

*Proceedings of the 13th Symposium on
Capillary Electrophoresis*

SCE'93

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム

講演要旨集

主催 日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会

共催 日本化学会、日本薬学会、日本生化学会、日本農芸化学会、日本臨床化学会、電気泳動学会、クロマトグラフィー科学会、日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会、日本機器分析工業会

協賛 日本質量分析学会、日本油化学協会、日本ビタミン学会、日本薬物動態学会、日本臨床病理学会

会期 1993年12月8日（水）～10日（金）

会場 東京大学大講堂（安田講堂）

タンパク質の分取精製に最適!!

MinipHor / ミニフォー



ミニフォーは、従来のゲルやメンブレンを使用する方法と異なり、支持体を使わずに、高速の薄層流体中で等電点電気泳動を行ない、分離後20のフラクションに液体のまま回収する事が出来ます。

●特徴

- ほとんどの試料の分離が1時間以内で完了します。
- アミノ酸バッファーで泳動可能。分離後の処理も簡単。低コスト。
- 広いサンプルロード範囲。
- 沈澱が起こっても運転可能。
- 高分解能、高回収率。
- メンテナンスも簡単。

●仕様

溶 液 量：30ml
フラクション：20フラクション 1.4ml/チューブ
1.5mlマイクロ遠心管 (20本) ラック付き
流路材質：テフロン、アクリル、ファームドチューブ
ペリスタルチックポンプ：20フラクション、2電解液チャンネル
外形寸法：33cm(W)×41.3cm(H)×25.4cm(D)
安全機構：パワーインタラプトカバースイッチ
電 源：100V AC、50/60Hz 1.5A

●パワーサプライ(別売) ●冷却装置(別売)

電 圧：1000V DC 冷却能力：100W以上
電 流：200mA 操作温度：5℃
電 力：50Watts



日本総代理店 未来にかける技術の専門商社

株式会社 **アムコ**

科学機械部

本 社 〒102 東京都千代田区飯田橋4-8-7 TEL.03-3265-4265(直)
大 阪 支 店 〒540 大阪市中央区釣鐘町2-4-17 TEL. 06-942-5971(代)
名古屋支店 〒466 名古屋市昭和区鶴舞3-23-20 TEL.052-741-6051(代)
福岡支店 〒812 福岡市博多区東光2-6-15 TEL.092-441-7641(代)
札幌出張所 〒060 札幌市中央区北三条東2-2 TEL.011-241-4428(代)

*Proceedings of the 13th Symposium on
Capillary Electrophoresis*

SCE'93

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム

講演要旨集

主催 日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会

共催 日本化学会、日本薬学会、日本生化学会、日本農芸化学会、日本臨床化学会、電気泳動学会、クロマトグラフィー科学会、日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会、日本機器分析工業会

協賛 日本質量分析学会、日本油化学協会、日本ビタミン学会、日本薬物動態学会、日本臨床病理学会

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム

1993年12月8日（水）～10日（金）、東京大学大講堂（安田講堂）

プログラム

第1日（12月8日）

12：00～12：05 開会の挨拶 世話人（中村 洋）、代表幹事（奥山典生）

12：05～13：05 （座長 奥山典生）

1. 双方向等速電気泳動法における電解液系の選択（I I）
（広大工¹・比治山女子短大²）○広川 健¹、木曾義之²
2. 細管式等速電気泳動法によるフレッシュコンクリート中の陰イオンの同時分析
（長岡技科大）○小林和容、程内和範、松原 浩、山田明文
3. シクロデキストリンを用いた細管式等速電気泳動法による無機陰イオンの分離
（神戸商船大船貨輸送研究施設¹・神戸女子短大²）○福士恵一¹、日色和夫²

13：05～14：05 （座長 広川 健）

4. 向流電気濃縮法（V I）
（名工大工）○田中浩文、北川慎也、津田孝雄
5. 電気クロマトグラフィー（X V）
（名工大工）○中島真邦、北川慎也、津田孝雄
6. 電気浸透流発生過程のシミュレーション
（兵庫県立工技センター¹・神戸大工²・阪大蛋白研³）○阪本英男¹、
藤村 庄¹、蔦原道久²、高木俊夫³

14：05～14：20 （休憩）

14：20～15：20 （座長 福士恵一）

7. キャピラリー電気泳動におけるキャピラリー温度の検討
（日立中央研）○西川哲夫、神原秀記
8. キャピラリー電気泳動におけるサンプル中メタノールの影響について
（川崎医大法医学）○富田正文、奥山敏子
9. 電気インジェクション法の直線性及びインジェクション量の関係について
（日本ミリポア）○佐々木秀輝、米久保 淳、高橋孝行

15：20～15：35 （休憩）

15:35~16:55 (座長 山田明文)

10. キャピラリー電気泳動を用いた高感度分析のためのオンライン試料濃縮
(ミリポアコーポレート¹⁾・日本ミリポア²⁾) M. Merion¹⁾, R. H. Aebersold¹⁾,
M. Fuchs¹⁾, ○鈴木政明²⁾
11. オンライン前処理キャピラリー電気泳動法の開発 (I I)
(国立衛試) ○森田幾江、蜂須賀暁子、山崎 壮、沢田純一
12. キャピラリー電気法による金属イオンの選択的分析
(廣大工¹⁾・比治山女子短大²⁾) ○広川 健¹⁾、夏 文¹⁾、大田高雄¹⁾、
芝山貴之¹⁾、西本和弘¹⁾、西山文隆¹⁾、木曾義之²⁾
13. キャピラリー電気泳動法による金属キレートの分離と添加剤の効果
(岡山理大理) ○横山 崇、善木道雄

第2日 (12月9日)

9:00~10:00 (座長 木曾義之)

14. 水及び排水中のイオン分析
(日本ミリポア¹⁾・ミリポアコーポレート²⁾) ○高橋孝行¹⁾、J. P. Romano²⁾,
J. Krol²⁾
15. フォトダイオードアレイ検出器を用いたキャピラリー電気泳動によるアルカリ金
属イオンの分離
(大塚電子) ○笹 一志、小野真澄、北岸恵子
16. ミセル動電クロマトグラフィーにおける有機溶媒の利用
(阪府高専¹⁾・京大工²⁾・姫路工大理³⁾) ○大塚浩二¹⁾、小池 亮¹⁾、東森光雄¹⁾、
輕墓 薫¹⁾、岡田行広²⁾、寺部 茂³⁾

10:00~11:00 (座長 澤田嗣郎)

17. 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油成分の分離選択性に及
ぼす効果
(京大工¹⁾・姫路工大理²⁾) ○岡田行広¹⁾、寺部 茂²⁾
18. 動電クロマトグラフィーによる環境汚染物質の分析 (X) -低級脂肪族アルデヒ
ドの分析について-
(大阪工業技術試験所) ○竹田さほり、脇田慎一、山根昌隆、川原昭宣、
東 国茂
19. 高分子界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィー：アクリル酸-アクリ
ル酸エステル共重合型高分子界面活性剤の利用
(カネカテクノリサーチ¹⁾・姫路工大理²⁾・第一工業製薬³⁾) ○尾崎祐人¹⁾、
寺部 茂²⁾、市原明信³⁾

11:00~12:00 (座長 赤田良信)

20. キャピラリー電気泳動によるアミノ酸分析
(日本ミリポア) ○丸山敏彦、丸野 清
21. 森林化学分野におけるキャピラリーイオン分析の応用 (I I) -芳香族化合物の分析-
(日本ミリポア¹⁾・北大農²⁾) ○米久保 淳¹⁾、佐々木秀輝¹⁾、高橋孝行¹⁾、寺沢 実²⁾
22. 高性能キャピラリー電気泳動によるPMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone)誘導体としての糖分析
(近畿大薬) ○本田 進、笹岡 功、鈴木茂生

12:00~13:00 (昼食・休憩)

13:00~14:00 (座長 馬場嘉信)

23. キャピラリー電気泳動法の医薬品分析への応用 (第8報) 黄連解毒湯煎液及びエキス製剤中のアルカロイドの分析
(徳島文理大薬) ○石井信之、赤田良信
24. キャピラリーゾーン電気泳動による中枢神経系疾患患者髄液中有機酸の分離・定量
(杏林大保健¹⁾・国立千葉病院²⁾・日本ミリポア³⁾) ○平岡 厚¹⁾、三浦勇夫¹⁾、赤井淳一郎¹⁾、服部宗和²⁾、富永 格²⁾、佐々木秀輝³⁾
25. キャピラリー電気泳動によるシスプラチン-グルタチオン複合体生成の検出
(大塚電子¹⁾・福井医大²⁾) ○新田哲士¹⁾、笹川秀男¹⁾、松川 茂²⁾、杉本千鶴^{2)<}

14:00~15:00 (座長 寺部 茂)

26. ミセル動電クロマトグラフィーによる血清中ベンゾジアゼピン系抗てんかん薬の分析
(国立精神神経センター神経研) ○今澤正興、赤星えりか
27. 高性能先端分析-キャピラリー電気泳動法による非タンパク結合型薬物濃度の測定
(京大薬) 小原敏夫、○澁川明正、吉本泰樹、中川照眞
28. キャピラリー電気泳動法によるエナンチオマー過剰率の検討
(日本分光) ○黒須泰行、志佐佳子、佐藤泰世、千田正昭

15:00~15:40 (座長 大塚浩二)

29. 新規キサントキシダーゼ阻害剤BOF-4272のキャピラリー電気泳動による光学分割
(京大薬¹⁾・大塚製薬²⁾・大塚電子³⁾) ○吉本泰樹¹⁾、澁川明正¹⁾、中川照眞¹⁾、西村益浩²⁾、内藤真策²⁾、笹川秀夫³⁾、新田哲士³⁾

30. アビジンを用いたアフィニティー動電クロマトグラフィーによる光学分割
(日本ペーリンガーインゲルハイム¹⁾・姫路工大理²⁾) ○田中喜秀¹⁾、寺部 茂²⁾

15:40~15:55 (休憩)

15:55~16:55 (座長 中村 洋)

特別講演 Professor Douglas Westerlund (Uppsala University, Sweden)

"Capillary Electro-separations of Peptides and Carbohydrates Utilising
Secondary Equilibria"

18:00~20:00 (懇親会 東京大学山上会館内食堂)

第3日 (12月10日)

9:00~10:00 (座長 津田孝雄)

31. マルチキャピラリー電気泳動のための新規蛍光検出装置
(塩野義新薬研¹⁾・アイオワ州立大²⁾) ○上野恭嗣¹⁾、Edward S. Yeung²⁾
32. 紫外パルスレーザー励起キャピラリー振動法の開発と超微量アミノ酸の高感度検出への応用
(東大工) ○小竹玉緒、北森武彦、澤田嗣郎
33. 新規蛍光ラベル化剤を用いる半導体レーザー蛍光検出キャピラリー電気泳動分析
(九大中央分析センター¹⁾・九大工²⁾・同仁化学³⁾) ○渡辺美登里¹⁾、
今坂藤太郎²⁾、金田 隆²⁾、志賀匡宣³⁾

10:00~11:00 (座長 中川照眞)

34. 高性能キャピラリー電気泳動による糖鎖-タンパク質相互作用の研究-競合糖を用いる結合定数の測定-
(近畿大薬) 本田 進、○安枝真一、多賀 淳
35. 高性能キャピラリー電気泳動による糖鎖-タンパク質相互作用の研究-中性糖の結合定数測定のためのイオン性置換基の導入-
(近畿大薬) 本田 進、○多賀 淳、望月美佳
36. アフィニティープローブキャピラリー電気泳動による抗原定量
(帝京大薬¹⁾・ノースイースタン大バーネット研²⁾) ○志村清仁¹⁾、
Barry L. Karger²⁾

11:00~12:00 (座長 高木俊夫)

37. メンブランフラクションの開発 II-イムノプロットティングへの応用-
(日本ミリポア¹⁾・ミリポアコーポレート²⁾) ○町田祥子¹⁾、Yung-Fung Cheng²⁾、
William Warren²⁾、Martin Fuchus²⁾

38. カードランゲル電気泳動法の高分子分析への適用
(東大薬) ○浜瀬健司、中村 洋、中嶋暉躬
39. キャピラリー電気泳動を用いたリニアポリマー添加による核酸とタンパク質の分離
(大塚電子) ○山田浩美、新田哲士、笹 一志、小野真澄、北岸恵子

12:00~13:00 (昼食・休憩)

13:00~14:00 (座長 本田 進)

40. プランマトリックス充填キャピラリー電気泳動による蛋白質の分離及び分子量測定
(日本ベーリンガーインゲルハイム¹⁾・京大薬²⁾) ○中谷 学¹⁾、渋谷明正²⁾、中川照真²⁾
41. キャピラリー電気泳動におけるDNAフラグメントの分離媒体としてのプラン溶液の評価
(阪大蛋白研) ○小暮栄一、亀山啓一、高木俊夫
42. キャピラリー等電点電気泳動条件の基礎的検討
(姫路工大理) ○真鍋 敬、友弘 保、寺部 茂

14:00~15:00 (座長 真鍋 敬)

43. 自由溶液キャピラリー電気泳動におけるドデシル硫酸ナトリウムと蛋白質ポリペプチドあるいはペプチドの間に形成された複合体の挙動
(阪大蛋白研) ○M. Rezaul Karim、品川 進、高木俊夫
44. ZI-Methyl添加のキャピラリー電気泳動法によるヒト血清蛋白質の分析
(東北大病院¹⁾・東北大医²⁾・杏和総合医学研³⁾・日本ミリポア⁴⁾) ○三浦利彦¹⁾、相澤裕子¹⁾、小原保彦¹⁾、矢吹重光¹⁾、船渡忠男²⁾、川村 武²⁾、坪 茂典³⁾、町田祥子⁴⁾
45. 無担体電気泳動によるDNAの分離 4. 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) 登載 F F E U の F M を用いた電気泳動
(城西大理¹⁾・東海大医²⁾・宇宙開発事業団³⁾) ○小林英三郎¹⁾、郷間 尚¹⁾、稲垣宗彰¹⁾、石井直明²⁾、長岡俊治³⁾

15:00~16:00 (座長 北森武彦)

46. ゲル電気泳動中のDNAの直接観察
(名大工¹⁾・名大人間情報²⁾) ○小穴英廣¹⁾、増淵雄一¹⁾、松本充弘¹⁾、土井正男¹⁾、松沢有希子²⁾、吉川研一²⁾
47. マルチキャピラリーゲル電気泳動装置によるDNA解析 I. 多色検出によるDNAシーケンシング
(日立中央研) ○高橋 智、穴沢 隆、村上勝彦、神原秀記

(日立中央研) ○高橋 智、穴沢 隆、村上勝彦、神原秀記

48. マルチキャピラリーゲル電気泳動装置によるDNA解析 I I. マルチシースフロー特性の評価

(日立中央研) ○穴沢 隆、高橋 智、村上勝彦、神原秀記

16:00~16:40 (座長 小林英三郎)

49. キャピラリー電気泳動によるヒトの遺伝情報解析

(神戸女子薬大¹⁾・日立中央研²⁾) ○馬場嘉信¹⁾、宮崎理代¹⁾、津波古充朝¹⁾、高橋 智²⁾、神原秀記²⁾

50. キャピラリー電気泳動によるがんの遺伝子診断

(神戸女子薬大¹⁾・九大遺伝情報²⁾・鹿児島大工³⁾・日立中央研⁴⁾)
○馬場嘉信¹⁾、津波古充朝¹⁾、林 健志²⁾、明石 満³⁾、高橋 智⁴⁾、神原秀記⁴⁾

16:40~16:45 閉会のあいさつ (中村 洋、中川照眞)

13TH SYMPOSIUM ON CAPILLARY ELECTROPHORESIS

December 8-10, 1993, Tokyo, Japan

PROGRAM

December 8, Wednesday

12:00~12:05 Opening Address H. Nakamura, T. Okuyama

12:05~13:05 Chairman T. Okuyama

1. Selection of Operational Electrolyte Systems for Bidirectional Isotachophoresis (II)

Takeshi Hirokawa¹⁾ and Yoshiyuki Kiso²⁾

1)Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University,

2)Hijiyama Women's College

2. Simultaneous Analysis of Anions in Fresh Concretes by Capillary Isotachophoresis

Kazuhiro Kobayasi, Kazunori Hodouchi, Hiroshi Matsubara and Akifumi Yamada

Nagaoka University of Technology

3. Use of Cyclodextrins in The Isotachophoretic Separation of Inorganic Anions

Keiichi Fukushi¹⁾ and Kazuo Hiroy²⁾

1)Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine,

2)Kobe Women's Junior College

13:05~14:05 Chairman T. Hirokawa

4. Countercurrent Electroconcentration (VI)

Hirofumi Tanaka, Shinya Kitagawa and Takao Tsuda

Nagoya Institute of Technology

5. Electrochromatography (XV)

Masakuni Nakashima, Shinya Kitagawa and Takao Tsuda

Nagoya Institute of Technology

6. Simulation Study on The Generation Process of Electroosmotic Flow

Hideo Sakamoto¹⁾, Taira Fujimura¹⁾, Michihisa Tsutahara²⁾ and Toshio Takagi³⁾

1)Hyogo Prefectural Institute of Industrial Research, 2)Department of Mechanical Engineering, Kobe University, 3)Institute for Protein Research, Osaka University

14:05~14:20 Recess

14:20~15:20 Chairman K. Fukushi

7. Study of Capillary Temperature in Capillary Electrophoresis

Tetsuo Nishikawa and Hideki Kambara

Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd

8. Effect of Methanol in Sample Solution on Capillary Electrophoresis

Masafumi Tomita and Toshiko Okuyama

Department of Legal Medicine, Kawasaki Medical School

9. The Relationship of Linearity and Total Amount Introduced by Electromigration

Hideki Sasaki, Jun Yonekubo and Takayuki Takahasi

Nihon Millipore Waters Chromatography Division

15:20~15:35 Recess

15:35~16:55 Chairman A. Yamada

10. The Use of On-Line Sample Cocentration to Increase The Sensitivity of Capillary Electrophoresis

M.Merion¹⁾, R.H.Aebersold¹⁾, M.Fuchs¹⁾ and Masaaki Suzuki²⁾

1)Waters Chromatography Devision of Millipore Corp., 2)Waters Chromatography Division of Nihon Millipore

11. Deveropment of A Capillary Electrophoresis System with On-Line Sample Pretreatment

Ikue Morita, Akiko Hachisuka, Takeshi Yamazaki and Jun-ichi Sawada

National Institute of Health Sciences

12. Selective Analysis of Metal Ions by Capillary Electrophoresis

Takeshi Hirokawa¹⁾, Wen Xia¹⁾, Takao Ohta¹⁾, Takayuki Shibayama¹⁾, Kazuhiro Nishimoto¹⁾, Fumitaka Nishiyama¹⁾ and Yoshiyuki Kiso²⁾

1)Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University,

2)Hijiyama Women's College

13. Effects of Additives on The Separation of Metal Chelates by Capillary Zone Electrophoresis

Takashi Yokoyama and Michio Zenki

Faculty of Science, Okayama University of Science

December 9, Thursday

9:00~10:00 Chairman Y. Kiso

14. Determination of Ions in Water and Solid Waste Leachates

Yosiyuki Takahasi¹⁾, P.Romano¹⁾ and J.Krol²⁾

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

15. Separation of Alkaline Metal Ions by Capillary Electrophoresis with A Photodiode Array Detector

Katsushi Sasa, Masumi Ono and Keiko Kitagishi

Otsuka Electronics Co.

16. Use of Organic Modifiers in Micellar Electrokinetic Chromatography

Koji Otsuka¹⁾, Ryo Koike¹⁾, Mitsuo Higashimori¹⁾, Kaoru Karuhaka¹⁾, Yukihiro Okada²⁾ and Shigeru Terabe³⁾

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

2)Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University,

3)Department of Material Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

10:00~11:00 Chairman T. Sawada

17. Effects of Oils on Separation Selectivity in Microemulsion Electrokinetic Chromatography

Yukihiro Okada¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾

1)Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University,

2)Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

18. Analysis of Environmental Pollutants by Electrokinetic Chromatography (X). Analysis of Lower Aliphatic Aldehydes

Sahori Takeda, Shin-ichi Wakida, Masataka Yamane, Akinori Kawahara and Kunishige Higashi

Osaka National Research Institute, AIST

19. Micellar Electrokinetic Chromatography Using High - Molecular Surfactants: Use of Acrylic Acid - Acrylic Ester Copolymer

Hiroto Ozaki¹⁾, Shigeru Terabe²⁾ and Akinobu Ichihara³⁾

1)Kaneka Techno Research Co. Ltd., 2)Faculty of Science, Himeji Institute of Technology,

3)Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co. Ltd.

11:00~12:00 Chairman Y. Akada

20. Separation of Free Amino Acids by Capillary Electrophoresis

Toshihiko Maruyama and Kiyoshi Maruno

Waters Division of Nihon Millipore

21. Capillary Ion Analysis Applied for Forest Chemistry (II) -Analysis of Aromatic Compounds-
Jun Yonekubo¹⁾, Hideki Sasaki¹⁾, Yoshiyuki Takahashi¹⁾ and Minoru Terazawa²⁾

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

22. Carbohydrate Analysis by High-Performance Capillary Electrophoresis as PMP Derivatives

Susumu Honda, Isao Sasaoka and Shigeo Suzuki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

12:00~13:00 Lunch

13:00~14:00 Chairman Y. Baba

23. Application of Capillary Electrophoresis to Pharmaceutical Analysis (VIII) Determination of Alkaloids in Ohrengetocho Decoctions and its Extracts

Nobuyuki Ishii and Yoshinobu Akada

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University

24. Capillary - Zone Electrophoretic Analysis of Organic Acids in Cerebrospinal Fluid from Patients with Various Central Nervous System Diseases

Atsushi Hiraoka¹⁾, Isao Miura¹⁾, Jun-ichiro Akai¹⁾, Itaru Tominaga²⁾, Munekazu Hattori²⁾ and Hideki Sasaki³⁾

1)Kyorin University School of Health Sciences, 2)Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital, 3)Nihon Millipore Co.

25. Non-Enzymatic Formation of Cisplatin-Glutathione Complex Molecules and Their Detection by Means of Capillary Electrophoresis

Satoshi Nitta¹⁾, Hideo Sasagawa¹⁾, Shigeru Matsukawa²⁾ and Chizuru Sugimoto²⁾

1)Otsuka Electronics Co.,Ltd., 2)Fukui Medical School

14:00~15:00 Chairman S.Terabe

26. Determination of Benzodiazepine Antiepileptics in Serum by Micellar Electrokinetic Chromatography

Masaoki Imazawa and Erika Akahoshi

National Institute of Neuroscience, NCNP

27. Determination of Unbound Drug Concentration by High-Performance Frontal Analysis / High-Performance Capillary Electrophoresis

Toshio Ohara, Akimasa Shibukawa, Yasuki Yoshimoto and Terumichi Nakagawa

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

28. Investigation of Enantiomer Excess by Capillary Electrophoresis

Yasuyuki Kurosu, Yoshiko Shisa, Yasuyo Satou and Masaaki Senda

JASCO Technical Research Laboratories Corporation

15:00~15:40 Chairman K. Otsuka

29. Chiral Separation of A New Xanthine Oxidase Inhibitor, BOF-4272, by Using High-Performance Capillary Electrophoresis

Yasuki Yoshimoto¹⁾, Akimasa Shibukawa¹⁾, Terumichi Nakagawa¹⁾, Masuhiro Nishimura²⁾, Shinsaku Naitoh²⁾, Hideo Sasagawa³⁾ and Satoshi Nitta³⁾

1)Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2)Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., 3)Otsuka Electronics Co. Ltd.

30. Separation of Enantiomers by Affinity Electrokinetic Chromatography Using Avidin
Yoshihide Tanaka¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾

1)Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd., 2)Faculty of Science, Himeji Institute of
Technology

15:40~15:55 Recess

15:55~16:55 Invited Lecture Chairman H. Nakamura

Douglas Westerlund (Uppsala University, Sweden)

"Capillary Electro-separations of Peptides and Carbohydrates Utilising Secondary Equilibria"

18:00~20:00 Banquet

December 10, Friday

9:00~10:00 Chairman T. Tsuda

31. Advanced Fluorescence Detector for Multi - Capillary Electrophoresis

Kyoji Ueno¹⁾ and Edward S. Yeung²⁾

1)Developmental Research Laboratories, Shionogi & Co. Ltd.,

2)Ames Laboratory-USDOE, Iowa State University

32. Development of UV Pulsed Laser-Induced Capillary Vibration Method and Its Application to
Ultrasensitive Detection of Ultramicro Amounts of Amino Acids

Tamao Odake, Takehiko Kitamori and Tsuguo Sawada

Faculty of Engineering, The University of Tokyo

33. New Fluorescent Labeling Reagents for Capillary Electrophoresis Based on Semiconductor
Laser Fluorescence Detection

Midori Watanabe¹⁾, Totaro Imasaka²⁾, Takashi Kaneda²⁾ and Masanobu Siga³⁾

1)Center of Advanced Instrumental Analysis, Kyusyu University, 2)Faculty of Engineering,
Kyusyu University, 3)Dojindo Laboratories

10:00~11:00 Chairman T. Nakagawa

34. Studies of Carbohydrate-Protein Interaction by High-Performance Capillary Electrophoresis
--Measurement of Binding Constant by Use of Competing Carbohydrates--

Susumu Honda, Shin-ichi Yasueda and Atsushi Taga

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

35. Studies of Carbohydrate-Protein Interaction by High-Performance Capillary Electrophoresis
--Introduction of Ionic Groups for The Binding Constant Measurement of Neutral Carbohydrates--

Susumu Honda, Atsushi Taga and Mika Mochizuki
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

36. Determination of Antigen by Affinity Probe Capillary Electrophoresis

Kiyohito Shimura¹⁾ and Barry L. Karger²⁾

1)Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 2)Northeastern University

11:00~12:00 Chairman T. Takagi

37. Membrane Fraction Collection for Capillary Electrophoresis - Post Run Analysis CE Fractions-

Sachiko Machida¹⁾, Yung-Fung Cheng²⁾, William Warren²⁾ and Martin Fuchus²⁾

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

38. Application of Curdlan Gel Electrophoresis to Biopolymer Analysis

Kenji Hamase, Hiroshi Nakamura and Terumi Nakajima

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

39. Separation of Nucleic Acids and Proteins by Capillary Electrophoresis in The Presence of Soluble Linear Polymer

Hiromi Yamada, Satoshi Nitta, Katsushi Sasa, Masumi Ono and Keiko Kitagishi

Otsuka Electronics Co.

12:00~13:00 Lunch

13:00~14:00 Chairman S. Honda

40. Capillary Electrophoresis of SDS-Proteins Using Pullulan Solution as Separation Medium
Manabu Nakatani¹⁾, Akimasa Shibukawa²⁾ and Terumichi Nakagawa²⁾

1)Pharmaceutical Research Dept., Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd., 2)Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

41. Evaluation of Pullulan Solutions as the Separation Media of DNA Fragments in Capillary Electrophoresis

Eiichi Kogure, Keiichi Kameyama and Toshio Takagi

Institute for Protein Research, Osaka University

42. Basic Studies on the Conditions of Capillary Isoelectric Focusing

Takashi Manabe, Tamotsu Tomohiro and Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

14:00~15:00 Chairman T. Manabe

43. Behavior of the Complexes Formed between Sodium Dodecyl Sulfate and Protein Polypeptide or Peptide in Free Solution Capillary Electrophoresis

M. Rezaul Karim, Susumu Shinagawa and Toshio Takagi

Institute for Protein Research, Osaka University

44. The Analysis of Human Serum Proteins by Capillary Electrophoresis Using Z1-Methyl
Toshihiko Miura¹⁾, Yuko Aizawa¹⁾, Yasuhiko Obara¹⁾, Shigemitsu Yabuki¹⁾, Tadao Funato²⁾,
Takeshi Kawamura²⁾, Shigenori Tsubo³⁾ and Sachiko Machida⁴⁾

1)Department of Clinical Laboratory, Tohoku University Hospital, 2)Department of Clinical and Laboratory Medicine, Tohoku University School of Medicine, 3)Kyowa Synthetic Medical Laboratory, 4)Waters Chromatography Division of Nihon Millipore

45. Separation of DNA on Free Flow Electrophoresis. 4. Electrophoresis by Using of the FFEU/FM for IML-2

Hidesaburo Kobayashi¹⁾, Takashi Goma¹⁾, Muneaki Inagaki¹⁾, Naoaki Ishii²⁾ and Syunji Nagaoka³⁾

1)Faculty of Science, Josai University, 2)School of Medicine, Tokai University, 3)NASDA

15:00~16:00 Chairman T. Kitamori

46. Direct Observation of DNA During Gel Electrophoresis

Hidehiro Oana¹⁾, Yuichi Masubuchi¹⁾, Mitsuhiro Matsumoto¹⁾, Masao Doi¹⁾, Yukiko Matsuzawa²⁾ and Kenichi Yoshikawa²⁾

1)Department of Applied Physics, School of Engineering, 2)Graduate School of Human Informatics, Nagoya University

47. Multiple Sheathflow Gel-Capillary-Array Electrophoresis for DNA Analysis I. Multi-Color Fluorescent DNA Sequencing

Satoshi Takahashi, Takashi Anazawa, Katsuhiko Murakami and Hideki Kambara
Central Research Laboratory., Hitachi, Ltd.

48. Multiple Sheathflow Gel-Capillary-Array Electrophoresis for DNA Analysis II. Study of Multiple Sheathflow Method

Takashi Anazawa, Satoshi Takahashi, Katsuhiko Murakami and Hideki Kambara
Central Research Laboratory., Hitachi, Ltd.

16:00~16:40 Chairman H. Kobayashi

49. Analysis of Human Genetic Information Using Capillary Electrophoresis

Yoshinobu Baba¹⁾, Riyo Tomisaki¹⁾, Mitsutomo Tsuchiko¹⁾, Satoshi Takahashi²⁾ and Hideki Kambara²⁾

1)Kobe Women's College of Pharmacy, 2)Hitachi Central Research Center

16:40~16:45 Closing Address H. Nakamura, T. Nakagawa

4)Hitachi Central Research Center

1)Kobe Women's College of Pharmacy, 2)Kyushu University, 3)Kagoshima University,

Takahashi⁴⁾ and Hideki Kambara⁴⁾

50. Gene Diagnosis of Cancer Using Capillary Electrophoresis
Yoshinobu Baba¹⁾, Mitsutomo Tshako¹⁾, Kenshi Hayashi²⁾, Mitsuru Akashi³⁾, Satoshi

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム 座長一覧

	時間帯	講演番号	座長
第1日 12月8日 (水)			
	開会の挨拶 12:00~12:05		中村 洋 奥山典生
	12:05~13:05	1- 3	奥山典生
	13:05~14:05	4- 6	広川 健
	14:20~15:20	7- 9	福士恵一
	15:35~16:55	10- 13	山田明文
第2日 12月9日 (木)			
	9:00~10:00	14- 16	木曾義之
	10:00~11:00	17- 19	澤田嗣郎
	11:00~12:00	20- 22	赤田良信
	13:00~14:00	23- 25	馬場嘉信
	14:00~15:00	26- 28	寺部 茂
	15:00~15:40	29- 30	大塚浩二
	15:55~16:55	特別講演	中村 洋
第3日 12月10日 (金)			
	9:00~10:00	31- 33	津田孝雄
	10:00~11:00	34- 36	中川照眞
	11:00~12:00	37- 39	高木俊夫
	13:00~14:00	40- 42	本田 進
	14:00~15:00	43- 45	真鍋 敬
	15:00~16:00	46- 48	北森武彦
	16:00~16:40	49- 50	小林英三郎
	閉会の挨拶 16:40~16:45		中村 洋 中川照眞

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム

特別講演

Invited Lecture

CAPILLARY ELECTROSEPARATIONS OF PEPTIDES AND CARBOHYDRATES UTILISING SECONDARY EQUILIBRIA

Douglas Westerlund

Analytical Pharmaceutical Chemistry, Uppsala University Biomedical Centre, Faculty of Pharmacy, P.O. Box 574, S-751 23 UPPSALA, SWEDEN

Short peptides

Electrophoretic mobilities and capacity factors for short peptides were determined in micellar electrokinetic systems (MEKC) using UV-detection at 210 nm (1). On the basis of determined capacity ratios, taurodeoxycholic acid was found to be a selective micellar agent for peptides. Structural features other than hydrophobicity were found to be decisive for the distribution of the peptides to the micellar phase. Basic peptides containing arginine were more highly distributed to the micelles than others, indicating the importance of electrostatic forces in the distribution mechanism. In systems with polyacrylamide-coated capillaries the micellar velocity toward the anode is larger than the electroosmosis, and conditions permitting splitting of a series of related peptides, i.e. some peptides migrating with the micelles and others toward the cathode resulting in infinite selectivities were developed.

Enkephalin-type peptides and protein kinase A substrates

Neutral and anionic micellar agents, the former also in the form of mixed micelles with hydrophobic amines, have been used for studies on the separation of enkephalin-related peptides and protein kinase A substrates. The electroosmosis has been controlled by pH, capillary coating and the addition of cationic monomers to the BGE. Use of anionic micellar agents at low pH, where the solutes are positively charged, give often high selectivities but low efficiencies; the latter effect probably being due to electrostatic surface interactions between adsorbed anionic monomers and the cationic solutes. The use of neutral or cationic micellar agents is therefore preferred. The separation window can be increased by combining reversed osmosis and neutral micelles, when the solute electrophoretic mobilities are directed against the cathode. The influence of peptide structure on the distribution to the micelles, studied by determination of capacity factors, indicate that electrostatic interactions play an important role. MEKC is demonstrated to be an attractive alternative in separating peptides that are difficult to separate by CZE.

1975
PhD
over 100 papers

{ Chromatographic
etc

Int. Bio Pharm. Symp.
1971.

Biochemical

—特1—

Carbohydrates

Glycoconjugates were separated by capillary electrophoresis at alkaline pH and the migration order was investigated using different complex forming agents in the electrolyte (2). Addition of cationic micelles, formed by cetrimide (CTA) hydroxide, made separation of anomers and element analogues possible. Boric acid gave the highest selectivity but the peak efficiency was slightly lower due to slow kinetics of the complexation mechanism. Although the background electrolyte had very high pH-values no indications on instabilities of the fused silica capillary or the analytes were observed during the separation conditions used.

An indirect detection technique was studied for mono- to tetrasaccharides at alkaline pH. Tryptophan and furanacrylic acid were used as anionic markers; N-benzyl-cinchonidium and nicotinamide as cationic and neutral markers, respectively. Highest response was obtained with the anionic markers, and the compounds with mobilities close to the markers showed the highest response. The response pattern followed generally the theory outlined by Poppe et al. (3). Pico- to attomole amounts of the carbohydrates could be determined by UV-detection at 280 to 290 nm.

References

1. I Beijersten and D Westerlund
Anal. Chem. In press.
2. M. Stefansson and D Westerlund
J. Chromatogr. 632 (1993) 195
3. G J M Bruin, A C van Asten, X Xu and H Poppe
J. Chromatogr. 608 (1992) 97

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム

一般講演

1 双方向等速電気泳動法における電解液系の選択 (II)

(広島大学・工) ○広川健、(比治山女子短期大学) 木曾義之

SELECTION OF OPERATIONAL ELECTROLYTE SYSTEMS FOR BIDIRECTIONAL ISOTACHOPHORESIS(II)

Takeshi Hirokawa and Yoshiyuki Kiso*

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,
Hiroshima university, *Hijiyama Women's College

ABSTRACT - Bidirectional isotachopheresis was applied to the separation of metal ions forming chelate complexes with EDTA. Electrolyte condition suitable for the selective separation of metal ions as anions and cations was discussed in relation to the difference of the stability constants.

1. はじめに

演者らは等速電気泳動法が原理的にアニオン・カチオン共に可能である事(双方向等速電気泳動、bidirectional ITP)を確認すると共に、この現象を分析・分取に利用するために電解液系が満足していなければならない条件を示し[1, 2]、pH領域3-10の範囲で双方向等速電気泳動が可能な15種の電解液システムを示した[3]。従来等速電気泳動法で使用されてきた多くの電解液系ではアニオンのみもしくはカチオンのみが等速電気泳動する。すなわち等速電気泳動法の特徴であるリーディング電解液の濃度に応じて試料が濃縮もしくは希釈される効果(濃度調整効果)はリーディングイオンと同符号のイオンに対しては期待できるが、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のみであった。

これに対して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析・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。さらに分離の場を双方向に展開できる事で従来の手法の枠を超えた新しい分離システムの開発が可能となる。本研究では本来カチオンである種々の金属イオンをEDTAキレートの生成により符号転換させ双方向等速電気泳動分離を試みた。理論的解析を可能にするためEDTAおよびキレートの移動度を決定すると共に、金属イオンの選択的分離を回収率良くおこなうための電解液条件とキレートの安定度定数との関連を明らかにした。

2. 実験方法

試料としてはCa, Mn, Ni, Cd, Pb, Al, Fe(II), Y, La, Ce, Pr, Gd, Luその他の塩化物を使用し、酢酸でpHを4.8に調整した等モル量のEDTA水溶液を加えた。EDTAおよびキレートの移動度の決定、回収率の測定に使用した電解液系を表-1に示した。定性指標REの測定に使用した検出器は高周波非接触電導度検出器(Dr. B. Gaš, Charles univ., Prague)でPTFE分離管の内径は0.25mmである。泳動装置本体にはZKI-001(LABECO, Slovakia)を、高圧電源としては島津IP-2A用のものを転用した。

3. 結果と考察

図-1はLa, Ce, Pr, Gdのうちから一種とMnとの混合試料を双方向に展開した場合のゾーン検出時間を示したものである。等速電気泳動法では試料ゾーンの濃度は試料毎に一定となるため、ゾーン長あるいはゾーン検出時間が定量指標となる。使用した陽極液は20 mM HCl / β -アラニンバッファー (pH = 3.6)、陰極液は20 mM アンモニア水 / 酢酸 (pH = 4.8) である。

この条件ではMn ($\log K = 15.63$) は全くキレート形成せずカチオンとして泳動しているのに対してLaやCeはアニオン(キレート)およびカチオンとして同時に検出されている。Pr, Gdと次第に安定度定数が増大するにつれカチオンとしては泳動しなくなりアニオンとして泳動するようになる。こうしてMnを基準とした場合、 $\log K$ で3.5(約3500倍)異なるとアニオン・カチオン双方向に選択的分離が可能である事が明らかになった。

算出した移動度、回収率に関する試料ゾーン中の自由金属濃度などシミュレーションの詳細は講演で報告する。

表-1 使用した電解液系

陽極液 (アニオンリーディング液、カチオンターミナル液)	
(1) 20mM HCl / トリグリシン,	pHL = 3.1
(2) 20mM HCl / β -アラニン,	pHL = 3.6
(3) 20mM HCl / ϵ -アミノカプロン酸,	pHL = 4.4
(4) 20mM HCl / ヒスチジン,	pHL = 6.0
陰極液 (カチオンリーディング液、アニオンターミナル液)	
(1) 20mM NH ₄ OH / 酢酸,	pHL = 4.8
(2) 20mM NH ₄ OH / カプロン酸,	pHL = 4.8
(3) 20mM NH ₄ OH / MOPS,	pHL = 6.0

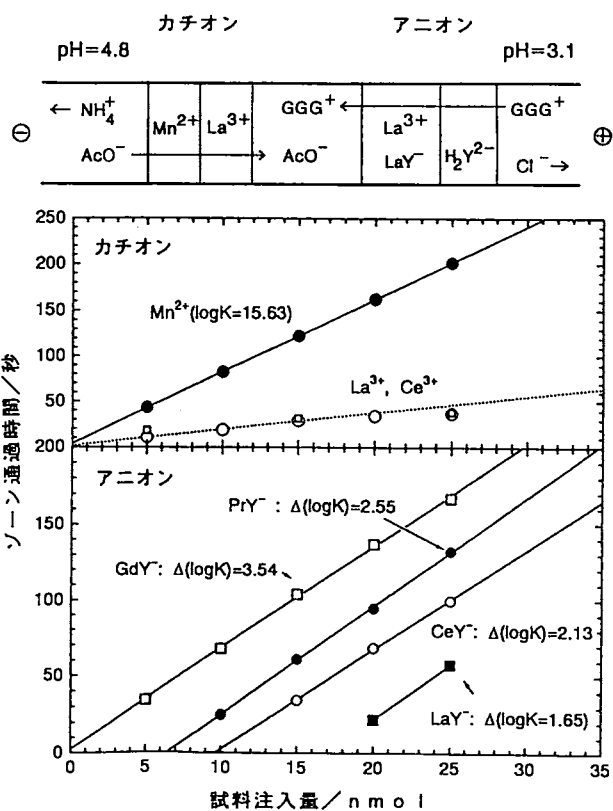


図-1 金属イオンの双方向分離挙動と安定度定数

[1] 渡辺和彦・広川健・木曾義之、SCE91、東京(1991)。
 [2] T.Hirokawa, K.Watanabe, Y.Yokota and Y.Kiso, J.Chromatogr., 633, 251(1993)。
 [3] 広川健、木曾義之、SCE92、姫路(1992)。

2

細管式等速電気泳動法による フレッシュコンクリート中の 陰イオンの同時分析

(長岡技術科学大学) ○小林和容・程内和範・松原 浩・山田明文

SIMULTANEOUS ANALYSIS OF ANIONS IN
FRESH CONCRETES BY CAPILLARY ISOTACHO-
PHORESIS.

Kazuhiro KOBAYASHI・Kazunori HODOUCHI・Hiroshi MATSUBARA・Akifumi YAMADA
Nagaoka University of Technology

Capillary isotachopheresis was applied to the simultaneous analysis of anions, especially chloride, chromate and sulfate which are major constituent anions of fresh concretes. Some difficulty was found in the simultaneous analysis since their contents were extremely different from each other. Therefore, two kind of detector were employed in order to perform the analysis ; chloride and sulfate ions were detected by a potential-gradient detector and chromate ion was detected by a UV detector ($\lambda = 254\text{nm}$). 5mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$ methanol (20%V/V) solution and 10mM CH_3COONa solution were used as a leading electrolyte and as a terminating electrolyte, respectively. These anions in fresh concrete samples of $2\mu\text{l}$ were detected simultaneously without any pre-treatment of the samples. The time required for the measurement was less than 30 min.

緒言 コンクリートは、種々の建築物に用いられ社会生活の基盤づくりに広く役立っている。また、練り終わったまだ固まっていないコンクリートは、フレッシュコンクリートと呼ばれ、セメント、砂、砂利、混和剤、水を調合したものである。これら各成分から溶け出すイオンとして主に、塩化物イオン、クロム酸イオン、硫酸イオンがある。ここで、基準値を越える塩化物イオンは、構造物の劣化に伴う塩害を引き起し、人体にきわめて有害であるクロム酸イオンについては、フレッシュコンクリートろ液が淡黄色に着色する程度溶け出しているため、環境問題に深く関わっている。硫酸イオンについては、フレッシュコンクリートの凝結と硬化に深く関係し、また、相対量が圧倒的に多く、これら陰イオンの同時分析をする上で妨害となる場合がある。これまで個々のイオンについての分析法は、報告されているが、相対量が大きく異なる同時分析は、あまり検討されていない。そこで本研究は、各種イオンを含む分離・分析法として細管式等速電気泳動法を用いることにより、フレッシュコンクリート中の陰イオンの同時分析について検討した。

実験 実験装置としては、電位勾配検出器を備えた細管式等速電気泳動分析装置 IP-3A (島津製) に紫外吸光検出器 UVD-3A (島津製) を取り付け用いた。泳動管には内径 0.7mm の太い泳動管と内径 0.5mm の細い泳動管の PTFE チューブ用いた。試料であるフレッシュコンクリートは、練った後吸引ろ過して得られたろ液を用いた。電解液には、5 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2 + 20\% (\text{V}/\text{V})$ メタノールをリーディング電解液として、10 mM CH_3COONa をターミナル電解液として用い同時分析を行った。

結果と考察 フレッシュコンクリートの主な性質がセメントにより決まることと、混和剤などからの不純物イオンの混入が避けられることから、まずセメントペースト液について同時分析を行った。適当な泳動条件下でリーディング電解液として 5 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液で分析を行ったところ、各イオンのゾーンは不安定で、分離が不明瞭であったが、リーディング電解液に 5 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2 + 20\% (\text{V}/\text{V})$ アセトンを用いると、ゾーンが安定し明瞭に分離することができた。しかし、相対量が微量であるクロム酸イオンは、電位勾配検出器では検出することができなかった。そのため、高感度な紫外吸光検出器 ($\lambda = 254 \text{ nm}$) を用いて検出しようとしたところ、この波長にアセトンの強い吸収があり、クロム酸イオンを検出することができなかった。そこで、この波長に吸収のないメタノールをリーディング電解液に 5 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2 + 20\% (\text{V}/\text{V})$ メタノールとして用いて行ったところ、明瞭に分離・定量することができた。このように、セメントペースト液の同時分析では良い結果が得られたため、フレッシュコンクリートに対してもリーディング電解液に 5 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2 + 20\% (\text{V}/\text{V})$ メタノールを用いたところ、塩化物イオン、硫酸イオンに対しては、電位勾配検出器により、クロム酸イオンについては、紫外吸光検出器を用いることにより、分析試料 $2 \mu\text{l}$ で、同時に分離・定量することができた。(Fig. 1) また、分析結果をイオンクロマトグラフィー及びジフェニルカルバジド吸光光度法と比較したところ、良く一致した。これより、細管式等速電気泳動法を用いることにより、フレッシュコンクリート中の陰イオンを前処理なしに、分析時間 30 分以内で同時分析を行うことが可能であった。

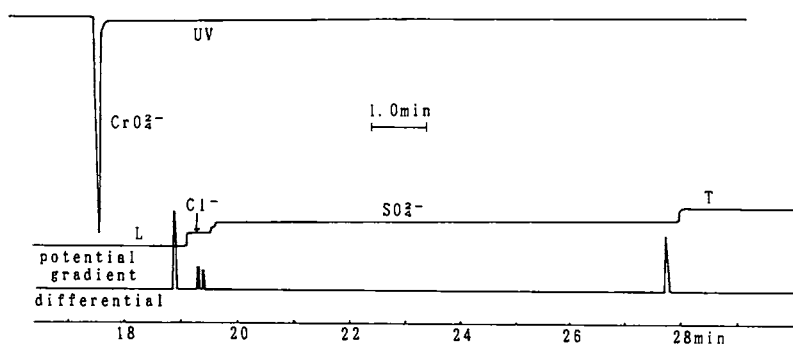


Fig. 1 Isotachopherograms for the separation of chloride, chromate, and sulfate ion in fresh concrete solution.
Leading electrolyte, 5 mM $\text{Ca}(\text{OH})_2 + 20\% (\text{V}/\text{V})$ methanol;
sample volume, $2 \mu\text{l}$; chart speed, 2 cm/min.

3

シクロデキストリンを用いた細管式等速電気泳動法による無機陰イオンの分離

(神戸商船大・船貨輸送研究施設) ○福士恵一
(神戸女子短大) 日色和夫

USE OF CYCLODEXTRINS IN THE ISOTACHOPHORETIC SEPARATION OF INORGANIC ANIONS

Keiichi FUKUSHI

Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe
University of Mercantile Marine
and

Kazuo HIRO

Kobe Women's Junior College

The effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on the R_E values of several inorganic anions in capillary isotachopheresis were investigated. The R_E values of several anions (e.g. chromate, perchlorate and periodate ions) increased with increasing the cyclodextrin concentration in a leading electrolyte. On the other hand, the R_E values of a few anions (e.g. fluoride ion) remained almost constant or slightly decreased with increasing the cyclodextrin concentration. For the determination of periodate ion, β -alanine was better than histidine as the buffer added to the leading electrolyte. Triton X-100 was also better than polyvinylalcohol as the additive for the leading electrolyte. The zone length for periodate ion decreased or the zone disappeared with increasing the cyclodextrin concentration.

1. 緒言

われわれは第9回電気泳動シンポジウムにおいて、通常の条件では細管式等速電気泳動法により分離困難な亜硝酸・硝酸イオン、シアン酸・チオシアン酸・セレンシアン酸イオン、塩素酸・過塩素酸イオン、塩化物・ヨウ化物イオンが、リーディング液中に適当量の α -シクロデキストリン(CD)を添加することにより、分離できること等を示した¹⁾。この際、リーディング液のバッファーとしてヒスチジンを用いたが、今回は β -アラニンを用い、 α -、 β -、 γ -CDの種々の無機陰イオンの R_E 値に対する影響について、過ヨウ素酸イオンの挙動を中心に検討した。以上の結果について報告する。

2. 実験

装置は島津細管式等速電気泳動分析装置 IP-2A型を使用した。泳動管は内径 1.0 mm, 長さ 10 cm の PTFE 製チューブに, 内径 0.5 mm, 長さ 15 cm の FEP 製チューブを接続したものである。検出器は電位勾配検出器を用いた。リーディング液は一定量の CD (~50 mM) と 0.01% Triton X-100 とを含む 5 mM 塩酸であり, β -アラニンで pH を 3.6 に調整した。ターミナル液は 10 mM 酢酸ナトリウムである。試料として 1 mM の各イオンを含む溶液 5 μ l を装置に導入した。泳動電流は最初の 9 あるいは 10 分間 150 μ A とした後, 50 μ A に切り換えた。今回は分析対象イオンとして, クロム酸, テトラチオン酸, フッ化物, 過塩素酸, ヨウ化物, ヨウ素酸, 過ヨウ素酸イオンの R_E 値の変化を調べた。

3. 結果

初めに過ヨウ素酸イオンの分離に対して最適なリーディング液のバッファーについて検討した。その結果, バッファーとしてヒスチジンをを用いて過ヨウ素酸イオン標準溶液を分析するとゾーンが 2 つ現れた。過ヨウ素酸以外のゾーンは, 過ヨウ素酸とヨウ素酸イオンの混合溶液の分析結果から, ヨウ素酸イオンに相当するものであると思われる。これについては目下検討中である。また分離を改善するためにリーディング液に加える添加剤としてポリビニルアルコール²⁾を用いた場合, ヨウ素酸イオンと過ヨウ素酸イオンとを分離することはできなかった。CD の濃度が増加するにつれて, Fig. 1 に示すように過ヨウ素酸イオンの R_E 値は増大したが, そのゾーン長は減少し, α -CD では 40 mM, γ -CD では 30 mM ではほぼ消滅した。代わりに現れたゾーンはヨウ素酸イオンに相当するものであると思われるが, これについてもさらに検討する必要がある。また, クロム酸, 過塩素酸, ヨウ化物イオンも α -, β -, γ -CD の影響を受け, それぞれ R_E 値が増大した。テトラチオン酸イオンも β -, γ -CD により同様の影響を受けたが, フッ化物, ヨウ素酸イオンは CD の種類により異なった影響を受けた。

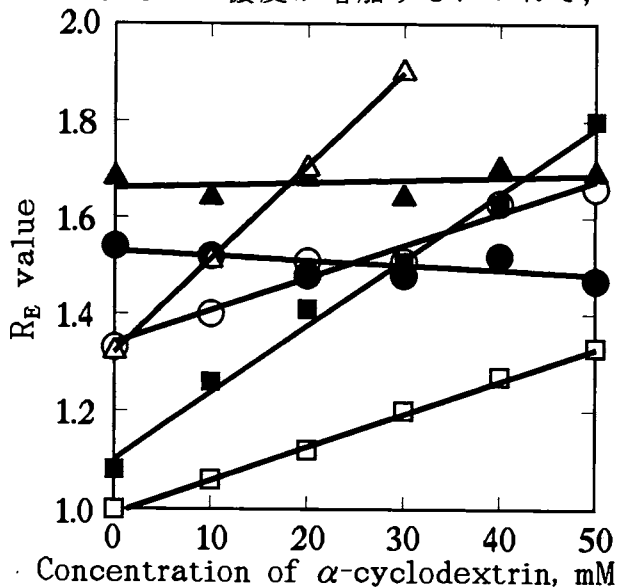


Fig. 1. Effect of α -cyclodextrin concentration on the R_E values of some anions. ○, CrO_4^{2-} ; ●, F^- ; ■, ClO_4^- ; □, I^- ; ▲, IO_3^- ; △, IO_4^- .

文献

- 1) 福士恵一, 日色和夫, 第9回電気泳動シンポジウム(細管・等速電気泳動)講演要旨集, p. 7 (1989).
- 2) S. Honda, H. Wakasa, M. Terao and K. Kakehi, J. Chromatogr., 177, 109 (1979).

4 向流電気濃縮法 (VI)

(名古屋工業大学 応用化学科) ○田中 浩史、北川 慎也、
津田 孝雄

— COUNTERCURRENT ELECTROCONCENTRATION (VI) —

Hirofumi TANAKA, Shinya KITAGAWA & Takao TSUDA

Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa, Nagoya 466

Countercurrent electroconcentration is based on counter flows in small channels, in which are a pressurized flow velocity and an electrophoretic velocity.

In this presentation, we will describe the countercurrent concentration using a glass tube connected two reservoirs and also a new apparatus for electroconcentration.

We use a filter instead of a glass tube as a channel. This new device reduces the period, which is necessary for concentration.

(はじめに)

向流電気濃縮法とは二つの容器をガラス管でつなぎ、各容器に+, -の電極を付け一方にマイクロフィーダーを取り付け吸引する。その時に起こる圧力差流と電圧を印加することにより生じる電気移動度とで濃縮する方法である(1)。

例えば、陽イオンを濃縮したい場合は、-極側容器に試料溶液を入れ+極側をマイクロフィーダーによって吸引する。電圧を印加し吸引を行うと、電気移動度による速度が圧力差流より大きい溶質は試料溶液を入れた容器側に留まり、電気移動度が圧力差流より小さい溶質や圧力差流の方向が同じ溶質や中性物質は吸引される。本実験ではDNAに、この方法を用い濃縮を行い、またピロロキノリンキノンのグリシンとのオキサゾール付加体(PQQ-gly)を用いて視覚的に濃縮される様を観察した。また同じ原理を用いて、フィルター(孔径 $0.45\mu\text{m}$)を使う新しい装置を考案し濃縮実験を行った。即ち、フィルターの細孔内での向流を利用する方法である。

(実験)

ニシンの精液のDNAおよびPQQ-glyに関しては、Fig. 1の様な装置を用いて濃縮を行った。二つの容器はガラス管(内径 1mm 、長さ 1cm)でつなぎ印加電圧は 600V を用いた(Fig. 3)。またマイクロフィーダーでの吸引流量は $0.037\text{ml}/\text{min}$ である。また、二つの容器をガラス管でつなぐのではなく孔径 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターによる濃縮装置をFig. 2に示す。この装置を用いて印加電圧 600V 、試料としてナフタリン-1, 3, 6-トリスルホン酸ナトリウム

を用い濃縮を行った。この場合は吸引流量は $0.073 \text{ mL} / \text{min}$ を用いた (Fig. 4)。

(結果, 考察)

濃縮の確認を充填剤に G3000SW (TOSOH) を用いた GPC により行った。DNA は Fig. 3 より 7 倍に濃縮されていた。(理論倍率 7.1 倍)

ナフタリン-1, 3, 6-トリスルホン酸ナトリウムは Fig. 4 より 8.6 倍に濃縮されていた。(理論倍率 10 倍)

フィルターを用いた場合には濃縮時間を短縮することができる。

(1) Akihiro Hori, Takatoshi Matsumoto, Yuji Nimura, Masakazu Ikeda, Hideki Okada & Takao Tsuda ; Analytical Chemistry, 1993 (in press)

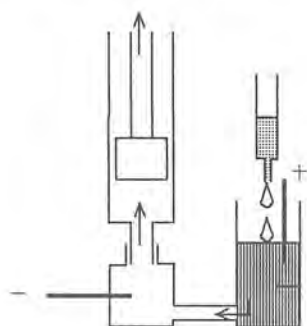


Figure 1

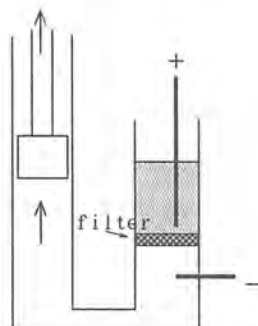


Figure 2

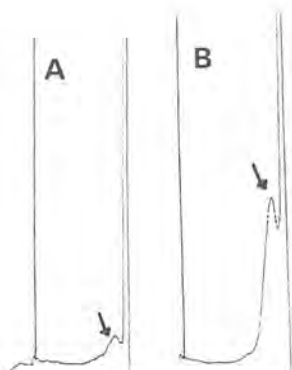


Figure 3

Concentration of herring DNA by CCEC.

A. before concentration

B. after concentration

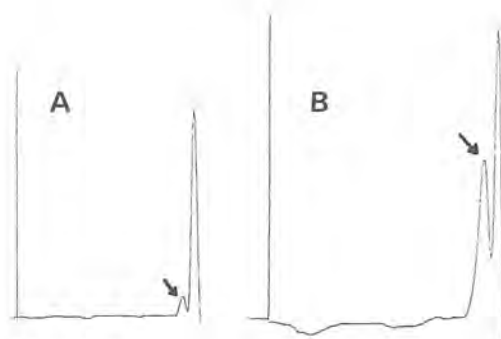


Figure 4

Concentration of Naphtalene-1, 3, 6-trisulfonic acid trisodium salt by filter-CCEC

A. before concentration

B. after concentration

5 電気クロマトグラフィー (XV)

(名古屋工業大学 応用化学科) ○中島真邦, 北川慎也,
津田孝雄

Electrochromatography(XV)

Masakuni NAKASHIMA, Shinya KITAGAWA and Takao TSUDA

Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa, Nagoya 466

Electrochromatography is performed using a Liquid chromatographic column with high applied voltages. It has two unique factors: Electrophoretic movement of solutes and electroosmotic flow generated. This two contributions may give an effective method for separation of mixtures. In this presentation, we study electrochromatography using ODS and anion exchange columns. Using the former column, we study chromatographic behaviors of benzoic acid and trimesic acid, and the latter typical anions.

はじめに

電気クロマトグラフィーとは、液体クロマトグラフィーのカラムに電圧を印加したものであり、その特徴としては、i) カラム中に固定相と移動相とがあり、二相間において相平衡が存在する、ii) 溶質の持つ電気移動度による電気泳動、iii) 圧力差流と、電圧の印加により生じる電気浸透流、などが挙げられる。

ここで、圧力差流、電気浸透流と溶質の泳動の方向が同じの場合、非常に速やかに溶出させることができ、対して、溶質の泳動が流れと反対の方向を持ち、しかも流れよりも大きい場合、溶質がカラムに留まることを利用して、濃縮を行うことができる。

電気浸透流や電気泳動の寄与を大きくするには、カラムに印加する電圧を大きくすれば良いが、それにともない発生するジュール熱も大きくなる。ジュール熱による気泡の発生を抑制することは大変重要なことである。

これまでカラムとしては、内径2 mmのガラスカラム、内径0.5 mmのテフロンカラム、内径2 mm x 1 mmの長方形断面のレクタングラーキャピラリー及び50 μ mフューズドシリカキャピラリーカラムを用いてきた。また、充填剤としてはODS (SHISEIDO Capcell ODS), GPC用充填剤(TOSOH G3000SW)などを用いてきた。

これらの研究から、電気クロマトグラフィーにおける溶質の移動、連続注入による特定成分の濃縮ができる等を明らかにしてきた。

装置

カラムは、ODS (SHISEIDO Capcell ODS)および陰イオン交換能を持つ充填剤 (TOSOH TSKgel IC-Anion-SW)とフューズドシリカキャピラリーとを用いて調製したものをを用いた。検出は、前者はUV吸収により、後者はUV間接吸収による。電圧はカラム軸方向に印加するが、印加しない状態では、通常の液体クロマトグラフィーである。

結果

i) ODSカラムによる典型的な分離例

安息香酸とトリメシン酸の混合試料を用いた場合のクロマトグラムをFig. 1に示す。安息香酸とトリメシン酸とでは、前者がより大きな電気移動度を持つために、溶出時間が後者より長くなっている。

ii) 電気移動度による速さ v (mob) と電気浸透流の速さ v (osm)

安息香酸の v (mob) および v (osm) と溶離液の pH との関係とを調べた。溶離液には各 pH に調製した 10 mM マロン酸-水酸化ナトリウムとメタノールを 1 対 1 で混合したものを使用した。pH 9.4 のときのトリメシン酸の溶出時間 t より v (press) を求め $t = L \{ R (v$ (press) + v (osm) - v (mob)) $\}^{-1}$ の式(ただし L ; カラム長, R ; 移動度比)を用い、安息香酸の溶出時間の変化により v (mob) を、中性物質であるエタノールの溶出時間の変化より v (osm) を求め、Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

iii) 陰イオン交換カラムによる挙動の例

2 mM 塩化ナトリウムを試料とした場合のクロマトグラムをFig. 4に示す。

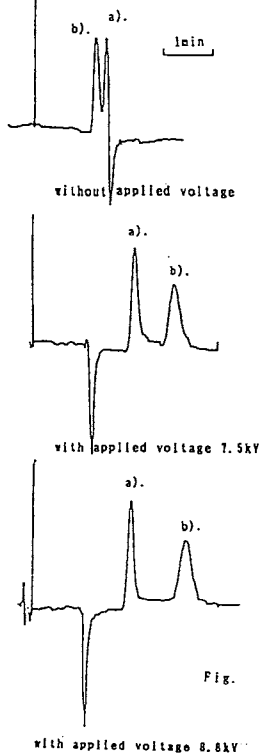


Figure 1
Effluent: 10mM Malonic Acid Sodium Salt (pH 8.0)/Methanol (50/50)
Sample: a). benzoic Acid b). Trimelic Acid
Column: I. D. 50 μ m x 7.5cm packed with ODS(dp 7 μ m)

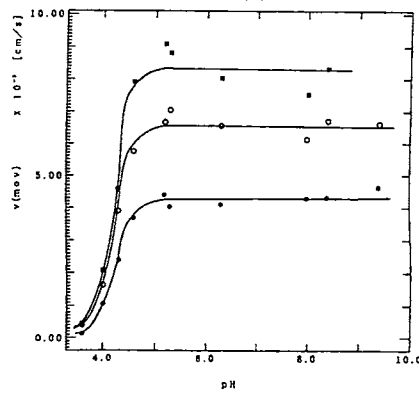


Figure 2

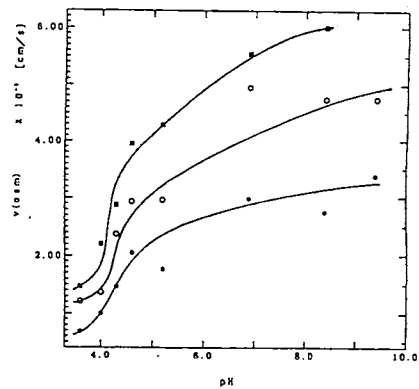


Figure 3

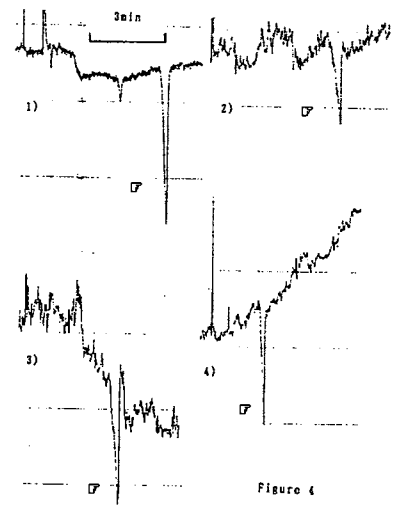


Figure 4

1) without applied voltage
2) with applied voltage 5kV
3) with applied voltage 7.5kV
4) with applied voltage 10kV
5) with applied voltage 12.5kV

Effluent: 0.75mM Sodium Phthalate 0.15mM HEPES 5% Methanol
Sample: Cl⁻
Column: I. D. 50 μ m x 14cm packed with IC-anion(dp 5 μ m)

6 電気浸透流発生過程のシミュレーション

(兵庫県立工技センター*) (神大工**) (阪大蛋白研***)
○阪本英男*、藤村庄*、蔦原道久**、高木俊夫***

SIMULATION STUDY ON THE GENERATION PROCESS OF ELECTROOSMOTIC FLOW

Hideo Sakamoto*, Taira Fujimura*, Michihisa Tsutahara**, Toshio Takagi***

Hyogo Prefectural Institute of Industrial Research*, Department of Mechanical Engineering, Kobe University**, Institute for Protein Research, Osaka University***.

Simulation of the generation process of electroosmotic flow in capillary electrophoresis is being tried using NAVIER-STOKES equation. A reasonable result has been obtained that seems to simulate the very initial process.

Problems to be overcome for simulation of the total process will be discussed.

1. 緒言

キャピラリー電気泳動は、蛋白質や核酸等の分析手段として高い分離能力を示すことが知られている。キャピラリー電気泳動では、通常電気泳動と同時に電気浸透流（以下「EOF」と略す）が発生する。EOFは動電クロマトグラフィーにおけるように積極的に活用される一方、不都合な場合には内壁をポリマーで被覆して抑制することが広く行われるなど、EOFの存在はキャピラリー電気泳動の活用に大きく影響する。従って、その流動状況の把握が重要であるが、ミクロなキャピラリー内部においては、その可視化は差し当たっては不可能である。そこで、実験からのアプローチを補佐するために、EOFの発生状況のシミュレーションを試み始めた。

2. シミュレーション

(1) 界面動電現象

EOFの形成は、キャピラリー内面での界面動電現象に起因するが、EOFの発生過程を以下のように定式化した。

キャピラリーチューブの材料として用いられる熔融石英は、水溶液のpHによりそのシラノール基が解離され、キャピラリー内面は負電荷を有する。

これに対して水溶液中の電解質の正イオンが内壁面に集まり、電気二重層を形成する。水溶液中では、正イオンがキャピラリー内壁面に引き寄せられたことで、正負イオンの相対的な偏りが生じ、これにより局所的な電氣的不均衡が生ずる。

この様子を図1.(a)に示す。ここで図中の κ は、いわゆる電気二重層の厚さを表すパラメーターであり、水溶液中の電荷密度分布を決定づける。

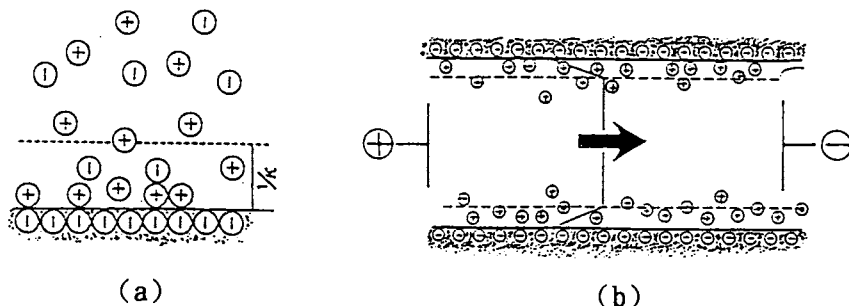


Fig.1 Distribution of Interfacial Charge.

この状態で図1.(b)のように直流電場をかけると、水溶液中の各部分は、その電荷密度の違いに起因して、各々に異なる電氣的駆動力を受けると考えられる。

この流体駆動力の違いは、水溶液の粘性により時間とともに全体的に緩和され、その結果として定常状態においては、流速分布は栓状になると考えられる。

本シミュレーションでは、電圧印加後、E O Fが成長する過程で水溶液の流速分布がどのように変化するかを各時間について求めることとした。

(2) 流速特性を与える支配方程式。

(1)のように定式化したE O Fの発生過程を微分方程式により表現すると、式(1)のように表せる。

$$\rho \frac{\partial v}{\partial t} = \mu \frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(r \frac{dv}{dr} \right) + \rho_e(r) \frac{dV}{dz} \quad (1)$$

v :流速, μ :粘性, ρ :密度, ε :誘電率, ρ_e :電荷密度, V :印加電圧

(1)を導くにあたり、キャピラリー電気泳動の系に、水溶液等の流れの一般的な支配方程式である Navier-Stokes方程式を適用し、流体駆動力として電荷密度に対する電氣力を与えた。

(3) 結果

現在、キャピラリー中での水溶液のpHに対するゼータ電位の測定結果に関する報告(C. Chwer, et al., Anal. Chem., 63, 1801(1991))に基づき、シミュレーションを行っている。

(4) 考察

現在行っているシミュレーションのモデルは、通常のE O Fの成長過程を対象とするものである。今後E O Fの制御を目的とした、ポリマー修飾によるE O Fの抑制のためのモデルの構築等へ展開するのが望ましいと考えられる。

7 キャピラリー電気泳動におけるキャピラリー温度の検討

(株)日立製作所, 中央研究所 ○西川哲夫, 神原秀記

STUDY OF CAPILLARY TEMPERATURE IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS.

Tetsuo Nishikawa, Hideki Kambara

Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd

The dependence of the capillary temperature on electrophoresis conditions both with and without air cooling was derived using the calculated heat transfer coefficients and measured by using thin thermocouples. The calculated electric field dependence of the temperature coincided well with the measured values. The capillary temperature became unstable at a threshold temperature of 64 °C without cooling in the case of 400 V/cm. With air cooling the capillary temperature was stable even at 700 V/cm. The decrease of the inner diameter of the capillary made the electric field causing the temperature instability increase to 800 V/cm, but the threshold temperature remained to be 64 °C as predicted by the calculation. The capillary temperature was shown to be independent of the outer diameter of the capillary. The response time of the capillary temperature to the electric field applying was calculated and measured to be approximately 3 seconds.

1. はじめに

近年、キャピラリーゲルを用いた電気泳動法 (CGE) が、高速で高分離な分析法としてDNA塩基配列の決定や二本鎖DNA断片の分離分析に用いられてきた。この方法の実際の応用のための課題として、キャピラリーゲルの安定性の向上、及び易動度の精度の向上がある。キャピラリーゲルの安定性と易動度の精度にはキャピラリー内部の温度が密接に関わっており、これらを向上させるためには、温度制御の方法や泳動条件を与えたときにキャピラリー内部の温度を求め得ることが重要である。キャピラリー内部の温度については、理論的研究と実験がいくつも行われている。Grushka等はキャピラリーの熱方程式を解き、与えられたバッファ条件の下でのキャピラリー内部の温度差を評価している[1]。また、Nelson等はキャピラリー温度制御法としてヘルメ素子による液温制御法を提案し、その場合のキャピラリー内部の温度を推定している[2]。ここでは、これらの研究において十分に扱われておらず、また実際上使用頻度も高い空冷条件の場合における温度の振る舞いに主に着目した。バッファ充填キャピラリーの場合に絞って、バッファ抵抗率の温度変化を考慮に入れた場合や非定常状態の場合も含めて理論的計算を行い、キャピラリー温度の泳動条件依存性を導いた。さらに、キャピラリー温度の実測によって、我々の計算で得たことの実証を行った。

2. 実験

7Mウレブ、1×TBEのバッファ溶液を充填したキャピラリー (内径(I.D.)0.05mm ~0.1mm、外径(O.D.)0.2mm、

0.375mm、長さ500mm) を調製し、両端に電界を印加した状態でキャピラー温度の測定を行った。キャピラー温度の測定には極細の熱電対 (クロム、アルメル線、0.025mm径) をキャピラーのまわりに巻着け、4方向へ張力を加えることによって密着を良くして測定した。キャピラーの空冷を行う場合には、キャピラーから10cm離れた位置のファンから送風 (風速推定値260cm/sec) した。

3. 結果, 及び考察

キャピラーと外部間の熱伝達率として文献[3]中の式を用い、バッファ電気抵抗率を定数として、キャピラー外表面-外部間温度 dTr を計算した。電界強度が200V/cmを超えると空冷しない場合 dTr は10℃を超え、バッファ電気抵抗率の温度依存性の影響が無視できなくなる。そこで、バッファ電気抵抗率の温度依存性の測定結果を用いて、 dTr の電界強度依存性の計算及び測定を行った。Fig.1にファン冷却の効果, Fig.2にキャピラー外径と内径の影響を示す。実験値は大体において計算値とよく一致している。ファン冷却を行わない場合、400V/cmで dTr は不安定になり沸騰するまで温度上昇するが、ファン冷却により700V/cmでも安定であった。キャピラー内径の減少は電界強度による dTr の変化の勾配を小さくするが、不安定になる dTr は64℃で一定であり、計算による予想が確かめられた。また、キャピラー外径は dTr に対してほとんど影響を与えなかった。これは、キャピラー外表面積の変化の影響を熱伝達率の変化 (サイズ効果) が打ち消しているものと解釈できる。次に、200V/cm電界印加時の dTr の時間変化を測定した結果、時定数として計算結果2.4秒に近い3.4秒が得られた。これは平板における15分に比べ2桁以上の高速応答である。

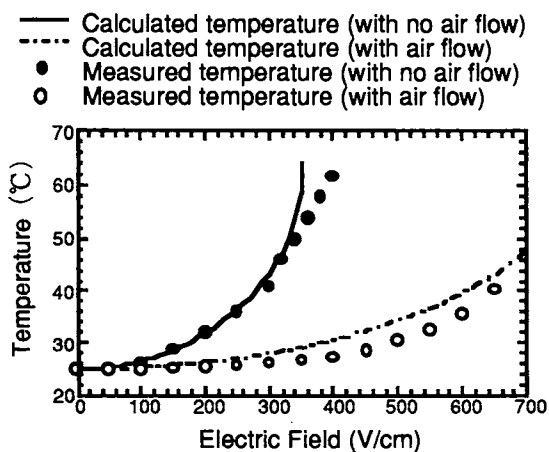


Fig.1 The dependence of the temperature on the electric field. (the effect of fan cooling) I.D.=0.1mm, O.D.=0.375mm

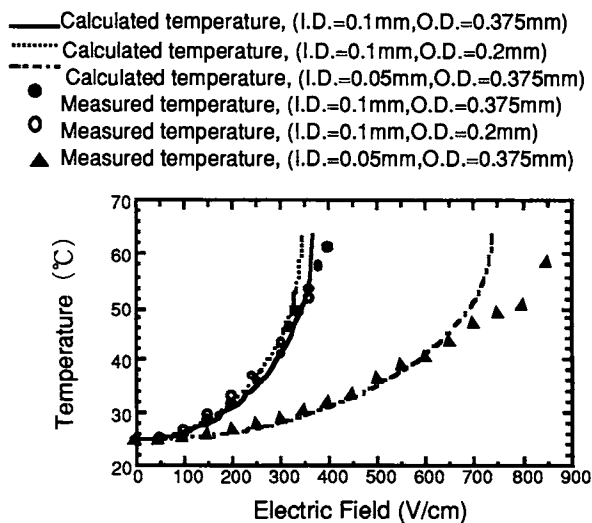


Fig.2 The dependence of the temperature on the electric field. (the effect of I.D. and O.D. with no air flow)

4. 文献

- [1] Grushka, E., McCormick, R. M., Kirkland, J. J. Anal. Chem., 1989, 61, 241-246.
- [2] Nelson, R. J., Paulus, A., Cohen, A. S. Guttman, A. and Karger, B. L. J.Chromatogr. 1989,480, 111-127.
- [3] 機械工学便覧改訂第6版, 日本機械学会, 1977, 第11編, 26-28

8

キャピラリー電気泳動におけるサンプル中メタノールの影響について

(川崎医大) ○富田正文, 奥山敏子

EFFECT OF METHANOL IN SAMPLE SOLUTION ON CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Masafumi Tomita and Toshiko Okuyama

Department of Legal Medicine, Kawasaki Medical School

ABSTRACT: We investigated the effect of methanol in sample solution on the electropherogram obtained by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). Sample methanol overload made it difficult to identify properly the chromatographic peaks of benzodiazepines in the sample solution. Nitrazepam gave two peaks under conditions of sample methanol-overload. These results show that methanol in the sample solution gives a significant effect on the electropherogram obtained.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動, とくにミセル動電クロマトグラフィー (MECC) の薬毒物分析への応用が今後ますます期待されている。ところで, MECCのピーク分離に及ぼす泳動緩衝液中の界面活性剤や有機溶剤などの影響についてはこれまでも多く報告されてきたが, 試料中における有機溶剤の影響については報告がない。一方, 多くの薬毒物は脂溶性であることが多く, 試料調製の上でメタノールなどの有機溶剤を用いる事が多い。今回, 我々はベンゾジアゼピン系薬物の一斉分析を検討していく中で, 一定の泳動条件の下でも試料中のメタノール濃度によって得られるElectropherogramが大きく異なることが分かった。そこで, ニトラゼパムを使って, このMECCの分離に及ぼす試料中メタノール濃度の影響についてさらに検討を加えた。

2. 実験

6種類のベンゾジアゼピン系薬物すなわちBromazepam, Triazolam, Estazolam, Diazepam, FlurazepamおよびNitrazepamのメタノール溶液をストック溶液とし, こ

れを蒸留水で希釈したものを試料溶液とした。電気泳動は、モデル270A (Applied Biosystems)を使用し、フューズドシリカカラム(50 μ m i. d. x 75 cm), 検出波長200 nmで測定した。泳動緩衝液はイオン濃度, SDS濃度, メタノール濃度の影響を検討し, 最終的に15%メタノール, 50 mM SDSを含む5 mM リン酸一ホウ砂緩衝液(pH 8.5)とした。試料は自動減圧吸引方式で注入し, 35 $^{\circ}$ C一定条件下で泳動した。

3. 結果および考察

10%メタノール試料溶液の注入量を1.5 nL(0.5s)から30 nL(10s)で検討した結果, ピークの出現順位, 各薬物の k' , t_o , t_{mc} にとくに変化は認められなかったが, 実際のElectropherogramにおいては注入量30 nLでピークの不完全な分離を示した。つぎに試料中のメタノール濃度を1%から50%として注入量12 nL(4s)で検討した結果, メタノール濃度30%以上で得られるElectropherogramにおいてはピークの同定が困難となり, さらに50%メタノール溶液では注入量3 nLからピーク数が増加する結果を得た。すなわち, 試料調製時でのアルコールに可溶化された状態が薬物の分離自体に大きな影響を与え, Electropherogramにおいてそれぞれの薬物が単一のピークにならないことが示唆された。

そこで, ニトラゼパムについてさらに詳細な検討を加えた。その結果, 試料中のメタノール濃度が10-15%ではシャープな1本のピークであったが, 20%以上では(注入量12 nL一定)ピークの分割がみられ, それは試料中メタノール濃度の増加とともに顕著になった。また試料中のメタノール濃度に依存して, とくに t_{mc} の低下が著しく, その結果 t_o/t_{mc} は増加し, 電気浸透流も増加することが分かった。一方, 試料中メタノール濃度50%で, 注入量を1.5 nL(0.5s)から30 nL(10s)で観察すると, 3 nLですでにピークの分割が観察でき, それは注入量の増加とともに顕著になった。 t_o , t_{mc} , 電気浸透流の変化も上と同様に認められた。50%メタノール溶液の12 nL(4s)注入条件で泳動電圧の効果を検討したが, 5 kVから30 kVまでニトラゼパムは常に2本のピークとして検出された。そこで泳動緩衝液中のメタノール濃度と試料溶液中メタノール濃度のElectropherogramに及ぼす関連について検討した結果, 試料中メタノール濃度が泳動緩衝液中メタノール濃度より高い条件下では2本のピークになる傾向を示した。

以上, MECCによる分析では, 極少量(注入量12 nLでチューブ全体積の0.85%)の試料におけるメタノール濃度が, そのElectropherogramに大きな影響を与えることが分かった。

9 電気インジェクション法の直線性および インジェクション量の関係について

(日本ミリポア・ウォーターズ・クロマトグラフィ事業部) ○佐々木秀輝、米久保淳、高橋孝行

The Relationship of Linearity and Total Amount Introduced by Electromigration

HIDEKI SASAKI, JUN YONEKUBO, TAKAYUKI TAKAHASHI
Nihon Millipore Waters Chromatography Division

There are two types of methods that introduce sample into the capillary in performing Capillary Electrophoresis. One is Hydrostatic method, and another is the Electromigrative method. In this report, the relationship of linearity and total amount introduced by electromigration is examined. The relationship was examined by changing some factors related to the electromigration method.

In very wide dynamic range of inorganic anion, two lines of quadratic or cubic calibration curves were observed. In this case, to get a better cubic line of logarithmic graph was applied. It is observed that changing injection time and injection voltage give linear lines. A relation between response and sample volume that filled sample vial is observed.

目的および背景：

キャピラリー電気泳動のインジェクション法には、大きく分けて、圧力を利用する方法と、電気的な力を利用する方法、即ち電気インジェクション法との2つがある。

電気インジェクション法を用いた場合、その注入量を変化させるパラメーターとして、電圧・注入時間・サンプルの電導度などがある。

今回、低分子イオンの分析を対象として、これらのパラメーターと、実際に得られるレスポンスとの関係について検討したので報告する。

実験：[用いた機器]

CIA Analyzer (キャピラリー電気泳動システム；Waters)
805 データステーション (データ処理；Waters)

[分析条件]

キャピラリー：75 μ ×60cm

検出：254nm, Indirect UV

電圧：20KV, Negative Polarity

泳動バッファー：5mM-Chromate, 2.5%-OFM AnionBT (waters)

1. 検量線の作成：イオンクロマト用スタンダード (Cl, SO₄, NO₃) を Milli-Q 水を用いて適宜希釈し、5ppb～10ppm の範囲で検量線を作成した。分析条件は Injection Voltage 1KV、Injection Time 30 sec で行った。
2. Injection Voltage - Peak Response 曲線の作成：サンプルには 1ppm スタンダードを用い、Injection Time は 15 sec で固定し、Injection Voltage を変化させて分析を行った。
3. Injection Time - Peak Response 曲線の作成：サンプルには 1ppm スタンダードを用い、Injection Voltage は 0.2KV で固定し、Injection time を変化させて分析を行った。
4. Sample Volume - Peak Response 曲線の作成：サンプルには 1ppm スタンダードを用い、Injection Voltage 1KV、Injection time 30sec で固定し、サンプルバイアルに入れる量を変化させて、分析を行った。

5. 同一サンプルの繰り返し分析回数 - Peak Response曲線の作成：サンプルには1ppmスタンダードを用い、Injection Voltage 1KV、Injection time 30 sec で分析を行った。

結果および考察：

Fig. 1はCl⁻イオンの検量線である。2～3オーダーにわたるような広いダイナミックレンジで検量線を引くと、無機イオンの場合では一般に、図に示したような2次あるいは3次で近似できる曲線となる。特に高濃度側では検量線とのずれが大きく、この領域だけで別に検量線を引くと、やはり2次あるいは3次で近似できる別の曲線となる。

一方、(モノ・ジ・トリ)クロロ酢酸などといった有機酸の場合では、このように広いダイナミックレンジで検量線を引いても、ほぼ直線とみなすことができるものが得られる。

このような現象の原因として考えられるのは、サンプルの濃度およびコンダクティビティーの変化に伴う、イオンの移動度の変化或いは、イオンの解離度の変化などと言ったものが挙げられる。

実際にこのような広い領域で無機アニオンの検量線を引く場合には、両対数をとったあと3次の式で近似すると良好な結果を得ることができる (Fig. 2)。

Injection voltage と Peak Response の関係は0.02～1.00KVの範囲で良好な直線性を得たが、それ以外のポイントでは、高電圧側で低く、低電圧側で高く出る傾向が見られた (Fig. 3)。一方、サンプリング時に示す電流値はオームの法則通りに、かけた電圧に比例する結果が得られているので、この両端の領域では何らかの電極反応が起きているか、電圧とPeak Responseとの間に直線関係を示さないファクターがあるのかのいずれかであろうと考えられる。

Injection timeとPeak Response との間では良好な直線性が得られた。

同一の供試液を繰り返し分析すると、Peak Response は等比級数的に減少する傾向が見られた。これはサンプル中の特定のイオンだけを選択的にインジェクションする為に、サンプル中の濃度が変化するためと考えられる。

サンプルバイアル中に入れるサンプルの量を変化させると、それに応じてPeak Responseも変化することが確認された (Fig.4)。

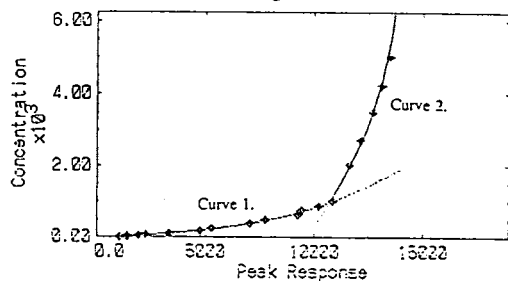


Fig.1 : Calibration Curve of Chloride

Curve 1.
Corr. Coef. (r) : 0.9964 Coef. of Determination (r²) : 0.9928
Formula : $C = 2.518E+01 - 1.218E-02 \cdot R + 9.116E-06 \cdot R^2$

Curve 2.
Corr. Coef. (r) : 0.9989 Coef. of Determination (r²) : 0.9979
Formula : $C = 9.728E+03 - 2.664E+00 \cdot R + 9.116E-06 \cdot R^2$

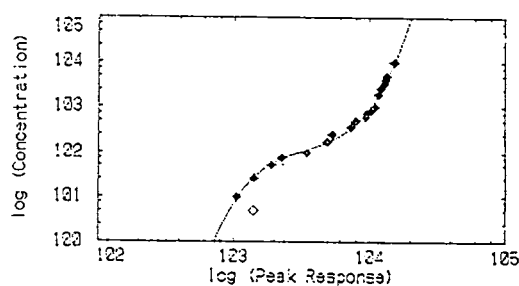


Fig.2 : Calibration Curve of Chloride

Coef. of Determination (r²) = 0.9936
Formula : $\ln C = -472.7 + 174.4(\ln R) - 21.36(\ln R)^2 + 0.8767(\ln R)^3$

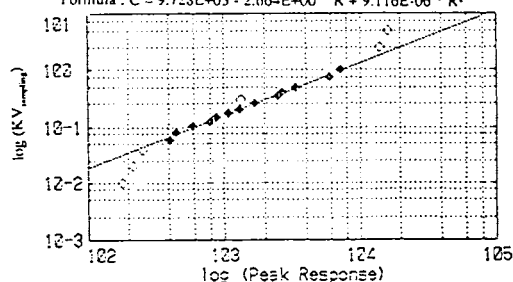


Fig.3 : Sampling voltage - Peak response Curve

Coef. of Determination (r²) = 0.9952
Formula : $\ln V = -8.272 + 0.9282(\ln R)$

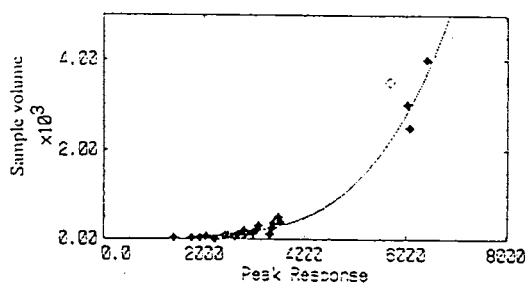


Fig.4 : Sample volume - Peak response Curve

Coef. of Determination (r²) = 0.9839
Formula : $\text{Sample volume} = -931 - 1.043 \cdot R - 3.76E-04 \cdot R^2 - 5.10E-08 \cdot R^3$

キャピラリー電気泳動を用いた高感度 分析のためのオンライン試料濃縮

(ミリポアコーポレート ウォーターズクロマトグラフィー事業部)

M.Merion,R.H.Aebersold,M.Fuchs

(日本ミリポア ウォーターズクロマトグラフィー事業部)

○鈴木 政明

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

(Waters Chromatography Division of Millipore Corp.)

M.Merion , R.H.Aebersold , M.Fuchs

(Waters Chromatography Division of Nihon Millipore)

Masaaki Suzuki

Abstract

Although a multitude of capillary electrophoresis (CE) applications have been reported in the literature, very little work has been documented concerning the analysis of drug from biological matrices, such as serum and urine. These types of samples are difficult to analyze using most analytical techniques, due to both matrix effects and sensitivity limitations. The degree of difficulty can be reduced, however, with recent advances in CE detection and capillary technology. This presentation will outline these enhancements and illustrate how they can be used to analyze drugs at therapeutic levels from biological matrices by CE.

【はじめに】

キャピラリー電気泳動は、近年溶融シリカキャピラリーの持つ高分解能を活かし生化学分野を初めとして、農芸化学、有機合成化学、環境化学など多くの分野でその使用が期待されている。今回は、臨床化学の分野において利用することが可能かどうか検討した。一般に重力インジェクション法でUV検出における薬物の検出限界は $S/N=3$ において1ppm程度であり、電気インジェクション法で濃縮を行うことが可能な薬物においても数100ppb程度である。特に疎水的な骨格が支配的な薬物においては、後者の方法を使用してもキャピラリー内で試料のバンドが広がるため、さほど検出限界 ($S/N=3$) の向上が認められない場合が多い。しかしながら薬物動態において、検出限界としては数10ppbから数100ppb、薬物によってはさらにそれ以上の感度が要求される。そこでこれらの問題を解決する手段の一つとして我々は、

先にペプチドの濃縮ゾーン付きキャピラリーの利用を報告した¹⁾。今回もこれを利用し抗うつ剤Doxepinを使用し検出限界とその挙動について検討した。

濃縮ゾーン付きキャピラリー：通常の溶融シリカキャピラリーの注入側に1mmのポリマーベースのC18をガラスのフリッツで固定したもの。

【実験】

装置は、ウォーターズ製クオンタ4000C Eシステムを用いた。キャピラリーはAccuSep C/PRP Capillary 75 μ m (i.d.) \times 60cm (有効長52.5cm)をプライミングシリンジでアセトニトリル、超純水、泳動バッファの順でコンディショニングした後、使用した。泳動バッファは、25mMのクエン酸ナトリウムを用いて行った。また、試料はDoxepinを泳動バッファで希釈して、電気インジェクション法を用いて注入した。濃縮ゾーンに濃縮された試料は、アセトニトリル、泳動バッファの混液で溶出し214nmを使用して検出した。

さらに、尿、血清に試料を添加しSep-Pak C18で前処理した後、上記と同様に分析しそれぞれの検出限界を求めた。

【結果及び考察】

Fig.1-Aは、75 μ m (i.d.) \times 60cm (有効長52.5cm)のキャピラリーを使用し、0.5ppmのDoxepinを5KV,20秒で電気インジェクション法により注入し、分析したフェログラムです。また、Fig.1-Bは、AccuSep C/PRP Capillary 75 μ m (i.d.) \times 60cm (有効長52.5cm)を使用し5KV,15分で同様に注入し、5KV,18秒で溶出したフェログラムです。Fig.1-A,Bにより、濃縮ゾーン付きキャピラリーを使用することで、ほぼ同一のピークの本幅においてS/N比を約27倍向上させています。さらに、Fig.2-Aは、尿から抽出した試料をFig.1-Aと同様に分析し、Fig.2-Bは、尿に5ppmのDoxepinを添加し抽出した試料を分析したフェログラムで、尿由来の妨害物質の影響を受けることなく分析が可能である。

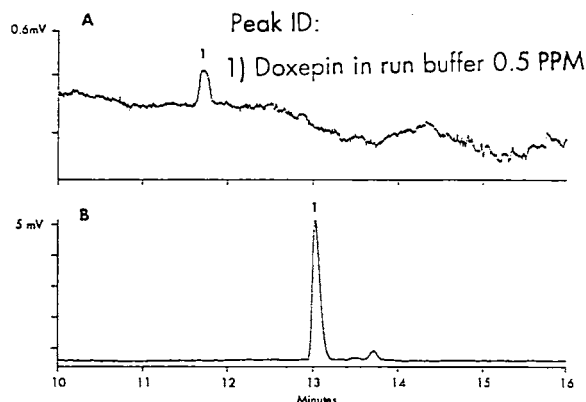


Fig.1 Signal to Noise Capillary Comparison

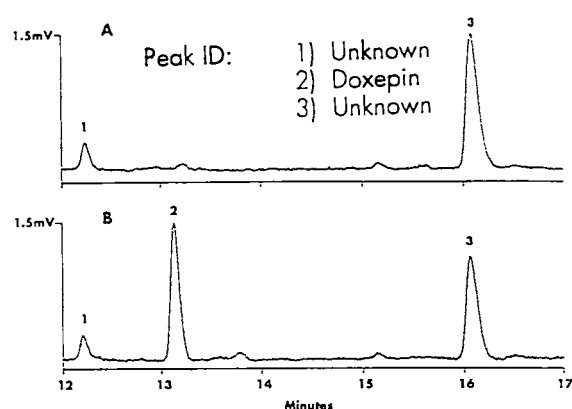


Fig.2 Extracted Urine Sample
On AccuSep C/PRP Capillary

【参考文献】

1)M.Merion, R.H.Aebersold, M.Fuchs and Tsuneyuki Sakai: 第11回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集P31(1991)

(国立衛試) ○森田幾江、蜂須賀暁子、山崎 壮、沢田純一

DEVELOPMENT OF A CAPILLARY ELECTROPHORESIS SYSTEM WITH ON-LINE
SAMPLE PRETREATMENTIkue Morita, Akiko Hachisuka, Takeshi Yamazaki, Jun-ichi Sawada
National Institute of Health Sciences

A new method of capillary electrophoresis (CE) using on-line sample pretreatment was developed. The system utilized on-line solid-phase extraction and capillary column-switching technique. To explore advantage of the method, drugs in serum and urine were analyzed by direct injection. The use of gel-packed capillary as an injection capillary permitted concentration of the analytes, whereas non-interest constituents in biological fluid were allowed to flow into a drain capillary. The analyte was detected by UV absorbance without any interfering peaks on a separation capillary.

【はじめに】

分離能、質量感度等に優れた特徴を有するキャピラリー電気泳動(CE)は、最近、種々の分野で関心を集めている。その実際においては、比較的純度の高い試料(標準品や抽出、精製された試料)を分析対象とする場合が多く、生体試料のような多成分系の試料の直接注入分析の適用例は少ない。また、注入量が少ないという利点は、希薄試料の分析に際し、試料体積(注入量)を多くできないため問題点にもなり、これらの場合、濃縮や抽出といった前処理操作が通常オフラインで行われている。

そこで我々は、目的物質の濃縮や夾雑物の除去といった前処理をオンラインで行う“オンライン前処理キャピラリー電気泳動法”の開発を目的とし、そのシステム(Multi-Field Capillary Electrophoresis)の開発を進めている¹。本報告では、生体(血清、尿)試料の直接注入分析の応用例をもとに、その方式、特徴等について報告する。

【実験】

キャピラリーを注入用、分離用及びドレイン用キャピラリーに分岐した三方分岐型キャピラリーと高電圧電源(CE-890, Jasco)、UV検出器(SPD-10A, Shimadzu)よりなるMFCE装置(Fig. 1)を自作した。尚、注入用キャピラリーの先端部には前処理充填剤が少量封入されたキャピラリーカラムになっている。分離は主にリン酸塩緩衝液(pH7.0, 50 mM)をキャリアーとする自由溶液ゾーン電気泳動により行った。

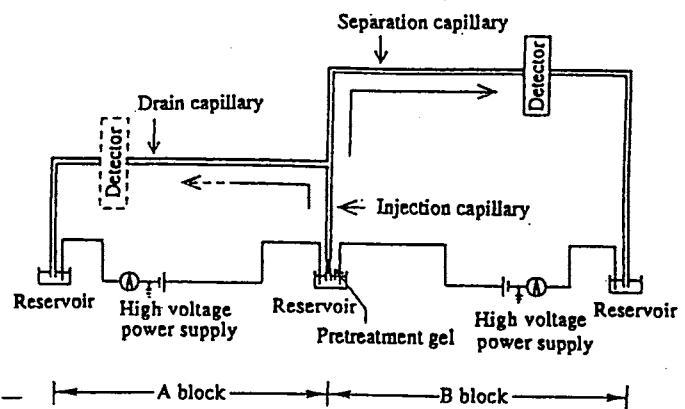


Fig. 1 Schematic diagram of MFCE apparatus

【結果と考察】

1) 前処理充填剤入りキャピラリーカラムの性質

血清試料の直接注入用に開発されたprotein-coated ODS²、または、anti-morphineモノクローナル抗体³を固定した担体を前処理充填剤として用い、その濃縮効果を検討した。アドリマイシン等の疎水性薬物はODSとの疎水性相互作用により、またモルヒネは抗原-抗体反応を利用したイムノアフィニティーにより、充填剤に保持された。その結果、いずれの場合に於いても試料体積を少なくとも1 μ lまで大きくすることができ(通常は、10 n l以下)検出限界濃度を100倍以上改善する濃縮分析が可能であった。

2) MFCEによる生体試料中薬物の直接注入分析

モノクローナル抗体を前処理充填剤に用いた生体試料中のモルヒネの直接分析をFig. 2に示す。試料注入部分で、固相抽出(イムノアフィニティー)に基づいた前処理を行い、尿中成分や血清タンパク質の夾雑物を、ドレイン用キャピラリーに導き、電気浸透流存在下、系外に廃棄する(A block)。その後、モルヒネを酸性溶液で抗体カラムから溶離し(protein-coated ODSの場合は、溶離液として有機溶媒含有溶液)、分離の場をB blockに換えるカラムスイッチングの手法により、モルヒネを分離用キャピラリー上で妨害成分の影響を受けることなく、UV 205 nmで検出した。尚、clean-up段階では必ずしもA blockに印加して電気泳動を行う必要はなく、ドレイン用キャピラリー端から減圧吸引する方法で夾雑物を除去した。また、この段階でキャピラリーの洗浄を行うこともでき、分析サイクルの時間短縮に役立った。異なる分離原理よりなる本法は、高い選択性を有しており、また固相抽出とカラムスイッチング法を用いた本法は、C Eにおけるオンライン前処理を可能とする分析法として期待された。

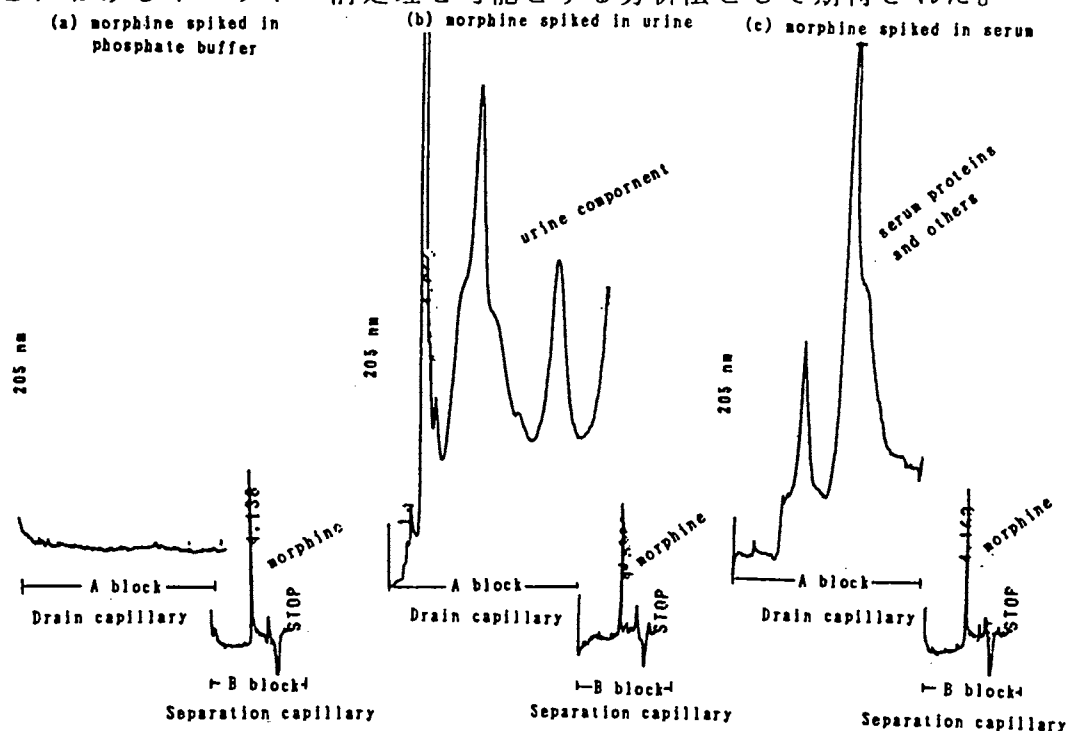


Fig. 2 Electropherograms of morphine spiked in (a) phosphate buffer, (b) urine and (c) serum by MFCE with direct injection.

文献: 1: I. Morita, J. Sawada, J. Chromatogr., 641 (1993) 375.
 2: H. Yoshida, I. Morita, G. Tamai et al. Chromatographia, 19 (1985) 466.
 3: J. Sawada, N. Janejai, K. Naganatsu et al. Mol. Immunol. 25, (1988) 937.

12 キャピラリー電気法による金属イオンの選択的分析

(広島大学・工) ○広川健、夏文、大田高雄、芝山貴之、西本和弘、西山文隆
(比治山女子短期大学) 木曾義之

SELECTIVE ANALYSIS OF METAL IONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Takeshi Hirokawa, Wen Xia, Takao Ohta, Takayuki Shibayama,
Kazuhiro Nishimoto, Fumitaka Nishiyama and Yoshiyuki Kiso*
Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering,
Hiroshima university, *Hijiyama Women's College

ABSTRACT - Selective separation in isotachopheresis was investigated of twenty kinds of metal ions forming kinetically labile complexes with tartaric acid. The metal ions were Ba^{2+} , Sr^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , Zn^{2+} , La^{2+} , Ce^{3+} , Pb^{2+} , Y^{3+} , Gd^{3+} , Lu^{3+} , Cu^{2+} and $Zr(IV)O^{2+}$. The leading electrolyte was a 20mM ammonia solution buffered by adding acetic acid (pH=4.8), the concentration of tartaric acid (C_{Tar}) was varied in the range of 0-5mM. With increase of C_{Tar} , the number of detectable metal ion species decreased to half but the separability was high.

1. はじめに

演者らは主として等速電気泳動法を使用して種々の金属イオンの分離挙動を検討してきた。特に大量のマトリックス成分中の微量成分の分析にどの程度まで電気泳動法が適用できるかという課題について検討し、希土類鉱石中の微量希土類、高レベル放射性廃液模擬試料中のアルカリ土類金属、希土類等の分析に等速電気泳動法を適用し良好な結果を得ている。従来使用してきた錯形成剤 α -ヒドロキシイソ酪酸 (HIB) はランタニドを全分離するという観点からは他に類を見ない試薬であるが他の金属イオンに対する選択性はむしろ低い。

目的金属イオンをその主成分から選択的に分離するにあたって実効移動度差が大きくなるような電解液条件を選ぶ事が最も重要である。全分析が必要ない場合には、より安定度定数の大きな錯形成剤を使用し目的元素以外を非イオン化したりイオン電荷を逆転させたりする事により妨害イオンとの移動度差を大きくした方が有利である。このような錯形成剤として酒石酸、EDTA、1,10-フェナントロリンなどを選び選択的分離の可能性について検討している。複雑な組成を持つ金属イオン試料の泳動挙動の確認は適切な検出器がないため通常は必ずしも容易ではないが本研究における分離の確認には分取したフラクションを粒子励起X線分析法により分析する方法 (IP-PIXE) を使用した。本講演では主として酒石酸を用いて得られた結果について報告する。

2. 実験方法

分析用電解液系の例を表-1に示した。試料としては20種の金属塩化物(5種の希土類を含む)および15種の希土類を使用した。定性指標 R_E の測定に用いた等速電気泳動装置の検出器は高周波非接触電導度検出器 (Dr. B. Gaš, Charles univ., Prague, Czech) で、PTFE分離管の内径は0.25mmである。泳動部にはZKI-001 (LABECO, Slovakia) を、高圧電源としては島津IP-2A用のものを転用した。分取

用等速電気泳動装置としては演者らの製作したカウンターフロー式を使用した。なお希土類の分離挙動についてはC Z Eモードでも検討した。使用したキャピラリ電気泳動装置は大塚電子C A P I - 3 0 0 0型である。

3. 結果と考察

図-1にIP-PIXE分析の結果明らかになった泳動順を示した。同じブロックに含まれるイオンは分離しにくい事を示す。また左端の点線のブロック内の元素は検出されなかった事を示す。酒石酸濃度が1 mMの時平均的に良好な分離が得られた。図-1に示したように酒石酸濃度の上昇につれ検出されるイオンの種類が減少していった。酒石酸濃度が5 mMになると希土類は全くマスクされて検出できなくなるが、

表-1 使用した電解液系

リーディング液	
20 mM NH ₄ OH/酢酸、酒石酸 0-5 mM, pH=4.8	
ターミナル液	
20 mM HCl/塩酸カルニチン pH=2.9	

それ以外の成分は良好な分離挙動を示す。このような挙動は希土類マトリックス中の微量成分の分析(希土類鉱石の分析など)に有用である。

さらに希土類の挙動がH I B系とは相当に異なっている事が明らかになったので、H I B系では分離不可能であったD yとYの分離を試みたところ酒石酸0.6 mM H I B 7.6 mMという系で分離が可能であることが明らかになった。しかしながらE uとG dの分離は逆に不可能になった。この事はC Z Eモードでも同様な結論が得られた。

その他の錯形成剤では、E D T Aとのキレート生成を利用するとイオン電荷の符号転換によりアルカリ・アルカリ土類金属のみを選択的に取り出して分析が可能である。また1,10-フェナントロリンはイオン半径の小さなイオンと安定な錯体を形成するがイオンサイズの大きなイオンとは相互作用しにくい。このような錯形成剤のイオン認識能を競合させると個別では不可能であった、より高度な選択性を発揮させられるものと考えられる。

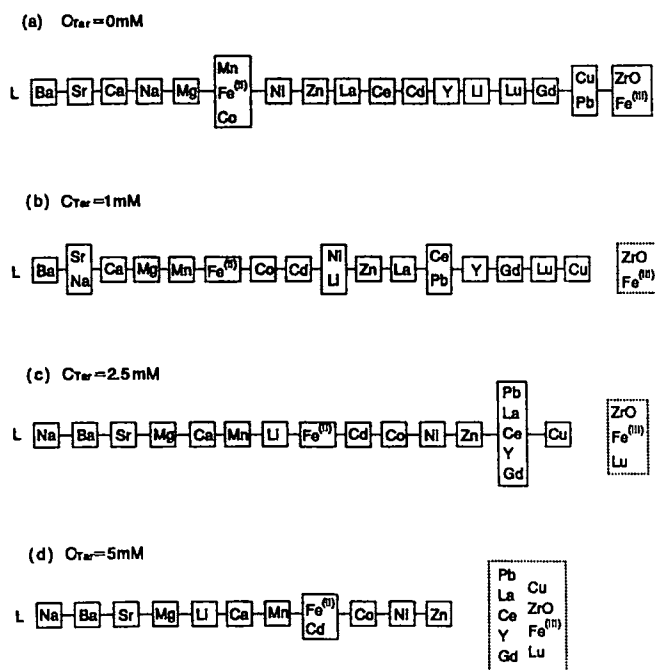


図-1 金属イオンの泳動順
(左端がリーディング側、右端がターミナル側)

キャピラリー電気泳動法による 金属キレートの分離と 添加剤の効果

(岡山理大理) ○横山 崇・善木道雄

EFFECTS OF ADDITIVES ON THE SEPARATION OF METAL
CHELATES BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

Takashi Yokoyama and Michio Zenki

Faculty of Science, Okayama University of Science

The separation of five transition metal ions with chelating reagent, such as phenanthroline (phen) and bathophenanthroline disulfonic acid (bps), was studied by capillary zone electrophoresis. A mixture of these metal ion complexes was separated in a fused-silica capillary column with acetate buffer of pH 4.7. The order of the mobilities of the complexes was $\text{bps} \approx \text{Zn}^{2+} \approx \text{Co}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Fe}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+}$ for bps and was $\text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} \approx \text{Fe}^{2+} \approx \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{phen}$ for phen. These chelating reagents can be used to separate these metal ions at even low pH. The effects of electrophoretic buffer additives affecting the migration behavior were also examined.

【緒言】 キャピラリー電気泳動法 (CE) によるスルホン酸基を有するナフタレン類の異性体の分離挙動は、界面活性剤を添加することによって分離能が向上し、また、界面活性剤の種類によって分離パターンが異なる。^{1)~3)} このことから、スルホン酸基を有するキレート試薬を用いると金属キレートの様々な分離パターンが得られると考えられる。電気泳動バッファーに添加剤を用いないこれらのスルホン酸基を有する金属キレートの分離挙動は電気泳動バッファーの種類および pH に大きく依存する。⁴⁾ それゆえ、電気泳動バッファーへ界面活性剤などの添加剤を加えることは、これらのスルホン酸基を有する金属キレートの分離挙動に対しての影響も大きいと考えられる。そこで、これらの金属キレートの分離挙動の添加剤の効果とスルホン酸基をもたない金属キレートの分離挙動を比較検討した。

【実験】 装置は大塚電子製 CAPI-3000、キャピラリーはジーエルサイエンス社製の溶融シリカキャピラリー 75 μm i.d. x 500 mm (有効長 378 mm) を用い、波長 220 nm、温度 30°C で測定した。サンプル注入は落差法により 25 mm、60 s で行った。パソフェナントロリンジスルホン酸 (bps)、フェナントロリン (phen) をキレート試薬として、Fe、Co、Ni、Cu、Zn の各金属イオンを分離する対象とした。サン

プルには、予めキレート試薬と各金属イオンとで錯形成を行った溶液を用いた。電気泳動バッファーとしては、 1×10^{-2} mol/l 四ほう酸ナトリウム溶液 pH 9.1 および 2×10^{-2} mol/l 酢酸-酢酸ナトリウム溶液 pH 4.7 を用い、電気泳動バッファーへの添加剤としては、ナフタレンジスルホン酸の異性体の分離において分離能の向上がみられたポリエチレングリコールなどを用いた。

【結果と考察】 bps をキレート試薬として用いて、電気泳動バッファーに酢酸-酢酸ナトリウムを用いた場合、fig. 1 のようなエレクトロフェログラムが得られ、電気泳動時間は $\text{bps} \approx \text{Zn}^{2+} \approx \text{Co}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Fe}^{2+} \approx \text{Ni}^{2+}$ の順であり Cu^{2+} キレートのみ単独の分離が得られた。また、phen をキレート試薬として用いると fig. 2 のようなエレクトロフェログラムが得られ、電気泳動時間は $\text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} \approx \text{Fe}^{2+} \approx \text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{phen}$ の順であり、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} キレートの単独の分離が得られた。キレート形成しない金属イオンの水酸化物の沈殿は pH 4.7 では起こらないと考えられることや金属キレートも高 pH より低 pH の方が安定である場合が多いと考えられるので pH 4.7 で金属キレートの分離が可能であるということは大きなメリットである。また、陽イオンである phen 錯体と陰イオンである bps 錯体と分離挙動を比較すると phen 錯体は電気浸透流に依存するピークよりも早い時間にピークが現れるのでこれらの金属イオンの分析時間のメリットがある。しかし、これらの CE による金属イオンの分離挙動がかなり異なっていることは興味深い。

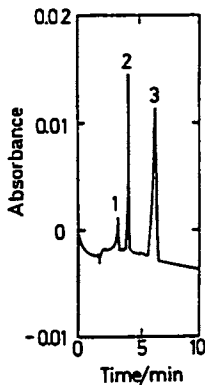


Fig. 1 Electropherogram of a mixture of five metal ions (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each) using phen as the chelating reagent; (1) Co^{2+} ; (2) Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} ; (3) Cu^{2+} ; (4) phen. Conditions: chelating reagent, 5×10^{-2} mol/l phen; electrophoretic buffer, 2×10^{-2} mol/l acetate buffer pH 4.7; applied voltage, 10 kV, temperature 30°C .

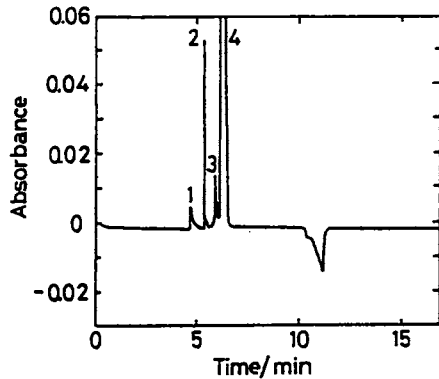


Fig. 2 Electropherogram of a mixture of five metal ions (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each) using bps as the chelating reagent; (1) bps, Zn^{2+} , Co^{2+} ; (2) Cu^{2+} ; (3) Fe^{2+} , Ni^{2+} . Conditions: chelating reagent, 2×10^{-2} mol/l bps; electrophoretic buffer, 2×10^{-2} mol/l acetate buffer pH 4.7; applied voltage, 30 kV; temperature 30°C .

- 【文献】 1) 行武、善木、横山、第 54 回分析化学討論会講演要旨集、2D10 (1993).
 2) 入澤、行武、横山、善木、日本分析化学会第 42 年会講演要旨集、3A10 (1993).
 3) 行武、善木、横山、平成 5 年度日本化学会中国四国支部・同九州支部合同大会講演要旨集、1D07 (1993).
 4) 横山、善木、日本分析化学会第 42 年会講演要旨集、3A08 (1993).

(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-事業部) ○高橋 孝行
(Waters Chromatography Division of Millipore) J.P.Romano, J.Krol

DETAMINATION OF IONS IN WATER AND SOLID WASTE LEACHATES.

(Waters Chromatography Division of Nihon Millipore) Yosiyuki Takahasi
(Waters Chromatography Division of Millipore) P.Romano, J.Krol

Capillary ion electrophoresis has recently been introduced as a new separations technique for the analysis of inorganic anions. Among its many attributes are rapid, highly efficient separations with different selectivities (compared to ion chromatography), simplicity, and economy. This paper demonstrates the ability of capillary ion electrophoresis to analyze primary and secondary anionic contaminants as well as other ions of environmental concern in drinking water, groundwater, and wastewater.

【初めに】

キャピラリーイオン電気泳動は、無機陰イオンの分析において新しい分離法として紹介された¹⁾。とりわけ他の分離法に比べ迅速で高い分離能を有しておりかつ簡便で経済的な方法といえる。キャピラリー電気泳動による、陰イオンの分離は、試料注入側に陰極を、検出器側に陽極を用い、バッファー中にカチオンの界面活性剤を加えることで電気浸透流を、陰極から陽極方向に流すことで、イオンのイオン当量導電率の大きいイオンから順に泳動し、間接法でUV検出することで多くのイオンを分離測定している。注入は、重力法あるいは微量の場合、電気泳法で注入することで分離分析を行う。分離のパターンは、イオンクロマトグラフィ-と逆となるため炭酸の多い試料やフッ素イオン等の測定に有効である。今回報告する試料は、アメリカにおける飲料水、水道水、排水、またEPA (Environmental Protection Agency)にて採取した地下水を用いた。

【装置及び試薬】

装置は、ウォーターズ製クオンタ4000CEシステムを用いた。検出は254nmの間接法で行った。注入は、重力法、10cm30秒で行った。キャピラリーは75μm (i.d.)×60cmの物を用いた。バッファー用にクロム酸ナトリウム、硫酸いずれもUS分析グレードを使用。カチオンの界面活性剤はウォーターズ製CIA™パックスOFMアニオンBTを用いた。

【結果】

Fig.1に飲料水のフェログラムを示す。試料は希釈せず測定した。Fig.2は、EPAにおいて採取された地下水を1000倍に希釈し測定しフェログラムであ

る。このEPA採取の地下水は、硫酸イオンの多い試料等を、選び測定した。Fig.3は工場排水を測定したフェログラムで、50倍に超純水で希釈したものを用いた。試料中に大量に存在する、炭酸イオンの影響でシングルカラム法のイオンクロマトグラフィーではフッ素イオンの測定は、不可能であるがキャピラリー電気泳動においては、フッ速度が炭酸より速いため、測定は可能である。

水道水、飲料水工場排水、火力発電所廃液の各試料中のイオンをシングルカラム方式によるイオンクロマトグラフィーと比較した表をTable 1に示す。キャピラリー電気泳動法と従来のイオン分析とにおいて同様の結果を得た。

【結論】

キャピラリー電気泳動は、従来タンパク質やペプチドと言った生化学的かつ分子の大きい試料を対象に発達してきた。しかしその高分離、迅速性と言った特徴を分子の小さいイオンや有機酸に用いる事により従来、時間のかかる測定法に比べ短時間で行えかつ経済的な方法としてイオンクロマトグラフィーをサポートする分析方法として発展していく物と思う。

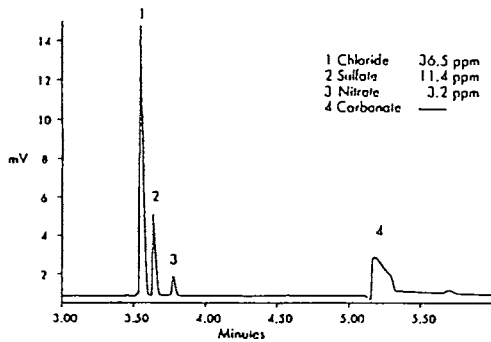


Fig.1 Elctropherogram of well water.

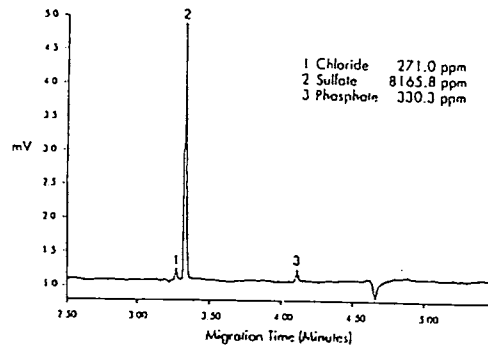


Fig.2 Elctropherogram of EPA ground water.

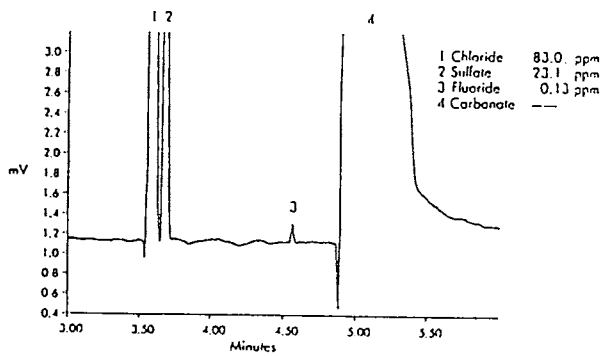


Fig.3 Elctropherogram of waste water.

Table 1 Comparison of Ion chromatography and Capillary ion analysis.

	IC (ppm)	CIA (ppm)	CIA/IC
Tapwater			
Chloride	20.222	20.035	0.991
Sulfate	14.772	14.044	0.951
Nitrate	3.551	3.531	0.994
Fluoride	Not Detected	0.062	—
Municipal Water			
Chloride	37.650	36.476	0.969
Sulfate	11.951	11.423	0.956
Nitrate	3.165	3.179	1.004
Industrial Wastewater			
Chloride	83.148	83.025	0.998
Sulfate	23.831	23.065	0.967
Fluoride	Not Detected	0.132	—
Power Plant Wastewater			
Chloride	171.834	177.768	1.041
Sulfate	79.882	76.748	0.961
Nitrate	2.384	2.231	0.937

1)W.R.Jones,P.Jandik,J.Chromatography546,445~458(1991).

フォトダイオードアレイ検出器を用いたキャピラリー電気泳動によるアルカリ金属イオンの分離

(大塚電子) ○笹 一志・小野真澄・北岸恵子

SEPARATION OF ALKALINE METAL IONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS
WITH A PHOTODIODE ARRAY DETECTOR
OTSUKA ELECTRONICS CO.
KATSUSHI SASA, MASUMI ONO AND KEIKO KITAGISHI

Capillary electrophoresis with a photodiode array detector was applied to separation of alkaline metal ions. Alkaline metal ions were separated by the addition of UV light-absorbing chelating agent(2,4-pentanedion) to the carrier buffer solution. The metal chelates were detected with on-column UV-absorption(290nm). The order of the electric mobility of the chelates was: $K^+ > NH_4^+ > Na^+ > Li^+$.

1. 緒言

紫外検出器を用いたキャピラリー電気泳動法では、紫外吸収をもたない金属イオンなどの分析は主にインダイレクトUV法でおこなわれている。それに対して、ダイレクトUV法によるそれらの分析例は少ない¹⁾。

今回、UVスペクトルに特徴をもつキレート剤を用いて錯体形成による金属イオンの分離およびその金属錯体の吸収極大で検出が可能か検討をおこなった。

2. 実験

金属イオンの Na^+ , K^+ , Li^+ イオンはそれぞれ和光純薬工業のイオンクロマト用を用いた。また、キレート剤である2,4-pentanedionは和光純薬工業の特級試薬を用いた。電気泳動に用いた緩衝溶液は、2,4-pentanedionを含んだトリス緩衝溶液を用いた。試料は、蒸留水で希釈をおこなった。

キャピラリー電気泳動装置は大塚電子社製C A P I - 3 0 0 0を用いた。キャピラリーは、内径 $75\mu m$, 全長 $72.5cm$ (有効長 $60cm$)のフューズドシリカ管を用いた。測定は $25^\circ C$, $10kV$ の定電圧でおこなった。

3. 結果および考察

2,4-pentanedionとアルカリ金属イオン(Li^+)との錯体反応メカニズムをFig. 1に、2,4-pentanedionの紫外吸収スペクトルをFig. 2に示す。Fig. 1のように、 Li^+ イオン $1mol$ に対し $2mol$ の2,4-pentanedionが結合するので、インダイレクトUV法とは逆に、アルカリ金属イオンが存在すれば、その領域はキャピラリーの

他の部分に比べて2,4-pentanedion濃度が高くなり、ダイレクトUVによるアルカリ金属イオンの検出が可能である。

このような原理に基づいて、2,4-pentanedionの吸収極大である290nmで、アルカリ金属イオンの検出をおこなった(Fig. 3)。各金属イオンの検出順序は K^+ 、 Na^+ 、 Li^+ となり原子量の大きい順になっている。

また、 NH_4^+ のピークは K^+ と Na^+ の間に検出されている。このことから、2,4-pentanedionによる陽イオンの分離は原子量または分子量の大きさに関係していると考えられる。検出感度においては、 Li^+ で0.5ppmまで検出可能であることがわかった。

また、2,4-pentanedionを用いた金属イオン分析は緩衝溶液のpHや組成、濃度等にも依存することがわかった。

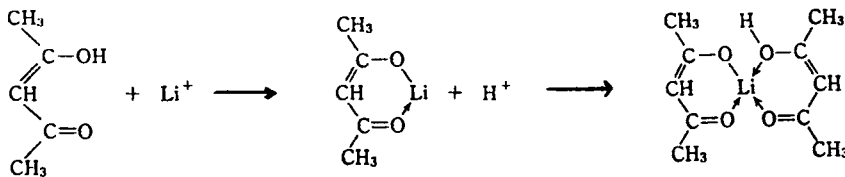


Fig.1. Metal chelate of 2,4-pentanedion

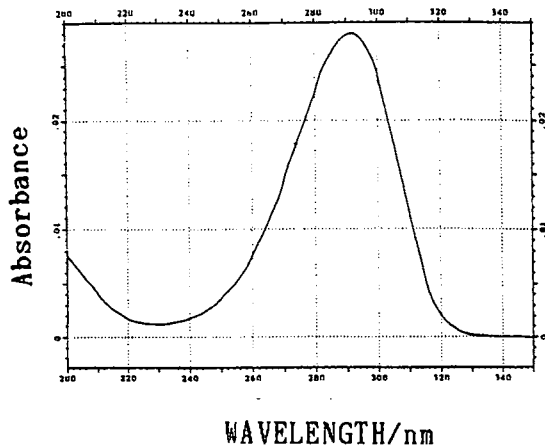


Fig.2. Absorption spectrum of 2,4-pentanedion metal in 50mM Tris-HCl buffer(pH8.5). Wavelength range:200-350nm

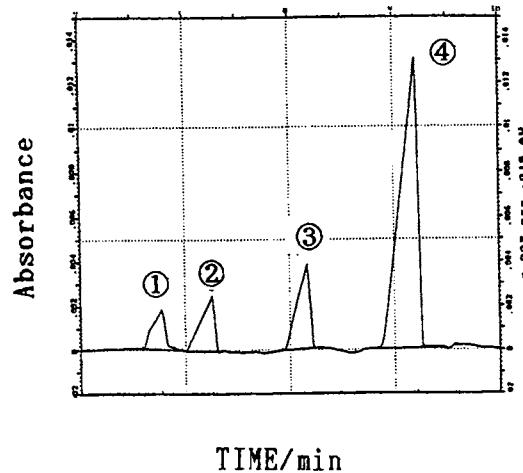


Fig.3. Electropherogram of metal chelates. The absorbance on the ordinate was measured at 290nm. ①: K^+ ②: NH_4^+ ③: Na^+ ④: Li^+

4. 参考文献

- 1) Motomizu, S. et al., Analytical Sciences., 7, 253-256 (1991)

(阪府高専) ○大塚浩二、小池 亮、東森光雄、輕墓 薫
 (京大工) 岡田行広
 (姫工大理) 寺部 茂

USE OF ORGANIC MODIFIERS IN MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Koji Otsuka^{*}, Ryo Koike, Mitsuo Higashimori, Kaoru Karuhaka
 Yukihiro Okada[†], and Shigeru Terabe[‡]

*Department of Industrial Chemistry, Osaka Prefectural College of Technology
 Saiwai-cho, Neyagawa, Osaka 572 (Japan)*

[†]*Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering
 Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01 (Japan)*

[‡]*Department of Material Science, Faculty of Science
 Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12 (Japan)*

ABSTRACT

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is capable of separating neutral compounds and has become popular in various fields. Addition of organic modifiers to aqueous micellar solutions has been investigated to improve resolution of lipophilic compounds. We have used dimethylsulfoxide (DMSO) as an organic modifier for the separation of some polyaromatic hydrocarbons (PAHs). In this study, DMSO and acetone were added to SDS micellar solutions for the PAHs separation and 2-propanol (IPA) to *N*-dodecanoyl- or *N*-tetradecanoyl-L-amino acid solutions for optical resolution. In the latter, the addition of IPA was essential to dissolve the amino acid derivatives or chiral surfactants.

1. はじめに

ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)は、キャピラリー電気泳動による小分子の分析において幅広い分野で使用されている分離モードである。MEKCでは通常水系溶媒が用いられるため脂溶性の強い試料の分析は困難であったが、ミセル溶液にDMFを添加することによって良好に分析できることが報告されている[1]。我々は、ジメチルスルホキシド(DMSO)を添加した硫酸ドデシルナトリウム(SDS)ミセル溶液系でいくつかの脂溶性試料の分離が可能であることを報告してきた[2, 3]。ここでは、MEKCによる脂溶性試料の分析および光学分割における有機溶媒の利用について検討した結果を報告する。

2. 実 験

ミセル溶液は、脂溶性試料の分析ではDMSOまたはアセトンを含む緩衝液にSDSを溶解して、光学分割においては2-プロパノール(IPA)を含む緩衝液に*N*-アルカノイル-L-アミノ酸を溶解して調製した。緩衝液には、リン酸塩-ホウ酸塩系を用いた。試料には、主に多環芳香族化合物(PAH)類とアミノ酸誘導体類を、装置にはBeckman P/ACE System 2000または実験室で組み立てたものを用いた。

3. 結果・考察

脂溶性試料の分離 DMSO系では、DMSO濃度を50% (v/v)程度まで高くすることにより、各ピークの形状が改善され良好な分離が達成された。この場合、DMSOが低波長領域で吸収を持つため、検出は280 nmで行った(Fig. 1)。アセトンは逆に長波長側で吸収を持つため、200 nmで検出を行った(Fig. 2)。DMSO系に比べ、再現性の点ではやや劣るが、前者で検出できなかったbenzeneやanthraceneが検出できるなど感度的にはむしろ有利であると言える。

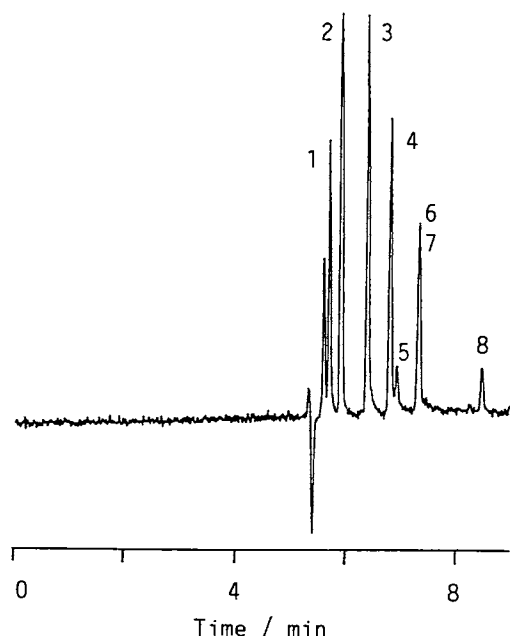


Figure 1. MEKC separation of some test solutes: (1)*p*-quinone, (2)naphthalene, (3)phenanthrene, (4)pyrene, (5)2,3-benzofluorene, (6)benzanthron, (7)benz(a)anthracene, (8)1,2-benzanthraquinone. Micellar solution, 25 mM SDS in borate-phosphate buffer (pH 7.0) containing 50%(v/v) DMSO; capillary, 52 μm i.d. \times 300 mm; applied voltage, 25 kV (676 V cm^{-1}); detection wavelength, 280 nm; temperature, 35 $^{\circ}\text{C}$.

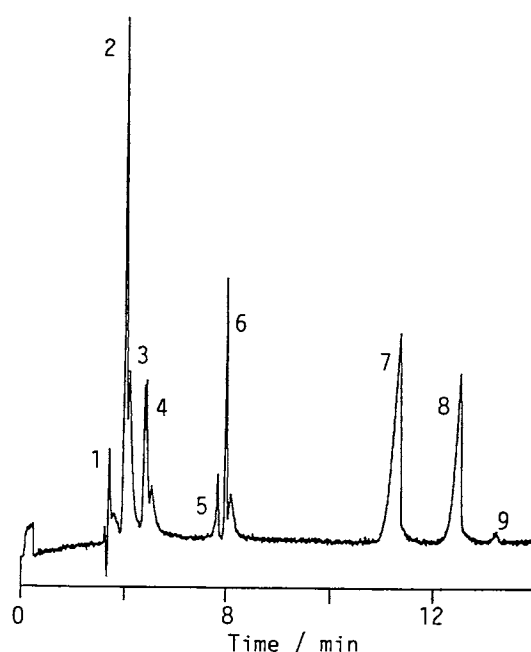


Figure 2. MEKC separation of some test solutes: (1)*p*-quinone, (2)benzene, (3)quinoline, (4)benzoin, (5)naphthalene, (6)fluorescein, (7)benzanthron, (8)phenanthrene, (9)anthracene. Micellar solution, 25 mM SDS in borate-phosphate buffer (pH 7.0) containing 20%(v/v) acetone; capillary, 52 μm i.d. \times 300 mm; applied voltage, 15 kV (405 V cm^{-1}); detection wavelength, 200 nm; temperature, 30 $^{\circ}\text{C}$.

光学分割 これまでに、N-ドデカノイル-L-アミノ酸ナトリウムを用いるMEKCによる光学分割について報告してきたが[4,5]、ここではよりアルキル鎖の長いものやカルボキシル基がフリーのものを使用した。これらの界面活性剤は緩衝液にIPAを添加することにより溶解することができ、数種のアミノ酸に対して光学分割能を示した。

- 1) 金田, 山下, 今坂: 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 8, 姫路, 1992年12月.
- 2) 大塚, 小池, 寺部: 日本化学会第65春季年会, 3A2 52, 東京, 1993年4月.
- 3) 大塚, 小池, 東森, 輕墓, 岡田, 寺部: 第4回クロマトグラフィー科学会議, 46, 東京, 1993年10月.
- 4) K. Otsuka, J. Kawahara, K. Tatekawa, S. Terabe, *J. Chromatogr.*, **1991**, 559, 209-214.
- 5) K. Otsuka, M. Kashihara, Y. Kawaguchi, R. Koike, T. Hisamitsu, S. Terabe, *J. Chromatogr.*, **1993**, in press.

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
油成分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 OILS ON SEPARATION SELECTIVITY
IN MICROEMULSION ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHYYukihiro Okada¹ Shigeru Terabe²¹Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University²Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

A microemulsion consisting of 2% oil-2.9% sodium dodecyl sulfate - buffer(pH 7.0) was mainly employed. The amount of oil or butanol in the microemulsion was altered and its effect was measured for some test solutes. The effect of different oil components such as ethyl propionate and L-(+)-tartaric acid di-n-butyl ester were also investigated.

○はじめに

マイクロエマルジョンは通常、界面活性剤、油、水、co-surfactant からなっている。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。これまでの研究で、co-surfactant が油よりも過剰に存在するとき、油の効果がほとんどでないことが分かった。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、2.9% の硫酸ドデシルナトリウム (SDS) (0.1 M) と 2.0% の油を 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 2.9% の SDS を緩衝液に溶解した通常のみセル動電クロマトグラフィーによる分離の例を示す。

Fig. 2 に co-surfactant であるブタノールを含んでいない SDS 2.9%、プロピオン酸エチル 2.0% の分離溶液を用いた時のクロマトグラムを、Fig. 3 に油成分を含んでいない SDS 2.9%、ブタノール 2.0% の分離溶液を用いた時のクロマトグラムを示す。2.5 min に出ているピークは、水相のトレーサーであるメタノールのものである。最後の 10 のピークは、ミセルとマイクロエマルジョンのトレーサーであるスダンⅢのものである。

Fig. 1 と Fig. 2 と比較すると Fig. 2 の方が移動時間の範囲が広がると同時に、分離選択性、電流値にも違いがみられた。Fig. 2 と Fig. 3 と比較するとその分離のパターンと移動時間範囲、電流値が、よく似ている。油としてプロピオン酸エチルのかわりに酒石酸ジブチルを用いると、分離選択性は異なるが移動時間範囲と電流値については、同様であった。このことから、この濃度では、Fig. 2 と Fig. 3 に用いた分離溶液の構造が似ていると考えられる。また、以前の実験では、ブタノール量を増す (6%~9%) と移動時間範囲が減少するという結果が得られたが、Fig. 1 と Fig. 3 との移動時間範囲をみるとその逆の傾向になっていた。

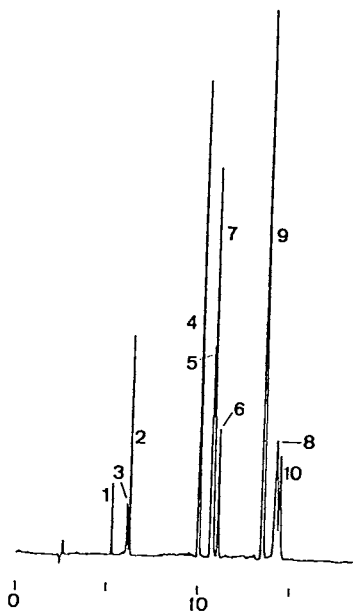


Fig. 1
2.9% SDS in borate-phosphate buffer (pH7.0); capillary, 52 μ m I.D., 200mm O.D. x 300mm; 15kV, 43mA

- 1=*m*-Hydroxybenzoic Acid
- 2=Nitrobenzene
- 3=Salicylic Acid
- 4=1-Naphthylamine
- 5=1-Naphthalenemethanol
- 6=2-Naphthalenemethanol
- 7=1-Naphthol
- 8=Phthalic Acid
- 9=1-Methylnaphthalene
- 10=Sudan 3

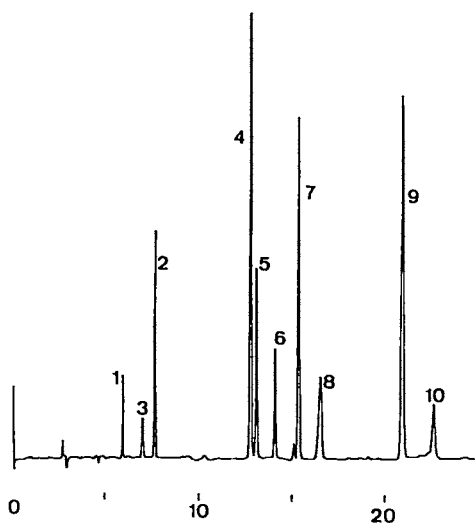


Fig. 2
2% Ethyl Propionate, 2.9% SDS in borate-phosphate buffer (pH7.0); capillary, 52 μ m I.D., 200 μ m O.D. x 300mm; 15kV, 49mA

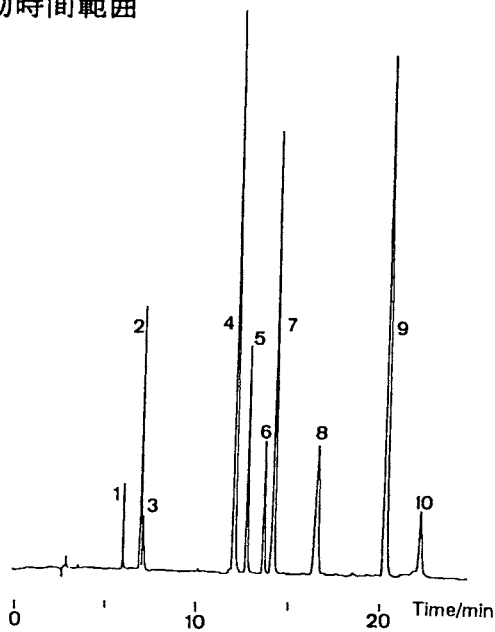


Fig. 3
2% Butanol, 2.9% SDS in borate-phosphate buffer (pH7.0); capillary, 52 μ m I.D., 200mm O.D. x 300mm; 15kV, 48mA

動電クロマトグラフィーによる環境汚染物質の分析(X) — 低級脂肪族アルデヒドの分析について —

(大工研) ○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 ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY (X). ANALYSIS OF LOWER ALIPHATIC ALDEHYDES

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

Osaka National Research Institute, AIST

Analysis of lower aliphatic aldehydes by electrokinetic chromatography (EKC) was studied. The method often used to determine aldehyde in the environment is to form their 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivative. After derivatization of aldehydes, effect of some analytical conditions in EKC, such as pH and CH₃CN concentration were investigated. The peaks of DNPH derivatives were completely separated from DNPH reagent peak. As to formaldehyde and acetaldehyde, good reproducibility, quantitativity and recovery from environmental waters were obtained.

1. はじめに

低級脂肪族アルデヒドは化石燃料の不完全燃焼、光化学反応、あるいは水道原水の消毒などによっても生じることが知られている。これらの毒性については不明な部分が多いが、ホルムアルデヒドは強い変異原性を有していることが知られており、その定量は重要である¹⁾。これらのアルデヒド類は非常に揮発性が高いので、通常は誘導体化したのちGCやHPLCにより測定されることが多い。

そこで我々は誘導体化法として最もよく用いられている2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(以下DNPHと略)法によりこれらのアルデヒドを誘導体化し、EKCによる測定について検討した。

2. 実験

装置は、アプライドバイオシステムズ社製のModel 270Aを使用した。分離用キャピラリーには、内径50μm、長さ72cm(有効長50cm)のフューズドシリカ管を、分離溶液には0.02Mホウ酸塩-リン酸塩緩衝溶液にキャリアーとして0.05Mの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360nmでの吸光度の測定により行った。

測定対象アルデヒドとしてはホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンア

ルデヒドおよびアクロレインの4種を選び、バッチ法による誘導体化はアルデヒド溶液1 mlに5 Nリン酸水溶液20 μ lと1000 mg/lのDNPHアセトニトリル溶液200 μ lを添加して、10分間放置することにより行った²⁾。

3. 結果

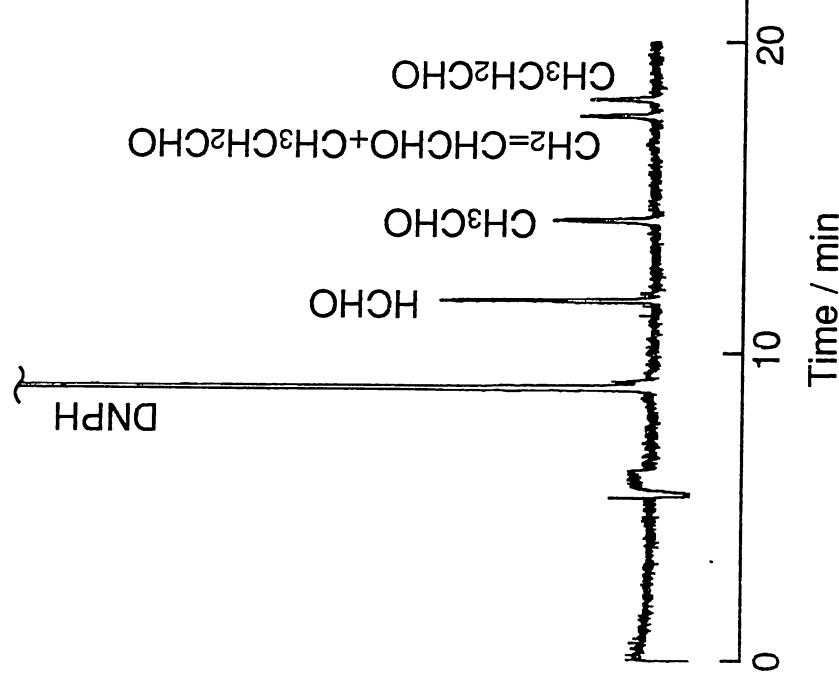
誘導体化後の測定溶液には過剰のDNPHが含まれているが、EKCにおいてはDNPHの試薬ピークとアルデヒド誘導体のピークの分離はきわめて良好であった。分離溶液のpHを6から9まで変えて検討した結果、pHが高いほどシャープなピークが得られたが、アクロレインとプロピオンアルデヒドの誘導体分離は不完全であった。そこでアセトニトリルを添加してそれらの分離を試みたところ、添加量5%以上でプロピオンアルデヒド、15%以上でアセトアルデヒドの誘導体の構造異性体がそれぞれ分離されたが、アクロレインとプロピオンアルデヒドの一方の異性体の誘導体については分離できなかった。

そこで、アセトニトリルの添加量を10%とし、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの定量性について検討した。各アルデヒド1 mg/lを測定したときのクロマトグラムをFig.1に示す。

0. 1~10 mg/lにおける検量線を作成したところ、いずれについても良好な直線性が得られ、検出限界はホルムアルデヒド0.05 mg/l、アセトアルデヒド0.08 mg/lであった。また、1 mg/lでの定量値の再現性はCV値で3.3%以内 ($n=8$)、河川水及び水道水に添加した場合の回収率は97~102% ($n=3$)と良好な値が得られた。現在、実環境水の測定やオンカラムでの誘導体化について検討を進めている。

4. 文献

- 1) 安原昭夫: 環境化学, 1, 253 (1991)
- 2) 松本ほか: 分析化学, 36, 179 (1987)



高分子界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィー：アクリル酸-アクリル酸エステル共重合型高分子界面活性剤の利用

(カネカテクノリサーチ) ○尾崎祐人
 (姫路工大理) 寺部茂
 (第一工業製薬) 市原明信

MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY USING HIGH - MOLECULAR SURFACTANTS : USE OF ACRYLIC ACID - ACRYLIC ESTER COPOLYMER.

Hiroto Ozaki¹, Shigeru Terabe² and Akinobu Ichihara³
 Kaneka Techno Research Co. Ltd.¹, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology² and Dai-ichi Kogyo Seiyaku Co. Ltd.³

Micellar electrokinetic chromatography using butyl acrylate-butyl methacrylate-methacrylic acid copolymer (BBMA) as high-molecular surfactant has been studied. Under the condition of 2% BBMA in borate-phosphate buffer (pH.8.0), some non-ionic test solutes were separated. For the separation of naphthalene derivatives, BBMA showed significantly different selectivity from SDS. The capacity factors of the naphthalene derivatives were proportional to the concentration of BBMA, and the critical micelle concentration was nearly zero. It suggests one molecule forms one micelle. Enantiomeric separation of ten dansylated DL-amino acids using 10mM β -CD and 2% BBMA was better than using 60mM β -CD and 100mM SDS, because of no interaction between the free surfactant molecule and β -CD.

1) はじめに

ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)は、現在様々な分野で応用が試みられており、使用するミセルへの新たな機能性付与が今後の重要な課題となっている。単分子でのミセル形成が予想される高分子界面活性剤の利用は、SDS等の低分子界面活性剤とは異なる分離選択性を有することが期待される。さらに単分子で形成されるミセルは温度、塩濃度等の変化に対して安定と考えられ、この点もMEKCに利用する場合には大きな長所となる。一方、オリゴソープと総称される高分子界面活性剤が分散剤、乳化剤として工業的に利用されている。今回の研究では、アニオン型オリゴソープであるアクリル酸-アクリル酸エステル共重合型界面活性剤を用いるMEKCについて検討した結果を報告する。

2) 実験

アニオン型オリゴソープには第一工業製薬製アクリル酸ブチル/メタクリル酸ブチル/メタクリル酸共重合体(BBMA)を用いた。分子量Ca.40000のものを基本的にそのまま、一部アセトン再沈精製して使用した。分離溶液は100mMホウ酸-50mMリン酸塩緩衝液に溶解し、必要に応じて添加剤を加えて調製した。MEKCは、

◆結果と考察

各pHのバッファーで泳動したところ、今回対象としたアミノ酸の分離度が最も高かったのはpH 2.5であった。(Fig. 1) ValとIle、ThrとTrp、GluとPhe の分離がそれぞれ不十分であるため Octanesulfonate をこの 25mM-Sodium phosphate pH2.5 のバッファーに添加した。1) 添加濃度により Arg と His, Ile Leu と Ser, Trp から Pro の間において泳動順序の逆転が occurring。(Fig. 2) (Fig. 3) Octanesulfonate の添加濃度が100mM としたときに全体の分離度が最大となったが、Tyr と Cystine の泳動時間が等しくなってしまった。

次にCyclodextrin を添加剤として25mM-Sodium phosphate pH2.5 に加えた。5mMの濃度で添加することによりTyr と Cystine を分離できたが Trp が未分離となった。(Fig. 4)

各試料中にはアミノ酸以外にも蛋白、ペプチド、ビタミン等の成分も含まれるため、それらとの分離も考慮しなければいけない。しかし pH 2.5 では EOF が停止しているため、この条件下で正荷電を持つ成分以外は問題とならず清涼飲料、製剤の分析ができた。定量値は表示含有値と一致した。尿中、ビール中の定量値は HPLC による測定値と近似値を示したがいくつかのアミノ酸については異なった値となった。生体試料等の分析では他の種類の遊離アミノ酸や蛋白、ペプチドの存在をもさらに検討する必要がある。185 nm による直接 UV 検出を行なっているため、誘導化したアミノ酸の検出よりも感度が低下するが、試料の前処理を行なわないため分析操作が簡単である。多検体、微量試料の分析に適する。

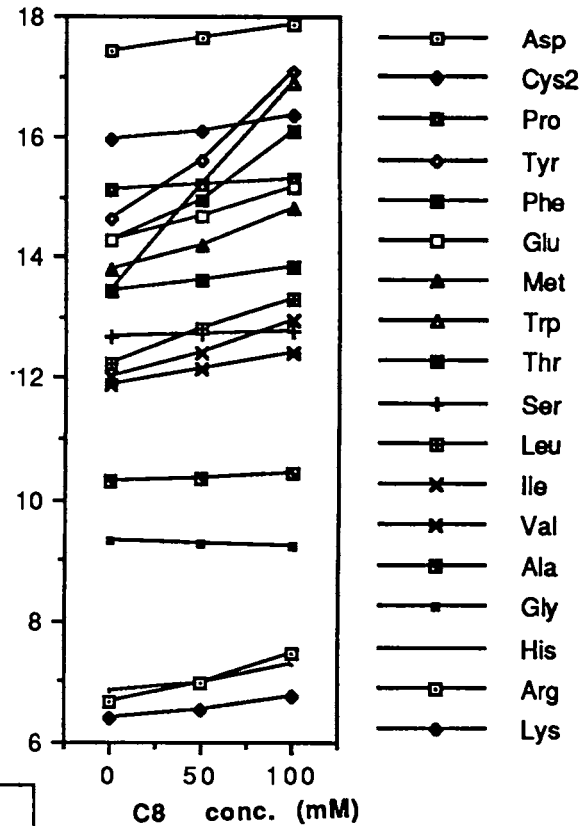


Fig.3 Octanesulfonate 対 Migration Time

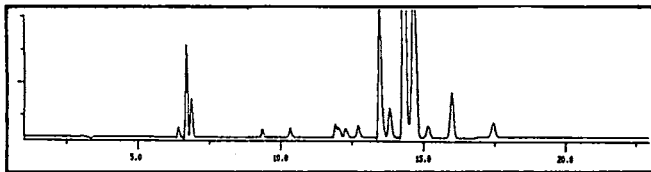


Fig.1 25mM-Sodium phosphate pH2.5

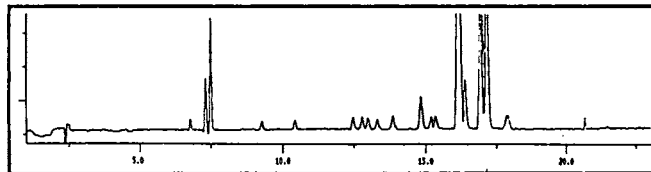


Fig.2 25mM-Sodium phosphate 100mM-Octanesulfonate pH2.5

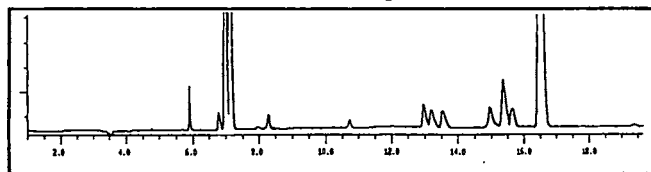


Fig.5 製剤中アミノ酸分析 25mM-Sodium phosphate 100mM-Octanesulfonate pH2.5

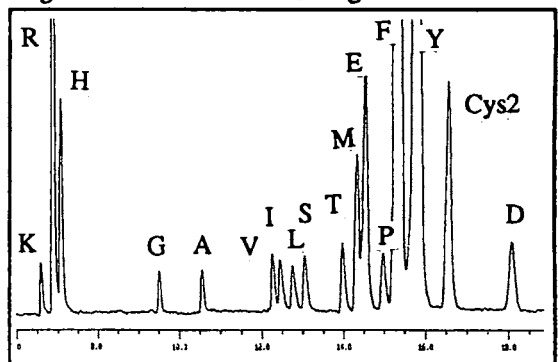


Fig.4 25mM-Sodium phosphate 5mM-β Cyclodextrin pH2.5

1) 丸山 町田 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集 p73 1992 12

(日本ミリポアウォーターズクロマトグラフィ-事業部) O米久保 淳、佐々木 秀輝、高橋 孝行
(北海道大学 農学部 森林化学講座) 寺沢 実

CAPILLARY ION ANALYSIS APPLIED FOR FOREST CHEMISTRY (II)

— Analysis of Aromatic Compounds —

(Waters Chromatography Division, Nihon Millipore) Jun Yonekubo, Hideki Sasaki, Yoshiyuki Takahashi
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University) Minoru Terazawa

Analysis of aromatic compounds such as Lignins, Tannins and Flavonoids is one of important methods in Forest Chemistry. TLC and HPLC have acquired for the quantitative and qualitative analysis of these compounds, and recently CZE and MEKC mode CE is being applied for aromatic compounds.

However, The analysis of the samples which include a large amount of neutral compounds or the enrichment of the anionic compounds by electromigration injection is difficult for the reason that the mobility vector of aromatic aldehydes and acids is toward anode against the electroosmosis flow under conditions in normal osmosis flow CZE and MEKC.

Optimum electrolyte condition for the separation of 15 aromatic compounds is established by CIA™ with reverse osmosis flow. This condition gives good separation for both standard and model solutions.

1. はじめに

芳香族化合物の分析は、紙・パルプ産業におけるリグニン分解のメカニズム、シキミ酸の生合成経路、樽材による蒸留酒の熟成プロセス、バイオマスの基礎研究等、森林化学分野における重要な研究手法の一つである。従来、これらの化合物の定量、定性にはTLCやHPLCといった分配クロマトグラフィーが主に用いられてきたが、近年、フラボノイドやタンニンの分析にCZEやMEKCモードによるCE分析が応用されはじめた。¹⁾これらのモードによるCE分析において、アルデヒドやカルボキシル基を有する化合物の泳動ベクトルは、電気浸透流に逆流したアノード方向に向かうため移動速度 v はカチオン及び中性成分のそれと比較してより小さなものとなり、大量の中性成分を含んだサンプルの分析や、電気泳動注入法によるサンプル濃縮が困難となっていた。

この問題解決のため、15種類の芳香族化合物及びそれらを含んだモデル溶液を用い、食品²⁾や廃棄物中³⁾の有機酸分析において有効な逆電気浸透流を有するCIA™ (キャピラリーイオン分析法)による最適条件について検討した。

2. 実験

装置はCIAシステム (Waters) を、データ処理はMax 820 (Waters) を用いた。キャピラリーはAccuSep (Waters) 75 μ mX60cmを使用し、254nmで検出した。

Coniferylaldehyde, Sinapaldehyde は、木材より単離、精製したものを、その他の標準品、試薬は市販品特級を使用した。モデル溶液は針葉樹 (カラマツ) 及び広葉樹 (オーク) 材の含水エタノール抽出画分に、標準品を添加したものをを使用した。

3. 結果及び考察

まず、通常のCZE (ノーマルオスモシスフロー) において15種の芳香族化合物標準溶液の最適分離条件を検討し、25mMホウ酸バッファー (pH9.2 未調整) でFig.1に示した分離を得た。次にオスモシスフローモディファイア- (OFM) 濃度を0.2mM固定とし、ホウ酸濃度を変化させたと

ころ、50 mM以上では Coniferylaldehyde と Sinapaldehyde の泳動に長時間を要し、10 mM以下では Gallic acid と Protocatechonic acid 及び Sinapic acid と Syringaldehyde の分離が損なわれた。又、いずれの濃度においても、Syringic acid と Ferulic acid の分離は達成されなかった。そこでホウ酸濃度を25 mM固定とし、OFM濃度を増加させたところ、浸透流速の増加に伴う泳動時間の短縮と共に特定ピークの泳動順に逆転が認められた。この事より 1) 逆電気浸透流下でも20 mM前後のホウ酸バッファが本化合物群の分離に適している事、2) 添加されたOFMは電気浸透流の逆転作用の他に、試料化合物と疎水性の分配作用を持つ事が示唆された。

次に未分離の Syringic acid と Ferulic acid 分離の為、pHを10.2 - 7.2に変化させたところ pH 8.0で目的の分離が得られ、最終的に15mM ホウ酸バッファ / 0.2mM OFM (pH 8.0) でFig.2に示した様な良好な結果が得られた。

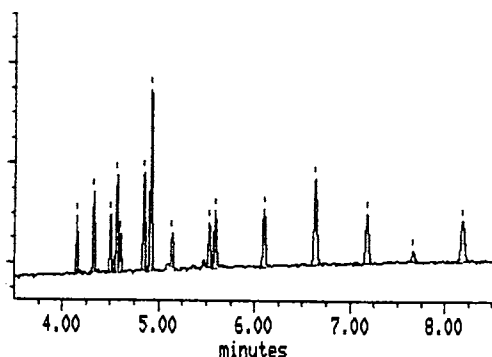


Fig.1 CZE with NOF*
* Normal Osmosis flow

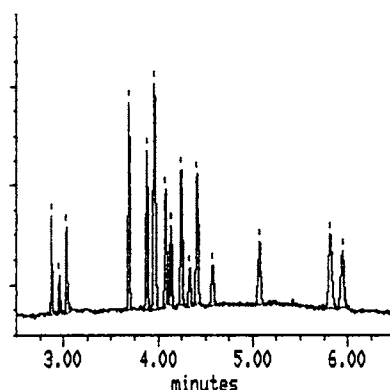


Fig. 2 CIA with ROF**
** Reverse Osmosis flow

Fig.3にモデル溶液でのCZE及びCIAメソッドにおけるエレクトロフェログラムを示した。

CIAモードでは Polyphenol 由来と考えられるブロードピークがCZEに比較して著しく減少して安定したベースラインが得られた。又、分析時間も大幅に短縮され、特にカルボキシル基を有する化合物については1/2以下の時間で精度良く定性、定量が可能であった。

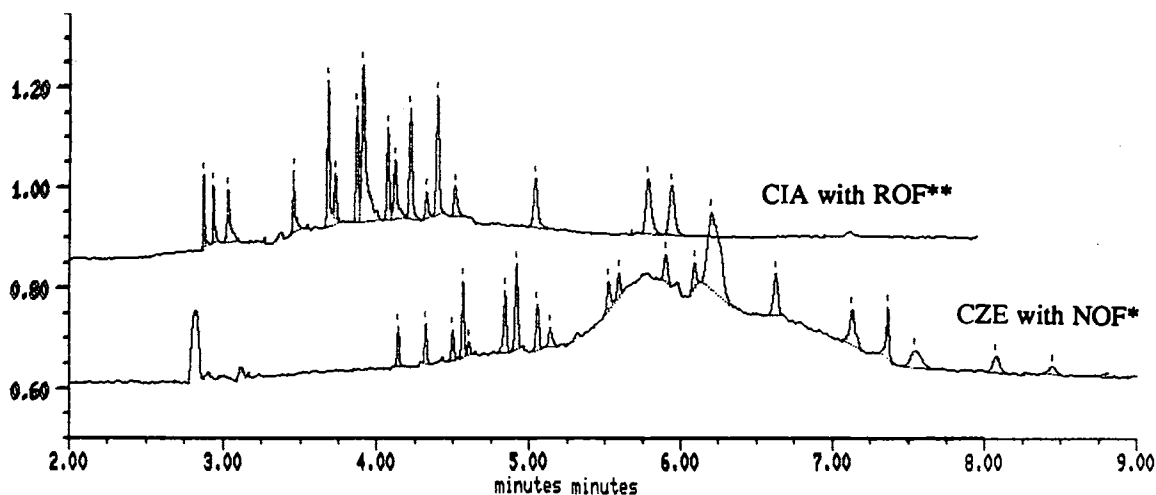


Fig.3 Electropherograms of model solutions

4. 文献

- 1) Petr Jandik, Gunther Bonn., Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions., pp 244-255
- 2) 佐々木 秀輝. 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集., pp 27-28
- 3) 米久保 淳, 寺沢 実., 環境化学., Vol.3, No.2, pp 426-427

高性能キャピラリー電気泳動による PMP (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone) 誘導体としての糖分析

(近畿大・薬) ○本田 進、笹岡 功、鈴木茂生

CARBOHYDRATE ANALYSIS BY HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS AS PMP DERIVATIVES

Susumu Honda, Isao Sasaoka, and Shigeo Suzuki
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Summary: PMP derivatives of mono- and oligosaccharides were analyzed by various modes of high-performance capillary electrophoresis. Zone electrophoresis as borate complexes and SDS-micellar electorokinetic chromatography gave complete resolution of all the monosaccharides commonly found in glycoproteins. Direct CZE, CZE as borate complexes and SDS-micellar electrokinetic chromatography allowed separation of homoglycans having various d.p.s with different magnitudes of resolution, and the last mode was effective for the separation of positional isomers of oligosaccharides.

【はじめに】

最近生化学を中心とした関連領域において複合糖質糖鎖の機能に注目が集まり、これにともなって簡便な糖鎖微量分析法の確立が切望されている。糖鎖は複雑な構造をもち、また生化学的試料中において糖鎖は構造の類似した異性体や同族体と共存するため、高分離能を有する高性能キャピラリー電気泳動 (HPCE) は糖鎖分析にとって期待できる方法と云える。しかし、生体成分としての糖鎖を分析する場合、試料は常に微量であり高感度検出が要求されるが、糖鎖には chromophore や fluorophore がないため HPCE で分離したのちオンカラムで直接高感度検出することができない。したがってやむを得ず誘導体化が重要な手段となる。HPCE においてはポストカラム誘導体化は非現実的であるため、もっぱらプレカラム誘導体化に焦点が絞られるが、演者らはこれまでの研究の結果から、この目的には現時点で PMP 法¹⁾が最も有望な方法と考えている。

本演題においては、種々の単糖およびオリゴ糖を PMP 誘導体として HPCE により分析する問題について、分離面を中心に基本的な検討を行った。

【実験】

HPCE 下記の構成による手製装置を使用して行った。高圧電源：松定プレシジョンデバイセス HER-30PI、検出器：日本分光 HCE 870-CE 型紫外外部検出器、キャピラリー：フューズドシリカ素管 (Polymicrotechnologies、内径 50 μm)。

【結果・考察】

単糖分析 糖の PMP 誘導体には糖 1 分子あたり 2 つの PMP が導入されており、これ

らの PMP 中に存在するケト基は中性～アルカリ性においてはエノール基に変換され、エノール基はさらに解離してエノレートイオンとなる。このため糖の PMP 誘導体は中性～アルカリ性では陰イオンとして挙動する。したがってフェーズドシリカ素管を用いるゾーン電気泳動では、静電的に陽極へ引き戻されながら電気浸透流によって陰極へ移動する。しかし、単糖の PMP 誘導体の電荷/サイズ比は単糖の種類にかかわらず等しいかほとんど差がないため、直接的なゾーン電気泳動モードでは相互分離されない。これに対してホウ酸錯体としてのゾーン電気泳動においては、錯体形成能や錯体の移動度の差により単糖 PMP 誘導体相互の分離が起こる。また、SDS-ミセル動電クロマトグラフィーにおいては、PMP 部分の疎水性により SDS-ミセルへの可溶化が起こるが、その度合は単糖 PMP 誘導体の種類によって若干異なるので、相互分離が可能である。これらの各モードについて最適化を行った結果、TABLE 1 に示したモードおよび条件で、糖タンパク質に共通して存在する単糖類（ガラクトース、マンノース、フコース、グルコサミンおよびガラクトサミン）ならびに内部標準として用いるラムノースを、一斉分離することができた（アミノ糖は N-アセチル体として分離した）。

TABLE 1 SEPARATION MODES AND OPTIMIZED CONDITIONS FOR THE SEPARATION OF MONOSACCHARIDES COMMONLY FOUND IN GLYCOPROTEINS

Separation mode	Carrier
Zone electrophoresis as borate complexes	200 mM borate bufer (pH 9.5) ²⁾
SDS-micellar electrokinetic chromatography	50 mM phosphate buffer (pH 6.8) containing SDS (40 mM)

オリゴ糖分析 オリゴ糖の PMP 誘導体には単糖の PMP 誘導体と同様に 1 分子あたり 2 つの PMP が導入されているが、単糖 PMP 誘導体と違って電荷は同じでもサイズが異なる。このため直接的なゾーン電気泳動においても、異なる速度で陰極へ移動し分離される。ホウ酸錯体としてのゾーン電気泳動においては、この効果に加えてホウ酸錯体形成能および錯体の移動度の違いに基づく効果が合併される。一方、SDS-ミセル動電クロマトグラフィーにおいては、PMP 部分の疎水性はすべての糖種について同じであるが、親水性の強い糖鎖部分が誘導体分子全体に占める割合に差があるため、全体としての可溶化の程度に違いができて、この結果相互分離が達成される。最適化された条件では、上述の 2 つの分離モードよりもより効果的な、重合度の違いに基づく分離が可能である。また、この分離モードでは、オリゴ糖の位置異性体を僅かな疎水性の違いに基づいて分離することも可能である。本演題においてはホモグリカンや糖タンパク質糖鎖の分離について詳細な検討を行った結果を示し、各分離モードの得失について比較・論議する予定である。

【文献】 1) S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, and J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, 180 (1989) 351. 2) S. Honda, S. Suzuki, A. Nose, and K. Kakehi, *Carbohydr. Res.*, 215 (1991) 193.

キャピラリー電気泳動法の医薬品
分析への応用 (第8報) 黄連解毒
湯煎液及びエキス製剤中のアルカ
ロイドの分析

(徳島文理大・薬) ○石井信之, 赤田良信

APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS TO PHARMACEUTICAL
ANALYSIS (VIII)

DETERMINATION OF ALKALOIDS IN OHRENGEDOKU DECOCTIONS AND
ITS EXTRACTS.

Nobuyuki ISHII and Yoshinobu AKADA

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

A capillary electrophoresis (CE) method for determination of berberine type alkaloids (berberine, palmatine and coptisine) in Ohrengedoku-Tho (黄連解毒湯), which is oriental pharmaceutical preparation, was established. Free zone CE with 100 mM phosphate buffer at pH 8.5 gave complete separation of three alkaloids within 15 min. Sample solution was introduced by hydrostatic method, and the on-column detection was performed at 214 nm. The Ohrengedoku-Tho decoction was treated by ion-pair extraction method and then applied to CE. The Ohrengedoku-Tho extracts was extracted with water-methanol (1:1) and then applied to CE directly. The detection limits for three alkaloids were 0.9 μ g/ml at a signal-to-noise ratio 3:1. Berberine, palmatine and coptisine in Ohrengedoku-Tho decoction and its extracts were determined with good reproducibility.

1. 緒言

黄連解毒湯は、代表的な漢方薬方剤の一つであり、4種の生薬（黄連、黄柏、山梔子、黄芩）が配合されている。本剤の配合生薬については、それぞれ指標成分が設定されており、HPLC等による定量法が報告されている。しかし、これらの分析法の黄連解毒湯の方剤やエキス剤の品質評価法への適用は、煩雑な前処理を必要とし、定量精度に問題があるなど、その実用性に難点があった。

演者らは、黄連解毒湯の構成生薬である黄連及び黄柏の主要成分であるベルベリン型アルカロイド類を、フリーゾーンによるキャピラリー電気泳動法により分析を行う

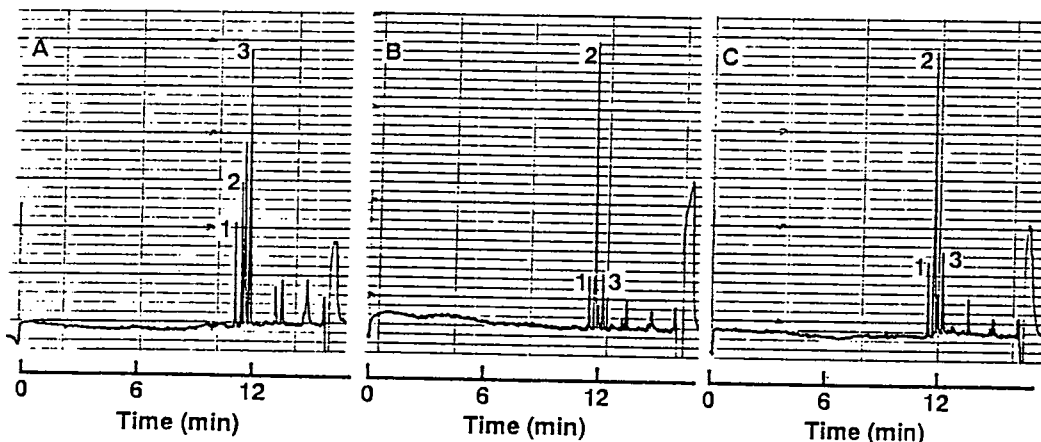
ための分離条件を検討した結果、簡単な前処理を行うのみで、黄連解毒湯中の各アルカロイドを精度良く分離定量できることがわかった。演者らが確立した分析法を用いて、黄連解毒湯煎液及び市販のエキス剤の理化学的な品質評価の検討を行った。

2. 実験

装置は、Waters Quanta 4000 System を用い、キャピラリーは、75 μ m \times 60 cm (有効長 53cm) の Waters 製アキュセップキャピラリーを使用した。検出は、装置に内臓の紫外部吸収検出器を用い、オンカラム検出法により行い、214 nm を検出波長とした。電解液は、pH 8.55 の 100 mM リン酸緩衝液を使用した。泳動電圧は、7 KV とした。標準溶液及び試料溶液の注入は、落差法 (10 sec) で行った。塩化ベルベリン、塩化パルマチン及び塩化コプチシンは、生薬定量用標準品を用いた。煎液は、常法に従って、水で半量煎じし、ガーゼろ過し、水で定容とし、トリデカンスルホン酸ナトリウム (C₁₃) によるイオン対抽出を行い、試料液を調製した。また、同方剤の 50% エタノール抽出液及びメタノール抽出液を調製し、方剤の煎液と比較し、各成分の水への移行率について検討した。また、市販のエキス剤は、その一定量を精密に量り、50% メタノールで抽出し、試料液とした。

3. 結果及び考察

本剤の構成生薬の黄連及び黄柏については、水煎液をそのまま試料液としてベルベリン型アルカロイドの分析が可能である。しかし、方剤である黄連解毒湯については、煎液をそのまま注入すると、共雑成分による妨害のためか、不分離なゾーンとなり、定量が妨害されることがわかった。そこで、煎液の前処理としてトリデカンスルホン酸ナトリウム (C₁₃) をカウンターイオンとする溶媒抽出を行った。演者らが提出した分析条件により得られた定量値から、方剤煎液中のベルベリン型アルカロイド含量は、単味生薬中のそれを大きく下回っていることがわかった。



Typical CE electropherograms of decoction, extract and powder

A : decoction B : extract C : powder
 1 : Coptisine 2 : Berberine 3 : Palmatine

キャピラリーゾーン電気泳動による中枢神経系疾患患者髄液中有機酸の分離・定量

(杏林大学保健学部) ○平岡 厚, 三浦 勇夫, 赤井 淳一郎
 (国立千葉病院・神経科) 服部 宗和, 富永 格
 (日本ミリポア) 佐々木 秀樹

CAPILLARY-ZONE ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF ORGANIC ACIDS IN CEREBROSPINAL FLUID FROM PATIENTS WITH VARIOUS CENTRAL NERVOUS SYSTEM DISEASES

Atsushi Hiraoka,¹ Isao Miura,¹ Jun-ichiro Akai,¹ Itaru Tominaga,² Munekazu Hattori² and Hideki Sasaki³

¹Kyorin University School of Health Sciences, ²Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital, ³Nihon Milipore, Co.

Capillary-zone electrophoresis (CZE) was applied to the analyses of organic acids in cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with various central nervous system (CNS) diseases. Under the conditions employed, the anionic components of CSF, such as oxalate, inorganic phosphate, pyruvate, glutamate, lactate, ascorbate etc. were clearly separated and the concentrations of lactate (normally 70-200 mg/l) and other organic acids (generally below 10 mg/l) could be measured by CZE. The results showed that the CSF levels of lactate and pyruvate were elevated being accompanied by elevation of the relative level to the latter of the former in cerebral infarction and bacterial meningitis and that the CSF levels of ascorbate were reduced in inflammatory disorders of brain and/or meninges. These results suggested that CZE can become a powerful tool as an aid in biochemical diagnosis using CSF of CNS diseases.

1. はじめに

髄液中には主成分の乳酸 (LA) を始め種々の有機酸が存在し, 中枢神経系内における糖・アミノ酸代謝や酸化還元状態の変化にもとづいて量的・質的に変動することが知られている。我々はキャピラリー電気泳動 (CZE) を用いて髄液有機酸におけるそのような変化を検出・測定することを試みた。

2. 方法

(1) 対象: 脳血管障害, 脳や髄膜の炎症, 脱髄・変性疾患, てんかん, 機能的な精神病, 神経症等各種の中枢神経系疾患の患者より採取された数十の髄液検体を限外ろ過により除蛋白して分析用の試料とした。

(2) 分析条件: (A) (B) の2条件を使用した。どちらも, 装置として Waters Quanta-4000 (Negative Powersupply 付き) を用いて検出は 185 nm にて

行ない、データ解析は Waters Maxima 805によった。条件 (A) は、食品試料中の有機酸の分析条件¹⁾の一つをほぼそのまま適用したもので、50 μm X 60 cm のカラムに20秒間注入して120 mM ホウ酸Na (5% NicePakを含む) を電解液として15 KVで泳動するものであり、一方、条件 (B) は感度を上げる為にカラムの内径を75 μm 、試料注入時間を60秒とし、それにもなって電解液を50 mM ホウ酸Na (2.5% NicePakを含む)、電圧を20 KVに変えた。

3. 結果及び考察

両条件下で、oxalate, pyruvate (PA), lactate, ascorbate等の髄液の有機酸(移動度の順) がきれいに分離され、又、inorganic phosphate, glutamateも検出された (Fig. 1)。 実用感度におけるこれらの化合物の検出限界は、条件 (A) においては3.13-6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、全検体について検出・定量が可能だったのはLA (正常値: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下、脳梗塞、細菌性髄膜炎等で増加) のみであったが、(B) においては1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも一応は検出されたので、PA, ascorbate, glutamate等の微量成分 (一般に10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下) の濃度も、多くの検体で測定可能であった。 CZEを用いて各疾患の髄液について得られたそれらの有機酸のレベルの変動の傾向は、初期の研究者が他の方法 (HPLC, 酵素法) で測定して得た値の傾向とよく一致していた。

1. Oxalate 2. Fumarate 3. Inorganic phosphate 4. Acetate
5. Pyruvate 6. Lactate 7. Glutamate 8. Ascorbate

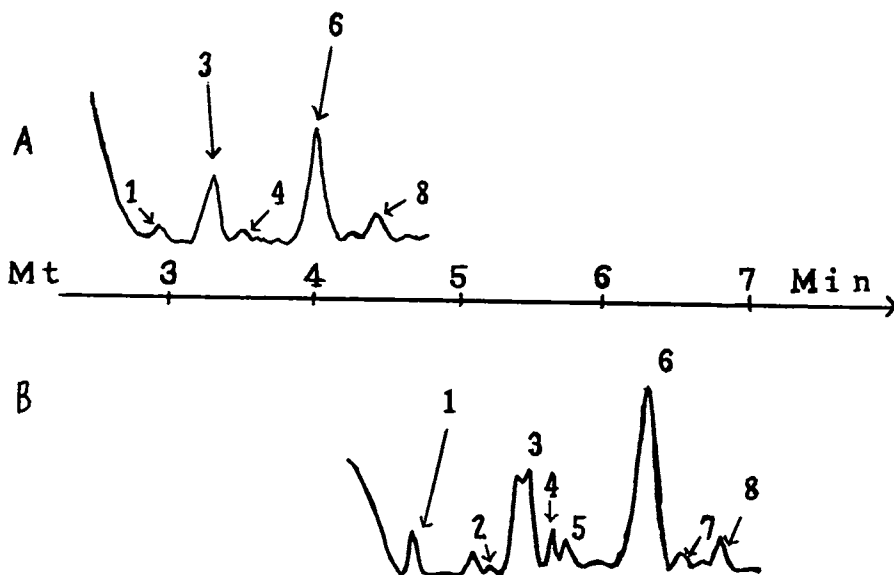


Fig. 1. Typical electropherograms of CSF anionic components obtained under the conditions (A) and (B)

参考文献

- 1) 佐々木 秀樹, 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集p27. (1992)

キャピラリー電気泳動によるシスプラチン-グルタチオン複合体生成の検出

(大塚電子)
(福井医科大学)

○新田哲士、笹川秀男
松川茂、杉本千鶴

NON-ENZYMATIC FORMATION OF CISPLATIN-GLUTATHION COMPLEX MOLECULES AND THEIR DETECTION BY MEANS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Satoshi Nitta¹⁾ and Hideo Sasagawa¹⁾ ,
Shigeru Matsukawa²⁾ and Chizuru Sugimoto²⁾
OTSUKA ELECTRONICS CO., LIT¹⁾, FUKUI MEDICAL SCHOOL²⁾

There has been an increasing attention to cisplatin (CDDP) and its analogues these days, which are effective therapeutics against cervical tumor, lung cancer, germinal glands tumor and others .

As is the case with many other anti-tumor and -cancer substances, many cancer cells will acquire resistance against CDDP. It is well known that its effectiveness is lost as the result of it, and one has been making strenuous efforts in order to figure out how to overcome such resistance.

It is assumed that glutathion (GSH) within a cell is associated with acquisition of resistance, which is also proved by many accumulating experimental data. Meanwhile, little is known about the mechanism how intracellular GSH makes CDDP innocuous, which was taken in the cancer cell. An attempt was made so that product(s) made from non-enzymatic reaction between CDDP and GSH in a test tube were separated, with the aim of elucidating chemical characteristics of the complex molecule(s) and mechanism of the reaction.

A capillary electrophoresis apparatus was used for separation, as being able to measure absorption spectra of separated peaks instantaneously. Two peaks assumable coming from the reacted products were successfully detected.

1. 緒言

シスプラチン (CDDP) は近年、頭頸部腫瘍、肺癌、生殖腺腫瘍などの治療に関して臨床的に有望視されている抗腫瘍性白金錯体である。しかし、多くの抗腫瘍性物質がそうであるように、癌細胞がCDDPに対して抵抗性を獲得する結果、抗癌剤としての有用性が失われていることが知られており、抵抗性を克服するための方策を見出すための努力が続けられている。この機構として細胞内グルタチオン (GSH) が抵抗性の獲得に関与すると推測され、事実これを支持する実験データも蓄積している。ところで、細胞内GSHが癌細胞に取り込まれたCDDPを無毒化する時の機構についてあまり知られていない。この解決のために、まず、試験管内で両者を非酵素的に反応させたときの反応生成物の分離を行い、その化学的特性と反応様式を明らかにすることを試みた。その結果、反応生成物と思われる2種のピークを検出することができた。

2. 実験

キャピラリー電気泳動の装置には、大塚電子社製CAPI-3000を用いた。キャピラリーは内径75 μ m、全長600mm、有効長475mmのものを用いた。サンプルは落差法で落差20mmで、30sec注入し、印加電圧は250V/cmで行った。キャピラリー部の温度制御は25 $^{\circ}$ Cで行なった。検出は、ホトダイオードアレイで200~395nmの範囲で行なった。

サンプルは1 mM CDDPと1または2 mM GSHを混合して使用した。緩衝溶液には10 mM リン酸緩衝液 pH7.4, 3 mM NaClを用いた。

3. 結果と考察

GSHは緩衝溶液中で反応し、他の成分を生成する。この成分はGSSG評品とMtおよびスペクトルが一致することより、GSHが自動酸化を受け、GSSGが形成されたと考えられる。(FIG-1 (C) (d), FIG-2 (a))

GSHとCDDPを反応させるとGSH, CDDP以外の新たな成分が生成される。(FIG-1) この成分はGSHとCDDPとは異なるスペクトルを示し(FIG-2), GSHとCDDPの反応後、時間とともに増加した。(FIG-3) この時、GSHの自動酸化は抑制された。(FIG-4) これらのことより、GSHとCDDPの反応によりGSH・CDDP複合体が形成されていると考えられる。

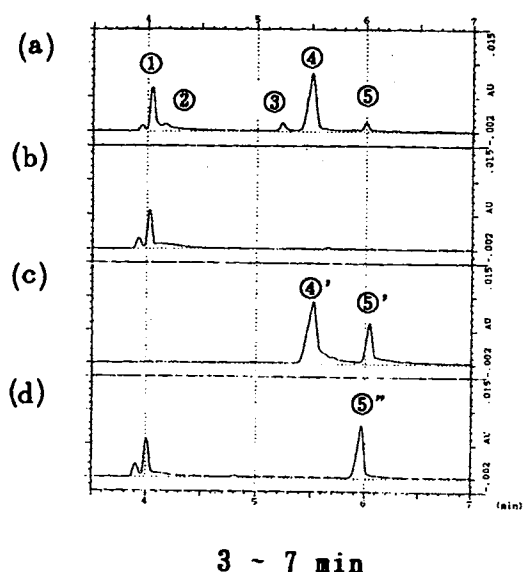


FIG.1, Display of capillary electrophoresis of reaction mixture with CDDP and GSH (or GSSG) after 150 min

(a) 2mM GSH, 1mM CDDP (b) 1mM CDDP
 (c) 2mM GSH (d) 2mM GSSG, 1mM CDDP

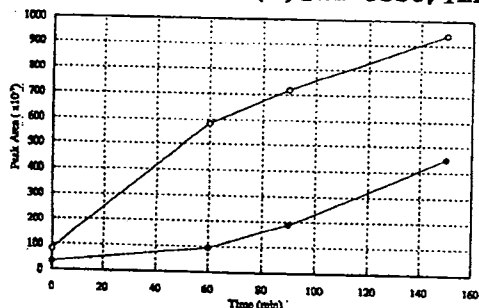


FIG.3, Changes in peak area of two new peaks as a function of reaction time

●- ; peak area of FIG-1 ④
 ○- ; peak area of FIG-1 ⑤

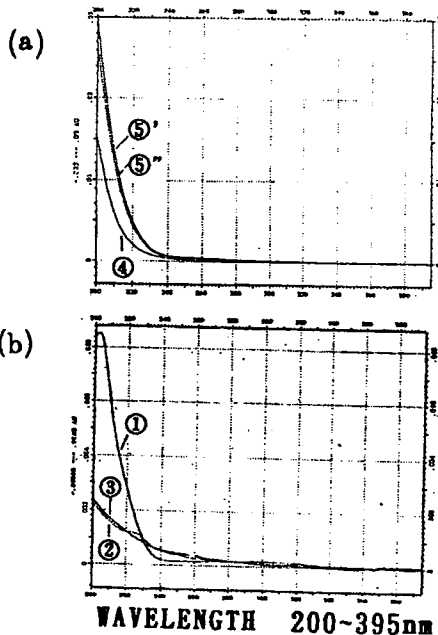


FIG.2, Absorption spectra of CDDP, GSH, GSSG and two peaks newly appeared

(a) SPECTRUM OF FIG-1 ④, ⑤', ⑤''
 (b) SPECTRUM OF FIG-1 ①, ②, ③

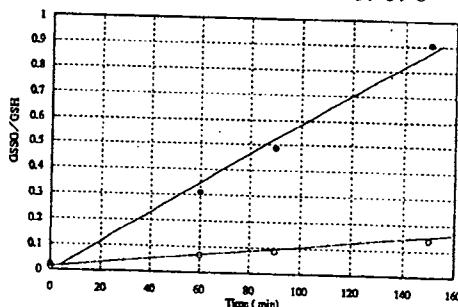


FIG.4, Prevention of auto-oxidation of GSH with CDDP

●- ; reaction of 2mM GSH alone
 ○- ; reaction of 2mM GSH and 1mM CDDP

ミセル動電クロマトグラフィーによる血清
中ベンゾジアゼピン系抗てんかん薬の分析

(国立精神神経センター神経研) 今沢正興、赤星えりか

DETERMINATION OF BENZODIAZEPINE ANTIEPILEPTICS IN
SERUM BY MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Masaoki Imazawa and Erika Akahoshi

National Institute of Neuroscience, NCNP

A micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the determination of four benzodiazepine antiepileptics (clonazepam, nitrazepam, diazepam and clobazam) in human serum is described. After solvent extraction, the complete separation of a spiked mixture of four antiepileptics was achieved within 8 min using lithium dodecylsulfate (LDS) as a micellar phase. Separation of diazepam and its active metabolite, N - desmethyldiazepam was achieved using hexadecyltrimethylammonium bromide as a micellar phase. On column UV monitoring enables detection and quantification of all the drugs at the therapeutic serum levels.

1. はじめに

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重要であり、てんかんの薬物治療のためにこれまで多くの血中抗てんかん薬の分析法が報告されている。我々は、これまで一般的な抗てんかん薬のキャピラリー電気泳動による簡便な同時分析法を報告してきたが、通常の抗てんかん薬は、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。今回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、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をもちいた。血清試料は、酢酸エチル-nペンタンによる有機溶媒抽出の後、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、泳動を行った。複数のベンゾジアゼピン系抗てんかん薬の分析には、分離溶液として 30mM ドデシル硫酸リチウム (LDS) を含む pH9.5 ほう酸緩衝液にエチルセロソルブ (9%) とシクロデキストリン (10 mM) を加えたものを用いた。検出波長 260nm, 25 $^{\circ}$ C, 30kV にてミセル動電クロマトグラフィーをおこなった。ジアゼパム (DZP) とその代謝産物、デスメチルジアゼパム (DMD) の分離には分離溶液として上記ほう酸緩衝液に陽イオン性界面活性剤ヘキサデシルトリメチルアムモニウムブロミド、HTAB (10mM) とエチルセロソルブ (9%) を加えたものを用い、電極の極性を逆転して分析した。血清試料は 1.0ml 使用した。

3. 結果および考察

LDSを用いたミセル動電クロマトグラフィーによりクロナゼパム (CZP)、ニトラゼパム (NZP)、DZP、クロバザムの4種のベンゾジアゼピン系抗てんかん薬と内部標準が完全に分離し、分析は8分以内に終了した (Fig. 1.)。エトキシエタノールおよびシクロデキストリンの添加は、薬物相互および血清由来の妨害ピークとの分離のために有効であった。各薬物の検出限界は5-15 ng/ml程度であり、分析値の変動係数は必要な濃度範囲において

10%以内で、ほぼ満足すべきものであった。フェニトイン、フェノバルビタール、カルバマゼピンなどの他の抗てんかん薬の共存は本分析を妨害しない。一般的に、複数のベンゾジアゼピン系抗てんかん薬が併用されることは少ないが、本法は各薬物の同定および定量に有効な簡便で正確な方法と言える。ただ、上記の条件ではDZPとその活性化代謝産物である脱メチル体、DMDは相互に分離されなかった。この目的のためには、LDSに替えて陽イオン性界面活性剤、HTABの使用が有効であった (Fig. 2.)。脱メチル体などの代謝産物も含めた構造類似の薬物相互の分離条件については、さらに検討が必要である。以上のように、キャピラリー電気泳動法は、治療有効血中濃度が100 ng/ml以下と、比較的低いベンゾジアゼピン系抗てんかん薬の分析にも適用可能であることが明らかとなった。

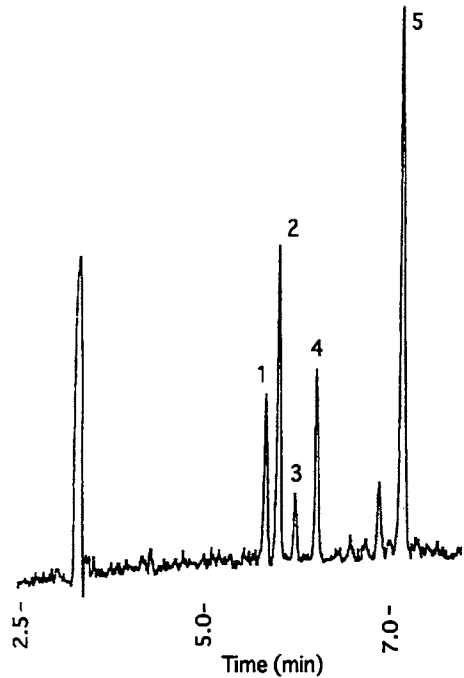


Fig. 1. Electropherogram of an extract of serum containing four benzodiazepine anti-epileptics. 1= nitrazepam(100ng/ml), 2=IS, 3=clonazepam(50 ng/ml, 4=clobazam (200 ng/ml), 5=diazepam(200ng/ml).

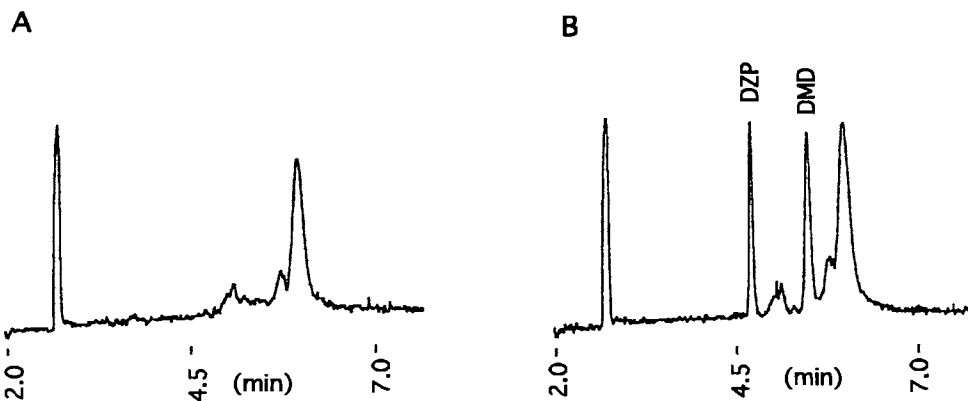


Fig. 2. Electropherograms of extracts of (A) blank human serum and (B) human serum spiked with diazepam and desmethyldiazepam (each 200ng/ml).

高性能先端分析—キャピラリー—電気泳動法による非タンパク結合型薬物濃度の測定

(京大・薬) 小原敏夫、○渋谷明正、吉本泰樹、中川照眞

DETERMINATION OF UNBOUND DRUG CONCENTRATION BY HIGH-PERFORMANCE FRONTAL ANALYSIS / HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Toshio Ohara, Akimasa Shibukawa, Yasuki Yoshimoto, Terumichi Nakagawa,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University,

A simple HPCE method based on the principle of frontal analysis was applied to the determination of unbound concentration of basic drugs in the protein binding equilibrium. A small amount of sample solution (ca. 80nL) was introduced into the fused silica capillary whose inner surface was coated with linear polyacrylamide through Si-C bond. Basic drug was eluted as a zonal peak with a plateau, and the unbound drug concentration was calculated as the drug concentration in the plateau region. The present method was applied to the protein binding study between α_1 -acid glycoprotein and basic drugs.

〔緒言〕 薬物は血漿中でアルブミンや α_1 -酸性糖タンパクと結合しており、結合型薬物濃度と非結合型薬物濃度は平衡状態にある。タンパク結合は、薬物の体内動態や薬理効果（あるいは副作用）の発現に大きな影響を及ぼす。従って、有効かつ安全な薬物の開発と使用のためにはタンパク結合の研究が不可欠であり、そのためには、非結合型薬物濃度の測定が必要である。非結合型薬物濃度の測定には、従来から試料を平衡透析や限外ろ過後 HPLC 分析する方法が汎用されているが、薬物の膜への吸着や結合型薬物の漏れに伴う測定誤差の発生、あるいは比較的多量の試料量を要する等の問題点がある。一方、我々が開発した高性能先端分析（High-Performance Frontal Analysis、HPFA）法は、制限進入型（restricted-access type）の HPLC カラムに試料を直接注入することにより非結合型薬物濃度を簡便に定量する新しい分析法（R1）であり、上述の問題点を克服できた。ところが、HPFA 法では非結合型薬物分率の高い試料ほど多量の試料注入量が必要になるので、注入量の一層の低減化が望まれていた。そこで我々は、キャピラリー電気泳動を用いた高性能先端分析（HPCE/FA）法を開発して、塩基性薬物のタンパク結合の簡便な極微量分析に応用した。

〔実験条件〕 HPCE 装置、270A（ABI 社）。泳動緩衝液、りん酸緩衝液（pH 7.4、イオン強度 0.17）。印加電圧、+10kV。検出、200nm 又は 200nm。温度、25°C。試料、ベラパミル（VER、カルシウムチャンネルブロッカー）又はイミプラミン（Im、抗うつ薬）とヒト血清アルブミン（HSA）又は α_1 -酸性糖タンパク（ α_1 -AGP）を泳動緩衝液に溶解して調整した。

〔結果、考察〕 内面をリニアポリアクリルアミドで処理したキャピラリー（内径 50 μ m、長さ 41cm、有効長 22cm）に 113~340 μ M のベラパミル（VER）と 100~550 μ M の HSA 混合溶液を

注入（吸引10秒、約80nL）した後、キャピラリー両端に電圧(+10kV)を印加した。泳動緩衝液にはりん酸buffer(pH7.4、I=0.17)を使用した。内面コーティングにより電気浸透流が発生しないので、タンパク質は検出側（負極側）には移動しない。一方、塩基性薬物であるVERは電気泳動により検出側に移動するが、結合型VERはタンパク質から解離した後、検出側に移動する。その結果、先端分析の原理に基づき、VERはプラトー部分を有する帯状ピークとして溶出された（図1）。プラトー高さに相当するVER濃度は限外ろ過-HPLC法により別途測定した非結合型VER濃度と良好に一致したことにより、HPCE/FA法により極微量の試料で非結合型薬物濃度を定量できることが判った。

血漿中での塩基性薬物のタンパク結合には、 α_1 -AGPが深く関与する。しかし α_1 -AGPは高価であり、微量分析法の開発が望まれている。そこで、HPCE/FA法を塩基性薬物と α_1 -AGPのタンパク結合研究に応用した。即ち、7.5~80 μ M VERと30 μ M α_1 -AGPの13種類の混合溶液をHPCE/FA法により分析して(1)式を用いてScatchard解析を行ったところ、会合定数(K)が $1.13 \times 10^6 (M^{-1})$ 、結合サイト数(n)が0.82となり、文献値と一致した値が得られた。また、5~350 μ M Imと22.5 μ M α_1 -AGPの15種類の混合溶液を本法により分析して(2)式を用いてLangmuir解析(R2)した結果、Imと α_1 -AGPとのタンパク結合には特異的結合と非特異的結合がみられ、特異的結合の会合定数(Ks)が $1.36 \times 10^5 (M^{-1})$ 、結合サイト数(n)が0.97であり、非特異的結合の会合定数(Kns)が $6.70 \times 10^3 (M^{-1})$ であった。

今回使用した混合溶液中のタンパク結合率は20~70%と広範囲にわたるが、いずれの試料も同一の注入量(80nL)で分析が可能であった。このことは、Scatchard解析のように薬物のタンパク結合率が異なる一連の試料を分析する際に有利である。

$$\text{Scatchard式} \quad r/Cu = nK - Kr \quad (1)$$

$$\text{Langmuir式} \quad r = nKsCu / (1 + KsCu) + KnsCu \quad (2)$$

ここでCuは非結合型薬物濃度、rはタンパク1分子に結合している薬物の分子数を示す。

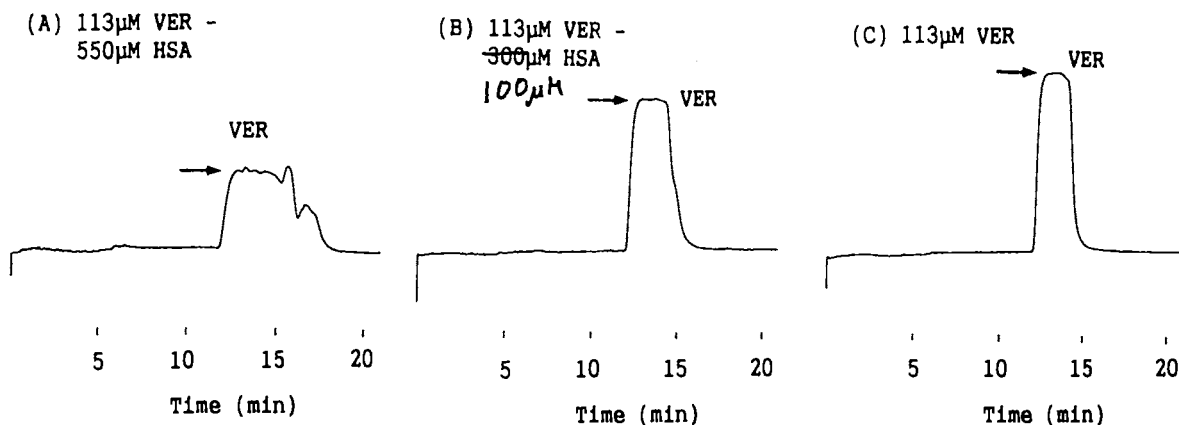


Figure 1. Electropherograms of VER - HSA mixed solutions.

[参考文献] R1 中川照眞、澁川明正、分析化学、40, 203-214(1991).

R2 Z. Taira, H. Terada, Biochem. Pharmacol., 34, 1999-2005(1985).

(日本分光技術研究所) ○黒須泰行、志佐佳子、佐藤泰世、千田正昭

INVESTIGATION OF ENANTIOMER EXCESS BY CAPILLARY
ELECTROPHORESIS

Yasuyuki Kurosu, Yoshiko Shisa, Yasuyo Satou, Masaaki Senda
JASCO Technical Research Laboratories Corporation

We investigated the accuracy and the correction of enantiomer excess for DL mixtures of DNS derivatives of standard amino acids by capillary electrophoresis (CE). When some racemic mixtures we are optically resolved, good reproducibility for D/L area ratio was obtained (CV value : 1.9 %). However, the rear peak area was larger than the front one. This is probably caused by the difference of the migration velocities for D and L compounds. Therefore, the peak are as for various mixtures were corrected by using the D/L ratio of migration velocity. The resulting correlation coefficient between expected and observed enantiomer excess was extremely high (0.9986). Furthermore, we studied the electrophoretic condition for resolution. The determination method of enantiomer excess by CE will be successfully applied to the DL mixtures of standard amino acids in the same as the polarimeter or circular dichroism spectrometer.

1. はじめに

近年、キャピラリー電気泳動(CE)法が有する高分離能の特長を生かして、光学分割を実現する方法が種々検討されている¹⁻³⁾。CEでは主に電解液にキラル化合物を認識する物質を添加する方法が用いられるため、操作・コストの点で、系統的に検討されてきた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)よりも有利と考えられる。

ところで、これまでのCEによる光学分割は主にラセミ化合物を分割できるか否かの検討に主眼が置かれ、分割精度やその補正についてなどの基本的な検討があまりなされていない。一方、食品化学、合成化学、薬学などの分野でアミノ酸のエナンチオマー過剰率 (ee (%)) = $D-L/D+L$ or $L-D/D+L$) の決定は重要な課題である。

本報告では標準アミノ酸のD体、L体、DL体を各々ダニッソル(DNS)化し、存在比の異なるDL混合物を調製し、より多くのアミノ酸の分割を目指した。さらにキャピラリー電気泳動によるee値の精度及びその補正について検討した。

2. 実験

2-1. DNS-アミノ酸の調製 D, L, DL-標準アミノ酸 各 10 mg を常法に従って、ダニッソル化し、水飽和酢酸エチルで抽出後、必要に応じて逆相系HPLCで精製した。

2.2. 電気泳動条件 電解液：60 mM γ -シクロデキストリン/100 mM SDS/100 mM sodium borate (pH 8.3)、 K^+/Li^+ -リ-：未処理 γ - D^+ シカ (50 μm I.D. x 実効長 30 cm、全長 50 cm、印加電圧：15 kV、注入法：サフロン法 (落差 5 cm, 20 sec, 注入量 約 4 nl)、検出：UV200 nm。以上を基本的な泳動条件とした。

3. 結果と考察

まず DNS-DL-Met (ラセミ体) を上記の条件で分割 (分離度 1.3 以上) し、その D^+ - L -面積における D/L 比を求めた。その結果、D 体、L 体の順に移動し、D/L 面積比は 0.9633 (面積百分率 49.3:50.7)、遅れて移動してくる L 体がやや大きめに検出された。この理由として、 L を通過する時間の違いの影響を受けたと考えられたので、D 体と L 体の移動速度 (D:5.508, L:5.617 min) の違い (移動速度の D/L 比 (移動時間の D/L 比の逆数)、0.9811) を考慮して、同速度になるように仮定して、補正を行なった。その結果、0.9819 (面積百分率 49.5:50.5) となり、改善された。さらに分割度の高い Phe についても行った結果、その補正の効果が顕著にあらわれた。

DNS-Met のラセミ体における面積比の CV 値は良好な値 (1.9% ($n = 5$)) を示したが、旋光度計 (約 0.2%) や円二色性 (1% M^+ - M^-) と比較するとやや低い値であった。次に、D/L 存在比の異なる混合物を調製し分析した。

その結果、D/L 存在比が異なる混合物の状態をよく反映したエレクトロフォラムが得られた。これらの結果をもとにして、期待される ee 値と測定値 (補正後) との相関を求めた結果、非常に高い値 (0.9985) を示した。また、pH や分割試薬濃度などの分割条件も検討する予定である。図 1 に分割度に対する pH の影響を調べた結果の一部 (Met と Phe) を示した。

総合的に眺めると、旋光度計や円二色性偏光計の精度よりやや劣るものの、短時間 (分析時間：約 10 分以内 (数種の DNS-アミノ酸において)) に、高感度 (質量感度：6.6 pg (DNS-Met, S/N=2)) で測定できることを考慮すると、非常に有用なアミノ酸の ee 値決定法に成り得るものと思われる。

- 1) K. Otsuka et al., J. Chromatogr., 559, 209 (1991)
- 2) A. Dobashi et al., Anal. Chem., 61, 1986 (1989)
- 3) H. Nishi et al., J. Chromatogr., 515, 233 (1990)

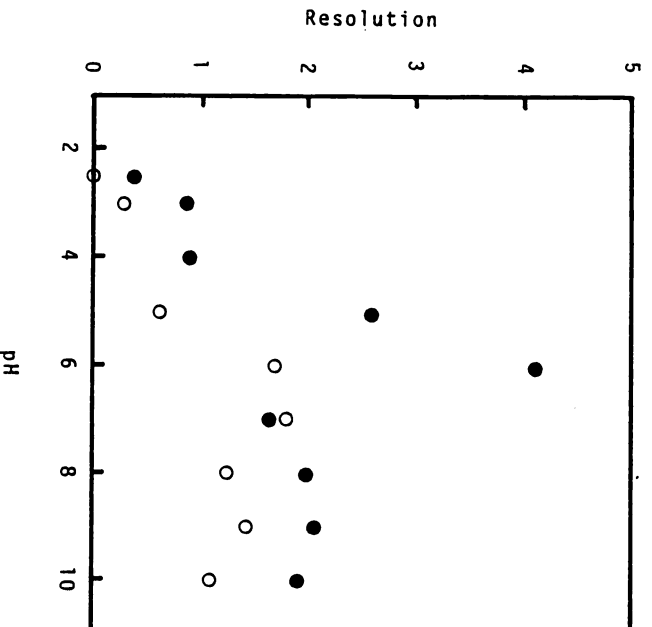


Fig. 1 Effect of pH on DL resolution of DNS-Met and Phe. Capillary, 50 μm I.D. x 300 mm (effective length); electrolyte, 60 mM γ -cyclodextrin/100 mM SDS/25 mM Na-PO₄ (pH 2.5-10); applied voltage, 15 kV; detection, UV absorption at 200 nm. Injection method was by siphon (height, 5 cm; injection time, 20 sec; injection volume, ca 4 nl). ○ and ● indicate Met and Phe, respectively.

新規キサンチンオキシダーゼ阻害
剤BOF-4272のキャピラリ
ー電気泳動による光学分割

(京大・薬)○吉本泰樹、渋谷明正、中川照眞、(大塚製薬工場・鳴門研究所)西村
益浩、内藤真策、(大塚電子株式会社)笹川秀夫、新田哲士

CHIRAL SEPARATION OF A NEW XANTHINE OXIDASE INHIBITOR, BOF-4272, BY USING
HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Yasuki YOSHIMOTO¹, Akimasa SHIBUKAWA¹, Terumichi NAKAGAWA¹, Masuhiro
NISHIMURA², Shinsaku NAITOH², Hideo SASAGAWA³, Satoshi NITTA³

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹, Otsuka Pharmaceutical
Factory, Inc.², Otsuka Electronics CO., LTD.³

HPCE was applied for the investigation on the enantioselective protein binding of a new xanthine oxidase inhibitor, BOF-4272. Serum albumin of different animals was added into the running buffer as a chiral selector; rat and mouse serum albumins enabled enantioseparation, but human, bovine and rabbit serum albumins did not. The effects of HPCE conditions such as buffer salt concentration, temperature and organic modifier on the enantioseparation were also investigated. The competitive binding study indicated that BOF-4272 competes with warfarin in binding to rat serum albumin.

【緒言】BOF-4272は、新規キサンチンオキシダーゼ阻害剤であるが、その光学異性体間での肝臓への取り込みに差があり、また各異性体ごとに取り込みに動物種差が存在する。この原因の一つとして各異性体間、あるいは動物種間でBOF-4272のタンパク結合に差があることが考えられる。そこで、今回は種々の血漿アルブミン溶液をrunning bufferとするHPCE法を用いて、BOF-4272とアルブミンのタンパク結合における立体選択性ならびに動物種の違いについて検討した。同時に、BOF-4272の光学分離に対するrunning bufferの条件の影響を調べた。

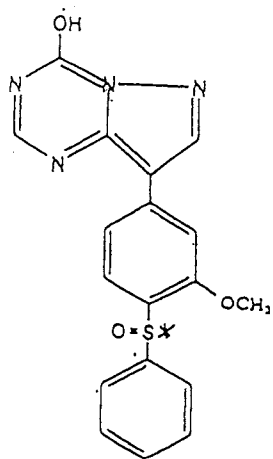
また、albuminはワルファリン、ジアゼパム、ジギトキシンの三種の薬物にそれぞれ特異的なbinding siteを持っていることが知られている。そこで、これらの3種の薬物とBOF-4272とを競合させることによりbinding siteの予測を行った。

【方法】内面にlinear-polyacrylamideを共有結合させることによって電気浸透流を消失させたcapillary(有効長30cm, 全長42.5cm)内部を5 μ Mのalbumin溶液(phosphate buffer)で満たした後、BOF-4272のsample solutionを落差法で注入し(5sec.)フォトダイオードアレイ検出器を備えた装置CAPI-3000(大塚電子)で、電圧(-7kV または -6kV)を印加した。

【結果と考察】 今回のHPCE条件ではBOF-4272は負電荷を有し、アルブミンも負に帯電している。また、BOF-4272のほうがアルブミンよりも早く移動する。したがって、光学異性体間でタンパク結合の強さが異なる場合、アルブミンとより強く結合する光学異性体の方が遅れて溶出されて、光学分離が達成される。ラットとマウスの血漿アルブミンを光学認識キャリアーとして用いた時にBOF-4272は光学分離され、タンパク結合に対する立体選択性が確認された。この時、(R)-異性体の方が(S)-異性体よりも早く溶出されたことから、(S)-異性体の方が強くタンパク結合することが判った(Fig. 2)。

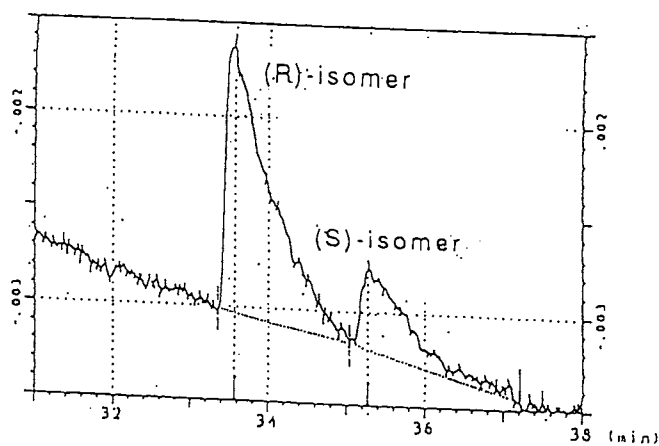
次に、BOF-4272の泳動挙動に及ぼすHPCEの条件の影響を調べたところ、温度の上昇(10℃→37℃)やイオン強度の増加(0.07→0.21)によって薬物とタンパクの結合力は弱くなり、薬物の移動時間は早くなった。また、2-propanolの添加(<5%)により分離度(Rs)の向上が確認されたが、それ以上の添加は分離度を減少させた。次に薬物タンパク結合における競合効果を考察するために、泳動緩衝液中にラットアルブミンおよびwarfarinを添加したところ、BOF-4272は光学分離されなくなった。このことから、BOF-4272とwarfarinはラットアルブミン分子上の同一サイトで結合すると考えられる。一方、diazepamやdigitoxinを添加した場合にはそのような競合効果は見られなかった。このように、タンパク質溶液を泳動緩衝液を用いるHPCE法は薬物のタンパク結合における競合効果を調べるうえで有用である。

Fig. 1



Structure of BOF-4272

Fig. 2



Chiral separation of (R)rich BOF-4272 by use of rat serum albumin.

30 アビジンを用いたアフィニティー動電クロマトグラフィーによる光学分割

(日本ベーリンガーインゲルハイム) ○田中喜秀
(姫路工大・理) 寺部茂

SEPARATION OF ENANTIOMERS BY AFFINITY ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY USING AVIDIN

Yoshihide Tanaka¹⁾ and Shigeru Terabe²⁾

1) Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd.

2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Direct separation of acidic racemates by affinity electrokinetic chromatography using avidin as a chiral selector has been studied. Optimazation of separation conditions such as the concentration of avidin and the pH of the buffer was carried out for some enantiometric separations. Most hydrophobic solutes showed serious band broadening probably because of the slow kinetics in binding equilibria. The addition of alcohols to the running buffer was effective to improve the peak shapes. The successful separation of nine acidic racemates could be achieved by this method.

1. はじめに

近年、動電クロマトグラフィーの高分離能を生かし、アルブミンをはじめ数種類のタンパク質を用いた光学分割の結果が報告されている。しかし、光学分割を行うことができた化合物の種類は限られている。そこで、卵白タンパク質のひとつであるアビジンをキラルセレクターとして用い、種々の酸性化合物の光学分割を行っている。今回はアビジンの濃度と緩衝液のpHについて検討を行い、泳動液の最適化を行った。また、タンパク質を用いた光学分割において、ピーク形状が著しくブロードとなる場合が多く、その原因についての考察と添加剤によるピーク形状の改善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装置はバイオ・ラッド製BioFocus 3000 system, キャピラリーはバイオ・ラッド製カートリッジ(内径50 μ m, 長さ36cm, コーティングタイプ)を用い、印加電圧は-12.0kV, 温度は25 $^{\circ}$ Cで行った。分離溶液はアビジンを50mMリン酸塩緩衝液に溶解し、更に必要に応じてアルコールを添加して調製した。

3. 結果と考察

(1) アビジン濃度と緩衝液pHの影響

試料としてバニルマンデル酸を用いて、泳動液中のアビジン濃度の影響について検討したところ、 $25\mu\text{M}$ でベースラインにおける完全分離が得られた。更にアビジンの濃度を上げると分離は向上するが、濃度を上げるに従い、特に 230nm 以下の短波長ではベースラインの変動が大きくなった。pHに関しては、 $\text{pH}4.0$ の緩衝液を用いた場合、最もよい分離が得られた。pHを試料の pK_a の値に近づけるほど、泳動時間が遅くなり、ピークがブロードとなった。逆にpHを高くすると移動速度が速くなり十分な分離が行えなかった。

(2) アルコールの効果

試料としてFolinic acidのジアステレオマーを用いて、アルコールの添加によるピーク形状の変化について調べた。Fig. 1に示すように、ジアステレオマーの一方はすべてシャープなピークが得られたが、もう一方はアルコールの種類によりピーク形状が著しく変化した。ピークがブロードとなる原因は、試料とアビジンとの間の強い結合により、平衡速度が遅いためと考えられる。相互作用を弱めるためには、アルコールの添加が非常に有効であった。

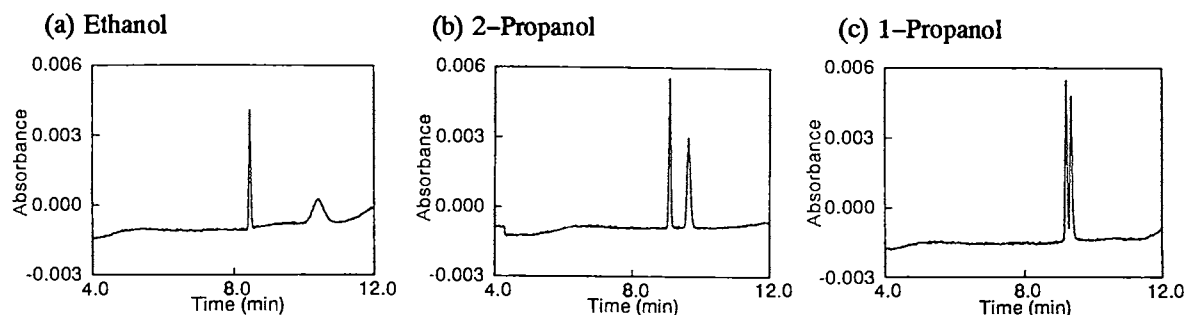


Fig. 1 Influence of different alcohols on the separation of diastereomeric folinic acid.

(3) アビジンで光学分割が可能な化合物

現在までに、アビジンを用いて光学分割を行うことができた化合物名と泳動液の条件をTable 1に列挙した。アビジンは酸性化合物の光学分割において非常に有効なキラルセクターであることがわかった。

Table 1 Separation of enantiomers using avidin as a chiral selector

Compounds	Concentration of avidin	Buffer pH	Additive
Vanilmandelic acid	$25\mu\text{M}$	4.0	
Atrolactic acid, 3-Phenyllactic acid, Phenoxypropionic acid	$50\mu\text{M}$	4.0	
Warfarin, Flurbiprofen	$25\mu\text{M}$	6.0	10 % Ethanol
Ketoprofen, Ibuprofen	$25\mu\text{M}$	6.0	10 % 2-Propanol
Iopanoic acid	$25\mu\text{M}$	7.0	10 % DMF

DMF : Dimethylformamide

マルチキャピラリー電気泳動 のための新規蛍光検出装置

(塩野義製薬(株)新薬研究所) ○上野 恭嗣
(アイオワ州立大学エイムズ研) Edward S. Yeung

ADVANCED FLUORESCENCE DETECTOR FOR MULTI-CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Kyoji UENO¹ and Edward S. YEUNG²

Developmental Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.¹
Ames Laboratory-USDOE, Iowa State University²

A laser-induced fluorescence detector has been developed for multi-capillary electrophoresis that makes it possible to monitor separations in multiple capillaries simultaneously. This system is based on an argon ion laser which is used to excite fluorescence compounds at two wavelengths, 514 nm and 488 nm, and a charge-coupled device camera which is used to detect fluorescence. Simultaneous separation and detection of TOTO-1 bound DNA restriction fragments with one hundred capillaries is demonstrated with this system.

【はじめに】 ヒトゲノム解析計画は 3×10^9 塩基対存在するヒトゲノム DNA の全構造を解析し、そこに含まれている遺伝情報のすべてを解読しようという計画である。この膨大な DNA 塩基配列決定を達成するには、桁違いに迅速でかつ高感度な方法の開発が不可欠である。キャピラリー電気泳動は、高分離能、迅速、極微量の必要試料量、新しい測定系の可能性、などの特長から DNA 塩基配列決定の分離手段として期待されている。また、その検出法としては、レーザー誘起蛍光検出法が、レーザーの集光性、高輝度などの特性及びその超高感度性から最も適していると考えられる。

一方、多数のキャピラリーを用いたキャピラリー電気泳動-レーザー誘起蛍光検出法による同時分析法の開発は、飛躍的な迅速化をもたらすと考えられるため、当グループも含め、種々のアプローチによる方法が報告されている。¹⁻³⁾ 我々はこれらの報告をふまえて、数千本のキャピラリーを用いた同時分析法の開発を最終目的としたプロジェクトの1ステップとして、100本のキャピラリーを用いて同時検出する系を開発した。

【装置】 マルチキャピラリー電気泳動のための蛍光検出装置の構成を Fig. 1 に示す。この装置では多波長のアルゴンレーザー光をプリズムで分光、ビームエキスパンダーで拡大し、514 nm 及び 488 nm の波長の光をミラーにより分離した後、平凸柱状レンズによりアルミニウム製ブロック上に並べた多数のキャピラリー (≤ 100 本) にライン状に集光、励起する。蛍光の検出には charge-coupled device (CCD) カメラを用いた。

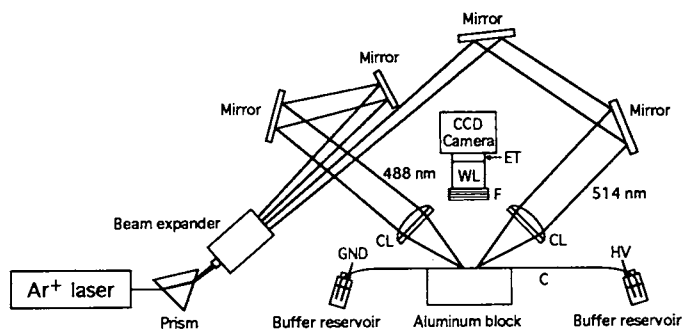


Fig. 1. Schematic diagram of the advanced fluorescence detection system for multi-capillary electrophoresis. ET, extension tube; F, filters; WL, wide-angle lens; CL, plano-convex cylindrical lens.

【実験】 電気泳動には DB-1 内面修飾 GC 用キャピラリー（内径 75 μm , 外径 150 μm , 全長 50 cm, 有効長 35 cm, J & W Scientific 製）及び 0.5% メチルセルロース 4000 を含む 100 mM トリス-ほう酸緩衝液（pH 8.2, 2 mM EDTA を含む）を用いた。

【結果と考察】 分析対象には ϕ X174RF DNA/HaeIII digest (72~1353 bp) の TOTO-1 蛍光誘導体を選び、Fig. 1 の装置及び 100 本のキャピラリーを用いて、分離及び 2 波長同時励起一斉検出を行った。その結果の一例を Fig. 2 に示すが、271/281 bp を除く残りの断片は良好に分離され、いずれの波長でも一斉分析できることが確認された。以上より、今回開発したマルチキャピラリー電気泳動-蛍光検出装置の有用性を示すことができた。

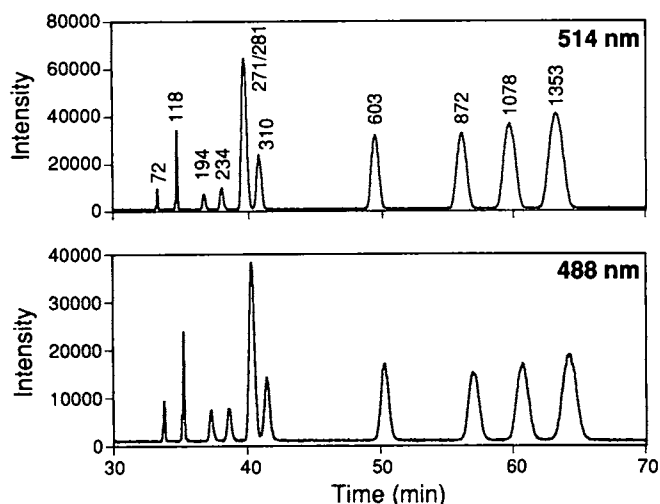


Fig. 2. Electropherograms of TOTO-1 bound ϕ X174RF DNA/HaeIII digest (96 $\mu\text{g}/\text{ml}$) with the system described in Fig. 1. Injection, 10 s at 100 V/cm; electrophoresis, 50 V/cm.

- 1) J. A. Taylor and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **65**, 956 (1993).
- 2) X. C. Huang, M. A. Quesada and R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, **64**, 2149 (1992).
- 3) S. Takahashi, K. Murakami, T. Anazawa, T. Nishikawa and H. Kambara, 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集, p.13 (1992).

紫外パルスレーザー励起キャピラリー振動法の開発と超微量アミノ酸の高感度検出への応用

(東大工) ○小竹 玉緒 北森 武彦 澤田 嗣郎

DEVELOPMENT OF UV PULSED LASER-INDUCED CAPILLARY
VIBRATION METHOD AND ITS APPLICATION TO ULTRASENSITIVE
DETECTION OF ULTRAMICRO AMOUNTS OF AMINO ACIDS

Tamao ODAKE, Takehiko KITAMORI and Tsuguo SAWADA
Faculty of Engineering, The University of Tokyo

We have been proposing a detection method utilizing capillary vibration induced by laser (CVL) as an ultrasensitive on-column absorbance detector for CZE. Because CVL signal is proportional to absorbance of sample, no derivatization of the sample is needed. In order to detect a biological sample, we introduced a UV pulsed laser as an excitation source. A series of excitation pulses was irradiated on a capillary. Adjusting the pulse repetition rate to the natural frequency of the vibration system, stable standing CVL was excited. This detection system was also sensitive to the absorbance of sample. Sub-femtomole amounts of amino acids were detected without derivatization.

【はじめに】 キャピラリー中の微量物質を高感度にon-columnで検出するには、レーザー光を用いた検出法が有効である。我々はその一つとして、レーザー誘起キャピラリー振動法 (Capillary Vibration induced by Laser: CVL) を提案してきた¹⁾。断続レーザー光をキャピラリーに照射することによって発生するキャピラリーの力学的振動は、試料の吸光度に対して高感度であるので、試料を蛍光などの誘導体化をせずに、試料そのものの吸収を利用した検出ができる。しかしながら、多くの生体関連物質は紫外領域に吸収をもつので、紫外レーザーが必要である。紫外レーザーは一般的にパルス発振であるので、パルスレーザーでキャピラリー振動を励起する方法を開発した。誘導体化しないアミノ酸を試料とし、CZEの検出器として本法を応用した。

【実験】 紫外レーザーにはエキシマレーザー (波長: 248nm、出力: 10 μ J/pulse、パルス幅: 60ns) を用いた。発生したキャピラリーの振動はプローブレーザー光で検出した²⁾。キャピラリーで発生した熱の放熱時間は約1msであるので、キャピラリーの固有振動数が約1kHzになるよう長さや張力を設定し、パルスの繰り返し周波数を固有振動数に一致させ、共振を定在化させた。パルスの繰り返し周波数に一致した信号成分をロックインアンプで検出した。試料はトリプトファンとフェニルアラニンを用い、

緩衝液は、0.02Mの KH_2PO_4 水溶液をリン酸でpH3に調製したものをを用いた。キャピラリーは内径 $20\mu\text{m}$ 、外径 $150\mu\text{m}$ 、全長0.6mのものをを用い、振動部分の長さは4cmとした。

【結果と検討】励起パルスの繰り返しをキャピラリーの共振周波数と一致させたときのCVL信号の波形をFig. 1に示す。安定した正弦波が得られ、パルス幅60nsの励起光でも周期1msのキャピラリーの振動を定在化できることがわかった。キャピラリーにトリプトファン溶液を流したときの信号強度をFig. 2に示す。濃度 10^{-4}M オーダーで定量性の良い結果が得られた。励起レーザーのビーム径を考慮した検出体積は $\sim\text{pL}$ であるので、サブfmolのアミノ酸を検出したことになる。トリプトファンとフェニルアラニンの混合溶液をCZEで分離し、パルス励起CVL法で検出した結果をFig. 3に示す。パルス励起CVL法により、fmolレベルのアミノ酸を誘導化せずに検出できた。検出限界($S/N=2$)は $10^1\sim 10^2\text{amol}$ であった。市販の吸光検出器では内径 $20\mu\text{m}$ のキャピラリーを用いることは困難であり、また、励起光の焦点の径を考慮すると、本法により検出体積を約3桁少なくできた。

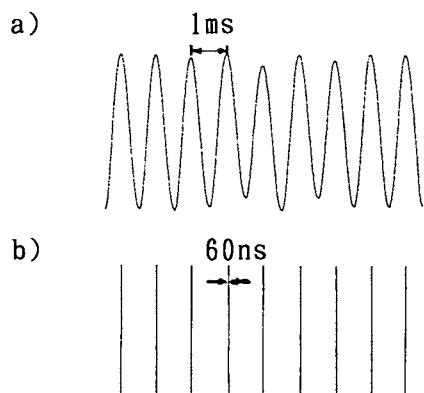


Fig. 1 Waveform of CVL standing wave induced by repetitive pulse excitation.
a) waveform b) excitation laser pulses

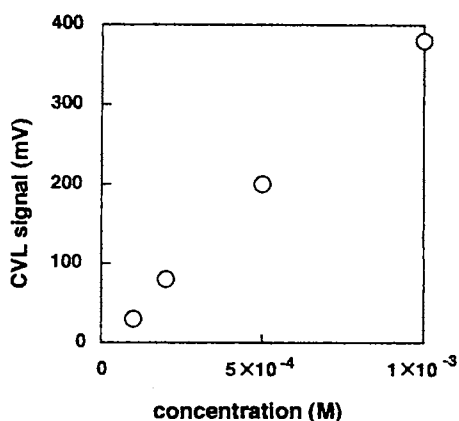


Fig. 2 CVL signal dependence on concentration of Tryptophan.

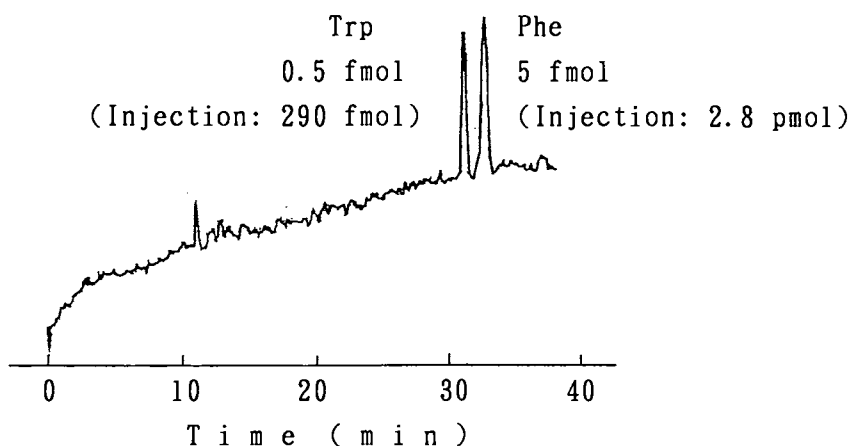


Fig. 3 Electropherogram of nonderivatized Tryptophan and Phenylalanine.

- 1) J. Wu, T. Odake, T. Kitamori, T. Sawada Anal. Chem. **63**, 2216 (1991)
- 2) 小竹, 北森, 澤田 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集 p17 (1992)

新規蛍光ラベル化剤を用いる半導体レーザー 蛍光検出キャピラリー電気泳動分析

(九大、中央分析センター) ○渡辺美登里

(九大、工学部)

今坂藤太郎、金田 隆

(同仁化学研究所)

志賀匡宣

NEW FLUORECENT LABELING REAGENTS FOR CAPILLARY ELECTROPHORESIS BASED ON SEMICONDUCTOR LASER FLUORECENCE DETECTION

Midori Watanabe, Totaro Imasaka, Takashi Kaneda and Masanobu Siga
Center of Advanced Instrumental Analysis, Kyushu University, Faculty
of Engineering, Kyushu University and Doinjo Laboratories

A semiconductor laser emitting at 660nm was used for excitation of the chemical species separated by capillary electrophoresis. A new labeling reagent (pyronin maleimide) fluorescent in the deep-red region was used for labeling biological substances having thiol group represented by amino acid and peptides. Glutathione was detected by this compact and inexpensive analytical system. This result suggests the possibility of application of various biological substances to capillary electrophoresis semiconductor laser fluorometry.

1. 緒言

レーザー励起蛍光法は、キャピラリー電気泳動分析における高感度検出法であることはよく知られているが、従来のレーザーを用いる方法は、レーザーが高価であること、操作、保守の煩雑さのため汎用機として扱うにはまだ問題を残している。一方、半導体レーザーはプリンタ等に用いられているように安価で小型、メンテナンスも容易であることから新たな光源として注目されている。しかし、半導体レーザーの発振波長は近赤外域にあり、一般の有機化合物はこの範囲において蛍光性を示すことはほとんどない。従って、近赤外あるいは深赤色域の蛍光試薬を用いて試料分子を標識して検出する必要がある。これまでに協同研究者らにより、活性エステル基を持つ深赤蛍光ラベル化剤をアミノ基標識に用いキャピラリー電気泳動/レーザー励起蛍光法によるアミノ酸の分離、検出が報告されている^{1), 2)}。本研究では、マレイミド基を有する新規蛍光ラベル化剤を用いてチオール基を持つアミノ酸、ペプチド等の生体関連物質のキャピラリー電気泳動分析を行なった。

2. 実験方法

実験装置は、これまでに報告されたものを多少改良して用いた。試料の分離には、

全長50cm、内径50 μ m、外径375 μ mのフューズドシリカ管を用い、試料の注入は落差法で行った。半導体レーザーは、発振波長660nm(2mW)の可視半導体レーザーを用い、キャピラリーの検出部に集光し、試料からの蛍光をフィルターを通した後、光電子増倍管で検出した。試料は、色素とHEPESバッファー(pH7.0,0.1M)とともに水浴中でインキュベート(37 $^{\circ}$ C,1h)してラベル化した。

3. 結果及び考察

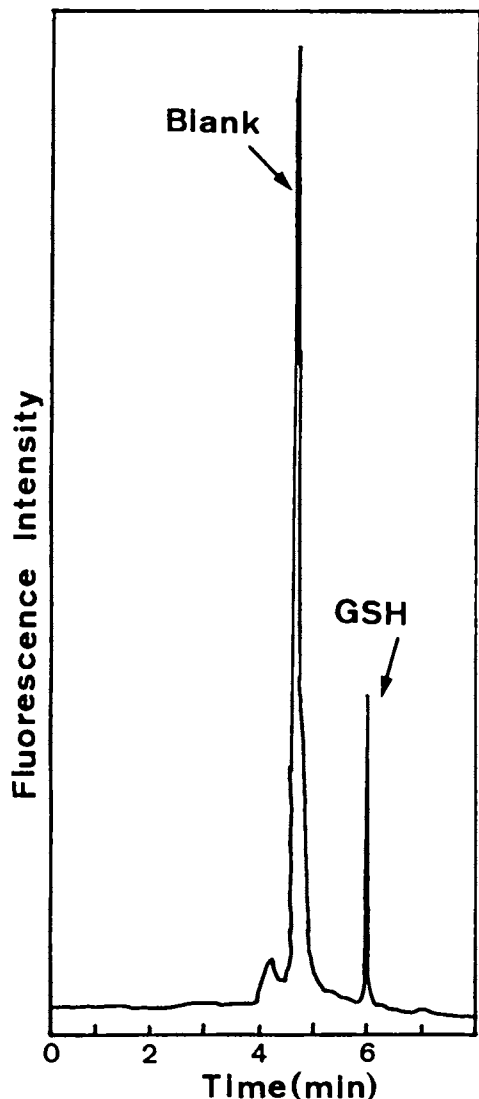


Fig.1にpH7.0、印加電圧20kVにおけるグルタチオンの電気泳動図を示した。N-アセチル-L-システインについても同様に検出することができた。しかし、チオール基を有するアミノ酸、システインについては容易に酸化され易いためか分離検出が不明瞭であった。一般に、チオール基のプロテクターとしてジチオスレイトール(DTT)が用いられるが、この試薬が過剰に存在すると今回用いたラベル化剤の蛍光が弱められることが観察されたので、DTT処理を行なう場合には、ラベル化前に反応系から除去することが必要である。また、最適分離検出条件を得るために、泳動用緩衝液や泳動電圧を検討をした。得られた結果より、タンパク質の分析にも適用できると考えられた。このような近赤外並びに深赤色域における蛍光分析法は、特に生化学試料において問題となる挟雑物の影響を受けにくいので、種々の生理活性物質の迅速、超微量分析に貢献できると期待される。

Fig.1 Electropherogram for glutathione(GSH) labeled with pyronin maleimide

4. 参考文献

- 1) T.Fuchigami, T.Imasaka and M.Shiga, Proceedings of Advances in Fluorescence Sensing Technology, 1885 435-438(1993).
- 2) T.Fuchigami, T.Imasaka and M.Shiga, Anal. Chim. Acta, in press.

高性能キャピラリー電気泳動による糖鎖—
タンパク質相互作用の研究
——競合糖を用いる結合定数の測定——

(近畿大・薬) 本田 進、○安枝 真一、多賀 淳

STUDIES OF CARBOHYDRATE-PROTEIN INTERACTION BY HIGH-
PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS
--MEASUREMENT OF BINDING CONSTANT BY USE OF COMPETING CARBOHYDRATES--

Susumu HONDA, Shin-ichi YASUEDA, Atsushi TAGA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

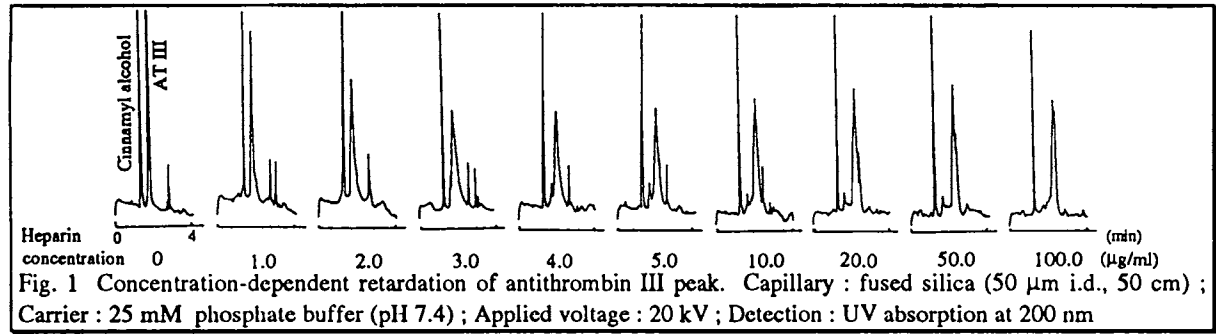
The binding constants of low molecular weight heparins to antithrombin III were estimated by competitive binding with heparin, in high performance affinity capillary electrophoresis, and the results were compared to those obtained by normal affinity capillary electrophoresis without competing ligands. The data obtained by both methods were practically identical, indicating the effectiveness of this newly introduced competing ligands method. It seems to be especially useful, when the ligand has no electric charge.

【はじめに】 アフィニティーキャピラリー電気泳動(ACE)は、少量のサンプルで簡便にしかも短時間のうちに生体成分間の相互作用の結合定数を決定できる^{*1*2}ことから、にわかには注目を集めている。血液凝固系におけるヘパリンとアンチスロンビンIII(AT III)の結合は周知の事実であり、ヘパリン製剤の由来や精製法によってこの結合にどのような違いが出るのか興味をもたれるところである。今回、私たちはヘパリンとAT IIIの結合定数の測定にACEを適用することを試みた。さらに、ヘパリンと低分子量ヘパリンを競合させながらACEを行うことにより、それぞれの結合定数を測定する別法についても検討した。

【方法】 HPCEは、日本分光工業社製875-CE型紫外外部検出器と松定プレジジョンデバイセズHEL-30P1型高圧電源装置を用いて行った。キャピラリーには全長50 cm、有効長30 cm、内径50 μmのフューズドシリカ管を用いた。印加電圧は20 kV、検出は紫外部200 nmの吸光度を測定することにより行った。結合定数の測定は室温で行った。ヘパリン試料はブタ腸粘膜由来ヘパリン(heparin(1))、ウシ肺由来ヘパリン(heparin(2))および数種の低分子量ヘパリン(low molecular weight heparin(1, 2, 3))を使用した。直接法ACEにおいては、キャリアーに25 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を使用し、種々の濃度のヘパリンや低分子量ヘパリンを単独でリガンドとして添加した。また、リガンド競合法ACEにおいてはlow molecular weight heparin (1)をheparin(1)とともに同上キャリアーに溶かして用いた。サンプルのAT IIIは5.435 μMに希釈し、落差法(5 cm, 10 sec)で陽極側から導入した。また、マーカーとしてシンナミルアルコールをサンプルに10⁻³ Mで添加した。

【結果および考察】 直接法ACE 今回の実験においてはサンプルがAT IIIでリガンドがヘパリンである。この反応は可逆的な反応で、一定の結合定数で平衡を保っている。よってリガンドの濃度を変化させることによって遊離のAT IIIと結合型AT IIIの存在比が変化する。ヘパリンは陰イオン性が高いため、キャリアーへのヘパリンの添加量の増大に伴って結合型AT IIIの割合が増加し、ピーク

の移動時間の遅延も大きくなる(Fig. 1)。この移動時間の変化を種々のリガンド濃度について測定し、



式(1)*¹によって結合定数を算出した。ヘパリンおよび低分子量ヘパリンの各種製剤ならびに

heparin(1)をヘパリナーゼで徹底消化した分解混合物の、AT IIIに対する結合定数を測定した結果をTable. 1に示す。ヘパリンおよび低分子量ヘパリンでは、ほぼ同等の結合定数を与えたが、ヘパリナーゼ消化により著しく分子量が低下すると結合定数は急激に減少した。

リガンド競合法ACE ヘパリンと低分子量ヘパリンを溶かしたキャリアーを用いて、両者を互いに競合させながら結合定数を測定した。まず、ヘパリンを一定濃度で含むキャリアーを調製し、ここへ種々の濃度で低分子量ヘパリンを添加した。この場合、ヘパリンに比べ低分子量ヘパリンは移動度が小さいため添加に伴ってAT IIIの移動時間は減少して行く。移動時間の変化と、すでに単独で測定したヘパリンの結合定数から低分子量ヘパリンの結合定数を式(2)によって算出した。さらに、ヘパリンと低分子量ヘパリンを逆にして同様のことを行った。low molecular weight heparin (1)では直接法で $5.21 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、リガンド競合法で $6.17 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、また、heparin(1)では直接法で $1.10 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、リガンド競合法で $1.26 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ といずれも両法について大差はなく、直接法と並んでリガンド競合法も有用な方法であることが示された。

今回の実験でACEが簡便に行える親和性の評価法であることが立証でき、また競合する阻害剤を用いたACEも行えることから、今後、中性リガンドの関わる系への応用が期待される。

*1 S. Honda, A. Taga, K. Suzuki, S. Suzuki and K. Kakehi, *J. Chromatogr.*, **597** (1992) 377-382.

*2 L. Z. Avila, Y. Chu, E. C. Blossey and G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.*, **36** (1993) 126-133.

$$\frac{1}{\Delta t} = \frac{t_{\max}}{\Delta t_{\max} \cdot t_1} \cdot \frac{1}{Ka} \cdot \frac{1}{[L]} + \frac{t_{\max}}{\Delta t_{\max} \cdot t_1} - \frac{1}{t_1} \dots \dots (1)$$

Ka : binding constant ; $[L]$: ligand concentration ; t_1 : migration time of AT III in the absence of heparin ; t : migration time of AT III in the presence of the ligand ; t_{\max} : migration time of AT III saturated by the ligand ; Δt : $t - t_1$; Δt_{\max} : $t_{\max} - t_1$

$$\frac{1}{\Delta t} = \frac{t_{\max}}{\Delta t_{\max} \cdot t_1} \cdot \frac{1}{\Delta t_{\max}} \cdot \frac{1}{Ka^{II}} \cdot \frac{1}{[L^{II}]} + \frac{t_{\max}}{\Delta t_{\max} \cdot t_1} - \frac{1}{t_1} \dots \dots (2)$$

$Ka^{II} - Ka^{II} \left(1 + Ka^I [L^I] \right)$
 Ka^I : binding constant of ligand I ; Ka^{II} : binding constant of ligand II ; $[L^I]$: ligand I concentration ; $[L^{II}]$: ligand II concentration ; t_1 : migration time of AT III in the absence of ligand II ; t : migration time of AT III in the presence of ligand II ; t_{\max} : migration time of AT III saturated by the ligand II ; Δt : $t - t_1$; Δt_{\max} : $t_{\max} - t_1$

Preparation	Average molecular weight	Ka (M^{-1})
Heparin (1)	20,000	1.10×10^7
Heparin (2)	20,000	4.96×10^6
Low molecular weight heparin (1)	5,000	5.21×10^6
Low molecular weight heparin (2)	5,000	2.88×10^6
Low molecular weight heparin (3)	4,500	3.07×10^6
Heparin (1) digested by heparinase	1,000	9.82×10^3

Table. 1 Binding constants of various heparin preparation

(近畿大・薬) 本田 進・○多賀 淳・望月 美佳

STUDIES OF CARBOHYDRATE—PROTEIN INTERACTION BY HIGH-PERFORMANCE CAPILLARY ELECTROPHORESIS—INTRODUCTION OF IONIC GROUPS FOR THE BINDING CONSTANT MEASUREMENT OF NEUTRAL CARBOHYDRATES—

Susumu Honda, Atsushi Taga, and Mika Mochizuki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

High-performance capillary electrophoresis allows rapid estimation of the binding constant between a protein sample and an ionic ligand in carrier electrolyte solution, based on the delay of the migration time of the protein sample, using small amounts of the sample and the ligand. This paper proposes a device to convert neutral oligosaccharides to ionic ligands. Dithioacetalation with β -mercaptoethanesulfonate in the presence of trifluoroacetic acid gave promising results.

[はじめに]

糖鎖-タンパク質間の結合定数を測定するには種々の方法が考えられるが、演者らは最近キャピラリー電気泳動を用いる方法を開発し、RCA₆₀-ラクトビオン酸系をモデルとして、微量試料を用い再現性良く結合定数を測定することができた¹⁾。しかしながら本法は中性糖にそのまま適用することは困難である。そこで今回、中性糖に陰イオン性のスルホン酸基を導入し、この誘導体をリガンドとして用いることにより、結合定数を測定することを検討した。

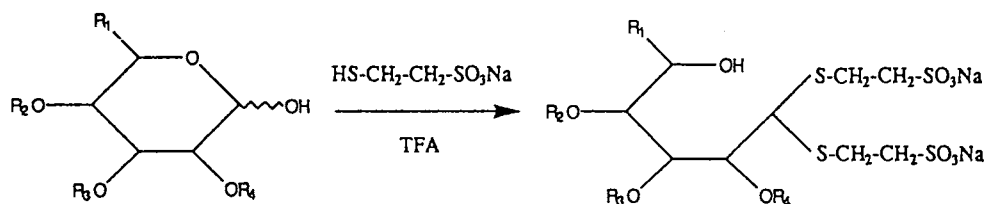
[実験方法]

キャピラリー電気泳動 アプライドバイオシステムズ 270A 型装置を用い、キャピラリーには内径 50 μm 、全長 50 cm のフューズドシリカ管を使用した。タンパク質試料：RCA₆₀ および ConA をキャリアーに 1mg/ml 濃度で溶かした溶液を用いた。ニュートラルマーカールにはシンナミルアルコール (1 mM) を用いた。検出波長は 220 nm、印加電圧は 15 kV、カラムオープンの温度は 30 度に設定して実験を行なった。

中性糖の誘導体化 中性糖としてラクトースおよびマルトース、誘導体化試薬として β -メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム (MES-Na) をトリフルオロ酢酸 (TFA) に溶かしたもの (組成：25 mg/600 μl) を用いた。誘導体化試薬 (500 μl) に中性糖 (1 μmol) を溶かし、室温で 5 min 反応後デシケーターで蒸発乾固し、Sephadex G-10 カラムで過剰試薬の大部分を除いた。含糖画分を凍結乾燥し、残渣を種々の濃度で 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶かしたものをキャリアーとして用いた。

[結果と考察]

誘導体化反応 上記操作により TFA を酸触媒として MES による中性糖のジチオアセタレーションが起こり (Scheme 1)、ジチオアセタールがほぼ定量的に生成した。TLC により調べても副生成物は検出されなかった。



Scheme 1

レクチンと中性糖 MES 誘導体の結合定数の測定 中性糖 MES 誘導体 (リガンド) を種々の濃度で含むキャリアーにレクチンを導入し、電気泳動させたところ、RCA₆₀-ラクトース MES 誘導体の系について得られたリガンド濃度 [L] vs t の関係を Fig. 1a に示す。リガンド濃度の上昇に伴ってレクチンの移動時間 (t) の遅れがみられた。リガンドを含まないキャリアーで分析した場合の RCA₆₀ の移動時間を t₁ とし、リガンド濃度の逆数に対して t - t₁ の逆数をプロットして得られる直線 (Fig. 1b) の傾きを A とすると RCA₆₀ - MES-ラクトース間の解離定数 (Kd) ならびに結合定数 (Ka) はこの結合が 1 価であるとする、次のような式で与えられる¹⁾。なお、グラフがプラトーに達した時の移動時間を t₂ とする。

$$Kd = Ka^{-1} = A \cdot t_1 / t_2 \cdot (t_2 - t_1) \quad \dots (1)$$

本実験においては直線が得られ、30度では t₁ = 4.17, t₂ = 4.45, A = 1.54 となり、式 (1) より結合定数は 2.47 × 10³ (M⁻¹) という値を得ることができた。今回得られた Ka 値は RCA₆₀-ラクトビオン酸間の Ka 値 3.3 × 10³ (M⁻¹)¹⁾ に近似した値であり、また RCA₆₀-ガラクトースの結合定数にも近似していた。ラクトースの MES 誘導体、ラクトビオン酸ともにラクトースの還元末端は開環した構造であり RCA₆₀ との結合は主としてガラクトース部分によっているものと考えられるので、これらの実験結果は納得できる。MES の導入が RCA₆₀ との結合に全く影響を与えなかったとは言いきれないが、鎖長の長いオリゴ糖とタンパク質の相互作用においては MES の導入の影響は無視できる程度になるであろうと推定される。

ConA-マルトース MES 誘導体の系についても同様にレクチンの移動時間のリガンド濃度依存性を調べ、結合定数を求めた。得られた値 (5.03 × 10² M⁻¹, 30度) は妥当なものであった。そして上記の [L]⁻¹ vs (t - t₁)⁻¹ プロットが直線を示したことはレクチン-リガンドの相互作用が 1 価モードであったことを意味し、4 個あると言われる ConA 上の 1 つのグルコース結合サイトに対する結合が他の結合サイトに対する結合より格段に大きいことなどが示唆される。

以上の結果より MES を用いる誘導体化により中性糖とタンパク質の結合定数を測定することができることが示された。この方法を用いることにより種々の糖鎖とタンパク質の親和性を測定することができると思われる。

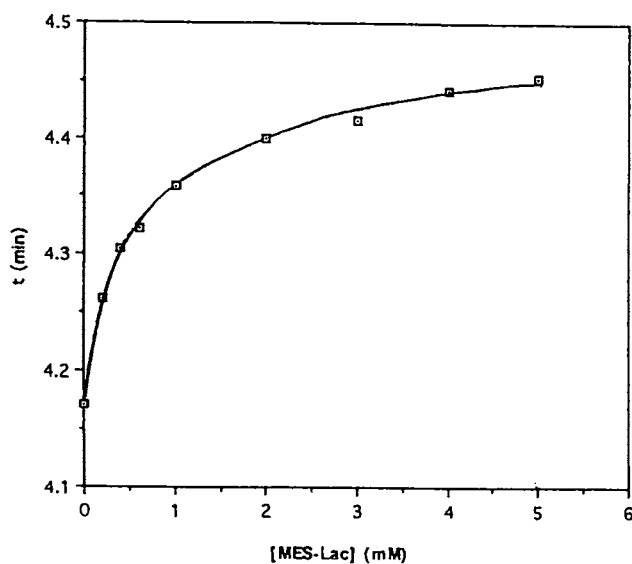


Fig. 1a Relationship between migration time of RCA₆₀ and concentration of MES-lactose in carrier.

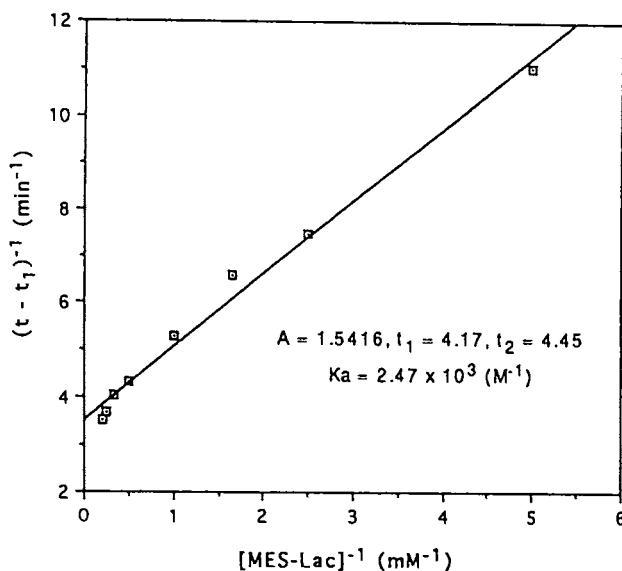


Fig. 1b Plot of reciprocal migration time vs reciprocal MES-lactose concentration.

1) S. Honda, A. Taga, K. Suzuki, S. Suzuki and K. Kakehi, J. Chromatogr., 597 (1992) 377 - 382

○志村清仁（ノースイースタン大学，現帝京大学薬学部），
バリー L. カーガー（ノースイースタン大学）

DETERMINATION OF ANTIGEN BY AFFINITY PROBE CAPILLARY
ELECTROPHORESIS

Kiyohito Shimura (Northeastern Univ., present address: Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Teikyo University), Barry L. Karger (Northeastern
University)

A new highly sensitive microscale analytical procedure called affinity probe capillary electrophoresis (APCE) is presented. Monovalent fragment of a mouse monoclonal antibody (anti-human growth hormone) was labelled with a fluorescent dye at a hinge region thiol group and used as an affinity probe. The affinity probe was mixed with a sample and the formed complex was separated by capillary isoelectric focusing with detection by laser induced fluorescence. Methionyl recombinant human growth hormone (met-rhGH) could be successfully determined down to detection levels of 5×10^{-12} M with good linearity over three orders of magnitude. Mono- and dideamidated variants of met-rhGH were detected simultaneously with the nondeamidated form of the antigen as separate peaks.

[はじめに] 生体高分子とりわけタンパク質は特異的親和力（アフィニティー）によって極めて選択的に，かつ速やかに複合体を形成する。また，その特異性の多様さは，ほとんどあらゆる抗原に対する抗体が作られることに示されるように，ほとんど限りがないといってよい。このようなタンパク質の特異的親和力をキャピラリー電気泳動と組み合わせることにより分析能力の飛躍的な発展が期待できることは衆論の一致するところであろう。高いアフィニティーを持つ複合体は比較的安定であってキャピラリー電気泳動による複合体の分離が可能である。このような分子の一方に蛍光標識を行なって，試料と混ぜた後，生成した複合体をキャピラリー電気泳動で分離し，蛍光で定量すれば特異的かつ高感度に試料中の相手分子の量を知ることができる。私たちは，この方法を”アフィニティープローブキャピラリー電気泳動（APCE）”と名づけた。この例としてモノクローナル抗体の蛍光標識1価フラグメントをアフィニティープローブとして用いた抗原タンパク質の超微量定量について紹介する。

[方法] アフィニティープローブの調製：抗ヒト成長ホルモンモノクローナル抗体（IgG1）のFab'フラグメントのヒンジ部SH基をテトラメチルローダミンヨ

ードアセトアミドで標識し，固定化pH勾配等電点電気泳動で精製した．アフィニティープローブキャピラリー電気泳動：一定量のアフィニティープローブ，両性担体（ファルマライト3-10）を試料と混ぜ，5分インキュベートした後，キャピラリー等電点電気泳動によって複合体を分離し，レーザー励起蛍光（Ex. 488 nm, Em 580 nm）で定量した．

[結果] 標識抗体フラグメントは等電点の異なる2成分（pI 7-8）からなっていた．精製の結果，等電点的に高純度の標識抗体フラグメントが得られた（Fig. 1a）．これを抗原であるメチオニン化組換えヒト成長ホルモン（met-rhGH, MW 22,000, pI 5.2）と混合すると，より酸性側に複合体ピークが検出された（Fig. 1b）．複合体の形成は速やかに起こり，2分後には最大値に達した．ヒト成長ホルモンの組換え体については，モノおよびジ脱アミド体が met-rhGH とともに3つの分離した複合体ピークとして検出された（Fig. 2）．Met-rhGH を標準物質として検量線を作製したところ，0.1 ng/ml (5×10^{-12} M) から 100 ng/ml (5×10^{-9} M) の範囲で直線的な関係が得られた．

[考察] 抗体のアフィニティーを利用した，高感度超微量定量法アフィニティープローブキャピラリー電気泳動法の大きな可能性が明らかになった．荷電状態の異なる抗原を同時に分離して検出できる点は今までの免疫測定法にない利点である．

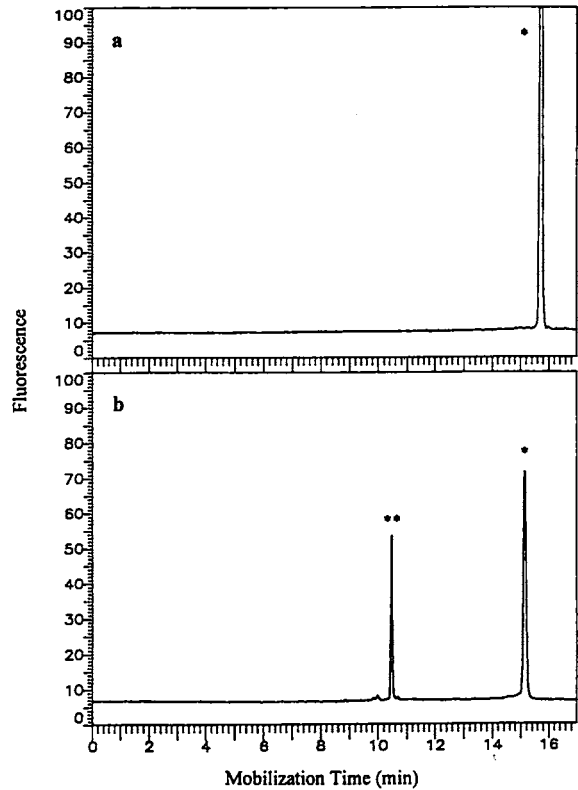


Fig. 1. Capillary isoelectric focusing of the affinity probe (a) and the mixture with the antigen, met-rhGH (b). Detection was carried out from the acidic side. *, Affinity probe; **, complex.

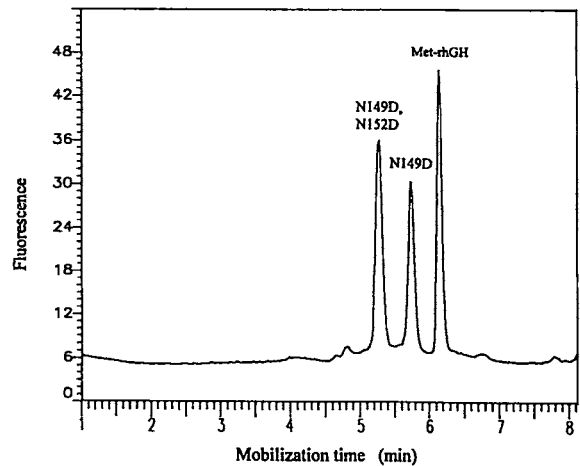


Fig. 2. Detection of met-rhGH, mono- (N149D) and di- (N149D, N152D) deamidated rhGH (10 ng/ml each) by the affinity probe capillary electrophoresis. The free affinity probe was observed after 8 min.

メンブランフラクションの開発 II ～イムノブロットイングへの応用～

(日本ミリポア ウォーターズクロマトグラフィー事業部)

○町田祥子

(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)

Yung-Fung Cheng, William warren, Martin Fuchus

Membrane Fraction Collection for Capillary Electrophoresis -Post Run Analysis CE Fractions-

Sachiko Machida¹⁾, Yung-Fung Cheng²⁾, William warren²⁾, Martin Fuchus²⁾

Waters Chromatography Division, Nihon Millipore¹⁾

Waters Chromatography Division, Millipore Corporation²⁾

We have demonstrated a general interface for performing post-run analysis of sample components separated by capillary electrophoresis. The interface, it is based on the continuous transfer of molecules emerging from the end of the capillary onto the moving PVDF membrane surface. We have previously presented that protein sequencing can be performed directly from the membrane surface after deposition of the purified protein from CE separation. Here we describe the results of a series of experiments with a variety of staining techniques. Utilizing routine capillary electrophoresis conditions, proteins collected onto PVDF membranewere analyzed using both non-specific and antigen-specific staining techniques. Excellent sensitivity and specificity was obtained with the immunological stains.

【はじめに】

メンブランブロットイングの技術は蛋白、核酸の分野において、一般的な解析手法として広く、染色、イムノアッセイ、化学分析、シークエンス等に用いられている。我々はこの技術をCEにおける有効な分取方法の一つとして利用することを試みている。昨年の本会ではCEで分離した蛋白成分をオンラインでPVDF膜上に分取し、シークエンシングへの試みに関して発表した。今回、さらに応用範囲を広げる意味でPVDF膜上へ分取した蛋白成分の選択的検出方法としてイムノアッセイを試みたので結果を報告する。

【実験】

Fig.1に示したようなフラクションコレクションモジュールをCE装置に装着して用いた。CE装置本体はWaters Quanta4000 CEsystemを用いた。

Capillary :75 μ m \times 60cm

Detection :185nm

Sample	:Lysozyme, CytochromeC, Myoglobin, Transferrin, BSA
Load	:20sec Hydrostatic (10cm)
Electrolyte	:100mM Phosphate (pH7) with or without 1M Z1-Methyl
Run	: + 7 kV
membrane	:Immobion-P (Millipore)
Staining	:Non-specific Detection;Coloidal Gold Stain Specific Detection;BCIP/NBT Chromogenic Stain Goat Anti-Human Transferrin IgG Rabbit Anti-Goat IgG Alkaline phosphate conjugate

【結果と考察】

分離を検討したところ、Z1-Methylを添加した場合に高分離、高再現性が得られた。また、Fig2.にフェログラムを示したように、通常のバッファバイアルで泳動する場合と、メンブランコレクションを用いた場合では分離は変わらなかった。注入サンプルの濃度をいくつか変えてメンブランに分取し、メンブラン上での検出感度を確認した。高感度の非選択的検出方法である金コロイド染色ではそれぞれ4.5ngまで検出方法が可能であった。また、選択的検出のターゲットとして、ヒトトランスフェリンの検出をアルカリフォスファターゼ標識抗体を用いたイムノステイニングの方法を試みたところ、45pgまで検出可能だった。CEとPVDF膜上への分取を組み合わせにおいて、イムノアッセイによる微量蛋白成分の選択的検出が可能であり、今後の応用が期待されると思われる。

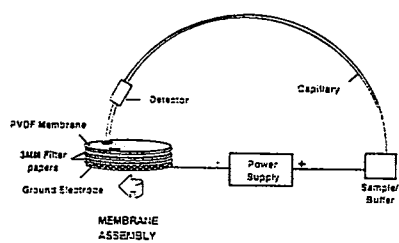
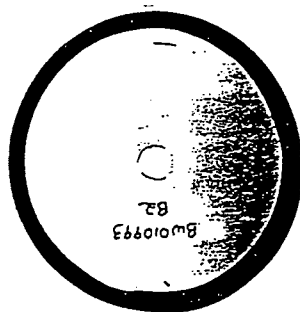


Fig.1 Schematic Diagram of Membran Fraction Collection Module



450 pg loaded

Fig.3 Membran with Collected Protein after Chromogenic Staining

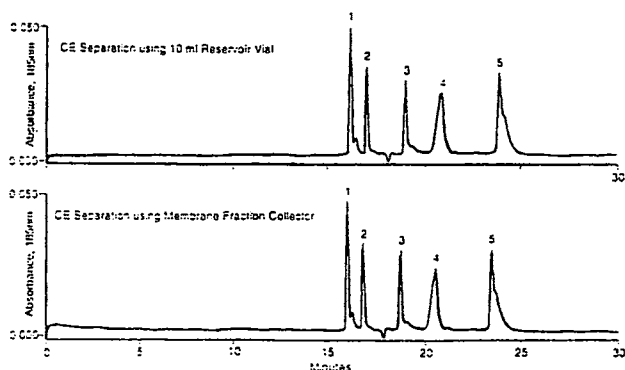


Fig.2 Separation of Protein Mixture With and Without CE Membran Fraction Collector

(東大・薬) ○浜瀬健司、中村 洋、中嶋暉躬

APPLICATION OF CURDLAN GEL ELECTROPHORESIS TO BIOPOLYMER ANALYSIS

Kenji HAMASE, Hiroshi NAKAMURA and Terumi MAKAJIMADepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
The University of Tokyo

Curdlan gel electrophoresis was applied to SDS - gel electrophoresis and native gel electrophoresis for proteins. Curdlan gel gave almost the same ability to separate proteins as that of polyacrylamide gel. Separation of DNAs was also performed; while linear DNAs moved depending on their molecular weights, the circular DNAs hardly moved in the curdlan gel.

【緒言】

ゲル電気泳動法は生体高分子分析に不可欠の手法として広く用いられている。しかし現在おもに用いられているポリアクリルアミドゲル(PAG)電気泳動法、アガロースゲル電気泳動法には毒性のある単体を使用する、使用できるpH範囲が狭い等の問題を有し、いずれも完全に満足できるとは言えない。当研究室ではそれらに代わる担体として微生物由来の β -1, 3-グルカンであるカードランゲルに着目し、カードランゲル電気泳動法を提案し、種々の高分子分析に適用してきた。今回はそれらの結果について報告するとともに、従来のPAGや、アガロースにはなかった種々の問題点についても報告する。また、それらの問題点に対する解決策を種々試みた結果についても報告する。

【実験】

a) 試薬とゲルの作製

カードランゲルは和光純薬工業株式会社より生化学用を購入し、アクリルアミド及びアガロースはナカライテスク株式会社より購入した。カードランゲルは楠井らの方法¹⁾にしたがって作製し、PAG及びアガロースは常法に従って作製した。使用した試薬は特に断わらない限り特級を使用し、水はミリポア社のミリQシステムにより精製したものを使用した。タンパク質はシグマ社及びバイオラッドラボラトリーズより購入し、核酸類及び核酸修飾試薬は宝酒造株式会社より購入した。

b) 電気泳動

ディスクゲル電気泳動にはアプライドバイオシステムズ社製の分取用電気泳動装

置230Aシステムを使用し、サブマリンゲル電気泳動装置は日本エイドー社製のものを使用した。泳動条件はタンパク質、核酸電気泳動ともに常法²⁾³⁾にしたがって行った。

【結果・考察】

カードランゲル電気泳動法をタンパク質のSDS-ゲル電気泳動に適用し、現在汎用されているSDS-PAGEとの比較を行った。その結果タンパク質の分離能に関してはPAGEとほぼ同等であり、移動度と分子量の相関も良くタンパク質の分子量決定の手段としても使用できることが示された。また、分取用ディスクゲル電気泳動においてゲルを連続使用したときの耐久性を調べたところ、PAGEよりもはるかに良い耐久性を示した。しかし、SDS-PAGEでマーカー色素として使用されているプロモフェノールブルーはカードランゲル中で強く吸着されるとともにゲルの萎縮を引き起こすことが明らかになった。そこでマーカー色素としてハロゲンを含まず、中性領域でイオン型となり赤色を呈するフェノールレッドを用いることにより良好な泳動が得られた。更にタンパク質を未変性系で泳動するNativeゲル電気泳動に適用し、生物活性タンパク質の活性回収率をNativePAGEと比較した。その結果、試みた全ての生物活性タンパク質に於てカードランゲル電気泳動はPAGEと同等以上の回収率が得られた。次に核酸類の電気泳動にも適用し種々のDNAの泳動挙動についてアガロースゲル電気泳動と比較を行った。核酸の電気泳動時にはタンパク質の泳動よりも低濃度のゲルが要求されるが、カードランゲルはアガロースゲルと比較して弾力性に富むが強度は弱く、取扱いに注意が必要となる。そこで種々の緩衝液系を試みた結果、トリス-ほう酸-EDTA緩衝液を使用するとゲル強度が高まり、核酸の泳動挙動にも影響を与えないことが明らかになった。更に泳動後の検出にエチジウムブロマイドによる蛍光発色を行ったところ、カードランゲルそのものが強い発色を示し、バンドの検出が困難であった。そこでエチジウムブロマイド染色を行った後、種々の溶媒で脱色を検討した結果、酢酸：メタノール：水=1：4：20の溶液で脱色を行うことによってゲル部分の発色のみを除くことができた。以上の系を用いてDNAの泳動挙動を調べたところ、鎖状DNAに関してはカードランゲル電気泳動ではアガロースと比較して分離能は劣るもののほぼ変わらない泳動挙動を示した。しかし環状DNAはカードランゲル中を殆ど泳動されないことが明らかになった。この結果はカードランゲルが鎖状DNAと環状DNAのグループセパレーションに適用できることを示唆する。

【引用文献】

1. S. Kusui, Gekkan Fudo Kemikaru, 5, 3 (1989).
2. U. K. Laemmli, Nature [London], 227, 850 (1970).
3. 寺田 弘, “核酸の電気泳動法” (寺田 弘編), pp. 23-42, 廣川書店 (1992).

キャピラリー電気泳動を用いた リニアポリマー添加による核酸と タンパク質の分離

(大塚電子) ○山田浩美, 新田哲士, 笹 一志
小野真澄, 北岸恵子

SEPARATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS
IN THE PRESENCE OF SOLUBLE LINEAR POLYMER, OTSUKA ELECTRONICS CO.

HIROMI YAMADA, SATOSHI NITTA, KATSUSHI SASA, MASUMI ONO, KEIKO KITAGISHI

Electrolytic polymers, e.g., DNA mixtures and protein-SDS complexes, are migrated by capillary electrophoresis, dependent on the molecular size in the presence of soluble polymers. Hydroxypropylcellulose and dextran were examined as additive polymers to the carrier buffer for DNA and protein-SDS complex, respectively. The molecular weight and the concentration of the additives were investigated for high-resolution separations.

【はじめに】

タンパク質や核酸等の生体高分子電解質を分子量の差を利用して分析するとき、一般的に行われている方法は、ポリアクリルアミドやアガロースのゲルを担体とするゲル電気泳動法である。高分解能微量測定であるキャピラリー電気泳動において、同じ様な測定を行う場合、2つの方法が可能である。第一に従来法と同様にキャピラリー内にゲルを充填する方法、第二に泳動溶媒に高分子を添加する方法^{1), 2), 3)}である。ゲル充填法は分解能に優れているが、高分子を添加する方法の方がゲルを作るような手間がかからず、測定毎にキャピラリー内の液を容易に交換することが出来る。

本実験では、タンパク質とDNAについて高分子添加法を行った。添加する高分子は非イオン性の多糖類で、タンパク質についてはデキストランを、DNAについてはヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を使い、重合度の異なる多糖類について高分子添加濃度依存性を検討した。

【方法】

大塚電子(株)製キャピラリー電気泳動装置、CAPI-3000を使用した。キャピラリーは合成石英製、内径75 μ mのものを用い、内壁をポリアクリルアミドコーティングを行って、電気浸透流を抑止した⁴⁾。核酸の分離については、ヒドロキシプロピルセルロース(SCIENTIFIC POLYMER PRODUCTS, INC.製)の平均分子量10万、30万、100万の3種類を用いた。分離に用いたDNAマーカーは、 ϕ X174DNAを制限酵素Hinc IIで

完全分解したもの79bps(Mw 0.51×10^5)~1057bps(Mw 6.87×10^5)、および ϕ X174RF I DNAを制限酵素Hinf Iで完全分解した24bps(Mw 0.156×10^5)~726bps(Mw 4.72×10^5)の2種類(いずれもニッポンジーン社製)を用いた。タンパク質については、0.1%のSDSを含む緩衝溶液を泳動溶媒として用い、平均分子量200万、51万、7万の3種類のデキストラン(シグマ社製)を添加した。

【結果・考察】

DNAフラグメントの移動度は、HPC添加濃度に依存して減少した。添加HPCの平均分子量が大きいほど分離できるDNAは大きいものに限定されるが、フェログラムの分解能は向上した。図1にHPC混合添加系のフェログラムを示すが、分離能も分解能も良好であった。タンパク質の分離においては、デキストランの分子量が大きい方が分離能が良いが、デキストランの添加濃度によってその移動度が大きく変化するわけではない。異なる分子量を持つ6種類のタンパク質の泳動例を図2に示す。

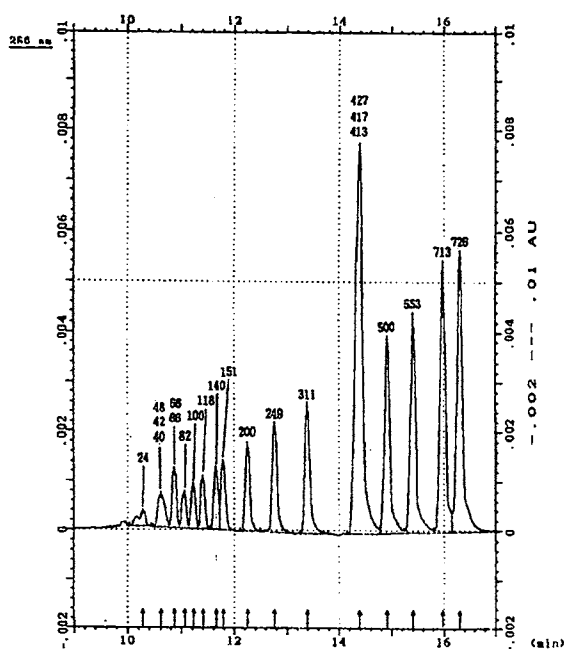


Figure 1. Electropherogram(200nm) of ϕ X174RF I/Hinf I DNA marker in the presence of HPC mixture. Numbers in the figure represent DNA sizes in base pairs. Carrier buffer: 0.1M Tris-borate(7mM EDTA, pH8.8) Capillary : I.D. 75 μ m \times 500m(effective length 375m) Injection : Migration -5kV \times 30 sec.

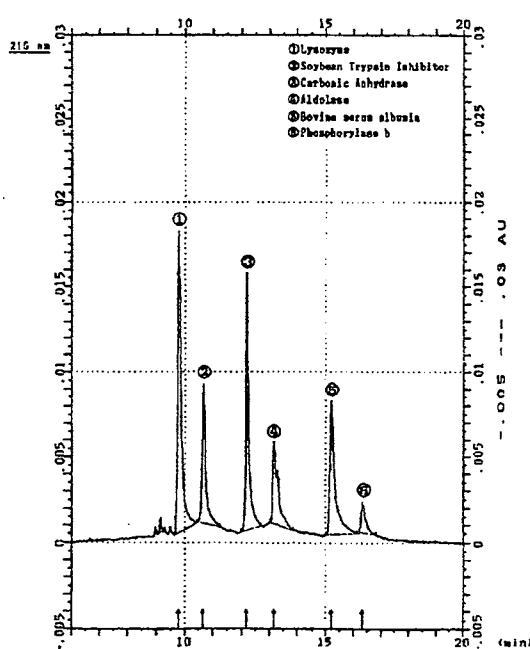


Figure 2. Electropherogram(215nm) of standard proteins-SDS complex in the presence of SE dextran(Mw=2,000,000). Carrier buffer:0.1M Tris-borate(0.1% SDS, pH7.6) Capillary : I.D. 75 μ m \times 400m(effective length 275m) Injection : Gravity 25m \times 60 sec.

【文献】

- (1)Grossman & Soane, Biopolymers (1991)31,1221-1228
- (2)Kogure et al., Proceedings of 12th Symposium on Capillary Electrophoresis (1992)67-68
- (3)Ganzler et al., Anal.Chem (1992)64,2665-2671
- (4)Gjerten, J. Chromatogr. (1985)347,191-198

プルランマトリックス充填キャピラリー電気泳動による蛋白質の分離及び分子量測定

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

CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF SDS-PROTEINS USING PULLULAN SOLUTION AS SEPARATION MEDIUM

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

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

**Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Sodium dodecyl sulfate (SDS) - capillary electrophoresis using pullulan solution as a separation matrix has been developed for the separation and molecular weight determination of proteins. The silanol functions on the inner wall of a fused silica capillary was deactivated by coating with linear polyacrylamide through Si-C linkages, in which pullulan solution was filled. The stability of the coating was examined by exposure of the inside of the capillary to alkaline buffer (pH 9.2) for up to 30 days. In comparison with the coatings with linear polyacrylamide through siloxane linkages, the present capillary markedly reduced the electroosmotic flow. Thus, the low viscous pullulan solution was stabilized, resulting in prolonged lifetime of the capillary and good reproducibility of separations. An excellent linear relationship was obtained between mobilities and logarithms of molecular weight of SDS-proteins. The relative standard deviation of migration time was below 0.3%, when pullulan solution was refilled repeatedly (n=10). The calibration plots of the integrated peak areas at 214 nm vs concentration of standard proteins were linear in a region of 5 μ g/mL to 0.1mg/mL.

1. 緒言

蛋白質及びポリペプチドの迅速な分離及び分子量測定法として、SDS を用いたキャピラリー電気泳動(SDS-CGE) が知られ、分離用マトリックスとしては、架橋または線状ポリアクリルアミドやデキストラン、ポリエチレングリコールなどが報告されている。一般に、SDS-CGE では蛋白質の検出をUVで行っているが、ポリアクリルアミドを分離用マトリックスとして用いる場合、それ自身がUV/230nm以下で強いUV吸収を持つため、UV/280nmが検出に用いられている。一方、蛋白及びポリペプチドはUV/200nm付近に強い吸収があり、それらは、UV/280nmでの吸収の20~50倍であると言われている。今回、分離用マトリックスとしてUV吸収の少ないプルランを使用し標準蛋白質の分離を試みた。なお、安定なSi-C結合を介してキャピラリー内壁に線状ポリアクリルアミド(LPAA)をコーティングすることにより電気浸透流を抑制し、マトリックスの安定化をはかった。

2. 実験

1. 装置及びキャピラリー内壁のコーティング

キャピラリーはGLサイエンス社製のものを使用し、キャピラリー電気泳動装置は日本分光社製のCE-800を使用した。測定は室温で行った。一方、シロキサン結合を介したLPAAのコーティングは、Hjertenの方法(J. Chromatogr., 374, 191(1985))に従った。Si-C結合を介したLPAAのコーティング方法は、前回の本シンポジウムで発表した方法で行った。

2. アルカリに対する内壁コーティングの耐久性の評価

Si-C結合またはシロキサン結合を介してキャピラリー内壁にLPAAのコーティングを施したキャピラリーに50mM sodium tetraborate (pH=9.2)を充填し30日間室温に放置した。その後、電気浸透流の測定を20mM sodium tetraborate (pH=9.2)を泳動用バッファーとして用い、mesityl oxide をマーカーとして行った。

3. 蛋白質の分離

泳動用バッファー(0.1M Tris-CHES, 0.1%SDS, pH 8.7)にプルラン(平均分子量: 50,000 ~100,000)を溶かした溶液を、Si-C結合でLPAAのコーティングを施したキャピラリーに充填し、蛋白質の分離に用いた。また、蛋白質は、1%SDS, 1% 2-Mercaptoethanol溶液に溶かし(蛋白質濃度: 約0.1mg/mL) 80°Cで15分間加熱した。

3. 結果及び考察

1. アルカリに対する内壁コーティングの耐久性

Si-C結合またはシロキサン結合を用いたLPAAのコーティングのアルカリに対する耐久性をFig. 1に示した。コーティング直後は、それぞれのキャピラリーとも電気浸透流が観測されず、コーティングによって電気浸透流が完全に抑えられていることがわかる。シロキサン結合でコーティングを施したキャピラリーは、アルカリバッファーを充填することにより、徐々に電気浸透流が観測されるようになったが、Si-C結合でコーティングを施したキャピラリーは、アルカリバッファー充填30日後も十分に電気浸透流を抑制していた。一方、キャピラリーの素管は30日間ほぼ一定速度の大きな電気浸透流が観測された。

2. プルラン充填キャピラリーによる蛋白質の分離

Fig. 2は、Si-C結合を介してLPAAをコーティングしたキャピラリーに7%w/vのプルランを充填し、7種の標準蛋白質の分離を行ったエレクトロフェログラムである。また、その時の各蛋白質のmigration timeの再現性をTable Iに示した。これらの結果より、今回作製したキャピラリーは、電気浸透流を完全に抑制しているため、充填したプルランが電気浸透流によってキャピラリーから、押し出されるのを防止し、再現性よく分離が行えたと言える。Fig. 3は、各蛋白質の移動度と蛋白質の分子量の対数値の関係をプルラン濃度を変えてプロットしたグラフである。この時の相関係数は、 $r^2 > 0.993$ であった。また、 α -lactalbumin及びcarbonic anhydraseについて定量性を検討した結果をFig. 4に示した。5 μ g/mLから0.1mg/mLの蛋白質濃度において良好な直線性が得られた($r^2 > 0.994$)。

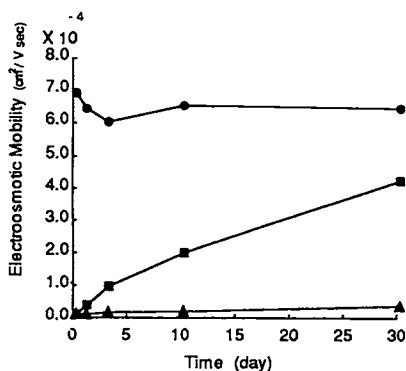


Fig. 1 Time course of electroosmotic mobility measured in the capillaries exposed in alkaline conditions (50mM sodium tetraborate pH9.2). ●=uncoated capillary, ■=capillary coated with linear polyacrylamide through Si-O-Si-C linkages, ▲=capillary coated with linear polyacrylamide through Si-C linkages

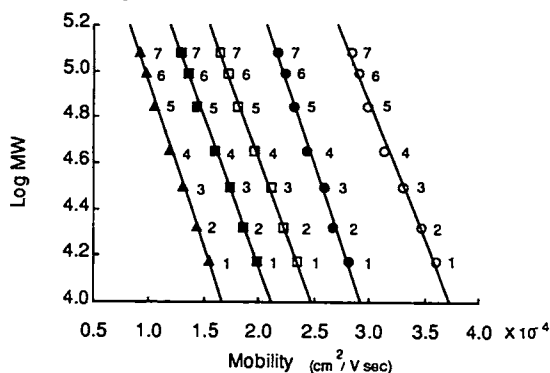


Fig. 3 Plot of log molecular weight vs mobility of proteins measured in the capillary containing 1%w/v (○), 3%w/v (●), 5%w/v (□), 7%w/v (■), 10%w/v (▲) pullulan solution. The capillary was coated with linear polyacrylamide through Si-C linkages. The peak numbers specify proteins shown in Table I.

Table I REPRODUCIBILITY OF MIGRATION TIMES USING 7%w/v PULLULAN (n=10)

Proteins	Molecular weight	% R. S. D.
1. α -lactalbumin	14400	0.37
2. trypsin inhibitor	20100	0.23
3. carbonic anhydrase	30000	0.24
4. ovalbumin	43000	0.22
5. BSA	67000	0.35
6. phosphorylase b	94000	0.29
7. β -galactosidase	116000	0.26

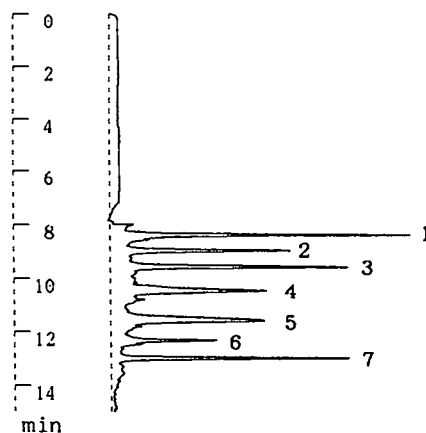


Fig. 2 Electropherogram of SDS-Proteins on 7%w/v pullulan solution-filled capillary. The inner wall of the capillary was coated with linear polyacrylamide through Si-C linkages. The peak numbers specify proteins shown in Table I. Capillary: 75 μ m i.d. \times 50cm (30cm to detector). Buffer: 0.1M Tris-CHES 0.1XSDS pH 8.7 Separation conditions: -15kV, Injection: -5kV 5 μ A 5sec. Detection: UV/214nm

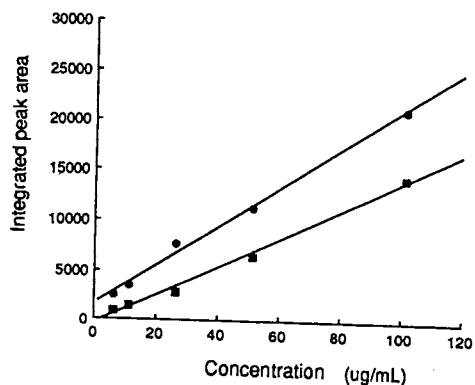


Fig. 4 Plots of the integrated peak areas vs concentration of standard proteins. ●= α -lactalbumin, ■=carbonic anhydrase The sample solutions of different protein concentrations were injected electrophoretically (-100v/cm, 5sec) into the coated capillary involving Si-C linkages filled with 5%w/v pullulan solution. Other conditions were the same as given in the legend of Fig. 2

(阪大・蛋白研) ○小暮 栄一、亀山啓一、高木俊夫

EVALUATION OF PULLULAN SOLUTIONS AS THE SEPARATION MEDIA OF DNA FRAGMENTS IN
CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Eiichi Kogure, Keiichi Kameyama, Toshio Takagi
Institute for Protein Reserch, Osaka University

DNA fragments (λ -phage DNA *Eco*T14 I digests and *Hind*III digests) were separated by capillary electrophoresis using three pullulan preparations with sharp and defined molecular weight distributions (800, 1600 and 2500K) to reveal that the larger fragments could be well separated both below and above the respective entangled threshold concentration in a mode of the Ogston type and the reptation type, respectively. Entanglement of the chains thus seems not to be a premise of separation but rather to lead to the change in the mode of separation.

1. はじめに：無架橋のポリマー溶液を分子ふるい媒体とする、DNAフラグメントのキャピラリー電気泳動が盛んに行われているが、それらの基礎に関する検討は不十分である。本研究は、鋭い分子量分布を持つプルランについて濃度、平均分子量、分子量分布などが、分離にどのように影響するかを明らかにする事を目的として行った。

2. 実験：大塚電子(株)のキャピラリー電気泳動装置、CAPI-3000、を使用した。熔融石英キャピラリー (G. L. Sci. (株)) は、内径100 μ m、有効長約36cmのものに、PAA被覆して使用した。Bromphenolblue (BPB) を内部標準として用い、残存する電気浸透について補正した。実験条件：温度、25 $^{\circ}$ C (空冷)；泳動電場強度、約200V/cm；緩衝液、89-89-2mM TBE-7M 尿素溶液、pH8.8；プルラン、(株)林原生化学研究所より供与されたGPC用分子量標準マーカ (P-800 (Mw, 823k), P-1600 (1600k), P-2500 (2530k))。上記の緩衝液中で8時間以上攪拌し、溶解させて電気泳動液および電極槽液として用いた。プルラン溶液の充填はポンプを用いる吸引により行った。3標品について、それぞれ0~1%の範囲で、キャピラリー電気泳動測定を行った。

試料としては、宝酒造(株)より市販されている λ -ファージDNAに制限酵素、*Hind*IIIあるいは*Eco*T14 I を働かせて得られた各々8、12種類のフラグメントの混合物を使用した。試料は電気泳動法により、電場強度約100V/cm、3秒間で導入した。

3. 結果および考察：分子ふるい効果はポリマー鎖の絡み合いにより形成された網目に起因するとされている。我々は網目が分離にどのような影響を与えるのかを検討するために、分離能と絡み合い濃度の関連性を検討した。P-2500について使用溶媒中で光散乱測定を行ない、絡み合い開始濃度、約0.15%が得られた。P-2500では水中の R_g が使用緩衝液中の値とほぼ一致したので、水中の文献値を流用してP-800の絡み合い開始濃度を評価すると約0.62%となる。したがって使用した3標品の絡み合い開始濃度は、いずれも1%以下と判定できる。

Fig. 1のようにファーガソンプロットを行うと、絡み合い開始濃度の前後において直線状のプロットに折れ目が生ずることが認められた。絡み合い開始濃度以下では、濃度ゼロへの外挿値が縦軸上に収斂し、オグストンモデルが成立することが認められた。それよりも高濃度側では各曲線の勾配は次第に小さくなる。これは絡み合い開始濃度以上では、分離に対する濃度の影響が低くなることを示している。

これまで、異なるポリマー分子鎖間に網目が形成された状態、すなわち絡み合い濃度以上でのみ分子ふるい効果が発現されると考えられてきたが、それ以下の濃度でも大きなフラグメントについては分離が十分可能である。

上記の結果を考慮すると、ポリマー溶液の分離能を活用するという観点に立つならば、絡み合い開始濃度の近辺の濃度を採用することが、一般的には最も効率が良いと判断される。この条件は分離能ばかりでなく、溶液の取り扱い易さおよび所要量からも好都合である。

我々は問題点を明らかにするために、分子量分布の狭い標品を扱ってきたが、分子量分布自体がどの様に分離に影響するかについては未検討であった。そこで濃度を固定して、異なる分子量の標品のブレンドの効果を検討を始めている。その結果も併せて発表したい。

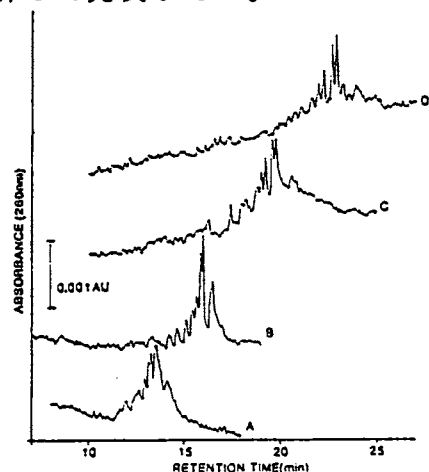


Fig. 1 Electropherograms of λ -phage DNA Eco114I digests obtained using the P-2500 pullulan solutions of different concentrations. Capillary: 359cm effective length; 100 μ m ID., coated with linear PAA. P-2500 concentrations (w/w): A. 0.09%; B. 0.15%; C. 0.46%; and D. 0.73%. Electrophoresis: 195 V/cm, 25°C; injection: 97V/cm, 3s; Detection: 260nm.

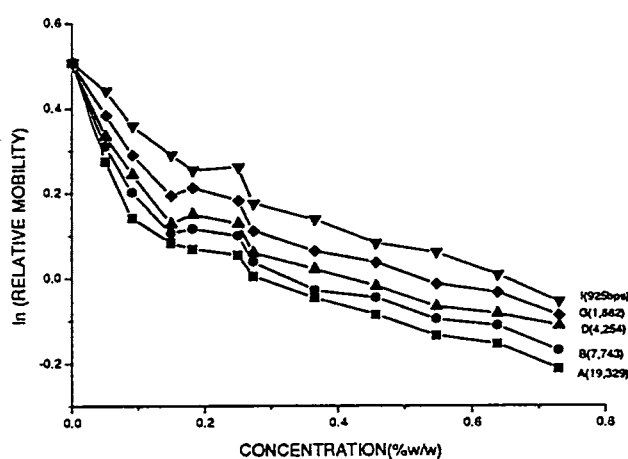


Fig. 2 Ferguson plots of λ -phage DNA Eco114I digests. The relative mobilities are plotted semi-logarithmically against the polymer concentrations.

姫路工大・理 ○真鍋 敬・友弘 保・寺部 茂

BASIC STUDIES ON THE CONDITIONS OF CAPILLARY
ISOELECTRIC FOCUSINGTakashi Manabe, Tamotsu Tomohiro and Shigeru Terabe
Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Basic conditions for the capillary isoelectric focusing of proteins were examined. Proteins with known isoelectric points were focused in a fused silica capillary (i.d. 75 μ m, length 190mm) in the presence of carrier ampholytes (Ampholine). For the mobilization of proteins after focusing, the method of "cathode buffer replacement" was employed; proteins were mobilized to the direction of UV-detector located close to the cathode end of the capillary. The detection time of proteins differed reflecting the difference of isoelectric points.

1. はじめに

架橋したポリアクリルアミドゲルによるキャピラリー SDS 電気泳動で、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。キャピラリー SDS 電気泳動とともに、タンパク質の高性能分離に不可欠であると考えられるキャピラリー等電点電気泳動について、基礎的条件を検討した。

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, ovalbumin, albumin, apotransferrin を用いた。それぞれのタンパク質の 5mg/ml 水溶液を用意し、その 5-20 μ l と両性電解質混合物 (Ampholine pH3.5-10, 40%w/v) 10 μ l とを水で 200 μ l としたものを試料溶液とした。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、インテグレーターは紫外吸収シグナル用に JASCO807-IT を、電流シグナル用に島津クロマトパック CR-6A を用いた。電源は松定プレシジョン HCZE30PN0.25-LDSW を用いた。フューズドシリカキャピラリーは外径 375 μ m、内径 75 μ m、長さ 19cm のものを用いた。キャピラリーの内壁処理は、Hjertén¹⁾らに従い、シラン化処理後直鎖ポリアクリルアミドを共有結合させる方法を用いた。等電点電気泳動には、陽極槽液として 20mM NaOH、陰極槽液として 20mM H₃PO₄ を用い、試料溶液を 10 μ l マイクロシリンジでキャピラリー中に注入し、5kV の電圧を印加した。電流値が低下した時点で、陰極槽液を NaCl に交換することによって収束後のタンパク質を移動させた。ただしこれら電極槽液は、いずれも 1% アガロースゲルの状態で用いた。

溶液中の電気泳動においては、2つの電極槽の水位の違いがキャピラリー中に液流を生じさ

せる。電極槽液をゲル状にし、液流を防ぐことによって、再現性が向上した。検出器の位置は、陰極側に置くほうがタンパク質ピークの検出に有利であった。

図1はミオグロビンの泳動結果の一例で、左に280nmの紫外吸収値の変化、右に電流値の変化のパターンを示している。等電点電気泳動の開始から10分後にいったん電源を切って電極槽液を20mM NaClに交換しており、交換後約10分でピークが検出されている。泳動開始から電極槽液交換までの時間を5分から20分まで変化させても、電極槽液交換からピークが検出されるまでの時間と、ピークの高さおよび幅には大きな変化は認められなかった。さらにタンパク質同志の分離を最適化するための方法を検討中である。

1) Hjertén, S., J. Chromatogr., 347 (1985) 191-198.

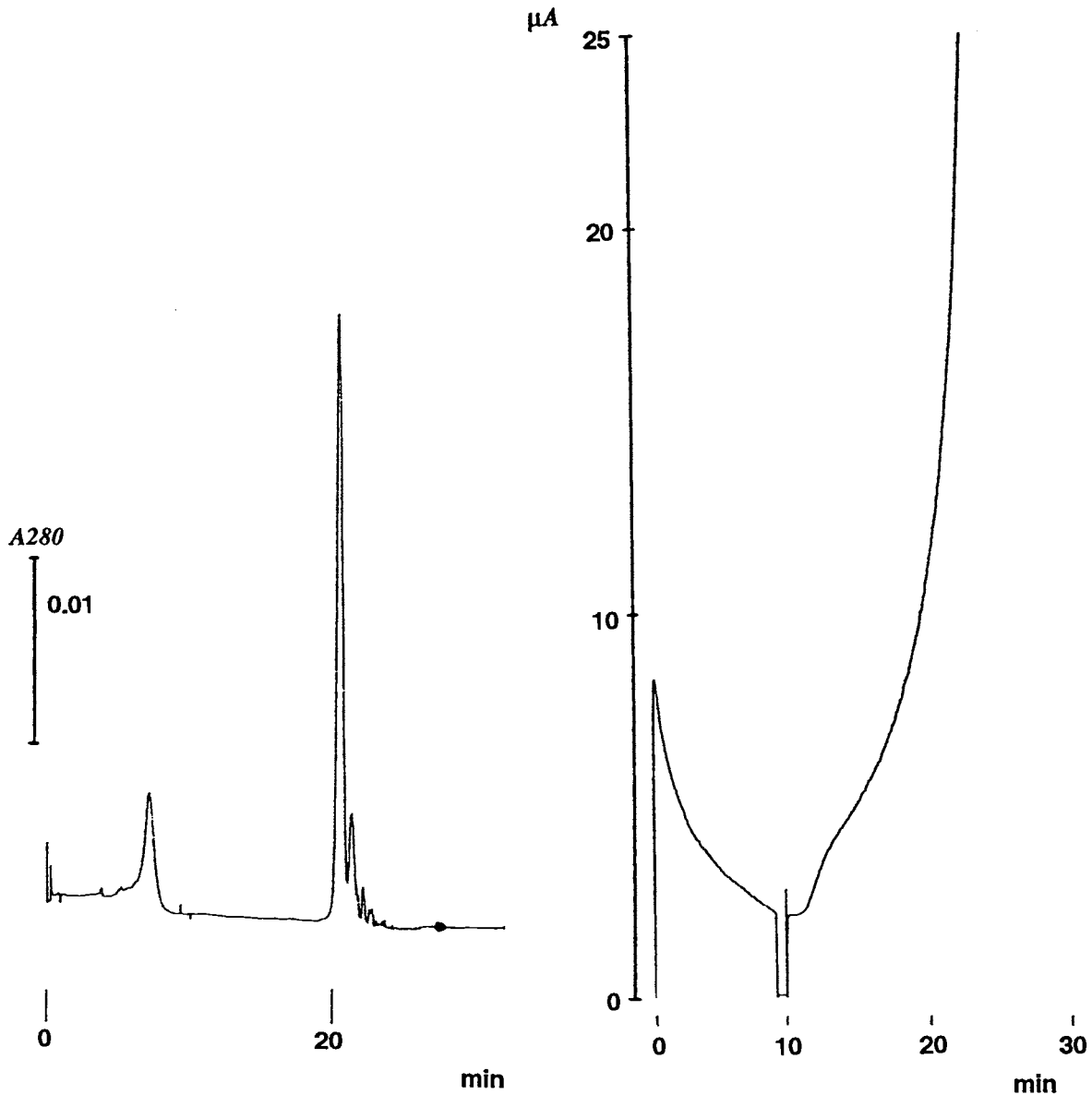


Fig. 1 Isoelectric focusing and mobilization of horse heart myoglobin.
Left; UV absorbance, right; current.

43

自由溶液キャピラリー電気泳動におけるドデシル硫酸ナトリウムと蛋白質ポリペプチドあるいはペプチドの間に形成された複合体の挙動

(阪大・蛋白研) M. Rezaul Karim、品川 進、高木俊夫

Behavior of the Complexes Formed between Sodium Dodecyl Sulfate and Protein Polypeptide or Peptide in Free Solution Capillary Electrophoresis

(Institute for Protein Research, Osaka University) M. Rezaul Karim, Susumu Shinagawa, Toshio Takagi

Mobilities of various proteins or peptides complexed with sodium dodecyl sulfate (SDS) were determined to know electrophoretic behavior of complexes as well as to assess the potentialities of capillary electrophoresis as a technique to determine such basic parameters.

1. INTRODUCTION

Quantitative data of electrophoretic behavior of the complexes between SDS and polypeptide or peptide in free solution is still lacking due to absence of suitable technique. We believe that information about electrophoretic behavior of the complexes is vitally important to discuss various problems arising from vast number of the electrophoretic runs carried out everyday and everywhere. Capillary electrophoresis was recently introduced and is finding various application mostly for analytical purposes. It was expected also to provide reliable electrophoretic mobilities in free solution for various objects. The present study was thus motivated.

2. MATERIALS AND METHODS

All proteins were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) except bovine serum albumin (BSA) which was purchased from Chibachikusan Kogyo Co. Ltd. (Chiba, Japan). Four small peptides were kindly donated by Prof. S. Aimoto of the Laboratory of Peptide Chemistry of the Institute for Protein Research. All sample solutions were prepared in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing dithiothreitol, and SDS. Among proteins and peptides, only BSA was various with respect to the derivatization of its 17 disulfide bonds. They are non-reduced, reduced, reduced-carboxymethylated (RCM), and reduced-S-carboxyamidomethylated (RCAM) BSA. A commercially available capillary electrophoresis instrument (CAPI-3000 System, Otsuka Electronics Co., Hirakata, Japan) was used. All electrophoresis run was conducted in fused-silica capillaries of 50 or 100 μ m I.D. and 375 μ m O.D., coated with polyacrylamide, with different column lengths. Orange G was always used as an internal standard.

3. RESULTS

The absolute electrophoretic mobility of Orange G in free solution was determined to be $-2.83 \times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{v}^{-1} \text{s}^{-1}$ in runs, where electroosmotic flow in a coated capillary was completely suppressed. Figure 1 shows dependence of electrophoretic mobilities of proteins or peptides on their molecular weights. A typical electropherogram for the mixture of reduced BSA and Orange G is given in Fig. 2A. Figure 2B illustrates that the free solution capillary electrophoresis is quite efficient and reliable to detect a small difference in mobility.

Figure 1. Plot of electrophoretic mobilities vs molecular weight of proteins or peptides studied. Points: 1, SDS micelle; 2, peptide IV; 3, peptide III; 4, peptide I; 5, vasopressin; 6, insulin; 7, peptide II; 8, lysozyme; 9, myoglobin; 10, trypsin inhibitor; 11, carbonic anhydrase; 12, ovalbumin; 13, reduced BSA; 14, RCAM-BSA; 15, RCM-BSA; 16, non-reduced BSA; 17, phosphorylase b; 18, β - galactosidase.

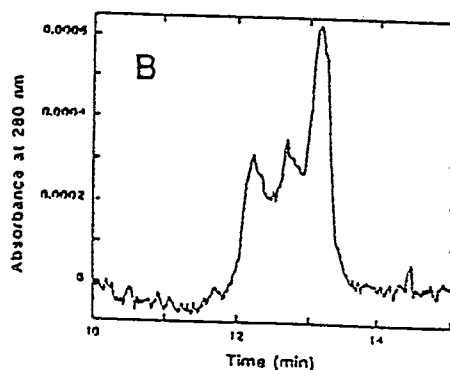
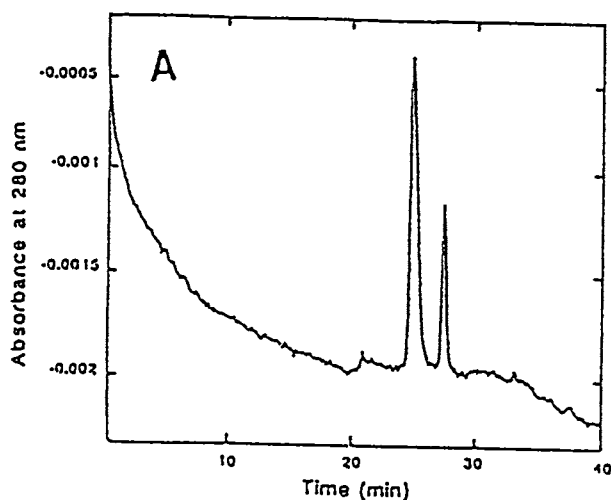
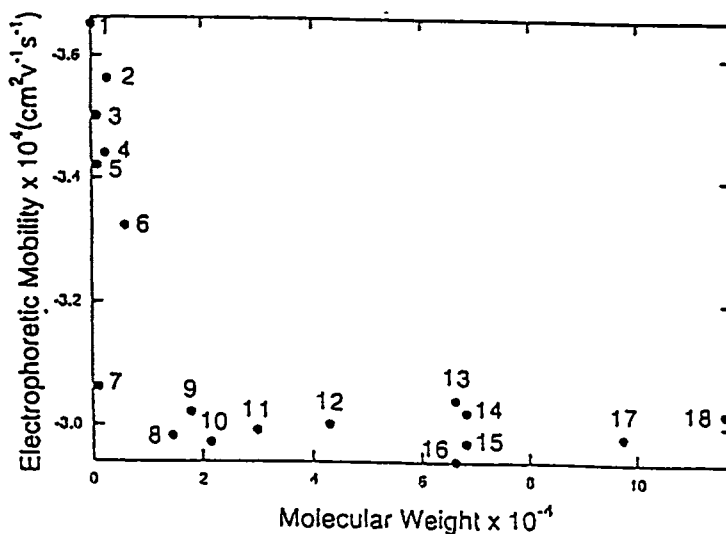


Figure 2. A, Electropherogram of reduced BSA. Conditions: running buffer and electrode buffer, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1% SDS; capillary, 49.7 cm total length; 37.6 cm effective length; 100 μ m I.D.; injection, 2 s at -5 kV; applied voltage, -4.7 kV; current, 56-58 μ A; run temperature, 20 $^{\circ}$ C; detection, UV at 280 nm. Peaks: left, BSA; right, Orange G. B, Electropherogram of a mixture of RCAM-BSA, RCM-BSA, and Orange G. Conditions: see Fig. 2A (except total length, 36.8 cm; effective length, 24.75 cm, 50 μ m I.D., current, 18-20 μ A). Peaks: from left to right, RCAM-BSA, RCM-BSA, and Orange G.

4. DISCUSSION

The observed electrophoretic mobilities of the complexes were virtually insensitive to the chain length. The insensitiveness to the size breaks as the molecular weight becomes less than 10,000. The nonsystematic value of mobilities observed for the relatively small peptides makes us pessimistic about the use of SDS-PAGE for MW estimation of such objects. Small difference of mobility among the three derivatives of BSA was successfully determined and might be a result of difference in size and/or charge of the molecules. We conclude that capillary electrophoresis may be used as a new, sensitive and easy technique for such type of studies.

44 Z1-Methyl 添加のキャピラリー電気泳動法 によるヒト血清蛋白質の分析

(東北大病院検査部¹⁾)

(東北大・医・臨床検査診断学²⁾)

(杏和総合医学研究所³⁾)

(日本ミリポアリミテッド⁴⁾)

○三浦利彦¹⁾, 相澤裕子¹⁾, 小原保彦¹⁾, 矢吹重光¹⁾, 船渡忠男²⁾, 川村 武²⁾,
坪 茂典³⁾, 町田祥子⁴⁾

The analysis of human serum proteins by capillary electrophoresis using Z1-Methyl.

Toshihiko Miura¹⁾, Yuko Aizawa¹⁾, Yasuhiko Obara¹⁾, Shigemitsu Yabuki¹⁾, Tadao Funato²⁾, Takeshi Kawamura²⁾, Shigenori Tsubo³⁾ and Sachiko Machida⁴⁾

- 1) Department of Clinical Laboratory, Tohoku University Hospital.
- 2) Department of Clinical and Laboratory Medicine, Tohoku University School of Medicine.
- 3) Kyowa Synthetic Medical Laboratory.
- 4) Waters Chromatography Division of Nihon Millipore.

Separations of four human serum proteins of various pI and M.W. values, and human serum were performed by capillary electrophoresis (CE) using untreated fused silica capillary. This study attempted the effects of pH and salt concentration in buffer on the capillary electrophoretic separation. For optimum separation of serum proteins, 50mM sodium borate (pH10.0) added 1.0 M Z1-Methyl was recommended. These results indicated that CE might be reliable technique for clinical diagnosis of serum protein abnormalities.

【はじめに】

キャピラリー電気泳動 (CE) によって蛋白を分離する場合、未処理フューズドシリカキャピラリーの内壁はシラノール基の解離によって負に帯電しているため、蛋白質が内壁に吸着し、分離能や再現性が損なわれることがある。

今回、未処理フューズドシリカキャピラリー内壁への蛋白の吸着を抑制させるために、緩衝液中に両性イオンである Z1-Methyl を添加し、精製ヒト血清蛋白およびヒト血清の分離分析を試み、緩衝液の pH と濃度について検討を加えたので報告する。

【実 験】

1. ヒト血清試料

健常者血清と血清蛋白分画像に異常を認めた患者血清を用いた。

2. 精製ヒト血清蛋白混合試料

ヒト Albumin (Organon Teknika), ヒト IgG (ICN), ヒト α_1 -antitrypsin (Chemicon International), ヒト α_2 HS-glycoprotein (Athens Research and Technology) を各々最終濃度が約 20mg/dl になるように混合して作製した。

3. キャピラリー電気泳動の条件

1) キャピラリー: 未処理フューズドシリカキャピラリー (75 μ m I.D. \times 60cm)。

2) 装置: Quanta 4000 システム (Waters) を使用し、得られたピークは M741 Data Module にてデータを解析した。

3) 電解液: 25, 50, 100mM ホウ酸ナトリウム液 (pH10.0) と 50mMリン酸ナトリウム液 (pH2.5, 4.0, 7.0) に 1.0M になるように Z1-Methyl (Millipore) を添加した。

4) 試料注入: 重量法 (落差 10cm) で 10秒注入した。

5) 泳動: 100 μ A を越えない範囲で定電圧をかけて泳動した。

6) 検出: フローセル方式によるオンライン検出 (波長 214nm)。

7) キャピラリーの初期化: 分析毎に 100 mM 水酸化リチウムを送液、次にイオン交換水を送液し、最後に緩衝液を送液した。

【結果および考察】

1. 電解液の pH

分離に及ぼす pH の影響の結果を 図 1 に示した。pH10.0 において十分な分離像が得られた。

2. 電解液の濃度

25, 50, 100 mM ホウ酸ナトリウム (pH10.0) について比較したところ、50mM ホウ酸ナトリウムにおいて迅速でかつ安定した分離が得られた。

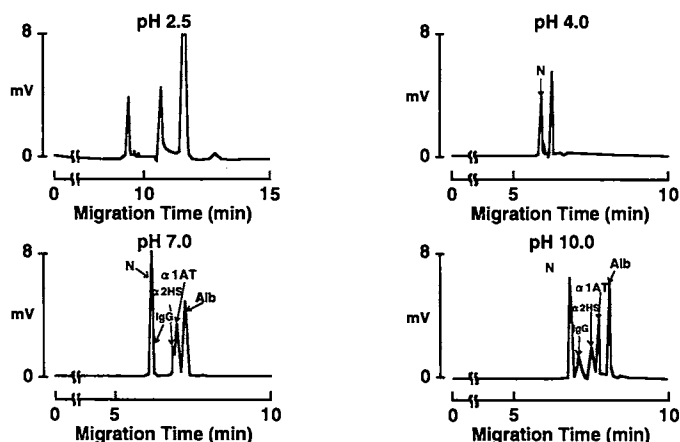


Fig.1. Effect of pH in buffer with 1.0M Z1-Methyl.

3. ヒト血清蛋白質の分析

電解液に 1.0M Z1-Methyl 含有の 50 mM ホウ酸ナトリウム液を用いてヒト血清蛋白質の分離分析を行った結果、これらの条件は血清蛋白質の異常を検出する上で有用と考えられた。

45 無担体電気泳動によるDNAの分離

4. 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) 搭載 FFEUのFMを用いた電気泳動

○小林英三郎, 郷間尚, 稲垣宗彰 (城西大学理学部化学科)
石井直明 (東海大学医学部分子生物学2), 長岡俊治 (宇宙開発事業団)

Separation of DNA on Free Flow Electrophoresis.

4. Electrophoresis by using of the FFEU/FM for IML-2.

Hidesaburo Kobayashi, Takashi Goma, Muneaki Inagaki¹⁾, Naoaki Ishii²⁾ and Syunji Nagaoka³⁾

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

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

3) NASDA, 1-1, Sengen 2-chome, TSUKUBA-SHI 305

Abstract: A electrophoresis experiment of nematode *C. elegans* DNA by using FFEU (Free flow electrophoresis unit) was performed for IML-2 (International microgravity laboratory 2) on the earth. FM (Flight Model) of FFEU is equipped ultraviolet absorption detector which composed from 512 channel glass fibers. The 3DEP (three dimensional electropherogram) with time course axis was a useful tool to analyze electrophoretic migration behavior of NADP and adenosine as markers for DNA on free flow electrophoresis. The schematic operation for the space lab was examined.

「はじめに」

無担体電気泳動装置を使用し線虫 (*C. elegans*) の染色体DNAの分離を目的としている。この研究の一環として、1994年7月にスペースシャトルで実施される微小重力下での実験計画IML2 (International microgravity laboratory 2) で無担体電気泳動装置 (FFEU) を使用し電気泳動を行なう。この装置のBBMおよびVAP11での泳動挙動は、既に第9回宇宙利用シンポジウム¹⁾および第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム²⁾で報告してあるので、ここでは本年3月に行った軌道上実験用装置 (FFEU/FM) を用いた利用実験およびクルートレーニングで得られた結果の一部を報告する。

「結果および考察」

IML-2計画で実施する軌道上実験では分画ポート数60に対し、搭載する冷凍庫の容積制限があるため、30分画のみが宇宙から帰還

後分析対象となる。従ってダウンリンクされるデータをもとに電気泳動状態からDNAを含む分画番号を推定し、地上から実験クルーに持ち帰るべき分画番号を指示する。またクルータイムが制限されているので実験は最小限の計画で行う考慮が必要である。

これらの問題に対処するため3回の軌道上実験を計画している。実験1ではDNAの分離に有効な電気泳動電圧を判断するために200Vおよび300Vで電気泳動を行う。この結果より実験2の電圧条件を決定し電気泳動を行う。実験3では分取ポート番号を決定し、分取を行ない帰還するまでの間スペースラブの冷凍庫に保管する。

無担体電気泳動装置を用いDNAの電気泳動を行う場合、高濃度溶液のDNA溶液は会合が起りやすいのでその濃度を低く抑える必要がある。このDNAの電気泳動挙動を判断するた

めにNADPおよびアデノシンをマーカーとして用いる。

FFEU/FMには512チャンネルの紫外線吸光度モニター(254nm)を泳動槽最下部に装備してあるので、分離挙動を10秒置きに観測することが出来る。改良された無担体電気泳動解析プログラム(FFE3D)による3Dエレクトロフェログラムから分離挙動を解析した。

本装置は60連のプランジャーで液流をコントロールし、サンプルインジェクションはシリンジポンプを用いている。NADPおよびアデノシンをマーカーとし*C.elegans*から得たDNAをサンプルとして電気泳動を行った。

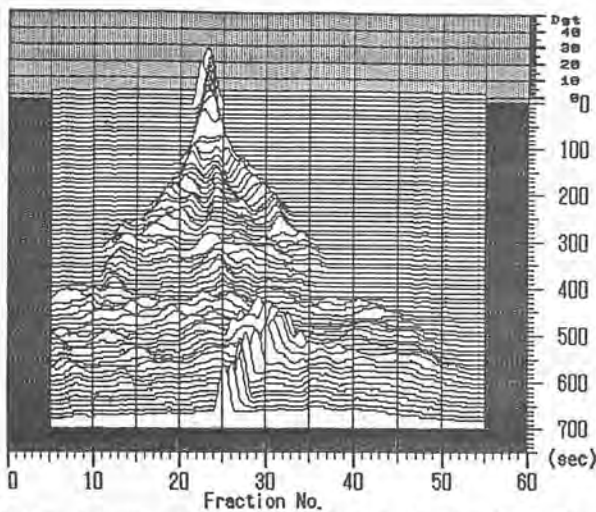


Fig.1 Electrophoretic profile of NADP, adenosine and *C.elegans* DNA solution. (front view) The sample flow rate was maintained at 1cm/min and the buffer was 2cm/min. The charge of electrophoresis was conducted at 33.3V/cm and after 450sec the charge was reduced to zero.

サンプル線流速1cm/min、緩衝液線流速2cm/minで流下し、サンプル流速が安定した後、33.3V/cmの電圧で泳動泳動を行った。加電開始後約400secで通電を止めサンプルのインジェクションポートへの戻り状況をFig.1に示した。またFig.2はサンプル線流速2.5cm/min、緩衝液線流速3cm/min、加電電圧50V/cmで同じサンプルを電気泳動移動した結果を示した。線流速3cm/minでの条件では比較的集束して分離する傾向があるが、線流速2cm/minでは槽内に広がり、電気泳動槽内で発生する熱による対流の影響をより受けやすいと考えられ

る。

電気泳動槽は前後両面から冷却されている。通電していないとき、緩衝液は冷却槽温度(5℃)であるが通電開始直後は急激な温度変化が見積られ流下状況が変化する。従って、サンプル流下と同時に荷電すると、電気泳動槽内が熱的平衡になるまでサンプルの電気泳動状態は不安定である。この影響を避けるためサンプル流下開始前7.5分間荷電し、槽内を熱的平衡状態としておくと、全体の分離状況は乱れてはいるが一定の状態を維持している。

「おわりに」

軌道上実験では熱対流が無いので熱的攪乱は

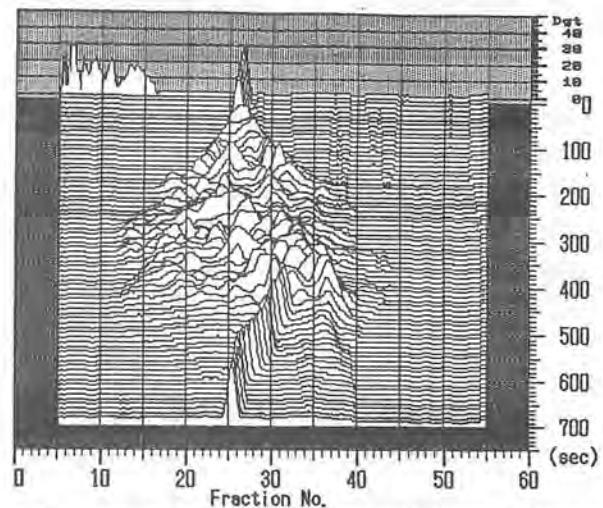


Fig.2 Electrophoretic profile of NADP, adenosine and *C.elegans* DNA solution. (front view) The sample flow rate was maintained at 2.5cm/min and the buffer was 3cm/min. The charge of electrophoresis was conducted at 50.0V/cm and after 450sec the charge reduced to zero.

少ないと期待できるが、今回のFM利用実験で荷電開始やサンプル導入のタイミングを再考することになった。使用できるクルータイムで最適条件の実験設定をすることは困難な点も多いが、地上実験では予測できない問題を最小限の実験で判断し、電気泳動分離実験を行うことになる。泳動緩衝液等の詳細検討は本年8月に宇宙開発事業団筑波宇宙実験棟に設置されたFFEU/BMを使用し続行中である。

- 1) 小林英三郎、石井直明、広川健
第9回宇宙利用シンポジウム、東京(1992.7)
- 2) 小林英三郎、藤倉裕一、日黒利和、石井直明
第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム、姫路(1992.12)

46 ゲル電気泳動中のDNAの直接観察

(名大工) ○小穴英廣・増淵雄一・松本充弘・土井正男
(名大人間情報) 松沢有希子・吉川研一

DIRECT OBSERVATION OF DNA DURING GEL ELECTROPHORESIS

Hidehiro Oana, Yuichi Masubuchi, Mitsuhiro Matsumoto, Masao Doi,
Yukiko Matsuzawa*, and Kenichi Yoshikawa*,

Department of Applied Physics, School of Engineering, and *Graduate School
of Human Informatics, Nagoya University, Nagoya 464-01 JAPAN

Gel electrophoresis is a useful technique to separate large DNA molecules. But there are many unsolved problems about the mechanism of the separation. In recent works, DNA molecules have been observed directly by using fluorescence microscopy. However, there are few quantitative analyses of conformational dynamics.

We performed microscopic direct observations of T4 DNA(166kbp) molecules under steady electric field in gel. With those video-microscopic images, quantitative and statistical analysis of dynamics of DNA was carried out. Conformational change in terms of the radius of gyration (R_g) and the velocity of center of mass (v) were calculated from the video images. Then we computed the time auto-correlation functions of v and R_g . They showed the periodic behavior of DNA molecules quantitatively and the period decreases with the increase of the field strength. Now experiments under different gel concentration are in progress.

- 1) 蛍光顕微鏡でゲル電気泳動中のDNA分子を直接観察できる事を利用して定常電場をかけたときのDNAの重心の移動速度とコンフォメーションの定量的解析を行なった。[1]
- 2) 蛍光色素EBを結合させたT4 DNA(166kbp)をアガロースゲル中でゲル電気泳動させてDNA分子の蛍光像をビデオに記録し、パーソナルコンピュータによって画像解析を行ない、DNA分子の広がり、重心の移動速度等を計測した。
- 3) 定常電場をかけると、DNAは電場と逆方向に向かって、ゲル繊維に引っ掛かったり外れたりして伸縮を繰り返しながら泳動する。このときの重心の移動速度の電場方向成分 v_x と、分子の広がりを知るための式(1)で定義される慣性半径 R_g を測定した。Fig.1は時間に対する v_x と R_g の変化であり、1本のDNAについてのデータの一例である。

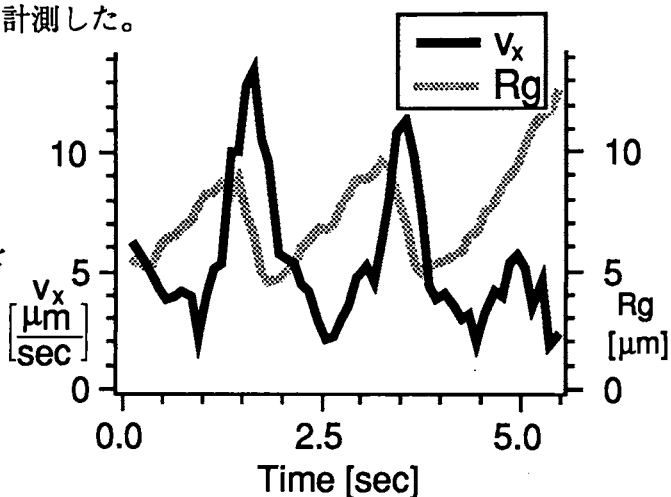


Fig.1. An example of the time development of v_x and R_g of T4 DNA during steady field gel electrophoresis. The field strength is 8V/cm. Gel concentration is 0.90%.

$$R_g = \sqrt{\frac{3(R_l^2 + R_s^2)}{2}} \quad (1)$$

R_l : 慣性楕円体の長軸半径 R_s : 同短軸半径

次に、式(2)を用いて v_x, Rg それぞれの時間自己相関関数 $C_{AA}(t)$ を求めた。

$$C_{AA}(t) \equiv \frac{\int (A(t+t') - \bar{A})(A(t') - \bar{A}) dt'}{\int (A(t') - \bar{A})^2 dt'} \quad (2)$$

$A(t)$: 物理量

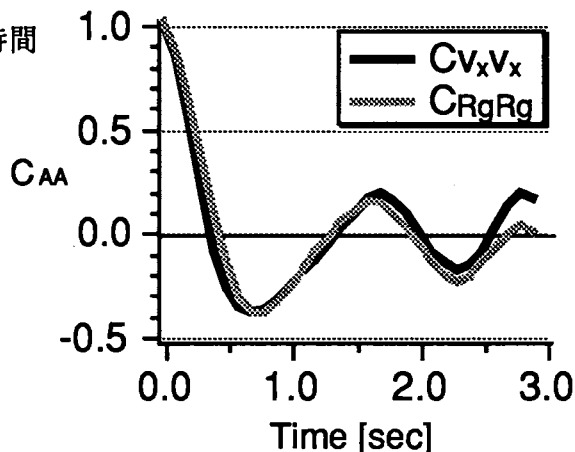


Fig.2. Ensemble average of auto-correlation function of v_x and Rg . $E = 8V/cm$. 0.90% agarose gel.

Fig.2は $8V/cm$ の条件で得た10個のデータから求めた時間自己相関関数のアンサンブル平均をとったものである。

この結果、定常電場をかけているにもかかわらず、DNAはかなり周期的な伸縮運動を繰り返しながらゲル中を泳動していることが分かった。

Rg, v_x それぞれの時間自己相関関数には共にはっきりとした周期性が現れており、これよりDNA分子の運動の周期を定量的に見積もることができた。この結果、定常電場をかけているにもかかわらず、DNAは周期的な伸縮運動を繰り返しながらゲル中を泳動しており、しかもこの周期は電場強度の増加につれて短くなっていくことが分かった。(Fig.3)

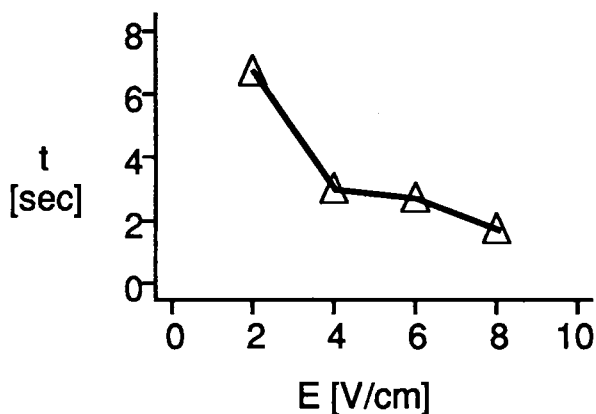


Fig.3. Oscillation period t estimated from the auto-correlation function of Rg plotted against the field strength E .

当日は、ゲルの濃度を変えた実験の結果についても報告する予定である。

文献

- [1] Masubuchi, Y.; Oana, H.; Ono, K.; Matsumoto, M.; Doi, M.; Matsuzawa, Y.; Minagawa, K.; Yoshikawa, K., "Periodic behavior of DNA Molecules during Steady Field Gel Electrophoresis", *Macromolecules*, 1993, vol.26, 5269.

47

マルチキャピラリーゲル電気泳動装置によるDNA解析 I. 多色検出によるDNAシーケンシング

○高橋 智, 穴沢 隆, 村上勝彦, 神原秀記 (日立中央研究所)

MULTIPLE SHEATHFLOW GEL-CAPILLARY-ARRAY ELECTROPHORESIS FOR DNA ANALYSIS I. MULTI-COLOR FLUORESCENT DNA SEQUENCING

Satoshi Takahashi, Takashi Anazawa, Katsuhiko Murakami, Hideki Kambara,
Central Research Laboratory., Hitachi, Ltd.

Dye tagged DNA sequencing samples are injected into twenty gel-filled capillaries and separated by gel electrophoresis. They are eluted from the capillary ends into a sheath flow. They are irradiated at the sheath flow region by a laser. The fluorescence image is divided into four color images using a splitting prism coupled with four color filters and detected on a two dimensional camera.

1. 緒言

ヒトの全遺伝子の解明は医学、生命科学を初めとして種々の分野へ大きな影響を及ぼすと期待されている。しかし、ヒトのDNAは 3×10^9 塩基対の大きさであり、現在の平板ゲルを使用した自動シーケンサ(2kb/hr程度のスループット)では、全DNAの配列決定に数十年必要とする。そのため塩基配列決定の高スループット化が望まれている。高スループット化には、高速泳動、多試料の並列処理が必要である。

平板ゲルをキャピラリーゲルに代えることによって大幅に泳動速度を向上させることができ、シーケンサへの応用が期待されている。しかしキャピラリーゲル泳動の場合、多試料の並列処理、及びキャピラリー毎に末端の4塩基種を識別して計測する必要がある等の課題があった。我々はこの問題を解決し、多数のDNA試料を同時にシーケンスできる多色検出型マルチキャピラリーゲル電気泳動装置を開発した。本報告では、装置構造と原理、シーケンス結果等について報告する。

2. 多色検出型マルチキャピラリーゲル電気泳動装置(Fig.1)

20本のゲルキャピラリーをアレイ状に配列し、その平面に沿ってレーザを入射させた。キャピラリー壁面でのレーザの散乱・屈折を除去するため照射部はキャピラリーの無い状態とした。その照射部で各泳動路に沿って多軸層流を形成し、DNAバンドの拡散と泳動路間の混合を防止した。各泳動路を照射して得られる蛍光を波長分離して計測するため、蛍光像を二次元検出器上に結像させる際に4分割プリズムを用いて4つの蛍光像を作り、各像を各々異なる分光フィルタを通して結像させた。

3. 方法

M13mp18を鋳型DNAとして、ジデオキシ法によりシーケンス試料を調製した。末端がA,C,G及びTである断片は、各々JOE,FAM,TAMRA,ROX標識プライマー(ABI社製品、蛍光極大波長は各々550,520,575,605nm)から相補鎖合成で得た。反応生成物はエタノール沈殿処理後ホルムアミドに0.2pmol/ μ lの濃度で溶解して使用した。内径0.1mm長さ40cmのキャピラリー

(外径0.2mm)にゲルをつめて使用した。ゲル濃度は4~9%T(0~5%C)の種々の条件で作成し、分離等の特性を検討した。

4.結果、考察

Fig.2(a) は二次元検出器で検出された蛍光像であり、20本のキャピラリー(横方向)を泳動するDNA断片を同時に、また4種の塩基からの蛍光を分離(縦方向)して同時に検出できたことを示す。各々の発光位置での蛍光強度の時間変化(Fig.2(b))を解析することで、A,C,G,T断片の泳動スペクトルを得、配列が決定出来た。泳動速度は9%T,0%Cを用いた時200b/hr程度でありゲル濃度を下げると400b/hr程度に向上する。9%T,0%Cの時のスループットは4000b/hrであるが、さらに100本以上のマルチ化が達成できる見通しを得ており、配列決定のスループットのより一層の向上を図る予定である。

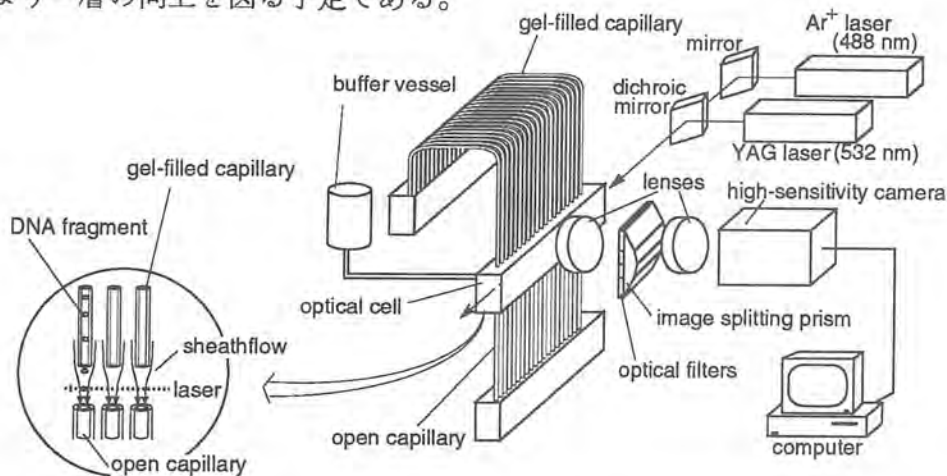


Fig.1 Schematic view of the multiple capillary gel electrophoresis system

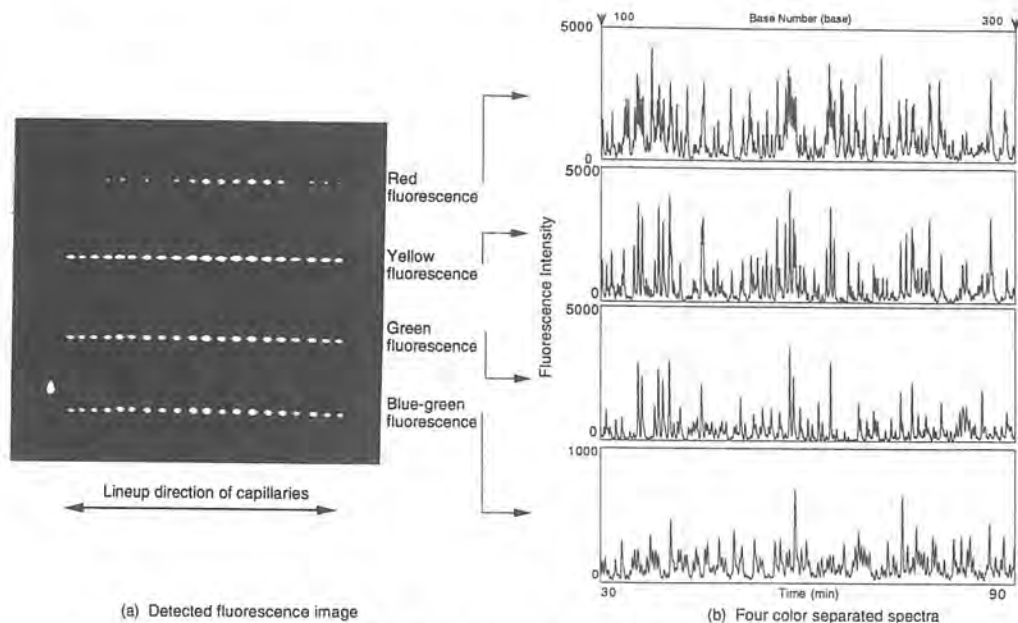


Fig.2 Four color detected image and spectra in twenty gel-filled capillaries system

○穴沢 隆, 高橋 智, 村上勝彦, 神原秀記
(日立製作所中央研究所)

MULTIPLE SHEATHFLOW GEL-CAPILLARY-ARRAY ELECTROPHORESIS
FOR DNA ANALYSIS II. STUDY OF MULTIPLE SEATHFLOW METHOD

Takashi Anazawa, Satoshi Takahashi, Katsuhiko Murakami, Hideki Kambara
Central Reserch Laboratory, Hitachi Ltd.

Characteristics of capillary array gel electrophoresis employing a multiple sheathflow have been investigated in comparison with the DNA detection on column. The DNA band resolution in the sheath flow system was the same as that in the on column detection, however the fluorescent signals decreased with DNA length in the seathflow case because of the difference in the migration velocity.

1. はじめに

ヒトゲノム解析計画に代表されるDNAの大規模解析には塩基配列決定の高スループット化が必要である。我々はこれを達成する手段としてマルチキャピラリーゲル電気泳動法を開発した。本法では、分離部にゲル充填キャピラリーアレーを用い、DNA断片をキャピラリー端より抜き出し、シースフローにより拡散を押さえて全ての泳動路を同時に光照射して蛍光検出を行っている。本報告ではシースフローを用いてDNAをゲルから抜き出して検出する方式(off column)とキャピラリー中で検出する方式(on column)でDNA断片の泳動パターンに変化があるかどうか、特に分離度、蛍光強度に注目して比較検討を行う。

2. 実験

(1) 試料 M13mp18を鋳型DNAとしてABI社のキットによりターミネーター蛍光標識サイクルシーケンス反応を行い、100%ホルムアミドに標準の4倍濃度で反応物を溶かした。4色のターミネーター-FAM, JOE, TAMRA, ROXはそれぞれ末端塩基種G, A, T, Cに対応している。

(2) キャピラリーゲル電気泳動 外径0.2mm, 内径0.1mmのキャピラリーの内面をシラン化処理後, アクリルアミド(4%T,5%C,7MUrea)を充填した。キャピラリー長35cmに3.5kV (100V/cm)を5秒間印加して試料を電界注入した後, 6kV(171V/cm)を印加して電気泳動を行った。

(3) 計測装置 Fig.1に示したように, マルチキャピラリー用蛍光セルに1本のゲルキャピラリーを設置した。励起用レーザービーム(He-Ne 594nm, 2.4mW)をシースフロー部分に照射後(キャピラリー先端より0.3mm下方), 直角プリズムによりビームを折り返してゲルキャピラリーに直接照射した(キャピラリー先端より0.9mm上方)。これらを干渉フィルター(ROXの蛍光のみを透過)を通して二次元I.I.CCDカメラにより撮影し, キャピラリー中(on column)及びシースフロー部分(off column)での蛍光強度の時間変化を調べた。この際, on columnとoff columnで検出される蛍光強度を同程度にするために, 検出面の直前にon column側にのみNDフィルター(透過率46%)を配置した。

3. 結果及び考察

Fig.2(A)はon column, (B)はoff columnにおける泳動パターンで、M13mp18のC断片の分離パターンを示した。100, 200, 300, 400塩基長付近でピーク間隔(D)及びピーク半値幅(W)よりピークの間隔度($R=0.59 \times D/W$ (0.5以上で分離可能))を求めたところ, on columnでは1.14, 1.07, 0.93, 0.61, off columnでは1.17, 1.27, 1.23, 0.68となり, off columnでの蛍光計測がon columnと比較して全く遜色ない分離能を有することがわかった。200, 300塩基長では, ピーク間隔はほとんど変化がないのに対して, ピークの半値幅がoff columnで小さくなっており, off columnの方が高い分離度を示した。これは, ゲルキャピラリーから抜き出したDNA断片がシースフローにより加速泳動されてバンドが空間的に引き伸ばされ, レーザのビーム幅が問題とならなくなったためである。次に同一のDNA断片についてon columnとoff columnのピーク強度をNDフィルターによる影響を考慮に入れて比較した。100, 200, 300, 400塩基長付近でのon columnに対するoff columnのおよその強度比は0.9, 0.6, 0.4, 0.3と順次減少していた。これはon columnと比較してoff columnの泳動速度が大きくなり, レーザビームを通過する時間が短くなったためと考えられる。いずれの場合もゲル電気泳動速度とシースフロー速度の比が重要であり, 最適化する必要がある。

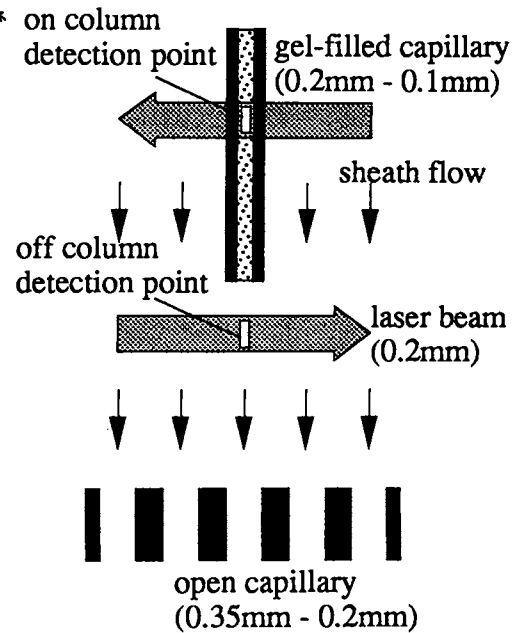


Fig.1 Simultaneous detection on and off column

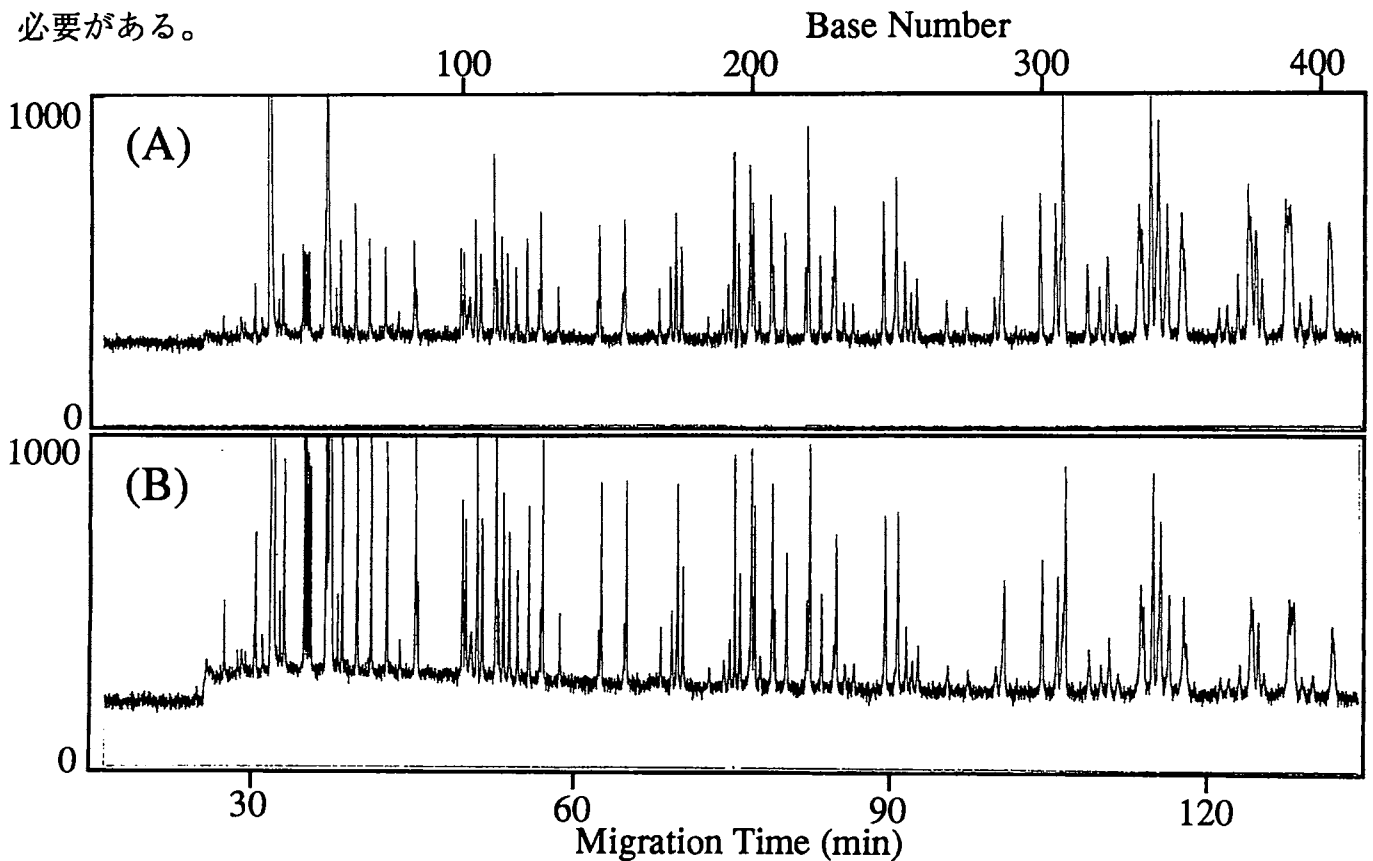


Fig.2 DNA migration pattern

Analysis of Human Genetic Information Using Capillary ElectrophoresisYoshinobu Baba¹, Riyo Tomisaki¹, Mitsutomo Tsuchiko¹, Satoshi Takahashi², and Hideki Kambara²*Kobe Women's College of Pharmacy¹ and Hitachi Central Research Center²*

Capillary gel electrophoresis (CGE) is becoming an key technology for large scale DNA sequencing in Human Genome Project. In this study, we developed a simple laser-induced fluorescence (LIF) detection system for CGE and examined the efficiency and performance of this system for high-speed DNA sequencing. Sequencing rates up to 700 bases/h are obtained at electric field strength of 350 V/cm using this system. An LIF detector produces detection limits of 20 amol of DNA.

はじめに

キャピラリー電気泳動は、DNAの高速・高分解能分離が可能であるので、ヒト・ゲノムDNAの次世代シーケンシング法として期待されている¹⁾³⁾。ヒトの遺伝情報が解析されれば、遺伝子による病気の診断および治療が進歩し、難病が克服されていくものと考えられているが、30億塩基対もの情報を有すると言われていたヒトのDNAを全て正確に解読するには、新しい高性能DNA解析装置の開発が必要である。そのためには、分離系および検出系の開発が必要である。既に、我々は、分離系の研究を進め、キャピラリー電気泳動がDNAの高速分離に応用できることを実証した⁴⁾⁷⁾。本研究においては、ヒトゲノムDNAの塩基配列決定のための検出系である、レーザー蛍光検出器の開発を行い、キャピラリー電気泳動によるDNAシーケンシングの条件検討を行なった。

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製Model 270Aおよび日本分光製CE-800を使用した。キャピラリーには、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、既に報告した方法で行った⁴⁾。レーザーは、空冷アルゴンレーザーを用いた。モデルDNAテンプレートとしてM13mp18を用い、アプライドバイオシステムズ製Taq Dye Primer or Terminator Cycle Sequencing Kitによりシーケンシング反応を行った。サンプルは電氣的に注入し、泳動は10 kV(200 V/cm)で行った。緩衝液は、トリス-ほう酸に尿素を適量加えたものを用いた。

結果と考察

DNAシーケンシングの際には、DNAを分離するだけでなく、DNAの高感度検出および遺伝情報解読のために、レーザー蛍光法の開発が必須である。しかも、DNAのA, G, C, Tの4種類の塩基は、それぞれ4種類の蛍光波長の異なる試薬によりラベルされているので、4色の蛍光を同時に検出できるものでなければならない。今回開発したDNAシーケンシングのためのレーザー蛍光検出装置をFig. 1に示す。この装置は、レーザー光をキャピラリーに照射し、キャピラリー中を泳動するDNAからの蛍光ビームを4箇所に取り出し、バンドパスフィルターおよび光電子増倍管を使い、4色の蛍光を同時に検出するものである。この装置を用いると、キャピラリー電気泳動により分離されたDNAの遺伝情報をレーザー蛍光検出器により解読することができる。

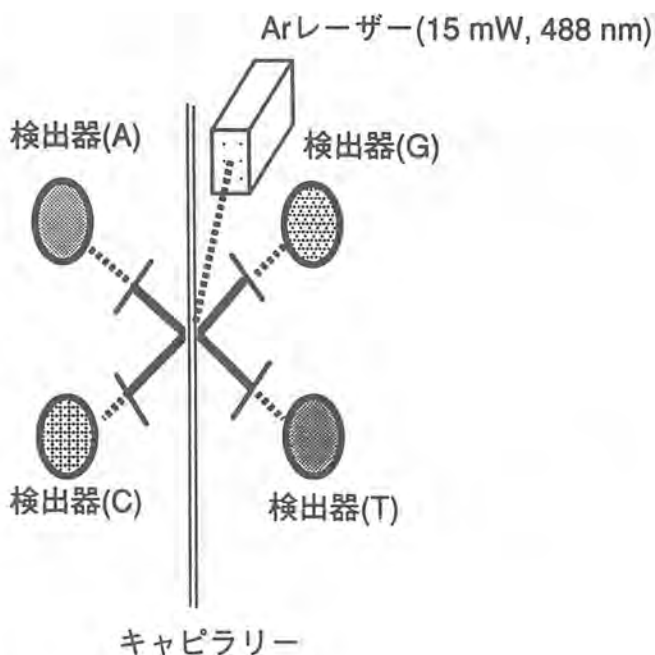


Fig. 1 LIF Detector for DNA Sequencing

この装置を用いてDNAシーケンシングを

行うと、300塩基までのDNAの塩基配列が30分以内に決定可能であった。これと同じシーケンシングを従来法で行うと、数時間程度必要であり、キャピラリー電気泳動により、数倍の高速化が達成できることが明かとなった。この時の理論段数は、1000~2000万段にも達している。さらに、分離条件を最適化するとシーケンシングの速度をさらに増すことができることが明かとなった。

文献

- 1) Y. Baba et al., *Trends Anal. Chem.*, **11**, 280 (1992).
- 2) 馬場嘉信、ぶんせき, **1993**(11), 861.
- 3) 馬場嘉信、蛋白質・核酸・酵素, **38**(13), 2243 (1993).
- 4) Y. Baba et al., *Anal. Chem.*, **64**(11), 1221 (1992).
- 5) Y. Baba et al., *J. Liq. Chromatogr.*, **16**(4), 955 (1993).
- 6) Y. Baba et al., *J. Chromatogr.*, in press (1993).
- 7) C. Sumita, Y. Baba et al., *J. Chromatogr.*, in press (1994).

(神戸女子薬大) ○馬場嘉信、津波古充朝 (九大遺伝情報) 林
健志 (鹿児島大工) 明石満 (日立中央研) 高橋智、神原秀記

Gene Diagnosis of Cancer Using Capillary Electrophoresis

Yoshinobu Baba¹, Mitsutomo Tsuchiko¹, Kenshi Hayashi², Mitsuru Akashi³, Satoshi Takahashi⁴, and Hideki Kambara⁴

Kobe Women's College of Pharmacy¹, Kyushu University², Kogoshima University³, and Hitachi Central Research Center⁴

Capillary gel electrophoresis (CGE) and capillary affinity gel electrophoresis (CAGE) are both becoming an important tool for gene diagnosis through high sensitive detection of point mutation on the oncogene. In this study, we examine efficiency and performance of CGE and CAGE in gene diagnosis for cancer. We will present the strategy for the design of gel columns for the sensitive detection of small differences in DNA sequence of wild-type oncogene and its mutant. CGE and CAGE were demonstrated to be effective for the sensitive DNA diagnostic analysis of oncogene with efficiencies as high as several 10^6 plates/m.

はじめに

細胞のがん化は、複数のがん遺伝子およびがん抑制遺伝子の異常が蓄積されることによって起こることが明かとなってきた。がん細胞の発生の後、良性ポリープへの成長、悪性ポリープへの転換、転移へと進行していく過程においてもがん遺伝子およびがん抑制遺伝子の変異が起こることが知られている。現在のがんの診断法には、組織診、細胞診、内視鏡診断、画像診断などがあるが、がん細胞がある程度の大きさに成長しなければ診断できないという欠点を有している。従って、がんを早期に発見するには、遺伝子診断が極めて有効であると考えられている。

遺伝子診断によってがんを早期に発見するには、遺伝子の変異を高い精度で検出することが必要である。本研究では、DNAの高分解能解析法であるキャピラリー電気泳動¹⁾⁻³⁾を用いて、がんの遺伝子診断を高速化・自動化することを目的としている。がん遺伝子には、正常な遺伝子と比べて、一塩基の置換による点突然変異を受けたものが多い。ここでは、キャピラリーゲル電気泳動(CGE)およびキャピラリーアフィニティーゲル電気泳動(CAGE)によるがん遺伝子の点突然変異の検出に関する基礎的実験を行った。

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製Model 270A、ウォータース社製Quanta 4000およびベックマン製P/ACE-2050を使用した。キャピラリーには、ポリアクリルアミドゲルあるいはポリビニルアデニンを物理的に固定化したポリアクリル

アミドゲルを充填して用いた。ゲルの充填は、既に報告した方法で行った⁴⁻⁶⁾。サンプルは、PCR (Techne PHC-3) により増幅したDNAを用いた。PCRの際に用いるプライマーは、ミリジェン製Cyclone Plus DNA合成装置で合成した。サンプルは電氣的に注入し、泳動は10 kV(200 V/cm)で行った。緩衝液は、トリス-ほう酸に尿素を適量加えたものを用いた。サンプルは電氣的に注入し、泳動は10 kV(200 V/cm)で行った。緩衝液は、トリス-ほう酸に尿素を適量加えたものを用いた。DNAは紫外吸収検出またはレーザー蛍光検出により行った。

結果と考察

Fig. 1に示す、SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism) は、正常遺伝子由来およびがん遺伝子由来のDNA断片を増幅し、熱変性させた1本鎖DNA断片の電気泳動挙動の違いにより、がん遺伝子の点突然変異を検出する方法である。CGEによるSSCP法を確立するために、1本鎖DNAの泳動挙動に対する点突然変異の影響について検討した。この結果をもとに、CGEをがんの遺伝子診断へ応用した。

次に、CAGEを、ヒトの代表的ながん遺伝子であるN-ras遺伝子の点突然変異の検出に応用した。N-ras遺伝子は、12, 13, 61番目のアミノ酸コドンが点突然変異を受けて活性化されることが知られている。そこで、それぞれのコドン付近のDNAの部分シーケンスを用いて、その正常型と変異型の検出を試みた。その結果、12および61番目のコドンの点突然変異については、迅速に高い精度で検出することが可能であった。以上の結果より、キャピラリー電気泳動は、がん遺伝子に存在する点突然変異の検出に適用可能であり、がんの遺伝子診断法として有効であることが明らかとなった。

文献

- 1) Y. Baba et al., *J. Chromatogr.*, **618**, 41 (1993).
- 2) 馬場嘉信、臨床化学, **22**, in press (1993).
- 3) 馬場嘉信、化学と工業, **47**, in press (1994).
- 4) Y. Baba et al., *Anal. Chem.*, **64**(17), 1920 (1992).
- 5) Y. Baba et al., *J. Chromatogr.*, **632**, 137 (1993).
- 6) Y. Baba et al., *J. Chromatogr.*, in press (1993).

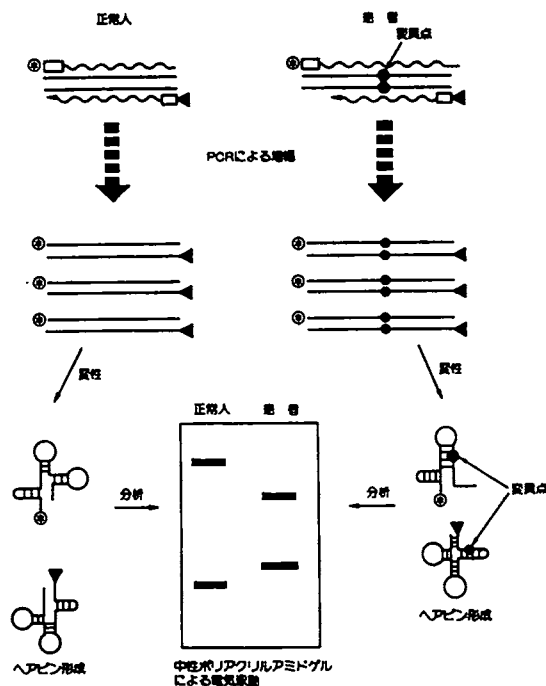


Fig. 1 Principle of SSCP Analysis

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム賛助企業

本シンポジウムの開催に当たり、下記企業から法人賛助費を賜りました。記して、ここに厚く御礼申し上げます。

- 5□ 大塚電子株式会社
- 3□ 日本分光株式会社
- 2□ スペルコジャパン株式会社
- 1□ 松定プレシジョン・デバイス株式会社
- 1□ 関東化学株式会社

(平成5年11月23日現在)

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム展示企業

本シンポジウムの開催に当たり、下記企業から機器・カタログ展示の協力を賜りました。記してここに厚く御礼申し上げます。

機器展示

- 2小間 富士フイルム株式会社（代理店 昭光通商株式会社）
- 1小間 大塚電子株式会社
- 1小間 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
- 1小間 日本分光株式会社
- 1小間 株式会社 パーキンエルマージャパン
- 1小間 ベックマン株式会社
- 1小間 松定プレシジョン・ディバイセズ株式会社
- 1小間 横河アナリティカルシステムズ株式会社

カタログ展示

- 1小間 財団法人 化学品検査協会

（平成5年11月23日現在）

平成5年度

(社) 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) | 寺部 茂 (姫路工大・理) |
| 雁野重威 (日立計測エンジニアリング) | 中川照眞 (京大・薬) |
| 木曾義之 (比治山女子短大) | ○中村 洋 (東大・薬) |
| 倉重友三 (日本ハイ・ラッドラボラトリーズ) | 花岡 讓 (横河アナリティカルシステムズ) |
| 児玉裕敬 (高知医大・化) | 広川 健 (広島大・工) |
| 小林英三郎 (城西大・理) | 福士恵一 (神戸商船大) |
| 酒井恒行 (日本ミホア・ウォーターズ・クロマト事業部) | 藤下 修 (九大附属病院) |
| 佐藤 隆 (ベックマン) | 本田 進 (近畿大・薬) |
| 千田正昭 (日本分光) | 真鍋 敬 (姫路工大・理) |
| 銭場利彦 (アプライド・ハイシステムズ・ジャパン) | 八木孝夫 (島津製作所) |
| 津田孝雄 (名工大) | 吉田治弘 (専修大・法) |
| 津田淑江 (共立女子短大) | |

(五十音順)

◎：代表幹事 ○：第13回シンポジウム世話人

第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集

平成5年12月8日発行

編集 東京都文京区本郷7-3-1
東京大学薬学部薬品分析化学教室内
第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム事務局
発行 (社) 日本分析化学会 電気泳動分析研究懇談会
印刷 広研印刷株式会社

バージョンUPしたCAPI(キャピイ)で ワンランク上の分離分析を!

- ▶ フォトダイオードアレイ検出器による高感度スペクトル解析
- ▶ 高精度キャピラリー温調機能で再現性の良いデータの提供
- ▶ 豊富な機能とデータシートで膨大な情報を提供

三次元・等高線表示、スペクトラムインデックス表示、
ピーク純度チェック・ライブラリーサーチ機能

新登場

TOPICS

従来の機能に加えてさらに性能向上

1. バイアル数の増加により、45検体までの連続自動測定
2. マルチタスク機能により、分析中に解析もOK
3. MS-Windows上で実行。市販ソフトで自由自在なレイアウトレポート作成も可能
4. サンプルの安定性を重視し、信頼性高いデータを提供
 - サンプルバイアルの温度調節機能により試料の安定性を保ち、蒸発も防ぐ
 - バッファバイアルの断面積/容積の増大
5. 豊富なアプリケーションキットを整備

キャピラリー電気泳動装置

CAPI-3100

大塚電子株式会社

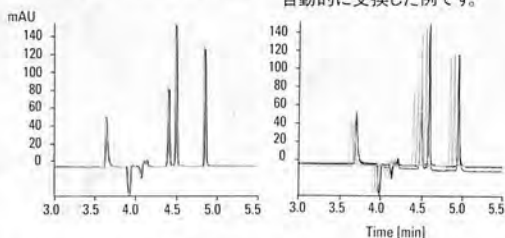
- 本社・研究所・西日本営業部 〒573 大阪府枚方市招提田近3丁目26-3 TEL.(0720)55-8550(代) FAX.(0720)55-8557
- 東日本営業部 〒192 東京都八王子市東町1-6 橋完LKビル2F TEL.(0426)44-4951(代) FAX.(0426)44-4961
- 筑波営業所 〒305 茨城県つくば市竹園1丁目6-1 つくば三井ビルディング14F TEL.(0298)56-5711(代) FAX.(0298)56-1934

離れられない出逢いになる。 HP^{3D}キャピラリー電気泳動システム 新発売



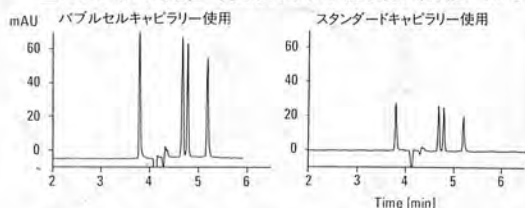
発売記念キャンペーン価格実施中！詳しくは最寄りの営業所にお問い合わせください。

■緩衝液の自動交換の効果 左のフェログラムは、分析5回毎に緩衝液を自動的に交換した例です。



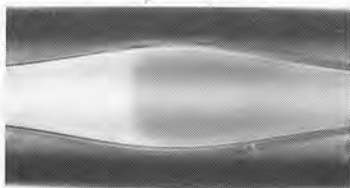
Capillary zone
electrophoresis
id = 50 μ m
l = 56cm
Inj. = 100mbars
V = 25kV
i = 13 μ A
Buffer = 89mM Tris-
borate, pH8.2

■パルスセルの効果 光路長が長くなり、感度が約3倍アップしています。



Capillary zone
electrophoresis
id = 50 μ m
l = 56cm
Inj. = 100mbars
V = 25kV
i = 13 μ A
Buffer = 89mM Tris-
borate, pH8.2

■パルスセル
キャピラリー



今の時代、二度、三度という場合もあるようですが、本来やっぱり一度のものです。なにしろ離れられない出逢いですからね。HPの新製品、^{3D}キャピラリー電気泳動システム。まさに、そんな出逢い、一目逢ったその日からというやつです。従来のキャピラリー電気泳動は、様々な利点を持ちながら、再現性のなさ等から幅広い利用というまでには至りませんでした。HPは、緩衝液の自動交換、注入圧力の自動補正により再現性の向上。高感度パルスセル付きダイオードアレイ検出器、ライブラリサーチによる強力な定性などHP独自の技術により、従来の問題を解決しました。そのうえキメステーションによる完全自動化と、ルーチン自動分析に必要な信頼性を備えた新製品、出逢ったあなたを虜にします。二度目を許さないほど。

横河アナリティカルシステムズ株式会社

本社 〒180 東京都武蔵野市中町1-16-10 ニッセイ武蔵野ビル 営業拠点/営業本部 武蔵野市中町1-16-10 ニッセイ武蔵野ビル Tel.0422-56-9393 9394
東京支店 新宿区西新宿1-25-1 Tel.03-3349-0707 関西支店 大阪市淀川区新高3-3-11 Tel.06-399-3711 筑波営業所 つくば市天久保1-16-10 Tel.0298-56-1467
中部営業所 名古屋市中村区名駅南1-27-2 Tel.052-581-6778 西日本営業所 福岡市博多区冷泉町5-35 Tel.092-262-7375 カスタマサポートセンター/東京都武蔵野市中町2-11-13 Tel.0422-52-5644
サービスステーション/東京サービスステーション 武蔵野市中町1-16-10 川崎サービスステーション 川崎市川崎区藤崎4-19-9 筑波サービスステーション つくば市天久保1-16-10
名古屋サービスステーション 名古屋市中村区名駅南1-27-2 大阪サービスステーション 大阪市淀川区新高3-3-11 徳山サービスステーション 徳山市代々木通り2-12 福岡サービスステーション 福岡市博多区冷泉町5-35