

# 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム

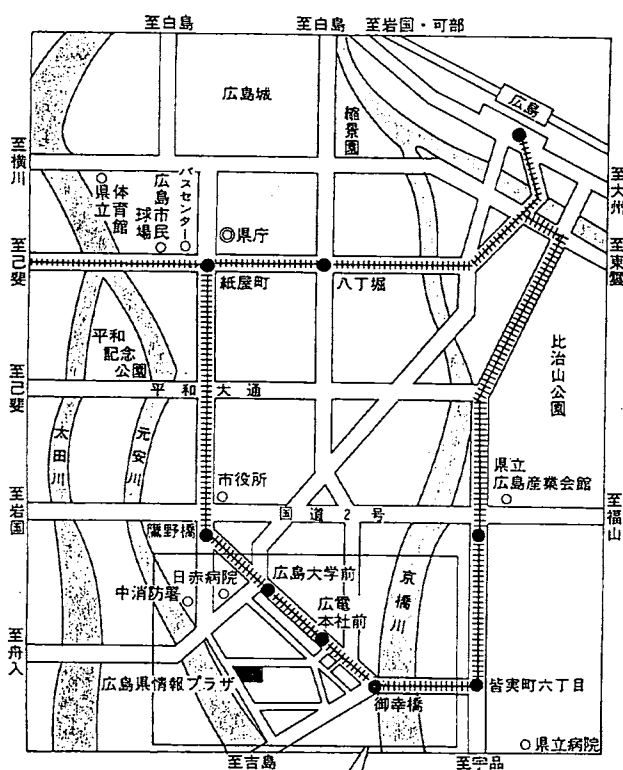
会期：12月6日（水）～12月8日（金）

会場：広島県情報プラザ（広島市中区千田町3丁目7-47）、地下一階多目的ホール

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・日本電気泳動学会・クロマトグラフィー科学会

交通：JR広島駅前より元宇品行きバス（21番）または宇品行き電車（1番）で  
広電本社前下車、西へ徒歩7分



## 交通機関

### ■路面電車

- ①番 広島駅——紙屋町経由——宇品
- ③番 己斐
- 途中 広電本社前下車 徒歩7分
- ⑤番 広島駅——比治山下経由——宇品
- 途中 皆実町六丁目下車 徒歩20分

### ■バス

- 広電バス（12番）
- 戸坂中学——八丁堀経由——仁保沖町
- 途中 御幸橋下車 徒歩9分
- 広島バス（21番）
- 向洋大原——広島駅経由——元宇品
- 途中 広電前下車 徒歩7分

### ■タクシー

広島駅から約20分



## 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム参加者の皆様へ

### シンポジウムへの参加：

シンポジウムへの参加は参加登録された方に限ります。当日会場受付で登録し、所定の名札をお付け下さい。

参加登録：会場受付にて参加登録申込書と共に下記の参加費を納め、講演要旨集および名札をお受け取り下さい。

登録費（含講演要旨集代）：一般6,000円、学生4,000円。

懇親会：12月7日（木）講演終了後、同プラザ内で開催します。参加費4,000円を、シンポジウム参加登録時にお支払い下さい。

発表者：全て口頭発表で行います。講演時間は一題あたり20分（質問時間を含む）です。時間を厳守して下さい。発表はスライド・OHPどちらでも結構ですが、OHPは発表者が操作していただきます。スライド・OHPのどちらを使用するかを受付に伝え、スライドの場合は開始40分前（2題前）までにスライド受付にお渡し下さい。スライドには通し番号、発表番号、講演者氏名を記入して下さい。講演終了後、忘れずスライドをお受け取り下さい。

次演者：講演時間の20分前（1題前）までに次演者席にご着席下さい。

展示会：関連機器・カタログ等の展示会を併設しています。会場は2階エレベーター前です。講演会場から直通のエレベーターはありませんので1階からご利用下さい。

### 座長一覧

	時間帯	講演番号	座長
第1日	9:20～10:40	1-4	寺部 茂
12月6日（水）	11:00～12:20	5-8	中川 照眞
	13:20～15:20	特1-特3	本田 進・中村 洋
	15:40～17:20	9-13	今坂 藤太郎
第2日	9:20～10:40	14-17	大塚 浩二
12月7日（木）	11:00～12:20	18-21	藤本 忠蔵
	13:20～15:00	22-26	真鍋 敬
	15:20～17:30	講1-講5	馬場 嘉信・廣川 健
第3日	9:20～10:40	27-30	小林 英三郎
12月8日	11:00～12:20	31-34	江坂 幸宏
	13:20～14:40	35-38	津田 孝雄
	15:00～16:20	39-42	高木 俊夫

## プログラム

### 第1日 12月6日(水)

9:15～9:20

開会の挨拶 木曾義之

9:20～10:40

座長 寺部 茂

1. 等速電気泳動法によるイットリウムおよび14種ランタニドイオンの一斉分離  
(広島大工) ○橋本義夫、西山文隆、廣川 健
2. 双方向等速電気泳動法による金属イオンの分離挙動  
(広島大工) ○西本和弘、橋本義夫、育田夏樹、西山文隆、竹味弘勝、廣川 健
3. キャピラリー電気泳動のピークの分離と面積計算における精度向上の試み  
(大塚電子) ○山田浩美、森田浩之、北岸恵子、新田哲士
4. キャピラリー電気泳動における電気浸透流速の補正  
(近大薬) ○本田 進、富樫一天、多賀 淳

10:40～11:00 (休憩)

11:00～12:20

座長 中川照眞

5. ミセル動電クロマトグラフィーにおけるミセル部分充填法の改善  
(カネカテクノロジー<sup>1)</sup>、姫路工大理<sup>2)</sup>) ○尾崎祐人<sup>1)</sup>、寺部 茂<sup>2)</sup>
6. ミセル動電クロマトグラフィーにおける試料注入由来のピーク形状劣化防止の検討  
(国立精神神経センター神経研究所) ○今澤正興、畑中由利子
7. 界面活性剤のアルキル鎖長がミセル動電クロマトグラフィーの分離挙動に及ぼす効果  
(大阪工業技術研究所<sup>1)</sup>、姫路工大理<sup>2)</sup>) ○竹田さほり<sup>1)</sup>、脇田慎一<sup>1)</sup>、山根昌隆<sup>1)</sup>、東 国茂<sup>1)</sup>、寺部 茂<sup>2)</sup>
8. 混合ミセルを用いたMEKCへの新しい分離様式の導入  
(岐阜薬大<sup>1)</sup>、京大農<sup>2)</sup>) ○小林幹男<sup>1)</sup>、江坂幸宏<sup>1)</sup>、池田篤治<sup>2)</sup>、加納健司<sup>2)</sup>

12:20～13:20 (休憩)

13:20～15:20

ワークショップ「キャピラリー電気泳動法の現状と将来」

座長 本田 進・中村 洋

特別講演1. キャピラリー電気泳動の現状と展望

(姫路工大理) 寺部 茂

特別講演 2. キャピラリー電気泳動分析における検出感度の現状と将来

(九州大工) 今坂 藤太郎

特別講演 3. キャピラリー電気泳動を用いる結合分析法の現状と展望

(愛媛大理) 真鍋 敬

15:20~15:40 (休憩)

15:40~17:20

座長 今坂 藤太郎

9. キャピラリー電気泳動による食用色素の分析における $\beta$ -シクロデキストリンのホスト-ゲスト抱合作用の影響について

(広島大医) ○Saeid Razee、田村 敦史、升島 努

10. シクロデキストリン誘導体を用いるキャピラリー電気泳動による酸性化合物の光学異性体の分離

(日本ベーリンガーインゲルハイム<sup>1)</sup>、姫路工大理<sup>2)</sup>) ○田中喜秀<sup>1)</sup>、寺部 茂<sup>2)</sup>

11. キャピラリー電気泳動によるアミノ酸誘導体の光学異性体の分離

(姫路工大理) ○山口拓哉、松原則男、大塚浩二、寺部 茂

12. キャピラリーゾーン電気泳動法の野菜分析への応用

(神戸商船大船貨輸送研究施設<sup>1)</sup>、大阪工業技術研究所<sup>2)</sup>、神戸女短大<sup>3)</sup>) ○福土恵一<sup>1)</sup>、竹田さほり<sup>2)</sup>、脇田慎一<sup>2)</sup>、東 国茂<sup>2)</sup>、日色和夫<sup>3)</sup>

13. キャピラリー電気泳動法の食品分析への応用

(共立女短大) ○津田淑江、蓮見知子

## 第2日 12月7日(木)

9:20~10:40

座長 大塚浩二

14. キャピラリーゾーン電気泳動法による希土類鉱石の分離・分析

(広島大工) ○真鍋雄生、廣川 健

15. アリザリンコンプレクソンをキレート剤とした金属イオンのキャピラリー電気泳動

(岡山理大理) ○横山 崇、善木道雄

16. キャピラリー電気泳動法によるアルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウムイオンの分離

(広島大工) ○伊藤一明、廣川 健

17. 錯形成反応を伴う混合希土類金属イオンの電気泳動に関する数値シミュレーション

(阪大基礎工) ○平田雄志、向井 寛、山端景子

10:40~11:00 (休憩)

11:00～12:20

座長 藤本忠蔵

18. スタッキング効果を利用する無機陰イオンの直接吸光-キャピラリー電気泳動分析  
(岡大理)○高柳俊夫、和田栄子、広井康子、本水昌二

19. 中止

20. キャピラリー電気泳動による次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンとの化学平衡について  
(大塚電子)○佐藤康博、笹 一志、北岸恵子

21. 非水系溶液を用いるキャピラリー電気泳動  
(姫路工大理)○大塚浩二、寺部 茂

12:20～13:20 (休憩)

13:20～15:00

座長 真鍋 敬

22. アミノ酸のレーザー励起蛍光検出キャピラリー電気泳動の最適化  
(東理大薬)○徳永武志、中村 洋

23. キャピラリー電気泳動-多色レーザー蛍光検出による成人病の遺伝子診断  
(神戸薬大<sup>1)</sup>、阪大医<sup>2)</sup>)○角田ちぬよ<sup>1)</sup>、馬場嘉信<sup>1)</sup>、津波古充朝<sup>1)</sup>、三木哲郎<sup>2)</sup>、  
萩原俊男<sup>2)</sup>

24. キャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出によるヒト、酵母、線虫DNAのシーケンシング  
(神戸薬大<sup>1)</sup>、かずさDNA研究所<sup>2)</sup>、理研<sup>3)</sup>、国立遺伝学研究所<sup>4)</sup>)○井上秀子<sup>1)</sup>、馬場  
嘉信<sup>1)</sup>、津波古充朝<sup>1)</sup>、野村信夫<sup>2)</sup>、高浪 満<sup>2)</sup>、村上康文<sup>3)</sup>、小原勇治<sup>4)</sup>

25. キャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出による心臓病原因遺伝子のVNTR解析  
(神戸薬大<sup>1)</sup>、阪大医<sup>2)</sup>)○西村明子<sup>1)</sup>、馬場嘉信<sup>1)</sup>、津波古充朝<sup>1)</sup>、三木哲郎<sup>2)</sup>、  
萩原俊男<sup>2)</sup>

26. オンカラムキャピラリーアレイゲル電気泳動によるDNA解析  
(日立製作所中央研究所)○穴沢 隆、高橋 智、神原秀記

15:00～15:20 (休憩)

15:20～17:30

ワークショップ 「キャピラリー電気泳動装置と各種アプリケーションの現状」

座長 馬場嘉信・廣川 健

講演1. キャピラリー型ABI PRISM310のGenetic Analyzerによる  
DNAシーケンシング及びDNAフラグメント解析

(パナソニック・バイオシステムズ事業部) 繁田喜紀

講演2. キャピラリー電気泳動における高感度検出の紹介  
(大塚電子・西日本営業部・分析チーム) 小野真澄

講演 3. HP<sup>3D</sup>キャピラリー電気泳動システムの特徴と最新のアプリケーション

(横河アナリティカルシステムズ・フィールドマーケティングセンター) 箕浦加穂

講演 4. キャピラリー電気泳動システムP/ACE 5000シリーズにおけるレーザ誘導蛍光検出

(ベックマン・科学機器事業部) 新井 悦郎

講演 5. CIA<sup>TM</sup>による無機イオン分析への応用

(日本ウォーターズリミテッド) 佐々木秀輝

### 第3日 12月8日

9:20~10:40

座長 小林英三郎

27. キャピラリー電気泳動によるアルキルアミン類の分析

(横河アナリティカルシステムズ) ○熊谷浩樹、曾我朋義

28. コロミン酸のHPCE

(近大薬) ○掛樋一晃、広瀬敦子、玉井利明、本田 進

29. キャピラリー電気泳動によるアビジン及びビオチンの泳動挙動

(北大院地球環境) ○児玉 心、田中俊逸、中村 博

30. SDS存在下でのポリエチレンオキシド: 見落とされている動的荷電マトリックスとしての側面

(近大薬<sup>1)</sup>、阪大蛋白研<sup>2)</sup>) 久保兼信<sup>1)</sup>、岡部亘雄<sup>1)</sup>、○高木俊夫<sup>2)</sup>

10:40~11:00 (休憩)

11:00~12:20

座長 江坂幸宏

31. 蛋白質ポリペプチド-ドデシルサルフェート複合体の電気泳動挙動に及ぼす対イオンの効果

(近大薬<sup>1)</sup>、阪大蛋白研<sup>2)</sup>) ○久保兼信<sup>1)</sup>、高木俊夫<sup>2)</sup>、岡部亘雄<sup>1)</sup>

32. 薬物のタンパク結合研究におけるキャピラリー電気泳動の利用

(京大薬) ○渋谷明正、塩野浩光、大西貴徳、中川照眞

33. キャピラリー等電点電気泳動法に用いる新しいpIマーカー

(城西大理<sup>1)</sup>、ベックマン<sup>2)</sup>) ○小林英三郎<sup>1)</sup>、青木幹容<sup>1)</sup>、荒井悦郎<sup>2)</sup>

34. キャピラリー等電点電気泳動におけるタンパク質移動過程の検討

(愛媛大理) ○宮本洋光、岩崎愛子、真鍋 敬

12:20~13:20 休憩

13:20~14:40

座長 津田孝雄

35. 通電キャピラリー液体クロマトグラフィー：非粒子系ゲル固定相の検討

(浜松医大) ○藤本忠蔵

36. エンドウマメレクチンのキャピラリーアフィノフォレシス：キャピラリー電気泳動による2価-多価相互作用の解析

(帝京大薬) ○志村清仁、笠井献一

37. レクチン存在下でのオリゴ糖のアフィニティーキャピラリー電気泳動分離ならびに結合定数の一斉測定

(近大薬) ○多賀 淳、薮曾幸子、北野敦子、本田 進

38. 線状ポリアクリルアミドを用いたキャピラリー電気泳動によるSDS結合タンパク質のサイズ分離

(愛媛大理) ○宇津見 卓二、大田英人、真鍋 敬

14:40~15:00 休憩

15:00~16:20

座長 高木俊夫

39. キャピラリー電気泳動によるp53癌抑制遺伝子のPCR-FSSCP解析

(大塚製薬診断事業部<sup>1)</sup>、大塚電子<sup>2)</sup>、京都桂病院呼吸器センター<sup>3)</sup>) ○葛城肅典<sup>1)</sup>、木下盛敏<sup>1)</sup>、北岸恵子<sup>2)</sup>、千葉 渉<sup>3)</sup>、池田貞雄<sup>3)</sup>

40. 種々のキャピラリー電気泳動分析系(通常型キャピラリーゾーン電気泳動、SDS高分子溶液キャピラリー電気泳動及びキャピラリー等電点電気泳動)による髄液中 $\beta$ -trace proteinその他の低分子蛋白質の分析

(杏林大保健<sup>1)</sup>、杏林大医<sup>2)</sup>、国立千葉病院神経科<sup>3)</sup>、ベックマン<sup>4)</sup>) ○平岡 厚<sup>1)</sup>、荒戸照世<sup>2)</sup>、富永 格<sup>3)</sup>、安生綾子<sup>4)</sup>

41. CZEによる細菌細胞の分析

(岐阜薬大<sup>1)</sup>、京大農<sup>2)</sup>) ○江坂幸宏<sup>1)</sup>、小林幹男<sup>1)</sup>、池田篤治<sup>2)</sup>、加納健司<sup>2)</sup>

42. シングルセルへのマイクロ分析手法の適用(Ⅱ)

(名工大<sup>1)</sup>、江南女短大<sup>2)</sup>、理研名古屋<sup>3)</sup>) ○津田孝雄<sup>1)</sup>、北川慎也<sup>1)</sup>、高橋 勤<sup>2)</sup>、高橋 修<sup>3)</sup>、木内一壽<sup>3)</sup>

閉会の挨拶 廣川 健

次回開催の案内(名工大) 津田孝雄

# 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム

## 一般講演



# 等速電気泳動法による 14 種ランタニドおよびイットリウムイオンの一斉分離

(広島大学工学部) ○橋本義夫、西山文隆、廣川 健

## SIMULTANEOUS SEPARATION OF FOURTEEN LANTHANIDE AND YTTRIUM IONS BY ISOTACHOPHORESIS

Yoshio Hashimoto, Fumitaka Nishiyama and Takeshi Hirokawa  
Applied Physics Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University.

An electrolyte system was developed for the simultaneous separation of fifteen rare earth ions (fourteen lanthanide and yttrium ions) by isotachopheresis. The leading electrolyte system contained  $\alpha$ -hydroxyisobutyric acid and malonic acid as the complex-forming agent. Optimization of the electrolyte system was studied and the separation behavior of fifteen rare earth ions with the complex-forming agents was briefly discussed.

### 【緒言】

希土類イオンは絶対移動度が類似しているため、例えば $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸(H I B)を錯形成剤として用い、安定度定数の相違により実効移動度に差を生じさせ分離を行う。しかし、全希土類(14 種のランタニド、イットリウムおよびスカンジウム)の分離となると、 $Y^{3+}$ と  $Dy^{3+}$ の分離が困難であり、現在まで電気泳動で全希土類イオンが一斉に分離可能な電解液系は知られていない。

我々はH I B系電解液に補助錯形成剤として酒石酸を添加することにより  $Y^{3+}$ と  $Dy^{3+}$ は分離可能になるが、 $Eu^{3+}$ と  $Gd^{3+}$ が分離されなくなることを報告した。そこで今回は、15 種希土類イオン(14 種のランタニドおよびイットリウムイオン)が一斉分離するような電解液系を開発するために補助錯形成剤について検討し、その結果H I B系電解液にマロン酸を添加することにより一斉分離が達成されたので報告する。

### 【実験】

使用したC E法は等速電気泳動法である。検出器は高周波非接触電導度検出器 (HFCCD) <sup>2)</sup>で、LABECO の ZKI-001 型等速電気泳動装置の分離ユニットと組み合わせて使用した。泳動電流は 40  $\mu$  A である。ターミナルゾーン検出までの電気量はブランク泳動で約 0.11C であった。高電圧電源としては島津 I P-2 A のものを使用した。測定は 25℃に温度制御された部屋で行った。分析に使用した電解液系は Table 1 に示した。15 種希土類イオンの等モル(0.33mM)混合試料は塩化物から調製した。

### 【結果と考察】

15 種希土類イオンを一斉分離するには、H I Bのみを錯形成剤として使用する限り不可能である。そこで我々はH I Bや酒石酸の構造との類似性を考慮し、リンゴ酸、タートロン酸、エチレングリコール、グリコール酸、マロン酸を補助錯形成剤として使用し、15 種希土類イオンの分離挙動、特に  $Eu^{3+}$ と  $Gd^{3+}$ の実効移動度の差および  $Y^{3+}$ と  $Dy^{3+}$ の実効移動度の差について検討した。

Fig. 1 はリーディング電解液中の補助錯形成剤の濃度と  $Eu^{3+}$ と  $Gd^{3+}$ および  $Y^{3+}$ と  $Dy^{3+}$ の実効移動度の差の関係を表す。Fig. 1 (d)を見るとマロン酸は濃度を高めると  $Y^{3+}$ と  $Dy^{3+}$ の実効移動度の差が増加していることがわかる。これに対して  $Eu^{3+}$ と  $Gd^{3+}$ の実効移動度の差は徐々に減少しているが、どの条件下でも分離は十分に達成されていた。Fig. 2 にマロン酸の濃度を最適化した時の 15 種希土類イオンの分離挙動を示した。このように分離されたことは Y-マロン酸錯体と Dy-マロン酸錯体の移動度が同じ

で Y-マロン酸錯体の安定度定数が Dy-マロン酸錯体のそれより小さいか、Y-マロン酸錯体と Dy-マロン酸錯体の安定度定数が同じで Y-マロン酸錯体の移動度が Dy-マロン酸錯体のそれより大きいかの二つの場合が考えられる。実際にマロン酸と希土類イオンの移動度や安定度定数を求める実験をした結果、後者であることがわかった。講演では 15 種希土類イオンの分離挙動およびマロン酸と希土類イオンとの移動度や安定度定数の詳細について報告する。

Table 1 Operational electrolyte system

Leading electrolyte	20mM ammonia solution.
Complexing agent	7.5mM $\alpha$ -hydroxyisobutyric acid
Additional complexing agent	(1)Tartaric acid (0.1mM~0.8mM)
	(2)Maric acid (0.1mM~0.8mM)
	(3)Tartronic acid (0.5mM~0.8mM)
	(4)Ethylen glycol (0.5mM~1.5mM)
	(5)Glycolic acid (0.5mM~1.5mM)
	(6)Malonic acid (0.1mM~2.5mM)
pH buffer	2-Ethyl-n-butyric acid
pH	4.80
Additive	0.1% Hydroxypropylcellulose
Terminating electrolyte	20mM Carnitine hydrochloride
Additive	0.1% Hydroxypropylcellulose

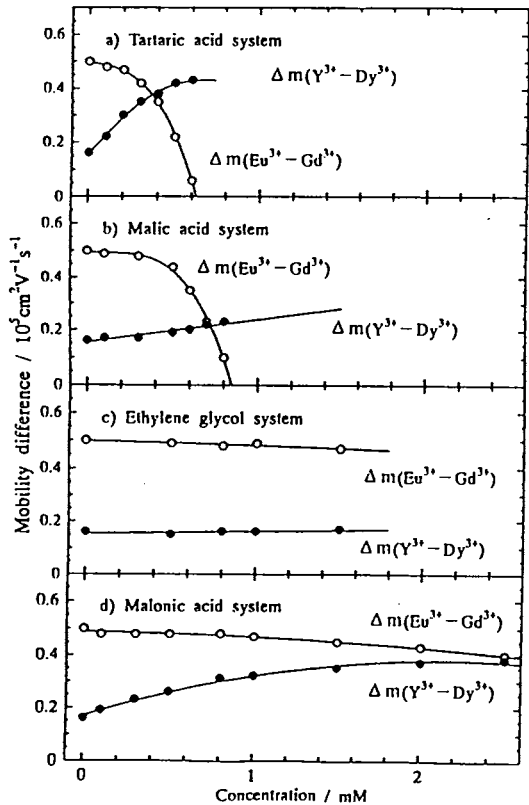


Fig.1 Mobility differences ( $\Delta m$ ) with the concentration of additional complexing agents

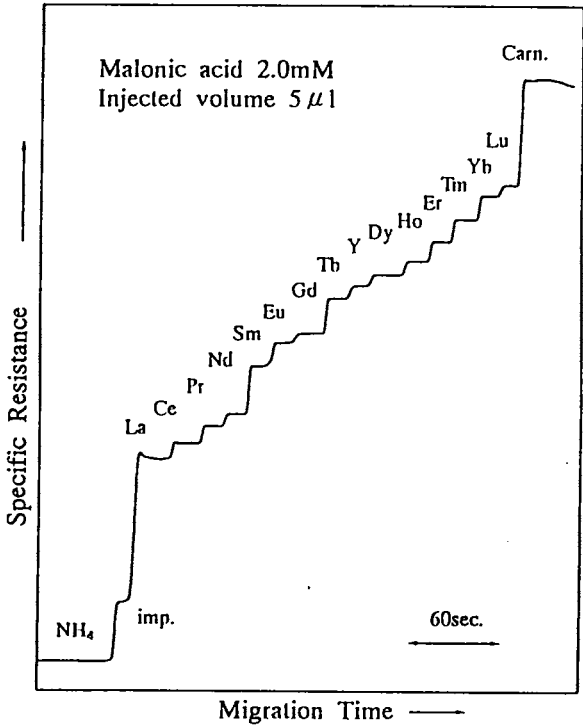


Fig.2 Isotachopheretic separation of fifteen rare earth ions

1) T.Hirokawa, W.Xia and Y.Kiso, J.Chromatogr.A, 689, 149 (1995)  
2) B.Gas, M.Demjanenko and J.Vacik, J.Chromatogr., 192, 253 (1980)

## 双方向等速電気泳動法による 金属イオンの分離挙動

(広島大工) ○西本和弘、橋本義夫、育田夏樹、西山文隆、竹味弘勝、廣川 健

### SEPARATION BEHAVIOR OF METAL IONS BY BIDIRECTIONAL ISOTACHOPHORESIS (BITP)

Kazuhiro Nishimoto, Yoshio Hashimoto, Natsuki Ikuta, Fumitaka Nishiyama,  
Hirokatsu Takemi and Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima Univ.

An operational electrolyte system for the BITP separation of iron and rare earth ions was developed by using 1,10-phenanthroline(phen) and ethylenediamine-tetraacetic acid(EDTA) as chelating agents. The developed electrolyte system was applied for the analysis of minor rare earth components in a rare earth ore containing iron as the matrix by using ITP-PIXE. The found abundance of the total rare earth was 2.8% and that of iron was 19%. Minimum detectable amount was 13ng for Eu in a 100ug ore.

【はじめに】 従来の等速電気泳動法(ITP)は、カチオンまたはアニオンのどちらか一方が分析の対象であったが、我々は電解液の適切な選択によりカチオン・アニオンの同時分析が可能であることを見出した[1](双方向等速電気泳動法)。希土類イオンは通常カチオンとして分析されるが、希土類鉱石中に含まれる微量の希土類成分(REE)を分析する場合、マトリックスである鉄の妨害を受け、正確な定量が困難であった。そこでBITPの高い分離選択性に着目し、鉄マトリックスから微量REEを電気泳動的に抽出する分離システムを開発した。そのため、phenによる鉄のITP分析を検討し[2]、更にその系に金属イオンのアニオン化試薬として有効なEDTA[3]を競合させた複合分離系を考案した。本講演では希土類アニオンキレート剤の分離挙動および開発した分離システムによる含鉄希土類鉱石(REE含有率公称3%)の分析結果について報告する。

【実験】 定性指標 $R_E$ の測定に用いた試料は塩化物から調製した。 $Fe(II)$ ,  $Fe(III)$ は硫酸、硝酸をそれぞれ添加して $pH=2.0$ とした。実試料の希土類鉱石はアルカリ熔融法によって調製した(2000ppm)。これにphen, EDTA,  $NH_2OH$ (還元剤)を添加してITP分取試料とした。なお試薬は全て片山化学特級品を使用した。実験装置は $R_E$ の測定に高周波電導度検出器(HFCD)を備えた泳動装置(LABECO:ZKI-001)を使用し、泳動電流は $40\mu A$ とした。ブランク泳動での電気量は $0.12C$ であった。またフラクションの分取には自作の双方向等速電気泳動分取装置を使用した。検出器は電位勾配検出器(PGD)でカチオン・アニオン成分に対応して2つ備えている。泳動電流は $300\mu A$ とし、分取は $200\mu A$ 以下で行った。分取終了までの全電気量は $6.0C$ であった。なおいずれの装置も電源としてIP-2A(島津)のものを転用した。使用した電解液系はTable. 1に示す。

Table.1 Electrolyte system for BITP

<b>Catholyte:</b> 20mM ammonia solution 0.1mM EDTA pH=4.8(buffer:acetic acid) 0.1w/w% HPC*	<b>Anolyte:</b> 20mM hydrochloric acid pH=3.6( $\beta$ -alanine) 0.1w/w% HPC
---	--

HPC\*:Hydroxypropylcellulose

【結果と考察】 実測 $R_f$ 値から算出した鉄(3価)および希土類キレートの絶対移動度をFig.1に示す。各キレートの移動度は非常に近く、希土類16種は一斉分離できないことが分かる。

しかし、この中で6種(La, Nd, Ho, Er, Tm, Sc)をIP-PIXE法で分析すると、回収率は100%であり、更に[La, Nd][Ho, Er, Tm][Sc]として群分離が達成されていた。

複合分離系による希土類鉱石の分析では、多量の鉄はphenによってカチオンとして、微量の希土類はEDTAによってアニオンとして泳動する。そこでアニオン側のフラクションを分取しPIXE法で分析した。その結果、主成分である軽希土類については良好に定量できたが、極微量の中・重希土類はキレート剤の競合よりアニオン側に僅かに泳動する鉄(3価)と混合するため、正確に定量することができなかった。

この点を改善する為、鉄と希土類キレートの間に有機物スペーサーの挿入を検討した。シミュレーションによってイタコン酸を選定し、更に陽極電解液のpHを3.75にすることによって鉄と希土類キレートの分離(Fig.2参照)に成功し、全希土類成分を高精度に分析することができた。解析の結果、鉱石中の希土類含有率は2.8%、鉄は19%と求められた。なおEuの13ngが定量限界で、これは全希土類成分の0.46%であった。Fig.3は鉱石中の希土類元素の存在率を示したもので、この図からモナザイト型鉱石であることが分かった。

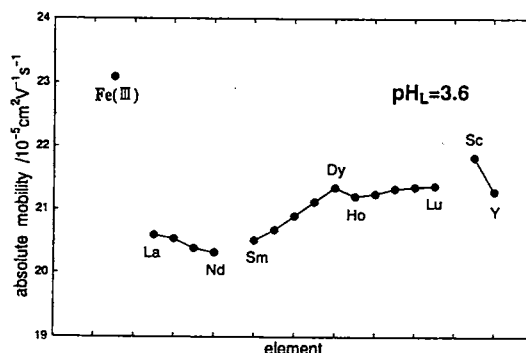


Fig.1 Mobility of metal chelates

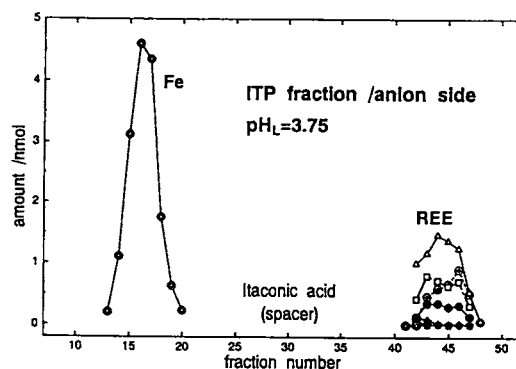


Fig.2 Result of ITP-PIXE

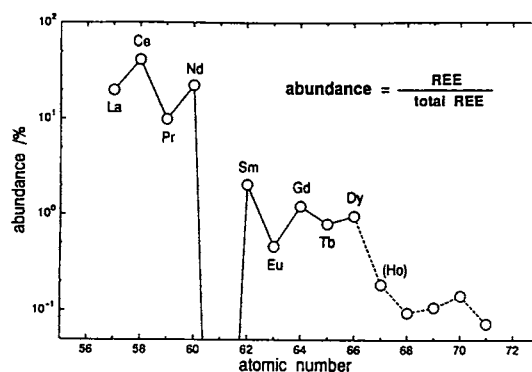


Fig.3 REE abundance by BITP-PIXE

- [1] T. Hirokawa, K. Watanabe, Y. Yokota and Y. Kiso, J. Chromatogr., **633**, 251(1993)
- [2] T. Hirokawa, K. Nishimoto, F. Nishiyama, J. Chromatogr. (1995)印刷中
- [3] T. Hirokawa, K. Nishimoto, T. Ohta et al., J. Chromatogr., **171**, 709(1995)

(近畿大・薬) ○本田 進、富樫一天、多賀 淳

## CORRECTION FOR ELECTROOSMOTIC FLOW IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Susumu Honda, Kazutaka Togashi, Atsushi Taga*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*

**Summary:** Electroosmotic flow generated in capillary electrophoresis is liable to be fluctuated depending on the conditions of capillary inner wall. This paper discusses the fundamental problem of this variation and proposes a simple mathematical treatment for its correction. Correction of the migration time by the equation,  $t = t' (1 + t' \cdot \chi)^{-1}$ , where  $\chi = t_0^{-1} - t_0'^{-1}$  and  $t_0'$  and  $t'$  are the migration times of a neutral marker and an analyte to be corrected, respectively, allows for more reproducible migration time and related indices such as resolution. The term  $t_0$  is either the shortest or the longest migration time of the neutral marker in a series of measurements, depending on conditions. This paper demonstrates the improvement of reproducibility of such indices by presenting a number of examples.

## 1 緒言

最近のキャピラリー電気泳動の発展には目を瞠るものがあるが、この分析法は移動時間の不安定さという問題を抱えており、その発展の初期には、このことが、移動指標の再現性が比較的高いクロマトグラフィーに慣れ親しんできた多くの人々に、この分析法に対する不信感を植えつける原因となっていた。ゾーン電気泳動の場合試料成分の移動速度は電気浸透流速と試料成分の電気泳動速度の代数和であるが、これらのうち移動時間の不安定さをもたらすのは主として電気浸透流速の方である。動電クロマトグラフィーにおいては、これらのほかにメディアーターへの取り込み速度も移動時間に影響を与えると考えられるが、やはりその不安定さの主因は電気浸透流速にあることには変わりはない。

このような欠点をカバーするには、電気浸透流速の再現性を直接高める努力が重要であることはいうまでもない。自動化され温度制御機能をもつ最近の装置ではこの問題はかなり解消され、キャピラリー内壁との相互作用の少ない試料では、高速液体クロマトグラフィーと同等かそれを凌ぐ高い再現性すら得られている場合もある。しかし、タンパク質などキャピラリーの内壁に吸着されやすい物質を含む試料の分析においては、依然としてこの問題は解決されていない。化学的手段によりキャピラリー内壁を改質する努力はこれを解決する1つの方向であるが、そのようにしてコーティングしたキャピラリーもせいぜい数十回の分析に堪えられる程度である。したがって血清をはじめ体液の成分の分析を目的にする臨床分析などにおいてはこの再現性の低さは致命的な欠点といってよい。

このような直接的な解決法とは別に、電気浸透流速の不安定さに対処する方法として、得

Table.1 Electrolyte system for BITP

<b>Catholyte:</b> 20mM ammonia solution 0.1mM EDTA pH=4.8(buffer:acetic acid) 0.1w/w% HPC*	<b>Anolyte:</b> 20mM hydrochloric acid pH=3.6( $\beta$ -alanine) 0.1w/w% HPC
---	--

HPC\*:Hydroxypropylcellulose

【結果と考察】 実測 $R_f$ 値から算出した鉄(3価)および希土類キレートの絶対移動度をFig.1に示す。各キレートの移動度は非常に近く、希土類16種は一斉分離できないことが分かる。

しかし、この中で6種(La, Nd, Ho, Er, Tm, Sc)をIP-PIXE法で分析すると、回収率は100%であり、更に[La, Nd][Ho, Er, Tm][Sc]として群分離が達成されていた。

複合分離系による希土類鉱石の分析では、多量の鉄はphenによってカチオンとして、微量の希土類はEDTAによってアニオンとして泳動する。そこでアニオン側のフラクションを分取しPIXE法で分析した。その結果、主成分である軽希土類については良好に定量できたが、極微量の中・重希土類はキレート剤の競合よりアニオン側に僅かに泳動する鉄(3価)と混合するため、正確に定量することができなかった。

この点を改善する為、鉄と希土類キレートの間に有機物スペーサーの挿入を検討した。

シミュレーションによってイタコン酸を選定し、更に陽極電解液のpHを3.75にすることによって鉄と希土類キレートの分離(Fig.2参照)に成功し、全希土類成分を高精度に分析することができた。解析の結果、鉱石中の希土類含有率は2.8%、鉄は19%と求められた。なおEuの13ngが定量限界で、これは全希土類成分の0.46%であった。

Fig.3は鉱石中の希土類元素の存在率を示したもので、この図からモナザイト型鉱石であることが分かった。

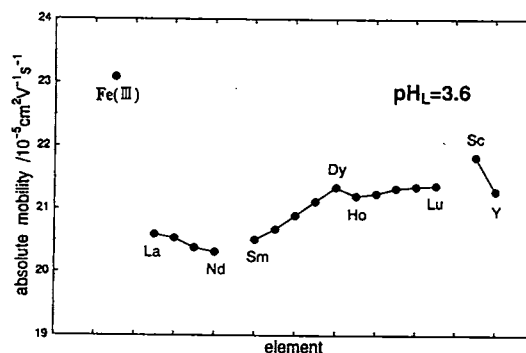


Fig.1 Mobility of metal chelates

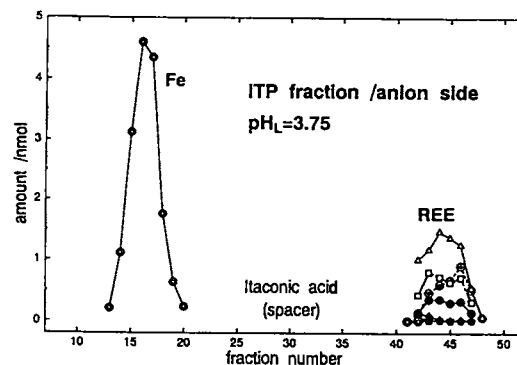


Fig.2 Result of ITP-PIXE

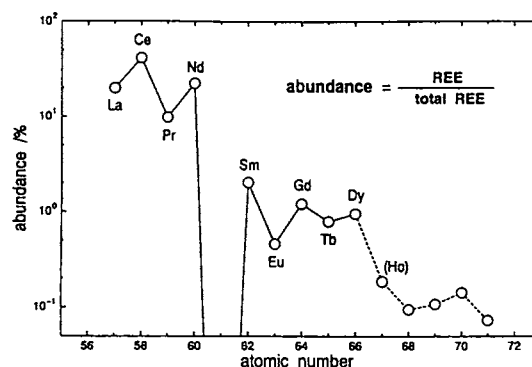


Fig.3 REE abundance by BITP-PIXE

- [1] T.Hirokawa, K.Watanabe, Y.Yokota and Y.Kiso, J.Chromatogr., **633**, 251(1993)
- [2] T.Hirokawa, K.Nishimoto, F.Nishiyama, J.Chromatogr. (1995)印刷中
- [3] T.Hirokawa, K.Nishimoto, T.Ohta et al., J.Chromatogr., **171**, 709(1995)

## キャピラリー電気泳動のピークの分離と 面積計算における精度向上の試み

(大塚電子株式会社)

○山田浩美、森田浩之

北岸恵子、新田哲士

### ATTEMPTS FOR IMPROVEMENT OF SEPARATION EFFICIENCY AND ACCURACY IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

HIROMI YAMADA, HIROYUKI MORITA, KEIKO KITAGISHI, SATOSHI NITTA

(OTSUKA ELECTRONICS CO., LTD)

#### ABSTRACT

We successfully achieved the separation of double-stranded DNA fragments of approximately 200bps with linear polymer solution filled in a bare capillary. Several factors such as polymer concentration, data sampling interval, spatial detection width, migration time and data processing were optimized, in order to improve the separation efficiency.

#### 1. はじめに

前々回の学会では、リニアポリマー溶液による核酸およびたんぱく質分離実験結果を報告した。このときには、ポリアクリルアミドでキャピラリー内壁をコーティングし、電気浸透流を抑止することにより、良好な分析結果が得られた。しかし、コーティングキャピラリーの作成には、時間を要し、また保存方法にも留意しなければならない。近年、コーティングをしていないキャピラリーで、希薄リニアポリマー溶液による二本鎖DNAの良好な分離が報告されている。[1,2]

本実験では、Barronらの方法を参考にして、ノンコーティングのキャピラリーにより簡便な核酸分離方法を200塩基対前後の二本鎖DNAの分離能を上げることに注目して検討した。

#### 2. 実験

大塚電子株式会社製キャピラリー電気泳動装置CAPI-3100を使用した。  
使用したキャピラリーは、ジエールサイエンス株式会社製のシリカキャピラリーチューブ、内径50 $\mu$ m、有効長378mmである。  
分離に使用したDNAマーカーは、pBR322DNAを制限酵素Msp Iで完全分解したもの

3 bps( $0.059 \times 105$ )~622bps( $4.04 \times 105$ )(株式会社ニッポンジーン製)であり、減圧法にてキャピラリー内に導入した。

泳動溶媒は、ヒドロキシプロピルセルロース(SCIENTIFIC POLYMER PRODUCTS, INC.)の平均分子量10万および100万の2種類を0.1M トリスーほう酸緩衝溶液(2mM EDTA, pH8.5)に溶解して用いた。

### 3. 結果・考察

種々のポリマー混合溶液について検討した結果、下図のフェログラムのような良好な分離が得られ、ノンコーティングのキャピラリーにおいてDNAの分離が可能であることがわかった。ここで242bpsおよび238bpsのピーク間距離に注目し、この間の分離度を向上させるために、さらに検出ウィンドウ幅、データインターバルおよび印加電圧などの実験条件を検討した。また、疑似ピークモデルを用いて、インターバル、泳動速度、および検出ウィンドウ幅の関係をコンピュータシミュレーションした。

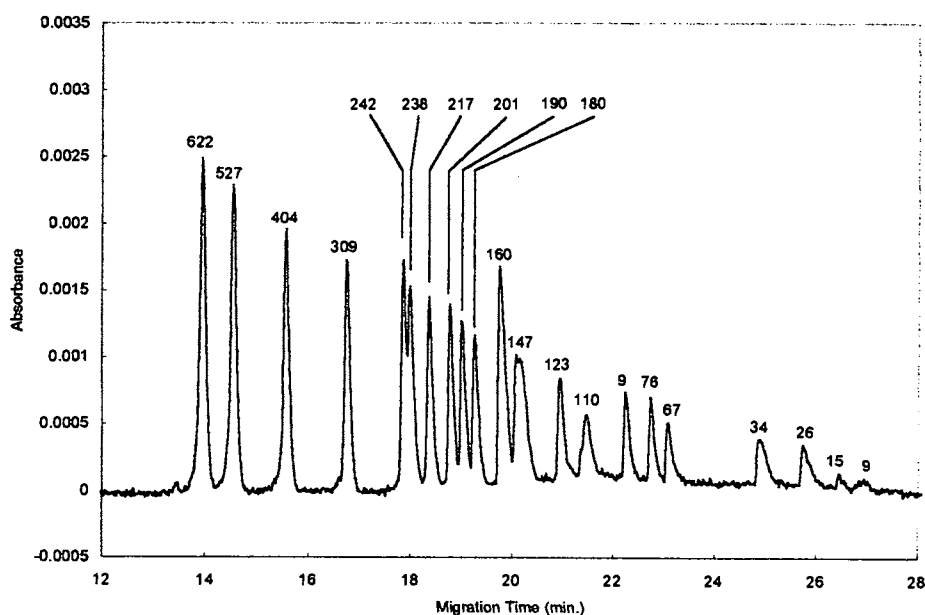


FIG.1 Electropherogram(260nm) of pBR322DNA/Msp I marker.  
Numbers in the figure represent DNA sizes in base pairs.  
Carrier buffer:0.1M Tris-Boric acid(2mM EDTA)  
Capillary:I.D.0.050mm×500mm(effective length 378mm)  
injection:N.Press 2sec

- 
- [1] A.B.Barron, H.W.Blanch and D.S.Soane  
[2] A.E.Barron, M.Sunada and H.W.Blanch

Electrophoresis 1994,15,597-615  
Electrophoresis 1995,16,64-74



(近畿大・薬) ○本田 進、富樫一天、多賀 淳

## CORRECTION FOR ELECTROOSMOTIC FLOW IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Susumu Honda, Kazutaka Togashi, Atsushi Taga*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*

**Summary:** Electroosmotic flow generated in capillary electrophoresis is liable to be fluctuated depending on the conditions of capillary inner wall. This paper discusses the fundamental problem of this variation and proposes a simple mathematical treatment for its correction. Correction of the migration time by the equation,  $t = t' (1 + t' \cdot \chi)^{-1}$ , where  $\chi = t_0^{-1} - t_0'^{-1}$  and  $t_0'$  and  $t'$  are the migration times of a neutral marker and an analyte to be corrected, respectively, allows for more reproducible migration time and related indices such as resolution. The term  $t_0$  is either the shortest or the longest migration time of the neutral marker in a series of measurements, depending on conditions. This paper demonstrates the improvement of reproducibility of such indices by presenting a number of examples.

## 1 緒言

最近のキャピラリー電気泳動の発展には目を瞠るものがあるが、この分析法は移動時間の不安定さという問題を抱えており、その発展の初期には、このことが、移動指標の再現性が比較的高いクロマトグラフィーに慣れ親しんできた多くの人々に、この分析法に対する不信感を植えつける原因となっていた。ゾーン電気泳動の場合試料成分の移動速度は電気浸透流速と試料成分の電気泳動速度の代数和であるが、これらのうち移動時間の不安定さをもたらすのは主として電気浸透流速の方である。動電クロマトグラフィーにおいては、これらのほかにメディアーターへの取り込み速度も移動時間に影響を与えられ考えられるが、やはりその不安定さの主因は電気浸透流速にあることには変わりはない。

このような欠点をカバーするには、電気浸透流速の再現性を直接高める努力が重要であることはいうまでもない。自動化され温度制御機能をもつ最近の装置ではこの問題はかなり解消され、キャピラリー内壁との相互作用の少ない試料では、高速液体クロマトグラフィーと同等かそれを凌ぐ高い再現性すら得られている場合もある。しかし、タンパク質などキャピラリーの内壁に吸着されやすい物質を含む試料の分析においては、依然としてこの問題は解決されていない。化学的手段によりキャピラリー内壁を改質する努力はこれを解決する1つの方向であるが、そのようにしてコーティングしたキャピラリーもせいぜい数十回の分析に堪えられる程度である。したがって血清をはじめ体液の成分の分析を目的にする臨床分析などにおいてはこの再現性の低さは致命的な欠点といつてよい。

このような直接的な解決法とは別に、電気浸透流速の不安定さに対処する方法として、得

られたデータから電気浸透流の変動によるバラツキを補正する方法も、十分に検討する余地があると思われる。そこで本演題では敢てこの問題について考えてみることにする。

## 2 実験

キャピラリー電気泳動は、手動装置である日本分光工業CE-800型装置と自動装置であるパーキネルマーABI-270A型装置を用いて行った。キャピラリーには共通してPolymicro Technologies 社製フューズドシリカ素管（内径 50  $\mu\text{m}$ 、外径 375  $\mu\text{m}$ ）を用い、検出は紫外外部吸収により行った。

## 3 理論・結果

### 移動時間に対する補正

キャピラリー内壁が正常で、基本的状態にあるときの中性マーカーおよび目的成分の移動時間をそれぞれ  $t_0$  および  $t$ 、キャピラリー内壁が汚染された状態にあるときのそれぞれの移動時間を  $t_0'$  および  $t'$  とすると、中性マーカーは電気浸透流のみによって移動し目的成分の電気泳動移動度は不変と考えるならば、つぎの補正式が得られる。

$$t = \frac{t'}{1 + t' \cdot \chi} \quad (1)$$

ただし、 $\chi = t_0^{-1} - t_0'^{-1}$  である。この式により移動時間の補正を行えば、電気泳動移動度と同等の再現性が得られることになる。Table 1 は標準的状态（キャピラリー：フューズドシリカ素管、長さ：72cm、泳動液：50 mM phosphate buffer, pH 6.8、印加電圧：20 kV）で血清希釈液を一回分析したのち、ケイ皮アルコール（中性マーカー）、バルビツール酸（ $t'$  の平均値 3.6 min）およびケイ皮酸（ $t'$  の平均値 10.5 min）の混合物を繰り返し30回分析し、それぞれの移動時間、補正移動時間および電気泳動移動度の相対標準偏差を比較したものであるが、この補正によって移動時間の再現性が大幅に改善され電気泳動移動度のそれに近くなることがわかる。

Table 1 An example of the correction of migration times by equation (1)

	Relative standard deviation (% , n = 30)		
	Migration time		Electrophoretic mobility
	Intact	Corrected	
Barbituric acid	11.3	1.56	2.40
Cinnamic acid	40.2	1.15	1.01

### その他の指標の補正

(1)式で移動時間の補正を行うことにより関連した種々の指標も補正することができる。例えば、分離度は次式により補正することができる。

$$Rs = \frac{(t_2 - t_1)}{(t_2' - t_1')} \left( \frac{t_1' \cdot t_2' (t_1' + t_2')}{t_1 \cdot t_2 (t_1 + t_2)} \right)^{1/2} Rs' \quad (2)$$

(2)式により得られた  $Rs$  補正值の再現性は未補正の  $Rs$  値の再現性に比べてかなり向上することが確かめられた。

## 5 ミセル動電クロマトグラフィーにおけるミセル部分充填法の改善

(カネカテクノリサーチ) ○尾崎祐人, (姫路工大理) 寺部茂

STUDY ON PARTIALLY FILLING METHOD IN MEKC.

Hiroto Ozaki<sup>1</sup>, Shigeru Terabe<sup>2</sup>

1 Kaneka Techno Research Co.Ltd.,

2 Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Partially filling method in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was studied with a high-molecular-mass surfactant, butyl acrylate/butyl methacrylate/methacrylic acid copolymer (BBMA) and SDS. Caffeine and its metabolites, 1,7-dimethylxanthine, 1-methylxanthine, 7-methylxanthine and 1-methyluric acid, were successfully separated with 5% BBMA introduced at 50 mbar for 20s before the micellar zone passed through the detector. Effects of buffer compositions and concentrations on the resolution were studied. The partially filling method with BBMA and SDS was applied to on-line MEKC-MS with electrospray ionization.

### 1) はじめに

我々はこれまでにMEKCにおける界面活性剤由来の検出時の妨害を回避する方法として、キャピラリーの一部にのみミセルを充填して分離をおこなう部分充填法について報告している<sup>1)</sup>。今回、部分充填法の改善のためいくつかの検討を行った。高分子界面活性剤ミセルを用いる方法について、使用する緩衝液の種類および濃度の、ミセルゾーンの形状や試料の分離に及ぼす影響について検討した

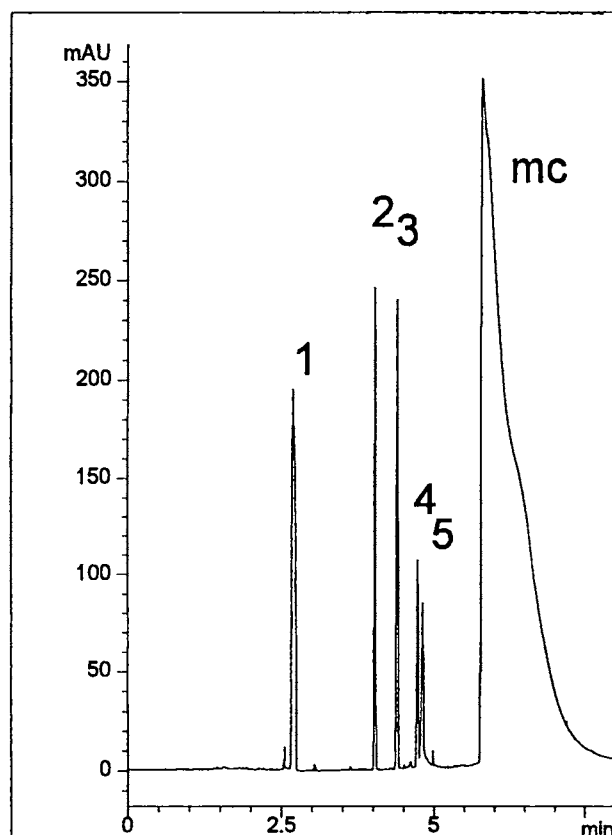
### 2) 実験と結果

MEKCは装置にヒューレットパッカート製HP-3DCEを使用し、部分充填法は既報<sup>1)</sup>同様に実施した。MEKC-MS測定は日本分光製CE990-10と日立製M1000型LC/API/MSに自作のインジェクターフェイスを接続し、既報<sup>2)</sup>と同様に行った。高分子界面活性剤アクリル酸ブチル/メタクリル酸ブチル/メタクリル酸共重合体(BBMA)は第一工業製薬製、その他試薬類および標準試料はすべて市販品をそのまま使用した。

これまでの部分充填法の検討は、通常のMEKCで汎用する50mMリン酸塩-100mM酢酸塩緩衝液(pH7)を用いて行ってきたが、使用する緩衝液の種類がミセルゾーンの形状に大きく影響することが判明した。リン酸塩-酢酸塩緩衝液の場合ミセルゾーンは全体的にかなりブロードでリーディングした形状になるが、100mM酢酸塩(pH9)の場合、ゾーンはシャープになり、またナフレン誘導体の分離においてはピークの分離が大きく向上した。緩衝液の種類を変え、また緩衝液の濃度についても検討を行った。これらの結果から、緩衝液中の塩の電気泳動移動度とミセル

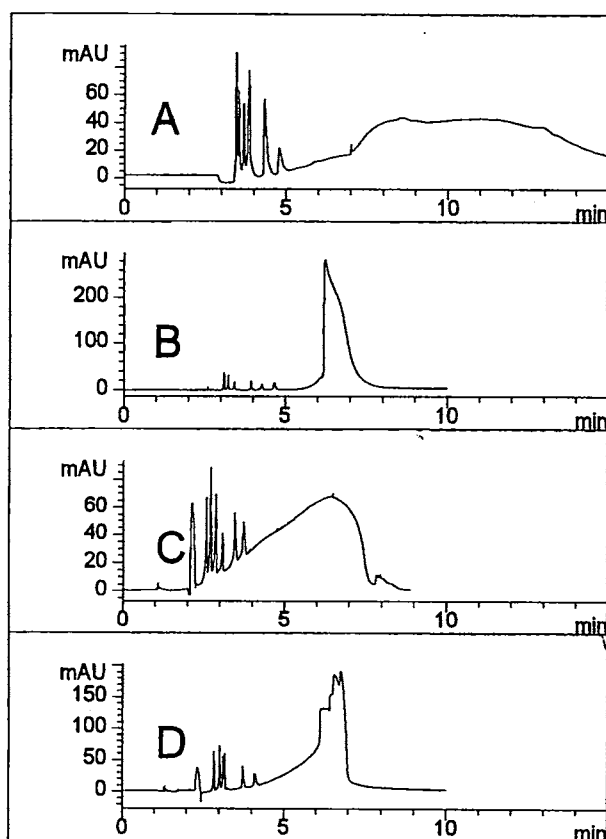
の電気泳動移動度の差がミセルゾーン形状に影響していることが推察された。カフェインとその代謝生成物からなる5成分の分離を行った結果をFig. 1に示す。また異なる緩衝液によるBBMAゾーン形状の比較をFig. 2に示す。また通常のMEKCで汎用されるSDSミセルの利用を検討した。さらにBBMAミセルを用いた場合と、SDSミセルを用いた場合について、実際のMS検出における課題を検討した。

- 1) 尾崎、伊藤、寺部、高田、坂入、小泉、第14回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集、p. 23 (1994) .
- 2) H. Ozaki, N. Itou, S. Terabe, Y. Takada, M. Sakairi and H. Koizumi, J. Chromatogr., in press.



**Fig.1. Partially filling MEKC of caffeine and its metabolites.**

Solute: 1 = caffeine; 2 = 1, 7-dimethylxanthine; 3 = 1-methylxanthine; 4 = 7-methylxanthine; 5 = 1-methyluric acid; mc = BBMA zone. Conditions: separation zone, 5% BBMA introduced at 50 mbar for 20 s; buffer, 100 mM borate (pH9); capillary, 50  $\mu$ m i.d., 48cm (40 cm to the detector) fused-silica; applied voltage, 20kV; detection wavelength, 210 nm.



**Fig.2. Dependence of the BBMA zone shape on the buffer composition.**

Solute: naphtharene derivatives. Buffer: A= 50 mM phosphate-100 mM borate (pH7); B= 100 mM borate (pH9); C= 20 mM ammonium formate (pH9); D= 20 mM ammonium acetate (pH9). Other conditions are the same as in Fig. 1.

## 6 ミセル動電クロマトグラフィーにおける試料注入由来のピーク形状劣化防止の検討

(国立精神神経センター神経研究所) ○今澤正興、畑中由利子

### PREVENTION OF THE PEAK DISTORTION RELATED TO SAMPLE INTRODUCTION IN MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Masaoki Imazawa, Yuriko Hatanaka

National Institute of Neuroscience, NCNP

Peak distortion due to entry of residual analyte from the outside of the capillary has previously been reported [ J.A.Lux et al., *Chromatographia*, **30**, 7 (1990) ]. The phenomenon is characterized here in greater detail to offer some ways to minimize it in micellar electrokinetic chromatography (MEKC). Evidence is presented that convection currents in the buffer in the inlet vial play the dominant role in the peak distortion.

#### 1. はじめに

キャピラリーの入り口外側に付着した試料の流入によるピーク形状の劣化については、Lux らによる報告<sup>1)</sup>があるが、詳しい条件の検討はなされていない。我々は、MEKC による体液中の薬物の定量を行っている際に、しばしば試料注入操作に関連すると思われるテイリング様のピークの乱れを認めた。定量の精度に悪影響を及ぼす本現象の性質とそれを防止する種々の方策を検討した。

#### 2. 実験

Beckman P/ACE 5010 キャピラリー電気泳動システムを使用し、キャピラリーには内径  $50\ \mu\text{m}$ 、有効長  $50\ \text{cm}$  のフューズドシリカ管を用いた。標準的な分離溶液としては、 $50\ \text{mM}$  SDS を含むほう酸緩衝液 ( $\text{pH}9.5$ 、 $20\ \text{mM}$ ) を使用した。キャピラリー温度  $25^\circ\text{C}$ 、電圧は、 $20\ \text{kV}$  とした。検出波長  $210\ \text{nm}$  にて、検出スリットの長さが  $200\ \mu\text{m}$  のキャピラリーカセットを用いた。試料として、caffeine, 2'-methylacetanilide, phenytoin, phenacetin の混合物を分離液に溶解し、ミクロチューブ中に  $20\ \mu\text{l}$  をとって、窒素圧下、1 秒間注入を行った。なお、特にふれる場合以外は、水循環によるバイアル等の冷却は行っていない。

#### 3. 結果および考察

入り口側バイアル中の分離液を交換して最初の分析では、4 種の薬物のピークの後に隣接して、それぞれ、顕著なブロードなピークが観察された (Fig.1A)。この現象は、3 ~ 4 回めの分析にかけて小さくなる (Fig.1B) が、それ以後の連続した分析でも変化せず、わずかな、しかし有意なテイリングが残る。また、数回分析後に、分離液を一度冷却してからセットし直すと再び顕著なピークの乱れが認められた (Fig.1C)。一方、分析直前に分離液を暖めると、このような現象は消失し、近接した初めの二つのピークでの完全なベースライン分離が確認された (Fig.1D)。このような良好な分離は、バイア

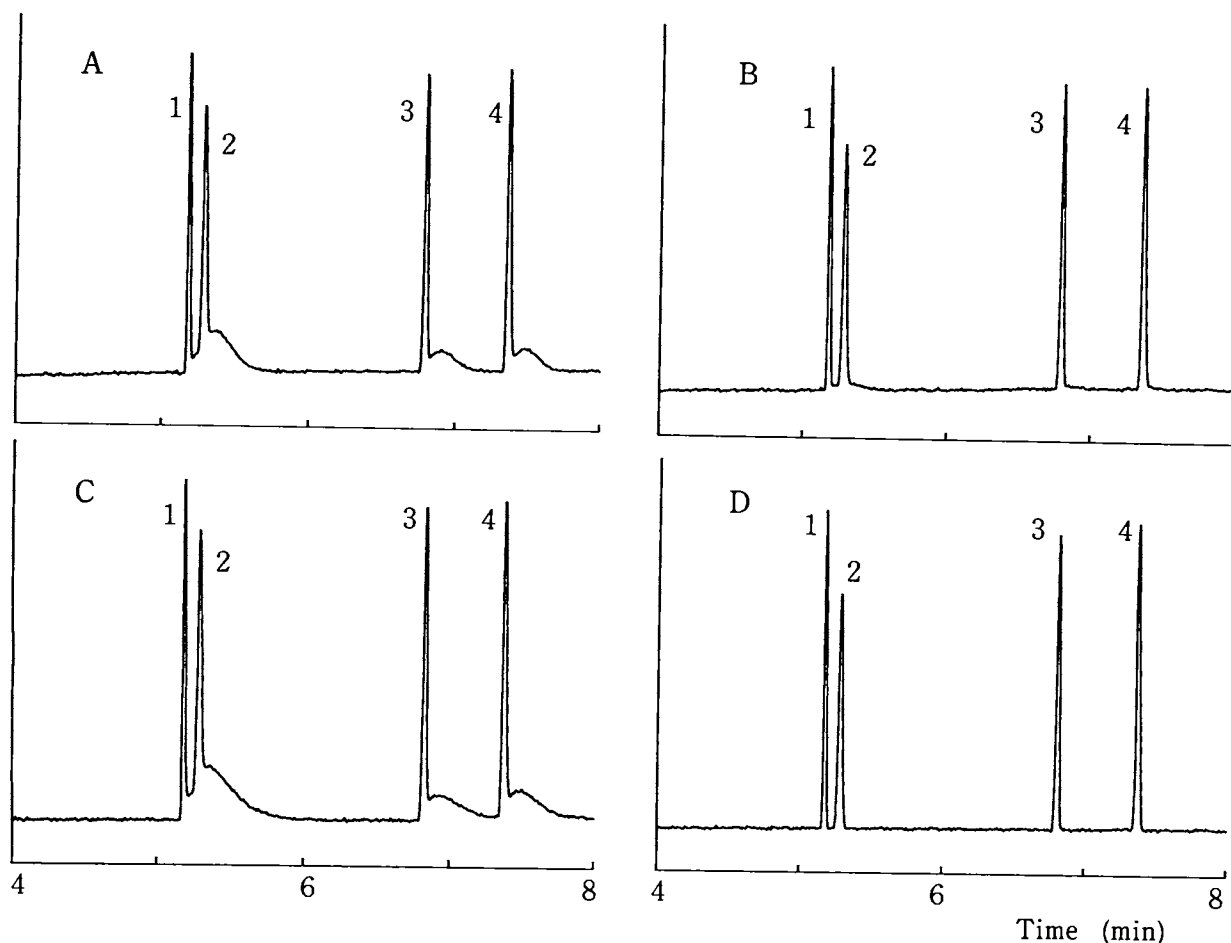


Fig. 1. Effect of various pretreatments of the buffer in the inlet vial: (A) 1st run after buffer replacement; (B) 3rd run; (C) cooling to 18°C after 3rd run; (D) heating to 33°C: (1) caffeine, (2) 2'-methylacetanilide, (3) phenytoin, (4) phenacetin.

ルトレイ内の水循環によって、分析の間、分離液をわずかに冷却し続けた場合にも認められ、多数のサンプルを精度良く自動分析するためには、この方法が最適である。Luxらは、この問題を解決するため、サンプル注入後、泳動開始前に、キャピラリー入り口を別の分離液に浸し洗浄することを提唱している。この操作の有効性は再確認できたが、必要な時間をかけた洗浄では、一度注入された試料の一部がキャピラリー外へ流失することが認められた。

上記の結果から、本現象に対しては、入り口側バイアル中の分離液における対流が大きな影響を及ぼすと考察される。すなわち、バイアルトレイ付近の温度は室温より高いため、分離液が温度上昇の過程にある初期の分析では、外側に付着した試料の入り口からの流入量が多い。一方、それを拡散させるような逆方向の対流がある場合には、テリング様のピークの乱れの無い良好な分離結果が得られる。数秒以上の試料注入を行えば、本現象の影響は相対的に少なくなるが、その場合でも、精度と再現性の良い定量を行うためには、各電気泳動システムの構造に対応した形で、上記のような対策を施すことが重要であろう。

### 3. 参考文献

- 1) J.A.Lux, H.-F.Yin, G.Schomburg, *Chromatographia*, 30, 7 (1990)

# 7 界面活性剤のアルキル鎖長がミセル動電クロマトグラフィーの分離挙動に及ぼす効果

(大阪工業技術研究所) ○竹田さほり、脇田慎一、山根昌隆、東 国茂  
(姫路工業大学理学部) 寺部 茂

## EFFECT OF THE ALKYL CHAIN LENGTHS OF SURFACTANTS ON MIGRATION BEHAVIOR IN MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Sahori Takeda<sup>1</sup>, Shin-ichi Wakida<sup>1</sup>, Masataka Yamane<sup>1</sup>, Kunishige Higashi<sup>1</sup>  
and Shigeru Terabe<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Osaka National Research Institute, AIST

<sup>2</sup>Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Homologous series surfactants were employed for micellar electrokinetic chromatography (MEKC). It was found that a series of N-acyl sarcosinates can be used as pseudo stationary phase in MEKC because their Krafft points are low enough to dissolve in buffer at ambient temperature. When the concentration of each surfactant was 0.05 M, the capacity factors of phenol and aniline derivatives increased with an increase in the alkyl chain lengths of the surfactants, while these surfactants gave almost same separation selectivities for the solutes. The use of different alkyl chain length surfactants affect capacity factor as well as the change of surfactant concentration.

### 1. はじめに

疑似固定相に界面活性剤ミセルを用いるミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) においては、界面活性剤の種類により分離挙動が変化するが、それらの構造が分離挙動に及ぼす影響については、まだわからない点も多い。疎水基としてアルキル直鎖を有する界面活性剤においては、その鎖長の違いによる分離挙動の変化について興味を持たれるが、アルキル鎖長が長くなるとクラフト点が上昇して室温でのミセル形成が困難になるものが多く、そういった一連の系についての研究はこれまであまりなされていなかった。今回我々は、アミノ酸系界面活性剤の一種である N-アシルサルコシンナトリウム塩のうち、アルキル鎖長の異なる 3 種類のもので MEKC に利用可能であることを見いだした。そこで、それらを MEKC による分析に適用して、アルキル鎖長の違いが分離挙動に及ぼす効果について調べた。

### 2. 実験

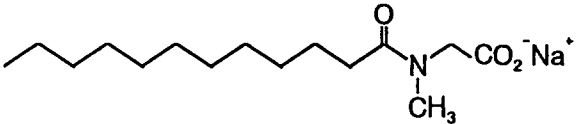
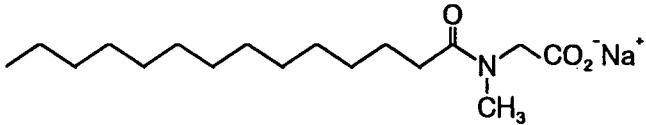
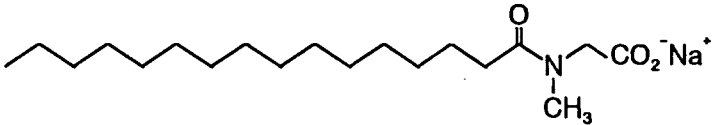
装置には、大塚電子製 CAPI-3000 を用いた。キャピラリーには内径 50 $\mu$ m、長さ 62cm (有効長 50cm) のフューズドシリカ管 (GL Science 社製) を用いた。界面活性剤は日光ケミカルズより提供を受けた。分離溶液は 0.05 M の界面活性剤を 0.02 M ホウ酸塩ーリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶かして調製した。測定は印加電圧 20 kV、温度 30  $^{\circ}$ C の条件下で行った。

### 3. 結果

実験に用いた界面活性剤とその構造および物性値を Table 1 に示す。CMC は導電率法により求めた。クラフト点については純水中での値であるが、塩濃度が高くなるにつれてクラフト点は上昇することが知られている。しかし、今回用いた分離溶液においても、これらの界面活性剤は実験温度ではミセルを形成して溶解し、MEKC で利用可能であった。

また、サンプルとしてアニリンおよびフェノール誘導体を用いた場合、容量比  $k'$  は界面活性剤のアルキル鎖長が長くなるにつれて大きくなる傾向が見られたが、アニリンまたはフェノール各誘導体に対する分離係数  $\alpha$  は界面活性剤の種類によらずほぼ一定であった。したがって、この場合にはアルキル鎖長を変えても選択性そのものはあまり変化せず、界面活性剤の鎖長を変えることは、相比すなわち界面活性剤濃度を変えることにより容量比をコントロールすることと同様な効果をもたらすものと考えられた。

Table 1 Structures and physicochemical properties of N-acyl sarcosinates

	Krafft point / $^{\circ}$ C (in dis. water) <sup>1)</sup>	CMC / mM (in buffer)
Sodium N-lauroylsarcosinate (SLN) 	< 0	6.0
Sodium N-myristoylsarcosinate (SMN) 	< 0	0.9
Sodium N-palmitoylsarcosinate (SPN) 	ca. 8	0.2

1) Ohki, K., *et al. Yukagaku*, 19, 897 (1970).



# 混合ミセルを用いたMEKCへの新しい 分離様式の導入

(岐阜薬科大学<sup>1</sup>、京大農<sup>2</sup>)

○小林幹男<sup>1</sup>、江坂幸宏<sup>1</sup>、池田篤治<sup>2</sup>、加納健司<sup>2</sup>

HYDROGEN-BONDING INTERACTION-ASSISTED MICELLAR ELECTROKINETIC  
CHROMATOGRAPHY USING MIXED SURFACTANT SYSTEMS

Mikio KOBAYASHI<sup>1</sup>, Yukihiro ESAKA<sup>1</sup>, Tokuji IKEDA<sup>2</sup>, Kenji KANO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Gifu Pharmaceutical University, <sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agricultural, Kyoto University

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has been examined using mixed surfactant systems consisting of Brij 35 or Tween 20, non-ionic surfactants with the polyether structure, together with sodium dodecyl sulfate (SDS). Addition of the non-ionic surfactant into a SDS micellar system provides selective increase in the relative capacity factors of some substituted benzenes having hydrogen-donating substituents such as a hydroxyl, amino, and amide group. This effect can be ascribed to hydrogen-bonding formation between these solutes and the polyether segments of the non-ionic surfactant. The hydrogen-bonding interaction appears to work additively against the hydrophobic interaction. The separation selectively can be well controlled by adjusting the mixing ratio of the two surfactants. The thermodynamic aspects of the mixed micellar systems are discussed in detail.

## 【緒言】

現在MEKCでは、既存、合成のものを含めて様々な界面活性剤が用いられており、その構造の違いは新たな分離選択性の獲得につながっている。一方で、様々な界面活性剤を組み合わせることで混合ミセルを形成させ、これを用いることもまた、様々な新しい分離様式を取り入れることを可能にする。我々は前の研究で、ポリエーテル化合物含有マトリックスを用いたCZEにおいて、ポリエーテル-溶質間の水素結合形成に基づく分離様式が働くことを見出した。そこで、本研究ではポリエーテル構造を有する中性界面活性剤のTween 20およびBrij 35と陰イオン界面活性剤であるSDSによる混合ミセルを用いて、ポリエーテルの水素結合能に基づく分離モードのMEKCへの導入を試みた。さらに、この混合ミセル系への分配について熱力学的な考察を行い、ミセル-試料間の相互作用を解析した。

## 【実験】

試料：置換ベンゼン類；フェノール (HO-Ph)、アニリン (NH<sub>2</sub>-Ph)、アセトアニリド (CH<sub>3</sub>CO NH-Ph)、フェニル酢酸 (CH<sub>3</sub>COO-Ph)、ベンズアルデヒド (CHO-Ph)、*p*-クレゾール (4HO-To)、*p*-トルイジン (4NH<sub>2</sub>-To)、*p*-アセトトルイジン (4CH<sub>3</sub>CONH-To)、*p*-クレゾール酢酸 (4CH<sub>3</sub>COO-To)、*p*-トルアルデヒド (4CHO-To) の各々を (不溶性のものはメタノールを少量加え) 水溶液 (4 mM) とし、これらを等量ずつ混合し、ミセルマーカースとしてオイルイエローを少量添加したものを用いた。電解液：緩衝液にSDS (50 mM) 及び中性界面活性剤であるTw e

en 20もしくはBrij 35 (0から50 mMまで)を溶解したものを用いた。緩衝液には、Tween 20 使用時には10 mMリン酸緩衝液 (pH7.8)、Brij 35 使用時には100 mMホウ酸 + 100 mMトリス (pH8.2) を使用した。電気泳動装置：キャピラリーは内径50  $\mu\text{m}$ 、全長50 cm (有効長30 cm) のものを用いた。検出には電気泳動様UV/VIS検出器870-CE (Jasco) を、高圧電源は890-CE (Jasco) を使用した。

### 【結果と考察】

中性界面活性剤濃度を徐々に上昇させていくにつれ、フェノール、*p*-クレゾールについて、著しい (他の試料に対して) 相対的な溶出時間の遅れが観測された。これはフェノール類の混合ミセルへの可溶化促進の度合いが他の試料に比べ高いことから生じる。この選択的な効果は、これらの試料のOH基と混合ミセルの非イオン性界面活性剤のポリエーテル部分との間の水素結合相互作用に基づくものと考えられる。他の試料もそれぞれ異なる強度の相互作用を受け、その結果として、溶出順序の著しい変化が観測された。また、中性界面活性剤の濃度を調整することにより、分離の最適条件を得ることができた。

次に熱力学的な観点から解析を行なった。非イオン性界面活性剤の濃度に対する水相から混合ミセル相への標準移行自由エネルギーの依存性を調べるために、 $RT \ln k' / k_o'$  ( $k'$ 、 $k_o'$  はそれぞれ試料及び基準物質としたベンズアルデドのキャパシティーファクターを表す。) をBrij 35 濃度に対してプロットし、これをFig. 1に示した。正方向に傾きが急なものほど、Brij 35によって強く相互作用を受け、可溶化促進の顕著なものである。Table 1に傾きの値をまとめる。この結果、相互作用の強さの順は、置換基で書くと、 $\text{HO} \geq \text{HO} + \text{CH}_3 > \text{NH}_2 \geq \text{NH}_2 + \text{CH}_3 > \text{CH}_3\text{CONH} \geq \text{CH}_3\text{CONH} + \text{CH}_3 > \text{CHO} \geq \text{CHO} + \text{CH}_3 > \text{CH}_3\text{COO} \geq \text{CH}_3\text{COO} + \text{CH}_3$  となる。これは、基本的には水素供与性の強さから説明され、水素結合に基づいた分離モードが、有効に働いていることを強く示唆する結果といえる。Tween 20-SDS系においてもほぼ同様の結果が得られた。

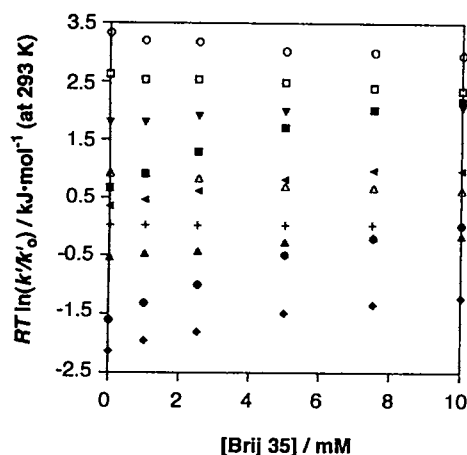


Table 1. Slopes of  $RT \ln(k'/k_o')$  vs. [Brij 35] plots at 293 K.

Slope / $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$	
HO-Ph (phenol)	218
4HO-To ( <i>p</i> -cresol)	210
NH <sub>2</sub> -Ph (aniline)	124
4NH <sub>2</sub> -To ( <i>p</i> -Toluidine)	93
CH <sub>3</sub> CONH-Ph (acetanilide)	52
4CH <sub>3</sub> CONH-To ( <i>p</i> -acetotoluidine)	42
CHO-Ph (benzaldehyde)	0
4CHO-To ( <i>p</i> -tolualdehyde)	-24
CH <sub>3</sub> COO-Ph (phenyl acetate)	-47
4CH <sub>3</sub> COO-To ( <i>p</i> -cresol acetate)	-54

Figure 1

Dependence of  $RT \ln(k'/k_o')$  of the substituted benzenes on the concentration of Brij 35.

Conditions: applied voltage: 10 kV; operating currents: <23 mA;  
capillary length: 50 cm (effective length: 30 cm); electrolyte solution :  
100 mM borate-100 mM Tris buffer containing surfactants (pH 8.2)

Symbols: (●) HO-Ph (■) 4HO-To (◆) NH<sub>2</sub>-Ph (◀) 4NH<sub>2</sub>-To

(▲) CH<sub>3</sub>CONH-Ph (▼) 4CH<sub>3</sub>CONH-To (Δ) CH<sub>3</sub>COO-Ph

(○) 4CH<sub>3</sub>COO-To (□) 4CHO-To (+) CHO-Ph (as a reference compound)

# 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム

## ワークショップ

「キャピラリー電気泳動の現状と将来」

## 特別講演

# 特別講演 1 キャピラリー電気泳動の現状と展望

(姫路工大理) 寺部 茂

## CAPILLARY ELECTROPHORESIS: PRESENT STATUS AND FUTURE PROSPECTS

Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Capillary electrophoresis (CE) has been accepted as a highly efficient analytical separation technique. CE can separate from small molecules to polymers, and even small particles based on differences in electrophoretic mobilities, isoelectric points, binding constants with additives, or distribution coefficients to the pseudo-stationary phases. In this paper, present status and issues of CE are going to be discussed, and future prospects will be described.

### 1. 緒言

キャピラリー電気泳動(CE)を誰が始めたかは議論の分かれるところあるが、1981年に発表されたJorgensonとLukacsの論文<sup>1</sup>がCEの有用性を明確に示し、分析化学者に大きな影響を与えたことは否定しがたい。初期のCEに関する研究は比較的少数の研究グループに限られていた。1980年代末にはCE装置も数種市販されるようになり、研究報告も急激に増加し始めた。1993年頃から応用研究が増加し始め、今日に至っている。本講演では、CEの現状を概観し、現在の問題点のいくつかを検討し、将来への展望を試みる。第9回以前の本シンポジウムのタイトルであった細管式等速電気泳動は現在のCEよりも以前から利用されており、CEの分離モードの一つではあるが、現在のCEへ直接進展したとは言いがたいので、本講演では等速電気泳動の進歩については、演者の専門外でもあり述べない。

### 2. CEの現状と問題点

a. 分離モード CEの分離モードとしては①キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)、②キャピラリーゲル電気泳動(CGE)、③等速電気泳動(ITP)、④等電点電気泳動(IEF)、⑤動電クロマトグラフィー(EKC)がある。電気泳動ではないが、電気浸透流を移動相の送液に用いる⑥エレクトロクロマトグラフィーもCE装置を用いて実行できる。

CEでは常に問題となる電気浸透流の制御については、まだ実用に耐える方法はなく、pHの調整、キャピラリーの内面処理、粘性率の調整、添加剤の利用等の方法によって行われているが、再現性を良くするためにはキャピラリーの内表面を常に同じ状態に保つよう努力する必要がある。そのために一般に各試料分析の間にキャピラリーの洗浄を行うことが推奨されている。実試料を用いる場合には、各試料に適した洗浄液を、

用いることが必要である。

現在まで最も広く利用されている分離モードはCZEであり、対象試料の範囲が広い。CZEで最近の注目すべき利用法の一つは光学異性体の分離への応用である<sup>2</sup>。とくにシクロデキストリン(CD)またはその誘導体をキラル選択子として用いるCD-CZEは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と比べて実行容易であり、広く利用されるようになると期待される。CZEはタンパク質の分析にも広く利用されている。タンパク質分析にはさらに優れた内面修飾キャピラリーの開発が望まれる。無機イオン分析や糖分析も重要な分野となりつつある。

CGEはもっぱらDNAの分離に利用されてきたが、他の高分子分析にも利用されつつある。架橋ゲルの代わりに線状高分子溶液をキャピラリーに充填して行う方法が広く採用されるようになり、厳密にはゲル電気泳動とは言い難くなっている。ITPは試料濃縮法として利用されるようになり、改めて注目されている。質量分析法(MS)を検出器として用いるCE-MSの分離モードとしても適している。IEFはタンパク質の分離法として優れた方法であり、キットも市販されているので、徐々に利用者が増加するものと思われる。EKCではミセルを擬似固定相とするMEKCが、主として低分子量分子の分析に広く利用されている。医薬、農業等の分析への応用の他に、最近では分離機構に関する研究も多く報告されている。ミセルの他に合成高分子等を擬似固定相として利用した方法も開発されつつある。エレクトロクロマトグラフィーはウルトラミクロLCとして注目されている。カラムとしては充填カラムの利用が多いが、その調製法は難しい。最近報告されている、ゲル充填キャピラリーの利用は注目される<sup>3</sup>。

b. 検出法 検出については別の特別講演があるので簡単に述べる。検出器としてはもっぱら吸光光度法が利用されているが、濃度感度は $\mu$ M程度であり不満が多い。レーザー励起蛍光法はCEに適した高感度検出法であるが、装置が高価なこと、適用対象試料が限定されること等の問題点がある。CE-MSはまだ実用段階には達していないが、近い将来には優れた装置が市販されると期待される。

c. 定量分析 CEはHPLCと比べて定量精度が悪いと一般に考えられている。その理由としては試料量が少ないこと、電気浸透流の安定性の問題、検出器の直線性の問題等が関係していると考えられるが、技術の進歩とともに改善されていくものと期待される。現時点ではむしろCEの利点を十分に生かした利用を考慮して欲しいものである。

### 3. 将来の展望

まずCEは省資源・省エネルギー分析法である点を強調したい。国内でも数10万台のHPLC装置が稼働していると考えられるが、その一部をCEに置き換えるだけでも大きな効果がある。今後の進展に期待したいのはチップ上で行うCEを含むトータル分析システムである。CEが超微量分析法である利点を生かすにはチップ技術は最も適した方法である。

1. J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298-1302.

2. H. Nishi, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 694 (1995) 245-276.

3. C. Fujimoto, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2050-2053.

# 特別講演 2 キャピラリー電気泳動分析における 検出感度の現状と将来

(九大工) 今坂藤太郎

DETECTION SENSITIVITY OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE STATE-OF-THE-ART AND IN THE FUTURE

Totaro Imasaka

Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering, Kyushu University

Laser spectrometry provides ultrahigh sensitivity in capillary electrophoresis. In an extreme case, single molecules are surely detected. A semiconductor laser is recently used as a light source in fluorometry, and amino acids as low as 800 zmol are detected. Photothermal and multiphoton ionization spectrometries are also used as sensitive analytical methods for nonfluorescent samples.

## 1. 緒言

クロマトグラフィーは現在最もよく利用されている分離法であるが、最近ではキャピラリー電気泳動法やミセル動電クロマトグラフ法がこれに置き代わる方法として注目されている。これらは数10万以上の理論段を有しており、ガスクロマトグラフ法の分離性能に匹敵する。しかしながら分離にキャピラリーを利用するので、微小部分の試料を如何に高感度に検出するかが鍵となる。たとえば現在最もよく利用されている吸光検出器の場合には光路長が50ミクロン程度になるので、検出できる試料濃度は $10^{-5}$ M前後となる。これに対して、従来のクロマトグラフ法は光路長が10ミリ程度であるので、キャピラリー電気泳動法の場合には分析感度が200倍程度低下することになる。したがってキャピラリー電気泳動の実用化に際しては、高感度な微小検出器の開発が不可欠である。たとえば電気化学検出器のように本質的に濃度を検出するものは、感度低下が起こらず好都合である。しかし検出器の微小化に伴い信号の安定性や雑音の影響を受ける場合には問題がある。レーザーを用いる検出法は、レーザーの集光性を利用して容易に微小検出器を構成できる。ここでは各種のレーザー分光法にスポットを当て、高感度検出法の現状を紹介するとともに将来の進展を考察する。

## 2. レーザー蛍光検出器

蛍光分析においては、信号強度は励起光強度に比例する。そこで高輝度光源であるレーザーを利用する高感度蛍光分析の研究が進められている。現在では、極限の感度を実証した

例も見られる。すなわち、流れの中で蛍光分子が少なくなると、単一分子が光の吸収と放出を繰り返すいわゆるフォトンバースト現象が見られる。これを観測することにより単一分子を確実に検出することができる。CastroとSheraは、250ミクロン離れたところに2つのレーザービームを照射して蛍光検出することにより、一つずつ流れてくる蛍光性分子をほぼ確実に検出できることを実証している。

### 3. レーザー吸光・多光子イオン化検出器

蛍光検出器は極限の感度を有するが、分析対象が蛍光性分子に限られる。非蛍光性分子の場合には蛍光標識して分析することになるが、新たに反応操作が加わる。これに対して非蛍光性分子を光熱変換現象を利用して検出する方法は、このような煩雑さが無い。Sawadaらは、レーザー光を集光した際に生じるキャピラリーの振動を、保持している圧電素子を用いて検出している。また第二のレーザー光を励起レーザー光付近に導入することにより、その偏向を検出することによって吸光検出する方法も提案している。一方、Ogawaらは、レーザー光を集光した際に生じるイオンを電極で検出する多光子イオン化分析法をキャピラリー電気泳動法に応用している。

### 4. 半導体レーザー励起蛍光検出器

レーザー励起蛍光法は極めて高感度であるが、レーザーの価格、保守、操作性に問題がある。通常のレーザーの代わりに半導体レーザーを利用すれば、このような問題点を一挙に解決できる。また近赤外域はバックグラウンドを与える不純物が少なく、蛍光検出を妨害するラマン散乱などの影響も小さい。しかし近赤外域の蛍光分析はそれほど研究の蓄積がなく、応用例はそれほど多くない。アミノ酸をピロニンスクシンイミドエステルで蛍光標識し、キャピラリー電気泳動法で分離して、670nmの半導体レーザーを用いて検出した例では、800zmolの検出限界が得られている。このような方式はたんぱく質の微量分析にも応用されている。今後蛍光標識試薬の開発に伴いさらに高感度化が達成できるものと期待される。一方、間接蛍光定量法を利用すると、レーザー波長で吸収バンドをもたない試料でも直ちに分析できる。ただし可視化剤（移動溶液に添加する蛍光物質）の選択に注意を要する。とくに近赤外域の色素は正の電荷をもっている場合が多いので、キャピラリーへの吸着が問題となる。キャピラリー表面をコーティングして吸着を減らし、メチレンブルーを利用して間接蛍光検出が行われている。また移動溶媒に正電荷の界面活性剤を添加してキャピラリーへの吸着をなくすこともできる。界面活性剤の濃度を高くすればミセル動電クロマトグラフのモードで分析することも可能である。芳香族化合物の間接蛍光分析例が報告されている。

### 5. おわりに

レーザー分光法は極限の感度をもつことが実証されている。しかし非蛍光物質を分析する際に、低濃度で蛍光標識反応が完結しないなどの問題点が指摘されている。今後試料の濃縮、微量での反応操作の確立などが要望される。一方、溶液を対象としたレーザー分光法は定性分析に関しする情報を与えない。質量分析法を検出部に利用する方法も研究されているが、分析感度に限界がある。今後定性機能を有する高感度検出器の出現を期待したい。

# 特別講演 3 キャピラリー電気泳動を用いる結合分析法の現状と展望

○愛媛大・理・化 真鍋 敬

## COMBINED ANALYSIS EMPLOYING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Takashi MANABE

Department of chemistry, Faculty of Science, Ehime University

Analytical techniques which have been used in the field of chemistry can be classified into two categories, one of them includes techniques to separate chemical species (separation techniques) and the other those to elucidate the chemical identity of each species (identification techniques). One analytical technique is sometimes not sufficient to analyze a complex mixture of chemical species. In such a case, two or more analytical techniques are sequentially combined: each chemical species is first purified by a separation technique, then identified by an identification technique. If the resolution of the separation technique is not sufficient, two separation techniques with different separation principles are further combined. Recently, combination of analytical techniques has become popular and the term "combined analysis" is often used. Present stage of the use of capillary electrophoresis in "combined analysis" will be reviewed and possibility of the field will be discussed.

### 1. はじめに

キャピラリー電気泳動はさまざまな化学種の分離・分析に利用できる高感度でかつ操作性の高い分析法として急速に利用が広がっている。操作性の高さを利用して、これを他の分析法と結合する試みも増加し始めている。そこでキャピラリー電気泳動を用いた結合分析法について、現状を概観し、今後の可能性を議論したい。

### 2. 分析法の分類

分析化学の教科書にある分析法の分類は、古典的方法（重量分析・容量分析）と機器分析法との分類であることが多い。機器分析法という言葉には、機器を用いる分析法という意味しか含まれないにもかかわらず、である。このような分類ではなく、分析の目的や用いる分析原理の質的な違いを明確にできるような分類が必要であると考えられる。例えば、分析の目的の違いを強調すれば、以下のような分類が可能である。

①分離分析法：化学種同志の分離あるいは精製を主目的とした分析法。



②構造解析法：化学種の分子構造の決定あるいは分子としての同定を主目的とした分析法。

実際、以下に述べるような結合分析法を総合的に理解するためには、このような分類は不可欠である。

### 3. 結合分析法

結合分析法という言葉は、最近使われ始めたもので、"hyphenated technique" と呼ばれることもある。代表的なものは、GC-MS、LC-MS、MS-MSなどで、質量分析計と他の分析法とを結合したものである。しかし、結合分析法を「2つの分析法を結合したもの」と定義すると、HPLCそのものも高速液体クロマトグラフィーという分析法と紫外吸収分光法などの分析法とを結合したものであり、すでに結合分析法であるということになる。従って、現在意味している内容から「結合分析法」を定義すると、「ある既成の機器分析法で分析した後、引き続き他の機器分析法で分析すること」のようである。

しかし、上記の一群の方法をさらに詳しく見ると、ハイフンの前にある方法（GC、LC、MS）は、いずれも試料を成分に分けるために（分離法として）用いられていることがわかる。すなわち、結合分析法の前提となっているのは、試料が化学種の複雑な混合物であって、まず分離分析法にかけなければ構造解析ができない、という点である。分析化学が対象物をより複雑な混合物系へと広げてきている過程が、結合分析法という領域の出現に反映されていると考えられる。実際、LC-LCやGC-GCのように、分離分析法同志を結合したのも結合分析法と呼ばれるようになってきている。

### 4. キャピラリー電気泳動を用いた結合分析法

キャピラリー電気泳動は分離分析法であり、分離後の化学種の構造情報を得るためにはMSと結合する結合分析法が研究の焦点となっている。高感度であることや、得られる情報の質が高いことから、現在のところ質量分析法は最も有効な構造解析法と考えられるからである。試料によっては、分離後他の構造解析法との結合が試みられている。タンパク質をキャピラリー電気泳動で分離した後に、アミノ酸配列情報を得るためにシーケンサーと結合した例などである。また、分離分析法同志の結合として、HPLCとキャピラリー電気泳動の結合などの報告がある。キャピラリー電気泳動そのものも、現在用いられているだけでも5種（ゾーン電気泳動、MEKC、等電点電気泳動、等速電気泳動、サイズ分離電気泳動）以上の分離原理に基づくものであり、異なる分離原理に基づくキャピラリー電気泳動法同志の結合も、今後発展してゆくことが期待される。

キャピラリー電気泳動の発展は、分析の対象とする試料の量が微少化していることの反映でもあると考えられる。また、分離された微量試料の構造解析は当然の要求である。すなわち、キャピラリー電気泳動の発展自身が、結合されるべき構造解析法の高感度化を要求することになるはずである。その意味でも、キャピラリー電気泳動は分析化学の領域全体において、新しい挑戦課題を提供しているといえることができる。

# 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム

## 一般講演

# 9 キャピラリー電気泳動による食用色素の分析における $\beta$ -シクロデキストリンのホスト-ゲスト抱合作用の影響について

(広島大・医・総合薬)

©Saeid Razee (サイド ラジー), 田村 敦史, 升島 努

Utilization of Host-Guest Complexation with  $\beta$ -cyclodextrin in Analysis of Food Additive Dyestuffs by Capillary Electrophoresis

Saeid Razee, Atsushi Tamura, Tsutomu Masujima

Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine

In this work we explain the achievements of a model study on food additive dyestuffs, taking advantage of host-guest complexation with  $\beta$ -CD for the manipulation of migration time, elution range, reproducibility, and peak shape of tested compounds. The obtained results showed that the method can be used as a general procedure when dealing with organic anions containing aromatic rings. The so-called sequential injection of dyestuffs and  $\beta$ -CD into CE column, provides an easy and rapid method for the qualitative comparison of inclusion complex formation ability of dyestuffs with  $\beta$ -CD.

## 【緒言】

キャピラリー電気泳動において、種々のモデュファイアが導入されているものの、その効果、使い方等について詳細に検討された例は少ない。今回、我々は $\beta$ -シクロデキストリンをホスト-ゲスト抱合体を食用色素の分離に応用した際の各種パラメータに与える影響を検討した。

さらに、試料-モデュファイア連続導入法を適用して、モデュファイア効果の簡易推測法を開発した。

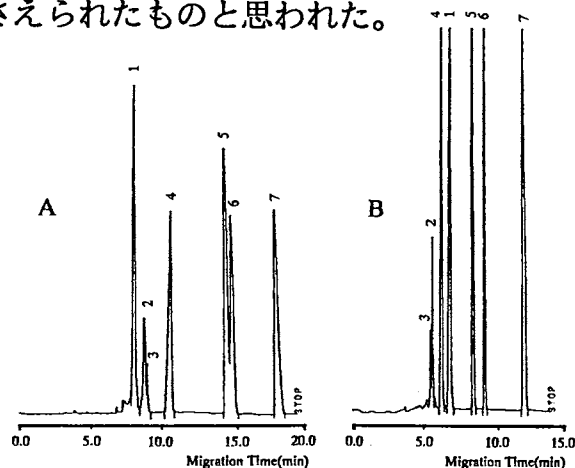
## 【実験】

キャピラリー電気泳動装置, CE-850 (日本分光) ; キャピラリー, フューズドシリカ管 (内径 50  $\mu$ m, 60 cm) ; 分離液, 20mM ホウ酸緩衝液 (pH 7.5) ; 印可電圧, 20 or 25 kV ; 温度, 室温 ; 検出, 245 nm

## 【結果及び考察】

抱合体形成は特に酸性の芳香族化合物に有効であった。酸性物質は電気浸透流に逆らって陽極側に戻ろうとする。しかし、抱合体形成によりこの戻ろうとする作用

が押さえられるため、分析時間の短縮につながるものと思われた。また、移動速度は、抱合体形成能によって異なった。さらに、ピーク形状・泳動時間の再現性が改善された (Fig.1 and Table 1)。これは、抱合体形成により試料のキャピラリー壁への接触が押さえられ、これらの変動要因となるキャピラリー壁への試料の吸着現象が押さえられたものと思われた。



**Figure 1.** Effect of complexation with  $\beta$ -CD on elution order, elution range, migration time, and peak shape of dyestuffs. (A):no  $\beta$ -CD, (B):15 mM  $\beta$ -CD added to the carrier electrolyte. Peaks; 1: erythrosine, 2: fast green FCF, 3: light green SF-yellowish, 4: sunst yellow FCF, 5: amaranth, 6: new coccine, 7: tartrazine.

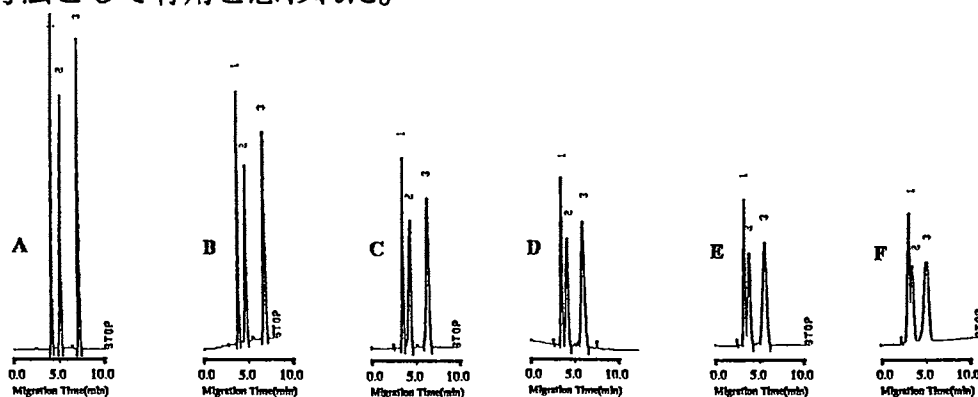
Compound	No additive			15 mM $\beta$ -CD	
	Mean	S.D. <sup>a</sup>	S.D. <sup>b</sup>	Mean	S.D. <sup>a</sup>
Erythrosine	7.45	0.38	0.03	6.59	0.05
Fast Green FCF	8.13	0.26	0.04	5.47	0.05
Light Green SF Yellowish	8.28	0.28	0.03	5.36	0.03
Sunset Yellow FCF	9.87	0.61	0.04	6.16	0.07
Amaranth	13.73	0.61	0.05	8.79	0.10
New Coccine	14.04	0.33	0.03	9.32	0.05
Tartrazine	17.50	0.33	0.03	11.83	0.06

a: No washing step between runs.  
b: With washing step between two runs.

**Table 1:** Improvement in reproducibility of migration time of dystuffs in the presence of  $\beta$ -CD in carrier electrolyte.

次に、食用色素 (erythrosine, sunset Yellow FCF 及び amaranth) を導入した 1 分後、 $\beta$ -シクロデキストリンを導入 (sequential injection) すると、検出時のピーク形状が異なっていた。これは、 $\beta$ -シクロデキストリンのゾーンが食用色素に追いつくと抱合体形成能の違いによりバンドの拡散の程度に違いが出るため考えられた (Fig. 2)。

今回導入した, sequential injection法は各種モデュファイアの効果の程度を簡単に確かめる方法として有用と思われた。



**Figure 2.** Electropherograms obtained from sequential injection of dyes and  $\beta$ -CD into a CE column. Peaks; 1: Erythrosine, 2: sunset yellow FCF, 3: Amaranth. Electropherograms; A: only injection of mixture of dyestuffs, B-F : injection of dyes mixture followed by injection of 5, 10, 15, 20, and 25 mM  $\beta$ -CD respectively.

文献：

S.Razee, A. Tamura, T. Masujima, *J. Chromatogr. A*, In press.

## シクロデキストリン誘導体を用いるキャピラリー電気泳動による酸性化合物の光学異性体の分離

(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 ACIDIC ENANTIOMERS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS USING CYCLODEXTRIN DERIVATIVES

Yoshihide Tanaka<sup>1)</sup> and Shigeru Terabe<sup>2)</sup>

1) Nippon Boehringer Ingelheim Co. Ltd.

2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Cyclodextrins (CDs) are most popular chiral selectors for the separation of enantiomers by capillary electrophoresis. In particular, charged CDs show higher enantioselectivity to oppositely charged racemates with low concentrations because the charges CDs have a strong electrostatic attraction to the analytes besides hydrophobic and hydrogen bonding interactions. In this work, we performed the separations of anionic enantiomers using a commercially available cationic  $\beta$ -CD which had quaternary ammonium groups. In addition, an amphoteric  $\beta$ -CD which had quaternary ammonium and carboxymethyl groups were also employed for those separations. Successful separations of various acidic racemates such as tropic acid, chlorowarfarin and dansyl amino acid derivatives were obtained at low concentrations of these CDs.

## 1. 緒言

キャピラリー電気泳動で光学異性体を分離する場合、泳動液にキラル識別剤を添加して行う必要があり、シクロデキストリン (CD) 及びその誘導体はその目的でよく用いられている。演者らは、塩基性化合物の光学異性体に対し、陰イオン型 CD 誘導体を用いると、疎水性相互作用や水素結合相互作用のほかに静電引力相互作用も加わり、低濃度でも優れた分離が得られることを報告した<sup>1), 2)</sup>。一方、酸性化合物に対しても、陽イオン型 CD 誘導体が優れた光学認識能を示すことが期待されるが、その報告例は僅かである<sup>3), 4)</sup>。そこで、今回 4 級アンモニウム基を持つ陽イオン型 CD 誘導体を用いて酸性化合物の光学異性体の分離を試みたので報告する。また、4 級アンモニウム基とカルボキシメチル基の両方を持つ両性の CD 誘導体についても合わせて検討を行ったので報告する。

## 2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は Bio-Rad 製 BioFocus 3000 System, キャピラリーは Polymicro 製のフューズドシリカキャピラリー (内径 50  $\mu\text{m}$ , 長さ 36 cm, 有効長 31.5 cm) をポリアクリルアミドでコーティング処理したものをを用いた。印加電圧は -12 kV または 12 kV, 検出波長は 210 nm, キャピラリーの温度は 20°C で行った。泳動液は

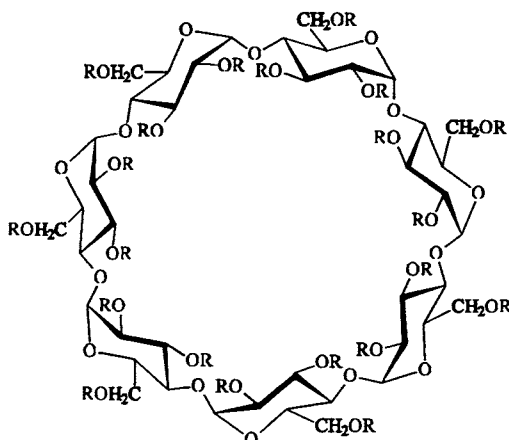
pH 5.0 ~ 7.0 の 50 mMリン酸塩緩衝液に CD 誘導体を溶解して用いた。陽イオン型  $\beta$ -CD 誘導体と両性  $\beta$ -CD 誘導体は シグマアルドリッチジャパン (米国, Spelco, Inc.) から購入した。

### 3. 結果

今回用いた CD 誘導体の構造は Fig. 1 に示した。陽イオン型 CD 誘導体は 1 分子中に 3.5 個の 4 級アンモニウム基を有している。一方、両性の CD 誘導体は 1 分子中に 2 個の 4 級アンモニウム基と 2 個のカルボキシメチル基を有しており、pH 5.0 ~ 7.0 の緩衝液中では電氣的に中性と考えられる。

分離条件に関しては、泳動液は試料の pKa より高い pH のものを用い、試料が負に帯電する条件で行った。また、ポリアクリルアミドでコーティング処理したキャピラリーを用いたので、電気浸透流は抑制されている。つまり、通常は試料の見かけの泳動方向が陽極側となり、試料を陰極側から注入し、印加電圧は -12 kV で行った。しかし、陽イオン型 CD 誘導体に対して結合定数が高い場合のみ、試料の見かけの泳動方向は陰極側となるため、試料を陽極側から注入し、印加電圧は 12 kV で行った。

様々な酸性ラセミ化合物の分離を試みたところ、トロパ酸、クロロワルファリン、ダンシルアミノ酸など多くの光学異性体の分離に成功した。両性の CD 誘導体については、ダンシルアミノ酸の一斉分析に良好な結果が得られた。一例として、トロパ酸の分離例を Fig. 2 に示した。現在、従来からよく用いられているメチル化 CD 誘導体、ヒドロキシプロピル CD 誘導体などとの比較を行っており、報告する予定である。



Cationic  $\beta$ -CD :  $R = -CH_2CH(OH)CH_2N(CH_3)_3Cl$  (DS=3.5)  
Amphoteric  $\beta$ -CD:  $R = -CH_2CH(OH)CH_2N(CH_3)_3Cl$  (DS=2)  
and  
 $R = -CH_2COONa$  (DS=2)

Fig. 1 Chemical structure of used cyclodextrin derivatives.

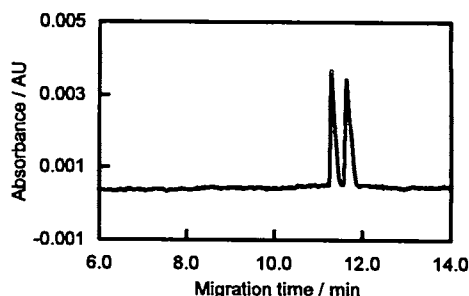


Fig. 2 Separation of racemic tropic acid using a cationic  $\beta$ -CD derivative. Conditions; 5 mM quaternary ammonium  $\beta$ -CD in 50 mM phosphate buffer (pH 5.0), -12 kV, 210 nm.

- 1) 第14回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集 pp. 13 ~ 14 (1994).
- 2) 第56回分析化学討論会講演要旨集 pp. 474 ~ 475 (1995).
- 3) S. Terabe: *Trends Anal. Chem.*, 8, 129 - 134 (1989).
- 4) A. Nardi, A. Eliseev, P. Bocek and S. Fanali: *J. Chromatogr.*, 638, 247 - 253 (1993).

# キャピラリー電気泳動による アミノ酸誘導体の光学異性体 の分離

(姫工大・理) ○山口拓哉、松原則男、大塚浩二、寺部 茂

## OPTICAL SEPARATION OF AMINO ACID DERIVATIVES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Takuya Yamaguchi, Norio Matsubara, Koji Otsuka, Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori,  
Hyogo 678-12 (Japan)

### ABSTRACT

Simultaneous chiral separation of seven DL-dansylamino acids in the presence of 2,3,6-tri-O-methyl- $\beta$ -cyclodextrin was investigated. These amino acid derivatives were successfully separated at pH 2.2 containing 40 mM 2,3,6-tri-O-methyl- $\beta$ -cyclodextrin although these were not separated at pH 9.0 with the same concentration of the cyclodextrin. The suppression of electroosmotic flow may be an effective factor for the separation of these amino acid derivatives.

### 1. はじめに

近年、様々な種類の光学異性体をキャピラリー電気泳動を用いて光学分割をする場合に、泳動液中に光学認識能を持つシクロデキストリン (CD) などを添加して試料の分離がされている。最近になっていくつかの CD 誘導体を用いた光学分割の報告がなされているが、CD 誘導体は誘導化されていない CD に比べて水に対する溶解度が高いなどの多くの利点があり、また、これを用いることによって誘導化されていない CD では光学分割されない試料も分離できるようになる場合が多く見られ、CD 誘導体に関する研究が重要になっている。本研究では CD 誘導体である 2,3,6-Tri-O-methyl- $\beta$ -CD などを泳動液中に添加し、試料としてラセミ体のダンシルアミノ酸 (DL-DNS-AA) を用いて電気泳動を行い、CD 誘導体の性質および選択性について研究、考察を行った。

### 2. 実験

キャピラリー電気泳動装置には Bio-Rad 製 BioFocus 3000 system、キャピラ

リーは Polymicro 製のフューズドシリカキャピラリー（内径 50  $\mu\text{m}$ 、長さ 36 cm、有効長 31.4 cm）のものを用いた。印加電圧は 15.0 kV、検出波長は 210 nm、キャピラリーの温度は 25  $^{\circ}\text{C}$  で実験を行った。泳動液は pH 2.2 のリン酸塩緩衝液及び pH 9.0 のホウ酸塩緩衝液に CD 及び CD 誘導体を溶解して用いた。CD、CD 誘導体は Nacalai Tesque そして DNS-AA は Sigma から購入した。

### 3. 結果・考察

Fig.1 に、pH 9.0 のホウ酸塩緩衝液を用いた場合 (a) と pH 2.2 のリン酸塩緩衝液を用いた場合 (b) での 7 種類の DL-DNS-AA の光学異性体の一斉分離例を示す。試料は DNS-AA (Aba, Leu, Met, Nle, Nva, Phe, Trp) で分離溶液はホウ酸塩緩衝液 100 mM (pH 9.0) およびリン酸塩緩衝液 25 mM (pH 2.2) に 2,3,6-Tri-O-methyl- $\beta$ -CD を 40 mM に調製したものである。(b) では 7 種類の DNS-AA は分離されずに検出されたが、(b) では DNS-AA の相互分離とそれぞれについて光学分割をすることができた。本条件では、2,3,6-Tri-O-methyl- $\beta$ -CD はダンシルアミノ酸相互の分離と D,L 体の光学分割の両方の働きがあることが認められた。

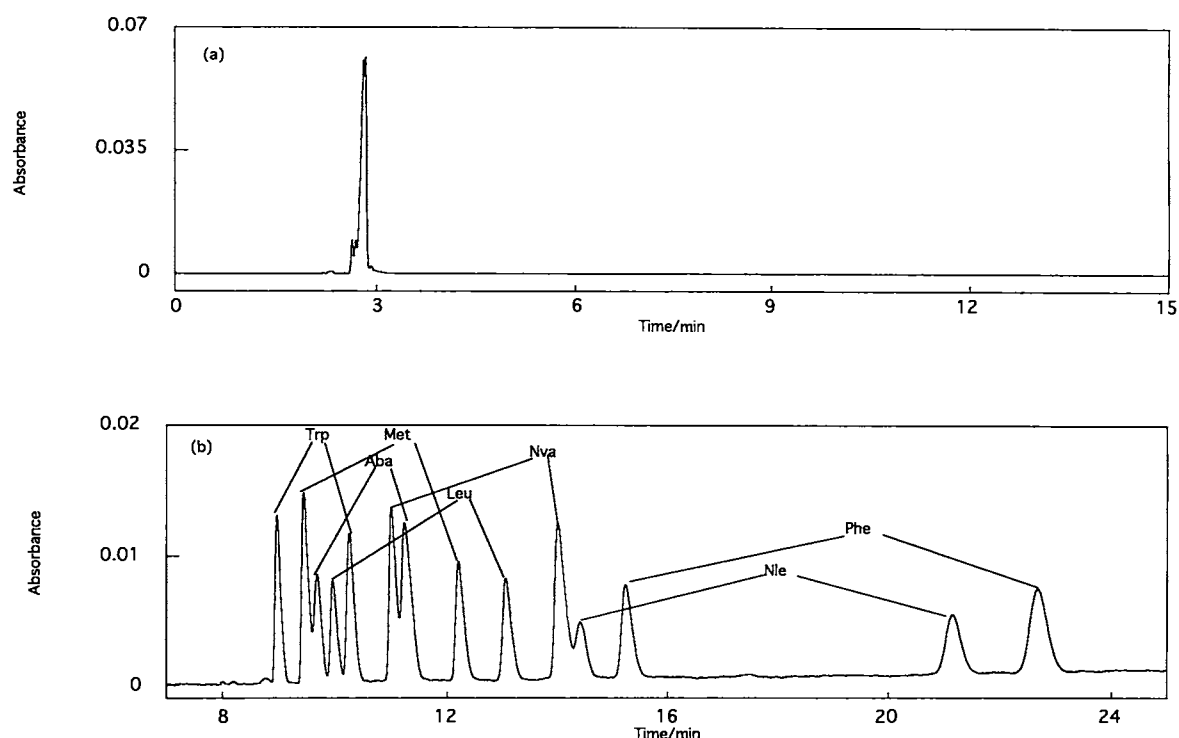


Fig.1. Separation of seven DL-dansylamino acids (Aba, Leu, Met, Nle, Nva, Phe, Trp).

Separation solution, (a) 100 mM borate buffer (pH 9.0) containing 40 mM 2,3,6-Tri-O-methyl- $\beta$ -CD; (b) 25 mM phosphate buffer (pH 2.2) containing 40 mM 2,3,6-tri-O-methyl- $\beta$ -CD. Capillary, 50  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  500 mm. Applied voltage, 15 kV. Detection wavelength, 210 nm. Temperature, 25  $^{\circ}\text{C}$



(<sup>\*</sup>神戸商船大船貨輸送研究施設) (<sup>\*\*</sup>大阪工業技術研究所) (<sup>\*\*\*</sup>神戸女子短大)  
○福士恵一<sup>\*</sup>, 竹田さほり<sup>\*\*</sup>, 脇田慎一<sup>\*\*</sup>, 東 国茂<sup>\*\*</sup>, 日色和夫<sup>\*\*\*</sup>

## APPLICATION OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS TO ANALYSIS OF VEGETABLES

<sup>\*</sup>KEIICHI FUKUSHI, <sup>\*\*</sup>SAHORI TAKEDA, <sup>\*\*</sup>SHIN-ICHI WAKIDA, <sup>\*\*</sup>KUNISHIGE HIGASHI, <sup>\*\*\*</sup>KAZUO HIRO

<sup>\*</sup>Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine, <sup>\*\*</sup>Osaka National Research Institute, AIST, <sup>\*\*\*</sup>Kobe Women's Junior College

Capillary zone electrophoresis was applied to the determination of calcium ion in vegetables. Procedure for the extraction of calcium ion from vegetables such as treatment method of vegetables and the boiling time was examined. The relative standard deviations of the peak area and the migration time for calcium ion were 2.9 and 0.4 %, respectively. Recovery of calcium ion in vegetables was 96–108 %.

Blue mussels and oysters were collected from the pond of our university and fermented using EM (Effective Micro-organisms) to depress the stench caused by the putrefaction. Chingentsuai and komatsuna were cultivated by use of them as the fertilizer. The proposed method was applied to the determination of calcium ion in these vegetables. The calcium content of chingentsuai cultivated using the blue mussel as well as their weight were almost the same as those of commercially available vegetables. It was proved that blue mussels and oysters could be used as a fertilizer for vegetables although the effectiveness of oysters could not be evaluated from the calcium content in chingentsuai and komatsuna.

### 1. 緒 言

港湾の鉛直壁などの中・下層に付着生息するムラサキイガイは、海水中の懸濁態窒素を取り込む水質浄化能をもつが、夏期における脱落・分解により鉛直壁付近の水質を悪化させる原因にもなっている<sup>1)</sup>。したがって脱落前にムラサキイガイを回収すれば、鉛直壁の積極的利用による港湾の水質浄化が可能となる。またムラサキイガイと同様に鉛直壁に付着しているカキも同様の効果をもつと思われる。しかしこの場合、回収したムラサキイガイやカキを放置すれば腐敗臭を放つため、その処理が問題となる。そこで本研究では、回収したムラサキイガイやカキの腐敗による悪臭を軽減するために、これらを発酵処理し、その肥料としての有用性を調べるために、まず、野菜中のカルシウムイオンをキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)により定量する方法について検討した。ついで、肥料化したムラサキイガイ及びカキを用いて野菜を栽培し、収穫した野菜中に含まれるカルシウムイオンを本法により定量し、また野菜の重さも測定し、市販野菜のそれらと比較した。以上の結果について報告する。

## 2. 実 験

装置はパーキンエルマー社製 Model 270Aを使用した。キャピラリー（内径  $50\mu\text{m}$ 、外径  $375\mu\text{m}$ ）の全長は  $72\text{cm}$ 、有効長は  $25\text{cm}$ とし、吸光検出器の測定波長は  $200\text{nm}$ とした。キャリアー溶液として、 $2\text{mMEDTA}$ を含む  $20\text{mM}$ ホウ酸ナトリウム溶液を用いた<sup>2)</sup>。泳動電圧は  $20\text{kV}$ 、恒温槽温度は  $35^\circ\text{C}$ とした。また試料吸引時間は3秒間とした。採取したムラサキイガイ及びカキを市販の発酵堆肥化材 EMで発酵させ、これらを肥料としてチンゲンサイ及びコマツナを栽培した。これらの野菜及び市販の野菜中のカルシウムイオンを以下のようにして定量した。乳鉢ですり潰した野菜  $1.0\text{g}$ を約  $50\text{ml}$ の沸騰水中に加え、 $15\sim 20$ 分間煮沸した<sup>3)</sup>。冷却後、 $0.45\mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過し、水で全量を  $100\text{ml}$ とした。この溶液中のカルシウムイオンをCZEで定量し、検量線法により野菜中のカルシウムイオン濃度を求めた<sup>4)</sup>。また、野菜の生長過程を観察し、収穫後の重さを測定した。

Table 1 Calcium content and weight of chingentsuai

	$\text{Ca}^{2+}(\text{mg/l})$	Weight(g)
Mussel+EM(layer)	146	113
Mussel+EM(mix)	105	110
Mussel(layer)	123	143
Without mussel	—	7
Purchased	136	139

## 3. 結 果

本法によるカルシウムイオンのピーク面積及び泳動時間の繰り返し精度は、それぞれ  $2.9$ 、 $0.4\%$ であり、泳動時間は約5分であった。またTable 1に示すように、ムラサキイガイを肥料として栽培したチンゲンサイ中のカルシウムイオン量及び収穫後の重さは、市販のものとほぼ同程度であった。Fig. 1は、EMで発酵させたムラサキイガイを土の間に約  $1/3$ 程層状に加えた土壌で栽培したチンゲンサイ（Table 1の Mussel+EM(layer)）を本法により処理したときのエレクトロフェログラムである。一方、EMで処理したカキを同様に加えた土壌で栽培したチンゲンサイやコマツナは、十分生長したが、収穫が遅れたため水分が少なく、カルシウム量について市販のものと比較することは困難であった。以上の結果より、本法は、野菜中のカルシウムイオンの定量法として高精度で迅速な方法であり、またムラサキイガイ及びカキは野菜の肥料として使用できることがわかった。

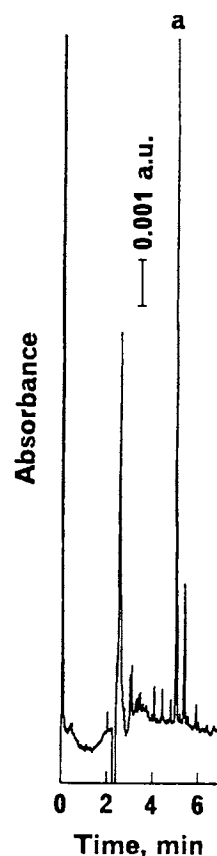


Fig. 1. Electropherogram of a chingentsuai sample. a,  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 文 献

- 1)大阪府立水産試験場，近畿大学：“渚の環境構造とその役割に関する調査研究報告書”，p.108（1993），（大阪府立水産試験場）。
- 2)S. Motomizu, M. Oshima, S. Matsuda, Y. Obata, H. Tanaka:Anal. Sci., 8, 619 (1992).
- 3)石井裕子，滝山一善：第54回分析化学討論会講演要旨集，p. 707 (1993).
- 4)福土恵一，竹田さほり，脇田慎一，東 国茂，日色和夫：第56回分析化学討論会講演要旨集，p. 53 (1995).

# 13                    キャピラリー電気泳動法の                                  食品分析への応用

共立女子短期大学

○津田   淑江、   蓮見   知子

Application of CZE for analysis of foodstuffs

Toshie TSUDA, Tomoko HASUMI

Kyouritsu Women's University

In this study, the composed amino acids of gluten in the processing of bread were analyzed by CZE. CZE analysis of amino acids were performed with CZE Quanta 4000 (Waters) with the following conditions: capillary, fused silica (30cm x 75  $\mu$ m ID); detection, 254nm; buffers, 50mM borate (pH5.0). The sample solution in foodstuffs was included amino acids and the other compounds with similar electrophoretic behavior. Since the separations of different compounds in foodstuffs were not successful, we have to specify the amino acids. The amino acids were derivatized using the procedure previously described. PTC-amino acids were successfully separated from each other. CZE was appropriate method to analyze compounds in foodstuffs.

## 1. 目的および方法

現在の日本では食物繊維の摂取量が不足している。演者らは食物繊維源としておからを取り上げ、食物繊維がパンの物性、食味特性などに与える影響を検討し、パンの機能性を高めることを目的とした研究を進めているが、食物繊維としておからをパン製造時に添加した場合、パンの膨化性は低下した。製パン性における小麦粉の持つ機能特性は、グルテンタンパク質の存在に由来していることが知られている。そこで食物繊維をパン製造時に添加した場合のグルテン形成への影響を調べるため、キャピラリー電気泳動法(CZE)を用いて、グルテン構成アミノ酸の相違点の分析を行い、CZEの食品分析への応用を試みた。

CZE (クオンタ4000; ウォーターズ社製) はFused Silica Capillary 75  $\mu$ m ID x 30cm、試料注入法としては落差法 (10cmx30sec)、検出は254nmを用いた。

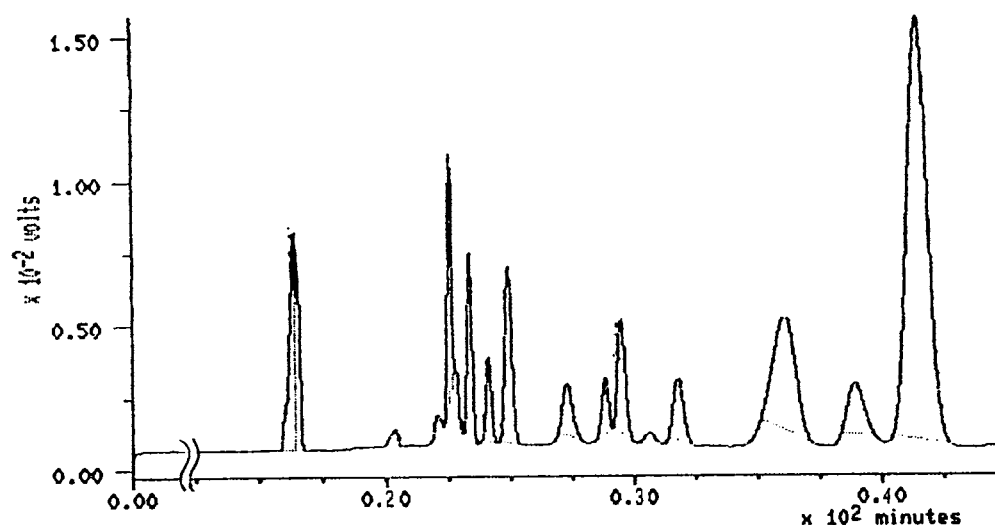
## 2. 結果および考察

バッファーは50mM Borate (pH5.0)を用い、加水分解したグルテンの泳動を行った。その結果、おからを添加した場合と、しない場合の泳動パターンの違いが確認されたが、同様の電荷を持ち、同じ移動度を有するアミノ酸以外の物質が存在するため、多くのピークが泳動されてきた。食品を試料とし、抽出液を直接分析に用いた場合、食品中にはアミノ酸以外の成分が多量に存在しており、得られたピークをアミノ酸と同定することが困難な場合がある。そのため試料の前処理または特定化が必要となってくることが多い。そこでアミノ酸をフェニルチオカルバミル (PTC) 誘導体化しCZEの泳動にどのように影響するか、また実際の食品中のアミノ酸分析に応用できるかどうか検討を行った。

まずCZEにおける泳動条件を検討した結果、50mMBorate pH3.0、4.0においてはいずれもイオンの分離性は悪かった。pH5.0、6.0においては各アミノ酸のピーク対の分離に問題が残ったが、SDSを10mM、50mM、75mM添加、Ureaを1M、2M、4M添加し、泳動を行った結果、分離能は改善されていった。最も良好な分離が得られたのはpH5.0、SDS75mM、Urea1Mを添加した泳動条件で、18種類の標準アミノ酸誘導体において良い分離能が得られた。

この分析条件でパン生地中のグルテン中のアミノ酸の泳動を行った。

Fig.1はおからを添加したパンの生地中のグルテンを加水分解した場合の泳動パターンである。きれいに分離した泳動パターンが得られ、定性、定量が可能となり食品中の分析に応用できることが明らかとなった。



**Fig.1 Capillary zone electrophoresis of the composed amino acids of gluten from Okara-bread**

## ANALYSIS OF RARE-EARTH ORES BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

Yuuki Manabe, Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Rare-earth ores were analyzed by capillary zone electrophoresis, where a new supporting electrolyte containing  $\alpha$ -HIB ( $\alpha$ -hydroxyisobutyric acid) and malonic acid as the complex forming agent was used to separate 15 rare earth ions (14 lanthanide and yttrium ions) simultaneously. Optimization of the electrolyte system and the utility of CZE over rare-earth ore analysis was discussed in comparison with the other analytical methods.

1. 緒言 希土類鉱石におけるマトリックス中の微量元素の分析はどのような分析法においても困難な分析の一つである。例えば AES における分光干渉、MS における同位体干渉、X 線分析におけるマトリックス効果などにより、それら本来の分析能力が妨害される事がある。このような場合、分離分析法が有効である。我々は高感度・高精度な分離分析法として、等速電気泳動分離-PI X E 分析法をこのような試料の分析に使用してきたが、実験時間がかかる点が問題であった。

一方キャピラリー電気泳動法 (CE) は、高感度で迅速分析が可能であるといった特徴がある。そこで、我々は CE 法を用いて、希土類鉱石中の成分がどのくらい微量まで定量できるかについて検討したので報告する。分析に当たっては、今回新たに開発した希土類 15 種 (Lanthanide+Y) の分離を可能にする電解液を使用した。

2. 実験 分離最適化用の標準試料は等濃度希土類混合物で、泳動時間・ピーク面積の補正のためアルカリ金属イオン (K, Na, Li) を添加した。希土類鉱石は塩酸溶解もしくはアルカリ溶融で調製し、同様にアルカリ金属イオンを添加した。電解液は、 $\alpha$ -HIB ( $\alpha$ -ヒドロキシイソ酪酸) とマロン酸を錯形成剤とし、これにクレアチニンを間接 UV 検出用に 30mM 加え、更に 2-エチル-n-酪酸で pH を 4.8 に調整したものをを用いた。CE モードはゾーン電気泳動法である。分析に使用した装置は CAPI-3100 (大塚電子) で、キャピラリーとしては内径 75  $\mu$ m の合成シリカキャピラリー (大塚電子) を全長 70cm、有効長 57.7cm で使用した。温調設定は 25°C にして行った。

3. 結果と考察 鉱石中にはかなりの量の Y が含まれているが、従来使用されてきた HIB を錯形成剤とする電解液条件では Y と Dy の分離が不可能である (Fig. 1 a)。そこで HIB の分離効果を妨げず Y と Dy の分離を可能にする補助錯形成剤を検討した。酒石酸を添加すると、Y と Dy は分離可能になったがその代わりに Eu と Gd は分離不可能になった (Fig. 1 b)。今回、マロン酸を補助錯形成剤として添加することにより、希土類 15 種の分離が可能になった (Fig. 1 c)。

この電解液をイオン吸着型鉱石の分析に応用した。フェログラムを Fig. 2 a に、分析結果を Table 1 に示した。図より明らかなように HIB-マロン酸電解液系では、希土類 15 種が検出可能であった。この実験では Y と Dy の分離は十分であったが、キャピラリー長は 1m 必要であった。70cm では Fig. 2b に示すように Y と Dy の分離は不十分であった。なお Fig. 2c に示すように、HIB のみを錯形成剤とする系では Y と Dy は分離できない。以上のように今回開発した電解液を使用すれば CE 法で希土類鉱石中の 1% 以下の成分も分析することが可能であった。本実験で検出された最小存在量の元素は Lu で全希土に対して 0.5% であった。講演では他の希土類鉱石の分析例についても報告する。

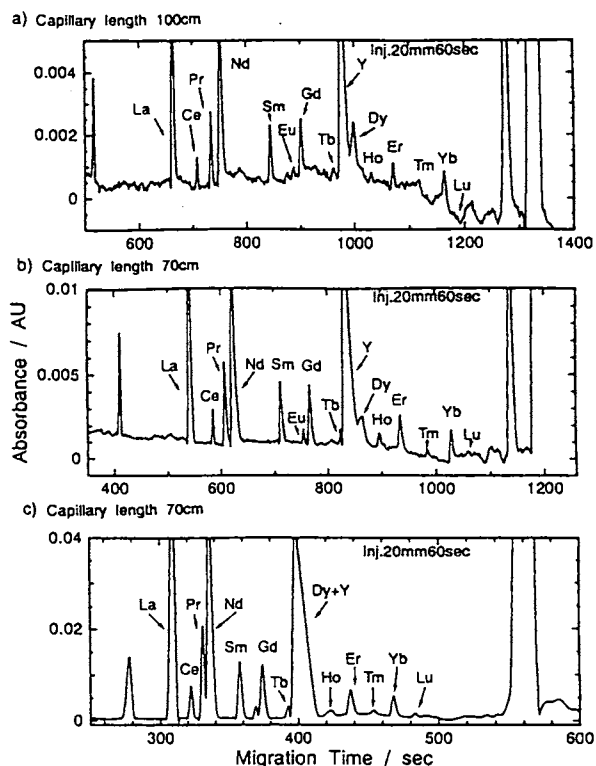
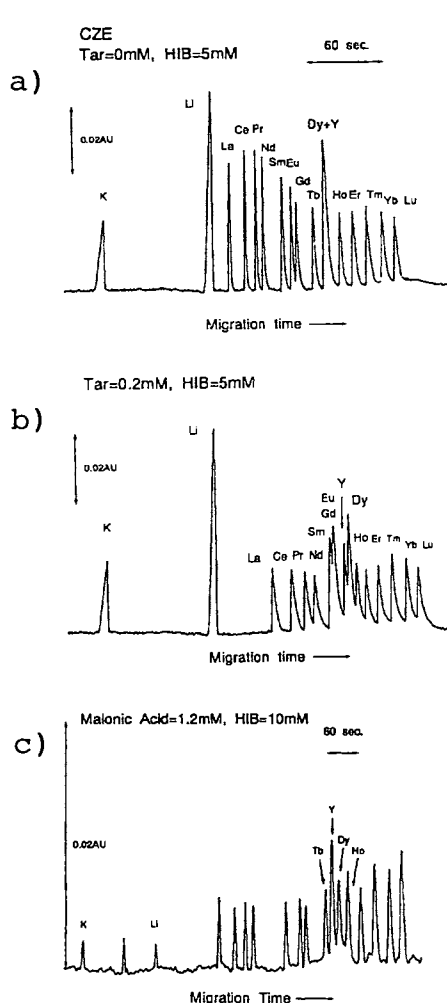


Fig. 2 Electropherogram of ion- adsorption type ore in  $\alpha$  -HIB electrolyte system and  $\alpha$  -HIB and malonic acid electrolyte system

Fig. 1 Electropherogram of 15 rare earth ions obtained by using 3 electrolyte systems

Table. 1 Analytical results of ion-absorption type ore

RE	CZE ( $\alpha$ -HIB)		CZE ( $\alpha$ -HIB and malonic acid)		IP-PIXE	PIXE
Samp. Conc.	0. 2g/l	1. 86g/l	0. 2g/l	1. 86g/l	2g/l	0. 5g/l
Inj. Vol.	30nl	30nl	30nl	30nl	14 $\mu$ l	14 $\mu$ l
Inj. Amount	3ng	55. 8ng	3ng	55. 8ng	28 $\mu$ g	7 $\mu$ g
R. E/Total R. E. E (%)						
La	25. 6	(26. 5)	27. 8	(27. 8)	27. 1	25. 3
Ce	2. 7	2. 7	2. 2	2. 3	2. 48	2. 9
Pr	6. 0	(6. 1)	5. 3	(5. 6)	6. 62	7. 3
Nd	21. 6	(23. 2)	24. 4	(24. 6)	22. 7	22. 8
Sm	5. 0	4. 5	4. 5	4. 7	4. 69	4. 40
Eu	1. 2	0. 88	-	0. 67	0. 97	1. 8
Gd	5. 0	5. 0	3. 4	5. 1	4. 56	5. 2
Tb	1. 1	0. 76	-	0. 65	0. 59	1. 2
Dy	-	-	2. 0	-	3. 92	3. 4
Ho	1. 4	0. 91	-	0. 45	0. 88	0. 6
Er	2. 4	2. 1	2. 4	1. 9	1. 84	1. 7
Tm	-	0. 30	-	0. 14	0. 37	0. 2
Yb	2. 0	1. 5	2. 1	1. 7	1. 45	2. 80
Lu	-	0. 22	-	0. 48	0. 16	0. 4
Y	26. 1*	26. 0	24. 9	(24. 6)	21. 7	21. 0
	100	100	100	100	100	100

\* The amount of Dy was included

1)T. Hirokawa, W. Xia, F. Nishiyama, H. Takemi, K. Ito and E. Shoto

Anal. Sci. , 804, 11 (1995)

# アリザリンコンプレクソンを キレート剤とした金属イオンの キャピラリー電気泳動

(岡山理大・理) ○横山 崇・善木道雄

## CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF METAL IONS USING ALIZARIN COMPLEXONE AS A CHELATE REAGENT

Takashi Yokoyama and Michio Zenki

Faculty of Science, Okayama University of Science

Separation behavior of metal ions with ALC was investigated for additives in electrophoretic buffer by capillary electrophoresis. The ferrous and cupric ion were separated from five transition metal ions (i.e., Fe, Co, Ni, Cu, and Zn) in electrophoretic buffer of 10 mM sodium tetraborate in presence of  $1 \times 10^{-3}$  M ALC. The order of electrophoretic mobilities was as follows:  $\text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ . When 10 v/v% pyridine was added into the borax electrophoretic buffer containing  $1 \times 10^{-3}$  M ALC, the electrophoretic mobility of the cupric ion was larger than that of the ferrous ion.

### 【緒言】

当研究室では、2座配位のキレート剤を用いて、キャピラリー電気泳動による金属イオンの分離を検討してきた。<sup>1)</sup> その結果、金属イオンとキレート剤が1:1もしくは1:2となり空位な配位座が存在すると、水酸化物イオンが配位し、分離挙動が異なることを見出した。<sup>2)</sup> アリザリンコンプレクソン (ALC) は、ランタンイオンとフッ化物イオンとの三元錯体がよく知られているように、金属イオン (M) と Fig. 1 のような水酸化物イオン、フッ化物イオンや水などが配位可能な1:1のキレートを形成する。そのため、電気泳動バッファー中に種々の配位子を添加することで金属イオンの分離挙動を変化させることができると考えられる。そこで、添加剤としてフッ化物イオン、チオシアン酸イオン、ドナー性有機溶媒を用いて、Fe、Co、Ni、Cu、Znの金属イオンについて分離挙動を検討した。

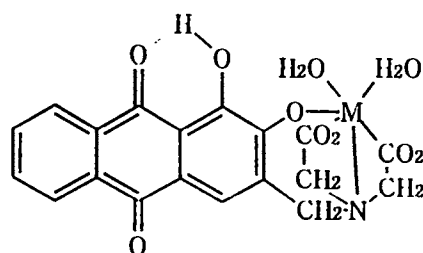


Fig. 1 M-ALC complex.

## 【実験】

装置は大塚電子製 CAPI-3000 を、キャピラリーはジューエルサイエンス社製の溶融シリカキャピラリー 75  $\mu\text{m}$  i.d. x 500 mm (有効長 378 mm) を用い、電圧 20 kV、波長 280 nm、温度 30  $^{\circ}\text{C}$  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。電気泳動バッファーとして、 $1 \times 10^{-3}$  M ALC を含む四ホウ酸ナトリウム溶液を用いた。添加剤のトリエチルアミン (TEA)、ピリジン (Py)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、アセトニトリル (AN)、メタノール (MeOH)、ジオキサン (DO) などの有機溶媒は、電気泳動バッファー中に 10 v/v%、フッ化物イオン、チオシアン酸イオンなどの陰イオンは 5 mM 添加した。

## 【結果と考察】

Fig. 2 に  $1 \times 10^{-3}$  M ALC を含む四ホウ酸ナトリウム溶液を電気泳動バッファーとした各々 1 ppm の Fe、Co、Ni、Cu、Zn 混合サンプルの電クロフェログラムを示す。(Co、Zn、Ni)、Fe、Cu の順に分離が得られた。ALC と安定な錯体を生成する La や Ce は Fe と Cu の間にピークが現れた。

Fig. 3 に有機溶媒を添加したときの各々の金属イオンの電気泳動移動度 ( $\mu_{ep}$ ) を示す。この電気泳動バッファーにピリジンを添加した場合 Cu の移動時間が

Fe よりも速くなった。

これは、Cu-ALC 錯体に配位した水酸化物イオンがピリジンと置換したためと考えられる。しかしながら、他の Fe、Co、Ni、Zn については大きな分離挙動の変化は見られなかった。

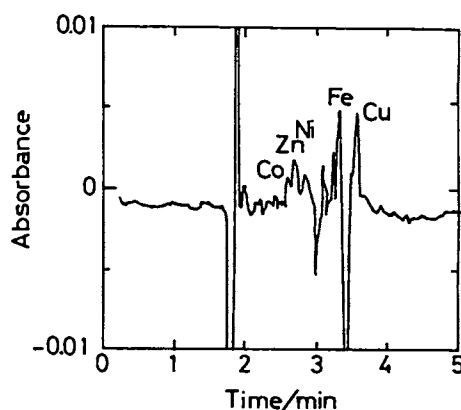


Fig. 2 Electropherogram of five metal ions.

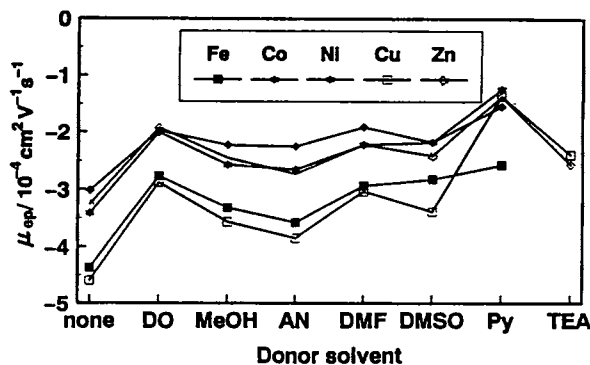


Fig. 3 Dependence of  $\mu_{ep}$  on additives of organic solvents.

## 【文献】

- 1) 赤松、横山、善木、日本分析化学会第 44 年会、p16 (1995).
- 2) 横山、善木、第 56 回分析化学討論会、p204 (1995).



# キャピラリー電気泳動法によるアルカリ金属、 アルカリ土類金属、アンモニウムイオンの分離

(広島大・工) ○伊藤一明・広川 健

## SEPARATION OF ALKALI METAL, ALKALINE-EARTH METAL, AND AMMONIUM CATIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Kazuaki ITO

Environmental Science, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Takeshi HIROKAWA

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

The separation of alkali metal and alkaline-earth metal and ammonium cations was investigated by capillary electrophoresis (CE) using polyethylene glycol (PEG) and tartaric acid ( $H_2Tar$ ) as electrolyte systems. Creatinine was used as a visualization co-ion for indirect UV detection (254 nm). The separation of all the analyte cations was enhanced by the complexation with PEG and the separation of alkaline-earth metal cations was also enhanced by complex formation with tartrate ions. Separation patterns of alkaline-earth metal cations by  $H_2Tar$  in  $H_2O$  were in good agreement with the results calculated. Thus, the complete separation of analyte cations was shown with PEG and  $H_2Tar$ .

### 1. はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) 法は、簡便で、しかも高い分離性能を示すため、低分子量のイオン性物質の分離・定量に汎用されているイオンクロマトグラフ (IC) 法に替わる新しい手法として注目されている。しかし、CE 法では、溶液中で同じ移動度を持つイオンの分離は困難である。

アルカリ金属、アルカリ土類金属、アンモニウムイオンの分離は、その一例であり、錯形成剤などを含まない水溶液では、幾つかのイオンは分離が困難である。このため、これまでに (1)電気的に中性な環状ポリエーテルとの錯形成、(2)有機溶媒の添加による溶媒和、(3)陰イオン性リガンドによるイオン対形成による分離が検討されているが、すべてのイオンの移動度の差は大きくないため完全分離は難しい。

本実験では、ポリエチレングリコール、酒石酸を電解液の添加剤として用い、目的イオンの完全分離を検討した結果を報告する。

### 2. 実験

CE実験には、日本分光製CE-875型電気泳動システムを用い、キャピラリーには内径 $50\mu m$ 、長さ50 cm (有効長30 cm) の合成シリカ管を用いた。電解液は、30 mMクレアチニンと15 mM塩酸水溶液であり、分離のために更にエチレングリコール (0 - 60 %, v/v) と酒石酸 (0 - 7.5 mM) を添加した。測定は、印加電圧+10 ~ +30 kV、

20℃で行ない、試料導入は電気泳動法によった。検出には、254 nmでの間接吸光法を用いた。

### 3. 結果と考察

目的イオンの分離におけるPEG添加量効果を調べる前に、その分子量の影響を検討した。分子量の増大とともに、移動度、電流値の減少が顕著であったので、平均分子量200のPEGを用いた。Fig. 1 にH<sub>2</sub>O - PEG (0-60%, v/v) 混合溶液中での、Li<sup>+</sup>に対する各イオンの相対移動度を示す。PEGの添加により、PEGを含まない電解液系では分離が困難な1価イオンの組み合わせ(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)と(Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>)

の分離を含め、6種の1価イオンの分離が可能であったが、高いPEG含量においては相対移動度の差が小さくなった。2価イオンについても、(Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>)の分離を含め4種のイオンの分離が可能であり、PEG添加効果は1価イオンより大きかった。

Fig. 2 に酒石酸の添加効果を示す。1価イオンにおいては、ほとんど移動度に変化がなかったのに対し、2価イオンでは7.5mM酒石酸の添加により4種のイオンが十分に分離された。酒石酸イオンとの錯形成定数が大きいCa<sup>2+</sup>は、酒石酸の添加による移動度の減少効果が大きく、一方錯形成定数の小さいMg<sup>2+</sup>では、小さかった。この酒石酸の添加効果を、各イオンに既知の錯形成定数などを用い、移動度の変化を計算したところ、ほぼ同様の添加効果を再現することができた。また、PEG含有する系においても、1価、2価イオンとも同様な酒石酸の添加効果を得ることができ、目的イオンの完全分離系を得た。

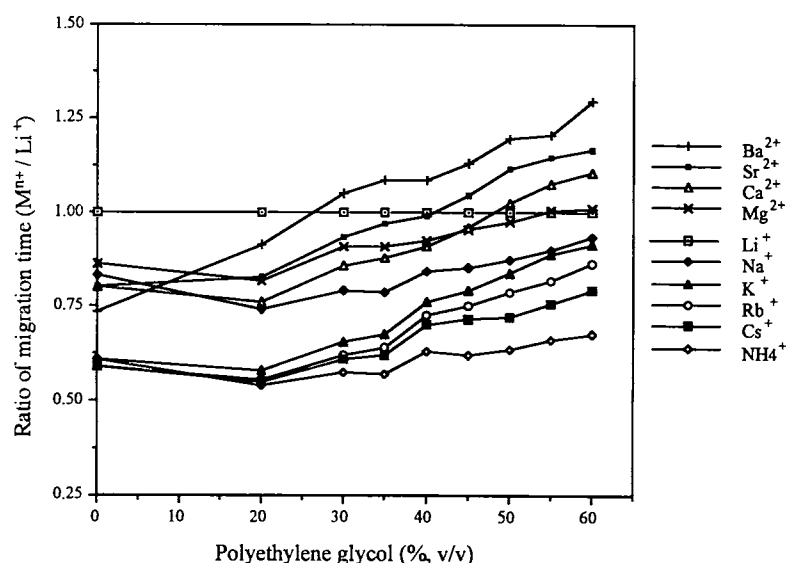


Fig.1 Effect of PEG on ratio of migration time of Mn<sup>2+</sup> to Li<sup>+</sup>

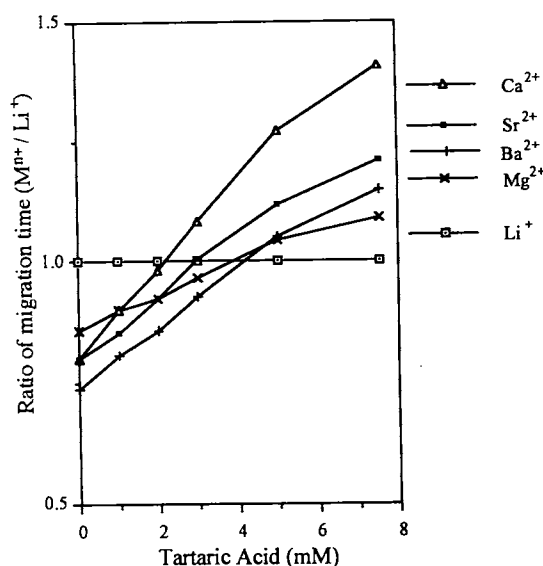


Fig.2 Effect of H<sub>2</sub>Tar on ratio of migration time of Mn<sup>2+</sup> to Li<sup>+</sup>

# 17 錯形成反応を伴う混合希土類金属イオンの電気泳動に関する数値シミュレーション

(阪大基礎工)

○平田雄志, 向井寛, 山端景子

NUMERICAL SIMULATION OF ELECTROPHORETIC SEPARATION OF MIXED RARE-EARTH IONS WITH EDTA COMPLEX FORMING REACTIONS

Yushi Hirata, Hiroshi Mukai and Keiko Yamaberi

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University

Numerical simulation for continuous electrophoretic separation of mixed rare-earth ions was carried out by combining the ion transport equation with the equilibrium relation of complex-forming reactions with EDTA. It has been confirmed that the numerical simulation is a powerful tool for improving operational conditions and finding an optimum condition for high performance of electrophoresis.

## 1. はじめに

一般に、電気泳動の分離能に関する因子は多種（印加電圧、泳動液pH、泳動液中のイオン種など）にわたる。例えば、EDTA錯形成反応を利用する本研究の系では、2成分希土類金属イオンの分離においても泳動・拡散現象に關与する化学種は10種以上に達し、これらの因子の影響を実験的に調べて分離条件を検討することは通常大変な労力を伴う。したがって、コンピュータを利用した泳動分離過程のシミュレーション解析は最適な分離条件の探索に有力な武器となる。

## 2. 解析法

z方向に一樣流速で泳動液が流れ、それに直角のx方向に電場が印加され、反応を起こしながらイオンが泳動・拡散している系を解析の対象とする。このような系におけるイオンの定常泳動・拡散現象は次式で記述される。

$$V_z \frac{\partial C_i}{\partial z} = \frac{\partial}{\partial x} \left( D_i \frac{\partial C_i}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial x} \left( U_i C_i \frac{\partial \phi}{\partial x} \right) + R_i \quad (1)$$

ここで、 $R_i$  は反応による化学種iの生成速度である。

本系における希土類金属イオン  $M_i^{3+}$  とEDTA ( $H_4L$ ) との反応では、全解離した  $L^{4-}$  が希土類金属イオン  $M_i^{3+}$  と反応する。この場合の反応速度は關係するイオンの泳動・拡散速度に比べて速いので、 $M_i^{3+}$  と反応によって生成した  $M_iL^-$  はあたかも一つのイオンとして泳動・拡散し、その移動度は次式で表される。

$$U_i = F(\omega_{Mi} Z_{Mi} C_{Mi} + \omega_{MiL} Z_{MiL} C_{MiL}) / (C_{Mi} + C_{MiL}) \quad (2)$$

希土類金属イオンの水和半径とEDTA錯イオンの半径とは同程度と考えられるので、 $\omega = \omega_{Mi} = \omega_{MiL}$  と

おき、さらに $Z_{\text{Mi}}=3$ ,  $Z_{\text{MIL}}=1$ および錯安定度定数 $K_{\text{Mi}}$ を用いると、次式が得られる。

$$U_i/\omega F = (3 - K_{\text{Mi}}C_L)/(1 + K_{\text{Mi}}C_L) \quad (3)$$

上式は、錯安定度定数の違いによって移動度が異なることを示している。すなわち、錯形成反応を利用することによって希土類イオンの電気泳動分離が可能となる。これらの式をそれぞれ関係するイオンに対して適用し、コンピュータ・シミュレーションにより泳動拡散過程を検討した。

### 3. シミュレーション結果

La・Ce 2 成分系の結果を以下に述べる。計算条件は、泳動槽に流入する $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$  は同一濃度で  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ , EDTAの濃度は  $5 \times 10^{-4}\text{M}$  である。

電圧を印加しない場合のシミュレーション結果を図1に示す。下方から上方に向かって泳動液は流れており、希土類金属イオンは中央部に供給されている。この場合は泳動は生じないので、拡散過程のシミュレーション結果となる。下流方向に拡散が進行して行く様子がよく分かるが、シミュレーション計算では数値拡散が生じ、それが分子拡散に重畳するので、基礎式を差分化するときには高次の項まで考慮する必要がある。pH=2.45, 無次元印加電圧 $\Phi=\phi F/RT$ の条件における泳動拡散過程を図2に示す。pHが一定であるので、この条件はゾーン電気泳動に対応する。Laが陽イオン、Ceが陰イオンとして、それぞれ陰極、陽極へ向かって拡散しながら泳動してゆく様子を示している。

次に、陽極側のpHを2.1、陰極側のpHを2.7として直線的なpH勾配を泳動槽内につけた場合のシミュレーション結果を図3に示す。この場合は等電点電気泳動に対応する。La, Ce 各イオンがそれぞれの等電点へ向かって泳動し、集中化してゆく様子を示している。実験的に連続的なpH勾配を泳動槽内に設定することは通常は困難であるので、ステップ状のpH勾配を設定した場合のシミュレーションも行った。結果を図4に示す。入り口での試料のpHは2.4 であり、試料より陽極側ではpH=2.1、陰極側ではpH=2.7である。水素イオンの拡散とともに鋭いpH勾配が形成され、そのために著しいLa, Ce イオン集中化が生じている。

数値シミュレーションでは差分化に伴う誤差や打ち切り誤差などを必ず伴うので、結果の妥当性を確かめるためには実験との照合が必要となる。結果の妥当性が確かめられた後は、本要旨に示したように数値シミュレーションは分離条件の検討に有力な武器となる。

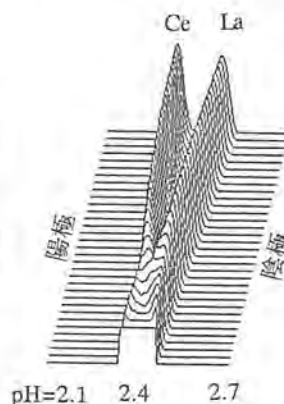
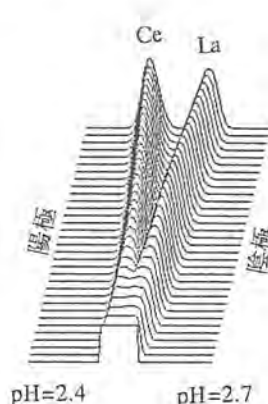
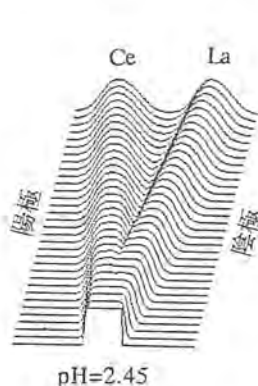
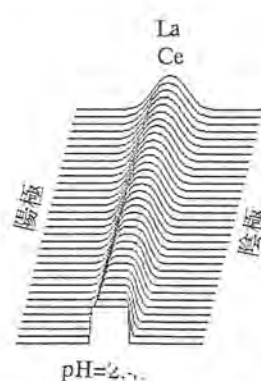


Fig.1 Diffusion process

Fig.2 Zone electrophoresis

Fig.3 Isoelectric focusing  
(Continuous pH gradient)

Fig.4 Isoelectric focusing  
(Stepwise pH gradient)

# 18                   スタッキング効果を利用する無機陰イオンの 直接吸光ーキャピラリー電気泳動分析

(岡山大理)   ○高柳俊夫・和田榮子・広井康子・本水昌二

Direct Photometric Detection of Inorganic Anions by Capillary Zone Electrophoresis  
Using Stacking Effect

Toshio Takayanagi, Eiko Wada, Yasuko Hiroi, and Shoji Motomizu

Faculty of Science, Okayama University

Stacking effect on the shape of sample peak was examined using  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in the analyses of inorganic anions by capillary electrophoresis – direct photometric detection method. Applied were three types of capillary: (1) a dynamically coated capillary with tetradecyltrimethylammoniumbromide ( $\text{TTMA}^+\text{Br}^-$ ), (2) a polymer coated capillary, and (3) an untreated fused silica capillary coupled with low pH migrating solutions. By using stacking effect, the signals became sharper, and the separation of anions, especially in nitrate and nitrite, was improved.

## 1. 緒言

無機陰イオンのキャピラリー電気泳動分析法としては、クロム酸イオンを間接吸光試薬として用いる分析法が知られている<sup>1)</sup>が、演者らはモリブデン酸イオンを間接吸光試薬として用いる分析法および陰イオンの泳動挙動<sup>2)</sup>、ポリマーコーティングキャピラリーと有機系間接吸光試薬を用いる分析法<sup>3)</sup>を提案してきた。しかしながら、これらの分析法では、ピーク間の分離が芳しくない場合もあったので、試料注入後のスタッキング効果を利用し、シグナルの鋭敏化・分離性能の向上について検討した。スタッキング試薬として、紫外領域にあまり吸収帯のない硫酸イオンを用いることにより、硝酸・亜硝酸イオンの良好な分離が達成され、高感度な直接吸光検出法が可能となった。

## 2. 実験

キャピラリー電気泳動装置としては、Applied Biosystems 270A-HT を使用した。装着したキャピラリーとして、a) 臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム( $\text{TTMA}^+\text{Br}^-$ )をダイナミックコーティングした全長 72 cm, 検出器までの有効長 50 cm, 内径 75  $\mu\text{m}$  の熔融シリカキャピラリー、b) 内壁をポリマーコーティングした全長 78 cm, 検出器までの有効長 55 cm, 内径 50  $\mu\text{m}$  のもの(ProFocus™, Applied Biosystems), c) 全長 72 cm, 検出器までの有効長 50 cm, 内径 50  $\mu\text{m}$  のもの、について検討を行った。試料イオンに対するスタッキング試薬として、泳動液に 0 ~ 30 mM の硫酸ナトリウムを添加した。

カソード側から減圧法により 3 秒間 (約 9 nL) 試料を注入し、20 kV で電気泳動を行い、220 nm で吸光度を測定した。測定中、キャピラリーは 35℃ 恒温とした。各陰イオンの泳動挙動は移動度から解析した。

## 3. 結果および考察

a) ダイナミックコーティングキャピラリーでの検討：第四級アンモニウムイオンでダイナミックコーティングしたキャピラリーでは、陰イオンの泳動方向と電気浸透流の方向が一致しており、すべての陰イオンが検出器に到達する。泳動液・測定条件の最適化を行い、( $\text{TTMA}^+\text{Br}^-$ ,

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Borax) を含む泳動液 (pH 8.1) を用いたところ, Fig.1 a) に示すフェログラムが得られ, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> などの陰イオンの検出が可能となった. 各陰イオンは 6 分以内で検出でき, 硫酸イオンを用いない場合 (Fig.1 b) と比較してピーク間の分離は良好であり, いずれのピークもシャープになった. 10<sup>-6</sup> ~ 10<sup>-5</sup> M 程度の硝酸イオン, 亜硝酸イオンの検量線は良好な直線関係を示した. 硫酸ナトリウム添加量の増加に従って, ピーク高は大きくなった. なお, 泳動液の pH 変化は検出時間, ピーク形状に影響を与えた.

b) ポリマーコーティングキャピラリーでの検討: 本系ではポリマーコーティングによって電気二重層の形成が抑制され, 電気浸透流がほとんどないことが特徴である. 泳動液として (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Borax) を含む pH 8.1 の泳

動液を用いて検討した. Br<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> を検出できたが, ベースラインノイズが大きく, Anitron buffer を用いる間接吸光検出法<sup>3)</sup>と比較して検出感度も低い.

c) 電気浸透流を制御した溶融シリカキャピラリーでの検討: 処理を施していない溶融シリカキャピラリーでは電気浸透流の方向と陰イオンの電気泳動の方向が逆となる. しかし, 低 pH の泳動溶液を用いれば表面シラノールの解離を押さえることにより陰イオンの検出が可能となる. モノクロロ酢酸緩衝溶液 (pH 3.2) に硫酸ナトリウムを添加して, スタッキング効果の検討を行った. そのフェログラムを Fig.2 に示す. S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, I<sup>-</sup> が検出できた. 硫酸ナトリウムの添加量の増加に従って, ピークは鋭くなり, 見かけの理論段数は大きくなった. 亜硝酸イオンは一部 HNO<sub>2</sub> として存在するので硝酸イオンや他の成分とのピーク分離は問題ないが, 8 分以内の検出には 20 mM 以上の硫酸ナトリウムの添加を必要とした. これは, pH 低下とイオン強度の増大により浸透流が抑制された結果と考えられる. なお, 亜硝酸イオンの検出時間は泳動液の pH を変化させることで容易に制御できた.

#### 4. 結論

各種キャピラリーを用いた陰イオンの直接吸光検出では, 検出に要する時間は電気浸透流の制御と化学種の溶存状態に依存している.

低 pH 泳動液を用いる方法では, 泳動液の単純さという利点に加え再現性の良さが特徴であり, イオンによれば非常に高感度な定量も可能である. 硫酸ナトリウムの添加は電気浸透流の抑制とともに注入試料の大きなスタッキング効果を実現し, 高い分離性能と高感度化が達成された.

#### 5. 文献

1) N. J. Benz and J. S. Fritz, *J. Chromatogr. A*, 671, 437(1994). 2) 高柳, 広井, 本水, 日本分析化学会第44年会, 講演要旨集p22. 3) 恩田, 小畑, 白根, 和田, 本水, 日本分析化学会第44年会, 講演要旨集p21.

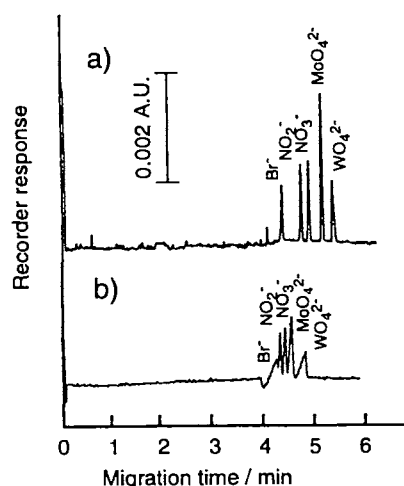


Fig.1 Typical electropherograms for anions with a stacking reagent in a dynamically coated capillary.  
Sample: Br<sup>-</sup>, WO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 5×10<sup>-5</sup> M; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1×10<sup>-5</sup> M.  
Carrier: TTMA+Br + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + borax (pH 8.1).  
a) SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> was added in the carrier; b) without SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

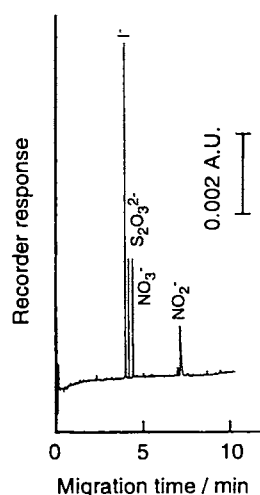


Fig.2 Typical electropherogram for anions in a pH controlled capillary.

Sample: 1×10<sup>-4</sup> M anions.  
Carrier: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> was added (pH 3).

# キャピラリー電気泳動による次亜塩素酸と次亜塩素酸イオンとの化学平衡について

(大塚電子株式会社) ○佐藤 康博、笹 一志、北岸 恵子

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF IONIZATION EQUILIBRIUM OF HYPOCHLOROUS ACID BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

YASUHIRO SATO, KATSUSI SASA, KEIKO KITAGISHI  
OSTUKA ELECTRONICS CO., LTD

Electrophoretic mobility of sodium hypochlorite was measured in the pH range between 5.4 and 9. The mobility decreases as pH increases, due to the ionization of hypochlorous acid. Ionization equilibrium can be evaluated by the pH dependence of electrophoretic mobility.

### 〔緒言〕

次亜塩素酸 ( $\text{HClO}$ ) は細菌や色素を酸化し、殺菌・漂白する作用が強力なため、殺菌剤・漂白剤・洗浄剤として広く使用されている。この  $\text{HClO}$  は pH が高くなると殺菌・漂白作用の低い次亜塩素酸イオン ( $\text{ClO}^-$ ) に変化する。このことから次亜塩素酸の殺菌剤・漂白剤・洗浄剤としての性能評価において  $\text{HClO}$  と  $\text{ClO}^-$  の分析は重要である。しかし、従来  $\text{HClO}$  の評価法として用いられている有効塩素濃度では塩化物イオン ( $\text{Cl}^-$ ) や塩素酸イオン ( $\text{ClO}_3^-$ ) を含んだものとなり次亜塩素酸の評価は困難であった。そこで、我々はキャピラリー電気泳動を用いて泳動液の pH 変化による  $\text{HClO}$  と  $\text{ClO}^-$  の解離状態の変動について検討を行った。

### 〔実験〕

キャピラリー電気泳動装置は大塚電子社製 CAPI-3100 を用いた。使用したキャピラリーは大塚電子社製の内径  $75\mu\text{m}$ 、有効長  $60\text{cm}$  の合成シリカキャピラリーチューブである。

サンプルとしては和光純薬社製次亜塩素酸ナトリウムを用いた。泳動液は pH 5.4 ~ 9 に調整したホウ酸緩衝液を使用した。印加電圧は全て  $15\text{kV}$  で行った。

# 〔結果〕

pH5.4から9における泳動でサンプルはいずれも1本のピークとして検出された。pH5.4とpH9で測定した結果を図1と図2にそれぞれ示す。すでに報告されているHClOとClO<sup>-</sup>の存在比 [1] から pH5.4で得られたピークはHClOであり、pH9で得られたピークはClO<sup>-</sup>であると考えられ、pH5.4から9.0でのピークの移動度についてpHの違いによって生じる電気浸透流速度を補正した値をpHに対してプロットした結果を図3に示す。pH5.4付近ではサンプル溶液中における大部分がHClOとして存在するため移動度は0となり、pHが大きくなるのに伴い負電荷を有するClO<sup>-</sup>が増加するために移動度は顕著に減少した。

HClO $\rightleftharpoons$ ClO<sup>-</sup>+H<sup>+</sup>のイオン化平衡において $K_a = [\text{ClO}^-][\text{H}^+] / [\text{HClO}]$ で表される。図3の電気泳動移動度のpH依存性からHClOのpK<sub>a</sub>は約7.6と求められ、従来法で求められた値と一致した。

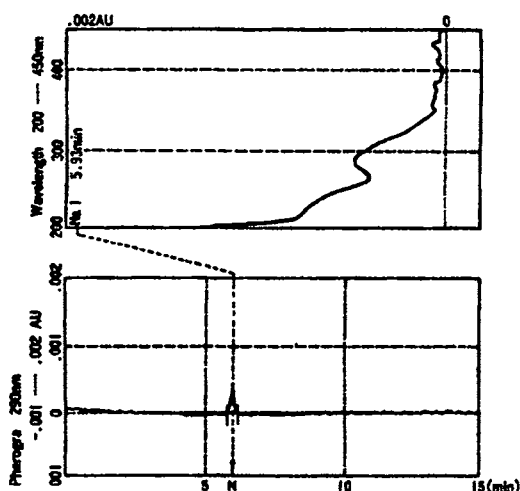


Fig. 1 Electropherogram of sodium hypochlorite at pH5.4.

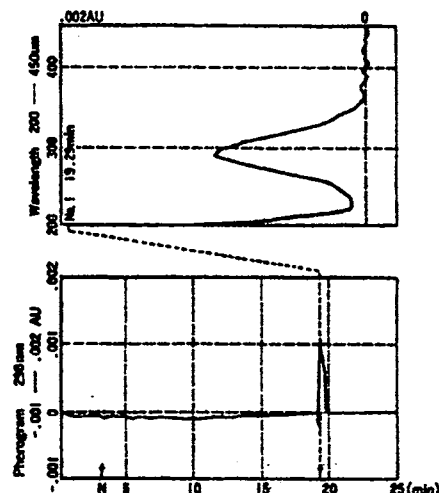


Fig. 2 Electropherogram of sodium hypochlorite at pH9

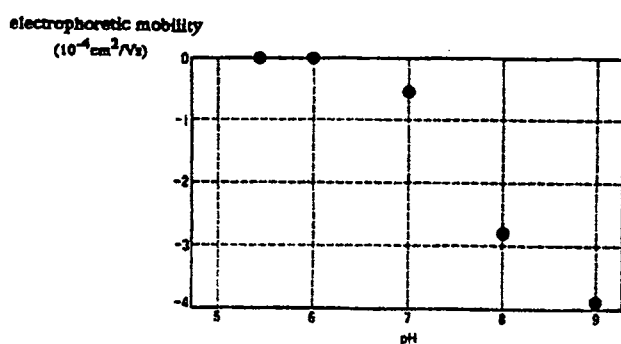


Fig. 3 The pH dependence of electrophoretic mobility of sodium hypochlorite.



# 非水系溶液を用いる キャピラリー電気泳動

(姫路工大理) ○大塚浩二、寺部 茂

## CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH NON-AQUEOUS SOLUTIONS

**Koji Otsuka and Shigeru Terabe**

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

### ABSTRACT

Capillary electrophoresis (CE) is normally operated with aqueous solutions and hence, separation of highly hydrophobic compounds is difficult even though by using separation buffers containing organic modifiers and/or some other additives, such as cyclodextrins. In these circumstances, we have tried to use non-aqueous solutions as separation solutions in CE to overcome such limitations and improve the separation of hydrophobic compounds. Several organic solvents, e.g., dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, tetrahydrofuran, were used as base compounds of separation solutions. In the present study, preliminary results on non-aqueous CE will be reported including the reproducibility of migration times.

### 1. はじめに

キャピラリー電気泳動(CE)では通常水系の泳動溶液が使用されるため、水に難溶性の物質の分析は困難であることが多い。また、分離溶液への添加剤として脂溶性の強い物質を利用することも難しい。このような制限を克服するため、泳動液に有機溶媒を添加したり、シクロデキストリンなどの添加剤を用いることによりある程度の脂溶性試料の分析は可能になってきているが、極めて疎水性の強い物質の分析は不可能である。

近年、泳動溶液に水を一切使用しない完全非水系、あるいは有機溶媒を高濃度に添加した系を利用するCEによって脂溶性の強い試料の分析が試みられはじめている。我々の研究室でも、CEの適用範囲拡大を図る一つの手段として非水系溶液を用いるCEについて検討を行っている。本研究では、非水系およびそれに近い条件下におけるCEの可能性についての予備的検討の結果について報告する。

### 2. 実 験

非水系では一般に電流が極めて流れにくいため、適当な電解質を非水溶媒中に溶解して導電性を増す必要がある。ここでは、過塩素酸テトラブチルアンモニウム (TBAP)、酢酸、酢酸アンモニウムなどを添加剤として使用した。有機溶媒には、ジメチルホルムアミド

(DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、テトラヒドロフラン (THF)などを使用した。装置には実験室で組み立てたもの (高電圧電源 = 松定 HCZE-30PN0.25-LDSW、紫外吸光検出器 = 日本分光 875-CE、データ処理装置 = 島津 クロマトパック C-R6A) を、フューズドシリカキャピラリーには内面にポリビニルアルコールをコーティングしたもの (Hewlett-Packard PVA coated; 50  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  250 mm) または内面無処理のもの (Polymicro Technologies; 50  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  300 mm) を使用した。

### 3. 結果・考察

非水系ではフューズドシリカキャピラリー内面の電荷量が水系溶液を用いた場合に比べて著しく減少するため、電気浸透流 (EOF) も水系に比べて小さくなる。Table 1 にいくつかの条件下における EOF の移動度 ( $\mu_{\text{eo}}$ ) の値を示す。なお、いずれの場合においても印加電圧の極性は通常と同じ (試料注入側: +、検出側: -) である。中性の水系条件下では内面無処理のキャピラリーを用いた場合、 $\mu_{\text{eo}}$  は  $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  程度であり、本系ではその 20% 前後にまで減少している。しかし、非水系においても内面無処理のキャピラリーを使用した場合には比較的大きな EOF が観測されており、PVA コーティングキャピラリーを用いることによってさらに EOF を抑制することが可能であると考えられる。

**Table 1. Values of  $\mu_{\text{eo}}$  in Several Non-Aqueous Solutions**

Organic Solvent	Additive	$\mu_{\text{eo}} / 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Capillary
DMSO	TBAP (10 mM)	3.2	PVA coated
THF	TBAP (10 mM)	2.6	
THF	酢酸 (1 M)	3.0	
THF	酢酸 (1 M)	8.3	Uncoated
DMF	酢酸 (1 M)	9.8	

Applied voltage, 20 kV; temperature, ambient.

なお、PVA コーティングキャピラリーを用いた場合 EOF の再現性は良好であり、上述の有機溶媒系を使用してもキャピラリーは安定であると言える。

非水系溶液を用いる CE の応用例として、これまでにイオン対生成を利用した光学異性体の分離が報告されている [1] が、そこで使用されているキラル識別剤、試料はいずれも水系での利用・分離が可能である。ここでは、新たに脂溶性の高いキラル識別剤の利用を試み、本系の光学分割への応用の可能性を探った結果についても言及する。

[1] Bjørnsdottir, I.; Terabe, S. unpublished data (1995).

(東理大・薬) ○徳永武志、中村 洋

OPTIMIZATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF AMINO ACIDS WITH  
LASER-INDUCED FLUORESCENCE DETECTIONTakeshi TOKUNAGA and Hiroshi NAKAMURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo

Capillary electrophoresis of amino acids, with laser-induced fluorescence detection ( $\text{Ar}^+$ ; Ex488nm, Em520nm), was attempted with a naked fused silica capillary after the derivatization with naphthalene dialdehyde and NaCN to produce fluorescent CBI derivatives. After the optimization of the CE system, all the CBI derivatives from 18 amino acids and cysteic acid were successfully resolved within 1hr.

【はじめに】アミノ酸をシアン化ナトリウム(NaCN)の存在下、ナフタレンジアルデヒド(NDA)でCBI誘導体に導き、キャピラリー電気泳動(CE)を用いて分離定量を試みた。自由溶液電気泳動を用いた場合、pHや緩衝剤の変化のみでは一斉分離が達成されないが電気泳動溶液にある種の有機溶媒を添加すると、分離が改善されることがわかった。分離条件(pH、緩衝剤の種類・濃度、有機溶媒の種類・濃度、電圧、試薬濃度)と検出条件(UV、レーザー励起蛍光)を最適化した場合の検出限界、並びにOn-lineでこの条件を生体試料の分析に応用した結果について報告する。

【実験】装置:CE装置には、P/ACE System 5010 (BECKMAN)を用いた。キャピラリー:フューズドシリカ管(内径:75 $\mu\text{m}$ 、全長:57cm、有効長:50cm)を用いた。検出:280nmにおける吸光度検出、あるいは $\text{Ar}^+$ レーザー励起蛍光検出(Ex488nm、Em520nm)を用いた。試薬:Gln、 $\text{CySO}_3\text{H}$  (関東化学)を除き、アミノ酸類(Arg, Lys, Trp, Tyr, His, Phe, Ile, Leu, Met, Asn, Thr, Val, Ser, Ala, Gly, Glu, Asp)は、宝興産製を使用した。NaCN (関東化学)、NDA (東京化成)は、特級品を使用した。アミノ酸、NaCNは水溶液としNDAはメタノール溶液とした。バッチ法 泳動溶液:Britton-Robinson緩衝液(pH 4-10)をそのまま、あるいは有機溶媒を5-40%になるように加えた溶液、リン酸ナトリウム緩衝液(pH 9)、ホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 9)を用いた。尚、泳動溶液に添加する有機溶媒としてはメタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、sec-ブタノール、イソブタノール、tert-ブタノール、及びアセトニトリルを用いた。試料溶液の調製:各アミノ酸の10mM溶液100 $\mu\text{l}$ に10mMNaCN溶液100 $\mu\text{l}$ 、10mMNDA溶液100 $\mu\text{l}$ を加え1時間放置し、試料溶液とした。ただし、Tyrについては2mM溶液100 $\mu\text{l}$ に10mMNaCN溶液、10mMNDA溶液を各々20 $\mu\text{l}$ 加え、Lysについては10mM溶液100 $\mu\text{l}$ に10mMNaCN溶液、10mMNDA溶液を各々200 $\mu\text{l}$ 加え1時間放置したものを試料溶液とし

た。注入・泳動条件:試料溶液を加圧法によりキャピラリーに2秒間注入し、泳動した(印加電圧:15-30kV、温度:23℃)。On-line法 泳動溶液:Britton-Robinson緩衝液(pH 9)にtert-ブタノールを20%、あるいはイソプロパノールを30%になるように添加した。注入・泳動条件:加圧法により20mMNDAA溶液を2秒間、2-10mMアミノ酸溶液に20mMNaCN溶液を加えた溶液を4秒間、20mMNDAA溶液を2秒間順次注入し、キャピラリー内で30分放置後泳動した(印加電圧:30kV、温度:23℃)。

【結果】バッチ法により、Britton-Robinson緩衝液を用いて、CBI-アミノ酸を泳動したところ、pH 4ではピークが確認できず、pH 6, 7, 9, 及び10では同じ本数(11種8本)が検出できたが、pH 6ではGlu, Aspのピークが、pH 10ではTrp, Gluのピークが鋭くなく、また、pHが上がるほどピーク間の幅が広がる事から、pH 9を選択した。次に、pH 9について緩衝剤の検討を行った。0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液ではピーク間の幅が狭く、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液ではGlu, Aspのピークが鋭くないことから、泳動時間とピーク形状から判断してBritton-Robinson緩衝液を選択した。次に、19種のCBI誘導体の相互分離を検討した。Britton-Robinson緩衝液にメタノールを加えると、泳動時間が長くなり、ピーク本数も増加する傾向が認められたため、各種有機溶媒について分離に与える影響を調べた。イソプロパノールを30%添加すると、酸性アミノ酸(Glu, Asp)と $\text{CySO}_3\text{H}$ が240分まで検出されず、Ile/Phe, Val/Glnが重なった。そこで、Britton-Robinson緩衝液濃度を変化させたが分離能は上がらなかった。次に、tert-ブタノールを20%添加したところ、Trp/Tyr, Ser/Alaが重なるものの、17種のCBI誘導体が分離できた(Fig. 1:左、全体図;右、部分拡大図)。次いで、バッチ法で用いた反応がOn-line法として適用できるかどうかを調べたところ、ややピークが広がるものの、バッチ法と同程度の分離パターンが得られた。

【考察】以上の結果からアミノ酸標準品のCBI誘導体を用いた分離では、Britton-Robinson緩衝液にイソプロパノールを30%、あるいはtert-ブタノールを20%添加する方法を併用することによりアミノ酸類19種の分離・同定が可能であることが判明した。また、On-line法においてもほぼ同等の結果を得た。今後は、定量範囲の検討、内部標準物質の選定を進め、On-line法による連続分析を行う予定である。

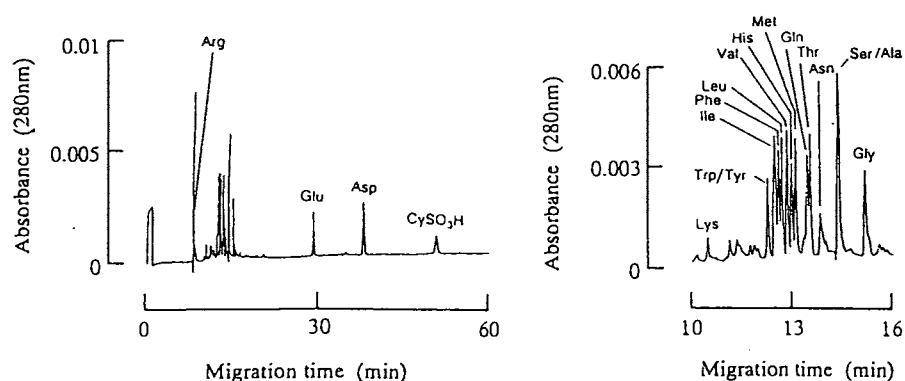


Fig.1 Separation of CBI derivatives

Britton-Robinson buffer (pH 9.00) : tert-butanol (8 : 2)  
Applied voltage : 30kV

(神戸薬大) ○角田ちぬよ、馬場嘉信、津波古充朝 (阪大医) 三木  
哲郎、萩原俊男

## Gene Diagnosis of Common Diseases Using Capillary Electrophoresis Equipped with Multi-Color Detectable Laser-Induced Fluorescence Detector

Chinuyo Sumita<sup>1</sup>, Yoshinobu Baba<sup>1</sup>, Mitsutomo Tsuhako<sup>1</sup>, Tetsuro Miki<sup>2</sup> and Toshio Ogihara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, Motoyama, Kitamachi, Higashinada, Kobe 658, Japan, and <sup>2</sup>Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Capillary electrophoresis (CE) in entangled polymer solution have been investigated as an efficient technology for gene diagnosis. In this study, we apply CE with laser-induced fluorescence detector (LIF) to gene diagnosis by (CA)<sub>n</sub> repeat analysis. (CA)<sub>n</sub> repeats with n varying from 10 to 60 locate 50,000 loci on human genome and are useful makers to make linkage map. The (CA)<sub>n</sub> repeat is associated with some common diseases. And particularly the (CA)<sub>n</sub> repeat which exist at chromosome I is related to hypertension. We try to analyze (CA)<sub>n</sub> repeat at chromosome VIII for gene diagnosis of common diseases with CE-LIF and multiple color detection.

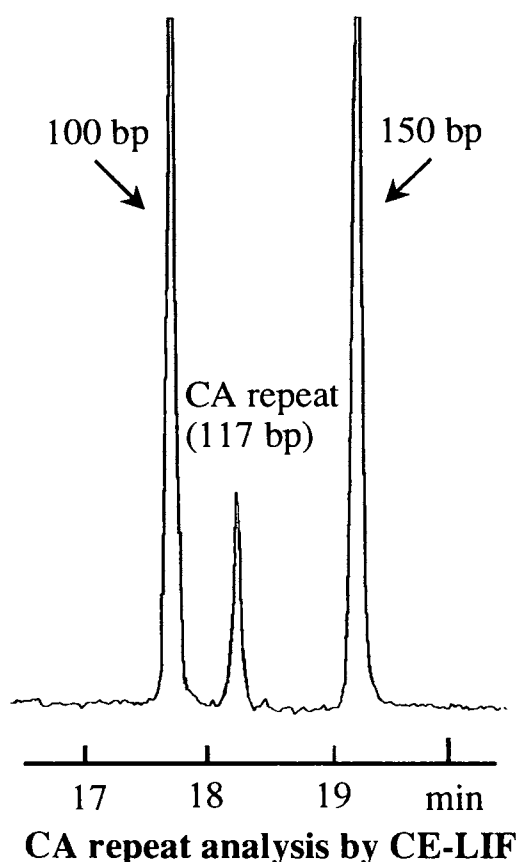
### はじめに

1991年に開始されたヒト、ゲノム解析計画の進展に伴い遺伝子診断技術は質、量ともにめざましい発展を遂げてきた。その手法は病気の診断だけでなく犯罪捜査、親子鑑定、個人識別、人類学、考古学の分野にも応用されてきている。成人病の遺伝子診断の第一歩となる原因遺伝子座位(目的の遺伝子の存在する場所)の決定は連鎖解析により行われる。減数分裂の際対合した相同染色体間では交叉が起こる。そこで遺伝子間の距離が遠いほど交差の起こる確立が高くなることを利用して目的の遺伝子の染色体上の位置を決定しようとするのが連鎖解析である。この際に目印となるマーカー(DNAマーカー)として用いられているのがマイクロサテライト多型である。マイクロサテライト多型とは、数塩基対のユニットが繰り返し存在してその繰り返しの回数が異なるものをさす。なかでもCAリピートは、ヒトゲノムの場合20～120 bp程度で $5 \times 10^4$ 箇所が存在するといわれておりDNAマーカーとして頻繁に用いられている。そこでこのCAリピートの分析を行うことは、遺伝子座位決定の際に大きく寄与するものとなる。又マイクロサテライト多型において極端に繰り返し回数が多い場合様々な病気の原因となることが知られ、なかでも第1番染色体に存在するCAリピートは高血圧の原因遺伝子であることが報告されている。そこで今回我々は第8番染色体上に存在するCAリピートの分析を今まで用いてきたキャピラリー電気泳動法<sup>(1)-(4)</sup>とアルゴンレーザー誘起蛍光検出器を組み合わせた装置により行い、CAリピートの分析方法を確立した。

## 実験

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子(株)との共同研究により開発したキャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出システム(CE-LIF)を使用した。キャピラリーはPolymicro Technologies 社製 (375  $\mu\text{m}$  o.d., 100  $\mu\text{m}$  i.d.) のカラムを従来の方法で内壁処理し<sup>(4)</sup>、セルロース誘導体溶液に各種インターカレートダイを加えた溶液を充填して用いた。サンプルはヒトゲノム由来のCAリピート多型をPCR法を用いて増幅させて使用した。また100 bpと150 bpのDNAフラグメントをPCR法により増幅させ内部標準マーカーとして用いた。さらに、多色検出を行うためにあらかじめ、CAリピート多型サンプルにDNAインターカレートダイであるYOYO-1(Detection : 550 nm)を添加し、100 bpおよび150 bpのDNAフラグメントはPCR反応を行う際に蛍光試薬であるROX(Detection : 610 nm)を結合させたプライマーを用いて増幅させた。サンプルは電氣的に注入した。緩衝液はトリス-ホウ酸溶液を用いた。

## 結果と考察



8番染色体上に存在するCAリピート(D8S1218)多型は111, 117, 119 bp の3種のDNAフラグメントを生成する。この100 bp程度のDNAフラグメントを2 bpの違いで分離するには緩衝液中のセルロース誘導体濃度を1%程度まで上げる必要があった。さらに緩衝液中にはレーザー蛍光検出のために必要なDNAのインターカレートダイとしてYO-PRO-1を添加した。YO-PRO-1は蛍光試薬としてだけでなく、分解能の向上にも寄与している。以上の条件でCAリピート多型と内部標準マーカーとして100 bp, 150 bpのDNAフラグメントを混合したサンプルを分析した結果の一例を図に示した。このように、CE-LIF装置を用いて100 bpと150 bp間のCAリピートDNAフラグメントの分析に成功した。また、あらかじめ、YOYO-1を添加したCAリピート多型サンプルとROXを結合させた100 bpおよび150 bp DNAフラグメントを混合してサンプルとし同時多色検出についても検討した。

## 文献

- 1) 馬場嘉信, *pharm. Tech. Japan*, **10**, 987 (1994)
- 2) Y. Baba, *J. Chromatogr.*, in press.
- 3) Y. Baba et al., *Biomedical Chromatogr.*, **8**, 291 (1994).
- 4) C. Sumita et al., *J. Chromatogr.*, **661**, 297 (1994).

## キャピラリー電気泳動—レーザー蛍光検出 によるヒト、酵母、線虫DNAのシーケン シング

(神戸薬大) ○井上秀子、馬場嘉信、津波古充朝 (かずさDNA研  
究所) 野村信夫、高浪満 (理化学研究所) 村上康文 (国立遺伝学研  
究所) 小原雄治

### Human, Yeast, and C. Elegans Genome Analysis Using Capillary Electrophoresis Equipped with Laser-Induced Fluorescence Detector

Hideko Inoue<sup>1</sup>, Yoshinobu Baba<sup>1</sup>, Mitsutomo Tsuchiko<sup>1</sup>, Nobuo Nomura<sup>2</sup>, Mitsuru Takanami<sup>2</sup>,  
Yasufumi Murakami<sup>3</sup>, Yuji Kohara<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, Kobe 658, Japan, <sup>2</sup>Kazusa DNA  
Research Institute, Chiba 292, Japan, <sup>3</sup>The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN),  
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan and <sup>4</sup>National Institute of Genetics, Shizuoka 411, Japan

The goal of the Human Genome Project is to sequence an enormous scale of the DNA in the human genome, consisting of about 3 billion bases. The present DNA sequencing technology is insufficient to permit sequencing on this scale at a reasonable speed and cost. The Project therefore requires the development of DNA sequencing methodologies with higher throughputs and cost effectiveness. In this study, we demonstrate DNA sequencing of human genomic DNA using capillary electrophoresis equipped with a laser-induced fluorescence detection system. we investigated the separation conditions (capillary length, gel composition, and electric field strength). Capillary electrophoresis is also successfully applied to high-speed DNA sequencing of cDNA for yeast and C. elegans genomes.

#### はじめに

ヒト・ゲノムプロジェクトの目標は30億塩基対もの膨大な情報を有するDNAの塩基配列を全て解析することである。現在のスラブゲル電気泳動を用いたDNAシーケンサーはスピードとコストの面で改良が望まれており、より高性能でコストパフォーマンスの高い、新規のDNA解析装置の開発が必要である。本研究においては、レーザー蛍光検出器を有するキャピラリー電気泳動装置を新しく開発し、ヒト・ゲノムをシーケンシングする際の条件検討を行った。また、このシステムを酵母および線虫のシーケンシングに応用する際の条件についても検討した。

#### 実験

キャピラリー電気泳動装置は、BECKMAN P/ACE System 2050および我々が開発したキャピラリー電気泳動—レーザー蛍光検出システム<sup>1)</sup>を使用した。DNAシーケンシング反応生成物は、市販のDye Primer Cycle Sequencing KitおよびDye Terminator Cycle Sequencing Kit (パーキンエルマー製) により生成したものをエタノール沈殿し、脱イオンホルムアミドに溶かして用いた。キャピラリーはポリアクリルアミドゲルあるいは市販のゲル

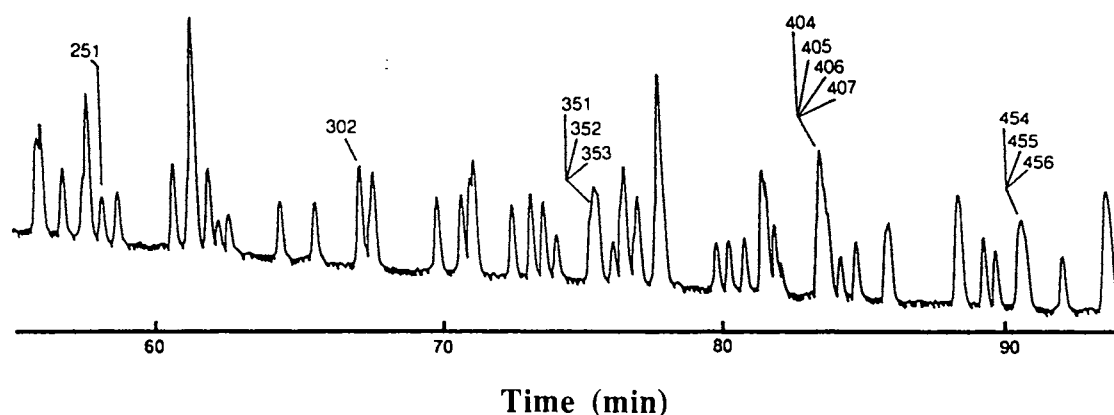
(ロングレンジーハイドロリンクゲル)を充填して用いた。サンプルはM13mp18DNAおよびヒト、酵母、線虫ゲノムを使用した。サンプルは90℃で2分間熱変性を行った後、電気泳動的に注入した。緩衝液はトリス-ホウ酸-尿素溶液を用いた。

## 結果と考察

キャピラリー電気泳動によるDNAシーケンシングを行う際に分離に影響を及ぼすパラメータはゲル濃度 (T)、架橋度 (C)、電場、キャピラリーの有効長がある。これらの条件を検討した結果、DNAの高速シーケンシングを行うためには比較的高いゲル濃度、高電圧で短いキャピラリーを用いる必要があることがわかった。ゲル濃度5 %T、架橋度3 %C、電場414 V/cm、キャピラリーの有効長15.3 cmの条件でシーケンシング反応生成物の分離を行うと300塩基までのDNAフラグメントは10分以内にほぼ完全に分離できるがそれ以上の長さのフラグメントの分離が不完全であった。

さらに、本研究は、300塩基以上のフラグメントを解析するための条件についても検討した。ゲル濃度 (T) が小さいほど分解速度は速くなるが分解能は低下する。また、分離速度は電場に比例し、キャピラリーの有効長に反比例することがわかった。なお架橋度 (C) は分離速度に影響をおよぼさないことがわかった。そこでゲル濃度 (T)、電場、キャピラリーの有効長を変化させて分離条件の最適化を行った。

Fig. 1はゲル濃度5 %、電場72.7 V/cm、キャピラリーの有効長13.8 cmの条件で塩基Aで終結したシーケンシング反応生成物の分離の結果である。図から明らかなように、電場を下げると分析時間が7倍になるがおよそ800塩基のフラグメントの解析が可能になることがわかった。



**Fig. 1 Separation of FAM-labeled C-termination sequencing product of M13mp18 by capillary electrophoresis.**

なお最近のDNAシーケンシング技術の発展に伴い、大きなDNAフラグメントを解析するためのゲルおよびシーケンシングキットが開発され、販売されているため、今回それらもあわせて検討した。

## 文献

- 1) 馬場嘉信、*Dojin News*, **71**, 8 (1994).
- 2) 馬場嘉信、*ぶんせき*, 1995, 342.
- 3) R. Tomisaki et al., *Anal. Sci.*, **10**, 817(1994).
- 4) 富崎理代 他、*分析化学*, **43**, 1205(1994).



## キャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出 による心臓病原因遺伝子のVNTR解析

(神戸薬大) ○西村明子、馬場嘉信、津波古充朝 (阪大医) 三木哲郎、萩原俊男

### Variable Number of Tandem Repeat Analysis for Heart Disease Causing Gene by Capillary Electrophoresis Equipped with Laser-Induced Fluorescence Detector

Akiko Nishimura<sup>1</sup>, Yoshinobu Baba<sup>1</sup>, Mitsutomo Tsuchiko<sup>1</sup>, Tetsuro Miki<sup>2</sup>, and Toshio Ogihara<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, Motoyama, Kitamachi, Higashinada, Kobe 658, Japan, and <sup>2</sup>Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Capillary electrophoresis(CE) is applied to the analysis for variable number of tandem repeat (VNTR) locus in the human apolipoprotein B gene (*APOB*). The apolipoprotein B VNTR alleles containing larger repeat units is a risk factor for heart disease. In this study, we investigated the method for accurate determination of the number of short oligonucleotide unit (16bp) of the VNTR using capillary electrophoresis. The analysis of these repeated sequence on human *APOB* VNTR locus leads to DNA diagnosis for heart disease.

#### はじめに

ヒトゲノム上には、variable number of tandem repeat (VNTR)と呼ばれる十数から数十塩基対の繰り返し配列が多数存在し、この繰り返し回数と心臓血管病や遺伝病などの様々な病気の発症との関連が明らかになってきた。したがって繰り返し配列の繰り返し回数を決定することにより、これらの病気のDNA診断も可能になってきた。しかし、これらの繰り返し回数を正確に決定することは現状では困難である。本研究においては、キャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出装置を用いて、心臓病原因遺伝子であるアポリポ蛋白B遺伝子(*APOB*)の繰り返し配列の繰り返し回数を正確に決定するための方法論の確立を行った。

#### 実験

キャピラリー電気泳動装置は、レーザー蛍光検出装置付ベックマン製P/ACE 2050, パーキン-エルマー製 Model 270A, ヒューレットパッカー製HP<sup>3D</sup>CEを使用した。キャピラリーは、J&W製 DB-17 を使用し、キャピラリーにはセルロース誘導体溶液 (50 mM トリス-ほう酸、0.5 % メチルセルロース、0.1 μM YO-PRO-1) を満たして用いた。サンプルは、PCR (パーキン-エルマー製 Gene Amp PCR System 2400) 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。測定温度は 30 °C で、注入は電氣的に 150 V/cm で 30 秒行った。検出は、レーザー蛍光検出 (Ex.: 488 nm, Em.: 560 nm) で行った。

## 結果と考察

アポリポ蛋白B遺伝子(*APOB*)は、第二番染色体の短腕に遺伝子座位があり、29個のエクソンと28個のイントロンから成る。この遺伝子の3'末端側には、16塩基対のオリゴヌクレオチド繰り返し配列(VNTR)が存在し、高い多型性を有する。一般に*APOB*のVNTR部分は、25~52回の繰り返し配列を有しており、このVNTR部分をPCRで増幅すると500~1000塩基対のDNA断片を生成する。

*APOB*の多型を解析するために、セルロース濃度(0.5%~1.0%)、電場(150 V/cm~300 V/cm)、キャピラリー有効長(20 cm~50 cm)をそれぞれ変化させて分離条件の最適化を行った。その結果最適条件では30分以内に*APOB*のVNTR多型を解析できることがわかった。

*APOB*のVNTRと心臓病との関連が証明されており、35回以上の繰り返し配列を有する場合は、心臓病の危険性が高くなることが知られている。このことにより、心臓病のDNA診断を行った例をFig. 1に示す。

これは、メチルセルロース濃度0.5%、電場150 V/cm、キャピラリー有効長50 cmの条件でPCR

で増幅した*APOB*を分離したものである。図から明らかなように、全ての例で心臓病の危険因子を有していることがわかった。このように、キャピラリー電気泳動により短時間のうちにDNA診断が可能になることがわかった。

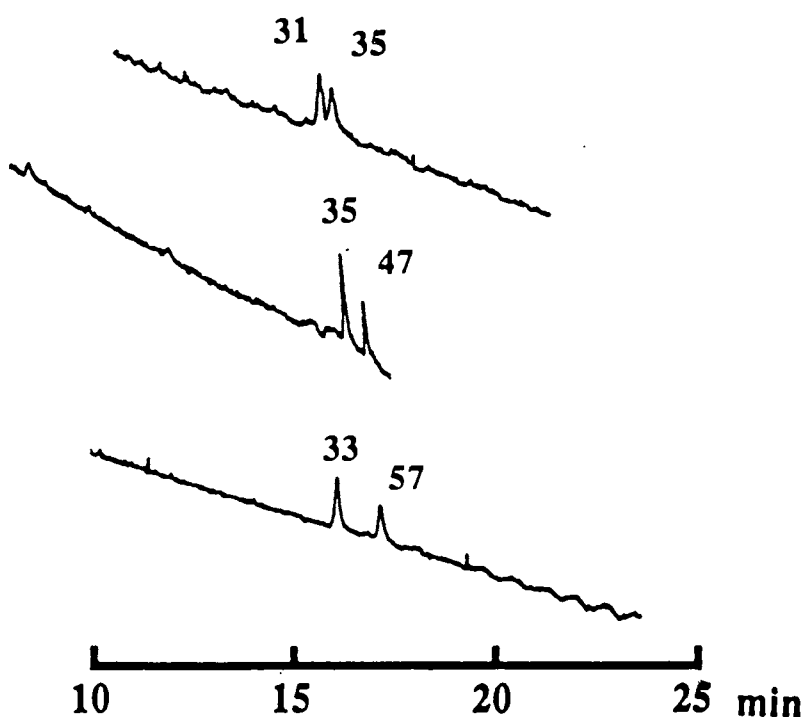


Fig.1 VNTR analysis of human apoB gene by CE

## 文献

- 1) Y. Baba, *J. Chromatogr.*, in press.
- 2) 馬場嘉信、化学と工業, **47**, 148 (1994).
- 3) Y. Baba et al., *Electrophoresis*, **16**, 1437 (1995).

## 26 オンカラムキャピラリーアレイゲル電気泳動によるDNA解析

(日立製作所中央研究所)

○穴沢 隆、高橋 智、神原秀記

### CAPILLARY ARRAY GEL ELECTROPHORESIS USING SIMULTANEOUS ON-COLUMN DETECTION METHOD FOR DNA ANALYSIS

Takashi Anazawa, Satoshi Takahashi, Hideki Kambara

Central Research Laboratory, Hitachi, Ltd.

Simple and highly sensitive detection for capillary array gel electrophoresis has been developed. Although each capillary is irradiated on-column, no laser-scanning and no laser-splitting are employed. Multiple capillaries are aligned in a plane and laser is introduced from the side of the plane to irradiate all the capillaries simultaneously. As a result, very efficient fluorescence detection is realized. DNA sequencing results on a 10-capillary array are presented.

#### 1. 緒言

ゲノム解析の進展にともない、高速、高スループットなDNAシーケンサーの開発が望まれている。これを可能にするものとして、キャピラリーアレイ電気泳動装置が期待されており、世界数カ所で開発が進められている。キャピラリーアレイ電気泳動装置の報告例としては、Mathiesらによるスキャン方式<sup>1)</sup>、上野、Yeungらによるレーザパワー分割方式<sup>2)3)</sup>、我々によるマルチシースフロー方式<sup>4)</sup>がある。前2方式は扱うキャピラリーの本数の増加にともなって、単位時間、キャピラリー1本あたりのレーザパワーが減少し、感度不足が懸念される。マルチシースフロー方式は多数のキャピラリーを並べて横から同時に照射するので効率が良いが、長い塩基長のDNAの感度が低下しがちである。そこで、キャピラリーを並べて単に側面からレーザを同時照射するという単純なキャピラリーアレイ計測方式を検討した。この結果、多くのキャピラリーを同時計測できるという興味深い結果を得たので報告する。

#### 2. 実験方法

4%T、5%Cのポリアクリルアミドゲルを充填した熔融石英キャピラリー（内径0.075mm、外径0.375mm）10本の蛍光計測部分をFig.1のように、各キャピラリー軸を平行に密着させ、無蛍光スライドガラス上に平面状に配列固定した。レーザ照射位置の各キャピラリーのポリイミド被覆はあらかじめ除去しておいた。各キャピラリーの全長は40cm、有効長は30cmとした。YAGレーザ532nm（10mW）をレンズでビーム径を0.1mm以下に絞った後、キャピラリー配列平面側方よりキャピラリー軸に垂直に照射し、10本のキャピラリーを一度に励起した。蛍光計測はキャピラリー配列平面に垂直な方向より冷却型の2次元CCDカメラを用い、10本のキャピラリーについて同時に行った。

試料はM13mp18とし、Texas Red標識プライマーを用いてA断片のみのサイクルシーケンス反応を行い、エタノール沈殿した後に100%ホルムアミドに溶かしたものをキャピラリーに電界注入した。電気泳動は100V/cmの電界強度で行った。

### 3. 結果と考察

10本のキャピラリーの電気泳動パターンはM13mp18のA断片の配列パターンを示し、いずれも配列決定に十分なS/N比、分解能であった。このうち、レーザ光源側から1、3、5、7、9番目のキャピラリーの電気泳動パターンをFig.2に示した。蛍光強度はレーザ光源から遠ざかるに従い減少し、10番目のキャピラリーのピーク強度は1番目の1/2程度であった。これはキャピラリー1本あたりのレーザパワーの透過率が90%を超えていることを示している。蛍光強度の減衰率と得られたS/N比を比較検討した結果、本実験条件で24本までのキャピラリーの同時計測が可能であると見積もることができた。

### 4. 参考文献

- 1) X.C.Huang,M.A.Quesada,R.A.Mathies;Anal.Chem.,64,2149(1992)
- 2) K.Ueno,E.A.Yeung;Anal.Chem.,66,1424(1994)
- 3) J.A.Taylor,E.A.Yeung;Anal.Chem.,65,956(1993)
- 4) S.Takahashi,K.Murakami,T.Anazawa,H.Kambara;Anal.Chem.,66,1021(1994)

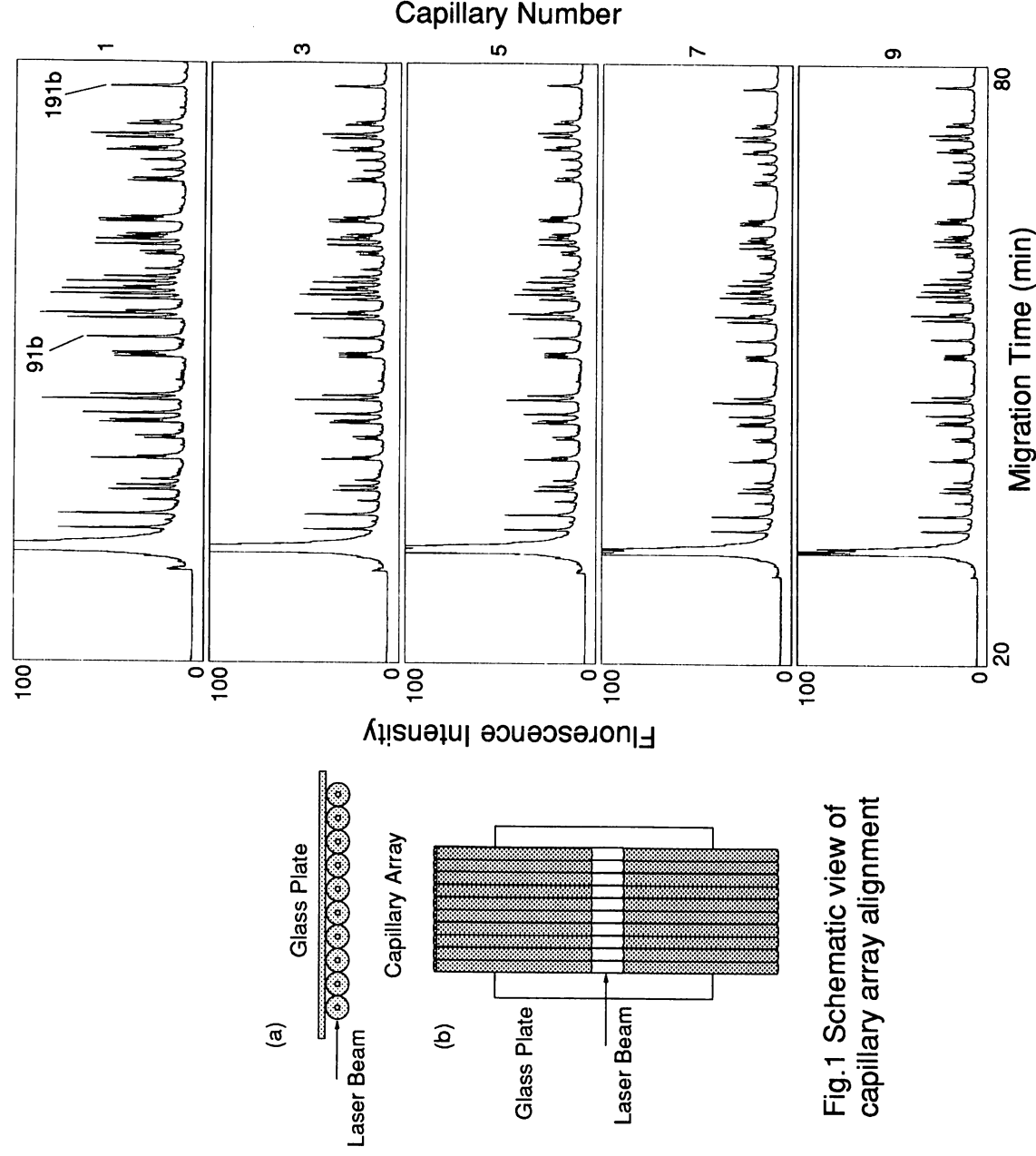


Fig.2 Electropherograms of DNA sequencing sample

## 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム

### ワークショップ

「キャピラリー電気泳動装置と各種アプリケーションの現状」

# 講演 1 キャピラリー型 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer による DNAシーケンシング及びDNAフラグメント解析

(株式会社パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステムズ事業部)

○繁田喜紀

分子生物学の飛躍的な発展にともない、DNAシーケンシングをはじめとするDNAフラグメント解析技術が不可欠なものになっています。蛍光自動DNAシーケンサの登場により、特別な施設がなくても誰もがDNAの遺伝情報を分析できるようになりました。これによって、自動化システムによるDNA分析法は、急速に普及しました。そして今日、様々なアプリケーションに対応し、簡単な操作で利用できる装置が求められています。パーキンエルマー社ではこのニーズに応えて、従来のスラブゲルに代えてキャピラリー技術を導入した遺伝子解析装置を開発しました。それが ABI PRISM 310 Genetic Analyzer です。

この ABI PRISM 310 Genetic Analyzer は、実績のある373DNAシーケンサの多色蛍光標識技術を継承しています。更にCCDカメラによる検出システムとキャピラリー技術を採用し、高速・高分離能・高感度・高再現性が得られるようになりました。またキャピラリー技術の採用は、ゲル板の調整やサンプルローディングの手間を省いた完全自動化をも実現しました。アクリルアミドやアガロースゲルを調製したり、サンプルをロードする必要はありません。結果、サンプルトレイにサンプルをセットするだけで、その後の分析プロセスは全て自動で行われ、ゲル／サンプルのロードからデータコレクション／アナリシスまで、全てをコンピュータがコントロールします。

Kary MullisによるPolymerase Chain Reaction (PCR) の開発は、分子生物学における実験手法を大きく塗り替えました。今日、PCRは、STR (Short Tandem Repeat) ・ VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) 増幅による個人識別・リンケージ解析・マッピングをはじめ、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ・ RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) などの多型解析、COP (Competitive Oligonucleotide Priming) ・ SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ・ HMA (Heteroduplex Mobility Assay) などの変異検出等、多様なアプリケーションに用いられています。もはや、これら多様なPCR増幅DNAフラグメントの自動解析能力が求められています。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer は、多様なアプリケーションに対応する柔軟性を備えた、自動遺伝子解析装置です。精度と再現性に優れたDNAフラグメント分析の自動化に最適です。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer は、DNAシーケンシングのみならず、多様なアプリケーションに対応した分析用試薬・ソフトウェア・プロトコールを用意しています。

ここでは ABI PRISM 310 Genetic Analyzer によるシーケンスデータとDNAフラグメント解析のデータについても説明します。

## 講演2      キャピラリー電気泳動における高感度 検出の紹介

(大塚電子株式会社) 小野真澄

### ENHANCEMENT OF DETECTION SENSITIVITY IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS BY USING CAPILLARIES WITH AN EXTENDED LIGHT-PATH

MASUMI ONO

OSTUKA ELECTRONICS CO., LTD

キャピラリー電気泳動法において検出感度向上のためにいろいろな方法が試みられています。その中でも検出部の光路長を拡大し、検出感度を向上する方法について紹介させていただきます。今回は光路長を拡大する方法として、キャピラリーの検出部にあたる部分を膨らませたものを用います。このキャピラリーを使用することで光路長拡大分をサンプルのピーク高さを増加する事ができます。また、このキャピラリーは内径のみを膨らませているのではなく外径も膨らんでいるため外観は球場となっているため、専用ホルダーに装着する事で光を集光する効果を持っています。光を集光できるということは光量が多くなり、ノイズを低下する事になります。

よって、このキャピラリーと専用ホルダーを合わせて使用することでS/NのSは光路長の拡大に伴い増加し、Nは反対に減少するので、光路長拡大に伴うS/Nの向上よりさらに良い結果を得ることができます。

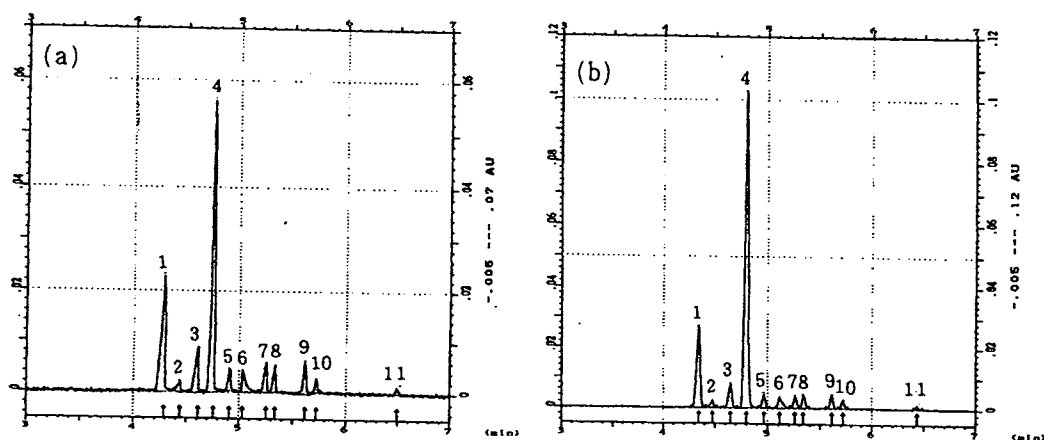


Fig.1 Electropherograms of organic acids in FZE with (a) a normal capillary and (b) an extended light-path. Peaks are identified to be (1) oxalic acid, (2) formic acid, (3) malonic acid, (4) maleic acid, (5) L-malic acid, (6) citric acid, (7) acetic acid, (8) glycolic acid, (9) propionic acid and (10), (11) lactic acid.

## 講演 3      HP<sup>3D</sup>キャピラリー電気泳動システム の特徴と最新のアプリケーション

(横河アナリティカルシステムズ(株))    ○箕浦 加穂、曽我 朋義、熊谷 浩樹

INSTRUMENTAL ASPECTS AND APPLICATION OF HP<sup>3D</sup>CAPILLARY  
ELECTROPHORESIS SYSTEM

Kaho Minoura, Tomoyoshi Soga, Hiroki Kumagai

Yokogawa Analytical Systems Inc.

### はじめに

ヒューレット・パカード社のキャピラリー電気泳動システムは、高速・高分離のキャピラリー電気泳動の特長を最大限生かし、しかも優れた再現性によりルーチン分析にも対応できる信頼性を備えた装置です。今回のワークショップでは、このHP<sup>3D</sup>キャピラリー電気泳動システムに採用されている数々の新しい技術と、さらにこの装置を用いて分析した最新のアプリケーションについてご紹介いたします。

### 装置の特徴

- 高感度ダイオードアレイ検出器を標準装備：多波長同時測定とスペクトルによるピークの定性
- HP独自のバブルセルキャピラリー：ストレートタイプに比べ2.5～5倍近くの感度を実現
- 泳動バッファの自動交換システム（リプレニッシュメントシステム）を装備  
：長時間・多検体の分析でもバッファのpHと組成を一定に保ち、再現性を向上
- 自動補正機構付き加圧注入システム：定量分析の信頼性を向上
- 使いやすく、冷却効率の高い強制空冷式によるキャピラリーの温度コントロール
- 泳動中でも全てのバイアルにランダムアクセス可能なオートサンブラ
- グラフィック画面による簡単操作：画面の絵をマウスでクリックするだけで、条件設定可能
- MS-Windows対応（近日MS-Windows 95対応版リリース予定）
- CE/MSへの拡張可能

### 最新のアプリケーション

無機イオン、有機酸、アミン類、タンパク質、DNA、光学活性物質などキャピラリー電気泳動の利点を生かした最新の分析例をご紹介いたします。



## 講演 4

# キャピラリー電気泳動システム P/ACE 5000 シリーズにおける レーザ誘導蛍光検出

(ベックマン 科学機器事業部) ○新井悦郎

Laser-Induced Fluorescence Detection on Capillary Electrophoresis System, P/ACE 5000 Series

Etsuo Arai (BECKMAN INSTRUMENTS (JAPAN) LTD.)

キャピラリー電気泳動における検出感度向上の手段として、レーザ光をキャピラリーに直接照射し、これにより得られる蛍光を検出するレーザ誘導蛍光 (LIF) 検出法が開発され、ベックマンの P/ACE 5000 シリーズと組み合わせて使用されています。

通常この検出法では紫外線吸収による検出法に比べ 100 ~ 1000 倍の感度が得られます。現在最も幅広く応用されているのは核酸分析の分野です。特に 2 本鎖 DNA の泳動においてはインタカレタの使用により特別な前処理が必要なく、キャピラリー電気泳動自体が持つデータの定量性向上や自動化への対応といった特徴とともに、PCR 産物の解析に貢献しています (Figure)。この手法のために、泳動試薬類や専用キャピラリーを含む LIFluor dsDNA 1000 キットを販売しています。

一方でこの LIF 検出法は、蛍光を発する分子のみを検出するという特徴も所持しており、これにより非常に高い選択性を有します。2 本鎖 DNA とインタカレタによる検出では 2 本鎖のものだけが検出され (Figure)、データ解析が容易になります。また蛍光ラベルしたプライマを用いれば、特定のシーケンスのみを検出できます。

この LIF 検出法の実用性は、抗原抗体反応を用いての微量試料検出法においても大きな利点となります。蛍光ラベルした抗原を用いての競合イムノアッセイにより、微量試料を高感度かつ高選択的に検出する方法が近年紹介されています。キャピラリー電気泳動との

組み合わせにより、短時間に複数の試料の同時検出が可能となります。

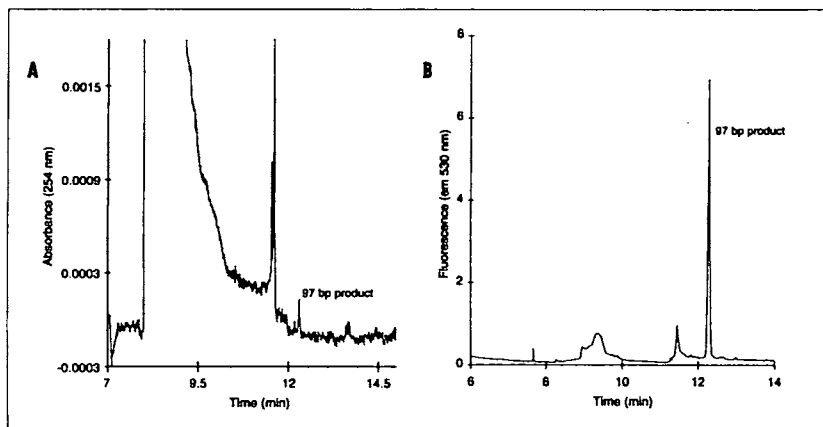


Figure PCR product analysis using (A) UV and (B) LIF detection. Sample was amplified for 30 cycles (target sequence 97 bp) and pressure-injected for ten seconds with no further pretreatment. Buffer systems were the same except for the addition of Enhance for LIF detection.

## 講演5 CIA™による無機イオン分析への応用

日本ウォーターズ（株）

技術部 佐々木秀輝

### 初めに

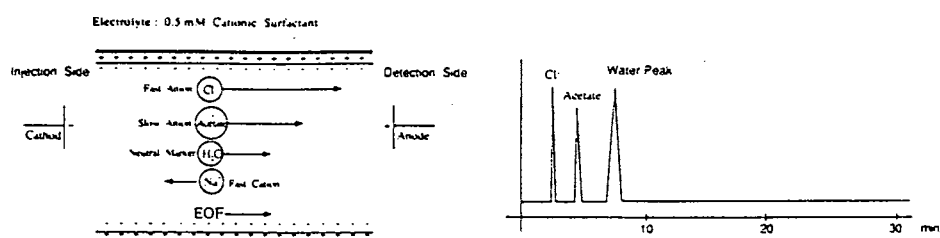
従来、無機イオンや有機酸の測定にはILCや原子吸光等と言った分析法が用いられてきた。しかし、近年急速に発展しつつあるキャピラリー電気泳動を用いることで、これらの分析我より迅速・簡便に行えるようになった。

CIA™ (Capillary Ion Analysis)は、CEの装置を用いた低分子イオンの分析法として開発されたもので、その特徴は、1) 無機イオンや有機酸のような低分子イオンを対象とし、2) 泳動バッファの流の無機と速度をコントロールし、3) 紫外部に吸収を持たない無機イオンは間接法を用いて検出するところにある。

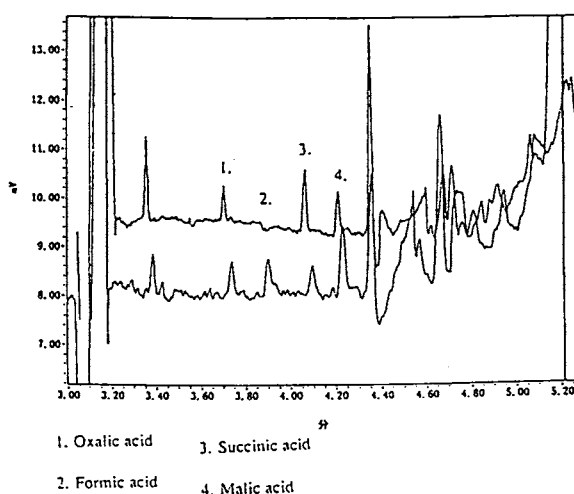
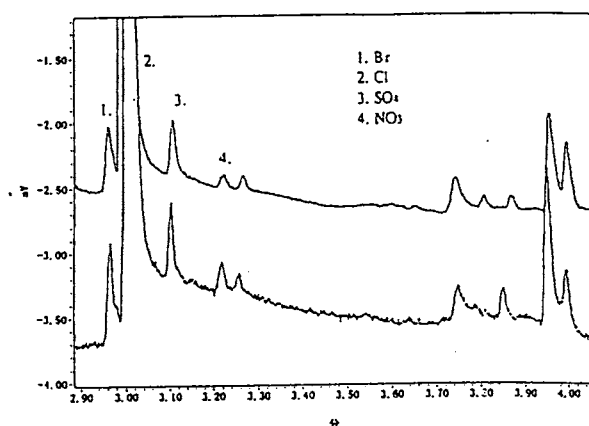
今回、このCIA™の原理と幾つかの応用例について紹介する。

### CIAの原理

Negative Power Supply CE: 陰極側からのInjection  
Reversed EOFでのCE



応用例：魚腸中アニオンの分析（図上：ゲンゴロウブナ、図下：カワムツ）



# 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム

## 一般講演

## キャピラリー電気泳動による アルキルアミン類の分析

(横河アナリティカルシステムズ) ○熊谷 浩樹、曾我 朋義

### Determination of Alkylamines by using Capillary Electrophoresis.

Hiroki KUMAGAI and Tomoyoshi SOGA.  
Yokogawa Analytical Systems Inc.,

A high resolution and rapid separation of alkylamines was accomplished by using capillary electrophoresis. 12 kinds of aliphatic amines were separated within 11 min with good reproducibility (RDS% of migration time were less than 0.3%). The separating behavior of alkylamines was different from reversed-phase or ion exchange HPLC. The differences was quite particular in the selectivity between tri alkyl amine and tetra alkyl ammonium ion. The hydrophobic effect of alkyl groups on the hydration would influence to this selectivity.

#### 1.はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)によるアルキルアミン類の分析は、イオン交換モードや逆相分配モードのHPLCと比較して、迅速、簡便に行えることが既に報告されている。CZEによるアルキルアミン類の分析における最大の特長は、従来のHPLC法とは分離機構が根本的に異なることである。このため、実試料分析でのマトリックスの影響の回避や軽減等が可能である。さらに、長鎖アルキルアミン類等の迅速分析も期待できる。ここでは、アルキルアミン類の分析におけるCZEの有用性を再検討する目的で、アルキルアミン類の泳動挙動について検討した結果を報告する。

#### 2.実験

装置は、ダイオードアレイ検出器を内蔵したHP<sup>3D</sup>キャピラリー電気泳動システム(Hewlett-Packard製)を用いた。キャピラリーには、内面未処理のフューズドシリカ(内径75 $\mu$ m、全長64.5cm、有効長56cm)を使用した。泳動緩衝液には、4mM Cu(II) sulfate + 4mM formic acid + 3mM 18-crown-6, pH 3.0 (Fluka社製 cat. No. 82621)を使用し、温度25 $^{\circ}$ C、印加電圧+20kVで測定した。試料の注入は、50mbar、4secの加圧法で行った。検出にはダイオードアレイ検出器を使用し、215nmで間接吸光検出を行った。

#### 3.結果および考察

Fig.1に12種類のアルキルおよびアルカノールアミン類を一斉分析したフェログラムを示す。泳動時間の再現性(RSD)はすべて、0.3%以下であった。CZEによる分析ではアミンが疎水性吸着を起こす可能性が小さいので、かなり炭素数の多いアルキル

アミンでも良好なピーク形状と短い分析時間で測定できることがわかった。

Fig.2にモノ、ジ、トリメチルアミンとテトラメチルアンモニウムを同時分析したフェログラムを示す。陽イオン交換モードのHPLCによる分析と比較すると、テトラメチルアンモニウムとトリメチルアミンとの間の選択性がかなり小さい。また、この条件下では、トリエチルアミンとテトラエチルアンモニウムの泳動時間は重なる。このような3級アミンと4級アンモニウム塩との間の選択性は、アルキル基の疎水性効果がアミンの水和に強く影響している結果と考えられる。

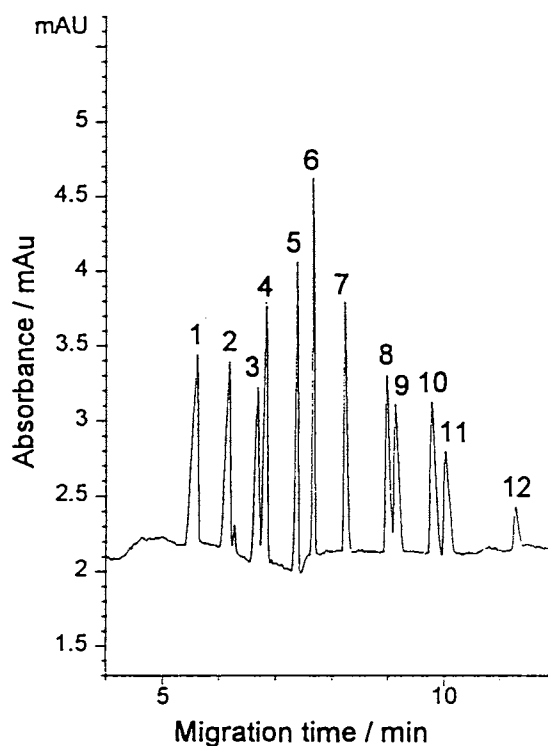


Fig. 1 Electropherogram of aliphatic amines.

(Peaks)

- 1 ; Monomethylamine,
- 2 ; Dimethylamine,
- 3 ; Trimethylamine,
- 4 ; Monoethylamine,
- 5 ; Monoethanolamine,
- 6 ; Mono *n*-propylamine,
- 7 ; Diethylamine,
- 8 ; Triethylamine,
- 9 ; Diethanolamine,
- 10 ; Di *n*-propylamine,
- 11 ; Triethanolamine,
- 12 ; Tri *n*-propylamine.

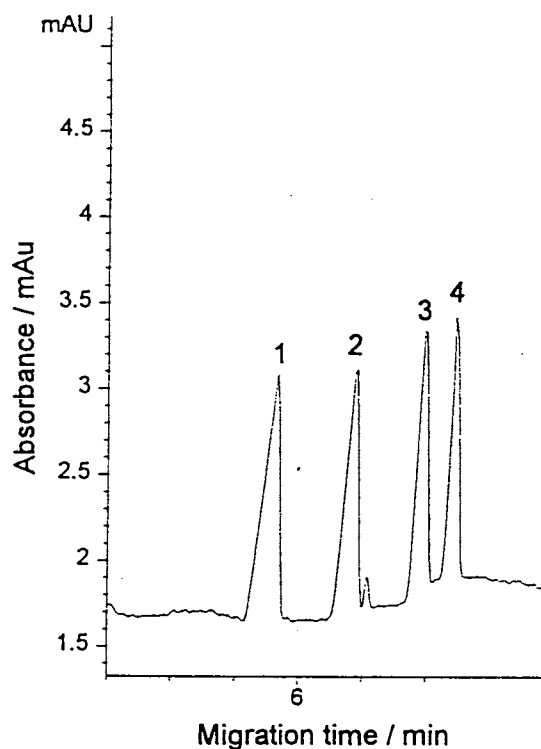


Fig. 2 Electropherogram of methyl amines.

(Peaks)

- 1 ; Monomethylamine,
- 2 ; Dimethylamine,
- 3 ; Trimethylamine,
- 4 ; Tetramethylammonium.

(近畿大・薬) 掛樋一晃、広瀬敦子、玉井利明、本田 進

## HPCE OF COLOMINIC ACID HOMOLOGUES

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Kazuaki Kakehi, Atsuko Hirose, Toshiaki Tamai and Susumu Honda

Colominic acid, a homologous series of polymers of  $\alpha 2 \rightarrow 8$ -linked N-acetylneuraminic acid (NANA), and NANA-oligomers thereof were analyzed by high performance capillary electrophoresis with low-wavelength detection. Colominic acid homologues having degree of polymerization (d.p.s) up to ca. 30 were successfully separated to the baseline level and the homologues having d.p.s 30 - 40 were discriminated from each other in 25 mM phosphate buffer containing SDS to a concentration of 100 mM as carrier using a 100 cm capillary (50  $\mu$ m i.d.). Their hydrolytic processes by weak acids and an enzyme were comparatively studied under the established analytical conditions.

コロミン酸はFig. 1に示すように、N-アセチルノイラミン酸(NANA)が $\alpha 2 \rightarrow 8$ 結合を介して重合したポリマーである。その部分加水分解物は生体中に存在するシアル酸オリゴマー含有糖脂質や糖タンパク質のクロマトグラフィーにおける標準物質としてしばしば利用されるが、

コロミン酸は分子内にNANAの重合度に対応する多数のカルボン酸残基を有する高極性物質であり、しかも分子内に紫外吸収基を持たないため、高感度検出が難しい分析対象である。

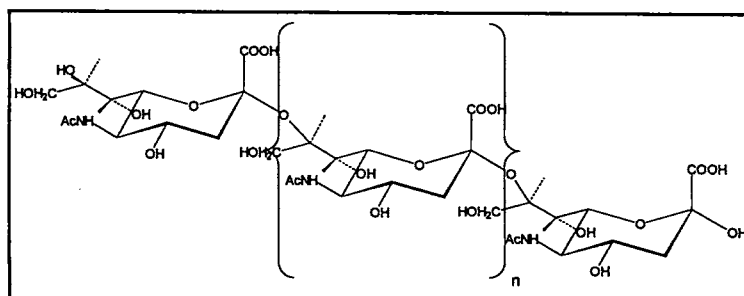


Fig. 1. Structure of colominic acid

本研究では、コロミン酸およびコロミン酸に由来するNANAオリゴマーの高分解能分離および高感度分析を目的としてキャピラリー電気泳動による分析について検討した。さらに、得られた分析条件を利用して、コロミン酸の酸加水分解および酵素分解の過程を追跡した。

「実験方法」 装置 分離条件の検討には、日本分光製JASCO CE-800型装置を使用し、200 nmの紫外吸収を利用して分析した。また温度を制御し、分離能をさらに向上させるために、Waters社製Quanta4000型装置を用い、185 nmの吸収を利用して分析した。キャピラリー：フューズドシリカ素管（内径 50  $\mu\text{m}$ , 有効長100または50 cm）。泳動用緩衝液：25 mMリン酸二ナトリウム水溶液にSDSを添加した溶液。

「結果・考察」 分離条件：コロミン酸（平均分子量14,800）を材料として、リン酸やホウ酸などの緩衝液を用いて分離条件を検討した。その結果、25 mM リン酸二ナトリウム水溶液(pH 9.5)を泳動用緩衝液とすることによりよく分離されることがわかった。またピーク間の分離を向上させるためにSDSの添加効果を調べたところ、100 mM濃度で100 cmの

キャピラリーを使用することにより、Fig.2に示すような分離が達成され、重合度30のオリゴ糖までほぼベースライン分離され、40糖程度まで区別することができた。これらの分離は重合度とともにコロミン酸の分子形状に变化が起こることに基づくと考えられる。コロミン酸の酸およびノイラミニダーゼによる加水分解過程の観察：コロミン酸

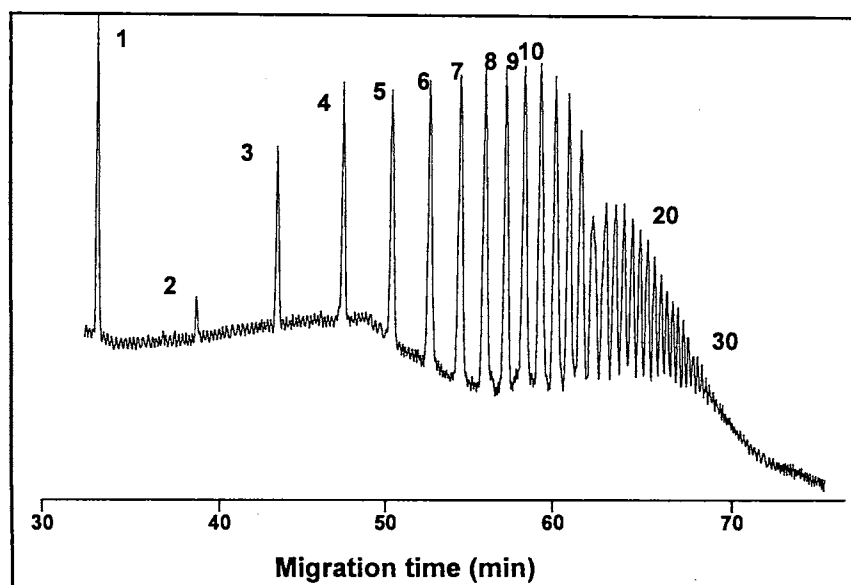


Fig. 2. Separation of colominic acid by capillary electrophoresis

を0.01 N 塩酸、酢酸緩衝液 (pH 4.8, 37 $^{\circ}$ )およびノイラミニダーゼにより水解し、その水解過程を追跡したところ、ノイラミニダーゼでは時間の経過とともにNANAの生成量が増加するものの、いずれの水解方法を用いても、最終産物であるモノマーの生成量が予想されるよりも少なく、むしろ重合度の低いオリゴマーの生成量が高いという興味ある結果が観察された。このことは重合度の低いNANAオリゴマーは加水分解や酵素反応に抵抗性を示すためであると考えられる。

「結論」 コロミン酸のようなシアル酸を含むオリゴマーは、従来分析の難しい対象であったが、キャピラリー電気泳動を利用することにより、感度よく短時間で分析できることが明らかになった。

# キャピラリー電気泳動によるア ビジン及びビオチンの泳動挙動

(北大院地環研) ○児玉 心, 田中 俊逸, 中村 博

## MIGRATION BEHAVIOR OF AVIDIN AND BIOTIN BY USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Kokoro Kodama, Shunitz Tanaka, Hiroshi Nakamura

Division of Material Science, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University.

### 【ABSTRACT】

The migration behaviors of the biotin, biocytin, lipoic acid, and HABA were investigated by CE. A good separation of four substances was achieved at pH 8.5-9.5 by CZE, while were at 0.15, 0.075, 0.1M SDS by MEKC.

Adsorption of the avidin onto the walls of capillary made it difficult to migrate regularly when bare fused silica capillary was used. Therefore, the migration behavior of the avidin was studied in varying CE conditions such as the addition of zweiter ion and polymers to the buffer and the use of a coated capillary.

### 【緒言】

キャピラリー電気泳動法(CE)を用い、生体内での代謝に関わる重要な物質であるビタミン類の分離、定量が試みられている。様々な水溶性、脂溶性ビタミンに対してもCEが適用されており、演者らも水溶性ビタミンの一種である、ナイアシンとその類似化合物のCEにおける泳動挙動について報告を行った。<sup>1</sup> 更に、ナイアシンと同様に水溶性ビタミンであるビオチンの泳動挙動について、バッファのpHや界面活性剤の効果についての検討を行った。

また、ビオチンは卵白中に存在する蛋白質であるアビジンと特異的な相互作用を持つことが知られている。しかし、アビジンのCEにおける泳動挙動については、まだ詳細な報告はされていない。そこでアビジンのCEにおける泳動挙動についても検討を行った。

### 【実験】

実験には、内径が50もしくは100 $\mu$ mの溶融シリカ製のキャピラリーが用いられた。バッファは0.2 $\mu$ mフィルターによって濾過された後、キャピラリーに導入する。検出はオンカラム吸光検出器で行い、印加電圧は実験に応じ変化させた。水相、ミセル相の測定には、それぞれメタノール、スダンIIIを用いた。



## 【結果と考察】

ビオチン及びビオチンと同様にアビジンとの相互作用を有するものとしてピオシチン、リポ酸、色素である2-(4'-hydroxyazobenzene) benzoic acid (HABA)の四種類の物質を対象として検討を行った。バッファのpHを7.5-9.5に変化させたときの四種類の物質の移動度の変化をFig.1に示す。ピオシチンの移動度がpH8.5を境に減少していることから、その等電点がpH8.5付近であることが予想される。また、HABAは、pHの増加とともに移動度の減少がみられることから、解離が進んでいることがわかる。ピオチン、リポ酸の移動度はこのpH範囲では変化がなく、これらはほぼ完全に解離しているものと考えられる。

次に、0.05-0.15Mのドデシル硫酸ナトリウム(SDS)をpH9.1のバッファに添加し、四種類の物質を泳動させた。この時のキャパシティーファクター( $k' = n_{mc} / n_{aq}$ )をSDS濃度に対しプロットしたところ、ピオシチンに直線関係が得られた。この直線の傾きより分配係数(K)を求めたところ、83.0であった。

次にアビジンのCEにおける泳動挙動について検討した。蛋白質の分析にCEを適用する場合、キャピリー内壁への蛋白質の吸着が問題となってくる。吸着を制御する為に、内壁をコーティングしたキャピラリーや、バッファへの両性イオンやポリマーの添加等、様々な条件が用いられた。

Fig.2に、正電荷を有する化学結合型キャピラリー（スベルコ社製、CElect<sup>TM</sup>-Amine）を用いたときのアビジンとストレプトアビジンの分離例を示す。

## 【参考文献】

1. S. Tanaka, K. Kodama, H. Nakamura and T. Kaneta, Migration behavior of niacin derivatives in capillary electrophoresis, J. Chromatogr. (1995) in press.

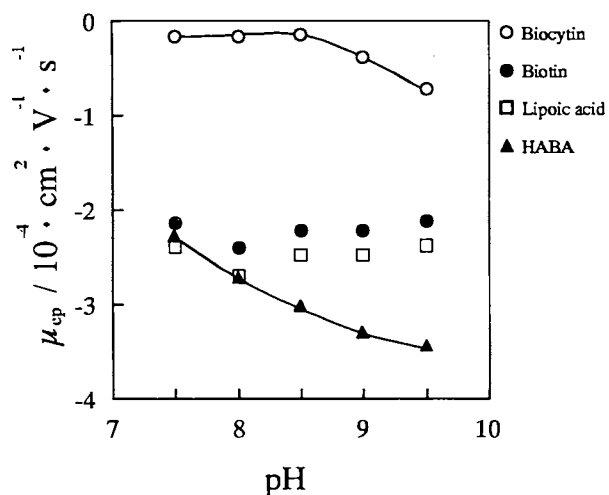


Fig.1. Effect of the pH on the Electrophoretic Mobility Buffer, Phosphate buffer (pH7.5-8.0), Borate buffer (pH8.5-9.5); Sample, 1)Biocytin, 2)Biotin, 3)Lipoic acid, 4)HABA ; Voltage, 15kV ; Capillary, 70cm x 50μm I.D..

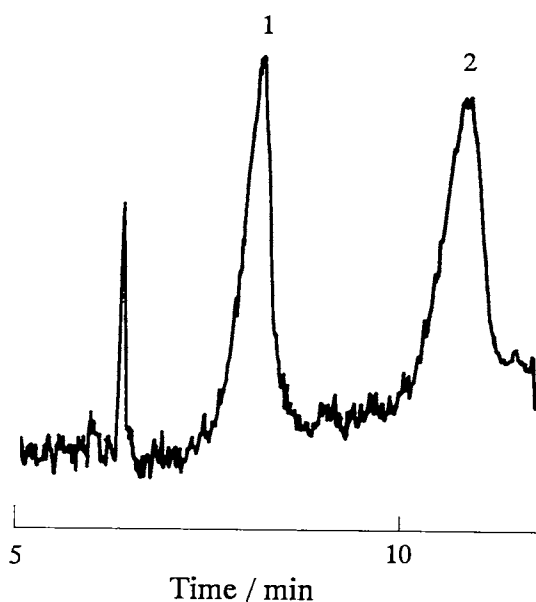


Fig. 2. Separation of avidin and streptavidin Sample, 1)Streptavidin, 2)Avidin ; Capillary, CElect<sup>TM</sup>Amine, 70cm x 50μm I.D. ; Buffer, 20mM acetic acid (pH4.0) ; Voltage, -15kV ; Current, 2μA ;

## 30 SDS存在下でのポリエチレンオキシド： 見落とされている動的荷電マトリックスとしての側面

(近畿大薬\*、阪大蛋白研\*\*) \*久保兼信、\*岡部亘雄、\*\*高木俊夫

POLY(ETHYLENEOXIDE) IN PRESENCE OF SDS: OVERLOOKED ASPECT OF DYNAMICALLY CHARGED MATRIX

Kanenqbu Kubo\*, Nobuo Okabe\*, Toshio Takagi\*\*

\*Fac.Pharm.Sci., Kinki Univ.; \*\*Inst.Protein Res., Osaka Univ.

**Poly(ethyleneoxide)(PEO) binds maximally about 4 grams of SDS per gram. The high affinity of SDS to PEO has been well recongnized in the field of surfactant research. On the other hand, PEO solution is used as a molecular sieve in CE in presence of SDS taking no notice of the context. Underlying principles of successful separation in the widely used CE mode must be thus considered taking care of the facts that both the matrix and analytes are dynamically chargeable.**

### 1. はじめに

ポリエチレンオキシド(PEO)がSDSを大量に結合し高密度に荷電することは、界面活性剤の研究者の間では広く知られている(Shirahama,K.(1974)Colloid Polym.Sci.,252, 978-981)。他方、キャピラリー電気泳動の分野においては、様々な高分子溶液が、SDS存在下で分子ふるい媒体として用いられている。それらの中で、PEO溶液はCE開発の遙か以前に最初にその“ふるい機能”が見出され(Bode,H.-J.(1976)FEBS Lett.,65,56-58)、CE開発後は広く愛用されている(Ganzler,K. et al.(1992)Anal. Chem.,64,2665-2671)。“分子ふるい”が荷電を持つことはタブーである。SDS存在下のPEO溶液を媒体とするCEにおけるように、“ふるうもの”と“ふるわれるもの”の双方が高度にマイナスに荷電し得る状況にあつて、しかもなお分子ふるい効果が十分に発揮されるのは一見すると不可思議なことである。この場合、双方の荷電は固定されていず、複合体形成の結果として導入された動的なものである。このような特殊な“分子ふるい”の事例の背後に、どのような事情が存在するのであろうかという疑問を抱いたことが、本研究開始の動機であった。

2. 実験 SDSの結合量測定: TSK-G3000SWXLカラムと示差屈折計を含むHPLCシステム。電気泳動: Quanta-4000 (Waters社)あるいはCapi-1000 (大塚電子)。キャピラリー: 溶融シリカキャピラリー (大塚電子; 内径75 $\mu$ m、全長33cm、有効長25cm)。PEO: TSKのGPC用分子量標準試料SEシリーズと通常の市販品。緩衝液: 50 mMリン酸ナトリウム、pH 7.5。SDS類縁体 (sodium octylbenzene sulfonate)、花王(株)より提供。

3. 結果 示差屈折法によってPEOへのSDSの結合量を決定したところ、PEO 1グラムあたり最大で約4グラムのSDSが結合することが見出された。結合量には顕著な分子量依存性は見出されなかった。CEにおいて用いられている他のポリマーについても検討した。ポリビニールアルコール、ポリビニールピロリドン、メチルセルロースはSDSを顕著に結合したが、デキストランとポリアクリルアミドは全くSDSを結合しなかった。

SDS存在下で各種のPEOのキャピラリー電気泳動を試みた。この際に、PEOとSDSのいずれもが吸光検出に適当な吸収帯を持たないので、ベンゼン核を有するSDS類縁体 (Tsuji, K. & Takagi, T. (1975) J. Biochem., 77, 117-123) あるいは油溶性色素、Yellow OB (Takagi, T. et al. (1980) Biochim. Biophys. Acta, 623, 271-279)、を添加することによって複合体をラベルして検出可能とした。PEOは頭書のようなSDSの大量結合の結果として、高度にマイナス荷電した複合体として電気泳動することが確認された。複合体の電気泳動移動度は広い範囲 (10-5000K) で分子量に依存しない、つまり高分子電解質に見られる“素抜け挙動”を示した。

マイナス極側の電極槽に比較的濃厚なPEO溶液を満たして、実際に分子ふるい媒体として用いるPEO溶液において網目自体が電気泳動するかを検討した。分子量15KのPEOの3%溶液においては、網目自体が結合したSDSによる荷電のために電気泳動することが見出された。

#### 4. 論議

PEOはSDSを最大量で約4 g/gも結合することが明らかになった。CEによって検討したところ、SDS-PEO複合体は典型的な素抜け挙動を示し、一種の疑似高分子電解質として電気泳動することが明らかになった。この電気泳動の傾向は3%程度の濃厚溶液においても見られた。

SDS-PEO複合体は、複数のSDSのミセルをPEO分子鎖が絡み付くようにして連結して形成されている (Cabane, B. (1977) J. Phys. Chem., 81, 1639-1645)。PEOへのSDSの結合はcmc付近で急激に起こって完結する、他方では蛋白質へのSDSの結合はcmc以前においてほぼ完結することが知られている。したがって、PEO溶液のSDS存在下での蛋白質への分子ふるい効果には、cmcを挟んで質的に異なる領域が存在すると予想される。CE分析において、PEO濃度は数%であり、他方SDSの仕込み濃度は0.1%程度である。PEO分子鎖へのSDSの結合は電気泳動開始時には飽和されていず、その後に漸次に供給されるSDSが結合して行くものと推定される。現在、SDSとPEOの相互作用に関する既存知識とSDS・PEO共存下のCE分析において観察される現象との間に、橋を架ける努力を継続している。

SDS存在下での高分子溶液を分子ふるい媒体とするCEは、用いる高分子のSDSに対する親和性に様々な差異が存在するという事実を無視して行われている。この問題に注意を払うべきである。

# 蛋白質ポリペプチドドデシルサル フェート複合体の電気泳動挙動に及 ぼす対イオンの効果

(近畿大薬\*) (阪大蛋白研\*\*)

○\*久保兼信、\*\*高木俊夫、\*岡部亘雄

SIGNIFICANT EFFECT OF COUNTERION REPLACEMENT FROM SODIUM TO ALKANOLAMMONIUM IN  
ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF PROTEINS IN PRESENCE OF DODECYL SULFATE

Kanenobu Kubo\*, Toshio Takagi\*\*, Nobuo Okabe\*

\*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University.

\*\*Institute for Protein Research, Osaka University.

Taking advantage of high efficiency and resolution of capillary electrophoresis, electrophoretic behavior of proteins in presence of dodecyl sulfate was compared under condition of presence of a sole cation using following alkanolammonium ions: Tris, Triethanolammonium and Triisopropanolammonium. Even when the cation is sodium, proteins turned out not to behave in free solution as expected. Namely they don't electrophorese with identical electrophoretic mobility. This tendency was found to be enhanced further when sodium was replaced by alkanolammonium to enable separation of proteins even in free solution.

1. はじめに ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の蛋白質変性能が、電気泳動媒体としてのトリス緩衝液濃度の増減によって変化することは、最初にクロロフィル・タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で示された。この結果は SDS の変性能力が対イオン種、ナトリウムであるかトリスであるか或いはそれらの割合、に依存して増減する事を示唆したものであった。我々是对イオンをアルカノールアンモニウムイオンに替えることによってドデシルサルフェート (DS) の変性能力を制御できることを見いだしている (Kubo et al. J. Biochem. 99, 1545 (1986), Anal. Biochem. 224, 572 (1995))。

そこでキャピラリー電気泳動の高分解能に着目し、上記グループの3種の対イオン (トリス (Tris), トリエタノールアンモニウム (Trie) そしてトリイソプロパノールアンモニウム (Triip)) とナトリウムを対象をしぼって、DS 存在下での蛋白質或いはそれらのポリペプチド鎖の電気泳動挙動が前者の対イオンの種類によって、どのような影響を受けるかを検討した。

2. 実験 キャピラリー (内径 75  $\mu$ m, 有効長 25cm, 全長 33cm, 大塚電子) は Hjertén の方法 (J. Chromatogr. 347, 191 (1985)) を多少改変することによりポリアクリルアミドでコ

ーティングした。試料蛋白質は必要に応じて還元アルキル化した。コラーゲン $\alpha 1$ と $\alpha 2$ 鎖はラット尾の腱より調製。これらの蛋白質は十分量のDS塩及び少量の $\text{NaN}_3$ とOrange Gを含む個々の泳動緩衝液に溶解し(最終濃度, 0.4 mg/ml) 5s/5kV でキャピラリーに導入した。ミセルマーカータにはYellow OBを用い蛋白質の導入法に準じた。電気泳動緩衝液(50 mM, pH 7.5)は次の組成のものを用い、陽極槽には0.1%のホルムアミドを加えた: 0.3% SDS/Sodium phosphate, 0.3% TrisDS/Tris-HCl, 0.3% TrieDS/Trie-HCl, 0.3% TriipDS/Triip-HCl。泳動装置はQuanta-4000(ウオターズ社)を使用し、印加電圧は5或いは10kV、室温下で行った。

3. 結果・考察 Figure 1にSDS, TrisDS, TrieDSそしてTriipDS存在下での蛋白質ポリペプチドの自由溶液中での電気泳動図を示す。SDS-蛋白質ポリペプチド複合体の自由溶液中の電気泳動移動度は蛋白質の種類・分子量に関わらず一定である(素抜け挙動)とされてきたが、キャピラリー電気泳動(CE)で測定すると高精度のために理想的な素抜け挙動からの逸脱が認められる。このSDS(R.S.D.=1.14)において見られた傾向はTrisDS(R.S.D.=1.73), TrieDS(R.S.D.=1.85)そしてTriipDS(R.S.D.=2.65)の順に一層増幅される。DSの対イオンの変更は単に蛋白質の自由溶液中での分離における分解能を高めるのみならず、電気泳動移動度の逆転を生ずる事例(TriipDS, peaks 3 and 4)が認められる。Fig. 2に4種のDSミセルの電気泳動図を示す。個々のミセルの電気泳動移動度の違いが高精度に検出でき、それらの順序は複合体についての素抜け挙動からの逸脱順序と良い相関を示している。他方、蛋白質へのDS結合量も上記の順序で低下することが判っている。自由溶液中でのミセルおよび複合体の電気泳動移動度は主にその実効荷電に依存するので、CE使用による分解能の向上によって明らかになった素抜け挙動からの逸脱は、蛋白質へのDS結合量が減少し複合体の荷電密度が低下した結果、それぞれの蛋白質の荷電あるいは立体構造の個性の抹殺の度合いが不十分になったためと推定される。以上の結果は、他方ではカチオン種に関してDS塩を選択することによって、蛋白質の分離の様式を制御できることを示している。

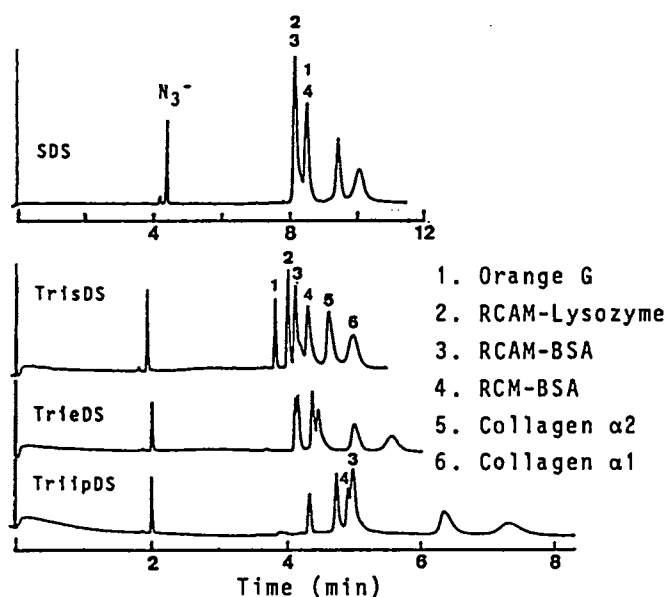


Fig. 1. Effect of counterion of dodecyl sulfate on electrophoretic separation of proteins.

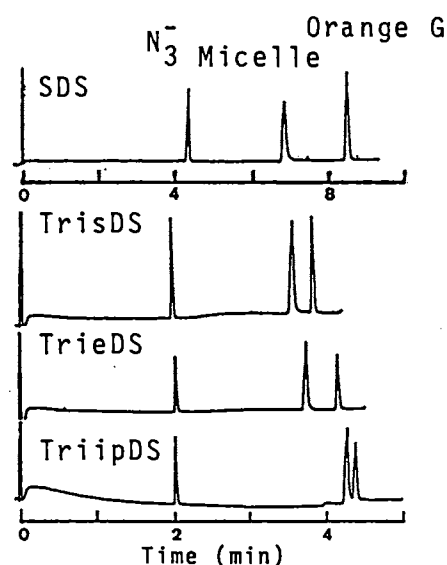


Fig. 2. Electrophoresis of dodecyl sulfate micelles with various cations.

(京都大学 薬学部) ○瀧川明正、塩野浩光、大西貴徳、中川照眞

## APPLICATION OF CE TO DRUG - PROTEIN BINDING STUDY

Akimasa SHIBUKAWA, Hiromitsu SHIONO, Takanori Ohnishi, Terumichi NAKAGAWA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Frontal analysis was incorporated into chiral CE for the enantioselective determination of unbound concentration of a chiral basic drug under plasma protein binding equilibrium. Electrokinetic injection of drug - protein mixed solution allowed only unbound drug bearing positive charge to enter the capillary, while neither negatively charged protein nor bound drug was introduced. Unbound basic drug was resolved into two zonal peaks of the enantiomers, and the unbound concentration of each enantiomer was determined from the corresponding plateau height. This method was applied to investigate the effect of sialic acid residue on the bindability of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP). It was suggested that sialic acid residue is responsible for the enantioselectivity in AGP - propranolol binding.

【緒言】薬物は血漿中でアルブミンや $\alpha_1$ -酸性糖タンパク (AGP) 等の血漿タンパク質と可逆的に結合 (タンパク結合) し、結合型薬物濃度と非結合型薬物濃度は平衡状態にある。非結合型薬物は血中から標的部位へ容易に移行できるが結合型薬物は血管壁を透過できないので、薬理効果 (又は副作用) の発現や薬物体内動態はタンパク結合の影響を強く受ける。従って、有効かつ安全な薬物の開発と臨床使用を行う上で、タンパク結合の研究は不可欠である。一方、現在使用されている薬物の約半数は光学活性中心を有しており、その半数はラセミ体として利用されている。光学活性な薬物では光学異性体間で薬理効果が異なる他、血漿タンパク質との相互作用が異なる可能性があるので、立体選択的なタンパク結合研究が必要である。

近年、極微量試料の分析が可能なキャピラリー電気泳動 (CE) をタンパク結合研究に適用する試みが注目されており、CE を用いる先端分析法や Hummel-Dreyer 法、あるいはアフィニティー CE 法などが開発されている。我々は、光学活性な CE に先端分析法を組み込むことにより、光学活性な塩基性薬物のタンパク結合を立体選択的に評価するための分析法 (HPCE/FA 法) を開発するとともに、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク (AGP) のタンパク結合における糖鎖構造の影響検討に適用したので報告する。モデル塩基性薬物としてベラパミル (VER、Ca チャンネル遮断薬) 並びにプロプラノロール (PRO、 $\beta$  遮断薬) を用いた。

【実験条件】HPCE 装置、大塚電子社製 CAPI-3000。泳動緩衝液、リン酸緩衝液 (pH2.5、40mM トリ

メチル- $\beta$ -シクロデキストリン(TM- $\beta$ -CD)を含む)。印加電圧、+15kV。検出、200nm。温度、25°C。

**【結果】 (1) chiral HPCE/FA法の開発** 試料導入は電気的方法 (+18kV、30秒) により行った。生体中でのタンパク結合を研究するには試料溶液を生理的条件 (pH7.4) に保つ必要があるが、VER光学分離のための泳動緩衝液の至適pHは2.5であった。従って、試料溶液を直接pHの低い泳動緩衝液に接触させると生理的平衡が保てなくなり、正しい分析値が得られない。そこで、試料溶液の導入に先立って、試料溶液と同じpHを持つ少量のリン酸緩衝液を吸引注入することによりこの問題を解決した。キャピラリー内部は酸性の泳動緩衝液 (pH 2.5、前述) で満たされており電気浸透流は発生しない。試料溶液中ではタンパク質は負に帯電しているのでキャピラリー内に導入されず、また、結合型薬物は導入されない。その結果、正に帯電した非結合型薬物だけが選択的に導入された。この際、光学異性体間で導入速度の差はなく、非結合型薬物は試料溶液中と同じ光学異性体比を保ちながら導入された。キャピラリー内に導入された非結合型薬物はキラルセクターにより光学分離され、プラトー部分を有する2つのピークが得られた。各プラトー高さから非結合型薬物濃度を光学異性体ごとに再現性良く求めることができた。なお、吸引法を用いて試料注入した場合にはピーク幅がタンパク結合率に依存し、結合性の高い試料では異性体ピークが重なってしまう場合があるが、電気的注入法を用いるとこの問題を回避できる。

**(2) AGP糖鎖構造が立体選択的タンパク結合に及ぼす影響** 塩基性薬物のタンパク結合にはAGPが深く関与する。AGPの糖含量は約40%であり、糖鎖末端にはシアル酸残基が存在する。また、AGPの糖鎖構造は生体中でミクロな不均一性を示すことが知られている。しかしながらAGPのタンパク結合における糖鎖の影響はほとんど知られていない。そこで、AGPシアル酸の酵素的切断に伴うVERやPRO異性体の非結合型濃度変化を本法を用いて立体選択的に調べた。AGP溶液中の(S)-VERの非結合型濃度は(R)-VERよりも1.6倍高く立体選択性を示したが、酵素処理を施しても非結合型濃度に顕著な変化はみられず、シアル酸残基はVERとAGPとの結合に関与しないことが判明した。次にAGPとPROとの結合性を調べたところ、(R)-PROの非結合型濃度は(S)-PROよりも1.3倍高く立体選択性が観察された。一方、アシアロ化に伴って、(R)-PROの非結合型濃度は変化しないのに対して(S)-PROの非結合型濃度は増加して(R)-PROと同じ値になった。このことから、シアル酸残基と(S)-PROとの相互作用が立体選択性の原因であることが示唆された。

**【結論】** 先端分析法をCEと組み合わせることにより塩基性薬物のタンパク結合を定量的、立体選択的に評価できる超微量分析法を開発した。本分析法の試料注入量は超微量(100~200nL)であり、asialo AGPのように容易に入手できないタンパクと薬物との結合性を調べる上で有用である。

**【文献】** 1) A.Shibukawa, Y.Yoshimoto, T.Ohara, T.Nakagawa, *J.Pharm.Sci.*, **83**(1994)616.

2) T.Ohara, A.Shibukawa, T.Nakagawa, *Anal.Chem.*, **67**(1995)3520.

### 33 キャピラリー等電点電気泳動法に用いる 新しい p I マーカー

(城西大学理学部化学科\*) (ベックマン株式会社\*\*)

○\* 小林英三郎、\* 青木 幹容、\*\* 新井 悦郎

New pI Marker for Isoelectric Focusing in Capillary Electrophoresis

Hidesaburo Kobayashi\*, Mikiyasu Aoki\* and Etsuo Arai\*\*

\* Faculty of Science, JOSAI University, SAKADO-SHI 350-02

\*\* Beckman Instruments Ltd., Sasazuka Center Bldg., SHIBUYA-KU 151

New pI markers for isoelectric focusing were synthesized from carrier ampholites and DNS-chloride. The purification of DNS-ampholites mixture was carried out by electrophoresis. The analysis of DNS-amph by capillary isoelectric focusing showed that these derivatives were useful pI markers for the protein analysis. We discuss the applicability of DNS-amph-pI marker in the capillary isoelectric focusing method.

はじめに

近年、タンパク質およびペプチドの等電点をキャピラリー電気泳動により測定する方法が実用化されてきており、分析速度、p I の測定精度および操作の簡便性が向上してきている。またキャピラリー等電点電気泳動は、従来広く使用されている平板およびディスクゲル電気泳動に代わるものとして有用であり、特に2次元電気泳動の分析手段として発展することも期待できる。

等電点電気泳動の手法において、p I が既知のタンパク質をマーカーとして未知サンプルの p I を決定するが、タンパク質の変性などにより p I が変化するなど、タンパク質をマーカーにはいくつかの欠点がある。

我々は分光学的に特徴のある誘導体を合成し、等電点電気泳動に用いるための安定な p I マーカーの開発を目的としている。p I マーカーの条件として、1) 広い pH 範囲で再現的な泳動がされること、2) 内部標準物質として分光学的にサンプルと容易に判別可能であること、3) 十分な溶解度を持つこと、4) キャピラリー等電点電気泳動で高感度に検出できることなどである。これらの条件を満たすため、市販のキャリアアンフォライトのDNS誘導体を合成した。この p I マーカー (DNS-amph pI marker) の p I 測定における有用性について報告する。



## 実験方法

合成：キャリアアンフォライト (Servalyte 3.5-10 または Ampholine 7-9) を炭酸水素ナトリウムおよび水酸化ナトリウムで pH 8 とし、DNS-Cl を加え室温で 17 時間反応後、不溶物を除去し精製のための標品とした。

精製：DNS-ampholite 混合物はバイオラッド社の THE ROTOFOR CELL を使い、12 W 定電力で 17 時間等電点電気泳動し DNS-ampholite を含む画分を得た。この画分の等電点電気泳動を繰り返し行い精製した。

装置：キャピラリー電気泳動装置はベックマン社の P/ACE システム 5510 および 5010、キャピラリーはベックマン社供給による内径 50  $\mu\text{m}$ 、全長 37 cm 内面処理ビューズドシリカキャピラリー (商品名：eCAP ニュートラルキャピラリー) を用いた。検出器はキャピラリー端より 7 cm の位置に設置し、データ処理はベックマン社のゴールドワークステーションソフトウェアを用いた。

## 結果と考察

ロトフォアセルによる DNS-ampholite の等電点電気泳動を図 1 に示す。DNS-ampholite は 320-340 nm に吸収極大を示すのでフラクション番号 7 を水で希釈し再度等電点電気泳動を行い精製を進めた。再電気泳動によって得た分画をマーカートンパク質と共に CIEF で分析した結果を図 2 に示す。DNS-ampholite のロトフォアセルによる分画は未だ不完全であるが、マーカートンパク質とは 280 nm および 320 nm の吸収強度の違いからそれぞれを明確に判別できる。これらの結果はロトフォアセルによる DNS-ampholite の精製を進め、単一成分を得れば有用な pI マーカー (DNS-amph pI marker) になることを示唆している。

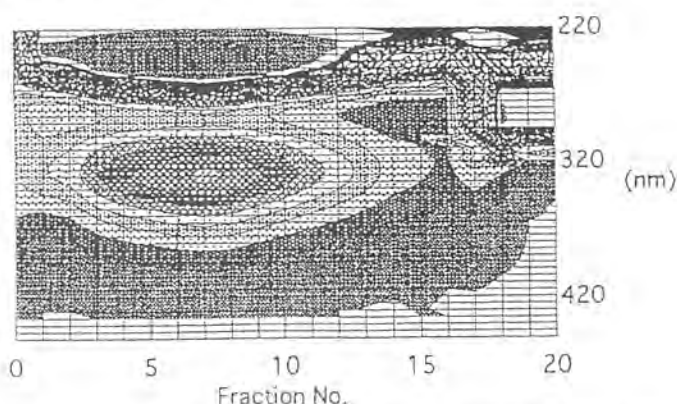


図 1 ロトフォアセルによる DNS-ampholite の等電点電気泳動

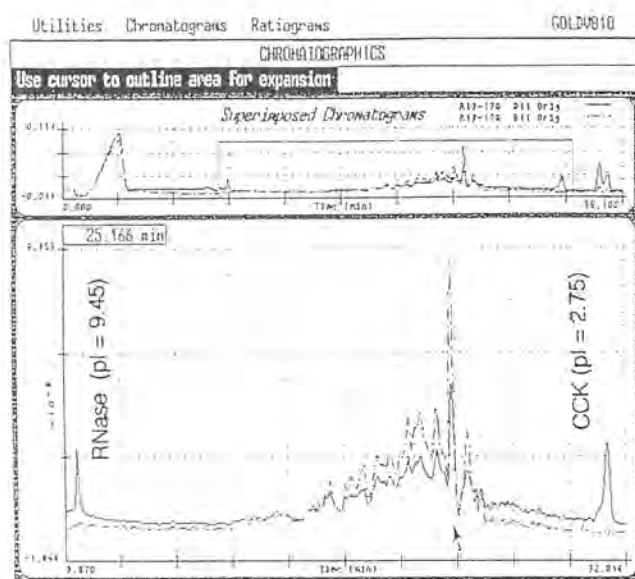


図 2 DNS-ampholite およびマーカートンパク質の CIEF  
実線：280 nm、点線：320 nm

# キャピラリー等電点電気泳動におけるタンパク質移動過程の検討

(愛媛大学理) ○宮本洋光、岩崎愛子、真鍋 敬

## STUDIES ON THE PROCESS OF PROTEIN MOBILIZATION IN CAPILLARY ISOELECTRIC FOCUSING

Hiromitsu MIYAMOTO, Aiko IWASAKI, Takashi MANABE

Faculty of Science, Ehime University

### ABSTRACT

The process of protein mobilization in capillary isoelectric focusing was studied. Purified proteins or human plasma were focused in a fused-silica capillary, inner wall of which was coated with linear polyacrylamide, in the presence of ampholyte mixtures.

For the mobilization of proteins after focusing, the method of "catholyte replacement" was employed. The process of protein mobilization in the capillary was monitored employing several replacement catholytes. The process of protein mobilization was further examined employing polyacrylamide gel isoelectric focusing for the monitoring of pH change caused by the catholyte replacement.

### 1. はじめに

キャピラリー電気泳動におけるタンパク質などの生体高分子の分析には、キャピラリーゾーン電気泳動をはじめ、すでにさまざまな方法が用いられている。今回我々は、タンパク質をその等電点 (pI) の違いに基づき分離する方法としてキャピラリー等電点電気泳動を行い、分離能を向上させるために泳動条件の検討を行った。さらにキャピラリー中でのタンパク質移動の過程を調べるために2次元ゲル電気泳動を用い、等電点電気泳動段階でのゲル中のpH変化とタンパク質の移動の様子を検討したので報告する。

### 2. 実験

装置：キャピラリー電気泳動装置は、サトウ・メディカル・ラボ社の UVspectrophotometer SC100、一部には Beckman 社の P/ACE System 2100 を使用した。キャピラリーは、内径 75  $\mu\text{m}$ 、全長 27 cm (有効長 20 cm)、ポリアクリルアミドで内壁処理したフューズドシリカキャピラリーを用いた。

試料：標準タンパク質は Sigma 社より購入したものを、正常人血漿はヘパリン入り試験管に採血後、遠心分離し血球を除いた後 -20℃ で冷凍保存したものを用いた。

泳動：タンパク質試料の希釈溶液と Ampholine (ファルマシア-LKB 社) の希釈溶液を混合し、こ

れをキャピラリーに注入した。通常、陽極槽液には 10mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 、陰極槽液には 10mM  $\text{NaOH}$  を用い、電場 250V/cm、Ampholine は通常終濃度 1% とした。タンパク質が収束した時点（通常、泳動開始後 10 分）で陰極槽の溶液組成を変えてタンパク質を検出器側に移動した。

### 3. 結果及び考察

キャピラリー等電点電気泳動は、電気浸透流を利用して収束と移動検出を 1 段階で行う方法もあるが、電気浸透流の制御が難しいと予想されたので収束と移動検出を分けて泳動を行う方法をとった。

陰極槽交換液を変えた場合  $\text{NaCl}$ ,  $\text{HCOOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ （すべて 10mM）の 4 種類について結果を比較すると、最も良い分離を示したのは酢酸で、精製タンパク質 6 種を混合した試料の泳動では約 80 本の紫外吸収ピーク及び肩を与えた。Fig.1. に酢酸交換液での精製タンパク質（6 種混合）の分離例を示す。また、正常人血漿を試料とした場合でも 10mM 酢酸が最も多い（約 70 本）紫外吸収ピーク及び肩を与えた。移動過程における電流値の上昇は、酢酸を交換液としたときが最も小さい。すなわち、交換液組成によってキャピラリー中の pH 変化の速度が調節できると考えられた。キャピラリー中での pH の測定は困難であるのでマイクロ 2 次元ゲル電気泳動の等電点ゲルを用い、実際の pH 変化及びタンパク質の移動を調べ、キャピラリー中でのタンパク質の移動過程を検討した。

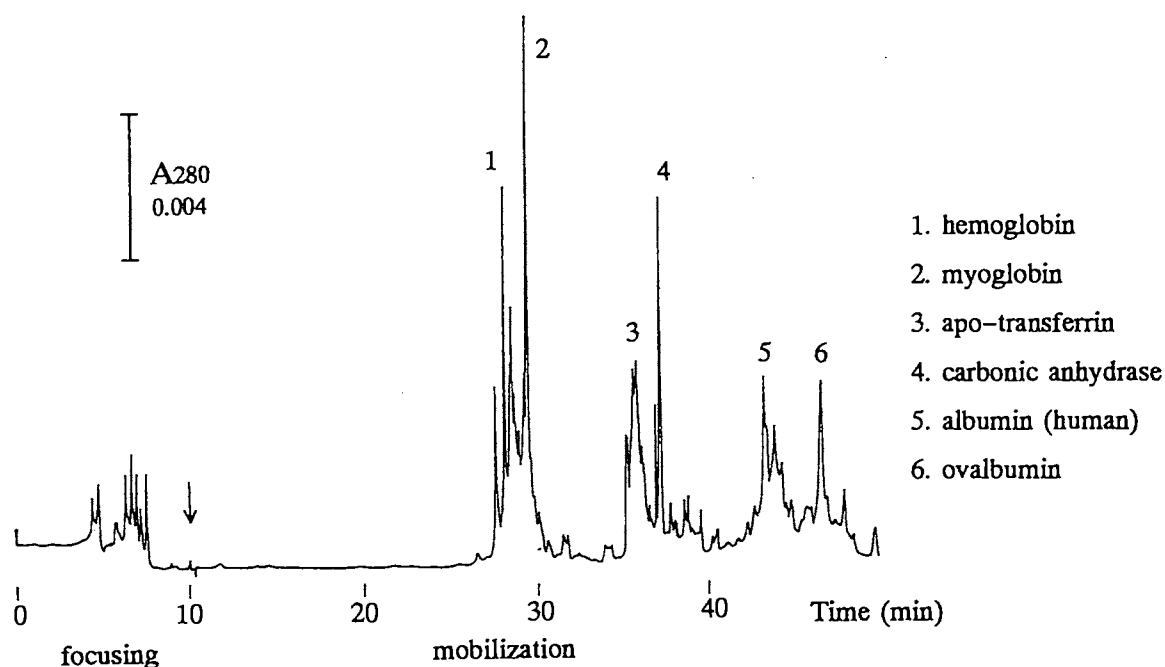


Fig. 1. Capillary isoelectric focusing and mobilization of proteins.

# 35 通電キャピラリー液体クロマトグラフィー：非粒子系ゲル固定相の検討

(浜松医科大学) 藤本忠蔵

## Ungranular Gels as Stationary Phases for Capillary Electrochromatography

Chuzo Fujimoto

*Department of Chemistry, Hamamatsu University School of Medicine*

Ungranular stationary phases are prepared directly in a capillary by the copolymerization of functional monomers and a crosslinking monomer. In one example, hydrophobic interaction is induced through the incorporation of an acrylamide monomer bearing an alkyl chain into the copolymer and its extent is changed by varying the content of organic solvents in mixed aqueous-organic buffers. Substantial electroosmotic flow, which permits the pumping of neutral compounds through the bed, is attained by the incorporation of acidic or basic acrylamide monomers into the gel materials. The performance of the ungranular gel packed columns is exemplified by separation of several solute mixtures. Also, the advantages and limitations of this approach will be discussed.

### 1. 緒言

電気浸透流を送液に使用する通電キャピラリー液体クロマトグラフィーが提案されてから二十年になるが、まだ一般的な手法となっていない。種々の固定相のマイクロ（充填）カラムならびに中空キャピラリーカラムが報告されてきたが、マイクロカラムの利用に関して幾つかの問題点が考えられる。第一に、充填剤をカラム内に保持するにはフリットが必要であり、フリット製作時のシリカ微粒子の過熱による閉塞は移動相の流れを低下させる。他方、不十分な加熱はカラムからの充填剤の流出を起こす。第二に、加熱に伴うポリイミドコーティングの剥離はカラムを著しく脆弱化する。第三に、固定相を充填したり（界面動電現象を利用しなければ）、カラム内に移動相を満たしたり、気泡を追いつけたりするには高速液体クロマトグラフィー用送液ポンプの補助が必要であり、装置の簡便性から考えると欠点である。第四に、液体クロマトグラフィー用充填剤を使用する限り、電気浸透流を送液に用いても、中性分子に対する分離の選択性は従来と変わらない。

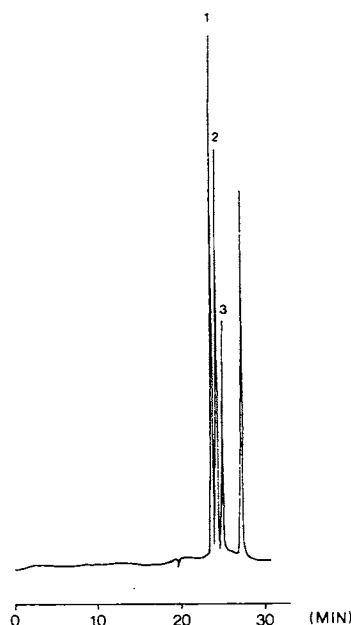
本研究では、種々のアクリルアミドをフューズドシリカキャピラリー内で重合して得られる非粒子系充填剤のカラムを用いる通電キャピラリー液体クロマトグラフィーについて検討した。合成したポリマーはいずれも透明なヒドロゲルで、高電圧下で十分な電気浸透流を発生した。

## 2. 装置

高電圧電源に HCZE-30PN0.25 (松定プレジジョンデバイス)、検出に 870-CE 紫外吸収検出器 (日本分光) を使用した。キャピラリーとして内径 75 $\mu$ m のフューズドシリカ素管 (GLサイエンス) を用いた。キャピラリーの内壁をメタクリル酸 3-トリメトキシシリルプロピルエステルで処理した後、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミドを架橋剤として用い、アクリルアミド類のモノマーを重合することによってカラムを製作した。カラムの使用に先立ち十分な予備通電を行った。

## 3. 結果

Fig. 1 は 2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸-*N*-イソプロピルアクリルアミド共重合体 [Poly(AMPS-co-IPAA)] 含水ゲルを充填剤としてステロイドを分離した例である。本手法により、通電キャピラリー液体クロマトグラフィーのカラム製作時の問題点を解決できるばかりでなく、高い圧力下では使用できなかった充填剤を含む新しい充填剤の使用が可能になると考えられる。



**Fig. 1** Chromatogram of a mixture of steroids on a Poly(AMPS-co-IPAA) hydrogel column. Mobile phase, 100 mM Tris-150 mM boric acid (pH 8.1); capillary, 65.0 cm X 0.075 mm i.d. (50.0 cm effective length); %T, 4.0; %C, 10.0, %S, 10.0; applied voltage, 20.0-kV; detection, 254 nm. Peaks: (1)hydrocortisone, (2)prednisolone, (3)hydrocortisone 21-acetate, (4) testosterone.

## エンドウマメレクチンのキャピラリーアフィノフォ レシス：キャピラリー電気泳動による 2 価 - 多価相 互作用の解析

(帝京大・薬) ○志村 清仁、笠井 献一

### CAPILLARY AFFINOPHORESIS OF PEA LECTIN: ANALYSIS OF DIVALENT-POLYVALENT INTERACTION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Kiyohito Shimura, Ken-ichi Kasai

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

The interaction between divalent protein, pea lectin, and affinophores bearing multiple mannoside residues on succinylpolylysine was analyzed by capillary electrophoresis with UV detection as a model system of divalent interactions. The analysis based on the principle of affinity electrophoresis yielded dissociation constants between the lectin and the affinophores ( $K_d$ ). The  $K_d$  is a function of two dissociation constants, i.e., one for monovalent and one for divalent interaction ( $K_1$  and  $K_2$ , respectively). The analysis of the inhibition of the affinophoresis by methyl mannoside revealed the relation between the dissociation constant for the lectin-methyl mannoside complex ( $K_i$ ) and  $K_2$ . Since  $K_i$  was determined by other technique,  $K_2$  was determined by the relation. Finally,  $K_1$  was determined by using the relationship among  $K_d$ ,  $K_1$  and  $K_2$ . High precision of capillary electrophoresis makes otherwise difficult analyses of molecular interactions feasible.

#### 【はじめに】

抗体やレクチンなどに見られるように、生体内では多価の相互作用が重要な働きをしている。多価の相互作用が結合を強めることは、抗体でボーナス効果としてよく知られているとおりである。しかし、多価の相互作用の寄与を定量的に調べる良い方法はない。そこで、2 価のレクチンであるエンドウマメレクチン (PSA) と、このレクチンが結合するマンノシドを多数持つアフィノフォアとの相互作用をモデル系として取り上げ、キャピラリー中でアフィノフォレシスを行うことにより 2 価と多価の分子間の相互作用を解析した。

#### 【方法】

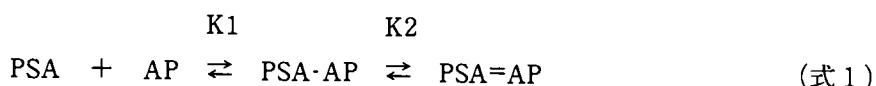
(1) アフィノフォアの調整 平均重合度 270 のポリリジンを完全にスクシニル化し、陰イオン性のアフィノフォアマトリックスとして用いた。マトリックスの一部のカルボキシル基に p-アミノフェニルマンノシドを水溶性カルボジイミド法によってアミド結合させ、マンノシドアフィノフォアとした。マンノシド含有率の異なるアフィノフォアを 3 種調製し実験に用いた。

(2) キャピラリー電気泳動 タンパク質の結合を押さえる目的で、内壁をスクシニル化ポリリジンでコーティングした内径 25  $\mu$ m の溶融シリカキャピラリー (全長 57 cm、泳動距離 50 cm) にアフィノフォア溶液を充填し、陽極端に PSA を添加して電気泳動 (350 V/cm) を行った。泳動緩衝液と

して 0.1 M トリス - 酢酸 (pH 7.9) を用い、25℃に恒温化した。中性単糖による阻害を見る場合には単糖を陽極液 (100  $\mu$ l) に加えた。装置は Beckman 2210 型を使用した。

## 【結果】

多価リガンドアフィノフォア (AP) と 2 価の PSA との間には次のような平衡を仮定した。



ここで、PSA-AP は 1 価の複合体、PSA=AP は 2 価の複合体を表し、 $K1 = [\text{PSA}][\text{AP}] / [\text{PSA} \cdot \text{AP}]$ 、 $K2 = [\text{PSA} \cdot \text{AP}] / [\text{PSA} = \text{AP}]$  である。AP の濃度を変えて PSA のアフィノフォレススを行うことにより、AP と PSA の複合体の解離定数 ( $K_d$ ) を求めた (表 1)。ここで、 $K_d = K1 K2 / (1 + K2)$  (式 2) である。

すでに親和力を決定してあるメチル  $\alpha$  - D - マンノシド (MeMan) の存在下に PSA のアフィノフォレススを行い、MeMan の存在によって大きくなった見かけの  $K_d$  ( $K_{dapp}$ ) のもとの  $K_d$  に対する比を MeMan の濃度に対してプロットすると、下に凸の曲線が得られた。この曲線の  $[\text{MeMan}] = 0$  での傾きは、 $(2 + K2) / (1 + K2) K1$  (式 3) になる。 $K1$  は PSA の 1 つの結合部位と MeMan がつくる複合体の解離定数であり、別の実験で 0.65 mM と求められた。式 3 から、リガンド含有量の異なる 3 つのアフィノフォアについて  $K2$  が得られた (表 1)。また、式 2 から、 $K1$  をそれぞれ求めることができた。

Table 1. Interaction between PSA and affinophores with different ligand density

affinophore	Man/ Lys (mol/ mol)	$K_d$ ( $\mu$ M)	$K1$ ( $\mu$ M)	$K2$
1	0.042	63	71	7
2	0.093	44	58	3
3	0.175	26	42	1.6

## 【考察】

アフィノフォア中のリガンドの含有量 (密度) が増すにしたがって、2 価の PSA と多価アフィノフォアとの相互作用は強まり、 $K_d$  の減少が見られた。予想されたように、同時に  $K2$  も減少しており、2 つ目の相互作用が起こりやすくなっていることが原因の 1 つであることが示された。しかし、リガンド密度の増加にともない  $K1$  の低下も見られ、1 つ目の相互作用も強まっていた。この理由については現在検討中である。

以上のように、2 価のタンパク質と多価の物質との相互作用については、競争的に結合する 1 価の物質による阻害を解析することにより、一歩踏み込んだ解析が可能になる。キャピラリー電気泳動はこのような解析においても、高感度かつ高精度な分析法として有用なことが明らかになった。

## 【文献】

- 1) K. Shimura, J. Chromatogr. 510, 251-270 (1990).
- 2) K. Shimura, K. Kasai, Anal. Biochem. 227, 186-194 (1995).
- 3) 志村清仁, 蛋白質核酸酵素, 39, 1625-1637 (1994).

# 37 レクチン存在下でのオリゴ糖のアフィニティー キャピラリー電気泳動分離ならびに結合定数の 一斉測定

(近畿大・薬) ○多賀 淳、薮嶋幸子、北野敦子、本田 進

## SEPARATION AND ASSOCIATION CONSTANT DETERMINATION OF OLIGOSACCHARIDES BY AFFINITY CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN THE PRESENCE OF LECTINS

Atsushi Taga, Sachiko Yabusako, Atsuko Kitano, and Susumu Honda  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

**SUMMARY** Five kinds of disaccharides (maltose, cellobiose, lactose, melibiose and gentiobiose) as PMP derivatives were well separated by affinity capillary electrophoresis in phosphate buffer (pH 6.8) containing RCA<sub>60</sub> (5.0 mg/ml) in a linear polyacrylamide-coated capillary and their association constants to RCA<sub>60</sub> were determined simultaneously. On the other hand isomaltooligosaccharides with varying d. p. s as ANTS derivatives were separated from each other and their migration times changed with the concentration of LCA in carrier. From these changes their association constants to LCA were determined simultaneously.

(はじめに)

キャピラリー内にリガンドを入れて電場をかけながらタンパク質の動きを観察する手法は両者の間の結合力を調べる方法として有効な方法であり、演者ら<sup>1)</sup>およびいくつかのグループ<sup>2,3)</sup>により検討されている。この反対にタンパク質を入れたキャピラリー内でリガンドの動きを調べることはこれと裏腹の関係にあり、両者の結合性に対して相補的な情報を提供する。この方法の利点は複数のリガンドを互いに分離させながら共通のタンパク質への結合性を調べることができる点にある。しかし、フューズドシリカ管にはタンパク質が吸着してゼータ電位が変動し、リガンドの移動時間を指標にする解析がほとんど無効になってしまうという弱点があった。本演題ではキャピラリー内壁のコーティングを行ってこの問題を取り除き、この方法の利点を生かした分析を試みた。以下にタンパク質としていくつかのレクチンを用い、リガンドには複数のオリゴ糖を用いるモデル実験の結果を示す。

(実験方法)

キャピラリー電気泳動装置：Applied Biosystems 270A 型装置にポリアクリルアミドでコーティングしたキャピラリー (内径 50  $\mu$ m、長さ 50 cm) を装着して使用した。キャピラリー内壁のコーティング<sup>4)</sup>：3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシランで内壁を活性化させたのち、アクリルアミドを重合させることにより行った。泳動液：50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) および、これにヒマメレクチン (RCA<sub>60</sub>) またはレンチルレクチン (LCA) を添加したものを使用した。糖鎖試料：二糖類混合物 (セロビオース：Cel、ゲンチオビオース：Gen、マルトース：Mal、メリビオース：Mel および ラクトース：Lac) の PMP 誘導体およびイソマルトオリゴ糖 (d. p. 1~20) の ANTS 誘導体を用いた。誘導体化：PMP 化および ANTS 化はそれぞれ文献<sup>5)</sup>および文献<sup>6)</sup>に従って行った。

(結果と考察)

レクチンが共存する適切な条件下でオリゴ糖誘導体は互いに分離される。また、それぞれのオリゴ糖の



移動度とレクチンの結合定数を求めることができる。以下に順を追って結果を述べ考察する。

**二糖類の分離：**5種類の二糖類混合物に内部標準としてラムノース (Rha) を添加して PMP 化を行い、レクチンを含まない 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を泳動液として用いて電気泳動を行った場合、Rha は二糖誘導体と完全に分離したが、5種類の二糖類は1本の幅広いピークを与えた。しかし、この泳動液にガラクトースを認識するタンパク質である RCA<sub>60</sub> を 5 mg/ml の濃度で添加して電気泳動を行った場合には、(Gen と Mal の分離は完全ではないが) Rha および 5種類の二糖類全てを分離することができた (Fig. 1)。

**対タンパク質結合定数の一斉測定：**5種類の二糖類のPMP誘導体混合物を試料として用い、泳動液に種々の濃度で RCA<sub>60</sub> を添加したところ、各二糖誘導体の移動時間には濃度依存的な変化がみられ、既報<sup>1)</sup>に基づいてこれらの関係を解析したところ RCA<sub>60</sub>-Lac および RCA<sub>60</sub>-Mel の結合定数としてそれぞれ  $1.08 \times 10^4$  (M<sup>-1</sup>) および  $1.52 \times 10^4$  (M<sup>-1</sup>) という値を得ることができた。

一方、イソマルトオリゴ糖の ANTS 誘導体をレクチンを含まないリン酸緩衝液 (pH 6.8) を泳動液として電気泳動したところ重合度 1~21 までの糖が完全に分離された。この泳動液にグルコースを認識するレクチンである LCA を種々の濃度で添加したところ、分離の改善はみられなかったが、LCA の濃度依存的な移動時間の変化がみられた。これらのデータをもとにイソマルトース (d. p. 2) から比較的ピークトップがはっきりしている d. p. 15 のオリゴ糖までについて LCA との結合定数を一斉に算出することができた。なお、このようにして求めたイソマルトース ANTS 誘導体の結合定数はイソマルトース ANTS 誘導体を単独で用いて求めた結合定数にほぼ一致し、この一斉測定の信頼性が確かめられた。

以上のように、アフィニティーキャピラリー電気泳動により糖鎖の分離を行うことができ、糖のキャピラリー電気泳動に分離モードを一つ加えることができた。また、多数の糖類の混合物を試料として用いてそれぞれの移動時間のレクチン濃度依存性を調べることににより、それぞれについてレクチン類との結合定数を一斉に求めることができた。このことは、単に結合定数を一斉に測定できたというばかりでなく、十分に精製されていない糖試料についても、本法を用いれば糖鎖-タンパク質結合定数を測定できる可能性を示している意味でも評価できる。

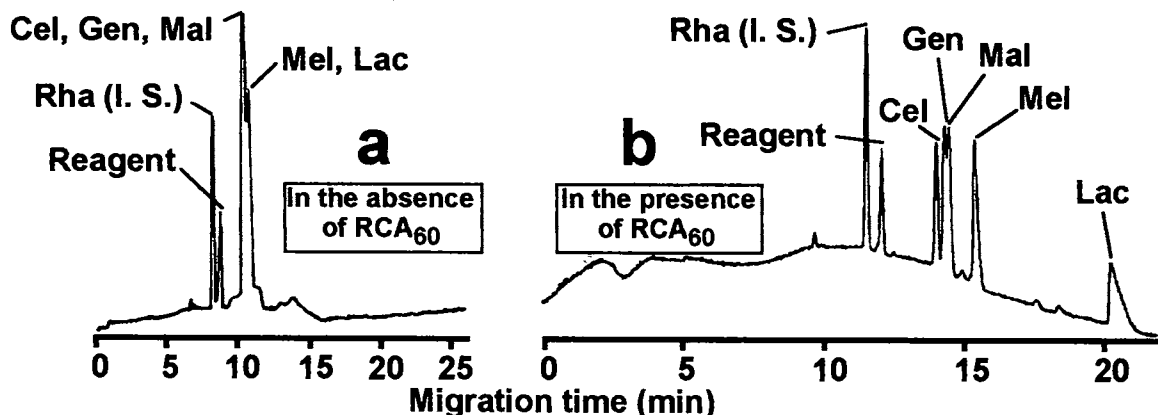


Fig. 1. Separation of several PMP-disaccharides by affinity capillary electrophoresis. Capillary, polyacrylamide-coated fused silica; carrier, 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) in the absence (a) and presence (5 mg/ml) (b) of RCA<sub>60</sub>; applied voltage, 20 kV (a) or 18 kV (b); detection, UV at 245 nm; temperature, 30°C

#### 文献

- 1) S. Honda et al., *J. Chromatogr.*, **597** (1992) 377.
- 2) G. M. Whitesides et al., *J. Med. Chem.*, **36** (1993) 126.
- 3) R. Kuhn et al., *Anal. Biochem.*, **218** (1994) 131.
- 4) Y. Baba et al., *J. Chromatogr.*, **653** (1993) 329.
- 5) S. Honda et al., *Anal. Biochem.*, **180** (1989) 351.
- 6) C. Horvath et al., *J. Chromatogr.*, **645** (1993) 337.

(愛媛大学・理) ○宇津見 卓二・大田 英人・真鍋 敬

SIZE-SEPARATION OF SDS-PROTEINS BY LINEAR POLYACRYLAMIDE-FILLED  
CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Takuji Utsumi, Hideto Ohta, Takashi Manabe

Department of Chemistry, Faculty of Science, Ehime University

Electrophoretic conditions for size-separation of proteins by linear polyacrylamide-filled capillary electrophoresis were examined. Standard proteins were separated according to their molecular mass (ranging from 12,500 to 76,000) both in Tris-hydrochloride buffer or in Tris-glycine buffer. The peak widths of the separated proteins were affected by the anion composition in the buffers. Attempts to further improve the protein-peak separation will be presented.

## 1 はじめに

細胞タンパク質をキャピラリー電気泳動によって高い分離能で分離分析するためには、電荷の違いによる分離とサイズの違いによる分離の両方を用いる必要があると予想される。ポリアクリルアミド架橋ゲルを用いたキャピラリー電気泳動によるタンパク質の分離はすでに報告した。また、架橋のない線状ポリアクリルアミドを用いたタンパク質のサイズ分離についても、報告されている。しかし、これらの方法によるタンパク質の分離能は従来のゲル電気泳動のそれをまだ上回っていないと考えられる。そこで、キャピラリー中に線状ポリアクリルアミド (linear polyacrylamide, LPA) を充填した場合について、タンパク質のサイズ分離の基礎的な条件の検討を行った。

## 2 方法

## 2-1. 試料

試料は Sigma社の精製タンパク質で cytochrome c, carbonic anhydrase, ovalbumin, albumin, apo transferrinを 0.5mg/ml、0.5% SDSの溶液とし、95℃で3分間加熱処理したものを純水で希釈して用いた。

## 2-2. 電気泳動法

- ・電気泳動装置: CAPI-1000 (大塚電子) および P/ACE 2100 (Beckman) を使用した。
- ・キャピラリー: 内壁処理溶融シリカキャピラリー (I.D. 75  $\mu$ m 実効長 20cm~30cm) を使用した。内壁処理は、壁面にシラン化合物を結合後、3% T線状ポリアクリルアミドを結合させる方法をとった。
- ・緩衝液: トリス-塩酸緩衝液およびトリス-グリシン緩衝液を用いた。

・線状ポリアクリルアミド：緩衝液に溶解し2～5 % Tとし、N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) と過硫酸アンモニウムで重合させた後、マイクロシリンジで直接キャピラリーに注入した。

### 3 結果と考察

まず、従来からのゲル電気泳動で用いられているトリス-塩酸緩衝溶液系におけるキャピラリー電気泳動の検討を行った。LPA濃度2～5 %の範囲で分子量12,500から76,000のタンパク質のサイズ分離が可能であった。しかし、タンパク質ピーク相互の分離は、充分ではなかった。このときの電気泳動の結果をFig. 1. (a) に示す。

トリス-塩酸緩衝溶液を含むLPAをキャピラリーに注入し試料を電気泳動注入後、陰極槽電極液をトリス-グリシン緩衝溶液に交換して泳動すると、ほぼ一本のピークに収束されて検出された。これは不連続緩衝溶液系ではSDSタンパク質の移動速度が大きく、等速電気泳動の状態が長く続いたためと考えられる。

トリス-グリシン緩衝溶液のみを泳動に用いた場合は、分離されたタンパク質のピーク幅はトリス-塩酸緩衝液のときよりも小さく、また緩衝溶液濃度が高いほどこの効果が大きく見られた。このときの電気泳動の結果をFig. 1. (b) に示す。また、試料中のSDSおよびタンパク質の濃度を変えた場合でもピーク幅が変化した。さらに試料ゾーンの濃縮を行い、分離能を向上させるための方法を検討している。

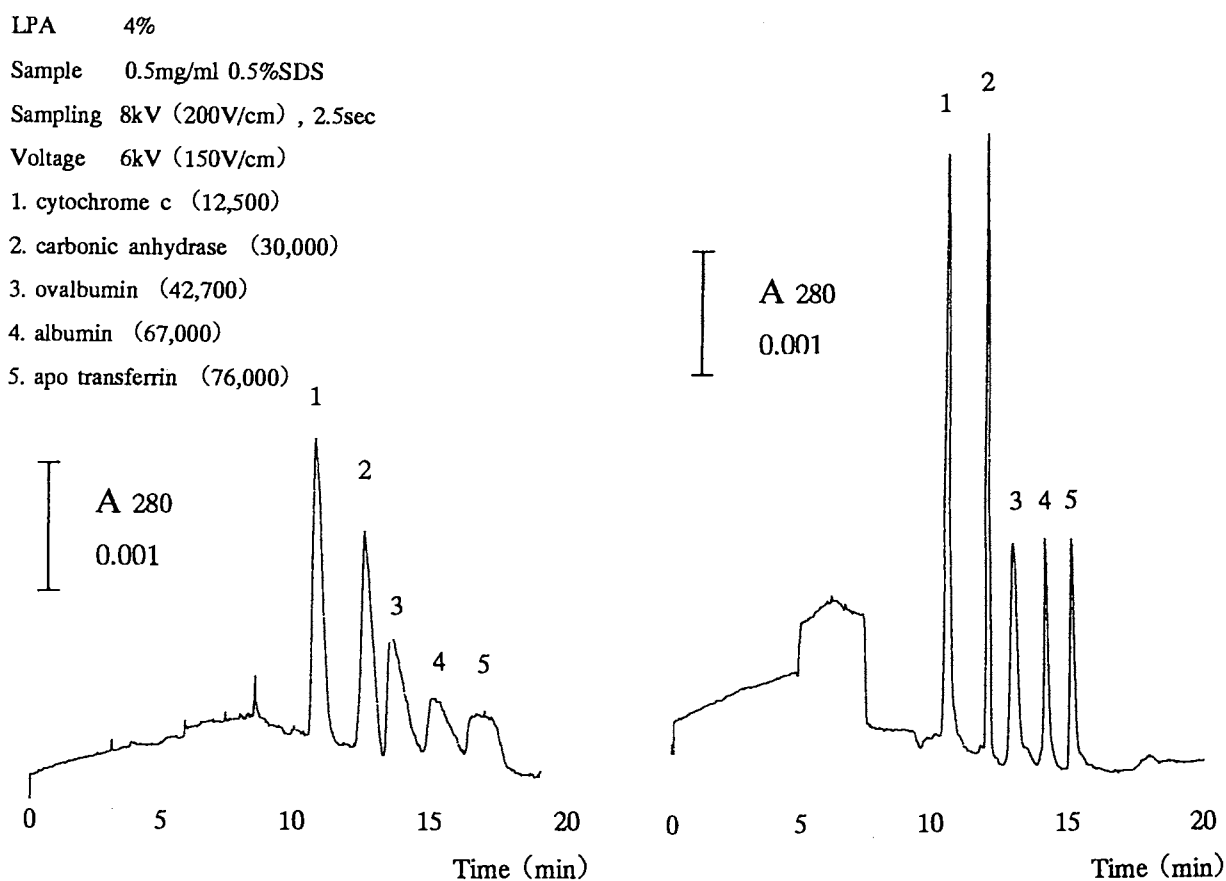


Fig.1. (a) Separation of proteins  
in Tris-hydrochloride buffer.

(b) Separation of proteins  
in Tris-glycine buffer.

## 39 キャピラリー電気泳動による p 5 3 癌抑制遺伝子の P C R - F S S C P 解析

(大塚製薬(株) 診断事業部) ○葛城肅典, 木下盛敏  
(大塚電子(株)) 北岸恵子  
(京都桂病院呼吸器センター) 千葉渉, 池田貞雄

### Fluorescence-Based Polymerase Chain Reaction-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of p53 gene by Capillary Electrophoresis

K. Katsuragi\* (1), K. Kitagishi (2), W. Chiba (3), S. Ikeda (3), and M. Kinoshita (1)

(1) Otsuka Assay Laboratories, Div. of Diagnostics, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan. (2) Otsuka Electronics Co., Ltd., Osaka, Japan. (3) Respiratory Disease Center, Kyoto-Katsura Hospital, Kyoto

Mutations of the p53 gene play an important role in neoplastic progression in human tumorigenesis. Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) techniques are now available for the detection of point mutations. The original method using polyacrylamide gel electrophoresis is disadvantageous, particularly for clinical tests and for analysis of large numbers of samples. However, using an automated capillary electrophoresis (CE) technique with molecular-sieving polymer solutions, we have devised a simple and rapid procedure, fluorescence-based PCR-SSCP, for the differential detection of point mutations that does not require SSCP with radioisotopes and polyacrylamide gels.

#### 【はじめに】

p 5 3 蛋白質は、細胞周期において D N A 複製の負の制御を行っている。p 5 3 遺伝子領域における点突然変異は多くの癌で多数報告されており、多段階発癌との関連が示唆されている。しかし、多くの場合 P C R - S S C P 法による解析であるため、その操作が繁雑なことやデータ解析に熟練を要することなどから、一般臨床検査として用いるには困難である。そこで、今回我々は自動化された P C R - S S C P 解析専用キャピラリー電気泳動装置を作成し、p 5 3 遺伝子点突然変異を検出する S S C P 解析法 (F S S C P - C E) を確立した。

#### 【実験材料および方法】

1. 対象 ; p 5 3 遺伝子の点突然変異の検出は、京都桂病院呼吸器セン

ターで切除された肺癌組織 63 例より抽出した染色体 DNA を対象とした。

2. プライマーおよび PCR ; p53 遺伝子エクソン 7 を完全に含むようにイントロン部分にプライマーを設定した。FSSCP-CE 解析に用いるプライマーは、アンチセンスプライマーの 5' 末端を FITC により標識した。PCR により増幅される DNA 断片長は、155 bp である。

3. 小型アクリルアミドゲルを用いた SSCP 解析とシークエンス解析 ; 小型アクリルアミドゲルによる SSCP 解析は、PCR 産物に脱イオンホルムアミドを添加し、熱処理により 1 本鎖に変性して、7% ポリアクリルアミドゲルにて 4 時間泳動後、エチジウムブロミド染色により検出した。変異が検出された 4 例については、PCR 産物を TAC クローニングベクターを用いてクローニングし、オートシーケンサーを用いたサイクルシーケンス法により塩基配列を決定した。

4. キャピラリー電気泳動法をもちいた SSCP 解析 ; 変異が検出された 4 例は、FITC で標識したアンチセンスプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR 産物は、脱イオンホルムアミドと混合した後、全自動キャピラリー電気泳動装置により SSCP 解析を行った。キャピラリー電気泳動装置は、サンプルの熱処理と冷却を自動的に行えるようにし、検出系は 100 W D2 ランプを使用した。泳動条件は、2% ポリアクリルアミドポリマーと 5% グリセロールを含む 2% ポリアクリルアミドポリマーを用いた non-gel sieving 法により行った。

### 【結果および考察】

1. 小型アクリルアミドゲルを用いた SSCP 解析により、4 例に点突然変異を検出した。シークエンス解析の結果、変異はコドン 247-248 番目における 6 塩基の欠失、コドン 260 番目とコドン 244 番目における 1 塩基の欠失、そしてコドン 244 番目の GGC から CGC への変異であった。

2. 4 例の点突然変異を FSSCP-CE 法により解析した結果、2% ポリアクリルアミドポリマーを用いた場合、コドン 244 番目の 1 塩基の欠失以外の 3 例において変異アリルを検出することができた。さらに 2% グリセロールを含む 5% ポリアクリルアミドポリマーを用いると、これら 4 種類の変異をすべて検出することが可能であった。

## 40 種々のキャピラリー電気泳動分析系（通常型キャピラリーゾーン電気泳動，SDS高分子溶液キャピラリー電気泳動及びキャピラリー等電点電気泳動）による髄液中 $\beta$ -trace proteinその他の低分子蛋白質の分析

（杏林大・保健\*）（杏林大・医・生化\*\*）（国立千葉病院・神経科\*\*\*）（ベックマン\*\*\*\*）

O\*平岡 厚，\*\*荒戸 照世，\*\*\*富永 格，\*\*\*\*安生 綾子

ANALYSES OF  $\beta$ -TRACE PROTEIN AND OTHER LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEINS IN CEREBROSPINAL FLUID BY VARIOUS CAPILLARY ELECTROPHORESIS SYSTEMS

Atsushi Hiraoka\*, Teruyo Arato\*\*, Itaru Toninaga\*\*\* and Ayako Anjyo\*\*\*\*

\*Kyorin University School of Health Sciences, \*\*Department of Biochemistry, Kyorin University School of Medicine, \*\*\*Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital, \*\*\*\*Beckman Instrument.

Ordinary capillary-zone electrophoresis, SDS polymer solution capillary electrophoresis and capillary isoelectrofocusing were applied to the analyses of  $\beta$ -trace protein and other low molecular weight proteins in cerebrospinal fluid from neuropsychiatric patients, and the data obtained were evaluated from the viewpoint of the biochemical diagnosis of central nervous system diseases.

### 1. 緒言

髄液の蛋白質には、血液に由来する主要成分の他、中枢神経系に由来するものも若干含まれており、それらは、プレアルブミンの一部及びトランスフェリンの一部を除いて分子量1-4万台の蛋白質としては比較的小さい分子種である。又、その主成分である $\beta$ -trace proteinは、最近になってProstaglandin D Synthetaseの活性を有することがわかり、神経化学の領域において注目を集めている。我々は、種々のキャピラリー電気泳動分析系を用いて、髄液中のその種の微量低分子蛋白質の分離定量を行ない、結果の臨床生化学的評価を行なった。

### 2. 対象及び方法

(1) 国立千葉病院・神経科を受診して髄液検査を施行された100人以上の種々の精神・神経疾患の患者を対象とした。

(2) 試料調整： 髄液を分画分子量の異なる限外ろ過膜を用いる遠心式限界外ろ過により，Major Protein Fraction（分子量3万又は5万の限外ろ過膜を通過しない成分の濃縮画分），Low Molecular Weight Minor Protein Fraction（分子量が1-3万又は1-5万の成分の濃縮画分）及び Small Substance Fraction（分子量1万以下の成分のみを含む，2回目の限外ろ過のろ液）の3分画に分け，2番目の分画のElectropherogram上にのみ検出されるピークを，主として検討の対象とした。1回目及び2回目の限外ろ過は，それぞれ2.5 mlのintactな髄液及び2 mlの1回目の限外ろ液を用いてdead stop volume (50  $\mu$ l)の濃縮画分が得られるまで定量的に行なった。通常型キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）の場合は，分子量3万の Cut Off 値を持つ膜を，又，SDS高分子溶液キャピラリー電気泳動（SDS-CZE）及びキャピラリー等電点電気泳動（CIEF）の場合は，分子量5万の Cut Off 値を持つ膜を，各々1回目の限外ろ過に使用した。

(3) 分析条件： 3種の分析モードとも Beckman P/ACE 2000 型を用いた。CZEの場合は，75  $\mu$ m X 50 cmのfused silica capillaryに20秒間試料を注入し，50 mM Borax (pH 9.2)を電解液として泳動し，280 nmで検出した。SDS-CZEのは，eCAP<sup>TM</sup> SDS-200 Kit(Beckman)によって行ない，各ピークを与えるPolypeptideの分子量は，分子量既知のマーカの挙動との比較により求めた。又，CIEFは，eCAP<sup>TM</sup> Neutral Capillary Methods Developing Kit/Protein を使用するOne-Step法（試料，Ampholyte試薬，TEMEDの混合液をhydrophilic polymerでcoatingした中性なCapillaryに均一に分布するように注入し，10 mM Phosphateと20 mM NaOHを両極液とするIEF終了後，電気浸透流を利用して動かして検出するもの）で行い，分画された蛋白成分のPI値の推定には，PIマーカの挙動を利用した。

### 3. 結果及び考察

CZEにおいては，Major Protein Fractionのelectropherogramは，セルロースアセテート膜又はagarose-gel filmを用いる通常の電気泳動におけるdensitogramの時間の方向を逆にしたものに類似し，又，Small Substance Fractionの分析では遊離の芳香族アミノ酸等が検出された。Low MW Minor Protein Fractionに特徴的な成分の一つ（この画分の主成分）は，ゲルろ過HPLCの結果（MW：約25,000）より $\beta$ -trace proteinと考えられた。 $\beta$ TPは，適当な内部標準を用いて定量分析が可能であり，種々の脳器質性疾患において髄液レベルが上昇していることが示唆された。SDS-CZEのelectropherogram上では， $\beta$ -trace proteinは分子量26,000(A)と23,500(B)の2つのfractionに分離し，脳の炎症・脱髄疾患におけるピーク面積比(A/B)は脳血管障害・てんかんにおけるその値より大であり，又，脳血管障害で低値傾向の分子量11,600の $\gamma$ -trace protein，脳・髄膜の炎症性疾患での増加が見られた12,400の $\beta_2$ -microglobulin及び約46000の $\alpha_1$ -acid glycoprotein等も同じ画分中に同定された。又，そのCIEFではPIが4-7の間に複数のピークが検出され，SDS-CZEの結果との比較より， $\beta$ TPの主fragment(A)のPI値は5.4と推定された。

(岐阜薬科大学<sup>1</sup>、京大農<sup>2</sup>)○江坂幸宏<sup>1</sup>、小林幹男<sup>1</sup>、池田篤治<sup>2</sup>、加納健司<sup>2</sup>

## ANALYSIS OF MICROORGANISMS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

Yukihiro ESAKA<sup>1</sup>, Mikio KOBAYASHI<sup>1</sup>, Tokuji IKEDA<sup>2</sup>, Kenji KANO<sup>2</sup><sup>1</sup>Gifu Pharmaceutical University, <sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University.

Electrophoresis of microorganism was studied using CZE. Electrophoretic mobilities ( $\mu$ ) of seven bacteria were measured under a same condition and each of them possessed a value of  $\mu$  different from the others'.  $\mu$  values decreased with increase in ionic strength of electrolyte and converged on certain values, not zero. Such behavior is known for a colloidal particle covered by an ion-penetrable surface-charge layer as cells.

【緒言】細胞が電場のなかで電気泳動することはよく知られている。これは、リン脂質で構成される細胞膜や、各種の解離性の官能基を有する細胞膜が電荷を持つためである。その電気泳動移動度 ( $\mu$ ) は、細胞の大きさや形に依存するだけでなく、細胞膜、細胞壁の構造、さらにはその表面の柔らかさをも反映する。したがって、 $\mu$ の測定及び解析は細胞の同定やキャラクタリゼーションにつながる。最近、通常の電気泳動を用いた研究のなかで転移性の癌細胞の表面の特徴的な柔らかさが報告されている。

大腸菌などの原核動物は大体1 $\mu$ m程度の直径を持つ。通常の細胞電気泳動の移動度； $\mu$ の測定は顕微鏡によるものであるが、通常対象は哺乳類細胞の様なより大きな細胞であり、原核細胞のように微小のものが対象である場合、測定に困難が生じるものと予想される。そこで、この測定に、キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)を用いることで、より簡便に測定が行えることが期待される。基礎実験として、CZEを用いて何種類かの細菌について $\mu$ を測定し、その結果を考察した。

【実験】試料(細菌7種) : *E. Coli*, *Acetobacter aceti* IFO, *Ceratia*, pf-TN5, NP.2503(ADH欠損), NP.2503C (ADH rich), 酵母 CZE測定条件: 電解液; 10 mM phosphate buffer(pH 7.8)+NaCl (イオン強度(I) = 0.026-0.176 M) , 10 mM phosphate buffer (pH 10.8) + NaCl (I = 0.032-0.182), 荷電圧; 5 kV (電流 4-39  $\mu$ A), キャピラリー長さ; 全長 50 cm (有効長 30 cm), 検出波長; 210 nm, 試料注入; 落差法。

【結果と考察】まず始めに、電解液に10 mM phosphate buffer(pH 7.8)を用いて、7種の試料について電気泳動を行い、 $\mu$ を測定した。pf-TN5を試料としたエレクトロフェログラムをFig.1に示す。細胞のピークは、比較的ブロードであることが特徴である。これは個体差を意味すると思われる。基本的に細胞は、測定条件下では負に帯電しており、また、ピークのテーリングもあまり見られないことから、キャピラリー内壁への吸着はあまりないものと考えられた。 $\mu$ は、各細菌によって異なった。特に、同種の細菌で、その含有するアルコールデハイドロゲナーゼ(ADH)の欠損株とrich株 (NP.2503及びNP.2503C) について $\mu$ に差があることが判った。

試料に pf-TN5を用いた、電解液のイオン強度と $\mu$ の関係をFig.2に示す。イオン強度の上昇に従い、移動度はある値に向けて頭打ちになる。粒子の電気泳動を行うとき、その電荷が粒子表面のみに



存在し、水も電解質イオンも浸み込めない剛い粒子の場合は、その  $\mu$  が Smoluchowski の式 (1式) に従う。

$$\mu = \epsilon_r \epsilon_0 \zeta / \eta \quad (1)$$

ここで、 $\epsilon_r, \epsilon_0, \eta$  はそれぞれ、比誘電率、真空の誘電率、電解質の粘性率を表す。この場合のゼータ電位 ( $\zeta$ ) は、実際の表面電荷 ( $\phi_0$ ) に近似的に等しい。この  $\phi_0$  は、2式のように書くことができる。従って、測定した  $\mu$  から表面電荷 ( $\phi$ ) が求められることになる。

$$\phi_0 = (2kT / ve) \operatorname{arcsinh} [\sigma / (8ne_0 kT)^{1/2}] \quad (2)$$

ここで、 $k, T, v, e, n$  は、それぞれ、Boltzmann定数、絶対温度、電解質の価数、電荷素量、イオンのバルク濃度を表す。しかし、細胞の  $\mu$  及び  $\phi_0$  は、1式及び2式では表せないことが判っている。細胞膜の外側には、細胞壁があり、そのなかには解離性の基に起因する電荷分布があり、水や電解質が浸み込むこともある。大島らは、細胞を表面が柔らかない粒子として捕え、その  $\mu$  を3式のように表した。

$$\mu = (\epsilon_r \epsilon_0 \zeta / \eta) (\phi_0 / k_m + \phi_{\text{DON}} / \lambda) / (1 / k_m + 1 / \lambda) + zeN / \eta \lambda^2 \quad (3)$$

ここで、 $k_m, \phi_{\text{DON}}$  は、それぞれ、表面電荷層内のDebye-Hukelパラメター、表面電荷層内部のDonnan 電位を示す。3式の右辺第2項は電解質濃度に依存しない。3式に従えば、Fig.2の頭打ちの値は第2項の値に相当する。(第1式及び第2式からは、電解質濃度の上昇に対し、 $\mu$  は0に収束していくことが示されている。) また、3式中の  $\lambda$  の値は、表面層の固さを表すパラメターであり、これが大きいほど粒子は剛いことを示す。今後、データの解析から表面の固さについての検討を行う予定である。

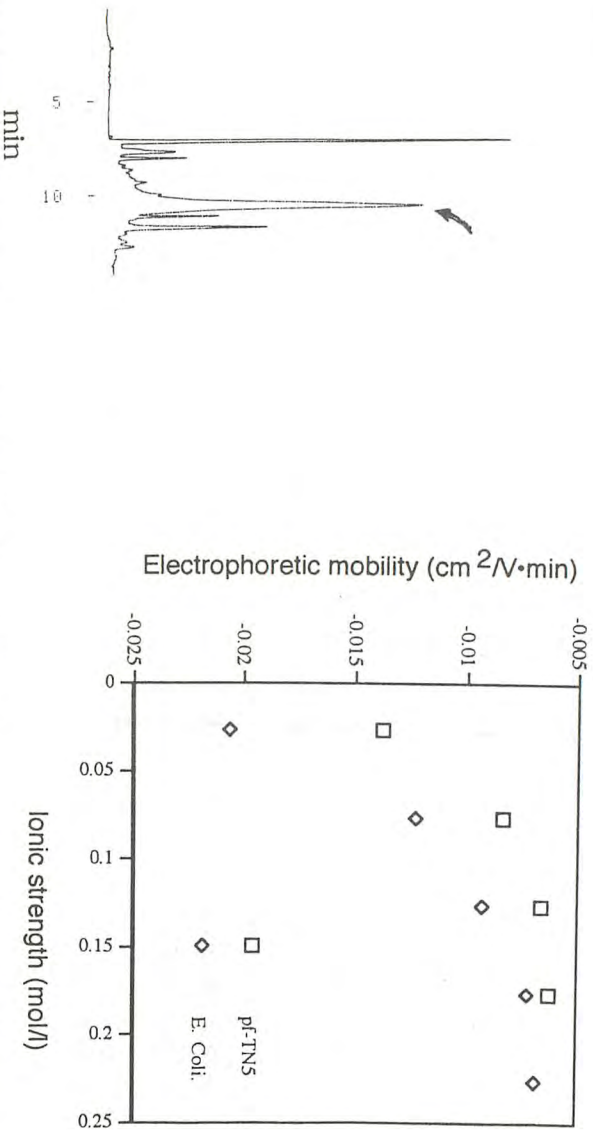


Fig. 1 An electropherogram of a bacteria (pI-TN5) conditions: electrolyte; 10 mM phosphate buffer (pH 7.8, I=0.026) applied voltage (current); 5 kV (4  $\mu$ A).

Fig. 2 Dependence of electrophoretic mobilities on ionic strength

- (参考文献) 1. 大島広行、生物物理 30(5) (1990) 13-17.  
 2. 大島広行、牧野公子 フラリマシア 29(5) (1993) 490-494.  
 3. H. OHSHIMA, T. KONDO, J. Colloid Interface Sci., 130 (1989) 281-282.  
 4. S. KAWAKITA et al. J. Colloid Interface Sci., 138 (1990) 182-186.

(名古屋工業大学) ○津田孝雄、北川慎也、

(江南女子短期大学) 高橋 勤

(理研・名古屋) 橋本 修、木内一壽

# MICRO ELELCTROPHORETIC SEPARATION SYSTEM FOR THE INNER FLUID IN A SINGLE CELL

Takao TSUDA<sup>1, 3)</sup>, Shinya KITAGAWA<sup>1)</sup>, Tsutomu TAKAHASHI<sup>2)</sup>,  
Osamu HASHIMOTO<sup>3)</sup> and Kazutoshi KIUCHI<sup>3)</sup>

1) Nagoya Institute of Technology, 2) Konan Woman's Junior College and

3) Riken Nagoya

A micro-separation system for capillary electrophoresis has been proposed. The system is composed of a short capillary ( $25\mu\text{m}$  i.d. and  $3\text{cm}$  long) for electrophoretic separation and a carbon fiber electrode ( $7\mu\text{m}$  o.d.) for electro chemical detection. The system is fixed on a stage of microscope and applied for the analysis of inner fluid in a single cell (PC12h).

Manipulation of a single cell has been also proposed with the aid of a capillary tubing and an electrostatic field.

細胞は複雑な生命体であり、様々な機能を持っている。これらの機能へのアプローチとして、一細胞内液の分離分析を行い、細胞内液の直接的な情報を得ることを試みた。

細胞の表面は負の電荷を持っており、細胞を静電場に置くと細胞は自らの負電荷により電気移動度を得、陽極へ向かって泳動する。これを利用し(1)細胞の電気泳動によるキャピラリー管中へ導入し、ついで(2)細胞の内液の分析を行った。

細胞のマニピュレーション及び内液の分析には神経芽細胞PC12hを用いた。

## (1) 細胞のキャピラリー管への導入

細胞のキャピラリーへの導入、及び分析を行う装置をFigure 1に示した。リザーバーA、B(容積約 $200\mu\text{l}$ )は一枚のプレパレート上に設けられている。電気浸透流のコントロールのため内壁処理をしたキャピラリー(内径 $25\mu\text{m}$ 、長さ $3\text{cm}$ )をA、B間に渡す。リザーバーBには生理食塩水を満たし、Aには細胞を含んだ培地を満たす。Aを陰極、Bを陽極とし $300\text{V}$ を印加すると細胞はその電気移動度により電気浸透流に逆らいキャピラリー管中へ導入される。これらの作業は顕微鏡下で行われ、細胞の導入を確認すると電圧の印加を停止する。

# キャピラリー電気泳動って 何だろう？



新刊

## 「キャピラリー電気泳動入門」

David N. Heiger 著(2色刷)B5判変型  
横河アナリティカルシステムズ監訳  
132頁 定価1,751円(税込)

⊕キャピラリー電気泳動は、高い分離能と迅速な分析。そして、サンプル量や溶媒の消費が最小限ですむ、新しく、すばらしい分離手法です。⊖でも、どうも、うまく使えない方。分析手法として興味はあるんだけど、って方。こんな本はいかがですか。⊕この本では、キャピラリー電気泳動を、もっと身近な分析技術として活用していただくための、理論から実際の分析ノウハウまでを詳しく解説しています。



### ビジュアルな図版でわかりやすい解説(本書の内容から)

電気浸透流の発生



a) フューズドシリカ(Si-O<sup>-</sup>)が負に帯電する



b) 水和された陽イオンが内壁表面に引き寄せられる



c) 電圧を印加すると陰極へ向う流れが発生する(プラグフロー)

### 主な内容

1. はじめに キャピラリー電気泳動・概説/分離技術の発展
2. キャピラリー電気泳動の原理 電気泳動/電気浸透流/EOFのコントロール/分析パラメータ/拡散/分離度
3. 分離モード キャピラリーゾーン電気泳動/選択性の変化と添加剤の利用/キャピラリー内壁のコーティング/CZEのアプリケーション/ミセル動電クロマトグラフィー/MEKCのアプリケーション/キャピラリーゲル電気泳動/CGEのアプリケーション/キャピラリー等電点電気泳動/OIEFのアプリケーション/キャピラリー等速電気泳動
4. HPCEの構造と操作 試料の注入/分離/検出/溶液の取扱い
5. 略語表
6. 参考文献
7. 索引

購入方法は、2通りあります。

1. 横河アナリティカルシステムズの営業所・代理店に、注文番号と冊数をご指定のうえお申し込み下さい。 \*注文番号: K9590ND
2. 下記の丸善本・支店にても販売しております。(他の書店では取り扱っておりません。)

取扱店

**M丸善**

本社・日本橋店: [〒103] 東京都中央区日本橋2-3-10 ☎(03)3272-7211 振替東京7-5番

支店・営業所—東京(お茶の水・丸の内・内幸町・浜松町・アークヒルズ・渋谷・錦糸町・北千住・取手・土浦・浜松・船橋)・千葉・八王子・松本・大宮・所沢・新潟/札幌・仙台・弘前・盛岡・郡山・筑波・水戸・横浜・名古屋・静岡・岐阜・三重・金沢・富山・福井・京都・滋賀・大阪・神戸・姫路・岡山・松山・広島・山口・福岡・長崎・鹿児島・沖縄/ニューヨーク・シカゴ・ロンドン



キャピラリー電気泳動は高圧電源で決まる!

超小型ハンディタイプ

キャピラリーゾーン電気泳動用

# 高圧電源

# New

## ■概要

キャピラリーゾーン電気泳動に必要なCV/CC、両極性出力、出力モニターなどを標準装備し、あらゆる分析もこの1台で行うことが可能となりました。汎用性にも優れた価値ある電源装置として注目を集めています。



**MATSUSADA**  
Precision Inc.



**松定プレジジョン株式会社**

東京営業所 〒101 東京都千代田区鍛冶町1-9-2高梨ビル7F TEL03-5256-7011 FAX03-5256-7012  
本社・研究所 〒525 滋賀県草津市青地町745 TEL0775-61-2111 FAX0775-61-2112

## (2) 細胞内液の分析

導入された細胞の内液を分析するためには、キャピラリー内で細胞のラプチャーを行う必要がある。ラプチャーは以下の手順で行った。リザーバーA内の細胞を含んだ培地を除去し、細胞をラプチャーさせるための溶液 (Triton X-100 を10% 含んだ25 mM ME S) を満たす。細胞導入時とは逆にAを陽極、Bを陰極として電圧を印加すると、電気浸透流により溶液はリザーバーBへと向かい細胞は電気移動度によりリザーバーAへと向かう。細胞が溶液と出会うと泳動速度が変化するので電圧印加を停止しラプチャーを視覚的に確認する。ついで、リザーバーAを分析用の溶液 (0.9% NaCl - 25 mM ME S) で満たし電圧 (300 V) を印加しキャピラリー電気泳動により細胞内液の成分を分離分析する。検出はリザーバーBのキャピラリー末端に7  $\mu$ mのカーボン電極を挿入し電気化学的に行った。

以上の方法で得られたエレクトロフォレグラムをFigure 2に示した。Figure 2-2は細胞の導入を行わずに上記手順を行ったブランクであり、ピークは見られない。このことより細胞導入時の培地による汚染はないと判断できる。Figure 2-1は細胞の分析結果である。180秒から270秒にかけて複数のピークが見られる。238秒付近にある最大のピークは神経伝達物質であるドーパミンと推定される。

現在これらのピークのより正確な定性情報を得るための検討を行っている。

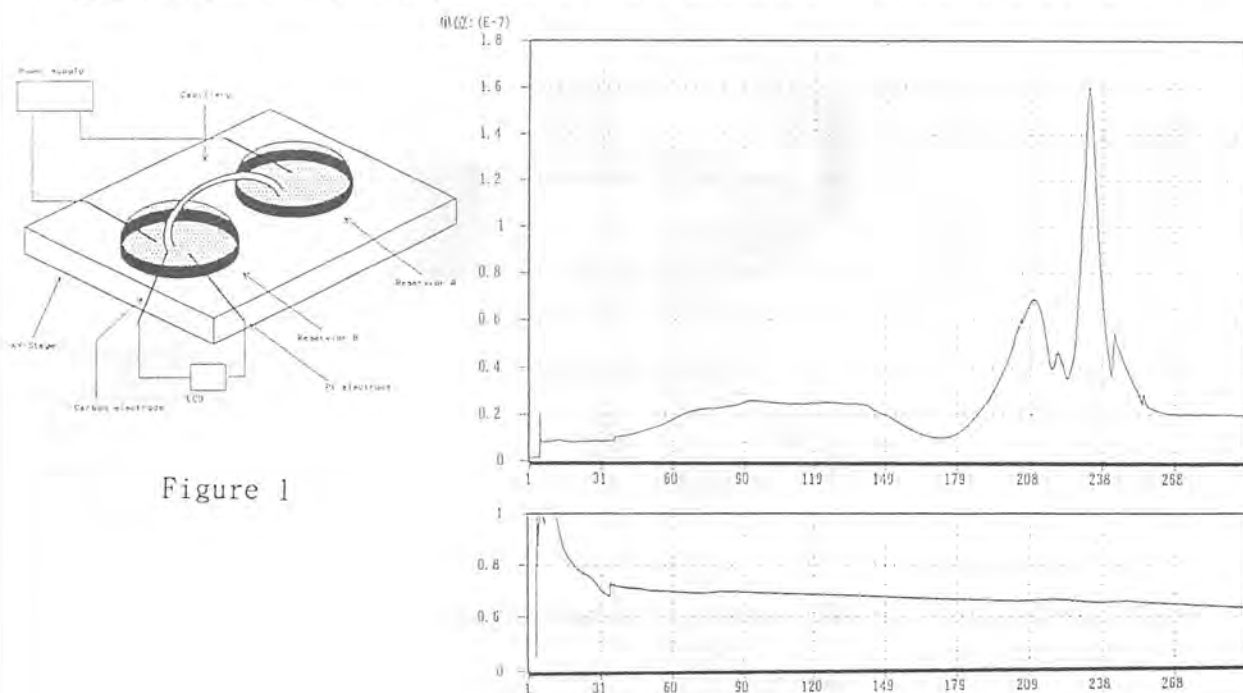


Figure 1

Figure 2-1(up) and 2-2(down)

## 参考文献

- (1) S. Kitagawa, C. Kawaura, O. Hashimoto, T. Takahashi, M. Naoi and T. Tsuda, Electrophoresis, 16, 1364-1368 (1995).



Model	Capacitance	Voltage	Dimensions
HV-1.1PN	1.1k	2.75	26×60×24
HV-1.5PN	1.5k	2	26×60×24
HV-6PN	6k	0.5	35×91×31
HV-10PN	10k	0.25	50×110×31
HV-25PN	25k	0.1	100×120×35

高信頼性重視型

MATSUSADA  
Precision Inc.



松定プレジジョン株式会社

東京営業所 〒101 東京都千代田区鍛冶町1-9-2高梨ビル7F TEL03-5256-7011 FAX03-5256-7012  
本社・研究所 〒525 滋賀県草津市青地町745 TEL0775-61-2111 FAX0775-61-2112

キャピラリー電気泳動が、もっと身近な分析技術になる。  
HP<sup>3D</sup>キャピラリー電気泳動システムの特長



# いま キャピラリー電気泳動(HPCE)で 高分離能・短時間・微量分析

低価格・パーソナルタイプのHPCE分析装置登場

## CAPI-1000

パーソナルキャピラリー電気泳動装置



- ・パネルスイッチによる簡単な手動操作で実験がおこなえます。
- ・キャピラリー温調や再現性の高いバキュームインジェクション方式のサンプル注入法を採用し、信頼性の高いデータを得ることができます。
- ・測定データはHPLC用インテグレーターによりレポートニング、再解析が可能です。

■仕様

検出器	UVD (ダブルビーム)
設定波長範囲	195~380nm (380~700nm)
波長分解能	6nm
波長精度	±1.0nm
光源	重水素ランプ
ノイズレベル	<5×10 <sup>-5</sup> ABU
サンプラー	6検体手動サンプラー
キャピラリー温調	室温+3~49℃ (±0.5℃)
出力	インテグレーター用出力 記録計用出力 電圧/電流モニター用出力



技術資料  
アプリケーション分析キット  
アフタートレーニングスクール開設

大塚電子は、  
キャピラリー電気泳動の  
分析技術を  
トータルサポートで  
提供します。



高性能HPCE分析装置

## CAPI-3100

マルチチャンネルキャピラリー電気泳動装置



■仕様

検出器	フォトダイオードアレイ512ch
測定波長範囲	190~600nm
波長分解能	1.3~20nm
波長精度	±1.0nm
ノイズレベル	<5×10 <sup>-5</sup> ABU
オートサンプラー	45検体
キャピラリー温調	5~45℃ (±0.2℃)
サンプル温調	5~45℃ (オプション)
分取機能	分取機能有



- ・定性能力をアップするフォトダイオードアレイ検出器を採用しています。
- ・多彩なデータ解析と豊富な機能(45検体オートサンプラー、キャピラリー温調、サンプル温調(オプション)等)に加え自動測定・自動解析ができます。
- ・陽イオン、陰イオンの連続自動測定が可能です。

◎詳細は下記営業所までお問い合わせください。

## 大塚電子株式会社

- 本社・大阪営業所 〒573 大阪府枚方市招堤田近3丁目26-3 TEL.(0720)55-8550(代) FAX.(0720)55-9100
- 東京営業所 〒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 〒300 茨城県土浦市卸町1丁目1-1 関鉄つくばビル6F TEL.(0298)43-5722(代) FAX.(0298)43-5730



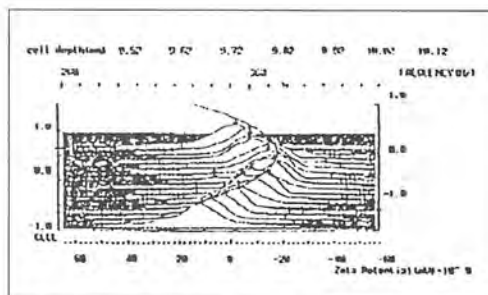
# ニュー フェイズイノベーション 光散乱物性測定

## ELS-800 電気泳動光散乱光度計

コロイド粒子や固体表面のゼータ電位を測定  
さまざまな試料の表面改質の研究にも威力を発揮



固体表面のゼータ電位測定用セル



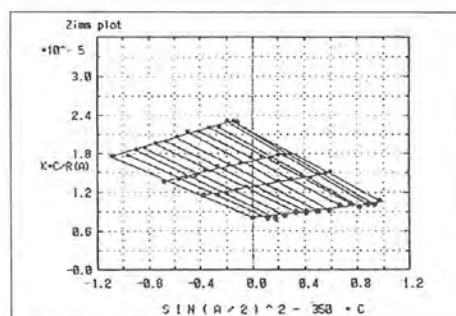
▲電気浸透プロット

### ◆測定項目

ゼータ電位	-100~100mV
移動度	$-10 \times 10^{-4} \sim 10 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{secV}$
粒径・粒径分布	3nm~3 $\mu\text{m}$

## DLS-7000 スーパーダイナミック光散乱光度計

リボソームやゲル化現象の解明、  
高温の分子量・粒径測定も可能



▲高温時でのポリエチレン分子量測定

### ◆測定項目

粒径・粒径分布	1.4nm~3 $\mu\text{m}$
並進拡散係数	$2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$
分子量	$3 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6 \text{ Mw}$
慣性自乗半径	20~10 <sup>3</sup> nm
第2ビリアル係数	$-1 \sim 20 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-2}$

◎詳細は下記営業所までお問い合わせください。

## 大塚電子株式会社

●本社・大阪営業所 〒573 大阪府枚方市招提町近3丁目26-3 TEL.(0720)55-8550(代) FAX.(0720)55-8557  
●東京営業所 〒192 東京都八王子市東町1-6 橋元LKビル2F TEL.(0426)44-4951(代) FAX.(0426)44-4961  
●筑波営業所 〒300 茨城県土浦市卸町1丁目1-1 関鉄つくばビル6F TEL.(0298)43-5722(代) FAX.(0298)43-5730

## 平成7年度日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会幹事

新井悦郎 (ハックマン)	津田孝雄 (名古屋工業大学応用化学科)
大塚浩二 (姫路工業大学理学部)	津田淑江 (共立女子短期大学)
奥山典生 (神奈川歯科大学)	寺部 茂 (姫路工業大学理学部)
恩田宣彦 (パーキンエルマー・ジャパン分析機器事業部)	中川照眞 (京都大学薬学部)
鴈野重威 (日立製作所テクノリサーチセンター)	中村 洋 (東京理科大学薬学部)
木曾義之 (比治山大学)*	西川清菊 (松定フレッズ・デバイス)
倉重友三 (日本ハイテックラボラトリーズ)	馬場嘉信 (神戸薬科大学)
児玉裕敬 (高知医科大学)	平岡 厚 (杏林大学保健学部)
小林英三郎 (城西大学理学部)	廣川 健 (広島大学工学部)**
酒井恒行 (日本ミロアフォーテックス・クロマト事業部)	福士恵一 (神戸商船大学)
笹川秀男 (大塚電子)	本田 進 (近畿大学薬学部)
志村清仁 (帝京大学薬学部)	真鍋 敬 (愛媛大学理学部)**
千田正昭 (日本分光)	八木孝夫 (島津製作所東京カスタムセンター)
曾我朋義 (横河アナリティカルシステムズ(株))	吉田基子 (日立製作所中央研究所)
高木俊夫 (大阪大学タンパク質研究所)	吉田治弘 (専修大学法学部)
田中信男 (京都工芸繊維大学繊維学部)	* 委員長、** 事務局

---

### 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集

平成7年12月6日発行

編集 〒739 東広島市鏡山1丁目4-1

広島大学工学部応用理化学機器分析研究室内

第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム事務局

編集責任者 廣川 健

発行 (社)日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

印刷 株式会社リョーイン

印刷 〒733 広島市西区観音新町4-8-4リョーコビル3F

電話 (082) 292-7572

FAX (082) 292-7115

---