

第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム

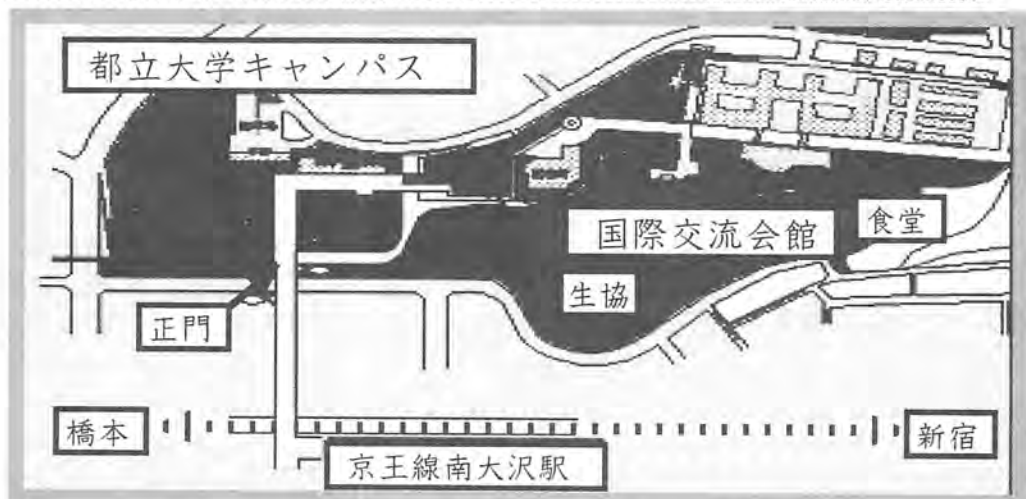
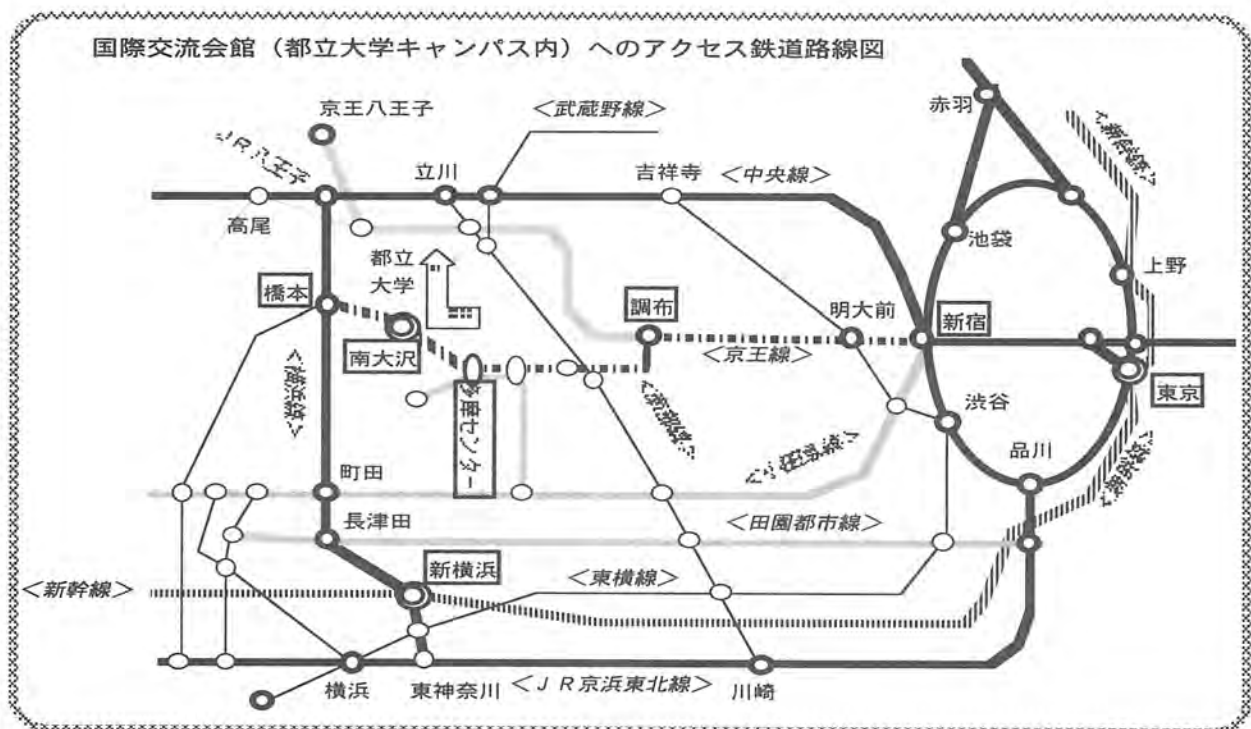
会期：12月11日（木）～12日（金）

会場：国際交流会館（都立大キャンパス内、TEL0426-77-3001）

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、日本生化学会、日本薬学会、日本分析化学会
クロマトグラフィー科学会、日本電気泳動学会

交通：京王線南大沢駅改札口を右へ出ると都立大学正門となります。会場まで徒歩5分



第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム参加者の皆様へ

シンポジウムの参加：シンポジウムの参加は登録された方に限ります。当日会場受け付けで登録し、所定の名札を付けて下さい。

参加登録：会場受け付け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（予約4,000円）、学生3,000円
なお予約されている方はお送りした受領番号をお示し下さい。

懇親会：12月11日（木）講演終了後、会議場（国際交流会館）の同じフロアにある食堂で開催します。参加費5,000円（予約4,000円）を参加登録の時にお支払い下さい。

発表者：口頭講演：講演時間は一演題あたり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40分前（2演題前）までにスライド受付にお渡し下さい。スライドは通し番号発表番号、講演者氏名を記入して下さい。講演終了後忘れずにスライドをお受け取り下さい。

次演者：講演20分前（1演題前）までに次演者席にご着席下さい。

ポスター掲示と撤去：11日午後1時まで掲示貼付して下さい。

撤去は12日正午までに御願います。

座長：

予定時刻の20分前（1演題前）までに会場受付にお越し下さい。

展示会：

関連機器、カタログ等の展示会を併設しています。会場は大会議室と同じフロアのメインホール、中会議室です。

座長一覧

第1日 12月11日（木）

9:20~10:40	(セッション I)	座長	大塚 浩二
11:00~12:20	(セッション II)	座長	廣川 健
13:20~14:10	(セッション III)	特別講演	座長 中川 照眞
15:40~17:00	(セッション V)	座長	高柳 俊夫
17:20~18:00	(セッション VI)	座長	江坂 幸宏

第2日 12月12日（金）

9:00~10:00	(セッション VII)	座長	澁川 明正
10:20~11:20	(セッション VIII)	座長	志村 清仁
11:40~12:40	(セッション IX)	座長	小林 英三郎
13:40~14:40	(セッション X)	座長	真鍋 敬
15:00~15:40	(セッション XI)	座長	馬場 嘉信
16:00~17:20	(セッション XII)	座長	千田 正昭

第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム プログラム

第1日 12月11日(木)

9:10~9:20 開会挨拶 委員長 寺部 茂、実行委員長 小林 英三郎

9:20~10:40 (セッション I) 座長 大塚 浩二

L01 CZEにおける非イオン性物質のピークプロファイル

(広島大学・工) 育田 夏樹*、廣川 健

L02 実効移動度を横軸とするCZEのエレクトロフェログラム

(広島大学・工) 廣川 健*、育田 夏樹、山田 裕治

L03 石英およびガラス製電気泳動チップの作製とその特性

(島津製作所基盤技術研) 阿部浩久*、西本尚弘、中西博昭

L04 非水系キャピラリー電気泳動: 親水性相互作用の活用

(岐阜薬大¹、京大農²) 江坂 幸宏*¹、吉村 訓徳¹、後藤 正志¹、加納 健司²

10:40~11:00 (休憩)

11:00~12:20 (セッション II) 座長 廣川 健

L05 ポリアリルアミンを担体とする動電クロマトグラフィー用キャリアの特性と、
混合擬似固定相による分離ウィンドウの制御

(京工織大・繊維) 中川 克仁*、永山 尚史、森本 尚夫、細矢 憲、
田中 信男

L06 物理吸着型内壁被覆キャピラリーの開発と

キャピラリー電気泳動/質量分析(CE/MS)への応用

(エーザイ・分析研究所) 片山 博之*、石濱 泰、浅川 直樹

L07 キャピラリー電気クロマトグラフィーでの使用を目的とした

粒子径均一微小高分子充てん剤の調製

(京工織大・繊維) 細矢 憲*、吉廻 公博、太田 浩章、中川 克仁、
木全 一博、田中 信男

L08 キャピラリーエレクトロクロマトグラフィーによる光学異性体の分離

(姫工大・理) 三上 千明*、大塚 浩二、寺部 茂

12:20~13:20 (休憩)

13:20~14:10 (セッション III) 特別講演 座長 中川 照眞

S01 特別講演

キャピラリー電気泳動の単相性とその利点

近畿大学薬学部 本田 進 教授

14:10~15:30 (セッション IV)

ポスター・セッション

- P01 プロトンターミナルイオンとする等速電気泳動法における
希土類イオンの回収率
(広島大学・工) 森脇 俊貴*, 育田 夏樹, 西山 文隆, 廣川 健
- P02 ポリエチレングリコールなどの非イオン性錯形成剤を用いた
20種金属イオンの等速電気泳動分離挙動
(広島大学・工) 藤沢 宏*, 育田 夏樹, 西山 文隆, 廣川 健
- P03 キャピラリー等速電気泳動法による有機スズ化合物の分離挙動
(神戸商船大¹、神戸大²、大阪工技研³、神戸女短大⁴) 鷺島 克啓*,
福士 恵一¹、齊藤 恵逸²、竹田さほり³、脇田 慎一³、東 国茂³、日色 和夫⁴
- P04 Tween 20/C T A C混合ミセル系を用いた有機陰イオンの分離
(岐阜薬大¹、京大・農²) 江坂幸宏*, 後藤正志¹、加納健司²
- P05 界面活性剤の構造に基づくミセル動電クロマトグラフィーにおける分離の最適化
(大阪工技研¹、姫工大・理²) 竹田さほり*, 脇田 慎一¹、山根 昌隆¹、
城間 純¹、東 国茂¹、寺部 茂²
- P06 オンラインキャピラリー電気泳動-原子発光分光分析法(CE-AES)の開発(1)
(広島大学・工) 榊原 弘史*, 育田 夏樹, 廣川 健
- P07 CE-MSによる界面活性剤の成分分析
(日本ベーリンガーインゲルハイム¹、姫工大・理²) 田中 喜秀*, 岸本 康弘¹、
大塚 浩二²、寺部 茂²
- P08 大気圧化学イオン化法 (APCI) をインターフェースとして用いる
オンラインMEKC-MSの検討
(姫工大・理²、カネカテクノリサーチ²) 横井 雅樹*, 尾崎 祐人²、
大塚 浩二¹、寺部 茂¹
- P09 二次元電気泳動相内のガラス表面の処理
(名工大¹、宇宙開発事業団²、宇宙環境利用推進センター³、日揮⁴)
佐藤 喜英*, 北川 慎也¹、津田 孝雄¹、佐藤 龍也²、辻 政俊³、横田明俊⁴
- P10 界面活性剤を用いたFFEU電気泳動槽からの泡除去
(広島大学・工¹、宇宙開発事業団²、宇宙環境利用推進センター³、日揮⁴)
育田 夏樹*, 毛 慶禄¹、廣川 健¹、佐藤 龍也²、辻 政俊³、横田明俊⁴
- P11 FFEU緩衝液からの気泡除去システム
(宇宙開発事業団¹、宇宙環境利用推進センター²、日揮³) 佐藤 龍也¹、辻 政俊²、
横田明俊³、竹内 範雄³、長谷川 昭³
- P12 電気クロマトグラフィー(26) エナンチオマー分離への電場の効果
(名工大) 田下 裕之*, 山村 初雄, 川井 正雄, 北川 慎也, 津田 孝雄

- P13 電気クロマトグラフィー(27)
ショートカラムを用いた分離システム構築とその応用
(名工大) 富永 真司*, 北川 慎也、津田 孝雄
- P14 キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その3
試薬含有泳動液を用いるキャピラリー通過方式による誘導体化
(近畿大・薬) 多賀 淳*, 西野 晶、本田 進
- P15 キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その4
キャピラリー入り口での誘導体化による糖のPMP化
(近畿大・薬) 多賀 淳、本田 進*
- P16 シクロデキストリン修飾キャピラリーゾーン電気泳動における
ジメチル- β -シクロデキストリンの組成がキラル識別能に及ぼす効果
(姫工大・理¹、京工繊大・繊維²、阪大・保全科学研) 加藤 純也*¹、
本田 周平¹、大塚 浩二¹、寺部 茂¹、木全 一博²、田中 稔³
- P17 非水ゾーンを用いるキャピラリー電気泳動による光学分割
(姫工大・理) 小林 信昭*、大塚 浩二、寺部 茂
- P18 CZEによるヒトIgGミエローマ蛋白質の分析
シアル酸を介した荷電不均一性
(近畿大・薬) 久保 兼信
- P19 キャピラリー電気泳動を用いるアルブミン分子上の薬物結合部位の同定
(京大・薬) 新井 廉代*、澁川 明正、中川 照眞
- P20 ConAアフィニティークロマトグラフィーで得られた
血漿タンパク質分画のキャピラリー等電点電気泳動
(愛媛大・理) 池田 文恵*、向井 準、渡部 賢二、真鍋 敬
- P21 キャピラリー等電点電気泳動による α_1 -酸性糖タンパク質の分析
(京大・薬) 曾 旻*、曹 波、澁川 明正、中川 照眞
- P22 *Celegans*タンパク質画分のキャピラリー等電点電気泳動
(城西大・理) 小林 英三郎*、関根 真紀、鈴木 望与
- P23 キャピラリー等電点電気泳動による米麴中の α -アミラーゼ活性の新規測定法
(ヤエガキ酒造¹、姫工大・理²) 渡辺 敏郎*¹、山本 明¹、永井 史郎¹、
寺部 茂²
- P24 キャピラリー電気泳動による髄液
 β -Trace Protein (Prostaglandin D₂ Synthase)のMicroheterogeneityの分析
(杏林大・保健¹、杏林大・医²、国立千葉病院³、PRESTO⁴、マルハ中央研⁵、
大阪バイオサイエンス研⁶) 平岡 厚*¹、荒戸 照世²、富永 格³、江口 直美⁴、
織田 浩司⁵、清木 興介⁵、裏出 良博⁶
- P25 ネコの血漿ORM、TFおよびGCの遺伝的多型性について
(専修大¹、Univ. Queensland²) 吉田 治浩*¹、H. Arthur²、K. Bell³

- P26 ポリマー溶液を用いたキャピラリーゲル電気泳動による
オリゴヌクレオチドの分析
(田辺製薬) 園田 龍太郎*, 西 博行、野田 浩逸、西村 紀之、佐藤 忠司
- P27 シングルセルからの情報(I) 赤血球のスペクトル変化
(名工大¹、大塚電子²) 今村 基*¹、北川 慎也¹、津田 孝雄¹、北岸 恵子²
- P28 キャピラリー電気泳動法における20種金属イオンの分離挙動
(広島大学・工) 陳 秀娟*、育田 夏樹、西山 文隆、廣川 健
- P29 キャピラリー電気泳動装置を用いた無電解Niメッキ液の分析
(大塚電子) 佐藤 康博*、笹 一志、北岸 恵子
- P30 キャピラリー電気泳動によるアルコール飲料中の有機酸の分析
(横河アナリティカルシステムズ) 曾我 朋義*、柳井 博子
- P31 キャピラリー電気泳動測定の情報管理におけるデータベースの活用
(大塚電子) 山田 浩美*、北岸 恵子、大嶋 浩正

15:30~15:40 (休憩)

15:40~17:00 (セッション V) 座長 高柳 俊夫

- L09 CE-ESI-MSによる光学異性体の分離検出
(姫工大・理¹、EHLS-NCEH²、京工繊大・繊維³) 大塚 浩二*¹、C. J. Smith²、
J. Grainger²、J. R. Barr²、D. G. Patterson, Jr.²、田中 信男³、寺部 茂¹
- L10 電荷を持つシクロデキストリンと中性なシクロデキストリンの組合せ
(Dual-CD system)による医薬品の光学分割
(田辺製薬) 泉本 真一*、西 博行、国仙谷 良男、佐藤 忠司
- L11 デキストリン修飾キャピラリー電気泳動法によるペンタゾシンの光学分割
(星薬大¹、グレラン製薬²) 高橋 京子*¹、堀内 美和子¹、加藤 嘉代子¹、
渡辺 卓穂¹、中澤 裕之¹、杉本 徹也²
- L12 キャピラリー電気泳動による薬物-血漿リポタンパク質結合解析
(京大・薬) N. A. L. Mohamed*、澁川 明正、中川 照眞

17:00~17:20 (休憩)

17:20~18:00 (セッション VI) 座長 江坂 幸宏

- L13 有機陰イオンのイオン会合-キャピラリー電気泳動分離における
対陽イオンの分子構造効果
(岡山大・理) 和田 栄子*、高柳 俊夫、本水 昌二
- L14 キャピラリー電気泳動法によるアルカリ金属-クラウンエーテル錯体の
イオン会合反応解析
(岡山大・理) 高柳 俊夫*、本水 昌二

18:10~20:00

懇親会 (国際交流会館食堂)

第2日 12月12日(金)

9:00~10:00 (セッション VII) 座長 澁川 明正

- L15 キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その5
酵素含有泳動液を用いるキャピラリー通過方式による分析
(近畿大・薬) 多賀 淳*、本田 進
- L16 キャピラリー内での予備濃縮による糖タンパク質糖鎖分析の微量化
(近畿大・薬) 本田 進、八島 由佳、多賀 淳、鈴木 茂生*
- L17 キャピラリー電気泳動分析におけるオンライン電気泳動濃縮法
(福井大・工¹、都立大・工²) 呉 行正*¹、穂坂 明彦²、保母 敏行²

10:00~10:20 (休憩)

10:20~11:20 (セッション VIII) 座長 志村 清仁

- L18 レーザー蛍光検出キャピラリー電気泳動による
脳組織由来NDA標識アミノ酸の分離
(国立精神神経センター・神経研) 今澤 正興*、畑中 由利子
- L19 キャピラリー電気泳動を利用するニコチン酸の体内動態
(近畿大・薬) 岩城 正宏、和田 暁典、菊池 政子*、小木 曾太郎、
小田 泰雄、岡部 巨雄、掛樋 一晃
- L20 サイズ排除効果を利用するヘパリン類のキャピラリー電気泳動
(大鵬薬品・製剤研¹、近畿大・薬²) 早瀬 省三¹、小田 泰男²、掛樋 一晃*²

11:20~11:40 (休憩)

11:40~12:40 (セッション IX) 座長 小林 英三郎

- L21 弾性ゲルによる迅速ウエスタンブロット法
(Univ. Maryland) 相澤 克則
- L22 UV検出キャピラリー等電点電気泳動用ペプチド性 pI マーカー
(帝京大・薬¹、分子バイオホトニクス研²) 志村 清仁*¹、王 志¹、笠井 献一¹、
松本 浩幸²
- L23 ヒト脊髄液タンパク質のキャピラリー等電点電気泳動による分析
(愛媛大・理¹、関東通信病院²) 宮本 洋光*¹、真鍋 敬¹、中津 雅美²、
新井 雅信²

12:40~13:40 (休憩)

13:40~14:40 (セッション X) 座長 真鍋 敬

- L24 キャピラリー電気泳動による3塩基繰り返しDNAフラグメントの
泳動挙動とトリプレットリピート病のDNA診断
(徳島大・薬¹、浜松医大²) 喜羽 百合子*¹、大原 浩市²、馬場 嘉信¹
- L25 キャピラリー電気泳動法による遺伝子解析の臨床応用への検討
(兵庫医大) 角田 ちぬよ*、末廣 謙、日笠 聡、吉本 裕、垣下 榮三

- L26 キャピラリー電気泳動による疾患原因遺伝子の変異・多型解析
(徳島大・薬) 屋代 直子、松田 聖子、馬場 嘉信*
14:40~15:00 (休憩)
15:00~15:40 (セッション XI) 座長 馬場 嘉信
- L27 CZEを用いた微生物の分離とその活性測定法
(京大院農¹、岐阜薬科大²、島津製作所³) 鳥村 政基*¹、加納 健司¹、
池田 篤治¹、江坂 幸宏²、上田 輝久³
- L28 CE法による微細藻類の電気泳動速度の測定
(大阪大・基礎工学研) 山端 景子*、村井 慶久、近藤 寿子、平田 雄志
15:40~16:00 (休憩)
16:00~17:20 (セッション XII) 座長 千田 正昭
- L29 高分子界面活性剤を用いるMEKC:アルキルジアミン添加の検討
(カネカテクノロジー¹、姫工大・理²) 尾崎 祐人*¹、寺部 茂²
- L30 工場排水中成分の測定(1)芳香族系アミン
(大塚電子¹、阪神水道企業団²) 丸山 敏彦*¹、八木 吉彦²、厩橋 哲也²
- L31 キャピラリー電気泳動法による金属イオンと陰イオンの同時分析について
(大塚電子) 笹 一志*、佐藤 康博、北岸 恵子
- L32 キャピラリー分析におけるサンプル中の塩の影響
(日本ウォーターズ) 佐々木 秀輝*、米久保 淳

閉会挨拶

第17回 実行委員長 小林 英三郎

1998年度開催の紹介

第18回 実行委員長 今坂 藤太郎

The 17th Symposium on Capillary Electrophoresis

December 11-12, 1997, Tokyo, Japan

PROGRAM

December 11, Thursday

Opening Address(9:10-9:20)

Chairman of Discussion Group on Electrophoresis

Prof. Shigeru Terabe

Chairman of the 17th Symposium on Capillary Electrophoresis

Prof. Hidesaburo Kobayashi

Session I (9:20-10:40) Chairman Prof. Koji Otsuka

L01 Peak Profiles of Nonions in CZE

Natsuki Ikuta* and Takeshi Hirokawa

Faculty of Engineering, Hiroshima University

L02 Electropherograms of CZE with Effective Mobility as Ordinate Scale

Takeshi Hirokawa*, Natsuki Ikuta and Yuji Yamada

Faculty of Engineering, Hiroshima University

L03 Fabrication of Quartz and Glass Microchips and their Performance

H. Abe*, T. Nishimoto and H. Nakanishi

Technology Research Laboratory, Shimadzu Co.

L04 Non-Aqueous CE: Utilization of Hydrophilic Interactions

Yukihiro Esaka*¹, Kuninori Yoshimura¹, Masashi Goto¹ and Kenji Kano²

1) Gifu Pharmaceutical Univ., 2) Faculty of Agriculture, Kyoto Univ.

Session II (11:00-12:20) Chairman Prof. Takeshi Hirokawa

L05 Characteristics of Pseudo-stationary Phase for Electrokinetic Chromatography Prepared from Polyallylamine, and the Control of Migration Time Windows by the Use of Mixed Polymeric Pseudo-Stationary Phases

Katsuhito Nakagawa*, Hisashi Nagayama, Hisao Morimoto, Ken Hosoya,
and Nobuo Tanaka

Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

L06 Development of Stable Capillary Coating Based on Physical Adsorption for Capillary Electrophoresis/mass Spectrometry (CE/MS)

Hiroyuki Katayama*, Yasushi Ishihama and Naoki Asakawa

Analytical Research Laboratories, Eisai Co., Ltd.

- L07 Uniformly-sized Polymer Microsphere Prepared as CEC Stationary Phase
Ken Hosoya*, Kimihiro Yosizako, Hiroaki Ohta, Katsuhito Nakagawa, Kazuhiro Kimata
and Nobuo Tanaka.
Department of Polymer Science, Kyoto Institute of Technology
- L08 Enantiomer Separation by Capillary Electrophoresis
Chiharu Mikami*, Koji Otsuka, Shigeru Terabe
Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Session III(13:20-14:10) Special Lecture.

Chairman Prof. Terumichi Nakagawa

**Single Phase Property of Capillary Electrophoresis and Its Advantages
Professor Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University**

Session IV(14:10-15:30) Poster

- P01 Recovery of Rare-Earth ions in Isotachopheresis Using Protons as the Terminator
Toshiki Moriwaki*, Natsuki Ikuta, Fumitaka Nishiyama and Takeshi Hirokawa
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P02 Isotachopheretic Separation Behavior of Twenty Kinds of Metal Ions Using Nonionic
Complexing Agents such as Polyethylenglycols
Hiroshi Fujisawa*, Natsuki Ikuta, Fumitaka Nishiyama and Takeshi Hirokawa
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P03 Separation Characteristics of Organotin Compounds by Capillary Isotachopheresis
Katsunori Sagishima*¹, Keiichi Fukushi¹, Keiitsu Saito², Sahori Takeda³,
Shin-ichi Wakida³, Kunishige Higashi³ and Kazuo Hiroyoshi⁴
1) Kobe University of Mercantile Marine
2) Faculty of Human Development, Kobe University
3) Osaka National Research Institute 4) Kobe Women's Junior College
- P04 MEKC Separation of Hydrophobic Anions Using Tween 20/CTAC Mixed Micellar System
Yukihiro Esaka*¹, Masashi Goto¹ and Kenji Kano²
1) Gifu Pharmaceutical Univ. 2) Faculty of Agriculture, Kyoto Univ.
- P05 Optimization of the Separation based on the Surfactant Structure in Micellar Electrokinetic
Chromatography
Sahori Takeda¹, Shin-ichi Wakida¹, Masataka Yamane¹, Zun Siroma¹, Kunishige Higashi¹
and Shigeru Terabe²
1) Osaka National Research Institute, AIST
2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

- P06 Development of Online Capillary Electrophoresis
Atomic Emission Spectrometry(CE-AES) (1)
Hiroshi Masuhara*, Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P07 Composition Analysis of Surfactants by CE-MS
Yoshihide Tanaka*¹, Yasuhiro Kishimoto¹, Koji Otsuka² and Shigeru Terabe²
1) Kawanishi Pharm Research Institute, Nippon Boehringer Ingelheim
2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- P08 On-Line MEKC-MS with APCI Interface.
Masaki Yokoi*¹, Hiroto Ozaki², Koji Otsuka¹ and Shigeru Terabe¹
1) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
2) Kaneka Techno Research Co.Ltd.,
- P09 Glass Surface Modifications in Two Dimensional Free Flow Electrophoresis for Protein
and Cell Analyses
Y. Satoh*¹, S. Kitagawa¹, T. Tsuda¹, T. Sato², M. Tsuji³ and A. Yokota⁴ 1) Department
of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology ,2) National Space Development
Agency of Japan, 3) Japan Space Utilization Promotion Center 4) JGC Corporation
- P10 Removal of Bubbles from Electrophoresis Compartment of FFEU by Using Surfactants
N. Ikuta*, Q. Mao, T. Hirokawa, T. Sato², M. Tsuji³ and A. Yokota⁴ 1) Faculty of
Engineering, Hiroshima University 2) National Space Development Agency of Japan
3) Japan Space Utilization Promotion Center 4) JGC Corporation
- P11 Bubble/Gas Eliminate System for Free Flow Electrophoresis
Tatsuya Sato¹, Masatoshi Tsuji² and Akitoshi Yokota*²
1) National Space Development Agency of Japan
2) Japan Space Utilization Promotion Center 3) JGC Corporation
- P12 Electrochromatography (26) Effect of Electric Field on Enantiomer Separations
Hiroyuki Tashita*, Hatsuo Yamamura, Masao Kawai, Shinya Kitagawa and Takao Tsuda
Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology
- P13 Electrochromatography (27) Instrumentation for a Short Column System and Its Application
Shinji Tominaga*, Shinya Kitagawa and Takao Tsuda
Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology
- P14 Analytical Methods Utilizing a Capillary for Reaction and Separation Part 3
Derivatization in a Reagent-Containing Electrophoretic Solution
Using the Throughout-Capillary Derivatization Format
Atsusi Taga*, Aki Nishino and Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

- P15 Analytical Methods Utilizing a Capillary for Reaction and Separation Part 4
Derivatization of Carbohydrates with PMP Using the At-Inlet Derivatization Format
Atsusi Taga and Susumu Honda*
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
- P16 Effects of compositions of dimethyl- β -cyclodextrin on chiral selectivity
in CD modified CZE.
Junya Kato*¹, Shuhei Honda¹, Koji Otsuka¹, Shigeru Terabe¹, Kazuhiro Kimata²
Nobuo Tanaka² and Minoru Tanaka³
1) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
2) Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology
3) Research Center for Environmental Preservation, Osaka University
- P17 Enantiomer Separation by Capillary Electrophoresis Using a Non-Aqueous Zone
Nobuaki Kobayashi*, Koji Otsuka and Shigeru Terabe
Faculty of Science, Homeji Institute of Technology
- P18 CZE Analysis of Human IgG Myeloma Proteins: Sialic Acid-Mediated Charge Heterogeneity
Kanenobu Kubo*
Faculty of pharmaceutical Sciences, Kinki University
- P19 Identification of Drug Binding Site on Albumin Molecule by Using Capillary Electrophoresis
Yukiyo Arai*, Akimasa Shibukawa and Terumichi Nakagawa
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
- P20 Capillary Isoelectric Focusing of Human Plasma Fractions Obtained by ConA-Affinity
Chromatography
Fumie Ikeda*, Jun Mukai, Kenji Watanabe and Takashi Manabe
Faculty of Science, Ehime University
- P21 Capillary Isoelectric Focusing of Human α_1 -Acid Glycoprotein
Min Zeng*, Bo Cao, Akimasa Shibukawa and Terumichi Nakagawa
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
- P22 Capillary Isoelectric Focusing of *C.elegans* Proteins Fractionated by Ammonium Sulfate
Hidesaburo Kobayashi*, Maki Sekine and Miyo Suzuki
Faculty of Science, Josai University
- P23 A Novel Method for Measurement of α -Amylase Activity in Rice *Koji*
by Using Capillary Isoelectric Focusing
Toshiro Watanabe*¹, Akira Yamamoto¹, Shiro Nagai¹ and Shigeru Terabe²
1) Yaegaki Sake & Spirits, Inc.
2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

- P24 Capillary Electrophoretic Analyses of Microheterogeneity
of β -Trace Protein (Prostaglandin D₂ Synthase) in Cerebrospinal Fluid
Atsushi Hiraoka*¹, Teruyo Arato², Itaru Tominaga³, Naomi Eguchi⁴, Hiroshi Oda⁵,
Kohsuke Seiki⁵ and Yoshihiro Urade⁶
1) Kyorin Univ. School of Health Sciences, 2) Kyorin Univ. School of Medicine,
3) Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital, 4)PRESTO,
5) Central Research Institute, MARUHA Co., 6) Osaka Bioscience Institute
- P25 Genetic Polymorphisms of Cat Plasma ORM, TF and GC Types.
Haruhiro Yoshida*¹, H.A. Auther² and K. Bell²
1) Senshu University 2) The University of Queensland
- P26 Capillary Gel Electrophoresis of Oligonucleotides Using Polymer Solutions
Ryotaro Sonoda*, Hiroyuki Nishi, Kouitu Noda, Noriyuki Nishimura and Tadashi Sato
Analytical Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co. Ltd.
- P27 Information from Single Cell (I) Spectrum Variation of Red Blood Cells
Motoki Imamura*¹, Shinya Kitagawa¹, Takao Tsuda¹ and Keiko Kitagishi²
1) Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology,
2) Otsuka Electronics Co., LTD.
- P28 Separation Behaviour of Twenty Kinds of Metal Ions by CZE
Chen Xiu Juan*, Natsuki Ikuta, Fumitaka Nishiyama and Takeshi Hirokawa
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P29 Analysis of Nickel Plating Bath by Capillary Electrophoresis
Yasuhiro Sato*, Katsushi Sasa and Keiko Kitagishi
Otsuka Electronics Co. Ltd.
- P30 Determination of Organic Acids in Liquors by Capillary Electrophoresis
Tomoyoshi Soga* and Hiroko Yanai
Yokogawa Analytical Systems Inc.
- P31 Application of Database in the Information Management of Capillary Electrophoresis
Hiromi Yamada*, Keiko Kitagishi and Kosei Oshima
Otsuka Electronics Co. Ltd.

Session V(15:40-17:00) Chairman Prof. Toshio Takayanagi

- L09 Stereoselective Separation and Detection by CE-ESI-MS
Koji Otsuka*¹, Christopher J. Smith², James Grainger², John R. Barr²,
Donald G. Patterson, Jr.², Nobuo Tanaka³ and Shigeru Terabe¹
1) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
2) National Center for Environmental Health, 3) Kyoto Institute of Technology

- L10 Enantiomer Separation of Drugs by Capillary Electrophoresis with Dual Cyclodextrin System
Shin-ichi Izumoto*, Hiroyuki Nishi, Yoshio Kokusenya, and Tadashi Sato
Analytical Research Laboratory Tanabe Seiyaku Co. Ltd.
- L11 Chiral Separation of Pentazocine by Dextrin-Mediated Capillary Electrophoresis
Kyoko Takahashi*¹, Miwako Horiuchi¹, Kayoko Kato¹ and Takaho Watanabe¹,
Hiroyuki Nakazawa¹ and Tetsuya Sugimoto²
1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University
2) Grelan Pharmaceutical Co., LTD.
- L12 Analysis of Drug-Plasma Lipoprotein Binding Using Capillary Electrophoresis
Niveen Abdel Latif Mohamed*, Akimasa Shibukawa and Terumichi Nakagawa
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Session VI(17:20-18:00) Chairman Prof. Yukihiro Esaka

- L13 Molecular Structure Effect on the Separation of Organic Anions
by Ion Association - Capillary Zone Electrophoresis
Eiko Wada*, Toshio Takayanagi and Shoji Motomizu
Department of Materials Science and Engineering, Faculty of Engineering, Fukui University
- L14 Analysis of the Ion Association of the Complex of Alkaline Metal Ions with Crown Ethers
by a Capillary-Electrophoretic Method
Toshio Takayanagi* and Shoji Motomizu
Department of Materials Science and Engineering, Faculty of Engineering, Fukui University

December 12, Friday

Session VII(9:00-10:00) Chairman Prof. Akimasa Shibukawa

- L15 Analytical Methods Utilizing a Capillary for Reaction and Separation Part 5
Analysis in an Enzyme-Containing Electrophoretic Solution
Using the Throughout-Capillary Derivatization Format
Atsusi Taga* and Susumu Honda
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
- L16 Microanalysis of Carbohydrates in Glycoproteins by Preconcentration in a Capillary
Susumu Honda, Yuka Yashima, Atsusi Taga and Sigeo Suzuki*
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
- L17 An On-line Electrophoretic Concentration Method for Capillary Electrophoresis
Xing-Zheng Wu*¹, Akihiko Hosaka² and Toshiyuki Hobo²
1) Faculty of Engineering, Fukui University
2) Faculty of Engineering, Tokyo Metropolitan University

Session VIII(10:20-11:20) Chairman Prof. Kiyohito Shimura

- L18 Separation of Naphtalene-2,3-dialdehyde-Labeled Amino Acids from Brain Tissue
by Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection
Masaoki Imazawa* and Yuriko Hatanaka
National Institute of Neuroscience, NCNP
- L19 Application of Capillary Electrophoresis to Pharmacokinetic Studies of Nicotinic Acid
Masahiro Iwaki, Akinori Wada, Masako Kikuchi*, Taro Ogiso, Yasuo Oda, Tsuneo Okabe,
and Kazuaki Kakehi
Faculty of pharmaceutical Sciences, Kinki University
- L20 High Performance Capillary Electrophoresis of Heparin and Its Preparations
Based on the Size Exclusion Effect
Shozo Hayase¹, Yasuo Oda² and Kazuaki Kakehi*²
1) Taiho Pharmaceutical Co. LTD. 2) Faculty of pharmaceutical Sciences, Kinki University

Session IX(11:40-12:40) Chairman Prof. Hidesaburo Kobayashi

- L21 Rapid Electro-Blotting of Proteins Using an Elastic Gel
Katsunori Aizawa*
Department of Microbiology, University of Maryland
- L22 Peptide pI Markers for Capillary Isoelectric Focusing with Ultraviolet Detection.
Kiyohito Shimura¹, Zhi Wang*¹, Ken-ichi Kasai¹ and Hiroyuki Matsumoto²
1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University
2) Laboratory of Molecular Biophotonics
- L23 Analysis of Human Cerebrospinal Fluid Proteins by Capillary Isoelectric Focusing
Hiromitsu Miyamoto*¹, Takashi Manabe¹, Masami Nakatsu² and Masanobu Arai²
1) Department of Chemistry, Faculty of Science, Ehime University
2) Medical Information Institute, Kanto Teishin Hospital

Session X(13:40-14:40) Chairman Prof. Takashi Manabe

- L24 Electrophoretic Behavior for Triplet Repeat DNA Fragments and DNA Diagnosis
of Triplet Repeat Disease by Capillary Electrophoresis
Yuriko Kiba *, Koichi Ohara, and Yoshinobu Baba
Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima
- L25 Study for Clinical Application of Gene Analysis Using Capillary Electrophoresis
Chinuyo Sumita*, Akira Suehiro, Satoshi Higasa, Hiroshi Yoshimoto and Eizo Kakishita
Hyogo College of Medicine

- L26 Mutation and Polymorphism Analysis of Disease Causing Genes
by Capillary Electrophoresis
Naoko Yashiro, Seiko Matsuda, and Yoshinobu Baba*
Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima

Session XI(15:00-15:40) Chairman Prof. Yoshinobu Baba

- L27 Capillary Zone Electrophoretic Separation and Activity Measurements of Microorganisms
Masaki Torimura*¹, Kenji Kano¹, Tokuji Ikeda¹, Yukihiro Esaka² and Teruhisa Ueda³
1) Graduate School of Agriculture, Kyoto University 2) Gifu Pharmaceutical University
3) Shimadzu Co.
- L28 Measurement of Electrophoretic Velocity of Microalgae by CE
Keiko Yamaberi*, Yoshihisa Murai, Hisako Kondo and Yushi Hirata
Department of Chemical Science and Engineering, Osaka University

Session XII(16:00-17:20) Chairman Prof. Masaaki Senda

- L29 Addition of Alkyl Diamines to High-Molecular-Mass Surfactant Solution
on Micellar Electrokinetic Chromatography
Hiroto Ozaki *¹ and Shigeru Terabe²
1) Kaneka Techno Research Co. Ltd. 2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- L30 Analysis of Plant Drainage by Capillary electrophoresis (1) Aromatic Amines
Toshihiko Maruyama*¹, Yoshihiko Yagi² and Tetsuya Mayahashi²
1) Analytical Group OTSUKA ELECTRONICS CO., LTD.
2) Water Examination Laboratory Hanshin Water Supply Authority
- L31 Simultaneous Separation of Metal Ions and Anions by Capillary Electrophoresis
Katsushi Sasa*, Yasuhiro Sato and Keiko Kitagishi
Otsuka Electronics Co. Ltd.
- L32 The Effects of Salts in Sample Matrix to Capillary Ion Analysis
Hideki Sasaki* and Jun Yonekubo
Nihon Waters K.K.

Concluding Remarks

Chairman of the 17th Symposium on Capillary Electrophoresis
Prof. Hidesaburo Kobayashi

Information for the 18th Symposium on Capillary Electrophoresis
Chairman of the 18th Symposium on Capillary Electrophoresis
Prof. Totaro Imasaka

*Proceedings of the 17th Symposium
on Capillary Electrophoresis
SCE17/Tokyo 1997*

December 11,12 '97

第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム

講演要旨

1997年12月11日、12日





CZEにおける非イオン性物質のピークプロファイル

育田 夏樹*、 廣川 健
広島大学工学部

Peak profiles of nonions in CZE

Natsuki Ikuta* and Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

In CZE experiments, the peak intensity of nonionic benzyl alcohol migrating by osmotic flow was stronger when dissolved in water than when dissolved in a supporting electrolyte. According to our computer simulation, this was because benzyl alcohol dissolved in water was concentrated behind the injection plug suggesting that velocity of EOF changed locally. The influence of ununiformity of EOF upon reproducibility in CZE will be discussed.

1. 緒言

キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)により分離する際、浸透流は分析時間を短縮する上で非常に重要な働きをしている。しかしながら、浸透流は電解液条件や履歴により大きく変化し、その挙動は複雑である。したがって浸透流の挙動を明らかにすることができれば、泳動時間の再現性の向上をはかることが可能となるであろう。

我々は既に、キャピラリー電気泳動をシミュレートするプログラムの製作に成功しており、この結果から、電位勾配の時間変化が泳動時間の再現性に影響を及ぼしていることを明らかにした。さらに、このプログラムでは局所的に電位勾配の異なるゾーンがあれば、それに応じて局所的に浸透流の速度が異なることが示唆された。本報告では、この現象を確かめるために、非イオン性物質のピークプロファイルについて実験およびシミュレーションにより検討し、この浸透流速度の変化が再現性に及ぼす影響について考察する。

2. 実験

支持電解液は Tris 40mM を用い HCl で pH8.0 に調節した。試料はベンジルアルコールを 0.1v/v% になるように超純水もしくは支持電解液に溶解した。キャピラリー電気泳動装置は CAPI-3100(大塚電子)を用いた。印加電圧 30kV、キャピラリーにはフューズドシリカキャピラリーを用い、内径 75 μ m、長さ 60cm、有効長 47.7cm、検出波長 204nm、キャピラリー設定温度 25 $^{\circ}$ C で測定を行った。試料は落差法(1cm, 60s)により注入した。

3. 結果と考察

Fig.1 の実験結果から明らかなように、非イオン性物質を超純水および支持電解液に溶解した試料のプロファイルは大きく異なっていた。水に溶解した試料のピークは高く左右対称なプロファイルを持ち、一方、電解液に溶解した試料のピークは相対的に低くテーリングを起こした。これらの現象は、定性的には以下のように説明することができる。水に溶解した場合、注入プラグの電位勾配が泳動ゾーンでの電位勾配より大きいため一旦ベンジルアルコールが濃縮された後、拡散によりピークが広がる。一方、電解液に溶解した場合、試料の濃縮や希釈は起こらず注入プラグの濃度プロファイルから拡散するため、水に溶解した場合と比べてピークの高さが低く、緩やかなピーク形状になる。すなわち、この現象は電気浸透流は全系で一定の速度で泳動するのではなく、電位勾配が部分的に変化することによって、異なる浸透流速度を持っていることを示唆する。

この現象を数値的に確かめるために、我々が開発したプログラム^{1,2}を用いてシミュレーションを行った。計算は実験と同じ条件で行い、計算に必要な他のパラメーターとして注入プラグ長 0.5cm、系内に含まれる全ての物質の拡散係数を $1 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 、空間差分 0.002cm、時間差分 0.005s、浸透流移動度 $30 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ とした。Fig.2 に示した泳動初期のベンジルアルコールの挙動からも明らかなように、シミュレーションによる結果においても、水に溶解した試料の方は濃縮される。すなわちこのシミュレーションで得られた結果も先の定性的説明と一致しており、浸透流もイオンの泳動と同じく局所的に異なりうることを示している。

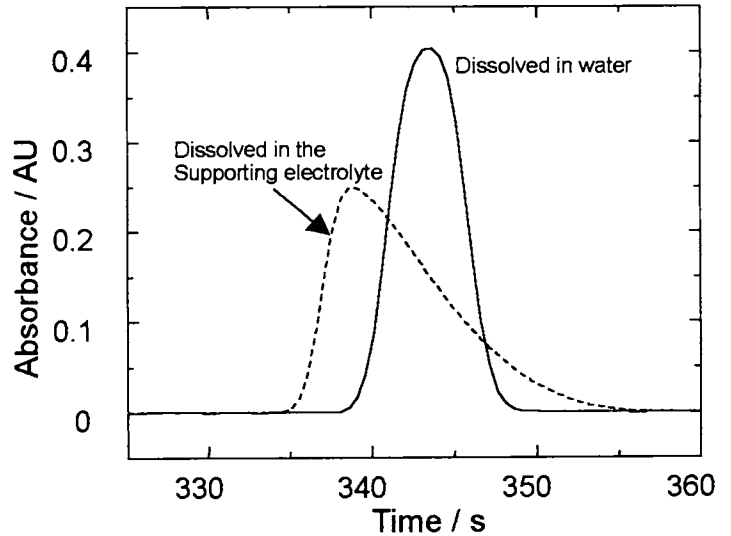


Fig. 1 Observed peak profiles of benzyl alcohol in CZE

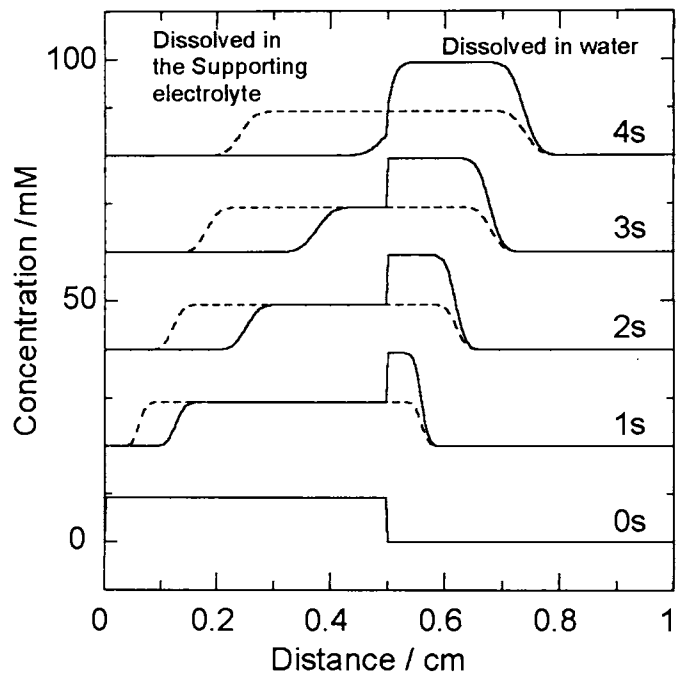


Fig. 2 Simulations of peak profiles of Benzyl alcohol in CZE

1) 第16回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集(1996)

2) N. Ikuta and T. Hirokawa, *J. Chromatogr.*, in press.



実効移動度を横軸とするCZEのエレクトロフェログラム

(広島大・工) 廣川 健*、育田夏樹、山田裕治

Electropherograms of CZE with effective mobility as ordinate scale

Takeshi Hirokawa*, Natsuki Ikuta and Yuji Yamada

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

A new method to give effective mobility at a certain temperature(ex.25°C) from migration time was developed, and the method was applied to convert the migration time scale in the electropherograms of CZE into the effective mobility scale. It was demonstrated that the converted pherograms were useful not only for accurate qualitative analysis but also for quantitative analysis.

1. 緒言

キャピラリー電気泳動法(CE)は分離能・絶対感度共に優れた方法であるほか、ゼロエミッションを指向する分析法として重要である。しかしながらCE分析の再現性・濃度感度に関しては課題も多く、改善の余地を残している。

キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)において泳動時間の再現性は定性・定量の精度に直接影響を与える。良好な再現性を得るには泳動電圧(電流)の制御や温度制御が最も重要であるが、これらが完全に制御されたとしても、CZE分離系には濃度制御の機能がないため、分離過程は試料組成の影響を強く受ける。その結果、試料が非常に希薄でかつ支持電解液に近い組成を持つ場合をのぞき、移動時間(t_{mig})は原理的に試料の濃度やカウンターイオンの種類に応じて変動する。

我々はこの変動が、エレクトロフェログラムの横軸を泳動時間から実効移動度へ変換する事によって抑制でき、この変換が定性分析のみならず定量分析についても有効である事を見いだしたので報告する。

2. 泳動時間の移動度への変換法

CZEでのイオンの移動時間(t_{mig})は次式で与えられる:

$$t_{mig} = l / v_{mig} = l / (v_{el} + v_{os}) = l / [(m_{el} + m_{os})E] \quad (1)$$

ここで l はキャピラリー有効長、 v_{mig} は泳動速度、 v_{el} は電気泳動速度、 v_{os} は浸透流速度、 m_{el} はある試料成分イオンの電気泳動実効移動度、 m_{os} は浸透流移動度、 E は電位勾配である。これらの中から試料の電気泳動実効移動度 m_{el} を精度良く抽出するには浸透流を正しく補正する必要がある。このためには通常移動度0の物質のピークもしくは間接吸収剤によるシステムピークが使用される。しかしこの場合得られた移動度 m_{el} は、キャピラリー内部の温度を反映しており、そのままでは同じ泳動バッファーを使用する分離条件であっても、分離キャピラリー恒温槽の設定温度や装置の温度保持能力に依存して、異なる移動度を与える結果となる。

希土類元素のCZE分離の典型的な例として、図1に同じ装置で泳動電圧を変えて(30kV~5kV)泳動させた場合を示した。この泳動時間を横軸とするフェログラムを浸透流

速度を補正して移動度軸に変換すると、図2を得る。おなじ物質であっても移動度差があるのはキャピラリー内部の温度が異なるためである。

温度上昇は原理的に避けられないが、この効果を補正する方法をとして、「時間により流速の変化する仮想的浸透流」の概念を適用する。この変換に使用する式は下記のとおりである。

$$\bar{m}(t_{mig}) = \left[\frac{l}{t_{mig}} - (a \cdot t_{mig} + b) \right] / E \quad (2)$$

ここで l は実効キャピラリー長、 $a \cdot t_{mig} + b$ は基準温度(例えば25°C)における内部標準物質(この場合K⁺)の移動度の理論値と、移動度0のピーク(間接吸収法のシステムピークなど)により求めた仮想的浸透流速、 E は電位勾配(電源電圧/キャピラリー全長)である。

この変換により、図3のように、図1とは大きく異なり、ほぼ一斉におなじ移動度を示すフェログラムが得られる。このような変換を施すことによりハードウェア依存性が消去できるので、高精度の定性分析が可能になる。少し移動度の値に違いが見られる事については電位勾配の緩和によるものと考えており、それを表す項(η)を泳動時間に加えることにより高精度な移動度への変換が可能になる。なお図4に幾つかの希土類についてピーク面積を示した。泳動電圧依存性が消去され、定量分析の精度向上にも効果的であることが明らかになった。講演ではこれらの例についてシミュレーションの結果を含め報告する。

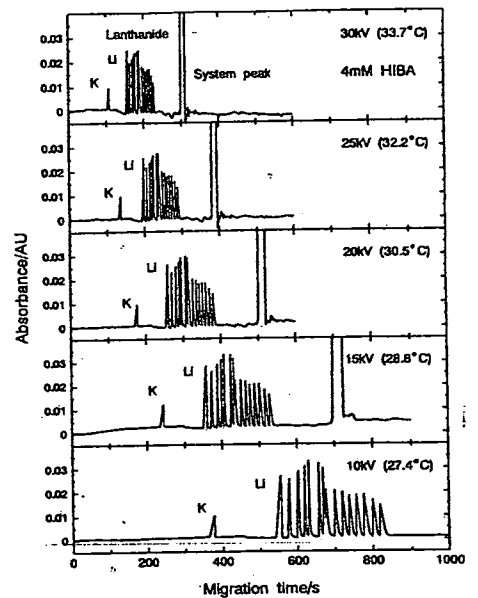


図1、ランタニドイオンのエレクトロフェログラム (泳動電圧 = 30kV-10kV)

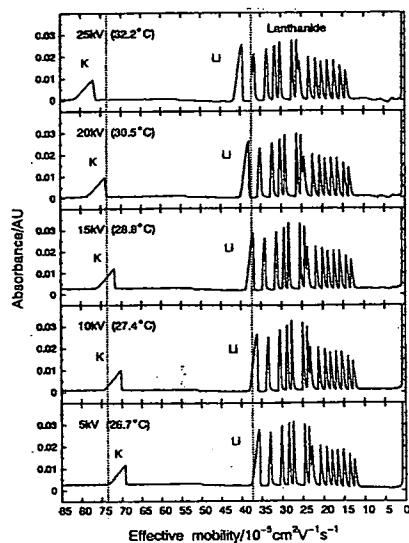


図2、式(1)により移動度軸に変換したフェログラム

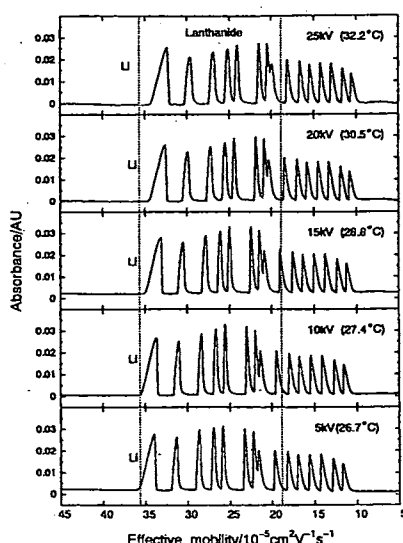


図3、式(2)により移動度軸に変換したフェログラム

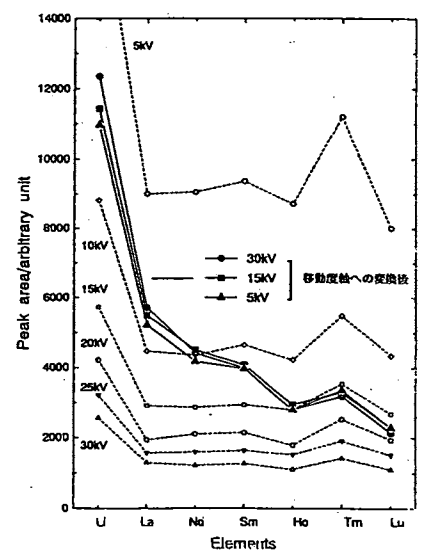
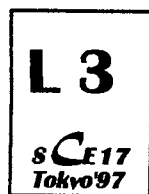


図4、変換前後のピーク面積



石英およびガラス製電気泳動チップの作製とその特性

阿部 浩久*、西本 尚弘、中西 博昭

(株) 島津製作所 基盤技術研究所

Fabrication of Quartz and Glass Microchips and their Performance

H. Abe*, T. Nishimoto, H. Nakanishi

Technology Research Laboratory, Shimadzu Co.

Abstract

Microchips for capillary electrophoresis have been fabricated in small size on quartz or glass substrates. Using these microchips, we show that they permit to perform quantitative sample injection (several 10 pl or less), effective separation (the number of theoretical plates is over 2,500) and high speed analysis (~30 sec).

1. はじめに

今までのキャピラリを、マイクロマシニングの技術を用いてガラス基板上に作製する試みが多数なされるようになってきた。この小さなガラス基板 --電気泳動チップ-- は、単にキャピラリの代用品ではなく、非常に優れた性質も合わせ持つ。

チップは、泳動によるジュール熱を効率よく放熱できるため、より高い電圧で泳動が可能となる。このため分析時間の短縮が図れる。また、キャピラリの長さや、検出位置を μm 単位で厳密に設定できる。これによって、再現性の向上が期待できる。さらに、自由な形状の流路を設計できることから、十字にクロスさせた流路も作製できる。これをサンプル注入流路と分析流路として使い、両方の流路に印加する電位を適正にコントロールすることで、数十plという微量なサンプルを定量的に簡便に導入できる。これは、分析再現性の向上と共に、装置の自動化に大きく貢献すると考えられる。

また、今までの電気泳動チップを用いた研究は¹⁾、主にPyrex[®]ガラス基板を用いて行われてきた。これは、石英の融点が約1150℃と高いため、熱融着による石英チップの作製が難しかったからである。しかし、Pyrex[®]は紫外に吸収を持つため、紫外吸収を検出に利用できなかった。そこで我々は、石英ガラスをHF水溶液を界面に介在させて接合する技術を開発し²⁾、室温にて簡便に石英チップを作製できるようにした。

2. 実験

Fig.1に示すようなデザインで幅 $50\mu\text{m}$ 、深さ $20\mu\text{m}$ の流路を持つチップを、Fig.2の手順に従って作製した。工程e)において、Pyrex®の場合には熱融着により、石英の場合にはHF水溶液を用いた手法で接合した²⁾。サンプル注入部から検出部までの有効分離長は 17mm である。

測定は、顕微鏡を改良して行い、アルゴンレーザー (488nm , 15mW) で励起し、フィルターで励起光をカットした後に光電子倍增管で検出した。レーザー光のスポット径は $10\mu\text{m}$ である。また、流路内の流れを観察するときには外部より固体ブルーレーザー (島津製作所製: HK5510、波長: 473nm) をチップに照射し、観察するとともにCCDにより記録した。

3. 結果と考察

FluoresceinとCalceinを用いて電気泳動チップの基本性能を評価した。その結果、 10pl 程度のサンプルを精度良く定量的に注入できる事がわかった。また、分離長 17mm でも、約30秒で全ての分析を終了できる。この時の理論段数は約2,500段である。実際には、サンプル注入部から数mmで試料の分離が観測できるため、さらなる分析のスループットの向上も可能であると考えられる。

さらに、電気泳動チップに期待されるもう一つの特徴として、チップの使い捨て化による分析再現性の向上がある。現在、この点についてより詳細に検討を行っており、その結果を含めて発表したい。

文献

- 1) D. J. Harrison, *et. al.*, Science, 261 (1993), 895-897
- 2) H. Nakanishi, *et. al.*, IEEE MEMS'97 Proceedings (1997), 299

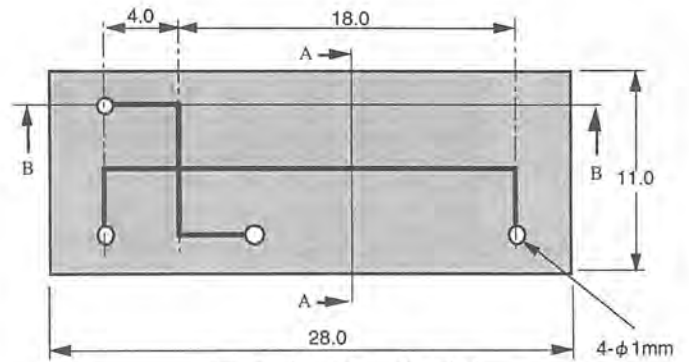


Fig.1 チップレイアウト

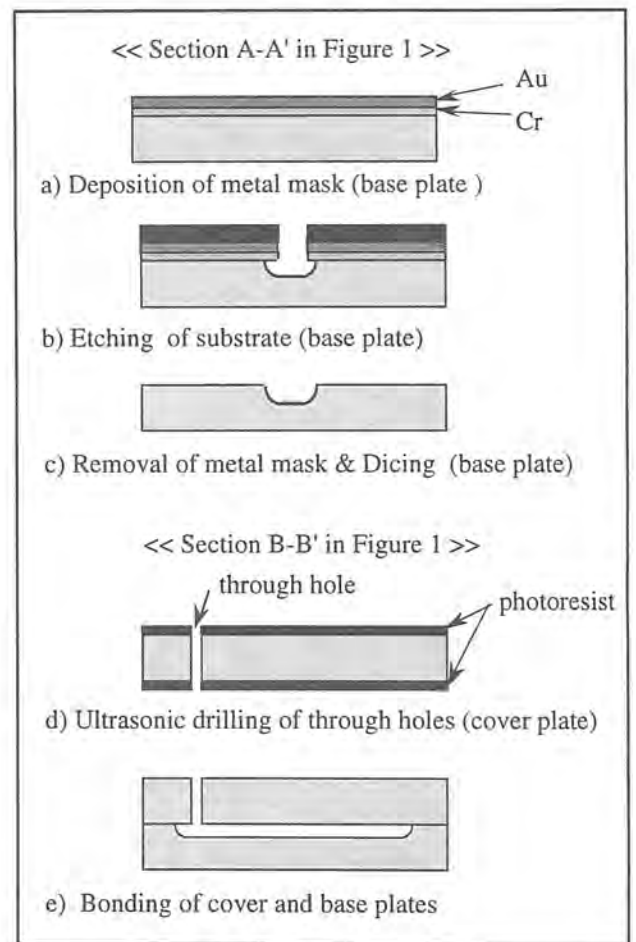


Fig.2 チップ作製プロセス

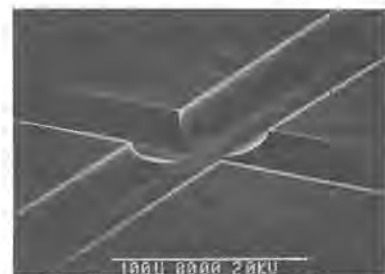


Fig.3 流路のSEM写真
(幅= $50\mu\text{m}$)



非水系キャピラリー電気泳動：親水性相互作用の活用

- 1) 江坂幸宏*, 吉村訓徳, 後藤正志, 2) 加納健司
1) 岐阜薬科大学, 2) 京大院農, 応用生命

Non-aqueous CE: Utilization of Hydrophilic Interactions

1)Yukihiro Esaka*, Kuninori Yoshimura, Masashi Goto, 2)Kenji Kano

1)Gifu Pharmaceutical University, 2)Division of Applied Life Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University.

Non-aqueous CE with acetonitrile-based electrolyte solutions containing poly(ethylene glycol), PEG, was studied. In acetonitrile solutions, migration behaviors of substituted benzoic acids as model samples are governed by hydrogen-bonding interaction with ether oxygen of PEG and ion-dipole interaction with terminal hydroxyl groups of PEG, while those in aqueous solutions are governed by the hydrogen-bonding interaction and hydrophobic interaction. As the results, drastic change in separation selectivity was observed between the aqueous systems and the non-aqueous systems.

1. はじめに

非水溶媒を用いる一つの大きな意味は、分離を支配する相互作用の起こる場の性質を変化させることにある。ほとんどが水系の環境で行われてきた電気泳動において、試料と相互作用する物質の選択と様々な性質の場の選択により今までにない選択性を有する分離系の構築が期待できる。水系で疎水性相互作用が有効に機能したように、非水系では水素結合や双極子相互作用のような親水性相互作用の活用に大きな可能性がある。

ここでは、アプロテックなアセトニトリルを用いた電解液に poly(ethylene glycol), PEG を添加した分離系で機能する相互作用の詳細な観察を通し、非水系 CE における親水性相互作用の活用について考察する。

2. 実験

装置：CE 装置は、松定プレジジョンデバイセズ社製高圧電源(HCZE-30PNO)、日本分光製紫外吸収検出器(UVIDEC-100 III)、島津製作所製クロマトパック(C-R6A)より構成される。キャピラリーは、C&W Scientific 社製 μ sil DB-1(0.05 mm i.d. \times 500 mm, 有効長 250 mm)を用いた。

測定条件：電解液は、支持電解質 tetra n-butylammonium perchlorate (5.7 mM)、塩基として tetra n-butylammonium hydroxide (0.16 mM)を含有したアセトニトリル溶液に、適宜 PEG400, PEG 4000, PEG 20000 等を溶解して用いた。印可電圧は 17 kV (電流 6 ~ 2 μ A) とし、測定を行った。

3. 結果と考察

Figure 1 に 11 種の安息香酸 (BA) 類の電気泳動図を示す。コーティングキャピラリーを用いており、浸透流はほとんど生じない。A, B はそれぞれ PEG を含有しないアセトニ

トリル系電解液と PEG 4000 を 20% 含有するアセトニトリル系電解液を用いたものである。PEG 4000 の添加により分離が著しく向上している。また、この分離条件下では全試料のカルボキシル基は完全解離しているものと思われる。

水系電解液中では、PEG は全て同じ傾向の効果を示したが、アセトニトリル系では鎖長の違いによって効果に質的な差が生じた。この差を定量的に評価するために各 PEG と試料の錯形成定数(K)を求め Table 1 に示した。Table 1 から以下のことがわかる。

(1) PEG 400 に対する K 値が水系に比較して 10 倍以上である。また、PEG 4000, PEG 20000 ではそれほど大きくない。

(2) K 値の大きさの順が、水系では試料置換基の水素ドナー性の強さの順で説明されたことに対し、アセトニトリル系の PEG400 については安息香酸類の共役塩基の強さの順と一致する。最も水系に近い傾向はアセトニトリル系では PEG 20000 に見られた。

アセトニトリル系では PEG と試料の相互作用は、試料官能基とエーテル酸素による水素結合性相互作用と PEG 末端水酸基と共役塩基型である試料の双極子-イオン相互作用が同時に働いていると思われる。

後者の強さは共役塩基の強さに比例し、またイオンが関与するために水素結合性相互作用より著しく強いことが推測される。PEG 400 は末端水酸基の含量が PEG 20000 の 50 倍であることから、その効果に末端水酸基による相互作用が支配的に反映したのに対し、PEG 20000 ではエーテル酸素による相互作用が主に反映したと解釈される。PEG 4000 は予想されるように中間的な傾向を示し、また PEG 4000 によって最も良い分離が得られている。イオン-双極子相互作用が水系でほとんど機能しなかった理由は、解離カルボキシル基、末端水酸基共に水分子によって溶媒和され十分に相互作用できなかつたためと思われる。

このように、アセトニトリル系に水系と異なる親水性相互作用が発現し新しい選択性が獲得されたことは、非水系 CE の大きな可能性を示唆するものであると考える。

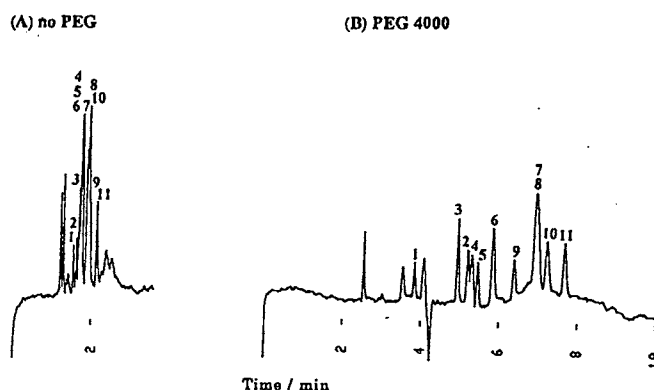


Figure 3 Electropherogram of Substituted and Unsubstituted benzoate in (A) the Absence of and (B) the Presence of PEG 4000 in Acetonitrile-based Electrolyte Solutions.

Conditions: electrolyte solutions: 5.7 mM (n-Bu)₄NClO₄ + 0.16 mM (n-Bu)₄NOH/ Acetonitrile (A); 4.6 mM (n-Bu)₄NClO₄ + 0.13 mM (n-Bu)₄NOH + 20% (w/v) PEG 4000/ Acetonitrile (B). Capillary tube: μ sil(DR-1 coating), 500 mm \times 0.05 mm, I.d. (effective length: 250 mm). Applied voltage: 17 kV (Current 5 μ A (A) and 3 μ A (B))
Peak: (1)2HO-BA(2)BA(3)2CHO-BA(4)4NO₂-BA(5)4CHO-BA(6)4CH₃-BA(7)4NH₂-BA(8)4(CH₃)₂N-BA(9)4CH₃COO-BA(10)4HO-BA(11)4CH₃CONH-BA

Table 1 Estimated values of complex formation constants (K)

Samples	$K \times 10^3 / [\text{PEG}]^{*1}$			
	in aq. soln. ^{*2} PEG 400	PEG 400	in MeCN soln. ^{*3} PEG 4000	PEG 20000
4HO-BA	10.0	118	18.9	13.0
2HO-BA	9.7	0	0 ^{*2}	0
4CH ₃ CONH-BA	9.5	103	14.6	13.3
4NH ₂ -BA	6.6	127	18.1	9.8
4CH ₃ -BA	7.0	113	14.6	6.0
4CH ₃ COO-BA	4.8	91	9.8	6.8
4CHO-BA	4.5	67	11.0	6.0
benzoate anion (BA)	2.7	99	14.5	5.9
2CHO-BA	0 ^{*2}	54	8.0	4.2
4(CH ₃) ₂ N-BA	-	127	17.3	6.8
4NO ₂ -BA	-	57	7.5	5.1

*¹ [PEG] in % (w/v).

*^{2,3} These values were estimated using 2CHO-BA and 2HO-BA, respectively.



ポリアリルアミンを担体とする動電クロマトグラフィー用キャリア の特性と、混合擬似固定相による分離ウィンドウの制御

中川 克仁*、永山 尚史、森本 尚夫、細矢 憲、田中 信男

京都工芸繊維大学繊維学部

Characteristics of Pseudo-stationary Phase for Electrokinetic Chromatography Prepared from Polyallylamine, and the Control of Migration Time Windows by the Use of Mixed Polymeric Pseudo-Stationary Phases

Katsuhito NAKAGAWA*, Hisashi NAGAYAMA, Hisao MORIMOTO, Ken HOSOYA, and Nobuo TANAKA
Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku,
Kyoto 606

Abstract

We will report the effects of alkyl chain length and the number of alkyl groups of polyallylamine-supported pseudo-stationary phases for electrokinetic chromatography. The effect of the addition of organic solvents and the use of mixed polymeric pseudo-stationary phases to control the selectivity and the migration time window will be discussed.

1. はじめに

動電クロマトグラフィーは、SDSなどの界面活性剤ミセルを用い、中性試料の分離を可能としているが、高疎水性化合物はそのほとんどがミセルに分配され相互の分離が達成されない。この問題を克服するための緩衝液への水溶性有機溶媒の添加は、低分子界面活性剤の場合、ミセル形成を阻害し分離を損なう。高分子キャリアは、分子ミセルを形成し、高濃度の有機溶媒存在下においても安定である。我々はポリアリルアミン(PAA)を担体として種々のアルキルを導入することにより高分子キャリアを合成し、アルキル基の鎖長と導入量、およびPAA-EKC系への有機溶媒添加量が分離ウィンドウと試料の相対移動時間に与える効果の検討を行った。また、キャリアの混合による分離ウィンドウと試料に対する選択性の制御を試みた。

2. 実験

[装置] 高圧電源：HCZE-30PN0.25-LDSW (Matsusada)、検出器：UV-8 II (TOSOH)、データプロセッサー：C-R3A (Shimadzu)、フューズドシリカキャピラリー：0.050 mm I.D. x 0.375 mm O.D. の内面未処理管(ジーエルサイエンス 1010-3185)。

[キャリア(PAA-C_n)の合成] ポリアリルアミン塩酸塩(MW=10000)から水酸化カリウムでPAAを遊離した後、アルキルブロミド(C_nH_{2n+1}Br, n=8-20)によりアルキル化した。得られたアルキル化PAAにアクリル酸メチルをマイケル付加し、これを水酸化ナトリウム

ムにより加水分解してカルボキシレート型としたものをキャリアとして使用した。

3. 結果と考察

緩衝液中においてキャリア PAA-C_n (n=8-16) のアルキル鎖長が長いほど、キャリアの溶出時間が短く、狭い分離ウィンドウ (t_c/t_0 , t_0 : 電気浸透流の移動時間, t_c : キャリアの移動時間) が得られた。有機溶媒濃度の増加にともなって電気浸透流は減少したが、PAA キャリアの電気泳動移動度は相対的に増大し、ある有機溶媒濃度以上で非常に広い分離ウィンドウを与えた。疎水性の高い溶質の相対移動時間 (t_R/t_0) は、低濃度の有機溶媒条件では t_c により支配されたが、高濃度の有機溶媒条件においては k' により支配され逆相クロマトグラフィ類似の分離が得られた。また分離ウィンドウの拡大は、キャリアのアルキル鎖長が長いほど、またアルキル基の導入量が多いほど高濃度の有機溶媒側で起こった。得られた結果は、有機溶媒の添加がキャリアの構造変化をもたらすこと、分離ウィンドウと試料の相対移動時間の大きな変化をもたらすことを示している。

さらに、異なる広さの分離ウィンドウと選択性を持つ高分子キャリアの混合により、分離ウィンドウの広さと試料に対する選択性の制御が可能となることが示された (図-1)。

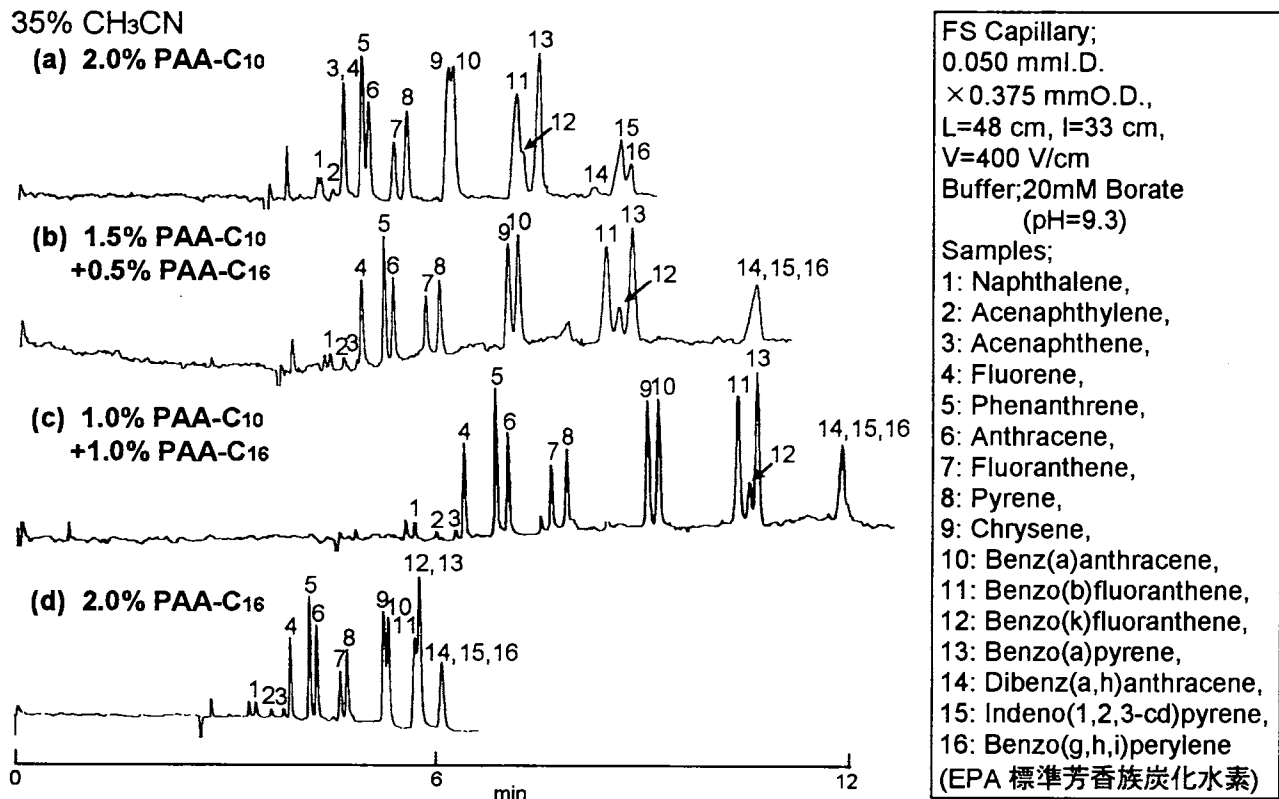


図-1 多環芳香族炭化水素の PAA-EKC 分離

4. 文献

N. Tanaka, K. Nakagawa, H. Iwasaki, K. Hosoya, K. Kimata, T. Araki, D. G. Patterson, Jr, J. Chromatogr. A, 781 (1997) 139-150, N. Tanaka, K. Nakagawa, K. Hosoya, C. P. Palmer, S. Kunugi, J. Chromatogr. A, in press.



物理吸着型内壁被覆キャピラリーの開発とキャピラリー電気泳動/ 質量分析 (CE/MS) への応用

片山博之*、石濱泰、浅川直樹

エーザイ (株) 分析研究所

Development of stable capillary coating based on physical adsorption for capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS)

Hiroyuki Katayama*, Yasushi Ishihama and Naoki Asakawa

Chemical Analysis Division, Analytical research laboratories, Eisai Co. Ltd.

It is well known that when capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS) was performed in a positive detection mode, inner wall of a capillary should be positively modified. In this study, we aimed to achieve a stable coating by physical adsorption and have developed a novel permanent coating procedure, "successive multiple ionic-polymer layers (SMIL)" coating. Cationic polymer polybrene (PB) was attached to the inner surface of the capillary by SMIL coating (SMIL-BP₍₃₎ capillary). The SMIL-PB₍₃₎ capillary had reversed EOF in the pH range 2-12 and showed stronger endurance than the conventional PB capillary. Therefore, it could be widely applied to CE/MS analyses.

1.はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) を質量分析 (MS) にオンライン連結しポジティブモードでカチオンの分析を行う場合、キャピラリーのスプレー端には連続的に正電圧が印加されているため、内壁未処理キャピラリーでは試料注入時に電気浸透流 (EOF) が逆転し、注入された試料がキャピラリー外へ出てしまうという問題が発生する。その対応策として、キャピラリー内壁の被覆が挙げられる。

本研究ではCE/MSのための物理吸着を基本原理とした新規内壁被覆法 (SMILコーティング) の開発を行い、カチオン内壁被覆キャピラリーを作製し評価を行った。被覆剤にはポリブレン (PB) を用いた。

2. 実験

CE装置はBeckman P/ACE 2100 (Beckman, Fullerton, CA, USA)を用いた。コーティングはP/ACE 2100のリンス機能を利用し、コーティング溶液をリンスすることにより行った。CE/MSはMATSUSADA高圧電源装置(松定プレジジョン、滋賀)とAPI III (PE SCIEX, Thornhill, Ontario, Canada)を接続することにより分析を行った。イオン化にはESIイオン化法を用いた。

3. 結果と考察

SMILコーティングによりPBをキャピラリー内壁に被覆し(SMIL-PB₍₃₎キャピラリー)、EOFを測定した。その結果をFig. 1に示す。内壁未処理キャピラリーではpH6以下でEOFが低下しはじめ、pH3以下ではほぼ抑制された。一方、SMIL-PB₍₃₎キャピラリーではEOFが逆転し、かつpH2-12の範囲内でpHに非依存的なEOFを有していた。またpH2-12で連続的にEOFの測定を行ってもPBが剥離しなかったことから考えて、SMIL-PB₍₃₎キャピラリーはpH安定性に優れているといえた。次に連続分析に対する耐久性試験を行った。pH3の条件下で1回10分間のEOF測定を行い、EOFが安定に発生する回数を調べることにより評価を行った。その結果をFig. 2に示す。従来法により内壁被覆を行ったPBキャピラリーは約20回でPBが剥離したのに対して、SMIL-PB₍₃₎キャピラリーは600回安定であった。

SMIL-PB₍₃₎キャピラリーを用いてシース液を用いたCE/MS分析を行った。試料注入はイオンスプレーボルト(ISV)を+5kV印加したま落差法により行った。テスト試料には塩基性試料である4種のβ-blockerを用い、検出はポジティブモードで行った。その時のTICマスクロマトグラムをFig. 3に示す。4種β-blockerの検出は可能であり、テーリングも抑制されていたためSMIL-PB₍₃₎キャピラリーはCE/MSへ適用可能なことが分かった。

本法によって作製された内壁被覆キャピラリーはpHに非依存的なEOFを有していたため、EOFの存在が必要不可欠であるマイクロスプレー及びナノスプレーCE/MSへの応用も将来的には期待できる。

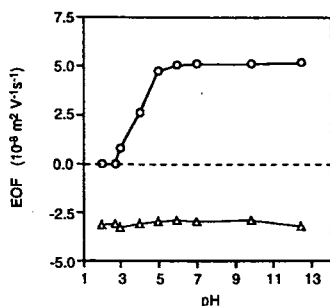


Fig. 1 EOF of uncoated and SMIL-PB₍₃₎ capillary

—○— uncoated

---△--- SMIL-PB₍₃₎

Conditions: detection, 214 nm; applied voltage, 7 kV; capillary, 75 μm I.D. x 27 cm (20 cm effective length).

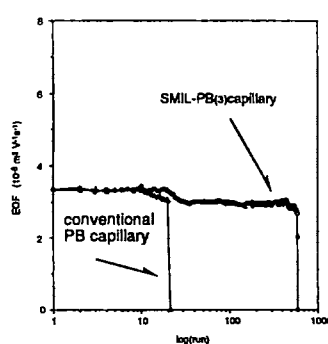


Fig. 2 Endurance of conventional PB capillary and SMIL-PB₍₃₎ capillary

Conditions: detection, 214 nm; applied voltage, -7 kV; buffer, phosphate buffer at pH 3.0 (I=0.05); capillary, 50 μm I.D. x 27 cm (20 cm effective)

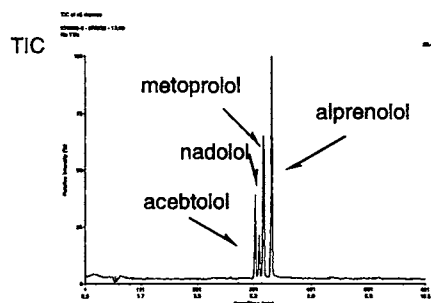
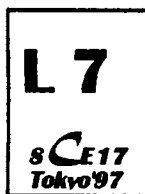


Fig. 3 CE/MS analysis of β-blockers

Conditions: detection, positive; applied voltage, -5 kV; ion spray voltage, +5 kV; buffer, 0.5 % (v/v) formate buffer pH 2.26; sheath liquid, 0.5 % (v/v) formate buffer : acetonitrile=25 : 75; capillary, 50 μm I. D. x 40 cm; injection, hydrodynamic injection



キャピラリー電気クロマトグラフィーでの使用を目的とした 粒子径均一微小高分子充てん剤の調製

細矢 憲*、吉廻公博、太田浩章、中川克仁、木全一博、田中信男
京都工芸繊維大学繊維学部

Uniformly-sized polymer microsphere prepared as CEC stationary phase
Ken Hosoya,* Kimihiro Yoshizako, Hiroaki Ohta, Katsuhito Nakagawa,
Kazuhiro Kimata, and Nobuo Tanaka
Department of Polymer Science, Kyoto Institute of Technology.

Abstract

Uniformly-sized polymer microspheres were prepared through two-step swelling and polymerization method as well as SPG emulsification method. The prepared microspheres were evaluated by chromatographic and physical methods to study the possibility of CEC stationary phase. SPG emulsification method afforded suitable size microsphere with moderate size uniformity and characteristics as HPLC or CEC stationary phase were acceptable. The microsphere modified with ion exchange groups was utilized for CEC to afford reasonable performance.

1. はじめに

キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) はキャピラリー電気泳動と液体クロマトグラフィーを組み合わせた分離モードであり、ポンプ等で送液する方法に依らないために微小充てん剤を用いた場合にも種々の利点を発揮する。CECにおける充てん剤としては、液体クロマトグラフィーに用いられるシリカゲル基材を用いた充てん剤が利用可能であるが、より広い範囲の分離に適応するためには有機ポリマー系充てん剤の利用も有意義であると期待される。ロッド型の多孔性ポリマー連続相を固定相として用いる方法もあるが、表面修飾や機能化の観点から、我々はCEC用の微小粒子径で均一粒径な各種ポリマー充てん剤の開発を試みた。今回は、その基礎的検討について報告する。

2. 実験

1) 粒子径均一粒子を与える二段階膨潤重合法とSPG膜乳化法によって粒子径3 μm 以下の粒子径均一多孔性ポリマー粒子を調製した。これらの粒子を物理的、および液体クロマトグラフィー的に評価し、その液体クロマトグラフィー用充てん剤としての性質を詳細に検討した。

2) SPG膜乳化法によって、3 μm 以下の粒子径均一多孔性ポリマー粒子を調製し、新規な方法によって、その粒子外表面にイオン交換性基を導入した。これらの粒子をスラリー法で内径100 μm 有効長300 mmのフューズドシリカ管に充てんし、CEC用充てん剤としての性能を基礎的に検討した。

3. 結果と考察

1) シード重合法である二段階膨潤重合法は優れた粒子径分布を有する粒子を与えたが、シード粒子の影響により、図1の様に3 μm 程度の直径においても真球粒子が得られない欠点を露呈した。一方、SPG膜乳化法は、優れた真球性を有する粒子を与え、その粒子径分布もシード重合法にはやや劣るものの充分実用に耐えうるものであった。また、液体クロマトグラフィー用充てん剤としての性能も良好であった。

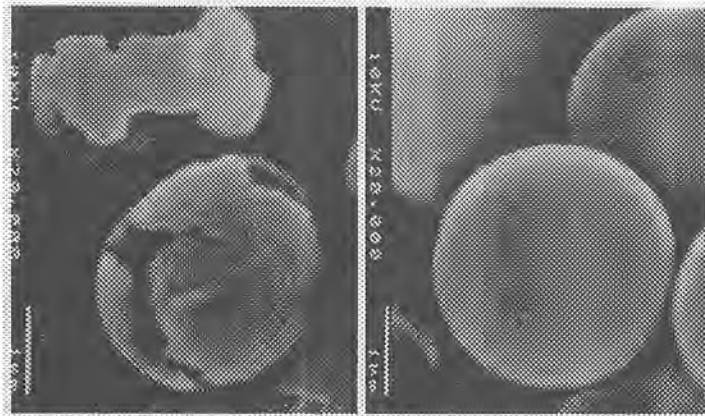


図1. 粒子の走査型電子顕微鏡写真 (左: 二段階膨潤重合法、右: SPG膜乳化法)

2) SPG膜乳化法で調製した粒子の外表面修飾を行い、これらによるCECを予備的に行った。表面修飾を行うモノマーとして、安息香酸ビニルを用いた充てん剤での下記条件でのアルキルベンゼンの理論段数は約25000段程度であった。(図2)

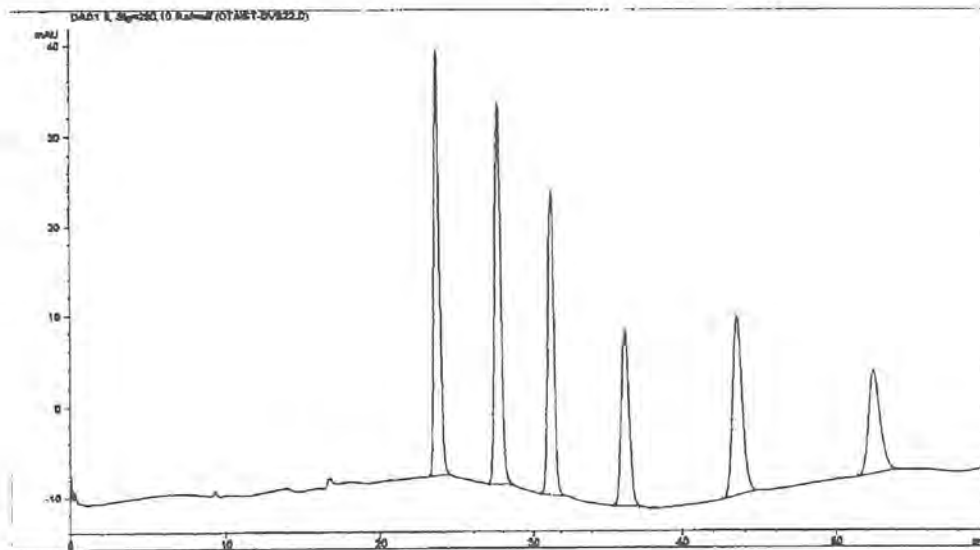


図2. アルキルベンゼンの分離クロマトグラム

カラムサイズ: 100 μm ID X 300 mm, 移動相: アセトニトリル: Tris-HCl 50 mM (pH = 8) = 90:10,
印加電圧: 30 kV, カラム両端に 8 bar の加圧、測定温度: 20 度、検出: 200 nm.



キャピラリーエレクトロクロマトグラフィーによる 光学異性体の分離

三上 千明*、大塚 浩二、寺部 茂
姫路工業大学理学部

Enantiomer Separation by Capillary Electrochromatography

Chiharu Mikami*, Koji Otsuka, Shigeru Terabe

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

ABSTRACT

Enantiomer separation by capillary electrochromatography (CEC) using a packed capillary was investigated. A packing material used was a Daicel OD-type chiral packing ($5\ \mu\text{m}$) originally designed for the use in HPLC. By using acidic and basic aqueous acetonitrile solutions as mobile phases, some neutral and basic racemic compounds were optically resolved. The separation efficiency in this CEC system was superior to that obtained in HPLC using Chiralcel packings. Typically, the plate height obtained varied from 8 to $12\ \mu\text{m}$.

1、はじめに

医薬品等に含まれる光学活性薬物の各エナンチオマーは、それぞれが異なる体内動態や薬理作用をもつことが多く、光学異性体の高性能分離分析法の開発は、医薬品の分析に必須である。近年、キャピラリー電気泳動 (CE) の新しい分離モードとして、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) より高い分離能をもち、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) 等よりも比較的分離条件選択が容易であると考えられているキャピラリーエレクトロクロマトグラフィー (CEC) が注目されているが、CECによる光学異性体の分離における分離条件の検討や利点についての報告は十分になされていなかった。そこで本実験では、HPLC用キラル充填剤をCECに適用して光学異性体の分離を試み、分離条件の最適化とCECの利点について検討した。

2、実験

装置はHP 3Dキャピラリー電気泳動システム (Hewlett-Packard社) を使用した。CEC用カラムには、ODタイプ充填剤 (粒径 $5\ \mu\text{m}$ 、ダイセル社製: Fig. 1) をフューズドシリカキャピラリー (全長33 cm, 内径 $100\ \mu\text{m}$, 有効長24 cm) に充填したものをを用いた。充填には2-プロパノールを分散溶媒に、アセトニトリルを加圧溶媒に用い、HPLC用ポンプによって420 barに加圧して行った。移動相には10 mM Na_2HPO_4 水溶液-アセトニトリル (30:70) あるいは、50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 4.0)-アセトニトリル (30:70) を用いた。試料注入は電氣的注入法で行った。印加電圧は25 kVで、キャピラリーの両端間に圧力 (8 bar) をかけて測定を行った。

3、結果および考察

CECにおける電気浸透流 (EOF) は、キャピラリー内壁と充填剤表面上の電荷に大きく左右される。EOFを安定させるためには、充填剤をキャピラリー内に均一に充填し安定させることが重要である。高圧力で充填されなかったカラムを実験に使用すると、測定を行っているあいだにキャピラリー内で充填剤が密な部分と疎な部分が生じ、EOFが安定しなくなる問題が生じた。このような現象を防ぐために、400 bar以上で充填を行う必要があった。ラセミ体であるピンドロール、プロプラノロール、4-フェニル-2-ブタノール、ワルファリン、ベンゾイン、インダパミド、ベラパミール、3-フェニル酪酸、イブプロフェンなどの光学分割を試みた。移動相に10 mM Na₂HPO₄水溶液-アセトニトリル (30:70) を用いた場合、ピンドロール、4-フェニル-2-ブタノール、ワルファリン、ベンゾイン、インダパミドの分割が可能であり、ベラパミールは分離が不十分であった。HPLC用カラム CHIRALCEL OD-Rの理論段数は5000~6000 (理論段高さ25 μm~30 μm) であるのに対し、CECでは20000~30000 (理論段高さ8 μm~12 μm) が得られ、またCECではHPLCより迅速な光学分割が達成された。Fig. 2にベンゾインの光学分割例を示す。移動相に50 mM リン酸塩緩衝液 (pH 4.0) -アセトニトリル (30:70) を用いた場合、プロプラノロールに分離の兆しが見られたが、3-フェニル酪酸、イブプロフェンは分割されず、他の試料においても明らかな改善はされなかった。本充填剤を用いるCECは、主に中性および塩基性光学異性体の分離に対して有効であることが明らかとなった。現在、引き続き酸性試料の光学分割に対する分離条件の最適化を検討しており、その結果についても報告する予定である。

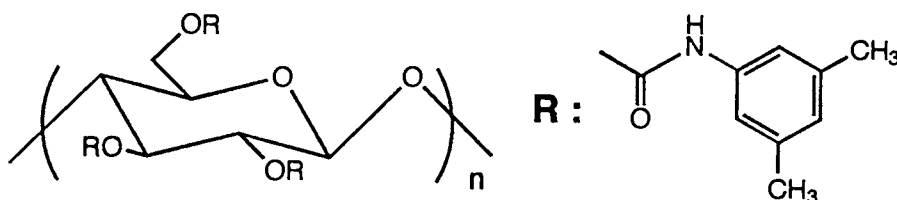


Fig. 1 OD-type chiral packing

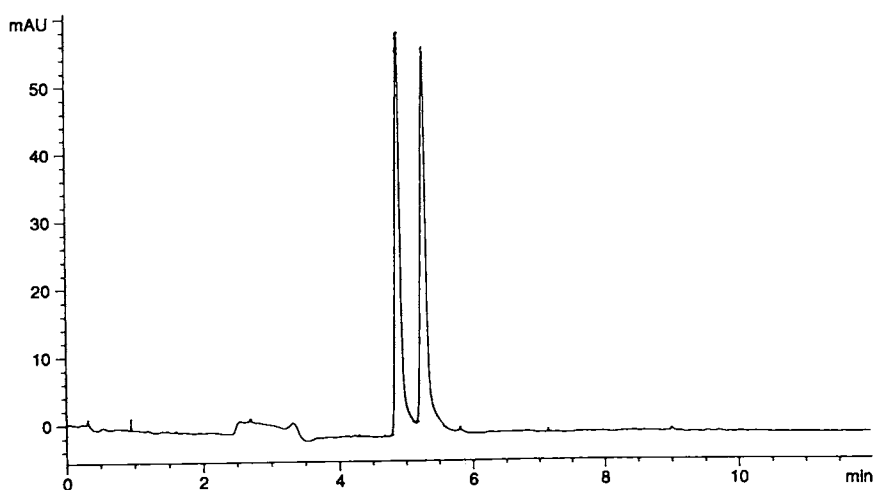


Fig. 2 chiral separation of benzoin by CEC



キャピラリー電気泳動の単相性とその利点

本田 進

近畿大学薬学部

Single Phase Property of Capillary Electrophoresis and Its Advantages

Susumu Honda

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Abstract Capillary electrophoresis has an inherent advantage that it can be performed in free solution. Intelligent use of this advantage allows highly reliable identification of sample ingredients by multiple mode analysis using relative mobility as a migration index, studies of micro scale chemical reactions including in-capillary derivatization, and observation of physical interaction between substances using minute amounts. This paper summarizes recent advancement of this rather hidden aspect of capillary electrophoresis.

1. はじめに

分離分析の中心をなす各種クロマトグラフィーにおいては、固定相と移動相の2相間における物質の分布の違いを利用して分離が行われる。また、電気泳動においても多くの方式では膜やゲルなどの支持体の中で分離が行われるので、分離のメカニズムこそ違うもののやはり2相分離とすることができる。これに対してキャピラリー電気泳動(CE)においては通常泳動液というただ一つの液相の中で分離が行われる。

キャピラリー電気泳動が高い分離能をもつ、適用範囲の広い分離分析法であることは周知のとおりであるが、多くの研究者が高分離に目を向けるあまり、この「単相性」という特長について考え深く論議することは少なく、CEの単なる付加価値としか受け止めていない傾向がある。そこで、本講演においてはこの問題について種々の角度から考察を加え、これらの特長を生かした分析について考えてみたい。

2. 分離指標の再現性に関する考察と多モード分析への展開

HPLCでは分離された試料の成分を圧力流で移動させるが、最近ではポンプの性能が向上し流速がかなり厳密に制御されているため溶出時間の再現性は比較的高い。CEでは成分の移動には電気浸透流(electroosmotic flow, EOF)が利用されるが、EOFはキャピラリー内壁の状態により変動しやすいため、移動時間も再現性が低い。しかし、CEにおける移動指標についてはもっと本質的な考察が必要である。

CEは上述のように均一相で行われるため、他の分離分析法におけるように固相による影響をうけることがない。したがって溶質の移動は、泳動液の物性と泳動液成分/試料成分間の相互作用のみによって決定される。移動時間 t は $QL\eta/[\epsilon V\{\xi_1 - 2/3f(\kappa_a)\xi_2\}]^{-1}$ {ただし、 Q : キャピラリー有効長、 L : キャピラリー全長、 η : 泳動液の粘性率、 ϵ : 泳動液の誘電率、 V : 印加電圧、 ξ_1 : キャピラリー内壁/泳動液間の電

位差、 ξ_2 : 成分イオン/泳動液間の電位差、 $f(\kappa_a)$: 成分イオンのサイズに関する Henry の補正式} で表わされるが、キャピラリーの内壁状態を表わす ξ_1 は、 η 、 ξ_2 、 $f(\kappa_a)$ 、 ε および V に比べてはるかに大きい変動を示す。測定と測定の間のキャピラリーの洗浄を注意深く行えば、不純物をほとんど含まない試料を用いる場合は、変動はかなり抑えられる。しかし、測定間の時間が長い場合(日間再現性等)や生体試料などキャピラリー壁への吸着が著しい場合には、 ξ_1 の変動を抑えることは難しい。このため移動時間 t を移動指標として用いる限り、移動の時間再現性の向上が望めないことは当然である。再現性を向上させるために考えられる一つの指標は、標準物質に対する移動時間 t の比 [相対移動時間 ; $t_{rel} = \{ \xi_1 - 2/3 f(\kappa_a)_{ref} (\xi_2)_{ref} \} \cdot \{ \xi_1 - 2/3 f(\kappa_a) (\xi_2) \}^{-1}$] である。この方法は、実用的には、かなりよく補正できる場合がある。しかし、式の中に ξ_1 を含むので、変動要因の除去という意味での根本的な解決にはなっていない。

これに対して電気泳動移動度(以下移動度と略記; $\mu_{ep} = 2/3 \varepsilon f(\kappa_a) \xi_2 \eta^{-1}$ は、式の中に ξ_1 を含んでいないため、理論的に再現性の改善が望める。 μ_{ep} は $Q(t - t_{e0})V^{-1} \cdot t^{-1} \cdot t_{e0}^{-1}$ により求めることができ、浸透流と同じ速度で泳動される中性物質を浸透流マーカーとして添加して電気浸透流移動時間 t_{e0} を測定することにより求めることができる。しかし、 t と t_{e0} が近いときには、相対標準偏差 (RSD) が大きくなる。この短所を補い、さらに相対誤差を小さくするためには、中性の浸透流基準物質のほか、さらに標準物質を添加し、相対移動度 $(\mu_{ep})_{rel}$ を求めて移動指標とするのが一つの解決策となる。 $(\mu_{ep})_{rel}$ は $f(\kappa_a) / f(\kappa_a)_{rel} \cdot \xi_2 / (\xi_2)_{rel}$ で表わされ次元をもたない相対値である。また、相対電気泳動時間 $\{ (t_{ep})_{rel} \}$ は μ_{ep} の逆数であり同様に次元をもたず再現性の高い値を示す。これらの指標の測定においては、標準物質の選択については十分注意しなければならない。相対移動度は $t_{ref}/t \cdot (t - t_{e0}) / (t_{ref} - t_{e0})$ として求めることができるが、分母に $(t_{ref} - t_{e0})$ という項を含む。 t_{ref} が t_{e0} に近いと、補正するつもりが却って大きな誤差を与えることになる。また、 t と t_{ref} が離れた値であるよりも、比較的近い値である場合の方が $(\mu_{ep})_{rel}$ が極端に大きくなったり小さくせず補正が有効となる。つまり、標準物質としては、絶対移動度が大きく、成分イオンと近い移動度のものが最も有効であるということである。

著者らは5種の成分をこのような条件でゾーン電気泳動により20回繰り返し分析したときの移動時間の再現性を調べたところ、RSDは0.35~1.93で、移動時間が長くなるほど大きかった¹⁾。これらの値はHPLCなどの従来法における値に比べてかなり大きい。一方、この結果を基にして相対移動度、相対電気泳動時間のRSDを算出したところ、いずれも1%以内の小さい値となり、これらの補正值は高い再現性を与えた。特に標準物質の移動時間が試料成分の移動時間に近い場合は、RSDは0.2%前後の低値を与えた。このように、相対移動度または相対電気泳動時間を用いれば、再現性は他法と比べて遜色ないばかりか、むしろ高なることがわかる。RSDが0.1%程度であれば、標品を用いずに、データベースのみの比較を行っても、隣接ピークと誤まって同定する可能性はきわめて低くなると考えられる。

CEの単相性をもっと積極的に利用することを考えるならば、多モード分析という考えに至るであろう²⁾。HPLCにおいて多モード分析を行おうとする場合は、モードの数だけカラムを用意しそれぞれに対する溶離液を考えなければならないが、CEでは同様のことを同じキャピラリーを用いて泳動液を次々に交換するだけで達成することができる。多くの市販装置では自動試料採取機構を備えているため、この操作はきわめて手軽に行うことができる。しかも、上述のような指標を用いるならば、各モードについて高い再現性が保証されているのであるから、信頼性の高い無標品同定も可能になると思われる。

CEにおいてはすでに多数の分離モードが開発されている。例えば演者らの研究室においては糖鎖誘導体の分離モードとして、単純ゾーン電気泳動^{3,4)}、鎖体形成を伴うゾーン電気泳動⁵⁻⁷⁾、ミセル動電クロマトグラフ

ィー⁶⁾、イオン相互作用動電クロマトグラフィー⁸⁾、アフィニティー電気泳動、エンタングルトポリマーによるサイズ排除電気泳動、水素結合電気泳動⁹⁾などの分離モードが開発されている。これらを組み合わせて多モード分析を行うならば、信頼性の高い高度な同定が約束されるであろう。

3. キャピラリー内での誘導体化

内径の細いキャピラリー内に満たされた泳動液中では、物質が急速に拡散せず適度の速さで拡散するため、キャピラリー内の一角を密閉系とみなすことができるので、これを小さな反応容器に見立てこの中で化学反応を行わせ、生成物を直ちにまたは同時に一斉分析することが可能である。この原理に基づく in-capillary 誘導体化は CE の大きな魅力の一つである。

この場合キャピラリー内のどの部位で反応を行うかにより、(田)キャピラリー入り口、(月)キャピラリー中央、(火)キャピラリー全体の3つの型が考えられる。それぞれによる方法を at-inlet 法、zone-passing 法、および throughou-tpapillary 法と呼ぶことにし、以下にそれぞれの方法の特徴を簡潔に述べる。

At-inlet 法は、キャピラリー入り口で試料溶液と試薬溶液を層積し分子拡散を利用して試料成分と試薬を反応させ、生成物を直ちに CE により分析する方法である。試料溶液および試薬溶液の層積にはタンデムモードとサンドウィッチモードがあるが、事情が許すならば後者の方が効率がよい。反応速度の速い系が有利であることは当然のことであり、例えばアミノ酸を α -phthalaldehyde(OPA) により誘導体化する系では pre-capillary 誘導体化とほぼ同等の反応率と再現性が得られた¹⁰⁾。この方法を自動試料採取機構と結びつけば自動分析が可能になる点は、大いに注目されるべきである。

Zone-passing 法は、キャピラリー内に試料溶液ゾーンと試薬溶液ゾーンを形成させ、電圧を印加して試料成分と試薬を移動・接触させ、試料成分を誘導体化すると同時に生成した誘導体を分析する方法である。試料と試薬の移動方向と移動速度の違いにより、導入口および導入順序を考えなければならない。また、追い越し型と衝突型の両者がある。演者らはアミノ酸を OPA により誘導体化する系について検討したところ、再現性は高いものの at-inlet 法に及ばなかった¹¹⁾。この方法では概して反応時間が短いため、at-inlet 法に比べて反応率が低く、定量限界が高くなるという欠点があった。しかし、反応速度論の研究には好適であり、高速反応をも対象にできるという利点が示された。

Throughout-capillary 法は試薬含有泳動液に試料溶液を導入し電圧を印加するという操作により、試料成分を泳動させながら誘導体化し、誘導体を分析する方法であり、種々の角度から取り上げられ利用されてきた。演者らも低分子間的高速反応系¹²⁾および高分子の関わる低速反応系¹³⁾について検討し、いずれにおいてもこの方法の有用性を明らかにすることができた。前者においては、副生成物の同時分析ができる反面多数成分の同時分析には若干の問題があることが示された。また、後者においては酵素反応系を検討したが、高濃度の酵素含有泳動液を用いれば反応を完結させ生成物を分析することは容易であり、これにより迅速簡易酵素活性測定が可能であった。しかし、ベースラインが高くなり、定量範囲が狭くなるという欠点があった。

In-capillary 誘導体化においては、いずれの方法についても微小体積試料を用いて微量成分を短時間に簡便な操作により分析することができ、また化学反応や酵素反応の反応速度を簡便に測定することができるため、反応機構の解明等に対しても大きな武器となるであろう。これらの特長は、他の分析法にはない CE 独特のものである。

4. 物質間相互作用の観察

均一な電位勾配のもとで行う CE において最も単純な分離モードはゾーン電気泳動であるが、泳動液に試料成分と相互作用する物質を添加しておけば、試料成分はこの添加物と相互作用しながらゾーン電気泳動により移動する。2 で述べた種々の分離モードにおいても、何らかの物質が泳動液に添加されているので、それらの添加物と試料成分との間に相互作用があり、その程度の違いが分離に影響を与える。また、それらの系において試料成分と添加物の相互作用の機構を研究することも大切である。

ところで2.において述べたモードの中で、アフィニティー電気泳動モードは生体成分間の相互作用に基づく分離を問題にするモードであるため、特に興味もたれる。何故ならば生体内では種々の生体成分が互いに結合し合い、その結合が引き金になって種々の重要な生命現象が起こると考えられるが、CE はそのような相互作用を分子レベルで観察できる、有力な方法であるといえる。演者らはそのような相互作用の中で特に糖鎖とタンパク質の間の相互作用に焦点を絞り、基礎研究を行った。

CE により糖鎖-タンパク質相互作用を観察する場合、泳動液にそれらのいずれかを添加し、他方を試料としてキャピラリー入り口から導入し、その移動挙動が添加された物質によりどのような影響を受けるかを観察することにより、結合の程度を推定することになる。演者らは、タンパク質または糖鎖リガンドの移動時間のずれを正確に測定し、添加された相手方物質の濃度との関係を利用して結合定数を測定する巧妙な方法を開発し¹⁴⁾、その方法により種々のタンパク質について糖鎖構造-タンパク質結合性相関を調べる研究を進めている。CE においては生体内と類似した条件をつくるのが容易であるため、この方法は生体内の相互作用を探るには適していると考えられる。

なお、このような研究を推進する過程で、キャピラリー内壁へのタンパク質の吸着の問題に遭遇したが、これはキャピラリーの被覆技術の向上によりほぼ解決した。また、電荷をもたない中性糖鎖の取扱いについても工夫が必要であったが、この問題は dithioacetal 法による酸性糖への定量的誘導体化または競合的結合法を開発することにより解消された。

5. 文献

- ¹⁾本田進、笹岡功、柴田史子、多賀淳: 第16回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, p. 2-1~2-2 (1996); 本田進: CE アドバンス (大塚電子), 1, 6-11 (1997). ²⁾Shigeo Suzuki, Kazuaki Kakehi, and Susumu Honda: *Anal. Biochem.*, 205, 227-236 (1992). ³⁾S. Honda, *J. Chromatogr.*, 720, 377 (1996). ⁴⁾Susumu Honda, Kazutaka Togashi, and Atsushi Taga: *J. Chromatogr.*, in press. ⁵⁾Susumu Honda, Shigefumi Iwase, Akiko Makino, and Shigeru Fujiwara: *Anal. Biochem.*, 176, 72-77 (1989). ⁶⁾Susumu Honda, Shigeo Suzuki, Akemi Nose, Keiko Yamamoto, and Kazuaki Kakehi: *Carbohydr. Res.*, 215, 193-198 (1991). ⁷⁾Susumu Honda, Keiko Yamamoto, Shigeo Suzuki, Minako Ueda, and Kazuaki Kakehi: *J. Chromatogr.*, 588, 327-333 (1991). ⁸⁾Susumu Honda, Kazutaka Togashi, Kana Uegaki, and Atsushi Taga: *J. Chromatogr. A*, submitted (1997). ⁹⁾Susumu Honda, Atsushi Taga, Masumi Kotani, and Edward R. Grover: *J. Chromatogr.*, in press. ¹⁰⁾Atsushi Taga and Susumu Honda: *J. Chromatogr.*, 742, 243-250 (1996). ¹¹⁾Atsushi Taga, Mayumi Sugimura, and Susumu Honda: *J. Chromatogr.*, submitted (1997). ¹²⁾多賀淳、西野晶、本田進: 本シリーズ第3報. ¹³⁾多賀淳、本田進: 本シリーズ第5報. ¹⁴⁾Susumu Honda, Atsushi Taga, Kenji Suzuki, Shigeo Suzuki, and Kazuaki Kakehi: *J. Chromatogr.*, 597, 377-382 (1992).



プロトンをターミナルイオンとする 等速電気泳動法における希土類イオンの回収率

(広島大工) 森脇 俊貴*、育田 夏樹、西山 文隆、廣川 健

Recovery of rare-earth ions in isotachopheresis using protons as the terminator

Toshiki Moriwaki*, Natsuki Ikuta, Fumitaka Nishiyama and Takeshi Hirokawa
Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University.

The leading electrolyte system for the separation of fifteen rare-earth (REE) ions was optimized considering both the separability and the recovery. According to accurate analysis of some test mixtures of REEs by ITP-PIXE, complete recovery required electrolyte conditions as follows: The pH of optimum leading electrolyte (pH=5.3) was larger than the previous value (4.8) and the concentration of α -hydroxyisobutyric (5.5mM) and malonic acid (1.0mM) was lower than the previous values (7.5mM and 2mM, respectively). This observation was in good agreement with estimation from computer simulations of effective mobilities of REEs.

1. 緒言

我々は15種希土類イオンを一斉分離する電解液(α -ヒドロキシイソ酪酸(HIBA)系電解液にマロン酸を補助錯形成剤として添加し、2-エチル-n-酪酸でpH=4.8に調整)を開発し、鉱石試料などの実試料の分析に供している[1]。高精度の定量分析を行うには高い分離能だけでなく高い回収率の電解液を開発する必要があるが、通常分離に重点が置かれ、回収率については十分に検討されていない。これは、実効移動度がリーディングとターミナルイオンの中間の値をとる試料イオンについては、回収率が100%と見なされている事、回収率の実験的確認には他法による分析を要する事による。

回収率を十分に満たすには、希土類イオンの実効移動度を大きくしてターミナルの実効移動度を小さくすることが重要である。そこで本研究では希土類イオンの分離、分取時の回収率の両面からリーディング電解液条件の最適化を行うことを目的とし、実験とシミュレーションの両面から検討した。

2. 実験

等速電気泳動装置としてはLABECOのZKI-001型等速電気泳動装置の分離ユニットと高周波非接触電導度検出器(HFCCD)を組み合わせて使用した。泳動電流は40 μ Aである。ブランクの電気量は0.12Cである。また、分取実験にはHFCCDを備え付けた自作の等速電気泳動分取装置を使用した。ブランク泳動での電気量は1.2Cである。15種希土類イオンの等モル(0.33mM)混合試料、La, Eu, Lu等モル(1.0mM)混合試料は塩化物から調整した。また、使用した電解液についてはTable 1に示す。

Table 1. The electrolyte system for ITP-PIXE

Leading electrolyte :20mM ammonia solution .pH buffer :2-Ethyl-n-butyric acid (4.8~5.3).
Complexing agent :5.5~7.5mM α -HIBA.
Additional complexing agent . Malonic acid:0.5~1.0mM .Additive:0.1% Hydroxypropylcellulose.
Terminating electrolyte:20mM Carnitine hydrochloride.Additive:0.1% Hydroxypropylcellulose.

3,結果と考察

本電解液システムのターミナルイオンはプロトンであるので、試料との移動度差を持たせ回収率を向上させるにはリーディング電解液のpHを上げる必要がある。Fig.1にシミュレーションによるY,Dy,Ho,Erの R_E 値のHIBA濃度およびpH依存性を示す。pH=4.8~5.3までは α -HIBAの濃度が増大するにつれて各成分間の R_E 値の差は大きくなっていくが、pH=5.4以上では R_E 値の差が減少し、分離不十分となる。このことからpH=5.3までがpH条件の限界であることがいえる。また、 α -HIBAの濃度は5mM以下になると各成分間の R_E 値の差がほとんどなくなるので、5.5~7.5mMまでの濃度が適当な濃度と判断した。また、従来15種希土類イオンを一斉分離するのにマロン酸の濃度は2.0mMを選択しており、各成分が分離されていたが、この条件下では重希土類成分の回収率が100%にならないため、今回はマロン酸の濃度を1.0~0.5mMを選択した。その結果、pHを上げ、それぞれの錯形成剤の濃度を下げることによってLuはほぼ完全に回収した。代表的な結果をFig.2に示す。

これらの結果から、15種希土類イオンの一斉分離において従来報告した電解液条件[1]では重希土において回収率に多少問題がある事、この点を改善するには多少分離能に犠牲を払い、今回開発した回収率が100%である電解液条件(従来よりpHが少し高く、錯形成剤濃度が小さい)を使用する方が望ましいことがわかった。講演では、その応用例として極微量希土類鉱石の分析結果について今回開発した電解液条件を使用した結果について報告する。

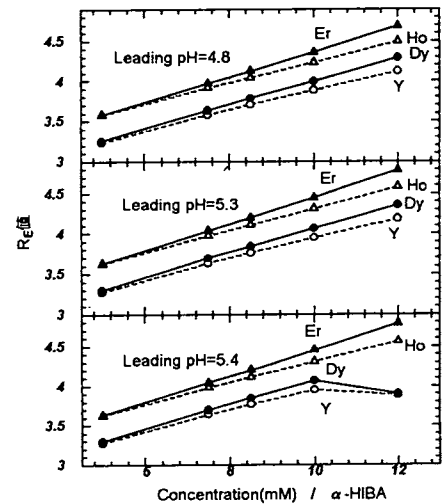


Fig.1 Simulated R_E values varying concentration of α -HIBA and pH of the leading electrolyte.

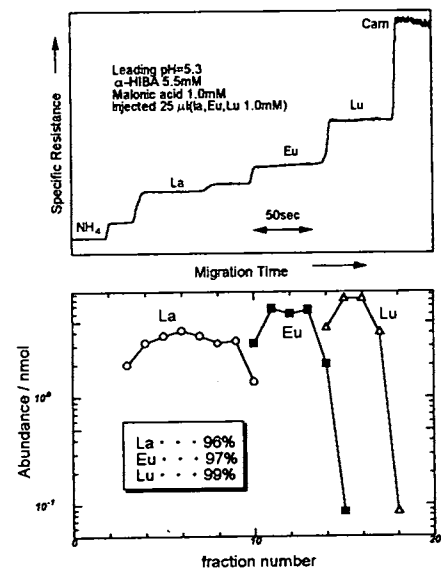
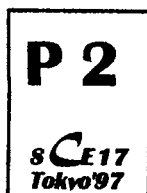


Fig.2 Result of ITP-PIXE for a test mixture of La, Eu and Lu.

[1]T. Hirokawa and Y. Hashimoto, J. Chromatogr. A, 772(1997)357-367.



ポリエチレングリコールなどの非イオン系錯形成剤を用いた 20種金属イオンの等速電気泳動分離挙動

(広島大学工学部) 藤沢 宏*、育田 夏樹、西山 文隆、廣川 健

Isotachophoretic separation behavior of twenty kinds of metal ions using nonionic complexing agents such as polyethylenglycols

Hiroshi Fujisawa*, Natsuki Ikuta, Nishiyama Fumitaka and Takeshi Hirokawa
Faculty of Engineering, Hiroshima University

Isotachophoretic separation behaviors of twenty kinds of metal ions were investigated using polyethylenglycol(MW=4000) as a non-ionic complexing agent. The used leading electrolytes was 20mM ammonia solution buffered by 40mM acetic acid containing 15w% and 30w% of PEG. Separation behaviour of twenty kinds of metal ions consisted of alkali metal, alkali-earth metal, transition metal and rare-earth metal were investigated by ITP-PIXE. Considerable change of the separation order was observed for alkali metal ions.

1.緒言

これまで我々の研究室では等速電気泳動法によって様々な電解液条件での金属イオンの分離・分析を行い、主として α -ヒドロキシイソ酪酸(HIBA)、マロン酸などのイオン性錯形成剤を用いた分離システムを開発してきた。しかしこれらのイオン性錯形成剤は特に低pHにおいては、試料との相互作用が弱くなり分離が不十分となる。そこで低pHで有効での有効性およびイオン性錯形成剤と異なる分離挙動を期待して、非イオン性錯形成剤としてポリエチレングリコール(以下 PEG)を用いた電解液を開発し、20種金属イオンの分離挙動を検討した。

2.実験

リーディング電解液としてアンモニア 20mM、酢酸 40mM、PEG 平均分子量 4000 (15w%、30w%) を含む水溶液を、ターミナル電解液としては塩酸 20mM を使用した。試料として金属 20 種混合試料 (イオン種 Li, Na, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Sr, Y, Zr, Cd, Ba, La, Ce, Gd, Lu, Pb) を用いて実験を行った。分離挙動の評価には等速電気泳動分離したフラクションを PIXE 分析する方法 (ITP-PIXE 法) を使用した。

3.結果と考察

Fig.1 に PEG を添加していない酢酸系の電解液でのフェログラムと PIXE 分析結果を示

す。アルカリ土類金属のバリウムが先頭を泳動していて、その後にストロンチウム、カルシウムと続いている。また Mn、Co、Fe や Y、Cd などが混合している。次に Fig.2 に PEG 濃度が 15wt% の電解液条件でのフェログラムと PIXE 分析結果を、Fig.3 に PEG 濃度が 30wt% の電解液条件でのフェログラムと PIXE 分析結果を示す。PEG の効果はアルカリ土類金属に強く現れた。特にこの効果はバリウムに顕著に見られ、PEG の濃度が増加するにつれ移動度が相対的に小さくなっていき、カルシウムとストロンチウムについても移動度が逆転した。希土類元素に関しては PEG の濃度が増加すると移動度差が小さくなり分離が困難となった。また鉄とジルコニウムは等速電気泳動の分離ゾーン中には検出されず、ターミナル電解液中をゾーン電気泳動しているものと思われる。非イオン性錯形成剤を用いた電解液はイオン性錯形成剤を用いた電解液に比べて特定のイオンに特に効果があることが確認できた。講演では、他の非イオン性錯形成剤を用いた系による結果についても議論する。

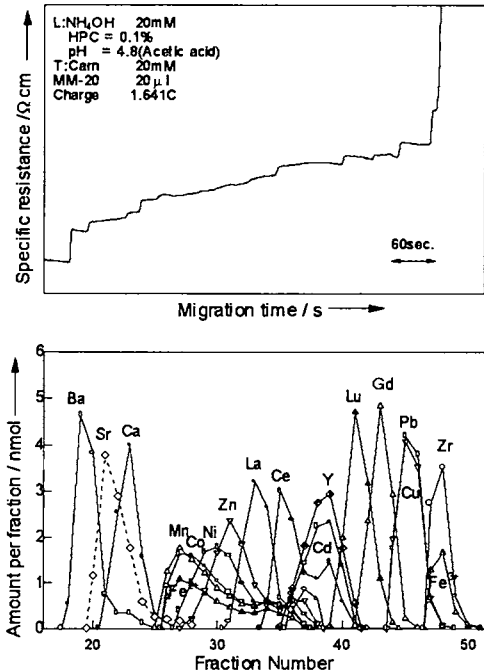


Fig.1 Electropherogram of twenty kinds of metals in acetic acid system

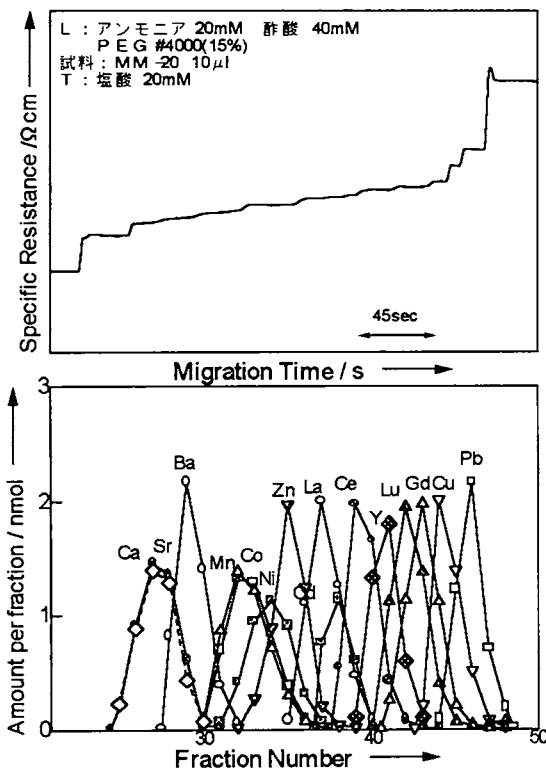


Fig.2 Electropherogram of twenty kinds of metals in PEG 15wt% system

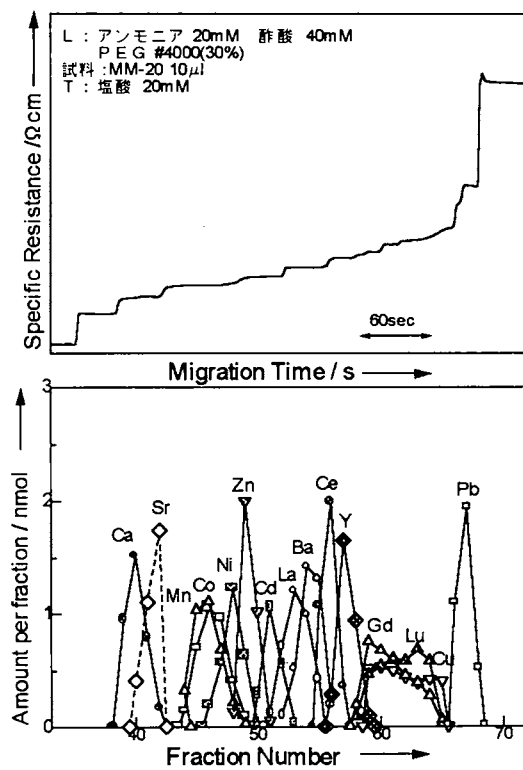
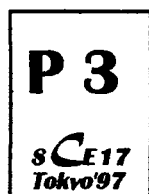


Fig.3 Electropherogram of twenty kinds of metals in PEG 30wt% system



キャピラリー等速電気泳動法による有機スズ化合物の分離挙動

- 1) 鷺島克啓*, 福士恵一, 2) 齊藤恵逸, 3) 竹田さほり, 脇田慎一,
東 国茂, 4) 日色和夫
1) 神戸商船大学船貨輸送研究施設, 2) 神戸大学発達科学部,
3) 大阪工業技術研究所, 4) 神戸女子短期大学

Separation Characteristics of Organotin Compounds by Capillary Isotachopheresis

- 1) Katsunori Sagishima*, Keiichi Fukushi, 2) Keiitsu Saito, 3) Sahori Takeda, Shin-ichi Wakida, Kunishige Higashi and 4) Kazuo Hihiro
1) Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine,
2) Faculty of Human Development, Kobe University, 3) Osaka National Research Institute, AIST, 4) Kobe Women's Junior College

Abstract

The separation characteristics of organotin compounds such as dimethyltin dichloride (DMT), dibutyltin dichloride (DBT), tributyltin chloride (TBT) and triphenyltin chloride (TPhT) were studied using capillary isotachopheresis (CITP). A mixed solution of 10 mM potassium hydroxide solution containing 0.1 % Triton X-100 and appropriate amount of acetone was used as a leading electrolyte. The pH of the potassium hydroxide solution was adjusted to 4.0-5.5 with glutamic acid. The acetone concentration in the leading electrolyte was varied in the range 0-70 %. The terminating electrolyte was 10 mM betaine hydrochloride solution. The organotin compounds, except for DBT, were separated using the leading electrolyte adjusted to pH 5.0 or 5.5 containing 50 % acetone, alternatively pH 4.0 with 70 % acetone could be used. Investigations of a variety of leading, counter and terminating ions, pH of the leading electrolyte and types and composition of organic solvents, are in progress. Also a study to determine if quantitative measurements can be performed are required.

1. はじめに

有機スズ化合物は船底塗料中の防汚剤, プラスティックの可塑剤, 殺菌剤, 殺虫剤などとして広く用いられてきた。これら有機スズ化合物は, 使用禁止あるいは使用が制限されてきたにもかかわらず, 依然としてこれらによる海底堆積物などの汚染が続いている。有機スズ化合物は毒性が強いため, 環境試料や生体試料中のそれらを分析する必要性が高い。一般に, これら試料中の有機スズ化合物は, 適当な方法で抽出後, GC,

HPLC などにより分離され、各種検出器で定量されている。最近、CE による各種有機スルホ化合物の分離例が報告されているが、ほとんどの有機スルホ化合物は、UV 吸収や蛍光強度が弱いため、間接吸光法¹⁾や間接蛍光法²⁾により検出されている。これに対して CITP では一般に電位勾配検出器が用いられているため、イオン性成分ならほとんどすべて直接検出可能である。またこれまで CITP による有機スルホ化合物の分離例はほとんどない。そこで本研究では、有機スルホ化合物としてジメチルスルホ (DMT), ジブチルスルホ (DBT), トリブチルスルホ (TBT), トリフェニルスルホ (TPhT) を選び、CITP によりこれら有機スルホ化合物の分離挙動について検討したので報告する。

2. 実験

装置は島津キャピラリー等速電気泳動装置 IP-2A 型を使用した。キャピラリーは内径 1.0 mm, 長さ 4 cm の PTFE 製チューブに、内径 0.5 mm, 長さ 15 cm の FEP 製チューブを接続したものである。検出器は電位勾配検出器を用いた。リーディング電解液は、0.1 % トリトン X-100 を含む 10 mM 水酸化カリウム溶液の pH をグルタミン酸で調整した溶液とアセトンとの混合溶液である。ターミナル電解液は、10 mM ベータイン塩酸塩である。有機スルホ化合物標準溶液はすべてメタノールを用いて調製した。リーディング電解液の pH を 4.0 ~ 5.5 と変化させ、あるいはリーディング電解液中のアセトンの量を 0 ~ 70 % と変化させ、有機スルホ化合物の R_E 値を求めた。また DMT, TBT, TPhT の混合溶液を分析し、それらの分離について検討した。

3. 結果と考察

DMT 及び TBT の R_E 値は、pH 4.0 ~ 5.5 ではほぼ一定であった。これに対して TPhT 及びターミナルイオンの R_E 値は、pH 5.0 までは pH の増加とともに増大したが、それ以上ではほぼ一定であった。また、DMT, TBT, TPhT 及びターミナルイオンの R_E 値は、アセトン添加量の増加とともに 50 % までは増大したが、それ以上では減少する傾向があった。アセトンを含まない場合は、DMT 以外は検出できなかった。なお DBT は、いずれの条件においても検出できなかった。さらに pH を 5.0 あるいは 5.5 に調整し、アセトンを 50 % 含むリーディング電解液、または pH を 4.0 に調整し、アセトンを 70 % 含むリーディング電解液を用いれば、DMT, TBT, TPhT が分離できることがわかった。Fig. 1 にイソタコフェログラムの一例を示す。リーディングイオン、カウンターイオン、ターミナルイオンの種類、リーディング電解液の pH、リーディング電解液に添加する有機溶媒の種類と量などの影響及び本法の定量性については、現在検討中である。

4. 文献

- 1) F. Han, J. L. Fasching and P. R. Brown, J. Chromatogr. B, 669 (1995) 103.
- 2) E. Pobozy, B. Glód, J. Kaniewska and M. Trojanowicz, J. Chromatogr. A, 718 (1995), 329.
- 3) Y. -T. Lee and C. -W. Whang, J. Chromatogr. A, 746 (1996), 269.

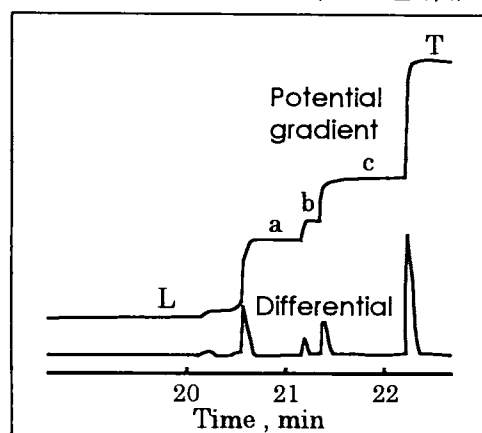


Fig1. Isotachopherogram for the separation of tributyltin, dimethyltin and triphenyltin cations. L= Leading ion; a = TBT; b= DMT; c=TPhT; T = Terminating ion.



Tween 20 / C T A C 混合ミセル系を用いた有機陰イオンの分離

1) 江坂幸宏*, 後藤正志, 2) 加納健司

1) 岐阜薬科大学, 2) 京大院農, 応用生命

MEKC Separation of Hydrophobic Anions using Tween 20/CTAC mixed micellar system

1)Yukihiko Esaka*, Masashi Goto, 2)Kenji Kano

1)Gifu Pharmaceutical University, 2)Division of Applied Life Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University.

In separation of organic anions with cationic CTAC based MEKC, addition of Tween 20 to the micellar system enables us to improve separation because of reduction of the interaction between CTAC and these anions to moderate level in strength.

1. はじめに

疑似固定相のミセルが逆相クロマトグラフィーの固定相と大きく異なることの一つは、表面に電荷を持つことである。この電荷の影響は、当然のことながら荷電粒子の分配に際して顕著に現れる。MEKCにおける、試料-ミセル間イオン性相互作用の泳動挙動への影響は早くから指摘されてきた。特に試料とミセルが反対電荷を有する場合は圧倒的な取り込みが生じ、結果として分離が損なわれたり分析時間が長くなりすぎ、問題児として認識されることが多かった。

しかし、分離選択性を高める意味からは、分離をコントロールするファクターとしてのイオン性相互作用は貴重である。実際、疎水性の高くない無機イオンの MEKC 分離にはイオン性相互作用が有用であることが報告されている。問題は、疎水性相互作用、イオン性相互作用などの試料-ミセル間の相互作用の総計が大きくなりすぎることにある。具体的には、ある程度高い疎水性を有する有機イオンが分離対象である場合に問題となる。この相互作用の総計を MEKC に利用するのに適度な大きさまで調節することができれば、イオン性相互作用の活用が可能になり、イオン性物質を対象にした新たな分離様式を提供できる。

イオン性相互作用の抑制は pH の調節による試料の解離の調整（電荷の調整）によって行うことができる。これに対して我々はミセルを修飾することで相互作用の調節を行うことを考え、前回、陰イオン性の SDS に中性で親水基にポリエーテル構造を有する Tween 20 を混合した系を用い、有機陽イオンの分離が効果的にコントロールできることを示した。今回、陽イオン性のセチルトリメチルアンモニウムクロリド(CTAC)と Tween 20 の混合系を用いて、この手法の有機陰イオンの分離への応用を試みたので報告する。

2. 実験

装置：CE装置は、CE-800 (日本分光) を用いた。分離キャピラリーは、内径 0.05mm 外径 0.375 mm (GL Science) のヒューズドシリカキャピラリーにポリアクリルアミドコー

ティングを施したものを用い、全長 500 mm、実行長 300 mm とした。電解液には、20 mM リン酸緩衝液 (pH=7.8) に CTAC を 20 mM、Tween 20 を 1~7.5 mM の範囲で含有したものをを用いた。印可電圧は 15 kV (電流 15~19 μ A) とした。

試料：1) サリチル酸 2) 4-ニトロ安息香酸、3) 4-トルイル酸、4) 4-ジメチルアミノ安息香酸、5) 4-アセトキシ安息香酸、6) 安息香酸 7) テレフタルアルデヒド酸、8) オルトフタルアルデヒド酸、9) 4-ヒドロキシ安息香酸の各 10 mM 水溶液を等量混合して用いた。番号は Figure 1 のピーク番号を示す。

キャピラリーのコーティングについて：未処理のキャピラリーを用いて行った実験では、CTAC-Tween 20 の混合系で測定回数を経るにしたがい浸透流の減少が見られ、再現性が著しく低下した。このことは、添加した Tween 20 によって壁面に吸着した CTAC が徐々に剥がされていることを意味した。そこで、Hjerten の方法(*J.Chromatogr.*, 374(1985)191) に従いポリアクリルアミドをコーティングしたところ、CTAC は壁面に固定された様子で浸透流は非常に安定したので、本実験ではコーティングキャピラリーを用いた。

3. 結果及び考察

CTAC を用いているので浸透流は負から正極に向かって流れているが、その大きさの絶対値がミセル (正から負極に流れる) の速度より小さいために、ミセルと強く相互作用をする有機陰イオンはミセルに続いて負極側で検出される。Figure 1 に示すように、Tween 20 の添加によりミセルとの相互作用が減少し、試料全体がより遅く広がって検出された。また用いた試料は完全に分離され、CTAC と Tween 20 の混合比の調節で分離の効果的なコントロールが期待できることが示された。前回の SDS-Tween 20 系では、ミセル表面へのポリエーテル鎖の導入で試料とミセル間のイオン性相互作用及び疎水性相互作用の抑制と試料官能基とミセル間の水素結合性相互作用の付加が示されたが、CTAC-Tween 20 系における Tween 20 の働きについて今後その効果を解析し検討する予定である。

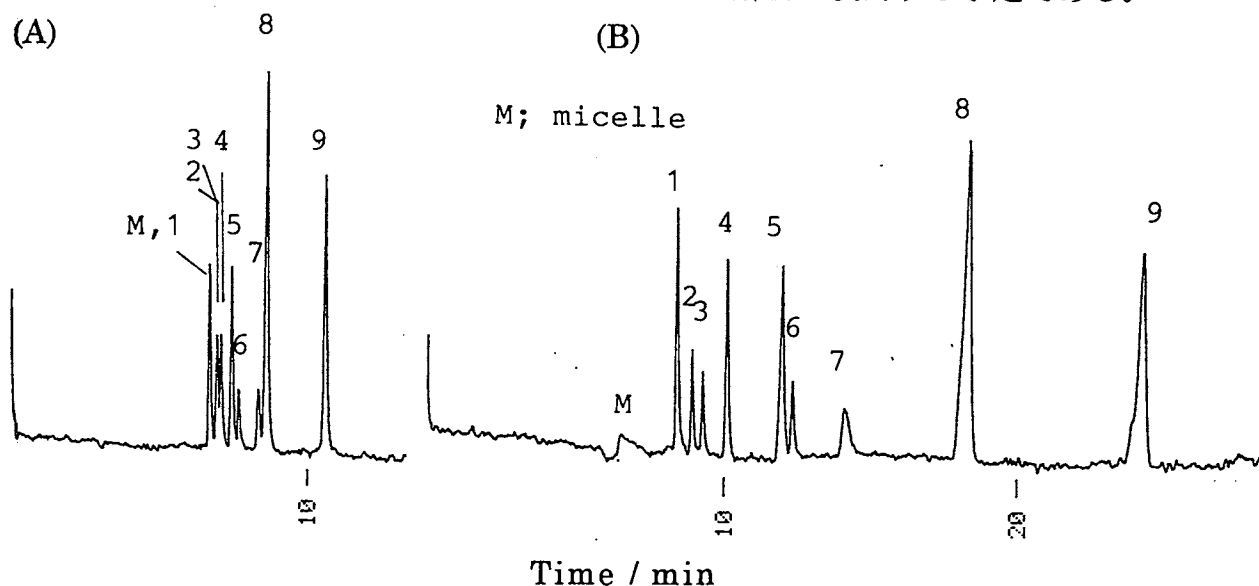
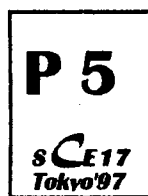


Figure 1 Electropherograms of nine benzoic acids with a CTAC (20 mM) system (A) and with a CTAC (20 mM) - Tween 20 (5 mM) System (B)



界面活性剤の構造に基づくミセル動電クロマトグラフィーにおける分離の最適化

- 1) 竹田さほり*、脇田慎一、山根昌隆、城間 純、東 国茂、2) 寺部 茂
1) 大阪工業技術研究所、2) 姫路工業大学理学部

Optimization of the separation based on the surfactant structure in micellar electrokinetic chromatography

- 1) Sahori Takeda*, Shin-ichi Wakida, Masataka Yamane, Zyun Siroma, Kunishige Higashi and 2) Shigeru Terabe
1) Osaka National Research Institute, AIST 2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Abstract

We have investigated the effect of the surfactant structure on migration behavior in micellar electrokinetic chromatography (MEKC). It was found that sodium N-lauroylsarcosinate (SLN) and sodium N-lauroyl-N-methyl- β -alaninate (ALE) can be used for MEKC. These surfactants and sodium N-lauroyl-N-methyltaurate (LMT) have amido linkages. Their selectivity for hydrophilic analytes are different from that of SDS. This result suggests that the existence of the amido linkage weaken the electrostatic interaction of the micelle. Then we tried to separate some isomelic aniline derivatives using these surfactants. The surfactants having the amido linkages gave the better separation than SDS. We also used a new surfactants, sodium laurylsulfoacetate (LSA) for the separation of the isomers. LSA has an ester linkage and its ionic group is sulfonate. The effect of the ester linkage on electrostatic interaction is expected to be weaker than that of the amido linkage. The prediction was supported by the comparison of the migration behavior. The separation given by LSA was also better than that of SDS.

1. はじめに

我々はこれまで、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) において、界面活性剤の構造と分離挙動との関連について検討を行ってきた^{1),2)}。今回は、それらの結果をふまえ、工業的および環境分野で重要と考えられるアニリン誘導体の相互分離について検討した。

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 μ 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。界面活性剤については、硫酸ドデシルナトリウム (SDS) および N-ラウロイルサルコシナトリウム (SLN) はナカライテスク製の市販品を用いた。N-ラウロイル-N-メチル- β -アラニンナトリウム (ALE) は川研ファインケミカルより、N-ラウロイル-N-メチルタウリンナトリウム (LMT) および

ラウリルスルホ酢酸ナトリウム (LSA) は日光ケミカルズよりそれぞれ提供を受けた。分離溶液は 50 mM の界面活性剤を 0.02 M ホウ酸塩-リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶かして調製した。分析は、印加電圧 20 kV、温度 30 °C の条件下で行った。

3. 結果と考察

アニリン及びその一置換誘導体 (メトキシ、メチル、ニトロ、クロロ) の各異性体の相互分離について検討した。SDS を用いた場合にはいくつかの誘導体が分離されなかったため、これまで用いた界面活性剤 ALE、LMT および SLN による分離を試みた。その結果、ALE と LMT ではクロロアニリンの m-体と p-体を除き相互分離が可能であった。

これまでの研究で、アミド結合を持つ界面活性剤は、SDS と比較して主に溶質との静電的相互作用がより小さいことにより、分離挙動が異なるものと考えられた。そこで、今回はさらに、アミド結合の代わりにエステル結合を持つ界面活性剤 LSA の利用を検討した。これら界面活性剤の構造および物性値を、図 1 に示す。LSA の緩衝液中でのクラフト点および CMC を調べた結果、他の 4 種類の界面活性剤と同様に、MEKC で利用可能であった。

エステル結合の場合、アミド結合と比較して、静電的相互作用への影響は少ないものと考えられるが、実際、図 2 に示すように、その分離挙動は LMT と SDS のほぼ中間的な結果となった。各誘導体の分離については、アニシジン (メトキシアニリン) の o-体と p-体を除き相互分離が可能であった。

4. 文献

- 1) S. Takeda, *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1996, 744, 135-139.
- 2) S. Takeda, *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 1997, in press.

	Krafft point / °C (in dis. water)	CMC / mM (in buffer)
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	16	4.6
ALE (Sodium N-lauroyl-N-methyl-β-alaninate)	<20	5.0
LMT (Sodium N-lauroyl-N-methyl taurate)	<0	4.5
SLN (Sodium N-lauroyl sarcosinate)	<0	6.0
LSA (Sodium lauryl sulfoacetate)	17	1.4

Figure 1 Structures and physicochemical properties of surfactants.

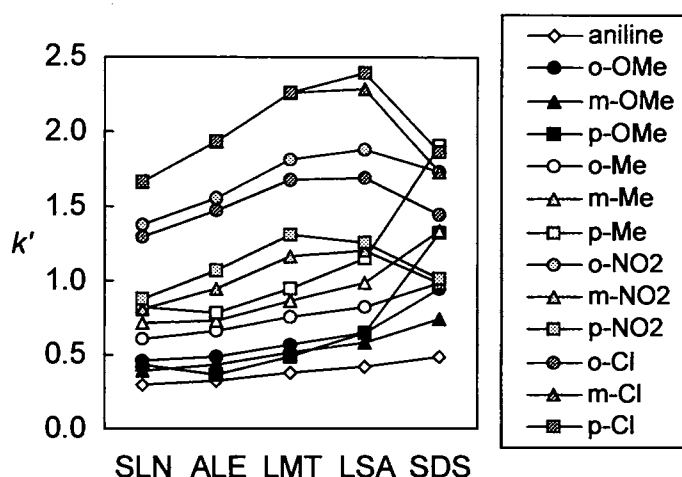
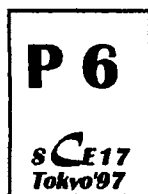


Figure 2 Migration behavior of aniline derivative isomers.



オンラインキャピラリー電気泳動—原子発光分光分析法 (CE—AES)の開発 (1)

(広島大学工学部) 梶原弘史*、育田夏樹、廣川健

Development of online capillary electrophoresis - atomic emission spectrometry(CE - AES) (1)

Hirofumi Masuhara*, Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa
Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

Online capillary electrophoresis - atomic emission spectrometry(CE-AES)system was developed for the analysis of light element, such as alkaline metal, alkaline earth metal etc. Atomic emission of isotachophoretically migrating Na^+ zone was successfully detected at 589nm. Construction of CE-AES system, in particular CE-AES interface part was reported in detail.

1. 緒言

キャピラリー電気泳動(CE法)は分離能や絶対感度が優れているが、定性能力は必ずしも高いとは言えない。このためMSとのオンライン結合が注目を集めている。本研究では金属イオンのオンライン検出の可能性を模索するため、オンラインキャピラリー電気泳動 - 原子発光分光(CE - AES)法の開発を行った。CEモードとして濃度調整効果のある等速電気泳動 (ITP) モードを用いた。

CE - AESはCEで試料を分離した後、キャピラリーの外へ試料ゾーンを引き出して、化学フレームを用いて励起させ、その原子発光を検出する手法であり、このような結合分析法の報告された例は無い。この手法ではAESが高感度検出法であり、さらに元素特有のスペクトルを表すことから、CEの極微量成分の定性、定量分析における問題が解決できると考えられる。例えばキャピラリー等速電気泳動法 (CITP) で電導度検出器など通常の汎用検出器を使用する場合、多量成分中の極微量成分の検出が困難になる問題の解決や、高分離能を利用してAESで問題となる分光干渉の問題の解決などに応用できるはずである。なお本研究でのテスト試料としては化学フレームで容易に励起することが可能なアルカリ金属等の軽元素、特に Na^+ を使用した。

2. 実験

等速電気泳動挙動の確認には高周波非接触電導度検出器(HFCCD)を使用した。AES法の検出器としてはフォトダイオードを使用し、分光器は単一波長検出型のものを使用し、 Na^+ の発光を589nmで待ち受け記録した。高電圧電源にはHEVL-30P0.5-HU(松定プレジジョン)を使用した。

CEとAESのインターフェイスとなるネブライザーとしてはガスバーナー

を改造して使用し、空気の供給にはカデットポンプ (Cole-Parameter Instrument社)を使用した。試料はNa(10mM)であり、塩化物から調整した。使用した電解液系はTable 1に示す。

Table.1 Electrolyte system for CE(ITP) - AES

Leading electrolyte	20mM ammonia solution. pH 4.8(buffer:acetic acid) 0.1% Hydroxypropylcellulose
Terminating electrolyte	20mM Carnitine hydrochloride 0.1% Hydroxypropylcellulose

3. 結果と考察

今回製作した実験装置の構成をFig.1に示す。本装置ではFig.1のINJで注入された試料ゾーンはリーディング側に向かってPTFE管中を泳動し、まずHFCCDで電気泳動(CE)の検出が行われる(①)。さらに試料ゾーンは泳動を続けてバーナー部の先に到達する。到達した試料ゾーンはGasとAirによって霧状化されて、化学フレイムに導入され、分光光度計中のフォトダイオードにより原子発光が検出される(②)。

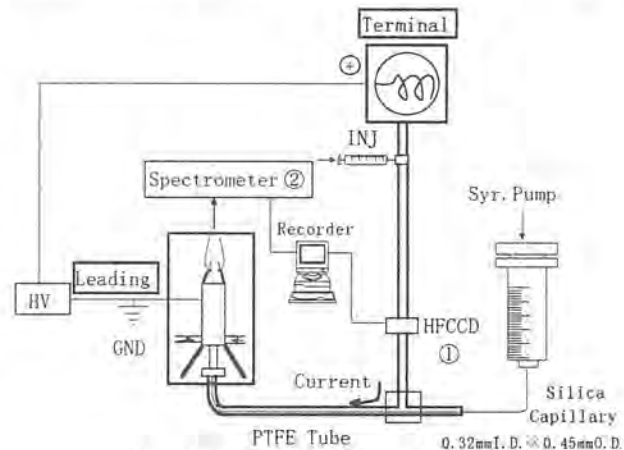


Fig.1 Online CE-AES System

Fig.2はバーナー部を拡大したものである。PTFE管はバーナー中を通して電極の直前まで配管されているので、フレイム導入の直前まで電気泳動させることができ、また泳動してきた試料を効率よく霧状化させることができた。このようにして電気泳動による検出、原子発光による検出をオンラインで行うことが達成された。Fig.3は製作した装置を用いてNa (60nmol)を検出したフェログラムである。Fig.3(a)はHFCCDで検出された等速電気泳動のイソタコフェログラムであり、Fig.3(b)はNaの波長

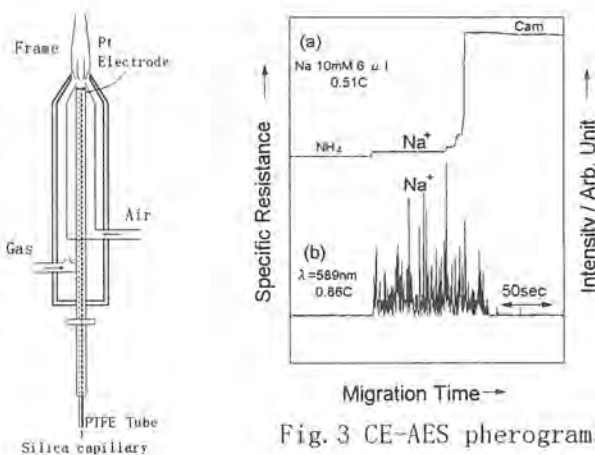


Fig.3 CE-AES pherograms

Fig.2 Detail of nebulizer

(589nm)で検出された原子発光によるフェログラムである。ゾーン長の対応など解決すべき問題も多いが、今回初めてオンラインAES法においてNaの選択的検出が可能になった。



CE-MS による界面活性剤の成分分析

田中喜秀*¹⁾, 岸本康弘¹⁾, 大塚浩二²⁾, 寺部 茂²⁾

1) 日本ベーリンガーインゲルハイム, 2) 姫路工業大学 理学部

Composition Analysis of Surfactants by CE-MS

Yoshihide Tanaka*¹⁾, Yasuhiro Kishimoto¹⁾, Koji Otsuka²⁾, Shigeru Terabe²⁾

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

Abstract

Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) was applied to the composition analysis of some anionic surfactants such as sodium polyoxyethylene(2) lauryl ether sulfate (SBL-2N). SBL-2N consists of mixtures varying in the degree of ethoxylation. The components were successfully separated by CE, and were identified on the basis of their molecular masses by MS. Furthermore, C₁₄H₂₉-homologues, which had the different alkyl chain lengths, were detected at a trace level. CE-MS is rapid, simple and easy to perform the composition analysis of ionic surfactants.

1. はじめに

市場に流通しているほとんどの界面活性剤は分子構造が異なる混合物であり、その組成も不明確である。そこで、簡便な成分分析法の開発が望まれているが、イオン性界面活性剤の場合はキャピラリー電気泳動法(CE)が適している。CEでイオン性界面活性剤を分析する場合、紫外吸収を持たない界面活性剤も多く、間接紫外吸光検出法がよく用いられている。しかし、成分分析に間接紫外吸光検出法を用いると、検出感度が劣るために微量成分の検出は困難である。また、純粋な界面活性剤がないと各成分の同定を行うこともできない。

最近、CE装置に質量分析計(MS)を連結したシステムが実用化され、演者らもシクロデキストリン誘導体¹⁾や硫酸ドデシルナトリウム²⁾などの分離分析に利用した。CE-MSでは紫外吸収が弱い化合物も高感度で検出でき、同時に分子量情報も得られる。すなわち、純粋な界面活性剤がなくても成分の同定が可能となる。今回は数種類のイオン性界面活性剤の成分分析を行ったので報告する。

2. 実験

CE装置はHewlett-Packard社製HP3^{SD} CEシステム、質量分析計はPerkin-Elmer Sciex社製API-300、インターフェースはAPI-300用イオンスプレープローブを用いた。キャピラリーは内径50 μm、外径150 μm、長さ80 cmのポリアクリルアミドで内壁を処

理した溶融シリカキャピラリーを用いた。分離溶液は pH 4.0 の 40 mM ギ酸アンモニウム緩衝液を用い、シース溶液は分離溶液とメタノールの混液 (1 : 1) を 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量で送液した。CE の電圧は -30 kV, イオンスプレーの電圧は -4.5 kV で行った。MS 検出は負イオンの選択的イオン検出法 (SIM) で行った。

3. 結果

陰イオン界面活性剤の成分分析の一例として、ポリオキシエチレン(2)ラウリルエーテル硫酸ナトリウム (SBL-2N) の結果を以下に示す。Fig. 1 に SBL-2N の構造を示したが、ポリオキシエチレン基の数 (n) は不明確

である。また、アルキル基 (R-) は $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ であるが、炭素数が異なる成分が含まれている可能性もある。そこで、CE-MS を用いて測定したところ、Fig. 2a に示すようにポリオキシエチレン基の数が異なる

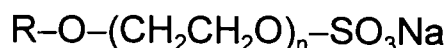


Fig. 1 Structure of sodium polyoxyethylene(2) lauryl ether sulfate (SBL-2N).

(n = 0~8) 成分が検出された。また、Fig. 2b に示すように、アルキル基 (R-) が $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ の成分も微量に検出された。本法は操作法や分離条件の検討も簡単であり、陰イオン界面活性剤の成分分析法として有望である。また、陽イオン界面活性剤や両性界面活性剤の成分分析にも応用することが可能である。

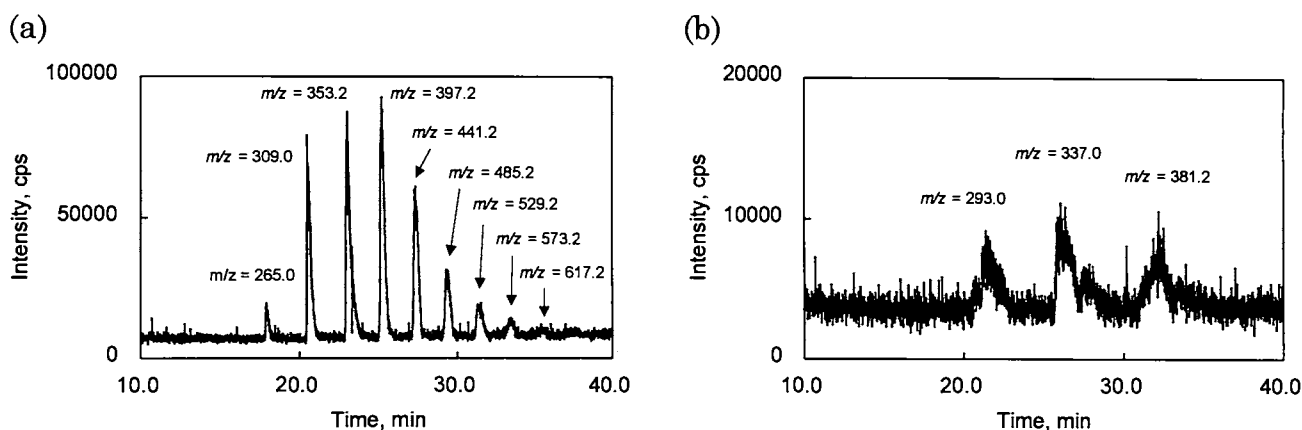
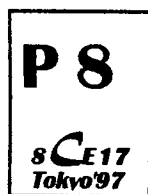


Fig. 2 Reconstructed ion current electropherograms obtained from the composition analysis of SBL-2N by CE-MS.

MS detection : (a) $m/z = 265.0, 309.0, 353.2, 397.2, 441.2, 485.2, 529.2, 573.2, 617.2, 661.2, 705.2, 749.4, 793.4$; (b) $m/z = 293.0, 337.0, 381.2$.

4. 文献

- 1) 田中喜秀ら : クロマトグラフィー, Vol. 18 (2), pp. 138-139 (1997).
- 2) 大塚浩二ら : 日本分析化学会第 46 年会講演要旨集, p. 148 (1997).



大気圧化学イオン化法 (APCI) をインターフェースとして用いるオンライン MEKC-MS の検討。

1) 横井 雅樹 *, 2) 尾崎 祐人, 1) 大塚浩二, 1) 寺部 茂
1) 姫路工業大学理学部, 2) カネカテクノリサーチ (株)

On-line MEKC-MS with APCI interface.

(1)Masaki Yokoi*, (2)Hiroto Ozaki, (3)Koji Otsuka, and (4)Shigeru Terabe

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

(2)Kaneka Techno Research Co. Ltd., 1-2-80, Yoshida-cho, Hyogo-ku, Kobe, 652 Japan

Abstract

Although atmospheric pressure chemical ionization (APCI) has been described as a very promising interface for capillary electrophoresis - mass spectrometry (CE-MS), this interface system has not been well characterized especially in the negatively charged ion detection mode. To establish this interface system, we examined various factors affecting ionization efficiency and spectral interference, and tried to optimize operating parameters to obtain a maximum signal intensity using phthalates as model compounds.

1、はじめに

前報では、正イオン検出モードにおいて、大気圧化学イオン化 (APCI) インターフェースシステムが、界面活性剤の濃度変化等に影響を受けにくく、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) インターフェースシステムよりも、MEKC-MS のインターフェースに適していると報告したが、試料化合物によっては、負イオン検出モードの方が、イオン化が比較的容易なものもあり、負イオン検出モードにおいても、試料のイオン化条件を最適化する必要があった。

そこで、本研究では、MEKC に汎用される界面活性剤を用いた条件下において、フタル酸エステル等の化合物をモデル試料とし、負イオン検出モードにおける種々の操作条件の変化が、試料のイオン化に及ぼす影響について調べた。又、分離条件の最適化を検討して、負イオン検出モードでの MEKC-APCI-MS 分離分析を同時に試みた。

2、実験

電気泳動装置は日本分光 CE-900、質量分析計には日立 M-1000 システムを、インターフェースには日立製 [1] を使用し、オンラインで接続して実験を行った。キャピラリーは内径 50 μ m、外径 150 μ m、全長 105cm、有効長 65cm のものを用い、CE 装置の印加電圧は 18kV、ES 電圧は -4.5kV、シース溶液は 100%MeOH、試料はそれぞれの実験条件に用

いた泳動溶液と同組成の溶液に溶かしたものを用い、測定はすべて SIM モード（負イオン検出）で行った。

3、結果・考察

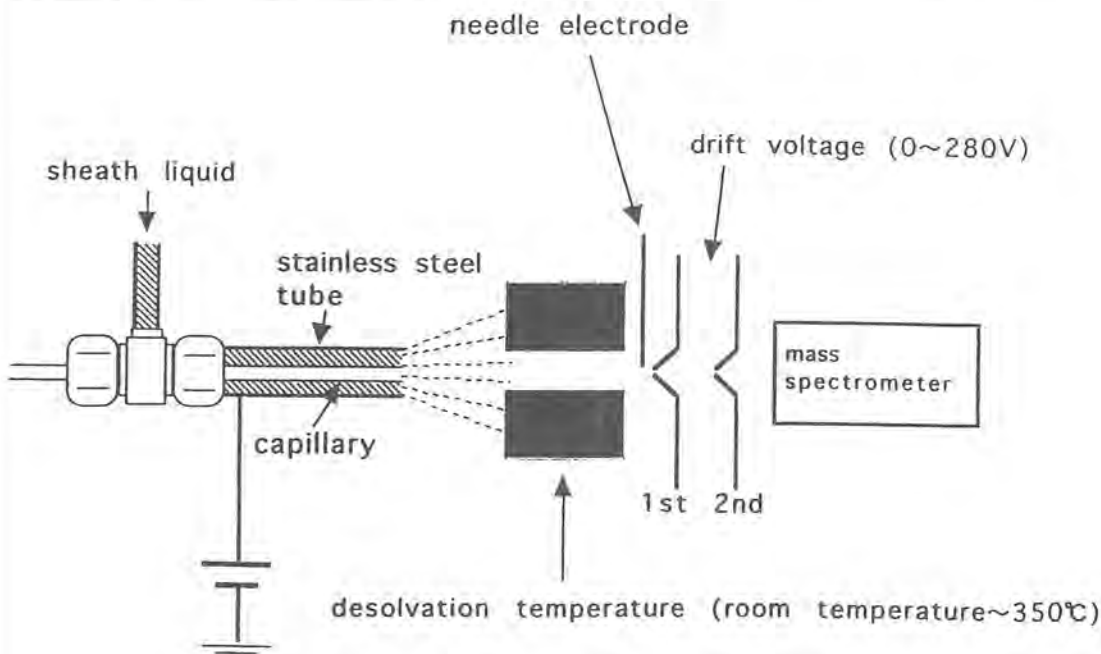
本研究では、フタル酸エステル化合物をモデル試料とし、陰イオン界面活性剤の濃度や測定回数等の各操作条件パラメーターを変化させ、試料 MS スペクトル強度に影響を及ぼす条件因子を、試料ピークの面積を比較することにより考察した。

陰イオン界面活性剤の濃度変化による影響については、界面活性剤として SDS を用い、SDS の濃度を 0 ~ 50mM の範囲で変化させて試料スペクトル強度の変位を調べたが、比較的高濃度の範囲でも、それほど強く SDS の影響を受けないことが確認できた。

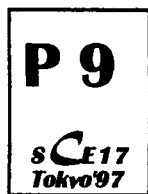
連続測定による試料スペクトル強度の変化においては、SDS 濃度 50 mM 以下において、20 回以上連続同条件で測定を行っても、スペクトル強度に顕著な変化がみられなかった。

APCI は、負イオン検出モードにおいても、MEKC に汎用される陰イオン界面活性剤等の影響が比較的小さいことから、ESI よりも MEKC-MS のインターフェースとして、より試料及びバッファ選択範囲が広く、実用的であると言える。又、混合物の MEKC ルーチン分析においても、有用性が高いと考えられる。

現在は、MEKC に汎用されている他の界面活性剤を用いた場合との比較や、他の操作条件の最適化について検討を進めており、今後、負イオン検出モードにおける試料混合物の MEKC-APCI-MS 分離分析結果と併せて報告する予定である。



Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface



二次元電気泳動槽内のガラス表面処理

(名工大・工) 佐藤喜英*、北川慎也、津田孝雄、
(宇宙開発事業団) 佐藤龍也、
((財) 宇宙環境利用推進センター) 辻政俊、
(日揮 (株)) 横田明俊

Glass surface modifications in two dimensional free flow electrophoresis for protein and cell analyses

Yoshihide SATOH *, Shinya KITAGAWA, Takao TSUDA (Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology),

Tatsuya SATOH (Space Utilization, National Space Development Agency of Japan),

Masatoshi TSUJI (Research and Survey, Japan Space Utilization Promotion Center),

Akitoshi YOKOTA (JGC Co.)

Inner walls of a chamber for the two dimensional free flow electrophoresis were modified. The wall was coated with polyacrylamide through Si-C bond which reduced the adsorption of proteins. To test the ability of the coated wall, the adsorptions of the bovine serum albumin and red blood cells on the wall were measured. The comparison of coated and uncoated wall was discussed. The chamber will be used under the field of micro gravity.

【はじめに】 地上では、厚い二次元電気泳動槽を使用すると通電に伴って発生するジュール熱により、槽内で熱対流が発生する。しかしながら、微少重力下では熱にともなう対流が起こらないため、連続的な試料注入によるかなりの量的な分取や高分離が可能と考えられている。地上での泳動槽の厚さは 1mm が限界だが、微少重力下においては 4mm の厚さも可能である。

本実験の目的は宇宙空間で使用する良い電気泳動槽を作ることである。電気泳動槽の内面にはガラスが用いられているので、この面への試料の吸着を防ぐ必要がある。また同時に宇宙空間では気泡が液中に安定に存在するので、微少重力下での気泡の処理は、装置の安定した運転に欠かせない。この気泡の付着しにくい壁面も重要な因子であろう。

そこで石英板表面を化学修飾し、様々の評価方法を用いて検討した。

【実験】 本実験では、従来ヒューズドシリカキャピラリーカラムで開発されてきた石英内面の処理法をスケールアップして用いた (1)。石英表面を Si-O-Si-C 結合よりも加水分解されにくい Si-C 結合により、表面活性剤の一つであるポリアクリルアミドを修飾した。

化学修飾には 4 つの段階を用いた。① 1M NaOH 水溶液中に石英板を一定時間浸し、石英板表面に水酸基を露呈させる。② 塩化チオニルを用いて水酸基の塩素化をおこなう。③ 0.25M ビニルマグネシウムブロミド THF 溶液によるグリニア反応。④ 重合反応。{(3%w/v アクリルアミド) + (0.1%w/v ペルオキ二硫酸アンモニウム) + (0.1%v/v N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)} 水溶液中、室温で重合させた。②③の反応は一定時間加温下でおこなった。

【評価方法】 ①水酸化ナトリウムで1時間処理して化学修飾した石英板（以下、コート1）と3時間処理して化学修飾した石英板（以下、コート3）についてFT-IR測定を行い、化学修飾の状況を確認した。②石英板に蒸留水を滴下し観察した。③石英板に赤血球を含んだ溶液を滴下し、ついで風乾させ生理食塩水で洗浄した後、表面に吸着していた赤血球数を比較した。④石英板にアルブミン溶液を滴下し、ついで風乾させ蒸留水で洗浄した後、表面に吸着していたアルブミンをプロモフェノールブルーにより青色に染色し、その青色の強度をコンピューターにより数値化し比較した。

【結果】 ①図1は化学修飾した石英板のFT-IR測定データ（ATR法、スキャン128回、分解能 4cm^{-1} 、参照側に未処理の石英板を用いた）である。これより、アミド結合（ $1500\sim 1750\text{cm}^{-1}$ ）と $-(\text{CH}_2)_n-$ （ $2850\sim 2950\text{cm}^{-1}$ ）の吸収帯がみとめられるので、石英板表面のポリアクリルアミドの存在が確認できた。

②化学修飾していない石英板に蒸留水を滴下すると、水滴の接触角が大きくなりよくはじくのに対して、化学修飾した石英板では接触角が非常に小さくなり、薄く広がるようになる。これは、コーティングにより表面張力が低下しているためだと考えられる。

③コート1への赤血球の吸着数は、コートなしと比較して1/3程度に減っていたが（コートなし平均17.0個に対して、コート1平均6.3個）、コート3では逆に増えていた（平均21.2個）。これは長時間の水酸化ナトリウム処理により表面が粗くなったためであろう。

④染色強度はブランク値を「約100」として、コートなしが「172」、コート1が「117」、コート3が「131」となった。この評価でもコート1の吸着量が他に比べて少ないという結果となった。

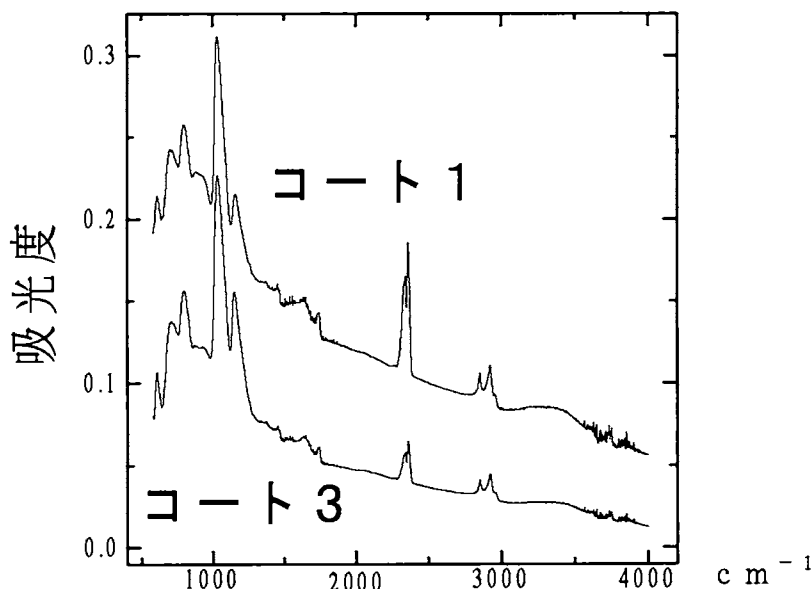
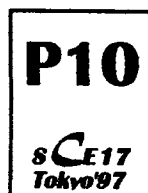


図1 化学修飾した石英板のFT-IR測定データ

各実験結果より、石英板表面におけるポリアクリルアミドの化学修飾は、タンパク質の吸着を妨げる方向に働くといえる。また、水酸化ナトリウム処理は一時間が適当で長時間の処理は逆に吸着量を増やしてしまう結果となった。

化学修飾した石英板を用いた二次元電気泳動槽を用いて、生化学物質の分離を目的としているので、このタンパク質の吸着を少なくする表面処理が重要と思われる。

(1) M.Nakatani, A.Shibukawa, T.Nakagawa, Biol.Pharm.Bull., 16, 1185~1188 (1993)



界面活性剤を用いたFFEU電気泳動槽からの泡除去

(広島大・工) 育田 夏樹*、毛 慶禄、廣川 健、(宇宙開発事業団)佐藤 龍也
(宇宙環境利用推進センター)辻 政俊、(日揮)横田 明俊

Removal of bubbles from electrophoresis compartment of FFEU by using surfactants

Natsuki Ikuta¹, Qinglu Mao¹, Takeshi Hirokawa¹, Tatsuya Satoh², Masatoshi Tsuji³ and Akitoshi Yokota⁴
Faculty of Engineering, Hiroshima University¹, NASDA², JSUP³, Nikki K.K.⁴

The use of surfactants such as SDS was proposed to remove bubbles from electrophoresis compartment of FFEU under microgravity environment. The surfactants decreased sticking power of the bubbles by reducing surface tension and attractive force due to electric double layer. According to our observation using a model electrophoresis compartment (fused silica glass), the optimum concentration range of SDS was 20-50mM and the flow rate was ca. 50ml/min.

1. はじめに

微小重力下におけるフリーフロー電気泳動(FFEU)法による分離・精製技術では、試料の沈降や熱対流が無視できるため、大きな分子、細胞、血球など地上実験では不可能な試料の分離や地上実験より格段に高い分離能が期待できる。しかしながらFFEUに限らず、微小重力下において水溶液を使用する実験では、何らかの理由で発生した気泡が非常に除去しにくく、しばしば実験の障害となる。そのため、今後続く宇宙実験において有用な気泡除去技術の開発が急がれている。

基本的には気体がわずかに水に溶けることを利用し、気液分離膜を利用して分離するが、例えば比較的大きな気泡が泳動槽に付着しているよう場合は、移動させ適当なポートから排出した方が迅速な対応が可能となる。

気泡に働く力は浮力、ファンデルワールス力、電気二重層による相互作用、表面張力などが考えられ、浮力以外は微小重力下でも存在する力である。そこで、我々は界面活性剤により表面張力を低下させる事により実際に気泡の除去が可能であるかどうか検討するため、模擬FFEU電気泳動槽を使用して地上での泡除去実験を行い、微小重力下における泡除去の可能性について検討した。

2. 実験

実験にはIML-2で使用された宇宙実験用FFEU電気泳動槽を模して作製した模擬FFEU槽(石英ガラス製)を使用した。送液にはペリスタポンプ(Watson-Marlow社製、503U)を用いた。この泳動槽にシリンジを用いて、多数の気泡(計10ml)をFFEU槽に導入し、気泡が移動

この泳動槽にシリンジを用いて、多数の気泡(計10ml)をFFEU槽に導入し、気泡が移動しないように槽を水平になるように調節した。蒸留水およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液(1mM~100mM)を一分おきに13ml/minずつ流量を増加させた。このときの気泡の様子をビデオに録画した。はじめの位置から動いた気泡を動き始めた流速と直径により分類した。

3. 結果と考察

図1に動いた気泡の面積が気泡の総面積に占める割合をしめす。この図から明らかなように、SDSの濃度を上昇させることで気泡を移動させることが可能になった。SDS濃度が10mMの時、低い流速で動き出しているの泡の面積が大きいのは大きい泡が槽内に存在したためである。

このようにSDSによる泡除去は非常に強力な手法であるが、高濃度になるほどガラス表面に付着したSDSを洗浄するための洗浄水が多く必要になる。これらのことから航空機実験および宇宙実験で最適なSDS濃度は20mM~50mM程度であると考えられる。

Fig.2にSDS20mMを流したときの泡が動き出した流速とその大きさの関係について示す。表面張力は泡の半径が小さいほど強力である。実験結果からも直径0.5mmといった小さな泡はほとんど動かなかった。しかしながら、大きなサイズの気泡でも、アクリル板やシリコンゴムに付着した気泡は移動しなかった。すなわち、泡とガラスもしくはその他FFEU槽を構成する材料との間で疎水的な吸着が起こっていると考えられ、

このような疎水的部分を泳動槽から排除する事も重要であることがわかった。

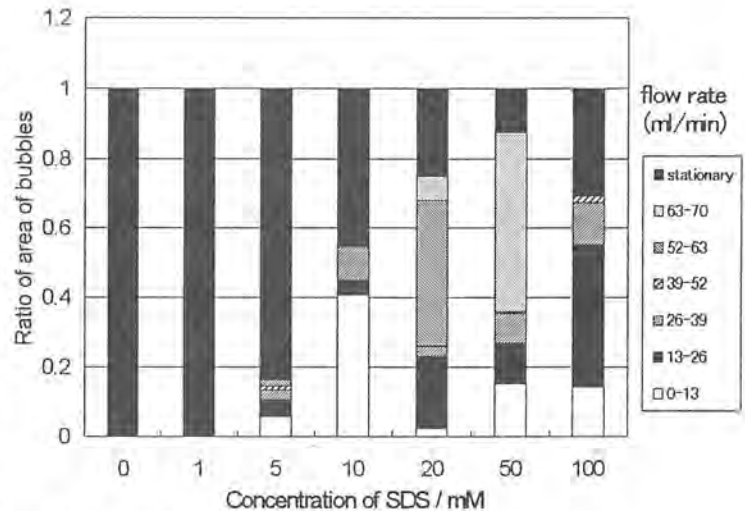


Fig. 1 Relative area of moved bubbles

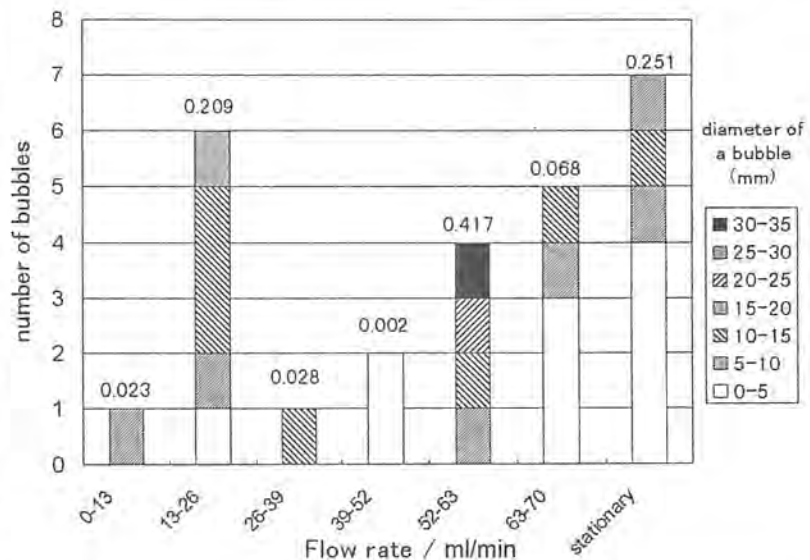
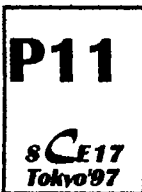


Fig. 2 Number of moved bubbles. Numbers in this figure are the proportion of total area of moved bubbles to one of all bubbles



FFEU緩衝液からの気泡除去システム

1)佐藤龍也, 2)辻 政俊, 3)横田明俊*, 竹内範雄, 長谷川昭
1)宇宙開発事業団, 2)財団法人宇宙環境利用推進センター, 3)日揮株式会社

1. はじめに

宇宙の微小重力環境を利用する試みは、米国のスペースシャトル、ロシアの宇宙ステーションミール等の手段を活用しながら、これまでに材料実験、ライフ系の実験等様々な研究が実施されている。

無担体電気泳動法(FFEU)は、地上であれば分離槽厚 1 mm が限界のところを微小重力下では熱対流が起きないため、この限界を大幅に改善することができ、大量の生体成分等を高精度で分離することが可能となるので、宇宙の特性を生かした分離技術として技術確立の努力がなされている。

日本でもスペースシャトルを使った第一次材料実験(FMPT)、第二回国際微小重力実験室(IML-2)でFFEU実験が実施されたが、このうちIML-2では、FFEUが、染色体DNAの分離、分析のキーシステムであることは確認された¹⁾ものの、実験中に泳動槽の内部に気泡が混入したことが原因と見られる異常な泳動挙動が検出され²⁾、気泡を除去する技術開発が急務となっている。

微小重力環境下においては、重力を利用した気液分離が十分できないため、遠心力や静電力、電磁気力、気泡の持つ表面張力を利用してメッシュを使って気液を分離する技術等が考案されているが、これらの気液分離方法は液側の操作温度における溶存ガスの溶解度以下にガス濃度を下げることができない。

一方、電気泳動法は分離用の電圧をかけるためにジュール熱が発生し、中心部分の温度が緩衝液貯蔵中の温度を上回る可能性があり、緩衝液のガス溶解濃度が高いと槽内で気泡を発生させる原因となる。このために緩衝液中の溶存ガス濃度を極力低く押さえるような脱気技術の開発が効果的と考えた。

本稿では真空脱気膜技術に幾つかの補助的要素を加えて宇宙実験用に開発した気泡除去システムについて開発状況を報告する。

2. 実験方法

2.1 試験装置

電気泳動槽の上流側の緩衝液タンクと電気泳動槽の間に気泡除去装置を設置する事を想定した(図-1参照)。

宇宙実験に供するBBM(Bread Board model)として以下の各要素を含む地上試験装置を試作した。

- 1) 気泡検出排除システム
- 2) 気泡の加圧溶解システム
- 3) 真空脱気システム

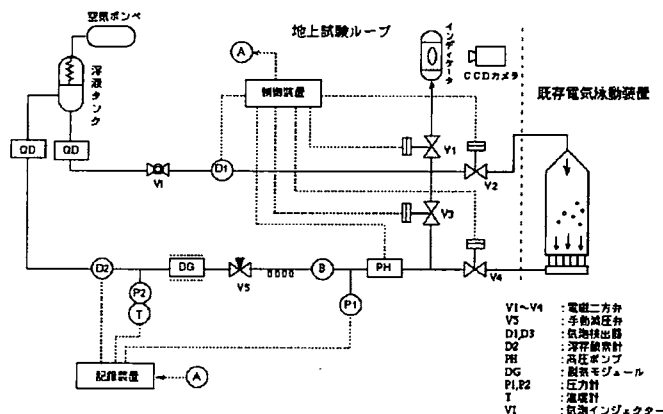


図-1 気泡除去地上実験装置

気泡検出排除システムは気泡検出器と電磁弁の組み合わせで、気泡検出後に作動して緩衝液タンク換操作後の大型の気泡を系外に排出する。その後、緩衝液は高圧ポンプを通して気泡溶解ポット(B)に送液されるが、排出弁で除去できなかった小型の気泡についても、ここで緩衝液中に高圧で溶解させる。気泡溶解後の緩衝液は、減圧ラインと減圧弁を通過して脱気膜にほぼ常圧で供給され、脱気膜を通過する間に脱気が完了する。宇宙実験準備段階において循環運転で脱気操作を繰り返すことで脱気効果を確実なものとする。

脱気システムとしては、市販のテフロン膜に加えてシリコン膜を2種類試作した。

使用した膜は以下の通り

- 1) テフロン膜：膜面積 500cm²、外形：50(W) x 60(D) x 80(L)
- 2) シリコン膜 1：膜面積 1440cm²、膜内径：500 μm、外形：48(φ)x 176 (L)
- 3) シリコン膜 2：膜面積 440cm²、膜内径：200 μm、外形：24(φ)x 164 (L)

2. 2 試験方法

表-1 に示す要素試験の実施内容に従って試験を実施した。

表-1 気泡除去要素試験の試験内容

試験項目	パラメータ項目			測定評価項目
	流量(ml/min)	圧力(kg/cm ²)	気泡量/ガス混入条件	
気泡検出/排出試験	5,10,20	0.3	0.1,0.5,1.0ml/回	気泡回収量 入口、出口の酸素濃度 気泡溶解時間、 酸素濃度の変化
脱気膜の性能試験	5,10,20	0.3	溶存酸素分	
加圧時の溶解挙動試験	5,10,20	0.3,1,10,50,75	1.0ml/回	

注) 試験用流体には純水を使用した。

3. 試験結果

3. 1 脱気膜の性能試験結果

脱気膜の性能を評価する指標として、下式に定義する脱気効率を比較した。

$$\text{酸素透過率} = ((\text{入口酸素濃度} - \text{出口酸素濃度}) / \text{入口酸素濃度}) / \text{膜面積}$$

図-2 に示すように、市販のオンライン脱気膜は今回試験した 5ml 以上の流量では、流量の増加とともに脱気効率が落ちる。

試作したシリコン脱気膜については、流量による影響は受けず、シリコン膜 2 (より薄い膜) の方が脱気効率が優れている。処理後の酸素濃度を比較すると大型のものとはほぼ同等の脱気性能が得られることがわかった。

3. 2 加圧時の気泡挙動

図-1 に示す気泡溶解ポット(内径 10mm、長さ 250mm) に気泡を 1 ml 注入し、加圧下での溶解挙動を観察した。

溶解ポット中の気泡の位置は出口側(位置 a)及び入り口側で気泡に水流が直接当たる位置(位置 b)とした。

どちらの位置に気泡を置いた場合も、圧力及び流量を増加させることによって溶解時間は短縮する。(図-3 参照)

位置 a の気泡は、圧力 50MPa の場合でも溶解するのに 2 時間以上を要する。これに対して位置 b の気泡は同圧力で 20 分ほどで完全に溶解した。いずれのケースも溶解ポット下流側に設置した真空脱気膜出口の酸素濃度は 2 ppm 程度で、FFEU 操作時の予想最高温度 35℃における酸素の飽和溶解度 7 ppm を大きく下回り、気泡溶解後も脱気により効果的に溶存ガスが除去されている。

現在、タンパク質を含む緩衝液に対しても同様の試験を実施しており、宇宙実験へのシステムの適用性を評価中である。

4. 参考文献

- 1) 電気泳動による線虫染色体 DNA の分離 小林英三郎、石井直道、広川健
宇宙基地利用基礎実験研究成果報告書 平成 6 年度 (IML-2 計画参加)
- 2) IML-2 における無担体電気泳動による分離実験 飛行後解析 小林英三郎、石井直道、広川健、長岡俊治 宇宙利用シンポジウム Vol.12th pp.138-141, 1995

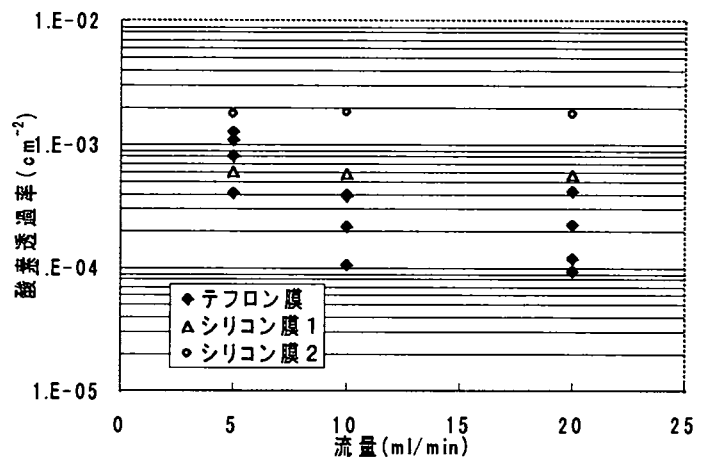


図-2 脱気膜の性能比較

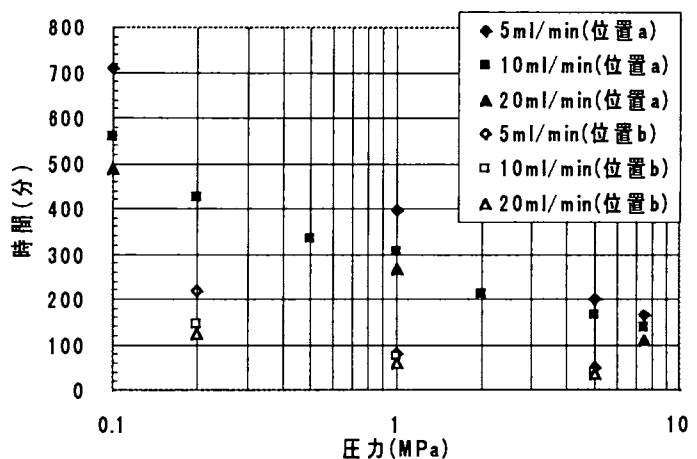


図-3 加圧時の気泡溶解時間

P12
SCE17
Tokyo'97

電気クロマトグラフィー (26) エナンチオマー分離への電場の効果

(名工大・工) 田下裕之*, 山村初雄、川井正雄、北川慎也、津田孝雄

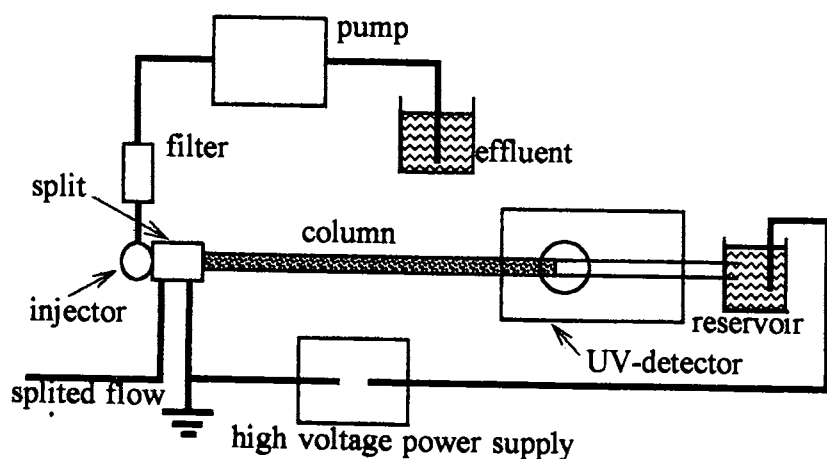
Electrochromatography (26) Effect of electric field on enantiomer separations
Hiroyuki TASHITA *, Hatsuo YAMAMURA, Masao KAWAI, Shinya KITAGAWA,
Takao TSUDA
Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

Chiral separation of the enantiomers of salsolinol was achieved by the use of ionpair-electrochromatography with a mobile phase containing cyclodextrin as a chiral additive. The separation was performed on the capillary packed column (150 μ m \times 20cm packed with CAPCELL C18,UG-120,5 μ m), and +1 ~ +3kV electric field was applied. The structural isomers of cresol (o-,m-,p-cresol) were also achieved by using a chemically bonded cyclodextrin-stationary phase (YMC CHIRAL β -CD BR). The electric field may have a role of enhancement of the separation due to the alternation of the nature of stationary phase.

1. はじめに

電気クロマトグラフィーは、液体クロマトグラフィーの性格に由来する分離モードと、キャピラリー電気泳動的性格に由来する分離モードを併せ持つ分析法である。その特徴として、「カラムに印加した電圧の正負、高低により溶出時間を変えることができる。」「液体クロマトグラフィーにおいては、分離が困難な試料を、電気泳動法の主要な因子である移動度差により分離を行うことができる。」が挙げられる。本研究では、種々の有機化合物と包接化合物をつくり、異性体分離にクロマトグラフィーの分離能を向上する働きを持つ β -シクロデキストリン(β -CD)を(1)移動相への添加物として用い光学異性体を持つ salsolinol 分離と、(2)固定相として使用して構造異性体を持つクレゾール類の電気クロマトグラフィーによる挙動を調べた。

2. 実験



装置：カラムは内径 150 μ m ヒューズドシリカキャピラリー (GL Science) に (1) ODS 充填剤 (資生堂 Capcell C18) および (2) CHIRAL-CD β -BR (YMC) を当研究室で充填した。ポンプは LC-6A (SHIMADZU) を使用、インジェクターは RHEODYNE 7410 を用い、スプリットインジェクション法で行った。検出器は

JASCO UV-970、高電圧装置には HCZE-30PN (Matsusada Precision 製) を使用した。電圧はカラム軸方向に印加しカラム入口は常に接地されゼロ電位となっているので+の電圧を印加した場合、カラム入口が陰極、カラム出口が陽極になっている (Figure1 参照)。

3. 結果

印加電圧にもとずいてエナンチオマーの分離能を向上させた例を Figure2 に示した。Figure2 では固定相として ODS 充填剤を充填したカラムを用いた電気クロマトグラフィーで印加電圧と R-,S-salsolinol の溶出時間の相対比の関係を示した。実験条件 {試料: R/S salsolinol 0.5mM、溶離液: 20mM リン酸 buffer (pH3.0), 12mM β -CD, 0.5mM Sodium 1-Heptanesulfonate、検出波長: 210nm、印加電圧 0 ~ +3kV}。pH3.0 において salsolinol は陽イオンとなるため、カラム出口に positive 電圧を印加すると salsolinol は圧力差流に逆らい電気泳動し保持時間が長くなる。また、溶離液中に β -CD が存在するため salsolinol が β -CD と包接化合物を作り (R) 体と (S) 体の電気泳動速度の差と共に固定相 ODS の関与がなされたと思われる。この結果より、印加電圧による効果として溶出時間の増加と、分離能の向上を見ることができる。

Figure3 に固定相として YMC CHIRAL β -CD BR を充填したカラムを用いた電気クロマトグラフィーでの o-,m-,p-cresol の印加電圧と保持比の関係を示す。実験条件 {試料: o-,m-,p-cresol、溶離液: 0.5mM リン酸 buffer (pH5.3) / MeOH (90/10)、検出波長: 254nm、印加電圧: -5kV ~ +5kV}。Figure3 より cresol 類は正負いずれの電圧を印加したときでも保持比が増大する現象が見られた。

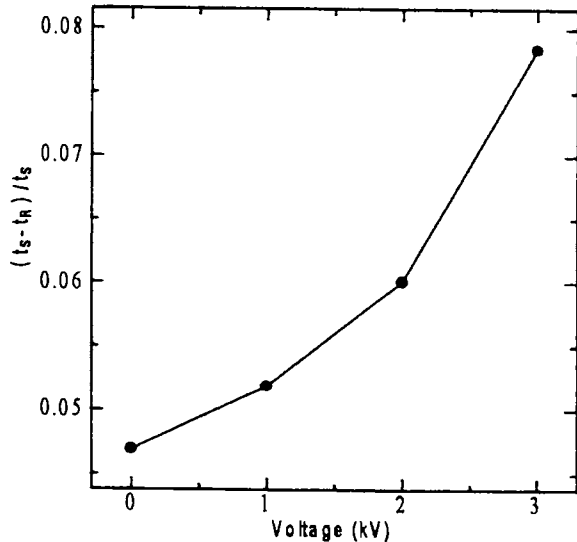


Figure2

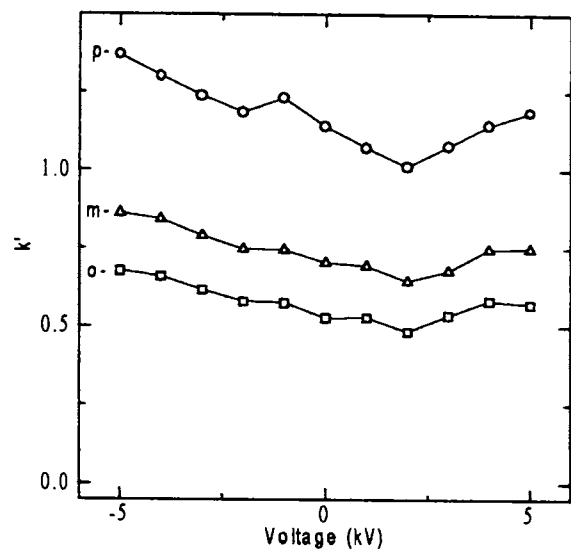


Figure3

1. T.Tsuda (Ed.), "Electric Field Applications in Chromatography, Industrial and Chemical Processes", VCH, 1995.
2. Y.Deng ; W.Maruyama ; P.Dostert ; H.Yamamura ; M,Kawai ; M,Naoi, Anal.Chem.,68,2626-2831, (1996).
3. 津田孝雄, 鄧 玉林, 北川慎也, 山村初雄, 川井正雄, 直井 信, Chromatography, Vol.18, No.2, p92-3 (1997).

P13
8CE17
Tokyo'97

電気クロマトグラフィー(27) ショートカラムを用いた分離システム構築とその適応

名古屋工業大学 工学部 ○富永真司 北川慎也 津田孝雄

Electrochromatography (27) Instrumentation for a short column system and its application

Shinji Tominaga, Shinya Kitagawa, Takao Tsuda

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

SUMMARY

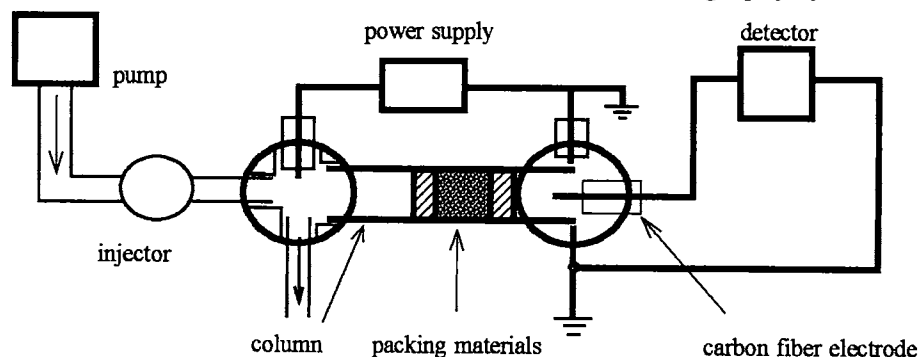
A short column-separation system for electrochromatography was proposed. The system was composed of a short column (40mm × 75 μ m I.D, packing length 23mm) and a carbon fiber electrode (7 μ m O.D) for electro chemical detection. The home-made separation and detection system was set on a microscope stage for easy handling and observation.

Sample was detected by inserting the bared tip of the carbon fiber electrode (50 μ m length) directly to the end of the column. The preliminary test of the present system was performed successfully.

はじめに

これまで細胞内液の分離は数 1000 ~ 100000 個の平均値として測定されていた。電気クロマトグラフィーの高分離能を用いて、カラム長 4 ~ 5cm, カラム充填長 2 ~ 3 cm の短いカラムを使用し、神経芽細胞などの 1 個の内液の分離を顕微鏡ステージ上で行える装置の構築を目標としている。今回は、神経伝達物質である dopamine, serotonin を用いシステムの検討を行った。検出には外径 7 μ m のカーボンファイバーを用いて電極を作成し、この電極をカラム末端に直接挿入し電気化学検出で行った。

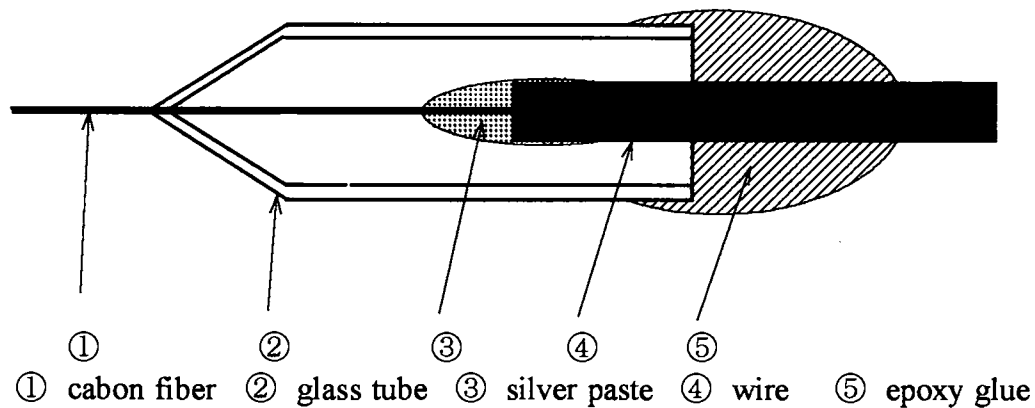
Figure 1 Schematic diagram for short column electrochromatography system



実験装置 Figure 1 参照

顕微鏡ステージ上にショートカラムとそのカラム両端にリザーバーを設定した。また、印加電圧としてカラム軸方向に対してカラム入り口側 (Fig.1 左側) を+, 出口側 (右側) をグランドとし 300V を印加し、測定電圧としてカーボン電極側を+として 750mV 印加した。ポンプはリザーバーの溶離液の交換とサンプルをカラム入り口へ運ぶために使い、サンプルの導入はポンプによる圧力差流によるのではなく、電気浸透流とサンプルの電気移動度によって行う。ポンプはハンディークロマト HC-2001 (旭テクネイオン社)、検出器には R8240 デジタル・エレクトロメータ (アドバンテスト(株)) を使用した。

Figure 2 A sketch of home-made carbon fiber electrode



カーボン電極の作成法

ここでは、Figure2に自作したカーボン電極を示した。

作成手順

1. carbon fiber を1本顕微鏡下で取り分けガラス管に通す。
2. このガラス管をニクロム線で熱しながら引っ張り carbon fiber を密着させる。
3. 導線と carbon fiber を接着するために silver paste を塗る。
4. ガラス管を導線に固定するためにエポキシボンドで接着する。
5. carbon fiber の先端を 0.05mm ほど残し瞬間接着剤でコーティングする。

結果と考察

充填長 23mm の短いカラムを用いて ($\times 10^{-11}$) 試料の分離を試みた。ここで充填剤として ODS C-18 (資生堂 capcell C-18) を内径 75 μ m のフューズドシリカキャピラリーに充填しカラムとして用いた。結果を Figure 3 に示した。

このクロマトグラムから 580 秒付

近にピークが確認された。この装置による神経伝達物質の分離の可能性を見いだすことができた。複数の生体試料を含んだサンプルを用いて分離を現在、試みている。

実際のシングルセル内の神経伝達物質の濃度は 0.01mM ~ 1mM 程度で、たとえば直径 7 μ m の神経細胞では内液は 0.2pl 程度であるのでこのような微量サンプルの検出が行えるような実験条件を検討している。

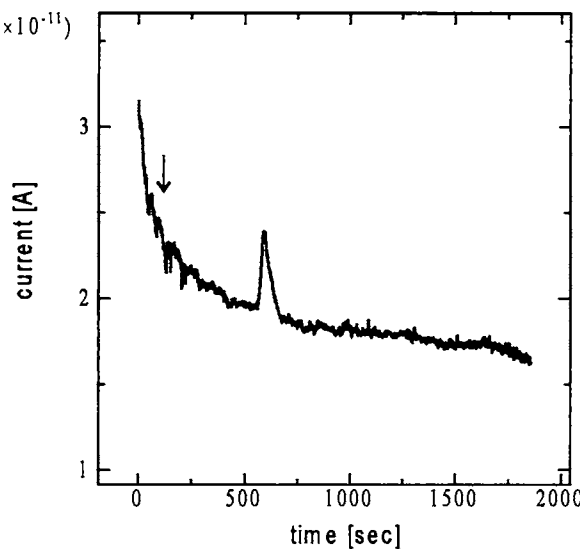


Figure 3
detection of serotonin

<実験条件>

- sample 10mM serotonin
- eluent 0.1M リン酸 buffer + アセトニトリル (80:20 pH3.0)
- column 42mm \times 0.075mm I.D
充填剤 ODS C-18
充填長 23mm
- detect ECD 750mV
- flow rate 120 μ l / min
- voltage 300 V

100sec で inject した。(↓)

P14

SC17
Tokyo'97

キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その3 試薬含有泳動液を用いるキャピラリー通過方式による誘導体化

多賀 淳*、西野晶、本田 進
近畿大・薬

Analytical Methods Utilizing a Capillary for Reaction and Separation Part 3 Derivatization in a Reagent-Containing Electrophoretic Solution Using the Throughout-Capillary Derivatization Format Atsushi Taga*, Aki Nishino and Susumu Honda Faculty of Pharmaceutical Sciences, KINKI UNIVERSITY

ABSTRACT Amino acids could be converted to *o*-phthalaldehyde (OPA) derivatives, which were concurrently separated from each other while they were moving through a capillary containing OPA in the electric field. Plot of concentration of each amino acid vs. relative peak response to an internal standard gave a straight line. Although amino acids could be analysed very simply and rapidly by this method, the electropherograms showed a tendency to give noisy and sometimes drifty base line. In this paper this throughout-capillary derivatization format was compared with the at-inlet and the passing-zone formats with regards to simplicity, reproducibility and sensitivity.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動におけるキャピラリー内誘導体化には、キャピラリー先端において誘導体化を行い反応終了後に分析するタイプ (at-inlet type)¹⁾、キャピラリー中に試薬ゾーンを形成し、移動速度の異なる試料がそのゾーンを通過する間に反応させるタイプ (zone-passing type)²⁾ および試薬含有泳動液を用いることにより電気泳動させながら誘導体化を行うタイプ (throughout-capillary type) の3者が考えられるが、これらのうち前2者については昨年の本シンポジウム等において基礎検討の結果を報告した。今回は最後の throughout-capillary type について若干の検討を行い、これら3つのtypeの特徴を比較した。

2. 実験方法

Throughout-capillary 誘導体化の検討には電気泳動装置として日本分光 870-CE UV/VIS 型検出器および Matsusada Precision Devices HEL-30PI 型高電圧電源を用い、キャピラリーには内径 50 μm 、長さ 70 cm のフューズドシリカ管を用いた。泳動液にはアミノ基標識試薬である *o*-phthalaldehyde (OPA) を 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) に 50 mM 濃度で溶かしたものを使用した。インキャピラリー誘導体化の3つのtypeの比較には Applied Biosystems 270A 型装置に長さ 71 cm のフューズドシリカ管を装着して用いた。泳動液には 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.0) を使用した。試液

には 50 mM 濃度で OPA を泳動液に添加したものを、試料溶液はグリシン (Gly)、フェニルアラニン (Phe) およびグルタミン酸 (Glu) ならびにケイ皮酸 (CA、内部標準) を同緩衝液に溶かして調製した。

3. 結果と考察

OPA 含有泳動液を用いて throughout-capillary 誘導体化により Phe、Gly および Glu を分析したところ、これら 3 種のアミノ酸および内部標準の CA はそれぞれフロンティングの傾向はあるものの良好なピーク形状を与え、互いに良く分離した。また、CA を内部標準として検量線を作成したところ、0.2~10 mM の範囲で相関係数 0.99 以上の直線性が得られた。しかしながら、誘導体化の過程において生成すると思われる複数の小ピークが見られた。そこでサンプルチューブ中で同様の反応条件により Gly を OPA 化したものを HPLC により分析したところ、この場合もやはりメインピークのほか複数の小ピークがみられたため、それぞれのピーク画分を分取し FAB-MS を用いて分子量を測定することにより主生成物および副生成物の構造を推測した。

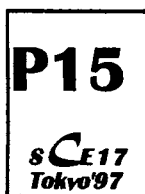
In-capillary 誘導体化における 3 つの type で同一試料を分析し、理論段数、ピークレスポンスおよび S/N 比の 3 つのパラメータを求めそれらを比較したところ、理論段数については、at-inlet type は pre-capillary 誘導体化には劣るもののいずれの試料についてもほぼ同等の高値を与え、zone-passing type はいずれの試料についてもほぼ同等の低値を与えたが、throughout-capillary type は Gly のみ著しい低値を与え、Phe および Glu は高値を与えた。これは電気泳動しながら誘導体化を行うために、未反応物と誘導体の移動速度の差が大きい試料においてはピークが広がり、移動速度の差が小さい試料においてはそのような影響が少なかったためと考えられる。ピークレスポンスについて最も高い値を与えたのは at-inlet type であり、pre-capillary 誘導体化とほぼ同等であった。次いで throughout-capillary type、zone-passing type の順であった。S/N 比についても at-inlet type が最も高い値を与え、次に throughout-capillary type、zone-passing type の順であった。

これらの比較から 3 つの type の in-capillary 誘導体化の特徴をまとめると、①誘導体と未反応物の移動速度がほぼ同じで、かつ誘導体化の反応条件に適した泳動液で分離できる場合には、操作が簡便かつ短時間での分析が可能な throughout-capillary type が最適であると思われる。②誘導体と未反応物の移動速度が大きく異なる試料においては、ピーク幅が著しく広がる。この場合にはむしろ at-inlet type が適している。また、反応条件に適した泳動液では分離が困難であり分析条件の検討が必要な場合にも、at-inlet type が適していると思われる。③一方、分離定量が目的ではなく比較的速度の速い反応の速度定数を求めようとする場合には、誘導体化試薬のピーク幅および試料の移動速度から反応時間を知ることができる zone-passing type が最適であると思われる。

このようにこれら 3 type の in-capillary 誘導体化はそれぞれ異なった特徴を持っているため、目的に合わせて type を選択すれば迅速微量分析や高速反応の解析が可能になるものと思われる。

4. 文献

- 1) A. Taga, S. Honda, *J. Chromatogr. A* 742(1996) 243-250.
- 2) A. Taga, M. Sugimura and S. Honda, submitted to *J. Chromatogr.*



キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その4 キャピラリー入り口での誘導体化による糖のPMP化

多賀 淳、本田 進*
近畿大・薬

Analytical Methods Utilizing a Capillary for Reaction and Separation Part 4

Derivatization of Carbohydrates with PMP Using the At-Inlet Derivatization Format

Atsushi Taga and Susumu Honda*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, KINKI UNIVERSITY

ABSTRACT In-capillary derivatization of reducing carbohydrates with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) at the inlet of a capillary was studied using maltopentaose as a carbohydrate model. Tandem zones of a sample and a reagent solutions were created at the inlet, which was driven to an appropriate position in a capillary secured in a thermostated oven and allowed to react by standing it for various times. At the maximum oven temperature (57°C) maltopentaose was completely derivatized with PMP in a slightly alkaline borate buffer (200 mM, pH 8.2) in 45~50 min. This method allowed derivatization of minute amounts of carbohydrates, but separation of the derivatives of monosaccharides was interfered by a large peak of the reagent. However, it was proved useful for the kinetic study of the derivatization reaction.

1. はじめに

キャピラリーを分離の場だけでなく、化学反応の場とする分析法にはいくつかの型がある。演者らはそれぞれの型について基本的な問題を検討し、それらの結果を本シリーズで報告してきた。それらの型のうちキャピラリー入り口で反応させたのち生成物を分析する at-inlet 型¹⁾については本シリーズ第1報²⁾で基礎検討の結果を報告した。この報告はアミノ酸を *o*-phthalaldehyde で誘導体化するという、高速反応を利用した系を対象とした研究に関するものであったが、この方法を一般化するためには比較的遅い反応についても検討する必要がある。そこで本報では還元糖を 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) で誘導体化する系について検討を行い、得られた結果を考察する。

2. 実験方法

電気泳動 Applied Biosystems 270A 型装置に 内径 50 μm 、全長 71 cm、有効長 49 cm のフューズドシリカ管を装着して使用し、泳動液には 200 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.2) を使用した。また、同一緩衝液に 25 mM 濃度で PMP を溶かしたものを誘導体化試液として使用した。**PMP による糖の誘導体化** 糖鎖モデルにはマルトペンタオースを用いた。既法³⁾を基に目的に適った条件を探して誘導体化を行った。検出は糖鎖-PMP 誘導体の極大吸収波長である 245 nm における紫外外部吸収を測定することにより行った。

3. 結果と考察

HPLC における糖のプレカラム標識用に開発された PMP 法はバッチ法により最適化され、得られた条件は 70°C、30 min³⁾ と比較的高温で長時間であった。しかし at-inlet 型の in-capillary 誘導体化によりこれを行う場合には、装置の構造上キャピラリー入り口は温度がコントロールされていないために、OPA/アミノ酸の系に対して用いたサンドイッチモード (本シリーズ第 1 報) による導入方法をそのまま糖鎖の PMP 化に適用することはできなかった。そこで温度コントロールされたキャピラリーオープン内まで試料および試薬ゾーンを移動させて反応させることについて検討した。この場合、吸引あるいは加圧法により強制的に移動させるとゾーンが著しく広がるため良好な分離が得られなかった。そのため電圧を印加することにより移動させることにした。種々検討した結果、泳動液に 200 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.2) を使用した場合には、試薬 10 sec および試料 1.5 sec を吸引法によりそれぞれ導入したのち 5 kV、3 min 電圧を印加した場合に最も良い結果が得られた。この条件で試料および試薬を導入し、種々の時間放置して誘導体化を行ったのちマルトペンタオース-PMP 誘導体の分析を行った。その生成量からマルトペンタオース残存量を求めた (Fig. 1a) ところ、反応が終了するまでには 45 min ~ 50 min と、バッチ法における最適条件よりも長時間が必要であった。これは用いた反応条件において試薬濃度が低く、また装置の都合上反応温度を十分高くすることができなかったためと考えられる。これらの結果を基にして種々の糖質を PMP で誘導体化し、生成物を直ちにこの系で分析した。オリゴ糖についてはある程度分離が期待できるものの、単糖は試薬の大きなピークに妨害され、分析できなかった。高 pH での分析ではこの問題が解決されることが考えられるが、このような条件は誘導体化には適さない。この問題については今後検討する必要があると思われる。一方、得られた結果から反応時間に対して未反応物濃度の対数をプロットしたところ良好な直線が得られた (Fig. 1b)。このプロットから本実験条件におけるマルトペンタオース/PMP の反応は一次反応であることがわかり、その反応速度定数として $6.16 \times 10^{-2} \text{ (sec}^{-1}\text{)}$ という値を得ることができた。

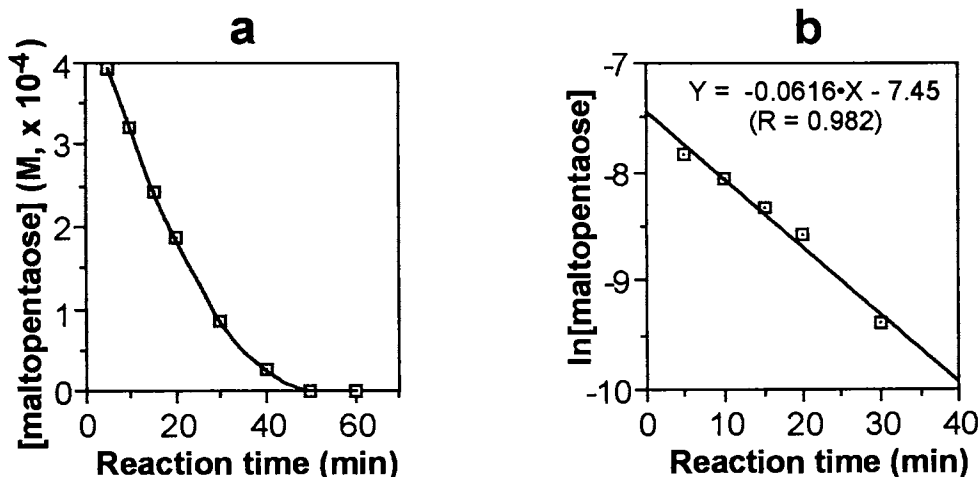
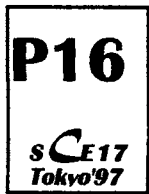


Fig. 1. a; Time course of reduction of maltopentaose concentration.
b; Plot of ln[remaining maltopentaose] vs. reaction time

4. 文献

- 1) A. Taga, S. Honda, *J. Chromatogr. A* 742(1996) 243-250.
- 2) 多賀淳, 本田進, 第16回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, 43-1~43-2(1996).
- 3) S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, 180(1989) 351-357.



シクロデキストリン修飾キャピラリーゾーン電気泳動における
ジメチル- β -シクロデキストリンの組成がキラル識別能に及ぼす効果
加藤純也*¹⁾、本田周平¹⁾、大塚浩二¹⁾、寺部 茂¹⁾、木全一博²⁾、田中信男²⁾
1)姫路工大・理、2)京都工繊大・繊維

Effects of compositions of dimethyl- β -cyclodextrin on chiral selectivity in CD modified CZE

Junya Kato*¹⁾, Shuhei Honda¹⁾, Koji Otsuka¹⁾, Shigeru Terabe¹⁾, Kazuhiro Kimata²⁾,
Nobuo Tanaka²⁾

¹⁾Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12, Japan

²⁾Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

In cyclodextrin modified capillary zone electrophoresis (CD-CZE), various CDs are used to achieve chiral recognition. For example, electrically neutral dimethyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD) is used for enantiomeric separation of various ionic drugs. However, we found that enantioselectivities achieved by using DM- β -CD from five different suppliers were significantly different from each other. The difference in enantiomeric selectivities is then studied by generating and comparing the binding constants of several enantiomeric drugs.

1.はじめに

ジメチル- β -シクロデキストリン (DM- β -CD) をキラルセレクトに用いるシクロデキストリン修飾キャピラリーゾーン電気泳動 (CD-CZE) による光学異性体の分離において、異なったメーカーから入手したDM- β -CDを使用した場合に試料によっては光学分割の程度に大きな差異が生じる。これは、メーカーによってDM- β -CDにおけるメチル化の程度に差があるためと考えられる。実際に5社から入手したDM- β -CDをHPLC、NMR、MSを用いて比較検討したところ、その組成に差があることが明らかになった。ここでは各社のDM- β -CDといくつかの試料との結合定数を求め、比較検討した結果について報告する。

2.実験

キャピラリー電気泳動装置にはP/ACE System 2200 (Beckman) を、分離キャピラリーには内径50 μ m、全長37 cm、有効長30 cmの内面無処理のフューズドシリカキャピラリー (Polymicro Technologies) を、分離溶液には3, 6, 9, 12, 15 mM DM- β -CD (pH 3.0) を用いた。検出波長は200 nm、印加電圧は20 kV、温度は25 $^{\circ}$ Cとし、試料には種々のイオン性薬物成分を用いた。

3.結果・考察

Fig.1にE社から入手したDM-β-CDをキラル認識剤とし、Terbutalineを試料として用いた場合のDM-β-CD濃度と試料の電気泳動移動度との関係を種々の形式でプロットしたグラフを示す。このグラフでのそれぞれのプロットから結合定数を算出することができる[1,2]。Table1に、Fig.1に示したプロットを用いて最小二乗法により計算したTerbutalineおよびClorprenalineに対する結合定数の値と、それらから求めた分離係数(α)の値を示す。3種類のプロットから求めた結合定数およびαの値は、それぞれの試料についていずれもややばらつきが認められる。これは各プロットの直線性があまり良くなかったことに起因すると考えられ、その原因については現在検討中である。

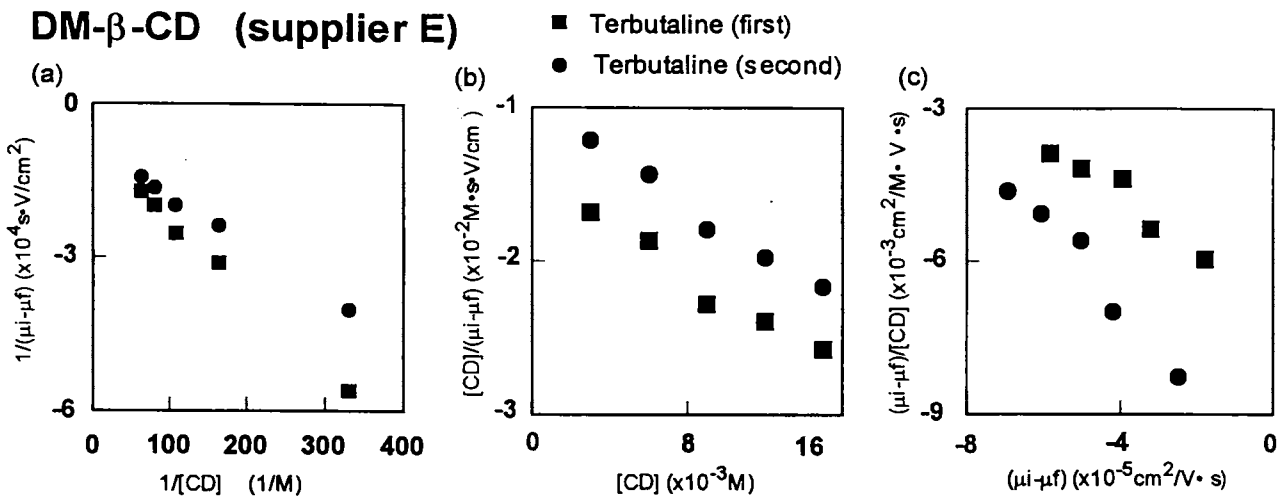


Fig.1. Dependence of various kinds of electrophoretic mobilities(μ) on concentrations of DM-β-CD. (a)Double reciprocal plot. (b)y-Reciprocal plot. (c)x-Reciprocal plot.

Table1. Binding constants (M⁻¹) for Terbutaline and Clorprenaline to DM-β-CD (supplier E).

	Double reciprocal plot	y-reciprocal plot	x-reciprocal plot
Terbutaline first	55.78	52.36	53.06
second	88.40	83.30	85.28
α value	1.585	1.591	1.607
Clorprenaline first	21.17	24.26	23.85
second	34.10	36.61	36.29
α value	1.611	1.509	1.522

[1] R. Kuhn, R. Frei, M. Christen, *Anal.Biochem.*, 218(1994) 131-135.

[2] K. L. Rundlett, D. W. Armstrong, *J.Chromatogr.A*, 721(1996) 173-186.

P17

SCF17
Tokyo'97

非水ゾーンを用いるキャピラリー電気泳動による光学分割

小林 信昭*, 大塚 浩二, 寺部 茂
姫路工大・理

Enantiomer Separation by Capillary Electrophoresis Using a Non-Aqueous Zone

Nobuaki Kobayashi*, Koji Otsuka, Shigeru Terabe

Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1201, Japan

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) is normally operated with aqueous buffer solutions and hence, separation of highly hydrophobic compounds and/or the use of highly hydrophobic additives are difficult even though by using separation buffers containing organic modifiers. In this study, the use of non-aqueous solutions in CE was investigated for enantiomer separations. We used a conventional CE technique with non-aqueous solutions and also the partial-filling technique of a non-aqueous zone, where both non-aqueous solutions contained chiral selectors, such as various cyclodextrins (CDs), CD derivatives, and a chiral polymer used as an enantioselective packing for HPLC. By using a dimethyl sulfoxide solution containing β -CD, enantiomer separation of three herbicides were successfully achieved.

1. はじめに

通常CEでは水系の泳動溶液が使用されるため、一般に水に難溶性の物質の分析は困難であり、また分離溶液への添加剤として脂溶性の高い物質の利用も難しい。これまで、泳動溶液に有機溶媒を高濃度に添加することによりある程度の脂溶性試料の分析は可能となってきているが、極めて疎水性の高い物質の分析は水系溶液を使用する限りほとんど不可能であると言わざるを得ない。

近年、非水溶液を用いるCEに関する研究がさかんに行われるようになり、疎水性試料の分析への応用も期待されている。我々はこれまでに、非水溶液を用いるCEについて基礎的な検討を行っており、通常のカピラリー内全体に非水溶液を満たす方法と、非水溶液をキャピラリー内の一部に導入する部分注入法の双方について報告している[1,2]。本実験ではこれらの結果に基づいて、非水溶液を用いるCEの光学異性体分析への応用について検討を行った。ここでは、不斉認識剤として種々のシクロデキストリン(CD)及び水に難溶性のキラルポリマーを使用し、キャピラリー内全体に非水溶液だけを満たした場合と非水溶液の部分注入を行った場合のそれぞれについて、光学異性体の分離の可能性を検討した結果について報告する。

2. 実験

CE装置にはBeckman P/ACE System 2000を、分離キャピラリーには内径 50 μm 、有効長30または50 cmの内面無処理のフューズドシリカキャピラリー(Polymicro Technologies)を用いた。使用したキラル認識剤は、脂溶性のキラルポリマーである OD-R (ダイセル化学工業より提供を受けたもの)と、種々のCD及びCD誘導体である。水系分離溶液にはリン酸塩緩衝液 (pH 2.5 または 6.0) に種々の有機溶媒を添加したものをを用いた。非水溶液には、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、アセトン、ジメチルスルホキシド(DMSO)、2-プロパノール、アセトニトリル等の有機溶媒に、酢酸アンモニウム、過塩素

酸塩等の電解質を添加し、キラル認識剤を溶解させたものを使用した。光学異性体試料には、種々の薬物成分、アミノ酸及びその誘導体、除草剤成分等のラセミ体を使用した。

3. 結果と考察

1) CDをキラル認識剤とする場合

主に除草剤成分を試料として検討を行った。通常的水系CEではトリメチル- β -CDにより数種の除草剤の相互分離と各ラセミ体の光学分割が可能である[3]が、種々のCDを含む非水ゾーンを利用する部分注入法では光学分割を行うことはできなかった。

一方、キャピラリー内全体に非水溶液を満たす通常のCE手法では、有機溶媒にDMF及びアセトニトリルを用いた場合には光学異性体の分離は不可能であったが、 β -CDのDMSO溶液を用いると、3種の除草剤成分の相互分離と光学分割が達成され (Fig. 1), 水系条件とは分離選択性が異なることも明らかとなった。

2) OD-Rをキラル認識剤とする場合

OD-Rポリマーは極めて疎水性が高く、DMFまたはアセトンに溶解させた後、他の有機溶媒、電解質(またはその溶液)を添加して溶液を調製した。OD-Rの濃度を0.5 ~ 200 mg/mLの範囲で変化させ、種々の有機溶媒の利用と、部分注入法及びキャピラリー内全体への注入法の各条件について比較検討を行ったが、いずれの場合においても試料の光学分割は不可能であった。特に部分注入法を用いる場合には、試料が検出器セルに到達する前にOD-Rゾーンを通過させるための条件設定が難しく、またゾーン前後におけるベースラインの乱れや不純物由来と思われるいくつかのピークによって試料ピークの確認が困難である等の問題が生じている。

非水溶液を用いるCEを用いることにより、水系CEとは異なった分離選択性を達成することが可能となり、また質量分析法(MS)との直接結合(CE-MS)も比較的容易に行えると考えられ、光学異性体分析への応用を含めて今後の進展が期待される。

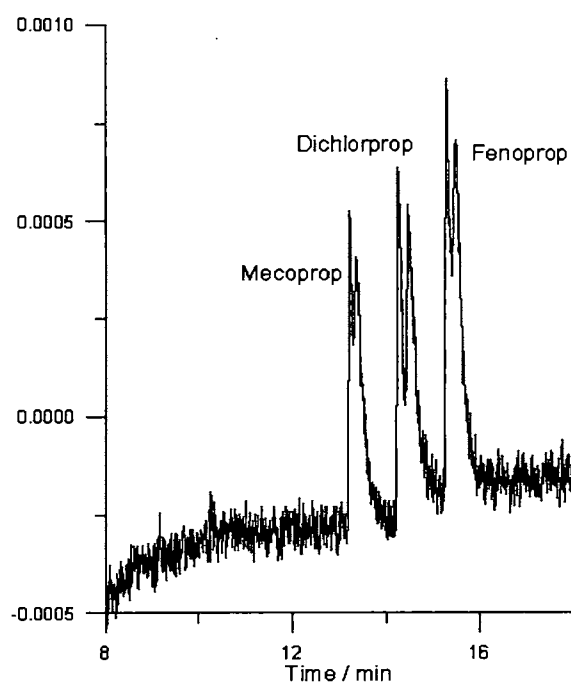
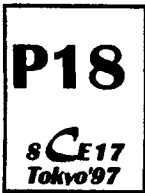


Fig. 1. Enantiomer separation of phenoxy acid herbicides by non-aqueous CE with β -CD. Separation solution, 15 mM β -CD in DMSO containing 10 mM ammonium acetate; capillary, 50 μ m i.d. x 300 mm; applied voltage, 20 kV (541 V/cm); detection wavelength, 254 nm.

1. 大塚, 寺部: *Abstracts of Papers*, 第15回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE'95), 広島, 1995; Abstract 21.
2. Otsuka, K.; Kamamoto, C.; Terabe, S. *Chromatography*, **1996**, *17*, 304-305.
3. Garrison, A. W.; Schmitt, P.; Kettrup, A. *J. Chromatogr. A*, **1994**, *688*, 317-327.



CZEによるヒトIgGミエローマ蛋白質の分析 —シアル酸を介した荷電不均一性—

久保兼信* 近畿大学 薬学部

CZE analysis of human IgG myeloma proteins: sialic acid-mediated charge heterogeneity

Kanenobu Kubo*

Faculty of pharmaceutical Sciences, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashiosaka, Osaka 577

Abstract

Human serum proteins including myeloma proteins (M proteins) were analyzed by capillary zone electrophoresis (CZE) using a linear polyacrylamide-coated capillary. Each of the two M proteins IgGs, which migrated to the beta and gamma zone, respectively, on cellulose acetate electrophoresis, were separated into two major peaks and more than 10 minor peaks. By incubation with neuraminidase, the major peaks with higher and lower mobility were found to be sialo-IgG and asialo-IgG, respectively. The sialo- and asialo-IgG, when incubated with N-glycosidase F, migrated as several peaks depend on the incubation time, and finally as a single peak with higher mobility than that of sialo-IgG.

1. はじめに

ミエローマ蛋白質は高度に均一な分子構造を示す。しかし、蛋白質の分離分析手法の進展は、この種の蛋白質がアミノ酸や糖鎖レベルでマイクロ不均一であることを明らかにして来ている。ところで、これらの分離・分析手法の多くは蛋白質の変性を伴い、そこでの結果は蛋白質構成ポリペプチド鎖についての知見であり、“生の蛋白質”としての特性が十分に反映されているとは言えない。キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)が示す高分離能は、蛋白質を生々の状態で取り扱うことを可能にし、それらのマイクロ不均一性を調べる研究手段として利用できる(1, 2)。

今回はミエローマ由来ヒトIgGのsialoとasialoを“生”の状態にCZEにより分離・分析することを試みた。

2. 実験

キャピラリー（内径 75 μ m, 有効長 25 cm, 全長 33 cm, 大塚電子）内表面は、7%モノアクリルアミドの重合によって被覆した(1)。電気泳動緩衝液には、0.1 M HEPES-Tris, pH 7.4 あるいは 0.1 M CHES-Tris, pH 9.1 を用いた。電気泳動は Quanta-4000 キャピラリー電気泳動装置（ウオターズ社）を用いて、印加電圧 20 kV、検出波長 220 nm、室温（26°C）下で行った。セルロースアセテート膜電気泳動において、 β あるいは γ 位に検出された IgG クラスの M 蛋白質を含むヒト血清を試料とした。M 蛋白質はプロテイン G カラムによる精製後、限外ろ過により当初の濃度に濃縮した。グリコシダーゼとして Neuraminidase, N-glycosidase F そして Endoglycosidase F を用いた。

3. 結果と考察

CAE 上 γ 位に認められた M 蛋白質は、pH 9.1 での CZE において、2本の主ピークと約10本の副ピークとして検出できた (Fig. 1A)。ピーク 2 は Neuraminidase 処理によってピーク 1 に収束した (Fig. 1B)。同時に数本の副ピークの消失が認められた。ピーク 2 のピーク 1 への移動度の低下はシアル酸の遊離に伴うマイナスチャージの減少と一致していた。 β 位の M 蛋白質（電気泳動、pH 7.4）についても、 γ 位の M 蛋白質のそれらと類似の結果が得られた。この結果、ピーク 2 は sialo-IgG、ピーク 1 は asialo-IgG であると考えられる。他方、N-glycosidase F 処理は、Fig. 1 で認められたピーク 1 と 2 そして多くの副ピークを消失させ、高い移動度を示す 1本の主ピーク 5 と複数の副ピークを新たに生成させた (Fig. 1D)。ピーク 1 と 2 のピーク 5 へのコンバートは、それぞれ 1 \rightarrow 3 \rightarrow 5 そして 2 \rightarrow 4 \rightarrow 5 と段階的に進行した (Fig. 1C)。これは、2個の CH2 ドメインに結合した2本の糖鎖の内、片方の遊離が完結した後に他方の糖鎖の遊離が始まることを示唆している。Endoglycosidase F は M 蛋白質の電気泳動図に変化をもたらさなかった。

これらの結果は、ミエローマ IgG はシアル酸について不均一であり、sialo-IgG と asialo-IgG を別個のピークとして、そして IgG 本体（脱糖体）は単一のピークとして、CZE で検出できることがわかった。

Ref. 1). K. Kubo, Anal. Biochem. 241 (1996) 680-685.

2). K. Kubo, J. Chromatogr B 697 (1997) 217-222.

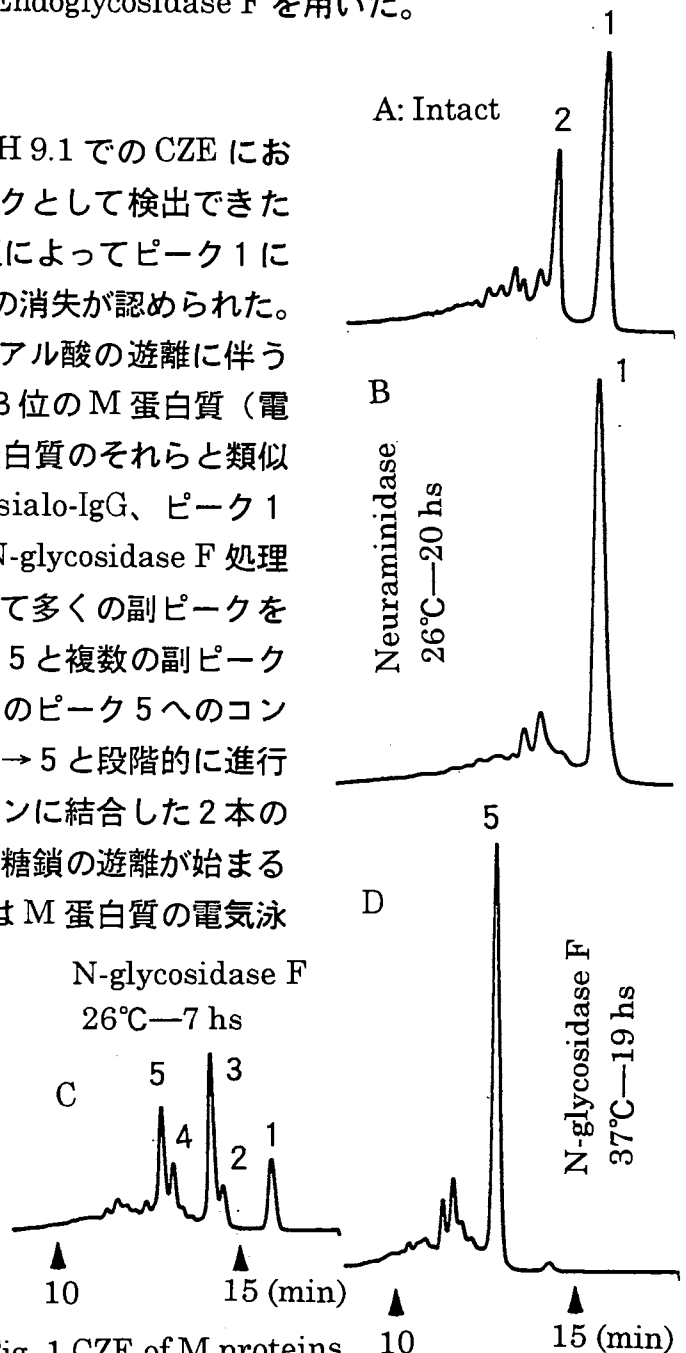
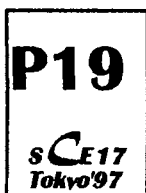


Fig. 1 CZE of M proteins



キャピラリー電気泳動を用いるアルブミン分子上の薬物結合部位の同定

(京大・薬) 新井廉代*、澁川明正、中川照眞

Identification of drug binding site on serum albumin molecule by using capillary electrophoresis

Yukiyo Arai*, Akimasa Shibukawa, Terumichi Nakagawa

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Frontal analysis incorporated into capillary electrophoresis (CE/FA) is a new microtechnology which we developed to measure unbound drug concentration under drug-protein binding equilibrium. CE/FA was applied to identify the binding site of semotiadil (R-isomer) and levosemotiadil (S-isomer) on human serum albumin molecule. Since these enantiomers are hydrophobic and bound to plasma proteins very strongly, conventional methods such as ultrafiltration and equilibrium dialysis are not suitable for the binding analysis of such drugs. The unbound drug concentrations in 50 μ M R- (or S-) isomer and 100 μ M HSA mixed solution before and after addition of a binding inhibitor (100 μ M warfarin or 100 μ M diazepam) were determined by CE/FA. The unbound drug concentrations were increased by addition of diazepam but not by addition of warfarin, indicating that the binding site of both enantiomers is site II (diazepam site).

【緒言】

薬物は血漿中でアルブミンなどのタンパク質と可逆的に結合（血漿タンパク結合）している。非結合型薬物は血中から組織内に容易に移行できるが、結合型薬物は血管壁を通過できないので、薬理効果・副作用の発現や薬物体内動態は血漿タンパク結合の影響を強く受ける。また、光学活性な薬物のタンパク結合は光学異性体間で異なる場合が多く、体内動態が異性体間で異なる原因となる。したがって、有効かつ安全な薬物の開発と使用のためには立体選択的タンパク結合研究が不可欠であり、そのためには非結合型薬物濃度の測定が必要である。

一方、我々は先端分析法をキャピラリー電気泳動に組込むことにより非タンパク結合型薬物濃度を直接注入分析できる新規分析法（CE/FA法）を開発した。本法は超微量の試料注入量（約 100nL）で分析することができるとともに、限外ろ過などの従来法で問題となる薬物の膜への吸着や結合型薬物の漏れに基づく誤差を回避できる。今回は、CE/FA法をヒト血清アルブミン（HSA）分子上の結合部位同定に適用した。

【実験条件】

HPCE 装置、P/ACE5510（ベックマン社）。泳動緩衝液、50mM リン酸緩衝液(pH2.5)。印

加電圧、+10kV。検出波長、UV200nm。試料薬物には、塩基性薬物であるセモチアジル (R 体、Ca チャンネル遮断薬) とその光学異性体であるレボセモチアジル (S 体) を用いた。各異性体とも血漿タンパク質と強く結合し、限外ろ過法などの従来法を用いる結合分析は困難であった。

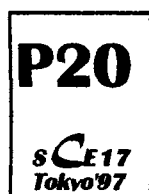
【結果】

溶融シリカキャピラリー (内径 75 μ m、全長 37cm、有効長 30cm) に酸性泳動緩衝液を満たし、試料溶液の溶媒と同じ組成の中性りん酸緩衝液 (pH7.4, I=0.17) を 0.1 秒間吸引した後、電気的注入法 (+10kV、100 秒) で試料注入を行なった。酸性緩衝液を用いているため電気浸透流が発生しないので負電荷を帯びたアルブミンや結合型薬物はキャピラリー内に導入されず、正電荷を有する非結合型薬物が選択的に導入された。なお、試料注入前にあらかじめ少量の中性緩衝液を導入するのは、中性の試料溶液が酸性泳動緩衝液に直接接触してタンパク結合平衡が乱れるのを防ぐためである。この結果、薬物はプラト一部分を有する帯状ピークとして検出され、プラト一高さから非結合型薬物濃度を求めることができる¹⁾。

アルブミンは多くの薬物の血漿タンパク結合に関与する代表的なタンパク質である。アルブミン分子上で薬物と強く結合する部位として、サイト I (warfarin site) とサイト II (diazepam site) が存在する。同一部位に結合する薬物を併用したり内因性結合阻害物質が蓄積すると、タンパク結合が阻害されて非結合型薬物濃度が増加し、副作用が発現したり体内動態に変化が生じる可能性があるため、結合部位の同定は重要である。そこで、50 μ M のセモチアジル (R 体) またはレボセモチアジル (S 体) と 100 μ M の HSA の混合溶液 (pH7.4, I=0.17) に各部位に結合する薬物 (100 μ M ワルファリン又は 100 μ M ジアゼパム) を添加し、非結合型薬物濃度の変化を調べた。結合阻害薬物添加前の非結合型薬物濃度は R 体が $12.3 \pm 0.08\mu$ M、S 体が $7.50 \pm 0.06\mu$ M であり、S 体の方が HSA と強く結合する。この試料に 100 μ M のジアゼパムを添加すると、R 体の非結合型濃度は 1.5 倍、S 体の非結合型濃度は 2.4 倍増加し、どちらの光学異性体ともジアゼパムにより結合阻害を受けた。一方、ワルファリンを添加した場合には、どちらの光学異性体とも非結合型濃度の変化はほとんど見られなかった。以上の結果から、HSA 分子上の結合部位は site II であることが示された。この知見は、HPLC 装置を用いる高性能先端分析法 (HPLC/FA 法) により得られた結果²⁾ と一致するが、CE/FA 法では HPLC/FA 法よりも 3 桁少ない試料注入量で分析できる利点がある。

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

2) 澁川明正、何静宜、中川照眞、第 12 回生体成分の分析化学シンポジウム講演要旨集(1997)、p372。



ConAアフィニティクロマトグラフィーで得られた血漿タンパク質 分画のキャピラリー等電点電気泳動

池田文恵*、向井 準、渡部賢二、真鍋 敬
愛媛大学理学部

Capillary Isoelectric Focusing of Human Plasma Fractions Obtained by ConA-Affinity Chromatography

Fumie IKEDA*, Jun MUKAI, Kenji WATANABE, Takashi MANABE

Faculty of Science, Ehime University

Abstract

The conditions of capillary isoelectric focusing (CIEF) were established for the analysis of protein fractions obtained by Concanavalin-A affinity chromatography of human plasma/serum samples. The CIEF patterns of the adsorbed fraction and the pass-through fraction differed each other reflecting the differences in protein composition.

1. はじめに

血漿タンパク質の多くは糖タンパク質であり、その微量成分の分画にはアフィニティクロマトグラフィーが有効である。得られた画分をキャピラリー電気泳動で分析できれば、分析による試料の損失を最小に抑えることができると考えられる。そこで血漿/血清タンパク質のConAアフィニティカラムからの溶出画分をキャピラリー等電点電気泳動により分析する条件を検討するとともに、糖タンパク質成分の解析を行った。

2. 実験

ConAアガロースはホーネンコーポレーションのものを用いた。アフィニティカラムは、プラスチック製の1 mLシリンジ(内径6mm)にConAアガロースを高さ1.6cmまで充填したものを使用した。ポンプはペリスタポンプアトーSJ-121(低流量タイプ)、検出器はスペクトラフィジックス社の波長可変分光光度計SC100、インテグレーターはJASCO社の807-ITを用いた。カラムと検出器は内径200 μ mのフューズドシリカキャピラリーでつないだ。カラムの流速は100 μ l/minとした。ヒト血漿/血清は5mM Tris-HCl-15mM NaCl緩衝液(pH7.2)で20倍に希釈してカラムに添加した。

キャピラリー電気泳動装置は、Hewlett-Packard製HD³⁰キャピラリー電気泳動システムを使用した。キャピラリーは内径75 μ m、全長29.5cm、有効長21cmのフューズドシリカキャピラリーをポリアクリルアミドで内壁処理したものをを用いた。両性電解質混合物は、ファルマシア社のAmpholine(3.5-10)を使用した。分取したサンプルは適当な濃度に希釈して2%ア

ンフォラインと等量混合した。陽極槽液を10mM H_3PO_4 、陰極槽液を10mM NaOH として370V/cmでタンパク質を収束させたのち、陰極槽液を10mM CH_3COOH に交換することでタンパク質を検出器まで移動させた。

3. 結果

ConAカラムへの糖タンパク質の吸着および溶出には50mM Tris-HCl 、0.15M NaCl 等の条件が一般的である。しかしイオン強度が大きいとキャピラリー等電点電気泳動(CIEF)の時に泳動時間が長くなる、カラムの劣化が早まる、等の影響があった。そこで緩衝液として5mM Tris-HCl -15mM NaCl を用いた。

20倍希釈ヒト血清1.0mlをConAカラムにかけた結果、緩衝液で溶出された画分(素通り画分)は約1.5ml(タンパク量約3mg)、0.2M- α -D-methylmannosideを含む緩衝液で溶出された画分(吸着画分)は約1ml(タンパク量は約1mg)であった。CIEFには1.5 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 程度タンパク量があれば充分であるので、溶出液は濃縮等の処理をせずそのまま分析できる。ただし、前記の緩衝液でも、泳動開始直後は電流値が大きくなるので、電流値の上限を5 μA に設定し、等電点への収束時間は15分とした。それぞれの画分をCIEFにかけた結果を図.1および2に示す。素通り画分にはIgGの一部とアルブミンが、吸着画分にはIgGの一部とトランスフェリンほかのタンパク質が分離されていると考えられた。そこで各画分についてさらにサイズ分離キャピラリーSDS電気泳動およびマイクロ2次元電気泳動で分析し、キャピラリー等電点電気泳動の結果と総合して血漿タンパク質の解析を行った。

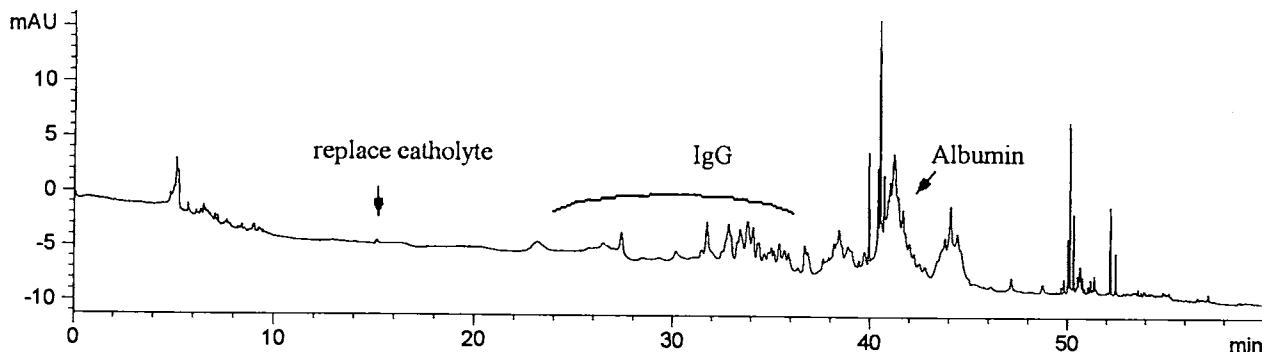


図1. ConAカラム素通り画分のキャピラリー等電点電気泳動

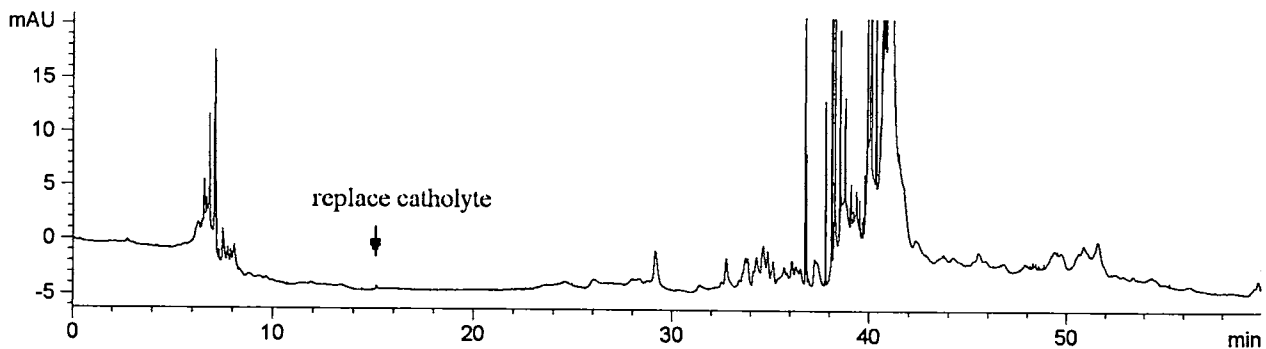
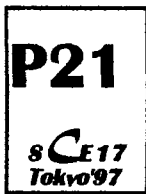


図2. ConAカラム吸着画分のキャピラリー等電点電気泳動



キャピラリー等電点電気泳動による α_1 -酸性糖タンパク質の分析

(京大薬) 曾 旻*、曹 波、澁川明正、中川照眞

CAPILLARY ISOELECTRIC FOCUSING OF HUMAN α_1 -ACID GLYCOPROTEIN

Min Zeng*, Bo Gao, Akimasa Shibukawa, Terumichi Nakagawa.

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University.

Abstract

α_1 -acid glycoprotein (AGP) is a major plasma protein involved in plasma transportation of basic drugs. AGP shows considerable microheterogeneity which varies under several physiological and pathological states. This paper describes application of capillary isoelectric focusing (CIEF) to the simple analysis of AGP microheterogeneity. Acidic ampholyte solution (pH3-5) was filled into a capillary, the inner surface of which was coated with a linear polyacrylamide. Focusing was carried out for 7min at 13kV using 20mM H_3PO_4 as anolyte and 20mM NaOH as catholyte, followed by a chemical mobilization. AGP was resolved into eight peaks of its glycoforms due to the difference in their pI values, and these glycoforms showed the same UV spectra. The calibration curve shows good linearity ($R>0.99$) within the AGP concentration range of 0.30~1.5g/L, which covers the physiological plasma concentration level of this protein.

【はじめに】

代表的な血漿糖タンパク質である α_1 -酸性糖タンパク (AGP) は5本の糖鎖を有し、糖鎖構造の違いに由来するミクロな不均一性(microheterogeneity)を示す。AGPは塩基性薬物の血漿タンパク結合に深く関与するが、その糖鎖構造がタンパク結合に及ぼす影響は不明な点が多く、その解明にはAGPの不均一性の簡便な分析法が不可欠である。また、血漿中のAGP濃度は外傷、腫瘍、炎症、感染症などの病態下において上昇するが、最近、AGP糖鎖構造の不均一性も病態時に変動することが判明し、病態診断の観点からもAGPミクロ不均一性の分析が注目されている。そこで我々は、キャピラリー等電点電気泳動法(CIEF)を用いて、糖鎖末端シアル酸残基数の相違に由来する

AGP の charge heterogeneity の簡便な分析法を開発した。

【実験】

キャピラリー電気泳動装置には CAPI 3000 (大塚電子) を使用した。溶融シリカキャピラリー (全長 52cm、有効長 40cm、内径 0.075mm) は Hjerten 法 (J. Chromatogr., 347, 191-198, 1985) により内面をリニアポリアクリルアミドでコーティングして使用した。陽極溶液には 20mM リン酸を、陰極溶液には 20mM NaOH を使用して、+13kV で 7 分間フォーカシングを行い、次に、陰極溶液を 20mM NaOH から 20mM リン酸溶液に交換した後に電圧 (+13kV) を印加して、化学的移動 (chemical mobilization) を行った。カラム温度、25°C。検出波長、UV 220nm。

【結果と考察】

キャピラリー内に 1% のアンフォライト (Servalyte pH3-5, Serva 社) 水溶液を満した後、AGP 溶液 (0.3g/L) を 2 秒間吸引注入し、+13kV で 7 分間フォーカシングを行った。次に、陰極溶液を 20mM NaOH から 20mM リン酸溶液に交換した後に電圧 (+13kV) を印加して、収束したタンパク質ゾーンを陰極方向 (検出側) に移動した。AGP (pI3.6-4.0) は 8 本ピークに分離されて、従来法である薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動と同程度の分離が得られた。各ピークの UV スペクトルは完全に一致した。従来法ではタンパクゾーンの染色などにより操作が煩雑で時間がかかるという問題点があるが、CIEF 法はオンラインで検出でき、操作性に優れている。各ピークは 20 分から 26 分 (フォーカシング後 13~19 分) の間に出現し、移動時間の再現性 (CV%) は 0.4%~1.26% (フォーカシング後 0.59%~1.73%) (n=5) であり、良好な再現性が得られた。また、主要な 6 本ピークの相対ピーク面積 (総ピーク面積に対する各ピーク面積の比) の CV 値は 1.37%~8.52% (n=5) であり、総ピーク面積の再現性 (CV%) は 4.2% であった。濃度範囲 0.3g/L~1.5g/L (AGP の生理的血漿中濃度をカバー) で AGP 検量線は良好な直線関係 (相関係数 > 0.99) を示した。今後、分離の一層の向上と heterogeneity の確認を行なう予定である。



***C.elegans* タンパク質画分のキャピラリー等電点電気泳動**

小林 英三郎*、関根 真紀、鈴木 望与

城西大学理学部 350-02 埼玉県坂戸市けやき台 1-1

Capillary Isoelectric Focusing of *C.elegans* Proteins Fractionated by Ammonium Sulfate

Hidesaburo Kobayashi, Maki Sekine and Miyo Suzuki

Department of Chemistry, Faculty of Science, Josai University

Keyakidai, Sakado, Saitama, 350-02 Japan e-mail: hkoba@pop.josai.ac.jp

Abstract

Analyses of protein fractionated by ammonium sulfate from *C. elegans* crude extract were carried out using capillary isoelectric focusing (cIEF). In this study the marker proteins were good results which provided a linear relationship between pI and migration time, nevertheless more complex protein mixtures, *C. elegans* fractionated samples, were not focused within desired time. These phenomena might depend on viscosity of gel and sample mixture. In the case of using low viscosity gel prepared from methylcellulose, the times of isoelectric focusing were shortened to 7 fold than using more high viscosity gel but the peaks were slightly wider than the later condition. We are trying to search gel for making an optimum condition of analysis of *C. elegans* proteins.

はじめに

線虫 (*C.elegans*) の DNA 解析は急速に進展しており、その全塩基配列 100 Mb の解析は 1998 年までに完了すると予測されている。既に 15,000 の全遺伝子のうち 3 分の 2 の解析が進行し、mRNA として約半分の 7,000 の遺伝子が分離され、神経、筋肉、生殖器など動物の基本体勢をもつこの虫は動物の発生、分化、老化の研究対象として多くのものが期待されている。しかしながら、この虫のタンパク質の研究は核酸ほど展開しておらず、タンパク質研究の基礎となるマップの作成をはじめとし構造と機能の解析が急がれている。タンパクマップは従来 2 次元ゲル電気泳動が多用されているが、我々はさらに迅速で高分離能を期待できるキャピラリー等電点電気泳動 (cIEF) を用いて等電点測定を行い、HPLC (イオン交換、疎水性クロマト) での分離および MALDI-TOF/MS での分子量の測定と組み合わせた多次元タンパクマップの作成を試みている。ここでは線虫抽出物の塩析分画物を試料とし等電点電気泳動の測定条件を検討したことを報告する。

実験

試料：大腸菌を餌として生育した線虫抽出液から硫酸アンモニウムにより 0-30、30-45、45-60、60-90% 塩析画分を得、これらを 20 mM トリス緩衝液 (pH 7.0) で透析し等電点測定用試料として用いた。

キャピラリー等電点電気泳動：キャピラリー電気泳動装置は Beckman P/ACE 5010 を用いた。内径 75 μ m、全長 27 cm、実行長 20 cm のニュートラルキャピラリーを使用し、陽極液には 0.1 M リン酸、陰極液には 0.01 M 水酸化ナトリウムを用いた。泳動用液は粘度の異なるメチルセルロースに Ampholite (pH 3.5-

10.0) とタンパクサンプルを混合し窒素圧によりキャピラリー全長を満たすように導入した。500V/cm、20℃で等電点電気泳動を行い、同時に陽極側から分離ゾーンを加圧移動させ紫外吸収(280nm)で検出を行った。

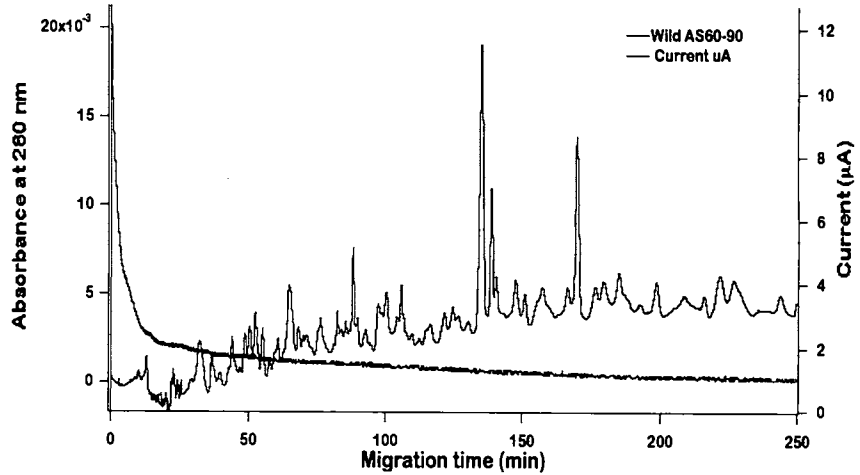


Fig. 1 An electropherogram of isoelectric focusing of the ammonium sulfate 60-90 fraction of *C.elegans*. Left axis shows absorbance at 280 nm and right current change.

結果と考察：線虫粗抽出液のc I E Fは酸性領域に核酸と考えられ

るピークが検出されるが、塩析画分ではpH勾配全域におよびタンパク質が検出されている。組成が単純である標準タンパク混合物での泳動時間はおよそ50分程度であるが、ここで用いた多成分タンパクサンプルの場合では数時間におよぶものもある。これは泳動液に加えたメチルセルロースとタンパクサンプルを混合することにより粘性が高まったものと考えられるので、粘度の異なるものを用い等電点電気泳動の分析時間の短縮条件を検討した。低粘度のメチルセルロースでは標準タンパク混合物での泳動時間はおよそ8分の泳動時間でフォーカスしていると思われるが、若干ピーク幅が広がる傾向があるので分析時間と分離に最適な粘度を持つメチルセルロースの使用を検討している。

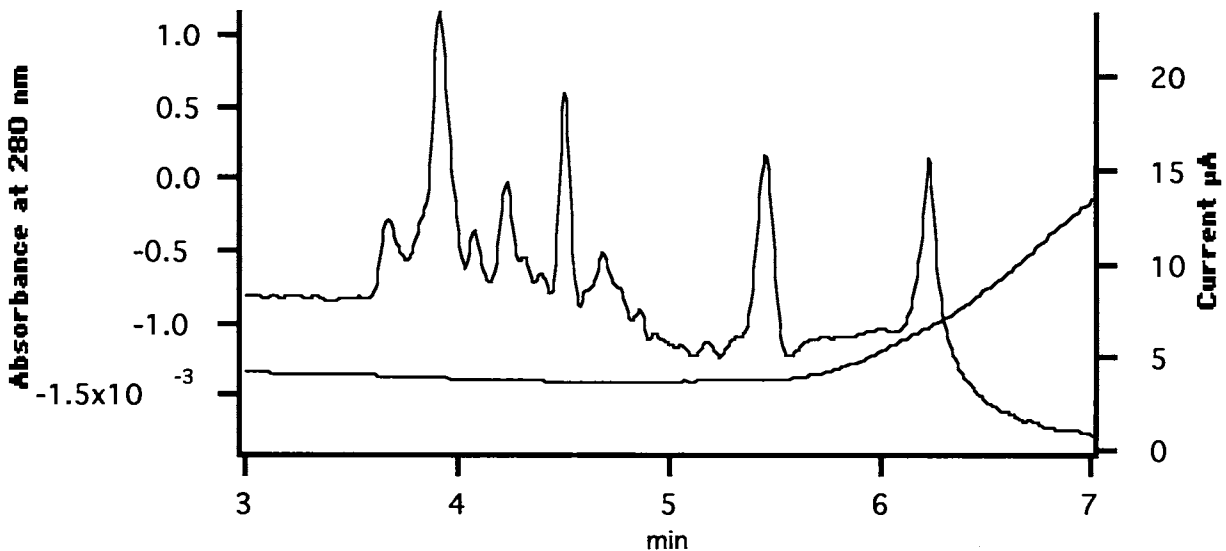


Fig. 2 An electropherogram of capillary isoelectric focusing of marker proteins using low density gel. Left axis shows absorbance at 280 nm and right current change.

P23

8CE17
Tokyo'97

キャピラリー等電点電気泳動による米麹中の α -アミラーゼ活性 の新規測定法

1)渡辺敏郎*, 1)山本 明, 1)永井史郎, 2)寺部 茂

1)ヤエガキ酒造(株)技術開発研究所, 2)姫路工業大学理学部物質科学科

A Novel Method for Measurement of the α -Amylase Activity in Rice Koji by using Capillary Isoelectric Focusing.

1)Toshiro WATANABE*, 1)Akira YAMAMOTO, 1)Shiro NAGAI, 2)Shigeru TERABE

1)Yaegaki Technology Development Laboratories, Yaegaki Sake & Spirits, Inc.

2)Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

A capillary isoelectric focusing (CIEF) method has been developed for the analysis of the α -amylase activity in rice koji. The standard of α -amylase and rice koji extracts were successfully separated by CIEF in a wide range pH gradient. The α -amylase from *Aspergillus oryzae* was found to have a pI 3.7, as determined by the migration times of six standard proteins. A simple method has been developed for the measurement of the α -amylase activity in rice koji, and the results were compared with those achieved by the official method. The coefficient of variation (C.V.) of the α -amylase assay was less than 0.9% in both intra-day and inter-day experiments. This CIEF method can be applied to the routine quality control of α -amylase activity in rice koji for the brewing of sake.

1) はじめに

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、清酒醸造に用いられる有用菌株である。麹とは、蒸し米にこの麹菌を接種、培養したもので α -アミラーゼをはじめとする様々な有用酵素を生産する。 α -アミラーゼは蒸し米のデンプンを分解し、分解された糖分を酵母がアルコール醗酵することにより清酒となる。したがって、清酒醸造において麹が生産する α -アミラーゼ活性を調べることはたいへん重要である。

麹の α -アミラーゼ活性の測定は、国税庁所定分析法にて行われている。我々はキャピラリー等電点電気泳動 (CIEF) により麹の α -アミラーゼ活性を簡易に測定する方法を試みた。

2) 実験

CE装置には、Bio-Rad製のBioFocus 3000 CE System、キャピラリーは、Supelco製のCElect-150 (内径50 μ m、長さ24cm、C8コーティング) を用いた。分析サンプルは、Bio-Rad製のアンフォライト溶液 (pH3-10) を最終濃度が1%となるよう混合し、350mbarで1min、キャピラリー中に充填した。20mMリン酸を陽極側、20mM NaOHを陰極側とし、印加電圧15kVにて等電点濃縮を行い、その後、陰極側をBio-Rad製の移送溶液に移し、280nm、15kVにて濃縮ゾーンを移動させた。

3) 結果と考察

CIEF法により試薬の α -アミラーゼ (Sigma製、from *A. oryzae*) の分離ができた。 α -アミラーゼの泳動時間と6種類 (チトクロムc、 α -キモトリプシノーゲンA、ミオグロビン、 β -ラクトグロブリンA、オボアルブミン、アミノグルコシダーゼ) の等電点 (pI) 標準タンパク質の泳動時間から、 α -アミラーゼのpIは3.7と求められた。 α -アミラーゼのpIは等電点電気泳動 (IEF) により3.6と報告されており、本法においてもほぼ同様の結果を得た。

麴抽出液についてもFig.1に示すとおりに α -アミラーゼのピークを得た。このピークは麴抽出液を加熱処理し、酵素失活させると加熱時間とともに消滅した。また活性型の α -アミラーゼが同じ位置にピークとして得られることから、ピークと酵素力価との間には相関性があると考えた。 α -アミラーゼ力価が400~1400units/g-*koji*の麴について国税庁所定分析法による力価と本法によるピーク高さの間には、Fig.2に示すとおりに高い相関関係が得られ、本法により麴中の α -アミラーゼ活性を容易に測定できることが明らかとなった。本測定におけるC.V.値は日内及び日間分析において0.9%以内であった。

本法は清酒醸造における米麴中 α -アミラーゼ活性測定の品質管理分析に応用できると考えられる。

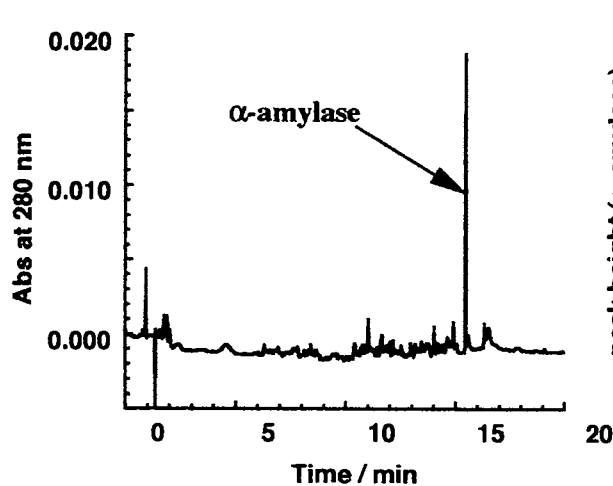


Fig.1 CIEF of a rice *koji* extract.

capillary, 50 μ m i.d. \times 24 cm coated with C8; sample solution, mixed with an ampholyte (pH3-10, final concentration 1%) and introduced into the whole capillary; focusing, 1 min at 15 kV; mobilization, 15 kV; detection, 280 nm.

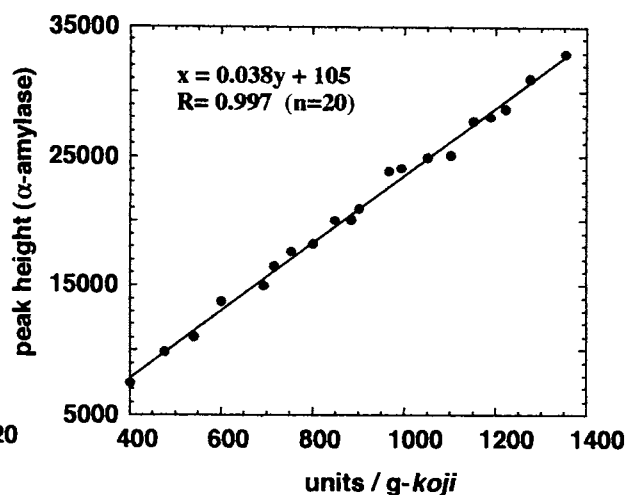


Fig.2 Dependence of α -amylase peak height on α -amylase activity in rice *koji*.

α -Amylase activity was measured by the official method of analysis of the National Tax Administration Agency of Japan.

P24

SCF17
Tokyo'97

キャピラリー電気泳動による髄液 β -Trace Protein (Prostaglandin D₂ Synthase) の Microheterogeneity の分析

1)平岡厚*, 2)荒戸照世, 3)富永格, 4)江口直美, 5)織田浩司, 清木興介, 6)裏出良博

1)杏林大学保健学部, 2)杏林大学医学部生化学, 3)国立千葉病院神経科, 4)PRESTO, 5)マルハ中央研究所, 6)大阪バイオサイエンス研究所

Capillary Electrophoretic Analyses of Microheterogeneity of β -Trace Protein (Prostaglandin D₂ synthase) in Cerebrospinal Fluid

1)Atsushi Hiraoka*, 2)Teruyo Arato, 3)Itaru Tominaga, 4)Naomi Eguchi, 5)Hiroshi Oda, Kohsuke Seiki, 6)Yoshihiro Urade

1)Kyorin University School of Health Sciences, 2)Department of Biochemistry, Kyorin University School of Medicine, 3)Department of Neuropsychiatry, Chiba National Hospital, 4)PRESTO, 5)Central Research Institute, MARUHA Corporations, 6)Osaka Bioscience Institute

Abstract

Microheterogeneities of β -trace protein (β TP; prostaglandin D₂ synthase) in cerebrospinal fluid (CSF) from patients with neurological disorders were analyzed by SDS-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE) and capillary-zone electrophoresis (CZE) after the treatments with denaturing agents. The total β TP level in CSF was also determined by enzyme immunoassay. Under the conditions employed in the SDS-CZE and CZE analyses, β TP was separated into several subfractions with different molecular weight (MW) and electric charge. Changes in MW and electric charge in the CSF β TP subfractions seemed to be associated with pathological conditions in the central nervous system.

1. はじめに

β -trace protein (β TP; Prostaglandin D₂ synthase) は、髄液蛋白質のうち中枢神経系 (CNS) 由来の部分の中では含量が最大の成分であり、その髄液

濃度が、種々のCNSの器質性疾患において非特異的に上昇することが知られている。 β TPは、平均分子量約27,000のsialoglycoproteinであり、オリゴ糖側鎖の構造の差異にもとづいて分子量及びchargeにおけるMicroheterogeneityを示すが、髄液 β TPのSubfractionのレベルでの変動と病態との関係については知られていない。我々は、2種類のキャピラリー電気泳動(CE)の系を用いてその検討を行った。

2. 対象及び方法

種々の精神・神経疾患の患者腰椎より得られた髄液検体より、分子量のcut-off値の異なる限外ろ過の組み合わせにより、分子量10,000-50,000の画分を定量的に調整し、SDS-PAGEの場合と同様な処理をしたものをCE分析用試料とした。

CEの系としては、主として前回の本シンポジウムにて発表したSDSキャピラリーゲル電気泳動(SDS-CGE)を用いたが、前々回に発表した通常のキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)も一部の試料に適用した。 β TPのピークの同定は、未処理の髄液をモノクロナル抗体カラムに通す前及び後の検体より調整した試料のElectropherogramを比較して行い、カラムを通すと消失する複数のピークのパターンと面積比を観察、測定した。又、酵素免疫測定法(EIA)により、髄液中 β TPの絶対濃度($\mu\text{g/ml}$)を求めた。

3. 結果及び考察

SDS-CGEのElectropherogram上で、髄液 β TPは分子量が約26,000と28,500にピークを示し、その間を境に低分子側(23,000-27,000)と高分子側(27,000-30,000)の両Subfractionに分離した。EIAにより測定された絶対濃度とElectropherogram上の面積比より、両Subfractionのレベルを近似的に求めて種々の疾患における消長を調べたところ、内因性精神病及び神経症の患者髄液の β TPと比較して、髄膜・脳の炎症性疾患においては低分子側のSubfractionが、又、病的な脳萎縮のある変性疾患において高分子側のSubfractionが各々増加の傾向を示した。脳血管障害では、一般検査で髄液総蛋白濃度が中等度以上の上昇の例(70 mg/dl以上)が炎症性疾患と類似したパターンを示し、又、脱髄疾患である多発性硬化症の髄液検体の一部に、分子量33,000の位置にも β TPの第3の小ピークが出現した(モノクロナル抗体のカラムへの吸着により同定)。

又、CZEにおいても β TPのcharge heterogeneityを示す複数のピークが検出されたので(SDSと CH_2SH による処理のため糖鎖中のシアル酸の電荷が蛋白分子表面に露出し、塩基性条件下で分離しやすくなったためであろう)、SDS-CGEの結果と合わせることで、各検体ごとに分子量とchargeの両面におけるMicroheterogeneityについて、2次元電気泳動の場合と同様の観察を行うことが可能になったので、現在、例数をふやし検討中である。

CEによって検出された髄液 β TPのSubfractionレベルの変動は、ポリペプチドに結合するシアル酸をふくむオリゴ糖側鎖の化学構造の差異の発生によるものであり、CNSの病態の相違を反映していると思われる。

P25

SC17
Tokyo'97

ネコの血漿ORM型、TF型およびGC型の遺伝的多型性について

- 1) 吉田治弘*、2) H. Auther and K. Bell
1) 専修大学、2) The University of Queensland

Genetic Polymorphisms of Cat plasma ORM, TF and GC Types.

- 1) Haruhiro Yoshida* 2) H. Auther and K. Bell
1) Senshu University, 2) The University of Queensland, Australia

Genetic polymorphisms of Orosomucoid (ORM), Transferrin (TF) and Groupspecific component (GC) were observed in about 1,000 samples include 22 different breeds of cats (*Felis catus*) using isoelectric focusing (pH4.0-6.0) of desialylated plasmas followed by immunoblotting with rabbit antiserum to human ORM, TF and GC. As for ORM types, 15 phenotypes were identified and family studies demonstrated an inheritance of five codominant alleles, ORM^A, ORM^B, ORM^C, ORM^D and ORM^E, at a single locus. As for TF types, 12 phenotypes were identified of five codominant alleles, TF^C, TF^E, TF^F, TF^H and TF^J, at a single locus. As for GC types, 3 phenotypes were identified of two codominant alleles, GC^F and GC^S, at a single locus.

家ネコの血液系遺伝標識に関する研究は、試料の収集などに困難を伴う事もあり、世界で考えても、それほど多くの報告はなされていない。今回、報告者らはオーストラリアおよびニュージーランドにて飼育されている家ネコの血液について、炎症、悪性腫瘍などにより血漿中に増加することが明らかにされている急性相反応物質の1種である血漿オロソムコイド型(Orosomucoid, ORM)については、ヒトおよび霊長類以外の動物では初めてその多型性が検討された。そして血漿タンパク質で多型性に富むことで知られているトランスフェリン型(TF)、ならびにグループスペシフィック・コンポーネント型(GC)について検討する機会を得、興味ある結果を得たので紹介する。

材料および方法

ヘパリン加血より血漿を分離した22品種、57家系を含む約1000例のネコ血漿について、血漿をノイラミニダーゼ処理し、pH 4.0 - 6.0のポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法により電気泳動し、蛋白質をセルロース膜に転写し、1次抗体には抗ヒト ORM、TF、GC血清などを用い、2次抗体には抗ウサギIgGを使用した。NTB、DCIPで発色させ各種表現型を検出し、型判定を行った。

実験結果および考察

ネコ血漿 3 μ lに10U/mlのノイラミニダーゼ 9 μ lを加え、室温に一晩静置したネコ血漿を等電点電気泳動し、ORM型、TF型、GC型の判定を実施した。

ORM型は図1に示す通り、陽極側からA, B, C, D, Eと名付けた5本のバンドからなる15表現型を検出した。

ORM型について、57家系、131例の子ネコを用いて遺伝支配を検討したところ、ORM^A, ORM^B, ORM^C, ORM^D および ORM^E常染色体性の共優性遺伝子により支配されていると考えられた。

TF型は図2に示す通り、C, E, F, H およびJの5本のバンドからなる12表現型として検出された。Fバンドは、今回の検討で初めて見出された物で、従来は、4本のバンドからなる7表現型が報告されていた。遺伝調査を行い、常染色体性の共優性遺伝子に支配されていると推定された。

GC型は図3に示す通り、FおよびS遺伝子により支配される3表現型が検出された。

ORM, TF, GCについて、22品種の家ネコについて、品種毎に表現型の頻度から遺伝子頻度を算出した。

各品種で30例以上の試料の在った物について、遺伝子頻度を表1にまとめた。

また、各形質について、遺伝子頻度から表現型の理論値を算出し、理論値と観察値間の χ^2 乗検定を実施し、Hardy-Weinbergの法則に適合しているか検討し、ほぼ全ての形質で各品種に於いて一致していた。
また、表1から明らかな様に、各形質に於いて遺伝子頻度の品種間差異が顕著に認められた。今後、試料の品種、例数、検査形質を増し、家ネコの発生、分化について検討して行きたいと考えている。

図1、血漿ORMの15表現型

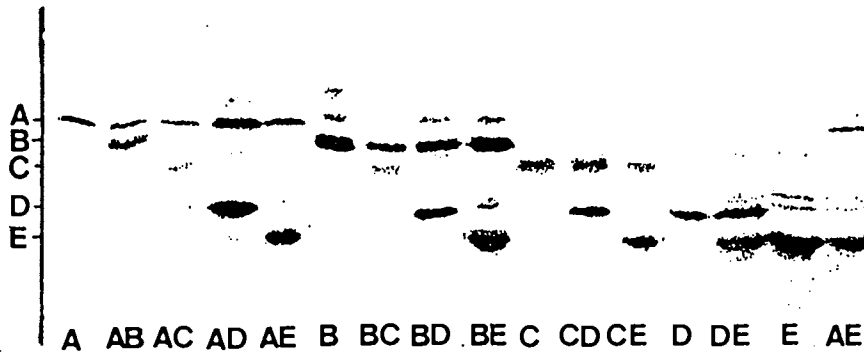


図2、血漿TF型の12表現型

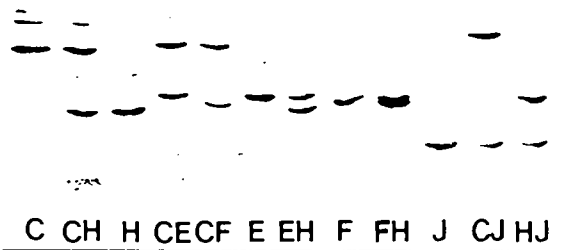


図3、血漿GC型の表現型

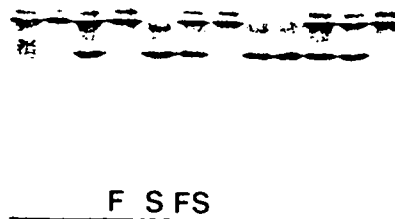


表1. ネコ各品種における血漿TF型、GC型の遺伝子頻度

品種	ORM					TF					GC				
	例数	A	B	C	D	E	例数	C	E	F	H	J	例数	F	S
BIR	433	.0012	.3048	.5046	.0127	.1767	431	.1473			.8527		436	.9885	.0115
ABY	113	.0088	.5443	.1062	.0088	.3319	111	.2297			.7703		112	.0268	.9732
DSH	90	.0722	.1444	.1611	.0444	.5779	85	.3823	.0117	.0294	.5674	.0118	90	.1222	.8778
DR	66	.0299	.2388	.0672	.0373	.6268	61	.3361	.2131		.4508		66	.3788	.6212
PER	48	.1146	.1250	.2396	.1979	.3229	42	.8542			.1548		44	.3409	.6591
SIA	40	.0125	.5875	.0125	.2500	.1375	40	.0750			.9250		42	.7619	.2381
BSH	38	.0128	.0769	.1282	.0000	.7821	38	.5921			.4079		38	.1711	.8289
BUR	34	.0000	.4412	.0441	.0147	.5000	32	.0469	.0156	.0937	.8438		34	.2059	.7941

BIR : Birman, ABY : Abyssinian

DSH : Domestic Short Hair

DR : Devon Rex, SIA : Siamese

PER : Persian, BUR : Burmese

BSH : British Short Hair

(各品種30例以上の試料の在った物をまとめた)

P26

SC17
Tokyo'97

ポリマー溶液を用いたキャピラリーゲル電気泳動によるオリゴヌクレオチドの分析

園田龍太郎*、西 博行、野田浩逸、西村紀之、佐藤忠司
(田辺製薬(株)、分析研究所)

Capillary Gel Electrophoresis of Oligonucleotides Using Polymer Solutions

Ryotaro SONODA*, Hiroyuki NISHI, Kouitsu NODA, Noriyuki NISHIMURA, Tadashi SATO
Analytical Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co. Ltd., 16-89, Kashima 3-chome,
Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

ABSTRACT

Capillary gel electrophoresis (CGE) has been recognized as an effective method for the analysis of oligonucleotides. Especially CGE using polymer solutions is useful and effective compared with CGE using cross linked gels.

In this study, we investigated CGE using many kinds of polymers such as polyacrylamide, dextrin, dextran, pullulan, etc. for the analysis of oligonucleotides less than 20 bases. These oligonucleotides were successfully resolved on the basis of the base number by using CGE with high concentration of dextran.

【緒言】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は、従来よりオリゴヌクレオチド分析に広く用いられている。しかしながら、PAGE ではゲルの作製、泳動、染色及び画像解析など煩雑な操作が必要となる。一方、キャピラリー電気泳動 (CE) は高性能な分離分析法であり、迅速かつ自動での分析が可能である。CE の中でも分子ふるい効果を利用するキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) は、DNA や生体高分子の分離に有効で、ヒトゲノム解析への適用が有望視されている。今回、対象試料としてオリゴヌクレオチド (20 塩基以下) の分離分析について CGE により検討を行ったところ、高濃度のデキストラン溶液 (30% W/V) を用いることで、比較的短時間で良好な分離が達成されることが分かった。分離に影響を与えるポリマーの種類、濃度、印加電圧などについて検討し、分離条件の最適化を行い、本法が 20 塩基以下のオリゴヌクレオチドの評価法として有用であることを明らかにした。

【実験】

キャピラリー電気泳動装置は Beckman 社製の P/ACE5510 を、キャピラリーは Bio-Rad 社製の BioCAP™ Oligonucleotide Analysis Capillary (全長 27cm、有効長 20cm、内径 75 μ m) を使用した。泳動溶液はアクリルアミド、デキストラン、デキストリン、プルラン、ポリエチレングリコールなどを 7M 尿素を

含むトリス-ホウ酸緩衝液に添加し、キャピラリーに加圧注入した。オリゴヌクレオチドは Pharmacia Biotech 社製の合成オリゴヌクレオチド (p(dT)_{11~20}) を用いた。これをホルムアミドを含むトリス-ホウ酸緩衝液で各オリゴヌクレオチドの濃度が 3.2OD (260nm) となるように調製し、95℃で2分間熱変性を行ったものを試料溶液とした。試料導入は電気的方法 (10kV, 4~16sec) により行った。

【結果及び考察】

ポリマー溶液を用いたキャピラリーゲル電気泳動によるオリゴヌクレオチドの分離分析にあたって、分離に影響を及ぼすポリマーの種類について検討を行った。ポリマーとしてデキストラン他数種類について検討した結果、デキストランがオリゴヌクレオチドの分離に有効であることが分かった。

次に、ポリマーとしてデキストランを選択し、オリゴヌクレオチドの分離に影響を及ぼすポリマーの濃度 (10~30%)、印加電圧 (300~700V/cm)、温度 (30~50℃) などについて検討し、分離条件の最適化を行った。図1に最適条件下でのオリゴヌクレオチドのエレクトロフェログラムを示す。

本実験で用いたオリゴヌクレオチドの分子量は約 3000~6000 と小さいため、分子篩マトリックスの編み目をより細かくする必要があり、高濃度のデキストランが必要であった。そこで高濃度のデキストラン溶液下での分子移動について、分離媒体としてのデキストランの濃度と各オリゴヌクレオチドの移動度の対数値との関係 (Ferguson Plot) を検討した。図2に 10~30%濃度での 12~20 塩基の Ferguson Plot を示す。相関係数は $r^2 > 0.999$ となり良好な直線関係を示し、本実験の条件下ではオリゴヌクレオチドは、Ogston モデルに従って分離されていると考えられた。

さらに、本法の定量性についても検討し、20 塩基以下のオリゴヌクレオチドの品質評価法として有用であることを明らかにした。

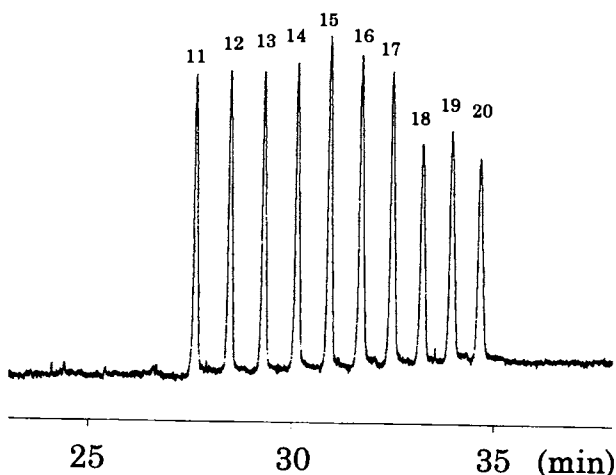


Fig. 1. Electropherogram of p(dT)₁₁₋₂₀.

Capillary, 75 μ m i.d. \times 27cm (effective length 20 cm); Gel, dextran (30%W/V, MW 100000-200000); Running buffer, 0.1M Tris - 0.1M boric acid - 7M urea; Electric field, -500V/cm; Running temperature, 40℃; Injection, -10kV, 4sec; Detection, UV/260nm

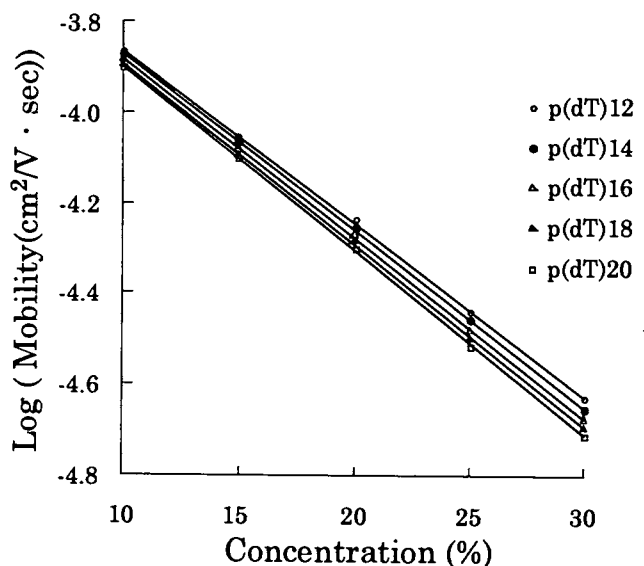


Fig. 2. Ferguson plots for dextran.

Dextran, MW 100000-200000; Capillary, 75 μ m i. d. \times 27cm (effective length 20cm), Running buffer, 0.1M Tris - 0.1M boric acid - 7M urea; Electric field, -500V/cm; Running temperature, 40℃; Injection, -10kV, 4sec; Detection, UV/260nm

P27

SC17
Tokyo'97

シングルセルからの情報(I) 赤血球のスペクトル変化

今村 基*、北川慎也、津田孝雄 [名工大・工]

北岸恵子 [大塚電子 (株)]

Information from single cell (I) Spectrum variation of red blood cells

Motoki IMAMURA, Shinya KITAGAWA, Takao TSUDA

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology

Keiko KITAGISHI

Otsuka Electronics Co.,LTD.

Absorption spectrum of red blood cell mostly depends on hemoglobin included. Absorption bands of oxyhemoglobin are at 577nm and 540nm and, on the other hand, that of deoxyhemoglobin at 555nm. The change for oxyhemoglobin to deoxyhemoglobin in cells is observed by comparing those spectra. 100 μ m I.D. fused silica capillary with a detection window and a inner flit was used for the measurements. Red blood cells were first injected into the capillary by using a syringe. Then 0.1% sodium hydrosulfite solution was injected into the capillary to reduce red blood cell. During this process, the variation of spectra of cells were recorded.

【はじめに】

赤血球の主成分はヘモグロビンであるので、赤血球の吸光スペクトルはヘモグロビンに大きく依存している。ヘモグロビンの吸光帯には第1吸光帯と第2吸光帯が存在し、第2吸光帯はオキシヘモグロビンの場合 577nm および 540nm、デオキシヘモグロビンの場合は 555nm である。ヒト赤血球の酸素が脱離する様子をスペクトルの連続測定によって観察した。最終的には単一の赤血球についての測定ができることを目標としている。

【実験】

スペクトルの測定には大塚電子製 MCPD-3600 を用いた。内径 100 μ m のフューズドシリカキャピラリーを用いて、これにディテクションウィンドウ及び中間フリットを調整した (Figure1)。採取した血液 100 μ L を 200 μ L の生理食塩水で洗浄し、遠心分離によって血漿を取り除く。この操作を3回繰り返す。得られた血液を20倍に希釈しサンプルとした。これをシリンジを用いてキャピラリー内に注入する。注入された赤血球は中間フリットによってディテクションウィンドウ内に保持される。続いてヘモグロビンを還元するために0.1%ヒドロサルファイトナトリウムの溶液を注入する。この間のスペクトル変化を連続測定により確認した。

【結果】

figure2 は、オキシヘモグロビンを持つ赤血球とデオキシヘモグロビンを持つ赤血球のスペクトルをそれぞれ測定し比較したものである。第1吸光帯と第2吸光帯の存在が確認でき、第2吸光帯の差異による O_2 の有無も確認することができている。またセル个数についてはセル自体を CCD カメラで撮影し、個数を調べている。現在、

- 1) より少ないセル个数での測定（最終的には単一の赤血球で）
- 2) 連続測定による、3次元プロットの確立を試みている。

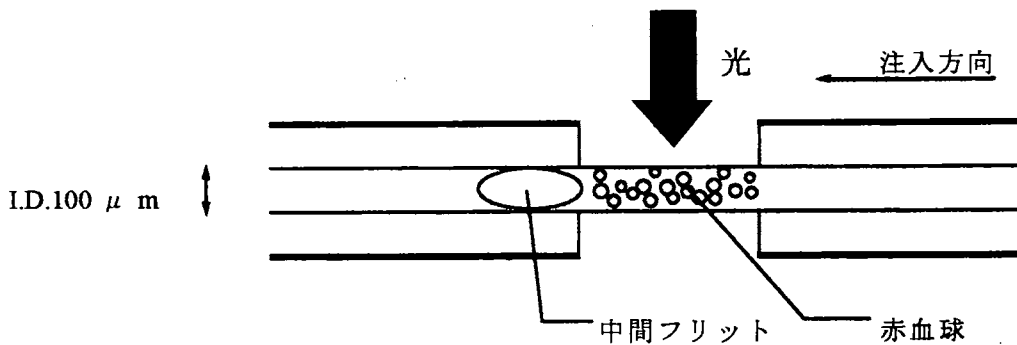


Figure1 測定部拡大図

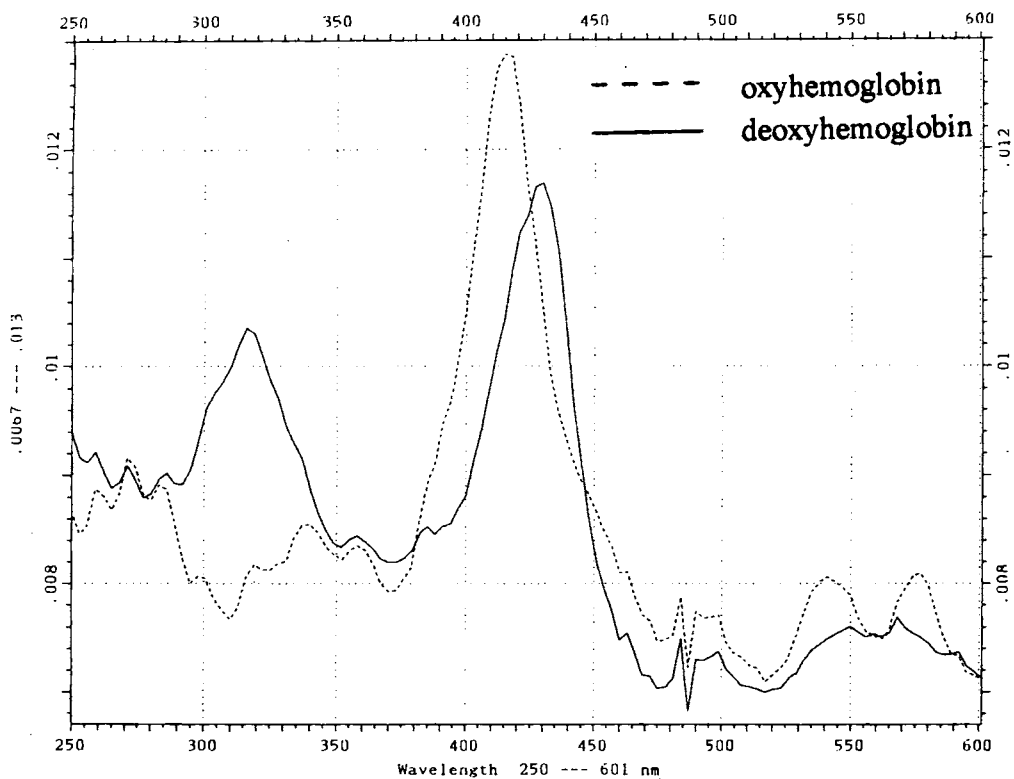


Figure2 オキシヘモグロビンを持つ赤血球とデオキシヘモグロビンを持つ赤血球の吸収スペクトル。

P28

SC17
Tokyo97

キャピラリーゾーン電気泳動法における 20 種

金属イオンの分離挙動

(広島大・工) 陳秀娟*、育田夏樹、西山文隆、廣川健

Separation behaviour of twenty kinds of metal ions in CZE

Xiu Juan Chen*, Natsuki Ikuta, Fumitaka Nishiyama and Takeshi Hirokawa
Applied physics and chemistry, faculty of engineering, Hiroshima University

Separation behaviour of twenty kinds of metal ions forming complexes with tartaric acid was studied by CZE using a 30mM creatinine solution buffered by adding acetic acid (pH4.8). The concentration of tartaric acid (C_{Tar}) was varied in the range of 1-5mM. When $C_{tar}=5mM$, the migration order was Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} (Ba^{2+}), Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , the others (Pb^{2+} , Ce^{3+} , La^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} , Gd^{3+} , Cu^{2+} , ZrO^{2+}) co-migrated near the system peak. Soluble components in ashes from waste plastics were analyzed using the developed electrolyte system.

はじめに

我々は種々の電解液の分離能評価に、アルカリ金属、アルカリ土類金属、希土類金属を含む 20 種金属イオンの混合物を使用している。既に等速電気泳動(ITP)モードでは、酒石酸や α -ヒドロキシイソ酪酸その他のイオン性錯形成剤を含む電解液に対して ITP-PIXE 法を用いて、分離挙動を検討した [1]。現在、CZE モードでこれらの錯形成剤を使用したときの分離挙動を検討しているが、今回は酒石酸を錯形成剤として用いた場合における 20 種金属イオンの分離挙動を検討した。さらに応用として、その電解液システムを使用し、生活ゴミ由来の廃プラスチックの燃焼後残った灰中の可溶成分を分析した。

実験

CZE 装置には大塚電子製 CAPI-3100 を用いた。再現性を維持するために室温および泳動キャピラリーは 25°C に保った。キャピラリーは内径 75 μm 、全長 50cm (有効長 37.7cm) の熔融シリカキャピラリーを用いた。泳動バッファーは、酒石酸 (1-5mM) を添加した 30mM クレアチニン (pH4.8、酢酸で調整) である。検出には、220nm での間接吸光法を用いた。泳動電圧は +15KV、試料注入は落差法 (1cm, 60s) で行った。20 種金属イオンは Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ce^{3+} , La^{3+} , Lu^{3+} , Y^{3+} , Gd^{3+} , Cu^{2+} , ZrO^{2+} であり (濃度、各 0.5mM)、全て塩化物から調製した。生活ゴミ由来の廃プラスチック 2 g をルツボで加熱燃焼させ、残った灰分 543mg のうち 250mg に濃硝酸 1 ml を添加し加熱乾固した。残分を水 100ml に溶解して試料とした。

結果と考察

Fig.1 に泳動時間の酒石酸濃度依存性を示す。酒石酸の濃度が低い時には、それぞれ金属イオンの泳動時間の差が小さく、十分な分離が達成されなかった。しかしながら、酒石酸濃度が増すにつれ、アルカリ金属ではほとんど移動度変化がなかったが、二価イオンについては移動度が減少し、分離の向上が見られた。Fig.2 に 5mM の酒石酸を用いた系でのエレクトロフェログラムを示す。5mM 酒石酸の添加ではシステムピークの前に 11 のピークが得られた。このように酒石酸の効果により金属イオンの分離が向上したが、 La^{3+} 、 Ce^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Y^{3+} 、 Lu^{3+} 、 ZrO^{2+} 、 Cu^{2+} などのピークはシステムピークに重なり、検出できなかった。これらのイオンはこの電解液システムでは移動度がゼロもしくは負になっていると考えられる。

この電解液システムの応用として、廃プラスチック灰中の可溶成分の分離分析を行った。Fig.3 にエレクトロフェログラムを示す。 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} が灰中に含まれたことが証明された。Table.1 にプラスチック灰中の K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} それぞれの濃度を示す。

本講演では EDTA をキレート剤として用いたアニオン分析による分離挙動及び定量結果も報告する。

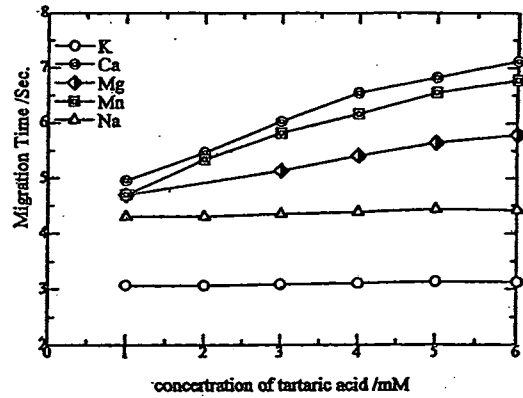


Fig.1 effect of tartaric acid on migration time

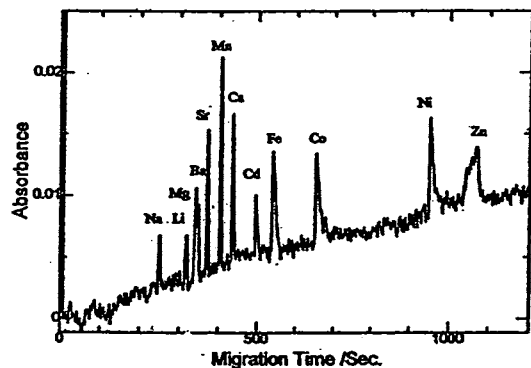


Fig.2 migration behaviour of twenty metal ions
concentration of twenty metal ions was 0.5mM of each ion
back-ground electrolyte: 5mM tartaric acid-30mM creatinine
wave length: 220nm injection time 60Sec.

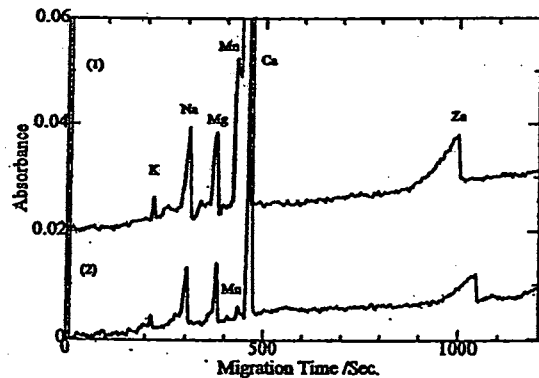


Fig.3 separation behaviour of soluble components in ashes from waste plastics
Back-ground electrolyte was 5mM tartaric acid-30mM creatinine
Wave length: 220nm
(1) injection time 120Sec. (2) injection time 60Sec.

Table.1 廃プラスチック灰中各イオンの濃度 (mM)

イオン	K	Na	Mg	Mn	Ca	Zn
濃度	0.208	2.230	0.475	0.038	3.714	0.254

(1) T. Hirokawa, W. Xia, K. Nakamura, I. Tanaka, F. Nishiyama, Y. Kiso, Bohuslav Gas, Jiri Vacik, J. Chromatography A, 663(1994), 245-254

P29

SCF17
Tokyo'97

キャピラリー電気泳動装置を用いた無電解Niメッキ液の分析 (大塚電子株式会社) 佐藤 康博*, 笹一志, 北岸 恵子

ANALYSIS OF NICKEL PLATING BATH BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Yasuhiro Sato, Katsushi Sasa, Keiko Kitagishi
(OTSUKA ELECTRONICS CO., LTD)

ABSTRACT

Capillary electrophoresis (CE) was applied to measure organic anions, phosphate and nickel ion in nickel plating bath without sample pretreatment. Phosphate and organic anions were simulataneously analyzed with indirect UV-detection. Migration velocity of phosphate and organic anions generally reflects the characteristec dissociation contant. Nickel ion was detected with direct UV-detection as a metal chelate compound.

1. はじめに

メッキは電子、機械工業などの分野で幅広く利用されている。メッキの手法には大別して電気メッキと無電解メッキがあり、特に最近では容易なメッキ工程により緻密な任意の厚さの皮膜を形成させる無電解メッキ液が注目されている。しかし、無電解メッキ液の組成は電気メッキ液に比べると複雑で変化しやすく厳密な管理を必要とする。

無電解メッキ液の分析法として、イオンクロマトグラフィー (IC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、等速電気泳動法 (ITP) などがよく用いられるが問題も指摘されている。例えば、ICやHPLCではメッキ液中の多くの電解質がカラムに吸着しカラムの劣化が著しく生じるためサンプルの前処理が必要である。ITPでは分析操作が非常に複雑で多検体の分析は不向きである。それに対し、キャピラリー電気泳動法はカラムの劣化やサンプルの前処理もほとんど無く多検体のサンプルについて迅速に測定が可能である。

今回、キャピラリー電気泳動装置を使用して無電解Niメッキ液中に含まれるリン酸イオン、有機酸、Niイオンについて分析したので報告する。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は大塚電子社製 CAPI-3200 を用いた。キャピラリーは内径 75 μm 、外径 345 μm 、全長 72.5cm、有効長 60.0 cmの合成シリカ製のものを使用した。

リン酸イオン、有機酸の分析は泳動バッファーとして有機酸分析用泳動バッファー(大塚電子分析キット)を使用し、検出はインダイレクトUV法により 220nm、印加電圧は-10kVでおこなった。

Niイオンの分析は泳動バッファーとしてキレート剤を含む四ホウ酸ナトリウムを使用し、検出はダイレクトUV法により 200nm、印加電圧は 25kVでおこなった。

3. 結果と考察

Fig. 1に、リン酸イオンと有機酸を含む計14種類の成分について分析をおこなった結果を示す。今回使用した条件では、ほとんどのイオンが解離定数の低いものから順に検出され、11min以内で完全に分離できた。

Fig.2に無電解Niメッキ液について測定した結果を示す。エレクトロフェログラムにみられた7本のピークは、添加法による同定により、次亜リン酸、亜リン酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、コハク酸、酢酸にそれぞれ相当することがわかった。

NiイオンについてはNi錯体を形成させ、比較的移動度の遅いサリチル酸、アクリル酸、フタル酸、イタコン酸と同時に分析が可能であった。

以上の2条件を併用すると、無電解Niメッキ液中に含まれる計19種類の成分について確認することがわかった。

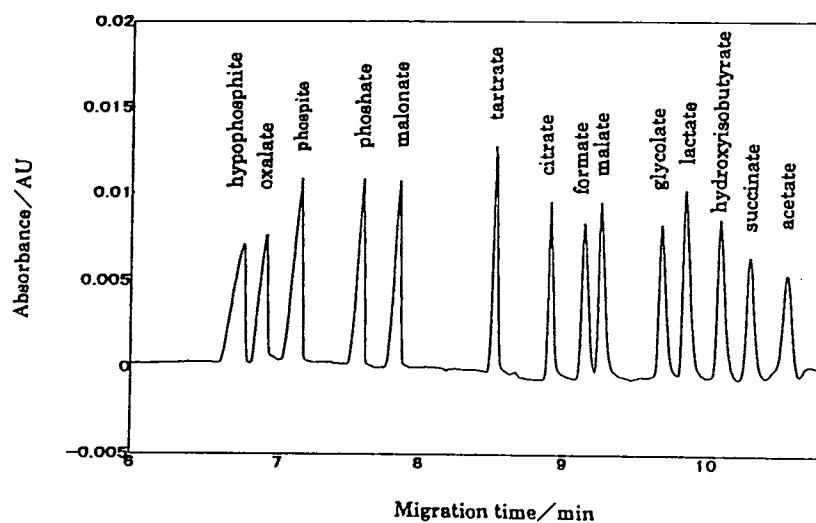


Fig. 1 Electropherogram of a mixture of the fourteen anions

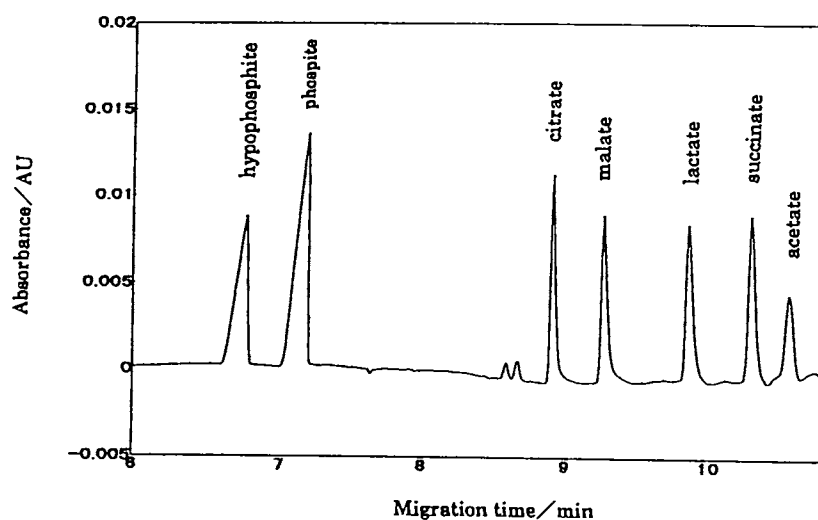
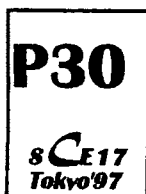


Fig. 2 Electropherogram of anions in nickelplating bath



キャピラリー電気泳動によるアルコール飲料中の有機酸の分析

曾我朋義*、柳井博子

横河アナリティカルシステムズ株式会社

Determination of Organic Acids in Liquors by Capillary Electrophoresis

Tomoyoshi Soga*, Hiroko Yanai
Yokogawa Analytical Systems Inc.

A capillary electrophoresis method for the determination of inorganic and organic anions in liquors was developed. Three inorganic anions (chloride, sulfate, and phosphate) and nine organic acids (oxalate, formate, malate, citrate, succinate, pyruvate, acetate, lactate, and pyroglutamate) in beer were separated and quantified in less than 7 min. Migration time reproducibilities were dramatically improved by ultrafiltering the beer through 30 kDa cutoff filter. The determined concentrations of anions were in good agreement with those found by current methods (ion chromatography for inorganic anions and liquid chromatography for organic acids). The method has advantages with respect to sample preparation, resolution, analysis time, and simplicity relative to the conventional techniques. The method could be readily applied to the analysis of anions in wine, sake and Chinese liquor.

1. はじめに

ビール、ワインなどのアルコール飲料中の有機酸は、発酵の過程を知る重要な物質であり、また風味に大きな影響を与えるため、現在広く測定されている。キャピラリー電気泳動は、高速、高分離能の分離分析法として知られているが、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やイオンクロマトグラフィー(IC)と異なるもう一つの特長は、分離に中空のキャピラリーを用いることである。したがってキャピラリーの洗浄が容易であり、夾雑物の多い実試料であっても、希釈、ろ過程度の簡単な前処理で測定することが可能である。

我々は、キャピラリー電気泳動を用いて、アルコール飲料中の無機陰イオン、有機酸を再現性よく一斉分析する方法を開発した。またアルコール飲料中のタンパク質が移動時間の再現性に与える影響についても報告する。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は、ダイオードアレイ検出器を内蔵した HP^{3D} キャピラリー電気泳動システム(Hewlett-Packard 製)を使用した。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 μ m、全長 80.5 cm、有効長 72 cm)を使用した。泳動緩衝液には、

HP Organic Acids Buffer (HP 社製 Part No. 8500-6785)を使用し、印加電圧 -25 kV、温度 20 °C で測定した。試料に注入は、加圧法 50 mbar, 2 sec で行った。検出は、ダイオードアレイ検出器を使用し、200 nm で間接吸光検出を行った。

3. 結果および考察

Fig. 1 にビール中の無機陰イオンおよび有機酸 12 成分の測定結果を示した。ビール中の各成分の定量値は 6–316 mg/l であった。ビール中のタンパク質を限外ろ過フィルターを用いて除去することと、バッファ自動交換機能を用いて泳動バッファを毎回交換することにより、移動時間、面積の再現性は著しく改善された。繰り返し 50 回連続測定の結果を Fig. 2 に示した。移動時間の再現性 (n=10) は 0.08 %–0.14 %、ピーク面積は、濃度の低いシュウ酸とギ酸を除いて 1.6 %–3.3 % であった。また 8 種類のビールと麦汁の定量値を従来法の HPLC と IC で測定した結果と比較したところ、すべての成分で 0.9392–0.9966 の相関が得られた。この方法を用いてワイン、日本酒、老酒中の陰イオン、有機酸を測定した。本法は従来法に比べ、前処理の簡便さ、分析時間、分離、無機陰イオンおよび有機酸が一斉分析できる等多くの点で優れており、アルコール飲料中の有機酸分析に有用な方法であると思われる。

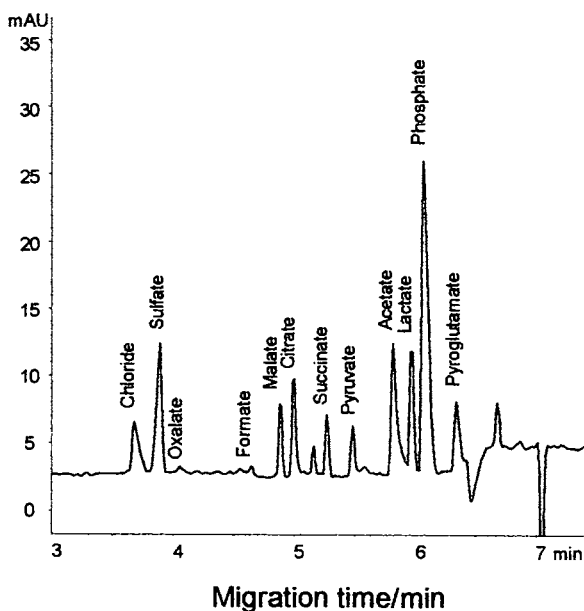


Fig. 1 Electropherogram of inorganic and organic acids in beer.

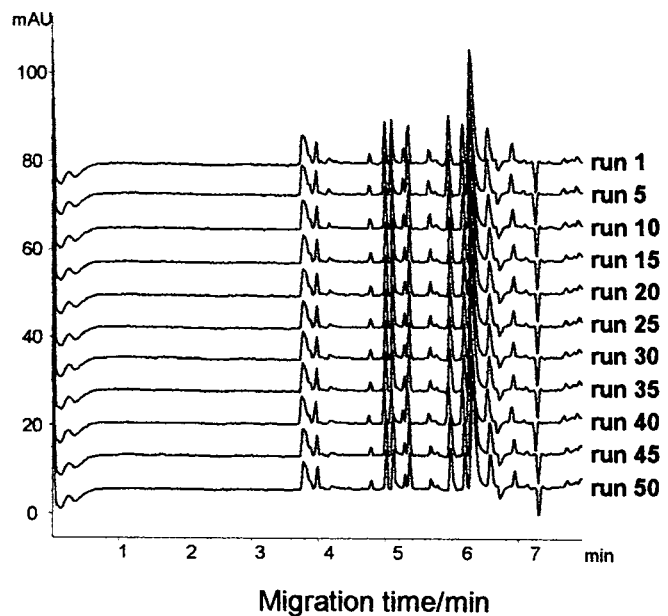


Fig. 2 Reproducibility of beer Analysis (n=50).

P31

SC_{E17}
Tokyo'97

キャピラリー電気泳動の情報管理におけるデータベースの活用

大塚電子(株) 山田 浩美*, 北岸 恵子, 大嶋浩正

Application of Database in the Information Management of Capillary Electrophoresis

Hiromi Yamada*, Keiko Kitagishi and Kosei Oshima

Otsuka Electronics Co., Ltd.

Database format is applied to sets of the conditions of the measurement, the data management and its consequence which are concerned in capillary electrophoresis system. The application of database facilitates learning how to both measure unknown samples and analyze the data. Search function of database is a dominant factor to the efficiency of method development and/or quality control.

1. はじめに

近年、研究開発におけるデータベースの活用が重視されている。これは、社内外の技術、特許、そして市場のニーズなどの最新情報を、他社よりいかに早く入手・分析し、研究開発に取り入れるかということが、競争の激しい業界で生き残っていくためには必要であり、そのための会社内におけるシステム作りが必要となってきたためである。

企業全体として研究者を支援し、研究の効率を向上させるために、研究開発に関連する様々な情報の収集、保存、そして伝達のあり方を組織的に見直す時期にきている。

今回は、組織内における情報システムの中で、研究活動の要となる実験支援システムとしての LA (Laboratory Automation) システム、その中でも実験データの扱われ方について文献 1)、2)を参考にして検討した。

2. データベース

LA システムを構築する際に、第一に考えなければならぬのは、いかにシステムを有効に活用するかということである。システムの有効利用とは、システムの中に有効な情報が蓄えられているか、つまりデータベースの中身をどれだけ活用できるかに依存するところが大きい。

その中でも実験データの収集、保持および検索が可能となるようにデータベースの維持・管理などを LA システム設計の最初の段階から十分に考慮に入れておくべきである。

一般に、分析化学分野でのデータベースというと、測定データの蓄積を新規データと比較して同定することが連想される。しかし、それ以外にもデータベースの採用は、測定や解析が容易に習得できる、測定条件や測定データの検索が行えるなど、多面的利用を可能にする。

このところを念頭におき、大塚電子(株)ではキャピラリー電気泳動装置 CAPI-3100 のバージョンアップに伴い、CAPI-3200 システムのデータフォーマットに Microsoft® Access¹ のデータベース形式を採用した。これにより、測定条件、測定データ、解析条件、および解析データが、一つのデータとして関連づけられて、時系列として一元管理することが可能となった。また、スペクトルライブラリ、検量線データ、およびユーザー管理の情報もデータベースにおいて管理されている。これにより、これらの情報の検索が容易におこなうことができるようになっている。

3. 考察

データベース化した意義をまとめると、

- ① 測定条件、測定データなどの情報を一元管理し、個人が持っているデータの共有化を促進する。そして迅速な情報提供により、業務の効率化を図る。
- ② 自社技術のノウハウ(分析方法、泳動溶媒など)を蓄積し、会社全体としての技術の向上化を図る。
- ③ 測定データと測定条件を一つの画面上で表し、蓄積した類似実験データや実験ノウハウを活用して知的生産性・創造性の向上を図る。

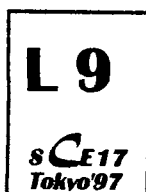
以上のことにより、情報の一元管理および容易な情報検索方法の開発、技術ノウハウの蓄積、技術的動向情報の提供、ペーパーレス化、情報へのアクセスインターフェースの統合化を図る。

実験データのデータベース化により、特に項目③における効率化が期待される。また、効率よくおこなうためには、検索システムの性能を向上させる必要がある。

4. 参考文献

- 1) 斉藤 功, 研究開発におけるデータベース活用法, 工業調査会(1994)
- 2) 木村 宏一, 入門 システムアドミニストレータ, 共立出版(1995)

¹ Microsoft Access は、米国 Microsoft 社の商標です。



CE-ESI-MSによる光学異性体の分離検出

大塚浩二^{*1)}, Christopher J. Smith²⁾, James Grainger²⁾, John R. Barr²⁾,
Donald G. Patterson, Jr.²⁾, 田中信男³⁾, 寺部 茂¹⁾

¹⁾姫路工大・理, ²⁾Centers for Disease Control and Prevention, ³⁾京工繊大・繊維

Stereoselective Separation and Detection by CE-ESI-MS

Koji Otsuka^{*1)}, Christopher J. Smith²⁾, James Grainger²⁾, John R. Barr²⁾,
Donald G. Patterson, Jr.²⁾, Nobuo Tanaka³⁾, Shigeru Terabe¹⁾

¹⁾Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-12, Japan; ²⁾EHLS-NCEH, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30341, USA; ³⁾Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Abstract

Recently, on-line coupling of capillary electrophoresis and mass spectrometry (CE-MS) has become popular as a powerful detection scheme in CE. In most cases, electrospray ionization (ESI) is adapted for a CE-MS interface and hence, non-volatile additives to separation solutions usually decrease the MS sensitivity. In this study, CE-ESI-MS was applied to stereoselective separation of some optically isomeric compounds. An ammonium acetate buffer containing heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -cyclodextrin (TMCD) was used as an enantioseparation solution, where TMCD migrated toward the cathodic end and moved directly into the ESI interface. However, by using the negative ionization mode along with a methanol-water-formic acid solution as a sheath liquid and nitrogen as a sheath gas, enantiomeric separation of three racemic herbicides was successfully achieved. Effects of several operation conditions on MS sensitivity were also investigated.

1. はじめに

近年、キャピラリー電気泳動(CE)の検出器として質量分析計(MS)を直接結合させるCE-MSに関する研究がさかんに行われている。通常CE-MSにおいてはエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を用いて試料のイオン化が行われるため、分離溶液中に不揮発性化合物が存在するとイオン化効率の低下やMSシグナル強度の減少、バックグラウンドノイズの増大などMS検出に対して悪影響を及ぼすことが多い。CEにおける分離選択性を改善・調節するための種々の添加剤も、MSに導入された場合同種の問題の要因となる可能性が指摘されている。ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)における低分子量イオン性界面活性剤はその典型的な例である。このような広い意味での添加剤をCE-MS系で使用する際には、部分充填(Partial-Filling)法やカウンターフロー法を用いて添加剤がMSへ導入されるのを抑制する試みがなされている。

本実験では、シクロデキストリン(CD)誘導体をキラル認識剤としてCEの分離溶液に添加し、紫外吸光検出とMS検出とを併用して除草剤成分である光学異性体の分離と検出とを行いCE-MSの応用の可能性を探ると共に、MSにおける添加剤の影響について検討した。

2. 実験

CEには主にMS用インターフェースを装備したBeckman P/ACE System 2000を、MSにはCE用ESIインターフェースを装備したFinnigan LCQを使用し、キャピラリーには内径50 μ m, 外径375 μ m, 全長

98 cmの内面無処理のフューズドシリカキャピラリーを用いた。試料には除草剤成分(Dichlorprop, Fenoprop, Mecoprop, Imazethapyr)のラセミ体(アセトニトリル溶液)を用いた。CEの分離溶液には 20 mM heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -CD (TMCD) を50 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.6) に溶解したものを、ESI のシース溶液にはギ酸または酢酸を含むメタノール - 水混合溶液を使用した。

3. 結果・考察

本実験では部分充填法やカウンターフロー法を用いず、また内面無処理のフューズドシリカキャピラリーをCE分離に使用して、CE-MSの可能性を検討した。その結果、TMCDを含む分離溶液をそのまま連続的にMSへ導入しても、比較的良好な再現性でMSシグナルを取得できることが明らかとなった。除草剤3種(Dichlorprop, Fenoprop, Mecoprop)の各ラセミ体混合試料をTMCD溶液で分析したところ、相互分離と各ラセミ体の光学分割が達成され、紫外吸光検出(UV)およびMS検出の双方で検出が可能であった。Fig. 1(a)にUV検出(214 nm)の結果を、また(b)にMS検出(負イオン検出モード)の結果を示す。

MS検出感度に対するシース溶液流量、ESIキャピラリー温度の影響について検討したところ、この除草剤混合試料検出についての最適値は、それぞれ 2.0 μ L/min, 250 $^{\circ}$ Cであった。

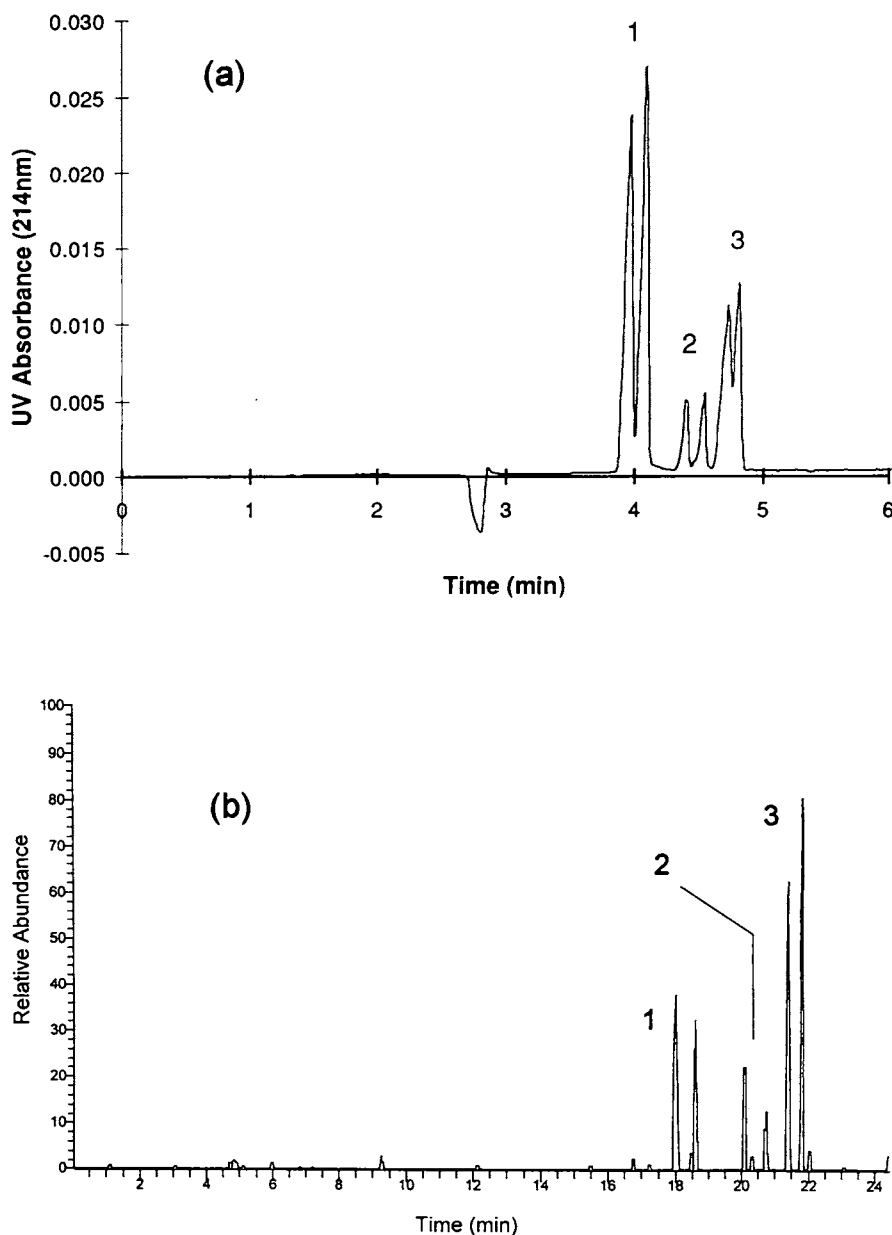
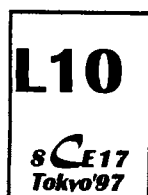


Fig. 1. Enantiomeric separation of herbicides by CD-CZE with (a)UV and (b)ESI-MS detections: (1)Fenoprop, (2)Mecoprop, (3)Dichlorprop. Separation solution, 20 mM TMCD in 50 mM ammonium acetate (pH 4.6); capillary, 50 μ m i.d. \times 980 mm, effective to UV detection, 200 mm; applied voltage by CE, 27.5 kV; detection wavelength, 214 nm; temperature, 25 $^{\circ}$ C; ESI voltage, -3.0 kV; ESI capillary temperature, 250 $^{\circ}$ C; sheath liquid, 50%(v/v) methanol in water containing 1%(v/v) formic acid; sheath liquid flow rate, 2.0 μ L/min; sheath gas, nitrogen.



電荷を持つシクロデキストリンと中性なシクロデキストリン の組合せ(Dual-CD system) による医薬品の光学分割

泉本真一*, 西 博行, 国仙谷良男, 佐藤忠司

(田辺製薬(株) 分析研究所)

Enantiomer Separation of Drugs by Capillary Electrophoresis with Dual Cyclodextrin System

Shin-ichi IZUMOTO*, Hiroyuki NISHI, Yoshio KOKUSENYA, Tadashi SATO
Analytical Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co. Ltd., 16-89, Kashima 3-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532, Japan

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) is powerful for the separation of enantiomers because of its relatively fast separation and high resolution. Various chiral additives have been employed for the CE enantiomer separation. Among them, cyclodextrins (CDs) show good enantioselectivity for a wide variety of enantiomeric compounds.

In this study, we employed charged CDs together with electrically neutral CDs (Dual CD system). Selectivity was manipulated through changing the concentration or the type of the electrically neutral CDs. After optimization of the running buffers, this method was applied to the optical purity testing of the drug.

【緒言】

キャピラリー電気泳動(CE)は高性能な分離分析法であり、光学分割に適した手法である。特に、シクロデキストリン(CD)は多くの化合物に対して光学認識能を示し、CE用キラルセクターとして繁用されている(CD-CZE)。演者らはCD誘導体のなかで、電荷を持つCDに着目し、動電クロマトグラフィー(EKC)用セクター、あるいは薬物の光学分割用キラルセクターとしての適用について検討し(CD-EKC)、既に報告した。¹⁾今回は、電荷を持つCDとして β -CD sulfateを使用し、これに電氣的に中性なCDを添加したDual CD系での光学異性体の分離について検討を行った。 β -CD sulfateの濃度、添加する中性CDの種類や濃度等について検討し、条件の最適化を行い、本手法の医薬品の光学純度測定への応用についても検討を加えた。

【実験】

キャピラリー電気泳動装置はベックマン社製のP/ACE5510を、キャピラリーはベックマン社製のフューズドシリカキャピラリー(全長47cm, 有効長40cm, 内径75 μ m)を使用した。印加電圧は-15kVまたは-20kV, 検出波長は210nm, キャピラリーの温度は20°Cで行った。泳動液は100mMリン酸水溶液にトリエチル

アミンを加えて pH を 3.0 に調整した後、 β -CD sulfate 及び中性 CD (DM- β -CD 他) を溶解させ、 $0.4 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過したものを使用した。CD 及び DM- β -CD は、シクロラボ社及びベックマン社から購入し、 β -CD sulfate はアルドリッチ社から購入したものを使用した。

【結果及び考察】

CE 用キラルセクターとして電荷を持つ β -CD sulfate のみ (CD-EKC) を使用し、検討した結果、22 種類のラセミ体中、デノパミン等 9 種類のラセミ体の光学分割が達成された。それらの中のいくつかは、酸性条件下で電気的に中性な CD を添加して光学分割を行った場合と比較して、エナンチオマーの移動順が逆転する現象が認められた。例えば、Fig.1 に示すデノパミンのように測定したいマイナーなエナンチオマー (S-form) が先に検出されることから、光学純度測定に有利となる場合があることが判った。

さらに、 β -CD sulfate を添加した泳動液に、電気的に中性な CD として DM- β -CD を添加し、分離選択性への影響について検討した。その結果を Fig.2 に示す。DM- β -CD の添加により試料の泳動時間が遅くなり、分離の改善が達成された。また、添加する CD の種類 (α , β , γ 型) や添加濃度 (0 ~ 20 mM) によっても分離選択性が大きく異なることが判った。

さらに、分離条件について最適化を行い、医薬品の光学純度測定への応用についても検討した。

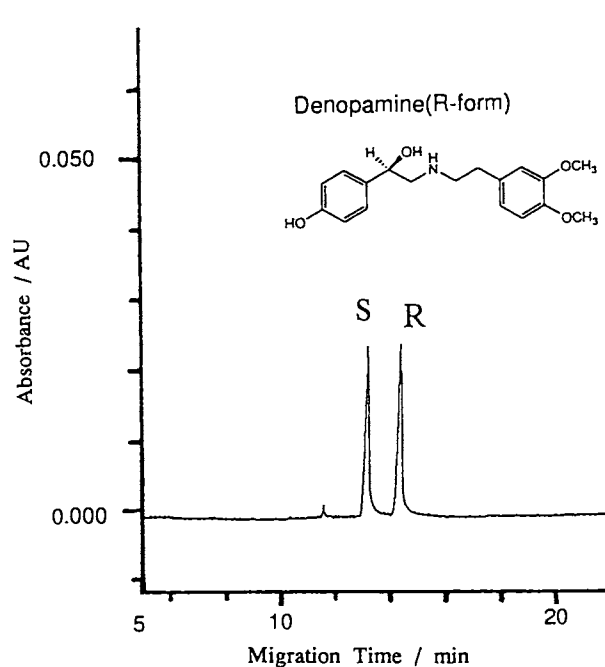


Fig.1. Separation of the Enantiomers of Denopamin

100 mM phosphate buffer (pH 3.0) of 10mM β -CDsulfate and 20 mM DM- β -CD.
Capillary, 50 μm i.d. x 47 cm (effect length 40 cm)
Applied voltage, 15 kV. Detection, 210 nm.

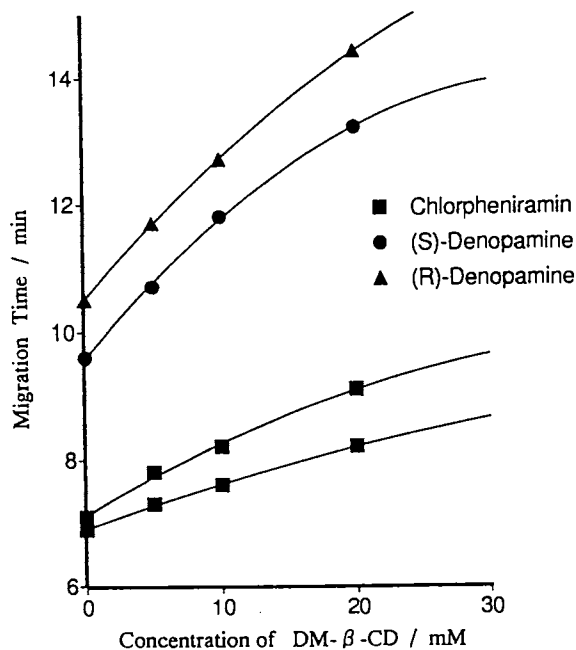


Fig.2. Effect of the Coccentration of DM- β -CD on the Separation of Denopamin and Chlorpheniramine

100 mM phosphate buffer (pH 3.0) of 10mM β -CDsulfate.
Other conditions as for Fig.1.



デキストリン修飾キャピラリー電気泳動法による ペンタゾシンの光学分割

- 1)高橋京子*, 堀内美和子, 加藤嘉代子, 渡辺卓穂, 中澤裕之, 2)杉本徹也
1)星薬大 2)グレラン製薬(株)

Chiral separation of pentazocine by dextrin-mediated capillary electrophoresis

1) Kyoko TAKAHASHI*, Miwako HORIUCHI, Kayoko KATO, Takaho WATANABE, Hiroyuki NAKAZAWA, 2) Tetsuya SUGIMOTO

1) Hoshi University, 2) Grelan Pharmaceutical Co., LTD.

Abstract

A chiral separation method for pentazocine using capillary electrophoresis was developed. A good separation of the enantiomers was obtained by use of maltodextrin as chiral selector and 20 mM Tris-phosphate (pH 2.5) buffer solution. Under the investigated conditions, the enantiomers were migrated within 15 min with a sufficient resolution. A linearity calibration curve was observed between the ratio of peak height to the internal standard dextromethorphan and the concentration in the range of 10 - 100 $\mu\text{g/mL}$ at 229nm. The present method is applicable to the separation and quantification of each enantiomer in pharmaceuticals.

1. はじめに

ペンタゾシンは非麻薬性の鎮痛薬として、临床上、ガン疼痛や麻酔前投薬に広く使用されている医薬品である。ペンタゾシンには光学異性体が存在し(Fig.1)、そのエナンチオマー間で薬理作用、分布、代謝、排泄等が異なっている。(－)－ペンタゾシンは鎮痛作用を持つが、(＋)－ペンタゾシンは鎮痛作用をほとんど持たず、ペンタゾシンの鎮痛作用は(－)－体に起因していると考えられている¹⁾。また、(＋)－ペンタゾシンは、(－)－体の鎮痛作用を減弱することが報告されているため²⁾、(－)－ペンタゾシンのみを医薬品とすることで、(＋)－体に由来する副作用の軽減、鎮痛作用の増強が望めるのではないかと期待されている。ペンタゾシンの光学分割は、ラジオイムノアッセイ法³⁾、高速液体クロマトグラフィー⁴⁾による報告があるが、特別な施設を必要としたり、高価な光学分離カラムを必要とするなどの問題点がある。そこで、近年、医薬品の光学分割が多数報告されているキャピラリー電気泳動法を用いて、ペンタゾシンの迅速な光学分割法について諸条件の検討を行った。

2. 実験

試料：標準試料として(+/-)-ペンタゾシン、内標準物質としてデキストロメトルファンを

用いた。分離ピークの同定には(-)-ペンタゾシンを使用した。

装置：キャピラリー電気泳動装置は Beckman 社製 P/ACE 5510、フューズドシリカキャピラリーは内径 75 μ m、長さ 47 cm (有効長 40 cm) を使用した。泳動緩衝液には Tris-リン酸緩衝液を濃度、pH を調整して用いた。検出はフォトダイオードアレイ検出器で行った。

3. 結果と考察

至適 Chiral Selector の選択：Chiral selector として、 β -シクロデキストリン(CD)、メチル- β -CD、ジメチル- β -CD、トリメチル- β -CD、ヒドロキシエチル- β -CD、ヒドロキシエチル- β -CD、 γ -CD は 15 mM、マルトデキストリンは 2% の濃度で検討した結果、マルトデキストリンを用いた場合、(-)-体と(+)-体間の相互分離が良好であった。さらに、マルトデキストリン濃度の影響を調べたところ、マルトデキストリンの濃度が高くなるほど分離がよくなったが、泳動時間は延長した。

緩衝液の pH と濃度、及び印可電圧の影響：5% マルトデキストリンを添加した Tris-リン酸緩衝液について、pH 2.5~7.0、濃度 10 mM~40 mM の範囲で分離度と泳動時間について調べたところ、pH が高くなるほど泳動時間は短くなり、相互分離は低下した。また、緩衝液濃度が上がるほど、多少の泳動時間の延長、分離度の向上が見られた。印加電圧については、電圧が高いほど泳動時間が速くなるが、分離度は低下した。20 mM Tris-リン酸緩衝液 (pH 2.5、5% マルトデキストリン添加) を用いた場合は、ペンタゾシンのラセミ体を 15 分以内で再現性よく分割可能であった。内標準物質としてデキストロメトルファンを用いて検量線を作成したところ、10 - 100 μ g/mL の範囲で良好な直線性が得られた。本法は、ペンタゾシンラセミ体を短時間で再現性よく分割可能であることから、ペンタゾシン製剤分析、品質管理等に応用できるものと期待される。

4. 参考文献

- 1) Berkowitz B.A and Way E.L, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 177, 500-508, (1971)
- 2) Chen, C-C and Pasternak, G.W, *Eur. J. Pharmacol.* 294, 303-308, (1995)
- 3) Nambara, T, *et. al.*, *J. Pharm. Dyn.* 2, 151-156, (1979)
- 4) Kelly, J.W, *et. al.*, *Biomed. Chromatogr.* 8, 255-257, (1994)

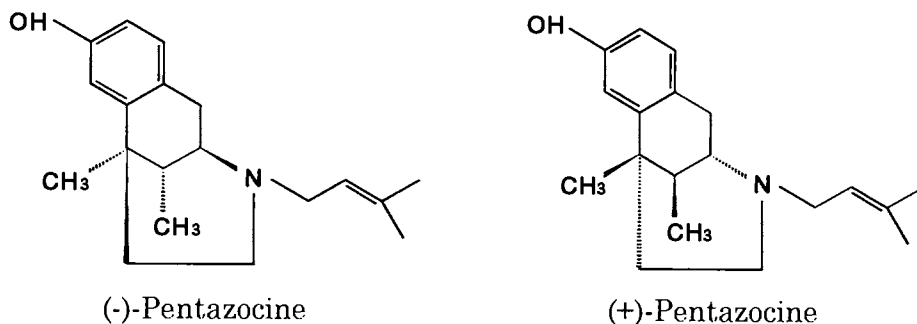


Fig.1 Structures of pentazocine enantiomers

L12

SC17
Tokyo'97

キャピラリー電気泳動による薬物-血漿リポタンパク質結合解析

(京大・薬) Niveen Abdel Latif Mohamed*、澁川明正、中川照眞

ANALYSIS OF DRUG - PLASMA LIPOPROTEIN BINDING USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Niveen Abdel Latif Mohamed*, Akimasa Shibukawa, Terumichi Nakagawa
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Capillary electrophoresis / frontal analysis (CE/FA) method was applied to the studies on binding between racemic drug and plasma lipoproteins. A ultra small volume (ca. 100nL) of (R)- or (S)-nilvadipine and human high-density lipoprotein (HDL) or low-density lipoprotein (LDL) mixed solution was introduced into capillary. Each enantiomer migrated as a zonal peak with a plateau, and the unbound drug concentration was calculated from the plateau height. Unbound nilvadipine fraction was constant regardless of the total drug concentration (9.86-29.2 μ M). Total binding affinities to HDL were calculated as $1.03 (\pm 0.04) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and $1.02 (\pm 0.03) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for (R)- and (S)-nilvadipine, respectively, and those to LDL were $7.66 (\pm 0.53) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ and $7.47 (\pm 0.33) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for (R)- and (S)-nilvadipine, respectively. This means that there is no enantiomeric difference in nilvadipine - lipoprotein binding, and the affinity to LDL which contains much higher lipid fraction is seventy times stronger than HDL.

【緒言】薬物は血漿中でタンパク質と可逆的に結合し（血漿タンパク結合）、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動できるが結合型薬物は血管壁を透過できない。そのため、血漿タンパク結合は薬物の体内動態や薬理効果（又は副作用）の発現に大きな影響を与える。また、光学活性な薬物のタンパク結合は光学異性体間で異なる可能性がある。血漿タンパク結合にはアルブミンや α 1-酸性糖タンパク質が関与するが、その他血漿リポタンパク質も寄与することが知られている。しかしながらアルブミンや α 1-酸性糖タンパク質に比べて、血漿リポタンパク質への薬物の結合性に関する研究は少なく、立体選択的研究はほとんど報告されていない。これは血漿リポタンパク質の入手が容易ではなく、微量試料を用いる結合分析法がなかったためである。一方、我々は先端分析法をキャピラリー電気泳動に組み込んだ CE/FA 法を開発し、アルブミンや α 1-酸性糖タンパク質と薬物との超微量結合分析に成功するとともに、立体選択的タンパク結合研究に適用してきた。前回の本シンポジウムにおいて、CE/FA法の塩基性薬物であるプロプラノロールと高密度リポタンパク質(HDL)との結合解析への

適用を報告した。今回は、プロプラノロールよりもはるかに強く血漿リポタンパク質と結合する中性の疎水性薬物であるニルバジピン (NV) と高密度リポタンパク質 (HDL) や低密度リポタンパク質 (LDL) との結合を光学異性体ごとに超微量分析した。

【実験】 HPCE 装置には ABI 社製 270A を用いた。泳動緩衝液はリン酸緩衝液 (pH7.4、イオン強度 0.17)、キャピラリーには Z 型セルを有する全長 122cm (有効長 100cm)、内径 75 μ m の熔融シリカキャピラリーを使用した。検出は 215nm、印加電圧は +4 kV、温度は 25 $^{\circ}$ C で行った。試料溶液には 9.86~29.2 μ M の (R)-NV 又は (S)-NV と 0.75g/L の HDL 又は 1.1g/L の LDL との混合溶液 (pH7.4、イオン強度 0.17) を用いた。

NaBr を添加して密度調節した健常人の血漿を超遠心 (38,000 又は 50,000rpm、20~48 時間、4 $^{\circ}$ C) することにより、LDL 画分 (密度 1.02~1.063g/mL) と HDL 画分 (密度 1.063~1.21g/mL) を得た。超遠心装置には Beckman L7-65 (ベックマン社) を使用した。各画分はサイズ排除クロマトグラフィーで精製・溶媒置換して使用した。

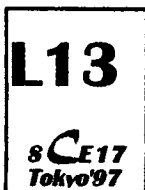
【結果・考察】 混合試料を吸引で 4 秒 (約 100nL) 注入後、泳動を開始する。NV は中性薬物であり、非結合型 NV は電気浸透流により負極 (検出) 方向に移動する。負に帯電した血漿リポタンパク質や結合型薬物も負極方向に移動するが、その移動度は非結合型 NV よりも遅い。結合型 NV は血漿リポタンパク質から解離した後、負極方向に移動する。薬物-タンパク質混合ゾーンは徐々に短くなり、最終的に総ての薬物はタンパク質から完全に分離されるが、タンパク結合は可逆的で瞬時に平衡に達する速い相互作用であるので、分離中、混合ゾーン中の結合平衡は一定に保たれる。その結果、非結合型薬物のゾーンが形成され、プラトー部分をもつ帯状ピークとして検出される。このプラトー高さから非結合型 NV 濃度を求めることができる。

HDL 溶液中の (R)-並びに (S)-NV の非タンパク結合率は薬物総濃度に依らず、約 19% とほぼ一定値を示し、(R)-NV と (S)-NV の非結合率はほとんど同じ値であり、PRO の HDL への結合には立体選択性が見られないことが判明した。同様に、LDL 溶液中の NV 光学異性体の非タンパク結合率は薬物総濃度に依らず約 22% とほぼ一定値を示し、立体選択性は見られなかった。

今回の分析結果から計算した NV と LDL との total binding affinity は $7.57 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり、HDL との total binding affinity は $1.03 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。即ち、脂質含量が高い LDL との結合は HDL との結合に比べて約 70 倍も高かった。薬物-血漿リポタンパク質間の相互作用には脂質層への薬物の溶解とアポリポタンパク質との結合が考えられるが、今回の結果から、NV との結合では脂質層への NV の溶解が支配的であると言える。

このように、疎水性の強い薬物と血漿リポタンパク質との相互作用の超微量解析に本法が有用であることが示された。

- 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.



有機陰イオンのイオン会合—キャピラリー電気泳動分離における 対陽イオンの分子構造効果

和田栄子*, 高柳俊夫, 本水昌二
岡山大学理学部

Molecular Structure Effect on the Separation of Organic Anions by Ion Association - Capillary Zone Electrophoresis

Eiko Wada*, Toshio Takayanagi and Shoji Motomizu
Faculty of Science, Okayama University

Abstract

On capillary zone electrophoretic separation utilizing ion association reaction, the improvement of the separability and selectivity of organic anions have been examined with several pairing cations. The pairing cations examined were ones with various hydrophobicity and hydrophilicity, possibility of $\pi - \pi$ interaction with aromatic ring and ability of multipoint interaction. The separation and ion associability behavior were compared with each other.

1. はじめに

演者らは、イオン性物質の分離性能の向上を目的として、イオン会合反応の活用について検討してきた。また、従来の方法では、反応性が乏しく解析が困難であった水溶液内イオン会合反応について、移動度変化を利用するイオン会合定数の決定法を開発した。これらを基にイオン会合反応における分子間相互作用について考察を行った。これまでに、イオン会合試薬のメチレン鎖1つあたりのイオン会合定数 (K_{ass}) への寄与は対数値で 0.06 であること、2価・2価間のイオン会合では電荷間の多点相互作用により選択性が変化すること、また分離のシミュレーションの結果、微少なイオン会合定数の差でも有意な分離が得られることを明らかにしてきた。本研究ではイオン会合試薬として、芳香環を有するピオローゲン誘導体 (N,N'-ジアルキル-4,4'-ビピリジニウムイオン)、比較的親水性の高い $H_3N^+(CH_2)_nN^+H_3$ (H_n^{2+} ; $n=3,5,7$) を用いたところ、イオン会合性の向上あるいは選択性の著しい変化が見られた。以下これらの考察について報告する。

2. 実験

電気泳動装置としては、ABI 270A-HT を使用した。キャピラリーは全長 72cm、検出器までの有効長 50cm、内径 50 μ m のポリマーコーティング型キャピラリー (CElect™-N, SUPELCO) を用いた。泳動液は 10mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) に、種々のイオン会合試薬を添加して用いた。試料は、 1×10^{-5} M の芳香族陰イオンをカソード側から減圧法により 3 秒間 (約 9nl) 注入し、35 $^{\circ}$ C、25kV で電気泳動を行い、230nm で吸光検出した。電

気浸透流速度は3%エタノールをアノード側から注入し、そのシグナルから求めた。

3. 結果と考察

3. 1 芳香族陰イオンとビオローゲン誘導体とのイオン会合

イオン会合試薬として芳香環を有するビオローゲン誘導体 (MV^{2+} , EV^{2+} , OV^{2+} , BV^{2+}) を用いた。電気泳動法で求めた移動度を用いて以下の式(1)に代入し、非線形最小二乗法によりイオン会合定数を決定した。

$$-\mu_{ep}' = \frac{1}{1 + K_{ass}[Q^{n+}]} (-\mu_{ep}) + \frac{K_{ass}[Q^{n+}]}{1 + K_{ass}[Q^{n+}]} (-\mu_{ep,IA}) \quad (1)$$

電荷間距離のほぼ等しいビオローゲン誘導体と $Et_3N^+(CH_2)_5N^+Et_3$ (C_5^{2+}) を比較すると前者のイオン会合定数は0.3~0.5大きくなった。芳香族陰イオンとの π 電子間相互作用によりイオン会合性が向上したと考えられる。また、アルキル鎖が長いほどイオン会合性が大きく、疎水性の寄与が見られた(Fig.1)。ナフタレンジスルホン酸の位置異性体では対イオンにおいて電荷間距離に近いものほどイオン会合性が大きく、多点相互作用の効果が見られた。

3. 2 疎水性と親水性の比較

イオン会合試薬として疎水性の高い $Et_3N^+(CH_2)_nN^+Et_3$ (C_n^{2+} ; $n=3,5,7$) と比較的親水性の試薬である H_n^{2+} を用いてイオン会合性の比較をした。親水性の H_n^{2+} を用いた場合、 C_n^{2+} より、ほとんどのイオンにおいてイオン会合性は小さくなったが、オルトフタル酸及び2,3-ナフタレンジスルホン酸イオンでは会合性が大きくなった(Fig.2)。これらのイオンは電荷が近接しており、水和しやすいためイオン会合しにくいと考えていたが、親水性の試薬を用いることでイオン会合性が向上するということが分かった。

4. まとめ

水溶液内のイオン会合反応には、電荷間の静電引力に加えイオンの疎水性、親水性、多点相互作用、 π 電子間相互作用なども効果的に利用できることが示された。

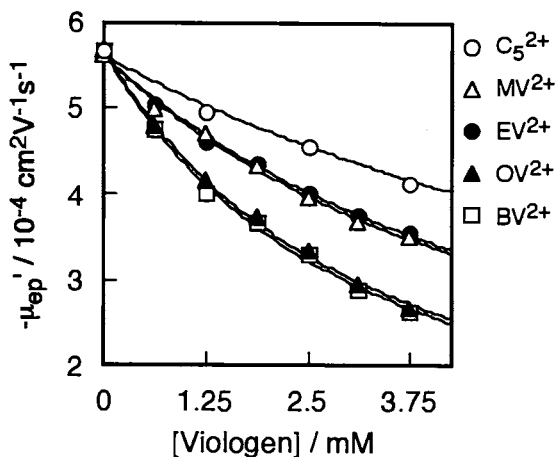


Fig.1 Mobility change of 1,5-NDS in the presence of ion association reagents.

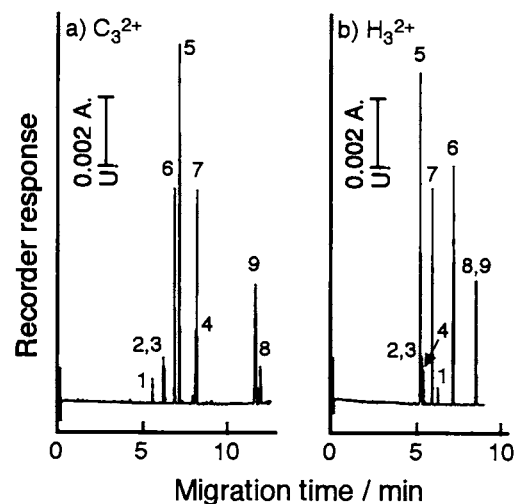


Fig.2 Electropherograms of aromatic anions.
1, PH; 2, i-PH; 3, t-PH; 4, 1,5-NDS; 5, 2,6-NDS;
6, 2,3-NDC; 7, 2,6-NDC; 8, 1-NS; 9, 2-NS.



キャピラリー電気泳動法によるアルカリ金属-クラウンエーテル 錯体のイオン会合反応解析

高柳俊夫*, 本水昌二
岡山大学理学部

Analysis of the Ion Association of the Complex of Alkaline metal Ions with Crown Ethers by a Capillary-Electrophoretic Method

Toshio Takayanagi* and Shoji Motomizu
Faculty of Science, Okayama University

Abstract

Complex formation constants of alkaline metal ions with crown ethers, which are slightly soluble in water, in aqueous solution were determined by analyzing mobility change in capillary zone electrophoresis. Ion association reactions of the complexes with perchlorate and picrate ions were also analyzed. The contribution of ion associability to the extractability of ion associates were considered.

1. はじめに

クラウンエーテル化合物はアルカリ金属イオンを識別する機能を有しているが、ジベンゾ-18-クラウン-6 (DB18C6) などの疎水性の高いものは水に対する溶解度が低く、通常の方法では水溶液内の反応解析は困難である。本研究では、キャピラリー電気泳動による正確な移動度測定法を利用することにより、 10^{-5} M の DB18C6 を試料溶液とし、大過剰存在するアルカリ金属イオンとの反応に基づく移動度変化から、水溶液内での上記反応の解析を行った。更に、生成した錯体と疎水性陰イオンとのイオン会合反応を検討し、イオン会合抽出への寄与を考察した。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置として、Applied Biosystems 270A-HT を使用し、これに溶融シリカキャピラリー (内径 50 μ m, 全長 72cm, 有効長 50cm) を装着した。泳動液として、5mM H_3PO_4 - Li_3PO_4 , NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 - K_2HPO_4 , H_3PO_4 - RbOH , H_3PO_4 - CsOH (pH 7.1 \pm 0.2)を用い、対応する塩化アルカリを 0~40mM 添加したものをを用いた。 1×10^{-5} M の DB18C6 を含む水溶液を試料溶液として、アノード側から減圧法により 3 秒間注入し、10kV の電圧を印加して電気泳動を行い、200nm で吸光検出して移動度を求めた。電気浸透流の移動度は、試料溶液に添加した 3 (v/v)%エタノールをモニターして求めた。イオン会合反応の解析では、アルカリ金属イオン濃度を 27.5mM に固定し、対陰イオン濃度の変化による移動度変化から解析した。

3. 結果と考察

3.1 アルカリ金属イオンと DB18C6 との水溶液内錯形成反応

DB18C6 は非イオン性物質であり、本来電気浸透流とともに泳動する。しかしながら、アルカリ金属イオンの存在下では、電気浸透流よりも速く泳動することから、正電荷を帯びていることが分かる (Fig. 1)。アルカリ金属イオン濃度に伴う移動度変化を Fig. 2 に示す。移動度変化から、次式を用いて非線形最小二乗法により 1 : 1 キレート生成定数 K_{ML} を求めた。

$$\mu_{ep,L}' = \frac{1}{1 + K_{ML}[M^+]} \mu_{ep,L} + \frac{K_{ML}[M^+]}{1 + K_{ML}[M^+]} \mu_{ep,ML}$$

最適化された DB18C6 の移動度 $\mu_{ep,L}$ はほぼ 0 となり、また生成定数は既報値と良好に一致した。

3.2 アルカリ金属-DB18C6 錯体と疎水性陰イオンとの水溶液内イオン会合反応

ピクリン酸イオンの移動度は、アルカリ金属イオンの濃度によらずほぼ一定となり、イオン会合性が低いことが分かった。アルカリ金属-DB18C6 錯体の移動度は、過塩素酸イオンの存在下ではほとんど変化しない。一方、ピクリン酸イオンの存在下ではその濃度増加に伴って大きく低下し、クラウンエーテルと錯体を形成することにより、イオン会合性が増加することが分かった。1 : 1 のイオン会合反応を仮定して、イオン会合定数 $K_{ML,x}$ を決定した。Na 錯体が K 錯体よりも高い会合性を示した。

4. まとめ

イオン会合抽出への寄与について検討した。イオン会合抽出定数 (K_{ex}) は以下の式で示され、錯体の生成 (K_{ML})、水溶液内イオン会合 ($K_{ML,x}$)、クラウンエーテルの分配 ($K_{D,L}$)、生成したイオン会合体の分配 ($K_{D,ML,x}$) を用いて表すことができる。

$$K_{ex} = K_{ML} \times K_{ML,x} \times K_{D,ML,x} / K_{D,L}$$

得られた値から $K_{D,ML,x}$ を計算した。Na⁺ と K⁺ の抽出分離では、 K_{ML} 、 $K_{D,ML,x}$ が選択的に大きく寄与していることが分かった。

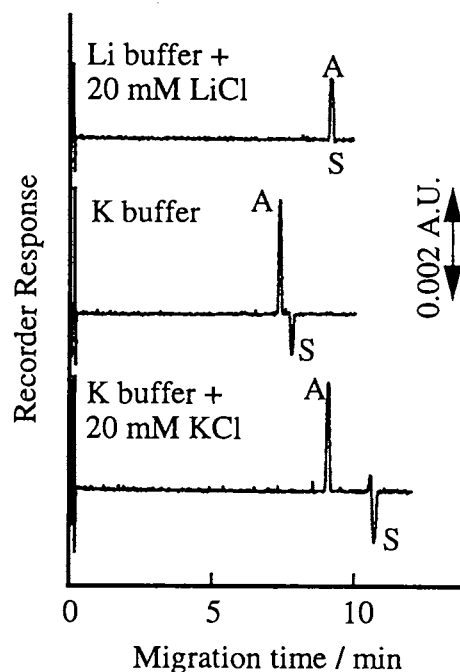


Fig. 1 Electropherograms.
A, Analyte (DB18C6); S, EOF.

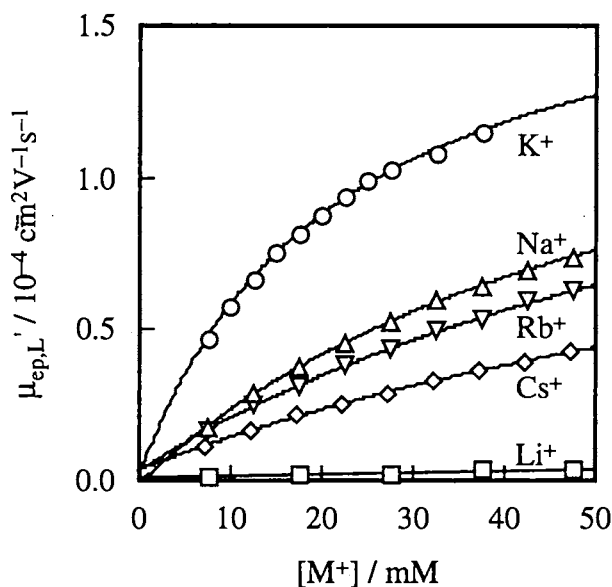


Fig. 2 Mobility change of DB18C6 in the presence of alkaline metal ion (M^+).



キャピラリーを反応および分離の場とする分析法 その5 酵素含有泳動液を用いるキャピラリー通過方式による分析

多賀 淳*、本田 進
近畿大・薬

Analytical Methods Utilizing a Capillary for Reaction and Separation Part 5 Analysis in an Enzyme-Containing Electrophoretic Solution Using the Throughout-Capillary Derivatization Format Atsushi Taga* and Susumu Honda Faculty of Pharmaceutical Sciences, KINKI UNIVERSITY

ABSTRACT Sialic acid released from sialooligosaccharides by sialidase could be easily determined by throughout-capillary digestion in a sialidase-containing electrophoretic solution using the stepwise applied voltage technique. Thus, sialidase activity was assayed by determining N-acetylneuramic acid, released from N-acetylneuraminylactose by this method. Sialic acid content of fetuin could also be easily and accurately measured similarly. This method is rapid and requires only small amounts of substrates and enzymes.

1. はじめに

キャピラリー内で誘導体化を行い生成物を直ちにあるいは同時に分析できることは、キャピラリー電気泳動の大きな魅力の一つである。これにはいくつかの型があるが^{1,2)}、本シリーズ第3報でも述べたように試薬含有泳動液中で throughout-capillary 型の誘導体化および分析を行うことも有用な方法の一つである。この報告では低分子間的高速反応を対象としたが、本報では高分子が関与する低速反応を取り扱い、基本的な検討を行った結果を報告する。

2. 実験方法

キャピラリー電気泳動：アプライドバイオシステムズ 270A 型装置にリニアポリアクリルアミドで内面を被覆したフューズドシリカを装着して使用した。泳動液：50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に *Arthrobacter ureafaciens* 由来のシアリダーゼを添加して使用した。試料：N-アセチルノイラミンラクトースおよび牛胎児血清フェツインをそれぞれ 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶かして使用した。キャピラリー温度：37°C。検出波長：200 nm。

3. 結果と考察

本報においてはシアロオリゴ糖に対するシアリダーゼの反応をとりあげ、主として遊離するシアル酸の生成量を指標とする研究を行った。**酵素反応の電圧依存性** N-アセチルノイラミンラクトース (Neu-Lac) を試料とし 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を泳動液として分析したところ、Neu-Lac および不純物として存在する N-アセチルノイラミン酸 (NANA) のピークが検出された (Fig. 1a)。シアリダーゼを含む酢酸緩衝液を泳動液として用いて印加電圧 5 kV で電気泳動を行った場合には、酵素反応により生じた NANA 由来の幅広いピークが現われ、原料である Neu-Lac のピークが消失した。また、印加電圧を 10 kV および 15 kV に上げて分析したところ、酵素反応により生じた NANA 由来の幅広いピークに重なって、残存する Neu-Lac のピークが検出された。このことから、印加電圧を制御することにより反応時間が変化し、それに伴い NANA の生成量が変化することが示された。**2 段階電圧印加と生成物の定量** 電圧を 2 段階で変化させて分析した結果およびピーク部分の拡大図を Fig. 1b に示す。ピークの拡大図において矢印で示した部分が 5 kV で 10 分間電気泳動する間に生成した NANA によるものであり、黒く塗りつぶした部分では電圧を 20 kV に変化させてから検出されるまでの間に生成した NANA が検出されていると考えられる。したがって矢印の部分のピーク面積を測定することにより一定反応時間における NANA の生成量を求めることができる。この方法を用いることにより Nue-Lac に対するシアリダーゼ活性を測定することができた。また、5 kV 印加時間を十分にとって消化した際のシアル酸生成量から牛胎児血清フェツインのシアル酸含量を短時間で容易に測定することができた。

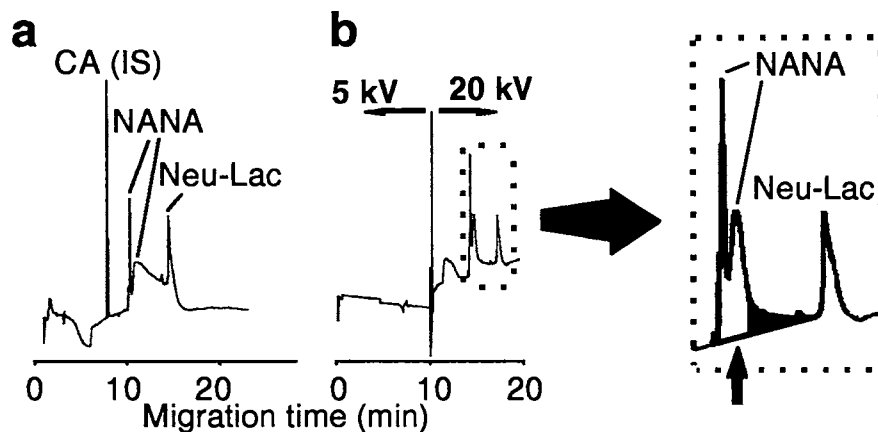


Fig. 1. (a) Observation of the reduction of N-acetylneuraminylactose concentration, when electrophoresed with concurrent digestion by sialidase throughout a capillary. (b) Observation of sialic acid formed during pre-stage voltage application (5 kV). Capillary: polyacrylamide-coated fused silica (50 μ m i. d., 50 cm), carrier: 50 mM acetate buffer (pH 5.0) containing sialidase. Applied voltage: 15 kV, fixed (a), or 5 kV for 10 min followed by 20 kV (b), detection: UV absorption at 200 nm, oven temperature: 37°C.

4. 文献

- 1) A. Taga, S. Honda, *J. Chromatogr. A* 742(1996) 243-250.
- 2) A. Taga, M. Sugimura and S. Honda, submitted to *J. Chromatogr.*



キャピラリー内での予備濃縮による 糖タンパク質糖鎖分析の微量化

本田 進、八島由佳、多賀 淳、鈴木茂生*

Microanalysis of Carbohydrates in Glycoproteins by Preconcentration in a Capillary

Susumu Honda, Yuka Yashima, Atsushi Taga, and Shigeo Suzuki
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Abstract We have developed a method for routine analysis of oligosaccharides in glycoproteins, based on derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) and simultaneous analysis of the derivatives by various modes of capillary electrophoresis. This method allows analysis of oligosaccharides in glycoprotein samples of as small as μ g-amounts. In this paper an attempt for further sensitization of this mapping method is described, based on preconcentration of the PMP derivatives utilizing the ionic strength difference between sample matrix and electrophoretic solution and mobility difference between sample matrix and analyte.

1. はじめに

近年糖質のもつ多彩な生化学的機能が注目されるようになり、性能の高い糖鎖分析法が要求されているが、現状でこの要求に応えているのは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法である。しかし、生体内に存在する糖鎖の種類はきわめて多く (数百種)、これらを正しく同定することはきわめて困難である。また、最近では医療においてタンパク質性医薬品の比重が高まっているが、これらの医薬品がバイオテクノロジーにより生産されるため、糖鎖に対する厳しいチェックが必要になっている。

このような状況の中で当プロジェクトではキャピラリー電気泳動 (CE) による糖鎖のルーティン分析システムを開発する研究を続け、基本的な部分をほぼ完成した。1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) による誘導体化を柱にするこの方法においては、 μ gレベルの糖タンパク質糖鎖を分析できるが、さらに微量化が望まれている。そこで分析試料の予備濃縮による微量化について検討を行った。

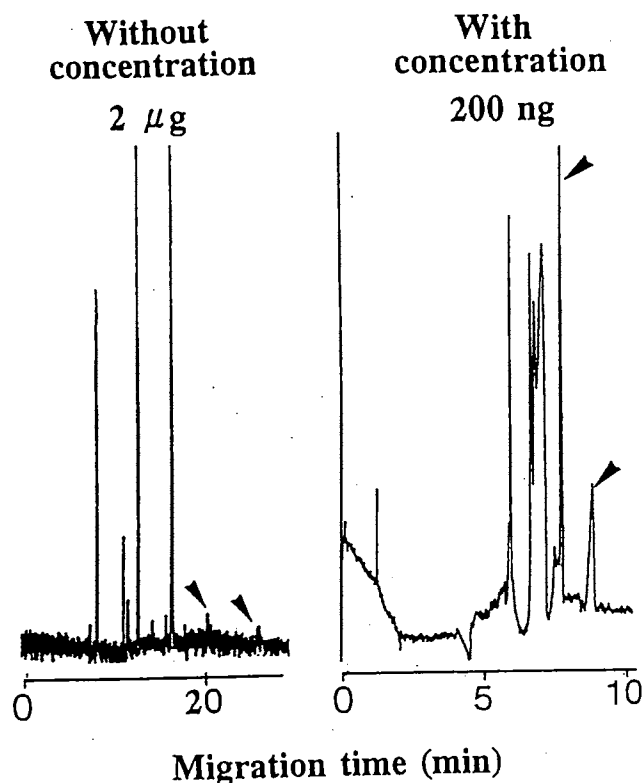
2. 実験

CE : Applied Biosystem 270A 型装置を使用し、これに内面ポリアクリルアミド被覆フューズドシリカキャピラリー (50 μ m i.d., 72.5 cm; Polymolymicro Technologies) を装着した。検出は 245nm における吸収を利用して行った。糖タンパク質試料 : 主としてヒト血清 transferrin を用いた。**糖鎖の切り離し** : PNGase F を用いて行った。**誘導体化** : 既報¹⁾に従い、PMPにより誘導体化した。

3. 結果・考察

イオン強度差を利用した濃縮

PMPによる誘導体化は、糖鎖をPMPをアルカリで中和して調製した試薬溶液中で反応させ、反応混合物を塩酸で中和したのち過剰のPMPを抽出除去することにより行う。最終的に得られた残鎖を濃度のSDS溶液に溶かして分析用試料とし、一方、泳動液には高濃度(30mM)にSDSを含むリン酸緩衝液を用いて動電クロマトグラフィーによる分析を行った。分析試料溶液と泳動液の間にはイオン強度の差があるために浸透圧差が生じ、通常の10倍程度の体積の試料溶液をキャピラリーに導入しても自然に濃縮され、ピークはあまり広がらずに糖鎖誘導体を分析することができ、これによって1桁の感度上昇が可能であった。

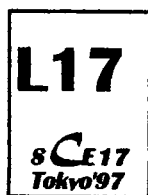


移動度差を利用した濃縮

上記分析用試料溶液を多量に陽極側よりキャピラリーに導入したのち、一定時間泳動させた。この分析用試料溶液には塩化物イオンが高濃度で含まれているが、移動度が高いためこの操作により大部分は陽極側に回収された、それに反して糖鎖PMP誘導体は移動度が小さいため電極側へは回収されずキャピラリーの試料導入口付近に濃縮された。続いて検出された。この方法により2桁程度の濃縮が達成された。Fig. 1に分析例を示す。この例では200 ngのtransferrin由来糖鎖が余裕をもって検出されている。

Fig.1. Analysis of PMP-derivatives of transferrin N-glycans after being concentrated utilizing mobility difference between sample and matrix. Carrier, 50 mM phosphate buffer containing SDS (30 mM). Applied voltage, 18 kV. The aqueous solution of the derivatization mixture was introduced from the anodic end by injection for 30 sec, then high voltage (5 kV) was applied for 10 min for preconcentration. Subsequently the electrodes were changed and the concentrated PMP derivatives were analyzed by SDS-micellar electrokinetic chromatography.

文献 ¹⁾S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, and J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, 180, 351 (1989).



キャピラリー電気泳動分析におけるオンライン 電気泳動濃縮法

呉 行正^{1*}、穂坂明彦²、保母敏行²

1 福井大・工、2 都立大・工

An On-line Electrophoretic Concentration Method for Capillary Electrophoresis

Xing-Zheng Wu^{1*}、Akihiko Hosaka²、Toshiyuki Hobo²

1:Department of Materials Science and Engineering, Faculty of Engineering, Fukui University, Bunkyo 3-9-1, Fukui-shi, 910. 2:Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Tokyo Metropolitan University, Minami Ohsawa, Hachiohji, Tokyo 192-03.

Abstract

One problem in UV absorbance detector for capillary electrophoresis (CE) is low concentration sensitivity due to the short pathlength. In this work, a novel on-line electrophoretic concentration method for capillary electrophoresis is proposed. A short semipermeable hollow fiber is connected to the inlet end of a capillary. When a sampling electric field is applied across one part of the hollow fiber, protein cations can not pass through the hollow fiber, and thus stopped in the hollow fiber, i.e., protein cations are concentrated in the hollow fiber. After a certain injection (concentration) time, CE is carried out. Four proteins were used as model samples, high concentration factor and high concentration sensitivity were demonstrated for the method.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動分析(CE)の検出器として最もよく使われている UV 検出器の濃度検出感度は HPLC の場合と比べると、通常一桁か二桁程度低い。従って、UV 検出器の濃度検出感度の向上は CE の一つの課題である。試料のオンライン濃縮は CE の濃度検出感度を向上する一つのアプローチである。現在、報告されたオンライン濃縮法には吸着剤をキャピラリーに詰める化学吸着濃縮法と不連続な緩衝液を使用する電気泳動濃縮法がある。

本研究では、キャピラリーの試料注入端に膜チューブをつなぎ、CE の新規オンライン電気泳動濃縮法を提案した。幾つかの蛋白質試料をモデル試料として用いて検討したところ、本法による CE の濃度検出感度の向上が確認されたので、報告する。

2. 実験

CE の装置系は高圧電源、キャピラリー、UV 検出器 (波長:215nm) から構成した。キャピラリー (i.d.:50 μ m、o.d.:375 μ m) の長さは 50cm で、試料の注入端と検出器との間の

距離は 35cm であった。試料の注入端にはテフロンチューブ(i.d.:0.5mm) を介し、透析膜チューブ(i.d.:0.2mm,長さ 4mm) を接続した(図1)。接続部をV型ガラスチューブに入れた。そのV型ガラスチューブにも緩衝液を満たした。試料を注入するとき、V型ガラスチューブと試料バイアルとの間に注入電圧(140V)を一定時間印加した。試料を注入後、V型ガラスチューブを緩衝液バイアルに差し込み、キャピラリーの另一端との間に電圧 10 KV を印加し、CE を行った。

緩衝液は pH3.0 のトリスりん酸緩衝液を用いた。モデル試料としての蛋白質試料チトクロム C、リゾチーム、リボヌクレアーゼ A、キモトリプシノーゲン A を緩衝液に各 10^{-4} mg/ml 溶解して用いた。

3. 結果と考察

図1に示したように、試料を注入するとき、注入電圧をV型ガラスチューブとその下の試料バイアルとの間に印加するので(V型ガラスチューブ側“-”、試料バイアル側“+”)、蛋白質陽イオンと緩衝液陽イオンが試料バイアルからV型ガラスチューブ側へ泳動する。蛋白質陽イオンが透析膜を通過できないので、透析膜内に留めることになる。つまり、蛋白質陽イオンが透析膜内で濃縮される。濃縮された蛋白質試料はCEにより分離、検出される。図2に本法による濃度検出感度の向上結果を示す。図2-Aは 10^{-4} mg/mlモデル蛋白質試料の通常のCE分析結果で、本装置系は 10^{-4} mg/mlモデル蛋白質試料の検出ができないことを示した。一方、図2-Bは本法によるCE分析結果である。10秒間の注入(濃縮)時間があれば、 10^{-4} mg/mlモデル蛋白質試料の検出は十分できることを明らかにした。従って、本法によりCEの濃度検出感度が向上した。

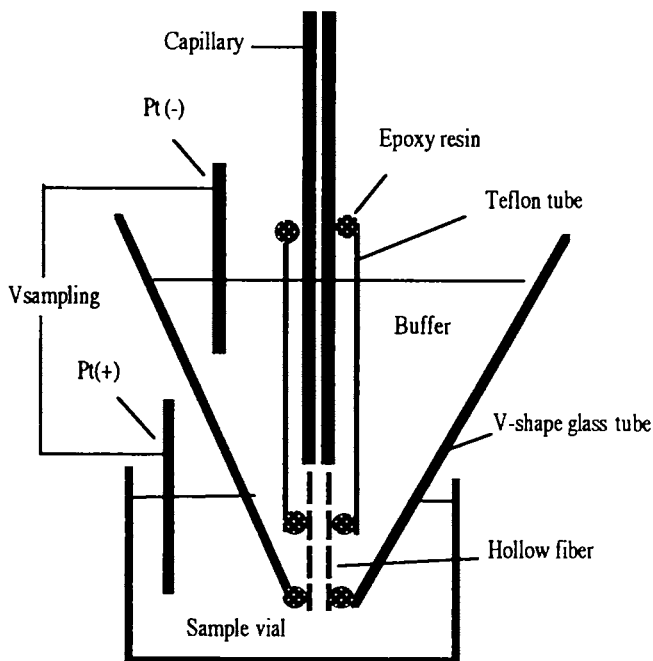


図1 キャピラリーの試料注入端の接続部

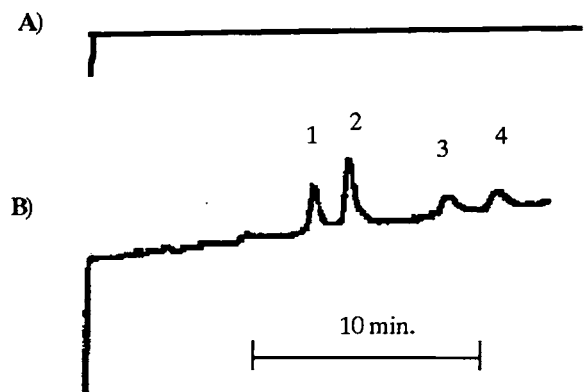


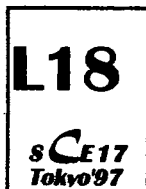
図2 モデル蛋白質試料のCE分析結果

A) 従来の電気泳動注入法
(注入電圧10 kV、時間5sec.)

B) 本法
(注入電圧140 V、時間10 sec)

1:チトクロムC 2:リゾチーム

3:リボヌクレアーゼA 4:キモトリプシノーゲンA



レーザー蛍光検出キャピラリー電気泳動による脳組織由来 NDA 標識アミノ酸の分離

今澤正興*、畑中由利子

国立精神神経センター神経研究所

Separation of Naphtalene-2,3-Dialdehyde-Labeled Amino Acids from Brain Tissue by Capillary Electrophoresis with Laser-induced Fluorescence Detection

Masaoki Imazawa*, Yuriko Hatanaka
National Institute of Neuroscience, NCNP

Abstract

Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection was used to analyze free amino acids including D-forms in rat brain. Pre column derivatization was performed using naphthalene-2,3-dialdehyde and cyanide. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) mode was applied with β - and γ -cyclodextrine (CD) as chiral selectors. Optimization of concentration of CDs, organic modifiers and separation temperature was carried out and was especially focused on the effective separation of the derivatives of D-serine and D-aspartate, which are considered to be useful probes for studies on excitatory amino acid neural transmitter systems.

1. はじめに

レーザー蛍光キャピラリー電気泳動法 (CE-LIF) は、多成分系試料の高感度分析のために有用である。我々は今回、脳組織中の遊離アミノ酸をナフタレンジアルデヒド (NDA)、NaCN により蛍光性のシアノベンツイソインドール (CBI) アミノ酸とし、CE-LIF により分離・分析する方法の検討を行った。分離モードとしては、 β -及び γ -シクロデキストリン (CD) を含む MEKC を適応し、特に興奮性アミノ酸神経伝達系との関連で興味をもたれる D-セリン及び D-アスパラギン酸の誘導体の良好な分離に力点をおいて、条件の最適化を行った。

2. 実験

Bekman P/ACE 5010 キャピラリー電気泳動システム (レーザー蛍光ディテクター付) を使用し、レーザー光源として金門電気製 He-Cd レーザ装置 (励起波長: 442 nm) を接続した。キャピラリーには内径 50 μ m、有効長 60 cm、全長 67 cm のフューズドシリカ管 (Supelco) を用い、電圧は 25 kV とした。標準的な分離溶液としては、70 mM SDS を含むホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に、 β -及び γ -CD と場合により少量の有機溶媒を加えたものを用いた。試料と

して、ラット前脳 (forebrain) の 9 倍容 5% トリクロロ酢酸 (TCA) 抽出液からエーテルにより TCA を除去し、誘導体化反応液に 1/100 容を加えた。誘導体化は、pH 9.5 ホウ酸緩衝液中、1 mM NaCN、0.5 mM NDA により、室温、30 分行った。

3. 結果と考察

CBI アミノ酸の CD-MEKC による DL 分離に関しては、 γ -CD によりセリンが、 β -CD によりアスパラギン酸が分離することが報告されている¹⁾が、今回の検討では、 γ -CD と β -CD をモル比 1 : 3 で含む分離溶液により、両アミノ酸の DL 体が、同時にまた同様な DL 分解能で分離できた。また、この DL 分離の、キャピラリー温度依存性を検討したところ、15° ~ 28° C の範囲において低温側で良好な分離結果が得られ、以後 16° C を標準分離条件とした。図 1 に生後 2 日のラット脳中のアミノ酸を分析したエレクトロフェログラムの一例の主要部分を示した。D-及び L-セリン、アスパラギン酸とともに大部分の L-アミノ酸と生体アミンが分離されている。この例では、アミノ酸相互の分離を改善するため、少量の有機溶媒を分離溶液に加えている。キャピラリー電気泳動時における、D-セリンの定量限界値は約 3×10^{-9} M であり、本分析法により、脳組織中の μ M レベルのアミノ酸の定量が十分可能である。

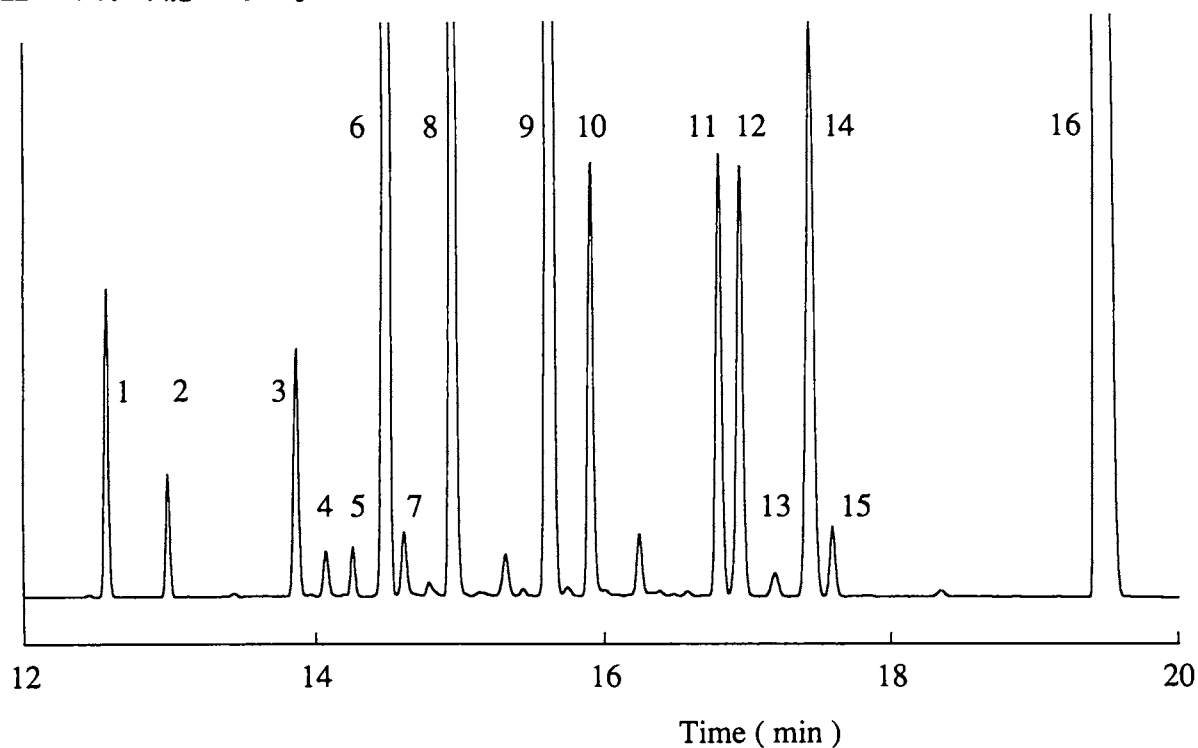


Fig.1. Analysis of amino acids from the forebrain tissue of 2-days old rat. Separation buffer: Na borate (pH 9.0) containing 70 mM SDS, 9 mM β -CD, 3mM γ -CD and 1.3 % of diethylene glycol diethyl ether; CBI derivatives of: 1: L-threonine, 2: L-valine, 3: L-serine, 4: D-serine, 5: L-isoleucine, 6: L-glutamine, 7: L-asparagine, 8: phosphorylethanolamine, 9: L-glutamate, 10: L-alanine, 11: glycine, 12: GABA, 13: D-aspartate, 14: L-aspartate, 15: L-tyrosine, 16: taurine.

4. 文献

- 1) T. Ueda, R. Mitchell, F. Kitamura, T. Metcalf, T. Kuwana and A. Nakamoto, J. Chromatogr., 593 (1992) 265.



キャピラリー電気泳動を利用する ニコチン酸の体内動態

近畿大・薬 岩城正宏、和田暁典、菊池政子*、小木曾太郎、小田泰雄
岡部巨雄、掛樋一晃

Application of Capillary Electrophoresis to Pharmacokinetic Studies of Nicotinic Acid

Masahiro Iwaki, Akinori Wada, Masako Kikuchi, Taro Ogiso, Yasuo Oda, Tsuneo Okabe and
Kazuaki Kakehi

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashi-osaka.

Nicotinic acid (NiAc) and nicotinamide (NiNH₂) and their six possible metabolites were successfully separated by capillary electrophoresis using borate buffer containing sodium dodecyl sulfate. Analysis of these compounds were completed within 20 min, and calibration curves showed good linearity for all compounds with good reproducibility. The present method was applied to a preliminary pharmacokinetic study in rats after oral and intravenous administrations of NiAc and NiNH₂.

ビタミンB複合体の一成分であるニコチン酸は長年にわたって高脂血症の治療に広く用いられているが、徐放性ニコチン酸製剤投与後にしばしば見られる肝毒性はこれまで知られていなかったニコチン酸の体内動態に起因する可能性がある。ニコチン酸の代謝は動物の種差によって著しく異なるが、グリシンと抱合体を形成してニコチン尿酸として代謝される経路とニコチンアミドを經由してヒドロキシピリジン誘導体として代謝される二種類の経路が報告されている。ニコチン酸の薬物動態を解析するためには、尿中及び血中のニコチン酸、ニコチンアミド及びその主要な代謝物を分析する必要があり、我々は既に高速液体クロマトグラフィーを用いる分析法について報告している(1)。しかし、ニコチン酸及びその代謝物は高い水溶性を有するために、全ての代謝物を一斉分析することは、試料の前処理が難しいのみならず HPLC による分析も容易ではない。以上のような理由から、本研究では尿中のニコチン酸、ニコチンアミド及びその関連代謝物のキャピラリー電気泳動について検討した。

[方法] キャピラリー電気泳動 装置としては大塚電子製 CAPI-3000 を使用し、キャピラリーはフューズドシリカ素管(有効長 60cm, 内径 75 μ m)を用いた。印加電圧は 15kV, 分析温度は 37 $^{\circ}$ C とし、検出は 214nm の紫外外部吸収検出を利用した。分析用緩衝液としては 0.15M SDS を含む 0.05M ホウ酸緩衝液(pH9.0)を使用した。試料の調製 採取尿を水で 10 倍希釈し、希釈尿 500 μ l につき内部標準としてトリゴネリン塩酸塩(1mg/ml)を 100 μ l 加えて分析用試料とした。実験動物及び投与方法 動物には Wistar 系雄性ラット(8~10 週令、体重 200~290g)を実験前 16hr 絶食して使用した。ニコチン酸及びニコチンアミドをそれぞれ 45mg/kg または 135mg/kg を胃ゾンデを用いて投与した。別に頸静脈カニューレよりニコチン酸及びニコチンアミドを 45mg/kg 静脈内投与した。ラットの採尿は、動物

をボールマニージャに固定し、投与後 1hr おきに行った。尿量は尿の比重を 1 として重量より換算した。

[結果・考察] ニコチン酸及びニコチンアミド代謝物の分析条件 ニコチン酸及びニコチンアミドの代謝は図 1 に示すような経路が報告されている。そこでこれらの代謝物について市販標準物質を用いて、酸性緩衝液、中性及びアルカリ性の緩衝液などを用いて種々検討した結果、上述の条件で図 2 に示すような分離が得られた。この条件で、各代謝物は少なくとも 2 µg/ml~500 µg/ml にわたって良好な直線性を示す検量線が得られ、予測される尿中濃度に対応できることがわかった。

ラットにおけるニコチン酸及びニコチンアミドの尿中排泄 ニコチン酸を投与した場合、主に、Nicotinuric acid (NiUAc)として尿に排泄され、蓄積排泄量は、経口投与では 6 時間後、静注では 4 時間後にプラトーに達した。ニコチンアミドを投与した場合では、主に Nicotinamide N-oxide (N-oxide)が尿中に検出され、経口投与の 10 時間後、また静注の 8 時間後においてもプラトーには達しなかった。一例としてニコチン酸の尿中への排泄の様子を

図 3 に示す。以上の結果、キャピラリー電気泳動を用いることによりニコチン酸、ニコチンアミド及びその関連代謝物の一斉分析が可能であり、体内動態の解析に有用であることがわかった。

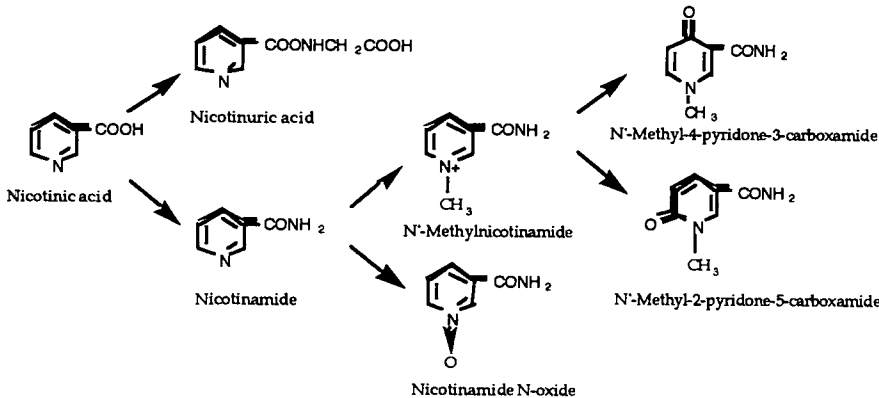


Fig 1. Metabolic pathway of nicotinic acid.

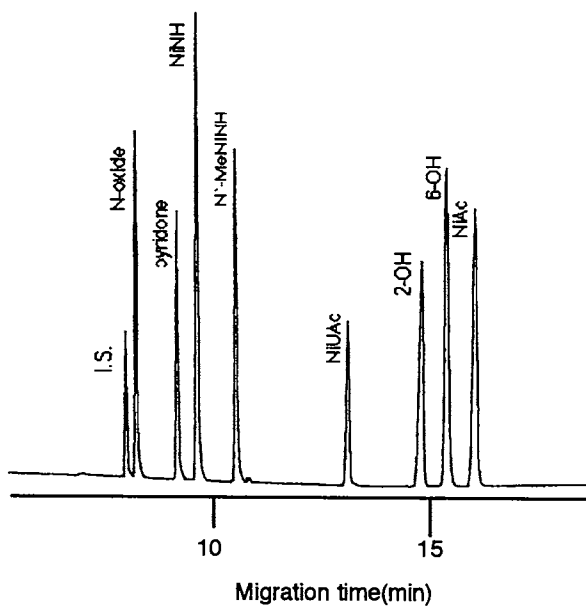


Fig 2. Separation of a mixture of nicotinic acid and their metabolites.

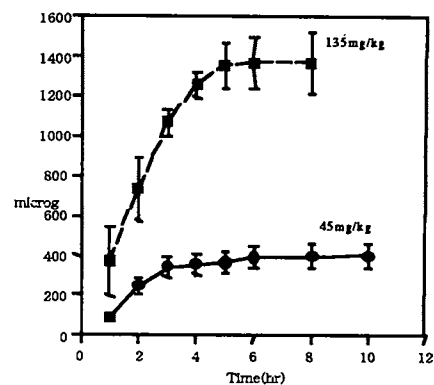
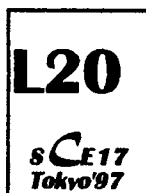


Fig 3. Cumulative urinary excretion curves of nicotinic acid in rats after oral administration of 135 mg/kg and 45 mg/kg of nicotinic acid.

[文献] (1) Iwaki et al. J. Chromatogr. 661 (1994) 154-158



サイズ排除効果を利用するヘパリン類の キャピラリー電気泳動

(大鵬薬品工業・製剤研究所、近畿大学・薬学部*)
早瀬 省三、小田泰雄*、○掛樋一晃*

High Performance Capillary Electrophoresis of Heparin and Its Preparations Based on the Size Exclusion Effect

Shozo Hayase, Yasuo Oda* and Kazuaki Kakehi*
Pharmaceutical Research Lab. Taiho Pharmaceutical Co. Ltd.
*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Effect of neutral polymers such as pullulan and hydroxypropyl cellulose in the carrier solution was examined on the separation of heparin formulations by capillary electrophoresis. Addition of hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) showed obvious peak broadening based on size exclusion effect, and allowed estimation of molecular mass distributions of heparin and low-molecular-weight heparin formulations.

抗血液凝固薬として広く使用されているヘパリン類は、高い不均一性を示す多糖である。我々は既に CE を用いてグリコサミノグリカンの一種であるヒアルロン酸の分子量分布を評価する方法について報告した(1)。そこで、本研究では各種の中性高分子を添加した弱酸性の緩衝液中で直接ヘパリンの電気泳動を行い、ヘパリン及びその医薬品製剤の均一性ならびに分子量分布を評価する方法について検討した。その結果、泳動緩衝液への中性ポリマー添加が及ぼす泳動時間及びピーク形状の変化がヘパリン類の均一性および分子量分布の有力な指標となることを見いだした。

「方法」装置：Waters Quanta 4000E System。 キャピラリー：フューズドシリカ素管（有効長 52.5 cm、内径 75 μ m）。印加電圧：20 kV。 分析温度：25 $^{\circ}$ C。 検出：185 nm。泳動用緩衝液：50mM リン酸緩衝液(pH4.0)を使用し、中性高分子として、プルランやヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどを添加。試料：ヘパリン（日本薬局方標準品、平均分子量：約 15,000 および Sigma 社製）、低分子ヘパリン（分子量：3,000~6,000、Sigma 社製）ならびにヘパリンおよび低分子ヘパリン製剤を使用した。

「結果・考察」 単純電気泳動による分析 単純電気泳動では、ヘパリン中のスルホン酸基とカルボキシル基の電荷が分離を支配すると考えられるため、均一性の評価は可能と考えられたが、ヘパリン(HE)と低分子ヘパリン(LMWH)の分子量分布を評

価することはできなかった。中性高分子の添加効果 ヒアルロン酸の分子量分布の評価でよい結果を与えたプルランを泳動緩衝液に添加して、ヘパリンに対するサイズ排除効果を検討したところ、期待した効果はほとんどみられなかった。これは、ポリマーネットワーク中をヘパリン分子が素通り状態で泳動されたためと考えられる。その他の中性高分子をいくつか検討したところ、HPMCの添加効果 数
 万から数十万の範囲でいくつかの HPMC 製品の添加効果を検討した結果、添加する HPMC の分子量が増加するに伴って、ヘパリンのピークは幅が広がった。また HPMC の濃度の上昇によっても、ピークの広がりも観察された。同一の HE 製品については、HPMC の添加によるピークの広がりにもかかわらず、泳動時間はほとんど変化しなかったことから、これらの現象は主としてサイズ排除効果によるものと考えられる。Fig. 1 に 0.5% HPMC (MW : 69kD)を用いた場合の分析例を示す。HE 及び LMWH の泳動時間に明らかな差が認められた。また両者の混合物も不完全ながら分離された。Fig.2 に医薬品製剤に適用した結果を示す。試料の分子量分布に対応して異なるピーク形状及び泳動時間が観察された。

以上の結果、適切な分子量と濃度の HPMC を添加することにより、ヘパリンのピーク形状と泳動時間から、均一性ならびに分子量の評価が可能になることが示唆された。

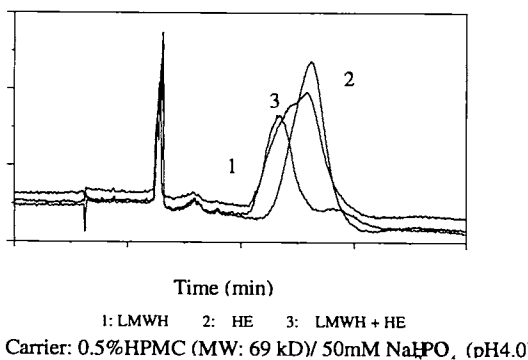


Fig.1 Electropherogram of HE and LMWH

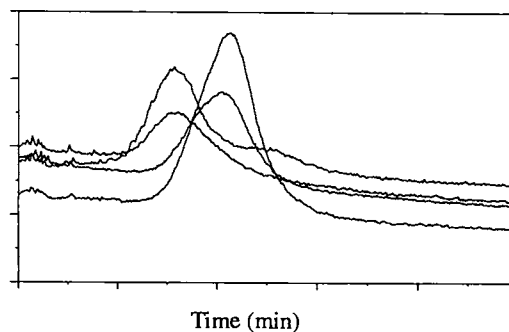


Fig. 2. Analysis of some heparin preparations

(1) Kakehi et al., J. Chromatogr. 768 (1997) 295 – 305.



弾性ゲルによる迅速ウエスタンブロット法

相澤克則* (メリーランド大学、微生物学、USA) E-mail; ka56@umail.umd.edu

Rapid Electro-blotting of Proteins Using an Elastic Gel

Katsunori Aizawa* (Dept. Microbiol., Univ. Maryland, College Park, MD20742, USA)

Abstract

Inclusion of 3% (w/v) hydrophilic polymer in acrylamide dramatically increased the elasticity of the polymerized gel (elastic gel). Such elastic behavior is preferable in handling the gels. Ultrathin elastic gels (0.18 mm in thickness, and 0.1% SDS-3% dextran T500-polyacrylamide: 12.3% T, 2.6% C) did not easily tear. Electrophoretic transfer methods were easily applicable to elastic gels without support materials. The whole procedure was simple and very fast: Coomassie brilliant blue R250 staining/destaining was done in 12 min and electro-blotting of proteins in 6 min. Because of the short time for blotting, change in temperature around the gels and transfer membranes during the procedure was minimum.

1. はじめに

アクリルアミドに親水性ポリマーを混合させて重合するとゲルの諸特性が顕著に変化する(1)。Gerstenらは同様のゲルにてマーカー蛋白質の電気泳動を行った(2)が、その有用性は不明瞭であった。ポリマーブレンドで作成される一部のゲルの構造と特性の研究も進められている(3)が充分ではない。我々は先にデキストラン-ポリアクリルアミドゲル(D-PAG)等が有機溶媒中で通常のゲル程に脱水/固化しない事に注目した。そして、D-PAG電気泳動により分離した蛋白質のゲルバンドを有機溶媒中で破碎し各アポ蛋白質上の脂溶性色素を効率的に回収する事に成功した(1)。親水性ポリマーを混合させたポリアクリルアミドゲル(D-PAGに限らない)は2-3倍に伸ばした後もゴムの様に元に戻れる別の特性もある(1)ので弾性ゲルとしての応用も期待される(4)。今回、この特性の活用の為、超薄ゲル電気泳動及び、その操作に続く蛋白質の迅速エレクトロブロット(迅速ウエスタンブロット)への応用を試みた。

2. 方法

バイオラド社の SDS-PAGE standards (marker proteins; 14.5 kDa - 90 kDa) または培養したラン藻(5)や紅藻のチラコイド膜の蛋白質を SDS/2-メルカプトエタノール液(6)等で処理した。これらの蛋白質を、0.18 mm厚の超薄または1.5 mm厚の D-PAG (3% dextran T500, polyacrylamide: 12.3% T, 3.3% C) 電気泳動で0.1% SDS存在の下に分離した。直立型のミニスラブのゲル面は7 cm (h) x 8 cm (w)であった。電気泳動した後のゲルを転写用の緩衝液(7)で平衡化の後、セミドライ型の転写法にて定電流の下にウエスタンブロッ

トを行った。転写膜には polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜を用いた。プロット後の PVDF 膜の洗浄/ブロッキング処理 (8) の後、酵素抗体法にてクロロフィル蛋白質 (PsaA/B や LHCI 等) の同定を行った。またプロット後の転写膜とゲルの一般の蛋白質の染色には Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) 溶液を用いた。

3. 結果と考察

超薄ゲルには利点が多いとされる。熱伝導が良好のため泳動時に高電圧がかけられる。各種の緩衝液/染色液等でのゲルの処理時間や保存の為のゲルの乾燥時間も短縮出来る。必要な試薬も微量である。しかしながら常用されるメディアは弾性が低く超薄ゲルとしての取り扱いが難しい。例えばポリアクリルアミドゲル (12.3% T, 3.3% C) では elongation at break 値が約 30% にすぎない (1)。従って電気泳動後の超薄ゲルに何らかの処理を行う際、従来のゲルでは支持マトリックスやゲル内の補強用薄網が必要であった。また支持マトリックス上の超薄ゲルで分離した蛋白質/核酸のプロットにはキャピラリープロットが主であったが、この処理には 6 時間から半日の長時間を要した。

弾性ゲルでは elongation at break 値が約 200% である (1)。これから予測される様に D-PAG で作成した超薄の弾性ゲル (厚さ 0.18 mm) の場合、電気泳動後のガラスプレートからのゲルの取出しから染色/脱色またはウエスタンププロット操作時まで支持体が不要であった。またフラップ技術を要せずに直立型のゲルを作成できた。電気泳動後のゲルの CBB 染色/脱色は D-PAG で室温下 12 分で充分であった。

ウエスタンププロットの場合、14 kDa - 66 kDa の分子量の蛋白質は 6 分でプロットを終了できた。対照とした通常の厚さのゲルでは同様の溶出効率に一時間余りを要したので大幅な時間短縮になった。長時間のウエスタンププロットの際、蛋白質によってはジュール熱により aggregation 等が起こる。この防止に強制冷却をするが条件によっては充分ではない。プロット時間の短縮により超薄ゲルでは発生熱の総量も少なかった。更に、超薄ゲルからプロットした PVDF 膜上での酵素抗体法による目的蛋白質のシグナルの S/N 比も通常ゲルから長時間を要し PVDF 膜上にプロットしたものと同等であった。

弾性ゲルの作成には特別な機器等を必要としない。当ゲルは弾性が必要な条件での別の応用 (例、大型の二次元ゲル電気泳動) も考えられるであろう。

4. 文献

1. Aizawa, K. et al. (in press) *Anal. Sciences*.
2. Gersten, D. M., et al. (1991) *Anal. Biochem.*, 197, 59- 64.
3. Righetti, P. G. (1995) *J. Chromatogr.*, A 698, 3-17.
4. Aizawa, K. (in press) in: *Trends in Analytical Biosciences*.
5. Aizawa, K. and Fujita, Y. (1997) *Plant Cell Physiology*, 38, 319-326.
6. Laemmli, H. K. (1970) *Nature* 227: 680-685.
7. Erickson, P. F. et al. (1982) *J. Immunol. Methods* 51: 241-249.
8. Aizawa, K. & Gantt, E. (accepted) *Anal. Chim. Acta*.



UV検出キャピラリー等電点電気泳動用ペプチド性pIマーカー

- 1) 志村 清仁*、王 志、笠井 献一、2) 松本 浩幸
1) 帝京大・薬、2) 分子バイオホトニクス研究所

Peptide pI Markers for Capillary Isoelectric Focusing with Ultraviolet Detection

- 1) Kiyohito Shimura, Zhi Wang, Ken-ichi Kasai, 2) Hiroyuki Matsumoto
1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 2) Laboratory of Molecular Biophotonics.

Sixteen peptides were designed as a set of pI markers for capillary isoelectric focusing. Each peptide has one tryptophan residue to help its detection by UV absorption and other amino acid residues with ionic side chains which are responsible for focusing to its pI. The isoelectric points of these peptides were determined by isoelectric focusing using a commercial carrier ampholyte in a polyacrylamide slab gel. Focused peptides in the gel were detected with absorption measurement at 280 nm using a scanning densitometer. The pH gradients were determined by measuring pH of the surface of gels. The measured pI values of the peptides ranged from 3.38 to 10.17. They formed a very sharp peaks in capillary isoelectric focusing.

【はじめに】

キャピラリー等電点電気泳動で、どのようなpH勾配が形成されたかを知るには、すでに等電点が明らかでない物質をpIマーカーとして利用するのが唯一の方法である。従来、pIマーカーとしては、性質がよく調べられ、等電点をはっきりしているタンパク質が一般に使われてきた。しかし、タンパク質は安定性に欠け、不均一性を生じやすいため標準物質として必ずしも満足しうるものではない。タンパク質に代わるpIマーカーとして、われわれはペプチドを利用する試みを重ねてきた。今回、UV検出用pIマーカーとしてデザインした16種類のペプチドの等電点を決定した。

【方法】 ペプチドの調製は受託合成サービスを利用した。両性担体としてファルマライトを用いポリアクリルアミドの平板ゲル中、25℃でペプチドの焦点化を行った。酸性側と塩基性側に添加した試料が融合して単一のバンドとなるのをもって定常状態に到達したものとした。ペプチドの焦点化位置はデンストメーターで280nmの吸光度を測定して決定した。次いでゲル表面のpH測定からゲル中のpH勾配を決定し、勾配中の位置からペプチドのpIを決定した。塩基性側のpIの決定は空気中の二酸化炭素の影響を避けるために、窒素気流中で行った。キャピラリー等電点電気泳動は内壁をポリアクリルアミドで被覆した内径50μm、長さ27cmのキャピラリー中で、両性担体としてファルマライト3-10を使用して行った。500V/cmの電圧で、焦点化後は同じ電圧を保ったまま陽極端に圧力をかけて、pH勾配を陰極側に移動させ、陰極端より7cmの位置で280nmの吸収によってペプチドを検出した。

【結果と考察】 ペプチドの等電点の実測値(5回の測定の平均値)は、各解離基のpKa値から予想される値と比較的によく一致した(表1)。キャピラリー等電点電気泳動では、いずれのペプチドも鋭いピークを形成した(図1)。pH勾配におけるペプチドの収束性の善し悪しは、主にそのペプチドの等電点における $-dz/dpH$ 値の大小による(z はペプチドの電荷)。これは、pH勾配中で等電点から離れたときに、電荷の変化が大きければ、それだけ等電点へ電気泳動的に強く押し戻されるからである。 $-dz/dpH$ 値が大きくなる

ためには、ペプチドはその等電点に近い pK_a の解離基を持つ必要がある。この点を考慮して、16種類のペプチドをデザインした。予想されたように、小さな $-dz/dpH$ 値を持つペプチドの焦点化に必要な Vh 値（電圧と時間の積）は大きくなった（表1）。

これらの合成ペプチドは良い収束性を示し、広い pH 範囲にわたってかなりよく分散しているので、UV 検出キャピラリー電気泳動用の pI マーカーとして有望と思われる。

表1 合成ペプチド性 pI マーカーの諸性質

構造	pI 計算値	pI 実測値	$-dz/dpH^*$	Vh^{**}
H-Trp-Tyr-Lys-Arg-OH	10.02	10.17	1.11	940
H-Trp-Tyr-Lys-Lys-OH	9.76	9.99	1.49	940
H-Trp-Tyr-Tyr-Lys-Lys-OH	9.52	9.68	1.73	940
H-Trp-Tyr-Tyr-Tyr-Lys-Lys-OH	9.36	9.50	1.90	940
H-Trp-Tyr-Lys-OH	8.62	8.40	0.37	
H-Trp-Glu-Tyr-Tyr-Lys-Lys-OH	8.46	8.40	0.52	2700
H-Trp-Glu-His-His-His-Arg-OH	7.34	7.27	1.23	1200
H-Trp-Glu-His-Arg-OH	7.04	7.00	0.77	1200
H-Trp-Glu-His-His-OH	6.42	6.66	1.31	1200
H-Trp-Glu-Arg-OH	6.06	5.91	0.12	5200
H-Trp-Glu-His-OH	5.48	5.52	0.43	2700
H-Trp-Asp-Asp-His-His-OH	5.24	5.31	0.53	3200
H-Trp-Glu-Glu-His-OH	4.54	4.28	1.38	700
H-Trp-Asp-Asp-Arg-OH	4.16	4.05	1.48	700
H-Trp-Glu-Glu-OH	3.82	3.78	1.25	700
H-Trp-Asp-Asp-Asp-OH	3.38	3.38	1.70	1200

* 計算値、** 電極間距離は 10 cm

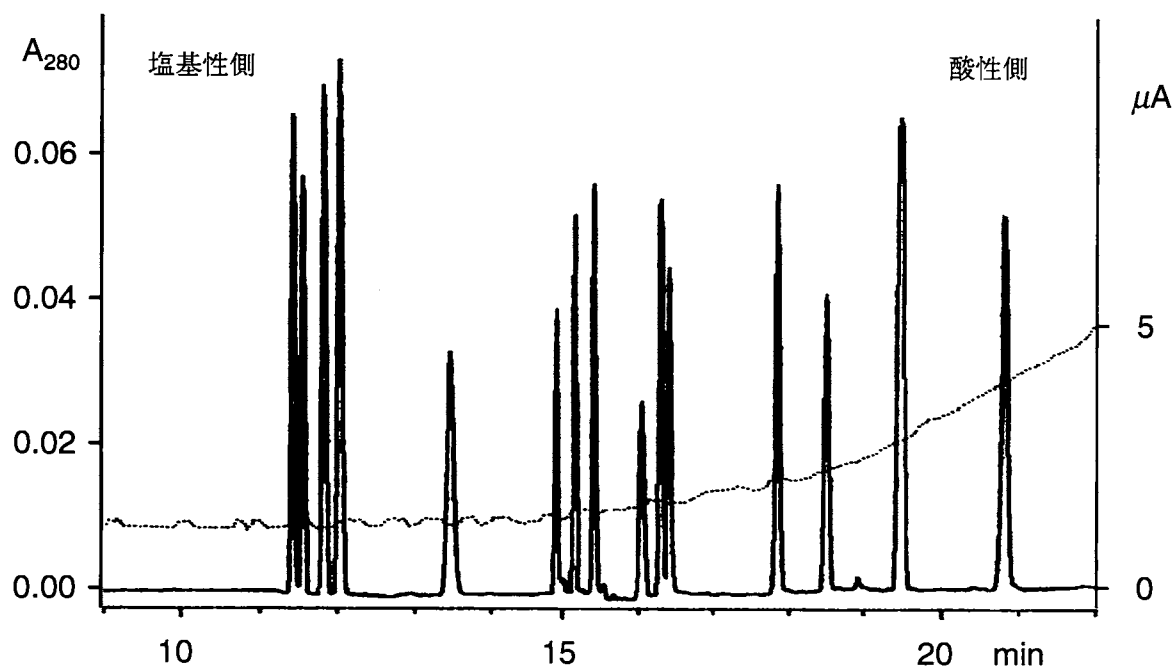


図1 H-Trp-Tyr-Lys-OH を除く 15 種のペプチドのキャピラリー等電点電気泳動による分離。



ヒト脊髄液タンパク質のキャピラリー等電点電気泳動による分析

- 1) 宮本洋光*、真鍋 敬、2) 中津雅美、新井雅信
1) 愛媛大学理学部、2) 関東通信病院第二研究部

Analysis of Human Cerebrospinal Fluid Proteins by Capillary Isoelectric Focusing

- 1) Hiromitsu MIYAMOTO*, Takashi MANABE, 2) Masami NAKATSU, Masanobu ARAI
1) Faculty of Science, Ehime University, 2) Faculty of The Second Research, Kanto Teishin Hospital

Abstract

The analytical conditions of human cerebrospinal fluid (CSF) proteins by capillary isoelectric focusing (CIEF) in the absence of denaturing agents were examined. Since the protein/salt concentration ratio of CSF is below 1/200 of that of plasma, CSF samples should be desalted necessary before they are subjected to CIEF. When compared with the patterns of plasma/serum proteins, those of CSF proteins showed characteristic peaks in the acidic region. CIEF of CSF proteins might be useful for the diagnosis of neurological diseases.

1. はじめに

キャピラリー等電点電気泳動は、タンパク質をその等電点 (pI) の違いに基づいて溶液中で分離を行う方法であり、精製タンパク質や限られた等電点範囲のタンパク質については多くの分離結果が報告されている。我々は、できるだけ広い等電点範囲のタンパク質を高い分離能で分離するための条件を確立し[1]、さらにそれを正常ヒト血漿タンパク質及び骨髄腫患者血清タンパク質の分析に応用した[2]。今回、我々はヒト血漿タンパク質の分離条件を基本として、それをヒト脊髄液タンパク質の分析に応用するための泳動条件の検討を行った。また、検討結果を用いてヒト脊髄液タンパク質の分離パターンと、ヒト血漿／血清タンパク質のパターンとを比較するとともに、脳神経系疾患の病態との関連について検討を行った。

2. 実験

2-1 試料

正常ヒト血漿は、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、冷凍保存したものを使用した。またヒト脊髄液は、関東通信病院への入院患者の検査のために採取されたものの一部を使用した。

2-2 装置

キャピラリー電気泳動装置は、THERMO SEPARATION PRODUCTS 社の波長可変分光光度計 Spectra100 に高電圧電源を組み合わせたもの及び、Beckman 社の P/ACE2100 を使用

した。キャピラリーは、内径 75 μ m、全長 270mm (実効長 200mm)、線状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使用した。また、透析装置には ATTO 社の微量透析装置 AE-6590 を、濃縮装置には Amicon 社の Microcon-3 を使用した。

2-3 電気泳動

キャピラリー電気泳動は、タンパク質試料溶液とファルマシア社の Ampholine (pH3.5-10) の希釈溶液を混合し、これをキャピラリーに注入した。陽極槽液には 0.01M H₃PO₄ 溶液を、陰極槽液には 0.01M NaOH 溶液を用い、電場 370V/cm でタンパク質を収束させた後、陰極槽液を 0.01M CH₃COOH 溶液に交換することでタンパク質を移動させ、280nm の紫外吸収で検出した。

3. 結果と考察

ヒト脊髄液のタンパク質濃度は、ヒト血漿の 1/200 以下とされている。ヒト血漿のキャピラリー等電点電気泳動では、試料は最終的に 1/200~1/300 に希釈して分析に用いている。そこで脊髄液は濃縮せず、原液のまま分析を行うことができると考えられた。しかし、原液をそのままヒト血漿タンパク質の分離条件にかけると、脊髄液中の塩により電流値が極めて大きくなり、キャピラリーの劣化が観察された。そこで、脱塩操作として 1) 透析法、2) 遠心による濃縮後希釈する方法、とを検討した。その結果、より少量で脱塩処理を行うことができる透析操作を用いることにした。ヒト脊髄液タンパク質の泳動結果の一例を Fig.1 に示す。ヒト血漿タンパク質の分離結果と比較してみると、脊髄液では酸性タンパク質領域に検出されたピークが特徴的であった。

また、これら泳動結果をアガロースゲル電気泳動の結果等と照らしあわせ、臨床応用への可能性を検討した。

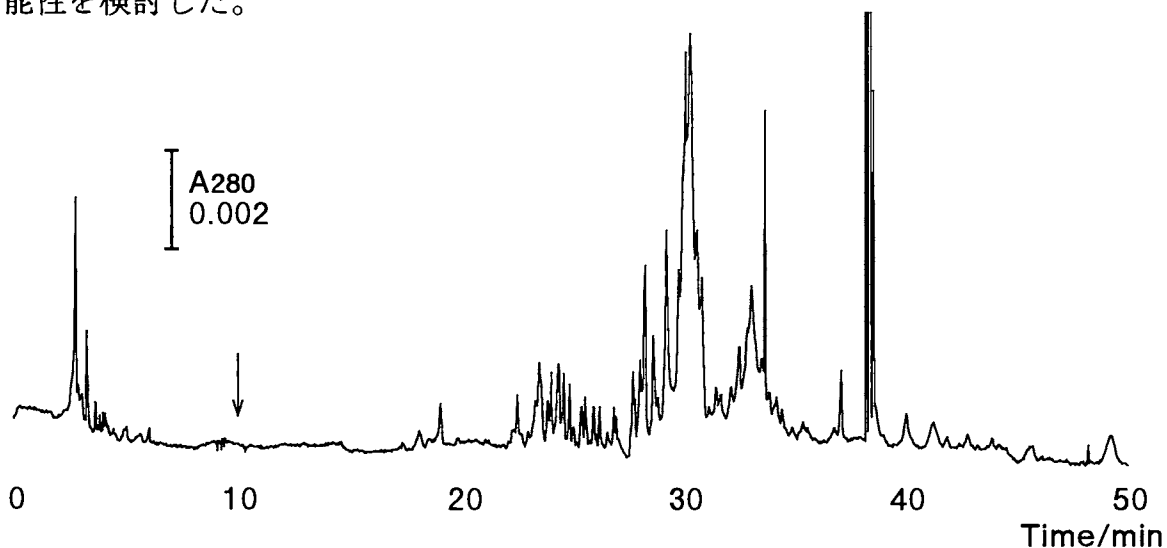
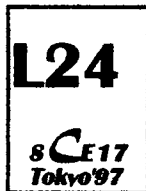


Fig.1 Capillary isoelectric focusing and mobilization of human cerebrospinal fluid proteins in the absence of denaturing agents.

- [1] T. Manabe, H. Miyamoto, A. Iwasaki *Electrophoresis* 18, 92-97 (1997)
- [2] T. Manabe, A. Iwasaki, H. Miyamoto *Electrophoresis* 18, 1159-1165 (1997)



キャピラリー電気泳動による3塩基繰り返しDNAフラグメントの泳動挙動とトリプレットリピート病のDNA診断

喜羽百合子^{*}、大原浩市[†]、馬場嘉信

徳島大学薬学部、[†]浜松医科大学

Electrophoretic Behavior for Triplet Repeat DNA Fragments and DNA Diagnosis of Triplet Repeat Disease by Capillary Electrophoresis

Yuriko Kiba^{*}, Koichi Ohara[†], and Yoshinobu Baba

Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima, Shomachi, Tokushima 770, Japan and [†]Department of Psychiatry, Hamamatsu University School of Medicine, Handa, Hamamatsu 431-31, Japan

ABSTRACT

The expansion of trinucleotide repeat sequences on human genome is the characteristic of triplet repeat diseases, such as myotonic dystrophy, the familial mental retardation, and an autosomal dominant disease. In this study, we investigate the capillary electrophoretic behavior of triplet repeat DNA fragments. We found triplet repeat DNA fragments showed unusual mobilities compared with those of DNA molecular markers. It is caused by the higher-order structure formed by GC-rich sequences of triplet repeat DNA fragments. From these basic experiments, we established a method for rapid and precise typing of trinucleotide repeat in the human genome for DNA diagnosis of triplet repeat disease using capillary electrophoresis.

はじめに

トリプレットリピート病は遺伝性神経筋疾患であり、ヒト・ゲノムDNA中の特定の領域における3塩基繰り返し配列の異常な伸長が原因で発症し、世代を経るにつれて発症年齢が若年化する表現促進現象や、リピート数の増加に伴う疾患の重篤化等、従来のメンデルの法則では説明できない現象が見られ、注目を集めている。伸長したトリプレットリピートがなぜ不安定性を示すのか、またどのようなメカニズムによって特定の神経細胞の障害を引き起こすのかについては完全には明らかにされておらず、速やかな遺伝子診断法の開発が期待されている。本研究では、キャピラリー電気泳動によるトリプレットリピート病の遺伝子診断システムの開発を目的とし、トリプレットリピートDNAフラグメントの泳動挙動を標準的なマーカーと比較することにより検討した。

実験

装置は、レーザー誘起蛍光検出器付BECKMAN P/ACE System 2100およびHP^{3D}CEを使用し、キャピラリーは、内壁をコーティングしたJ&W製DB-17を使用した。サンプルは、DNA分子量マーカーおよびCNG配列を有するトリプレットリピートDNAフラグメントを用いた。緩衝液はトリス-ほう酸にメチルセルロースを加えたものを用いた。緩衝液は加

圧によりキャピラリー中に充填し、サンプルは電氣的に注入した。

結果と考察

キャピラリー電気泳動により、1本鎖DNAマーカーといくつかの長さの異なるトリプレットリピートDNAフラグメントの解析を行い、その結果を比較すると、トリプレットリピートDNAフラグメントの移動時間は、マーカーのサイズから予想されるよりも短くなった (Fig. 1)。この時、移動時間のrepeatabilityは、1% (RSD, n=10)以下であった。

ゲルやポリマーを用いた電気泳動におけるDNAの分離メカニズムは、DNAのサイズとマトリックスのポアサイズによりOgston領域とreptation領域に分類される。DNAの泳動挙動は、DNAのサイズが小さいときはOgstonモデルに一致するが、サイズが大きくなるにつれて移動度がOgston関数系から外れるようになり、その領域はreptation領域と呼ばれる。本研究では各フラグメントの移動度についてOgston関数系に基づきfittingを行い、その妥当性を検討したところ、150塩基程度までのDNAの泳動挙動はOgstonモデルによく一致することが明らかになった (Fig. 2)。これに対して、トリプレットリピートDNAフラグメントの移動度は、同じサイズのマーカーよりも大きくなった (Fig. 2)。これはトリプレットリピートDNAフラグメントの見かけのサイズがマーカーよりも小さくなっていることを示している。

このような泳動挙動の違いは、ヒト・ゲノム上のトリプレットリピートDNAフラグメントに特徴的なGCリッチな配列によるものであり、このGCリッチな領域で特異な高次構造が形成され、マーカーとトリプレットリピートDNAフラグメントの移動度が異なると考えられる。これらのデータから、トリプレットリピート病の遺伝子診断システムの開発のための最適条件を検討した。

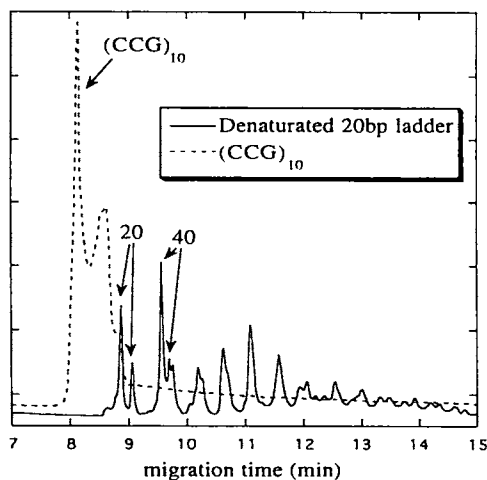


Fig.1 CE separation of Denaturated DNA marker and triplet repeat fragment

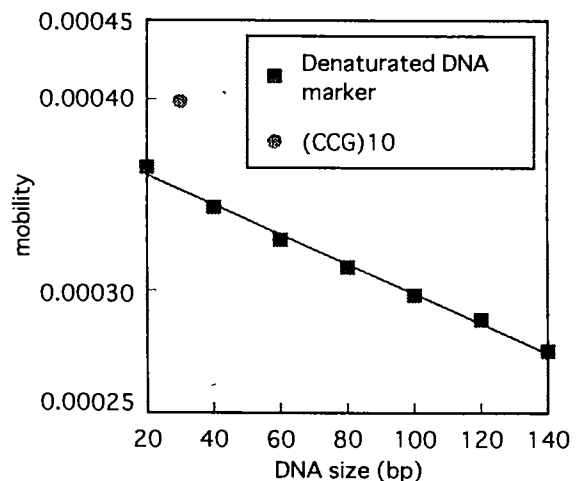


Fig.2 Ogston plot of Denaturated DNA marker and triplet repeat DNA fragment



キャピラリー電気泳動法による遺伝子解析の臨床応用への検討

角田 ちぬよ*、末廣 謙、日笠 聡、吉本 裕、垣下 榮三
兵庫医科大学 第2内科

Study for clinical application of gene analysis using capillary electrophoresis

Chinuyo Sumita*, Akira Suehiro, Satoshi Higasa, Hiroshi Yoshimoto, and Eizo Kakishita
2nd Department of Internal Medicine, Hyogo College of Medicine

Abstract

The repeatability and accuracy of the analysis in DNA length for gene diagnosis with capillary electrophoresis were investigated. The R.S.D. of analysis in DNA marker and PCR products were up to 0.1% and 3%, respectively. For the determination of DNA length, the relationship between the relative migration time and DNA length were examined. ApoB VNTR alleles from human were calculated by relative migration time. The accuracy of this calculated value was showed by DNA sequencing using capillary electrophoresis.

1. はじめに

最近ヒトゲノムの解析及びウイルスや細菌感染の有無を診断するために DNA 分析が頻繁に行われるようになってきた。特に献血におけるウイルス感染の有無を決定するための PCR 法導入が急がれており DNA 分析の自動化は急務となっている。しかし、臨床における DNA 分析においては未だスラブゲル電気泳動法が主流であり、できるだけ正確で速やかな診断法の確立が望まれている。キャピラリー電気泳動法は高速でしかも分析の自動化が可能となる点で非常に優れた方法であるが、その分析における再現性と正確さについてのデータは少なくスラブゲル電気泳動法からの移行の妨げとなっている。そこで、DNA 分析におけるキャピラリー電気泳動法の再現性と正確さについての検討を行った。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は Hewlett-Packard 製 HP³⁰CE を、キャピラリーは J&W 製 DB-17 に、セルロース誘導体溶液に YOPRO-1 を加えた溶液を充填して使用した。DNA フラグメントサイズの決定は既報に従って行った¹⁾。すなわち最初に市販の 20 bp ladder maker の分析を行い任意の一フラグメントの泳動時間に対する各フラグメントの相対移動時間を求め、その相対移動時間とフラグメント長さの関数を用い、未知のサンプルの相対移動時間からフラグメント長さを求める事とした。この方法で求めたフラグメントサイズの正確さを調べるために 300 bp と 500 bp のフラグメントを PCR 法により増幅して得、この混合物の分析を行い 300 bp フラグメントサイズの計算値を比較した。またこれらの分析の際

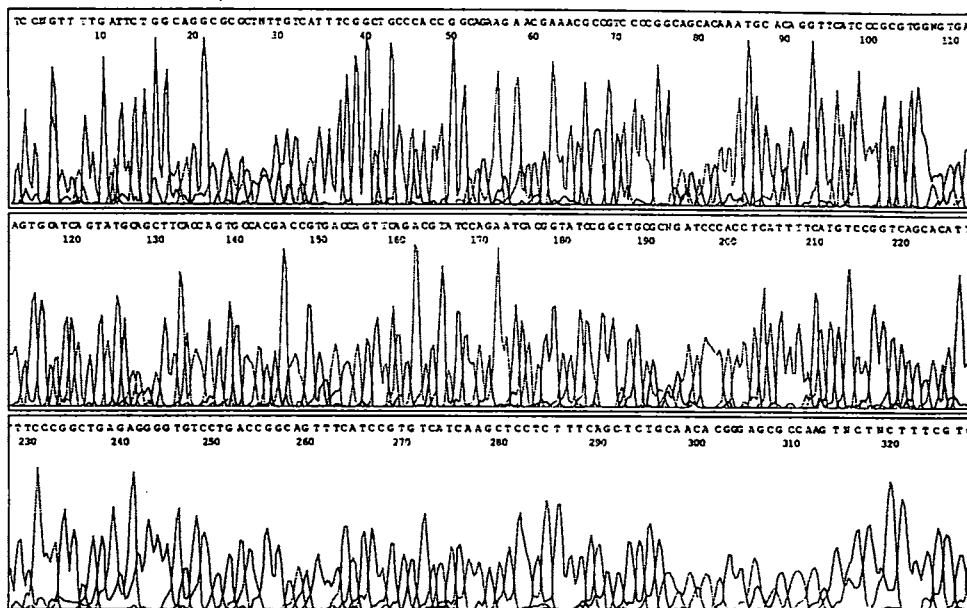
の再現性についても検討した。次に健常人の末梢血から DNA を抽出し 2p23 のアポリポ蛋白 B (アポ B) 遺伝子に存在する VNTR の繰り返し回数の計算を上記の方法で行った。さらにこの計算値の正確さを検討するためにキャピラリー電気泳動法によるシーケンサー (Perkin-Elmer 製 ABI 310 Genetic Analyzer) を用いて実際の遺伝子の塩基配列を調べた。まず塩基配列の判明している 500 bp フラグメントの塩基配列をキャピラリーシーケンサーで測定し、どの程度の誤差範囲で塩基配列が決定できるかを検討した。次にアポ B の塩基配列を測定しそれにより決定した VNTR の繰り返し回数を先に求めた計算値と比較した。

3. 結果と考察

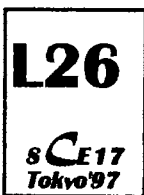
市販の 20 bp ladder marker の分析による 500bp に対する各フラグメントの相対移動時間の RSD は 0.1%以下であり非常に再現性に優れていることが明らかとなった。またその相対時間と各フラグメント長さの関係をグラフにとりその関数を 3 次式で示すと(1)式となる。

$$Y=5723.1X^3-12726X^2+10446X-2947.5 \dots (1)$$

300bp と 500bp の混合物の分析を 10 回行い、(1)式を用いて 300bp の計算値を求めたところ平均値は 299.2bp で、RSD は 3%となった。データのばらつきは少し大きい診断に大きく影響する程ではないと考えられる。このことから DNA フラグメント長さを求めるには先の方法が簡便で正確であることが示された。この方法で複数の健常人から抽出したアポ B 遺伝子の VNTR を分析するとその繰り返し回数は 23~35 回となった。キャピラリーシーケンサーで行った既知配列の 500bp フラグメントのデータの一部を下記に示した。Forward 側からと Reverse 側からの両方の塩基配列を検討して得た塩基配列の誤差は 2bp 以下でほぼ正確なデータが得られることが判明した。このキャピラリーシーケンサーにより決定したアポ B 遺伝子の VNTR の繰り返し回数と先の計算値はほぼ一致し良好な結果を得た。



1) A. Nishimura, Y. Baba, M. Tshako, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, in press.



キャピラリー電気泳動による疾患原因遺伝子の変異・多型 解析

屋代直子、松田聖子、馬場嘉信*

徳島大学薬学部

Mutation and Polymorphism Analysis of Disease Causing Genes by Capillary Electrophoresis

Naoko Yashiro, Seiko Matsuda, and Yoshinobu Baba*

*Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of
Tokushima, Shomachi, Tokushima 770, Japan*

ABSTRACT

Capillary electrophoresis was applied to the detection of mutations and polymorphism on human genes towards DNA diagnosis of human diseases. We used capillary electrophoresis coupled with the PCR-based techniques, including restriction fragment length polymorphism, single strand conformation polymorphism, variable number of tandem repeat, dinucleotide repeat analysis, triplet repeat analysis, and hybridization technique. In these instances, electrophoretic conditions were optimized in each case and the precision of the measurement were examined in each case.

はじめに

成人病などの様々な疾患は、その原因遺伝子に起こる変異や多型に起因している。これらの変異や多型を正確に解析することは、疾患の遺伝子診断を可能にするのみならず、疾患の遺伝子レベルでの原因解明に貢献する。我々は、キャピラリー電気泳動を用いた疾患の遺伝子診断法の確立のために、様々な疾患原因遺伝子の変異・多型解析について研究を進めてきた¹⁾⁻¹⁸⁾。これらの研究においては、キャピラリー電気泳動と様々なPCRに基づく変異・多型解析技術(RFLP, SSCP, VNTR, ジヌクレオチドリピート解析、トリプレットリピート解析、ハイブリダイゼーション法)を組み合わせて、それぞれの疾患原因遺伝子における多型・変異の解析を行ってきた。本研究では、キャピラリー電気泳動を用いた遺伝子の変異・多型解析における最適条件の設定および高精度化のために、どのようなファクターが重要であるかを検討した結果について発表する。

実験

装置は、大塚電子と共同開発した多色蛍光検出型キャピラリー電気泳動システムおよび市販の7種のキャピラリー電気泳動装置(ABI, AMS, Beckman, HP, Jasco, Otsuka, Waters)を使用した。サンプルは、DNA分子量マーカーおよび遺伝子診断のための、マイクロサテライトマーカー、VNTRマーカーおよびPCR-RFLP生成物を用いた。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を満たして用いた。サンプルは電氣的に注入した。

結果と考察

まず、DNA解析のために数種類のポリマー (PAA: ポリアクリルアミド, HEC: ヒドロキシエチルセルロース, MC: メチルセルロース, PEG: ポリエチレングリコール, PEO: ポリエチレンオキシド) を用いて、DNA分子量マーカーを解析し、DNAのサイズと移動度の関係を検討した。その結果、表1に示すように、それぞれのポリマーによって、濃度と解析可能なDNAサイズの関係が明らかになった。

表1 解析可能なDNAのサイズと各ポリマー濃度

DNAサイズ (bp)	ポリマー濃度 (% w/v)		
	PAA	HEC, MC	PEG, PEO
1-100	8.0-12	1.0-3.0	6.0-8.0
100-300	7.0-8.0	0.7-1.0	3.0-6.0
300-1000	5.0-7.0	0.5-0.7	2.0-3.0
1000-10000	3.0-5.0	0.3-0.5	0.5-2.0
10000-30000	2.0-3.0	0.01-0.3	—

比較的サイズの小さいDNAを解析す

る方法 (RFLP, ジヌクレオチドリピート解析) の場合には、DNAの泳動挙動がOgstonモデル (分子ふるい効果) で説明できるために、DNAサイズの決定が容易であった。しかし、比較的大きいサイズのDNAあるいは、1本鎖DNAの高次構造が生じる場合は (SSCP, VNTR, トリプレットリピート解析) 解析の高精度化が困難であった。このような場合は、DNAの泳動挙動が必ずしもOgstonモデルに一致せず、他のモデルを考える必要がある。この泳動挙動を解析するために、蛍光顕微鏡を用いて、ポリマー溶液中における単一分子DNAのダイナミクスを直接観察した。その結果、ポリマー溶液中において、DNAは、ゲル中でのダイナミクスとかなり異なるコンフォメーションをとることが明らかとなった。

文献

- 1) M. Ueda and Y. Baba, *Anal. Sci.*, **1997**, *13*(1), 109-112.
- 2) M. Ueda, H. Oana, Y. Baba, M. Doi, and K. Yoshikawa, *Biophys. Chem.*, **1997**, in press.
- 3) H. Inoue, M. Tshukako, and Y. Baba, *J. Chromatogr. A*, **1997**, in press.
- 4) Y. Baba, T. Sawa, A. Kishida, and M. Akashi, *Electrophoresis*, **1997**, in press.
- 5) Y. Baba, C. Sumita, M. Tsujio, S. Nitta, H. Sasawaga, T. Miki, and T. Ogihara, *J. Chromatogr. B.*, **1997**, in press.
- 6) Y. Baba, *J. Chromatogr. B.*, **1996**, *687*, 271-302.
- 7) Y. Baba, *J. Chromatogr. B.*, **1997**, in press.
- 8) Y. Baba, "Analytical and Preparative Separation Methods of Macromolecules", H.Y. Aboul-Enein (Editor), Marcel Dekker, New York, NY, in press.
- 9) 馬場嘉信, "最新の分離・精製・検出法", **1997**, 梅澤他編, エヌ・ティー・エス出版.
- 10) 馬場嘉信, "ゲルテクノロジー", **1997**, 阿部他編, サイエンスフォーラム.
- 11) 馬場嘉信, "ゲルハンドブック", **1997**, 長田他編, エヌ・ティー・エス出版.
- 12) 馬場嘉信, *薬学雑誌*, **1997**, *117*(5), 265-281.
- 13) 馬場嘉信, *臨床検査*, **1997**, *41*(5), 569-583.
- 14) 馬場嘉信, *医学のあゆみ*, **1997**, *183*(4), 285-289.
- 15) 明石満, 岸田晶夫, 澤智裕, 馬場嘉信, *Jasco Report*, **1997**, *39*(2), 37-43.
- 16) 馬場嘉信, *高分子*, **1997**, *46*, in press.
- 17) 馬場嘉信, "医療におけるバイオテクノロジー", 木村編, *医薬ジャーナル*, 印刷中.
- 18) 馬場嘉信他, "基礎化学コース 分析化学III", 丸善, 印刷中.



CZEを用いた微生物の分離とその活性測定法

- 1) 鳥村政基*、加納健司、池田篤治、2) 江坂幸宏、3) 上田輝久
1) 京大院農・応用生命 2) 岐阜薬科大 3) 島津製作所

Capillary zone electrophoretic separation and activity measurements of microorganisms

Masaki Torimura^{1*}, Kenji Kano¹, Tokuji Ikeda¹, Yukihiro Esaka², Teruhisa Ueda³
1, Division of Applied Life Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto University 2, Gifu Pharmaceutical University 3, Shimadzu Corporation

In order to separate and characterize microorganisms, CZE was applied to the separation and the redox activity measurements of microorganisms, where specific redox enzymatic reactions in microorganisms occurring in the capillary were simultaneously monitored during the electrophoretic process.

1、はじめに

一般に多くの細胞表面は生理的条件下で負電荷を有しており、その表面電荷特性は細胞の種類・状態によって異なり、電氣的に泳動させることでそれらの分離が可能になる。高分離能を有するキャピラリー電気泳動法(CZE)は微量の細胞を生きたままの状態に迅速に分離するのに適している。本研究ではCZEを用いた微生物細胞の分離検出法の可能性を検討した。各種実験条件下における電気泳動移動度から、細胞の電荷・形状・集合状態のみならず、細胞膜や細胞壁の構造あるいは表面の柔らかさに関する情報が得られると考えられる。

一方でこの分離場としてのキャピラリー内微小空間を細胞内特定酵素の反応場と見なし、分離過程に酵素反応を進行させれば細胞の分離と活性測定が同時にできると期待される。また本手法の確立により、細胞の生理特性と細胞内酵素活性の相関を簡便に評価できると考えられる。これらの情報を統合化して細胞の新規キャラクタリゼーションを提案するとともに、同一細胞種の細胞表面状態、生理活性状態に与える外環境の影響を調べ、細胞成長、分化を物理化学的視点で考察する。また、これらの応用として各種細胞の同定や生菌数測定法の開発へと発展させる。

2、実験

Escherichia coli, *Pseudomonas fluorescens* TN-5, *Bifidobacterium longum*, *Paracoccus denitrificans* 等種々の微生物について CZE におけ

るその泳動挙動を分光学的に追跡するとともに、顕微鏡レベルでの直接観察も行った。また泳動溶液の組成（pHあるいはイオン強度等）が泳動度に与える影響についても検討し、その静電特性をはじめとする細胞表面の状態について考察した。

さらに細胞分離と同時にキャピラリー内で細胞活性測定を行うことを目的とし、基質とともに酸化還元色素を含有した溶液を泳動溶液とし電気泳動を行った。また本手法を用いて、細胞の生理特性と細胞内酵素活性の相関を考察し、生菌数測定法への可能性を検討した。

3、結果および考察

種々の微生物はCZEにおいて異なる泳動挙動を示し、顕微鏡レベルでの泳動挙動も観察できた。実際、微生物の種類・状態、あるいは集合状態によってその挙動が異なることが観察された。得られたそれらのピークは比較的ブロードであり、これは同一細胞種の1つ1つの表面電荷特性の違いを反映しているものと考えられる。また泳動液のイオン強度を変化させた実験データの解析から、表面電荷密度に加え細胞表面の柔らかさの情報を得ることに成功した。一方、基質（glucose）と酸化還元色素

（2,6-dichlorophenolindophenol）を含有する泳動液に *Escherichia coli* を泳動させたとき、泳動と同時にその細胞質特定酵素の活性を測定することができた（Figure 1）。本手法を用いて、各種細胞の基質特異性を利用した微生物の選択的分離検出が可能である。

現在これらの手法の応用として、*Escherichia coli* の同調培養により増殖サイクルと細胞表面特性および細胞活性の関係について検討している。

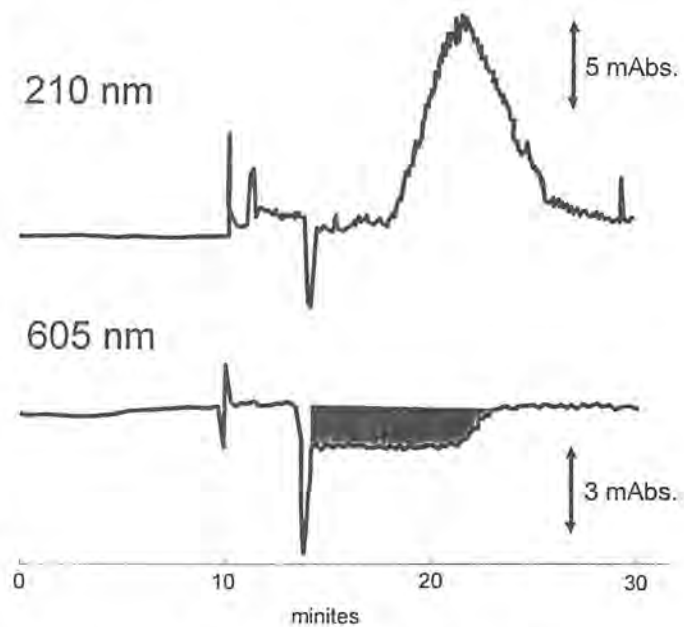


Figure 1 Redox reaction of *E. coli* in capillary during separation

Conditions; Running buffer; 10 mM glucose and 0.5 mM 2,6-dichlorophenolindophenol in pH 7.0 phosphate buffer
Capillary; 800 mm × 0.05 mm (effective length 500 mm)
Applied voltage; 10 kV, Injection; siphoning



CE法による微細藻類の電気泳動速度の測定

山端景子*、村井慶久、近藤寿子、平田雄志
大阪大学大学院基礎工学研究科化学系専攻化学工学分野

Measurement of electrophoretic velocity of microalgae by CE

Keiko Yamaberi*, Yoshihisa Murai, Hisako Kondo, Yushi Hirata
Division of Chemical Engineering, Department of Chemical Science and Engineering,
Osaka University

Abstract

In applying CE to measuring the electrophoretic velocity of microalgae, their migration velocities may be affected by the gravitational settling. To clarify this effect on the electropherogram, measurements have been carried out by changing the capillary setup from horizontal to vertical. In the horizontal setup, spike disturbances appeared apart from the peak of an electropherogram, which showed the existence of algal cells migrating at lower velocities near the capillary wall due to the gravitational settling. Such disturbance disappeared in the vertical setup and the electrophoretic velocities of microalgae have been measured by varying the strength of the electric field.

1. はじめに

微細藻類の新規回収技術として電気浸透脱水法が注目されている。電気浸透脱水法は界面動電現象により藻体電荷に対して逆符号に帯電した水を電場中で移動させる電気浸透脱水と藻体自身の電気泳動分離の両者の効果を利用したものであり、その開発には藻体の表面電荷を明らかにすることが重要である。そこでCE法により藻体の電気泳動速度を測定し、藻体表面の荷電状態の検討を行った。

一般にCE法では高い分離能を得るため100 μ m径までの細いキャピラリーが用いられる。しかし、沈降性を有する細胞等の電気泳動速度を測定する場合、一般に使用される試料導入口と検出部が水平に位置する水平型CE装置では泳動中に細胞がキャピラリー壁に沈降付着し、正常な泳動速度を測定できない可能性が高い。このため藻体の電気泳動速度測定には試料導入口と検出部が垂直に位置する垂直型CE装置を用いる必要がある。本研究では水平型CE装置と垂直

型CE装置の両者を用いて微細藻類の電気泳動速度を測定した結果について報告する。

2. 実験

微細藻類として淡水性緑藻*Chlorella pyrenoidosa* IAM C212を用いた。2LのローラーボトルにおいてModified Bristol Mediumを用い、30 $^{\circ}$ C、10,000lux、1%CO₂混合空気通気量0.1vvmで培養を行った。細胞増殖が停止した静止期の藻体5~10ml (1.3 $\times 10^{11}$ [cells/l])を遠心分離 (2,000rpm、15min) 後、培養液と同濃度のリン酸buffer (75mg/L K₂HPO₄、175mg/L KH₂PO₄: 泳動液) で2回洗浄し、リン酸bufferで総量が1mlとなるよう調整した藻体懸濁液をCE実験に用いた。

使用した電気泳動装置は日本分光890-CE (水平型) であり、キャピラリーが垂直に設置できるよう一部改良した。キャピラリーは内径50 μ mのフューズドシリカキャピラリーチューブ (全長100cm、有効長30cmもしくは50cm) であり、吸光度検出には藻体の吸収極大波長である210nmとクロロフ

イルの極大吸収波長680nmの2波長を用いた。また、藻体の泳動実験前後に電気的中性物質としてグルコースを用いて電気浸透流速速度を測定し（検出波長210nm）、その平均値を藻体泳動時の電気浸透流速速度とした。

3. 結果と考察

顕微鏡観察した藻体の形状は球状であった。顕微鏡画像をパソコンに取り込んで画像処理を行い、面積相当径を求めたところ Fig. 1のような細胞径分布を得た。これより体積平均径は4.2 μ mとなった。比重瓶による比重測定およびヘマクトメーターによる数密度の計測より *Chlorella* の密度は 1.036g/cm³であった。Stokesの沈降速度式 $v = gDa^2(\rho_a - \rho_f) / 18\mu f$ より算出した細胞の沈降速度は0.39 μ m/sとなる。従って50 μ m径の水平キャピラリーを用いた場合、泳動開始3分後には藻体は壁に沈着することになる。

Fig. 2に水平型、垂直型CE装置で得られた電気泳動図を示す。全体的なピーク位置から算出される藻体の電気泳動速度は両装置において同じであった。しかし、水平型CE装置では全体的なピーク位置とは異なる位置に高いスパイク状のピーク（矢印）が見られた。これは泳動中に壁へ沈降し、泳動速度が遅くなった藻体が検出されたピークである。垂直型CE装置ではこのようなピークは現れない。

垂直型CE装置を用い、pH=4、6、9での電場の強さに対する藻体電気泳動速度の変化を調べた（Fig. 3）。電場の強さ20kV/m以下では電気泳動速度は電場の強さに対し良好な直線性を示し、この範囲ではジュール熱による温度上昇の影響のない測定が可能である。また、実験結果の相関線が原点を通ることより、本藻体の重力沈降速度は電気泳動速度に対し無視できるほど小さい。この結果はStokesの沈降速度式より試算し

た沈降速度（0.39 μ m/s）が電気泳動速度に対し十分小さい値であることと合致している。

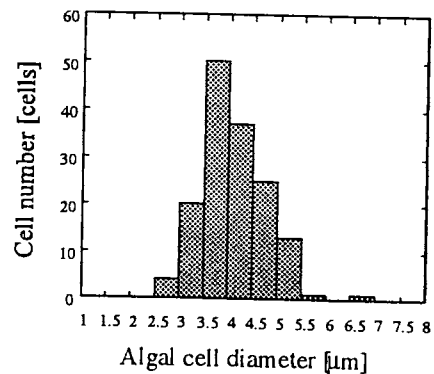


Fig. 1. The distribution of algal cell diameter

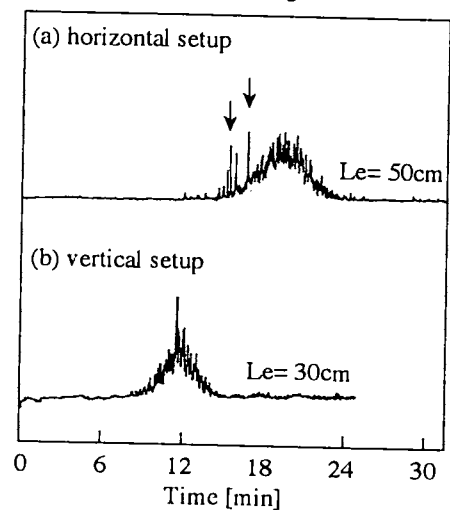


Fig. 2. Comparison of electropherograms measured at 210nm, pH=4 and E=20kV/m by using a capillary of 50 μ m in diameter. (a)horizontal setup (Le=50cm) (b)vertical setup (Le=30cm)

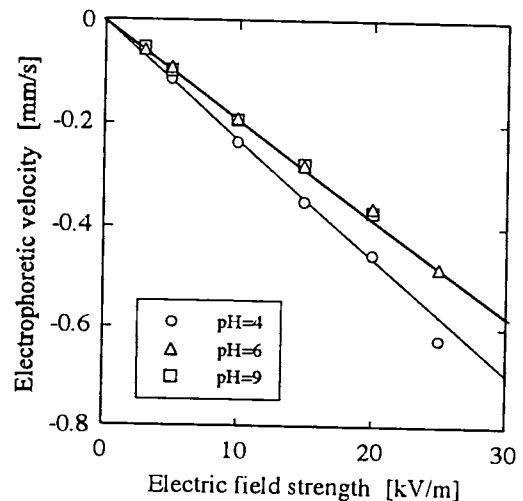


Fig. 3. Relationship between electrophoretic velocity and electric field strength.

L29

SC17
Tokyo'97

高分子界面活性剤を用いるMEKC:アルキルジアミン添加の検討

1) 尾崎祐人*, 2) 寺部 茂

1) 株式会社カネカテクノリサーチ, 2) 姫路工業大学理学部

Addition of alkyl diamines to high-molecular-mass surfactant solution on micellar electrokinetic chromatography.

Hiroto Ozaki^{1*}, Shigeru Terabe²

1) Kaneka Techno Research Co. Ltd.

2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

1,6-diaminohexane (DAH) was utilized as a novel additive in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using a high-molecular-mass surfactant, butyl acrylate/butyl methacrylate/ methacrylic acid copolymer sodium salt (BBMA). The migration times of the non-ionic test solutes, naphthalene derivatives, were increased significantly by addition of 0.5 mg/ml DAH to the 10 mg/ml BBMA in a borate-phosphate buffer (pH 8.0). The dependence of the migration times on the concentration of DAH and pH was studied. Adding DAH was applied to the on-line MEKC-ESI-MS.

1. 緒言

我々は、擬似固定相として高分子界面活性剤を用いるミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) について検討している¹⁻³⁾。これまでにアクリル酸ブチル-メタクリル酸ブチル-メタクリル酸共重合体 (BBMA) に代表される高分子界面活性剤を単独で使用する場合¹⁾と、有機溶媒、シクロキストリン、非イオン界面活性剤などの添加剤を併用する場合²⁾について報告しているが、今回、電気的に中性な試料の分離改善の上で特徴的な効果を生じる1,6-ジアミノヘキサン (DAH) を用いる方法について検討した。添加濃度およびpHの影響を中心に調べ、いくつかの試料への応用を検討した。

2. 実験

MEKCは装置にヒューレットパッカート製HP-3DCEを使用し、通常の手法で実施した¹⁾。BBMAは第一工業製薬から提供されたものを使用した。DAHはナカライスケ製を使用した。MEKC-ESI-MSは基本的に既報と同様³⁾に実施した。

3. 結果および考察

最初にナフthalen誘導体を用いた検討を実施し、DAH濃度の添加濃度の増大とともにピークの溶出時間が極めて大きくなることが判明した。1%BBMAを用いた場合(pH8)、0.1%のDAH添加により各成分の移動時間は2~3倍となり、容量比はいずれも増大が認められた。

一例として分子量分布を有する非イオン性界面活性剤のTriton X-100の分離を行った例をFig. 1に示す。BBMA単独では完全分離は困難であるが、DAH添加によりほぼ完全に分離できた。pH依存性を検討したところ、Fig. 2に示すようにpH8-11の範囲で、pH上昇とともに

に添加効果は小さくなる傾向にあった。DAHのみを含む分離溶液によるCEの検討 (pH8) の結果、DAH単独では動電クロマトグラフィー用キャリアとしての効果は認められず、添加により電気浸透流は小さくなるが、電気浸透流の逆転は生じないことが判明した。

かなり低濃度のBBMA溶液においてもDAH添加効果が大きいことから、オンラインMEKC-ESI-MSへの応用も有用である。上述のTriton X-100は、ESIで安定な付加体を生じるポリオキシエチレン鎖を有するため、これを標準試料として検討を行った。

- 1) H. Ozaki, S. Terabe et al., *J. Chromatogr.*, 680(1994)117-123
- 2) H. Ozaki, S. Terabe et al., *J. Chromatogr.*, 709(1995)3-10
- 3) H. Ozaki, S. Terabe et al., *J. Chromatogr.*, 716(1995)69-79

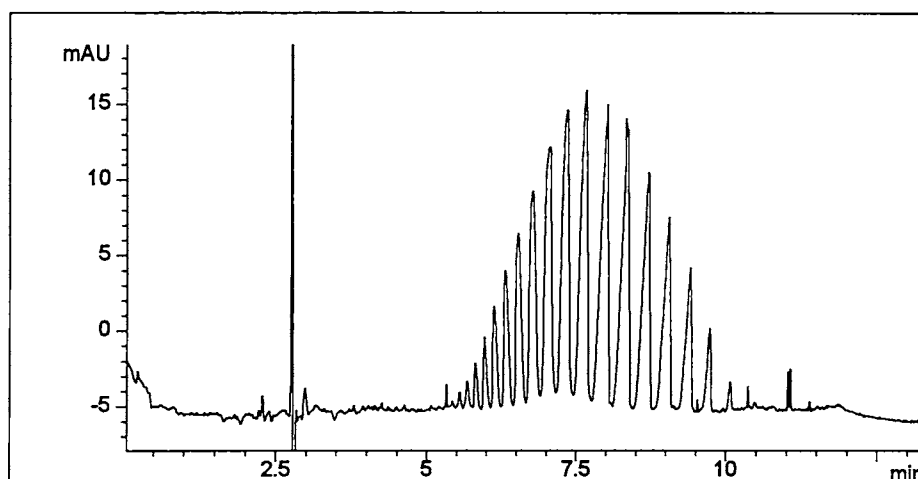


Fig.1 MEKC separation of Triton X-100.

Conditions: capillary, 38 cm (30 cm to the detector) x 50 μ m; running solution, 0.1% BBMA containing 0.03% DAH in 50 mM phosphate-100 mM borate buffer (pH8); applied voltage, 20kV; detection wavelength, 195 nm.

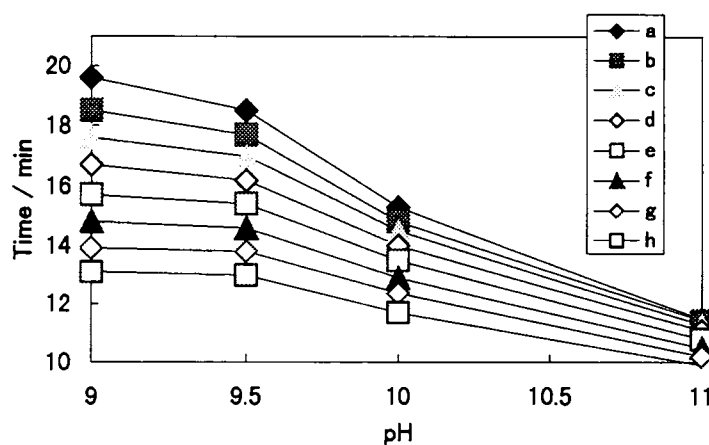


Fig.2 Dependence on pH of the separation solution.

Analyte: Triton x-100 (The last 8 of the peaks in Fig.1). Conditions: capillary, 50 cm (42 cm to the detector) x 50 μ m; running solution, 0.1% BBMA containing 0.025% DAH in 50 mM phosphate-100 mM borate buffer; applied voltage, 20kV; detection wavelength, 195 nm.



工場排水中成分の測定 (1) 芳香族系アミン

- 1) 丸山 敏彦※ 2) 八木 吉彦 厩橋 哲也
1) 大塚電子株式会社 計測事業部分分析グループ
2) 阪神水道企業団 水質試験所

Analysis of plant drainage by capillary electrophoresis : Aromatic amines

Toshihiko Maruyama(1)

Yoshihiko Yagi(2) Tetsuya Mayahashi(2)

Organization : (1) Analytical Business Unit Analytical Group OTSUKA ELECTRONICS
CO., LTD.

(2) Water examination Laboratory Hanshin Water Supply Authority

Many kinds of components in plant drainage are analyzed by capillary electrophoresis. Aromatic amines are one of them. We studied mobility of these compounds and analyzed 3,5-dimethylpyrazol.

はじめに

平成8年に淀川の水質が悪化し最終処理水に強いクロラミン様の悪臭が発生した。その発生源は不明であり、原因物質を当初芳香族アミンの反応物と考えていた。しかしアンモニア性窒素量とジクロラミン濃度が低レベルであったことと、脱塩素処理を行うことで臭気が消失したことから3,5-ジメチルピラールと塩素との反応性生物であると推測された。そこで工場排水中の各種成分測定の一貫として、この3,5-ジメチルピラールと芳香族アミン系の各種泳動条件における挙動を調査し、これらの成分が含まれると考えられる工場の排水を分析した。

実験

使用装置

CAP I-3200 キャピラリー電気泳動システム

試料

標準試料：3,5-ジメチルピラール、o-アミノフェノール、m-アミノフェノール、p-アミノフェノール、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、アニリン、フェニル尿素、DL-フェニルアラニン

工場排水：京都府下工場にて採取

標準物質の分離検討

3,5-ジメチルピラールおよび芳香族アミンの泳動についてリン酸ナトリウム水溶液とホウ酸ナトリウム水溶液のpHによる影響を検討した。次にこれらにアルキルスルホン酸、サイクロデキストリンを添加しその影響を検討した。

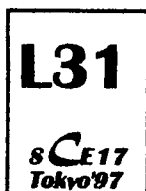
工場排水の分析

標準物質の分離条件の結果を踏まえ採取した工場排水を適当な濃度に希釈し分析をおこなった。

結果と考察

3,5-ジメチルピラールおよび今回選んだ芳香族アミンは各泳動溶液におけるpHの検討だけでは相互に完全分離することはできなかった。特にo-アミノフェノール、m-アミノフェノール、p-アミノフェノールの分離には困難を要したが、アルキルスルホン酸、サイクロデキストリンを泳動溶液に添加することにより相互の分離が向上した。pH2.5の泳動溶液ではほとんどの分離は達成できたが、30分という長い分析時間を要した。pH9の泳動溶液では添加剤を使用しても全成分の相互の分離は芳ばしくなかったが5分以内という短時間で全成分が検出できるため多検体の未知試料をスクリーニングするのに適するという長所が認められた。

工場排水の分析にあたって今回用意した標準試料に対応する成分が存在するかどうかは不明であり、またそれ以外の成分が検出されることも考えられるため、添加剤は使用せずpH9の泳動溶液で分析を行った。その結果、工場排水試料中に3,5-ジメチルピラールが検出された。しかしこの条件では電気浸透流速で移動しているためアルキルスルホン酸を添加し、標準試料のスペクトルと比較しながら単離していることを確認し定量を行った。またその他多くのピークの中には今回標準物質として選んだ芳香族アミン系成分と考えられるものもいくつか検出することができた。しかし未知成分との分離が不十分は部分もあるため、標準試料において検討した条件より今後さらに分離条件の検討をすすめる必要性がある。



キャピラリー電気泳動法による金属イオンと陰イオンの 同時分析について

(大塚電子株式会社) 笹 一志*、佐藤康博、北岸恵子

SIMULTANEOUS SEPARATION OF METAL IONS AND ANIONS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

KATSUSHI SASA, YASUHIRO SATO, KEIKO KITAGISHI
(OTSUKA ELECTRONICS CO.,LTD)

ABSTRACT

Complexation of metal ions with chelating agents is applied to the analysis of metal ions by capillary electrophoresis. Conditions of electrophoretic separations of metal chelate compounds overlaps those of organic and inorganic anions.

We successfully achieved the simultaneous separation of metal ions and anions in the presence of chelating agents.

1. 緒言

キャピラリー電気泳動法におけるイオン分析において、陽イオンと陰イオンの分離はそれらが正負反対の荷電をもつことから別々の分析法を用いている。しかし、この方法では連続測定を行う場合、Bufferの交換、キャピラリーの洗浄工程等の操作が煩雑になり分析時間もかかる。

金属イオンは色々なキレート試薬と錯イオンを形成することは知られている。そこで、今回この性質を用いて金属イオンを負のイオンとし、無機の陰イオンや有機酸との同時分析が可能であるか検討を行った。

2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子社製CAP1-3200、キャピラリーはフューズドシリカキャピラリー(内径75 μ m、全長725mm、有効長600mm)を用いた。印可電圧は-15kV、検出波長は375nm(インダイレクトUV検出)と200nm(ダイレクトUV検出)、キャピラリーの温度調節は25 $^{\circ}$ Cで行った。泳動液は、キレート試薬を含んだ無機陰イオンと有機酸分析緩衝溶液を用いた。

3. 結果および考察

金属イオンと陰イオンを同時分析を行うためには、キレート試薬の選択が重要になる。その選択は、検出方法(インダイレクト、ダイレクトUV検出)やイオン種すなわち移動度の大きさによって変わる。

今回は、陰イオン分析の中でも比較的移動度の大きな無機の陰イオンと有機酸を用いてダイレクトUVとインダイレクトUV検出の2つの手法について検討を行った。

図1と2に示すように金属イオンを錯イオン化させ、無機の陰イオンおよび有機酸の同時分析が可能であることがわかった。

また、多種の金属イオンの分離への応用や種々のキレート試薬の選択の検討をも行ったのであわせて報告を行う。

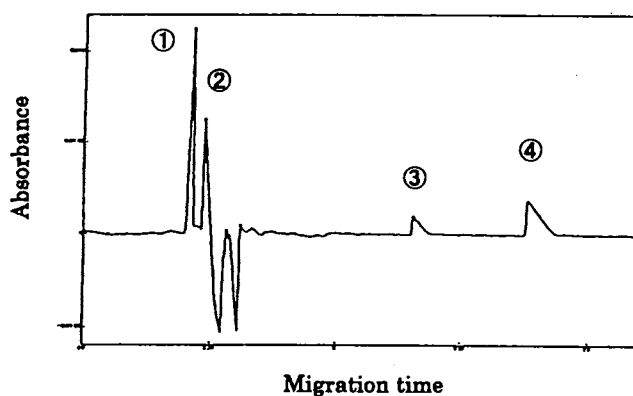


Fig.1. Electropherogram of metal ion and inorganic anions

① Cl^- ② SO_4^{2-} ③ Ni^{2+} ④ BO_3^{3-}

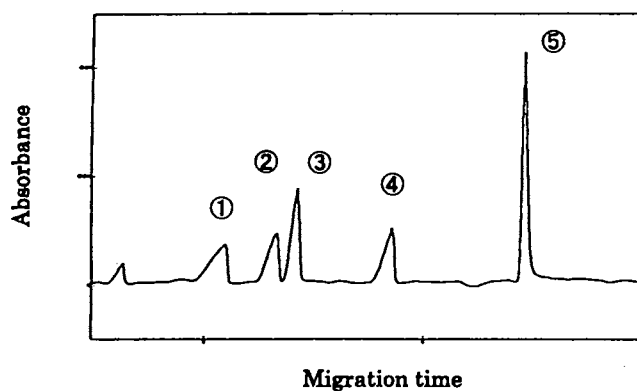


Fig.2. Electropherogram of metal ion and organic acid

① formic ② succinic ③ citric ④ acetic ⑤ Ni^{2+}



キャピラリーイオン分析におけるサンプル中の塩の影響

佐々木秀輝*、米久保淳
日本ウォーターズ (株)

The Effects of Salts in Sample Matrix to Capillary Ion Analysis HIDEKI SASAKI* , JUN YONEKUBO Nihon Waters K.K.

The effects of salts existing in sample solution on capillary ion analysis was studied . Two facts was declared that (1) the conductivity of sample solution effects to electroosmosis flow , the electroosmosis flow increase according to sample conductivity , to avoid this effect adding same salt in sample is effective .(2) the ion strengthen effects to peak shape , the peaks become broader according to the ion strengthen of sample matrix , it is remarkable specially in the case of weak base, finally the peaks disappear .

1.要旨: キャピラリーイオン分析において、サンプル中に共存する塩類が及ぼす影響について調べたところ以下の事が判明した。(1) サンプル溶液の電気伝導度は電気浸透流に影響し、電気伝導度が大きくなるに従い電気浸透流は早くなる。この影響を軽減する上で、サンプル中に一定量の塩を添加する方法が有効であった。(2) サンプルのイオン強度はピーク形状に影響し、共存する塩の濃度が高くなるに従いピークはブロードになり、特に弱イオンの場合ではこの現象が顕著で、最終的にピークは消失する。

2.実験: [用いた器機] CIA Analyzer (キャピラリー電気泳動システム; Waters)、Millennium 2010 v.2.22 (データ処理; Waters)

[分析条件] Capillary : 75 μ m \times 60 cm (有効長 52.5 cm)、Detect : Indirect UV at 254 nm、Voltage : 20kV Negative Polarity、Injection : 10 cm hydrostatic for 30 sec.

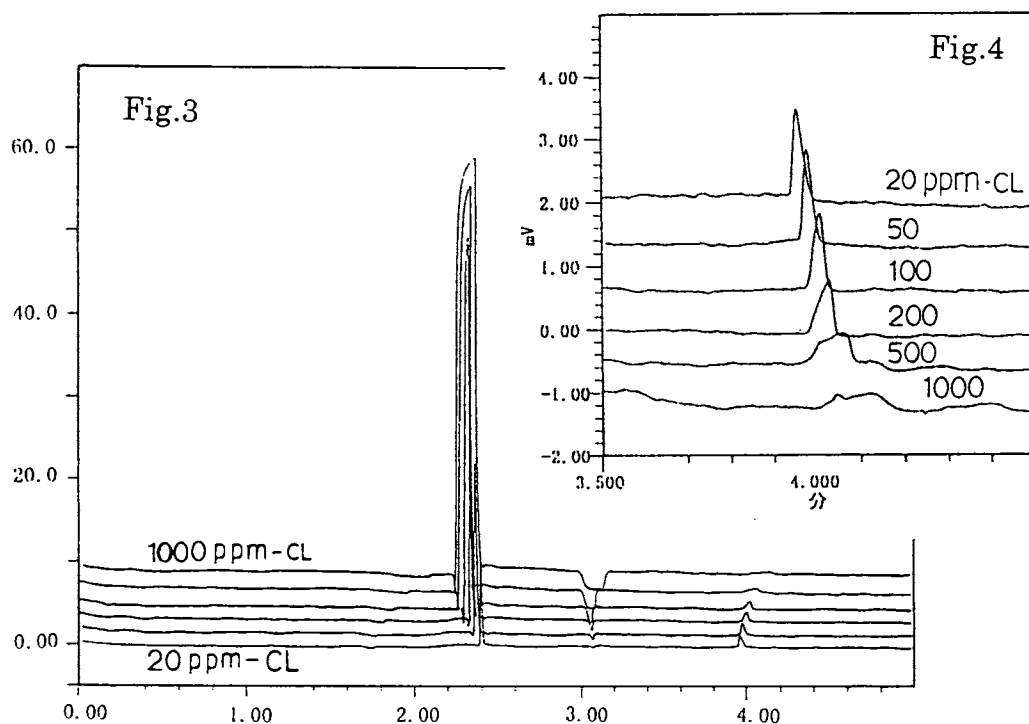
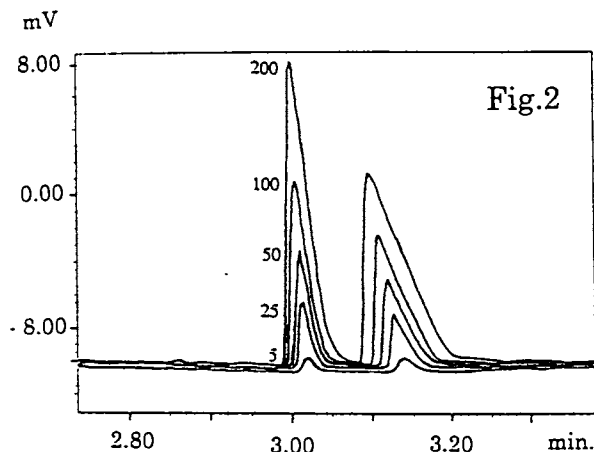
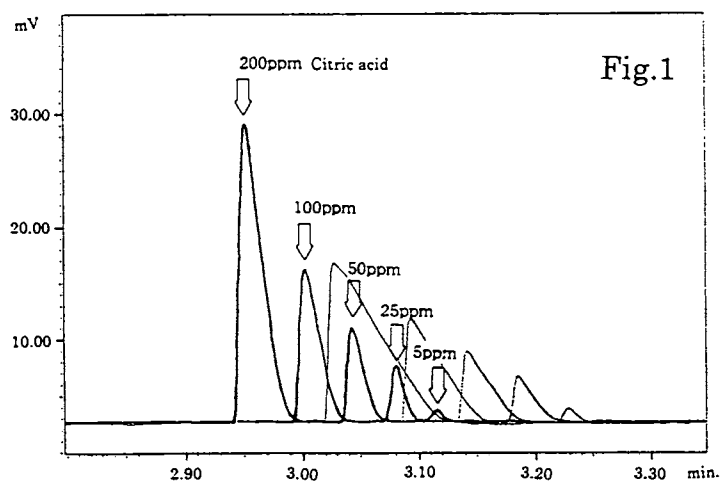
Running Solution 1. 5mM-Potassium hydrogenphthalate , 2.5v/v%-OFM anion BT(Waters) , pH 3.2 with Phthalic acid

Running Solution 2. 5mM-Sodium Chromate , 2.5 v/v%-OFM anion BT (Waters) , pH 11.0 with 0.1N-NaOH

3.結果及び考察: Fig.1.は泳動バッファー 1.を用い、クエン酸とリンゴ酸のスタンダードを分析したものの重ね書きである。この様に、サンプル中の測定成分の濃度が増え、サンプルの電気伝導度が増えたと、それに従い泳動時間が短くなっており、同時にニュートラル成分の泳動時間が早くなっている事から、電気浸透流が早くなっているものと考えられた。一方、Fig.2 は同じサンプルに NaCl をそれぞれ溶液中で 10mM になるように調整したスタンダードの例である。スタンダードの量の変化による電気伝導度の変化がサンプル溶液中で無視出来るほど小さいため、電気浸透流の速さ、及び泳動時間がそれぞれでほぼ等しい値となっている。これらの現象は以下

のように考えると説明可能であった。サンプルを注入した直後では、キャピラリー中でサンプルと泳動バッファーが界面をはさんだ状態にあるため、系全体では抵抗を直列に繋げた電気回路に成っており、分析開始直後ではキャピラリー中の泳動バッファー部分にかかる電圧降下がサンプル毎に異なり、泳動時間に差が出る。

Fig.3、Fig.4 は 10ppm の Taurine (MT=4.0min 前後) を分析したもので共存イオンとして 20~1,000ppm の Cl (MT=2.3min 前後) イオンが存在している。Taurine は両性イオンであるため、この条件では泳動バッファーの pH を 11.0 にする事でプラスのチャージを抑制し、Taurine をマイナスのイオンとして分析している。共存する Cl イオンの影響でピーク形状が次第にプロトになっている。



第18回キャピラリー電気泳動シンポジウム開催 (予定)

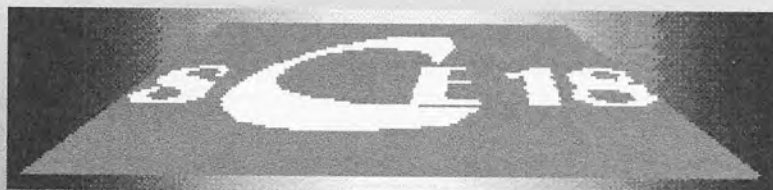
1998年12月、九州大学で開催を予定しています。
正式なお知らせが出来るまでは下記にお問い合わせ下さい。

第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム
実行委員長 小林英三郎

FAX:0492-71-7985

e-mail:hkoba@pop.josai.ac.jp

<http://www.josai.ac.jp/hkoba/sce17.html>



平成9年度(社)日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会委員

委員長

寺部 茂

姫路工業大学理学部

常任委員

大塚 浩二(*)

姫路工業大学理学部 (*事務局)

廣川 健

広島大学工学部応用理化学機器分析

委員

新井	悦郎	ベックマン (株)
奥津	徹	日本バイオラッドラボラトリーズ (株)
奥山	典生	プロテインテクノインスティテュート
恩田	宣彦	(株) パーキンエルマー・ジャパン
鷹野	重威	日立計測エンジニアリング (株)
木曾	義之	広島大学名誉教授
北岸	恵子	大塚電子 (株)
児玉	裕敬	高知医科大学
○小林	英三郎	城西大学理学部
酒井	恒行	日本ウオーターズ (株)
志村	清仁	帝京大学薬学部
千田	正昭	日本分光 (株)
曾我	朋義	横河アナリティカルシステムズ (株)
高木	俊夫	大阪大学名誉教授
田中	信男	京都工芸繊維大学繊維学部
津田	孝雄	名古屋工業大学応用化学科
津田	淑江	共立女子短期大学
中川	照眞	京都大学大学院薬学研究科
中村	洋	東京理科大学薬学部薬品分析化学
永柳	衍	(株) 島津製作所
西村	健一	松定プレシジョン (株)
馬場	嘉信	徳島大学薬学部薬品物理化学教室
平岡	厚	杏林大学保健学部
福士	恵一	神戸商船大学
本田	進	近畿大学薬学部
真鍋	敬	愛媛大学理学部
吉田	治弘	専修大学法学部
吉田	基子	日立製作所 (株)

○第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム実行委員長

第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集

平成9年12月1日発行

編集：城西大学理学部化学科

第17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 小林英三郎

発行：(社)日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

印刷：電算印刷株式会社

長野県松本市筑摩1-11-30

TEL 0263-25-4329

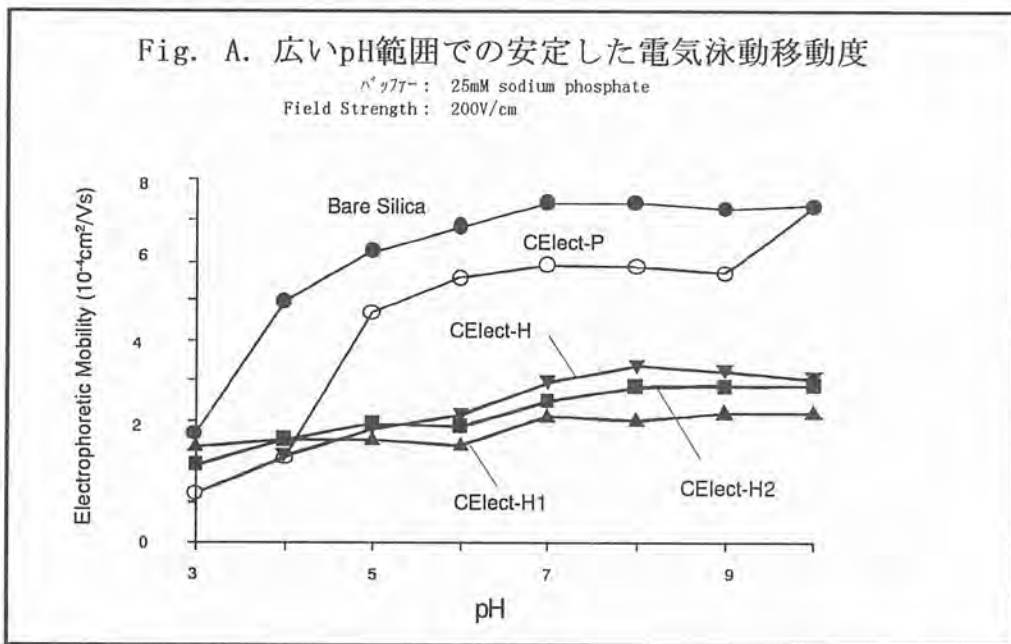
キャピラリー電気泳動カラム

CElect Column

化学結合型キャピラリーカラム

特長

- キャピラリー内壁での吸着がない
- 電気浸透流を逆にできる
- 電気浸透流が小さく、分離促進
- MECC分離で分離度向上
- 電気浸透流が安定(pH 3-10)



新発売

キャピラリー内壁	品名	結合相	電気浸透流	特長・応用例
無化学修飾	CElect-FS	フェースド・シリカ	大きい	汎用
内面化学結合型	CElect-P1	中性親水性化学結合	中	蛋白質、ペプチド
	CElect-H	弱疎水性(C1)化学結合	小さい	蛋白質、DNAフラグメント
	CElect-H1	中疎水性(C8)化学結合	小さい	蛋白質
	CElect-H2	強疎水性(C18)化学結合	小さい	蛋白質、Brij35と併用
	CElect-アミン	アミノ基結合	電気浸透流が逆	無機アニオン、塩基性蛋白質、イソチオマー
	CElect-N	中性疎水性化学結合	起こらない	CZE、DNAフラグメント、SDS-Protein complexによる蛋白質、ペプチドの分離

化学結合型キャピラリーカラムのCElectがMには、外径363 μ m、長さ1m、内径は50 μ m、75 μ mの2種類があり、全てウインドウ付きです。又コングestion 済みとコングestion 無しがあります。

詳細は弊社営業所へお問い合わせ下さい。

SUPELCO

シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社
 スペルコ 事業部

〒103 東京都中央区日本橋堀留町1-10-15 JL日本橋ビル
 TEL 03-5640-8863 FAX 03-5640-8857
 〒532 大阪市淀川区西宮原2-7-38 新大阪西浦ビル
 TEL 06-397-5963 FAX 06-397-4649

ダイオードアレイ検出器と
バブルセルキャピラリー

🌿 スペクトルもシグナルも高感度
で採取

🌿 ピークの追跡と確認が容易

サンプルトレイ

🌿 全てのバイアルにランダム
アクセス。泳動中にバイアル
をセットできる

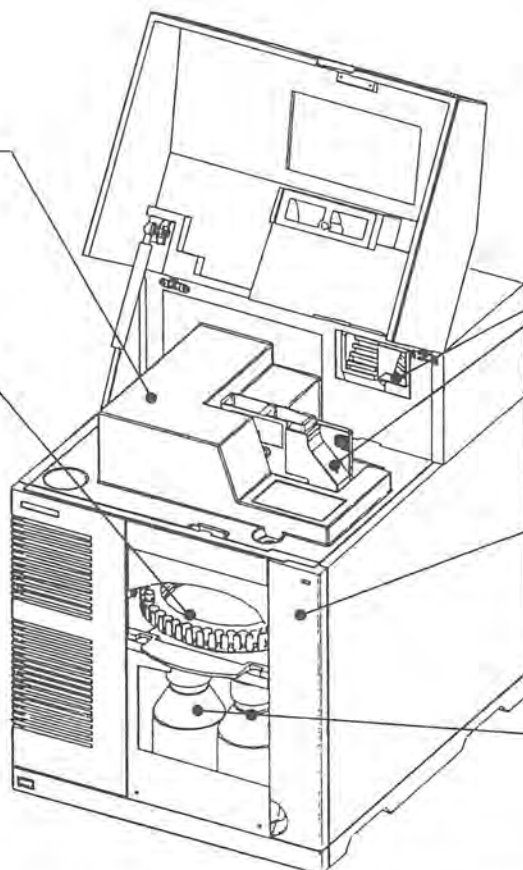
🌿 条件開発にもルーチン
分析にも自在に対応



MS-Windows対応ソフトウェア

🌿 グラフィック画面から操作

🌿 誰でも簡単に使えます



🌿 根っこマーク…何が出来るか？

🌿 葉っぱマーク…何が良いのか？

ペルチエ型温度コントローラと
キャピラリーカートリッジ

🌿 室温-10°C~60°Cまで、液冷式とほ
とんどかわらない温調精度

🌿 空冷式なので、キャピラリーの交換が
とても簡単(1分以内)

自動補正機構付加圧注入システム

🌿 独自の補正機構で、設定量を正確に
注入

🌿 定量値の信頼性が大幅に向上

リプレニッシュメントシステム(バッファ自動
交換機構)

🌿 いつも一定の組成のバッファで分析
できるようにバッファを自動交換

🌿 移動時間の再現性が大幅に向上

“キャピラリー電気泳動はHP” こんな、うわさの花が咲いたよ、 根も葉もある花だよ。

— うわさの真偽は SCE 17で —



HPは、従来CE最大の問題点とされていた
ピークの移動時間と面積値の再現性の悪さを、
見事に解決。これにより、分離能が高いという
CEの特長を、最大限引き出せました。巷では、
キャピラリー電気泳動(HPCE)はHP、ともっば
らの評判です。その真偽のほどは、SCE 17
でお確かめください。

質量分析計(MSD)に、簡単に接続できます。

CE/MSインターフェースキットにより、MSとの接続が容易になりました。
タンパク、ペプチド、薬物など、新しいアプリケーションの可能性が
広がります。接続できるMSの種類については、お問い合わせ下さい。

**"ユーザー第一"から生まれたソフトウェアにより
誰でも簡単に、信頼性の高い"HPCE分析"が実現**

CAPI-3200

**日本語版
Windows95**

マルチチャンネル

キャピラリー電気泳動装置

- 微量サンプル・短時間・高分離能分析を高い信頼性で実現
- 前処理簡略化、陽・陰イオン同時セット分析等、HPLC・IC・原子吸光・ゲル電気泳動法と比較してメリット多数
- Windows95完全対応、日本語表示、機能重視でシンプルな画面構成
初心者から研究者まで対応のユーザーインターフェース装備
- 1画面で測定条件のすべてが設定できる初心者向けの簡単測定
 - ・オートサンプラー対応連続測定
 - ・自動測定と自動解析を連続して実行するランアンドレポート機能
 - ・品質管理に適したバリデーション採用 etc.
- フォトダイオードアレイ検出器採用や自己診断機能等、ハードウェア充実
- 測定法開発をはじめ、分析技術をトータルサポート
- GLP対応



CEは今、普及のとき

HPCE普及キャンペーン

期間限定 '97年11月12日 ~ '98年4年30日

使い易くなった

キャピラリー電気泳動装置CAPI-3200を
この機会に是非、ご検討ください。

**キャンペーン価格
(標準システム)**

498万円

きめ細かいサポート・サービスは変わりません。

大塚電子株式会社

●大阪営業所 〒573 大阪府枚方市招提田近3-26-3
●東京営業所 〒192 東京都八王子市東町1-6 橋元LKビル2F
●筑波営業所 〒300 茨城県土浦市卸町1-1 関鉄つくばビル6F

TEL.0720-55-8554(営業直通) FAX.0720-55-9100
TEL.0426-44-4951(代) FAX.0426-44-4961
TEL.0298-43-5722(代) FAX.0298-43-5730