH 2.5、12.235 mM の溶液を調製した (Ce と見なして計算)。

3. 結果および考察

図-1 は今回取り扱った希土類鉱石の I P - P I X E 法による分析結果を示している。全ランタニドと Y が検出された。図より明らかなように La と Nd の量が一番多く、ついで Pr、Sm、Gd、Y、Dy という順になった。この成分と含有量からみると、この鉱石は中国のイオン吸着鉱であると推定された。他の微量元素の分離はあまり良くなかった。

なお、電気量を増大させ、より大量の試料を注入して分離した後、多量成分を除去すれば、 H_o 以下微量の重希土の分析も可能になると期待される。

希土類元素含有量は鉱石によって異なる。図-2と図-3はモナズ石由来の粗塩化希土²⁾と今回分析した希土類鉱石の成分存在率を示している。試料の分離能は成分間の実効移動度差や成分数から影響を受ける。本試料とモナズ石由来の試料では成分数は同じであるため、分離能は実効移動度差によってのみ影響を受ける。希土類中、最も分離しにくいのはEuとGdであるが、本試料では含有量がそれぞれ1.88%、8.30%と多い。そのため粗塩化希土の分離能が 408.6 nmol/C であったのに対して、本試料では 155.7 nmol/C と低い値となった。今回取り扱った希土類鉱石はモナズ石由来の粗塩化希土類より分離しにくい。

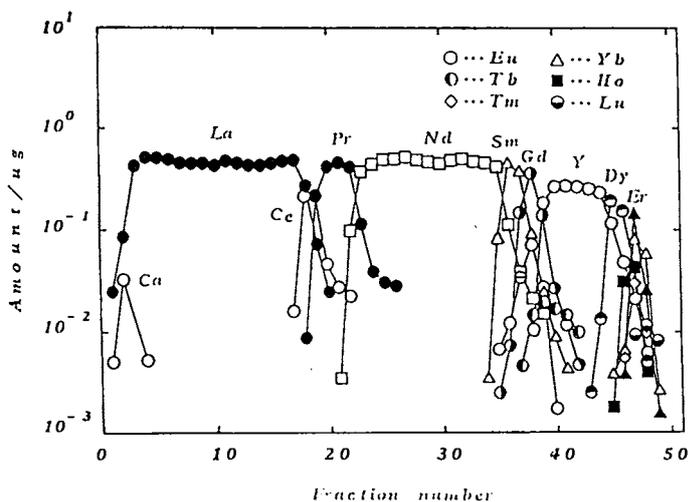


図-1 分取した試料ゾーンをPIXE法により分析した結果

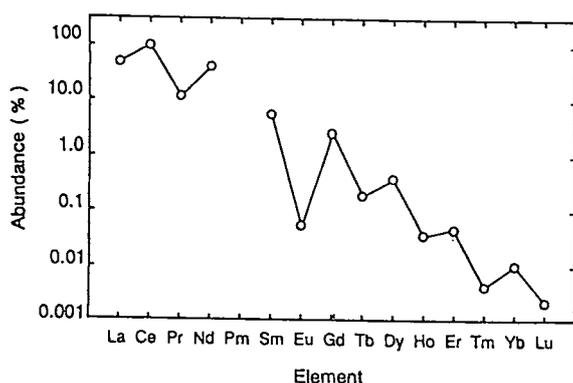


図-2 粗塩化希土の成分存在率
(Ce = 100)

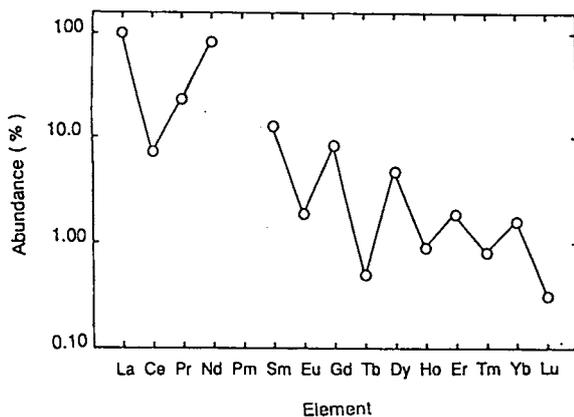


図-3 希土類鉱石の成分存在率
(La = 100)

1) T. Hirokawa, J. Hu, K. Umada, G. Kimura H. Ikeda, F. Nishiyama, and Y. Kiso, J. Chromatogr., 513(1990)297-310.

2) J. Hu, T. Hirokawa, F. Nishiyama and Y. Kiso, J. Chromatogr., 594(1991)371.

キャピラリー電気泳動を用いた 食品中の有機酸の分析

(日本ミリポア・ウォーターズクロマトグラフィー事業部)

佐々木 秀輝

Hideki Sasaki

Waters Chromatography division, Millipore cooperation

ANALYSIS OF ORGANIC ACID IN FOOD SAMPLE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Abstract: It is examined that the practical efficiency of some methods to analyze organic acid in food by Capillary Electrophoresis (CE). The system is suited to detect sensitively that uses Phosphate buffer. To analyze slow moving materials, upper pH is suitable. And for fast moving materials, lower pH is suitable. In order to analyze another materials that can't be separated with Phosphate buffer, or to determine simultaneously more than 20 kinds of organic acid, the system using Borate buffer is suitable.

〔背景及び目的〕

従来、食品中の有機酸分析は、酵素法やHPLCを用いた方法によって行われてきました。しかし、これらの方法は、複雑で時間がかかるため、製造過程をモニターしたり、数多くの検体を分析するには、非常に多くの労力と経費を必要とし、実際には、非常に限られた範囲でしか、分析は行われてきませんでした。

一方キャピラリー電気泳動を用いた分析法は、迅速簡単に分析することができ、ランニングコストも低いので、このような作業に対して非常に効果的な方法と言えます。そこで、キャピラリー電気泳動を用いて、いくつかの分析条件を検討し、それぞれの有効性を確認しました。

〔実験〕

検討した分析条件は以下の3種類で、測定にはそれぞれクォンタ4000（電気泳動装置；Waters）・820J（データ処理；Waters）を用いました。

- 条件1：キャピラリー・・・75 μ ×60 cm
 電圧・・・20 KV ; Negative Powersupply
 検出・・・254 nm ; Indirect UV
 注入方法・・・重力法 20 sec
 バッファー・・・5 mM- フタル酸水素カリウム
 2.5 % -NicePak
 pH 3.8
- 条件2： 同上（バッファーのみ pH を3.2 に変更）
- 条件3：キャピラリー・・・50 μ ×60 cm
 電圧・・・15 KV ; Negative Powersupply
 検出・・・185 nm ; Direct UV

注入方法 重力法 20 sec

バッファー 120 mM- ホウ酸ナトリウム

5 % - NicePak

用いたサンプルはビールで、前処理として1晩放置した後、脱気しました。また、条件1及び2では10倍希釈したものを、条件3では原液を、供試液として用いました。

[結果及び考察]

フタル酸を用いたバッファーで分析を行った場合、pHを変化させることでその分離特性を大きく変化させることができます。すなわち、pHを下げることによって比較的移動度の高い一群の分離が良くなり、pHを上げることにより比較的移動度の低い一群の分離が良くなります。図1、2はそれぞれpHを3.8, 3.2に調整したものによるフェログラムです。pH3.8のものではクエン酸付近の分離が余りよくありませんが、pH3.2のものではかなり改善されています。逆に、コハク酸付近のものに関しては、pH3.8で良く分離されています。定量限界は双方とも1 ppm 前後ですが、電気インジェクション法を用いれば数ppbまで定量することができます。

図3、4はホウ酸を用いたバッファーで分析を行ったものです。この場合、ホウ酸の濃度を上げることによって、かなり分解能を高めることができ、20種類以上の有機酸(酸性アミノ酸を含む)が同時に定量できます。定量限界は重力法で1~10 ppm 前後、電気インジェクション法で数十~数百 ppb 程度で、インダイレクトUV法を用いた方が、高感度で分析できます。

しかし今回までの段階では、ほかの条件で分析できないものも、ホウ酸を用いた系で分離できる場合が多々あるので、有機酸の分析に対して極めて有効な分析手段のひとつであるといえます。

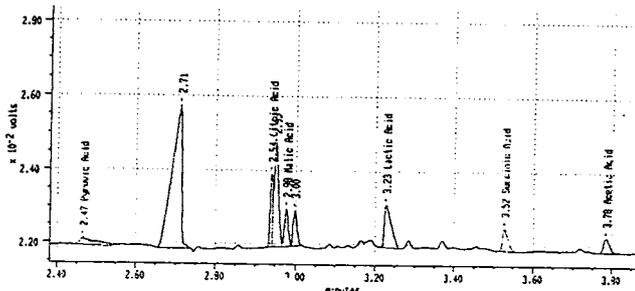


図1.: 条件1. ビール10倍希釈液

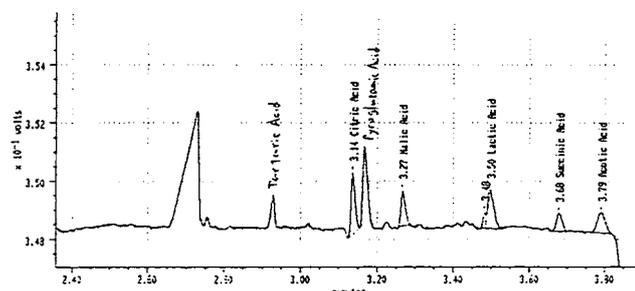


図2.: 条件2. ビール10倍希釈液

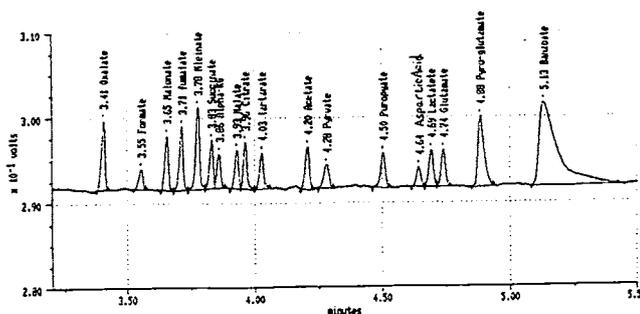


図3.: 条件3. スタンダード

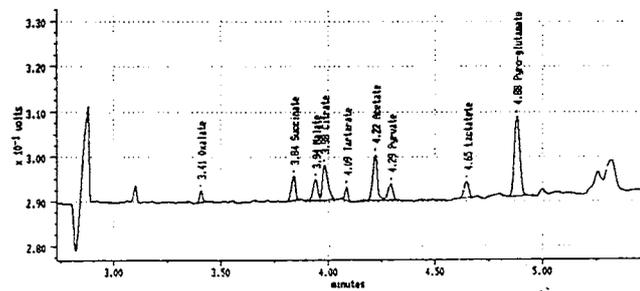


図4.: 条件3. ビール原液

日本ダイオネクス(株) 関口陽子、O渡辺一夫

THE EXAMINATION OF THE BUFFER WHICH CAN REVERSE
THE ELECTROOSMOSIS FLOW.

Nippon Dionex K.K.

Yoko SEKIGUCHI, Kazuo WATANABE

Electroosmosis flow in untreated silica capillary is towards the cathode. Anionic compounds are migrating against the electroosmosis flow under this conditions and therefore take a long time to be detected. The solution is to add an electroosmosis flow modifier which reverses the electroosmosis flow by forming a positively charged monolayer on the capillary wall.

In this paper we discuss about the the modifier which can reverse the electroosmosis flow with good reproducibility.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動において、熔融シリカのキャピラリーに特別な処理を行わない場合、電気浸透流は陰極に向かって進む。そのため、一般的な分析例では検出器側が陰極となる様にして試料測定を行っている。

しかしこの方法では、陰イオン性成分の分析時間が非常に長くなってしまふことや、陽イオン性を示す成分は逆に泳動時間が短か過ぎて満足な分離を得られないことがある。

そのため、この問題を解消するためにキャピラリーの内壁をプラスにチャージさせる添加剤が検討されてきており、これを用いて電気浸透流を陽極に向かって流すという分析例も幾つか報告されている。

そこで、ここではこういった添加剤の効果と測定精度について、具体的な分析結果を含めて報告する。

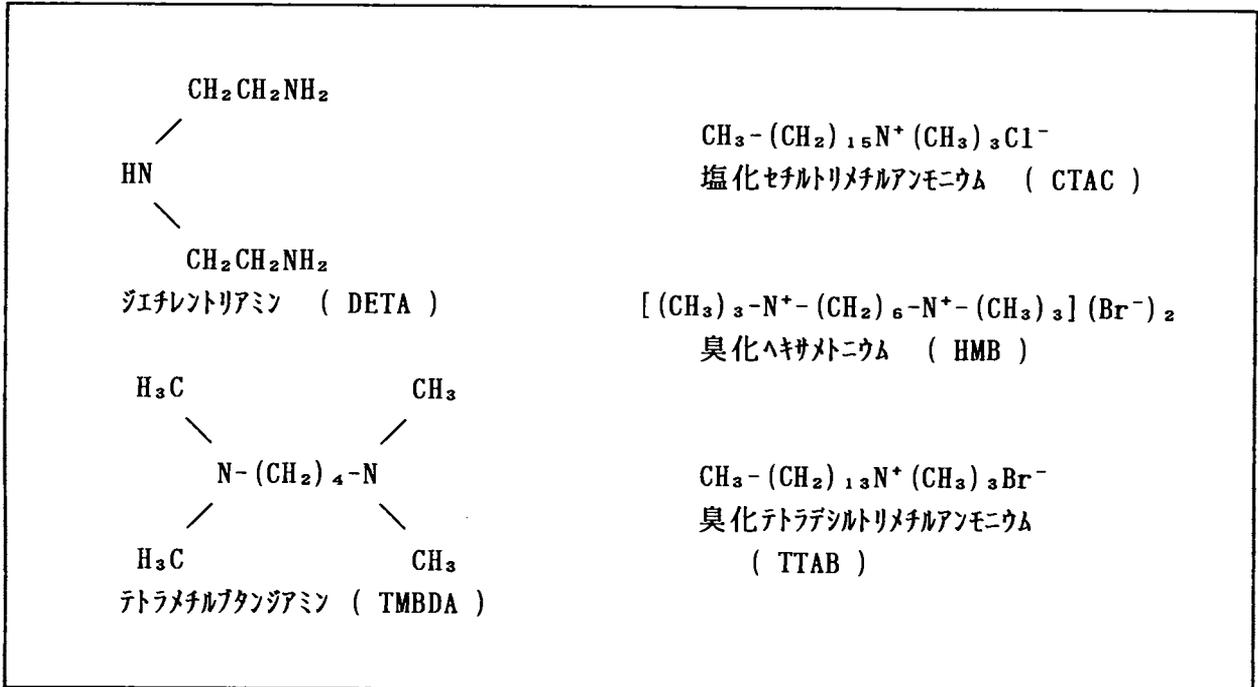
2. 実験

今回の検討に使用した添加剤の成分名とその構造式を Table 1 に示す。測定装置にはダイオネクス社製CES-I、キャピラリーは内径 $50\mu\text{m}$ で全長が60cmのものを用い、試料注入は落差法(100mm, 30sec)、検出はUV検出で測定波長は250nmから270nmの間で選択をした。また、キャピラリーへの供給電位を20kVとして極性を随時逆転させた。

検討の手順として、電気浸透流が逆転していることを確認するために、非イオン性であるベンゼンを注入して検出器側を陽極にした場合でのみ検出されるかをみた。

次に各添加剤を使用した時の泳動時間の再現性を確認し、ベンゼンの他にフタル酸やイオン性界面活性剤などについても同様の測定を行った。

Table 1 添加剤の構造式



3. 結果と考察

泳動時間の再現性については、ベンゼンの場合にはどの添加剤を使用しても CV 値として 1% 以下という良好な結果を得ることができた。それに対し、界面活性剤では CTAC が、フタル酸では HMB が最も再現性の良い結果となった。(fig. 1 参照)

これまでのところ、こういった種類の試料にどの添加剤が適しているかということや、その要因となるメカニズムについてはまだ確証がとれていないが、今後多くの試料を試していくことで、検討を進めていく予定である。

また、CTAC を用いて陽イオン性界面活性剤を分析した時のエレクトロフェログラムを fig. 2 に示す。

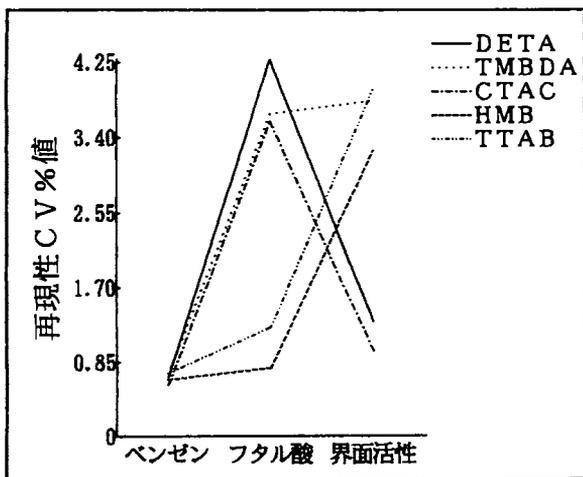


fig. 1 泳動時間の再現性

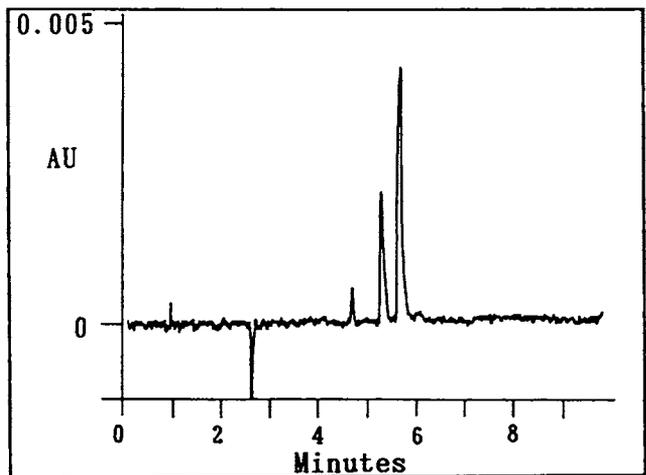


fig. 2 陽イオン性界面活性剤の分析例

高性能キャピラリー電気泳動における
ピーク同定のための
co-migrationに関する考察

(近畿大・薬) ○多賀 淳、安枝真一、大田恭子、鈴木茂生、本田 進

OBSERVATIONS ON CO-MIGRATION FOR PEAK IDENTIFICATION
IN HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
Atsushi TAGA, Shin-ichi YASUEDA, Yasuko OHTA, Shigeo SUZUKI
and Susumu HONDA

In HPCE peaks are conveniently identified by co-migration with authentic specimens. However, the co-migration technique is associated with a number of problems which lead to false identification of peaks. This paper discusses how the peak identity should be judged, on the basis of some experimental data. Two methods are proposed, one based on the estimation of apparent mobility and the other based on the evaluation of peak symmetry. Both methods are simple and convenient.

【はじめに】 高性能キャピラリー電気泳動 (High performance capillary electrophoresis, HPCE) は分離能が高く、検出の再現性が良い分離分析法として、急速な発展を遂げつつあるが、電気浸透流速がそれほど安定でなく移動時間の再現性はあまり良くないので、試料成分の移動時間を標品のそれと比較することにより同定を行うことは、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) におけるよりも信頼性が低い。また、HPCE においては試料導入量が少ないため、分離された成分のスペクトルを直接測定することにより同定を行うことも現状では困難である。

しかし、HPCE においては、試料と標品を共泳動 (co-migration) させることは、HPLC (この場合は co-elution) よりも技術的に容易であるという利点がある。特に自動化された試料導入器を備えている装置を用いる場合には、この技法は極めて簡単にしかも再現性よく行うことができる。したがって HPCE における試料成分の同定には co-migration はなくてはならないものと言えるが、この技法を用いる場合の問題点については、これまでのところあまり注意が払われていないように見受けられる。そこで実験データを基に、この問題について 2、3 の考察を行った。

【実験方法】 HPCE は、松定プレジジョンデバイセス HEL-30PI 型高圧電源 (印加電圧 ~30 kV) と日本分光工業 CE-875 型紫外検出器を用いて行った。キャピラリーには内径 50 μ m、全長 70 cm、入り口から検出器までの距離 50 cm) のフューズドシリカ管 (Poly-micro Technologies) を用いた。キャリアーには 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を使用し、試料は落差 (10 cm) 法により導入した。

【結果・考察】 Co-migration は通常試料成分と想定される化合物の標品の溶液を試料溶液とともにキャピラリーに層積導入し、両層が分析中に混合した結果生ずるピークの高さが、試料溶液だけ導入した場合に比べて増加することを利用して同定を行うが、多くの場合標品の濃度は特に厳密に調整するわけではなく、試料溶液と標品溶液の導入時間もまちまちである。したがってピーク高さの増加は定量的にとらえられているのではなく、ピー

ク形状の変化についてもほとんど考慮されないのが実状である。このような状況では試料溶液と標品溶液の混合は様々な状態で行われ、試料成分と標品の移動度が近似している場合には誤った同定をしてしまう恐れが充分にある。そこで両溶液のモデルとして、共通して cinnamyl alcohol (CAL) および cinnamic acid (CAC) を、キャリアーと同一組成の緩衝液に溶かした溶液を用いて、混合に関する基礎的な検討を行った。この場合分離は中性のリン酸緩衝液を用い単純ゾーン泳動モードで行った。

試料成分の移動度に関する考察 試料溶液をまず導入時間 τ で導入し、これに仮想標品の溶液を同じ時間をかけて層積導入し、両者を共泳動させた場合、試料成分のピークは試料溶液のみを泳動させた場合に比べて幾分遅く移動する。この遅れに基づくみかけの電気泳動移動度（以下移動度と略す）の増加 (α) は、中性マーカー溶液と仮想標品溶液をそれぞれ時間 τ づつかけてこの順に導入したときの仮想標品ピークの移動度（本来は取り出して純化・精製した試料成分を用いた場合のピークの移動度とするべきであるが、実際には粉のような操作は不可能であるため、仮想標品を用いた場合のピークで代用する）から、試料溶液について得られた試料成分の移動度 (μ_{ep})_s を差し引くことにより近似的に求めることができる。このようにして得られる α 値を用いることにより、試料溶液と仮想標品溶液を共泳動させた場合の移動度 (μ_{ep})_{co-m} は (μ_{ep})_s + α の近傍にあるはずであり、試料成分ピークの半値幅を $W_{1/2}$ とすると、 $(\mu_{ep})_s + \alpha \pm W_{1/2} / 5.54^{1/2}$ の範囲にある確率が約 70% であることになる。 α 値の算出にあたり、仮想標品を用いることによる誤差は、その選び方にもよるが、co-migration によって双子ピークを与えるようなものを選ぶことはあり得ないと考えられるので、せいぜい試料成分のピーク半値幅に相当する分と考えてよい。導入時間各 10 sec で CA（移動度、約 $23 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ）について得られた α の値は $0.48 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。

ピークの対称性に関する考察 Co-migration の結果の解釈における煩雑さを省くため、試料溶液と仮想標品溶液は常に同一時間をかけて導入するものとし、両溶液を層積導入することによって、合成ピークの対称性が試料溶液を単独で同じ時間導入した場合に比べて、どの程度変化するかをみることも、有力な判断材料となる。 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ CA 溶液を試料溶液、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ CA を標品溶液と仮定し、試料溶液と標品溶液を共泳動させた場合の CA ピークの対称度 (symmetry factor $SF = W_{0.05L} / W_{0.05R}$) と試料溶液単独で泳動させた場合の対称度の比が、導入時間 (τ) の変化とともにどのように変わるかを調べたところ、 τ が限界値に達するまでは SF 比はほとんど変化しなかったが、以後は急速に増加した。ただし、 $W_{0.05L}$ および $W_{0.05R}$ はそれぞれピーク頂点からの垂線がピーク高さの 5% の位置で切り取るピーク左半および右半の幅である。同定用に選んだ仮想標品との co-migration において SF 比がこの曲線よりもある域値を超えて上にでる場合は、この試料がこの標品と同一であると断定することが危険であることを示している。この域値としては、SF 比の標準偏差を選ぶのが妥当であると考えられる。例えば限界導入時間の約半分の $\tau = 10 \text{ sec}$ で試料溶液について得られた CA ピークの SF (平均値 0.86) および試料溶液と仮想標品溶液の共泳動について得られた CA ピークの SF (平均値 1.05) の標準偏差はともに 0.013 であり、SF 比 (平均値 1.23) の標準偏差は 0.018 であった。

上述の考察より co-migration によるピーク同定について、試料溶液と仮想標品溶液を同一時間導入することだけを条件とする 2 つの判定法を提起した。これらの方法にはそれぞれの欠点もあるが、簡便であることは評価されてよいと思われる。

なお、今回の検討では試料および標品はキャリアーと同じ組成の緩衝液に溶かして用いたが、生体成分などの分析においてはこのような状況をつくるのが困難な場合もある。この点については今後視点を変えて詳細に検討すべきであるが、試みに行った柑橘類果実の単一毛細胞中の貯留液の成分分析においては、このことを特に考慮しなかったにもかかわらず、不都合は見られなかった。

高性能キャピラリー電気泳動における みかけの移動度の信頼性について

(近畿大薬) ○本田 進、多賀 淳、笹岡 功、島谷史子、田中里佳

RELIABILITY OF APPARENT ELECTROPHORETIC MOBILITY IN HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHRESIS

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
Susumu HONDA, Atsushi TAGA, Isao SASAOKA, Noriko SHIMATANI
and Rika TANAKA

The migration times of a few standard compounds were measured in the same carrier using various kinds of HPCE apparatus and capillary tubes, and the apparent electrophoretic mobilities (μ_{ep} s) were calculated. There was strikingly large variation among μ_{ep} values, presumably due to varied effects of heat dissipation during analysis. In order to understand such variation the influences of capillary diameter and applied voltage on heat dissipation were examined. The use of relative apparent electrophoretic mobility to an internal standard, however, reduced variation considerably, and allowed reliable identification of sample components.

【はじめに】 キャピラリー電気泳動 (high performance capillary electrophoresis, HPCE) は、高い分離能と検出における高再現性の故に注目され、急速に各領域で用いられるようになってきた。この方法は進化した電気泳動と液体クロマトグラフィーの結合と見ることでもでき、両者の長所が活かされてさらに勢いよく発展することが期待される。そのためにはまず、これまであまり深く認識されていなかった HPCE の特徴を浮き彫りにしてみることが大切と考えられる。今回は、そのような特徴の中で、HPCE が自由溶液中でその高い性能を発揮できる点を指摘したい。

液体クロマトグラフィー (HPLC) における分離には固定相と移動相の二相が関与するが、自由溶液中で行う HPCE においてはキャリアーのみによって分離が支配される。したがって HPLC における溶出時間や保持比の再現性は二相によって決まるのに対して、HPCE における移動時間や電気泳動移動度 (略して移動度) はキャリアーの組成によってのみ決まることになる。移動時間は電気浸透流速と電気泳動速度の関数であり、このうち電気浸透流速はキャリアーとキャピラリーの相互関係によって左右されるため、概して変動は大きい。電気泳動速度はキャピラリーの状態に関係なくキャリアー組成が一定ならば一定値を与えるものと考えられ、したがって電気泳動速度と電場の強さの比である“移動度”の再現性も高いものと考えられる。

演者らはこのような観点から、複雑で類似構造をもつ一連の生体成分を移動度を用いて多次元マッピングする研究を続けているが、移動度の不易性がどの程度かを調べる必要性を感じ、以下に述べる一連の測定を行い、その結果を考察した。

【実験】 装置 下記のものを用いた。() 内はキャピラリーのサイズならびに設置状態を示す。Beckman P/ACE 2100 型 (内径 75 μ m、長さ 47 cm; Peltier 恒温カセット内に固定)、Applied Biosystems 270A 型 (内径 50 μ m、長さ 64 cm; 強制循環式空気恒温槽内に固定)、Waters Quanta 4000 型 (内径 50 μ m、長さ 51 cm; 温度調節のない密閉容器中に固定)、日本分光 CE-800 型 (内径 50 μ m、長さ 70 cm; 直接室内に露出させて固定)。試薬 いずれも市販の特級品を用いた。

【結果】 測定装置による μ_{ep} 値の違い Table 1 はそれぞれの装置を標準的な状態で

作動させて、標準物質 (cinnamic acid, 4-methoxycinnamic acid, barbituric acid および cinnamylalcohol = 中性マーカー) を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) をキャリアーとして、単純ゾーン泳動モードで分析した際の移動度を Table 1 に示す。

Table 1 Apparent electrophoretic mobilities of a few standard compounds, obtained by using various apparatus.

Apparatus	Strength of electric field (kV/cm)	Temperature (°C)		μ_{ep} *	
		Capillary	Room	Barbiturate	Cinnamate
P/ACE 2100	0.26	20.0	25.3	1.71	21.0
	0.26	30.0	25.3	2.37	22.1
	0.26	40.0	25.3	2.80	26.5
270A	0.31	22.0	20.0	1.26	14.6
	0.31	30.0	19.9	1.50	16.2
	0.31	40.0	19.5	2.00	18.3
	0.31	50.0	19.3	2.67	20.4
Quanta 4000	0.39	-	22.0	1.50	15.3
CE-800	0.29	22	19.0	1.53	17.0

* Each value is the average of 5 determinations.

Table 1 より、同一物質を同一キャリアー中で分析してもみかけの移動度 (μ_{ep}) にはかなりの変動があることがわかる。また、同一装置と同一キャピラリーを用いても μ_{ep} 値はキャピラリー温度の上昇とともに増加する傾向が観察された。Table 1 には内径の等しいキャピラリーを用いてほぼ等しいキャピラリー温度で測定したデータも示されているが、放熱状態が必ずしも同一ではないため正確な比較ができないので、電場の強さやキャピラリー径の及ぼす影響について基礎的な検討を行った。

電場の強さの影響 同一装置と同一キャピラリーを用いて電場の強さを変えながら μ_{ep} 値を比較したところ、電場が強くなるにつれて μ_{ep} が加速度的に増加することがみとめられた。

キャピラリーの径の影響 同一素材からつくられ、長さが等しく内径が異なる種々のキャピラリーを用い、等しい電場で分析を行い、 μ_{ep} 値を比較したところ、内径が大きいほど μ_{ep} 値は高かった。また、同一内径のキャピラリーについて外径の大小を比較したが、両者の間で μ_{ep} に大きな違いはみられなかった。

これらの結果を総合すると、キャピラリーの放熱状態の違いが μ_{ep} をばらつかせる根本的な原因と考えられる。 μ_{ep} はキャリアーの誘電率とキャリアー/キャピラリー間のゼータ電位に比例し、キャリアーの粘度に反比例することが知られているが、キャピラリー温度の変化がこれらの各因子にどのように影響するかを調べることは今後の課題である。

これらの因子の究明とは別に、移動度そのものを用いず、適切な内部標準に対する相対移動度を利用すれば、変動は目立って抑えられ、信頼性の高い同定が可能であることが示された。この結果に基づいて種々の物質の2次元マッピングを試みたところ、満足できる結果を得ることができた。

キャピラリー電気泳動システムとイオン会合現象 を利用する高電荷金属錯体の新しい高性能分離法

(東北大工) ○壹岐 伸彦, 星野 仁, 四ツ柳 隆夫

A New Highly Effective Separation Method for Equally and Highly Charged Metal Chelates by Capillary Electrophoresis System Utilizing Ion Association

Nobuhiko IKI, Hitoshi HOSHINO, and Takao YOTSUYANAGI

*Department of Molecular Chemistry and Engineering,
Faculty of Engineering, Tohoku University*

A new separation method for highly charged metal chelates based on ion association in capillary electrophoresis (CE) system was developed. Metal chelates of Al(III), Co(III), Cr(III), and Fe(III) ion with 2,2'-dihydroxyazobenzene-5,5'-disulphonate could not be separated by conventional CE system (Electrophoretic buffer: $[\text{NaH}_2\text{PO}_4]_{\text{T}}=0.02 \text{ M}$, $\text{pH}=7.0$). While, for instance, the addition of 25 mM of tetrabutylammonium bromide to the same electrophoretic buffer makes it possible to resolve each four chelates mentioned above within 11 min ($V=21.3 \text{ kV}$, $i=40 \mu\text{A}$). The order of migration are very likely attributed to the ability of ion association of the chelates.

1. Introduction

演者らはキャピラリー電気泳動(CE)系を高速液体クロマトグラフィーに代わる超微量金属イオンの新しいセンシングシステムとみなし, CEに適合するキレート試薬の分子設計及びCEの高機能化のためのシステム設計の双方からのアプローチを行っている. その結果CE適合性試薬設計に関しては, 中心金属イオンの特性を酸解離反応特性に変換する官能基を配位子の外側に導入することが要件の一つであることを明らかにした¹⁾. 一方システム設計に関しては, 同一の高い電荷を持つ錯体の相互分離には, 対イオンの添加が有効であることを明らかにした²⁾. 本システムでは錯体それぞれの持つイオン会合性の差異が分離特性に反映するものと考えられる. そこで今回はCEに導入する対イオンの濃度および種類を変化させ, その分離挙動への影響について検討した結果について報告する.

2. Experimental

配位子として2,2'-ジヒドロキシアゾベンゼン-5,5'-ジスルホン酸二ナトリウム塩 (DHABS, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$) を用いた. サンプル溶液は, 11種類の金属イオン {Al(III), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Ni(II), Mn(II), Mo(VI), V(V)及びZn(II)}を各々 $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, DHABSを $1 \times 10^{-3} \text{ M}$, 及びTris-HCl緩衝溶液($\text{pH} 8$)を 0.02 M 含ませ, 60°C で15分間加熱して調製した. キャリア溶液は基本的にリン酸緩衝液 ($[\text{NaH}_2\text{PO}_4]_{\text{T}}=0.02 \text{ M}$, $\text{pH}7.0$) に所定量の臭化テトラアルキルアンモニウム(alkyl = methyl(TMABr), ethyl(TEABr), propyl(TPABr), butyl(TBABr), amyl(TAABr)) 或いは塩化テトラフェニルホスホニウム(TPPCl)を添加して用いた. キャピラリー内径は 0.05 mm , サンプル注入量は 6 nL である.

3. Results and Discussion

3.1 Normal CE carrier system: DHABSはAl(III), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Ni(II), Mn(II), V(V)及びZn(II)イオンと錯体を生成した. 通常のCE用緩衝液 {[NaH₂PO₄]_T, [Na₂B₄O₇]_T: 0.01~0.02 M, pH7.0~9.0} を用いたところ, Al(III), Co(III), Cr(III), Cu(II), Fe(III), 及びV(V)錯体に対し選択的にピークを与えた(速度論的識別機能). しかし等しい電荷(-5)を持つAl(III), Co(III), Cr(III), 及びFe(III)錯体([M(III)L₂]⁵⁻)の相互分離は不可能であった.

3.2 Carrier with TBABr: Fig.1 にキャリア中のTBABr濃度の主な溶質の電気泳動移動度 μ_{ep} (+極方向を正とする)への影響を示す. ただし, $\mu_{ep} = \mu_{obs}$ (見かけの移動度) - μ_{eo} (電気浸透移動度, 溶媒ピークによる). 5 mMのTBABrの添加ですでに3種類の[M(III)L₂]⁵⁻錯体の μ_{ep} に差が生じた. TBABr濃度の増加に伴う μ_{ep} の減少は, 各溶質がTBAイオンとより高次のイオン会合体を形成することに起因すると考えられる. 移動速度の順序から[M(III)L₂]⁵⁻錯体のTBAイオンとのイオン会合体の生成のしやすさは, Al(III)<Co(III)<Fe(III)錯体の順に大きくなると考えられる.

3.3 Carrier with other counter cation: 様々な対カチオンの25 mM添加時の主な溶質の μ_{ep} をFig.2に示す. TMAイオンの場合3種類の[M(III)L₂]⁵⁻の分離は不可能であったが, アルキル鎖長の増大と共に μ_{ep} は減少し相互分離が良好になった. これは対カチオンと錯体とのイオン会合は単純に静電的引力だけによるのではなく, 疎水的な相互作用も多分に寄与していることを示唆するものである. さらに, 芳香環を有するTPPイオンの場合各 μ_{ep} はゼロに近づき, その差が縮小された.

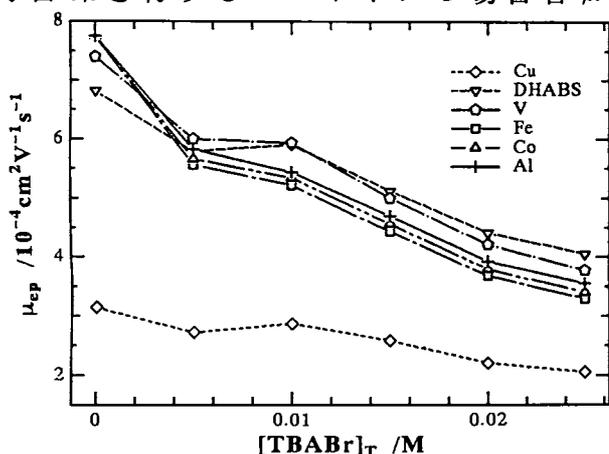


Fig.1 The effect of TBA ion on the migration of DHABS chelates. Carrier: [NaH₂PO₄]_T=0.02 M, [TBABr]_T=0~25 mM, pH=7.0. l=57cm, L=72 cm.

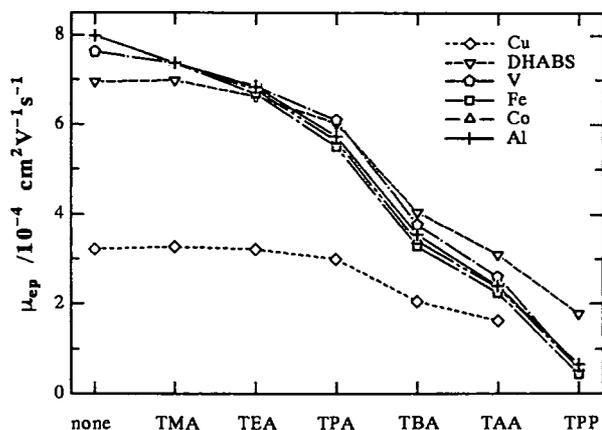


Fig.2 The effect of counter ion on the migration of DHABS chelates. Carrier: [NaH₂PO₄]_T=0.02 M, [Counter cation]_T=25 mM except "none", pH=7.0. l=57 cm, L=72 cm.

4. Conclusion

以上検討したイオン会合体は, いずれも μ_{ep} が正の値をとることから, 電荷を残存した水和化学種として存在していると考えられる. これは, 電荷の完全中和と脱水和を経て第二相に移行させる, という従来のイオン会合体を利用する分離法の戦略とは一線を画するものである. その意味で本システムはCEとイオン会合現象をとる利用する新しい分離計測法であり, イオン会合CE(IACE)と呼ぶにふさわしいと考える.

5. References

- 1) 壹岐伸彦, 四ツ柳隆夫, 日本化学会第63春季年会 講演予稿集 I, 1992, p870.
- 2) 壹岐伸彦, 星野仁, 四ツ柳隆夫, 第53回分析化学討論会 講演予稿集, 1992, p426.

日本ダイオネクス(株) 関口陽子、O渡辺一夫

ANALYSIS OF INDUSTRIAL ORGANIC COMPOUND
BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS
Nippon Dionex K.K.
Yoko SEKIGUCHI, Kazuo WATANABE

Some organic compounds are important as additives in many industrial fields, and a variety of compounds are used as a mixture, including anionic, cationic, neutral and zwitterionic. Characterization of these compounds have been done by HPLC, but HPLC has some problems on those analysis. Capillary Electrophoresis can be successfully applied to the analysis of several types of organic compounds.

In this paper we demonstrate the usefulness of capillary electrophoresis as a good "fingerprinting" technique.

1. はじめに

現在、様々な有機化合物が工業用添加剤として使用されており、イオン性のものから中性のものまで非常に多くの種類がある。

これまで、こういった有機化合物質の分析にはHPLCが利用されてきたが、これは測定目的成分によって分析条件が複雑であったり、1検体の測定時間が非常に長い、といった問題点を持っている。

キャピラリー電気泳動分析法は、この様な有機化合物の分析を比較的速く行うことができ、同一条件下で検出できる成分の範囲も広いことから、工業用有機化合物の形態分析にかなり有用ではないかと思われる。

ここでは、キャピラリー電気泳動による工業用添加剤の分析について、実測例を含めて報告する。

2. 実験

今回、試料としてはメッキ浴に使用されている光沢剤や界面活性剤を対象に分析を行った。

この時に使用した分析条件を Table. 1 に示す。

上述の様に、こういった有機化合物には陰イオン性、陽イオン性、中性や双性のものがあるため、分析条件も幾通りかを容易しておくのが望ましい。この時、HPLCでは数種類のカラムが必要となるが、キャピラリー電気泳動法では1本のキャピラリーのみでこれらを分析することができる。

ここで、実試料を測定したエレクトロフェログラムを fig. 1 および fig. 2 に示す。

Table 1 分析条件

装置	ダイオネクス社製 CES-I	
キャピラリー	50 μ m I.D., 375 μ m O.D. X 55 cm (有効長)	
注入	落差法 (100mm, 30sec)	
条件1	バッファー	10mM Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O, 50mM H ₃ BO ₃ pH = 8.5
	供給電位	+20 kV (一定) [検出器側が (-)]
	検出	UV (波長 λ = 210 nm)
条件2	バッファー	10mM Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O, 50mM H ₃ BO ₃ , 50mM SDS 50mM SDS, 25% メタノール pH = 8.5
	供給電位	+23 kV (一定) [検出器側が (-)]
	検出	UV (波長 λ = 254 nm)
条件3	バッファー	10mM Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O, 50mM H ₃ BO ₃ , 0.25% 塩化セチルトリメチルアンモニウム pH = 8.5
	供給電位	-25 kV (一定) [検出器側が (+)]
	検出	UV (波長 λ = 254 nm)

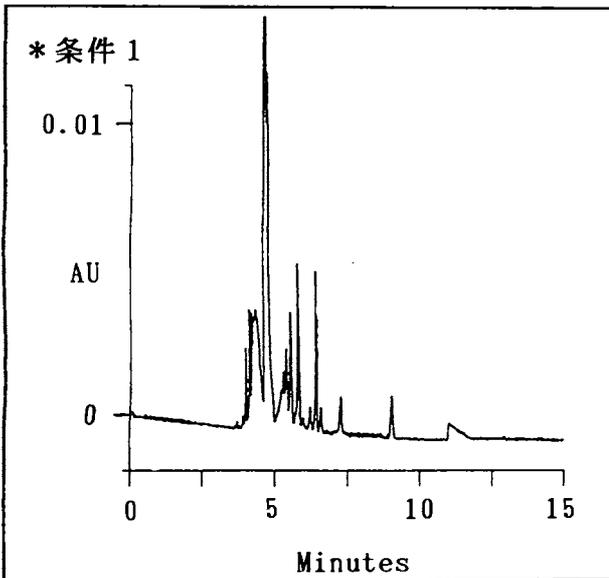


fig. 1 光沢剤の分析例

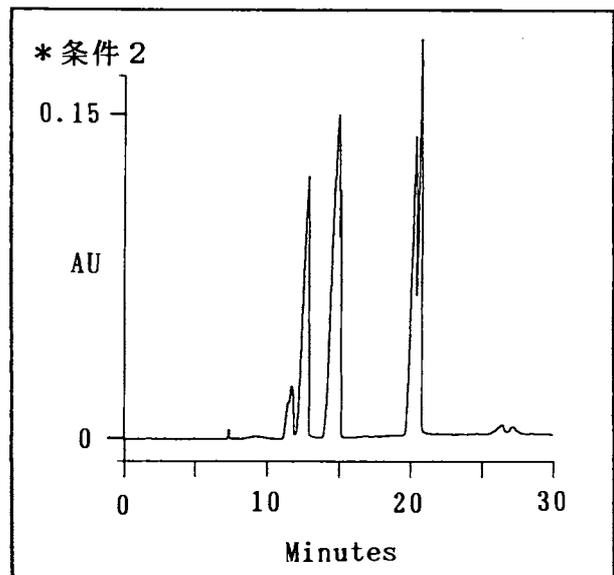


fig. 2 界面活性剤の分析例

3. 結果と考察

以上の様に、キャピラリー電気泳動法は工業用添加剤の分析に応用することが比較的容易であり、これにより得られる知見も多い。今後はこれらの測定結果を添加剤の効力と対比しながら、この方法のより有効な利用例を検討していく予定である。

動電クロマトグラフィのミセル濃度の情報理論に基づく最適化

(国衛試) ○林 譲, 松田 りえ子

INFORMATION THEORY-BASED OPTIMIZATION OF MICELLE CONCENTRATION IN ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

National Institute of Hygienic Sciences

1-18-1 Kami-Yoga, Setagaya, Tokyo 158

Yuzuru Hayashi and Rieko Matsuda

The function on mutual information ϕ_j , abbreviated as FUMI, is simply related to the relative standard deviation (RSD_j) of concentration measurements for peak j : $\phi_j = \log(1/RSD_j)$ [1]. FUMI is called the precision and also a function of peak shape, overlap and noise level in the output of an analytical system such as a chromatogram. The total information Φ of a multi-component chromatogram is the sum of the individual peak information ϕ_j over all the target peaks: $\Phi = \phi_1 + \dots + \phi_n$. In HPLC, many variables (mobile phase composition, detection wavelength, flow rate, etc.) were simultaneously optimized for antipyretics mixture and pesticides with FUMI Φ as a criterion. The optimum is defined as a set of operating conditions (chromatographic variables) that provides the maximum of FUMI among all the examined conditions. Then, the optimum means the most precise analysis. In HPLC, the optimum chosen by FUMI often corresponds to the minimum-time analysis without severe peak overlap ($R_s \geq 1.5$ or 1.0).

One of the most important advantages of FUMI is that we can estimate the relative standard deviation of concentration measurements of every peak from a "single" chromatogram. Usually, many experiments are required in each set of conditions to obtain the statistically valid results and to reach the most precise analysis. However, FUMI can avoid the tiresome repetition of experiments, if they are reproducible except the white noise. The theoretical RSD_j derived from a chromatogram and FUMI has proved to be very close to RSD_j obtained from the repeated experiments, especially in trace analysis.

In this address, we present the examination of the influence of capacity factor on the resolution R_s and the information FUMI for model experiments. A practical application of FUMI to micellar electrokinetic chromatography will also be demonstrated.

1. はじめに

最近、著者らは情報理論に基づいた液体クロマトグラフィの最適化理論を提出した

[1]. 従来の方法では、ピーク分離 (Resolution R_s 等) や測定時間を基準にして最適条件を見出していた。しかし、これらの方法は実際には問題点が多い。最も重要な点は、最適条件の科学的意味が曖昧な事である。また、実践的にも多くの難点がある。

一方、著者らの最適化理論は、最適条件を最も精度が高い (最も定量値の標準偏差が小さい) 条件であると定義している。この定量精度は、情報量 (Function of Mutual Information, FUMIと略す) として数値的に表される。FUMIはピーク分離だけではなく、ピークの形 (面積と幅 (鋭さ)) とノイズレベルの関数である。この理論を用いて、著者らは医薬品や農薬を対象として、液体クロマトグラフィの移動相組成、測定波長、カラム長、流速、内部標準物質の選択、その添加量を同時に最適化する事ができた。

FUMIの最も重要な利点の一つは、ピークの定量精度がピークの形から計算できる事である。さらに、この統計量 (精度) は繰返し実験なしに、1つのクロマトグラムから推定できる事である。この精度の推定値は、微量分析においてはかなり良く実験値と一致する。これが、統計量を基準として最適条件を見出す実験が、FUMI理論を用いれば簡単に行える理由である。

この演題では、FUMIの最適化理論の動電クロマトグラフィへの応用について述べる。ミセル濃度の定量精度に対する影響について調べた結果を発表する。

2. 実験

実験は全て、コンピューターを用いたシミュレーションである。このシミュレーションはNEC 9801T上で、N88 BASICまたはQUICK BASICを用いて行った。

3. 結果および考察

動電クロマトグラフィでは、2つのピークの保持比 α を一定にしてキャパシティブクター k' を大きくしていくと、分離度 R_s はある k' の値で極大を示す。ここが通常の液体クロマトグラフィと異なるところである。後者では、 R_s は k' と共に増大し極大は示さない。しかし、情報量FUMIは、どちらの場合も極大値を示すが、 R_s の極大値と必ずしも一致するとは限らない。この違いは、FUMIは、分離度 R_s だけに依存するのではなく、ピークの形にも依存するからである。FUMIの最大値は最大の精度を与える分離に対応し、最適分離と呼ばれる。寺部らによれば[2]、 k' はミセル濃度に比例するので、上記のことは2つのピークの情報量或いは定量精度のミセル濃度への依存性を表している。

分析の迅速性も、分析システムを評価する上で重要な要素である。FUMIの理論に依れば、情報量の流れとして定義できる。つまり、これは、測定から得られる情報量を測定時間で割ったものであり、分析効率と呼ばれている。ミセル濃度の分析効率に対する影響も考察する。もう少し具体的な例も上げる。

参考文献

[1] Y. Hayashi and R. Matsuda, Chemom. Intel. Lab. Sys., in press.

[2] S. Terabe, K. Otsuka and T. Ando, Anal. Chem., 57 (1985) 834.

動電クロマトグラフィーによる環境汚染物質の分析
 (VII) - アニリン類の分離挙動について -
 (阪工試) ○竹田さほり・脇田慎一・山根昌隆・川原昭宣・東国茂

ANALYSIS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS BY MICELLAR
 ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY (VII). SEPARATION
 BEHAVIOR OF ANILINE DERIVATIVES

Sahori TAKEDA, Shin-ichi WAKIDA, Masataka YAMANE, Akinori
 KAWAHARA and Kunishige HIGASHI

Government Industrial Research Institute, Osaka

Analysis of the standard sample of 10 aniline derivatives by electrokinetic chromatography (EKC) was studied. Effect of some conditions, such as pH and carrier (SDS) concentration, on the separation behavior of the aniline derivatives were investigated. The capacity factors (\tilde{k}') for some of the aniline derivatives having large pKa increased with decreasing pH of carrier solution. This phenomenon could be explained by the difference in micelle-solvent distribution coefficients between the solute and its conjugated acid. The effects of SDS concentration on \tilde{k}' of aniline derivatives with two pH conditions (pH6 and pH9) were different from each other.

1. 緒言 近年、有害化学物質による環境水の汚染が問題となっている。そこで我々は、動電クロマトグラフィー (EKC) によりこれらの物質を分析するための基礎的検討を行っている¹⁾。今回は、対象物質としてアニリン類を選び、それらのEKCによる分離挙動について検討した結果を報告する。

2. 実験 装置には、アプライドバイオシステムズ社製Model 270Aを用いた。分離用キャピラリーには、内径50 μ m、長さ72cm (有効長50cm) のフューズドシリカ管を、溶離液には0.02Mホウ酸塩-リン酸塩緩衝液にキャリアーとしてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えたものを用いた。検出は210nmにおける吸光度の測定により行った。

3. 結果と考察 アニリン類は、環境水中から検出されているもの²⁾を中心に10種類を選択した。以下、これらの標準溶液 (各アニリンの濃度50mg/l) を用いて、その分析条件について検討した。溶離液のpHを6から9まで変化させたときの見かけの \tilde{k}' ³⁾ (水相中のアニリン類の電気泳動移動度を考慮していない値) の変化をFig. 1に示す。pHを変化させると、10種のうちp-アニシジン、N-メチルアニリン、アニリンの \tilde{k}' は大きく変化したが、o-クロロアニリン、m-クロロアニリンではほとんど変化しなかった。この変化の度合いは、Table 1に示したアニリン類のpKaの値の傾向と良い一致を示している。このpH範囲においては、pHが低くなると前者はその一部がカチオン性の共役酸として存在すると考えられ、したがって、アニリン類の分離挙動のpH依存性は、各アニリン類とその共役酸の間のミセルへの分配係数の違いによるものであると考えられる。さらに、pH6とpH9の条件下で、SDS濃度を变化させたときの見かけの \tilde{k}' をそれぞれFig. 2に示す。pH9の場合には、SDS濃

度の変化にかかわらず溶離順序は一定であった。一方、pH6の場合には、SDS濃度を変化させることにより、一部については溶離順序が入れ替わった。このようなアニリン類における分離挙動のpH依存性について、さらに詳細な検討を行っている。

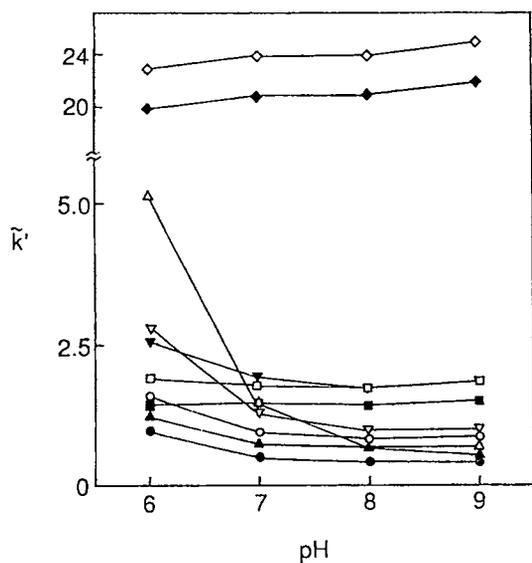


Fig.1 Effect of pH on the capacity factor \tilde{k}'

Table 1 Aniline derivatives and pK_a

	pK _a
●— Aniline	4.63
○— <i>o</i> -Anisidine	4.52
▲— <i>m</i> -Anisidine	4.23
△— <i>p</i> -Anisidine	5.34
■— <i>o</i> -Chloroaniline	2.65
□— <i>m</i> -Chloroaniline	3.46
▼— <i>p</i> -Chloroaniline	4.15
▽— <i>N</i> -Methylaniline	4.848
◆— Diphenylamine	0.79
◇— <i>N</i> -Nitrosodiphenylamine	—

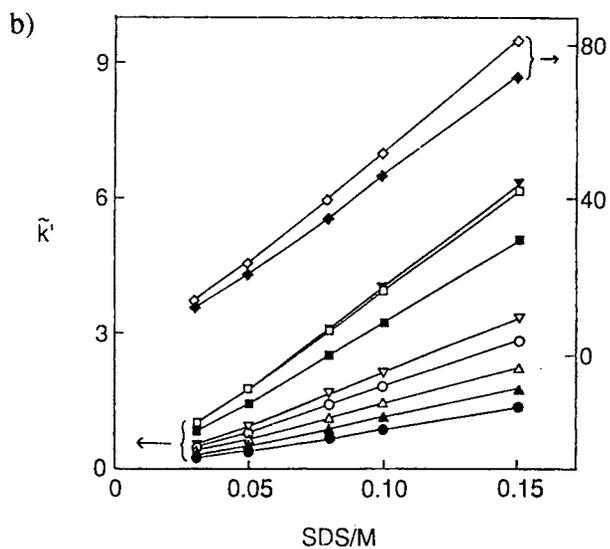
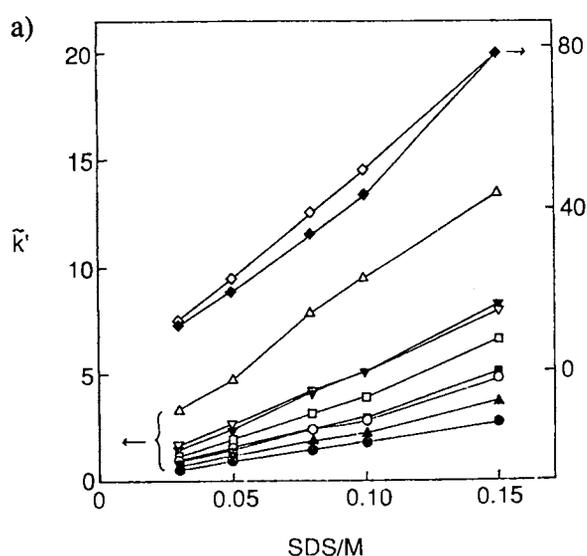


Fig.2 Effect of SDS concentration on the capacity factor \tilde{k}' : a) pH6, b) pH9

4. 文献

- 1) S. Takeda, S. Wakida, M. Yamane, A. Kawahara, K. Higashi, *Anal. Sci.* 7(supl.), 1113-1114 (1991)
- 2) 平成3年版 化学物質と環境/環境庁保健調査室
- 3) K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando, *J. Chromatogr.*, 348, 39-47 (1985)

マイクロエマルジョン動電クロマトグラフィーにおける 組成の分離選択性に及ぼす効果

京都大学工学部 ○岡田行広
姫路工業大学理学部 寺部 茂

Effects of Microemulsion Compositions on Separation Selectivity
in Microemulsion Electrokinetic Chromatography

Yukihiro Okada Department of Industrial Chemistry,
Faculty of Engineering, Kyoto University

Shigeru Terabe Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

A microemulsion consisting of 0.1 M heptane - 0.1 M sodium dodecyl sulfate - 1.0 M butanol - buffer(pH 7.0) was mainly employed. The amount of heptane or butanol in the microemulsion was altered and its effect was measured for some test solutes. The effect of different oil components such as diallyl ether and diisopropyl ether, and those of different co-surfactants such as pentanol, hexanol and heptanol were also investigated.

○はじめに

渡会によって報告されている {*Chem. Lett.*, (1991) 391} マイクロエマルジョン動電クロマトグラフィー (MEEKC) によると、マイクロエマルジョンの組成により、その電気泳動移動度が大きく変化する。また、組成の違いにより、溶質のマイクロエマルジョンへの分配係数が異なり、移動度に影響を及ぼすことが考えられる。今回の研究では、MEEKC においてマイクロエマルジョンの組成が、分離選択性に対しどのような効果を持っているのかを明らかにする目的で、以下の実験を行った。

○実験

実験には、高電圧電源、UV検出器とキャピラリーを組み合わせて自作したものを用いた。分離用キャピラリーとして内径 52 μm 、有効長 30 cm のものを用い、分離溶液として、硫酸ドデシルナトリウム (SDS) (0.1 M)、ヘプタン (0.1 M)、ブタノール (1.0 M) を 0.1 M ホウ酸塩 - 0.05 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものを主に用いた。検出には、210 nm での紫外吸収をオンカラムで測定した。

○結果

Fig. 1 にブタノールの濃度を変えたときの 6 種の風邪薬成分のクロマトグラムを示した。最初のピークは水相のトレーサーであるメタノールのものである。また最後のピークはマイクロエマルジョンのトレーサーであるフェナントレンのものである。Fig. 1 から得られた容量比 k' の値を Table 1 に示す。これから、ブタノールの量を減少させることで、移

動時間の範囲を広げられることが分かった。また、4 のトリメトキノールと 5 のエテンズアミドの移動順も変化していた。さらに、SDS の濃度を変化させたときの 7 種のフェノール類のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。SDS の濃度を増加させることでも移動時間の範囲を簡単に広げられることが分かった。また、今回の研究では、ブタノールを他のアルコールに変えたり、マイクロエマルジョンのコアになっていると思われるヘプタンについても他のものに変えてその分離選択性に対する効果を確かめた。

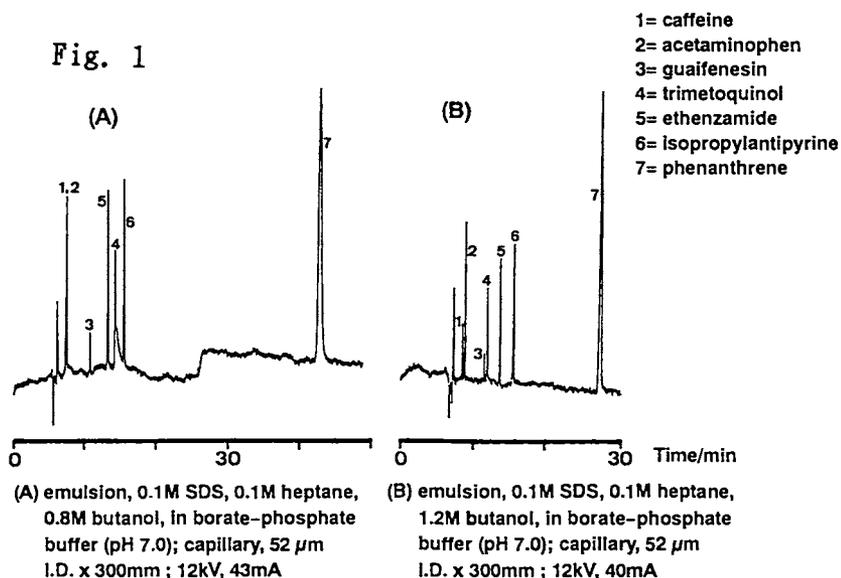


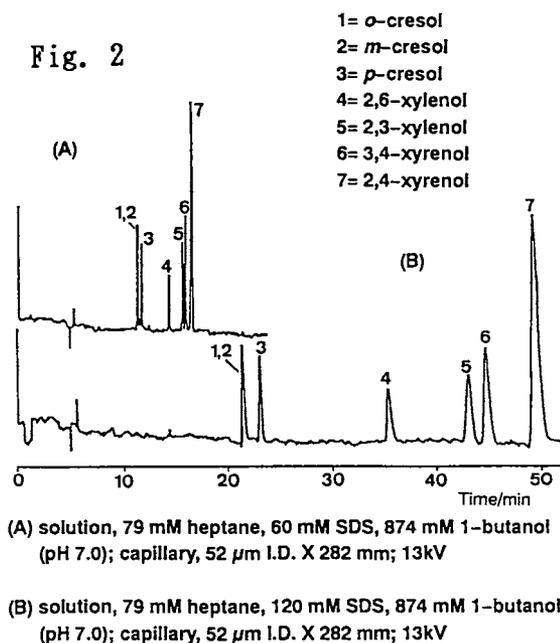
Table 1

The Effect of Butanol Content

SDS:heptane:BuOH	(1:1:8)	(1:1:10)	(1:1:12)
k'			
caffeine	0.381	0.388	0.386
acetaminophen	0.410	0.443	0.465
guaifenesin	1.24	1.25	1.22
trimetoquinol	2.34	1.75	1.36
ethenzamide	1.99	2.02	2.08
isopropylantipyrine	2.79	2.82	3.10
t_0	5.41	6.08	6.60
t_m	42.2	34.9	27.2
t_0 / t_m	0.128	0.174	0.243

microemulsion, ([SDS]:[heptane]:[BuOH])/100mM
in borate-phosphate buffer (pH 7.0);
capillary, 52 μ m I.D. x 300 mm; 12kV

Fig. 2



光学活性デタージェントを用いる
キャピラリーMEKCによる光学分割

北里大学薬学部 ○二村典行、満野千加子、伊藤裕子、木下俊夫
国際解析研 花井俊彦

Optical Resolution by Capillary MEKC Using Optically Active Detergents

Noriyuki Nimura¹, Chikako Mitsuno¹, Hiroko Itoh¹, Toshio Kinoshita¹, and Tosihiko Hanai²
School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University¹
International Institute of Technological Analysis²

Optical resolution of enantiomers by capillary micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using optically active detergents as a chiral selector was investigated. We found that long-chain alkyl glucosides and thioglucosides were seemed to be useful for the purpose. Various Dns-amino acid enantiomers were separated from each other and optically resolved with the mixed micelle of 15 mM n-octyl- β -D-thioglucoside / 20 mM SDS. It was also found that critical micelle concentrations of the detergents affected the resolution of enantiomers. Under acidic conditions, as electroosmotic velocity was extremely smaller than that under neutral conditions, delivering the micelle by the osmotic flow was suppressed. Accordingly, a micelle of only alkyl thioglucoside in high concentration also showed enantioselectivity.

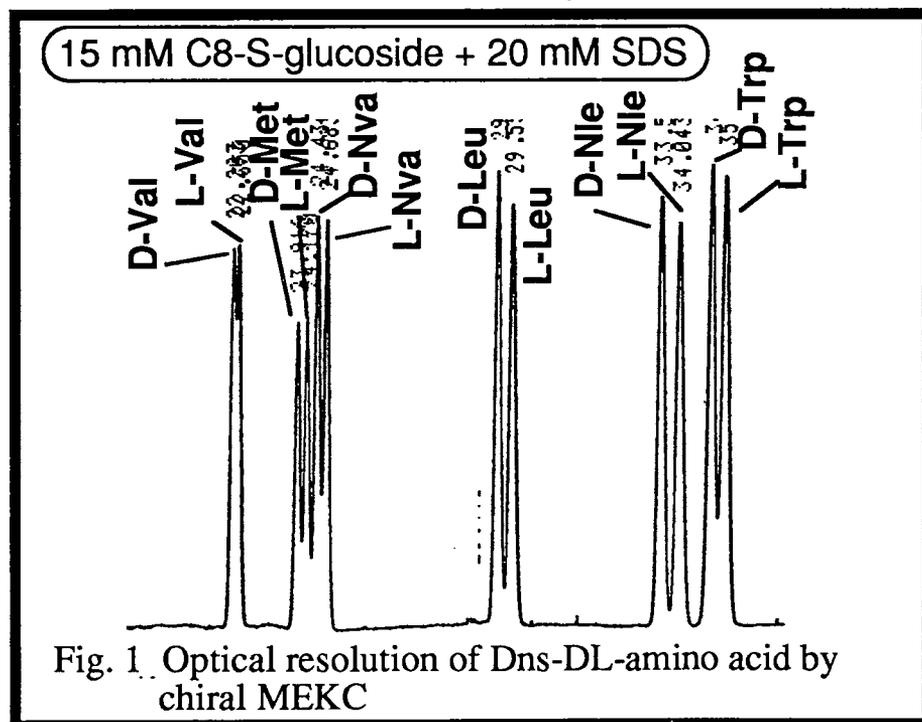
【はじめに】キャピラリー電気泳動法の手法の一つであるミセル動電クロマトグラフィー (Micellar Electrokinetic Chromatography: MEKC)は、キャピラリー内に生ずる電気浸透流を有効利用することによって中性化合物を含む広範な化合物の分離に適用できることから、生体成分分析を含めた広範な応用が期待されている。このなかで、光学活性な界面活性物質をキャリアーに添加し、生成する光学活性ミセルを疑似固定相として溶質光学対掌体分子を分配させることにより光学分割を実現する方法が種々検討されている。一方、市販のデタージェント (膜蛋白質可溶化剤) の中にも光学活性な部分構造を有するものが比較的多く存在する。そこで我々は、これらの中からこの目的に適用可能な化合物を見出すための検討を行なった。

【実験】キャピラリー電気泳動装置; Model 270A Capillary Electrophoresis System (Applied Biosystems Inc.)、キャピラリー; 内径50 μ m, 有効長50 cm。キャリアー溶液; リン酸又はホウ酸緩衝液に光学活性デタージェントを溶解、更に必要に応じてラウリル硫酸ナトリウム (SDS)を添加する。光学活性デタージェント; ドータイト膜タンパク質可溶化剤キット (CHAPS;3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane-sulfonate, CHAPSO; 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane

sulfonate, MEGA-8; Octanoyl-N-methylglucamide, MEGA-9; Nonanoyl-N-methylglucamide, MEGA-10; Decanoyl-N-methylglucamide, n-Octyl- β -D-glucoside, n-Heptyl- β -D-thioglucoside, 及び n-Octyl- β -D-thioglucoside)。試料; DL-アミノ酸のDns-誘導体のメタノール溶液を、適宜緩衝液で希釈したもの。

【結果及び考察】上記デタージェントとSDSとを数mMから数十mMの濃度でキャリアー緩衝液に添加し、サンプル側を陽極、紫外部検出波長を220 nm、印加電圧を数kVから20 kVの範囲で設定してアミノ酸Dns-誘導体の分割能を調べた。光学活性部位を構造中に有するデタージェント(MEGAシリーズは総てラセミ体)は、何れも少なからずDns-アミノ酸に対する光学分割能を示したが、特に長鎖アルキル-D-グルコシド及びチオグルコシドとSDSとの混合ミセルを用いることにより良好な光学分割が有望と思われた。

更に、これら長鎖アルキルグルコシドとSDSとの混合ミセル系での系統的な検討を行なったところ、光学活性デタージェントのCMC(臨界ミセル濃度)の値と光学分割能とに関連があることが判明した。今回検討したアルキルグルコシドの中では、その溶解性なども考慮すると、C8-S-glucosideとSDSとの組み合わせが最も実用的な混合ミセルであると考えられる。分離例をFig. 1に示す。



以上のような混合ミセルの系において、光学分割の成否は、溶質光学体掌体と光学活性ミセルとの会合の効率を如何に向上させるかにあると考えられる。即ち、必ずしも中性デタージェントとイオン性界面活性剤を組み合わせなくとも、中性デタージェントのみによる光学活性ミセルを高濃度にキャピラリー内に存在させること

ができれば、光学分割が可能であることが予想された。そこでキャリアー溶液やキャピラリーを工夫し、電気浸透流の影響を極力小さくすることにより、中性の光学活性デタージェント単独ミセルをキャピラリー内に停滞させる手法を採用したところ、予想されたように光学分割が可能であった。

Application of Capillary Electrophoresis to Optical Resolution**Koji Otsuka*, Masanori Kashihara, Yasushi Kawaguchi,
Ryo Koike, and Toshio Hisamitsu***Department of Industrial Chemistry**Osaka Prefectural College of Technology**Saiwai-cho, Neyagawa, Osaka 572 (Japan)*

Optical resolution by capillary electrophoresis (CE) was investigated. To achieve chiral recognition, following three modes were employed: (1) cyclodextrin (CD) added capillary zone electrophoresis (CZE), (2) micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with chiral surfactants, and (3) CD modified MEKC (CD/MEKC). In CD added CZE (CD/CZE), *RS*-chlorpheniramine was optically resolved with a β -CD solution. In MEKC, some chiral surfactants *e.g.*, sodium *N*-dodecanoyl-L-glutamate (SDGlu) and bile salts, were used. Some phenylthiohydantoin (PTH)-DL-amino acids were optically resolved. Chiral separation by CD/MEKC with sodium dodecyl sulfate (SDS) and chiral micelles was also examined.

1.はじめに

近年、キャピラリー電気泳動(CE)による光学分割に関する研究がさかんに行われるようになってきており、CEの高分離能を生かした応用分野の一つとして医学・薬学分野を中心に注目を集めている。CEによる光学分割では、①シクロデキストリン(CD)を添加するキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)、②キラルな界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)、③CD修飾MEKC(CD/MEKC)、のいずれかの手法が用いられることが多い。いずれの場合にも分離溶液にキラルな物質が添加されるため、操作・コストの点においては高速液体クロマトグラフィーよりも有利であると考えられる。

本研究では、上述の①～③の種々の系について、応用範囲の拡大と分離度の向上の可能性について検討した結果を報告する。

2.実 験

CD添加CZE(CD/CZE)においては主に β -および γ -CDを、MEKCにおいてはキラルな界面活性剤としてアミノ酸誘導体(*N*-ドデカノイル-L-バリン・ナトリウム = SDVal; *N*-ドデカノイル-L-グルタミン酸・モノナトリウム = SDGlu)および種々の胆汁酸ナトリウム塩を、またCD/MEKCではCDには β -および γ -、界面活性剤には硫酸ドデシルナトリウム(SDS)および前述のキラルな界面活性剤も合わせて用いた。

分離溶液は、CD、界面活性剤などを50 mM リン酸塩緩衝液に溶解しさらに必要に応じて尿素、メタノールなどを添加して調製した。

装置にはP/ACE System 2000 (Beckman)および実験室で組み立てたもの(高電圧電源 = 松定 HCZE-30PN0.25-LDS; UV検出器 = 島津 SPD-6A; データ処理装置 = 島

津 クロマトパックC-R6A)を使用した。分離カラムには、内径 50 μm 、全長 26 cm、有効長 20 cm (P/ACE)および内径 50 μm 、全長 50 cm、有効長 30 cm (実験室製装置)のフューズドシリカ管を用いた。分析はすべて定電圧条件で行い、温度は25 $^{\circ}\text{C}$ (P/ACE)または室温(実験室製装置)とした。

3.結果・考察

CD/CZEは、特にイオン性鏡像体試料の光学分割に対して有効であると考えられ、我々はすでにRS-クロルフェニラミンの分割を報告した[1]。その場合、分離溶液には β -CD/尿素系を用い、場合によってメタノールを添加した。なお、 γ -CDを利用した系では、満足できる結果は得られなかった。同試料は、SDSを使用したCD/MEKCでも分割されている。その場合、分離溶液には例えばSDS/ β -CD/尿素系を用いた。

SDValを用いたMEKCによるPTH-アミノ酸の光学分割についてはすでに報告されており[2]、SDS、尿素およびメタノールを添加することによって選択性が向上し、ピーク形状も改善されることが明らかとなっている。ここでは、新たに同種の界面活性剤であるSDGluを用い、応用の可能性を探った。Fig. 1に、75 mM SDGlu/50 mM SDS/1 M 尿素 (pH 9.0)/10% (v/v) メタノールを用いた場合のPTH-アミノ酸の光学分割例を示す。本活性剤はSDValとはアミノ酸残基が一部異なるだけであり、同試料の分割についてはSDValの場合と比べてあまり差異は認められなかった。Table IIに、Fig. 1の各DL体についての容量比と分離係数の計算結果を示す。

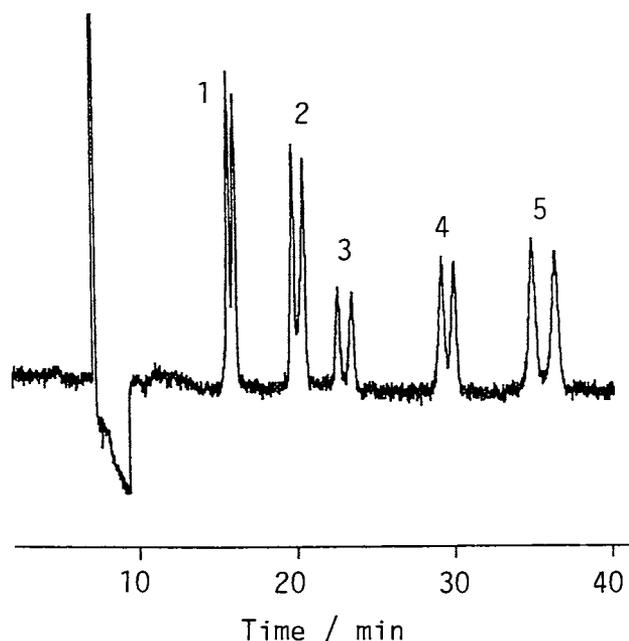


Table I. Capacity Factors (k') and Separation Factors (α) of Some PTH-DL-Amino Acids

Solute	k'_1	k'_2	α
(1)Aba	1.7	1.7	1.06
(2)Met	2.7	2.9	1.07
(3)Nva	3.8	3.9	1.01
(4)Trp	6.2	6.6	1.08
(5)Nle	9.7	11.0	1.14

75 mM SDGlu/50 mM SDS/1 M Urea (pH 9.0) containing 10%(v/v) methanol; 0.05 mm x 350 mm; 227 V cm^{-1} ; 32 μA ; ambient temperature.

Figure 1. Optical resolution of some PTH-DL-amino acids by MEKC with SDGlu. Solutes and conditions are given in Table I.

[1] Otsuka, K.; Terabe, S. *J. Liq. Chromatogr.*, submitted.

[2] Otsuka, K.; Kawahara, J.; Tatekawa, K.; Terabe, S. *J. Chromatogr.*, 1991, 559, 209-214.

キャピラリー電気泳動による薬物の光学分割
—シクロデキストリンの利用—(田辺製薬・分析研) ○西 博行、国仙谷良男、
宮本尚明、佐藤忠司OPTICAL RESOLUTION OF DRUGS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS
—USE OF CYCLODEXTRINS—

Analytical Chemistry Research Laboratory

Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

Hiroyuki NISHI, Yoshio KOKUSENYA, Takaaki MIYAMOTO
and Tadashi SATO

Enantiomers of some drugs such as denopamine and trimetoquinol hydrochloride were successfully resolved by capillary electrophoresis using cyclodextrins (CDs). The effects of the type and the amount of CDs added to the background electrolyte and the pH value of the buffer solutions on the resolution of the enantiomers were examined. Good resolution of the enantiomers of some drugs was obtained using a phosphate buffer of pH 2.2 containing heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -CD.

1. 緒言

キャピラリー電気泳動(CE)は高性能な分離分析法であり、動電クロマトグラフィー(EKC)の発展とともに適応範囲が一層広がり、薬物等の低分子量化合物の分離に対しては、HPLCと比較し遜色のない分離分析法となっている¹⁾。特に、CE、EKCでは、分離選択性を広範囲に容易に変えることができ、さらに、添加試薬類の必要量も少量で良いので経済的である。

光学異性体は、一般に生理活性を異にすることが多く、合成医薬品の多くは光学活性体で開発される傾向にある。品質面からは対応するエナンチオマーは一種の不純物とも言え、近年では、体内動態に立体特異性を示す薬物が存在していることも明らかとなっている。それ故、光学異性薬物の体内動態研究や光学純度保証のための簡便な光学分割法の開発が望まれており、精力的な研究が行われている。我々は、CEの高分離性能に注目し、緩衝液組成を工夫することによる光学分割法について検討を行っており、胆汁酸塩ミセルを利用するMEKC、あるいは、CDをSDSミセルに添加する方法(CD/MEKC)による薬物の光学分割については、既に報告した²⁾。今回は、ミセルを用いないCEモードでの手法について検討を行ったのでその結果について報告する。

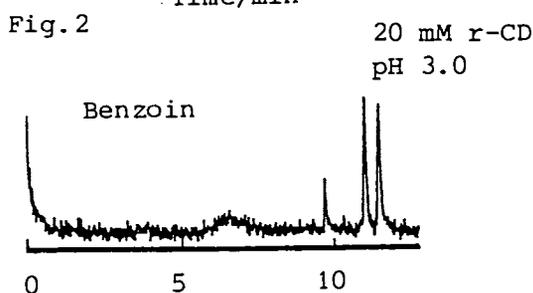
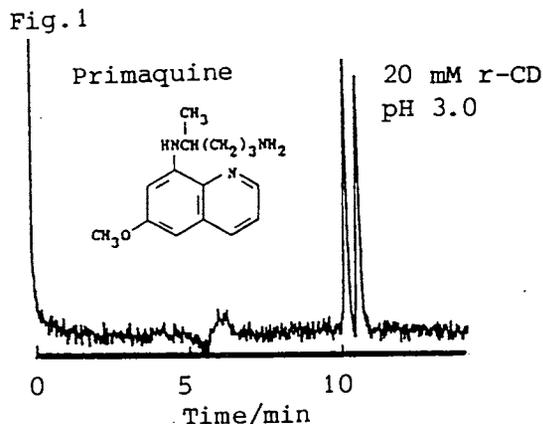
2. 実験

実験装置は、検出器とし島津SPD-6Aのセル部分を改造した自作装置を使用した。高圧電源はHCZE-30PNO.25(松定プレシジョン製)、キャピラリーは内径50 μ m、長さ約75cm(有効長50cm)のフューズドシリカ管を用い、室温で印可電圧15~20kVで行った。緩衝液はリン酸塩緩衝液(PH 2.2~3.0)に尿素及び各種CD(β -CD、 γ -CD、DM- β -CD、TM- β -CD、ナカ

ライテスク)を添加したものを用いた。試料は、芳香環を有する薬物を中心とした。

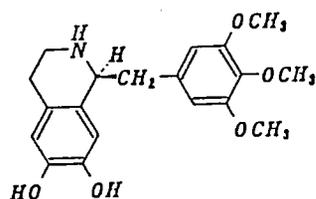
3. 結果及び考察

25 mM リン酸緩衝液 (pH 3.0) に尿素 2 M 及び各種 CD 20 mM を添加した溶液を用いて、試料とした約 30 種類余りの薬物に対する光学識別能を検討した。その結果、わずかでも識別が認められた薬物は、 β -CD で 6 種類、 γ -CD で 4 種類、TM- β -CD で 4 種類と僅かであった。しかし、DM- β -CD では 11 種類と広範囲の薬物に対して光学識別能を示し、塩酸トリメトキノール (イノリン、気管支拡張剤) や直接光学分割が今までに達成されていないデノパミン (カルゲート、心機能改善剤) の直接光学分割に成功し、CE における光学分割用添加剤として、4 種類の CD の中では DM- β -CD が有用であることが判った。Fig. 1, 2 に γ -CD を添加してプリマキン、ベンゾインを光学分割した例を示す。



次にリン酸塩緩衝液 (25 mM) の pH について検討したところ、pH が低いほど、ピーク形状の改善が見られた。これは、試料とした薬物 (塩基性) のキャピラリー管壁への吸着防止効果によるものと考えられた。また、有機溶媒 (メタノール) の添加も検討したが本系では逆に光学識別能を低下させた。Fig. 3 に pH 2.5、DM- β -CD 20 mM 添加した時のデノパミン、トリメトキノール他の分離例を示す。さらに、緩衝液や尿素、及び CD の添加濃度等についても検討を加えた。

1 : Trimetoquinol



2 : Denopamine

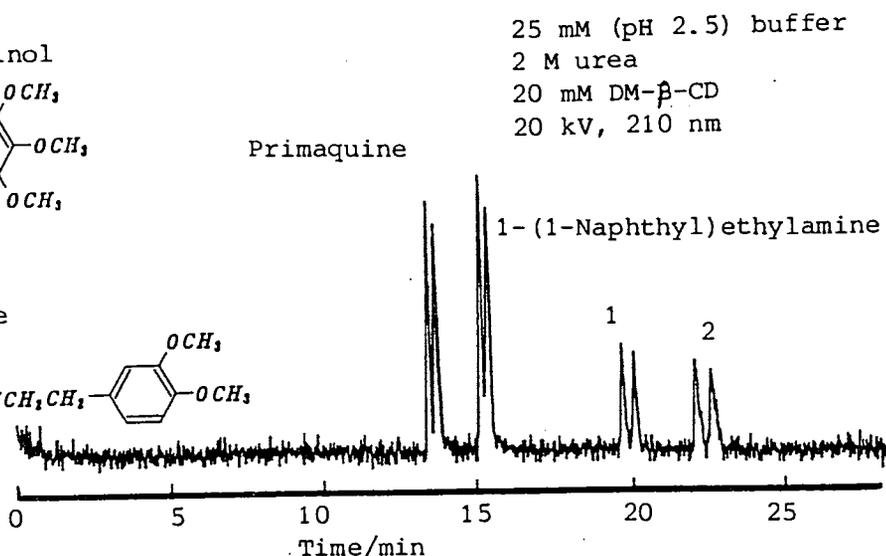
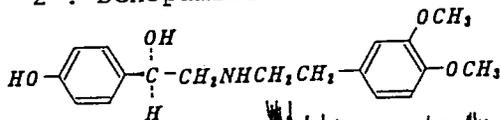


Fig. 3 Chiral separation of four compounds by CE

(1) H. Nishi, S. Terabe, ELECTROPHORESIS, 11(1990)691-701.

(2) 西、国仙谷、科学と工業 Vol.65 No.11(1991)1-11.

キャピラリー電気泳動による尿中ニトラゼパム及びその代謝物の分析

(川崎医大) ○富田正文、 奥山敏子
(川崎医療短大) 佐藤彰一

DETERMINATION OF NITRAZEPAM AND ITS METABOLITES IN URINE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Department of Legal Medicine, Kawasaki Medical School¹⁾
and Kawasaki College of Allied Health Professions²⁾
Masafumi Tomita¹⁾, Toshiko Okuyama¹⁾ and Shoichi Sato²⁾

We applied capillary electrophoresis to simultaneous separation and detection of nitrazepam and its major metabolites, 7-acetamidonitrazepam and 7-aminonitrazepam, in urine. The three compounds were successfully extracted from fortified urine with Sep-Pak C₁₈ cartridges, and then were separated with a fused silica capillary tube containing 5.1 mM phosphate-borate (pH.8.5), 15% methanol and 51 mM SDS. The separation was completed within 25 min at an applied potential of 20 kV. Calibration curves were linear up to 10 $\mu\text{g/mL}$. The detection limits of the three compounds were 50-100 pg (0.1-0.2 $\mu\text{g/mL}$ in fortified urine) and the recoveries were 78.9-100.8 for 1 $\mu\text{g/mL}$ and 84.1-100.3% for 5 $\mu\text{g/mL}$. Few other peaks or obstructions existed in the electropherogram, and we could determine each compound with good specificity in a short run time.

1. はじめに

体液中の薬毒物およびその代謝物の濃度測定は中毒学領域における重要課題の1つである。ここで検討したニトラゼパムについては今日までRIA、GCおよびHPLCがその目的に用いられてきたが、その代謝物との同時分析においては分離の悪さやピークのテーリングなどから未だ満足な方法はないのが現状である。今回我々は尿中のニトラゼパム及びその主要代謝物の同時分析にキャピラリー電気泳動を試みた。

2. 実験

ニトラゼパムは和光純薬から購入、その主要代謝物(7-acetamidonitrazepam, 7-aminonitrazepam)は合成してMS及びNMRで確認した。メタノール溶液をStock溶液とし、これを用いて添加尿を調製した。この尿試料2 mLに炭酸緩衝液(pH 9.8) 6 mLを加え、あらかじめ活性化させたSep-Pak C₁₈に注入した。その後蒸留水、20%アセトニトリル、n-hexaneで洗浄し1分間吸引を続けカラムの乾燥を行ったのちメチレンクロライド 4 mLで溶出しサンプルとした。キャピラリー電気泳動は Applied Biosystems 社の Model 270A を用い、分離用キャピラリーには、内径50 μ m、全長75 cm のフューズドシリカ管を使用した。分離用電解液は、最適な条件として15%メタノール、51mM SDSを含む5.1mM リン酸一ホウ砂(pH 8.5)を用い電圧は20 kVとした。検出波長は200 nm、カラム温度は35°Cである。

3. 結果及び考察

ニトラゼパム及びその主要代謝物(7-acetamidonitrazepam, 7-aminonitrazepam,)は25分以内にベースライン分離を示し、他に妨害ピークはほとんど見られなかった(Fig.1)。Sep-Pakによる抽出では、n-hexaneを加えた後のカラムの乾燥処理が他の妨害物質を除去するのに有効であった。またカラムからの溶出はメタノールやアセトニトリルよりメチレンクロライドによる溶出液を試料としたときに最も良好なElectropherogramが得られた。尿に添加したニトラゼパム及びその代謝物濃度とElectropherogramのピーク面積の間には0~10 μ g/mLの範囲で良好な直線関係が得られ、またピーク面積の再現性を1 μ g/mL, 5 μ g/mLで検討した結果、CV値はそれぞれ4.0~8.0%, 1.7~3.0%であった。本法による検出限界は50~100 pg (0.1-0.2 μ g/mL in urine, injection volume=ca.12 nL)であり、回収率は1 μ g/mLで78.9~100.8%, 5 μ g/mLで84.1~100.3%と満足できる値であった。

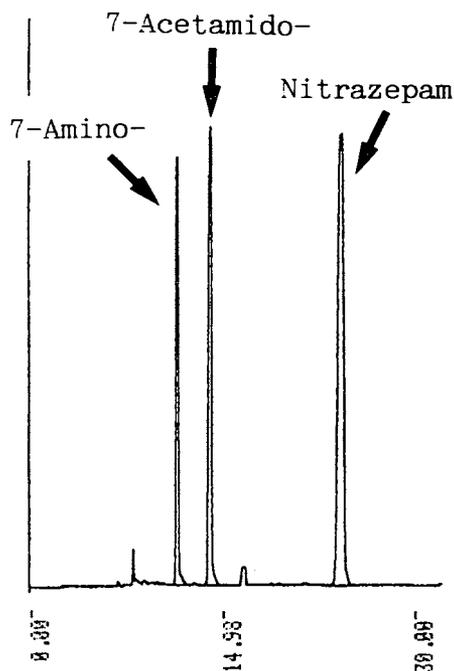


Fig.1 Electropherogram on urine extract.

体液中ニトラゼパムのHPLCやGCは既に多く報告されているが、その代謝物を同時に満足に微量定量できる方法の報告はほとんどない。そこで1) Sep-Pakカラムによる抽出と濃縮、2) ミセル動電クロマトグラフィーをその同時分析に応用した結果、本法が体液中の薬毒物スクリーニングに今後大いに有効であろうと思われる結果を得ることができた。ただ薬毒物の微量分析分野に応用するにあたっては極微量のサンプル注入量が逆に欠点となり検出感度に限界がでてくる。今後、オンカラム方式でのサンプル濃縮についての研究が必要であろう。

キャピラリー電気泳動による 血清中の複数の抗てんかん薬 の同時定量について

(国立精神神経センター) ○今沢正興

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANTIEPILEPTIC DRUGS IN SERUM BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Masaoki Imazawa

National Institute of Neuroscience, NCNP

A simple HPCE method for simultaneous determination of common antiepileptic drugs in human serum is presented. After solvent extraction, primidone, phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, zonisamide, valproic acid and ethosuximide can be completely separated in 9 min by the MECC mode. On-column UV monitoring enables detection and quantification of all the drugs at the therapeutic serum levels.

1. はじめに

抗てんかん薬を用いた薬物療法は、一部の難治性のものを除いて、てんかんの最も一般的で有効な治療法である。科学的な薬物治療には、血中の薬物レベルをモニターし、治療有効濃度を維持することが必要とされている。これまでの抗てんかん薬の分析法としては免疫化学的な方法及びHPLCが主なものであるが、てんかん治療には多剤併用が行われることが多いので、その点を考慮する必要がある。今回、キャピラリー電気泳動の高分離能に着目して、血清中の複数の抗てんかん薬の同時分析法に応用することを検討した。

2. 実験

Beckman P/ACE 2000 キャピラリー電気泳動システムを用い、分離用キャピラリーには、内径75 μ m、有効長50cmのフューズドシリカ管 (Beckman社供給) を用いた。血清試料は、有機溶媒抽出の後、遠心エバポレーターによる溶媒留去後、少量の溶液としてキャピラリーに注入し、25kVで泳動を行った。バルプロ酸 (VPA) を含まない複数の抗てんかん薬の分析の場合には、内部標準 (IS) としてメチルフェニルフェニルヒダントイン (MPPH) を、抽出溶媒として酢酸エチルを用い、分離には、25mM SDSを含むpH8.6ほう酸緩衝液を使用して、検出波長214nm、25 $^{\circ}$ Cにてミセル動電クロマトグラフィーを行った。VPAを含む場合には、ISとしてシクロヘプタンカルボン酸を用い、血清を塩酸酸性とした後、nペンタン-酢酸エチルで抽出を行い、30mM LDSを含むpH6.0リン酸緩衝液、200nm、28 $^{\circ}$ Cにて泳動を行った。定量はISに対する面積比により行った。

3. 結果および考察

VPAを含まない複数の抗てんかん薬の分析の場合、上記の条件でフェノバルビタール (PB)、フェニトイン (PHT)、カルバマゼピン (CBZ)、プリミドン (PRM)、エトサクシミ

ド (ESM)、ゾニスアミド (ZNS) およびそれらの代謝産物、エポキシカルバマゼピン (epoxy-CBZ)、ヒドロキシフェニルフェニルヒダントイン (p-HPPH) と内部標準が完全に分離し、分析は8分以内に終了した。各薬物はいずれも $1\mu\text{g/ml}$ までの分析が可能で、分析値の変動係数 (CV) はCBZの低濃度の場合を除き、いずれも約5%以下であった。移動の順序はESM、PRM、ZNS、PB、HPPH、PHT、MPPH、epoxy-CBZ、CBZであり、逆相カラムを用いたHPLCの分離パターンと類似の傾向を示した。

次にVPAを含む複数の抗てんかん薬の分析には感度上昇の目的で検出波長を200nmに変更した。同時に妨害ピークの増大が予期されたが、上述の条件でVPAとISは血清もしくは溶媒由来のピークと分離して検出された。分離緩衝液のpHは、検討の結果、VPAのピーク形状が良好な6.0を用いることとした。VPAの検出限界は $5\mu\text{g/ml}$ 程度である。サンプルの前処理の際、従来問題とされてきた、有機溶媒留去におけるVPAの一部の損失は、リン酸塩を含む水溶液を共存させることにより防ぐことができ、分析の精度は良好である。本法は誘導体化していないVPAの分析法として、操作が簡便であり、感度的にも満足できる。この系における他の抗てんかん薬の分離に関してはZNS、PB、PHT、CBZが各々単一のピークとして、夾雑物のピークと分離して確認され、以上の分析は9分以内に終了した (Fig.1)。

以上のように、キャピラリー電気泳動が血中の抗てんかん薬の分析法としても優れていることを明らかにした。上述の、一般的な抗てんかん薬は、治療に使用される血中濃度が比較的高く、そのため分析が容易であるとも考えられる。現在、血中レベルが二桁程度低い、ベンゾジアゼピン系の抗てんかん薬の分析法についても検討中である。

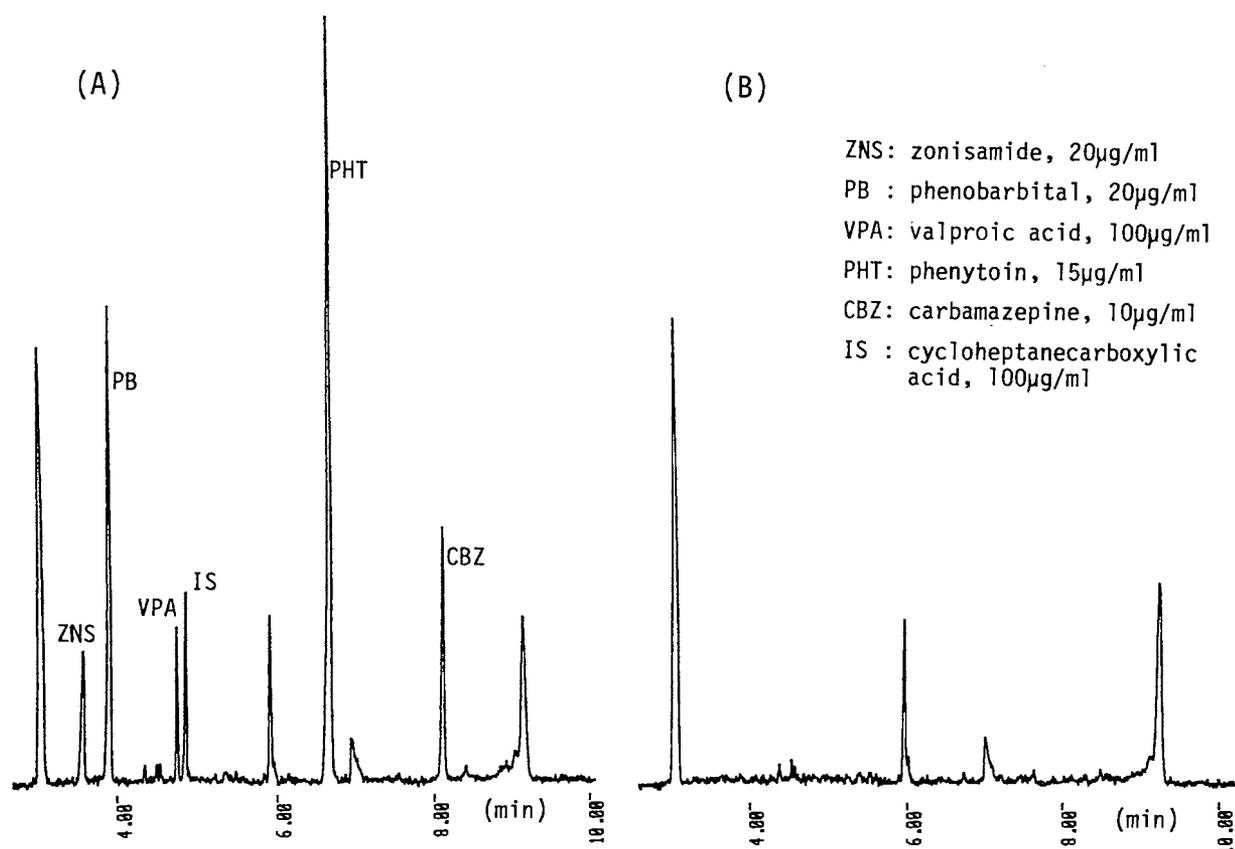


Fig. 1. Electropherograms of extracts of serum containing five antiepileptic drugs (A) and drug-free serum (B).

キャピラリー電気泳動による 食肉用抗菌剤の分析

(国立衛試) ○松田りえ子, 林 譲, 鈴木隆, 齊藤行生

CAPILLARY ZONE ELECTROPHORETIC (CZE) ANALYSIS OF ANTIBACTERIALS FOR MEAT

National Institute of Hygienic Sciences

Rieko Matsuda, Yuzuru Hayashi, Takashi Suzuki and Yukio Saito

Five antibacterial drugs are separated by capillary zone electrophoresis. FUMI (function of mutual information) is used for evaluation of analytical conditions, and the effects of buffer pH and applied voltage on FUMI are investigated. In the low-pH region the migration time is elongated and FUMI increases owing to the increased peak area. The high applied voltage decreases FUMI. The effects are compared with those in high performance liquid chromatography (HPLC).

食肉用の家畜には、感染症の予防のために種々の抗菌薬が投与されている。これらの薬物は食肉中へ残留してはならないと定められているが、時として高濃度の抗菌薬が検出される事例がある。食肉中の抗菌薬は従来、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で分離定量されていたが、今回キャピラリー電気泳動 (CZE) による分析法の開発を行うため、使用頻度の高い抗菌薬5種類を選び、泳動条件の基礎的な検討を行った。さらに、HPLCの分析条件の最適化に有用であった情報量を用い、泳動液のpHおよび電圧の影響を検討した。

[実験] スルファキノキサリン (SQX), スルファモノメトキシ (SMM), スルファジミジン (SMM), オキサリ酸 (OXA), ピロミド酸 (PDA) の5種類を使用した。いずれも塩基性条件化では解離してアニオンとして存在している。

キャピラリー電気泳動システムはWaters社製Quanta4000を使用した。分離用キャピラリーは内径75 μ m, 全長65cm (有効長60cm) のフューズドシリカ管 (Waters製, AccuSep) を用い、254nmの吸光度を検出した。

泳動溶液は25mMホウ酸ナトリウムと100mMリン酸二水素ナトリウムを混合しpHを調節して調製した。

[情報量の計算] 我々はクロマトグラフからの信号解析により得られる情報量FUMI (Function of Mutual Information) を用いて、HPLC条件の最適化を行ってきた。情報量FUMIは分析の精密度と等価な量であり、大きな情報量を与えるクロマトグラムから得られたデータは精密度が高い (バラ付きが小さい)。面積 A_j , 高さ h_j のGaussian peakからは、次式で表される情報量が得られる。

はクロマトグラム上のホウイソキサの分散と、 σ はコーンバーターのsampling intervalの積である。 σ はピークの重なりによる情報の損失で、ピークが他のピークと強く重なっていると、情報は小さくなる

[結果・考察]

図1に各薬物の移動速度のpHによる変化を示

した。陽極から陰極へ方向を正とした。pHが

低下するとともに、解離が抑制され移動速度が小

さくなっていく。各pHで得られた泳動図のピー

ク面積及び高さから上記の式に従い、情報量を計

算した。結果を図2に示す。ピークが重なりを

大きくになると、情報量が大きく低下することか

分る。低pHでは泳動時間が長くなることも情

報量が徐々に増加する。HPLCでは移動相組成

の変化によってピークの溶出が遅くなる。情報

量が低下し、CZEとは逆の傾向が見られた。こ

れはHPLCでは溶出時間とともにピーク高が低

下する(面積は一定)のに対し、CZEでは移動

速度が小さくなり泳動図上のピーク面積が大き

くなるためである。一方、理論段数が小さくな

るために、ピーク高はやや徐々にする。しかし、

低pHではSDのピーク吸収が小さくなって

定量が困難であり、また全体の分析時間も長くな

るため、分析効率をも考慮すればpH8が最適で

あった。

電圧を変化させた場合にも、低電圧で泳動時間

が長くなることも情報量が増大する結果を得た。

HPLCで移動相の流速を変化させた場合にも同

様な結果となった。しかし、HPLCでは高流速

に伴い理論段数が低くなり分離が悪くなるが、C

ZEでは高電圧では理論段数が増加する点が異な

っている。図にpH8, 15kVでの泳動図を示す。

Figure 3 Electropherogram of antibacterial drugs
pH8, 15kV : 1 SDD, 2 PDA, 3 OXA, 4 SQX, 5 SMM

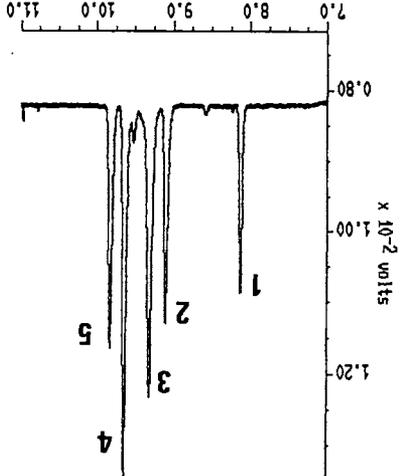


Figure 2 Effect of pH on PUMI

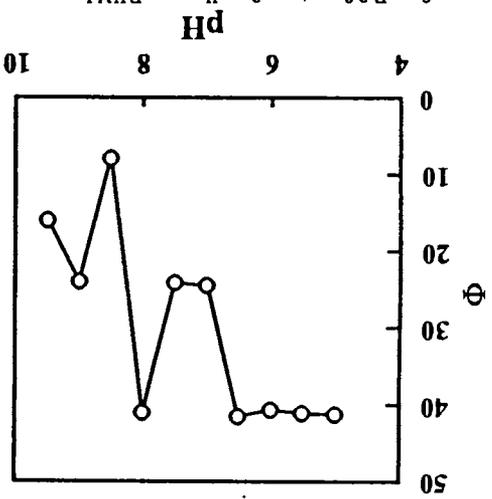
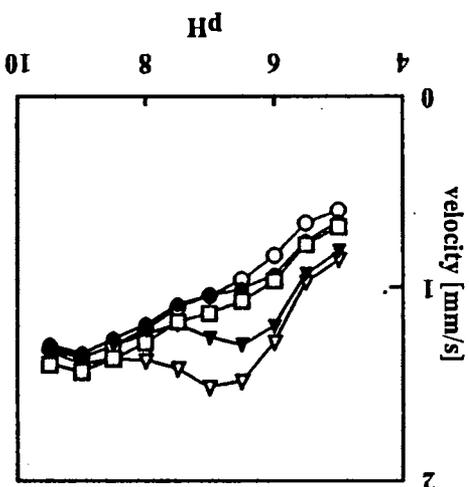


Figure 1 Effect of pH on velocity



$$\sigma = \frac{1}{2} \log \left(\frac{A h^2}{2^{1/2} a} \right)$$

(近畿大・薬) ○上野哲司、本田 進

ANALYSIS OF MACROMOLECULAR GLYCOSAMINOGLYCANS
BY HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESISFaculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
Tetsuji UENO and Susumu HONDA

Glycosaminoglycans (GAGs) were directly analyzed by HPCE in the zone electrophoresis mode with uv monitoring at 185 nm. The best separation was obtained with 100 mM borate buffer, pH 10. The migration was in the order of increasing acidity, i. e., chondroitin & hyaluronic acid, keratan sulfate, heparan sulfate, chondroitin sulfates (A-C) & heparin, chondroitin sulfate D, chondroitin sulfate E. The combinations of GAGs having approximately the same acidity (chondroitin and hyaluronic acid; three species of chondroitin sulfates, A-C, and heparin) were incomplete. A few GAGs such as hyaluronic acid and chondroitin sulfate C in pharmaceutical preparations could be determined by this method with high reproducibility.

【はじめに】 グリコサミノグリカン類 (GAGs) は動物の体内や微生物中に存在し、種々の重要な生理的役割を果たしている。例えば heparin は強力な血液凝固阻止作用を有し、血栓症になくなくてはならない医薬品であるし、chondroitin sulfate や hyaluronic acid は粘滑剤として種々の医薬品に配合される。しかし、多くの場合これらは共存するため、抽出・製造の過程で互いに混入し、精製は容易でない。このため製品の純度検定は重要な問題である。また、これらはいずれもアミノ糖とウロン酸の繰り返しを基本構造とするが、重合度の違いに基づくサイズ不均一性と、基本構造に分布する硫酸基やアセチル基などの数や結合位置などに基づく微細構造不均一性をもっているため、それらの分析には特有の問題がある。

GAGs は従来セルロースアセテート膜を用いる電気泳動やサイズ排除クロマトグラフィーにより分析されてきたが、これらはいずれも満足できる方法とは云い難い。グリコシド結合を特異的に切断する酵素を作用させることにより生ずるオリゴ糖を一斉分析して、微細構造に関する情報を得る工夫も行われているが、これは GAGs そのものの分析ではない。

高性能キャピラリー電気泳動 (high performance capillary electrophoresis, HPCE) は最近発展しつつある優れた分離分析法であり、種々の生体成分の分析に適用されているが、検出面では現在のところ紫外外部吸収または蛍光を測定する以外に実用的な方法は開発されていない。GAGs は通常紫外外部においては吸収を示さないし、また蛍光も発しないため、HPCE の対象としてはあまり適切なものとは云えないが、最近紫外外部の吸収をかなり感度よく検出できる検出器が入手できるようになったため、GAGs の直接分析も可能と考えられる。そこで今回紫外外部検出 HPCE による GAGs の分析について検討し、若干の知見を得たので、その結果について述べる。

【実験】 HPCE Waters Quanta 4000 システムを用いた。キャピラリーには内径 50 μm のフューズドシリカ管を用い、検出は 185 nm で行った。試料は落差法により導入し、分析は室温で行った。試料は 1mg/ml の水溶液として用い、混合試料におけるピークの同定は標品との co-migration により行った。試薬 いずれも市販の特級品を用いた。

【結果】 GAGs の分離 GAGs はいずれもカルボキシル基をもち、hyaluronic acid 以外は硫酸基をも含む酸性物質であるため、直接にゾーン泳動モードで分離できると考えられる。中性～アルカリ性のリン酸緩衝液をキャリアーとすることにより、ある程度 of 分離が達成されたが、すべての GAGs を完全に分離するには至らなかった。水酸基の配向の違いによるホウ酸錯体形成能の差を利用して分離を試みたが、リン酸緩衝液を用いた場合に比べて若干の改善がみられるにとどまった。Fig. 1 に 100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9) を用いて GAGs 標品の分離を行った結果を示す。

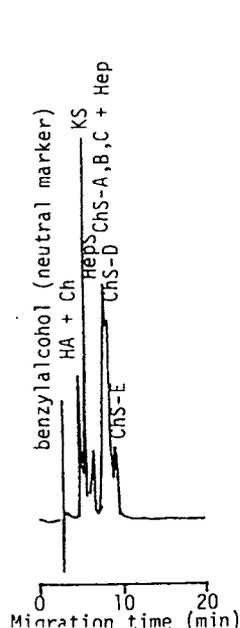


Fig. 1. Separation of GAGs by HPCE in the zone electrophoresis mode. Capillary, fused silica (50 μm , 51 cm); carrier, 100 mM borate buffer (pH 9.0); applied voltage, 20 kV; detection, UV 185 nm.

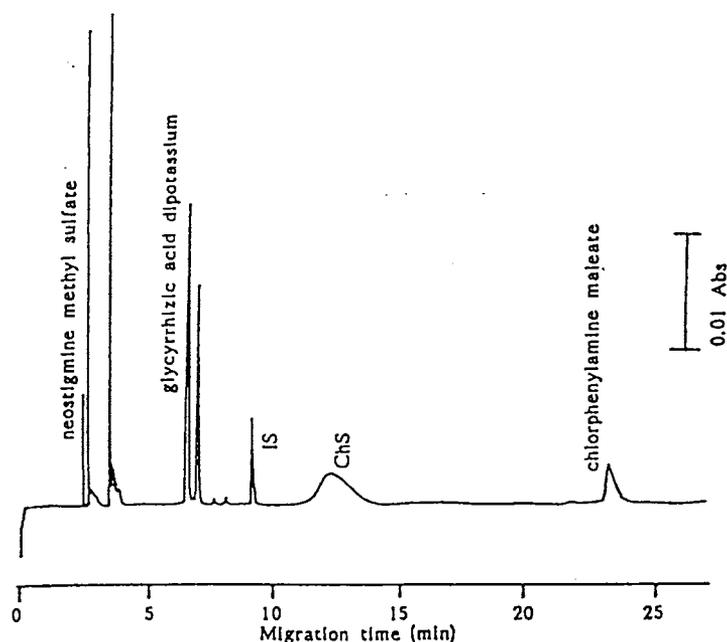


Fig. 2. Analysis of chondroitin sulfates in a commercial sample of eye lotion. The analytical conditions are the same as in Fig. 1.

定量 Fig. 1 に示した条件で、いずれの GAG についてもピークレスポンスは試料濃度に対して直線性の高い検量線を与え、再現性も良好であった。この結果に基づいて医薬品中の GAG の定量を試みたところ、満足できる結果が得られた。市販の点眼薬について得られた分析例を Fig. 2 に示す。

高性能キャピラリー電気泳動による生薬中の糖類の分析

(近畿大・薬) ○湯谷勝治、掛樋一晃、久保道德、本田 進
(北京市臨床薬学研) 杜 曉曦

ANALYSIS OF CARBOHYDRATES IN CRUDE DRUGS BY HIGH PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
Shoji YUTANI, Kazuaki KAKEHI, Michinori KUBO and Susumu HONDA
and
Beijing Institute of Pharmacy
Gyohki TOH

A simple and sensitive method for analysis of the component monosaccharides of carbohydrate materials in crude drugs was developed, based on capillary zone electrophoresis of the borate complexes of their 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) derivatives. A generalized procedure for analysis of fructooligosaccharides was also developed on the basis of digestion by invertase, followed by direct zone electrophoresis of the PMP derivatives in a carrier containing Z-1 methyl.

【はじめに】多くの生薬は古来民間伝承的にスクリーニングを受け生き残ってきた薬物であり、その薬効の証明には不備な点もあるが、改めて近代的な手法により調査する価値をもっていると思われる。これまでに取り出されて構造が決定され、また薬理学的調査により重要な医薬品として取り上げられた成分も多いが、ほとんどかえりみられることがなかったものも少なくない。糖類はその典型的な例であり、近代的な調査の対象としてとりあげるべき化合物群である。

根類生薬または根茎類生薬中には、広く一般の植物にも含まれる糖類も存在するが、特徴のあるオリゴ糖や多糖も含まれており、薬理学的にまた栄養学的に興味もたれる。そこで、今回はまずそれらの糖類の分析において共通した問題である単糖分析に関して、高性能キャピラリー電気泳動 (high performance capillary electrophoresis, HPCE) を用いる方法について検討を行った。また、特徴ある糖類の一群をなすフルクトオリゴ糖についても一般的な分析法の開発を試みた。

【実験方法】生薬試料 特に示すもの以外は市場品を用いた。生薬からの糖成分の抽出 生薬を 100倍量の水で繰り返し冷浸し、抽出液を併せて濃縮したのち、Amberlite CG-120 (H⁺型) および Amberlite CG-400 (OAc⁻型) の小カラムを用いて脱塩し、通過液および洗液を併せて凍結乾燥した。糖標品および試薬 いずれも市販の特級品を用いた。HPCE 日本分光工業 CE-800 型装置 (紫外外部吸収検出器つき) を用い、内径 50 μm のフューズドシリカキャピラリーを使用して分析を行った。試料は落差法 (10 cm、10 sec) によりキャピラリーに導入した。単糖類の誘導体化: 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) を用い既報¹ (Honda et al., Anal. Biochem., 180 (1989) 351) により行った。フルクトオリゴ糖の誘導体化: 生薬抽出脱塩物を酢酸緩衝液中 invertase で消化したものについて、単糖と同様に誘導体化を行った。

【結果】単糖類の分析 生薬中の糖類にはウロン酸などの酸性単糖も含まれるが、大部分の構成単糖は中性であるため、HPCE により分離するためには何らかの手段によりイオン化しなければならない。また、検出の面から考えると、単糖類には発色団や発蛍光団がな

いため直接検出することは困難である。このため PMP による誘導体化を行った。この場合誘導体はいずれも PMP を 2 個を含み強い紫外吸収を与えると同時に、ピラズロン環のケト基のエノール化により弱酸性を示し、通常のゾーン泳動モードでも移動させることができた。しかし、単糖異性体間では移動度の差がないため分離することはできなかったため、ホウ酸錯体の形成を利用して分離することを検討した。キャリアーのホウ酸塩濃度や pH について最適化を行った結果、100 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.5) を用いることにより、生薬中の糖類に共通して含まれる中性単糖 (arabinose, xylose, glucose, galactose および rhamnose) をすべて完全に分離することができた。また、アミノ糖 (glucoamine) は N-アセチル体として、相互にまた中性単糖類から、分離することができた。ウロン酸 (glucuronic acid および galacturonic acid) はそれ自体のもつカルボキシル基のために最も遅れて移動し、他の単糖から明瞭に分離することができた。Fig. 1 にこれらの単糖類を一斉分析した結果を示す。この方法により種々のオリゴ糖や多糖の構成単糖の分析を行ったところ、満足できる結果が得られた。

フルクトオリゴ糖の分析 Raffinose 系オリゴ糖などの還元末端にフルクトース残基をもつ糖類は特定の生薬中に高濃度で存在し、薬効との関連にも興味もたれるため、共通の分析法を検討した。これらの非還元糖は構成単糖と同様紫外外部吸収による直接検出ができないので誘導体化する必要があるが、直接誘導体化することは困難であるため、invertase 消化により一旦還元糖に変換したのち単糖と同様に PMP と縮合させる方法を検討した。オリゴ糖の種類によって invertase に対する基質特異性に差はあったが、充分に利用できる方法であることが確かめられた。分離は、含まれるオリゴ糖の組合せによるが、raffinose 系オリゴ糖に限定する場合は、直接的なゾーン泳動モードで充分に分離でき、trimethylammoniopropanesulfonate (Z-1 methyl) などの両性界面活性剤を添加することにより電気浸透流速をあげ、分析時間を短縮することができた。Fig. 2 にこの方法を raffinose 系オリゴ糖に適用した場合に得られた分析結果を示す。

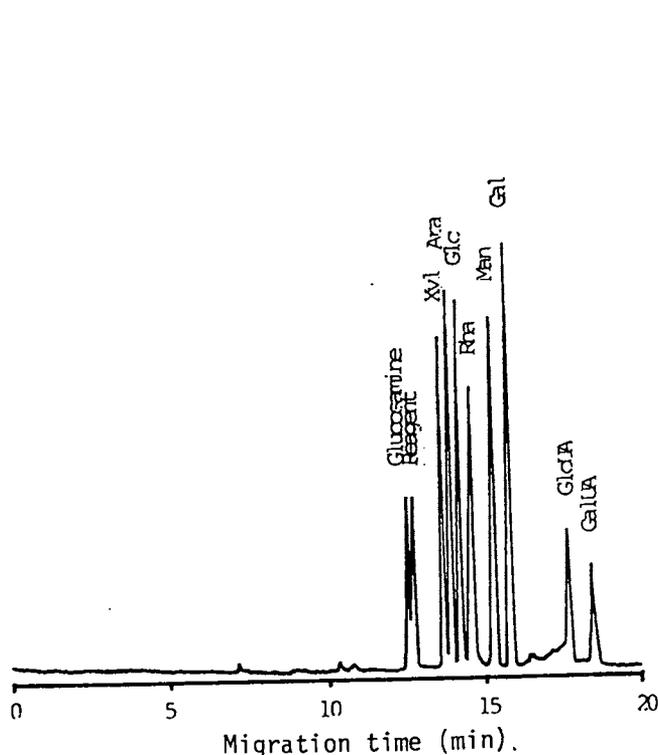


Fig. 1. Analysis of the monosaccharide components of carbohydrate materials in crude drugs as the borate complexes of the PMP derivatives. Capillary, fused silica (50 μ m i.d., 70 cm); carrier, 100 mM borate buffer (pH 10.5); applied voltage, 15 kV; detection, uv absorption at 245 nm.

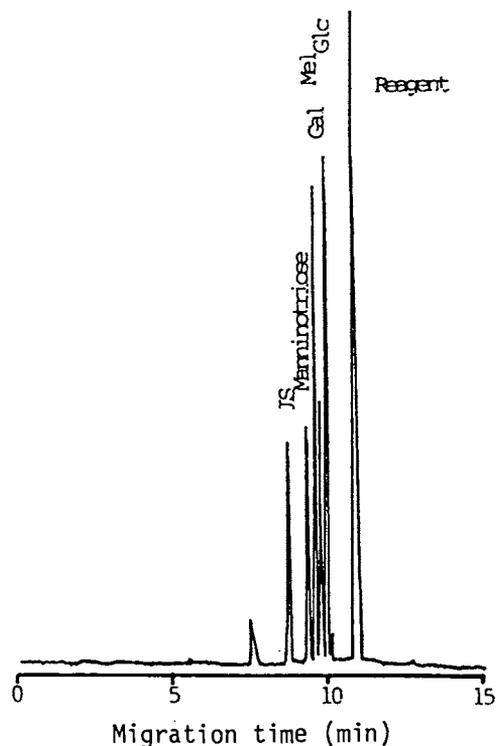


Fig. 2. Analysis of the oligosaccharides of raffinose series as the PMP derivatives of their defructosylated products. Capillary, fused silica (50 μ m i.d., 70 cm); carrier, 50 mM phosphate buffer (pH 7.3) containing Z-1 methyl (0.5 M); applied voltage and detectin method, as in Fig. 1.

31 ゲル充填キャピラリー電気泳動分析におけるDNAの塩基組成と移動度の関係

(城西大学理学部化学科¹⁾、ベックマン(株)科学機器事業部²⁾)
○歌川祐史¹⁾、小林英三郎¹⁾、秋山忠雄²⁾、佐藤隆²⁾

A novel way to the simultaneous determination of migration coefficients of each base in heterogeneous oligo DNA on gel filled capillary electrophoresis
Yuushi UTAGAWA¹⁾、Hidesaburo KOBAYASHI¹⁾、Tadao AKIYAMA²⁾、Takashi SATOW²⁾

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

2) Beckman Instruments(Japan)Ltd., 6, Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo

On the base composition of heterogeneous oligo DNA, we may be able to predict the migration times by using the migration coefficients obtained from observation function on HPCE.¹⁾ The migration time of the oligo DNAs, which are composed from 15mer to 21mer, showed good agreement with the calculations and the observations obtained here. We have also the same results when this method was applied to estimation for the migration distance on DNA sequencing electropherogram "Ladder".

1. はじめに

核酸分子のゲル電気泳動は、DNA フラグメントの分離や配列決定に広く使用されているが、手技で行う操作が多く完全自動化への展開は困難な問題点がある。一方高性能ゲルキャピラリーゲルカラム(ベックマン社, eCap U100P)を用いオリゴDNAの電気泳動での移動時間に基づく観測方程式を報告した。¹⁾ 20mer から 61mer までのヘテロジニアスなオリゴ核酸塩基に起因する係数を求めほぼ 0.5mer の精度で移動時間を予想する事が出来た。

本研究では、DNA 合成装置で合成した数種のモデルオリゴDNAと市販されているオリゴDNAを試料とし観測方程式のより詳細な検討を行う事を目的とした。さらに、本観測方程式はキャピラリーゲル電気泳動におけるオリゴ核酸の移動時間に適用できるばかりでなく、スラブゲル電気泳動による核酸配列解析での移動距離にも適用できる事を報告する。

2. 実験

HPCE 装置としてベックマン社から市販されている P/ACE System 2050 に eCap U100P ゲル(ポリアクリルアミドゲル, 7M 尿素含)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, 検出器までの有効長は 30cm の物を使用した。キャピラリー温度は 30 度に保ち, 検出は 260nm で行った。電極電解液は eCap Buffer (100mM Tris, 250mM Borate, 7M Urea, pH8.3-8.4)を使用した。電気泳動は, 11.00kV の定電

圧方式を使用し、試料注入は電気泳動的に 500kV で 2.0 秒間行った。

試料には演者達が合成した 20,21および15mer のオリゴDNAを使用した。

20A-C:5'-AAGAAAGCAGCAACTGCATC-3'

20A-A:5'-AAGAAAGCAGCAACTGCATA-3'

20G-T:5'-GAGAAAGCAGCAACTGCATT-3'

21A-T:5'-AATAATAATAATAATAATAAT-3'

15C-A:5'-CTACTACTACTACTA-3'

また宝酒造より市販されている以下に示す 17mer のオリゴ DNA も試料として使用した。

SK:5'-TCTAGAAGTAGTGGATC-3'

T7:5'-AATACGACTCACTATAG-3'

全ての実験にはスタンダードとして宝酒造より供給された 20mer から 61mer までの合成オリゴ DNA 11 種を含む混合水溶液を使用した。

3. 結果及び考察

3-1. HPCE によるオリゴ DNA の分析と観測方程式による移動時間

合成及び市販品である 20A-C, 21A-T, 15C-A, SK および T7 の各オリゴヌクレオチドは測定された移動時間と観測方程式から得られた移動時間では、ほぼ 0.5mer に相当する移動時間内で良い一致を示した。

一方、合成オリゴヌクレオチドである 20A-A と 20G-T は予測より短いヌクレオチドである事を示す移動時間を得た。移動時間を用い観測方程式によりシュミレーションしたところ 20A-A は 12mer, 20G-T は 11mer と 12mer の混合物と推定された。この 2 つのオリゴヌクレオチドは、核酸自動合成装置による合成過程で、設計したものより短いオリゴヌクレオチドが合成された事も考えられるので詳細な検討を行っている。

3-2. DNA 配列決定用スラブゲル電気泳動への観測方程式の適用。

DNA のゲル電気泳動における電気泳動原理は、基本的にゲルキャピラリー電気泳動と同じであると考えられる。DNA 配列決定のために電気泳動したラダーの泳動図を用い、オリゴヌクレオチドの移動距離を観測方程式を用いて評価した。全てのヌクレオチドが一本鎖である事も反映して 100mer から 310mer 迄の移動距離はその塩基組成から計算される移動距離と 0.5mer 以内の一致を示した。

4. おわりに

本研究では、ゲル電気泳動におけるオリゴヌクレオチドの移動時間および移動距離を観測方程式に適用した。実験に用いたオリゴヌクレオチドは、スラブゲル電気泳動も同様に予測移動時間、予測移動距離と良く一致し、本観測方程式が低分子核酸のゲル電気泳動における一般的な解析手段として用いる事が出来ると考えている。

5. 参考文献

1) 佐藤, 町田: 第 11 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集 p75 (1991)

32 新規ゲルを用いたキャピラリーゲル電気泳動によるDNAの高速分離

(神戸女子薬大¹、鹿児島大工²) ○馬場嘉信¹、津波古充朝¹、
澤智裕²、明石満²

High-Speed Separation of DNA by Capillary Gel Electrophoresis Using New Gel Columns

Yoshinobu Baba¹, Mitsutomo Tshako¹, Tomohiro Sawa², and Mitsuru Akashi²
Kobe Women's College of Pharmacy¹ and Faculty of Engineering, Kogoshima University²

Although capillary gel electrophoresis and capillary array electrophoresis have realized high-speed DNA sequencing, the throughput of these techniques is still insufficient to complete sequencing of DNA with 3 billion base pairs in the human genome. We tried high speed single base separation of DNA with high resolution. Our goal is the separation of 1,000 bases per hour and 5×10^7 plates per meter will be required for this purpose. We made crosslinked and noncrosslinked polyacrylamide gel filled capillaries and novel gel filled capillaries to achieve high speed separation of DNA. A preliminary result demonstrated the complete resolution of 350 bases within 23 min with 2×10^7 plates per meter.

はじめに

核酸の分離には、従来、ゲル電気泳動とHPLCが広く用いられてきたが、最近、キャピラリー電気泳動(Capillary Electrophoresis)¹⁾がその分離能力の高さから注目を集めている。キャピラリー電気泳動の中でも、キャピラリー中にポリアクリルアミドゲルを充填したキャピラリーゲル電気泳動²⁾は、500塩基までの1本鎖DNAを、1塩基のみの違いでわずか30分から1時間以内に分離することができるほどの性能を有している。また、同じ方法により、50塩基対から20,000塩基対のDNA断片を30分以内で分離可能である。さらに、分子ふるい効果を有するポリマー(メチルセルロース、非架橋ポリアクリルアミドなど)溶液を利用したキャピラリー電気泳動³⁾が、2本鎖DNA断片の高速分離に有効であることが明らかとなってきた。本研究では、従来のゲルやポリマーと異なる新規材料を用いたキャピラリー電気泳動による1本鎖DNAおよび2本鎖DNAの分離を行ない、その分離性能および速度について検討した。

実験

キャピラリー電気泳動の装置は、アプライドバイオシステムズ社製モデル270Aを使用した。キャピラリーには、ポリアクリルアミドゲルおよびその他のゲルを充填して用いた。ゲルの充填は、既に報告した方法²⁾で行なった。サンプルとしては、合成ポリヌクレオチドを用いた。サンプルは電気的に注入し、泳動は10-30 kV(200-500 V/cm)で行な

った。緩衝液は、トリス-ほう酸-EDTAに尿素を適量加えたものを用いた。検出は260 nmで行なった。

結果と考察

まず、キャピラリーゲル電気泳動によるDNAの高速分離を達成するための分離条件の検討および新規ゲルの検討を行なった。その結果、従来のポリアクリルアミドゲルを用いた場合、Fig. 1に示すように1本鎖DNAを1時間に240塩基の分離が可能であることがわかった。全く同じ条件下であっても、新規ゲルを用いれば、1時間以内に400塩基が分離可能であり、速度が60%以上増加することを明らかにした(Fig. 2)。次に、ポリマ

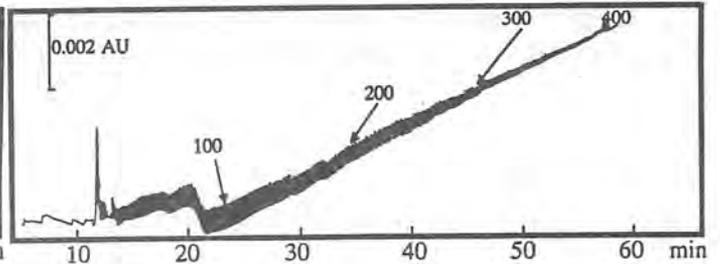
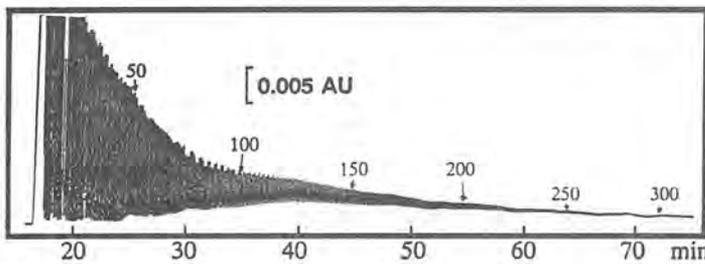


Fig. 1 Separation of DNA by polyacrylamide gel filled capillary

Fig. 2 Separation of DNA by HydroLink™ gel filled capillary

ー溶液を用いたキャピラリー電気泳動について検討した。その結果、0.5%誘導体化セルロースを用いると、100塩基対から10,000塩基対までの2本鎖DNAがわずか20分で分離可能であった(Fig. 3)。

以上のように、キャピラリー電気泳動に用いる新しい分離媒体の開発は、DNAの分離の高速化および高分解能化にとって重要であることが明らかとなった。

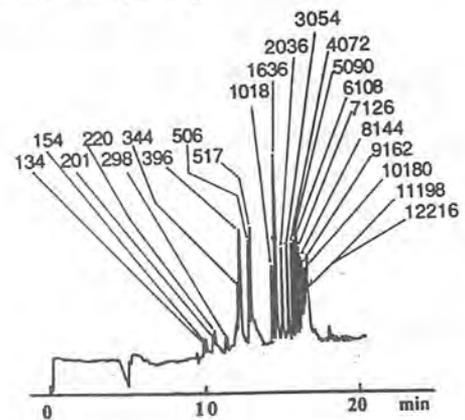


Fig. 3 Separation of DNA by CE in polymer solution

文献

- 1) Y. Baba and M. Tshako, *Trends Anal. Chem.*, **11**, 280(1992).
- 2) Y. Baba et al., *Anal. Chem.*, **64**, 1221(1992).
- 3) Y. Baba et al., *J. Liq. Chromatogr.*, submitted.

キャピラリーアフィニティーゲル電気泳動によるDNAの塩基組成および塩基配列の認識

(神戸女子薬大¹、鹿児島大工²) ○馬場嘉信¹、津波古充朝¹、澤智裕²、明石満²

Base- and Sequence-Specific Recognition of DNA by Capillary Affinity Gel Electrophoresis

Yoshinobu Baba¹, Mitsutomo Tsuhako¹, Tomohiro Sawa², and Mitsuru Akashi²
Kobe Women's College of Pharmacy¹ and Faculty of Engineering, Kogoshima University²

We will present the principle of capillary affinity gel electrophoresis in specific base- and sequence-recognition of DNA and the strategy for the development of sequence recognizable gel columns. We developed novel gel columns for capillary affinity gel electrophoresis. Capillary affinity gel electrophoresis was effective for the selective and sensitive base- and sequence-specific recognition of DNA with efficiencies as high as several 10^6 plates per meter and demonstrated the complete resolution of sequence isomers, such as TTTATT, TTTTAT, and TTTTAA, which could not be separated by capillary gel electrophoresis.

はじめに

キャピラリーゲル電気泳動(CGE)^{1,2)}は、DNAの高速・高分解能分離法として最近注目されているが、これは、キャピラリー充填剤としてポリアクリルアミドゲルを用いているために、DNAをサイズによってのみしか識別できない。HPLCの場合と同様に、CGEで用いられる分離カラム(ゲル充填キャピラリー)についても、分離機構の異なる多種類のカラムを開発することができれば、キャピラリー電気泳動の応用範囲を著しく拡大することができる。本研究においては、DNAを識別できる装置を開発するために、DNAの特異的な塩基配列を認識できるCGEのための分離カラムの開発について研究を行なった。今回開発した分離カラムを用いれば、塩基配列および塩基組成を識別できるCGEすなわち、キャピラリーアフィニティーゲル電気泳動(CAGE)システム^{3,4)}を構築することができる。

実験

キャピラリー電気泳動の装置は、アプライドバイオシステムズ社製モデル270Aおよびウォータース社製Quanta 4000を使用した。キャピラリーには、ポリアクリルアミドゲルおよびポリビニルアデニンを含んだポリアクリルアミドゲルを充填して用いた。ゲルの充填は、既に報告した方法¹⁻³⁾で行なった。ポリビニルアデニンの合成は、報告した方法で行なった³⁾。サンプルとしては、合成ポリヌクレオチドを用いた。サンプルは電気的に注入し、泳動は9-20 kV(200-400 V/cm)で行なった。緩衝液は、トリス-ほう酸-EDTAに尿素を適量加えたものを用いた。検出は260 nmで行なった。

結果と考察

まず、ポリビニルアデニンを含むポリアクリルアミドゲルを充填したキャピラリーを用い、DNAオリゴマーの塩基組成および塩基配列の識別を試みた。Fig. 1にオリゴデオキシアデニル酸とオリゴチミジル酸(dT_{15})の混合物の分離の例を示す。図から明らかのように、ポリビニルアデニンと相互作用するオリゴチミジル酸の泳動が遅れ、ポリビニルアデニンと相互作用しないオリゴアデニル酸は、キャピラリーゲル電気泳動の場合と同様な泳動が起こり、分離が達成される。このようにして、キャピラリーアフィニティーゲル電気泳動により、DNAの塩基組成を識別できるシステムを開発することができた。さらに、尿素濃度を変化させることで dT_{15} の泳動時間を適切に調節できることが明らかとなった。

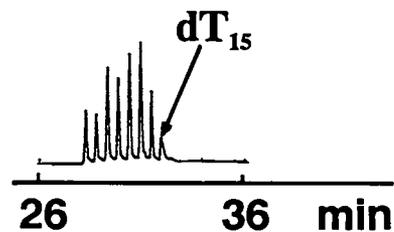


Fig. 1 Separation of dA_{12-18} and dT_{15} by capillary affinity gel electrophoresis

次に、キャピラリー温度が分離に及ぼす影響について検討した。温度を30~60℃と変化させて、分離を試みたが、40℃以上では塩基組成を識別することができなかった。30℃では塩基組成の識別は可能であったが、 dT_{15} とポリビニルアデニンとの相互作用が強すぎるために、バンドが拡がり、分解能が著しく減少した。そこで、キャピラリー温度のグラジエントをかけて塩基の識別を試みた。その結果、Fig. 2に示すような温度グラジエントの時に、効率良くDNAの塩基組成の識別が可能になった。さらに、同じシステムを用いて塩基配列の識別についても可能であることを明らかにした。

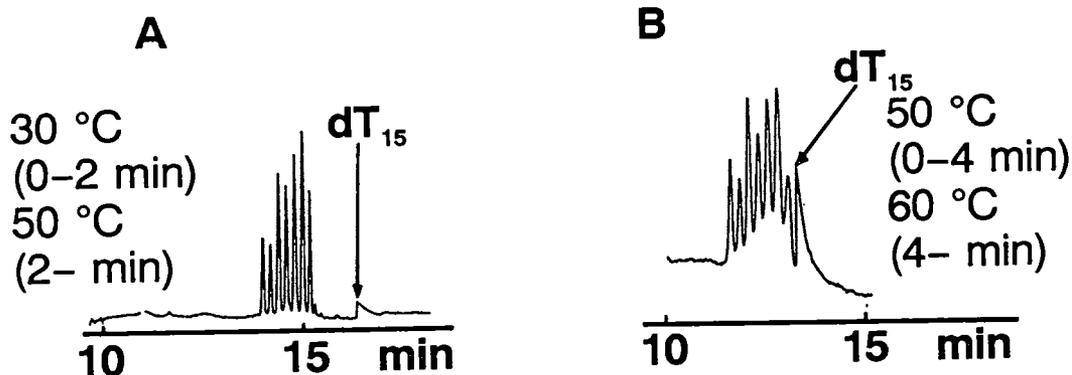


Fig. 2 Base-specific recognition of dT_{15} from a mixture of oligodeoxynucleotides by temperature-programming capillary affinity gel electrophoresis

文献

- 1) Y. Baba and M. Tshako, *Trends Anal. Chem.*, **11**, 280(1992).
- 2) Y. Baba et al., *Anal. Chem.*, **64**, 1221(1992).
- 3) Y. Baba et al., *Anal. Chem.*, **64**, 1920(1992).
- 4) M. Akashi et al., *J. High Resolut. Chromatogr.*, **15**, 625(1992).

35 無担体電気泳動によるDNAの分離

3. 第2次国際微小重力実験計画 (IML-2) 登載FFEUのBBMを用いた電気泳動
○小林英三郎¹⁾、藤倉裕一¹⁾、目黒和良¹⁾、石井直明²⁾

1) 城西大学理学部化学科、2) 東海大学医学部分子生物学2

Separation of DNA by free flow electrophoresis

3. Electrophoresis by using a FFEU/BBM for IML-2

Hidesaburo Kobayashi¹⁾, Yuichi Fujikura¹⁾, Kazuyoshi Meguro¹⁾ and Naoaki Ishii²⁾

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

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

Our objective is the separation of chromosome DNA of nematode by using a FFEU (free flow electrophoresis unit) on IML-2 that will be carried out on space shuttle Columbia, July 1994. We developed a program for 3DEP (three dimensional electropherogram) to analyze separation behavior of DNAs on a BBM (bread board model) of FFEU. This 3DEP may be able to use as a tool to judge migration and flow tendency on free flow electrophoresis system.

1.はじめに

無担体電気泳動装置 (FFEU; free flow electrophoresis unit) を使用し、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の染色体DNAを分離することを目的としている。この研究で検討する染色体DNAの無担体電気泳動の泳動条件に基づき、1994年7月にスペースシャトル・コロンビアで行われる国際微小重力実験室 (IML-2: International Microgravity Laboratory 2) においてFFEUを用いた染色体DNAの電気泳動による分離を行う。今回は宇宙開発事業団が三菱重工株式会社神戸造船所に依頼制作した地上評価用装置 (BBM) を用いDNAサンプルの電気泳動を行った。吸光度信号処理用プログラム「3Dview FFE/JEG」による3Dエレクトロフェログラム (3DEP) を用い、電気泳動による分離傾向についての解析を試みた。

2.実験方法

2-1.紫外線 (UV) 検出器

光源 (254 nm) から電気泳動槽下部に光学ファイバーでガイドして、液層 1 mm のライトパスを構成し、シリコンフォトダイオードアレイで受光する。512チャンネルの信号はA/D変換、対数変換をおこない吸光度データとした後、バイナリーデータとして記憶装置に転送する。

2-2.吸光度信号処理プログラム

今回新たに吸光度信号処理用に「3Dview FFE/JEG」プログラムを開発し、時間軸を導入した3DEPにより、電気泳動緩衝液の流下状態の安定性、サンプル注入状態の安定性、およびサンプルの分離過程を解析を試みた。

3.結果および考察

3-1.サンプル注入の安定性

結果と考察

まず、ポリビニルアデニンを含むポリアクリルアミドゲルを充填したキャピラリーを用い、DNAオリゴマーの塩基組成および塩基配列の識別を試みた。Fig. 1にオリゴデオキシアデニル酸とオリゴチミジル酸(dT_{15})の混合物の分離の例を示す。図から明らかのように、ポリビニルアデニンと相互作用するオリゴチミジル酸の泳動が遅れ、ポリビニルアデニンと相互作用しないオリゴアデニル酸は、キャピラリーゲル電気泳動の場合と同様な泳動が起こり、分離が達成される。このようにして、キャピラリーアフィニティーゲル電気泳動により、DNAの塩基組成を識別できるシステムを開発することができた。さらに、尿素濃度を変化させることで dT_{15} の泳動時間を適切に調節できることが明らかとなった。

次に、キャピラリー温度が分離に及ぼす影響について検討した。温度を30~60℃と変化させて、分離を試みたが、40℃以上では塩基組成を識別することができなかった。30℃では塩基組成の識別は可能であったが、 dT_{15} とポリビニルアデニンとの相互作用が強すぎるために、バンドが拡がり、分解能が著しく減少した。そこで、キャピラリー温度のグラジエントをかけて塩基の識別を試みた。その結果、Fig. 2に示すような温度グラジエントの時に、効率良くDNAの塩基組成の識別が可能になった。さらに、同じシステムを用いて塩基配列の識別についても可能であることを明らかにした。

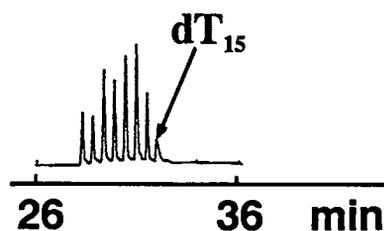


Fig. 1 Separation of dA_{12-18} and dT_{15} by capillary affinity gel electrophoresis

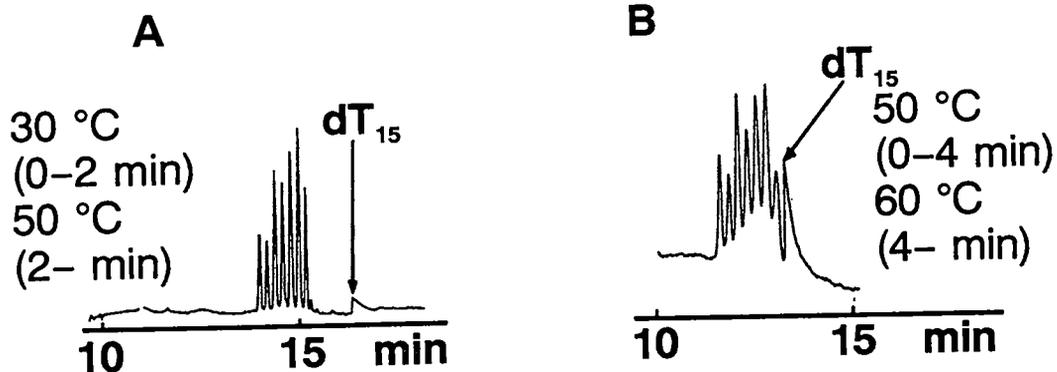


Fig. 2 Base-specific recognition of dT_{15} from a mixture of oligodeoxynucleotides by temperature-programming capillary affinity gel electrophoresis

文献

- 1) Y. Baba and M. Tshako, *Trends Anal. Chem.*, **11**, 280(1992).
- 2) Y. Baba et al., *Anal. Chem.*, **64**, 1221(1992).
- 3) Y. Baba et al., *Anal. Chem.*, **64**, 1920(1992).
- 4) M. Akashi et al., *J. High Resolut. Chromatogr.*, **15**, 625(1992).

(阪大蛋白研) ○小暮栄一、亀山啓一、高木俊夫

CAPILLARY ELECTROPHORETIC BEHAVIOR OF DNA
FRAGMENTS IN PULLULAN SOLUTIONInstitute for Protein Research, Osaka University
Eiichi KOGURE, Keiichi KAMEYAMA and Toshio TAKAGI

Capillary electrophoresis made linear polymer solutions practicable as sieving media. Restriction fragments of λ -phage DNA was electrophoresed in a polyacrylamide-coated fused silica capillary filled with pullulan preparations of various narrow average molecular weights. It was found that only a preparation with a highest molecular weight gave satisfactory resolution. Molecular weight rather than concentration was found to be a deciding factor in the separation.

1. はじめに

分離の媒体として線状ポリマー溶液を使用できることが、キャピラリー電気泳動の主要な特徴の一つである。既に、線状ポリアクリルアミド、アガロースおよびセルロース誘導体などの溶液を用いた分離例が幾つも報告されている。私達は、単に高分離能の追求に止まらず、この種の媒体の“ふるい効果”の実態を明らかにすることが重要であると考えた。今回は、DNAの制限酵素フラグメントの分離の媒体として、非常に狭い分子量分布を持つ多糖、プルラン、の溶液を用い、キャピラリー電気泳動による分離能がプルランの分子量によってどのような影響を受けるかを検討した。

2. 実験

大塚電子(株)製のキャピラリー電気泳動装置、CAPI-3000を使用した。用いた溶融石英キャピラリーは、内径100 μ m、全長約50cm、有効長約38cmのものであった。内壁をポリアクリルアミドで被覆することにより、電気浸透流を抑止した。以下の組成の緩衝液、pH 8.6を使用した: 89mM Tris-89mM ホウ酸-2mM EDTA-7M 尿素。これに所定のプルランを溶解し、電気泳動液および電極槽液として用いた。前者は吸引によってキャピラリー内に導入した。電場強度は97V/cmを常用した。

λ -ファージDNAに制限酵素、*Eco*RI 1、を働かせて得られた12種のフラグメントの混合物(宝酒造(株))を使用した。試料は電気泳動によりキャピラリー内に導入された。この際の電場強度は測定時と同じで、所要時間は5~7秒であった。

プルランは林原生化学研究所(株)で、GPCにおける分子量標準として分画精製されたものである。これらは、発表者の一人(T.T.)が分子量標準品としての評価研究グループの一員であった際に試供されたものであった。それらの中から主として、P-2000(重量平均分子量2,500K)、P-800(同800K)、そしてP-400(同400K)の三標品を使用した。

3. 結果および考察

各プルラン標品の0.4%(W/V)溶液を媒体として λ -ファージDNA制限酵素フラグメントのキャピラリー電気泳動を行った。良好な分離は、最高の分子量を持つ標品P-2000 (Fig. 1a) についてのみ認められ、P-800 (Fig. 1b) とP-400では高分子量のDNAフラグメントは分離しなかった。プルランの溶液は高分子量のものでも粘性は高くなく、吸引によるキャピラリー内への導入に支障はなかった。

P-800標品の濃度を0.6あるいは0.8%に高めて試みたがフラグメントの分離状況は改善されなかった。他方、P-2000標品においては濃度を0.2%に下げても高い分離能が維持され、0.1%に下げてもようやく分離能の低下が認められた。用いたDNAフラグメントの分離には、媒体のプルランの分子量が濃度に比して遙かに重要な因子であることが明らかになった。

プルランを含まぬ緩衝液中においては、全てのDNAフラグメントが分離することなく泳動したことが観察された。プルラン (P-2000) の濃度に対してDNAフラグメントの電気泳動移動度をプロットした、いわゆるファークソンプロットを行うと、各フラグメントの単純な外挿はプルランを上記の電気泳動移動度に収束しない。これは、この場合の泳動挙動がオグストンモデルでは説明できないことを示している。

DNAフラグメントの塩基対数に対して、P-2000標品のそれぞれの濃度におけるDNAフラグメントの電気泳動移動度のプロットを行った。そこで長大なフラグメントに注目すると、何れの濃度においてもプロットは下に凸であった。これはDNAフラグメントが電場のもとで配向して泳動していることを示唆している。このような挙動は、いわゆるレプテーションモデルあるいはバイアスレプテーションモデルから予想されるものと見掛け上は類似している。P-2000について動的光散乱測定強度によって決定された溶液中での慣性自乗半径は、約75nmである (T. Kato, T. Katsuki, and A. Takahashi, *Macromolecules*, 17, 1726-1730 (1984))。この値からは、本実験条件下ではプルランの鎖が分子間で絡み合って網目を形成するのは0.9%以上と推定される。従来考えられていたような、網目をくぐり抜けながらDNA断片が泳動しながら、ふるい分けられるというモデルが成立しないようである。より詳細な検討を進めている。

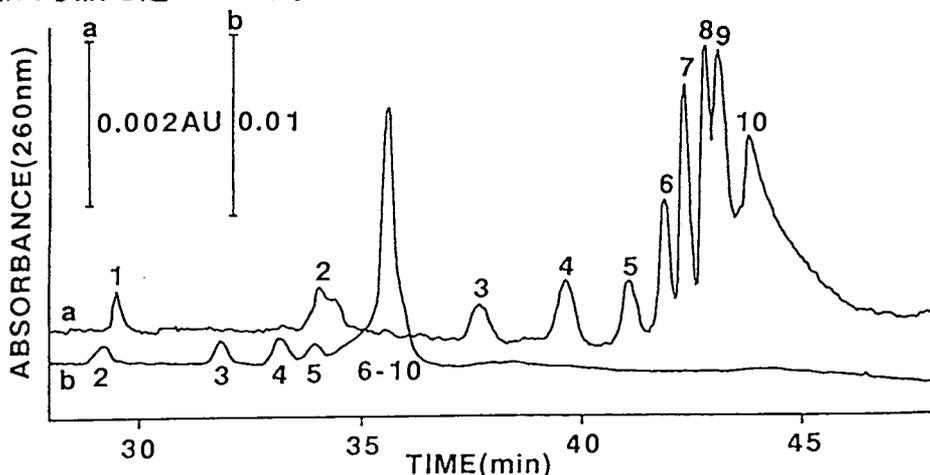


Fig. 1 λ -ファージのEcoRIフラグメントの電気泳動パターン。a、bはそれぞれP-2000、およびP-800の0.4%(W/V)溶液を用いて得られた。ピークの上下の番号は該当する各フラグメントの塩基対数を表す：1)421bps、2)925、3)1489、4)1882、5)2690、6)3472、7)4254、8)6223、9)7743、10)19329。

35 無担体電気泳動によるDNAの分離

3. 第2次国際微小重力実験計画 (IML-2) 登載FFEUのBBMを用いた電気泳動

○小林英三郎¹⁾、藤倉裕一¹⁾、目黒和良¹⁾、石井直明²⁾

1) 城西大学理学部化学科、2) 東海大学医学部分子生物学2

Separation of DNA by free flow electrophoresis

3. Electrophoresis by using a FFEU/BBM for IML-2

Hidesaburo Kobayashi¹⁾, Yuichi Fujikura¹⁾, Kazuyoshi Meguro¹⁾ and Naoaki Ishii²⁾

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

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

Our objective is the separation of chromosome DNA of nematode by using a FFEU (free flow electrophoresis unit) on IML-2 that will be carried out on space shuttle Columbia, July 1994. We developed a program for 3DEP (three dimensional electropherogram) to analyze separation behavior of DNAs on a BBM (bread board model) of FFEU. This 3DEP may be able to use as a tool to judge migration and flow tendency on free flow electrophoresis system.

1. はじめに

無担体電気泳動装置 (FFEU; free flow electrophoresis unit) を使用し、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の染色体DNAを分離することを目的としている。この研究で検討する染色体DNAの無担体電気泳動の泳動条件に基づき、1994年7月にスペースシャトル・コロンビアで行われる国際微小重力実験室 (IML-2: International Microgravity Laboratory 2) においてFFEUを用いた染色体DNAの電気泳動による分離を行う。今回は宇宙開発事業団が三菱重工株式会社神戸造船所に依頼制作した地上評価用装置 (BBM) を用いDNAサンプルの電気泳動を行った。吸光度信号処理プログラム「3Dview FFE/JEG」による3Dエレクトロフェログラム (3DEP) を用い、電気泳動による分離傾向についての解析を試みた。

2. 実験方法

2-1. 紫外線 (UV) 検出器

光源 (254 nm) から電気泳動槽下部に光学ファイバーでガイドして、液層 1 mm のライトパスを構成し、シリコンフォトダイオードアレイで受光する。512 チャンネルの信号はA/D変換、対数変換をおこない吸光度データとした後、バイナリーデータとして記憶装置に転送する。

2-2. 吸光度信号処理プログラム

今回新たに吸光度信号処理用に「3Dview FFE/JEG」プログラムを開発し、時間軸を導入した3DEPにより、電気泳動緩衝液の流下状態の安定性、サンプル注入状態の安定性、およびサンプルの分離過程を解析を試みた。

3. 結果および考察

3-1. サンプル注入の安定性

サンプル注入口は泳動槽の中央のチャンネル番号256である。無加電状態でサンプルを注入したもののピーク位置は204チャンネルであり、加電実験後再び無加電状態で測定したものは217チャンネルであった。中央からのずれはサンプルインジェクションポートの微細な構造上の問題を反映していると思われる。

3-2. DNAおよびNADPの電気泳動

無加電状態でサンプルを注入し定常流となった時加電すると電気泳動開始時における泳動挙動を知ることが出来る。また同様に加電状態から無加電状態に戻した時には電気泳動槽内のサンプルの定常流下状態への戻りを観測することが出来る。

Fig.1は2110秒間のUV信号の3DEPを示した。メインピークは加電直後に一定の速度で泳動される。一方、無加電状態に戻した時は加電初期の挙動とは大きく異なり、メインピークが中央に戻ってから吸収が一定になるまで140秒経過し、またサンプル注入停止後UV吸収が認められなくなるまで650秒を要した。これらの定常状態への移行時間がかかるのはサンプルおよび電気泳動緩衝液と泳動槽表面の間に干渉作用が起きていることを示す。

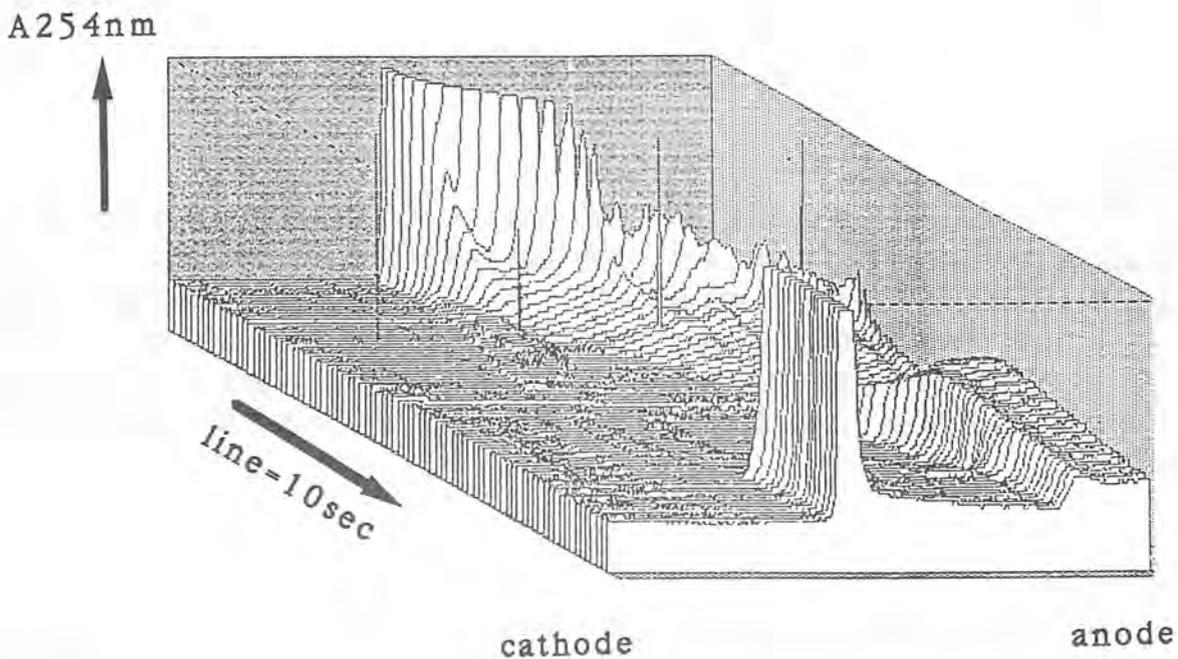


Fig.1 3DEP of DNA and NADP on BBM.

Sample contains 0.01% of salmon DNA and 1mM NADP.

4.おわりに

吸光度信号処理用プログラム「3Dview FFE/JEG」による3DEPを用い、電気泳動による分離傾向についての解析を試みた。しかしながら本装置を使用する機会は僅か2回であり、電気泳動およびサンプルの諸条件を検討しBBMによる電気泳動の最適条件を求めることは出来なかった。今後BBMを再度使用する環境が整えば今回開発した3Dエレクトロフェログラムを用い迅速な解析と電気泳動諸条件を決定することが出来ると考えている。

Effect of additives for the analysis of aminoacid under low pH condition

MASUMI ONO ,SATOSI NITTA ,HIDEO SASAGAWA
OTSUKA ELECTRONICS CO.,LTD ,

With free zone capillary electrophoresis, it is difficult to analyze plus charged sample and minus charged sample simultaneously at low pH around 2.5 as the sample migrates by electrophoresis due to small electroosmosis flow at such pH condition. Our purpose for this time experiment was to examine the conditions which enable simultaneous analyses of a sample with plus charge and minus charge at low pH condition.

1. はじめに

フリーゾーンキャピラリー電気泳動 (FZE/CZE) を用いてアミノ酸類の分離を行う場合、サンプル間の電荷の差を生じさせるために、泳動溶液の pH は 2~3 あるいは 8~10 が望ましいと考えられている。今回、我々は pH 2.5~3 の泳動溶液について検討した。ところが、pH 2.5 付近では電気浸透流が小さくなり、正電荷及び負電荷のサンプルを同時の分析することは困難であった。今実験では臨界ミセル濃度以下のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加し、正電荷のサンプルと負電荷のサンプルとを同一泳動条件での検出を試みた。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子社製の CAPI-3000 を用いた。キャピラリーは内径 75 μm 、全長 500 mm、有効長 375 mm のものを用いた。試料は落差法を用い落差 15 mm で、15 秒注入し、電気泳動は印加電圧 15 kV (300 v/cm) で行った。キャピラリー周辺部の温度制御は 25 $^{\circ}\text{C}$ で行った。検出はホトダイオードアレイを用い、波長範囲 200~300 nm で行った。

試料はグルシン、アラニン、メチオニン、グルタミン酸、メチオニンスルホン、ヒドロキシメチオニンの各濃度を 1 mg/ml に蒸留水で希釈し使用した。泳動溶液には 30 mM NaH_2PO_4 、pH 2.5~3 を用いた。また、添加剤として SDS を用いて 1~10 mM の範囲で検討した。

3. 結果と考察

pH 2.5の泳動溶液では、試料中のグリシン、アラニン、メチオニン、グルタミン酸、メチオニンスルホンは正電荷、ヒドロキシメチオニンは負電荷である。また、電気浸透流がほとんど存在しないので、負電荷であるヒドロキシメチオニンを正電荷である他のサンプルと同一泳動条件で測定することは不可能であった。泳動溶液のpHを2.5から3に上げると、正電荷のサンプルについては分離が向上した。しかし、ヒドロキシメチオニンを検出することはできなかった。(Fig-1) pH 2.5の泳動緩衝液濃度を30mMにし、添加剤としてSDSを検討した結果、正電荷のサンプルと同時に負電荷のヒドロキシメチオニンを検出することができた。(Fig-2)

この結果、キャピラリー内表面の電荷が小さくなり電気浸透流がなくなる、溶融シリカの等電点付近の泳動溶液中に臨界ミセル濃度以下のSDSを添加することで、電荷のないキャピラリー内表面とSDSの作用により、電気浸透流が発生し、正電荷のサンプルと負電荷のサンプルを同一泳動条件で測定することが可能であると考る。

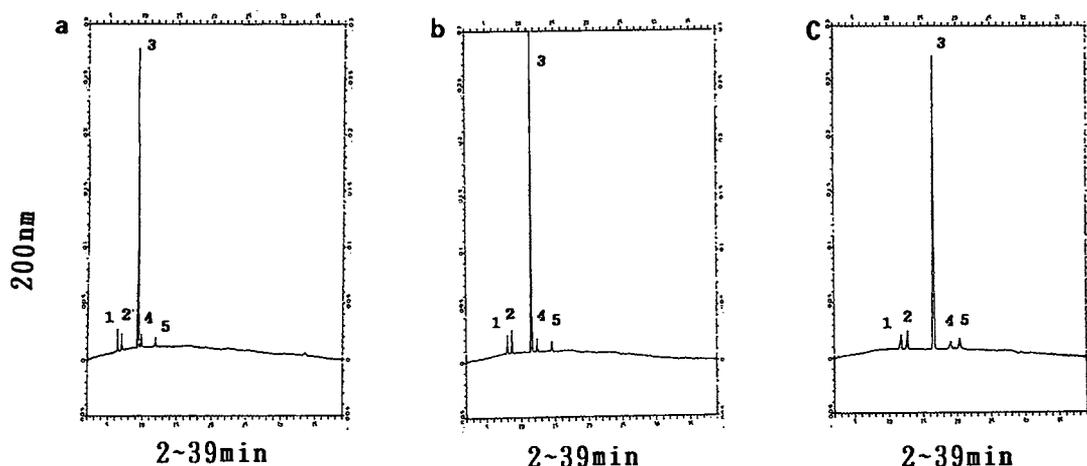


Fig-1 アミノ酸分析における泳動溶液のpH効果

30mM NaH_2PO_4 (a;pH2.5 b;pH2.7 C;pH3), 15kV
 サンプル; 1、グリシン 2、アラニン 3、メチオニン 4、グルタミン酸 5、メチオニンスルホン

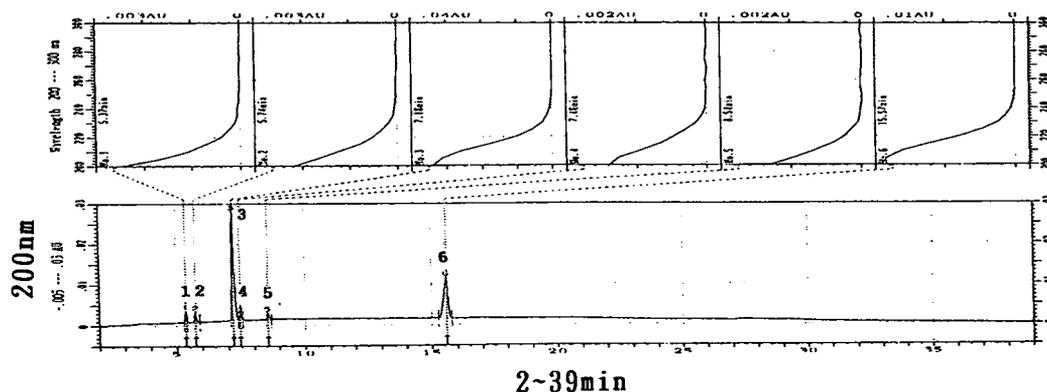


Fig-2 低pH条件のアミノ酸分離におけるSDSの効果

30mM NaH_2PO_4 (pH2.5) 2mM SDS, 15kV
 サンプル; 1、グリシン 2、アラニン 3、メチオニン 4、グルタミン酸 5、メチオニンスルホン 6、ヒドロキシメチオニン

キャピラリー電気泳動によるペプチド、アミノ酸分離での添加剤の検討

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
キャピラリー電気泳動部

○丸山敏彦 町田祥子

Buffer Additives for Capillary Electrophoresis of Similar Peptide and Amino acids Toshihiko Maruyama Sachiko machida

Electrolyte composition can significantly effect peptide separations by capillary electrophoresis. In optimizing a peptide separation, changes in buffer-ion, ionic-strength, viscosity, or organic modifier should be investigated. Addition of organic modifier, for instance SDS, improves of very similar peptides, and several study were reported. This report is influence of alkylsulfonate for separation of small peptides and amino acids.

■はじめに

キャピラリー電気泳動でのペプチド分離ではバッファーの種類、イオン強度、粘度、pHを変化させることで大きな効果が得られる。又、ストークス径と荷電状態の差が僅かしかない場合には界面活性剤の添加が効果的であり、SDS等の使用が報告されている。本報告ではペプチドならびにアミノ酸分析でのアルキルスルホン酸の効果を報告する。

■実験

◇Sample : 1) 10アミノ酸残基ペプチド Mixture 各0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

P1: NH_2 - Arg - Gly - Ala - Gly - Gly - Lue - Gly - Leu - Gly - Lys - Amide
P2: Acetyl - Arg - Gly - Gly - Gly - Gly - Lue - Gly - Leu - Gly - Lys - Amide
P3: Acetyl - Arg - Gly - Ala - Gly - Gly - Lue - Gly - Leu - Gly - Lys - Amide
P4: Acetyl - Arg - Gly - Val - Gly - Gly - Lue - Gly - Leu - Gly - Lys - Amide
P5: Acetyl - Arg - Gly - Val - Val - Gly - Lue - Gly - Leu - Gly - Lys - Amide

2) アミノ酸 Mixture 各0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Gly Ala Val Leu Ile

分析条件

◇装置 : クオンタ 4000 CEシステム

◇Buffer : 25mM-Sodium Phosphate with Modifier pH2.5

◇キャピラリー : 75 μm \times 60cm

◇Modifier : 50mM-Alkylsulfonate and 500mM-Zl Methyl

1) Alkylsulfonate 無添加 ϕ

◇検出 : UV185nm

2) Methane sulfonate C1

◇電圧 : 15kV

3) Propane C3

4) Pentane C5

5) Hexane C6

6) Heptane C7

7) Octane C8

■結果と考察

バッファーはpH 2.5の25mM Phosphateとした。このpH条件下でArgと、Lys残基の側鎖が(+)チャージを持ち、P1は(+3)のチャージを持ち、他のペプチドは(+2)の状態となる。再現性を高めジュール熱の発生を抑えるために、Z1-メチル試薬を添加した。この条件下でアルキルスルホン酸の種類と濃度を変えた。アルキルスルホン酸を添加しない場合には、GlyとAla残基のみの差しか現われない。P2とP3の間に移動度の差がみられない。またアミノ酸もこの条件下では、ValとIleが未分離となる。このバッファーに添加剤としてアルキルスルホン酸を加えるとアルキル鎖長の長いものほどペプチドにおいてもアミノ酸においても分離度が増している。またアルキルスルホン酸の添加濃度については今回分析をおこなった100mMまでの範囲で高濃度になるにしたがい、分離度が増している。この実験に使用したような、中性アミノ酸残基のみが異なるペプチドの分離に使用するアルキルスルホン酸には、ある程度の疎水構造と濃度が必要であり、アミノ酸分離においても同等の機構による効果が得られると考えられる。

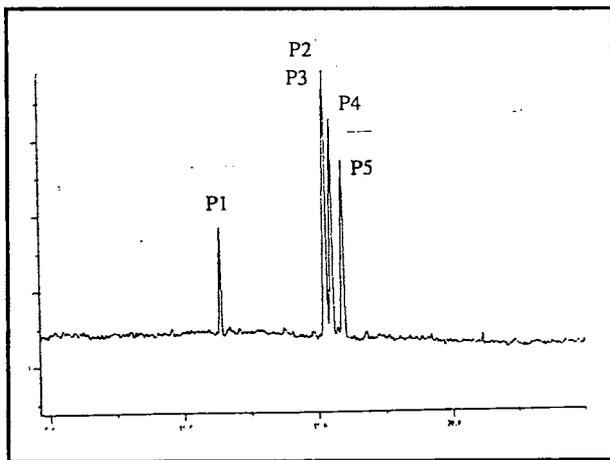


Fig 1. アルキルスルホン酸なし

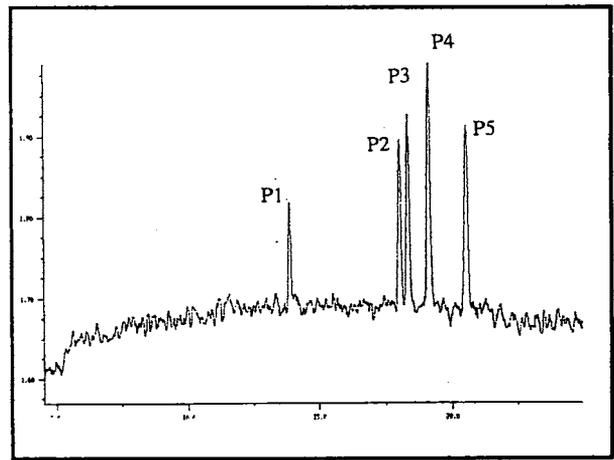


Fig 2. アルキルスルホン酸添加

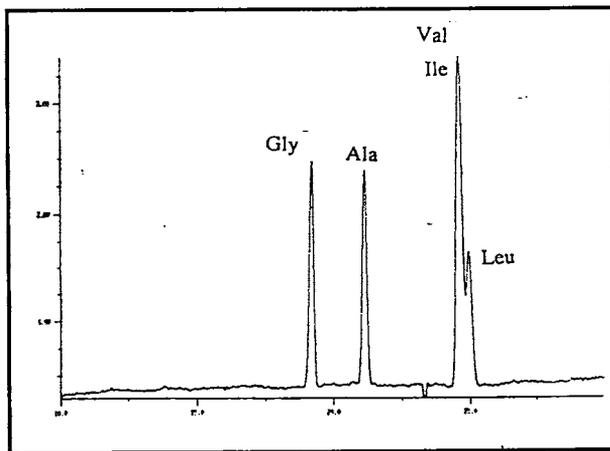


Fig 3. アルキルスルホン酸なし

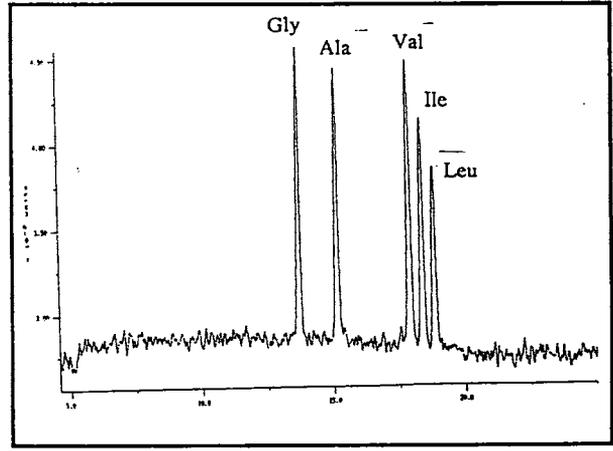


Fig 4. アルキルスルホン酸添加

キャピラリー電気泳動を用いた インスリンの分析

(大塚電子)

○新田哲士、笹川秀男

(国立衛生試験所 大阪支所) 四方田千佳子、岡田敏史

Analysis of insulin by capillary electrophoresis

SATOSHI NITTA ,HIDEO SASAGAWA ,CHIKAKO YOMOTA ,SATOSHI OKADA
OTSUKA ELECTRONICS CO.,LTD ,
National Institute of hygienic Sciences,Osaka

Insulin is an unstable polypeptide, with an amino radical liberated at 21 position of the A-chain and at 3 position of the B-chain, and thus, 3 types of des-amido body are generated. This sample has been analyzed by disk electrophoresis and HPLC up to now with insufficient result of separation. For this reason, we made an examination on the analysis method for insulin and its des-amide body by means of capillary electrophoresis measurement.

1. はじめに

ヒトインスリンは不安定なポリペプチドであり、可溶化させる溶液として塩酸溶液を使用するが容易にデスアミド体インスリンが生じる。デスアミド体はインスリンのA鎖の21位とB鎖の3位に位置するアスパラギン中のアミノ基が遊離することによると言われている。インスリン中のデスアミド体の比率を正確かつ短時間に分析することは品質管理の面から重要なことである。現在までディスク電気泳動あるいはHPLCによりインスリン中のデスアミド体の比率が分析されてきたが、繁雑であったり、分離不十分であり、インスリン中のデスアミド体を短時間かつ高分離能で分析することが望まれている。そこでキャピラリー電気泳動によるインスリンとそのデスアミド体の最良の分析条件について検討したので報告する。

2. 実験

キャピラリー電気泳動の装置には、大塚電子社製C A P I - 3 0 0 0を用いた。キャピラリーは内径75 μ m、全長500mm、有効長375mmのものを用いた。サンプルは落差法で落差10mmで、20sec注入し、印加電圧は10kV(200V/cm)で行った。キャピラリー部の温度制御は25 $^{\circ}$ Cで行った。検出は、ホトダイオードアレイで200~300nmの範囲で行った。

サンプルの調製は1mg/mlの濃度で、0.01N HClに希釈した後、48時間、40 $^{\circ}$ Cで放置したものを使用した。泳動用緩衝液には10~100mM ほう酸 pH9を用いた。また、添加剤としてメタノールを用いて10~30%の範囲で検討した。

3. 結果と考察

インスリンの等電点はpI 5.5であり、pH 9の緩衝溶液中では負電荷を持ち、電気浸透流の方向と逆方向に移動する。インスリンとデスアミド体インスリンとの分離条件を検討した結果、pH 9のホウ酸においては塩濃度を10から100 mMに増加させると電気浸透流が押さえられ、インスリンとそのデスアミド体の分離能が向上した。(Fig.1, Fig-4) ホウ酸濃度を50 mMとし、添加剤としてメタノールを検討した結果、電気浸透流がちいさくなり、インスリンの実効移動度も小さくなった。その結果、インスリンとデスアミド体の分離能が向上した。(Fig-2、Fig-4)

また、HPLCでデスアミド体のインスリンを分取した試料をHPCEで分析したデータとデスアミド化インシュリンのデータを比較し、同定をおこなった。(Fig-3) その結果、インスリンのピークの後方にデスアミド体が位置し、デスアミド体がインスリンよりも負電荷が大きいことが推測される。これはインスリン中のAsnのアミノ基が遊離し、カルボニル基に変化することにより、デスアミド体が生じると考えられていることと一致する。

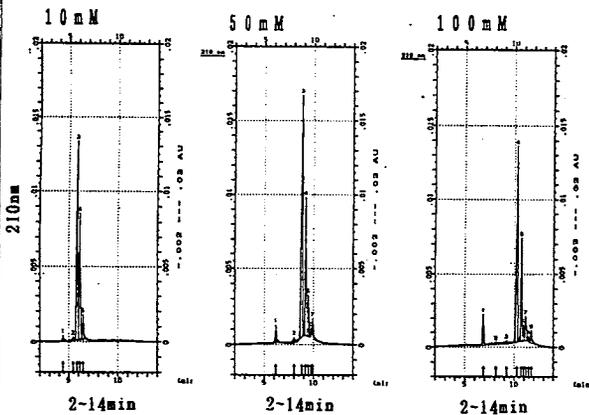


Fig-1 インスリンとデスアミド体の分離における緩衝溶液の濃度効果
10~100mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH9), 10kV

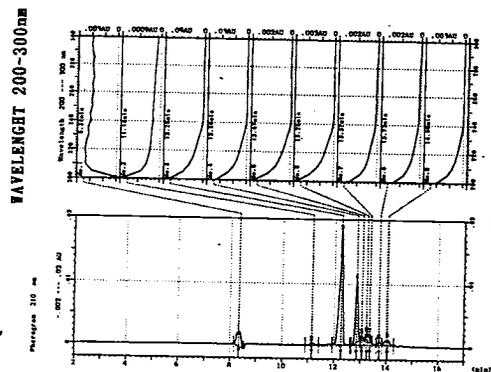


Fig-2 インスリンとデスアミド体の分離における緩衝溶液の濃度効果
50mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH9), 10kV
10% methanol

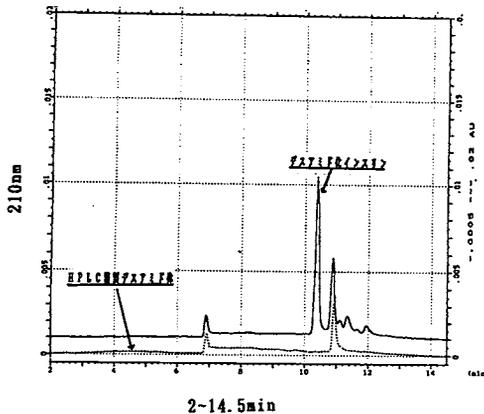


Fig-3 デスアミド化インスリンとデスアミド体の比較
100mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH9), 10kV

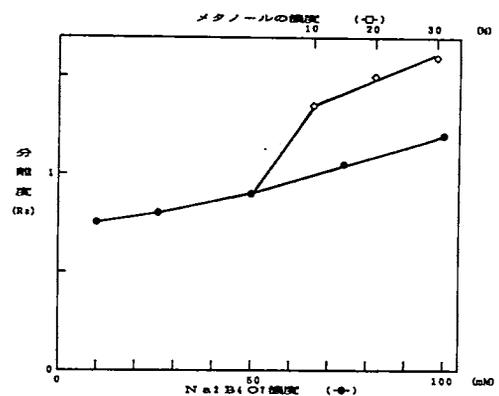


Fig-4 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 濃度とメタノール濃度の効果

CZEによる酸化還元補酵素PQQ のオキサゾール付加体の分離分析

(岐阜薬科大学) ○江坂幸宏、山口恭生、加納健司

SEPARATION OF OXAZOLE DERIVATIVES OF REDOX COENZYME PQQ BY CZE

Yukihiro ESAKA, Yasuo YAMAGUCHI and Kenji KANO
Gifu Pharmaceutical University

Condensate products (oxazole derivatives) between coenzyme pyrroloquinoline quinone (PQQ) and several α -amino acids were separated by capillary zone electrophoresis (CZE). Addition of acetonitrile to electrolyte is essential for reproducible and complete separation, which appears to prevent oxazole derivatives from adsorbing on capillary wall. A good bit of new information concerning the condensation reaction was obtained. PQQ spiked bovine serum was also analyzed. Type 1 oxazole derivative was detected predominantly. This result suggests that most of PQQ in mammalian fluid exists, if any, as PQQ derivatives, most likely as Type 1 oxazole derivative.

〔緒言〕 菌類から発見された酸化還元補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) の哺乳類体中における存在の有無について議論が盛んである (1)。我々は、現在HPLC分離にPQQの触媒機能を利用した高感度選択的検出法を結合し、生体関連試料中の遊離PQQの検索を行っている。その結果、多くの遊離PQQは生体内物質と反応した誘導体となって触媒機能を失っている可能性が高いことが示唆された。したがって、状態分析という立場からのPQQの検索も重要になってきた。PQQはアミノ酸と容易に反応し、オキサゾール付加体を形成する (2)。そこで本研究ではオキサゾール付加体を生体内でのPQQの存在形態の一つと予想し、そのアミノ酸種の違いから多種生成されると思われるオキサゾール付加体を一斉分離することを目的とした。同一電荷を持ち、部分構造だけに差異を有するオキサゾール付加体の分離にはCZEが適当であると考えた。諸条件の検討によりCZEによって各種オキサゾール付加体の一斉分離に成功し、また、各種アミノ酸とPQQの反応についても新たな知見が得られた。さらに、PQQ添加血清試料を分析し、生体中でのPQQの存在形態について考察した。

〔実験〕 試料：オキサゾール付加体はPQQ水溶液(0.01 M)とアミノ酸水溶液 (0.004 g/l) を1:9の比率で混合して生成させたものを使った。PQQ添加血清試料は、PQQを牛血清に添加し、これを10倍量の生理食塩水で透析し、pH調整の後イソブチルアルコールで抽出したものである。CZE: 電解液は20 mM Na₂HPO₄ aq.: アセトニトリル (ACN) = 5:1を用いた。キャピラリーは内径 50 μ m、全長50 cm (有効長30 cm) のものを用いた。検出にはUVIDEC-100-III(Jasco) を、高圧電源はHCZE-30PNO (松定プレジジョンデバイセズ) を使用した。

〔結果と考察〕 Figure 1 に、オキサゾール付加体の電気泳動図を示す。オキサゾール付加体の分離は電解液にアセトニトリルを添加することで達成された。塩水溶液のみの場合キャピラリーの内壁に試料の吸着と思われる現象が見られ、再現性が著しく悪く、時には検出すらできなかった。吸着を防ぐため、有機溶媒を電解液に添加したが、アセトニトリルが最も良好であった。検出限界はオキサゾール1型で50 fmol ($\lambda=420$ nm, S/N = 3, 10 μ mol/l, 5 nl inject) 程度であった。ほかの有機溶媒 (メタノール、ジオキサ

サン) は電気浸透流を著しく弱め、泳動時間の再現性が低下した。加えて、分析時間を長くすることにもつながった。

各アミノ酸とPQQの反応生成物について Table 1 にまとめる。反応生成物の決定は泳動時間と紫外可視吸収スペクトルから行った。Duine らがHPLCを用いて行った結果(2)に対する今回の知見は次の通りである。[i] Ser はオキサゾール1型を形成すると報告されているが我々の結果は2型を形成することを示している。[ii] Ala は1型、2型を5:8の割合で形成するとされているが、我々の結果では、2型がほとんどであった。[iii] 2型を生成するアミノ酸は1型も形成するがその生成率は非常に低かった。[iv] Met 及び塩基性アミノ酸(Lys, Arg, His)のPQQとの反応生成物は多様であった。塩基性アミノ酸についてはそのR基に含まれるアミノ基がPQQに求核攻撃した結果生じた化合物であることが考えられる。[v] Lys はオキサゾール体をつくらないと報告されているが、2型が極低収率で生成していることが観測された。

PQQ添加血清試料は、オキサゾール体を含んでいると思われる特徴的な黄色を呈していた。この試料についてCZEを行うとオキサゾール1型の溶出位置に主ピークをもつ電気泳動図が得られた。更に、この試料にオキサゾール1型を添加して、CZEを行うと主ピークが増大した。紫外可視スペクトルからも主ピーク成分がオキサゾール1型であることが支持された。また、オキサゾール2型の泳動位置付近にごく小さなサブピーク群が見られ、2型も生成している可能性が高い。このほか遊離PQQ自体も少量観測されている。これらのことはPQQの酸化体が血清中に存在している場合かなりの割合がオキサゾール1型に速やかに誘導化され、1型として存在することを示唆している。

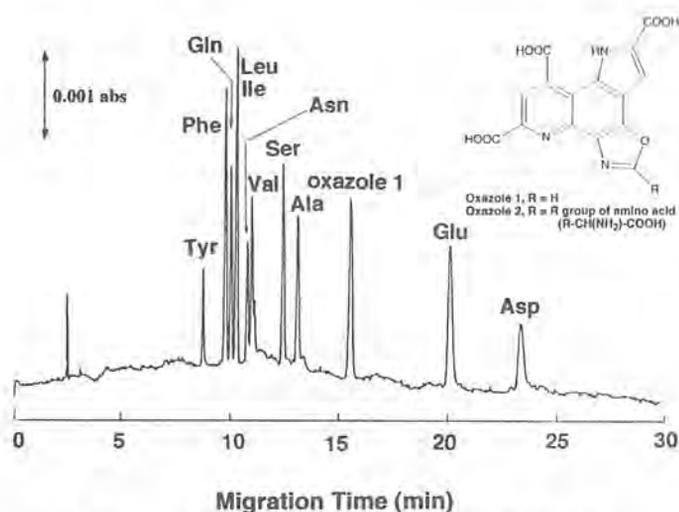


Fig. 1 CZE Separation of Oxazole Derivatives

capillary: 50 cm of 50 μ m i.d. fused silica, 30 cm separation distance
buffer: 20 mM Na_2HPO_4 : ACN = 5 : 1
detection: 420 nm
injection: 20 cm, 7sec (hydrodynamic injection)
separation voltage: 18 kV
sample, PQQ aq.(20 mM) : Amino Acids aq.(ca. 0.03% for each AAs:
Gly, Trp, Thr, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Asn, Gln, Ser, Tyr, Asp, Glu)
= 1 : 9

Table 1 Different types of Oxazoles

Amino acid	Migration time (min)	Reaction type
Gly	15.46	1
Trp	15.46	1
Thr	15.46	1
Ala	13.02	2
Val	10.91	2
Leu	10.23	2
Ile	10.23	2
Phe	9.71	2
Asn	10.72	2
Gln	9.97	2
Ser	12.35	2
Tyr	8.68	2
Asp	23.40	2
Glu	20.01	2
Pro	—	3
Hyp	—	3
Cys	—	3
Cys-Cys	—	3
Met	—	4
Lys	—	4
Arg	—	4
His	—	4

Type 1 and type 2 yield oxazole 1 and 2, respectively.

Type 3 yields nothing.

Type 4 yields a little of oxazole 2 and something other than oxazole 1 and 2.

1. a) S.M.James et al. *Science*, **248**, 981(1990). b) N.Ito et al. *Nature*, **350**,87 (1991). c) W.S.McIntire et al. *Science*, **252**, 817 (1991). d) P.M.Gallop et al. Abstract: 2nd International Symposium on PQQ and Quinoproteins, 1991, Nov.(Yamaguchi, Japan) p.40,1991. e) H. Nishigori et al., p39 of ref d).
2. M.A.G. Van Kleef et al., *Eur.J.Biochem.*, **183**, 41(1989).

キャピラリー電気泳動法によるタンパク質の種々の分析方法

(大塚電子) ○笹 一志, 笹川秀男

SEVERAL ANALYSIS METHODS OF PROTEINS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS
TECHNICAL BUSINESS SECTION, OTSUKA ELECTRONICS CO.
KATSUSHI SASA AND HIDEO SASAGAWA

Separation of basic proteins by capillary electrophoresis has been explored with various analysis methods (salt additive effect, pH effect, amphoteric electrolyte additive effect, surfactant additive effect).

In this time analysis, Lysozyme (basic protein, pI=10-11) was experiment in the dilute phosphate buffer solution. The phosphate buffer of rather low concentration (pH7.0; ionic strength 0.014 and contained SDS) was used in order to keep the temperature rise by Joule's heat. The electropherogram of lysozyme obtained a sharpening single peak and the theoretical plate number was more high resolution than other analysis methods.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動によるタンパク質の分離において、塩基性タンパク質のキャピラリーへの吸着が問題にされている。この対処方法として、比較的高濃度の緩衝溶液を用いてpHのコントロールや両性化合物の添加等がおこなわれている。^{1), 2)}しかし、高濃度の緩衝溶液を使用するためジュール熱によるキャピラリー内部の温度上昇がおこる。(1ワットで約10℃上昇)。今回、塩基性タンパク質であるリゾチームを用いて温度上昇を抑えるためイオン強度の低い緩衝溶液による分析方法の検討をおこなった。

2. 実験

卵白リゾチームはSigma社の、牛血清アルブミン(BSA)はMiles社のものを用いた。低イオン強度の緩衝溶液は、pH7.0のリン酸緩衝溶液($\mu=0.014$)を用いた。分離用キャピラリーには、内径75 μm 、全長50cm(有効長37.5cm)のフューズドシリカ管を用い、キャピラリー電気泳動測定は大塚電子のCAPI-3000でおこなった。

3. 結果および考察

Fig. 1にみられるように100mM リン酸緩衝溶液を用いたフリーゾーンキャピラリー電気泳動によるリゾチーム (pI=11) のエレクトロフェログラムはブロードになり、キャピラリー内部の温度上昇は約5℃である。しかし、低濃度の緩衝溶液では、同じ濃度のリゾチームを測定してもキャピラリーへの吸着によりピークは検出されなかった。これは、少しではあるがイオン強度を高くすることにより吸着を抑える効果がみられる。

Fig. 2にSDS処理をした(二次構造を壊さない程度)リゾチームの低イオン強度の緩衝溶液におけるエレクトロフェログラムを示す。リゾチームのピークは、約0.2分間以内で検出される鋭い単一ピークとなり、キャピラリー内部の温度上昇もほとんどみられなかった。

また、どの程度検出感度が向上されるか 1×10^{-5} MのBSA (pI=4.8)を用いてSDS処理の有無による感度比較をおこなった。SDS処理をしたBSAのエレクトロフェログラムは、リゾチームと同様に処理をしていないそれより鋭い単一ピークが得られた。それぞれのpeak heightで比較すると、SDS処理をした方がしないのに対し約4倍の感度が得られた。

今回、SDS処理をし低イオン強度の緩衝溶液によるタンパク質の分析方法は、高分解能でジュール熱による影響を受けないことがわかった。

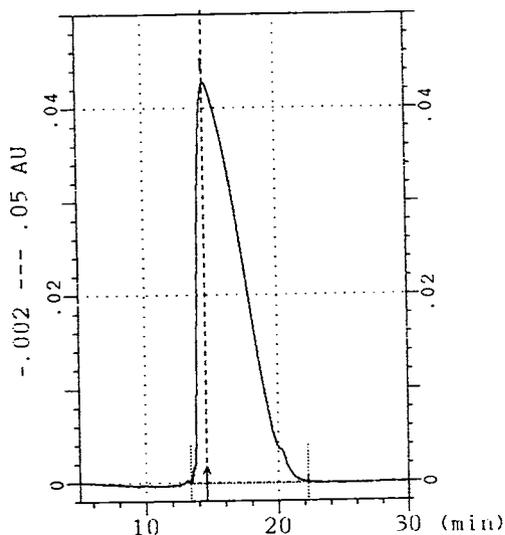


Fig.1. SDS処理をしていないリゾチームのフェログラム, 100mM リン酸緩衝溶液 (pH7.0), 印可電圧/電流値: 7kV/73 μ A

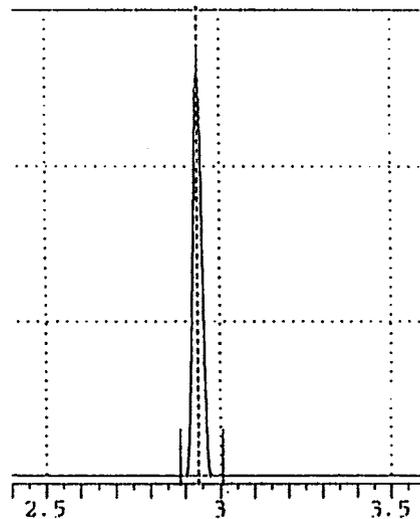


Fig.2. SDS処理をしたリゾチームのフェログラム, 低イオン強度のリン酸緩衝溶液 (7.0), 印可電圧/電流値: 15kV/12 μ A

4. 参考文献

- 1) Mingde, Z., Roberto, R., Dave H., and Tim W., J.Chromatogr., 516 (1990) 123-131.
- 2) Ernst, K., and Karin, S., J. Chromatogr., 545 (1991) 397-402.

(近畿大学薬、ウプサラ大生物医学セ) ○久保兼信・Stellan Hjerten

CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS OF PROTEINS:

A NEW TYPE COATING AND ITS ASSESSMENT

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University and
Department of Biochemistry, University of Uppsala,
Biomedical Center
Kanenobu KUBO and Stellan HJERTEN

We propose a method to coat fused silica tube with hydrophilic polymer, such as methylcellulose and dextran in order to eliminate electroendosmosis and adsorption of solutes onto the tube wall. The coating was not split off upon exposure to a 5% solution of SDS at pH around 12 during a period of sixteen days or to 0.5 M HCl during 10 days. The high stability of the coating permits electrophoresis experiments at extreme pH values as well as neutral one and allows short washings of the electrophoresis tubes between the runs with 0.05 M NaOH containing 5% SDS and with 1 M HCl. These washing solutions release efficiently those solutes which have a tendency to adsorb onto the coating, which is a prerequisite for reproducible runs.

1、はじめに キャリアーフリーのキャピラリー電気泳動におけるタンパク質の分離の成否は、キャピラリー内表面へのそれらの吸着をどのようにして除去するかにかかっている。これは電気浸透流の消去にほかならない。タンパク質は主に静電的にシラノールイオンに吸着する。しかしタンパク質は疎水性も兼ね備えた高分子である。そこで親水性で無電荷、そして酸、アルカリに安定な直鎖状天然高分子であるメチルセルロースそしてデキストランをコーティング材としてキャピラリー内壁をコーティングし、それらの酸、アルカリに対する安定性ならびに酸性そして塩基性タンパク質の電気泳動を実施することにより、上記のコーティング法を評価した。

2、実験 キャピラリー(0.05x150(110), 300(260)mm)の前処理、0.1M NaOH, 5 min or 1M KOH/MeOH, 3 min → 0.1M HCl、活性化、0.4% Bind-Silane/Acetic acid, pH 3, ≥15h or 50% Bind-Silane/Acetone, ≥15h、コーティング、0.7% Allyl methyl cellulose (or Allyl dextran(T 40, T 500))/50 mM Potassium phosphate, pH 7.4(500 μl), 10% Ammonium persulfate(7.5 μl), 5% TEMED(7.5 μl), ≥15h、余剰なコーティング材の除去、5% SDS/pH 10-12, 1-2 day。アリルメチルセルロースの合成、2% NaBH₄/2.5 M NaOH (10ml) + 2% Methylcellulose/H₂O(10ml), Mix → + Allyl glycidyl ether(2ml), Mix → 20h → Dialysis(or after neutralized) → Freeze dry。アリルデキストランの合成、本質的にアリルメチルセルロースの場合と同様の方法。定電圧, 200 v/cm。

3、結果 酸、アルカリ条件下での安定性¹⁾。 アリルメチルセルロース (AMC) でコートしたチューブは酸、アルカリに対して安定であった。図1は連日数回の泳動そして0.5M塩酸中での保存を10日間繰り返したときに得られた pH 7 での塩基性タンパク質の泳動図である。図2には 5% SDS を含む0.005M NaOH に15日間保存した場合について示す (酸性タンパク質、pH 9.8で泳動)。 モデルタンパク質の泳動 図3にAMCチューブで得られた種々のタンパク質混合物の泳動図を示す。aは順そしてbとcは逆方向に pH 7.5 でそれぞれ塩基性、酸性タンパク質混合物そして卵白アルブミンを、dは9種の混合物を pH 3.5 で泳動。

1). ELECTROPHORESIS 投稿中

4、考察 タンパク質のCZEに不可欠なそれらの内壁への吸着を防ぎ、さらに酸、アルカリそしてSDS耐久性に優れたこれまでにない上記コーティング法は、この分野のさらなる発展に寄与すると思う。

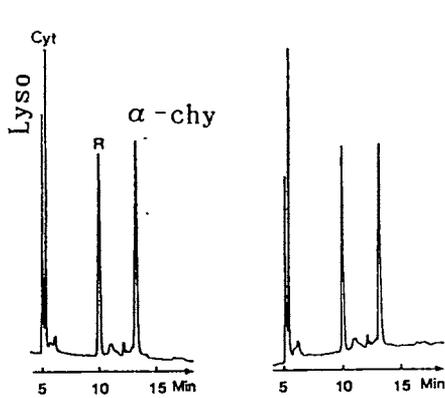


Fig.1

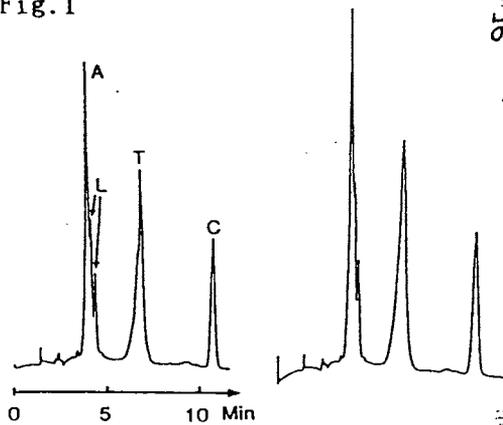


Fig.2

A, human albumin; R, ribonuclease A
T, transferrin; L, β -lactoglobulin
C, bovine carbonic anhydrase

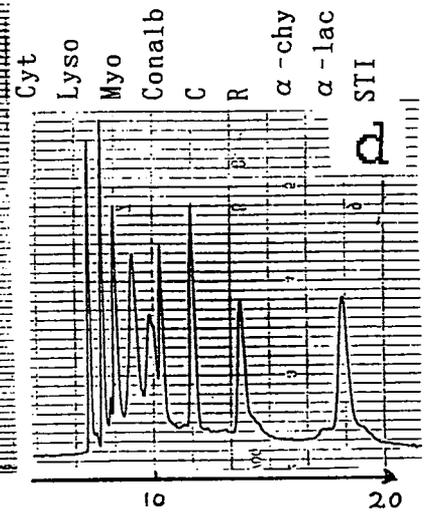
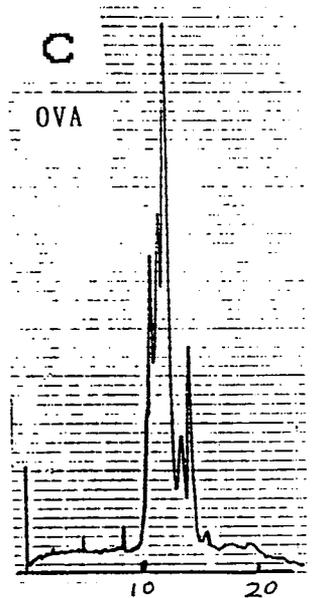
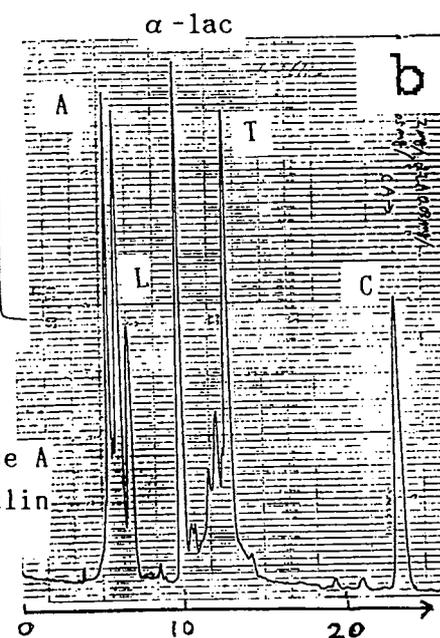
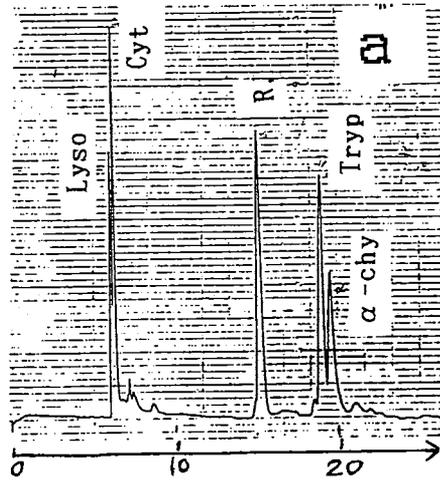


Fig.3

SDS-ウシ血清アルブミン
由来ポリペプチド複合体の自由
溶液キャピラリー電気泳動

(阪大・蛋白研) Mohammad R. Karim、品川 進、高木 俊夫

BEHAVIOR OF THE COMPLEXES FORMED BETWEEN SODIUM DODECYL
SULFATE AND POLYPEPTIDE DERIVED FROM BOVINE SERUM ALBUMIN

(Inst. for Protein Res., Osaka Univ.) M.R. Karim, S. Shinagawa, T. Takagi

Electrophoretic mobilities of complexes between SDS and protein polypeptides derived from bovine serum albumin were determined by free solution capillary electrophoresis to assess its performance in quantitative studies of electrophoretic behavior of such complexes.

1. INTRODUCTION

Complexes formed between sodium dodecyl sulfate (SDS) and protein polypeptide are the electrophoresing entities in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Quantitative discussion of the electrophoretic behavior of such complexes must start from that of their absolute electrophoretic mobilities in free solution. We have been badly lacking in a way to obtain such basic constants. The present study was undertaken to assess the performance of free solution capillary electrophoresis for the above purpose. Some of the data obtained were crosschecked by comparing with data obtained by Tiselius-type free boundary electrophoresis and electrophoretic light scattering.

2. MATERIALS AND METHODS

Bovine serum albumin was various in the mode of modification of its 17 disulfide linkages: intact, reduced, reduced-carboxymethylated(RCM), and reduced-carboxyamidomethylated(RCAM). Electrophoresis was carried out using a capillary electrophoresis apparatus(CAPI-3000: Otsuka Electronics Co., Hirakata, Japan) at 20°C. Polyacrylamide-coated capillaries with an internal diameter of 100 μ m were used. The capillary as well as the electrode vessels were filled with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 containing 0.1% SDS. Orange G was used as an internal standard. Electrophoresis was also measured using an electrophoretic light scattering photometer(ELS-800:Otsuka Electronics Co.).

3. RESULTS

Figure 1 illustrates a typical example of electropherograms obtained. All the preparations of polypeptide derived from bovine serum albumin complexed with SDS gave a single symmetrical peak in addition to the

internal standard peak of Orange G. All the data obtained are compiled in Table 1. Electrophoretic mobilities of the internal standard was firstly determined for each of the electropherogram obtained, and were found virtually identical. Considering the use of several different capillaries during the measurements, this can be taken to indicate that the electroosmotic flow was always completely suppressed. Thus electrophoretic mobilities of the complexes were determined directly without referring to the internal standard. Electrophoretic mobility was also determined for RCAM-bovine serum albumin by electrophoretic light scattering to be $-2.71 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{volt}^{-1}$ under the same condition.

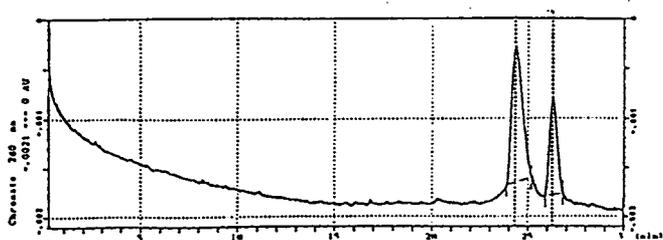


Fig.1 Electropherogram of RCAM bovine serum albumin. capillary effective length, 49.7 cm; applied voltage, 4.7 kV; current, 58-60 μ A; detection, absorbance at 280 nm. Left, protein complex; right, Orange OT.

Table 1
Electrophoretic mobilities of complexes between SDS and polypeptide derived from bovine serum albumin.

Complex	Mobility $\times 10^4$ ($\text{cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{volt}^{-1}$)
Denatured BSA	-2.43 ± 0.013
Reduced BSA	-2.67 ± 0.004
RCM-BSA	-2.71 ± 0.014
RCAM-BSA	-2.72 ± 0.008

4. DISCUSSION

The electrophoretic mobilities determined respectively by capillary electrophoresis and electrophoretic light scattering agreed excellently. Moreover, they also agreed well with the value determined previously by Tiselius-type electrophoresis. This can be taken as to guarantee the use of capillary electrophoresis for determination of absolute electrophoretic mobilities of the complexes between SDS and polypeptides derived from proteins.

The electrophoretic mobilities determined for the three derivatives of bovine albumin were surprisingly similar. The RCM-bovine serum albumin molecule has 34 additional negative charges compared to the other two. Such an equalization with respect to electrophoretic mobility in free solution has been pointed out to be a basic premise of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, but escaped from detailed study due to absence of suitable electrophoretic technique. Capillary electrophoresis seemed to be the best choice as the technique for obtaining reliable absolute electrophoretic mobilities of SDS-protein polypeptide complexes. The underlying mechanism bringing about the equalization of the mobilities must wait future detailed study.

(日本分光・技術研究所) ○黒須泰行、佐藤泰世
(慈恵医大・臨床検査医学) 町田勝彦
(慈恵医大・医科研・生化学) 都丸慶子、栗岡晋

CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF HUMAN SERUM PROTEINS

¹JASCO, Technical Research Laboratory, ²Department of Laboratory Medicine and ³Division of Biochemistry, Institute of Medicine, The Jikei University School of Medicine
Yasuyuki KUROSU¹⁾, Yasuyo SATOU¹⁾, Katsuhiko MACHIDA²⁾,
Keiko TOMARU³⁾ and Susumu KURIOKA³⁾

We investigated the separation of human serum proteins by using capillary electrophoresis (CE) in solution. The CE with coating reagent gave no better separation. The resulting method used was with sodium borate buffer at pH 10.0. The CE profiles of serum proteins were very similar to those by cellulose acetate membrane electrophoresis. The method was successfully applied to the analysis of serum proteins.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) 法はここ数年注目を浴びてきた分析法である。その特長は微量分析 (試料量: 数 nl、数 pg)、短時間分析 (通常30分以内)、簡便な操作 (高速液体クロマトグラフィー分析の操作に類似) に要約される。この特長を活かした応用例が多く発表され、その有用性が確認されている。

我々は今回このキャピラリー電気泳動法のタンパク質に対する基礎的検討 (電解液、洗浄法の工夫、コーティング剤・添加剤の使用など) をフリーゾーンで行った後、血清分析に応用した。さらに代表的な電気泳動法の一つであるセルロースアセテート (CA) 膜電気泳動と分離を比較することによってその有用性を実証した。

2. 実験

2-1. 試料 標準タンパク質 血清アルブミン、リゾチーム、ミオグロビン、オボアルブミン、トリプシンインヒビター、トランスフェリン、リボヌクレアーゼA、トリプシノーゲン、チトクロームc、インスリンを使用した。血清の調製 コントロール血清 (和光純薬工業製、Control Serum I)、正常血清、異常血清をそれぞれの分析法に応じて以下のように調製した。①セルロースアセテート (CA) 膜法: 血清をそのまま使用した。②キャピラリー電気泳動 (CE) 法: 75 mM 塩化ナトリウムを含む20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) により、5% 濃度になるように血清を希釈した。

2-2. CE法

①試薬: 電解液、洗浄液用のホウ酸、リン酸及び水酸化ナトリウム、水酸化リチウムは和光純薬製の特級を使用した。コーティング剤または添加剤として次のものを使用した。アンモニア、リジン、CHAPS: 3-[-Cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propanesulfonate、TSAC: Trimethyl stearyl ammonium chloride、塩化コリン、セルバライト、ポリエチレンイミンP-70、アンフォライン [pH 4-6]、アンフォライン [pH 9-11]、メチルアミン、

- ②キャピラリー：未処理フューズドシリカ (50 μ m I.D. x 全長 50 cm) を使用した。
 ③電気泳動装置：キャピラリー電気泳動システムCE-800 (日本分光製) を使用した*。
 ④分析条件：分析時間の短縮化、高い再現性及び高分離を得るために、電解液、添加剤、洗浄液の種類を検討を行った。泳動は定電圧 12 kVまたは15 kVで行い、通常10分以内に終了した。泳動後、毎回5分間キャピラリーに洗浄液を送液し、再び5分間電解液を送液し初期化した。送液はキャピラリー内を陰圧にして吸引する方式で行った。試料はサイフォン法 (落差 5 cm, 10 sec, 注入量 約3-6 nl) により行った。
 ⑤検出：フローセル方式によるオンライン検出 (波長200 nm) を行った。

2-3. CA膜法

- ①CA膜：セラフォア (6 x 24 cm, ザルトリウス社製) 使用した。
 ②電気泳動装置：全自動電気泳動装置FED-3200 (コスモ社製) を使用した。
 ③泳動条件：バルビタール緩衝液 (70 mM, pH 8.6) を使用し血清塗布量は0.3 μ l/0.5 cm幅 (実際の血清必要量30-50 μ l) とした。0.6 mA/cmの定電流の条件で19分間泳動を行った。
 ④タンパク質染色法：0.8% ポンソー3R液 (C.I.No. 16155, コスモ社製) +6% トリクロロ酢酸 (TCA) で20秒間染色を行った後、1% 酢酸溶液にて脱色を行った。
 ⑤検出：デンストメトリー (波長505 nm) により測定を行った。

3. 結果

3-1. 分離条件の検討

電解液のpH (2-10)、電解液の種類を検討した結果、ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0) で最も良好な結果が得られた。また洗浄液 (水酸化ナトリウム、塩酸、リン酸) の検討では常法の水酸化ナトリウム溶液 (常法) よりもリン酸溶液が移動時間においても、ピーク面積においても再現性が優れている結果を示した。さらに、分離の向上を期待して、シラノール基と相互作用すると考えられる物質 (基本的にアミノ基などの塩基性基を有する化合物) を非共有結合で吸着させ (コーティング法)、その分離に対する影響を検討した。コーティングの方法は泳動、洗浄そして初期化後、5分間コーティング溶液を送液し、再び電解液を5分間送液し、再び初期化した。しかし、この方法では良好な結果を得ることができなかった。そこで電解液にコーティング剤を添加して泳動する方法の検討も行った。つまりコーティング剤 (添加剤) がキャピラリー内表面と溶液中をが平衡状態で存在していると考えられる。最終的には今回使用した試薬の範囲ではコーティング (非共有結合) の方法 (分離前に吸着させるやり方と電解液に添加して常に吸着させておくやり方) はノンコーティング (未処理) の方法を越えることができなかった。

3-2. ヒト血清タンパク質のCE

上記で検討した結果に基づいて、ヒト正常血清分析を行った。その結果、CA膜法における分析パターンとほぼ同様なパターンを得ることができた。また、血清に各成分を添加し、相当するピークの増大を確認する方法でピークを同定し、CA膜法と一致することを確認した。Fig. 1に異常血清の代表として、ポリクローナル γ 症患者血清のエレクトロフェログラムを示した。ピーク順に、 γ 、 β 、 α_2 、 α_1 -グロブリン、アルブミン分画である。これらのピーク面積比はCA法の結果とほぼ一致し、CE法による分析が有用であることを確認した。

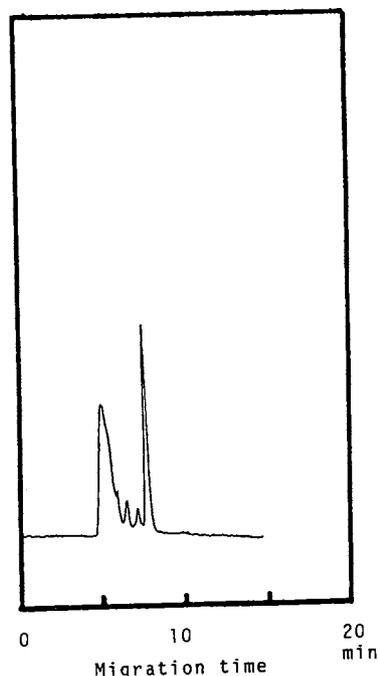


Fig.1 Electropherogram of abnormal human serum

SDS-線状ポリアクリルアミドゲル充填キャピラリー電気泳動による蛋白質の分子量測定

日本ベーリンガーインゲルハイム(株)
京都大学 薬学部

○中谷 学

澁川 明正、中川 照眞

SODIUM DODECYL SULFATE - LINEAR POLYACRYLAMIDE GEL-FILLED CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR THE MOLECULAR WEIGHT DETERMINATION OF PROTEINS

Manabu NAKATANI*, Akimasa SHIBUKAWA **, Terumichi NAKAGAWA **

*Pharmaceutical Research Dept., Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd.

**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Sodium dodecyl sulfate (SDS) - linear polyacrylamide (LPAA) gel-filled capillary electrophoresis using a coated fused silica capillary has been developed for the molecular weight determination of proteins. To suppress the electroosmotic flow and to reduce the adsorption of proteins, the inner wall of the capillary was coated with LPAA through Si-C bonds. Acrylamide (AA) solution containing SDS is filled into the coated capillary and then polymerized. The electroosmotic flow rate in the coated capillary was substantially zero (unmeasurably low). Compared with the uncoated SDS - LPAA gel-filled capillary, the durability and the reproducibility of the developed capillary were markedly improved. An excellent linear relationship existed between the relative mobility against a marker (Orange G) and the molecular weight of proteins. The relative standard deviation of the relative mobility was below 0.5 %.

【はじめに】

近年、SDS-PAGEをキャピラリー電気泳動を用いる蛋白質及びポリペプチドの分子量測定が報告されている。それらは、架橋ポリアクリルアミド(CPAA)を用いる方法と線状ポリアクリルアミド(LPAA)を用いる方法に分類される。CAPPを用いる方法では、ゲル重合時や分析中にゲル内に気泡が発生し、一度気泡が発生するとそのゲル充填キャピラリーは分離能が急激に低下して使用できない。一方、LPAAはゾル状態であるため気泡が発生しにくく、また繰り返し充填が可能なのでキャピラリーを再利用できる利点がある。今回は、電気浸透流によってキャピラリーからLPAAが押し出されるのを防ぐために従来のシロキサン(Si-O-Si-C)結合ではなく、より安定なSi-C結合を介してLPAAを内壁にコーティングを施したキャピラリーを使用した。

【実験】

1. 試薬、試料及び装置

Vinylmagnesium bromide(1.0M THF 溶液)は Aldrich Chemical Co. から購入した。Thionyl chloride, Acrylamide (AA), N,N,N',N'-tetramethylenediamide(TEMED), Ammonium persulfate, Orange G, 2-Mercaptoethanol は和光純薬工業(株)から、標準蛋白質は Sigma社から購入した。電気泳動用バッファーは Protein Gel-Mix Running Mate 5X TGS Buffer(Life Technologies, Inc.)を使用した。Fused Silica CapillaryはGLサイエンス社から購入した。キャピラリー電気泳動装置は日本分光の CE-800 を使用した。測定は室温で行った。

2. ゲル充填キャピラリーの調製

(1)キャピラリーを1M NaOH で処理した後、Thionyl chlorideを反応させる。(2)塩素化したキャピラリー内壁に Vinylmagnesium bromide を反応させビニル基を導入する。(3)TEMED 及び過硫酸アンモニウムと共にAAモノマーを注入しコーティングする。(4)キャピラリー内を精製水で十分に洗浄する(コーティング完了, Fig.1参照)。(5)コーティングしたキャピラリーに SDS を含む AA モノマー溶液を充填し、重合させる。

3. サンプルの調製

4.9mM Tris, 38.4mM Glycine, 1% SDS, 1% 2-Mercaptoethanol溶液に蛋白質を溶かし80°Cで15分間加熱した。

【結果及び考察】

Fig. 2 は内壁にコーティングを施したキャピラリーに 5% の LPAA を充填し蛋白質を分離した結果である。また、Eq. 1 で求めた蛋白質の Orange G に対する相対移動度の繰り返し再現性を Table 1 に示した。これらの結果より、キャピラリー内壁をコーティングすることによって再現性が大きく向上することがわかる。Fig. 3 は相対移動度と蛋白質の分子量の関係をプロットした図である。この時の相関係数はゲル濃度が 5% のとき 0.997, 7% のとき 0.999, 9% のとき 0.999 であった。一方、このコーティングしたキャピラリーを 1 カ月間使用した後に、酸化メシチルをマーカーとして電気浸透流の測定を行ったが 6 時間後も検出されなかったことから、電気浸透流の実質的消滅が確認された。

$$\text{Eq. 1} \quad \text{Relative Mobility} = \frac{\text{Migration Time of Proteins}}{\text{Migration Time of Orange G}}$$

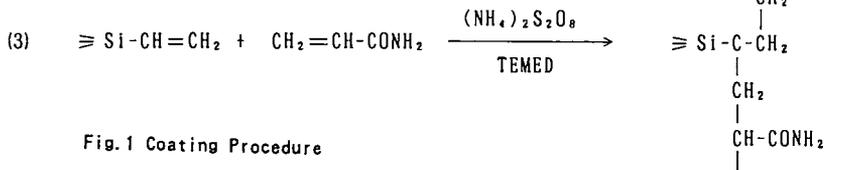
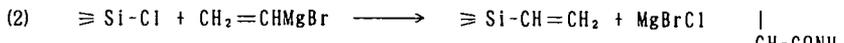


Fig. 1 Coating Procedure

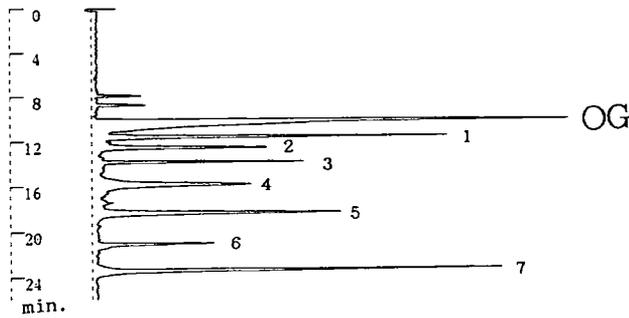


Fig. 2 Electropherogram of SDS-Proteins using the Coated Capillary
 Capillary: 75 μm i.d. × 50cm (30cm to detector)
 Gel: 5% linear polyacrylamide
 Buffer: 49mM Tris, 384mM Glycine, 0.1% SDS, pH=8.7
 Separation Conditions: -15kV 12 μA, Injection: -5kV 6 μA 10sec.
 Detection: UV/280nm, Peaks are identified by number in Table 1

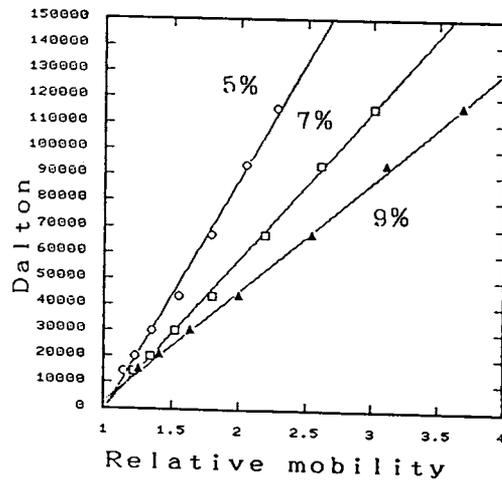


Fig. 3 Molecular Weight Calibration Graphs

Proteins	MW	% R. S. D. (n=5)	
		Coated	Uncoated
1. α-Lactalbumin	14400	0.44	0.43
2. Trypsin Inhibitor	20100	0.33	0.74
3. Carbonic Anhydrase	30000	0.37	0.68
4. Ovalbumin	43000	0.00	1.32
5. BSA	67000	0.28	1.72
6. Phosphorylase b	94000	0.39	1.52
7. β-Galactosidase	116000	0.22	1.36

Table 1 Reproducibility of Relative Mobility

SDSゲルキャピラリー電気泳動法 によるタンパク質の分子量分析

(ベックマン)○秋山忠雄・船串佳世・佐藤 隆

SIZE SEPARATION OF PROTEINS WITH SDS GEL CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Tadao AKIYAMA, Kayo FUNAKUSHI, Takashi SATO
Beckman Instruments (Japan) LTD.

Size separation of proteins was achieved in 20 min. by employing SDS gel capillary electrophoresis with physical gel (linear polymernetwork). This technique has the migration time reproducibility of better than 0.3CV%, the area reproducibility of 2%, and the area ratio reproducibility of 2% (N=5) with a standard protein mixture. The correlation-coefficient between molecular weights and migration times was 0.993. The SDS gel capillary electrophoresis may be an excellent alternative of traditional SDS-PAGE.

[はじめに]

ポリアクリルアミドを用いたSDS電気泳動法(SDS-PAGE)は、タンパク質の分離において現在最も広く使われている手法である。一方、キャピラリー電気泳動法には短時間分離、オンカラム検出等の長所があり、キャピラリー電気泳動法でのSDS電気泳動法の確立がタンパク質研究者の間で熱望されていた。今回我々は、ポリアクリルアミドゲルのかわりに、リニアなポリマーを添加した高粘性キャリアーを用いて、標準タンパク質の分離を行ない、良好な分離と再現性を得ることができた。また、分子量とミグレーションタイムの間にも良好な相関を得ることができた。

[実験方法]

装置：キャピラリー電気泳動装置はベックマン社のPAGEシステム2100を用いた。キャピラリーはベックマン社供給による、内径100 μ m、全長47cm、有効長40cmの内面処理ヒューズドシリカキャピラリーを用いた。データ処理はベックマン社のゴールドワークステーションソフトウェアを用いた。

試薬：タンパク質試料としてはシグマ社より購入した分子量マーカー又は標準タンパク質を用いた。ゲルバッファーはベックマン社より供給されたものを用いた。

実験：タンパク質は0.1~1mgを1% SDS、2.5% 2-メルカプトエタノールを含む0.12M トリス-塩酸バッファpH6.6に溶解し、5分間100℃で加熱しSDS処理を行なった。試料の注入は0.5 psi N₂ガスによる加圧法で行ない、分析ごとにキャピラリーを1NのHClで洗浄し、新しいゲルバッファーをキャピラリーに注入した。洗浄及びバッファーの注入は20psiの加圧で行なった。

[結果及び考察]

Fig. 1に示すように、各タンパク質が分子量の差で分離できることが確認できた。ミグレーションタイムのCV%は0.3%、ピーク面積は3%、ピーク面積比は2%（それぞれN=5）とスラブゲルを用いた手法と比較して、大幅な再現性の向上が確認された。分子量とミグレーションタイムの相関については、0.993という相関係数が得られ（Fig. 2）、キャリブレーションカーブの再現性も良好であった。

また、我々はこの手法を、遺伝子組換えタンパク質の精製過程のモニターへの応用について検討し、良好な結果を得ることができた。

これらの結果より、SDSゲルキャピラリー電気泳動法が従来のSDS-PAGにかわる、タンパク質分析の手法として有効であることが確認できた。

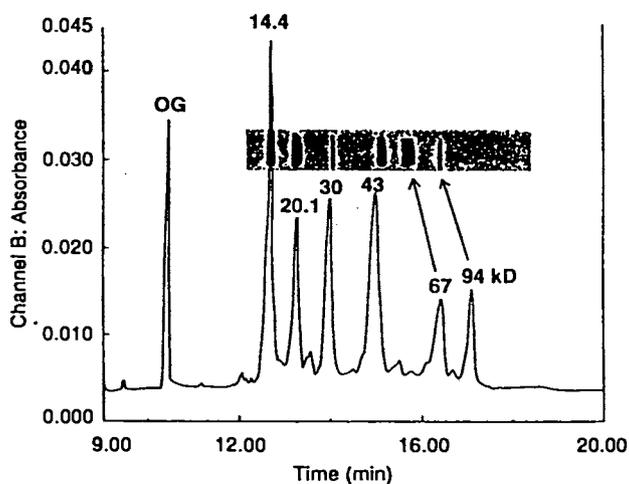


Fig. 1 SDSゲルキャピラリー-電気泳動による標準タンパク質の分離

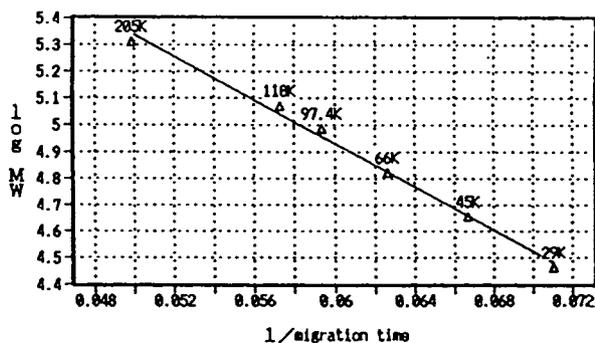


Fig. 2 分子量とミグレーションタイムの相関

タンパク質のSDS電気泳動—キャピラリーゲルとカラム／スラブゲルの比較

姫路工大・理 ○真鍋 敬・寺部 茂

SDS Electrophoresis of Proteins—Features of Capillary Gel Electrophoresis Compared With Column/Slab Gel Electrophoresis
Takashi Manabe and Shigeru Terabe
Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

The performance of capillary electrophoresis for protein separation was examined using polyacrylamide gel-filled fused-silica capillaries. Solution of acrylamide and bisacrylamide (3–6%T and 5%C) was filled in the capillaries (i.d. 75 μ m–200 μ m), then polymerized. Proteins (Mr ranged from 17,000 to 116,000) were separated according to their molecular mass by capillary gel-SDS electrophoresis. Features of Capillary gel-SDS electrophoresis, compared with column/slab gel-SDS electrophoresis will be discussed.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動は、泳動中に検出できる点や、キャピラリーの内径を小さくすることで分離方向への拡散を小さくできるなど、タンパク質の高性能分離分析法としての素質を備えていると考えられる。架橋のないポリアクリルアミドゲルをキャピラリーに充填し、タンパク質のサイズ分離が可能であることはすでに報告した。このような流動性のある物質を、サイズ分離の場合にも支持体として用いることは重要な課題であるが、その流動性がタンパク質の分離結果の解析を複雑にすることも明らかになった。そこで通常の架橋ポリアクリルアミドゲルをキャピラリーに充填してSDS電気泳動を行い、ガラス円筒型ゲルを用いた従来のSDS電気泳動の場合と比較して、何が異なるのかを調べた。

2. 方法と結果

タンパク質試料はシグマ社から購入したcytochrome c, myoglobin, carbonic anhydrase, ovalbumin, albumin, apotransferrin, phosphorylase b, β -galactosidase を用いた。これらの水溶液をそれぞれがほぼ同じ濃度になるように混合し、SDSと蔗糖をそれぞれ1%、20%の濃度になるように加え、100 $^{\circ}$ C 3分加熱したものを電気泳動用試料とした。キャピラリー電気泳動装置はスペクトラフィジックス社の波長可変分光光度計SC100にキャピラリー装着用アダプターを付けたものを用い、電極槽、試料添加装置は自作した。フューズドシリカキャピラリーは外径375 μ m、内径75または200 μ m、長さ(試料添加端から検出器まで)約2.5cm~約10cmのものを用いた。ポリアクリルアミドゲルは、アクリルアミドとN, N'-メチレンビスアクリルアミド(bis)の濃度の和(T%)を3%~9%とし、bisの割合(C%)を5%として、N, N', N', N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)と過硫酸アンモニウムでキャピラリー中で重合させた。ゲル内緩衝液は0.025Mトリス-グリシン(pH8.3)に0.1%SDSを加えたものを用いた。試料は陰

極側のゲル上端に直接添加するか、電気泳動添加法を用い、電流値が $12\mu\text{A}$ を越えない範囲で定電圧で泳動した。

図1に前記タンパク質を内径 $200\mu\text{m}$ 、分離長 7.0cm のキャピラリー、 3.6% Tポリアクリルアミドゲルで分離した例を示す。試料は 0.7kV の定電圧で4秒間電気泳動添加した。7種のタンパク質が分子量の小さい順に約30分の間に検出されている。内壁を処理しないキャピラリーを用いてゲルを調製したが、10回~20回の繰り返し分析が可能であった。

カラム/スラブ型のゲルを用いる従来のSDS電気泳動と比較すると、キャピラリー電気泳動においては、1)タンパク質を移動させながら検出するため、より低いゲル密度を用いる、2)繰り返し分析を可能にするため、電流値を小さく保ち、かつ短時間で分析するため高電圧をかけられるよう、緩衝液を選択しなおす、3)2)の制約から、試料中の緩衝液、イオンの濃度はできるだけ低くする、などの点を考慮する必要がある。内径 $200\mu\text{m}$ のキャピラリーを用いた場合、 280nm の紫外吸収によってタンパク質を検出するための最低必要量は 1ng 程度であった。これはカラム/スラブゲル上で色素(Coomassie brilliant blue R-250)染色・目視検出する場合の必要量が 100ng 程度であるのに比較すると、高感度であるといえる。

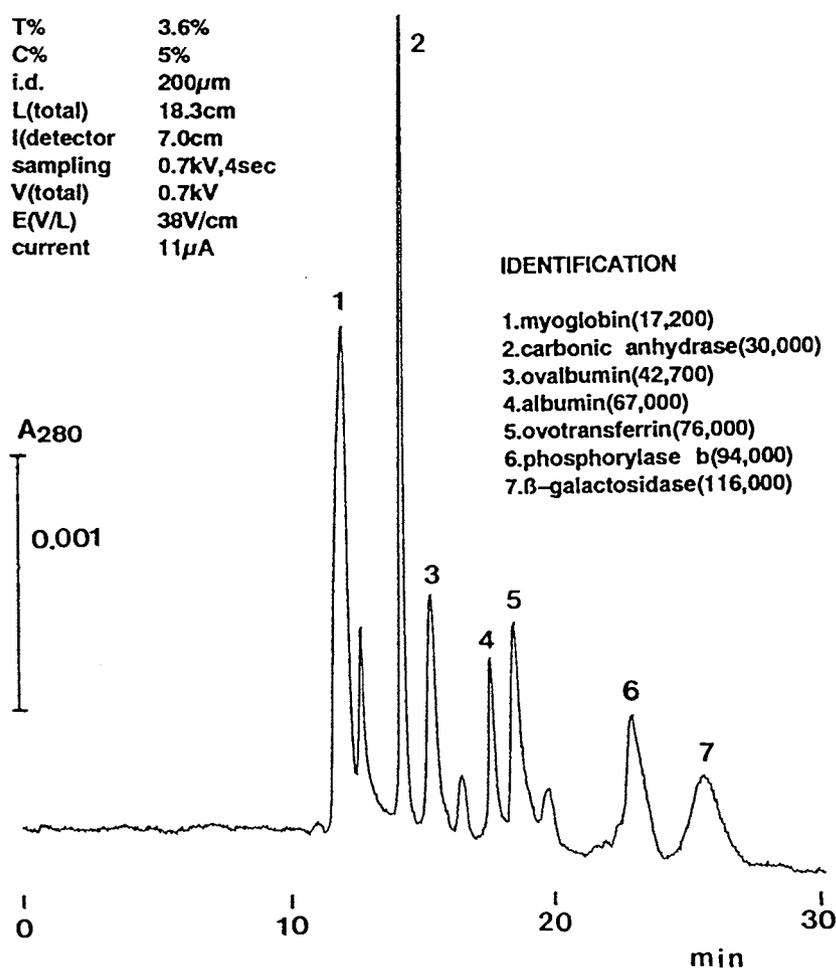


Fig. 1 Separation of proteins by capillary gel-SDS electrophoresis

CE/SDS-PAGEによる タンパク質分析

(日本分光) ○佐々木 徹、千田 正昭
(埼玉大、理) 檜山 哲夫

SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF PROTEINS

(JASCO) Toru Sasaki, Masaaki Senda
(Saitama Univ.) Tetsuo Hiyama

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis (CE/SDS-PAGE) of proteins has been performed using a CE system of Jasco model CE-800, reconstructed partially. Gel filled capillaries were prepared without pretreatment of inner surface of capillary. The size separation mechanism was confirmed by Ferguson plots of standard proteins. An excellent linear relationship ($r > 0.99$) existed between the peak mobility and the molecular weight (\log). The result of molecular weight determination was similar to the result of conventional SDS-PAGE. The reproducibility of migration time on the same capillary and from capillary to capillary were 1.6-1.9% (RSD, $n=5$) and 1.7-2.3% (RSD, $n=5$), respectively.

1. はじめに

キャピラリーゲル電気泳動を行う場合、キャピラリーの内壁処理が、重要とされている。^{1,2)}しかし、この処理は極めて煩雑であり、誰もが行えるものではない。演者らはこの煩雑な内壁の処理を行わずゲル充填キャピラリーを調製し、タンパク質のCE/SDS-PAGEを行い、未処理でも、問題のないことがわかった。すなわち、10分析程度のゲル充填キャピラリーの耐久性、良好な移動時間の再現性を確認した。³⁾また電解液とゲルの添加剤として用いたエチレングリコルの効果も確認した。ゲル充填キャピラリー調製法、標準タンパク質の分離(架橋ゲル、非架橋ゲル)、分離機構の確認(架橋ゲル、非架橋ゲル)、タンパク質の分子量測定への応用、分析の再現性について報告する。

2. 実験(詳細は参考文献4)に掲載予定)

(装置) 日本分光製キャピラリー電気泳動システムCE-800を短いキャピラリーが使用できる様に一部改造し、実験に用いた。

(キャピラリーと試薬) キャピラリーは、内径75 μ m、外径375 μ mの内面未処理フューストシリカ管(ジールサイエンス社)を用いた。試薬は特級品もしくは電気泳動用を用いた。

(ゲル充填キャピラリーおよび電解液の調製法) ゲル調製等は常法⁵⁾に従った。キャピラリーへ吸引によりゲルを充填した。電解液は100 mMトリス、150 mM酢酸、0~4 Mエチレングリコルの0.1% SDS溶液である。これに架橋ゲルの場合5~10%T(3%G)、非架橋ゲルの場合7.5~12.5%T(0%G)となるようにアクリルアミドを加えゲル溶液とした。

(分析条件) キャピラリーは全長20 cm(分離長10 cm)。泳動電圧は4~6 kV、220 nmで検出した。試料(標準タンパク質)は常法¹⁾に従い調製し、最終濃度(タンパク質1種あたり0.1 mg/ml)とし、負極側から電氣的移動法(5 kV、10 sec)で導入した。

3. 結果

(標準タンパク質の分離) 電解液中およびゲル中のエチレングリコール濃度は、2 M前後で最もよい分離を示した(図1)。それ以下の濃度では、低分子量域(分子量10,000以下)の分離が不十分となり、それ以上の濃度では、分離度の向上は見られなかった。よって、以後エチレングリコール濃度2.35 Mを用いた。このときの泳動パターンを図1に示した。

(分離の機構) CE/SDS-PAGEにおいて架橋ゲル、非架橋ゲルともに分子ふるいにより分離されていることをFerguson plotにより確認した。また各タンパク質の移動度と分子量の対数は、良好な直線相関($r > 0.99$)を示した。

(分子量測定への応用) 試料にはグリセラルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(Sigma)、分子量36,000(メーカーの公称値)を用いた。分子量較性曲線より得られた分子量は約34,000となり、従来法と同程度の結果が得られた。公称値とは、約2,000の開きがあったが、従来法においても分子量測定の誤差は、5%前後とされており、CE/SDS-PAGEにおける誤差も同程度と思われる。

(再現性) 同一のキャピラリーを使用した連続分析時の移動時間の再現性($n = 5$)は、1.6~1.9%(RSD)であった。ゲル充填キャピラリー5本間での移動時間の再現性は、1.7~2.3%(RSD)であった。

4. おわりに

キャピラリーの内壁処理を施さないゲル充填キャピラリーでも10回程度の分析に使用できることがわかった。調製が極めて簡単であるため、この程度の耐久性であっても実用上問題ないと思われる。タンパク質の分子量測定に応用した場合、従来法と同程度の測定精度であった。連続分析における相対移動時間の再現性は、極めて良好であった。ゲル充填キャピラリーの調製の再現性も良好であることが、キャピラリー間での移動時間の再現性により明らかとなった。

5. 参考文献

- 1) G. Schomburg, 12th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY, P767
- 2) K. Tsuji, Journal of Chromatography, 550(1991)823
- 3) 佐々木徹, Jasco Report, Vol.34, No.5(1992)
- 4) 佐々木徹, Jasco Report, Vol.34, No.9(1992) in press
- 5) 真鍋敬, 新化学実験講座 I、12章 電気泳動、356~359ページ

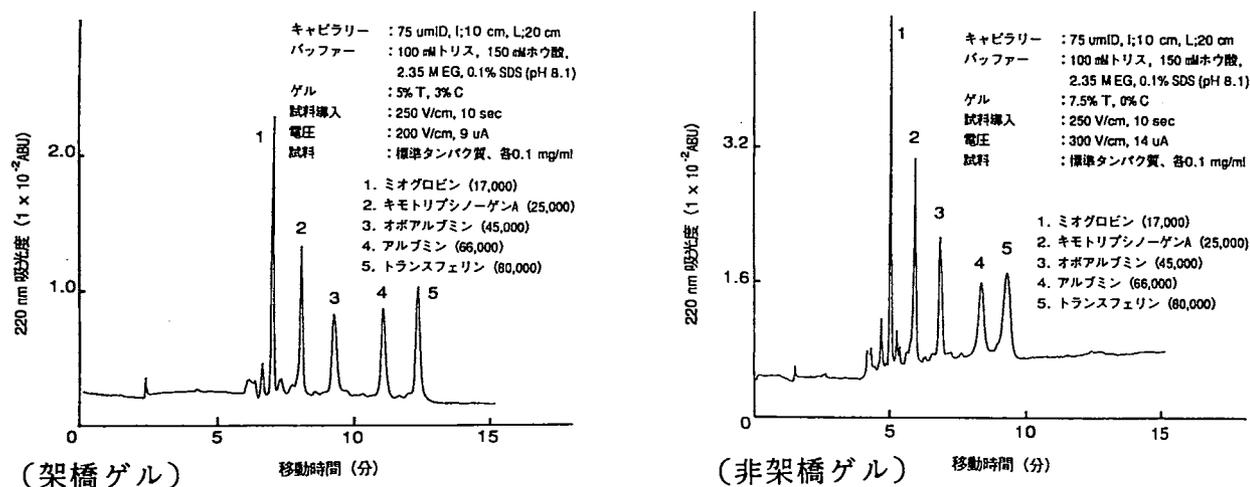


図1. 標準タンパク質のCE/SDS-PAGE

新潟大学医学部法医 ○小野政孝 山内春夫 出羽厚二

Application of capillary isotachopheresis to analysis of vitreous humor.

Ono Masataka, Yamanouchi Haruo, Dewa Koji

Department of Legal Medicine Niigata University of Medicine.

Analysis of vitreous humor from 57 autopsy cases were performed with the Shimadzu capillary isotachopheresis(IP-3A). Standard isotachopherograms of vitreous humor from 18 persons were recognized two remarkable peaks(A and B peak) with reproducible many peaks. The relative time (AoT) from azid ion peak (Ao) to eachpeak was calculated per the time from Ao to ending peak (E). AoT of A and B peak in standard isotachopherograms was respectively 34.8-41.5(average 37.9) and 56.6-62.1(average 59.3) . The height of A and B was respectively 11-130.0mm (average 52.5mm) and 14.0-84.0mm (average 42.5mm). Six cases by death in conflagration showed high B peaks and another high peaks following B peak. Two blood loss cases showed lower peaks than standard patterns .

我々は、これまで細管式等速電気泳動(イソタコ)により、ヒト血清、尿、DNAについて分析してきた。今回、眼球硝子体についてイソタコによる分析を行ってみた。

〔試料および方法〕

新潟大学医学部法医学教室で行った司法解剖例57例の眼球硝子体を試料とした。イソタコ装置(島津IP-3A)で内径0.5mmのFEP製の検出用キャピラリーを使用し、リーディング液(5mM Hcl-10mM Ammediol-0.1%HPMC 4000)、ターミナル液(10mM Amonocaproric acid-10mM Ammediol:pH 10.8)を用い、試料とスペーサー(6種類の0.2mM アミノ酸-2%アンホライン : pH 3.5~9.5)を1:3で混合したもの1 μ lを注入した。陽極のターミナル電極(T)と陰極のリーディング電極(L)の間で、150 μ A(5分)、75 μ A(12~20分)の定電流で泳動した。泳動パターンは、波長254nm(レンジ16)でのUV吸収パターンを検討した。

〔結果及び考察〕

1. 死後経過時間が2日以内で、その死因が、眼球硝子体の組成に変化が少ないと考えられる25例(脳損傷、頸髄損傷、外傷性ショック死、窒息死等)のイソタコグラムを比較したところ18例のイソタコグラムは、比較的そのパターンが類似しており、標準パターンと考えた。18例の標準パターンについてみると、リーディング溶液、ターミナル溶液中の不純物(アジドイオン)のAoピークから、泳動の最後にみられるEピークまでの間に22本前後のピークを認め、各ピークの出現時間を泳動時間(Ao-E)に対する相対時間(AoT)で表した。AoTが、34.8-41.5(平均37.9)の部に高さ11-130mm(平均52.5mm)のピークを認めAピークとし、AoTが56.6-62.1(平均59.3)の部に高さ14-84mm(平均42.5mm)ピークを認めBピークとした。18例のA/Bは、0.27-6.20(平均1.23)であった。

標準パターンを示さなかった7例についてみると、4例は Aピークが 2-7mmと低い以外はほかは標準パターンと類似していた。2例はAピークの中が広く、ピークの形の異常も認め、他の1例は全体のピークが小さかった。

- 次に、死後2日以内で上記の25例以外の25例のイソタコグラムを標準パターンと比較した。焼死6例のBピークの高さは、それぞれ59mm(AoT62.1)、68mm(AoT58.9)、74mm(AoT60.1)、81mm(AoT58.7)、96mm(AoT59.1)、110mm(AoT60.3)で、平均81.3mmと標準パターンに比べていずれも高かった。このうち炭化焼損が高度な3例では、Bピークよりも高いピークを認め、それぞれ高さ128mm(AoT64.8)、160mm(AoT65.8)、88mm(AoT68.3)であった。しかしCO中毒死2例では、いずれも標準パターンとの差を認めなかった。刃物による出血死の2例では、Aピークの高さが0.5mm、3mmと低く、Bピークの高さも33mm、21mmと低かった。農薬中毒死2例のうち1例は、Aピークが巾広くなっており、他の1例では、Bピークの高さが8mmと極めて低かった。凍死の1例で全体のピークが低かったが、他の1例は標準パターンを示した。溺死の7例のうち1例ではAピークとAoピークの間にAピークとほぼ同じ高さのピークを認め、また1例では全体のピークが低かった。他の5例では標準パターンを示した。なお、嬰兒4例のイソタコグラムとは標準パターンを示していた。
- 死亡経過時間が2日以上7例についてみると、死後3日の3例(脳挫傷、肝硬変、溺死)では、標準パターンと差異を認めなかった。しかし、土中で死後3-4日(窒息死)と死後5-6日(硬膜外血腫)の2例ではAピークとAoピークの間にAピークよりも高いピークを認めた。また、死後4-7日(衰弱死)の1例ではBピークよりも高いピークを認め、全体に高いピークが目立ち、明らかに標準パターンと異なっていた。しかし、死後4週間の1例(溺死)では、標準パターンを示していた。
- 硝子体を分子量5000及び30000のメンブランフィルターを用いて約2倍及び80倍に濃縮して、その濃縮液をイソタコにより分析すると、各ピークの高さが低くなった。また、蒸留水中でピスコーフで透析し、蛋白精製したものについてイソタコにより分析すると、殆どのピークが消失した。このことから、眼球硝子体のイソタコグラムの多くのピークは、低分子量の物質と考えた。
- 二次元電気泳動法のクマシー染色上のアルブミンのスポットの大きさとのに比較を行ったところ、アルブミンのスポットが大きい例ではAピークの中が広がった。

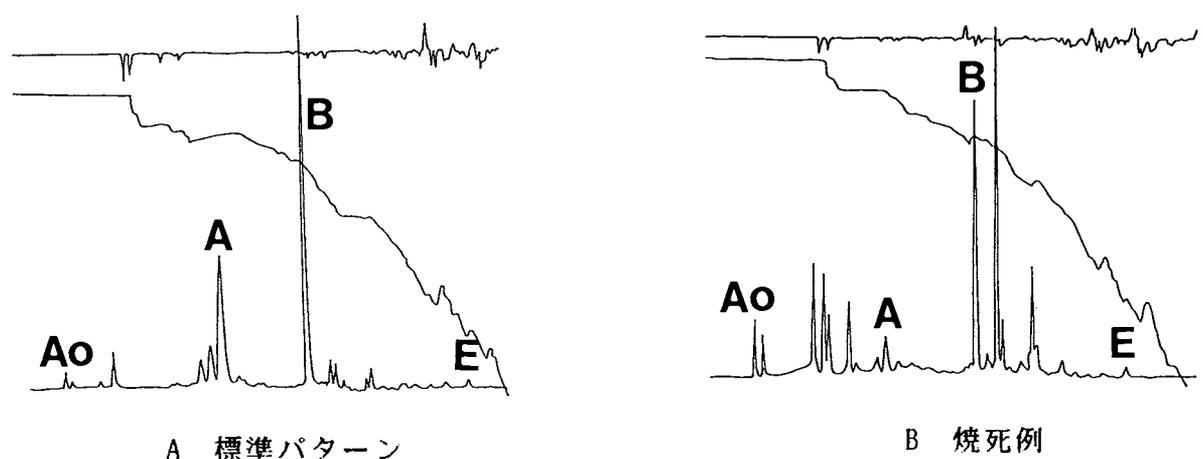


Fig.1 硝子体のイソタコグラム

髄液に特徴的な低分子蛋白成分
の含量の中樞神経系疾患におけ
る変動のキャピラリー電気泳動
による測定

(杏林大保健)〇平岡 厚, 伊藤 詠子, 三浦 勇夫

(国立千葉病院・神経科) 服部 宗和, 富永 格

CAPILLARY ELECTROPHORETIC MEASUREMENT OF CHANGES IN CENTRAL
NERVOUS SYSTEM DISEASES IN THE CONTENTS OF A LOW MOLECULAR
WEIGHT PROTEIN COMPONENT CHARACTERISTIC TO CEREBROSPINAL FLUID

Kyorin University School of Health Sciences

Atsushi Hiraoka, Eiko Ito and Isao Miura

Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital

Munekazu Hattori and Itaru Tominaga

Capillary electrophoresis was applied to the analyses of the protein and amino acid components of cerebrospinal fluid (CSF) samples and their fractions (ultrafiltrates and concentrates). Under the conditions employed, a peak responsible for the component with molecular weight of $1\sim 3 \times 10^3$ was detected on the electropherograms, and change in its CSF contents in various neurological disorders could be measured by the mixed analyses with an internal standard sample. The results showed its remarkable increase in CSF of multiple sclerosis, and it was tentatively identified as β -trace protein characteristic to CSF.

1. はじめに

我々は、キャピラリー電気泳動(CZE)を髄液及び対照血清の蛋白質及びアミノ酸系成分の分析に適用し、種々の中樞神経系疾患の病態と結びついた髄液蛋白質の変化(血液脳髄液関門の障害による血中高分子蛋白成分の流入昂進、中樞神経系内でのIgGの合成等)や肝性脳症において増加した髄液中グルタミンの定量に、CZEが有用であることを報告してきたが、又、その際、髄液中の分子量 $1\sim 3 \times 10^3$ の成分を主として含む画分のelectropherogram上にも検体によって有無やその高さが変化する複数のピークが観察されていること

を指摘した。¹⁾ 今回は、それらのピークのうち最大でどの髄液検体のelectropherogram上にも見いだされるものについて、一定量のinternal standardとの混合分析により、種々の中枢神経系疾患におけるその髄液中含量の変動を調べた。

2. 対象及び方法

(1) 対象： 国立千葉病院神経科を受診し、髄液の検査を施行された各種の中枢神経系疾患の患者合計70名余を対象とした。 疾患の種類としては、脳梗塞等の脳血管障害、髄膜や脳の炎症・感染症、多発性硬化性やAlzheimer病等の変性・脱髄性疾患、糖尿病性神経障害や肝性脳症等の代謝性疾患、てんかん、機能性精神病（分裂病、うつ病等）、神経症その他が含まれ、一部の患者からは入院期間中に複数回採取した。

(2) 方法： 凍解した髄液検体各2mlからCentricon-30を用いる遠心限外によりろ液（分子量3万以下の成分のみを含む）を得、その1mlを更にCentricon-10を使用して分子量1万以下の成分のみを含むろ液と1-3万の成分も含む濃縮液に分けた。 後者をとって生理食塩水を加え、dead stop(50 μ l)までの遠心濃縮を3回繰り返して、低分子成分を極力除去して試料とした。 試料10 μ lと内部標準（50 μ g/mlの6-aminocaproate水溶液）10 μ lを混合したものを、WatersのQuanta-4000 Capillary-Electrophoresis System（キャピラリーは75 μ m X 60 cm）に10秒間hydrostatic injectionにより注入し、泳動用緩衝液として50 mMホウ砂（with or without Z₁-Methyl = trimethylammoniumpropylsulfonate）を用いて15 KVで泳動し、185 nmに吸収を有するcationを検出した。

又、脳器質性疾患における脳実質損傷の程度のmarkerとされている髄液中のneuron-specific enolase (NSE) の濃度を、脳血管障害及び変性脱髄性疾患の例について、酵素免疫測定法により定量した。

3. 結果及び考察

得られたelectropherogram上のmigration time(Mt)約10分のAlbumin領域（ただし、分子量が3万以上のAlbuminは上記試料中に存在しない）に、この画分の主成分のピークが観察された。 このピークは全検体に検出されたので、これと内部標準（Mt: 約7分）のピークの高さの比（前者/後者）を各検体について計算した。大部分の検体では、その値は0.1-0.4の間に分布したが、多発性硬化症（特に増悪時のもの）において上昇し、0.8以上に達した場合もあった。 多発性硬化症におけるその値の変動は、髄液NSEの濃度と有意に相関し、その値が高いこと（髄液の低分子蛋白の主成分の含量が増えていること）と脳実質がactiveに崩壊しつつあることが、一致していることが示された。しかし、その他の変性・脱髄性疾患や脳梗塞等では、髄液NSEの高値にもかかわらず低分子蛋白主成分は増加していない例が多く、病態の相違がうかがわれた。 このピークを与える髄液成分は、その分子量、移動度、量の多さ、多発性硬化症における増加及び血清における不在等より、髄液に特徴的な低分子蛋白質として知られている β -trace protein²⁾と考えられた。

4. 参考文献

- 1) 平岡 厚他, 生物物理化学, 36: 26, 1992.
- 2) Link, H., Olsson, J.E., Acta Neurol. Scand., 48: 57-68, 1972.

(専修大) ○吉田治弘、(武蔵藤沢動物病院) 廣田順子
(日本獣医畜産大) 江島博康

Electrophoretical observation of Genetical Polymorphisms in Serum Protein of Dog and Cat

Haruhiro YOSHIDA, Junko HIROTA¹⁾, Hiroyasu EJIMA²⁾

Laboratory of Physiology, Senshu University

1) Musashi-fujisawa Animal Hospital

2) Nippon Veterinary and Zootechnical College

Blood samples were collected from Dog and Cat including both healthy and sick individuals, and genetical polymorphisms at Gc, Hp and Tf in the serum loci were examined by Micro-two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (M2D-PAGE), and Isoelectrofocusing(IEF)-PAGE and Capillarytype isotachopheresis(CITP). Gc and Tf in Cat serum are under control of 2 alleles and have three phenotypes as F, S and FS. Tf in Dog serum are under control of 5 alleles and have 9 phenotype as AB, AC, B, BC, C, CD, BE, CE and E. Hp and other proteins' quantitative differences are found by M2D-PAGE and CITP.

1. はじめに

演者らは、小動物の血清タンパク質像を比較的簡便な方法による検出と、臨床の場での利用について検討を進めている。血清タンパク質についてはマイクロ2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(M2D-PAGE)、等電点電気泳動法(IEF)および細管式等速電気泳動(CITP)などにより血清タンパク像、遺伝的多型性などの検出に利用している。今回、イヌとネコの血清について、遺伝的多型性の検討を実施し興味ある結果を得たので報告する。

2. 材料および方法

供試したイヌ血清は、日獣大にて輸血用に飼育されている健康犬80頭、共同研究者の動物病院に来院した患畜約50頭から採血した。ネコ血清も患畜約50頭から採血した。いずれも血清を分離したのち-30℃にて凍結保存し、使用時に解凍した。

M2D-PAGEは真鍋らの方法に従った。IEFは、Gc型の判定には pH4.5~5.4 の範囲で泳動し、抗ヒトGc血清でImmunofixationし型判定した。Tf型は血清に5倍量の硫酸第一鉄アンモニウムを加え、4℃に一晩置き試料とした。pH 4~7 で泳動したのちクマシーブリアントブルー R-250で染色した。CITPは演者らの従来の方法を僅かに改変し実施した。

3. 結果と考察

1) M2D-PAGEによる血清タンパク質パターン

イヌ、ネコ血清をM2D-PAGEで泳動し、そのタンパク質パターンを観察すると顕著な個体差は、Hpの濃度差(高(H)中(M)低(L)濃度)、イヌのPost-Alb域のタンパク質スポット

および分子量域の異なるTf域のスポット群ならびに疾病によると思われる IgG域の濃度差として検出される。 イヌ血清のHpの濃度差は、すでにSDS-Disc-PAGE、CITPでも明らかにしているが、ネコ血清にも同様な個体差が観察された。イヌで見いだされたTf域のスポット群についてはM2D-PAGE後に immunoblottingでTfであることを確認し、Tfの多様性を改めて認識した。 IgG域の濃度差については疾病との関連を検討している。

イヌのHp、Post-Alb、ネコのHpの表現型の出現頻度は表1にまとめる。

2) IEFによる遺伝的多型性の検出

イヌ、ネコ血清のTf型およびネコのGc、Tf型は IEFで泳動し、型判定した。イヌのTf型については、演者はすでに 100例以上の雑種犬について検査しているが、TfB, BC, Cの3型を見いだしたのみであったが、今回は2本ずつのbandがpairで出現し、9種の表現型を認めた。ネコのTfはF, FS, Sの3表現型が認められた。Gc型はイヌでは全例同一のパターンを示し、ネコではF, FS, Sの3表現型が認められた。各表現型の出現頻度は表1にまとめる。

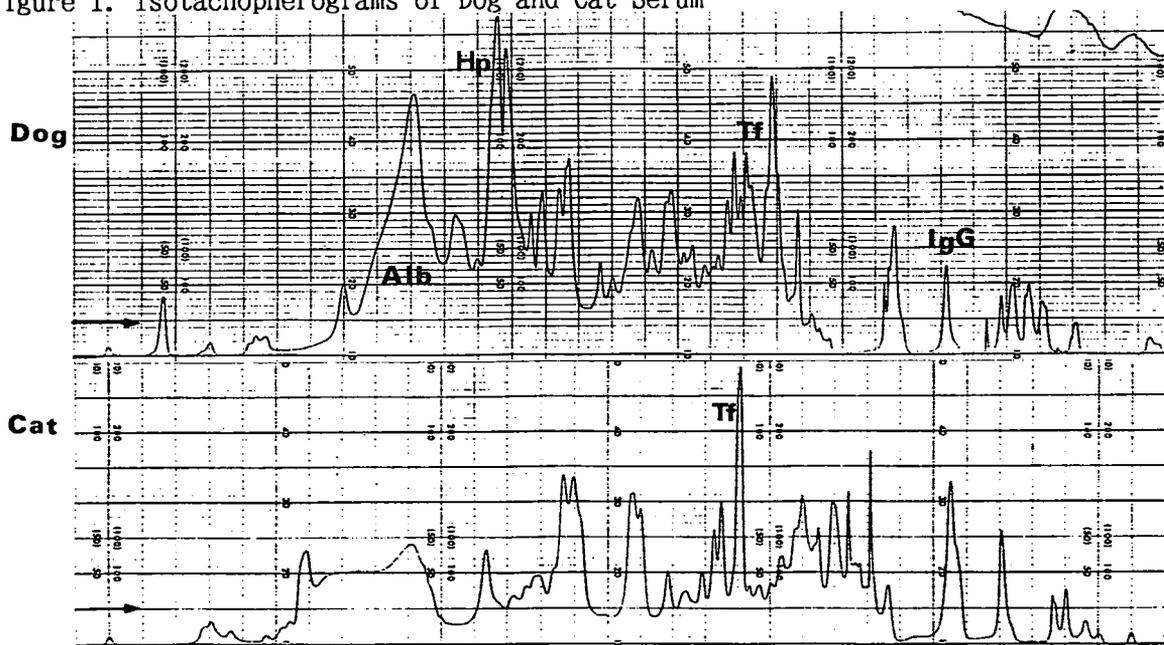
3) CITPによるイヌ、ネコ血清の泳動パターン

CITPによるイヌ、ネコ血清の分析を試みた。イヌ、ネコ血清の isotachopherogramは図1に示す様にAlb 域のパターンが演者の従来の血清のパターンとは異なるが、血清全体を観察するには今回のパターンの方が適している。血清のパターンからTfの多型性の一部とHp, IgGの量的差異が検出されている。タンパク質の各ピークの定量化は、今後の課題として考えている。

Table 1. The phenotype frequencies of Hp, Gc(Pos-Alb) and Tf of Dog and Cat Serum

Dog	Hp	H	M	L	Poa	1	1-2	2	Tf	AB	AC	B	BC	C	CD	BE	CE	E
Healthy	80	7	50	23	79	33	40	6	80	1	7	17	31	22	0	1	0	1
Sick	52	13	29	10	52	31	12	9	59	1	0	8	20	28	1	0	1	0
Cat	Hp	H	M	L	Gc	F	FS	S	Tf	F	FS	S						
	49	17	27	5	50	7	22	21	49	17	27	5						

Figure 1. Isotachopherograms of Dog and Cat Serum



ブロッキング膜を用いた キャピラリー電気泳動用 マイクロ分取装置の開発

(三共株式会社分析代謝研究所) ○紺世智徳、高橋達彦
長島 潜、岩岡貞樹

DEVELOPMENT OF MICROPREPARATION SYSTEM FOR
CAPILLARY ELECTROPHORESIS USING BLOTTING MEMBRANE
ANALYTICAL and METABOLIC RESEARCH LABORATORIES, SANKYO CO., LTD
Tomonori KONSE, Tatsuhiko TAKAHASHI, Hisomu NAGASHIMA
Teiki IWAOKA

Micropreparation system for proteins and peptides separated by capillary electrophoresis (CE) was developed using blotting membrane and modified microtestplate which functioned as an electrode vessel. The system was evaluated for the diagnosis and the purification of the enzyme commercially available. The enzyme separated by CE was collected in a concentrated spot on these membranes without being diluted and the activity was successfully measured.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動法(Capillary Electrophoresis; CE)は、その分離機構の特殊性から、液体クロマトグラフィー(HPLC)の相補的分析手段として近年着目されており、特にペプチド及びタンパク質の分離に関しては、HPLCをしのぐ理論段数を有することから今後の発展が充分期待できる分析法である。

この様に高分離能を有するCEではあるが、サンプリング量が微小である為分離されたピークの分取・同定が困難であるといった問題点がある。従来の分取法としては溶出側のバイアルを目的サンプルの溶出時間にあわせて交換し、溶液中に分取する方法が報告されている。しかしながら、この方法では、分取時に於ける溶出サンプルの希釈が避けられず、従って、以降の分析に供する上で濃縮の必要性、また場合によっては脱塩操作の必要性が生じてくる。更に、疎水性タンパク質等の場合には、バイアルへの吸着等も問題となる。

そこで、本報告ではタンパク質、特に生理活性を有する酵素類のCEによる分離分取を目的とし、マイクロテストプレートの各ウェル中に塩橋を用いてブロッキング膜をセットする新しいマイクロ分取装置を考案した。即ち、本装置ではキャピラリーから溶出した酵素をPVDF(Polyvinylidene difluoride)膜上に捕集することにより、溶液により希釈されない濃縮された酵素を得る。捕集されたこれらの酵素は標準的生化学的手法または質量分析等の分析化学的方法により同定することができる。ここでは、 γ -GTPを用いて本法の適用性の検討を行い、良好な結果を得たので以下に報告する。

2. 実験

2-1. ミクロ分取装置の作成

図1に作成したキャピラリー電気泳動用ミクロ分取装置の概略図を示した。

ミクロ分取装置の本体は、アクリル板によりマイクロテストプレートが入る大きさに製作した。電極には、長さ30 cm、外径0.4 mmの白金線を用いて、アクリル製のプールの底に均一な電圧がかかるように接着した。

各ウェルの底には、直径2 mmの穴を開け塩橋を満たし、その上にパンチャーで直径6 mmの円形に切り取ったPVDF膜を乗せる。各PVDF膜は、メタノールで浸潤させたのち泳動用の電解液で濡らし電氣的導通を保った。

2-2. キャピラリー電気泳動による γ -GTPの分析

キャピラリー電気泳動は、日本分光工業株式会社製キャピラリー電気泳動装置CE-800を用いて行った。キャピラリーカラムには、ジーエルサイエンス株式会社製のフューズドシリカキャピラリーカラムを必要に応じた長さで切り、UV検出用のスリットを装着したものをを用いた。CEによる分離ピークのオンライン検出は、すべて200 nmのUV吸収を測定して行った。泳動緩衝液には、20 mMホウ酸緩衝液(pH 9.4)を調製して用いた。

3. 結果および考察

γ -GTP標準溶液を20 kV、15 μ Aで電気泳動した後、溶出成分を5分後から1分間隔で連続的に本ミクロ分取装置によりPVDF膜上に捕集した。溶出成分を捕集した各PVDF膜を別のマイクロテストプレートのウェルの中に移し、基質を加えて酵素反応を進行させ、発色法によりその酵素活性を測定した。

一方、分取に用いたキャピラリーの全長を有効長とするキャピラリーを用いて、25 kV、15 μ Aで同様に電気泳動を行った。得られたエレクトロフェログラムに、先に得られた各時間の分取フラクションによる呈色の吸光度を対応させると図2の様になった。吸光度は、先のエレクトロフェログラムにおける γ -GTPのメインピークとよく一致した。

以上の結果から、今回開発したキャピラリー電気泳動用ミクロ分取装置は、CEにより分離された酵素を希釈することなくPVDF膜上に濃縮・捕集することができ、また、分取されたPVDF膜上の酵素の活性を測定することが容易であることが示された。

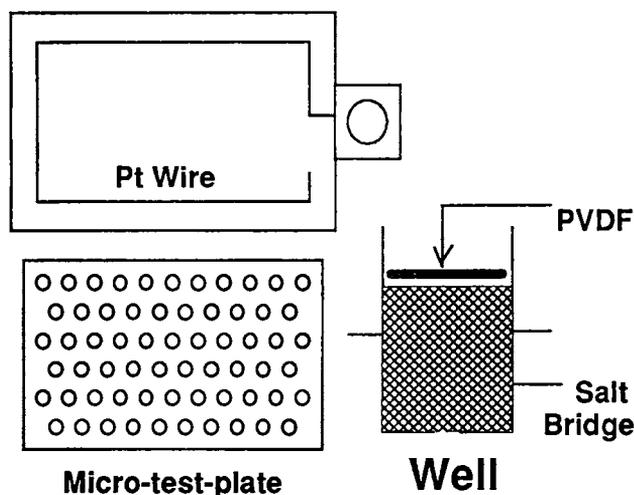


図1 ミクロ分取装置概略図

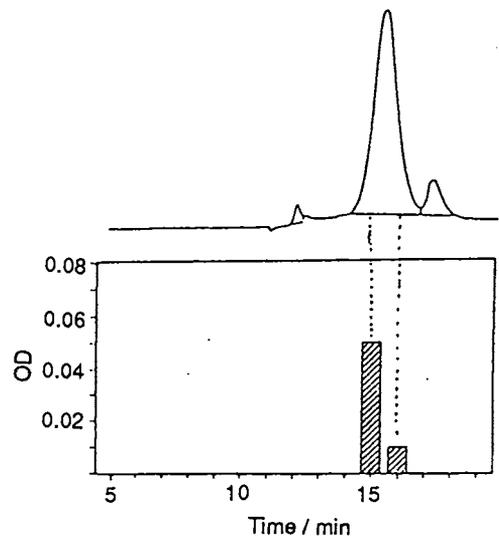


図2 CE及び本分析装置による γ -GTPの分析

日本ミリポア ウォーターズクロマトグラフィー事業部

Yung-Fong Cheng, Martin David Andrews, William Carson ○酒井恒行

Membrane Fraction Collection for Capillary Electrophoresis

Yung-Fong Cheng, Martin David Andrews, William Carson ○T. Sakai

Millipore Corporation, Waters Chromatography Div.

This report describes a new and simple instrument system combining high performance capillary electrophoresis and membrane technology. CE fraction collection is successfully implemented using a membrane assembly at the exit end of a capillary to complete the electrical circuit for electrophoretic separation. This membrane assembly comprises a PVDF membrane, a buffer reservoir (two layers of 3mm Chrom filter paper), and a stainless steel plate as the ground electrode. Two model proteins are separated and collected onto the membrane. Direct protein sequencing is demonstrated from this membrane after CE fraction collection.

【始めに】

メンブレンテクノロジーは最初にゲル電気泳動において開発された技術です。すなわち1次、2次元ゲル電気泳動で分離された蛋白質や核酸をブロッティングしてメンブレンに移し染色法、イムノアッセイ、化学分析、シークエンスすることにもちいられております。我々は最近試料の損出が無く、希釈されず、さらに分解能を損なうことのない分取法を発表いたしました。この報告ではこの技術をどのようにキャピラリー電気泳動システムに結び付けていくかについて発表します。さらにその有効性を証明するために分離回収された蛋白質のシークエンスを行いました。

【実験】

メンブレン フラクシヨン コレクターの構成

コレクター付きキャピラリー電気泳動の構成は図1の通りです。キャピラリー電気泳動本体にはクオンタ4000CEシステム（ミリポア、ウォーターズクロマトグラフィー事業部）キャピラリーは75 μ x 70 cm、検出には214 nm、メンブレンにはイモビロン-p（ミリポア）、メンブレンの保持には3 mmのワットマンの濾紙（Chrom filter paper）を用い回転数は2.2回転/時としました。

試料と試薬

ミオグロビン（馬心臓、pI6.76、7.16）（8mg/ml）、ベータラクトグロブリン（牛乳、pI5.13）（8mg/ml）を25 mM、pH7のリン酸バッファーで溶解しました。添加剤としての両性イオンはZ1-メチル（ミリポア、ウォーターズ）を用い濃度1 Mとしました（20 mMのリン酸バッファーpH7）。染色試薬としてBrilliant Blue R250（シグマ）1.25 gを500 mlの溶液（200ml methanol, 35ml glacial acetic acid, 265ml water）に溶解したものをを用い、脱色試薬として90：10（v/v）のメタノール/水を用いました。

【手順】

キャピラリー電気泳動のメンブレンフラクションの手順は以下の通りとしました。

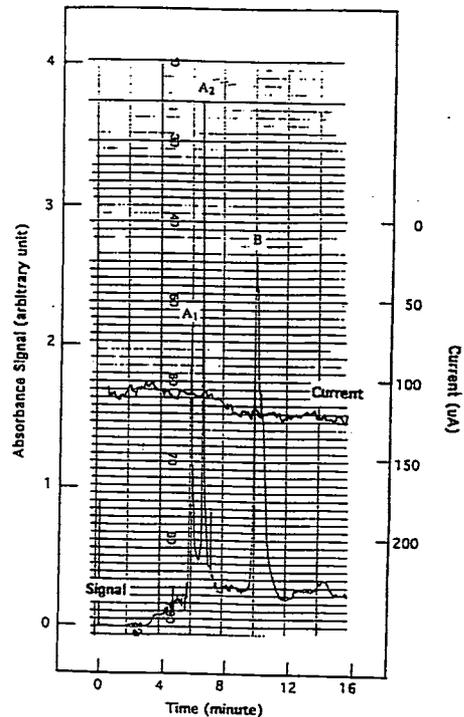
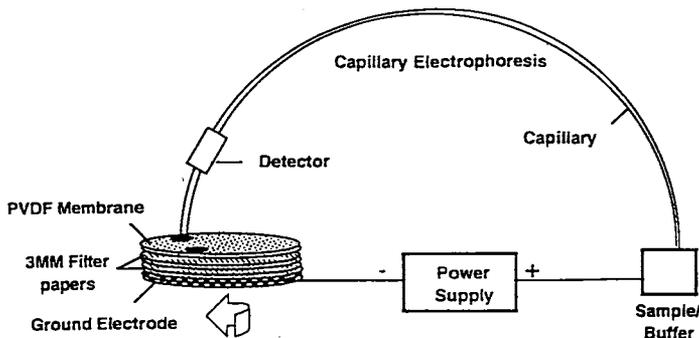
1. 試料を泳動法を用いて (6 KV) 10 秒間注入しました。両性イオンを加えたバッファーと加えないバッファーを用いて別々に泳動しました (20 KV)
2. 泳動開始と同時にコレクターを回転させました。分離は20分で完了しましたのでメンブレンをアッセムブリーから取り出しました。
3. 染色液で10分染色後脱色液で3回洗浄しました。

【直接 蛋白質シーケンス】

蛋白質は非常にシャープなバンドとして検出され6600型シーケンサー (ウォーターズ) によりシーケンスを行いました。前のサイクルのクロマトグラムを引くことによりそのサイクルのアミノ酸を同定いたしました。

【結果と考察】

図2にフェログラムと電流値の結果を示しました。電流値は100-125 μ Aの間で推移し、メンブレンを利用しても電流値におおきな影響は見られませんでした。PVDF膜に5回連続して同一条件で繰り返し分取した蛋白をクーマシーで染色した結果数多くのブルーの染色部位が観察され この条件では繰り返し分取が再現性が悪いため不可能と考えられます。Z1メチルを加えたpH7のリン酸バッファー (電流値は52-56 μ A) の結果再現性 (CV%) はピークA1で0.6%、ピークBで1.1%でした。再現性のよいZ1メチルを加えた系を用いメンブレン上で4回連続分取を試み2つのきれいなスポットが確認されます。合計分取量はミオグロビン28pモル β ラクトグロブリン10.8pモルでした。



協賛企業

本シンポジウムには下記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。

日本ダイオネクス株式会社

大塚電子株式会社

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

日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社

ベックマン株式会社

医理化機器株式会社

日本分光株式会社

アプライド バイオシステムズ ジャパン株式会社

株式会社 島津製作所

スベルコジャパン株式会社

平成4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 (神奈川歯科大) ☆	雁野重威 (日立製作所テクニカルセンター)
木曾義之 (比治山女子短大)	児玉裕敬 (高知医大・化)
小林英三郎 (城西大・理)	酒井恒行 (日本ミホア・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)
錢場俊彦 (アプライドバイオシステムズ)	津田孝雄 (名工大)
津田敏江 (共立女子大)	寺部 茂 (姫路工大・理) ★
花岡 譲 (横河電機)	広川 健 (広島大・工)
福土恵一 (神戸商船大)	藤下 修 (九大附属病院)
本田 進 (近畿大・薬)	真鍋 敬 (姫路工大・理)
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12回シンポジウム世話人

第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集

平成4年12月 2日 発行

編集 兵庫県赤穂郡上郡町金出地1479
姫路工業大学理学部内
第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム事務局
発行 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会
印刷 井上印刷所

