

Proceedings of the 18th Symposium on Capillary Electrophoresis

SCE '98

第18回キャピラリー電気泳動シンポジウム 講演要旨集

主催：日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会
共催：日本化学会、日本薬学会、日本生化学会、
日本電気泳動学会、クロマトグラフィー科学会

会場：九州大学工学部物質科学工学科・国際ホール

会期：1998年12月9日（水）～11日（金）

**Proceedings of the 18th Symposium on
Capillary Electrophoresis**

**Proceedings of Asian Pacific Forum on
Capillary Electrophoresis**

第 18 回キャピラリー電気泳動シンポジウム

キャピラリー電気泳動・アジア・太平洋国際
フォーラム

講 演 要 旨 集

第18回キャピラリー電気泳動シンポジウム キャピラリー電気泳動・アジア・太平洋国際フォーラム

1998年12月9日(水)～11日(金)

九州大学箱崎キャンパス工学部物質科学工学科・国際ホール

プログラム

第1日目(12月9日、工学部物質科学工学科)

開会挨拶(13:00～13:10) 本田 進

ポスターセッション(13:10～14:50)

P01 外的要因を考慮した泳動時間-実効移動度変換法による絶対移動度、pKa の評価

(広島大工) 前田 裕之*, 育田 夏樹, 廣川 健

P02 キャピラリー電気泳動装置の小型化と泳動界面の対流観察

(広島大工) 引地 龍吾*, 育田 夏樹, 廣川 健

P03 電荷量を横軸とするCZEのエレクトロフェログラム

(日本分光技術研究所¹・徳島大工²) 黒須 泰行*¹, 佐藤 泰世¹,
小勝 負純¹, 岩田 哲郎²

P04 キャピラリー電気泳動-電子衝撃イオン化-質量分析装置(CE-EI-MS)の開発(II)

(広島大工) 堀田 洋二郎*, 育田 夏樹, 廣川 健

P05 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(4)

(広島大工) 榎原 弘史*, 育田 夏樹, 廣川 健

P06 水溶液内における一価芳香族陽イオン-一価芳香族陰イオン間のイオン会合反応の解析

(岡山大理) 伴 律明*, 高柳 俊夫, 本水 昌二

P07 DNA-ポリアクリルアミドコンジュゲートを擬似固定相としたアフィニティーキャピラリー電気泳動

(九大院工) 尾崎 祥久, 有澤 卓巳*, 片山 佳樹, 前田 瑞夫

P08 非イオン性錯形成剤を用いた金属イオンのフリーフロー電気泳動分離

(広島大工) 藤沢 宏*, 育田 夏樹, 西山 文隆, 廣川 健

P09 キャピラリーゾーン電気泳動法によるアンモニウムイオンの直接UV検出

(神戸商船大学船貨輸送研究施設¹・甲南大学理学部化学科²・大阪工業技術研究所³・神戸女子短期大学⁴) 伊藤 秀幸*¹, 木村 健一¹,
福土 恵一¹, 茶山 健二², 竹田 さほり³, 脇田 慎一³,
日色 和夫⁴

- P10 半導体レーザー励起蛍光検出用蛍光標識試薬の開発と応用
(九大院工) 金田 隆*, 柴 宏樹, 小松原 剛, 今坂 藤太郎
- P11 高分子界面活性剤を用いる動電クロマトグラフィー
(浜松医大) 藤本 忠蔵*, 櫻井 政仁
- P12 石英管を用いたSDSゲル電気泳動によるタンパク質のサイズ分離とオンカラム検出
(愛媛大理) 猶原 暢洋*, 向井 準, 水摩 仁美, 山口 奈緒, 真鍋 敬
- P13 キャピラリー電気泳動による染料分解生成物の分析
(大工研¹・日本ベーリンガーインゲルハイム²) 竹田 さほり*¹,
田中 喜秀², 山根 昌隆¹, 城間 純¹, 脇田 慎一¹
- P14 血清中5-フロロウラシル (5FU) のキャピラリー電気泳動分析
(大塚電子) 北岸 恵子*, 山田 浩美
- P15 キャピラリー電気泳動による無機陰イオン、有機酸、金属イオンの一斉分析
(横河アナリティカルシステムズ) 曾我 朋義*, 柳井 博子
- P16 有機酸のキャピラリー電気泳動分析による醤油の識別
(近畿大九州工) 河済 博文*, 辻村 真治, 飯山 悟
- P17 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
(姫路工大理) 三上 千明*, 大塚 浩二, 寺部 茂
- P18 MEKC の高分子分析への応用
(カネカテクノロジー) 尾崎祐人*

外国人特別講演 (15:00~16:30)

座長: 馬場 嘉信

S01 Postelectrophoresis Capillary Scanning: A High-Throughput, Versatile DNA Analysis Method

(Pohang University of Science and Technology) Jong Hoon Hahn

座長: 福士 恵一

S02 Analysis of Phenolic Compounds by Solid-Phase Microextraction Coupled with Capillary Electrophoresis

(Tunghai University) Chen-Wen Whang

座長: 今坂 藤太郎

S03 A Novel Method for the Study of Affinity Capillary Electrophoresis
(Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences)

Guo-Quan Liu

レセプション (16:30~17:30)

第2日目(12月10日、国際ホール)

セッションI(9:00~10:15)座長:大塚 浩二

- L01 キャピラリー電気泳動の数値シミュレーション(IV)
(広島大工) 育田 夏樹*, 廣川 健
- L02 キャピラリーゾーン電気泳動の泳動時間に対する組成効果(II)
(広島大工) 廣川 健*, 育田 夏樹
- L03 オンライン電気泳動濃縮によるキャピラリー電気泳動分析の濃度検出感度の向上
(福井大工) 笠島 崇功, 呉 行正*
- L04 マイクロ加工技術を用いて作製したフリーフロー電気泳動モジュール
(オリンパス光学工業) 田島 信芳*, 鈴木 浩文, 篠原 悦夫,
狩野 恭一
- L05 電気泳動用チップ - 微小リザーバにおける電気分解の影響について
(島津製作所) 阿部 浩久*, 西本 尚弘, 叶井 正樹, 中西 博昭

セッションII(10:30~11:45)座長:志村 清仁

- L06 カラム内化学処理によるキャピラリー電気クロマトグラフィー用カラムの調製
(近畿大薬) 鈴木 茂生*, 桑原 ゆり, 牧浦 恭子, 本田 進
- L07 ポリマーチューブを用いるキャピラリーエレクトロクロマトグラフィー
(浜松医大) 櫻井 政仁*, 藤本 忠蔵
- L08 多孔質シリカ連続体のCEC/HPLCへの適用
(京都工芸繊維大¹・京大工²) 永山 尚史*¹, 小林 宏資¹,
森本 尚夫¹, 石塚 紀生², 水口 博義², 中西 和樹², 池上 亨¹,
細矢 憲¹, 田中 信男¹
- L09 錯体形成ゾーン電気泳動/イオン相互作用動電クロマトグラフィー複合モードによる糖誘導体の分離
(近畿大薬) 富樫 一天*, 多賀 淳, 上垣 佳奈, 本田 進
- L10 DNA固定化キャピラリーを用いた遺伝子分離システムの構築
(九大院工) 尾崎 祥久*, 片山 佳樹, 井原 敏博, 前田 瑞夫

セッションIII(13:15~14:30)座長:廣川 健

- L11 蛍光イメージング検出法を用いたキャピラリー等電点電気泳動システムの構築とその評価
(分子バイオホトニクス研究所¹・帝京大薬²) 松本 浩幸*¹,
牧野 強¹, 津賀田 貴子¹, 石田 雅之¹, 高本 尚宜¹,
志村 清仁², 笠井 献一²
- L12 C.elegans タンパク質塩析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, 関根 晶紀

- L13 蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動のための蛍光標識ペプチド性等電点マーカースステイン残基の標識
(帝京大薬¹・分子バイオホトニクス研究所²) 志村 清仁*¹, Zhi Wang (王 志)¹, 松本 浩幸², 笠井 献一¹
- L14 アガロースゲル等電点電気泳動とキャピラリーSDS電気泳動の組み合わせによる血漿タンパク質の2次元分離
(愛媛大理) 向井 準*, 水摩 仁美, 山口 奈緒, 猶原 暢洋, 真鍋 敬
- L15 キャピラリー電気泳動を用いるシアル酸含有糖タンパク質の不均一性の分析
(近畿大薬) 掛樋 一晃*, 船窪 整, 木下充弘, 小田 泰雄
- セッションIV (14:45~16:00) 座長: 小林 英三郎
- L16 HPCE-CZE による新規可逆性蛍光標識試薬 Dansylaminomethylmaleic acid (DAM) の評価
(九大薬) 坂田 佳代*, 浜瀬 健司, 財津 潔
- L17 バンコマイシンを光学識別剤としたミセル動電クロマトグラフィーによるNDA誘導体化D-,L-アミノ酸の分離
(国立精神神経センター神経研究所) 今澤 正興*, 畑中 由利子
- L18 CE-LIFによるアルカリフォスファターゼ標識抗体の検出
(北陸先端科技大学院大学) 小泉 顕, 森田 智之, 村上 裕二*, 民谷 栄一
- L19 Polyacrylamide Gel Electrophoresis a Tool for Metal Stress Induced Enzymatic Changes in Rice (*Oryza sativa* L.)
(National Institute of Health Sciences) Shah Kavita*
- L20 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よる光学異性体の分離: 結合定数の測定
(姫工大理¹・京工織大繊維²・阪大・保全科学研究センター³) 加藤純也*¹, 大塚 浩二¹, 寺部 茂¹, 木全 一博², 田中 信男², 田中 稔³
- セッションV (16:15~17:30) 座長: 真鍋 敬
- L21 CEによる変異ヌクレオチドの分析
(岐阜薬大¹・京大院農²) 江坂 幸宏*¹, 稲垣 真輔¹, 後藤 正志¹, 出屋敷 喜宏¹, 酒向 孫市¹, 加納 健司²
- L22 キャピラリー電気泳動による疾患関連遺伝子の多型解析
(徳島大薬) 屋代 直子*, 馬場 嘉信
- L23 キャピラリー電気泳動によるプラスミドDNAの解析
(徳島大薬) 松田 聖子*, 馬場 嘉信
- L24 HPCEによるアミノピラジン誘導体化単糖類の分析
(九大薬) 山本 貢史*, 浜瀬 健司, 財津 潔

L25 糖質-タンパク質複合系における相互作用の観察
(近畿大薬) 多賀 淳*, 樋口 陽子, 本田 進

外国人特別講演 (17:45~18:45)

座長: 中川 照眞

S04 High-speed Capillary Electrochromatography

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences) Yukui Zhang

座長: 本田 進

S05 New Injection Technique for Capillary Electrophoresis

(The National University of Singapore) Sam Fong Yau Li

懇親会 (19:00~21:00) 九州大学理農学部生協

第3日目 (12月11日, 会場: 国際ホール)

セッションVI (9:00~10:30) 座長: 江坂 幸宏

L26 酵素分解生成物のキャピラリー電気泳動分析によるヘパリンのキャラクターゼーション

(近畿大薬¹・近畿大医²) 本田 進*¹, 安枝 真一¹, 松浦 直子¹,
多賀 淳¹, 鈴木 茂生¹, 西浦 早織², 立花 貞信²

L27 キャピラリー電気泳動による糖タンパク質グリコフォームの分析

(近畿大薬) 上垣 佳奈*, 多賀 淳, 本田 進

L28 メタロチオネインのCZE: 亜鉛投与でマウス肝に誘導された新規アイソフォームについて

(近畿大薬¹・奈良医大²・産業医学総合研究所³・慶應義塾大医⁴)
久保 兼信¹, 南 武志², 小滝 規子³, 木村 正巳⁴

L29 血漿リポタンパク質の酸化に伴う薬物結合性の変化

(京大院薬) 黒田 幸弘*, 曹 波, 澁川 明正, 中川 照眞

L30 ヒト赤血球の電気泳動

(名工大) 山本 洋平, 山内 規寛, 北川 慎也, 津田 孝雄*

L31 動電クロマトグラフィー/質量分析法(EKC/MC): 基礎的研究と医薬品分析への応用

(日本ベーリンガーインゲルハイム(株)¹・姫路工大理²)
田中 喜秀¹, 岸本 康弘¹, 大塚 浩二², 寺部 茂²

セッションVII (10:45~12:15) 座長: 金田 隆

L32 遠赤外線炊飯における影響 (キャピラリーゾーン電気泳動法による米中のV-B1の分析)

(共立女短大) 津田 淑江, 伊藤 愛*

- L33 CE法を用いた粒子の電気泳動速度の測定
(阪大院基礎工) 山端 景子*, 村井 慶久, 平田 雄志
- L34 オンライン濃縮を用いるミセル動電クロマトグラフィーによる環境科学関連物質の高感度分析
(三菱重工¹・姫路工大理²) 林原 浩文*¹, 山内 澄男¹,
Joselito P. Quirino², 大塚 浩二², 寺部 茂²
- L35 キャピラリー電気泳動法による海水の分析: イオン会合反応とイオン包接反応を利用する陰イオンの分離
(Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical
Chemistry¹・岡山大理²) Andrei R. Timerbaev*^{1,2}, 高柳 俊夫²,
本水 昌二²
- L36 キャピラリー電気泳動によるめっき液分析
(大塚電子) 佐藤 康博*, 笹 一志, 丸山 敏彦
- L37 キャピラリー電気泳動によるヒ酸、亜ヒ酸、シアン等毒物の分析
(大塚電子) 丸山 敏彦*, 佐藤 康博, 笹 一志
- 閉会挨拶 (12:15~12:30)

The 18th Symposium on Capillary Electrophoresis
Asian Pacific Forum on Capillary Electrophoresis
December 9-11 1998, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Program

December 9, Wednesday

Opening Address (13:00-13:10) Prof. Susumu Honda

Poster Session (13:10-14:50)

- P01 Estimation of Absolute Mobility and pKa in Transformation of Migration time into Effective Mobility Considering External Factors
Hiroyuki MAEDA*, Natsuki IKUTA, Takeshi HIROKAWA
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P02 Miniaturization of Capillary Electrophoresis Unit and Direct Observation of Convection at Moving Boundary
Ryugo HIKICHI*, Natsuki IKUTA, Takeshi HIROKAWA
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P03 Electropherograms in Capillary Zone Electrophoresis Plotted as a Function of the Quantity of Electric Charge
Yasuyuki KUROSU*¹⁾, Yasuyo SATOU¹⁾, Jun KOSHOUBU¹⁾, Tetsuo IWATA²⁾
1) JASCO Technical Research Laboratories Corporation
2) Faculty of Engineering, University of Tokushima
- P04 Development of Capillary Electrophoresis - Electron Impact - Mass Spectrometry (II)
Youjiro HOTTA*, Natsuki IKUTA, Takeshi HIROKAWA
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P05 Development of On-Line Capillary Electrophoresis-Atomic Emission Spectrometry (CE-AES) (4)
Hirofumi MASUHARA*, Natsuki IKUTA, Takeshi HIROKAWA
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P06 Analysis of Ion Association Reaction between Monovalent Aromatic Cations and Anions in an Aqueous Solution by Capillary Zone Electrophoresis
Noriaki BAN*, Toshio TAKAYANAGI, Shoji MOTOMIZU
Faculty of Science, Okayama University
- P07 Affinity Capillary Electrophoresis Using DNA-Polyacrylamide Conjugate as Pseudo Stationary Phase
Yoshihisa OZAKI, Takumi ARISAWA*, Yoshiki KATAYAMA, Mizuo MAEDA
Graduate School of Engineering, Kyushu University

- P08 Free Flow Electrophoretic Separation of Metal Ions Using Nonionic Complexing Agents
Hiroshi FUJISAWA*, Natsuki IKUTA, Fumitaka NISHIYAMA, Takeshi HIROKAWA
Faculty of Engineering, Hiroshima University
- P09 Direct UV Detection OF Ammonium Ion by Capillary Zone Electrophoresis
Hideyuki ITO*¹⁾, Ken-ichi KIMURA¹⁾, Keiichi FUKUSHI¹⁾, Kenji CHAYAMA²⁾, Sahori TAKEDA³⁾, Shin-ichi WAKIDA³⁾, Kazuo HIIRO⁴⁾
1) Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine
2) Faculty of Science, Konan University
3) Osaka National Research Institute, AIST
4) Kobe Women's Junior College
- P10 Development and Applications of Fluorescent Labeling Reagents for Diode Laser-Induced Fluorescence Detection
Takashi KANETA*, Hiroki SHIBA, Takeshi KOMATSUBARA, Totaro IMASAKA
Graduate School of Engineering, Kyushu University
- P11 Polymer Surfactants for Electrokinetic Chromatography
Chuzo FUJIMOTO* and Masahito SAKURAI
Hamamatsu University School of Medicine
- P12 Size Separation and On-Column Detection of Proteins Using by SDS Gel Electrophoresis in Silica Columns
Nobuhiro NAOHARA*, Jun MUKAI, Hitomi MIZUMA, Nao YAMAGUCHI, Takashi MANABE
Faculty of Science, Ehime University
- P13 Analysis of Dyestuff Degradation Products by Capillary Electrophoresis
Sahori TAKEDA*¹⁾, Yoshihide TANAKA²⁾, Masataka YAMANE¹⁾, Zyun SIROMA¹⁾, Shin-ichi WAKIDA¹⁾
1) Osaka National Research Institute, AIST
2) Nippon Boehringer Ingelheim
- P14 Determination of 5-Fluorouracil in Human Serum with Capillary Electrophoresis
Keiko KITAGISHI*, Hiromi YAMADA
Otsuka Electronics Co.
- P15 Simultaneous Determination of Inorganic Anions, Organic Acids and Metal Cations by Capillary Electrophoresis
Tomoyoshi SOGA*, Hiroko YANAI
Application Development Department, Yokogawa Analytical Systems Inc.

P16 Categorization of Soy Sauce with Analysis of Organic Anions by Capillary Electrophoresis

Hirofumi KAWAZUMI*, Shinji TSUJIMURA, Satoru IYAMA
Kyushu School of Engineering, Kinki University

P17 Enantiomer Separation by Capillary Electrochromatography

Chiharu MIKAMI*, Koji OTSUKA, Shigeru TERABE
Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

P18 The Detection of Antibody Labeled with Alkaline Phosphatase by CE-LIF

Akira KOIZUMI, Tomoyuki MORITA, Yuji MURAKAMI*, Eiichi TAMIYA
The School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology,
Hokuriku

Coffee Break

Invited Session (15:00-16:30)

S01 Postelectrophoresis Capillary Scanning: A High-Throughput, Versatile DNA Analysis Method

Jong Hoon HAHN
Pohang University of Science and Technology, South Korea

S02 Analysis of Phenolic Compounds by Solid-Phase Microextraction Coupled with Capillary Electrophoresis

Chen-Wen WHANG
Tunghai University, Taiwan

S03 A Novel Method for the Study of Affinity Capillary Electrophoresis

Guo-Quan LIU
Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, China

December 10, Thursday

Session I (9:00-10:15)

L01 Numeric Simulation of Capillary Electrophoresis (IV)

Natsuki IKUTA *, Takeshi HIROKAWA
Faculty of Engineering, Hiroshima University

L02 Constituent Effect on the Migration Time in CZE(II)

Takeshi HIROKAWA*, Natsuki IKUTA
Faculty of Engineering, Hiroshima University

L03 Improvement of Concentration Detection Sensitivity for Capillary Electrophoresis with On-Line Electrophoretic Concentration Method

Takanori KASASHIMA, Xing-Zheng WU*
Faculty of Engineering, Fukui University

L04 Free Flow Electrophoresis Module Fabricated by Use of Micro Fabrication Technology
Nobuyoshi TAJIMA*, Hirobumi SUZUKI, Etsuo SHINOHARA, Kyoichi KANO
Biomedical Research Center, Olympus Optical Co. Ltd.

L05 Microchip CE - Studies on Effects of Electrolysis at Small Reservoir
Hirohisa ABE*, Tadahiro NISHIMOTO, Masaki KANAI, Hiroaki NAKANISHI
Technology Research Laboratory, Shimadzu Co.

Coffee Break

Session II (10:30-11:45)

L06 Preparation of Columns for Capillary Electrochromatography by In-Column Chemical Treatments

Shigeo SUZUKI, Yuri KUWAHARA, Kyoko MAKIURA, Susumu HONDA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

L07 Capillary Electrochromatography in Polymer Capillaries

Masahito SAKURAI*, Chuzo FUJIMOTO
Hamamatsu University School of Medicine

L08 Application of Continuous Porous Silica Columns to CEC and HPLC

Hisashi NAGAYAMA*¹⁾, Hiroshi KOBAYASHI¹⁾, Hisao MORIMOTO¹⁾, Norio ISHIZUKA²⁾, Hiroyoshi MINAKUCHI²⁾, Kazuki NAKANISHI²⁾, Tohru IKEGAMI¹⁾, Ken HOSOYA¹⁾, Nobuo TANAKA¹⁾

1) Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

2) Graduate School of Engineering, Kyoto University

L09 Separation of Carbohydrate Derivatives by the Combined Modes of Complexation Zone Electrophoresis and Ion-Interaction Electrokinetic Chromatography

Kazutaka TOGASHI*, Atsushi TAGA, Kana UEGAKI, Susumu HONDA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

L10 The Development of Gene Separation System Using the DNA Immobilized Capillary

Yoshihisa OZAKI*, Yoshiki KATAYAMA, Toshihiro IHARA, Mizuo MAEDA
Graduate School of Engineering, Kyushu University

Lunch (11:45-13:15)

Session III (13:15-14:30)

L11 Development and Evaluation of a Capillary Isoelectric Focusing System with Fluorescence-Imaging Detection

Hiroyuki MATSUMOTO*¹⁾, Tsuyoshi MAKINO¹⁾, Takako TSUGATA¹⁾, Masayuki, ISHIDA¹⁾, Hisayoshi TAKAMOTO¹⁾, Kiyohito SHIMURA²⁾, Ken-ichi KASAI²⁾

1) Laboratory of Molecular Biophotonics

2) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

- L12 Capillary Isoelectric Focusing of *C.elegans* Proteins Obtained by Ammonium Sulfate Fractionation.
Hidesaburo KOBAYASHI*, Maki SEKINE, Masaki SEKINE
Faculty of Science, Josai University
- L13 Fluorescence Labeled Peptide pI Markers for Capillary Isoelectric Focusing-Labeling of a Cysteine Residue.
Kiyohito SHIMURA*¹⁾, Zhi WANG¹⁾, Hiroyuki MATSUMOTO²⁾, Ken-ichi KASAI¹⁾
1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University
2) Laboratory of Molecular BioPhotonics
- L14 Two-Dimensional Separation of Human Plasma Proteins by Agarose Gel Isoelectric Focusing Followed by Capillary SDS Electrophoresis
Jun MUKAI*, Hitomi MIZUMA, Nao YAMAGUCHI, Nobuhiro NAOHARA, Takashi MANABE
Faculty of Science, Ehime University
- L15 Analysis of the Heterogeneity of Carbohydrate Chains in Sialic-Acid Containing Glycoproteins Using Capillary Electrophoresis
Kazuaki KAKEHI*, Tadashi FUNAKUBO, Mitsuhiro KINOSHITA, Yasuo ODA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Coffee Break

Session IV (14:45-16:00)

- L16 Evaluation of a New Reversible Fluorescence Labeling Reagent, Dansylaminomethylmaleic Acid (DAM), by HPCE-CZE
Kayo SAKATA*, Kenji HAMASE, Kiyoshi ZAITSU
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University
- L17 Separation of NDA-Labeled D- and L-Amino Acids by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Vancomycin as Chiral Selector
Masaoki IMAZAWA*, Yuriko HATANAKA
National Institute of Neuroscience, NCNP
- L18 Application of MEKC to Polymer Analysis
Hiroto OZAKI
Kaneka Techno Research Co. Ltd.
- L19 Polyacrylamide Gel Electrophoresis a Tool for Metal Stress Induced Enzymatic Changes in Rice (*Oryza sativa* L.)
Kavita SHAH
Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences

L20 Chiral Separations by Cyclodextrin Modified Capillary Zone Electrophoresis: Estimation of Binding Constants

Junya KATO*¹⁾, Koji OTSUKA¹⁾, Shigeru TERABE¹⁾, Kazuhiro KIMATA²⁾, Nobuo TANAKA²⁾, Minoru TANAKA³⁾

1) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

2) Department of Polymer Science, Kyoto Institute of Technology

3) Reserch Center for Enviromental Preservation, Osaka University

Coffee Break

Session V (16:15-17:30)

L21 CE Analysis of a Damaged Nucleotide Related to Alcohol Abuse

Yukihiro ESAKA*¹⁾, Shinsuke INAGAKI¹⁾, Masashi GOTO¹⁾, Yoshihiro DEYASHIKI¹⁾, Magoichi SAKO¹⁾, Kenji KANO²⁾

1) Gifu Pharmaceutical University

2) Graduate School of Agriculture, Kyoto University

L22 Polymorphism Analysis of Disease-Causing Genes by Capillary Electrophoresis

Naoko YASHIRO*, Yoshinobu BABA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima

L23 Analysis of Plasmid DNA by Capillary Electrophoresis

Seiko MATSUDA*, Yoshinobu BABA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima

L24 Determination of Aminopyrazine Derivative of Monosaccharides by High-Performance Capillary Electrophoresis

Koji YAMAMOTO*, Kenji HAMASE, Kiyoshi ZAITSU

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

L25 Observations on the Carbohydrate-Protein Interaction in Complex Systems

Atsushi TAGA*, Yoko HIGUCHI, Susumu HONDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Coffee Break

Invited Session (17:45-18:45)

S04 High-speed Capillary Electrochromatography

Yukui ZHANG

Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, China

S05 New Injection Technique for Capillary Electrophoresis

Sam Fong Yau LI

The National University of Singapore, Singapore

December 11, Friday

Session VI (9:00-10:30)

L26 Characterization of Heparin Preparations by CE Analysis of Their Enzymatic Degradation Products

Susumu HONDA*¹⁾, Shin-ichi YASUEDA¹⁾, Naoko MATSUURA¹⁾, Atsushi TAGA¹⁾, Shigeo SUZUKI¹⁾, Saori NISHIURA²⁾, Sadanobu TACHIBANA²⁾

1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

2) Hospital Pharmacy, Kinki University

L27 Analysis of Glycoprotein Glycoforms by Capillary Electrophoresis

Kana UEGAKI*, Atsushi TAGA, Susumu Honda

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

L28 Capillary Zone Electrophoresis of Metallothioneins Using a Polyacrylamide-Coated Capillary: Identification of New Isoforms Induced in Zn-Administered Mouse Liver

Kanenobu KUBO*¹⁾, Takeshi MINAMI²⁾, Noriko OTAKI³⁾, Masami KIMURA⁴⁾

1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

2) Department of Anatomy, Nara Medical University

3) Department of Occupational Disease, National Institute of Industrial Health

4) Department of Molecular Biology, Keio University, School of Medicine

L29 Change in Drug Binding Affinity of Plasma Lipoprotein Caused by Oxidation

Yukihito KURODA*, Cao BO, Akimasa SHIBUKAWA, Terumichi NAKAGAWA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

L30 Electrophoresis of Human Red Blood Cells

Youhei YAMAMOTO, Norihiro YAMAUCHI, Shinya KITAGAWA, Takao TSUDA*

Nagoya Institute of Technology

L31 Electrokinetic Chromatography/Mass Spectrometry (EKC/MS): Fundamental Studies and Applications in Drug Analysis

Yoshihide TANAKA*¹⁾, Yasuhiro KISHIMOTO¹⁾, Koji OHTSUKA²⁾, Shigeru TERABE²⁾

1) Department of Analytical Chemistry, Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd.

2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

Coffee Break

Session VII (10:45-12:15)

L32 The Cooking Effects for Radiating Far-Infrared Ray on Rice (The Study on CZE for Analysis of Vitamin B1 in Rice)

Toshie TSUDA and Megumi ITOU*

- L33 Measurement of Electrophoretic Velocity of Particles Using CE
Keiko YAMABERI*, Yoshihisa MURAI, Yushi HIRATA
Department of Chemical Science and Engineering, Osaka University
- L34 High Sensitive Analysis of Environmental-Interest Analytes by Micellar Electrokinetic Chromatography Using On-Line Concentration
Hirofumi HAYASHIBARA*¹⁾, Sumio YAMAUCHI¹⁾, Koji OTSUKA²⁾, Joselito P. QUIRINO²⁾, Shigeru TERABE²⁾
1) Takasago Research & Development Center, Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.
2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology
- L35 Seawater Analysis by Capillary Electrophoresis: Separation of Anions Using Ion-Association and Ion-Inclusion Interactions in Carrier Electrolyte
Andrei R. TIMERBAEV*^{1),2)}, Toshio TAKAYANAGI²⁾, and Shoji MOTOMIZU²⁾
1) Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry,
2) Department of Chemistry, Okayama University
- L36 Analysis of Plating Bath Solution by Capillary Electrophoresis
Yasuhiro SATO*, Katsushi SASA, , Toshihiko MARUYAMA,
Otsuka Electronics Co.,Ltd.
- L37 Analysis of Arcenate, Arcenite, Cyanate by Capillary Electrophoresis
Toshihiko MARUYAMA*, Yasuhiro SATO, Katsushi SASA
Otsuka Electronics Co.,Ltd.
- Closing Address (12:15-12:30)

Proceedings of the 18th Symposium on Capillary Electrophoresis

第 18 回キャピラリー電気泳動シンポジウム

講 演 要 旨 集

主催：日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

**共催：日本化学会、日本生化学会、日本薬学会、日
本電気泳動学会、クロマトグラフィー科学会**

外的要因を考慮した泳動時間—実効移動度
変換法による絶対移動度、pKa の評価

前田 裕之*、育田 夏樹、廣川 健
広島大学工学部

**Estimation of absolute mobility and pKa in transformation of
migration time into effective mobility considering external factors**

Hiroyuki Maeda*, Natsuki Ikuta and Takeshi Hirokawa

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

In CZE, since ions are separated according to differences of their effective mobility, it is possible to evaluate their absolute mobility and pKa easily. Frequently, effective mobility may be estimated larger than we expected because of Joule's heat. We have developed a conversion method of migration time into effective mobility taking into account Joule's heat. In this report, this method was applied to evaluating absolute mobility and pKa of organic acids. The values of absolute mobility and pKa were approximately equal to the previously reported values.

1. はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)では実効移動度の差を用いてイオン性物質の分離が行われるため、物質の分離・分析だけではなく、多成分の移動度・pKaなどの物理化学定数を同時に求めることが可能である。また、CZEは自動化が容易なため、物質の絶対移動度・pKa迅速自動決定システムの構築が期待できる。

しかしながら、迅速に移動度を求めるために高電圧を印加すると、ジュール熱の発生によりキャピラリー内の温度が上昇し、移動度が大きく見積もられる。そこで、我々はキャピラリー内温度の上昇や電位勾配の時間変化など外的要因を考慮した泳動時間—実効移動度変換法の開発を行ってきた。この変換法を用いることで実効移動度の温度依存性をほぼ無視する事ができるようになった。

本研究では、アニオン試料の絶対移動度・pKaの決定に、我々が開発した泳動時間—実効移動度変換法を応用し、その結果と過去に報告された値とを比較した。また、この手法を移動度・pKaが未知な物質への応用についても検討を行った。

2. 実験

CZE装置には大塚電子社製 CAPI-3100 を用いた。キャピラリーは内径 $75\mu\text{m}$ のヒューズドシリカキャピラリーを用い全長 50cm (有効長 37.7cm)、測定電圧 20kV (定電圧)、

設定温度 25℃で行った。使用した電解液系を Table.1 に示す。全ての電解液には逆浸透剤として n-Hexadecyltrimethylammonium Hydroxide を添加した。試料として Formic acid , Acetic acid , Butyric acid , Caproic acid , Cl⁻ , BrO₃⁻ の各 0.5mM 等モル混合溶液を落差法(2cm,30s)で注入した。

Table 1 Used supporting electrolyte systems.

pH = 7.2, 6.9, 6.5	Benzoic acid	10mM	(Buffer : Imidazole)
pH = 5.9, 5.4, 5.0	NaOH	10mM	(Buffer : Phthalic acid)
pH = 4.7, 4.4, 4.0	NaOH	10mM	(Buffer : Benzoic acid)
pH = 3.4, 2.9	NaOH	10mM	(Buffer : Phthalic acid)

3. 結果・考察

約 130 分で pH=2.9~7.2 の全ての電解液で分析を行うことが出来た。標準物質として pH により移動度が変化しない Cl⁻ , BrO₃⁻ を選択した。得られた横軸が泳動時間のフェログラムから、我々が開発した変換法により横軸を実効移動度に変換したフェログラムを Fig.1 に示す。この図から明らかのように、pH7.2~5.4 の Formic acid と BrO₃⁻ を除き、移動度の決定に十分な程度に分離されていた。得られたフェログラムのピークの後端を物質の実効移動度とした。

Fig.2 に酢酸の実効移動度の pH 依存性を示す。黒丸で示した今回 CZE の結果から評価した実効移動度と、報告された絶対移動度・pKa から予測される実効移動度はよく一致している。したがって、この手法により見積もられた、実効移動度を用いて絶対移動度・pKa を評価しても、正しい値が得られると考えられる。そこで、得られた実効移動度から、非線形の最小二乗法を使って評価した有機酸 4 種の絶対移動度・pKa を Table 2 に示す。その結果、報告されている値とほぼ同じであった。このことから明らかのように、CZE を用いて迅速に絶対移動度・pKa を求めることは可能である。講演では、この手法を他の物質に応用した例についても議論する。

Table.2 Absolute mobility and pKa evaluated in CZE. Values in brackets are previously reported in the other methods.

Sample	Absolute mobility	pKa
Formic acid	57.4 (56.6)	3.79 (3.75)
Acetic acid	43.1 (42.4)	4.73 (4.76)
Butyric acid	34.7 (33.8)	4.85 (4.82)
Caproic acid	30.1 (30.2)	4.94 (4.86)

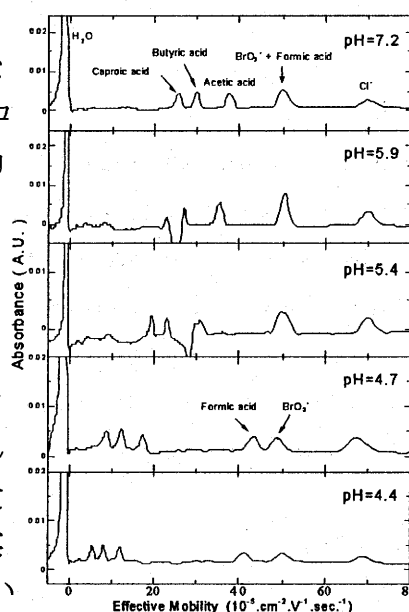


Fig.1 Electropherograms with effective mobility axis.

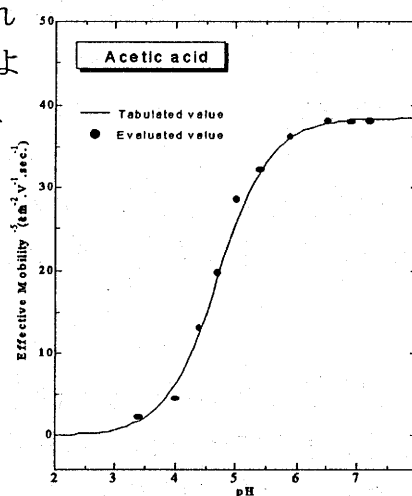


Fig.2 pH dependence of effective mobility of acetic acid.

キャピラリー電気泳動装置の小型化と泳動界面の対流観察

1) 引地 龍吾*、 1) 育田 夏樹、 1) 廣川 健
1) 広島大学工学部

Miniaturization of Capillary electrophoresis unit and direct observation of convection at moving boundary

1) Ryugo Hikichi* 1) Natsuki Ikuta; 1) Takeshi Hirokawa
1) Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

Recently a microchipped CE device attracts a great deal of attention. However, since the separability of such a device is limited due to its small column hold-up, both detection methods and suitable samples are limited seriously. In order to solve these problems, we miniaturized a traditional device. It was made of acrylic resin and equipped with 40mm length of a capillary. Since we can see inside of the capillary, separation process can be observed. In our poster, construction of miniaturized capillary electrophoresis devices and direct observation of convection at moving boundary will be reported.

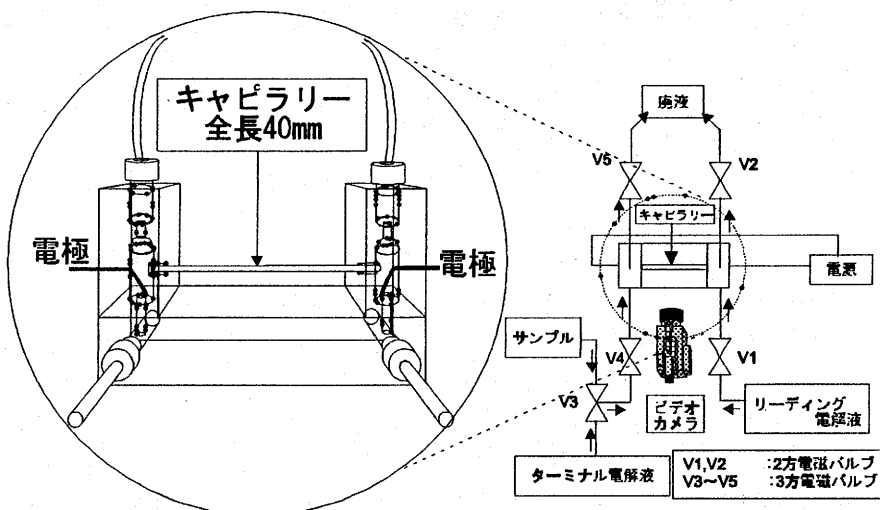
1.はじめに

最近マイクロチップ化されたCE装置が注目を集めている。しかしながら、実用的な分離装置とするためには、あまり小型化しても分離能・検出限界・適用可能な試料等の点で問題がある。この点を考慮し、本研究ではチップではなく従来型の装置を小型化する方針でこれらの問題を解決できないかを検討するため、キャピラリー長を40mm程度に短縮したアクリル樹脂製小型装置を製作した。また、この装置はキャピラリーが剥き出しになっているので分離中の様子を観察することもできる。この点を利用して、分離能を低下させる要因の一つである対流が泳動界面に与える影響を無重量落下実験施設(MGLAB)で調べることも視野に入れて装置を製作した。今回は、本装置の概要と本装置を使用して地上重力下での泳動界面の対流観察について報告する。

2.実験

今回製作した装置の概略図を図1に示す。アクリル板上に同じくアクリル製の電解液槽を作り、有効長40mmのキャピラリー(内径0.53mm, 1.00mm, 1.80mm)を取り付けた。電解液槽には白金電極を取り付けた。電解液とサンプルの送液にはポンプを用い、また流

路の切り替えには電磁バルブを使用した。泳動界面の観察にはビデオカメラ (SONY DCR-VX1000) を用いた。電気泳動モードとしては電気泳動時の試料界面が明瞭な等速電気泳動法を選択した。リーディング電解液として 5mM 塩酸 pH 4.8 (クレアチン)、ターミナル電解液として 10mM MES pH 6.0 (ヒス



ジンを)を用いた。共に電気浸透流抑制のため 0.1% トロキシポピルセルロースを加えてある。サンプルとして SPADNS、モノクロ酢酸、ピクリン酸の混合溶液(以下、SMP三成分系)を使用した。またサンプルをキャピラリー内へ導入する方法として電氣的導入法(500V, 10s)を採用した。

3. 結果と考察

今回製作した内径0.53mmと1.80mmの装置で供給可能な電気量はそれぞれ最大で 7.20mC、76.4mCであった。そして内径0.53mmの装置の場合、SPADNSとピクリン酸の定量可能な範囲はそれぞれ0.14~1.13nmol、0.24~0.80nmolであった。ここで、等速電気泳動法における分離能は電気量に比例するため、内径1.80mmの装置では0.53mmの装置の約10倍の分離能が得られるはずである。しかし、図2と図3にSMP三成分系の泳動状況(右側からリーディング電解液、SPADNS、モノクロ酢酸、ピクリン酸、ターミナル電解液のゾーンの順で、右側へ泳動:1秒間隔)を示しているが、図2は内径が大きいいため左端のターミナル電解液のゾーンとピクリン酸のゾーンとの界面が図3に比べ対流の影響でゾーンが乱れているのが分かる。この対流の影響により分離能が低下すると考えられる。

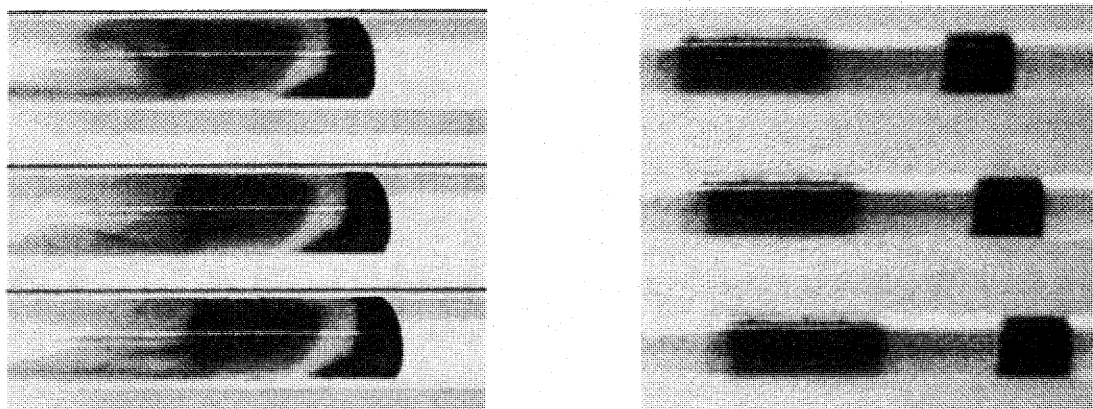


図3 内径 0.53mm

電荷量を横軸とする CZE のエレクトロフェログラム

- 1) 黒須泰行*、佐藤泰世、小勝負純、2) 岩田哲郎
 1) 日本分光技研
 2) 徳島大・工

Electropherograms in capillary zone electrophoresis plotted as a function of the quantity of electric charge

- 1) Yasuyuki Kurosu*, Yasuyo Satou, Jun Koshoubu, 2) Tetsuo Iwata
 1) JASCO Technical Research Laboratories Corporation, 2097-2, Ishikawa-cho, Hachioji-shi, Tokyo 192-0032, Japan;
 2) Dept. of Mechanical Eng., Fac. of Eng., Univ. of Tokushima, Minami-Jyosanjima-cho-2, Tokushima 770-8506, Japan

ABSTRACT

We have plotted electropherograms in capillary zone electrophoresis (CZE) as a function of the quantity of electric charge (Q) in order to eliminate the dependency of the analyte peak areas, as well as that of the migration times, upon both the capillary temperature and the applied voltage. The procedure is based on an idea of a migration index (MI) and an adjusted migration index (AMI) which were originally proposed by Lee and Yeung. The value of Q is measured accurately and calculated easily because it is given by a product of the electrophoretic current and the migration times, where the index MI is derived by dividing the value of Q by the effective volume of the capillary. By calculating the CZE peak area from the newly plotted electropherogram, improvement in precision in quantitative analysis is expected. Concerning AMI, careful treatments should be required in applying to analyte peaks whose migration time is close to that of the neutral marker.

1.はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)のエレクトロフェログラムの横軸は通常時間で目盛られる。その場合、移動時間の再現性の悪さが結果として定性定量分析の精度の低下をもたらし、CZEの問題点の1つとなっていた。これに対して、LeeとYeungは移動時間を migration index (MI) に変換し、最終的には adjusted migration index (AMI) で表現することを提案した¹⁾。MIを使用すれば、印加電圧、キャピラリーの長さ、内径、電解液の粘性係数とその温度依存性の影響がキャンセルされる。さらに中性マーカーを導入してAMIを使用すれば、キャピラリー管壁と電解液間のゼータ電位の依存性がキャンセルされる。

ここでMIは、キャピラリーの長さ、内径、電解液の種類を固定すれば、分析(移動)時間中に流れた電荷量(Q)をキャピラリーの実効容積(Vol)で割算したものに等しい($MI=Q/Vol$)。つまりQはMIと同様に扱える。そこで我々は、定性分析の再現性の向上のため、取得したエレクトロフェログラムの横軸全体をQでプロットした。さらに定量精度の向上のため、各分離ピークの面積を算出して定量を行った²⁾。

2. MI と AMI

MI と AMI の式は以下の通りである¹⁾。

$$MI \equiv \int_0^{t_m} \frac{i}{L_{\text{eff}}} dt = \frac{Q_m}{Vol}$$

$$= \frac{k\eta}{\varepsilon \left[\zeta_c + \frac{2}{3} \zeta_a f(\kappa a) \right]}$$

$\kappa \eta$ 積は温度の影響を受けず一定(Walden rule)であるとされるので、MI は η の温度依存性の影響を取り除くことができる。また、キャピラリーの長さ及び内径を一定にすれば (Vol 一定)、MI は簡単に Q_m/Vol で得られる。我々は分析時の電流 i を常時モニターし、 $Q_m = i t_m$ の関係式から Q_m を算出した。

where t_m is the analyte migration time, i current density [ampere·cm⁻²], L_{eff} the effective length of capillary, Q_m the value of Q_m required during the migration time t_m , Vol [cm³] the effective volume of the capillary, κ specific conductance [$\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], η the viscosity coefficient, ε the dielectric constant of the medium, ζ_c the ζ potential of the inner wall the capillary, ζ_a that of the analyte, κ the reciprocal of the analyte double layer thickness, a the radius of the analyte, and $f(\kappa a)$ is a function depending upon the shape and κa of the analyte in the buffer.

$$AMI \equiv \frac{MI_{\infty} MI}{MI_{\infty} - MI}$$

AMI は $\zeta_a f(\kappa a)$ のみに依存した値、すなわち試料の性質のみによって決定される。我々は AMI と同様なものとして、 $AMIC(AMI \text{ with the quantity of electric charge, } AMIC=AMI \times Vol)$ を使用して、AMI の有用性を検討した。

$$= \frac{3k\eta}{2\varepsilon \zeta_a f(\kappa a)}$$

where MI_{∞} is a value of MI for a neutral marker.

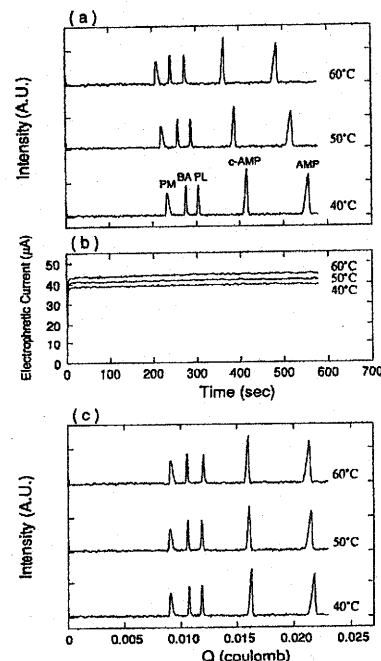
3. 結果と考察

印加電圧と温度を変えて、横軸を電荷量で目盛ったエレクトロフェログラムと、時間で目盛ったものを比較した。その結果、両者とも電荷量で目盛ったエレクトロフェログラムの方が良好な定性定量結果を示した。従って電荷量を横軸とするエレクトロフェログラムは、再現性を向上させる一手段として極めて有望であると考えられる。また AMIC(AMI) に関しては、中性マーカー付近のピークについては、良好な再現性を得ることができず、注意が必要であることが判明した。結果の一部を図 1 に示す。

Fig.1 (a) Electropherograms plotted as a function of the time for various capillary column temperatures.

(b) Electrophoretic currents plotted as a function of the time which were simultaneously monitored.

(c) Electropherograms plotted as a function of the quantity of electric charge (Q).



4. 文献 1) T.T. Lee and E.S. Yeung, Anal. Chem. 63 (1991) 2842.

2) T. Iwata, J. Koshoubu, and Y. Kurosu, J. Chromatogr. A, 810 (1998) 183.

キャピラリー電気泳動-電子衝撃イオン化-

質量分析装置 (CE-EI-MS) の開発(Ⅱ)

1)堀田 洋二郎* 1)育田 夏樹 1)廣川 健
1)広島大学工学部

Development of capillary electrophoresis – electron impact – mass spectrometry(Ⅱ)

1) Youjiro Hotta*, 1) Natsuki Ikuta, 1) Takeshi Hirokawa
1) Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

Capillary electrophoresis – mass spectrometry(CE-MS) is a useful method combining CE with high separation efficiency and MS with molecular mass evaluation. However, enough fragmentation cannot be expected by the usual CE-MS systems which utilizes the electrospray interface for LC-MS. So we developed a CE-MS system using an electron impact ionization(EI) interface. In this system, the analytes are separated by CE, introduced to EI-MS as a spray, and then detected by MS. Construction of CE-EI-MS system will be reported in detail.

はじめに

近年、キャピラリー電気泳動法(CE)と質量分析法(MS)とを接続した CE-MS が注目を集めている。この方法は CE の持つ高分離能と、MS の分子量による同定が可能であるというそれぞれの特徴を合わせ持っている。しかし従来の CE-MS では、イオン化方法として、LC-MS で使用されている電子スプレーイオン化法(ESI)を応用したものがほとんどであった。しかし ESI はソフトなイオン化法であり、試料によっては十分なフラグメンテーションを行うことは困難であった。そこで、我々は電子衝撃イオン化(EI)法を CE-MS におけるイオン化法として選択し、CE-EI-MS のインターフェイスを開発した。これによりイオン化が困難である物質に関しても分析が行うことが可能となる。

実験

キャピラリー電気泳動部での検出には UV 検出器 (Spectro Detector MODEL 502UA, ジーエルサイエンス) を使用した。MS 部は GC-MS (QP-1000 EI/CI, 島津製作所) から製作し、EI 部は既に MS に組み込まれている。CE 部と EI 部とのインターフェイスとしては ESI を参考に製作し、電気泳動分離した試料を電圧、Sheath liquid、He gas を用いてスプレー化し、MS に導入した。Sheath liquid としてはメタノールに 3%酢酸を加えたものを、リーディング電解液は 20mM アンモニア (pH 4.8 buffer 酢酸)、ターミナル電解液としては 20mM 塩酸カルニチンを使用した。また、試料としてはアニリンを使用した。

結果と考察

製作した装置の概略図を Fig.1 に示す。本装置では、まずリーディング電解液をキャピラリーに充填し、試料を電氣的注入法で注入した後、最後にターミナル電解液を導入し、泳動を開始する。泳動分離された試料はまず UV 検出器によって検出される。さらに試料は泳動を続け、ESI の先端部でスプレーとして吐き出され、またその場に印加している ESI 電圧によって引き出し電極に引き寄せられる。試料は引き出し電極の中心に取り付けたキャピラリーから EI-MS に導入される。本装置において安定に試料をスプレー化すること、またそのスプレーを効率良く MS に導入することが感度に関与する。そのため少量の Sheath liquid (2 μ l/min) で、ESI チップから噴射する He ガス (50~100ml/min) によって試料を連続的に吐き出し、かつそれが指向性を持たず浮遊した状態であることが望ましい。そのような状態の試料を ESI 電圧によって引き出し電極付近に引き寄せ、MS 側に取り付けたキャピラリーより EI-MS に吸い込まれる。測定時のスプレーの様子は CCD カメラ (DCR-VX1000, SONY) により常に観察が行えるようになっている。またスプレー発生部は He gas 雰囲気であり、MS の真空度はこの大量に吸い込まれる He gas を MS に付属のセパレーターで排出することによって保たれている。

Fig. 2 はアニリンを試料として測定した MS フェログラムと MS スペクトルである。アニリンのフラグメンテーションが起こっていることがわかる。本公演では制作した装置により得られた結果について議論する。

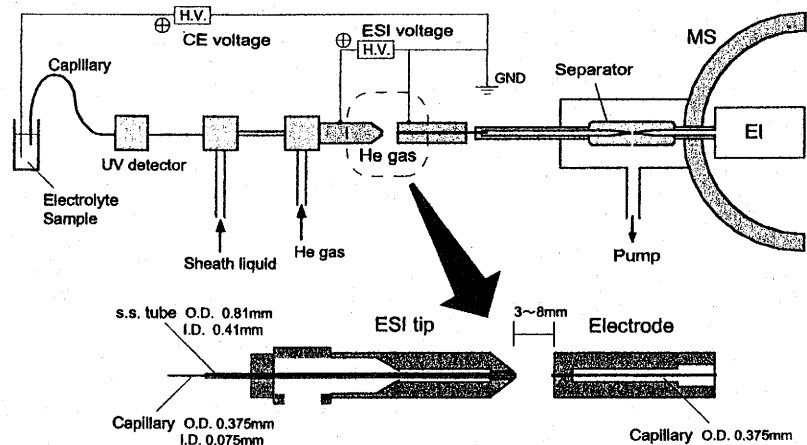


Fig.1 装置概略図

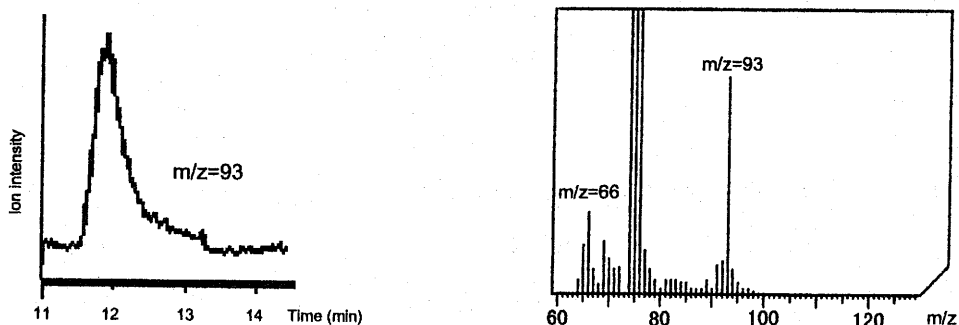


Fig.2 CE-EI-MSにおけるアニリンのMSフェログラムとMSスペクトル

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(4)

- 1) 梶原弘史*、1) 育田夏樹、1) 廣川健
1) 広島大学工学部

Development of on-line capillary electrophoresis-atomic emission spectrometry(CE-AES)(4)

- 1) Hirofumi Masuhara*, 1) Natsuki Ikuta, 1) Takeshi Hirokawa
1) Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

We have developed the on-line capillary electrophoresis-atomic emission spectrometry (CE-AES) system for elemental analysis. In this work, CE-AES system using a multichannel detector for AES was constructed and simultaneous analysis of Na and Li was demonstrated for the application of this system. We will report analytical result of twenty kinds of metal ions (MM20) and construction of CE-AES system.

1.はじめに

キャピラリー電気泳動法(CE)は分離能や絶対感度に優れた分析法であるが、汎用検出器を用いた場合、定性能力が必ずしも高いとはいえない。そこで、試料に応じた専用検出器が必要になる。有機物の分析の場合、近年 CE-MS が開発され、注目されている。我々は、CE の新たな検出法として、元素の高感度分析に有用である原子発光分光分析法(AES)をオンラインで導入した CE-AES の開発をおこなってきた。AES においては、従来は単一波長型検出器を使用していたが、新たに多波長同時検出器を使用することで、Na⁺や Li⁺などの金属イオン成分の多元素同時分析を可能にすることができた。今回は試料として、20 種金属イオン(MM20)を使用し、金属イオン極微量成分の多元素同時分析を試みた。本講演では、その実験結果及び(CE-AES)装置の概要について報告する。

2.実験

CE モードとして、濃度調整効果を有する等速電気泳動法(ITP)を使用し、その挙動の確認には、高周波非接触電導度検出器(HFCCD)を用いた。また AES 法の検出器として、多波長同時型検出器(Ocean Optics 製 Model S2000)を使用した。AES の検出は光ファイバーを通して原子発光を取り込む方式をとっている。試料として、20 種金属イオン(イオン種: **Li,Na,Mg,Ca,Mn,Fe,Co,Ni,Cu,Zn,Sr,Y,Zr,Cd,Ba,La,Ce,Gd,Lu,Pb**)を使用し、その中のアルカリ金属イオン成分の検出をおこなった。使用した電解液系を Table.1 に示す。

Table.1 Electrolyte system for CE-AES

Leading electrolyte	: 20mM ammonia solution , pH4.80(buffer:aceticacid) , 0.1%*HPC
Terminating electrolyte	: 20mM Carnitine hydrochloride , 0.1%HPC

*HPC:Hydroxypropylcellulose

3.結果と考察

本装置(Fig.1)では、CE ステージで、注入された試料は分離しながら、リーディングに向かって泳動し、CE-AES インターフェイスであるバーナーの先端部に到達する。続いて試料ゾーンは霧状化され AES ステージに導入されるが、その際に霧化の直前まで電気泳動状態が保たれるようにバーナー先端に電解液送液用シリンジポンプからリーディング液を連続供給するようなシステムになっている。次に AES ステージにおいて、試料ゾーンは化学フレイムによって励起され多波長同時型検出器でその発光が検出される。尚、検出部への外光の侵入を防ぐために遮光用煙突を取り付けている。また煙突から検出部へフレイムの熱が伝わらないように、この部分は非接触になるようにした。

Fig.2 はオンライン CE-AES 装置で得られた 20 種金属イオン(MM20)5nmol のエレクトロフェログラムを示している。(1)ITP 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、(2)AES は多波長同時型検出器で検出された原子発光によるフェログラムである。等速電気泳動法において、MM20 のような複雑な試料では、今まで極微量検出の際に元素、特にアルカリ金属などの軽元素の同定が難しいという問題があったが、原子発光分析法によって、MM20 に含まれている成分

の中で、波長 589nm で Na、670nm で Li を選択的に検出することができた。また現在よりさらに多くの元素の検出を行うために、酸素フレイムなどの導入を含めた、化学フレイムの温度の最適化を検討している。本講演では、CE-AES システムの詳細と実験結果について報告する。

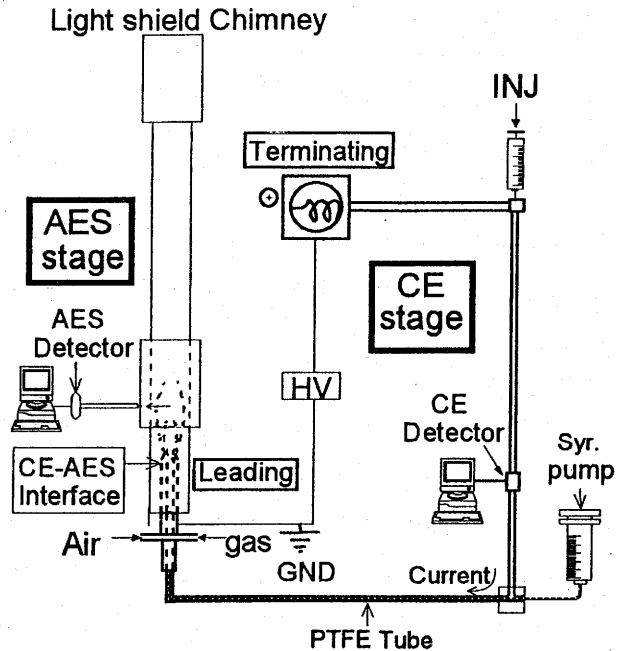


Fig.1 Online CE-AES system

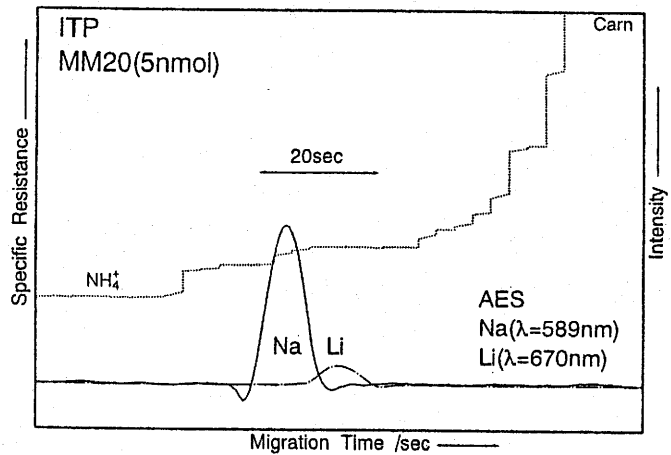


Fig.2 MM20 electropherogram

水溶液内における一価芳香族陽イオン—一価芳香族陰イオン間のイオン会合反応の解析

伴律明, 高柳俊夫, 本水昌二
岡山大学理学部

Analysis of Ion Association Reaction between Monovalent Aromatic Cations and Anions in an aqueous solution by Capillary Zone Electrophoresis

Noriaki Ban, Tosio Takayanagi, Shoji Motomizu
Faculty of Analytical Science, Okayama University

ABSTRACT

Ion association reaction between monovalent aromatic anions and aromatic cations in an aqueous solution was studied by means of the electrophoretic mobility measurement. Ion association constants were obtained by using a non-linear least-squares method. The ion association constants obtained in this work increased with increasing the number of aromatic groups both in cationic and anionic reagents. Contribution of the aromatic group to ion associability was discussed.

1.はじめに

イオン会合反応は静電理論に基づいてその基礎と概念が形成されている。イオン会合の基本は静電相互作用であるが、イオン会合性に寄与する因子は静電相互作用の他にも、さまざまな寄与が考えられる。今回、そのひとつとして考えられる π 電子間相互作用の寄与を明らかにするために、多環芳香族カルボン酸イオンとピリジニウム系、キノリニウム系イオン会合試薬との水溶液内におけるイオン会合反応をモデルとしてキャピラリー電気泳動法により調べた。キャピラリー電気泳動法の移動度変化から芳香環の数がイオン会合性に及ぼす効果について考察した。

2.実験

キャピラリー電気泳動装置として Applied Biosystems 270A-HT を用い、これに内径 $50\mu\text{m}$ 、全長 72cm 、有効長 50cm の熔融シリカキャピラリーを装着して用いた。イオン会合試薬としては、1-エチルピリジニウムブロミド (1-EP)、1-プロピルピリジニウムブロミド (1-PP)、1-プロピルキノリニウムブロミド (1-PQ)、2-プロピルイソキノリニウムブロミド (2-PIQ)、1-プロピルベンゾ[f]キノリニウムブロミド (1-PBFQ) の 5 種類を用いた。またサンプルイオンとしては、安息香酸イオン (BC)、1-ナフタレンカルボン酸イオン (1-NC)、2-ナフタレンカルボン酸イオン (2-NC)、1-アントラセンカルボン酸イオン

(1-AC), 2-アントラセンカルボン酸イオン (2-AC), 9-アントラセンカルボン酸イオン (9-AC), 1-ピレンカルボン酸イオン (1-PC)の7種類を用いた. 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にピリジニウム系, キノリニウム系の陽イオン性イオン会合試薬を添加したものを泳動液として用いた. 芳香族カルボン酸イオンとの水溶液内におけるイオン会合反応を, キャピラリー電気泳動法の移動度変化から解析した. 芳香族カルボン酸イオンをそれぞれ $1 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度に調製し, エタノールを5パーセント含むように調製した混合液をサンプルとした. 試料を3秒間減圧法により注入し, 温度 35°C , 印加電圧 20kV の条件で電気泳動を行い, $230 \sim 250 \text{nm}$ で陰イオンを検出した. 所定のイオン会合試薬の濃度範囲において, それぞれ3回ずつ測定した. 得られたエレクトロフェログラムからエタノールのピークと各サンプルのピークの泳動時間を求め, 見かけの移動度を算出し, 非線形最小二乗法を用いる解析によりイオン会合定数 (K_{ass}) を求めた.

3. 結果および考察

Fig.1 にイオン会合試薬の添加による分離性能の向上を示す. イオン会合により, 分離性能は大幅に向上することが分かる. 一連の実験結果から, 芳香族カルボン酸イオンの形状や大きさと, ピリジニウム系, キノリニウム系イオン会合試薬とのイオン会合性をイオン会合定数の値から比較すると, 芳香環数の増加によってイオン会合が起こりやすくなることが分かった. これはイオン間に働く疎水性相互作用に加えて, π 電子間相互作用が強まるためと考えられる. 各サンプルイオンの移動度変化からみたイオン会合性の大きさの順序は, 分子の大きいものほどイオン会合しやすく $\text{PC} > \text{AC} > \text{NC} > \text{BC}$ の順となり, 芳香環数の多いものほど会合性が高い. また位置異性体についてのイオン会合性を比較したところ, $2\text{-AC} > 1\text{-AC} > 9\text{-AC}$, $2\text{-NC} > 1\text{-NC}$ となり, 陰イオン全体では $1\text{-PC} > 2\text{-AC} > 1\text{-AC} > 9\text{-AC} > 2\text{-NC} > 1\text{-NC} > \text{BC}$ という結果が得られた.

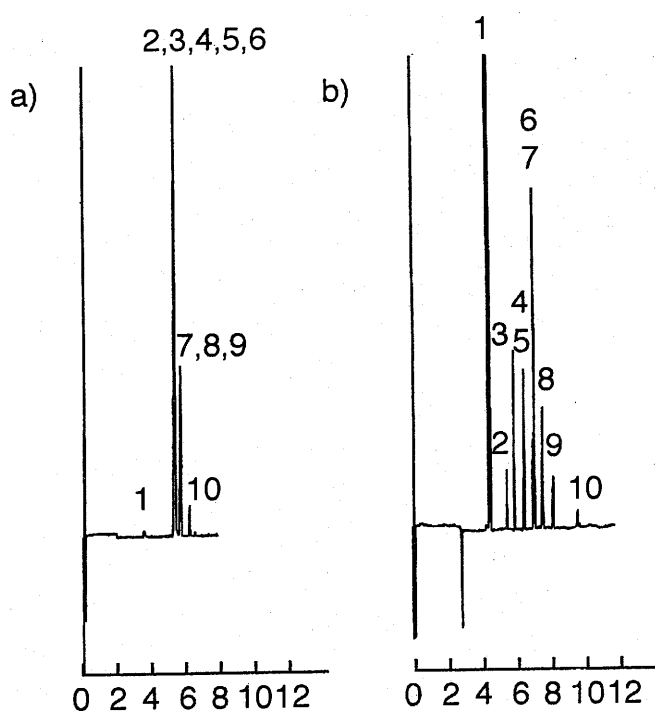


Fig.1 Typical electropherograms of anions with 2-PQ as a ion association reagent.

Samples: $1 \times 10^{-5} \text{M}$ anions.

1, EOF(ethanol); 2, 1-PC; 3, 5, 2-AC; 4, 6, 1-AC; 7, 9-AC; 8, 2-NC; 9, 1-NC; 10, BC.

a) Carroer: 10mM Phoshate buffer

b) Carroer: 10mM Phoshate buffer + 7mM 2-PQ

DNA-ポリアクリルアミドコンジュゲートを擬似固定相とした
アフィニティーキャピラリー電気泳動

尾崎 祥久, 有澤 卓己*, 片山 佳樹, 前田 瑞夫

九大院工

Affinity Capillary Electrophoresis using DNA-Polyacrylamide Conjugate as Pseudo-Immobilized Phase

Yoshihisa Ozaki, Takumi Arisawa*, Yoshiki Katayama, Mizuo Maeda

Graduate School of Engineering, Kyushu University

ABSTRACT

Novel affinity capillary electrophoresis for gene mutation assay was developed using (dT)₁₂-polyacrylamide conjugate as pseudo-immobilized phase. In the system, Mg²⁺ concentration was found to be a key factor to achieve good separation of sequential isomers of oligonucleotide having same chain length. Separation of two sequential isomers, (dA)₆(dT)(dA)₅ and (dA)₈(dT)(dA)₃, was improved with increasing Mg²⁺ concentration and finally two peaks for these isomers were separated completely in the presence of 1 mM of Mg²⁺. While, simple polyacrylamide gel capillary could not separate these isomers in any conditions investigated here.

1.はじめに

DNAやRNAの分離には、従来、ゲル電気泳動やHPLCが広く用いられてきたが、最近キャピラリーゲル電気泳動(CGE)が急速に発展し、従来よりも高い分離能を有することが報告されている。しかし、CGE法ではDNAを鎖長の違いにより分離するため、同一鎖長の配列異性DNA、点変異DNAなどは分離困難である。これらの分離には、試料を特異的に認識する相補鎖DNAをアフィニティーリガンドとしてキャピラリー内に担持した、アフィニティーキャピラリー電気泳動(ACE)が有望である。しかし、アフィニティーリガンドと被検試料の電荷密度が同程度であるため、電圧の印加により両者とも同一方向に移動してしまう。そこで本研究では、アフィニティーリガンドをキャピラリー内に固定化する手法を開発した。アフィニティーリガンドとしてデオキシチミジンヌクレオチドの12量体((dT)₁₂)をキャピラリー内に固定化するため、(dT)₁₂-ポリアクリルアミドコンジュゲート((dT)₁₂-polyAAM)を新規合成し、電気浸透流を抑制したキャピラリー内に注入した。(dT)₁₂-polyAAMは被検試料DNAに対して泳動速度が極端に遅いため、擬似固定相となる。本手法を用いて、オリゴヌクレオチドの分離を行い、その有用性を検討した。

2.実験

5'末端にアミノ基を有する(dT)₁₂をDNA自動合成装置により合成し、メタクリル酸の活

性エステルとのカップリング反応により5'末端にビニル基を導入した。(dT)₁₂-ビニル誘導体をアクリルアミドと共重合し、(dT)₁₂-polyAAmを合成した。

キャピラリーは溶融シリカキャピラリー(内径75 μ m、外径375 μ m、全長50cm、有効長38cm)の内壁をポリアクリルアミドでコーティングしたものを用いた。キャピラリー内全体にpolyAAm溶液を注入した後、コンジュゲート溶液をキャピラリーの中程まで注入した。一度電圧を印加して未反応のビニル化(dT)₁₂を除去した後、試料を注入して電気泳動を行った。比較実験としてコンジュゲート溶液の代わりにpolyAAm溶液を用いて同様の測定を行った。擬似固定相として用いた溶液は、コンジュゲート及びpolyAAmの重合反応溶液を2倍に希釈して、5mM Tris-Borate(pH 7.4)、所定濃度のMgCl₂を含むように調製した。泳動試料はそれぞれ50 μ M(base濃度)、5mM Tris-Borate(pH 7.4)を含むように調製した。

3. 結果と考察

鎖長の異なる4種のオリゴデオキシアデニンヌクレオチドの混合試料(dA)_{6,7,8,9}を電気泳動した結果、polyAAm溶液を使用した場合と比較して、コンジュゲート溶液を使用した場合、試料の検出時間は遅くなり、分離度も増大した。これはキャピラリー内に注入したコンジュゲート溶液の(dT)₁₂部位と試料とが相互作用したためであると考えられる。次に鎖長の等しい試料として、(dA)₁₂とその1塩基をチミンに置換した(dA)₆(dT)(dA)₅の混合試料に対して同手法を適用した。その結果、泳動溶液にMg²⁺イオンを添加していない場合には、polyAAm溶液、コンジュゲート溶液どちらを使用した場合も、単一ピークが検出され、混合試料を分離することができなかった。しかし泳動溶液にMg²⁺イオンを添加した場合には、2本のシングルピークが検出され、混合試料を完全に分離することができた。これは泳動溶液に添加したMg²⁺イオンによって、コンジュゲートの(dT)₁₂部位と試料との相互作用の強さに差が生じたためであると考えられる。さらに同手法により、配列異性オリゴヌクレオチドである(dA)₆(dT)(dA)₅と(dA)₈(dT)(dA)₃の混合試料について検討した結果、泳動溶液に添加するMg²⁺イオン濃度を調節することで、混合試料を分離することに成功した。本手法において、Mg²⁺イオンを分離場に添加し、試料とアフィニティーリガンドとの相互作用を制御することによって、適切な分離条件を設定することが可能となった。DNA-ポリアクリルアミドコンジュゲートを擬似固定相としたACE法は遺伝子診断等への応用が期待される。

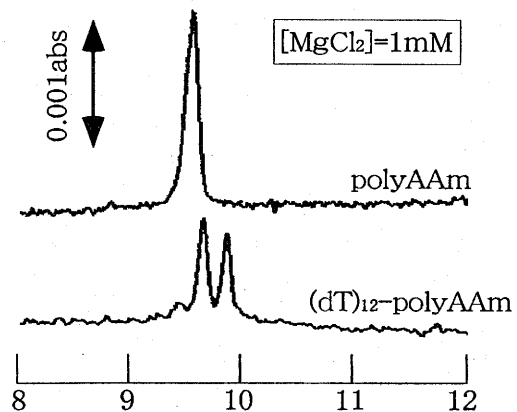


図.混合試料((dA)₆(dT)(dA)₅, (dA)₈(dT)(dA)₃)の電気泳動フェログラム

- ・泳動緩衝液; 5mM Tris-Borate(pH 7.4, 1mM MgCl₂を含む)
- ・印加電圧; -15kV
- ・温度; 25 $^{\circ}$ C
- ・検出; UV検出(260nm)
- ・試料注入法; 加圧法(0.3kgf/cm², 1s)

非イオン性錯形成剤を用いた金属イオンのフリーフロー電気泳動分離
藤沢 宏*、育田 夏樹、西山 文隆、廣川 健
広島大学工学部

Free flow electrophoresis separation of metal ions using nonionic complexing agents.

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

For Free Flow Electrophoresis(FFE)-PIXE analysis of the low pH sample consisted of twenty-eight kinds of elements, the electrolyte system containing polyethyleneglycol (PEG) as nonionic complexing agent was developed. Using electrolyte system containing 30% of PEG almost metal ions in the sample could be separated.

1.緒言

高レベル廃液の処理には金属イオン特にセシウム、ストロンチウム等の放射性元素の分離が不可欠である。我々はこれまで用いてきたイオン性錯形成剤を適用したところ、pHが低い高レベル廃液では相互作用が弱く分離が不十分であったため、ポリエチレングリコール(以下 PEG)を非イオン性錯形成剤として用いた電解液を開発した。この電解液を用いて高レベル廃液模擬試料を分離分取し、その挙動を粒子励起X線発光(PIXE)分析により調べた。また、実際に高レベル廃液の分離処理を行うためには、バッチ処理ではなく連続処理を行うことが必要になる。そのために双方向等速電気泳動条件を決定し、フリーフロー電気泳動-PIXE(FFE-PIXE)分析の実験条件を検討しイオン性錯形成剤を用いた FFE-PIXE の結果と比較する。

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 (30wt%) 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 28 種類のイオンが存在する高レベル廃液模擬試料の定量分析を行った。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。またこれらの結果を基にノニオン、アニオン同時分析可能な FFE-PIXE をこれから行う予定である。

3.結果と考察

Fig.1 に試料の ITP-PIXE 法を用いた分析結果を示す。フェログラムを見て明らかのように、ナトリウムが多量に存在していた。また PIXE 分析からセリウムも多量に存在してい

た。イオン性錯形成剤ではナトリウムの前でゾーン電気泳動していたセシウム、ルビジウム等もナトリウムのゾーンの前で等速電気泳動ゾーンを形成した。また PIXE 分析結果からマンガンとニッケル、プラセオジウムとイットリウム、鉄とクロムは混合ゾーンを形成していたが、他の元素は良好な分離が得られた。

さらに分離が改善することを期待して PEG 濃度を 30wt%にした電解液系での分析結果を Fig.3 に示す。分析結果を見ると鉄とクロムは混合ゾーンを形成したが、それ以外の元素の分離に関しては有効であった。また PEG 濃度が上昇したことによりイットリウムの移動度が低下し、ネオジウムより後方を泳動する様になった。PEG 濃度に対する R_E 値の変化を Fig.4 に示す。このように PEG 濃度を増加させることで移動度が低下する事を利用して、カチオン、アニオン、ノニオンの分離を期待して双方向 FFE-PIXE 分析を行う予定である。

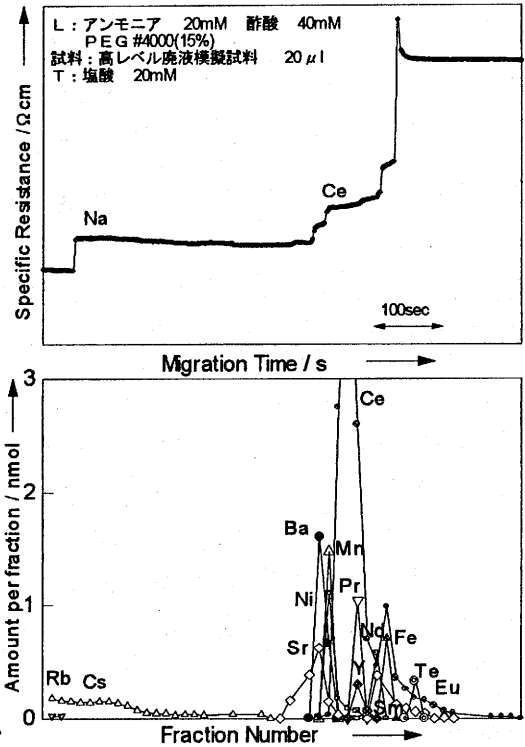


Fig.1 Electropherogram of the sample in PEG 15wt% system.

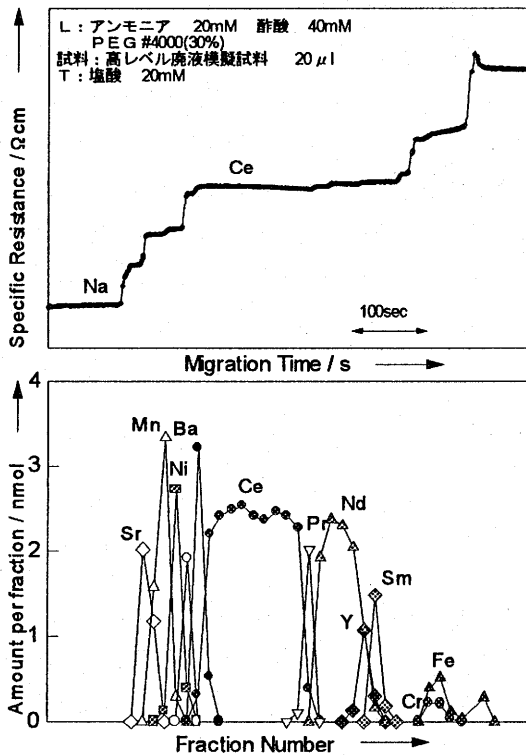


Fig.3 Detailed electropherogram of the sample in PEG 30wt% system.

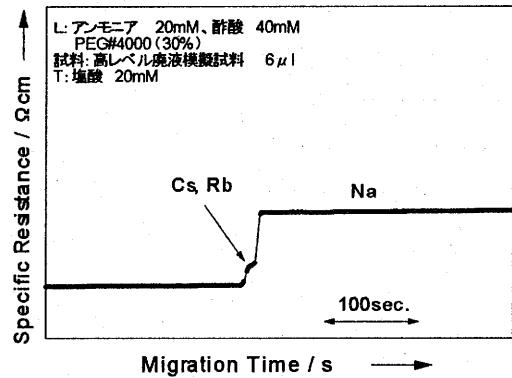


Fig.2 Electropherogram of Cs and Rb zone in PEG 30wt% system.

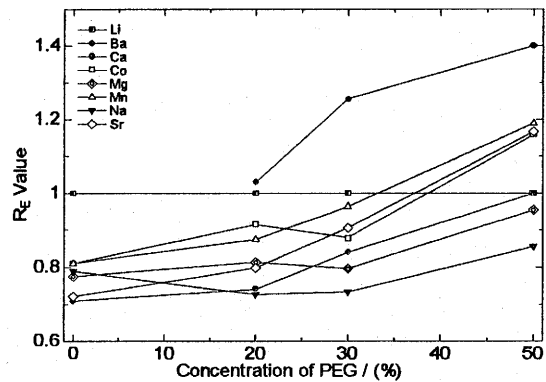


Fig.4 PEG concentration dependence of R_E values of metal ions.

キャピラリーゾーン電気泳動法によるアンモニウムイオンの直接UV検出

1) 伊藤秀幸*, 木村健一, 福士恵一, 2) 茶山健二, 3) 竹田さほり, 脇田慎一, 4) 日色和夫

1) 神戸商船大学船貨輸送研究施設, 2) 甲南大学理学部化学科, 3) 大阪工業技術研究所, 4) 神戸女子短期大学

Direct UV Detection of Ammonium Ion by Capillary Zone Electrophoresis

1) Hideyuki Ito*, Ken-ichi Kimura, Keiichi Fukushi, 2) Kenji Chayama, 3) Sahori Takeda, Shin-ichi Wakida, 4) Kazuo Hiiro

1) Research Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University of Mercantile Marine, 2) Department of Chemistry, Faculty of Science, Konan University, 3) Osaka National Research Institute, AIST, 4) Kobe Women's Junior College

Abstract

Capillary zone electrophoresis (CZE) with direct UV detection was used for the determination of ammonium ion in natural river, lake, and rainwater samples. A solution of 20 mM sodium borate adjusted to pH 10 with sodium hydroxide was used as the buffer. A polyimide-coated fused silica capillary, 100 μ m i.d. \times 375 μ m o.d., served as the capillary electrophoresis column. The total length of the column was 72 cm; the effective length was 50 cm. A sample solution was vacuum injected into the capillary electrophoresis apparatus for 5 s. A voltage of 10 kV was applied with the sample inlet side as the anode. Ammonium ion in the sample was converted into ammonia in the capillary during migration and detected in approximately 7 min by UV absorption at 190 nm. The proposed method was applied to the determination of ammonium ion in river water samples. Investigations of the effects of the i.d. of the column and concentrations of coexisting ions in sample solutions and the comparison of the direct detection with indirect detection etc. are in progress.

1. はじめに

窒素, リンなどの栄養塩類は, 河川水や下水処理場の放流水などに含まれて, 依然として沿岸海域へ流入し続けている. これら環境水中の栄養塩類濃度の簡便で迅速な定量法を開発することは, 閉鎖性海域の富栄養化防止の観点から重要である. 栄養塩類のうちアンモニウムイオンは UV 吸収をもたないため, キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) では一般に間接吸光法により検出されている. しかし間接吸光法によりアンモニウムイオンを定量する場合, アンモニウムイオンとカリウムイオンの電気泳動移動度はほぼ等しいため, これらを分離する

ために 18-crown-6 を添加したバッファーなどが用いられている。われわれは、アモニアに起因すると考えられる吸収が 190 nm 付近に存在することを見いだした。そこで本研究では、環境水中のアモニウムイオンを CZE により直接定量するために各種分析条件について検討した。また本法を河川水中のアモニウムイオンの定量に適用したので報告する。

2. 実験

装置はパキソルマー社製 Model 270HA-HT を使用した。キャピラリー（内径 100 μ m, 外径 375 μ m）の全長は 72 cm, 有効長は 50cm である。バッファー溶液として 20 mM 酢酸ナトリウム溶液を用い、水酸化ナトリウムにより pH を 8 ~ 11 と変化させた。また UV 検出器の波長を 190 ~ 210 nm と変え、アモニアの最適検出波長について検討した。さらに泳動電圧（6 ~ 14 kV）、試料吸引時間（3 ~ 7 s）の影響について調べた。なお、キャピラリー内径や河川水試料中の共存イオンの影響、電気的注入法や間接吸光検出法との比較などについては現在検討中である。

3. 結果と考察

バッファー溶液の pH を変化させた場合、アモニウムイオンのピーク面積は、pH 10 までは直線的に増大したが、それ以上の pH ではほぼ一定であった。アモニウムイオンのピーク高さ及び泳動時間は、pH とともにほぼ直線的に増大した。これら CZE パラメータ（泳動時間、ピーク面積、ピーク高さ）が増大したのは、pH とともにキャピラリー内におけるアモニアの存在割合が増大したためであると思われる（アモニウムイオンの pK_a は約 9.24）。pH 11 のバッファー溶液を用いた場合、ベースラインが不安定であり、CZE パラメータの相対標準偏差(R.S.D.)は、pH 8 ~ 10 のバッファー溶液を使用した場合の R.S.D.より明らかに大きかった。またアモニウムイオンのピーク面積、ピーク高さとも検出波長 190 nm において最大となり、波長が増大するにつれて減少し、205 nm 以上ではアモニウムイオンは検出されなかった。泳動電圧の増大とともに、アモニウムイオンの泳動時間及びピーク面積は、ほぼ直線的に減少した。一方、アモニウムイオンのピーク高さはほぼ一定であった。これは、電圧の増大とともに電気浸透流が増大したためであると考えられる。電圧が増大するにつれて、ベースラインのドリフトやノイズの増大などが観察された。また試料吸引時間が長くなるにつれて、アモニウムイオンのピーク面積及びピーク高さはほぼ直線的に増加したが、泳動時間は短くなる傾向にあった。なお 7 s 以上では、アモニウムイオンのピークは、水による負のピークの影響を受け、ピーク面積などを正確に測定することは困難であった。5.0 mg/l までのアモニウムイオンを含む標準溶液を用いて検量線を作成したところ、直線性のよいものが得られた。本法により、河川水試料中のアモニウムイオンを定量したときのクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

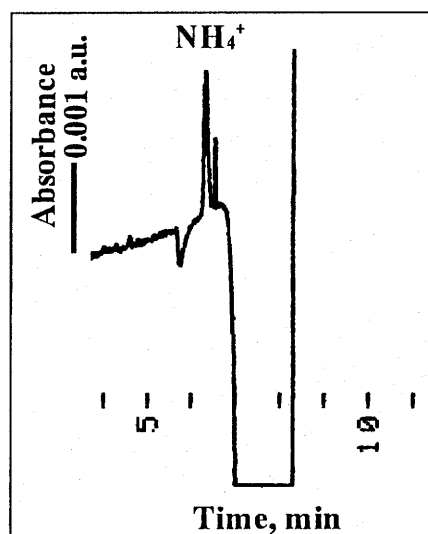


Fig. 1. Electropherogram of a river water sample.

半導体レーザー励起蛍光検出用蛍光標識試薬の開発と応用

金田 隆*, 柴 宏樹, 小松原 剛, 今坂 藤太郎

九大院工

Development and Application of Fluorescent Labeling Reagents for Diode Laser-Induced Fluorescence Detection

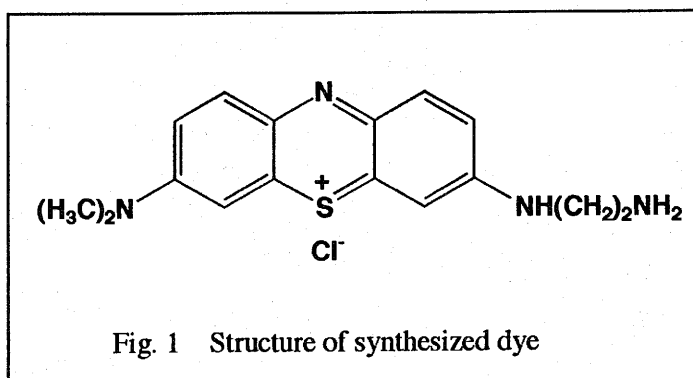
Takashi Kaneta*, Hiroki Shiba, Takeshi Komatsubara, Totaro Imasaka

Graduate School of Engineering, Kyushu University

A fluorescent dye for diode laser-induced fluorescence detection was synthesized. The fluorescent dye was applied to determination of organic acids. Also, cyanine labeling reagents, which are commercially available, were used for determination of amino acids and their optical isomers by micellar electrokinetic chromatography combined with diode laser-induced fluorescence detection. Diode lasers emitting at 635 and a diode-pumped Nd:YAG laser emitting at 532 nm were employed as excitation sources for Cy5 (Absorption maximum, 649 nm) and Cy3 (Absorption maximum, 550 nm), respectively. The detection limit for cyanine labeled amino acid was about 5×10^{-8} M.

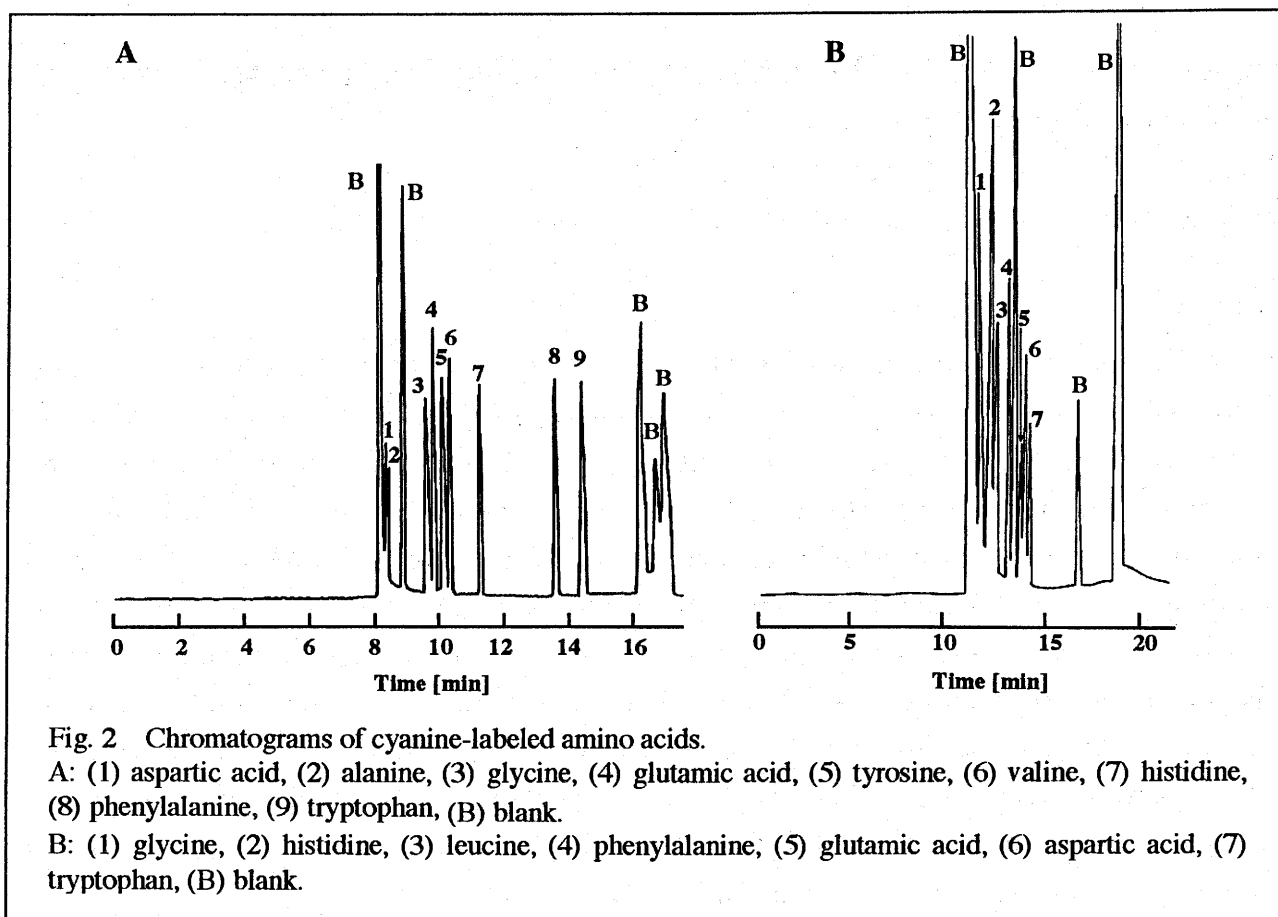
1. はじめに：レーザー励起蛍光法は、キャピラリー電気泳動法において高感度な検出法の一つである。一方、半導体レーザーは、小型・低価格・高安定性などの優れた特性を持つ。また、発振波長が深赤色から近赤外領域であることから、生体関連物質の吸収バンドは紫外領域にあるため、タンパク質や DNA 等の生体関連物質分析において、バックグラウンドの低い高感度な検出が可能である。本研究では半導体レーザー励起蛍光検出・キャピラリー電気泳動法による有機酸分析のための蛍光色素の合成と応用、並びに市販の蛍光標識試薬を用いるアミノ酸分析法について検討を行った。

2. 実験：合成した色素は図 1 に示すような活性なアミノ基を有する有機酸分析用の蛍光色素である。この色素と有機酸を二官能性試薬を用いて結合させ、電気泳動で分離した後に半導体レーザー励起蛍光法で検出した。また、ポリメチン系の標識試薬である Cy3 及び Cy5 (Amersham 株式会社) を用い、アミノ酸を半導体レーザー励起



光法により検出した。キャピラリーは内径 50 μm 、長さ 60 cm (有効長 50 cm) の熔融シリカキャピラリーを、励起光源は発振波長 635 nm の半導体レーザー並びに半導体レーザー励起 Nd:YAG レーザー (第二高調波、532 nm) を用いた。

3. 結果と考察：合成した蛍光色素は 650 nm に励起極大を持ち、635 nm の半導体レーザーを励起光源として利用することができる。合成した色素をギ酸および酢酸と結合させ、動電クロマトグラフィーにより分離した結果、検出限界が 1×10^{-5} M とかなり大きな値であった。これは色素の純度が低いこと、並びに二官能性試薬との反応における反応率が低いことに起因すると考えられる。



市販のシアニン色素の標識試薬を用いてアミノ酸を分離した結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2A は半導体レーザー(635 nm) を、Fig. 2B は Nd:YAG レーザーを光源として用いた場合の結果である¹。それぞれの色素の吸収極大波長は 649 nm (Cy5) および 550 nm (Cy3) である。いずれの場合にも 10^{-8} M レベルの検出限界が得られている。また、光学異性体の分離について検討した結果、50 mM γ -CD と 0.5% ポリビニルピロリドン (PVP) を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) を泳動溶液として用いるとき、6 種のアミノ酸の光学分割が達成できることがわかった²。

4. 文献

- (1) T. Kaneta, T. Komatsubara, H. Shiba, T. Imasaka, *Anal. Sci.*, **14**, 1017 (1998).
- (2) T. Kaneta, H. Shiba, T. Imasaka, *J. Chromatogr. A*, **805**, 295 (1998).

高分子界面活性剤を用いる動電クロマトグラフィー

藤本忠蔵*, 櫻井政人
浜松医大

Micellar Electrokinetic Chromatography Using Polymerized Surfactants as Pseudo-Stationary Phases

Chuzo. Fujimoto* and Masahito Sakurai

Department of Chemistry, Hamamatsu University School of Medicine

ABSTRACT

The use of polymerized surfactants as a pseudo-stationary phase in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has been reported in recent years. Polymerized surfactants have several potential advantages over the normal micelles generated from monomeric surfactants: (a) zero cmc, (b) enhanced stability of pseudo-stationary phase, (c) applicability to highly hydrophobic samples in the buffers modified with a high portion of organic solvents, (d) compatibility with MEKC/MS, and (e) different selectivity. To our knowledge, however, few papers have reported the use of polymers with high degree of polymerization. In the present study, the polymer of sodium 11-acrylamidoundecanoate was synthesized and characterized by means of SEC with RI and multiangle laser light scattering-SEC. The molecular weight was very high (a few millions) and the molecular weight distribution was moderately narrow ($M_w/M_n=1.3-1.5$). The polymerized surfactant was evaluated as a pseudo-stationary phase for MEKC.

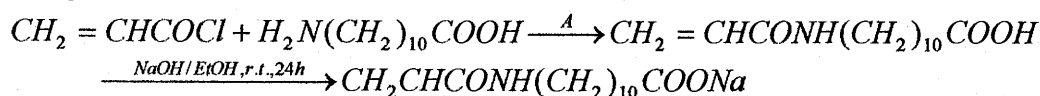
1. はじめに

最近、キャピラリー動電クロマトグラフィーにおける擬似固定相として高分子界面活性剤の使用に関心が向けられている¹⁻⁸⁾。既に多くの論文等に述べられているように、ポリマーミセルは従来の標準的なミセルと比較して、(a) 臨界ミセル濃度がゼロのため比較的低濃度でも使用可能、(b) 動的平衡がなく、温度や塩濃度の変化に対して安定、(c) 疎水性の高い物質を分離するために高濃度の有機溶媒が使用可能、(d) 質量分析との結合に関する適合性、(e) 異なる選択性が期待される、等の特徴を有する。

本研究では、11-アクリルアミドウンデカン酸ナトリウム塩を合成し、これをラジカル重合して得たポリマーをサイズ排除クロマトグラフィー(SEC) 及び多角度光散乱 SEC によりキャラクタリゼーションを行なった。さらに、動電クロマトグラフィーにおける擬似固定相として使用し、その分離挙動について基礎的検討を行なった。

2. 実験

[擬似固定相の合成] 次の反応によってモノマーを合成した。生成物は融点, IR, NMR により確認した。



A: 1) NaOH, EtOH/H₂O, 30 °C, 1 h 2) acidified with dil. HCl

3) repeatedly recrystallized from aq. ethanol

ペルオキシ二硫酸カリウムを開始剤として重合した後, 過剰のアセトンを加えて沈殿物を得た。沈殿物をメタノールで数回洗浄し, 擬似固定相として用いた。

[SEC] 回転半径と分子量は示差屈折計と多角度レーザー光散乱 (Wyatt Technology, DAWN-DSP) を付属した Tosoh 製 SEC 装置を用いて 25°C で測定した。カラムは Tosoh α-M を 2 本連結して用いた。移動相は 10mM トリシューホウ酸 (pH 8.0) 緩衝液を使用した。試料濃度は 0.10 wt % とし, 100μL カラムに導入した。標準物質としてプルランを使用した。

[電気泳動装置] カラムには内径 50μm, 外径 365μm の熔融シリカキャピラリーを用いた。高電圧電源に松定プレジジョンデバイセズ HCZE-30PN0.25-LD, 検出に日本分光 870-CE 紫外吸収検出器を使用した。

3. 結果と考察

合成したポリマーの分子量及び分子量分布を Table 1 に示す。M_w > 10⁶ であり, 重合度が極めて大きいことがわかる。また, 回転半径と分子量のプロットから緩衝液中で比較的コンパクトな構造をとっていることが明らかとなった。25mM ホウ酸緩衝液を用いてナフタレン誘導体の MEKC 分離を行なった。既に報告のあるラウリル硫酸ナトリウムやウンデシレン硫酸ナトリウムオリゴマーを擬似固定相とする MEKC と比較して異なる分離選択性が得られることがわかった。

Table 1 Molecular weight of poly(sodium acrylamidoundecanoate).

	M _w	M _w /M _n
SEC with RI Detector	1.89 × 10 ⁶	1.54
Multiangle Light-Scattering SEC	3.04 × 10 ⁶	1.29

4. 文献 (アキラル MEKC)

- (1) C. P. Palmer and H. M. McNair, *J. Microcol. Sep.*, 4(1992)509. (2) C. P. Palmer, M. Y. Khaled and H. M. McNair, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 15(1992)756. (3) C. P. Palmer and S. Terabe, *J. Microcol. Sep.*, 8(1996)115. (4) C. P. Palmer and S. Terabe, *Anal. Chem.*, 69(1997)1852. (5) S. A. Shamsi, C. Akbay and I. W. Warner, *Anal. Chem.*, 70(1998)3078. (6) H. Ozaki, S. Terabe and A. Ichihara, *J. Chromatogr. A*, 680(1994)117. (7) H. Ozaki, A. Ichihara and S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 709(1994)3. (8) N. Tanaka, T. Fukutome, K. Hosoya, K. Kimata and T. Araki, *J. Chromatogr. A*, 716(1994)57.

石英管を用いたSDSゲル電気泳動による
タンパク質のサイズ分離とオンカラム検出
猶原暢洋*、向井 準、水摩仁美、山口奈緒、真鍋 敬
愛媛大学理学部物質理学科(化学系)

**Separation and On-column Detection of Proteins by SDS Gel
Electrophoresis in Silica Columns**

Nobuhiro Naohara*, Jun Mukai, Hitomi Mizuma, Nao Yamaguchi, Takashi Manabe
Department of Chemistry, Faculty of Science, Ehime University

ABSTRACT

Aiming to separate and recover proteins in semi-preparative scale, size-separation of proteins by sodium dodecyl sulfate(SDS) polyacrylamide gel electrophoresis was performed in silica columns of i.d.2.6mm. Electrophoretic conditions were examined to optimize the resolution and reproducibility of protein separation. Using a silica column of 75mm effective length, SDS complexes of human plasma proteins were separated and detected on-column as about 25peaks and shoulders in 180min and 8Murea-mercaptoethanol-treated plasma polypeptides as about 20peaks and shoulders in 100min.

1. はじめに

線状ポリアクリルアミド(LPA)溶液を用いたキャピラリーSDS電気泳動によるタンパク質の分離条件と、これを用いて血漿タンパク質のSDS複合体が高性能に分離できることはすでに報告した。¹⁾ また、内径200 μ mの熔融シリカキャピラリーを用いても、タンパク質の分離能は低下しないことについてもすでに報告した。²⁾ 分離能を大きく低下させることなく、タンパク質の処理量を増やすことができるかどうかを検討する目的で、熔融シリカキャピラリーの代わりに内径2.6mmの石英管を用い、SDSタンパク質複合体のサイズ分離の基礎条件を検討した。

2. 実験

タンパク質試料は分子量既知の市販精製タンパク質及びヒト血漿を用いた。ヒト血漿はSDS処理したもの(最終濃度タンパク質約5mg/ml、SDS1%、ショ糖20%としたもの)と、さらに、尿素・還元剤処理したもの(最終濃度タンパク質5mg/ml、SDS1%、メルカプトエタノール2%とした後、95℃で5分間加熱し、尿素粉末を8Mになるように加えたもの)の2種類を電気泳動用試料とした。キャピラリー電気泳動装置はスペクトラフィジックス社の波長可変分光光度計SC100に自作した石英管装着用アダプターをつけたものとJASCO社のインテグレーター807-IT、松定プレシジョン社のHJPM-3P5とを組み合わせたものを用いた。石英管は内径2.6mm、全長15.5cm、有効長7.5cmのものを用いた。ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミドとN,N'-メチレンビスアクリルアミド(bis)の濃度の和(T%)を4%とし、bisの割合(c%)を1%としてN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)と過硫酸

アンモニウムを用いて石英管中で重合させた。緩衝液は80mM Tris-10mM Tricineに0.1%SDSを加えたものを用いた。試料は陰極側のゲル上端に直接注入し、電流値が1.1mAを越えない範囲で定電圧で泳動を行った。

3. 結果および考察

内径75 μm および200 μm のキャピラリーと支持体ポリマーLPAを用いたときの血漿タンパク質のサイズ分離結果と比較すると、内径の大きい石英管を用いた場合 1)電流値を抑えるため緩衝液組成に工夫が必要である、2)ポリアクリルアミドゲルの吸収のため230nmにおける検出は難しく、280nmを用いる必要がある、ことが分かった。

緩衝液組成については、サイズ分離キャピラリー電気泳動で用いた緩衝液 (50mM Tris-50mM Tricine-0.1%SDS)を単に希釈したものでは分離能が低く、再現性にも問題があった。検討の結果、80mM Tris-10mM Tricine-0.1%SDSで以下の実験を行った。

SDS処理した血漿試料についてのタンパク質のサイズ分離結果をFig. 1Aに、SDS・尿素・還元剤処理した血漿試料についてのタンパク質 (ポリペプチド) のサイズ分離結果をFig. 1Bに示した。SDS処理の場合、約25本の紫外吸収ピークまたは肩が検出され、分子量範囲は2万程度から約50万程度と推定された。尿素・還元剤処理すると、約20本のピークまたは肩が検出され、分子量範囲は約1万から約20万程度と推定された。この分離能は内径75 μm または200 μm のキャピラリーとLPAを用いた場合にはやや劣ったものの、特に分子量7万以上の領域で2次元ゲル電気泳動におけるサイズ分離よりも優れていた。さらに、分離されたタンパク質の回収法について検討を進めている。

1) T.Manabe et al. Electrophoresis, 19(1998)2308-2316

2) 竹村結花 他、第16回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集(1998)P. 8

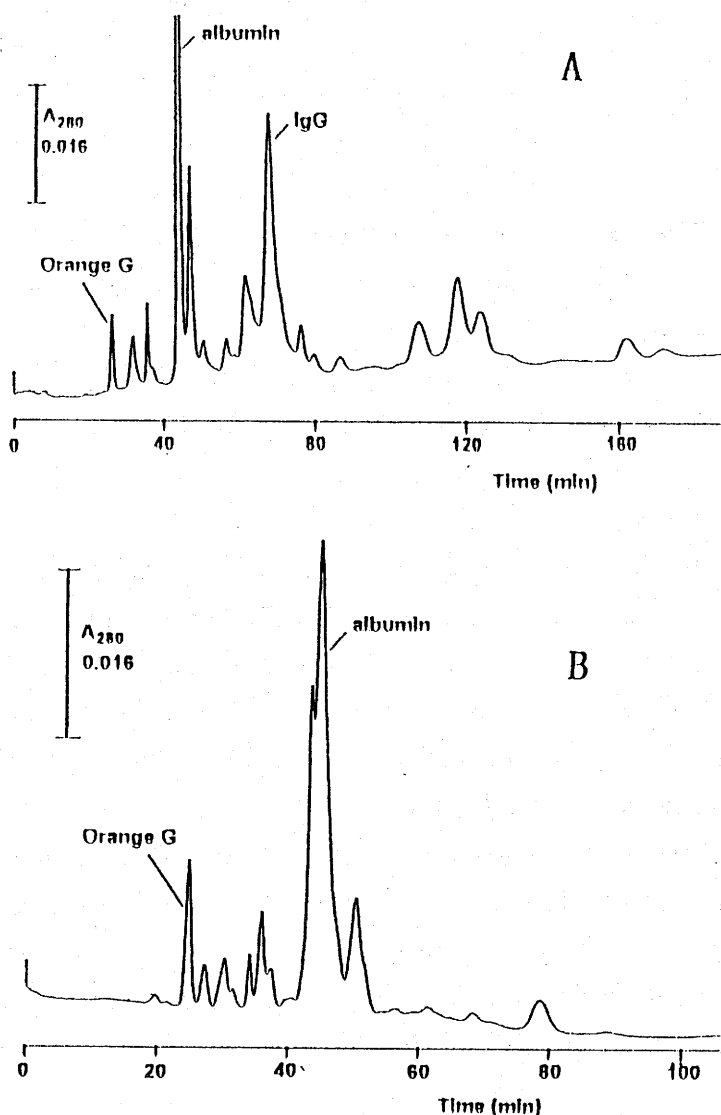


Fig. 1. Size separation of human plasma proteins. A, SDS-treated plasma sample; B, SDS-2ME-urea treated plasma sample.

キャピラリー電気泳動による染料分解生成物の分析

1) 竹田さほり*、山根昌隆、城間 純、脇田慎一、2) 田中喜秀

1) 大阪工業技術研究所

2) 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

Analysis of dyestuff degradation products by capillary electrophoresis

1) Sahori Takeda*, Masataka Yamane, Zyun Siroma, Shin-ichi Wakida, 2) Yoshihide Tanaka

1) Osaka National Research Institute, AIST

2) Nippon Boehringer Ingelheim, Co. Ltd.

Abstract

We have studied wet oxidation with solid catalysts as the treatment method of wastewaters containing dyestuffs. When the Orange II solution was used as the model wastewater, treated solution contained highly polar degradation products. They could not be identified by conventional HPLC. We applied capillary electrophoresis (CE) with two different detection methods, mass spectrometry (MS) and UV absorption spectroscopy with photo-diode array detection (UV-DAD), for the analysis of the products. We were able to determine the molecular weights of some products by CE/MS. From this clue, we tried to identify these products by CE/UV-DAD. By means of the comparison of the migration time and UV spectra of standard samples, three degradation products were identified. The separation of degradation products was successful within 15 min.

1. はじめに

我々はこれまで、効率よく染料排水の分解や脱色を行う技術として、固体触媒を用いる湿式酸化法や固体高分子電解質膜を用いる電解酸化法の研究を行ってきた。湿式酸化法においてモデル物質としてオレンジIIを用いた場合、分解生成物としてより極性の高い化合物が生じていることがHPLCによる分析で明らかとなったが、その分離・同定は困難であった¹⁾。そこで、キャピラリー電気泳動を用いる分析について検討し、検出法として質量分析法 (MS) および紫外吸収-フォトダイオードアレイ検出法 (UV-DAD) を用いて、分解生成物の分離および同定を試みた。

2. 実験

試料にはオレンジII 1000mg/l のモデル排水を白金触媒を用いて湿式酸化処理し、所定時間毎に採取した反応液を用いた。CE/MS の装置は HP^{3D}CE システム (Hewlett-Packard) と API-300 (Perkin-Elmer Sciex) を接続して用い、泳動溶液には 50mM 炭酸アンモニウム

緩衝液(pH8.5)または40mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.0)を用いた。キャピラリーには内径50 μ m、全長75cmのフューズドシリカ管を用い、pH8.5の際にはそのまま、pH6.0の際には内面をポリアクリルアミド処理して用いた。CE/UV-DADの装置はCAPI-3000(大塚電子)を用い、キャピラリーには内径75 μ m、全長62cm(有効長50cm)のフューズドシリカ管を、泳動溶液には50mM炭酸アンモニウム緩衝液(pH9.3)を用いた。印加電圧は20kVとし、波長範囲200~600nmでフォトダイオードによるオンライン紫外吸光検出を行った。

3. 結果と考察

まずCE/MSにより、分解生成物の分子量測定を試みた。2種類の緩衝液により測定した結果、pH8.5の条件では一部の分解生成物の泳動速度が速くピークを検出できなかったため、キャピラリー内の電気浸透流を抑えpH6.0の条件で検出することとした。反応開始50分後に採取した試料について負イオン検出を行った結果、オレンジII($m/z=327.0$)のピークの泳動時間は約29分であった。また、 $m/z=172.8$ で約19分、164.8で約13分、200.8で約11分にそれぞれ分解生成物と思われるピークが検出された。同じ試料をCE/UV-DADで分析し、波長240nmで検出した結果、Fig.1に示すように、約4分でオレンジII、約7分および8分に比較的大きな分解生成物のピークが得られた。MSによる分子量情報を元に標品との泳動時間とUVスペクトルの比較を行った結果、これらのピークはそれぞれp-フェノールスルホン酸($mw=174.2$)およびo-フタル酸($mw=166.1$)と同定された。また、反応開始170分後に採取した試料については、CE/MSでは $m/z=200.8$ のピークが検出された。CE/UV-DADでは10分前後に2つのピークが得られたが、50分後の試料と同様に同定を行った結果、最初のものがp-スルホ安息香酸($mw=202.2$)であると判明した。CEにおいては分解生成物の迅速・簡便な分離および同定が可能であった。

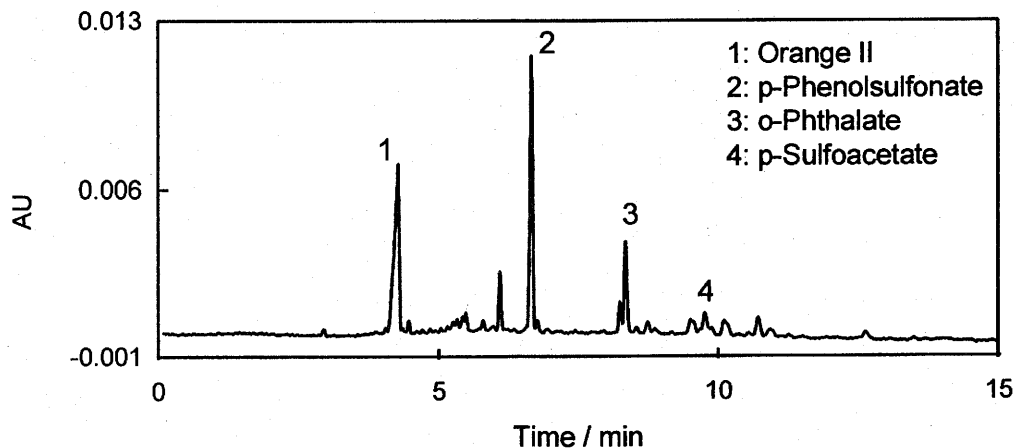


Fig.1 Pherogram of the treated solution containing dyestuff degradation products

4. 文献

- 1) 杉本 太、竹田さほり、東 国茂：環境技術，**24**，517-522 (1995).

血清中5-フロロウラシル (5FU) のキャピラリー電気泳動分析

北岸恵子*、山田浩美
大塚電子株式会社 応用開発部

Determination of 5-Fluorouracil in Human Serum with Capillary Electrophoresis

Keiko Kitagishi*, Hiromi Yamada
Otsuka Electronics Co.

ABSTRACT

The quantitative analysis of 5-fluorouracil (5FU), an antineoplastic drug, provides the informations about its proper dose. We investigated the assay system of 5FU in human serum by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) without any deproteinization processes. The separation conditions such as pH and micelle concentration of electrolyte, temperature, *etc.*, were optimized for human normal serum with the addition of 5FU and the pyrimidine derivatives. The limit of detection of 5FU was obtained to be 0.1ppm in human serum under the conditions that 5FU could be separated both from its eight derivatives and serum proteins.

1. はじめに

5-Fluorouracil (5FU) は抗癌作用を有すると報告されている。血清中の5FUを他のピリミジン誘導体と分離、定量することは、5FUの投与方法を設定して薬剤の安定性を確保するうえで意義がある。現在、5FUの代謝はGC-MS法で行われているが、分析操作が煩雑で高価な測定装置であり、専門の分析センターに測定依頼をしている。また、採血から検査結果を得るまでに数日を要し、治療の管理には適していない。

本報告においては、血清を除蛋白などの処理をせず、キャピラリーに導入し、血清に含まれる5FUを他のピリミジン誘導体から分離し、定量することを試みた。血清には多量のタンパク質が含まれ、紫外吸収検出法での妨害物質となるので、SDS-血清タンパク質の形成によってタンパク質の検出を遅らせることができるMEKCを応用した¹⁻³。

2. 実験

分析に用いた9種類のピリミジン誘導体は、5-fluorouracil (5FU)、uracil (U)、cytosine (C)、thymine (T)、5-fluorouridine (5FUrd)、5-fluorodeoxyuridine (FdUrd)、3-cyano-2,6-dihydroxypyridine (CNDP)、1-ethoxymethyl-5-fluorouracil (EMFU)、isophthalic acidである。試料溶液は、標準試料の母液 (200 μ g/ml) をヒトノーマル血清に添加して調整した。調整した血清サンプルは4mm Millex-LH (0.5 μ m ポア径、Millipore) で除粒子した後、ドデシル硫酸塩を含む緩衝液で希釈して、直接キャピラリーに注入した。測定には大塚電子CAPI-3200を用いた。

3. 結果と考察

血清に各 4 ppm の濃度で化合物を添加して、MEKC で分析した例を図 1 に示す。図 1 の条件で、5FU は、他のピリミジン誘導体のピーク、および血清由来のピークから分離できた。次に、この条件での U、C、5FU の検出限界を知るために、低濃度の標準試料を血清に添加して測定した。U、C については、0.1 ppm までの検量線が可能、0.06 ppm までピーク判定可能であった。5FU はピークがブロードなので、検量線の相関係数が U、C より低くなった。0.1 ppm の 5FU 添加でもピークは検出できるが、S/N レベルから見て定量限界は 0.2 ~ 0.5 ppm 程度である。今回の検討により、血清中の 0.1 ppm 以上の 5FU は、血清を前処理せずに直接注入しても十分検出可能であることがわかった。

4. 文献

- (1) Nakagawa, T., Oda, Y., Shibukawa, A., Fukuda, H., Tanaka, H. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 707 (1989)
- (2) Nishi, H., Fukuyama, T., Matsuo, M. *J. Chromatogr.* 515, 245 (1990)
- (3) Thormann, W., Minger, A. Molteni, S., Caslavská, J., Gebauer, P. *J. Chromatogr.* 593, 275 (1992)

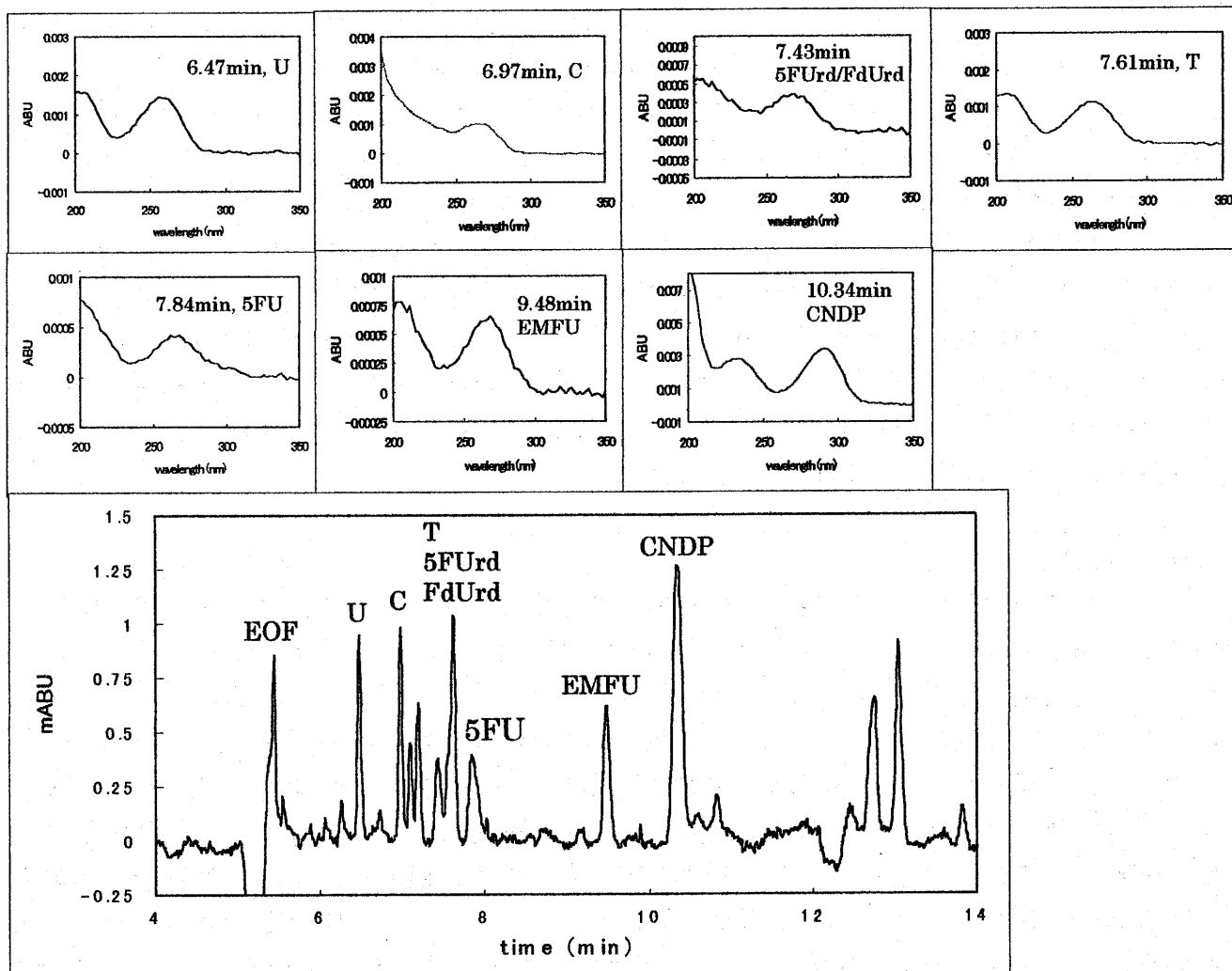


図 1. 9 種の化合物を各 4ppm ずつ血清に添加した試料のエレクトロフェログラム(270nm)とピークのスペクトル。Isophthalic acid はこの時間内には検出されない。ドデシル硫酸塩を添加したリン酸緩衝液 pH7.75。キャピラリーの内径 75 μ m、全長 50 cm、有効長 37.8 cm。

キャピラリー電気泳動による無機陰イオン、有機酸、金属イオンの一斉分析

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

Simultaneous Determination of Inorganic Anions, Organic Acids and Metal Cations by Capillary Electrophoresis

Tomoyoshi Soga, Hiroko Yanai*

Yokogawa Analytical Systems Inc.

ABSTRACT

A capillary electrophoresis method for the simultaneous determination of inorganic anions, organic acids and metal cations was developed. A complex agent was used as the background electrolyte to permit indirect UV detection of anions. The reagent also worked to confer a negative charge on metal cations via its complex formation. The EOF was reversed in order to detect both anions and metal complexes simultaneously. In the method detection of anions was carried out with indirect UV detection, whereas metal cations were detected directly. Thirteen anions and three metal cations were completely separated at the optimized condition. The R.S.D.(n=6) values of the method were better than 0.2 % for migration times and between 1.1 % and 3.9 % for peak areas. The minimum detectable levels ranged from 0.2 mg/l to 1.9 mg/l with 300 mbars pressure injection (6 nl) at a signal-to-noise ratio of 3. This method is simple, rapid and reproducible and could be readily applied to the analysis of anions and metal cations in plating bath samples.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動は、高速、高分離能の分離分析手法であり、現在は、陰イオン、陽イオン等のイオン分析にも広く用いられている。陰イオンと陽イオンの測定は、それぞれの条件で測定することが一般的であったが、近年、キャピラリーの両端から試料を注入し、キャピラリーの中央で陰イオン、陽イオンを同時に検出する方法が報告されている^{1,2}。

我々は、金属イオンに対して高い錯安定化定数を持つ物質を泳動緩衝液に用い、無機イオン、有機酸、金属イオンを同時に測定する方法を開発した。この方法では、金属イオンは、泳動緩衝液により陰イオン性の錯体を形成するため、無機陰イオン、有機酸と同様に陽極方向に泳動するため、一斉分析が可能となった。この方法の再現性、検出下限、検量線の直線性の測定結果を報告する。また応用例としてめっき液中の無機陰イオン、有機酸、金属イオンを一斉分析したので、その結果を報告する。

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 50 μm 、全長 112.5 cm、有効長 104 cm) を使用した。泳動緩衝液には、HP Universal Anion Buffer を使用し、印加電圧 -30 kV、温度 15 $^{\circ}\text{C}$ で測定した。試料に注入は、加圧法 50 mbar, 6 sec で行った。検出は、ダイオードアレイ検出器を使用し、230 nm で測定した。

3. 結果および考察

Fig. 1 に無機陰イオン 6 成分、有機酸 7 成分および金属イオン 3 成分の標準液の一斉分析結果を示した。この方法では、金属イオンのピークはベースラインより下側に検出される。この方法は間接吸光度法を用いており、測定したこれらの金属イオンは測定波長の 230 nm に UV 吸収をもつため、下側に検出された。注入量 6 nl における検出下限(S/N=3)は、陰イオンが 0.8-1.9 mg/l であり、金属イオンは、0.2 mg/l であった。この方法を用いて、無電解ニッケルめっき液を 5 回繰り返し測定を行い、それを重ね書いた結果を Fig. 2 に示した。移動時間の再現性 (n=5) は 0.03 % 以内、ピーク面積は、1.4 % - 3.2 % と良好であった。本法は簡便に無機陰イオン、有機酸および金属イオン一斉分析できるため、めっき液以外にも広い分野で有用な分析方法であると思われる。

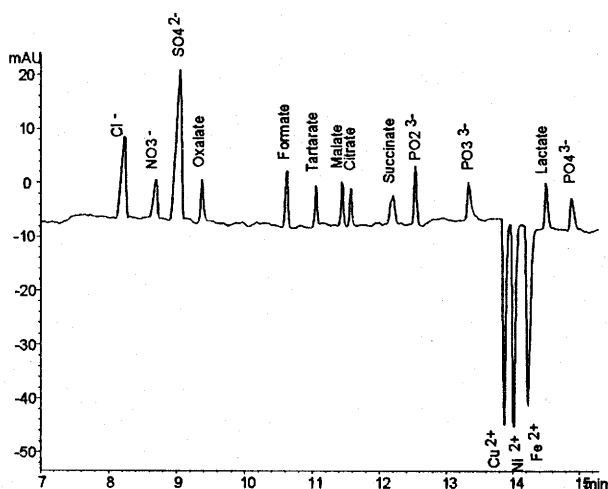


Fig. 1 Electropherogram of a standard mixture of inorganic, organic anions and metal Cations.

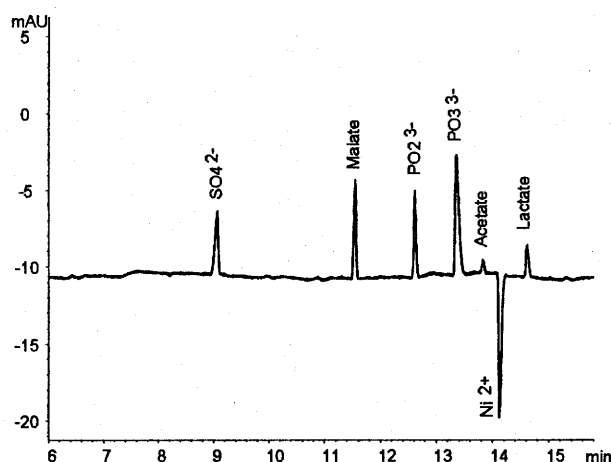


Fig. 2 Reproducibility of nickel plating bath analysis (n=5).

4. 文献

- [1] Padaruskas, A.; Olsauskaite, V.; Schwedt, G. *J. Chromatogr. A*, 800, 369 (1998).
- [2] Kuban, P.; Karlberg, B. *Anal. Chem.* 70, 360 (1998).

有機酸のキャピラリー電気泳動分析による醤油の識別

河済 博文*, 辻村 真治, 飯山 悟

近畿大学 九州工学部

Categorization of Soy Sauce with Analysis of Organic Anions by Capillary Electrophoresis

Hirofumi Kawazumi*, Shinji Tsujimura, Satoru Iiyama

Kyushu School of Engineering, Kinki University

ABSTRACT

Taste classification of soy sauce (shoyu) has been investigated by using the capillary electrophoresis with the analysis of organic anions. Thirty one kinds of soy sauce were analyzed and eight organic anions and three inorganic anions were found in fourteen peaks. The principal component analysis of these peak intensities reveals the categorization of three conventional tastes; koikuchi, usukuchi, sashimi.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動 (CE) の高分解能, 高速分析, 自動化分析といった特徴は, 食品分析のように複雑な成分を対象とし品質管理を目的とする場合に非常に有用なものとなる。CEによる飲料や調味料の無機イオン, 有機酸, ビタミンなどの分析方法が種々検討され, 従来のクロマトグラフィーによるものと同程度の信頼性が得られるようになってきた。さらに食品分析では単なる成分分析にとどまらず, 「味覚」の定量化も研究されつつある。複数の半導体や脂質・高分子膜をトランスデューサとした味覚センサが開発されている。本研究では, 脂質・高分子膜型のマルチチャンネル味覚センサとの比較を前提に, CEにより醤油中の無機陰イオンと有機酸が高分解能で一斉分離できることを利用し, 得られた成分分布の多変量解析から醤油の種類識別が可能かどうか検討した。

2. 実験

CE装置はHewlettPackard HP-3D Capillary Electrophoresis Systemを用いた。醤油(メーカー別の異なるもの31種)は, イオン交換水で50倍に希釈後, 銀カラムで塩素イオンを除去し, 有機酸分析用緩衝液(可視化剤 2,6-pyridinedicarboxylic acidを含む)で間接吸収法により分析した¹。測定した成分のピーク面積強度をマイクロソフト社表計算ソフト・エクセルに取り込み主成分分析により解析した。比較したマルチチャンネル味覚センサは5種類の脂質とその混合物を受容膜としたもので, 従来よりビール, コーヒーなどの

味の評価に用いられたものである²。

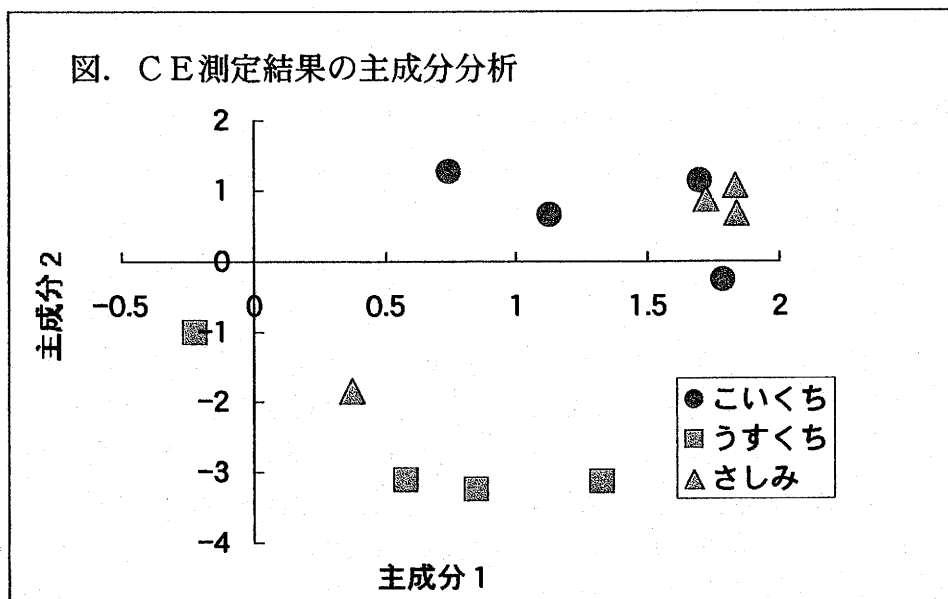
3. 結果と考察

全ての醤油において、2～10分の分析時間で14個のピークが分離でき、それぞれに特徴的なエレクトロフェログラムが得られた。そのうち11個のピークが、塩素、硫酸、シュウ酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、ピルビン酸、酢酸、乳酸、リン酸、ピログルタミン酸の各イオンと同定できた。醤油は約10%以上の食塩を含むため、良い再現性を得るために銀カラムによる塩素イオンの除去は不可欠であった。除去の程度により大きく変動する塩素イオンを除く13個のピーク強度を変数とし主成分分析を行い、第1主成分と第2主成分による固有ベクトルをプロットし、醤油の種別同定を行った。有機酸の量は主に醤油の酸味にきくと思われるが、31種の醤油に対応したプロットのポジショニングは、再現性良く、それぞれの醤油の識別ができる程度にはプロット位置は分散した。図に4つのメーカーそれぞれの「こいくち」「うすくち」「さしみ」醤油のプロットを示す。メーカーを識別できるような特徴は現れなかったが、製法別には集合が見られた。特にJAS規格による分類である「こいくち」と「うすくち」の違いは明確に表れた。一方、味覚センサやアミノ酸分析の結果ではメーカー別の特徴により集合が表れたが、製法による味の違いを識別できなかった。

4. 文献

¹ Soga, T.; Wakaura, M. J. Am. Soc. Brew. Chem., 55 (2) 44 (1997).

² Iiyama, S.; Ikeda, T.; Toko, K.; Yahiro, M. 日本食品科学工学会誌 44 (9) 615 (1997).



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 ($5\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m}$) 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 $5\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m}$ 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 -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。また充填の際、分散溶媒の選択が重要であった。分散溶媒は、充填剤の沈殿を防ぎ充填を円滑に進めるために用いるため、充填剤と比重の等しい溶液を用いるのが好ましかった。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-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。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。

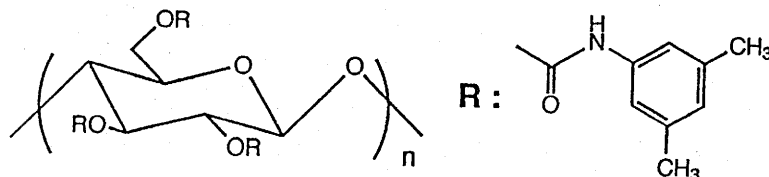


Fig.1 : ODタイプ充填剤 (5 μm, 3 μm 基材表面処理は異なる) コーティングポリマー

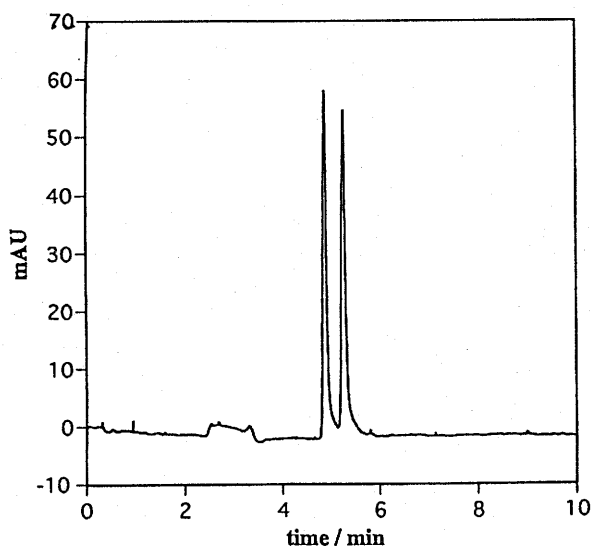
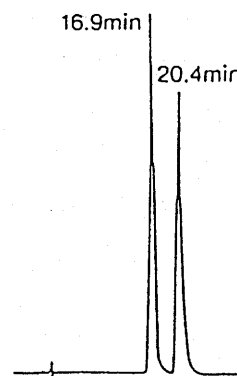


Fig.2 : Chiral separation of benzoin by CEC



Chiral separation by HPLC

MEKCの高分子分析への応用：高分子界面活性剤による酸化防止剤分離の検討

尾崎 祐人

株式会社カネカテクノリサーチ

Application of MEKC to polymer analysis: separation of antioxidants using high-molecular-mass surfactants.

Hiroto Ozaki

Kaneka Techno Research Co. Ltd.

ABSTRACT

Separation of some polymer additives, 2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol and the other antioxidants, by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was studied. A high-molecular-mass surfactant, butyl acrylate/butyl methacrylate/ methacrylic acid copolymer sodium salt (BBMA) was utilised with organic solvents and the other additives to the running solutions.

1.はじめに

合成樹脂、合成ゴムなどのいわゆる高分子材料は単独の化合物がそのまま使用される事は少なく、ほとんどの場合種々の添加剤が併用される。従って高分子材料の分析において分離分析法が果たす役割は大きく、CEの応用も期待される¹⁾。今回、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) を利用した酸化防止剤の分離の検討を行った。2,6-di-tert-butyl-4-methyl phenol (BHT)などの代表的なフェノール系酸化防止剤を対象とし、比較的分子量の酸化防止剤を用いて条件検討を行い、高分子量化させた酸化防止剤の分離への応用を試みた結果を報告する。検討に用いた酸化防止剤の構造を図1に示す。BHT (No.1)、4,4'-butylidene-bis-(3-methyl-6-tert-butylphenol) (スミライザーBBM、No.2)、n-octadecyl-3-(3',5'-di-tert-butyl-4'-hydroxyphenyl)-propionate (イルガノックス1076、No.3)、tetrakis-[methylene-3-(3',5'-tert-butyl-4'-hydroxy phenol) propionate]-methane (イルガノックス1010、No.4)を用いた。MEKC分離溶液には高分子界面活性剤²⁾を利用し、有機溶媒その他添加剤利用による分離改善を試みた。

2.実験

検討にはHP製3DCE1602Aを使用した。キャピラリーはGLサイエンス製内径50 μ m、外径350 μ m、長さ40~50cmのフーズドシリカキャピラリーをそのまま使用した。高分子界面活性剤のアクリル酸ブチル-メタクリル酸ブチル-メタクリル酸共重合体 (BBMA) は第一工業製薬から提供されたものを使用した。その他試薬および標準試料は市販品をそのまま使用した。

3.結果と考察

BHTをはじめいずれの試料も水溶性はなく、メタノール、アセトニトリルへの溶解性も低い。アセトニトリル/THF混合溶媒の溶液として使用した。BBMA単独分離溶液（濃度1-2%）では良好な分離を得られなかったため、有機溶媒添加による分離改善を検討した。アセトニトリル添加系で得られた分離例を図2に示す。分子量の大きい3, 4は有機溶媒50%の条件でもミセルに強く保持されかなり遅く移動している。これら高分子量酸化防止剤を対象に、より有機溶媒量の多い条件下での分離も検討した。

また、ポリプロピレン樹脂を例に樹脂抽出物の酸化防止剤検出への応用を検討した。

1) 尾崎、第3回高分子分析討論会要旨集 印刷中

2) 尾崎、寺部 第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集 p. 123 (1997)

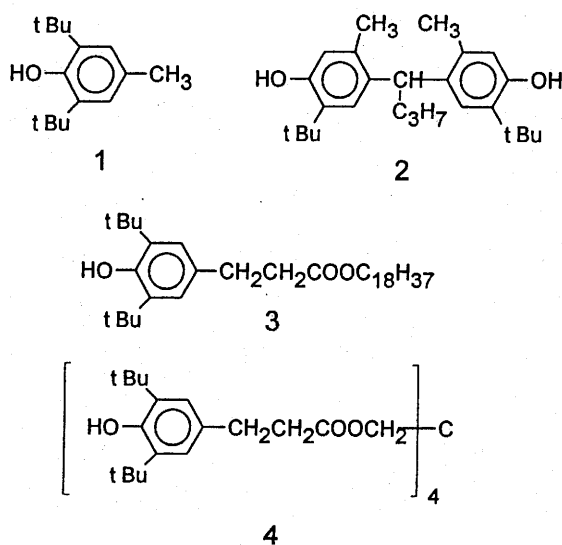
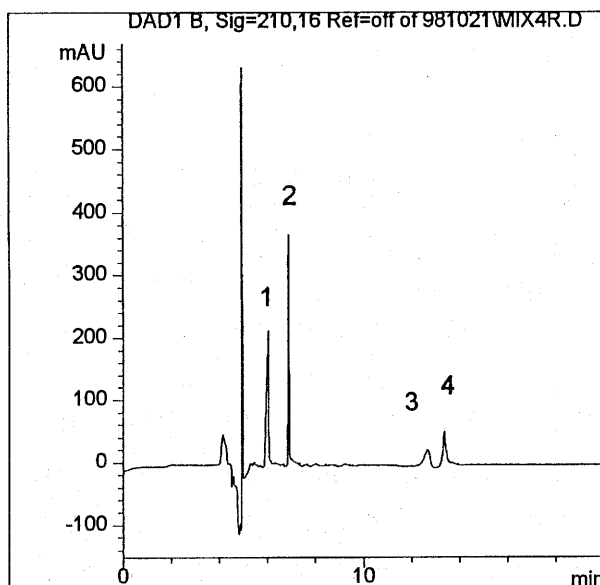


Fig.1. Structures of the antioxidants



1) BHT
 2) Sumilizer BBM
 3) Irganox 1076
 4) Irganox 1010
 Conditions: capillary, 40 cm (32 cm to the detector) x 50 μ m; running solution, 2.5% BBMA containing 50% acetonitrile in water; applied voltage, 20kV; detection wavelength, 210nm.

Fig. 2. MEKC separation of the antioxidants

キャピラリー電気泳動の数値シミュレーション(IV)

育田 夏樹*, 岡野 洋介, 廣川 健
広島大・工

Numeric Simulation of Capillary Electrophoresis (IV)

Natsuki Ikuta*, Yosuke Okano; Takeshi Hirokawa
Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

It was clarified by using our simulation program that the causes of the decrease of sample recovery in isotachopheresis using proton as terminating ion. The causes were tailing of zone of the slowest sample ion and the sample stayed in the injection zone. Especially, the tailing of the slowest sample zone was confirmed experimentally by using a scanning UV detector constructed in our laboratory.

はじめに

キャピラリー等速電気泳動(ITP)法は濃度調整効果や試料の大量注入が可能なことから、分析法としてだけでなく、分取などの前処理法として有効な電気泳動モードである。我々は等速電気泳動法で分離した後、PIXE法で分析する ITP-PIXE 法により希土類鉱石などの分析を行ってきた。希土類鉱石のようにその成分中に鉄を多く含む場合、沈殿の発生を抑えるために、リーディング電解液の pH を低くする必要がある。このような条件ではプロトンがターミナルイオンとして振る舞う¹⁾。低 pH 条件下で ITP-PIXE を行うと、最後を泳動するイオンの回収率がしばしば低下する現象が見られた²⁾。

今回、我々が開発したプログラムを用いてシミュレーションを行い、回収率の低下がどのようなメカニズムで起こるのかを議論する。また、走査型 UV 検出器を用いた実験とシミュレーション結果とを比較する。

実験

計算機実験には我々が開発したキャピラリー電気泳動シミュレーションプログラムを用いた³⁾。キャピラリー全長は 10cm、電流密度は $100\text{mA}/\text{cm}^2$ とした。リーディング電解液としてアンモニア 3mM-酢酸 6mM(pH4.8)の水溶液を、ターミナル電解液として 5mM HCl を選択した。試料は NaOH, LiOH, Tris の各 2mM 等モル水溶液とし、注入プラグ長は 1cm であった。

計算機実験との比較のために、当研究室で開発した走査型 UV 検出器を用いて等速電気泳動実験を行った。リーディング電解液はアンモニア 5mM-酢酸 10mM(pH4.8)、ターミナル電解液には HCl 5mM を用いた。試料としてトルイジンブルー(以後、TB)5mM を 20 μl 注入した。内径 0.53mm のキャピラリーを用いて、駆動電流 10 μA (電流密度 $1.13\text{mA}/\text{cm}^2$) の定電流モードで駆動した。

結果と考察

図1にシミュレーションによって得られたTRIS及びプロトンの濃度プロファイルと電位勾配の時間変化を示す。試料の中で最も移動度が小さいTRISは電圧印加直後に試料プラグ内で2つのピークに分裂する(図1b)。リーディング側のピークは濃度界面で濃度調節されながら注入プラグから出ていくが、ターミナル側のピークは移動せず、徐々にそのピーク高さが減少するのみである(図1c)。15秒後、TRISがテーリングしており、さらに注入ゾーン内にTRISのピークが残存している(図1d)。20秒後、注入ゾーン内のTRISのピークは消滅したが、テーリングはなお存在している(図1e)。電位勾配検出器では一つのゾーンを形成しているが、実際には試料ゾーンの後ろ側にできるテーリングは時間が経過しても残り続ける(図1f)。従って、分取の際、注入ゾーン中のピーク及びテーリングのために回収率が低下する。この現象を確認するために、走査型UV検出器により、試料ゾーンのゾーン形状を確認した(図2)。シミュレーションの結果から期待されたように、泳動開始から48分後において観測されたTBのゾーンはテーリングを起こしており、時間とともに減少する。しかしながら、72分後でも完全に消滅することはなかった。これはノイズレベルと比較して、十分有意であった。また、このテールはシミュレーションと同じく時間とともに減少した。

本講演では回収率の低下について、その原因についてさらに詳しく報告する。

参考文献

- 1) P.Bocek, P.Gebauer and M.Deml, *J.Chromatogr.*, 219, 21(1981).
- 2) 森脇俊貴、育田夏樹、西山文隆、廣川健：第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, 21(1997)
- 3) N.Ikuta and T.Hirokawa, *J.Chromatogr. A*, 802,49(1998).

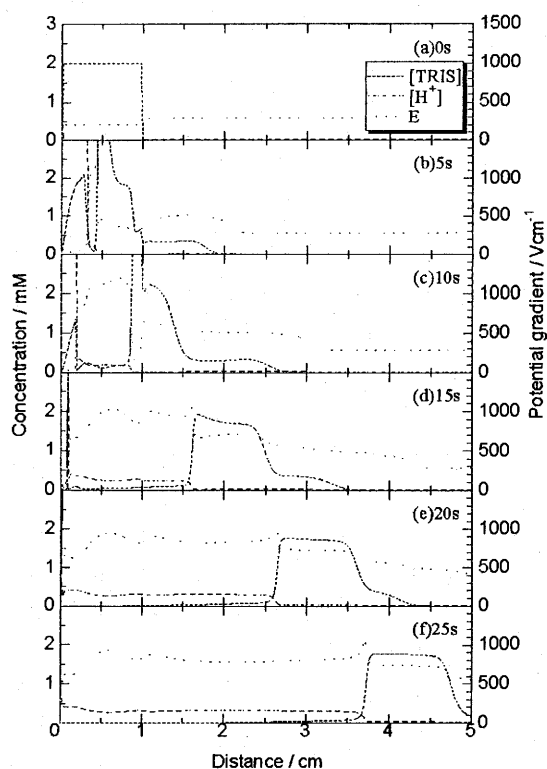


Fig.1 シミュレーションにより得られた $[H^+]$, $[TRIS]$ および電位勾配のプロファイルの時間変化

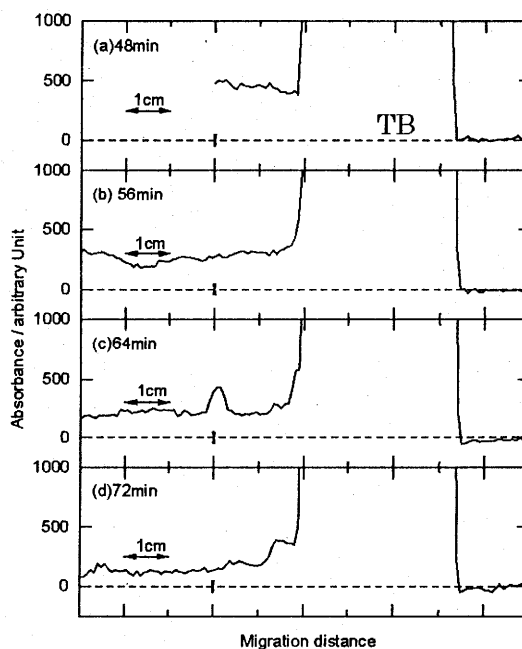


Fig.2 走査型UV検出器により得られたTBのプロファイル。ベースライン上の矢印はノイズレベル。

キャピラリーゾーン電気泳動の泳動時間に対する組成効果(II)

(広島大・工) 廣川 健*, 育田夏樹

Constituent Effect on the migration time in CZE(II)

Takeshi Hirokawa* and Natsuki Ikuta

Applied Physics and Chemistry, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Abstract

A CZE system may be easily perturbed by the sample constituent, because the electrolyte system is simple and it has no concentrating effect. For this reason, potential gradient of the separation field varies depending on the sample constituent, which sometimes causes bad reproducibility of migration time. In this paper, concentration dependence on the migration time of sample components is studied in detail when CZE is applied to the analysis of minor elements in a sample containing matrix component. Used samples were a test mixture of equimolar rare-earth metal ions and a model mixture of xenotime ore.

1. 緒言

キャピラリー電気泳動法(CE)はゼロエミッションを指向できる迅速かつ高感度な分析法として重要である。最近の自動化装置の性能は非常に高く、同一試料の繰り返し測定においては非常に良好なCV値が容易に得られるようになっている。しかしながらCZEモードにおいては、同じ成分を含む試料であっても、濃度が異なったり、同時に他の成分を多量に含み組成が異なる場合、標品とは異なる泳動時間を示すことが多く、定性・定量共に分析精度低下の原因となる。演者らは最近この問題を詳細に検討した結果、これは使用するハードウェアに依存するものではなく、「電位勾配の緩和効果」と名付けた試料プラグの性質に起因する原理的な現象である事を見いだした。

CZE系では電位勾配が常にキャピラリーのどの部分でも平均電位勾配(印加電圧/キャピラリー全長)に等しければ、泳動時間の再現性は保証される。しかし実際にはこのような事はない。電位勾配の緩和効果とは、泳動初期に試料プラグ部に極めて高電位勾配の過渡的ゾーンが生成し拡散していく間に分離場の電位勾配が変化し、再現性不良の原因となる現象を言う。本研究では特に大量のマトリックス成分中の微量成分の分析をCZEで行うとき、どのように泳動時間が試料に依存するか、モデル混合物のコンピューターシミュレーションと希土類試料の実験の両面から検討した。

2. 実験

シミュレーションには当研究室で作製したソフトウェアを使用し[1]、4種のカチオン(0.3-30mM、K, Li, クレアチン, モデル試料)と非イオン(3mM)を含む模擬試料を使用し濃度効果を検討した。計算条件を表1に示した。希土類分離実験の試料としては等モル希土類16種のテスト混合物およびゼノタイムモデル試料(主成分Y)を使用した。移動度への変換のため、K, LiおよびTPA(tetrapropylammonium ion)塩を参照用に添加した。CE装置としてはCAPI-3100を、分離用電解液系としては α -ヒドロキシイソ酪酸を主成分とする希土類分離用電解液を使用した。ゾーンの検出にはクレアチニンのUV間接吸収を利用した。

3. 結果と考察

電位勾配の緩和効果による泳動時間の遅れは、試料濃度が高く、しかも支持電解液と組成が異なるほど、また試料プラグ長が長いほど明瞭に現れる。図1は同じ成分を含む試料（試料プラグ長5mm）であるが、低いピークは試料濃度が0.3mM、高いピークは30mMである。図中の点線は試料プラグ長が2mmで試料濃度が全て0.3mMの時のピーク位置であり、プラグ長が長くなり、高濃度になるほどピークがずれてきている事が良くわかる。これは全て電位勾配の緩和によるものである。

このような泳動時間の試料濃度依存性を補正するため、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方法を開発した。この変換によると緩和効果による泳動時間の遅れ (τ) や分離用キャピラリー内での温度上昇が補正できる。この様な変換は定性分析のみならず定量分析についても有効であり、解析用ソフトウェアを開発して実用に供している。

図2に示した希土類試料のフェログラム（等モル希土類およびゼノタイムモデル試料）は時間軸を横軸とする実測フェログラムをもとに、25℃における移動度を横軸とするフェログラムに変換したものである。我々は既にいくつかの変換方法を提案済みであるが、ここでは「仮想的浸透流法」を用いた。

図1より、ゼノタイムの主成分以外の微量成分を定量するためには多量の試料を導入する必要がある事、および TPA の前後で成分の泳動挙動が異なる事が明らかである。TPA はそのピークの形状から泳動バッファー中のカチオン成分であるクレアチニンと同じ移動度である。TPA の移動度以上の成分の定性に問題はないが、TPA 以後検出される成分に明瞭な試料濃度依存性が認められ、参照試料との単純な対応によってのみは定性分析が不可能であることがわかる。これはある程度までは電位勾配の緩和で説明できるが、さらに他の現象（疑似等速電気泳動？）が分離仮定で起こっているためではないかと考えられる。講演ではより高濃度の試料のシミュレーションを含め報告する予定である。

[1] N.Ikuta and T.Hirokawa, *J.Chromatogr. A*, 802,49(1998).

表1 シミュレーションの条件

Capillary length	40 cm
detection point	40 cm
Applied voltage	30 kV
Average potential gradient	750 V/cm
Plug length	0.2 cm, 0.5cm
Mobility of EOF	$30 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{Vs}$
Cell length (dx)	0.02 cm, 0.025cm
Time increment (dt)	$1 \times 10^{-3} \text{ sec}$
Diffusion coefficient	$0 \text{ cm}^2/\text{s}^{-1}$
Migration time	200
Calculation time	27hrs(dx=0.025cm)
CPU	Pentium II 450MHz

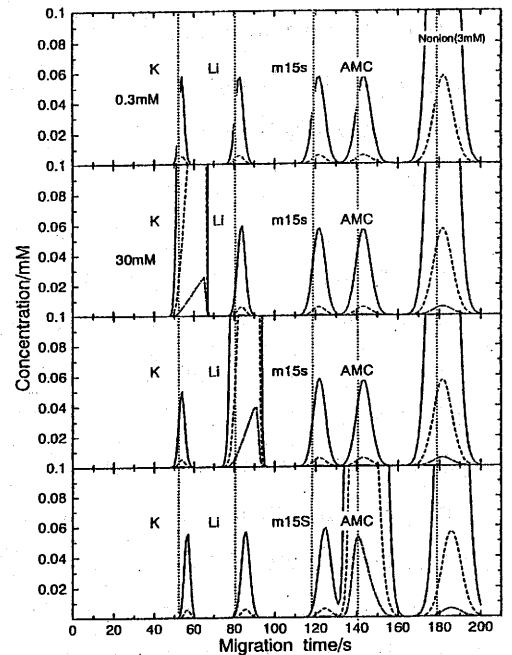


図1

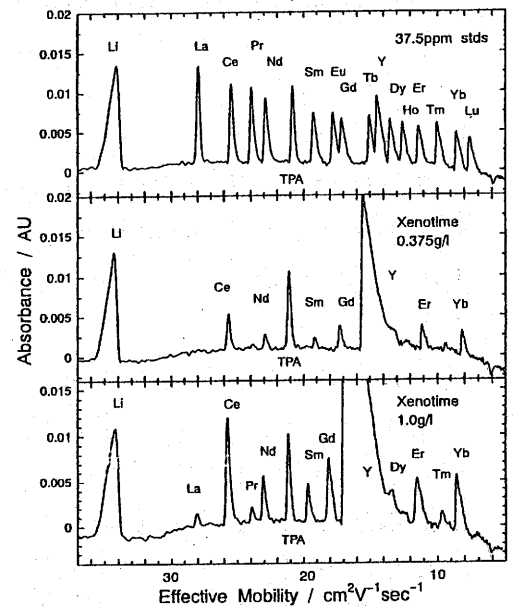


図2

オンライン電気泳動濃縮によるキャピラリー電気泳動分析 の濃度検出感度の向上

笠島崇功、呉 行正*
福井大・工

Improvement of Concentration Detection Sensitivity for Capillary Electrophoresis with On-line Electrophoretic Concentration Method

Takanori Kasasima, Xing-Zheng Wu*

Department of Materials Science and Engineering, Faculty of Engineering, Fukui University, Bunkyo 3-9-1, Fukui-shi, 910.

Abstract

One problem in UV absorbance detector for capillary electrophoresis (CE) is low concentration sensitivity due to the short pathlength. We have proposed an on-line electrophoretic concentration method for CE. In our previous work, a short semipermeable hollow fiber was connected to the inlet end of a capillary. When a sampling electric field was applied across one part of the hollow fiber, protein cations could not pass through the hollow fiber, and thus stopped in the hollow fiber, i.e., protein cations were concentrated in the hollow fiber. In this work, we have improved the connection method between the hollow fiber and the inlet end of the capillary. Factors affecting the on-line concentration effect, such as the concentration electric field, pH of buffer solution, are also investigated. Three 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。

我々はキャピラリーの試料注入端に膜チューブをつなぎ、試料をその膜チューブ内に濃縮するというCEの新規オンライン電気泳動濃縮法を提案した¹⁾。このオンライン電気泳動濃縮法により、蛋白質試料のCE濃度検出感度を大いに向上できることをすでに明らかにした。本研究では、キャピラリーの試料導入端と膜チューブとのカップリング法を改良し、濃縮結果の再現性を向上した。また、濃縮効果に影響する実験要素も検討した。

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。キャピラリーの試料導入端は図1に示す。キャピラリーの先端をまず40% HF水溶液で1.5時間エッチングし、外径を細くした後、透析膜チューブ(i.d.:0.2 μ m、長さ4 μ m)に差し入れ、接着剤で固定した。キャピラリーの試料注入端に固定された透析膜チューブををV型ガラス管に挿し入れ、同様に接着剤で固定した。そのV型ガラス管にも緩衝液を満たし、白金電極も設置した。試料を注入するとき、V型ガラス管と試料バイアルとの間に注入電圧(数10Vから数百Vまで)を一定時間印加し、試料を透析膜内に濃縮させた。試料を濃縮した後、V型ガラス管を緩衝液バイアルに差し込み、キャピラリーのもう一端との間に電圧10KV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型ガラス管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。本実験では、通常の落差法によるモデル蛋白質試料のCE濃度検出下限は 10^{-2} mg/mlであるが、オンライン濃縮法では 10^{-4} mg/mlモデル蛋白質試料を簡単に検出できる。また、緩衝液のpH、注入電圧(注入電流)等の実験条件の濃縮効果への影響も検討した。

1) X.-Z. Wu, A. Hosaka, T. Hobo, Anal. Chem., 70, 2081 (1998).

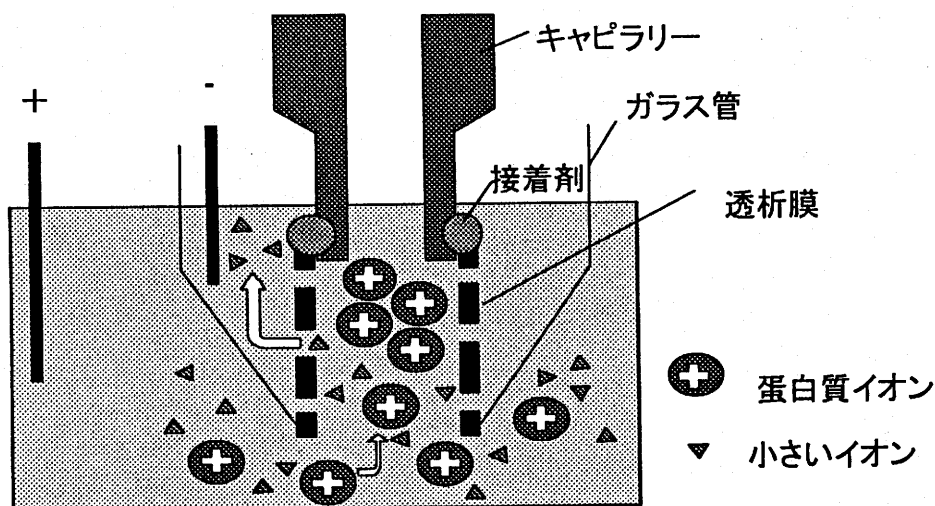


図1 改良後のキャピラリーと透析膜との接続

マイクロ加工技術を用いて作製した フリーフロー電気泳動モジュール

田島 信芳*, 鈴木 浩文, 篠原 悦夫, 狩野 恭一
オリンパス光学工業(株) バイオメディカルリサーチセンター

Free flow electrophoresis module fabricated by use of microfabrication technologies

Nobuyoshi Tajima*, Hirobumi Suzuki, Etsuo Shinohara and Kyoichi Kano
Biomedical Research Center, Olympus Optical Co., Ltd.

Abstract

Free flow electrophoresis (FFE) module for separation DNA from other contaminants was prepared in Pyrex glass substrates using microfabrication technologies. The size of the module was 66x70mm, in which 47x40mm electrophoresis bed with 10 or 50 μm deep flow gap was constructed. Seven inlets of buffer solution, one inlet of sample and 30 outlets were formed on the module. Two gold wire electrodes were fixed to the both edges parallel to its flow direction. To investigate its function a mixture of genomic DNA, plasmid, albumin and globulin was applied to the FFE with 1kv at a flow rate of 10mm/sec. The genomic DNA, plasmid were recovered from outlet No. 5&6, albumin from No. 6&7 and globulin from No. 7&8.

1. はじめに

遺伝子解析や遺伝子診断には、蛋白質などを含む試料からDNAを分離抽出する前処理技術が必要不可欠である。我々はDNAを高速に分離・分取することを目的に、半導体の微細加工技術を応用して、電気泳動層に試料とバッファを連続的に注入しながら分離・分取を行うフリーフロー電気泳動(FFE)モジュールを試作した。FFEは、これまで宇宙実験用の分離・精製装置としての検討や¹⁾、マイクロ加工技術を応用したシリコンウエハーとパイレックスガラスからなるFFEモジュールの試作検討が報告されている²⁾。シリコンウエハーは製作が容易な反面、電流のリークが問題となる。我々は全てパイレックスガラスからなるFFEモジュールを試作し、DNAの分離検討を行った。

2. 実験

試作したFFEモジュールの概要をFig.1に示す。FFEモジュールのサイズは66×70mmであり、電気泳動部として47×40mm、深さ10～50 μm の溝を加工したパイレックス基板と、溝のふたとなるパイレックス基板とを接合して構成される。泳動バッファの注入口7個、DNAを含んだ試料の注入口1個、及び30個に分岐した液の排出口を有し、注入口と排出口の間の両端に金ワイヤーからなる電極2本を有する。液の流路となる溝はアモルファスシリコンをマスクとしてウェットエッチングにより形成し、パイレックスガラス同士の接合はアモルファスシリコンを接着層として陽極接合法により接合した。

分離操作は予めバッファ注入口から一定流速でバッファを流して排出口への液の流れを作り、試料注入口からDNAを含んだ試料を注入する。2本の電極間に電圧を印加すると試料に含まれる物質は、電気泳動の原理によって正負いずれかの電極側に泳動分離しながら排出口に到達する。従って、特定の排出口より液を取り出すことにより試料の分取が行える。

モジュール内におけるバッファとサンプルの流れは、サンプルとして色素を注入しモジュール上部に設置したビデオカメラによる流れの観察、及びコンピュータによる流体解析にて評価した。流速は約10mm/secで行った。DN

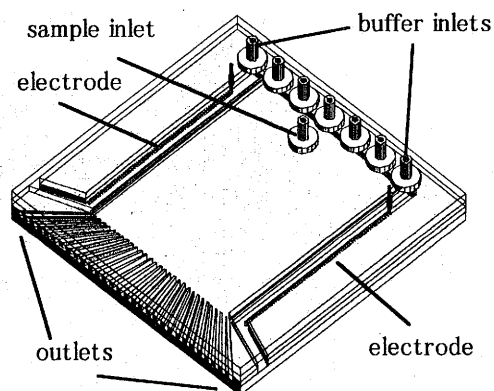


Fig.1 Overview of free flow electrophoresis module :size 66x70mm, the electrophoresis bed, 47x40mm and 10 or 50 μm deep gap

A 混合サンプルの分離評価は、各分取口からの流出液を色素で染色して蛍光及び吸収強度からDNA及びタンパクの濃度を測定した。また、ゲル電気泳動にて詳細な評価を行った。

3. 結果と考察

試料としてキシレンシアノール色素を流した場合、色素は電圧の印加に伴って電気浸透流により陰極側に移動し、電圧の増加により移動距離も増加した (Fig.2)。印加電圧を上げると陰極へ泳動は大きくなった。また、色素はバッファーと混合することなく、排出口に流出することがわかる。この現象は μ -fluidics と呼ばれる微小空間における流体の特徴であり、低レイノルズ数 (本装置では 2~10) では流れが強い層流となり液体が混合しにくい状態が生じるためである。流体解析ソフトを用いモジュール内の流れを解析した結果、バッファー注入口から排出口に向かって直線的な流れが実現できていることが分かった。

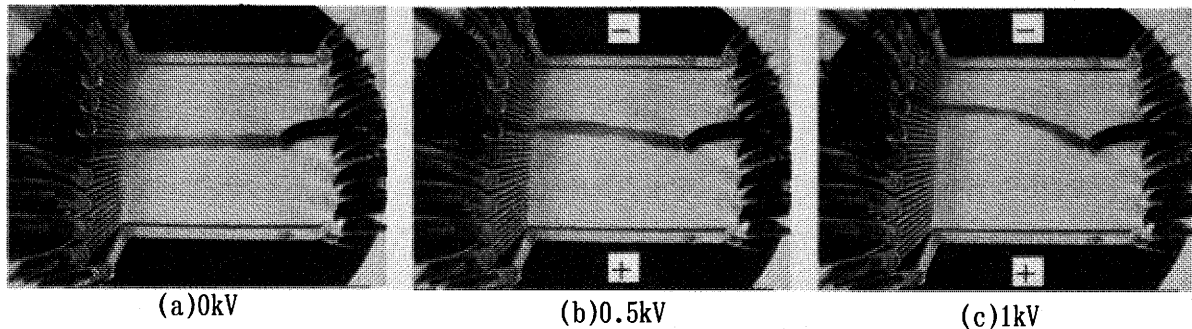


Fig.2 Photographs of actual flow

flow speed: 10mm/sec., dye: Xylene cyanol, applied voltage (a) 0kV, (b) 0.5kV and (c) 1kV

ゲノムDNA、プラスミド、アルブミン、グロブリンの混合サンプルを調製し、FFEモジュールでの分離評価を行った。バッファーにはTris-HClバッファー (pH8) を用い、印加電圧は1kVとした。各分取口からの流出液のDNA濃度は、エチジウムブロマイドにて染色し620nmの蛍光強度から測定した。また、蛋白質濃度はクマシーブリリアントブルーにて染色し630nmの吸光度から測定した。Fig.3に示すように、DNAは陽極側の分取口No.5,6に、蛋白質は陰極側の分取口No.6~8に流出した。ゲル電気泳動にて分析した結果、分取口No.5,6にはゲノムDNA、プラスミドが、分取口No.6,7にはアルブミンが、分取口No.7,8にはグロブリンが流出していることがわかった。

DNAと蛋白質は等電点が大きく異なるため、電気泳動による泳動方向及び泳動速度が異なってそれぞれが分離して流出する。蛋白質はその種類によっても等電点が異なるため、各蛋白質が分離して流出した。DNAの等電点はpH2前後のためpH8ではマイナスに強く荷電しており、蛋白質とは逆方向に泳動し分子量に依存せず同一排出口から流出した。

本検討から、FFEモジュールは前処理技術においてDNAを取り出す有効な手段であることが明らかとなった。

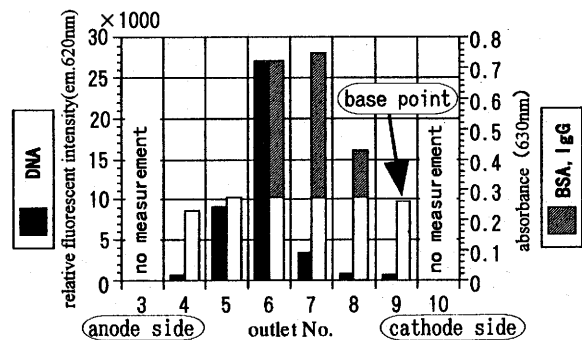


Fig.3 Fractions recovered from outlets

- sample: genomeDNA (1mb/ml): BSA (10mg/ml): IgG (10mg/ml) = 4:1:4
- buffer: Tris-HCl (1mM) pH8
- applied voltage: 1kV

5. 謝辞

本研究開発は、オリンパス光学工業 (株) がNEDOから委託を受けた「高感度DNA光検査装置の開発」として、実施したものである。

6. 文献

- (1) 佐藤龍也, 辻政俊, 横田明俊, 竹内範雄, 他, 第17回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1997) 41
- (2) D. E. Raymond, A. Manz, and H. M. Widmer, Anal. Chem. 66 (1994) 2858.

電気泳動用チップ - 微小リザーバにおける電気分解の影響について

阿部 浩久*、西本 尚弘、叶井 正樹、中西 博昭
(株)島津製作所 基盤技術研究所

Microchip CE - Studies on effects of electrolysis at small reservoir

H.Abe, T.Nishimoto, M.Kanai and H.Nakanishi

Technology Research Laboratory, Shimadzu Co.

ABSTRACT

Effects of electrolysis at small reservoir on a microchip, which have been fabricated in small size on quartz substrates, are investigated. The electrolysis of buffer leads to variation of migration time. To improve this CE system, we examined various factors (i.e. EOF, reservoir volume and buffer concentration), and tried to optimize design of the microchannel.

1. はじめに

近年、マイクロマシニングの技術を利用しガラス基板の上にキャピラリを形成し、これを電気泳動に用いる試みが多数なされている。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でなく非常に優れた性能を合わせ持つ。

チップは従来のキャピラリのようにポリイミドの被覆を必要としないため熱伝導性に優れ、電気泳動により発生するジュール熱を効率よく放熱できる。このため、より高い電圧で電気泳動が可能となり、分析時間の短縮が図れる。

また、マイクロマシニング技術で作製されるキャピラリは、長さやLIF装置での検出位置を μm 単位で厳密に設定でき、分析再現性の向上が期待できる。さらに自由なデザインの流路を設計することが可能であり、十字にクロスした流路を用いることで、数十 μl という微量なサンプルを定量的に簡便に導入したり、多数の流路を小さなチップの上に形成し同時に多数のサンプルを分析することも可能になってきた。

しかし、小さなチップの上に作製されるリザーバ体積は、数 μl 以下と非常に微少である。そのため、電気泳動中に泳動液の組成が電気分解により変化し、分析に影響を与える。この影響について考察し、分析条件の最適化を試みたので報告する。

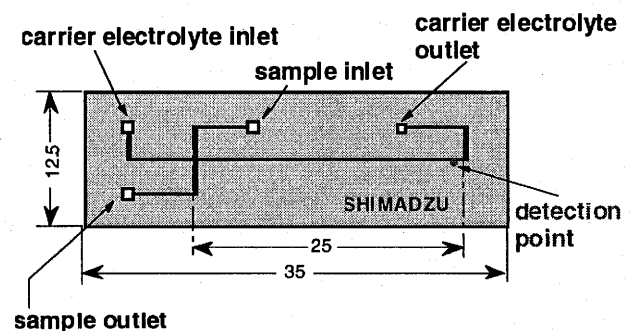


Fig.1 電気泳動用チップ構成図

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石英で作製したり。このチップに各種緩衝液を満たし、リザーバ部には $1\mu\text{l}$ の緩衝液を満たした。この状態でリザーバ内に白金線を挿入し、 1kV (0.25kV/cm)の電圧を印加し流れる電流を測定した。

3. 結果と考察

実際に電気分解によって生じる化学種は緩衝液の組成によって異なり種類も多いが、簡単のために水の電気分解のみを考える。このモデルでは、+極では H^+ が-極では OH^- が生成する。この2種のイオンの移動度は他のイオンに比べ飛び抜けて大きく流路の電気抵抗に大きく影響するだけでなく、流路内面の ξ 電位を動かし電気浸透流を変化させるため分析結果に強く影響すると考えられる。

以前、我々が報告してきた電気泳動の系²⁾においては、電流値が小さく電気分解の影響を受けない。具体的には、 50mM Tris-ホウ酸緩衝液を用いる場合、電流値はほぼ $0.6\mu\text{A}$ であるから30秒間の電気泳動でリザーバ中に生成する H^+ (OH^-)の量は約 0.2nmol となる。これは、 $1.0\mu\text{l}$ のリザーバ中では 0.2mM に相当するが、緩衝液の濃度(50mM)から考えて十分に緩衝できる量である。この結果は、実際の泳動電流が安定していることから確認できる(Fig.2-A)。

一方、 20mM リン酸緩衝液を用いると、電流値はほぼ $5\mu\text{A}$ であるから30秒間の電気泳動でリザーバ中に生成する H^+ (OH^-)の量は約 2nmol となる。これは、 $1.0\mu\text{l}$ のリザーバ中では 2mM に相当し、実際の電気泳動中の泳動電流の変化として観測され(Fig.2-B)、分析結果に悪影響を与える。

この泳動電流の変化は、リザーバ内で電気分解によって生じたイオン移動度の大きな H^+ (OH^-)が、電気浸透流によってキャピラリに流れ込むために起こると考えられる。これを防ぐには、リザーバの容量と緩衝液の濃度を分析条件に合わせて適切にコントロールする必要がある。また、流路内面をアクリルアミドで被覆し電気浸透流を抑制することによって、電気分解の影響を抑制できる(Fig.2-C)。さらに発表では、流路デザインによる改良についても報告する。

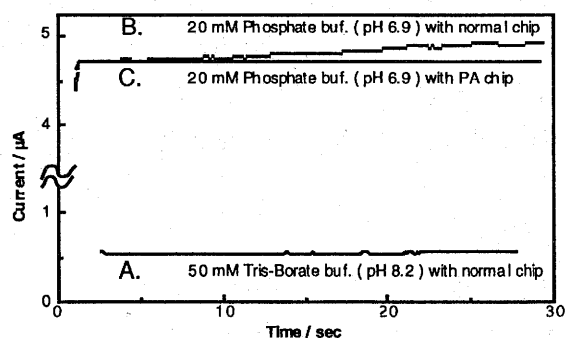


Fig.2 泳動条件による電流変化

4. 文献

- 1) 中西博昭, 阿部浩久, 西本尚弘, 荒井昭博, 分析化学, 47(6), 361-368(1998)
- 2) 阿部浩久, 西本尚弘, 叶井正樹, 中西博昭, 第59回分析化学討論会要旨集, 130(1998)

カラム内化学処理によるキャピラリー電気クロマトグラフィー用カラムの調製

鈴木 茂生*、桑原 ゆり、牧浦 恭子、本田 進
近畿大・薬

Preparation of Columns for Capillary Electrochromatography by In-column Chemical Treatment

Shigeo SUZUKI, Yuri KUWAHARA, Kyoko MAKIURA, Susumu HONDA

ABSTRACT

One of the most serious problems encountered in capillary electrochromatography (CEC) is the lack in suitable packing materials. We tried to prepare various kinds of columns of chemically bonded silica by pumping a solution of silylating reagent through a bare silica-packed column thermostated at 110°C. This is an efficient method to provide desired columns, since the reactions were complete within 1 hr in all cases. We present some applications of these columns for the analysis of various compounds. We also discuss the effect of the pore size of silica base on the CEC 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、高速液体クロマトグラフィーとキャピラリー電気泳動を組み合わせた分離分析法として注目されている。CEC では充填剤表面で発生する電気浸透流によって移動相を送液するため、pressure drop による分離の低下がなく、3 μm 程度の粒径の小さなシリカ系充填剤が好んで用いられる。しかし、市販されている充填剤は種類が少ない上、end-capping により表面を不活性化した充填剤では十分な電気浸透流が得られない¹ため、CEC に用いることのできる市販の充填剤の種類は極めて限られている。そこで我々は、未修飾シリカを充填したキャピラリーを調製し、これに適当なシリル化剤の溶液を送液して目的のカラムを調製する、インカラム修飾法について検討した。

2. 実験

キャピラリーカラムの調製 シリカには Develosil silica(粒径 3 μm 、孔径 30 Å)、DaisoGel silica (粒径 3 μm 、孔径 60 Å および 300 Å)、Nucleosil silica(粒径 3 μm 、孔径 100 Å)および Hypersil silica(粒径 3 μm 、孔径 120 Å)を使用した。キャピラリーには内径 50 μm あるいは 100 μm 、外径 375 μm のフューズドシリカ管を用いた。長さ 40 cm に切断したキャピラリーの一端を Kitagawa らの方法²に準じて水ガラスを使って仮止めし、イソプロパノールを送液して内部を洗浄した。次にイソプロパノールに懸濁したシリカを 400 kg/cm² の圧力で充填した。得られたシリカゲル充填カラムを 110°C の恒温槽内にセットし、これに 2%濃度のシリル化剤を含む 0.5%酢酸-エタノール溶液を 400 kg/cm² の圧力で 1 時間送液した。シリル化剤としては、アミノプロピルトリメ

キシランやオクタデシルトリメトキシシリルプロピルジメチルアンモニウムなどを使用した。次いで、カラムをエタノールで洗浄後、水で置換し、充填層の両端をニクロム線で加熱することにより、フリットを設けた。カラムにはさらにアセトニトリルを送液した後、移動相で置換した。CEC 装置には Hewlett-Packard 社製 3D CE 装置を使用した。分析は 20°C で行い、芳香族化合物や糖誘導体の分離には HEPES 緩衝液-アセトニトリル、ジメチルフタレートとチオ尿素の分離にはリン酸-アセトニトリルを使用した。糖の PMP 誘導体化³ アルドペントース類(アラビノース、キシロース、リキソースおよびリボース)および糖タンパク質構成単糖(*N*-アセチルガラクトサミン、*N*-アセチルグルコサミン、ガラクトース、マンノースおよびフコース)の組合せについて検討した。糖試料(各 10 nmol)に 0.3 M NaOH および 0.5 M PMP メタノール溶液各 50 μ l を加えて 70°C で 30 分間加熱した後、0.3 M HCl を加えて中和し、過剰の試薬は酢酸エチルで抽出した。残渣は 50 μ l の水-アセトニトリル(1:1)に溶かし CEC の試料とした。

3. 結果および考察

インカラム誘導体化の条件検討 シリカカラムをオクタデシルトリメトキシシリルを使って修飾した際の経時変化を調べたところ、およそ 10 分間の送液で順相から逆相への変化がみられ、1 時間の処理で電気浸透流が観測できないほど遅くなったため、1 時間を反応時間とした。**孔径の影響** 種々の孔径をもつ未修飾のシリカカラムについて、DMP と TU の保持時間をもとに電気浸透流速、capacity factor および理論段数を調べた。その結果、電気浸透流は $30\text{\AA} > 60\text{\AA} > 300\text{\AA} > 100\text{\AA} > 120\text{\AA}$ の順となり、孔径の小さなものほど大きかったが、300 \AA は例外であり、孔の内部でも電気浸透流が発生するために再び大きくなった。保持は孔径の小さなものほど大きかった。一方、理論段数は充填の状態等に依存すると考えられるが、100 \AA 前後のシリカでもっとも良好であった。分離 未修飾シリカおよび種々のインカラム誘導体化を施したカラムを用いて種々の芳香族化合物や糖 PMP 誘導体の分離を試みた。得られた結果の一部を Fig. 1 に示す。一般に未修飾シリカでは 30 \AA の Divelosil silica で最もよい分離が得られたが、修飾シリカでは 100 \AA の孔径で良好な分離が得られた。

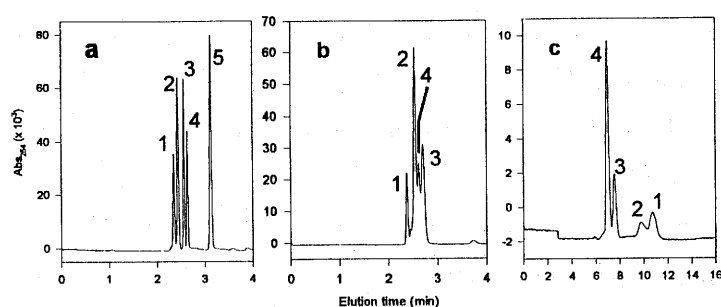


Fig. 1. Separation of some aromatic compounds by CEC. (a) Column: Divelosil silica (30 \AA , 100 μ m i.d., 25 cm), eluent: MeCN-50 mM HEPES, pH 6.0 (4:1), appl. volt.: 25 kV. (b) Column: Nucleosil aminosilica (100 \AA , 100 μ m i.d., 25 cm), eluent: MeCN-25 mM HEPES, pH 6.5 (2:1), appl. volt.: -25 kV. (c) Column: Nucleosil silica derivatized with cyclohexylamino-propyltrimethoxysilane, eluent: MeCN-25 mM HEPES, pH 6.0 (2:1), appl. volt.: -15 kV. 1 = 6-*tert.* butyl-*m*-cresol, 2 = 1-naphthol, 3 = phenol, 4 = benzamide, 5 = benzoic acid.

4. 文献

- 1) Zimina, T. M. et al., *J. Chromatogr. A*, **758**:191(1997).
- 2) Kitagawa, S. et al., *Chromatography*, **14**:39R (1993).
- 3) Honda, S. et al., *Anal. Biochem.*, **180**:351 (1989).

ポリマーチューブを用いるキャピラリーエレクトロクロマトグラフィー

櫻井政仁*、藤本忠蔵

Capillary Electrochromatography Using Polymer Tubes

Masahito Sakurai*, Chuzo Fujimoto

Hamamatsu University School of Medicine

Abstract

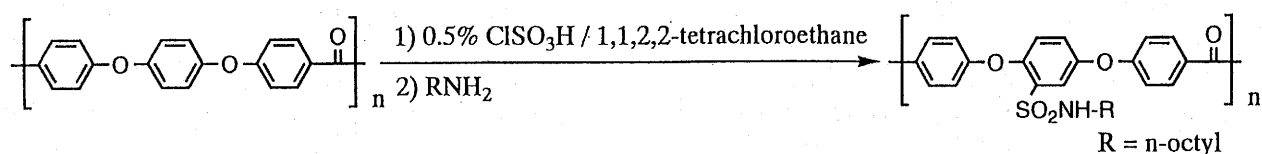
PEEK tubes were used for capillary electrochromatography. The tubes were sulfonated with 0.5% chlorosulfonic acid in 1,1,2,2-tetrachloroethane. After washing with 1,1,2,2-tetrachloroethane, the tubes were treated with n-octylamine over night. Prior to use, the tubes were rinsed with acetone, methanol and distilled water. A mixture of benzyl alcohol, benzaldehyde, benzene, toluene, and thiourea was separated with 50% acetonitrile in 2.5mM phosphate buffer.

1.はじめに

ポリマーチューブの内部に親水性のポリマーを結合したキャピラリーを用いる電気泳動法により、蛋白などの電荷をもつ化合物の分離例が報告されている。最近、未修飾の PEEK チューブを用いたキャピラリー電気泳動分離¹⁾が報告されている。本研究では、ポリマーチューブとして PEEK を使い、内部に疎水性のアルキル基を共有結合させ、電荷をもたない炭化水素化合物を分離することに成功した。

2.キャピラリー内部の化学処理

内径 130 μ m、全長 51cm の PEEK チューブを用いた。室温で 0.5% クロロスルホン酸の 1,1,2,2-テトラクロロエタン溶液でスルホン化し、その後 1,1,2,2-テトラクロロエタンで洗い、オクチルアミンを反応させ、スルホン酸アミドとした。これをアセトン、メタノール、蒸留水で洗い、キャピラリーカラムとして用いた。



3.分析

検出窓を付けるためにスルホンアミド化したPEEKチューブに、内径100 μ m、全長20cmのシリカキャピラリーを接続した。検出器は、JASCO 870-CE、インテグレーターはSic Labchart180、電源はMatsusada Precision Devices 製 HCZE-30PN 0.25-LD をそれぞれ用いた。

移動相として50%アセトニトリルの2.5mMリン酸緩衝液を用い、試料としてベンジルアルコール、ベンズアルデヒド、ベンゼン、トルエン、チオ尿素の混合試料を分析した。試料は電気法により注入し、分離は電圧20kV、電流6 μ Aで行なった。検出波長は215nmとした。

3.結果と考察

得られたクロマトグラムをFigure1に示した。

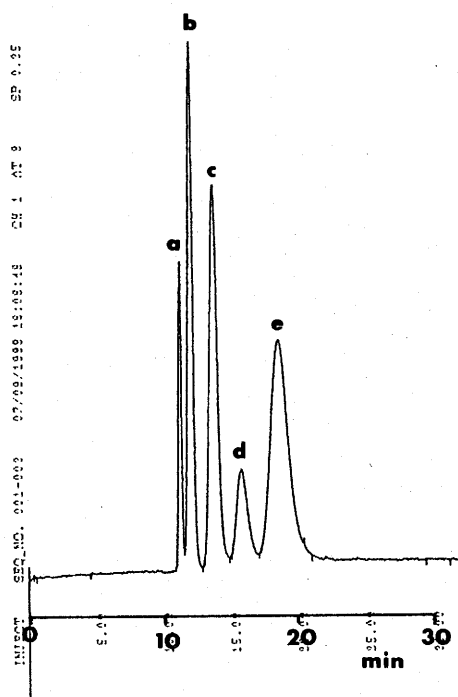


Figure1 Separation of a mixture of (a) thiourea, (b) benzylalcohol, (c) benzaldehyde, (d) benzene, and (e) toluene using 50% acetonitrile in 2.5mM phosphate buffer. V=20kV; I=6 μ A.

化学的安定性から考えてPEEKチューブの内部に疎水基を共有結合させるこの方法は、従来のシリカチューブを用いた場合に比べて、幅広いpHで分析が可能であると思われる。

今後は、内径が65 μ mのPEEKチューブを用い、アミンの炭素鎖数(R)を種々変え、さまざまな化合物の分離に最適な条件を探索していく予定である。

4.文献

- 1) P. J. Schneider and H. Engelhardt, J. Chromatogr. A, 802 (1998) 17.

多孔質シリカ連続体のCEC/HPLCへの適用

- 1) 永山 尚史*, 1) 小林 宏資, 1) 森本 尚夫, 2) 石塚 紀生, 2) 水口 博義
 2) 中西 和樹, 1) 池上 亨, 1) 細矢 憲, 1) 田中 信男
 1) 京都工芸繊維大学繊維学部 2) 京都大学大学院工学研究科

Application of Continuous Porous Silica Columns to CEC and HPLC

- 1) Hisashi Nagayama, 1) Hiroshi Kobayashi, 1) Hisao Morimoto, 2) Norio Ishizuka, 2) Hiroyoshi Minakuchi 2) Kazuki Nakanishi, 1) Tohru Ikegami, 1) Ken Hosoya, 1) Nobuo Tanaka
 1) Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology.
 2) Division of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University.

ABSTRACT

A continuous porous silica rod was prepared in a fused silica capillary, and examined in reversed-phase HPLC and CEC after octadecylsilylation. The silica rod prepared in the confined space possesses a double-pore structure with micrometer-size co-continuous through-pores and silica skeletons which have mesopores. The through-pore size is ca. $7\mu\text{m}$ and the skeleton size ca. $2\mu\text{m}$, and is larger than commonly found in a conventional continuous porous silica rod column prepared by PEEK coating (SR(PEEK)). The silica rod capillary ($100\mu\text{m}$ in diameter, 25 cm in length) produced 12000-4800 theoretical plates at the linear velocity of 0.6-3.8 mm/s in HPLC and 40000-20000 theoretical plates at the linear velocity of 0.4-1.4 mm/s in CEC for hexylbenzene in 90% acetonitrile.

1. はじめに

多孔質シリカ連続体カラムは、 μm サイズの巨大細孔(スルーポア)と10 nmサイズの細孔とをもち、シリカ骨格とスルーポアは連続的かつ周期的な秩序構造をもっている。従来の粒子充填型カラムと異なり、シリカ連続体においては骨格径とスルーポア径を独立して制御できるので低いカラム圧力で高性能分離が得られる。本研究では、この多孔質シリカ連続体をフューズドシリカキャピラリー中で調製し、キャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行った。

2. 実験

内径 $100\mu\text{m}$ 、全長35.5 cmのフューズドシリカキャピラリーを1N NaOH水溶液で満たし、3時間室温で処理した。キャピラリー内で多孔質シリカ連続体を合成し検出部を作製後(有効長25 cm)、ODS化を行った。CECにおいては50mM、pH 8.0のTris bufferとアセトニトリルとの混合溶媒を移動相とし、電圧は10~30kVの範囲で変化させた。また、HPLCにおいては、水-アセトニトリル混合溶媒を移動相とした。SECは、THFを移動相としてODS化前後で行い、ベンゼンの溶出体積をそのシリカ連続体キャピラリ

一カラム (SR (FS)-ODS) の全浸透体積とした。これらの結果を棒状シリカ連続体 (4.6 mm × 100 mm) をPEEKコーティングして得られたカラム (SR (PEEK)-ODS) についての結果と比較した。

3. 結果と考察

SR (FS) の切断面のSEM写真からSR (FS) のシリカ骨格とスルーポア径 (2 μm/7 μm) を測定した結果、スルーポアサイズがSR (PEEK) 系と比較して大きくなると同時に、部分的に非常に大きな空隙を与える傾向がみられた。SR (FS) についてODS前後のSEC (THF中) の結果をFig. 1に、90%アセトニトリル移動相中、CECとHPLCにおけるH-uプロットをFig. 2に示した。SECの結果は、SR (FS) が非常に大きな空隙率をもつことを示している。これは、キャピラリー内のシリカ連続体の合成において、キャピラリー内壁に結合したシリカ骨格が重合、熱処理によって収縮し、スルーポアサイズが大きくなったことによるものと考えられる。

圧力送液 (HPLC) において90%アセトニトリル中SR (FS)-ODSは、1 mm/s以下の低流速において、約20 μmの理論段高 (H) を与え、流速の増加に伴って、小さな骨格径 (2 μm) としては非常に大きな理論段高の増加を示した。一方CEC条件下においてはH = 7 μm (印加電圧 30kV) を与えた。HPLCとCECとの間の理論段高の差は、主にH-uプロットにおけるA項の寄与の差に起因している。一般的に粒子充填型キャピラリーカラムについて見られるCECとHPLCとの間の性能の差と比較して大きな差がみられたが、これはシリカ連続体キャピラリーカラムに存在する大きな空隙の寄与を示している。調製時のシリカ骨格の収縮を最小限とすることによりさらに高性能のカラムが得られるものと期待される。

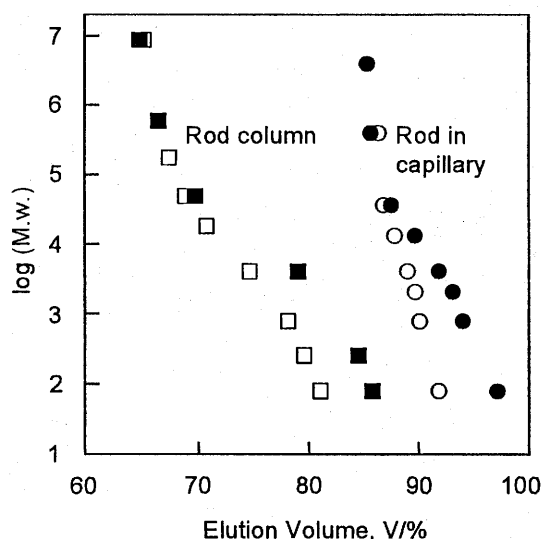


Fig. 1 キャピラリー中のシリカ連続体を与えるSEC校正曲線 (●, ■: ODS化前, ○, □: ODS化後)

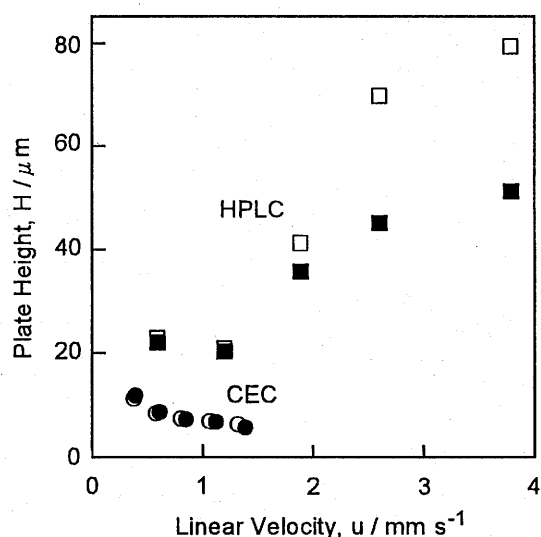


Fig. 2 90%アセトニトリル移動相におけるシリカ連続体キャピラリーについてのH-uプロット (ヘキシルベンゼン(●, ■), ベンツピレン(○, □))

錯体形成ゾーン電気泳動／イオン相互作用動電クロマトグラフィー複合モードによる糖誘導体の分離¹⁾

富樫一天*、多賀淳、上垣佳奈、本田進
近畿大・薬

Separation of carbohydrate derivatives by the combined modes of complexation zone electrophoresis and ion-interaction electrokinetic chromatography

Kazutaka TOGASHI*, Atsushi TAGA, Kana UEGAKI, and Susumu HONDA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

Abstract It is one of the advantages of capillary electrophoresis that it permits a number of separation modes using a common capillary. So far this advantage has been utilized to ensure reliable identification of solutes by accumulating data by single mode analysis for various separation modes. This paper further demonstrates the efficacy of compound mode analysis using complexation zone electrophoresis and ion-interaction electrokinetic chromatography as a model.

1. はじめに

キャピラリー電気泳動(CE)のもつ種々の特長の中で、1本のキャピラリーを用い多数の分離モードで分析できる点は他の分離分析法にない特長である。これまでのところ、この利点を生かすべく1つの試料に対して種々の分離モードを構築するという努力がなされてきた。演者らも糖質を対象とする約10種の分離モードを確立することができ²⁾、これらを同定のために有効に利用している。しかし、複数の分離モードを組み合わせた複合モードにより分離を改善するという考え方が組織的に検討されたことはないと思われる。本演題ではこのような考え方に立ち、複合モードの利点を追及するための基礎検討を行なった。

2. 実験

装置：CEはWaters Quanta 2,000装置に内径50 μ mのフューズドシリカキャピラリーを相着して行なった。試料導入は落差法(落差10 cm)により、検出は245 nmにおける紫外外部吸収により行なった。試料：単糖を既報³⁾に従い1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン(PMP)誘導体化して用いた。

3. 結果・考察

ホウ酸錯体としてのゾーン泳動(BO_2^- -CZE)

糖質はホウ酸などの酸素酸塩と反応して陰イオン性錯体を形成することはよく知られている。この性質を利用して糖質をホウ酸塩中でゾーン泳動(CZE)により分析すると、それらはホウ酸錯体として分離される⁴⁾。例えばアルドヘキソース類のPMP誘導体混合物をフュ

ーズドシリカ素管に陽極側から導入して電圧を印加し、陰極側で検出すると、Fig. 1 にみられるように各ヘキソース誘導体は互いに良く分離される。しかし、分析には約 60 min を要し、決して満足できる状況ではない。

Polybrene 添加によるイオン相互作用動電クロマトグラフィー (BO₂⁻-CZE/IIKIC)

Fig. 1 の系に陽イオン性ポリマーである Polybrene を添加した場合、電気浸透流は逆転するため、試料導入は陰極側から行ない検出は陽極側で行なはなければならないが、各ヘキソース PMP 誘導体は BO₂⁻-CZE の場合と異なる順序で移動し、移動時間はかなり短縮される。

隣接ヘキソース PMP 誘導体の分離度を Polybrene 添加時と無添加時について比較すると、Fig. 2 に示すようにいずれの組み合わせについても Polybrene 添加により大幅に改善されている。このモードでは陰イオン性のホウ酸錯体が泳動液中の陽イオン性の Polybrene とイオン相互作用する。ホウ酸錯体の移動速度は錯体の電荷/サイズ比やイオン相互作用の度合により左右されるが、錯体形成およびイオン相互作用の反応速度の違いも錯体の移動時間に影響を与えるものと考えられる。

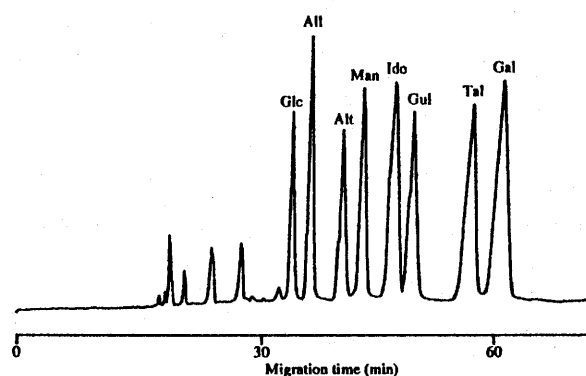


Fig. 1

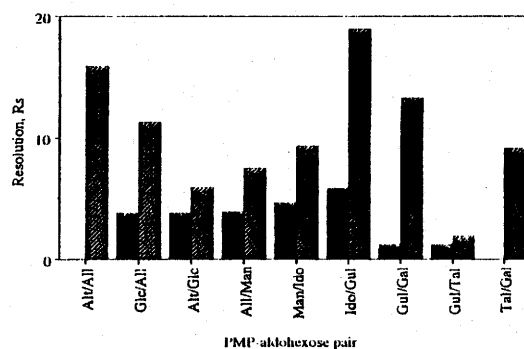


Fig. 2

Fig. 1. Separation of the PMP derivatives of aldohexoses by CZE as borate complexes. Capillary, 58 cm; running buffer, 200 mM borate buffer (pH 9.5); applied voltage, 15 kV. The sample was introduced from the anodic end.

Fig. 2. Comparison of the separation of the PMP derivatives of aldohexoses by CZE in a borate system (black bars, data taken from Fig. 1) and by CZE-IIKIC in a borate-Polybrene system (bars with slanting lines, 1% Polybrene was added to the running buffer in Fig. 1).

このように BO₂⁻-CZE の系に Polybrene を添加し IIKIC モードを追加して複合モードにすると、分離の様子が大きく変化し、条件を最適化することにより分離が改善できることが示された。このような考え方は CE において積極的に利用すべきであると考えられる。

4. 文献

- 1) S. Honda et al., J. Chromatogr. A, 805 (1998) 277.
- 2) S. Hoda et al., presented at 8th Internat. Symp. HPCE (Orlando, 1996).
- 3) S. Honda et al., Anal. Biochem., 180 (1989) 351.
- 5) S. Honda et al., Anal., Biochem., 176 (1990) 72.

DNA 固定化キャピラリーを用いた遺伝子分離システムの構築
(九大院工) ○尾崎祥久、片山佳樹、井原敏博、前田瑞夫

The development of gene separation system using the DNA immobilized capillary.
(Faculty of Engineering, Kyushu University) Yoshihisa Ozaki, Yoshiki Katayama,
Toshihiro Ihara, Mizuo Maeda

ABSTRACT

Novel capillary electrophoresis for gene analysis were developed using oligonucleotide immobilized capillary. Oligonucleotide(dT)₁₂ was immobilized onto the capillary inner surface, which had been modified with γ -methacryloyloxypropyltrimethoxysilane, by the copolymerization of acrylamide and vinyl-derivative of (dT)₁₂. Sharp peak of sample (dT)₁₂ were apparently detected. However peak of (dA)₁₂, which was complementary base sequence to (dT)₁₂, disappeared with containing Mg²⁺ in running buffer. This indicates that the (dT)₁₂ immobilized in the capillary served as an affinity ligand to (dA)₁₂ which has complementary sequence to (dT)₁₂.

1. はじめに

癌やその他の疾病の多くは、遺伝子の変異により引き起こされることが知られている。これら変異遺伝子を分離・分析する手法について、最近数多くの研究がなされているが、数多くある DNA 分析法の中でも高分離性能を誇る CE 法においてさえ、変異遺伝子の塩基配列を識別して分離する普遍的な手法は確立していない。我々は、DNA を塩基配列特異的に分離する手法を確立する為、新規 DNA 固定化キャピラリーを調整した。これを用い、キャピラリー内に固定化された DNA を遺伝子認識素子とするアフィニティーキャピラリー電気泳動法を開発した。

2. 実験

・キャピラリー内壁への(dT)₁₂ 固定化

アフィニティーリガンドとする(dT)₁₂ をキャピラリー内壁へ固定化するため、自動合成によって得られた 5'-O-aminohexyl (dT)₁₂ を、メタクロイルスクシンイミドと反応させ、(dT)₁₂-ビニル誘導体を合成した。キャピラリー中に(dT)₁₂-ビニル誘導体を固定化するプロセスは、キャピラリー内壁をポリアクリルアミドでコーティングする定法に準じて行った (Fig.1)。

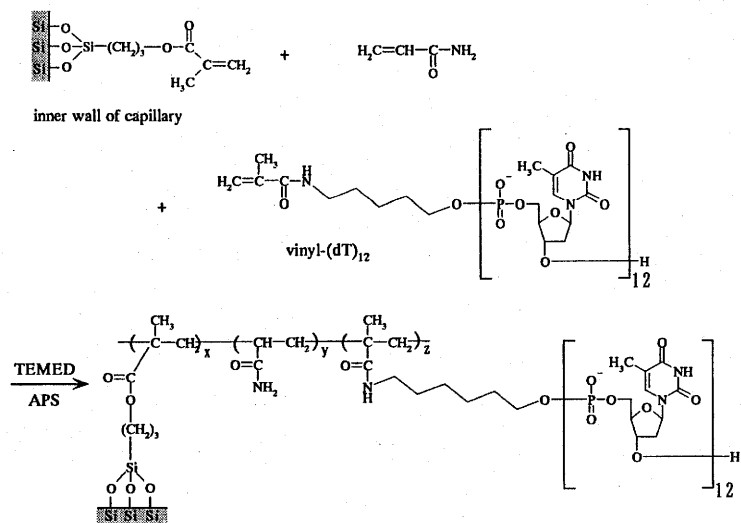


Fig.1 Scheme of (dT)₁₂ immobilization onto inner surface of capillary ; APS, ammoniumperoxodisulfate ; TEMED, N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine

・ (dT)₁₂-immobilized capillary を用いた (dA)₁₂ と (dT)₁₂ のアフィニティーキャピラリー電気泳動

得られた (dT)₁₂ 固定化キャピラリーを用い、各試料の電気泳動を行った。泳動緩衝液は所定濃度の MgCl₂ を含む 5mM Tris-11.5mM Borate 緩衝液を使用した。各試料溶液 (4.2 μM) を加圧法 (0.1kgf/cm², 1sec) により注入し、キャピラリーを所定温度 (25℃、30℃、35℃、40℃) に制御して、15kV の付加電圧により電気泳動を行った。電気泳動終了後、キャピラリー内を水で洗浄した後、再び泳動バッファを注入して平衡化し、次の電気泳動測定を行った。

3. 結果および考察

(dT)₁₂ と (dA)₁₂ をそれぞれ電気泳動した結果を Fig.2 に示す。(dT)₁₂ のピークは、どの MgCl₂ 濃度においても、いずれもシャープなピークであったのに対し、(dA)₁₂ は、MgCl₂ 濃度の増加に伴いピーク高さが減少し、500 μM でほぼ消失した。

1mM MgCl₂ を泳動緩衝液中に添加し、キャピラリー温度を変えて (dA)₁₂、(dT)₁₂ の電気泳動を行い、それぞれのキャピラリー温度に対し、試料の検出ピークの吸光度をプロットした (Fig.3)。(dT)₁₂ の吸光度は、どのキャピラリー温度においてもほぼ一定となった。これに対し、(dA)₁₂ の検出ピークは、キャピラリー温度 25 度で消失したが、温度の上昇に伴い、その吸光度は徐々に増大した後、一定となった。

一般的に、相補的塩基配列である ssDNA 間の二重螺旋の安定性は、水溶液のイオン強度 (特に Mg²⁺) や温度に大きく影響される。MgCl₂ 濃度が高いほど、また温度が低いほど、ssDNA 間の相互作用は強いことが、分光学的測定などにより確認されている。これらの知見を考慮すると、(dA)₁₂ を電気泳動した際の MgCl₂ 濃度やキャピラリー温度の影響は、(dA)₁₂ が内壁に固定化された (dT)₁₂ と相互作用し、相補的な塩基対水素結合により二本鎖を形成していることを示唆している。

本研究により、キャピラリー内壁に固定化した ssDNA は、試料の相補的な塩基配列を識別するアフィニティーリガンドとして作用することが分かった。本手法によれば、試料ピークの有無により、正常遺伝子と変異遺伝子を識別することができる。更に、本学会では、本分離手法により、癌遺伝子の一つである c-K-ras Codon12 の変異した塩基配列を含むヘテロオリゴマーの検出についても報告する。

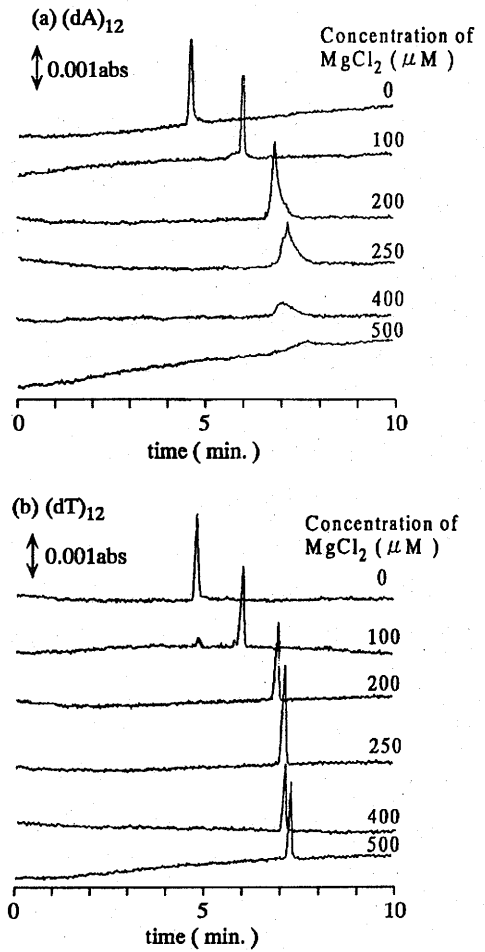


Fig.2 Electropherograms of oligodeoxy nucleotides using oligonucleotide-immobilized capillary.

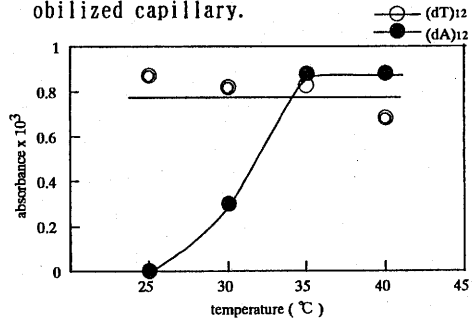


Fig.3 Effect of the capillary temperature on the peak height of oligodeoxynucleotides

蛍光イメージング検出法を用いたキャピラリー等電点電気泳動システムの構築とその評価

- 1) 松本浩幸*、牧野 強、津賀田貴子、石田雅之、高本尚宜
- 2) 志村清仁、笠井献一
- 1) 分子バイオホトニクス研究所
- 2) 帝京大・薬

Development and Evaluation of Capillary Isoelectric Focusing System with Fluorescence-Imaging Detection

- 1) Hiroyuki Matsumoto, Tsuyoshi Makino, Takako Tsugata, Masayuki Ishida, Hisayoshi Takamoto
- 2) Kiyohito Shimura, Ken-ichi Kasai
- 1) Laboratory of Molecular Biophotonics
- 2) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

We have developed a capillary isoelectric focusing system with fluorescence-imaging detection using micro channels formed by mechanical engraving and bonding of fused silica plates. A diode-pumped YAG laser (532 nm) was used as an excitation source. The laser beam was expanded and, then, focused into the micro channels by a cylindrical lens. The fluorescence image of the whole plate was captured by an ultra sensitive charge-coupled device camera. Focusing process of fluorescence-labeled peptides originally loaded throughout the channels into bright spots was observed continuously.

1. はじめに

レーザー励起蛍光検出法とキャピラリー等電点電気泳動法の組合せは超微量、高感度分離定量法としてきわめて有用である。その理由はレーザー励起蛍光法の高感度特性に加えて、等電点電気泳動法が試料の濃縮と分離を同時に行い得るからである。しかしながら、キャピラリー内に収束した試料成分の検出には検出部位まで試料を移動させる必要があり、その方法としては電極液を変えて電気泳動的に動かす方法と、圧力を加えて押し出す方法があるが、いずれも再現性の点から十分であるとは言い難い。キャピラリー全体が照明でき、さらに連続的な蛍光検出が可能となれば、収束した試料成分を移動させる必要がない上、収束する過程も観察することができ、多くの知見が得られるものと期待される。そこで我々は、石英基板中に微小流路を設け、流路全体を照明して蛍光検出を行うレーザー励起蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動のシステムを試作した。本発表ではこの試作した

システムを用いての基礎的検討結果について報告する。

2. 実験

縦25mm、横60mm、厚さ6mmの熔融石英基板中に長さ60mm、一辺が100 μ mの角柱状の微小流路を2本設け、流路内壁を直鎖状ポリアクリルアミドで被覆した。また、微小流路の洗浄や試料溶液の導入、さらには両端の電極槽への電極液の導入をバルブの切り替えで行えるように複数の送液ラインを接続したホルダーを考案した(図1)。試料として、われわれがこれまでに開発してきた蛍光標識ペプチドを用いての蛍光性pIマーカー数種類を用いた。微小流路に40倍希釈 Pharmalyte 3-10、0.1% Tween 20、5mM アルギニン、0.5%メチルセルロースを含む試料溶液を充填後、電極液として0.4%メチルセルロースを含む20mM H₃PO₄(陽極液)、20mM NaOH(陰極液)を用い、200V/cmの電圧で焦点化を行った。測定は光源として半導体励起YAGレーザー(532nm)を用いて微小流路全体を照射し、高感度CCDカメラにて撮像を行い解析した。

3. 結果と考察

熔融石英基板中に設けた微小流路中で試料が等電点収束する様子が時間を追って観察された。また、考案したホルダーも試料溶液や電極液を精度良く導入できた。今回試作したレーザー励起蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動システムは、高感度かつ迅速な分離分析装置として発展する可能性を秘めている。現在はさらなる高感度化を目指し、検出系を構築中である。

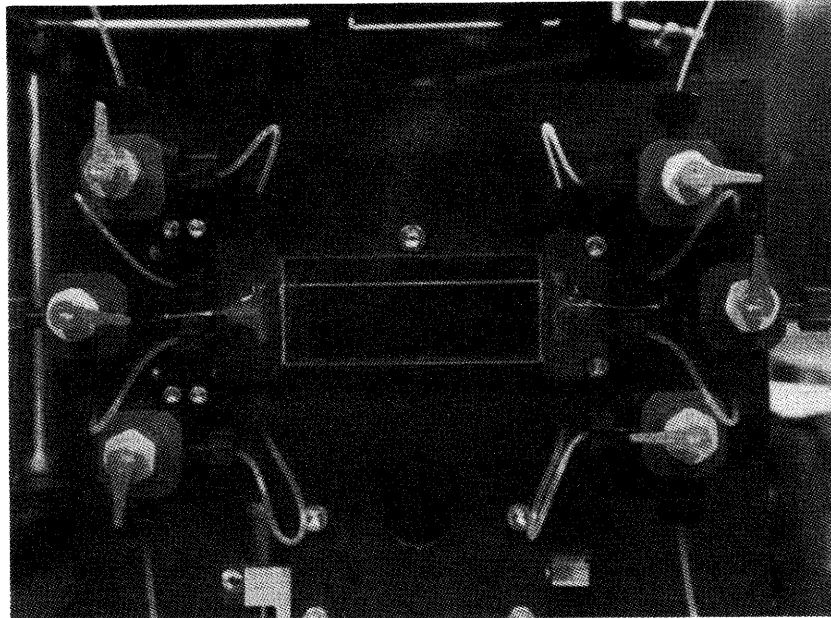


図1. 微小流路を設けた熔融石英基板と複数の送液ラインを有するホルダー
なお、2本の微小流路のうちの一本には色素が充填されている

*C.elegans*タンパク質塩析画分の
キャピラリー等電点電気泳動

○小林 英三郎*、関根 真紀、関根 晶紀

城西大学理学部 350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1

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

Hidesaburo Kobayashi, Maki Sekine and Akinori Sekine

Department of Chemistry, Faculty of Science, Josai University

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

Abstract

The marker peptides were the good results which provided a linear relationship between pI and migration time in short focussing time, 8 minutes. 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. It seem that the low concentration of methylcellulose (MC) for decreasing the viscosity of analyte solution was suitable for rapid estimation of protein pIs by cIEF.

はじめに

線虫 (*C.elegans*) のDNA全塩基配列100Mbの解析は1998年までに完了すると予測されている。神経、筋肉、生殖器など動物の基本体勢をもつこの虫の全遺伝子15,000のうち3分の2の解析が進行し、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と同時にプロテオーム研究の好材料でもある。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、タンパクマップの作成が急がれている。我々はこの目的を達成する手段として、高分離能を期待できるキャピラリー等電点電気泳動 (cIEF) を用いる迅速な等電点測定と、HPLC (イオン交換、疎水性クロマト) での分離およびMALDI-TOF/MSでの分子量測定との組み合わせによる多次元タンパクマップの作成を試みている。ここでは合成ペプチドをpIマーカー用い、迅速な等電点電気泳動の条件検討と線虫タンパク質等電点測定を試みた。

実験

ペプチドpIマーカー：次の各ペプチドを合成し、括弧内に示した志村らの報告¹⁾に基づく実測値をpI値として使用した。H-Trp-Asp-Asp-Asp-OH(3.38)、H-Trp-Glu-Glu-His-OH(4.28)、H-Trp-Glu-Arg-OH(5.91)、H-Trp-Glu-His-His-Arg-OH(7.27)、H-Trp-Tyr-Tyr-Tyr-Lys-Lys-OH(9.50)、H-Trp-Tyr-Lys-Arg-OH(10.17)

タンパク試料：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%塩析画分を等電点測定用試料とした。

キャピラリー等電点電気泳動：Beckman P/ACE 5010、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、泳動用液は粘度の異なるメチルセルロース (MC) 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

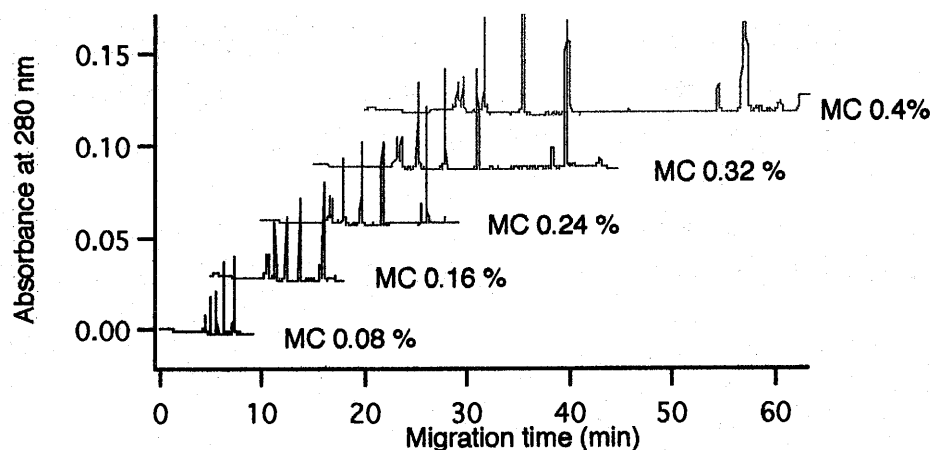


Fig. 1 A electropherogram of capillary isoelectric focusing of marker peptides on various concentration of MC.

入した。500 V/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 (280 nm) で検出を行った。

結果と考察

ペプチドマーカーは安定であり、MCの濃度が低いときはpIと移動時間との直線性は良好で且つ全分析時間が8分と迅速な測定が可能であった。しかしながら塩基性領域での直線性および酸性領域での移動速度の遅れはキャリアアンフォライトの組成に依存するものと考えられ、これらの領域の成分を強化する必要があると思われる。また、線虫粗抽出液のcIEFはメチルセルロースとの混合で粘性が高まり計測時間が長くなったと考えられるので分離に最適な粘度を持つ粘性剤の使用を検討している。

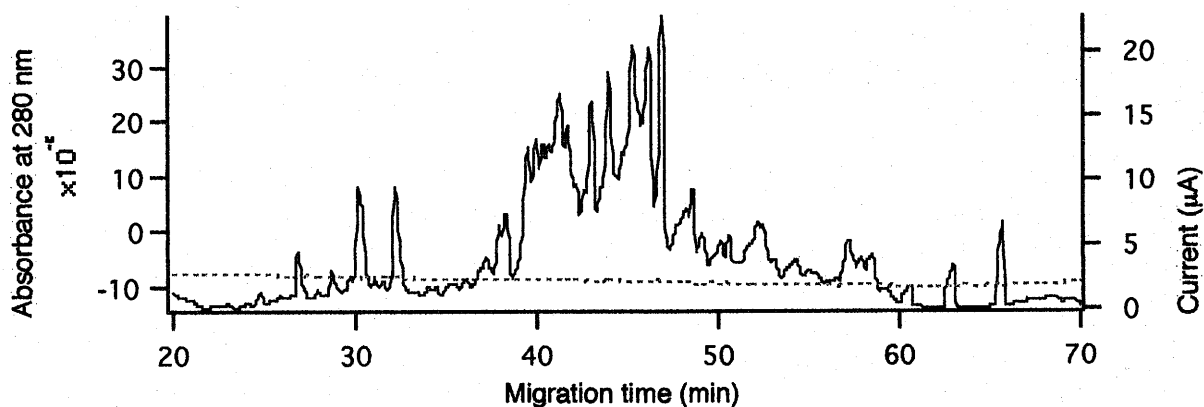


Fig. 2 A cIEF electropherogram at 280 nm and a current profile of the AS 60-90 fraction of *C.elegans*. Gel concentration was 0.4% of MC.

1) K. Shimura et al.

(Proceedings of The 17th Symposium on Capillary Electrophoresis, Tokyo 1997, pp 109-110)

蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動のための蛍光標識ペプチド性 等電点マーカー — システイン残基の標識

- 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

Fluorescence-labeled peptide pI markers for capillary isoelectric focusing with fluorescence detection - labeling at a cysteine residue

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

ABSTRACT

Because of focusing effect, capillary isoelectric focusing (cIEF) could be a highly sensitive separation technique for ampholytes, such as proteins and peptides. When analytes are labeled with a fluorescent dye and detected using laser-induced fluorescence, its sensitivity reaches to a level of several pM range even with a simple on-capillary detector. To explore the utility of the technique, we need fluorescent pI markers that calibrate the pH gradient formed in a capillary. Previously we reported fluorescence-labeled peptides as pI markers in which a tetramethylrhodamine dye was attached at the N-terminal amino group of peptides. In this report, we report another set of fluorescence-labeled peptide pI markers in which the dye is coupled at the thiol of a cysteine residue of synthetic peptides so as to harness the ionization of the N-terminal amino group for focusing in a pH gradient. The new set of the fluorescent pI markers covers a wider pH range of 3.64 to 10.15 with the largest interval of 0.7 pH unit. Branched peptides with two or three N-termini showed specific utility as pI markers in weakly alkaline region. These markers should facilitate the survey of the possibility of cIEF with fluorescence detection as an ultrasensitive separation method.

1. はじめに

キャピラリー等電点電気泳動 (cIEF) は焦点化の際の試料濃縮効果によって極めて高い感度が得られる。さらに、レーザー励起蛍光検出法を用いると比較的簡単な検出器でも数 pM の標識タンパク質やペプチドを分離検出できる。この方法をさらに発展させるには、キャピラリー内に形成された pH 勾配を知る必要があり、それには蛍光性の等電点マーカー (pI マーカー) が必要である。すでに、われわれはペプチドの N 末端アミノ基にテトラメチルローダミンを結合させた蛍光性 pI マーカーを報告した。今回、システイン 1 残基を含むペプチドを各種合成し、そのチオール基に蛍光色素を結合させた。これによって、N 末端アミノ基の解離反応も等電点への収束に利用できるようになる。これらの pI マーカーの調製とそれらの等電点決定について報告する。

2. 実験

ペプチドの標識 ペプチドの調製は受託合成サービスを利用した。市販の tetramethylrhodamine-5-iodoacetamide (Molecular Probes, T-6006) を逆相クロマトグラフィーで精製し、弱アルカリ性で小過剰量のペプチドに室温にて終夜反応させ、反応産物を逆相クロマトグラフィーにかけて、 A_{280} で検出した主ピークを標識ペプチドとして分取した。 **標識ペプチドの等電点決定** 両性担体としてファルマライト (2.5-5, 5-8, 8-10.5) 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。収束した

ペプチドの赤色バンドに pH 電極をあててゲル表面の pH を求め、標識ペプチドの pI とした。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、窒素気流下で行った。キャピラリー等電点電気泳動 内壁をポリアクリルアミドで被覆した内径 50 μm 、長さ 22 cm のキャピラリーを用い、両性担体としてファルマライト 3-10 を使って行った。500 V/cm の電圧で、5 分間焦点化後、同じ電圧を保ったまま陽極液槽を約 10 cm 持ち上げ、静水圧によって pH 勾配を陰極側に移動させ、陰極端より 2 cm の位置で、He-Ne レーザー (543.5 nm) で励起して 590 nm の蛍光によってペプチドを検出した。

3. 結果と考察

標識ペプチドの等電点の実測値を、各解離基の pKa 値から計算される予想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、いずれの標識ペプチドも鋭いピークを形成した (図 1)。

これらの標識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ので、蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動における有用な等電点マーカーになると思われる。

Table 1. Structures and isoelectric points of fluorescence labeled peptides.

No.	peptides	predicted pI	measured pI
46	Gly-Cys-Tyr-Lys-Arg	10.02	10.15
47	Gly-Cys-Tyr-Lys-Lys	9.76	9.93
48	Gly-Cys-Tyr-Tyr-Lys-Lys	9.52	9.7
45	Gly-Cys-Tyr-Tyr-Tyr-Lys-Lys	9.36	9.54
73	Gly-Cys-Lys-Lys-Lys-Tyr-Tyr-Glu-Glu-Tyr-Arg-Tyr-Tyr	9.1	9.22
74	Lys(Gly)-Cys-Glu-Tyr-Tyr-Lys-Lys-Tyr	8.56	8.78
76	Lys(Gly)-Cys-Glu-Lys(Gly)-Tyr-Tyr-Tyr-Lys-Lys-Tyr-Tyr	8.56	8.7
75	Lys(Gly)-Cys-Lys-Lys(Gly)-Glu	7.9	8.2
69	Gly-Cys-His-His-His-His-His-His-His-His-His	7.66	7.66
50	Gly-Cys-Glu-His-His-His-Arg	7.34	7.61
51	Gly-Cys-Glu-His-Arg	7.04	7.41
52	Gly-Cys-Glu-His-His	6.42	6.85
70	Gly-Cys-His-Glu-His-Glu-His-Glu-His	6.02	6.14
71	Gly-Cys-His-Glu-His-Glu-His-Glu-His-Glu	5.46	5.45
72	Gly-Cys-Glu-His-Glu-His-Glu-His-Glu-Lys-Glu	5.02	4.9
56	Gly-Cys-Glu-Glu-His	4.54	4.59
57	Gly-Cys-Asp-Asp-Arg	4.16	4.23
58	Gly-Cys-Glu-Glu	3.82	3.99
59	Gly-Cys-Asp-Asp-Asp	3.38	3.64

Labeling was at a thiol group of Cys. Lys(Gly) stands for N(epsilon)-glycyl-lysine.

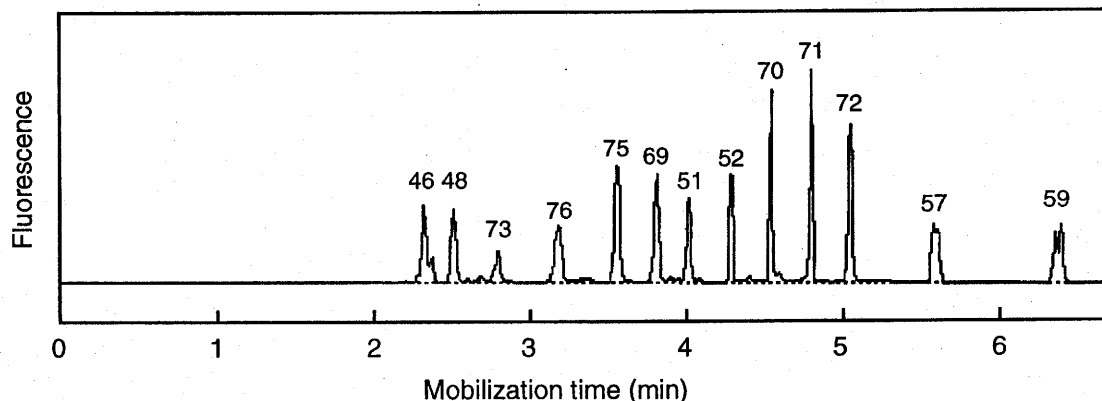


Fig. 1. Separation of 13 labeled peptides by cIEF (0.25 nM each).

アガロースゲル等電点電気泳動とキャピラリーSDS電気泳動の
組み合わせによる血漿タンパク質の2次元分離
向井 準*、水摩仁美、山口奈緒、猶原暢洋、真鍋 敬
愛媛大・理

Two-dimensional Separation of Human Plasma Proteins Combining Agarose Gel Isoelectric Focusing and Capillary SDS Electrophoresis

Jun Mukai, Hitomi Mizuma, Nao Yamaguchi, Nobuhiro Naohara, Takashi Manabe
Department of Chemistry, Faculty of Science Ehime University

ABSTRACT

Two-dimensional separation of human plasma proteins combining agarose gel isoelectric focusing and capillary SDS electrophoresis was examined. When compared with the results of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, better resolution was obtained for high molecular weight (above 70kDa) plasma proteins.

1. はじめに

当研究室ではこれまでに、線状ポリアクリルアミド(LPA)を支持体とするキャピラリー電気泳動で、SDS結合タンパク質を分子サイズの違いで分離する方法の条件を検討し、ヒト血漿タンパク質の分析に応用してきた。¹⁾ しかし、血漿タンパク質など複雑なタンパク質混合物のように、分子量が同程度のタンパク質が複数存在する場合、1次元の泳動パターンにおいて、それらのピークは重なってしまい1ピークとしてしか検出されない。そこで、まず試料をゲル等電点電気泳動で等電点に収束させた後、ゲルを切片にし、各切片から抽出したタンパク質をキャピラリーSDS電気泳動にかける一種の2次元分離を試みた。

2. 実験

1次元目の等電点ゲルには内径5mm、長さ16cmのアガロースゲルを用いた。試料として40%ショ糖を含むヒト血漿50 μ lを用い、陽極層に0.01Mリン酸、陰極層に0.04M水酸化ナトリウムを用い、500Vでタンパク質を等電点に収束させた。泳動後ゲルを5mmごとに切り、SDS溶液を加えゲルをつぶして細片化し、1時間放置してタンパク質を抽出した。また、同時に泳動したゲルでゲル中のpH勾配を測定した。

2次元目のキャピラリーSDS電気泳動は、Beckman社のP/ACE 2100を用い、キャピラリーは内径75 μ m、実効長30cmとし、内壁処理をして使用した。泳動液は0.05M Tris-0.05M Tricine, 0.1%SDSを用い、キャピラリーには4%LPAを含む泳動液を充填し、150V/cmの定電圧で泳動した。試料注入は150V/cmの電気泳動注入で行い、検出は230nmの紫外吸収を用いた。

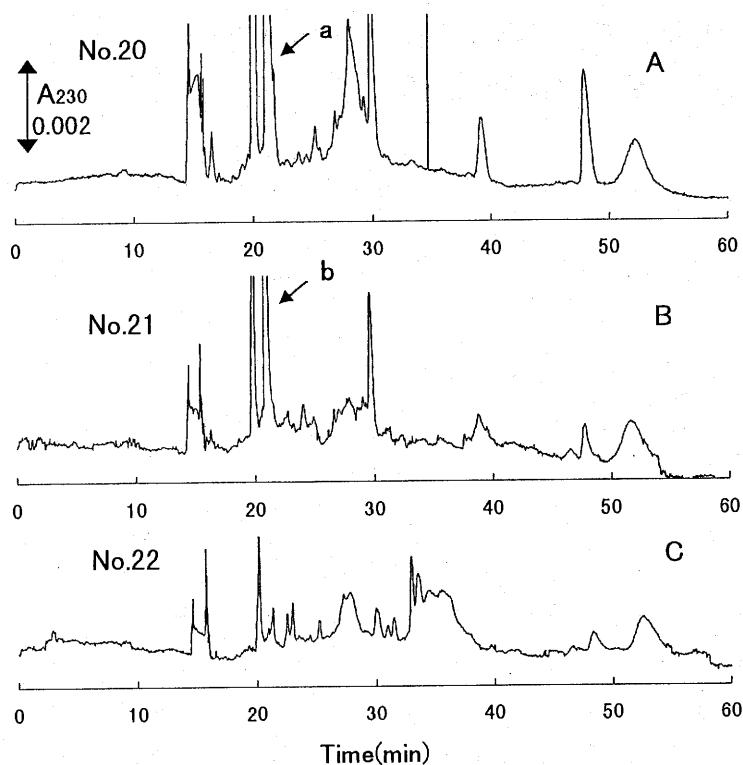


Fig. Capillary electrophoresis of human plasma proteins extracted from agarose IEF gel sections. A, proteins extracted from section No. 20; B, section No. 21; C, section No. 22

3. 結果

キャピラリーSDS電気泳動においては、試料注入を電気泳動で行うため、キャピラリー中に導入されるタンパク質の量は試料中のイオン組成と深く関係すると予想される。そこで、まず、血漿タンパク質を高感度に検出するためのタンパク質濃度とSDS濃度の関係を調べた。その結果、試料注入量と分離能の点で、血漿タンパク質を5mg/ml、SDS濃度を1%とした。また、この濃度比を維持していれば試料溶液を10倍程度まで希釈しても、試料注入量に大きな変化がないことが分かった。これらの結果をもとに、アガロースゲル切片からタンパク質を抽出するためのSDS溶液の濃度と量を決定した。

アガロースゲルを32のゲル切片とし、タンパク質を抽出し、キャピラリーSDS電気泳動にかけた結果の一部(No. 20-No. 22)をFig. 1に示す。連続した切片について、Fig. 1A, Bのピークaおよびピークbは同じ検出時間を示しており、これらは同一タンパク質に由来するピークだと考えた。また、検出時間が同じであっても、切片として離れていれば別のタンパク質と考えた。各ピークに番号を付け、すべての切片のピークについて、上記の重ね合わせの操作を行った。また、その結果をゲル2次元電気泳動の泳動結果と比較し、関連づけを行った。その結果、特にアルブミン(分子量約7万)よりも高分子量側において、サイズ分離キャピラリー電気泳動のほうが高い分離能を示した。

4. 文献

- 1) T. Manabe, H. Oota, J. Mukai, *Electrophoresis* 19(1998) 2308-2316.

キャピラリー電気泳動を用いるシアル酸含有糖タンパク質の不均一性の分析

(近畿大薬) ○掛樋 一晃、船窪 整、木下 充弘、小田 泰雄

Analysis of the heterogeneity of carbohydrate chains in sialic acid-containing glycoproteins using capillary electrophoresis

Kazuaki Kakehi, Tadashi Funakubo, Mitsuhiro Kinoshita, and Yasuo Oda

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Kowakae 3-4-1, Higashi-osaka 577, Japan.

Many glycoprotein drugs produced by recombinant technique are now commercially available. For quality evaluation of such drugs, isoelectric focusing is the most widely employed technique. As a more facile alternative, we examined a few methods using capillary electrophoresis with some model glycoproteins and found that separation with a chemically modified capillary was useful at slightly higher pHs than the isoelectric point of the protein.

1980年代からのバイオテクノロジー技術の目覚ましい発達により、エリスロポエチンやコロニー刺激因子、インターフェロンなどのバイオ医薬品の市場は目覚ましい発展を遂げつつあるが、これらの医薬品は概ねシアル酸を末端にもつ糖タンパク質医薬品である。したがって、開発の当初から精密な糖鎖の分析法が望まれ、キャピラリー電気泳動もその手段の一つとして検討が行われてきたが、糖鎖構造の違いによる分離に基づく分析法としてはもっぱらスラブゲルを利用する等電点電気泳動法やSDS-PAGEが利用されている。今回、我々はキャピラリー電気泳動を利用する再現性の高い迅速な糖タンパク質の分析法についていくつかの分離モードを比較検討したので報告する。

【実験方法】 **装置** Beckman P/ACE 5010型キャピラリー電気泳動装置を使用し、200 nmの吸収を利用して検出した。**キャピラリー** フューズドシリカ素管（内径 50 μm ）または Dimethyl polysiloxane 処理シリカキャピラリー（DB-1, 内径 100 μm ）。**泳動用緩衝液** 化学結合型キャピラリーについては 50 mM Tris-borate buffer を使用した。シリカ素管を用いる電気泳動についてはリン酸緩衝液、酢酸緩衝液などを検討した。**タンパク質試料** トランスフェリン、フェツイン、卵白アルブミン、 α 1-酸性糖タンパク質など。

【結果及び考察】 シアル酸含有糖タンパク質のキャピラリー電気泳動による分離については既に多くの報告がみられるが、その多くは電気浸透流をコントロールするために、少量の1,4-ジアミノブタンを含む緩衝液が用いられている。そこでこの緩衝液を用いていくつかのモデル糖タンパク質を使用して分析の再現性を検討した。その結果、このモードを利用する分析は分離能については非常に優れているものの、再現性については満足できなかった。また、本分離系を用いる電気泳動において、フェツインがエリスロポエチンの分離条件検討において適当なモデル糖タンパク質であることがわかった。

我々はタンパク質のキャピラリーへの吸着を防ぐ目的で両性イオンを用いる分離系についても検討した。その結果、Z-1 Methylを含む中性付近の緩衝液を用いることにより、分離についてはさらに改善が必要であるが極めて迅速な分析が達成できることを見出した。

さらに、2、3の化学修飾キャピラリーを使用して、pH および中性ポリマーの添加効果などについて詳しく調べた結果、等電点から約1高いpHで分離を行うことによりシアル酸含有糖タンパク質を再現性よく分離できることが明らかになった。

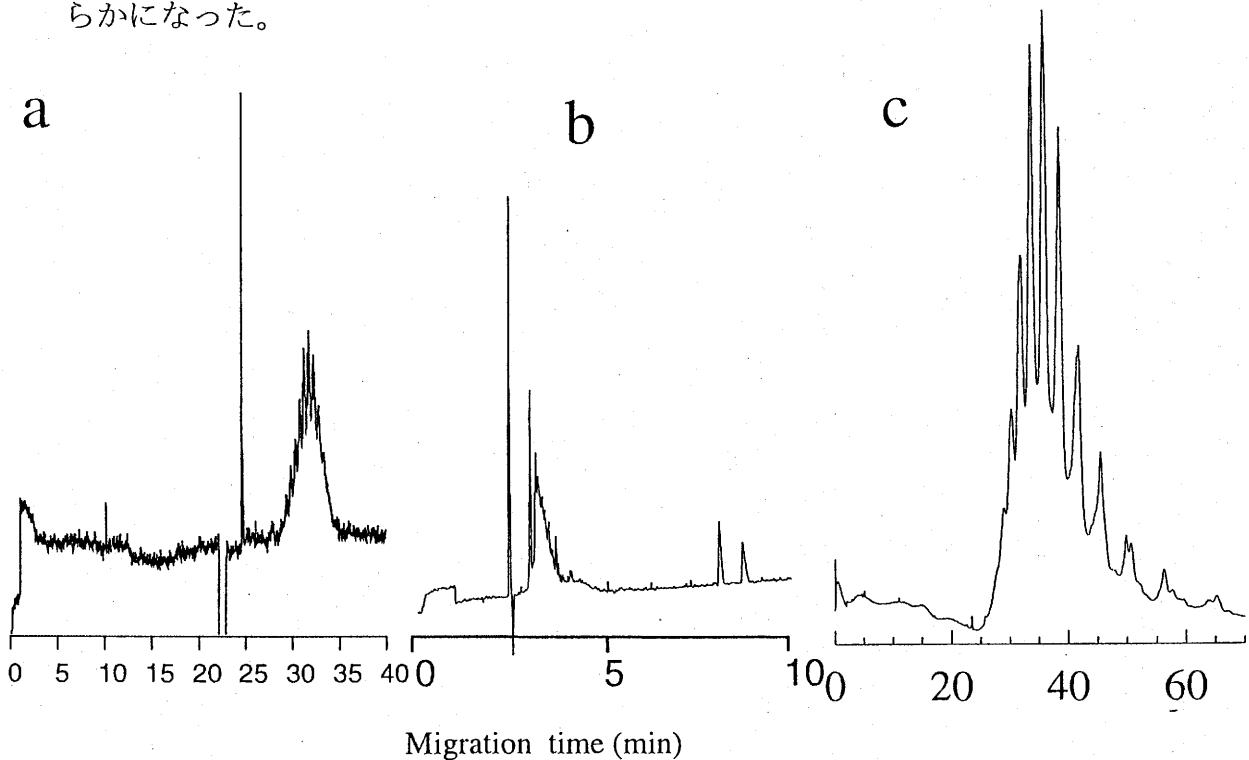


Fig. Separation of fetuin in three different separation modes. a) in a buffer containing 1,4-diaminobutane. b) in a buffer containing Z-1 Methyl c) in a buffer (pH 4.2) using a DB-1 capillary.

HPCE-CZE による新規可逆性蛍光標識試薬
Dansylaminomethylmaleic acid (DAM) の評価

坂田佳代*、浜瀬健司、財津 潔

九州大学薬学部

Evaluation of a new reversible fluorescence labeling reagent,
dansylaminomethylmaleic acid (DAM), by HPCE-CZE

Kayo Sakata*, Kenji Hamase and Kiyoshi Zaitu

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

ABSTRACT

Evaluation of a new reversible fluorescence labeling reagent for amino groups, dansylaminomethylmaleic acid (DAM), was performed using HPCE-CZE. A fused silica capillary (50 μm i.d. x 65 cm, e.f. 45 cm) filled with 25 mM borate-phosphate buffer (pH 8.0) was used for the separation. With this system, benzylamine, DAM and BDAM were completely separated and determined within 12 min. Regeneration of benzylamine from fluorescence derivative (*N*-benzyl-2-dansylaminomethylmaleamic acid, BDAM) under various pH was investigated and found that about 80 % of benzylamine was regenerated from BDAM at pH 3.5 within a day. These results showed the reagent we synthesized has a good reversibility under acidic conditions.

1. はじめに

蛍光標識法は高感度、高選択的検出が期待される優れた分析法であるが、標識化によって対象物質は生理活性や免疫反応性等が変化する可能性がある。従って微量生理活性物質の高感度検出と天然構造での回収を可能とするためには、着脱可能な可逆的蛍光標識が望まれる。そこで当研究室では蛍光団として Dansyl 基、アミノ基との可逆的反応基としてメチルマレイン酸構造を有する新規試薬を合成し、アミノ基含有化合物のモデルに benzylamine を用いて可逆的蛍光誘導体化法の検討を行っている。この検討において、試薬 (DAM) と誘導体 (BDAM) は酸性化合物であり、測定対象であるアミノ基含有化合物を含めた HPLC による一斉分析は困難であった。そこで今回は HPCE-CZE を用いてこれらの一斉分析法を確立し、DAM を用いる benzylamine の蛍光誘導体化並びに種々の pH における可逆性について検討した。

2. 実験

HPCE

HPCE はフューズドシリカ管 (50 μm i.d. x 65 cm, e.f. 45 cm) を用いる CZE モードで行い、泳動用緩衝液は 25mM ホウ酸-25mM リン酸-NaOH 混合緩衝液 (pH8.0) を用いた。また検出には 210nm の吸光度を用いた。泳動は室温で行い、印加電圧は 20 kv とした。

可逆性の検討

800 μ MのBDAMメタノール溶液100 μ lに25mMホウ酸-25mMリン酸-NaOH混合緩衝液(pH 1.5, 3.5, 5.0, 7.0, 10.0)900 μ lを加え25 $^{\circ}$ Cもしくは60 $^{\circ}$ Cに放置した。この溶液100 μ lを0, 2, 4, 6, 24時間後にサンプリングし、10%メタノールを含む上記緩衝液(pH 8.0)100 μ lと混合し、HPCEにより分析した。

3. 結果・考察

HPCEの泳動用緩衝液について、pH 1-10で電解質溶液が作成できる系を検討した結果、Carmodyの広域緩衝液(ホウ酸、クエン酸、リン酸三ナトリウム混合溶液)では、ベースラインが安定せず微量分析が困難であった。リン酸塩緩衝液では、電流値が高く分析に長時間を要した。一方ホウ酸-リン酸塩緩衝液では安定な迅速分析が可能であり、25mMホウ酸-25mMリン酸-NaOH混合緩衝液(pH 8.0)を用いてbenzylamine、DAM、BDAM及び中性物質のマーカとして用いたdansylamideは12分以内で完全に分離された(Fig. 1)。このときbenzylamine、DAM、BDAMの検量線は、2.5-100 μ Mの範囲で相関係数がそれぞれ1.000、0.996、0.993の直線性が認められた。また本法におけるbenzylamine、DAM、BDAM定量値の日内変動はそれぞれ1.54、3.60、1.22%、日間変動は3.63、4.10、3.82%であり、良好な再現性が認められた。

このHPCE条件を用いて、BDAMからのbenzylamine再生を指標に可逆性の検討を行った結果をFig. 2に示す。25 $^{\circ}$ CにおいてpH 7.0、pH 10.0ではbenzylamineの再生が認められなかったのに対し、pH 1.5、pH 3.5では1日で約80%の再生が認められた。また60 $^{\circ}$ CにおいてはpH 5.0でも80%程度の再生が認められ、本試薬が酸性条件下で良好な可逆性を有することが示された。

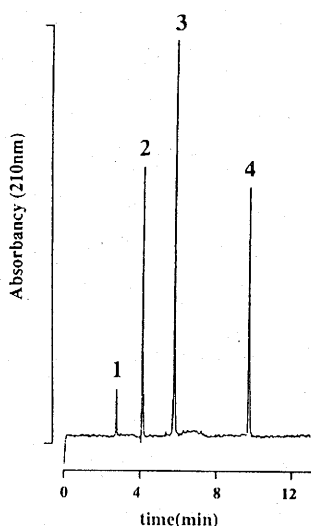


Fig. 1 Electropherogram for benzylamine and relating compounds
Peakes : 1, benzylamine; 2, dansylamide;
3, BDAM; 4, DAM

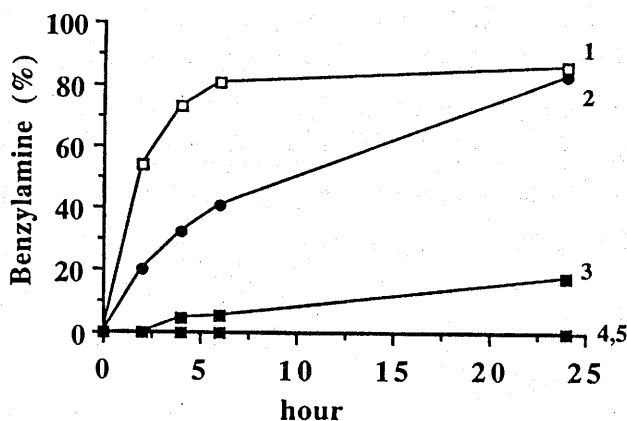


Fig. 2 Regeneration of benzylamine at 25 $^{\circ}$ C
Curves: 1, pH 1.5; 2, pH 3.5; 3, pH 5.0;
4, pH 7.0; 5, pH 10.0

バンコマイシンを光学識別剤としたミセル動電クロマトグラフィーによる NDA 誘導体化 D-,L-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 NDA-Labeled D- and L-Amino Acids by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Vancomycin as Chiral Selector

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. Pre column derivatization was performed using naphthalene-2,3-dialdehyde and cyanide to yield 1-cyano-2-substituted-benz(L)isoindole (CBI) amino acids. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) mode was applied with glycopeptide antibiotics vancomycin and cyclodextrines (CDs) as chiral selectors to resolve the enantiomers of the CBI derivatives of a variety of amino acids.

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。我々は昨年度、複数の D-,L-遊離アミノ酸を含む混合試料をナフタレンジアルデヒド (NDA) により蛍光性の CBI アミノ酸とし、CE-LIF により分離・分析することを検討した。分離モードとしては、 β - 及び γ -シクロデキストリン (CD)、SDS を含む MEKC を用いたが、その際グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジンの誘導体の D, L 分離はできなかった。胆汁酸塩を界面活性剤として用いてこれらのアミノ酸誘導体の光学異性体分離を行った報告がある¹⁾ が、これを多成分系試料に適用しようとするると複数の CBI アミノ酸相互の分離が十分でなかった。今回、この点を改良すべく、グリコペプチド系抗生物質バンコマイシンと SDS、CD の混合系を分離液として検討を行った。

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 μm 、有効長 60 cm、全長 67 cm のフューズドシリカ管 (Supelco) を用いた。標準的な分離溶液としては 1~4 mM バンコマイシン、35 mM SDS を含むリン酸緩衝液 (pH 7.0) 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。試料としては、種々の D-, L-アミノ酸 (各 0.5 μM と 1 μM) を CBI 誘導体化した混合物を

用いた。

3. 結果と考察

図1に4 mMのバンコマイシンと35 mMのSDSを含む分離液を用いた8種のDL-CBIアミノ酸の分離例を示した。グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン誘導体の光学異性体分離とともに16種の化合物相互の分離もほぼ完全に行われている。この例では、分離選択性を改善するため、 γ -CDと少量の有機溶媒を分離溶液に加えている。別に、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、アルギニン等の比較的ミセルへの保持能の高いCBIアミノ酸のD、L分離及び相互分離については、より低濃度(1 mM)のバンコマイシンを含む分離液を用いて、好結果を得ることができた。いずれの分離系でも、各ピークの理論段数は400,000~800,000であった。バンコマイシンは優れた光学識別剤であるが、キャピラリー壁への吸着のためカラム効率の低下を起すことが知られている。この点を改善し、多成分系試料への適用を可能するため分離液への界面活性剤の添加が提唱されている²⁾。これまで実際の適用例は少ないが、今回の結果から、本法は一般的に有用な光学異性体分離法となると考えられる。

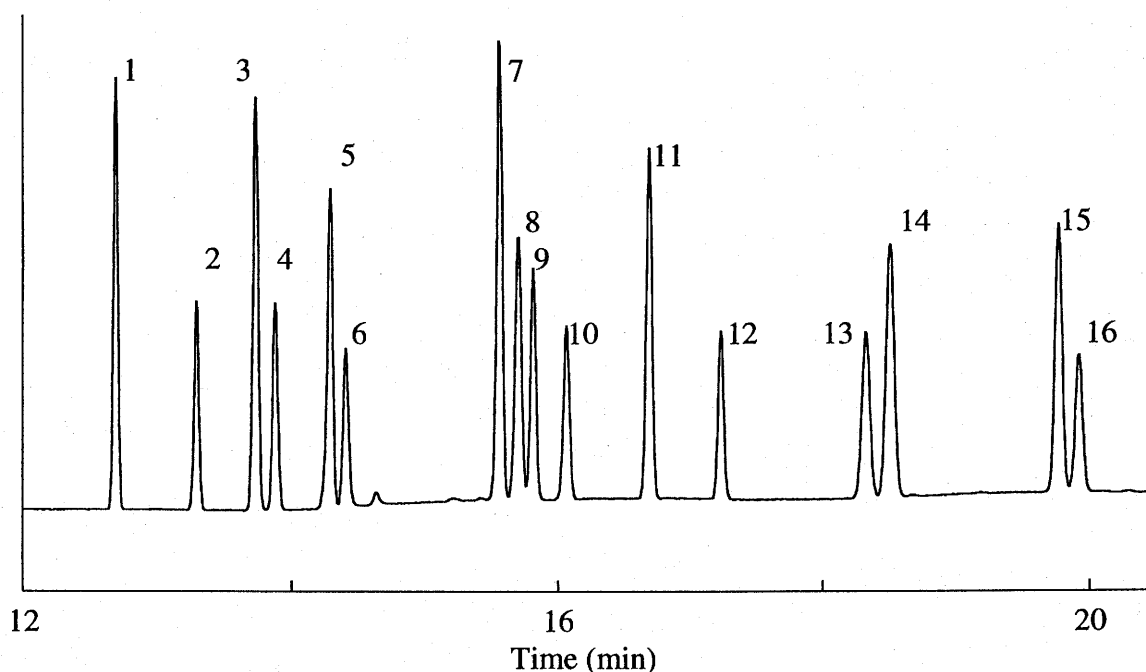


Fig.1. Electropherogram of a mixture of CBI derivatized DL-amino acids. Separation buffer: Sodium phosphate (pH 7.0) containing 4 mM vancomycin, 35 mM SDS, 1mM γ -CD and 1 % of diethylene glycol diethyl ether; CBI derivatives of: 1: L-threonine, 2: D-threonine, 3: L-serine, 4: D-serine, 5: L-glutamine, 6: D-glutamine, 7: L-isoleucine, 8: L-alanine, 9: D-isoleucine, 10: D-alanine, 11: L-methionine, 12: D-methionine, 13: D-glutamate, 14: L-glutamate, 15: L-histidine, 16: D-histidine.

4. 文献

- 1) Okafo, G. N.; Camilleri, P. J. *Microcol. Sep.*, 5, 149 (1993).
- 2) Rundlett, K. L.; Armstrong, D. W. *Anal. Chem.*, 67, 2088 (1995).

CE-LIF によるアルカリフォスファターゼ標識抗体の検出
小泉顕、森田智之、村上裕二*、民谷栄一
北陸先端科学技術大学院大学 材料科学研究科

The Detection of Antibody Labelled with Alkaline Phosphatase
by CE-LIF

Akira Koizumi, Tomoyuki Morita, Yuji Murakami, Eiichi Tamiya

The School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and
Technology, Hokuriku

Abstract

Antibody labelled with alkaline phosphatase was separated and detected by a capillary electrophoresis system equipped with a laser induced fluorescence detection system. The combination of B/F separation and the LIF detection of the label enzyme is potentially useful for a highly sensitive detection of antigen. After B/F separation by CE, label enzymes catalyzes a hydrolysis of fluorescein diphosphate in the running buffer, producing fluorescein for several minutes. Experiments with various ratio of Ab to Ag revealed that the faster peak was the complex of Ab and Ag, and the other was free Ab.

1. はじめに

微量試料を高速かつ高い分離能で分析が可能なキャピラリー電気泳動(CE)はすでにタンパク質分析にも幅広く応用されているが、分離後のタンパク質機能を指標とした検出はあまり行われていない。本研究は酵素活性を指標とした汎用性のある分析方法の開発を目的とし、オンキャピラリー酵素反応を行うことで、エンザイムイムノアッセイ(EIA)への応用を試みた。CEによる高速かつ高分解能なB/F分離と、ラベル酵素によるシグナル増幅とLIFによる蛍光検出の組み合わせによる高感度検出が期待される手法である。

2. 実験

ホウ酸緩衝液(pH10.0)で希釈したアルカリフォスファターゼ(AP)標識抗ラット IgG とその抗原(Ag)である標識なしのラット IgG を混合し室温で反応させた。CE装置は、内径 50 μ m, 長さ 80cm (有効長 38cm)の熔融シリカキャピラリーを用い、Ar レーザー

と光電子増倍管、fluorescein 用蛍光フィルターセットを有する倒立型蛍光顕微鏡により自作した。酵素基質である fluorescein diphosphate (FDP)を泳動液とし、落差法による試料導入後、電圧を印加して分離した。一時的に電圧印加を止めて泳動を中止し、キャピラリー内で酵素反応を進めた後、電圧印加を再開して生成物である fluorescein の蛍光を検出した。この再開した時点を泳動チャートにおける 0 min とした。

3. 結果と考察

AP のみを導入したときのチャートを図 1 に示す。2 分以降からバックグラウンドの上昇が認められ、4 分前後にいくつかのピークが得られた。各ピークは、反応時間を変化させると時間に比例してピーク高さが変わることからいずれも酵素反応に由来するものであると考えられ、すなわち AP のアイソザイムであると考えられる。バックグラウンドの上昇は、分離途中に起こる酵素反応によるものだと考えられる。よって分離後の下流域において酵素基質を混合させることによりこのバックグラウンドを低減させることが可能であると考えられる。

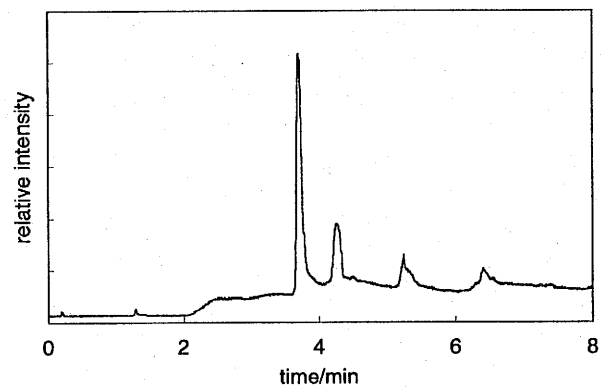


図 1 アルカリフォスファターゼの電気泳動チャート
分離 1min, 反応 2min, 30 kV, 基質 FDP 2 μ M

抗原抗体を種々の濃度比で反応させた後、導入した結果を図 2 に示す。いずれも 3 分前後に 2 つのピークが得られた。泳動時間が一定しないものの、濃度比の傾向から泳動時間順に抗原抗体複合体、抗体単独に由来するピークであると考えられる。

これにより、サンドイッチ法や抗原認識後に酵素活性を変化させる特殊な標識抗体を使用せず、抗原抗体反応後 10 分程度という短時間での複合体検出が可能となった。

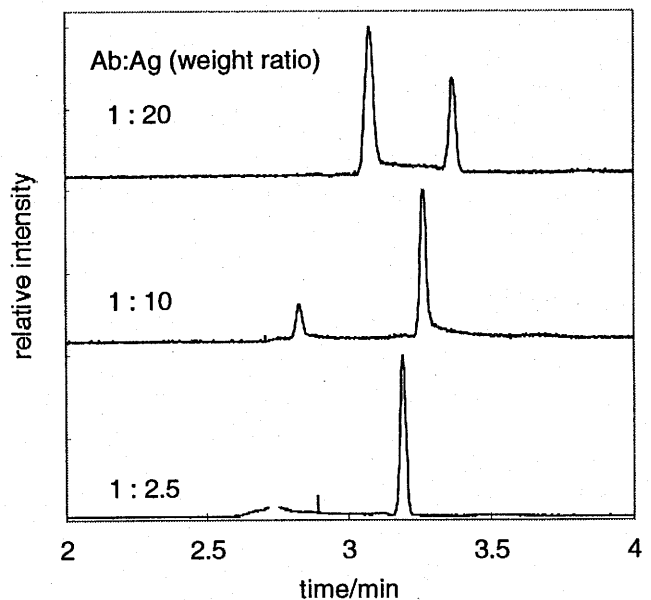


図 2 CE による B/F 分離

分離 1min, 反応 2min, 30 kV, 基質 FDP 2 μ M

POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS A TOOL FOR METAL STRESS INDUCED ENZYMATIC CHANGES IN RICE (*ORYZA SATIVA* L.)

Kavita Shah

Division of Food Additives, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Hyperlink--Department of Biochemistry, Faculty of Science, Banaras Hindu University, Varanasi-221005, India

ABSTRACT

When rice seedlings were raised under increasing levels of cadmium nitrate (0-500 μ M) in the medium, lengths as well as weights of roots and shoots decreased with increase in cadmium concentration. Metal treated seedlings had stunted growth and comparatively more broad leaves with necrosis than control grown seedlings. The activities of various key enzymes like ribonucleases, phosphatases and superoxide dismutase was studied. The various isoforms of these enzymes were detected employing Native-polyacrylamide gel electrophoresis technique with seedlings grown under varying cadmium levels. Seven isoforms for ribonuclease could be detected under metal stress as compared to control grown seedlings and were located using negative staining. Three acid phosphatase isoenzymes could be observed in roots/shoots of 15 day grown seedlings whereas four such isoforms were located during germination stage in embryoaxes. Superoxide dismutases were observed to have two isoenzymic bands one of which was induced under Cd stress. Higher Cadmium levels lead to a decrease in the intensities of some of the isoenzymic bands. Results suggest possible suppression of RNA hydrolysis, altered phosphate metabolism and increased antioxidant activity under metal stress in growing rice plants.

1. Introduction

Plants subjected to adverse environmental conditions adjust themselves to the changing environment by coordinated regulation of various enzymatic and metabolic pathways. Cadmium is one of the major heavy metal pollutants which has toxic effects on growing plants. The heavy metals in general lead to severe losses in the crop yield and affect food production. Though the influence of changing environmental conditions is being studied intensively yet still several questions regarding the influence of heavy metals on enzymatic processes remain unanswered. Rice is one of the major food crop for the majority of world population and is highly susceptible to heavy metal stress especially cadmium. Several key enzymes involved in important metabolic pathways have been shown to exist in more than one forms called as isoforms. The study of these isoforms provide us with an understanding about the role of the enzyme in binding and sequestration of the heavy metal under stressful conditions. Native polyacrylamide gel electrophoresis is a technique that enables the study of such isoforms and the changes brought about in their pattern as influenced by the changing environmental conditions like metal stress.

2. Experimental

Key enzymes of the nucleolytic, phosphorolytic and antioxidative processes were studied electrophoretically in rice seedlings subjected to 100 and 500 μ M cadmium in the growth medium. Electrophoretic patterns of enzyme ribonuclease, acid phosphatase and superoxide dismutase were determined in enzyme extracts from rice *cv.* Jaya exposed to varying cadmium treatments. Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed in vertical slab gels at 4°C using 7.5% acrylamide as resolving gel and 3.5% as stacking gel with 0.01 M Tris-glycine (pH 8.8) as electrode buffer. Enzyme samples from roots/shoots or endosperms/embryoaxes containing 100 μ g protein mixed with concentrated sucrose solution were layered on to the stacking gel. An electrophoretic run was performed using 25mA current. Bromophenol blue was used as marker dye. Gels were incubated with the respective substrates for the enzyme activity and the enzyme specific staining was carried out to localise the isoenzymic bands of each of the enzymes under study. For ribonuclease, 1% toluidine blue in 30% methanol, for acid phosphatase, 1mg ml⁻¹ fast blue RR base in 0.1M acetate buffer (pH 5.0) and for SOD, 2.5mM Nitroblue terazolium in phosphate buffer (pH 7.8) containing 28 μ M riboflavin and

28mM TEMED were used for staining the bands, respectively.

In all enzyme preparations protein was determined according to Lowry *et. al* (1951) using BSA (Sigma) as standard.

3. Results

Figure 1: Seven major RNase isoforms were detected in roots of seedlings grown without Cd with R_f values 0.1, 0.14, 0.42, 0.5, 0.57, 0.61 and 0.69. A 500 μ M Cd level caused disappearance of a band with R_f 0.50, decrease in intensities of the bands with R_f values 0.42 and 0.61 and increased intensity of a band with R_f 0.69. In shoots however 4 isoenzyme bands with R_f values 0.41, 0.50, 0.57 and 0.69 were observed. With a higher Cd level of 500 μ M decrease in intensities of 3 preexisting bands with R_f values 0.41, 0.50 and 0.57 and increase in intensity of one band with R_f 0.69 was noted.

Figure 2: The zymogram revealed three acid phosphatase isoenzyme bands in both roots and shoots with R_f values 0.18, 0.24 and 0.40 in controls as well as Cd stressed seedlings. In 100 μ M Cd grown seedlings, in roots the band with R_f of 0.40 became more intensified whereas in 500 μ M Cd grown seedlings intensity of all the three bands declined. Similarly in shoot samples the intensity of all the three bands declined under higher Cd levels. Enzyme extracts from embryoaxes showed presence of four acid phosphatase isoenzyme bands with R_f values 0.15, 0.24, 0.36 and 0.49 in control as well as cadmium treatments, the intensity of which declined significantly in 500 μ M Cd treatments as compared to controls. There were three isoenzymic bands present in endosperms with almost no alteration in the position or intensity of the bands under 100 or 500 μ M Cd treatments.

Presence of an additional SOD isoenzyme under metal stress was observed under 500 μ M Cd levels in 15 day grown rice seedlings.

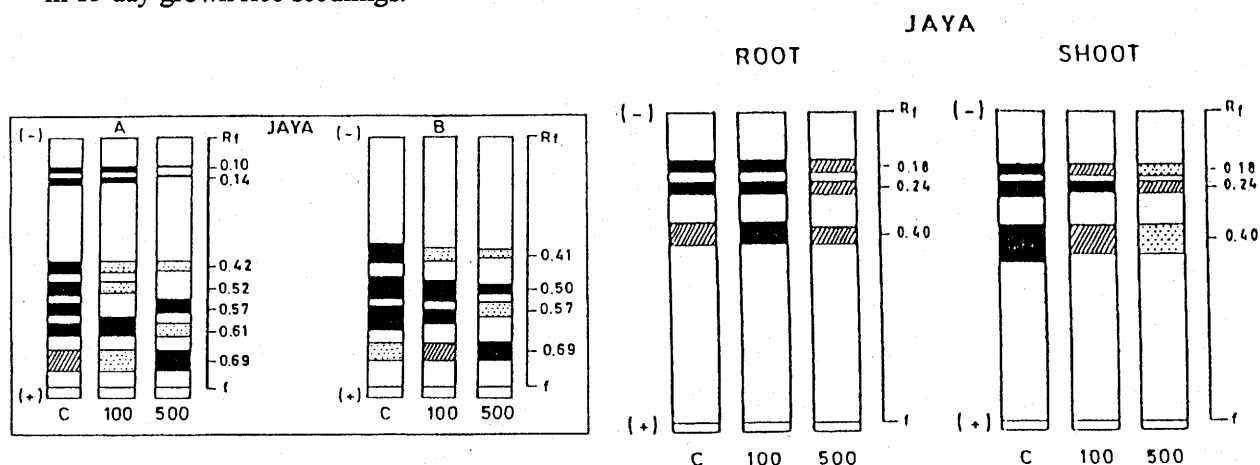


Figure 1. Effect of cadmium on ribonuclease isoforms in rice seedlings. A, root; B, shoot. Diagrammatic representation of isoenzyme profiles of RNase in enzyme preparations from roots and shoots of cv. Jaya at 15 days of growth under increasing levels of cadmium. (C) control; (100), 100 μ M Cd(NO₃)₂; (500), 500 μ M Cd(NO₃)₂. Band thickness represents the width of enzyme isoforms. Dark zone, line shaded zone and dotted zones represent intensity of isoenzymes in decreasing order.

Figure 2. The acid phosphatase isoenzymes from roots and shoots of 15 day-old rice seedlings cv. Jaya, under increasing concentrations of Cd(NO₃)₂; C, control; 100, 100 μ M.

4. Reference:

1. Shah K and Dubey RS 1995. *Plant Physiology and Biochemistry* (Paris), **33**, 577-584.
2. Shah K and Dubey RS 1997. *Journal of Agronomy and Crop Science* (Hamburg), **179**, 35-45.
3. Shah K and Dubey RS 1998. *Journal of Plant Physiology* (Germany), **152**, 448-454.
4. Shah K and Dubey RS 1998. *Journal of Agronomy and Crop Science* (Hamburg), In Press.
5. Davis, BJ 1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
6. Lowry OH, Rosenbrough, JJ, Farr AL and Randall RJ 1951. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

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よる光学異性体の分離：結合定数の測定

1) 加藤純也*, 1) 大塚浩二, 1) 寺部 茂, 2) 木全一博, 2) 田中信男
3) 田中 稔

1)姫路工大・理, 2)京工繊大・繊維, 3)阪大・保全科学研究センター

Chiral Separations by Cyclodextrin Modified Capillary Zone Electrophoresis : Estimation of Binding Constants

1) Junya Kato*, 1) Koji Otsuka, 1) Shigeru Terabe, 2) Kazuhiro Kimata, 2) Nobuo Tanaka
3) Minoru Tanaka

1) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297, Japan

2) Department of Polymer Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

3) Research Center for Environmental Preservation, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

ABSTRACT

In enantiomeric separation by capillary zone electrophoresis using dimethyl- β -cyclodextrin (DM- β -CD) as a chiral selector, enantioselectivities were sometimes significantly different among DM- β -CDs from five different suppliers. The reason was due to the difference in the compositions among these commercial products, which was shown by the liquid chromatographic (LC) analysis. As for commercial DM- β -CD from one supplier, two major components were obtained by preparative LC. NMR spectroscopic and mass spectrometric analyses of these two components were performed to estimate the structure of each component. The difference in enantiomeric selectivities is then studied by measuring 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)をキラル識別剤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)において光学異性体を分離する際、異なった5つの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た。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社の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¹⁾。ここでは、メチル誘導体化CDといくつかの試料との結合定数を測定し、CDのメチル基が光学分割に及ぼす影響について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/ACE2200(Beckman) を、キャピラリーには内径 50 μm 、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を用いた。分離溶液には 50 mM リン酸塩緩衝液(pH 3.0)に β -CD、DM- β -CD、2, 3, 6-トリメチル- β -CD (TM- β -CD)をそれぞれ 3, 6, 9, 12, 15 mM の濃度に溶解して調製した。検出波長は 200 nm、印加電圧は 20 kV、温度は 25 $^{\circ}\text{C}$ とし、試料には Terbutaline、Clorprenaline、Tolperisone などのイオン性薬物成分を用いた。

3. 結果と考察

あるメーカー(D 社)から購入した DM- β -CD は、2 種のメチル化 β -CD の混合物であることが明らかになっている¹⁾。この 2 成分のうち HPLC で分取した一つ(D1)と、非誘導体化 β -CD、TM- β -CD、D 社製及び E 社製の DM- β -CD (DM- β -CD(D)、DM- β -CD(E))の 5 種の CD について、5 つの濃度(3, 6, 9, 12, 15 mM)での移動時間を測定し、それらを用いて結合定数と α 値(結合定数の比)を計算し、結果を図 1 に示す^{2,4)}。図から結合定数の値を比べてみると、ほとんどのメチル誘導体化 CD は誘導体化されていない β -CD に比べて大きな値の結合定数を与えた。このことから、メチル基が光学異性体の分離に何らかの影響を及ぼしていることが分かる。しかし、測定した範囲内において、その他の CD についてはメチル基の位置、数に関しては特に際だった影響は見られなかった。今後、さらにいくつかのメチル誘導体化 CD について結合定数を求め検討する予定である。

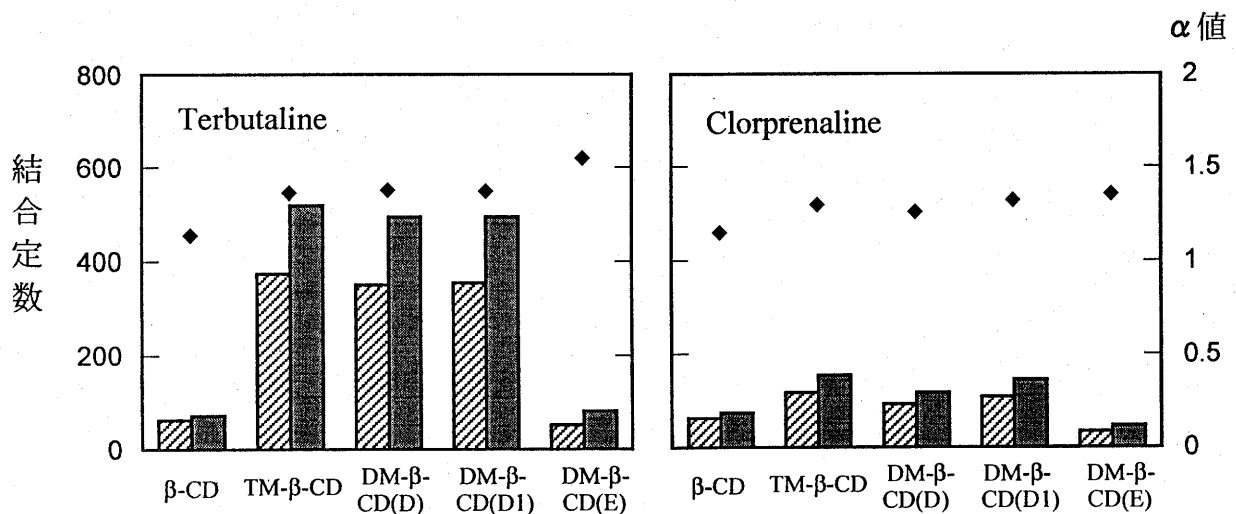


図 1. Double Reciprocal plot を用いて計算した結合定数と α 値

4. 文献

- 1) K. Otsuka, S. Honda, J. Kato, S. Terabe, K. Kimata and N. Tanaka, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17, 1179-1191(1998).
- 2) R. Kuhn, R. Frei and M. Christen, *Anal. Biochem.*, 218, 131-135(1994).
- 3) Kimber L. Rundlett, Daniel W. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, 721, 173-186(1996).
- 4) Y. Tanaka, M. Yanagawa and S. Terabe, *J. High Resol. Chromatogr.*, 19, 421-433(1996).

CEによる変異ヌクレオチドの分析

1) 江坂 幸宏*, 稲垣真輔, 後藤正志, 出屋敷喜宏, 酒向孫市, 2) 加納健司

1) 岐阜薬大、

2) 京大院農、応用生命

Electrophoretic separation of deoxyribonucleotides and N^2 -ethyl-2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate adduct related to alcohol abuse

1) Yukihiro Esaka*, Shinsuke Inagaki, Masashi Goto, Yoshihiro Deyashiki, Magoichi Sakou, 2) Kenji Kano

1) Gifu Pharmaceutical Univ. 2) Div. of Applied Life Science, Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.

ABSTRACT

CZE separation of deoxyribonucleotides (5'-dGMP, 5'-dAMP, 5'-dCMP and 5'-dTMP) and N^2 -ethyl-2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate adduct (N^2 -ethyl-5'-dGMP) was investigated for detection of N^2 -ethyl-guanine on DNA related to alcohol abuse. Separation was well controlled with pH of borate buffer solutions, because of pK_a values of boric acid close to those of thymine, guanine and perhaps N^2 -ethyl-guanine, which facilitate optimization of the separation.. Furthermore addition of PEG to the borate system causes remarkable change in migration order of the analytes. In this separation system, PEG would work as a hydrophobic selector and addition of PEG would also depress the dissociation of NH groups of 5'-dGMP, 5'-dTMP and N^2 -ethyl-5'-dGMP to decrease electrophoretic mobility of them. More sufficient separation can be obtained in the borate buffer solution containing PEG compared with separation in the borate buffer alone.

1. はじめに

DNA上の核酸塩基の変異は、とくにガンの発生と関連して深刻な現象である。最近アルコール依存症患者の白血球DNA上で、アミノ基の部位がエチル化されたグアニンの変異体が発見され(Jia-Long Fang and Carlos E. Vaca, *Carcinogenesis*, **16** (1995) 2177)、アルコール摂取とガン発症の関係を考える立場からも注目されている。このエチル化はアルコールの第一代謝物であるアセトアルデヒドによって起こされると考えられている。この変異機構の解明は、薬学的な立場から非常に重要であると思われる。そこで、ここでは分離様式の構築が容易で、分解能が高く、貴重な生体試料を微量で分析可能なキャピラリー電気泳動法を用いて、この変異ヌクレオチドの分析法を検討した。

2. 実験

装置：電源、松定プレシジョンデバイセズ HCZE-30PNO; 紫外可視吸光検出器、日本分光 CE-970; インテグレーター、島津製作所クロマトパック C-R6A; キャピラリー、GL

サイエンス 0.365 mm o.d., 0.050 mm i.d., 500 mm (有効長 300 mm ないし 200mm)

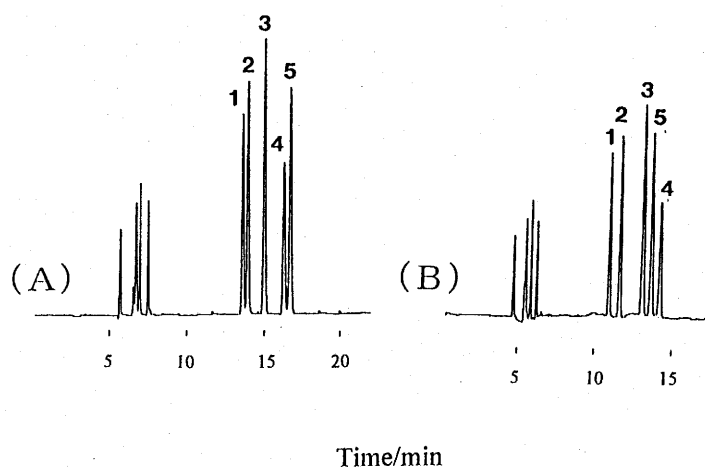
試薬: dGMP, dAMP, dCMP, dTMP は、シグマ、ナカライ、コージンから購入した。 N^2 -ethyl-5'-dGMP のみ合成した。添加剤として用いた PEG 4000 はナカライから購入した。

3. 結果・考察

変異した塩基について、ヌクレオチドの形 (N^2 -ethyl-5'-dGMP) で検出することにし、他の 4 種のネーティブなものを含めた 5 種の完全な分離を検討した。泳動液としてリン酸緩衝液とホウ酸緩衝液を用いた場合、ホウ酸緩衝液のほうが相当により分離が得られる。これは主に、ホウ酸の pKa の近傍にグアニンとチミン (と、多分変異グアニン) の pKa があり、緩衝液の pH 変化によってこれらの解離状態を変化させることで、泳動移動度の差別化をして分離を調節できるためである。また、ホウ酸緩衝液では pH の上昇と共に浸透流が減少する独特な傾向をみせ、結果的にこれが分離の時間窓を広げて分離を向上する助けとなった。

このホウ酸緩衝液にセクターとしてポリエチレングリコール (平均分子量 4000、PEG 4000) を添加し、更に分離の改善を行った。PEG 4000 の添加は、顕著な泳動順序の変化を起こし、これによって 5 種の完全な分離を達成できた。この際の PEG の働きを考える上で各 pH における PEG との結合定数 (K) を見積もったところ、核酸塩基がほとんど解離していない pH 領域では K の大きさの順が N^2 -ethyl-5'-dGMP > dGMP \approx dAMP (プリン塩基) > dCMP \approx dTMP (ピリミジン塩基) となり、PEG が疎水性相互作用によるセクターとして働いていることが示唆された。一方、グアニン、チミンが解離するより高い pH 領域では dGMP > dAMP ; dTMP > dCMP となる。これは PEG 添加によってグアニン、チミンの解離が抑えられ、電気泳動移動度が抑えられた結果、見かけ上大きな K 値を持ったものと思われる。この二つの効果により PEG 添加系は pH 変化だけでは得られない選択性を有し、分離をより最適化することが可能となった。この分離系は、比較的自由に各ヌクレオチドの泳動挙動を調節できるので他の変異塩基の分析にも有効であると思われる。

CZE Separation of Nucleotide



Conditions: Running solutions, (A) 100 mM borate buffer (pH 9.5), (B) 100 mM borate buffer containing 6.5 % (w/v) PEG 4000 (pH 9.5); Capillary tube: 500 mm \times 0.05 mm, i.d. (effective length, (A) 300, (B) 200 mm); Applied voltage (Current), 10 kV ((A) 22, (B) 16 μ A),

Peak: 1, N^2 -ethyl-5'-dGMP; 2, dGMP; 3, dAMP; 4, dCMP; 5, dTMP

キャピラリー電気泳動による疾患関連遺伝子の多型解析

(徳島大・薬) ○屋代直子、馬場嘉信

Polymorphism Analysis of Disease-causing genes by Capillary Electrophoresis

Naoko Yashiro and Yoshinobu Baba

Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

In this study, we examined to optimize the separation conditions of Capillary electrophoresis (CE) for the analysis of human amelogenin gene to establish the sex identification system with high-speed, high-efficiency, and high-accuracy. Human amelogenin gene is located on both X- and Y-chromosome and the specific region of amelogenin gene on each chromosome has some deletion in its sequence. Since PCR of amelogenin locus produces the X-specific fragment of the Y-specific fragment, Human amelogenin gene is useful for sex identification.

はじめに

現在、ヒトゲノム計画の発展により、疾患との関連のあるヒト遺伝子が報告されている。個人の判別ができるようになれば、それを応用して疾患関連遺伝子を同定することができる。最近では、ヒト遺伝子配列をはじめとした特有の配列を応用し、DNAタイピングにより個人のDNA鑑定が実施されるようになってきた[1,2]。これまでに、我々は、マイクロサテライト配列を利用した個人の同定について、キャピラリー電気泳動による新規解析技術の開発を行ってきた[3-8]。本研究においては、キャピラリー電気泳動による男女識別システムを開発するために、男女を識別するために有用なアメロゲニン遺伝子[9-11]をPCRにより増幅したサンプルについて、キャピラリー電気泳動により解析した。

実験

装置は、レーザー励起蛍光検出器付きのキャピラリー電気泳動装置(BECKMAN P/ACE2100)を使用した。サンプルは、DNA分子量マーカーおよびPCR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。PCRの際にはパーキン-エルマー製GeneAmp PCR System 2400およびGeneAmp PCR Reagent Kitを用いた。サンプルは電氣的に注入した。緩衝液は、トリス-ほう酸にセルロース誘導体を適量加えたものを用いた。

男性と女性のDNAをテンプレートとして、106,112,87,90塩基対のDNAフラグメントをPCR法により増幅した。106と112塩基対のフラグメントを増幅するには、プライマーの

シーケンスは、5'側プライマーが 5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3、3'側プライマーは5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'を用いた。87と90塩基対のフラグメントを増幅するには、プライマーのシーケンスは、5'側プライマーが 5'-CCCCTTTGAAGTGGTACCAG-3、3'側プライマーは 5'-GCATGCCTAATATTTTCAGGG-3'を用いた。

結果と考察

ヒトX-Y領域アメロゲニン遺伝子のPCR増幅した配列について、ヒトのX,Y染色体の塩基配列は類似しているが、X染色体において欠損している部分やY染色体に欠損している部分がある。今回用いた配列は、アメロゲニン遺伝子において、X染色体に座位する場合に、6塩基対の欠損が存在し、その部分を利用して、性別の判断ができる。

今回の実験においては、アメロゲニン遺伝子の解析条件を最適化するために、ポリマー溶液の濃度、電場等を種々変更して、PCR産物の解析を行った。その結果、アメロゲニン遺伝子を10分以内に再現性良く解析することに成功した。

文献

- 1) Y. Baba, *J. Chromatogr.B*, **1996**, 687, 271-302.
- 2) 匂坂馨, *ぶんせき*, **1998**, 4, 276-281.
- 3) 馬場嘉信, *薬学雑誌*, **1997**, 117(5), 265-281.
- 4) 馬場嘉信, *臨床検査*, **1997**, 41(5), 569-583.
- 5) 馬場嘉信, *医学のあゆみ*, **1997**, 183(4), 285-289.
- 6) Y. Baba, T. Sawa, A. Kishida, and M. Akashi, *Electrophoresis*, **1998**, 19(3) 433-436.
- 7) A. Nishimura, M. Tsuhako, T. Miki, T. Ogihara, and Y. Baba, *Chem. Pharm. Bull.*, **1998**, 46(2), 294-297.
- 8) A. Nishimura, M. Tsuhako, and Y. Baba, submitted.
- 9) Y. Nakahori, K. Hamano, M. Iwaya, and Y. Nakagome, *Am J. Medical Genetics*, **1991**, 39, 472-473.
- 10) Y. Nakahori, O. Takenaka, and Y. Nakagome, *Genomics*, **1991**, 9, 264-269.
- 11) V. P. Pouchkarev, E. F. Shved, P. I. Novikov, *Electrophoresis*, **1998**, 19, 76-79.

キャピラリー電気泳動によるプラスミド DNA の解析

(徳島大・薬) ○松田聖子、馬場嘉信

Analysis of Supercoiled DNA by Capillary Electrophoresis

Seiko Matsuda and Yoshinobu Baba

Department of Medicinal Chemistry, The University of Tokushima, Tokushima 770-8505

Plasmid DNA has several conformations caused by the super-coiling. We examined the separations of linear double-stranded DNA and supercoiled plasmid DNA under several separation conditions using capillary electrophoresis for the better understanding of the separation mechanisms of circular DNA fragments. The conformation of plasmid DNA is directly observed by fluorescence microscopy and atomic force microscopy in aqueous solutions. The relationship between the conformation confirmed by microscopic techniques and electrophoretic behavior will be discussed.

はじめに

プラスミドは、分子生物学の分野において、遺伝子操作を行う上で、必要不可欠の DNA である[1,2]。特に遺伝子治療において、遺伝子を細胞内に導入する際には、プラスミドを利用することが多い。しかし、プラスミドを解析するためには、専らゲル電気泳動が用いられており、自動化、簡便化、高速化の点で、著しく遅れている。これは、プラスミドが、超らせん構造等の複雑なコンフォメーションを取りうるために、泳動挙動が複雑になることに起因していた。

本研究においては、プラスミドの高性能解析技術確立のために、キャピラリー電気泳動によるプラスミドの解析を行った。ここでは、超らせん構造をとるプラスミドの泳動挙動を直鎖状 DNA の泳動挙動と比較し、詳細に検討した。さらに、蛍光顕微鏡および原子間力顕微鏡(AFM)により、水溶液中のプラスミドのコンフォメーションを直接観察し[3-5]、そのコンフォメーションと泳動挙動の関係についても考察した。

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キャピラリー電気泳動装置(HP^{3D}CE)を使用した。サンプルは、DNA 分子量マーカー、プラスミド、そしてそれを消化した直鎖 DNA を用いた。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、キャピラリーを満たす緩衝液には、50 mM トリス-ホウ酸を含むセルロース誘導体溶液を用いた。

結果と考察

直鎖状及び環状のDNA分子量マーカー、プラスミド、直鎖DNAを同じ条件でキャピラリー電気泳動を用いて解析した (Fig.1)。解析の結果、それぞれ比較検討してみると、直鎖状と環状のDNA分子量マーカーは異なった移動度を示した。また、直鎖状DNAと直鎖状のDNA分子量マーカー、環状DNAと環状のDNA分子量マーカーはそれぞれ似通った移動度を示した。

その違いはプラスミドと直鎖DNAの構造が異なることにより起こる。直鎖DNAはその名の通り一本のひものような構造であるが、プラスミドは環状であり、また超らせん構造や弛緩した構造など条件によって複雑なコンフォメーションをとるので直鎖DNA以上に複雑な泳動挙動を示すものと思われる。

また、AFMや蛍光顕微鏡を用いてプラスミドを観察した結果、プラスミドDNAは、溶液中で様々なコンフォメーションをとっているが明らかになった。これらのコンフォメーションの違いが泳動挙動に影響を及ぼしたものと思われる。

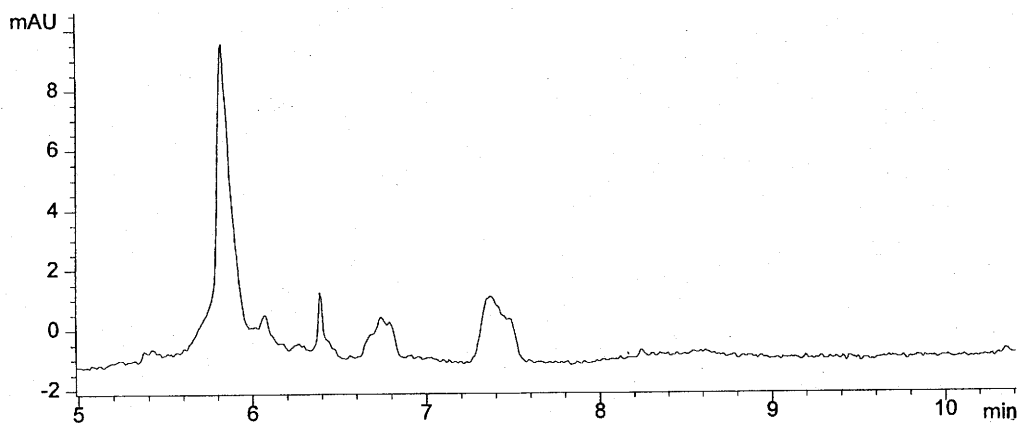


Fig.1 Separation of supercoiled DNA ladder (2-10 kbp)

文献

- 1) Y. Baba, *Mol. Biotechnol.*, **1996**, 6, 143-153.
- 2) 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.
- 3) 上田正則、馬場嘉信, *バイオイメージング*, **1998**, 7(2), 31-37.
- 4) M. Ueda and Y. Baba, *Anal. Sci.*, **1997**, 13(1), 109-112.
- 5) M. Ueda, H. Oana, Y. Baba, M. Doi, and K. Yoshikawa, *Biophys. Chem.*, **1998**, 71, 113-123.

HPCEによるアミノピラジン誘導体化単糖類の分析

山本貢史*、浜瀬健司、財津 潔

九州大学薬学部

Determination of aminopyrazine derivative of monosaccharides by high-performance capillary electrophoresis

Koji Yamamoto*, Kenji Hamase and Kiyoshi Zaitso

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

ABSTRACT

Neutral and amino monosaccharides were derivatized with aminopyrazine and determined by high-performance capillary electrophoresis. Separation conditions were investigated with respect to pH, concentration of the borate buffer and capillary temperature. The eight monosaccharides tested were completely separated within 22min using 300mM borate buffer (pH10.0) at 25°C. Absorbance of each monosaccharide was measured at 245nm. The within day and day-to-day precisions of the present method were less than 5%. The detection limits of the monosaccharides were 180-300fmol.

1. はじめに

糖質の多くは重要な生体反応に深く関与し、細胞膜成分や細胞間物質として様々な生理機能を果たしている。当研究室では微量糖質分析法として、アミノピラジンを用いる糖類のプレカラム蛍光誘導体化HPLC法を開発し、検討を行ってきた。しかし、糖質の構造は非常に多様であり、一つの試薬に対して分離モードの異なる複数の定量法の開発が望まれる。今回はアミノピラジンを用いる糖質の精密分析の一環としてHPCE分析法の開発を行ったので報告する。

2. 実験

凍結乾燥した8種類の単糖混合物に0.75Mアミノピラジン酢酸溶液を加えて90°Cで30分間加熱しカップリング反応させた後、0.7Mジメチルアミンボラン酢酸溶液を加えて還元し安定な誘導体とした。この反応溶液を減圧乾固し、電気泳動用緩衝液500μlを加えてHPCE用の試料とした。HPCEにはBeckman P/ACE System 5510を用い、印加電圧は20kVとした。泳動用緩衝液はpH7.0-11.0のホウ酸緩衝液を用いた。

3. 結果・考察

8種類の誘導体化単糖はホウ酸緩衝液を用いて電気泳動を行い、緩衝液のpH (7.0-11.0)、ホウ酸濃度 (100-300mM)、キャピラリー温度 (15-30°C) について分離条件を検討した。まず緩衝液のpHについて検討したところ、pH10.0において最も良い分離が認められた。この時のホウ酸濃度を検討した結果、濃度上昇に伴って良好な分離が認められたが、同時に電流値が増加し、再現性の良い分析が困難となったため300mMとした。また温度上昇に伴って電流値が増加すると共に泳動時間は短くなったが、分離能はほとんど変化しなかった。以上の検討により、キャピラリー温度25°Cにおいて300mM、pH10.0のホウ酸緩衝液を用いて、約20分で8種類の誘導体化単糖のベースライン分離が達成された (Fig.1.)。また検出については、誘導体および試薬であるアミノピラジンのUVスペクトルを比較することにより、245nmの紫外吸収を用いて誘導体に対し選択性の高い検出を可能とした。本法における検量線はアミノ糖が200fmol-6pmol、中性糖が300fmol-12pmolの範囲で相関係数0.998以上の直線性が認められ、検出限界はS/N=3で200-300fmolであった。また本法の日内変動は、8種類全ての単糖について4%以下、日間変動は5%以下であり良好な再現性を示した。今後、本法を実際の生物試料の構成糖分析や糖鎖分析に応用する予定である。

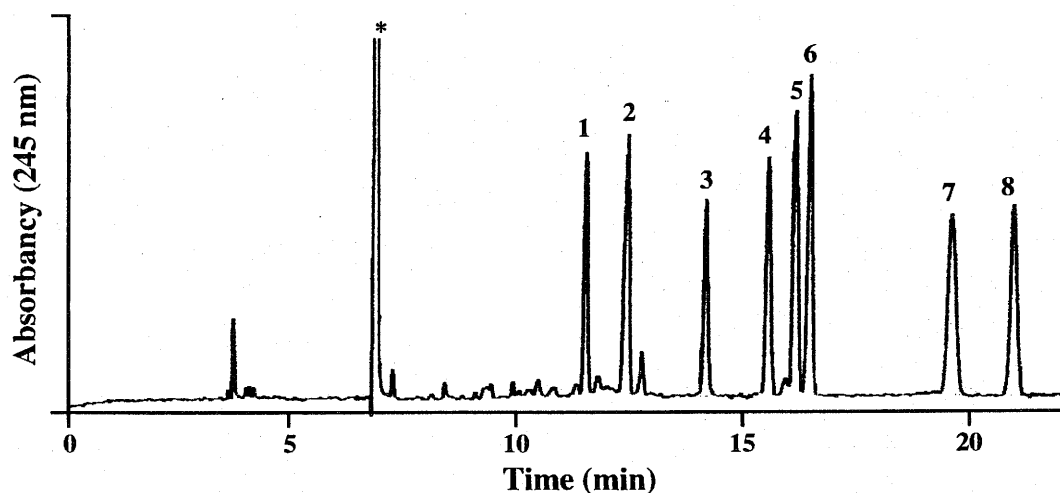


Fig. 1. *Electropherogram of aminopyrazine derivative of monosaccharides*
HPCE conditions

Capillary : fused silica (50 μ m i.d. \times 57 cm, e.f. 50 cm)

Buffer : 300 mM borate buffer (pH 10.0)

Sampling : pressure, 5 s

Analysis : 20 kV constant voltage, 25 $^{\circ}$ C

Detection : UV absorbance (245 nm)

Peak assignment

1 GalNAc, 2 Rha, 3 Xyl, 4 GlcNAc, 5 Glc, 6 Man, 7 Fuc, 8 Gal, * Reagent

糖鎖-タンパク質複合系における相互作用の観察

多賀淳*、樋口陽子、本田進
近畿大・薬

Observations on the Carbohydrate-Protein Interaction in Complex Systems

Atsushi TAGA*, Yoko HIGUCHI and Susumu HONDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

ABSTRACT This paper describes the first example of the simultaneous determination of the association constants for two protein-carbohydrate couples (LCA/MES-maltose and PNA/MES-lactose, where LCA and PNA are *Lens culinaris* and Peanut agglutinins, respectively, and MES is a mercaptoethanesulfonate tag). LCA and PNA as samples were well separated from each other by CE in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8, and the migration times were delayed by adding MES-maltose and MES-lactose to the electrophoretic solutions. The association constants of LCA to MES-maltose and PNA to MES-lactose could be independently determined from the migration time delays of LCA and PNA with MES-maltose and MES-lactose concentrations, respectively.

1. はじめに

演者らのグループは糖鎖-タンパク質間結合定数を測定する方法について種々検討を行ってきたが、これまでの研究においては糖鎖およびタンパク質がそれぞれ単一である系、あるいは同一タンパク質に対する複数リガンドを用いる系が対象であった。しかしながら、生体成分においては糖鎖あるいはタンパク質をそれぞれ単離することが困難な場合があると思われる。そこで今回は、それらを取り出すことなく結合定数を測定できる方法を確立する目的で、糖鎖およびタンパク質がそれぞれ複数存在する系におけるアフィニティーキャピラリー電気泳動について基礎検討を行った。

2. 実験

キャピラリー電気泳動は、アプライドバイオシステムズ 270A 型装置に内面未修飾のフューズドシリカ管 (内径 50 μm 、長さ 72 cm) を装着して行った。糖鎖リガンドにはマルトース (Mal) およびラクトース (Lac) の 2-メルカプトエタンスルホン酸 (MES) 誘導体を使用した。タンパク質にはグルコース認識レクチンであるレンズ豆レクチン (*Lens culinaris* agglutinin, LCA) およびガラクトース認識レクチンであるピーナッツレクチン (Peanut agglutinin, PNA) を用いた。泳動液には、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) および同一緩衝液に MES-Mal および MES-Lac を種々の濃度で添加・溶解したものを使用した。検出波長 214 nm、印加電圧 15 kV、キャピラリーオープン温度 30°C で電気泳動を行った。

3. 結果と考察

イオン性リガンド含有泳動液を用いてタンパク質を電気泳動する場合、リガンドの添加濃度に依存して移動時間が変化する。リガンドを添加しない場合のタンパク質の移動時間 (t_1) とリガンドを濃度 $[C]$ で添加した場合の移動時間 (t) の差の逆数 $(t - t_1)^{-1}$ と $[C]^{-1}$ の間には直線関係が成り立ち、この直線の傾き (A) および Y 軸切片 (B) から結合定数 (K_a) を $K_a = (B \cdot t_1 + 1) (A \cdot t_1)^{-1}$ により求めることができる²⁾。この方法により LCA/MES-Mal 間および PNA/MES-Lac 間結合定数を独立に測定したところ、それぞれ $1.18 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ および $9.05 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ という値が得られた。一方、MES-Mal および MES-Lac を同一濃度で添加した 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を使用し、LCA および PNA 混合物を試料として 2 タンパク質-2 リガンド複合系における結合定数測定について検討を行った。タンパク質試料をリガンドを含まない泳動液を用いて電気泳動したところ両者は互いに良く分離された。また、同一緩衝液にリガンドを添加した泳動液を用いた場合には、いずれのタンパク質試料においてもリガンド濃度依存的な移動時間の遅れが見られ (Fig. 1)、得られたデータを基に $[C]^{-1}$ に対して $(t - t_1)^{-1}$ をプロットしたところ、いずれの系においても良好な直線が得られた (Fig. 2)。これらの直線の傾きおよび Y 軸切片から算出した LCA/MES-Mal および PNA/MES-Lac 間結合定数はそれぞれ $1.19 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ および $9.56 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ となり、いずれの系においても単一系で求めた結合定数とほぼ同等の値が得られ、今回のモデル複合系においては互いに干渉しあうことなく、それぞれの組み合わせについて糖鎖-タンパク質結合定数の測定が可能であった。しかしながら、複数リガンド系においては泳動液中に含まれる塩濃度が高くなるため単一系に比べて電流値が高くなり、リガンドを高濃度で添加することが困難であった。また、交叉反応が起こる複合系においては競合的阻害による過小評価および複数リガンドを添加することによる過剰評価の問題があると考えられるので今後更に検討する必要があるものと思われる。

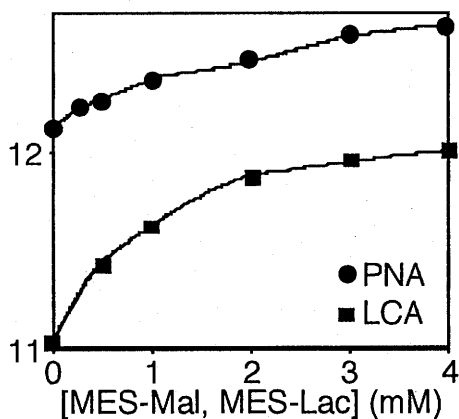


Fig. 1. Relationships between concentration of the ligand and migration time

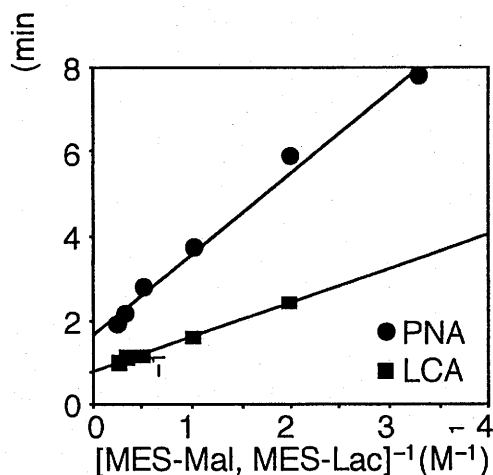


Fig. 2. Plot of $(t - t_1)^{-1}$ vs $[\text{MES-Mal, MES-Lac}]^{-1}$

4. 文献

- 1) A. Taga, S. Yasueda, M. Mochizuki, H. Itoh and S. Honda, *Analisis*, 26(1998)M35.
- 2) S. Honda, A. Taga, K. Suzuki, S. Suzuki and K. Kakehi, *J. Chromatogr.*, 597(1992)377.

酵素分解生成物のキャピラリー電気泳動分析による ヘパリンのキャラクタリゼーション

本田進^{1*}, 安枝真一¹, 松浦直子¹, 多賀淳¹, 鈴木茂生¹, 西浦早織², 立花貞信²
¹近畿大・薬 ²近畿大・病院・薬剤

Characterization of Heparin Preparations by CE Analysis of Their Enzymic Degradation Products

Susumu HONDA^{1*}, Shin-ichi YASUEDA¹, Naoko MATSUURA¹, Atsushi TAGA¹,
Shigeo SUZUKI¹, Saori NISHIURA², and Sadanobu TACHIBANA²
¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University
and ²Department of Pharmacy, Kinki University Hospital

Abstract Though heparin is a polysaccharide used as a potent anticoagulant, its structure is complex and the correlation to its activity has not been completely elucidated. This paper reports some results of CE analysis of heparinase I-derived oligosaccharides having various d.p.s and heparinase I,II,III-derived disaccharides from various heparin preparations.

1. はじめに

演者らはこれまでに種々の糖質をキャピラリー電気泳動(CE)により分析するシステムを開発してきたが、開発したシステムの有効利用についてもごく最近研究を開始しつつある。

ところでプロテオグリカンには生理活性をもつものがあるが、とりわけヘパリンは強い血液凝固阻止作用や血液清浄化作用などをもつため古くから医療用に用いられ、外科・内科領域では無くてはならない薬物である。この物質はヘキソサミンとウロン酸が交互に結合し合った多糖骨格にアセチル基や硫酸基が結合した構造をもち、それらの置換基の数や配置は多彩である。分子サイズが極端に大きいため直接構造を精密に解析することが難しく、置換基の分布と生理活性の関係も完全にはわかっていない。最も有望な方法は化学的・酵素的に分解した際に生成するオリゴ糖を分析する間接的方法である。

本演題では、CEをヘパリンの酵素消化生成物の分析への応用を試みた結果について報告する。

2. 実験

CEによる分析は主として JASCO 800-CE または 870-CE 装置に Polymicro Technologies 社製、内径 50 μ m のフューズドシリカキャピラリーを装着して行なった。試料導入は落差法により行ない、検出は不飽和結合に基づく 232 nm における吸収を測定

することにより行なった。ヘパリン製剤は当病院薬剤部において収集した。ヘパリナーゼ類は Sigma 社から入手し、血液凝固阻止活性は第 13 改正日本薬局方に従い測定した。

3. 結果・考察

① Heparinase I により生成するオリゴ糖の一斉分析

本酵素は N-硫酸化されたグルコサミンと 2 位に硫酸基のあるウロン酸の間を切断するエリミナーゼであり、生成物をアルカリ性リン酸緩衝液中で分析したところ、非還元末端に不飽和結合をもつ 2~8 糖が分離・検出され、それらのモル比を相対ピーク面積比から求めることができた。得られた電気泳動図の一例を Fig. 1 に示す。

② Heparinase I, II および III 併用徹底消化により生成する 2 糖類の一斉分析

これらの 3 酵素で同時消化すると、ヘパリン糖鎖のヘキソサミナイド結合がすべて切断され、種々の構造をもつ不飽和 2 糖を生成する。それらは酸性のギ酸緩衝液中でよく分離され、ピーク面積比から相対モル比を測定することができた。得られた電気泳動図の一例を Fig. 2 に示す。

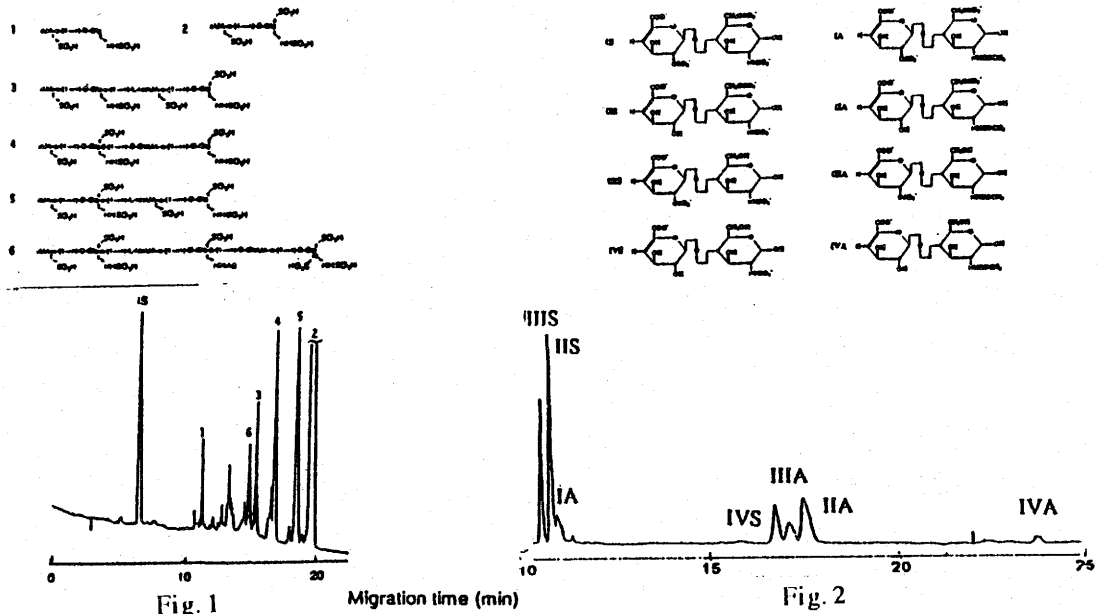


Fig. 1. Analysis of the oligosaccharides derived from heparin by the digestion with heparinase I. Capillary, 70 cm, running buffer, 25 mM phosphate buffer (pH 10.5), applied voltage, 20 kV. Samples were introduced from the anodic end.
 Fig. 2. Analysis of the disaccharides derived from heparin by the concerted digestion with heparinases I, II and III. Capillary, 60 cm, running buffer, 60 mM formic acid buffer (pH 3.4), applied voltage, 20 kV. Samples were introduced from the cathodic end. For other conditions see the experimental section for both Figs. 1 and 2.

③ ヘパリン製剤間での違い

医療用ヘパリンは哺乳動物や魚類から抽出・精製されるが、製剤間で微細構造と生理活性が異なることが知られている。入手した約 10 種のヘパリン製剤について①および②のオリゴ糖分析を行なったところ、製剤間でオリゴ糖分布にかなり大きな違いが認められた。また、血液凝固阻止活性とオリゴ糖生成比の間にも示唆的な関係がみられた。

キャピラリー電気泳動による糖タンパク質glycoformの分析

上垣佳奈*、多賀淳、本田進
近畿大・薬

Analysis of glycoprotein glycoforms by capillary electrophoresis

Kana UEGAKI*, Atsushi TAGA and Susumu HONDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, KINKI UNIVERSITY

ABSTRACT Glycoprotein-protein interaction was observed by capillary zone electrophoresis, using ribonuclease glycoforms and ribonuclease-specific lectins as glycoprotein and protein models, respectively. The migration time of each glycoform peak changed in a concentration-dependent manner by the addition of a lectin to the electrophoretic solution, and the association constants for individual glycoforms could simultaneously be obtained from the values of t_1 (migration time of glycoprotein), t_2 (migration time of the complex) and A [the slope of the $(t-t_1)^{-1}$ vs $[C]^{-1}$ plot, where t and $[C]$ are the migration time of the glycoform in the presence of the lectin and the concentration of the lectin, respectively].

1、はじめに

構造の異なるオリゴ糖鎖を同一ペプチドコアに持つ糖タンパク質(glycoform)においては、糖鎖構造の違いにより安定性や生理活性などに違いがある場合が知られている。糖鎖の果たす役割を調べるためには、glycoformを互いに分離して取り出し、それぞれのglycoformについてタンパク質に対する相互作用の度合を調べる必要があるが、この仕事は一般に容易でない。そのためglycoformを取り出すことなく微量試料を用いて結合定数を一斉に測定することができる方法が望まれる。そこで、演者らは種々の高マンノース型糖鎖を有するribonuclease glycoformをモデルとして、キャピラリー電気泳動(CE)により同一タンパク質に対する結合定数の一斉測定を試みた。

また、比較のためribonuclease Bから切り出した各種糖鎖についても、8-amino-1,3,6-naphthalenetrisulfonate(ANTS)で誘導体¹⁾としたのち、同一レクチンに対する結合定数の一斉測定を行った。

2、実験

Waters 4000型装置を用い、これに、内壁をPolybreneで処理したキャピラリー(有効長50 cm、全長58 cm、内径50 μ m)あるいはlinear polyacrylamideで被覆したキャピラリー(有効長30 cm、全長38 cm、内径50 μ m)を装着した。泳動液には、100 mMリン酸緩衝液(pH 5.8)にレンズ豆レクチン(LCA)を添加したものを使用した。陰極からglycoform試料を導入し、室温(23~24 $^{\circ}$ C)、印加電圧10 kVで分析を行った。検出は、糖タンパク質の分析では185 nm、糖鎖ANTS誘導体の分析では280 nmにおける紫外吸収を測定することにより行った。

3. 結果と考察

糖タンパク質試料として用いたribonuclease Bは分子量約1.4 kDaの高マンノース型の糖タンパク質(等電点約9.5)である。塩基性タンパク質の分析においては、キャピラリー内壁への吸着が問題となるため内壁処理が必要である。linear polyacrylamideによる被覆²⁾を試みたが、分析時間が長すぎる傾向があった。そこで、キャピラリー内壁を陽イオン性高分子であるPolybreneで処理³⁾して極性を逆転させることを試みた。その結果、ribonuclease及びレクチンの吸着を防ぐことができ、電気浸透流を利用することにより分析時間を短縮することができた。分析条件を種々検討した結果、100 mM リン酸緩衝液(pH 5.8)を泳動液として用いることによりribonucleaseの複数glycoformを分離することができた。一方、マンノース認識レクチンであるLCAを種々の濃度で添加した泳動液を用いて、分析を行ったところ、LCAが高濃度になるにつれてピークの分離が良くなり(Fig.1)、濃度依存的な移動時間の変化が見られた。それぞれのglycoformについて移動時間の逆数をLCAの濃度の逆数に対してプロットしたところ、いずれのglycoformについても良好な直線が得られ、その直線の傾き(A)及び切片(B)から $Ka=(t_1B+1)/t_1A$ により、LCAに対する結合定数を求めることができた。この一斉測定によりどの程度の強さでそれぞれのglycoformが相互作用を起こすかを知ることができた。

比較のため、ヒドラジン分解によりribonuclease Bから切り出し、ANTS誘導体化とした糖鎖についてもLCAとの結合実験を行った。ANTS誘導体は強い負電荷を有するため、Polybrene処理したキャピラリーを用いれば内壁に吸着される恐れがあるため、キャピラリーにはlinear polyacrylamideで被覆したのものを使用した。糖タンパク質を分析した場合と同様に100 mM リン酸緩衝液(pH 5.8)を用いて、それぞれの糖鎖ANTS誘導体とLCAの間の結合定数を測定した。いずれのglycoformにおいてもLCAに対する糖鎖誘導体の結合定数は、glycoformとしての結合定数と比較すると小さくなるということがわかった。これは、糖鎖ばかりでなくペプチドコアも結合に関与していることを示唆している。

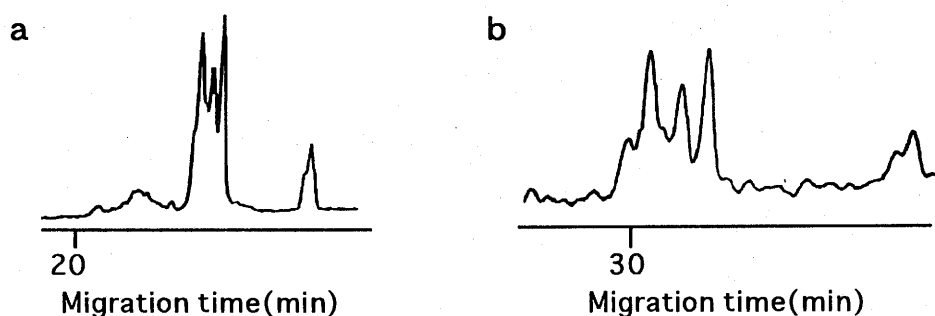


Fig.1 Electropherograms of ribonuclease glycoforms in the presence (a) and absence (1.0 mg/ml) (b) of LCA

1) Jackson P. Biochem. J. 270 (1990) 705-713.

2) Y. Baba et al. J. Chromatogr. A 653 (1993) 329-335.

3) S. Pleasance and P. Thibault in "Capillary Electrophoresis, Theory and Practice", ed. P. Camillier, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, p.311.

メタロチオネインのCZE: 亜鉛投与でマウス肝に誘導された新規アイソフォームについて

1) 久保兼信*、2) 南 武志、3) 小滝規子、4) 木村正巳

1) 近畿大学 薬学部 2) 奈良医大 第一解剖 3) 産業医学総合研究所
4) 慶應義塾大学 医学部

Capillary Zone Electrophoresis of Metallothioneins Using a Polyacrylamide-coated Capillary: Identification of New Isoforms Induced in Zn-administered Mouse liver

1) Kanenobu Kubo*, 2) Takeshi Minami, 3) Noriko Otaki, 4) Masami Kimura
1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, 2) Department of Anatomy, Nara Medical University, 3) Department of Occupational Disease, National Institute of Industrial Health, 4) Department of Molecular Biology, Keio University, School of Medicine

ABSTRACT

The peaks separated by CZE analysis, in general, can be identified by the technique of coinjection with individual standard metallothioneins (MTs). However, it is appear that the technique is not suitable for the detection of new MT isoforms and/or sub-isoforms. Therefore, we tried to detect the MTs by CZE using rabbit anti-rat MT antibody. The antibody-treated preparations, purified mouse MT-1 and MT-2, and commercial rabbit MT-1, allowed the detection of MT components as a time-dependent decrease in the height of peaks, and finally with disappearance of them. Four peaks including MT-1 and MT-2 reacted with the antibody, when the cytosol preparation from Zn-administered mouse liver was analyzed. It was thus apparent that the CZE system is capable of detecting new MT isoforms,

1. はじめに

メタロチオネイン (MT) は有害金属の無毒化、必須金属の代謝、酸化還元反応に関与している。その分子 (モル質量 6000 g) は熱に対して比較的安定である。反面、MT は 20 個のシステイン残基 (メルカプタイド結合) を含み反応性に富むので迅速分析が要求される。この目的には CE が優れており、最近、種々なモードでの CE が MT 分析に利用されている。しかし、それらに於いて MT は “migration time の一致” によって同定されているので、新たな MT 分子種の同定には不向きである。そこでこの欠点を補うために、MT 抗体による MT の検出を試みた。

2. 実験

CZE 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。電気泳動緩衝液には、50mM HEPES-Tris, pH 7.4 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、20 kV、検出波長 214 nm、室温 (26°C) 下で行った。票品 木村らの方法により精製マウス MT-1, MT-2 票品¹、そして Rabbit Anti-Rat MT-1 抗体²を調製。ウサギ MT-1 票品は Sigma 社より得た。MT サイトゾールの調製 Zn (50mg/kg)を皮下投与、24 時間後の肝臓を摘出。0.25 M しょ糖でホモジナイズ(0.1g/0.9ml)し、超遠心上清を得た。この上清と、これを 1 分煮沸し再度の遠心により得た上清の両者を試料とした。

3. 結果と考察

MT 票品 Sigma MT-1 についての結果を Fig. 1 に示す。抗体処理前の泳動図より、Sigma MT-1 票品には MT-2 成分が混在しており³、本研究において好都合であった。抗体添加後 (室温) 30 分で両ピークは殆ど消失、15 時間後 (4°C) で更に僅かなピーク高の低下がみられた。両 MT ピーク高の激減は、この抗体が MT に特異的であることを示す。左端の幅広いピークは抗体に含まれるアルブミン由来である。精製 MT-1 と MT-2 についても、特異的なピークの消失が認められた。サイトゾール 煮沸処理後の可溶性画分の泳動図を Fig. 2 に示す。抗体処理によって、2 本の大きなピーク (MT-2 と MT-1、それぞれ泳動時間は 5.5 と 8.1 分) と 2 本の小さなピーク (6.3 と 9.4 分) について、ピーク高の減少 (2 分後) と消失 (25 分後) が認められた。他のピークについては形状の変化はなかった。これらの結果より、小さな 2 本のピークは新たなあるいは修飾された MT であると考えられる。また抗体の使用が未知タンパク質の CZE 分析に有用であることも示された。

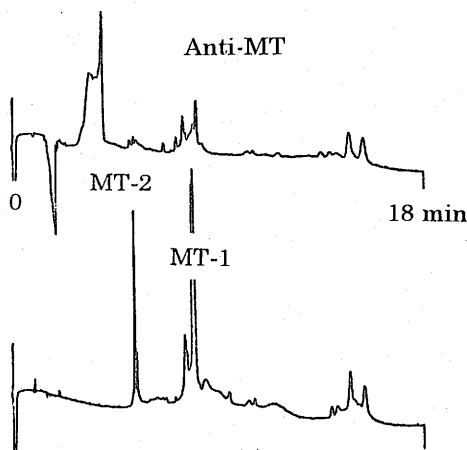


Fig. 1. Effect of anti-MT on the CZE chromatogram of a standard MT-1.

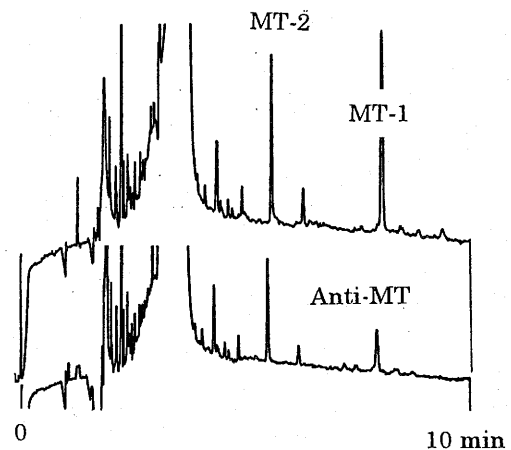


Fig. 2. Effect of anti-MT on the CZE chromatogram of a cytosol MT(Zn).

4. 文献 (1) Kimura, M.; Otaki, N.; Imano, M. *Experientia Suppl.*, 34, 163 (1979).

(2) 池井暢皓、他、*臨床検査*, 33 巻, 215 (1989).

(3) Minami, T.; Matsubara, H.; O-higashi, M.; Kubo, K.; Okabe, N.; Okazaki, Y., *Electrophoresis*, 17, 1602 (1996).

血漿リポタンパク質の酸化に伴う薬物結合性の変化

黒田 幸弘^{*}、曹 波、澁川 明正、中川 照眞

京都大学大学院 薬学研究科

Effect of Oxidation upon Drug Binding Affinity of Lipoprotein as Studied by Capillary Electrophoresis/Frontal Analysis (CE/FA) Method

Yukihiro Kuroda^{*}, Cao Bo, Akimasa Shibukawa and Terumichi Nakagawa.

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University.

ABSTRACT

High performance capillary electrophoresis / frontal analysis (HPCE/FA) has been applied to investigate the effect of oxidation of human low density lipoprotein (LDL) upon the drug binding affinity. Normal LDL was isolated from human plasma and was oxidized by copper sulfate (II) to obtain oxidized LDL. Verapamil and nilvadipine, chiral calcium channel blocking agents, were used as the model drugs. Enantioselectivity was not observed in binding of these model drugs to native and oxidized LDLs, though the unbound drug fractions of both enantiomers were constant regardless of the total drug concentration, which suggests that the partition-like binding to the lipid part of LDL is dominant over specific binding to apolipoprotein. The total binding affinity was increased by the oxidation of LDL.

【緒言】

薬物の血漿タンパク結合は体内動態並びに薬理効果や副作用の発現に影響を与える。また、血漿タンパク質は高度に光学活性であるため、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ことが多く、有効かつ安全な薬物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ことが知られているが、その他、疎水性の高い中性薬物や塩基性薬物の血漿タンパク結合にはリポタンパク質も寄与することが知られている。リポタンパク質は密度の違いにより数種類のサブクラスに分類されるが、その中で最も血中濃度が高い低密度リポタンパク質 (LDL) は高脂血症や動脈硬化症等の病態時に濃度が大きく変動するとともに、一部は生体内で酸化修飾を受ける。また、アポリポタンパク質や脂質成分の一部はキラルな化合物であるのでラセミ体薬物との結合が光学異性体間で異なる可能性がある。ところが現在までのところ、リポタンパク質の健常時、病態時における詳細なタンパク結合研究や立体選択性に関する研究はほとんど行われていない。これは、リポタンパク質は長期保存に適さず、さらに多量の入手が困難であるにもかかわらず、従来微量試料によるタンパク結合分析方法がなかったためである。一方、当研究室では先端分析法をキャピラリー電気泳

動に組み込んだ新規分析法 (HPCE/FA 法) を開発し、塩基性薬物と血漿タンパク質との結合の超微量かつ立体選択的タンパク結合研究に適用してきた。本研究では、HPCE/FA 法を用いて LDL の酸化程度の違いが、塩基性光学異性体薬物との結合に与える影響を超微量解析した。モデル薬物として塩基性薬物であるベラパミルと中性薬物であるニルバジピンを用いた。いずれも光学活性なカルシウムチャンネル遮断薬であり、ラセミ体として臨床使用されている。

【実験】

低密度リポタンパク質(LDL)の分取: 超遠心分離法によりヒト血漿から LDL 画分 (密度 1.02~1.063g/mL) を分画後、サイズ排除クロマトグラフィーで精製した。3g/L の LDL 溶液 (pH 7.4、I=0.17) に 5 μ M の Cu²⁺を加えて、37 $^{\circ}$ C で 4、8、12 時間振とう後、銅イオンを除去し酸化型 LDL を得た。

HPCE/FA 法による非結合型薬物濃度の測定: 泳動緩衝液 (りん酸緩衝液、pH7.4、I=0.17) を満たした内表面未修飾キャピラリー (30+22cm、内径 75 μ m) に薬物-LDL 混合試料溶液を吸引注入 (6 秒、注入体積約 160nL) した後、電気泳動を開始した (+7kV)。モデル薬物は負に帯電した LDL よりも速く移動するが、結合平衡を保ちつつ相互分離されるので、非結合型薬物ゾーンが引き出されて台形状の非結合型薬物ピークが検出された。このプラトー高さから非結合型薬物濃度を求めた。HPCE 装置は大塚電子製 CAPI 3000 を用いた。検出波長、200nm、254nm。キャピラリー温度、25 $^{\circ}$ C。

【結果・考察】

0.48 μ M の LDL 溶液 (pH7.4、イオン強度 0.17) 中のニルバジピンの結合率は、R 体 S 体ともに総薬物濃度 (10~30 μ M) に依らず一定 (21%) であった。このことから、LDL との結合には立体選択性が見られないとともに、LDL との結合は特定結合部位への選択的結合ではなく、脂質層への分配的結合が支配的であることが判った。次に、12 時間酸化した LDL との結合を解析した結果、total binding affinity (nK) は約 8 倍増加するが、立体選択性は見られないことが判明した。

次に LDL の酸化時間を変えてベラパミル異性体との結合性の変化を調べたところ、いずれの光学異性体ともに酸化時間が増すにつれて nK 値はほぼ直線的に増加し、12 時間酸化により nK 値は約 5 倍増加した。また、LDL の酸化状態に依らず、光学異性体間で LDL との結合に差は見られなかった。

以上の結果から、LDL の酸化により薬物との結合が強くなることが判明した。また、LDL とモデル薬物との結合は脂質層への分配的結合が支配的であり、立体選択性は見られないことも判明した。本分析法は微量試料による結合分析が可能であり、血漿リポタンパク質の定量的な結合研究に有用である。

【文献】

- (1) Ohara, T., Shibukawa, A., Nakagawa, T. (1995) *Anal. Chem.* **67**, 3520-3525.
- (2) Shiono, H., Shibukawa, A., Kuroda, Y., Nakagawa, T. (1997) *Chirality* **9**, 291-296.

ヒト赤血球の電気泳動

山本洋平、山内規寛、北川慎也、○津田孝雄
名古屋工業大学工学部応用化学科

Electrophoresis of Human Red Blood Cells

Youhei Yamamoto, Norihiro Yamauchi, Shinya Kitagawa, Takao Tsuda

Department of Applied Chemistry, Nagoya Institute of Technology, Gokiso, Showa, Nagoya 466-8555, Japan

ABSTRACT

Under an electric field, human red blood cells migrate to a positive electrode, due to their negative charges on the surface. Under the 1G, the interaction and friction with inner wall of the capillary effect electrophoresis of RBC. Under the micro-gravity RBCs are floating, so there is no interaction and friction. It was proved that the electrophoretic mobility of RBC under micro-gravity is larger comparison with under the 1G.

RBCs were separated in fused-silica capillary tubing (50 μ m i.d., 23.6 cm and effective length 8.5 cm), which inner wall was coated with albumin bovine serum (BSA) to avoid adsorption of cells. 0.9% sodium chloride - 1% BSA aqueous solution was used as medium. The electropherogram is very fine and shows about one hundred peaks. RBCs have been separated in single cell levels. By using CCD-video system, the separation of RBCs at single cell level is also observed.

ヒト赤血球は通常表面にマイナスの電荷をもっている。そのため赤血球を電場下におくと、陽極へ向かって電気泳動を行う。今回は、微小重力下における赤血球の電気泳動と、赤血球のシングルセルレベルでの分離について検討した。

微小重力下における赤血球の電気移動度の測定

赤血球の比重は生理食塩水や血漿と比較して大きい。従って 1G 下においては沈降し、泳動を行うキャピラリーの底面と接触する。この状態で電圧を印加し電気泳動を行った場合は、血球と壁面との摩擦や、血球-壁面間の相互作用などのため、真の電気泳動速度よりも小さい値で泳動を行うと予想される。地上においては血球の沈降を防ぐため糖類などを添加し泳動媒体の比重を増加する方法が用いられることもあるが、この方法によって得られる値は媒体の影響を受ける。

赤血球の電気移動度の測定においては体内における状態に近い条件で測定を行うことが、体内における血球の状態を知る上で望ましいと思われる。すなわち、自己血漿中における電気移動度を測定することが望ましい。しかしながら上述の通り、1G 下においては真の電気移動度を測定することは困難である。そこで微小重力場を利用することで、*in vitro* でありながら *in vivo* に近い条件で赤血球の電気移動度の測定を行うことを試みた。

実験：実験に用いた装置の概略図を Figure 1 に示した。装置は泳動用セルであるヒューズドシリカキャピラリー、白金電極を備えた二つのリザーバー、電源装置、セル観察用顕微鏡システム (1000 倍)

からなる。実験では自己血漿、または生理食塩水で 50 倍程度に希釈した全血をキャピラリー管に満たしたのちに、両端を 1%アガロースゲルで封印した。これにより 1G 下における高低差による溶液および血球の動きを封じた。内径 50 μ m、長さ 20mm のヒューズドシリカキャピラリーに対して電圧を印加し泳動状態を撮像、記録した。泳動媒体として生理食塩水を用いる際には血球の内壁への吸着を防ぐためあらかじめ自己血漿を内壁に物理吸着させたキャピラリー管を使用した。また顕微鏡システムによる観察はキャピラリー管に対して水平方向から行った。すなわち、重力場の影響を容易に観察できる装置を構築した。

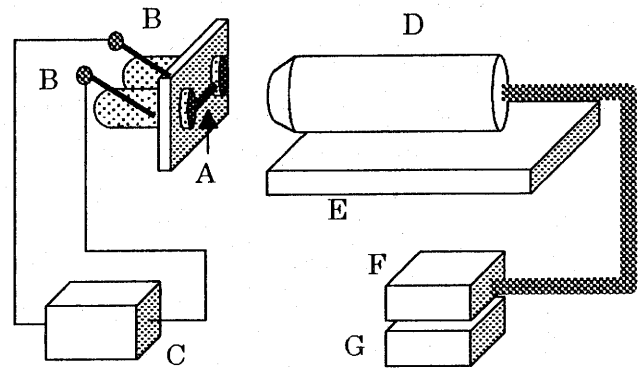


Figure 1 Schematic diagram of an apparatus for observation of red blood cells.

(A) capillary tubing, (B) reservoir with Pt electrode, (C) power supply (D) microscope-CCD system, (E) X-Y stage, (F) timer, (G) video recorder.

結果：1G 及び微小重力下の赤血球を観察したところ、1G における泳動では赤血球は重力によっ

て沈降しキャピラリー管底面と接触しているのに対して、微小重力下における泳動では赤血球は管壁より浮かび上がり管中央よりを泳動していることがわかった。このように微小重力場でセル電気泳動を行うことで管内壁の影響を避けることができることが映像的に観察できた。

また、記録された赤血球が泳動する画像から、赤血球の泳動速度を算出し、それを別途記録していた印加電圧から算出した電位勾配で割ることにより試料の電気泳動移動度を算出した。その結果、微小重力下における血球の電気移動度は 1G 下における電気移動度よりも大きいことがわかった。すなわち 1G 下における泳動速度は内壁との摩擦や相互作用によって小さくなっていることが確認された。

赤血球のシングルセルレベルでの分離

電気泳動を利用した細胞の分離はすでにいくつか報告されている。それらの報告では、ウイルスや細胞が種のレベルで分離されている。すなわち、一つの種で一つのピークを描いている。これまでの細胞分析は、数千個～数万個の細胞を一つのグループとして、その平均値をデータとして扱ってきた。しかしながら実際の細胞は、固有の性質を持っている。それゆえ現在シングルセルレベルでの分析が非常に重要視されてきている。シングルセルレベルでの分析の試みとして、キャピラリー電気泳動法を用い赤血球のシングルセルレベルでの分離を行った。

実験：使用したキャピラリーは赤血球の吸着を防ぐため以下の手順で内壁にウシ血清アルブミン (bovine serum albumin(BSA)、和光純薬工業、大阪) でコーティングを行った。泳動溶液には 1%BSA-0.9%NaCl 水溶液を用いた。赤血球は全血を生理食塩水 (大塚製薬、東京) で 10 倍量に希釈して使用した。赤血球の検出にはヘモグロビンの極大吸収波長である 430nm (分子吸光係数 144×10^3) を使用した。また、赤血球がシングルセルレベルで泳動していることを確認するために、CCD-ビデオカメラシステムを用いて観察を行った。

結果：430nm の吸光検出を行ったところ、スパイク状のピークが 100 本以上みられるエレクトロフェログラムが得られた。また、CCD システムでも赤血球がシングルセルレベルで泳動してくる様子が観察された。

動電クロマトグラフィー／質量分析法 (EKC/MS) : 基礎的研究と 医薬品分析への応用

1) 田中喜秀*, 岸本康弘, 2) 大塚浩二, 寺部 茂

1) 日本ベーリンガーインゲルハイム(株)

2) 姫路工業大学 理学部

Electrokinetic Chromatography/Mass spectrometry (EKC/MS) : Fundamental Studies and Applications in Drug Analysis

1) Yoshihide Tanaka*, Yasuhiro Kishimoto, 2) Koji Otsuka, Shigeru Terabe

1) Nippon Boehringer Ingelheim Co., Ltd.

2) Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

ABSTRACT

Although electrokinetic chromatography/mass spectrometry (EKC/MS) is an attractive analytical technique, it is commonly said that direct coupling of EKC with MS is incompatible due to the continuous introduction of nonvolatile buffer additives such as sodium dodecyl sulfate (SDS). In this study, however, the introduction of SDS did not cause low ionization efficiency of analytes. Some analytes were detected by both positive ion mode and negative ion mode in the selected ion monitoring (SIM). Several consecutive analyses were performed without problematic contamination of the ion-source and the MS instrument by SDS.

1. はじめに

近年、キャピラリー電気泳動／質量分析法 (CE/MS) の研究が盛んに行われており、様々な分析例が報告されている。しかし、そのほとんどは分離モードとしてキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) を利用したものである。中性試料を分離するときは動電クロマトグラフィー (EKC) を用いる必要があり、硫酸ドデシルナトリウム (SDS) のような不揮発性の添加剤が分離溶液に加えられる。しかし、EKC/MS ではそれらが MS 装置の汚染や目的成分のイオン化阻害の原因となる。今までに、キャピラリーの一部にのみ分離溶液を注入する部分注入法、あるいは弱酸性の分離溶液を用いて電気浸透流を抑制することにより MS 装置への SDS の侵入を防ぐ方法などが検討されているが、本研究では SDS が MS 装置へ侵入する条件で行い、SDS の影響について詳細に調べた。

2. 実験

CE 装置は Hewlett-Packard 製 HP^{8D} CE システム、質量分析計は Perkin-Elmer Sciex 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 (ISP) を用いた。CE キャピラリーにはスベルコ製の内径 50 μm 、外径 180 μm の未処理溶融シリカキャピラリーを長さ約 80 cm で用いた。分離溶液は 50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 8.5) に SDS を溶かして調製した。シース液は 50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 8.5) とメタノールの等量混液とし、

5 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液した。試料にはかぜ薬成分及びビタミン類を用いた。MS で正イオンを検出する場合は、CE 側に 20 kV 及び ISP のニードルに 5 kV の電圧を印加した。負イオンを検出する場合は、CE 側に 10 kV 及び ISP のニードルに -4.5 kV の電圧を印加した。

3. 結果

1) SDS による MS 装置の汚染

分析開始前に CE キャピラリーを分離溶液で洗浄するとき、ISP のニードルには電圧を印加しておらず、イオンスプレーによる SDS のイオン化は行われぬ。しかし、ネブライザーガスは流れており、キャピラリー先端より SDS を含む分離溶液が噴霧され、MS 装置を汚染する可能性がある。API-300 の場合、CE キャピラリーは MS 装置に対して同軸上に設置されておらず、分離溶液は MS 装置のオリフィス孔に直接噴霧されない。そのため、オリフィス孔の周辺は SDS で汚染されるが、オリフィス孔が詰まることはなかった。分析中は MS 装置に SDS が侵入するが、MS 装置を特に清掃する必要はなく、10 回以上の連続分析でも汚染に関する問題は生じなかった。

2) SDS によるバックグラウンド MS ピーク

正イオン検出の場合、SDS 陰イオンへのアンモニウムイオン又はナトリウムイオン付加物 ($m/z=284$, $m/z=289$, $m/z=301$, $m/z=306$, $m/z=311$) が検出された。負イオン検出の場合、SDS 陰イオン ($m/z=265$) 及び SDS に含まれる不純物の陰イオン ($m/z=279$, $m/z=297$ 等) が検出された。これらの質量数以外では、SDS が共存する場合でも選択的イオンモニタリング法 (SIM) により目的成分を検出することは可能である。

3) SDS による試料検出への影響

正イオン検出では Fig. 1a に示すように、SDS の影響を受けることなく試料ピークの検出が可能であった。負イオン検出では、Fig. 1b のように一部の試料についてのみ検出できた。

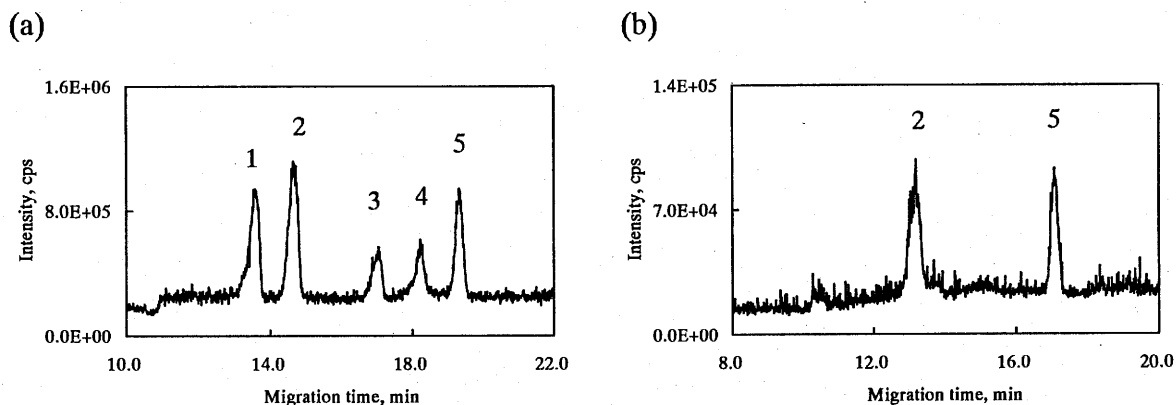


Fig. 1 Reconstructed ion electropherograms by EKC/MS using SDS micelles. MS detection, SIM by (a) positive ion mode, (b) negative ion mode. Separation solution, 80 mM SDS in 50 mM ammonium hydrogencarbonate buffer (pH 8.5); sample, 1: caffeine, 2: acetanilide, 3: guaifenesin, 4: riboflavin, 5: phenacetin; sample concentration, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each analyte.

遠赤外線の炊飯における影響(キャピラリーゾーン
電気泳動法による米中のV-B₁の分析)

津田 淑江、伊藤 愛*
共立女子短期大学

The Cooking Effects for Far-Infrared Ray on Rice
(The Study on CZE for Analysis of Vitamin B₁ in Rice)

Toshie TSUDA, Megumi ITOU*
Kyoritsu Women's University

ABSTRACT

Rice is the staple food in Japan, it is relevant to measure how different cooking methods affect the taste and nutrient. A radiating far-infrared ray has recently been developed to improve taste and also save energy. The cooking effects of radiating far-infrared ray were evaluated with rice. The three types of rice cookers (radiating far-infrared ray heater or Nickel coating heater) were compared with respect to changes of V-B₁ content and sensory evaluation.

Thiamine contents in cooked rice were analysed by Capillary zone electrophoresis (CZE). CZE analysis of thiamine was performed with CZE Quanta 4000 (Waters) with the following conditions: 0.05M SDS in phosphate solution buffer (0.02M Na₂HPO₄ plus 0.02M KH₂PO₄, pH9.0), 68.5cm × 75 μm I.D. fused-silica column, detection; UV absorbance detector at 254nm, applied voltage; 18kV.

These results indicated that radiant heating by far-infrared radiation provided good cooking effects for rice.

1. 目的

米は私達日本人にとって毎日主食として食されている食物である。おいしい飯を炊くことは、炊飯器に求められている。近年、遠赤外線を利用した調理器具は、加熱時間の短縮、食味の変化などの効果が認められ、市場に多く出回っている。本研究では遠赤外線炊飯器で米を炊くとき、飯の出来映え、ビタミンB₁残存率に遠赤外線がどのような影響を与えるか、その付加価値を検討することを目的とした。

2. 実験

炊飯器の内ブタ、内釜を遠赤外線放射材料でコーティングした遠赤フタ付き遠赤内釜(遠赤-遠赤)、内釜のみコーティングをしたNiメッキフタ付き遠赤内釜(Ni-遠赤)、内ブタ、内釜どちらも遠赤外線未処理Niメッキを行ったNiメッキフタ付きNiメッキ内釜(Ni-Ni)の3種類を使用した。炊飯器の違いによる飯のおいしさ(官能評価)、色差、粘度、ビタミンB₁残存量の測定を行った。米中のビタミンB₁の定量には、キャピラリー電気泳動(Capillary zone electrophoresis; CZE)を用いて行った。CZEは、クオンタ4000; ウォーターズ社製、Fused Silica Capillary 75 μm × 68.5cm、注入法は落差法、検出には254

nmを用いた。内部標準物質としてp-アミノ安息香酸エチル(水:エタノール 1:1 V/V)を用いた。

3. 結果及び考察

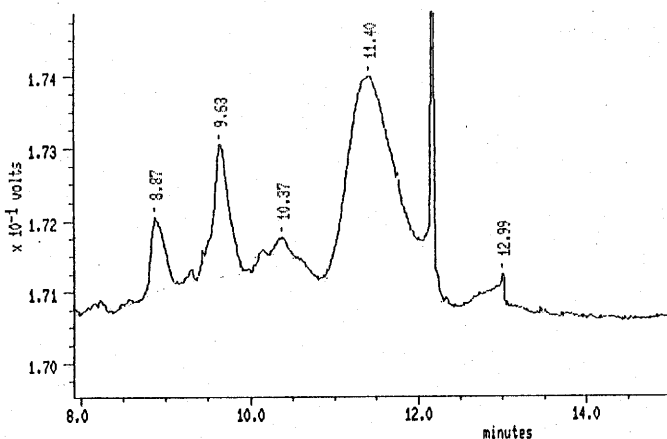
(1)飯の出来映え

試料は精白米を用いた。試料の米は、直径2 mmメッシュのふるいで米粒を均一にしてから同条件で洗米炊飯を行った。炊飯直後ではNi-Niは黄色味が強く、Ni-遠赤は黄色味が弱かった。また、Ni-Niは保温時間経過と共に黄色味が増す傾向にあった。糖度は炊飯直後、Ni-Niの糖度が最も高く、Ni-遠赤が低かった。いずれの炊飯器においても保温時間に伴い糖度は高くなる傾向を示したが18時間後のNi-Niの糖度は低くなる結果となった。官能検査の結果、Ni-Niは外観においては他の飯と大差は認められなかったが硬さ、粘り、香り、味の点で評価が悪く、総合的に好まれない結果となった。Ni-遠赤は粘りが強く味の点でも評価され、総合的に最も好まれた。

(2)ビタミンB₁分析

試料は胚芽精米を用いた。試料調製は以下の通りに行った。生米中のV-B₁定量の場合は粉末にし蒸留水で懸濁液とした。飯中のV-B₁定量においては米は洗米せずに直接炊飯した。飯に蒸留水を加えてホモジナイズし懸濁液とし、氷酢酸を加えpH4~5とした後、沸騰水浴中で30分間加熱した。冷却後、5%タカジアスターゼ溶液を加えてよく混和し、トルエン数滴を加えた後37℃恒温槽中で16時間反応させた。1N-H₂SO₄を加え、沸騰水浴中で30分間加熱し、酵素反応を止めた。冷却後、少量のエタノールを添加した後、蒸留水でメスアップし、濾過した。この濾液をCZE試料として用いた。

泳動溶液は、0.02M phosphate solution (0.02M リン酸水素二ナトリウム+0.02M リン酸二水素カリウム(pH 9.01)、0.05M ドデシル硫酸ナトリウム)、試料注入時間200秒、



18 kVの泳動条件で行った。その結果炊飯によるV-B₁の残存量は、いずれの炊飯器によっても炊飯直後には変化はみられなかった。

以上のように炊飯器の違いにより飯中のV-B₁量に大差は認められなかった。しかし保温時間によっては味、色などのおいしさの点においては明らかに遠赤外線の効果認められた。

Fig.1 Capillary zone electrophoresis of thiamine in rice with germs.

4. 文献

(1)S. Fujiwara, S. Iwase and S. Honda, *J. Chromatogr.*, 447(1988) 133

(2) H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto and S. Terabe, *J. Chromatogr.*, 465 (1989) 331

CE法を用いた粒子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化学工学分野

Measurement of electrophoretic velocity of particles with CE

Keiko Yamaberi*, Yoshihisa Murai, Hisako Kondo, Yushi Hirata

Division of Chemical Engineering, Department of Chemical Science and Engineering,
Osaka University

Abstract

Measurement of electrophoretic velocities of particles was conducted in a vertical capillary electrophoresis system, because the gravitational settling of particles largely affects the measurement in the usual horizontal CE system. The migration velocities of SiO₂ particles with uniform diameter of 2.26 μm and density of 1.92 g/cm³ were measured in a 100 μm capillary by changing the electric field strength from 5 to 25 kV/m and the solution pH from 4 to 9. The electro-osmotic velocities were measured before and after each measurement of migration velocity by using glucose as a tracer. The measured migration velocities varied linearly with the electric field strength, and the values extrapolated to zero electric field strength almost coincided with the gravitational settling velocity. The electrophoretic velocity of the particle increases with the solution pH.

1. はじめに

μmオーダーの径をもつ微小な粒子の電気泳動速度の測定には、従来、顕微鏡電気泳動法が用いられてきた。しかしながら、この方法では閉鎖系の透明セルを用いるために重大な問題が存在する。閉鎖系ではセル断面内で積分した流量がゼロとなるので、セル中央部に電気浸透流の環流が発生し、セル内の流速分布は壁からの距離に依存する。このため、粒子の電気泳動速度を求めるためには電気浸透流速度がゼロとなる位置（定常レベル）において移動速度を測定する必要がある。定常レベルの位置は理論的には導出されているが、この位置に存在する粒子に焦点を合わせ、その移動速度を測定することは困難である。また、粒子が浮上、沈降し、電気浸透流速度が粒子位置によって異なるため、粒子の真の電気泳動速度の測定は困難なものとなっている。

CE法においてもキャピラリー内壁は電荷をもち、キャピラリー中には電気浸透流が生じる。しかしながらキャピラリーの両端が開放形であるため環流が生じず、管内の電気浸透流速度は一定となる。このためキャピラリー内の粒子の移動速度は壁からの距離に関わらず一定となり、従来法に比べて高精度な電気泳動速度測定が期待される。本研究ではCE法のこのような特徴を利用し、粒子の真の電気泳動速度の測定を試みた。

2. 実験

粒子としてSiO₂粒子（MSF-30M、リキッドガス）を用いた。本粒子は球形でほぼ均一な粒子径をもち、体積平均径は2.26 μm、粒子密度は1.92 g/cm³である。従って、個々の粒

子の沈降速度、泳動速度はほぼ一定と考えることができる。

装置には市販のキャピラリー電気泳動装置（日本分光890-CE）を試料導入口から検出部までキャピラリーを垂直に設置出来るよう一部改良した（Fig. 1）。また、温度による電気泳動速度の変化を防ぐため、空気循環型恒温装置を設置し、25℃一定とした。キャピラリーは内径100 μ m、全長100cmのフューズドシリカキャピラリーを使用した。電気的中性物質としてグルコースを用い、粒子の泳動実験の前後に電気浸透流速を測定し、その平均値を泳動時の電気浸透流速とした。検出には210nmの紫外吸収を用いた。

3. 結果と考察

水平型CE装置では泳動中の粒子の沈降のため、様々な泳動時間をもつ粒子群ピークが検出されたが、垂直型CE装置では粒子のキャピラリー壁への沈降が防がれ、粒子群の検出ピークは単一となり移動速度の特定が可能となった。垂直型CE装置では粒子の沈降方向と移動方向が同一であるため、粒子の移動速度は電気泳動速度、電気浸透流速、沈降速度の和となる。電気浸透流速は電気的中性物質の移動速度として、また沈降速度は電場強さEに対する電気泳動速度と沈降速度の和のグラフの切片、つまり電場強さE=0の値として求められる。25kV/m以下の電場強さに対する電気泳動速度と沈降速度の和のグラフは良好な線形関係にあり、高電場下においてもジュール熱の影響のない測定が可能であった（Fig. 2）。測定データを電場強さE=0に外挿して求めた値はStokesの沈降速度式から求めた値とほぼ一致した。また、溶液pH=4では電気泳動速度はほぼゼロに近い値であったが、pHが4、6、9と増加するにつれ、負の電気泳動速度が増加した。これはpHの増加とともに粒子表面がより負に荷電したことを示し、粒子の材質であるSiO₂の性状と一致する。以上、本装置を用いて粒子の電気泳動速度の測定が可能であることが確認された。現在、

キャピラリー径と粒子との相対的大きさを変化させた泳動実験を行い、キャピラリー内壁が泳動に及ぼす影響を検討している。

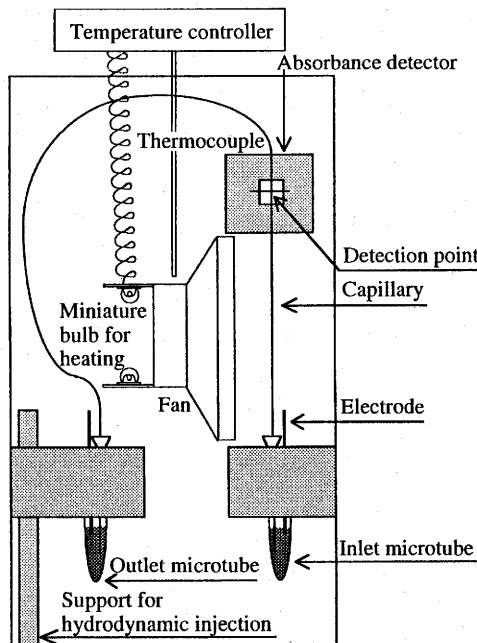


Fig. 1 Vertical capillary electrophoresis system

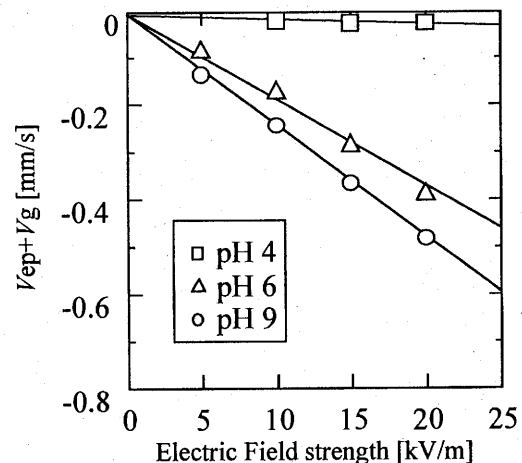


Fig. 2 Relationship between ($V_{ep} + V_g$) and electric field strength.

V_{ep} : electrophoretic velocity
 V_g : sedimentation velocity

オンライン濃縮を用いるミセル動電クロマトグラフィーによる環境科学関連物質の高感度分析

林原 浩文^{*1)}, 山内 澄男¹⁾, Joselito P. Quirino²⁾, 大塚 浩二²⁾, 寺部 茂²⁾

¹⁾三菱重工業, ²⁾姫路工大・理

High-Sensitive Analysis of Environmental-Interest Analytes by Micellar Electrokinetic Chromatography Using On-Line Concentration

Hirofumi Hayashibara^{*1)}, Sumio Yamauchi¹⁾,

Joselito P. Quirino²⁾, Koji Otsuka²⁾, Shigeru Terabe²⁾

¹⁾ *Mitsubishi Heavy Industries*, ²⁾ *Faculty of Science, Himeji Institute of Technology*

Abstract

An application of on-line concentration techniques of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was investigated in the environmental analysis. Several environmental pollutants or related compounds, such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs), were used as test solutes. Cyclodextrin modified MEKC (CD-MEKC) was used as a separation mode and stacking using reverse migrating micelles and water plug (SRW) [1] as a concentration technique. As previously reported, almost 100-fold or more gain in detection sensitivity was obtained for some model compounds. Effect of sample matrix, length of water and sample zones, and compositions of separation solutions on concentration-efficiency will be discussed.

1. はじめに

ポリ塩素化ジベンゾジオキシンやポリ塩素化ジベンゾフラン等の環境科学関連物質の分析は昨今その重要度をますます高めているが、多種類の構造異性体を識別できる分離能力と高い検出感度が要求される。溶媒抽出, カラム抽出, さらに高分解能ガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC-MS) を併用した現在の分析法は, 複雑な分析操作と高価な分析装置のために所要時間が非常に長く, かつコストも高いものとなっており, 経済的かつ効率的な分析技術の開発が強く望まれている。

キャピラリー電気泳動法 (CE) は分離能力が高く, 操作が容易で, かつ必要とする試料量が極めて少量ですむため, 環境科学関連物質の分析に適用すれば, 分析時間の短縮及び効率化に大きく貢献できるものと考えられる。そこで, ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) を用いたポリ塩素化ジベンゾジオキシンやポリ塩素化ジベンゾフランの分析を検討し, さらに検出感度の向上を試みた。

2. 実験

CE装置には大塚電子CAPI-3200を, 分離キャピラリーには内径50 μ m, 有効長30cm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。分離溶液には, 水に難溶性の中性分

子を構造異性体別に分離するため、ホウ酸塩或いはリン酸塩緩衝液に尿素、界面活性剤 (S D S), さらに γ -シクロデキストリンを添加したものを使用した。構造異性体試料には, 1,4-ジオキサン/エタノール混合溶媒にポリ塩素化ジベンゾジオキシン及びジベンゾフランを溶解したものをを使用した。

3. 結果と考察

ホウ酸塩緩衝液 (pH=9) からなる分離溶液を用いて電気泳動を行った結果をFig.1に示す。S D Sと γ -シクロデキストリンを用いたMEKCによって, 2,3-ジクロロジベンゾジオキシン, ジベンゾフラン, 2,3,7-トリクロロジベンゾジオキシン, ジベンゾジオキシン, 2,7-ジクロロジベンゾジオキシンを明確に分離できることが確認できた。この条件での検出下限はS N比から判断すると10ppm程度であり, 大気や河川水, 土壌等の環境分析への適用を図るためには, 検出下限の更なる改善が必要である。

そこで, キャピラリー内オンライン濃縮[1]による感度の向上を試みた。目的成分である中性分子を濃縮するため, キャピラリー内の一部に純水を注入して電圧印加時に電場が強化されるゾーンを形成させた。このゾーン内のミセルの移動速度は, 分離溶液内のそれより遙かに大きいため, 目的成分を内包したミセルは純水と分離溶液の界面に濃縮される。この手法を用いると, ポリ塩素化ジベンゾジオキシン及びジベンゾフランの検出下限を2桁以上改善できるものと考えられる。

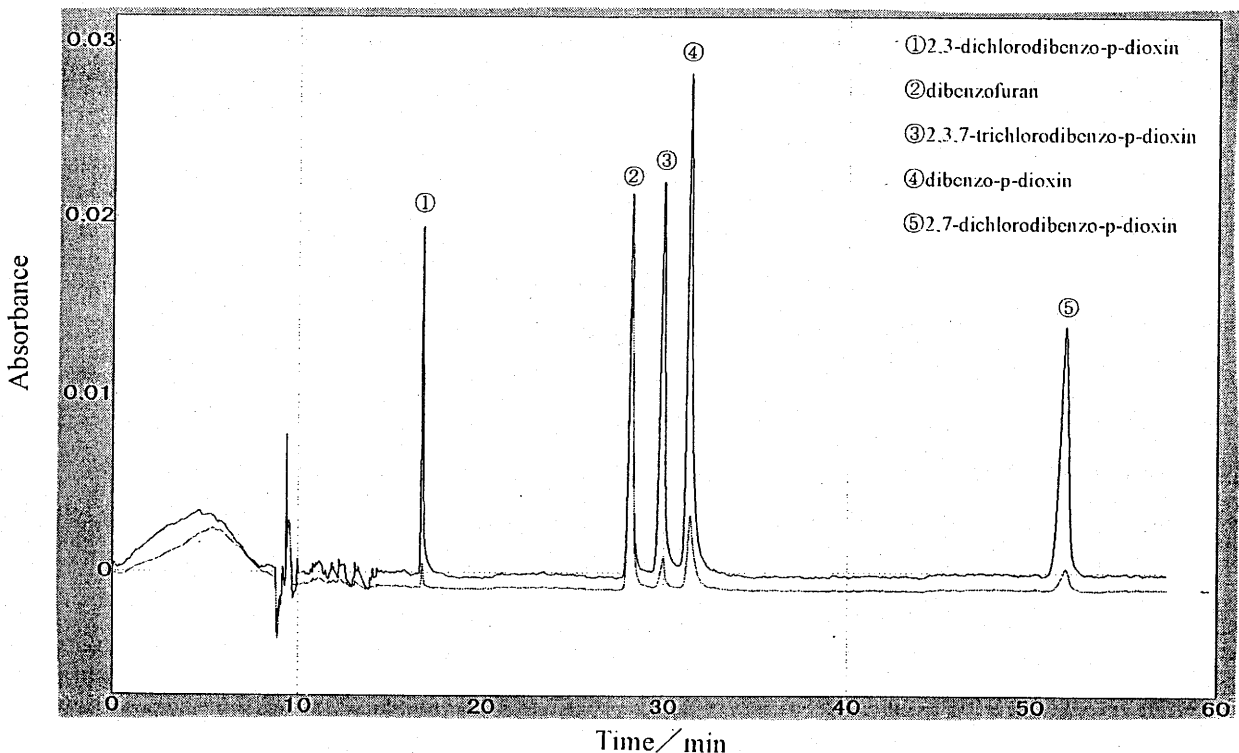


Fig. 1. Structural isomer separation of PCDDs by CD-MEKC.
:applied voltage, 15kV; capillary temperature, 10°C; detection wavelength, 230nm.

4. 文献

[1] J. P. Quirino, S. Terabe, *Anal.Chem.*, **1998**, *70*, 1893-1901

キャピラリー電気泳動法による海水の分析：イオン会合反応とイオン包摂反応を利用する陰イオンの分離

1) Andrei R. Timerbaev*, 2) 高柳俊夫、本水昌二

1) Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry,
Moscow

2) 岡山大学理学部

Seawater Analysis by Capillary Electrophoresis: Separation of Anions Using Ion-Association and Ion-Inclusion Interactions in Carrier Electrolyte

1) Andrei R. Timerbaev*, 2) Toshio Takayanagi, Shoji Motomizu

1) Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Moscow

2) Department of Chemistry, Okayama University

ABSTRACT

A preliminary CE method has been developed for determining inorganic anions in seawater using direct UV detection. The carrier electrolyte contained 100 mM KCl at pH 4.0 that offers the possibility of preventing interferences from high chloride matrix concentrations and makes unnecessary the use of an additional flow modifier. Modifications of the carrier electrolyte composition by incorporating tetrabutylammonium or 18-crown-6 were found essential for furnishing the separation selectivity. The role of ion-association and ion-inclusion interactions taking place in the CE system has been discussed.

1. Introduction

While a great many troublesome matrices are already amenable to the analysis by CE, seawater still remains a sample uneasy for the direct determination of inorganic anions. This is reflected by the fact that so far only a few published accounts on this subject can be traced in the literature [1-3]. The problem is mainly due to the strong matrix interference induced by the chloride ions, having an adverse effect on both the detection sensitivity and separation selectivity. This effect can hardly be overcome using conventional CE conditions without system performance being noticeably impaired. Therefore, there is a strong necessity for developing the advanced electrolyte systems for seawater analysis by CE.

2. Experimental

The CE experiments were performed using a Hewlett Packard 3D CE system comprising a CE unit with built-in diode-array detector. Separations were carried out on fused-silica capillaries with 50 μm i.d. x 40 cm effective length (48.5 cm total length). Before each injection both inlet and outlet buffer vials were renewed and the capillary was preconditioned for 5 min by flushing with the

run electrolyte. The applied negative voltage was set at 10 kV. The capillary cassette was thermostated at 30°C. The direct UV absorbance was measured at 200 nm. Surface seawater was taken from around the coastal area of Shibukawa.

3. Results and discussion

According to our preliminary investigations, among inorganic anions commonly occurring in seawater, bromide, iodide, nitrate, nitrite, and thiocyanate could be detected by means of direct UV absorbance measurements. Still, trace anionic analysis was challenging because of high excess of chloride in seawater. Advantageously, when a 100 mM KCl electrolyte (pH 4.0) has been applied, no peak due to chloride is recorded while injecting 1.0 M KCl, the chloride concentration level that is well above the typical seawater concentrations. Nonetheless, this electrolyte does not allow for complete separation of bromide/iodide and nitrite/thiocyanate ions injected from spiked seawater.

In order to attain a reasonable resolution for the tested anionic analytes, tetrabutylammonium (TBA), 18-crown-6, and 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane ([14]aneN₄) have been explored as electrolyte additives. The presence of TBA leads to an improved resolution of the Br⁻/I⁻ pair. On the other hand, nitrate and nitrite peaks tend to be co-migrated until the reverse in their migration order was observed at 50 mM TBA. The latter can be ascribed to the ion-pairing effect. At these electrolyte conditions, however, the bromide peak converted into a negative peak.

When 18-crown-6 is the modifier in the electrolyte, the separation performance showed improvement over the TBA system. A successful separation of all anions of interest was achieved with 15 mM 18-crown-6, nitrite being migrated after thiocyanate. The mechanism behind the observed selectivity changes and improvements is thought to be the formation of the potassium-polyether inclusion complex, accompanied by ion association with the sample anions.

Separations involving a positively charged macrocycle, [14]aneN₄ capable to interact specifically with anionic species due to both electrostatic and structural effects, revealed a different selectivity pattern regarding slowly migrating anions (nitrite – nitrate - thiocyanate), but Br⁻ and I⁻ remained co-migrated.

Summarizing, the CE method using acidic solutions containing high concentrations of KCl as the carrier electrolyte appears to be highly effective for the rapid separation of minor anionic seawater constituents amenable to direct UV detection, such as bromide, iodide, nitrate, nitrite, thiocyanate, etc. Detection performed with a Hewlett Packard high sensitivity detection cell (a pathlength of 1200 μm) would be tested in the present paper in an attempt to attain adequate detection sensitivity at the concentration levels relevant to the desired analyses.

4. References

- (1) Sakai, T.; Takahashi, T.; Suzuki, M. *Kankyo Kagaku*, 3, 494 (1993).
- (2) Fukushi, K.; Watanabe, K.; Takeda, S.; et al. *J. Chromatogr. A*, 802, 211 (1998).
- (3) Fritz, J.S.; Ding, W. International Ion Chromatography Symposium, Osaka, 1998, Abstract 12.

キャピラリー電気泳動によるめっき液分析

佐藤康博*、笹一志、丸山俊彦
大塚電子株式会社

Analysis of Plating Bath solution by Capillary Electrophoresis.

Yasuhiro Sato, Katsushi Sasa, Toshihiko Maruyama
OTSUKA ELECTRONICS CO., LTD.

Abstract

Control of nonelectroplating bath solution is not easy. Source of metal and reducing agents are gradually decreased. For that reason it's indispensable to supply very often those materials on a basis analyzing plating bath solution.

Analyzing by-products is also necessary to maintain gloss and uniformity of plating coat. Capillary electrophoresis has many advantages in comparison with usual methods. For example, preparation of sample is only dilution.

We studied on separation and reproducibility of nickel plating bath solution. Our separation method determined the quantity of nickel, inorganic and organic anions, cations.

1. はじめに

めっきの皮膜を一定に保つためにはめっき液の組成について一定時間毎に測定をおこない管理する必要がある。

キャピラリー電気泳動法で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も迅速な測定が可能である。

今回、キャピラリー電気泳動装置を使用して無電解めっき液中に含まれるリン酸イオン、有機酸、金属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。キャピラリーは全長 72.5cm、内径 75 μ m、外径 345 μ m、有効長 60cm の合成シリカ製のものを使用した。無機アニオンと有機酸の分析は有機酸分析用泳動バッファー（大塚電子社製）を使用し、検出は 220nm（インダイレクト UV 法）、印加電圧は -10 kV でおこなった。金属イオンの分析は四ほう酸ナトリウムにキレート剤 α -ISOC

(大塚電子社製) を添加して 200nm (ダイレクト UV)、印加電圧は 20kV でおこなった。

3. 結果と考察

図1に無電解ニッケルめっき液中に含まれる無機アニオンと有機酸について測定した結果を、図2に金属イオンについて測定した結果をそれぞれ示す。

図1では、無電解ニッケルめっき液で還元剤としてよく使用される次亜リン酸、亜リン酸、緩衝剤および錯化剤としてのリンゴ酸、酢酸、乳酸のピークがみられた。今回使用した泳動バッファの pH は測定対象とした各イオンの pKa よりも高いために、ピークの検出順序は電荷密度の高いイオンから順番に検出された。

金属イオンについては Ni^{2+} と Pb^{2+} がそれぞれみられた。 Ni^{2+} は Pb^{2+} よりも遅れて検出され、 Pb^{2+} に比べて Ni^{2+} は泳動バッファー中のキレート剤と錯体を形成しやすいものと考えられる。

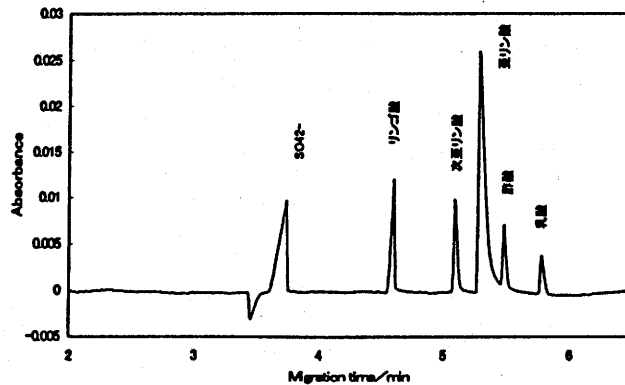


図1 無電解Niめっき液 (500倍希釈) 中に含まれる無機アニオンと有機酸のエレクトロフェログラム

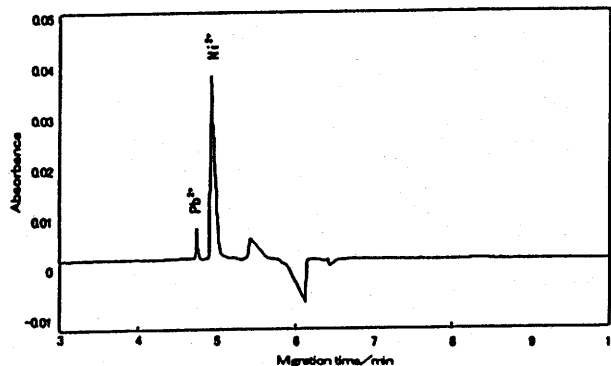


図2 無電解Niめっき液 (500倍希釈) 中に含まれる金属イオンのエレクトロフェログラム

キャピラリー電気泳動によるヒ酸, 亜ヒ酸, シアン等毒物の分析

- 1)丸山 敏彦*, 佐藤 康博、2)笹 一志、
 1)大塚電子株式会社 計測事業部 応用開発部 分析グループ
 2)大塚電子株式会社 東京支店

Analysis of Poisons by Capillary Electrophoresis
 Toshihiko Maruyama*, Yasuhiro Sato, Katsushi Sasa, ,
 Otsuka Electronics Co.,Ltd.

ABSTRACT

Cyanide, arsenate, and arsenite are used for plating solution and chemical plant solution in factory . However, these compounds were used in foods as poisons for murder . Those incidents demand us to analyze poisons in food samples. It's more difficult than analysis of factory samples , because we couldn't know obstacles. We investigated electrolyte and sample preparation. Problem of detection limit remains , but capillary electrophoresis gave a simple and rapid method to analyze poisons.

1. はじめに

これまでヒ酸、亜ヒ酸、シアン等はめっき液や工場排水などの中の成分として分析が行われてきた。しかし本年、毒物事件が多発したことにより食品や生体試料中で分析の要求が高まった。めっき液や工場排水などでは試料中に含まれる成分の全体像がおおよそ把握できているため分析条件の設定が容易であるが、食品などの試料は構成成分が未知であるため定性の信頼性を高める必要がある。そこでこれまで工場関連の試料分析で用いていた方法だけでなく、新たな条件を検討した。

2. 実験

装置 : CAPI-3200

測定対象成分 : Cyanide、Arsenate、Arsenite、Cacodylate、Azide

試料 : 烏龍茶、スポーツドリンク、トマトジュース、コーヒー牛乳、ジャム
 尿、

pH の異なる泳動液で測定対象成分の標準試料の分析を行いその挙動を調べた。また泳動液として各種のイオン種を検討した。定性の信頼性をたかめるためには複数の条件での分析を行なった。また試料ごとに前処理の検討をも行なった。

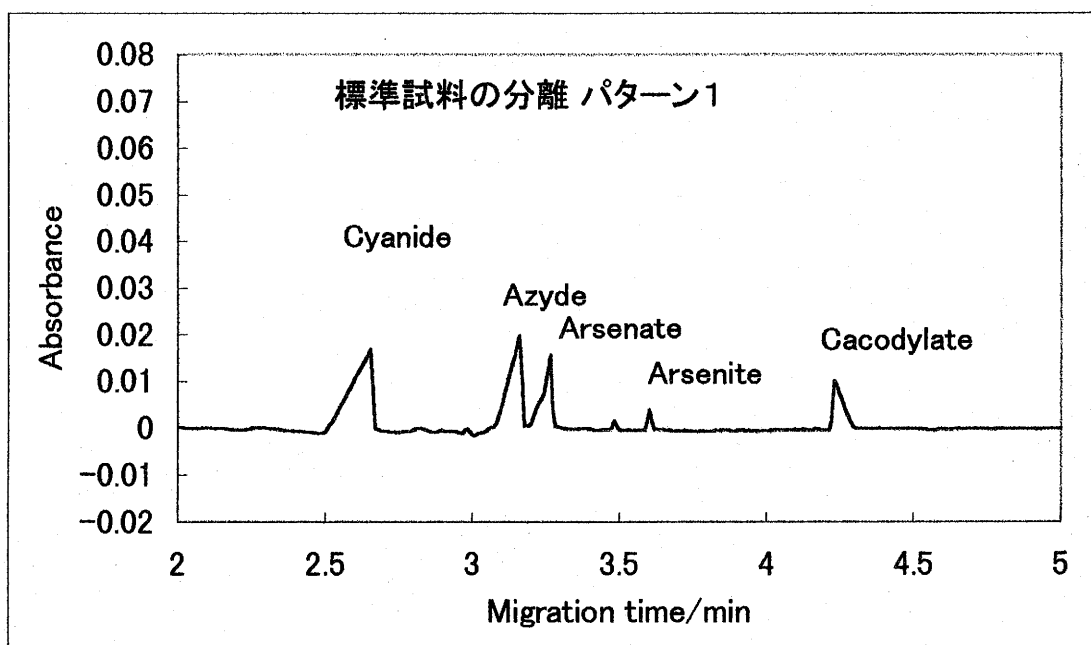
3. 結果と考察

泳動液のpHを10以上にすることによって Cyanide や Arcenite の分離を行なうことが可能となる。インダイレクト検出のために泳動液のイオン種としては安息香酸系、フタル酸系、サリチル酸系など各種が使用できるが、ベースラインのパターンに差があり試料に合わせて選択することができる。

ヒ酸、亜ヒ酸、カコジル酸等の砒素化合物は容易に分離同定することができる。

烏龍茶やイオン性飲料の場合はそのまま試料を分析することが可能であったが、トマトジュースやコーヒー牛乳などエマルジョンや固形成分を含む試料の場合はろ過フィルターや限外ろ過膜による前処理を行なうことで容易に分析できるようになった。

陽イオンの分析も合わせて行なった。これにより塩の種類も試料によっては可能である。



Proceedings of Asian Pacific Forum on Capillary Electrophoresis

キャピラリー電気泳動・アジア・太平洋国際
フォーラム

講 演 要 旨 集

主催：九州大学工学部

Postelectrophoresis Capillary Scanning: A High-Throughput, Versatile DNA Analysis Method

Suhyeon Kim and Jong Hoon Hahn

Department of Chemistry and Center for Biofunctional Molecules, Pohang University of Science and Technology, San 31 Hyoja Dong, Pohang 790-784, South Korea

INTRODUCTION

Capillary electrophoresis (CE) has been employed for the separation of fluorescently labeled DNA fragments.[1] CE provides rapid separation of DNA fragments. However, it is necessary to operate many capillaries in parallel to compete with slab-gel electrophoresis systems. A number of capillary array electrophoresis (CAE) system have been reported.[2] However, CAE systems have difficulties in preparation and manipulation of large numbers of capillaries,[3] in addition to their limited flexibility when running small number of samples. We have developed a new method, called postelectrophoresis capillary scanning (PECS), for increasing the throughput of CE-based DNA sequencing.[4-6] PECS method features a spatially and temporally separated arrangement between CE separation of DNA fragments and the visualization of the separation pattern. The capability of scanning a gel-filled capillary separated from the electrophoresis system increases the overall throughput because the scanner is not tied up during the slow electrophoresis step.

MATERIALS AND METHODS

Schematic of the capillary scanning system is presented in Figure 1. PECS system was similar to that of our previous work.[5] The major modifications are, first, stepping motor was used instead of DC motor for increasing precision of the peak location reading. Second, single-color detection was extended to a simultaneous four-color detection with two excitation beams (488 nm and 514 nm of Ar⁺ laser) and four emission light (540 nm, 560 nm, 580 nm and 610 nm for FAM, JOE, TAMRA, and ROX, respectively).

Fluorescently labeled DNA sequencing fragments were produced by dye primer cycle sequencing ready reaction -21M13 kit (Perkin-Elmer, Foster

City, CA, USA). Thermal cycling reaction was performed in a Perkin-Elmer GeneAmp 2400, under the condition provided by the manufacturer. Fluorescein-labeled allelic ladders on the four short tandem repeat (STR) loci (vWA, TH01, TPOX, and CSF1PO) and amelogenin locus were provided by Dr. Myunsoo Han, DNA Analysis Section of National Institute of Scientific Investigation, Seoul, South Korea. Carboxy-X-rhodamine (ROX) labeled T-track sequencing fragments of pSK(-), used as internal size markers, were generated by the same reaction as DNA sequencing.

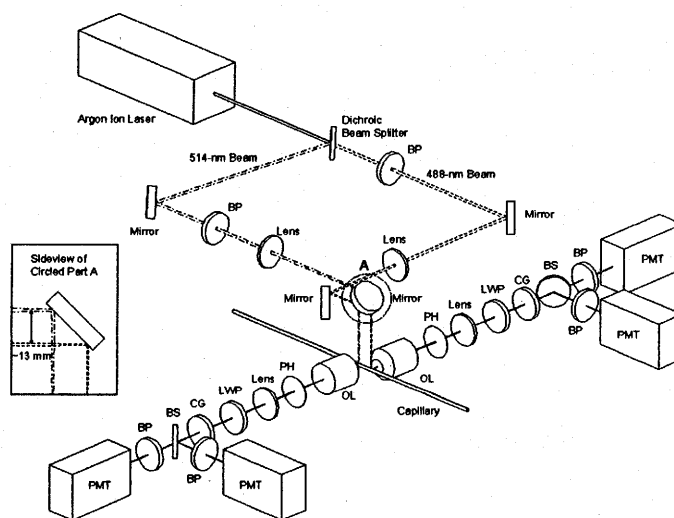


Figure 1. Schematic of capillary scanning system.

RESULTS AND DISCUSSION

The performance of this system was tested by sequence analysis of pGEM[®]-3zf(+) DNA. Figure 2 shows the results of scanning a capillary with the capillary scanning system after running it at 12 kV (100 V/cm) for 200 min. It took 3.5 s to scan the whole length of the capillary with a rate of 33 cm/s. The data were acquired at 2300 Hz with 140 μ m resolution. Readable sequence was obtained from base 20 which is the 2nd nucleotide after the primer. The determined sequence was well matched with the known sequence of the DNA template from base 23. Considering only a single nucleotide, the T-terminated nucleotides can be base-line resolved up to base 256. The sequence can be determined up to 400 bases.

To demonstrate the feasibility of the PECS method in the field of genotyping, we have performed rapid size analysis of fluorescein-labeled allelic ladders on four STR loci (vWA, THO1, TPOX, and CSF1PO) and amelogenin locus. The size marker was co-injected with the allelic ladders for eliminating run-to-run variations. Figure 3 shows the results of scanning the capillary containing the allelic ladders and the size marker. Base number of the size markers was assigned with the sequence of pSK(-) DNA. For the same STR locus each allele is separated with 4-bp difference, except THO1 9.3 where one adenine is missing in the seventh repeat so that 9.3 differs from 10 by only one base pair. That almost agrees with the results obtained by the PECS system.

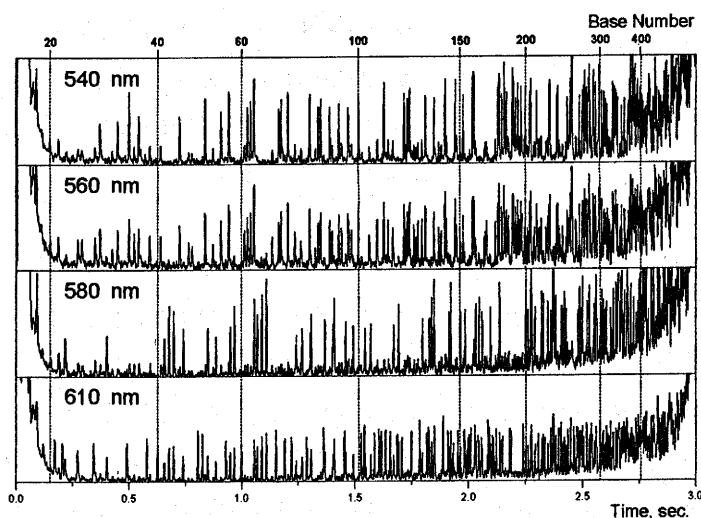


Figure 2. Sequencing data for pGEM generated with PECS.

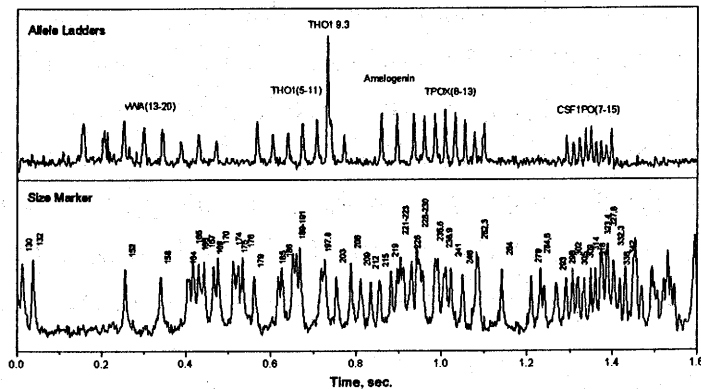


Figure 3. Electropherograms of genotyping samples detected with 540-nm (upper) and 610-nm channels (lower).

REFERENCES

1. Luckey, J. A.; Drossman, H.; Kostichka, A. J.; Mead, D. A.; D'Cunha, J.; Norris, T. B.; Smith, L. M. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 4417-4421.
2. Dovichi, N. J. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2393-2399.
3. Woolley, A. T.; Sensabaugh, G. F.; Mathies, R. A. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2181-2186.
4. Kim, S.; Yoo, H. J.; Nam, H.-G.; Hahn, J. H. *Chromatographia* **1995**, *40*, 345-349.
5. Kim, S.; Yoo, H. J.; Hahn, J. H. *Anal. Sci.* **1996**, *12*, 371-375.
6. Kim, S.; Yoo, H. J.; Hahn, J. H. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 936-939.

Analysis of Phenolic Compounds by Solid-Phase Microextraction Coupled with Capillary Electrophoresis

1) Chen-Wen Whang*, 2) Janusz Pawliszyn

1) Department of Chemistry, Tunghai University, Taichung, Taiwan 407

2) Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1

ABSTRACT

An on-line coupled solid-phase microextraction (SPME)/capillary electrophoresis (CE) method for phenolic compounds is described. Extraction of phenols from an aqueous sample was performed with a poly(acrylate) (PA)-coated silica fiber. A custom-designed interface was used to facilitate the direct insertion of the analyte-bearing fiber into the inlet end of a separation capillary. The performance of the interface was evaluated by SPME/CE analysis of the priority pollutant phenols using a 40- μm o.d. PA-coated silica fiber connected to a 75- μm i.d. capillary. The results clearly demonstrate that the interface is effective for on-line coupling SPME with CE.

1. Introduction

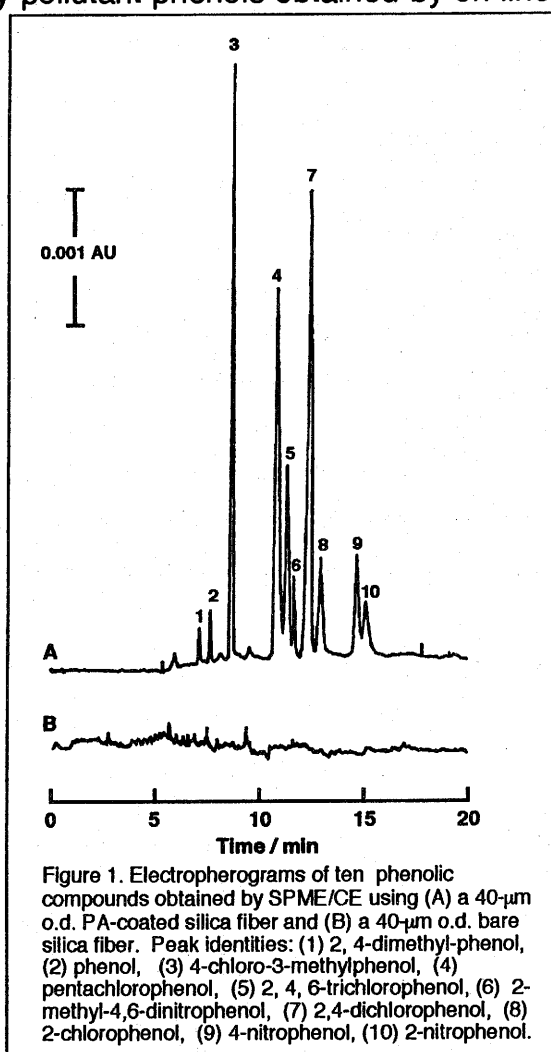
Solid-phase microextraction (SPME)¹ is a combined sampling and sample concentration technique which requires very simple and low-cost devices. The basic concept of SPME resides in absorbing the target analytes from the sample matrix onto a thin coat of polymer attached to a fused silica fiber. SPME was originally developed for gas chromatographic (GC) analysis of volatile compounds. Recently, it also has been applied to the high-performance liquid chromatography (HPLC)² and capillary electrophoresis (CE)³ of semi- or nonvolatile analytes. In this report, analysis of phenolic compounds by on-line coupled SPME/CE using a custom-designed interface will be presented.⁴

2. Experimental

A 40- μm o.d. poly(acrylate) (PA)-coated fused silica fiber was prepared in the laboratory. Phenolic compounds were extracted onto the fiber by immersing the fiber in an acidified (pH 2), salt-saturated aqueous sample for a fixed time of period. Following extraction, the analyte-bearing fiber was directly inserted into the injection end of a 75 μm i.d x 360 μm o.d. x 40 cm length separation capillary with the aid of a laboratory-designed SPME/CE interface. Separation of the ten priority pollutant phenols was performed using a 20 mM sodium borate buffer at pH 9.9. UV detection was carried out at 220 nm.

3. Results and Discussion

The PA phase, which is a low density solid polymer of medium polarity, has been shown to be the optimal coating for phenols. Although the extraction procedure for SPME/CE is the same as that for SPME/GC or SPME/HPLC, the commercial PA-coated fibers for GC or HPLC analysis are not suitable for CE because their diameters (100-300 μm o.d.) are too large to fit in with the commonly used capillary tubing. All SPME fibers used in this study were laboratory-made and were of 40 μm in diameter. Extraction was performed in an acidified (pH 2), salt-saturated aqueous sample containing the spiked analytes. In order to facilitate a direct insertion of the analyte-bearing PA fiber into the inlet end of a separation capillary, a simple interfacing device was constructed in the laboratory. Figure 1A shows an electropherogram of ten priority pollutant phenols obtained by on-line coupled SPME/CE using a 40- μm o.d. PA-coated silica fiber and a 75- μm i.d. separation capillary. Sharp and symmetrical peaks were observed for all the analytes. Additionally, the migration order of the ten phenols is the same as that obtained using conventional CE without SPME sample introduction. These observations clearly demonstrate the applicability of the thin fiber as well as the high performance of the custom-made interface. It is interesting to note that without a PA-coating, the bare fused silica fiber can not extract sufficient amount of phenol from an aqueous medium for detection, despite its polar characteristic (see Figure 1B). The concentration detection limit ($S/N = 3$) for pentachlorophenol obtained by SPME/CE with UV detection was found to be 2 ppb, which is about 2 orders of magnitude lower than that obtained using conventional CE-UV detection without sample preconcentration.



4. References

- (1) Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction*; Wiley-VCH, Inc; New York, 1997.
- (2) Chen, J.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 1995, 67, 2530.
- (3) Nguyen, A.-L.; Luong, J.H.T. *Anal. Chem.* 1997, 69, 1726.
- (4) Whang, C.W.; Pawliszyn, J. *Anal. Commun.* 1998, 35, in press.

A novel method for the study of Affinity Capillary Electrophoresis

Mei FANG Li SHENG Huiwan HAN Xiao YU Rui ZHAO Guoquan LIU*

Laboratory of Analytical chemistry in Life Science, Institute of Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

Abstract

A new affinity capillary electrophoresis method coupled with on-line microdialysis using attachable electrode in order to study the interaction of biomacromolecule with its small molecule ligands was developed. The sampling mechanism was discussed and the experimental condition was optimized. With a home-made equipment the binding constants of bovine serum albumin (BSA) with D,L-tryptophan (Trp), Sulfamethoxazole (SMZ) with trypsin and chymotrypsin were determined. The method is simple and practical and available to be performed in the desired physiological condition.

1. Introduction

Determination of binding constants plays an important role for the studies of biomolecule recognition. Compared with traditional methods such as equilibrium dialysis, HPLC, the affinity capillary electrophoresis [1] is preferable in investigating the biomolecular interactions with the advantages of small sample amount consumed, and observing the interactions in free solution. But the application of ACE, whether mobility change analysis or equilibrium mixture analysis, is limited because macromolecule is easily adsorbed to capillary wall, which makes electroosmotic flow vary, or electrophoretic peak broad.

We developed a new capillary electrophoresis method coupled with on-line microdialysis using attachable electrode. It is suitable for the introduction of positively or negatively charged or neutral analyte and was used to study the interactions between macromolecules and its small molecule ligands.

2. Experimental

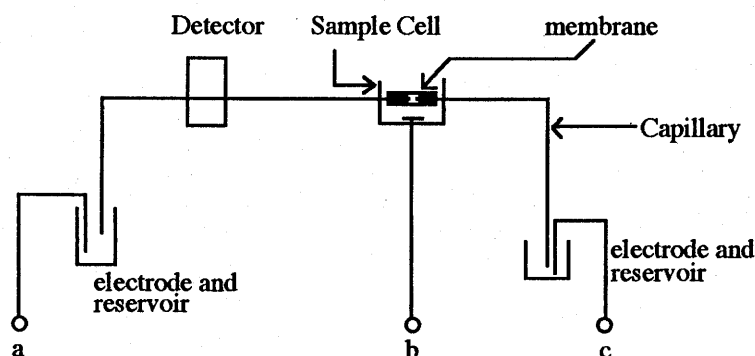


Fig.1. Schematic diagram of experimental set-up

The homemade electrophoresis equipment is shown in Fig. 1. The sample cell is circular with a volume of 100 μ L. An attachable platinum electrode was fixed at the bottom of the cell. Fill the capillary with running buffer. When sampling add the analyte in the sample cell, immediately apply voltage for certain time between a and b or b and c electrode depending on the charge of the analyte. Replace the analyte in the sample cell with running buffer and perform electrophoresis.

3 Results and discussion

3.1 Determination of the binding constant of SMZ-BSA

A series of SMZ standard solutions were determined under the above stated conditions. The peak area calibration curve for SMZ was obtained with a correlation coefficient r^* of 0.9929. The precision of the method in terms of RSD was 2.6% (n=4).

Different concentrations of SMZ were incubated with BSA of the fixed concentration for 15 min and determined. The concentrations of free SMZ were obtained from the calibration curve. According to the Klotz plot of $1/r$ versus $1/[SMZ]$ and the Scatchard plot of $r/[SMZ]$ versus r for SMZ-BSA we can get $K_{SMZ-BSA}$ and $K_{SMZ-BSA}$ being $5.9 \times 10^4 M^{-1}$ and $5.7 \times 10^4 M^{-1}$ respectively. The average value is $5.8 \times 10^4 M^{-1}$.

It was showed that the amount of free small molecule introduction from the sample cell was small, resulting in free concentration being determined without disturbing the equilibrium established.

3.2 Determination of binding constants of L-tryptophan-BSA and D-tryptophan-BSA

The binding constant of BSA with L-tryptophan was determined by mentioned method, with $K=2.3 \times 10^4 mol/L^{-1}$. There is few report on binding constant of BSA with D-tryptophan. Using the same method as above the value was determined with $K=1.77 \times 10^3 mol/L^{-1}$.

3.3 Determination of the binding constants of SMZ-trypsin and SMZ-chymotrypsin

Using the similar method the binding constants of SMZ-trypsin and SMZ-chymotrypsin have been determined with $K=1.4 \times 10^4 mol/L^{-1}$ for SMZ-trypsin and $K=6 \times 10^3 mol/L^{-1}$ for SMZ-chymotrypsin. The results are concordant with those of affinity chromatography [2,3].

3.4 The mechanism of sample introduction

Introduction of the sample was performed by applying voltage in different way. It can be shown that the sample was introduced through the combined effect of electromigration [4], free diffusion [5] and electroosmosis. The amount of sample introduced is a linear function of the voltage. The correlation coefficient r^* is 0.9922.

References

1. Kiyohito Shimura, Ken-ichi Kasai, *Analytical Biochemistry* 1997,251,1
2. Xiaojun Wu and Guoquan Liu, *Biomedical chromatography* 1996, 10, 228-232
3. Xiaojun Wu and Guoquan Liu, *Chinese Journal of Analytical chemistry*, 1996, 24 (11) 1245
4. Q-Sh Lin, T-T Zhang, G-Q Liu, *Chinese Chemical Letter*, 1996, 7 (1), 35.
5. Chen Yi, Zhu An, *SE PU (Chinese J. of Chromatography)*, 1991, 9 (6) :353

CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY- ITS APPLICATION IN HIGH SPEED SEPARATION

Zhang, Yukui Shi, Wei Zhang, Lihua Zou, Hanfa Zhu, Jun
Dalian Institute of Chemical Physics,
Chinese Academy of Sciences
Dalian 116023 P.O. Box 110

Capillary Electrochromatography (CEC) is a relatively new micro separation technique that can be regarded as the combination of HPLC and CE. It has many advantages such as high efficiency, high resolution and low consumption of both samples and solvents. Separation of complex samples by common CEC is always time-consuming. This report is focused on the application of CEC in high speed separation.

Theoretically, CEC shows advantages over HPLC with higher linear speed of the mobile phase due to the plug like electroosmotic flow (EOF) profile. Several experimental parameters, such as column length, applied voltage, pH value of the mobile phase, type and/or concentration of organic modifier, kind of the stationary phase and elution mode, should be considered together to shorten the analysis time of CEC while keeping the performance relatively high at the same time.

Since the column efficiency of CEC is usually above 150,000 plates/meter, compounds could even be separated well on a short CEC column in less time. Column with 6.5 cm packed length could be utilized on a fully automated Beckman P/ACE instrument. Samples such as aldehydes, ketones hydrocarbons and even chiral compounds were successfully separated in short time with high efficiency and high reproducibility. A new high speed separation criterion in CEC was developed.

2 μm non-porous silica (NPS) based C_{18} stationary phase was also investigated. 2 to 3 times higher speed was achieved with efficiency above 500,000 plates/meter. Data collection ratio was proved important in high speed separation.

Several kinds of gradient elution modes (titration and transferring mobile phase vials)were developed to shorten the analysis time without loosing resolution. Detection limit were also improved greatly.

For most brands of C_{18} , the velocity of EOF is very slow at low pH value. Mixed packing column (MP column) with SCX and C_{18} were first developed to generate high speed EOF at even extreme low pH value. Retention mechanism of such column was studied and proved superior to conventional column in high speed separation.

By applying electric field and pressure together (also called pressurized electrochromatography), the separation speed could also be improved greatly, which was also investigated in this research.

S 05

New Injection Technique for Capillary Electrophoresis

Sam Fong Yau Li

Department of Chemistry, The National University of Singapore

協 賛 企 業

本シンポジウムには下記企業からの協賛がありました。ここに厚く御礼申し上げます。

大塚電子株式会社

横河アナリティカルシステムズ株式会社

株式会社 島津製作所

株式会社 ケムコ

ベックマン コールター株式会社

日本ウォーターズ株式会社

シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社

日本バイオラッドラボラトリーズ株式会社

平成10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

本田 進 近畿大学薬学部

常任委員

大塚 浩二 姫路工業大学理学部

鈴木 茂生 近畿大学薬学部

委 員

新井 悦郎 ベックマン(株)

高柳 俊夫 岡山大学理学部

石濱 泰 エーザイ(株)

竹田 さほり 大阪工業技術研究所

今坂 藤太郎 九州大学大学院工学研究科

田中 信男 京都工芸繊維大学繊維学部

今澤 正興 国立精神・神経センター神経研究所

津田 孝雄 名古屋工業大学

江坂 幸宏 岐阜薬科大学

津田 淑江 共立女子短期大学

奥津 徹 日本バイオラッドラボラトリーズ(株)

寺部 茂 姫路工業大学理学部

奥山 典生 プロテイン・テクノス・インスティテュート

中川 照眞 京都大学大学院薬学研究科

恩田 宣彦 (株)パーキンエルマー・ジャパン

中村 洋 東京理科大学薬学部

金田 隆 九州大学大学院工学研究科

永柳 衍 (株)島津製作所

木曾 義之 広島大学名誉教授

西 博行 田辺製菓(株)

北岸 恵子 大塚電子(株)

萩中 淳 武庫川女子大学薬学部

児玉 裕敬 高知医科大学

馬場 嘉信 徳島大学薬学部

小林 英三郎 城西大学理学部

平岡 厚 杏林大学保健学部

酒井 忠雄 愛知工業大学

廣川 健 広島大学工学部

酒井 恒行 日本ウォーターズ(株)

福士 恵一 神戸商船大学

志村 清仁 帝京大学薬学部

藤本 忠蔵 浜松医科大学医学部

千田 正昭 日本分光(株)

真鍋 敬 愛媛大学理学部

曾我 朋義 横河アパリティカルシステムズ(株)

吉田 治弘 専修大学法学部

高木 俊夫 大阪大学名誉教授

渡辺 卓穂 星薬科大学薬学部

アンダーライン：第18回キャピラリー電気泳動シンポジウム実行委員長

第18回キャピラリー電気泳動シンポジウム講演要旨集

平成10年12月4日発行

編集：九州大学大学院工学研究科化学システム工学専攻

第18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 金田 隆

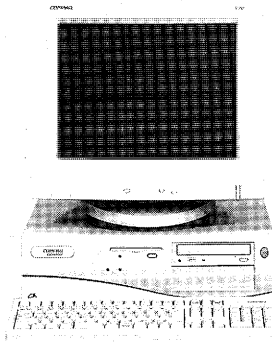
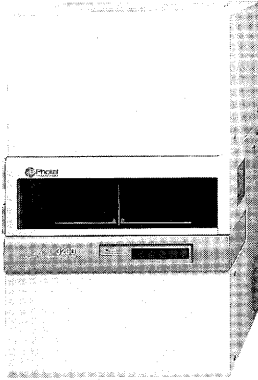
発行：(社)日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

印刷：陽明印刷企業組合

〒816-0811 福岡県春日市春日公園 1-3

TEL: 092-582-5229 FAX: 092-582-5281

顧客との対話が優れたクオリティーを生みだしました。



CAPI-3200Q CAPILLARY ELECTROPHORESIS MEASURING SYSTEM

マルチチャンネルキャピラリー電気泳動装置

日本語版 Windows98

第2回

期間限定キャンペーン

期間:'98分析機器展 ('98年9月2日)~'99年3月31日

キャンペーン価格
(CAPI-3200Q 標準システム)

498万円

ダブルキャンペーン

消費電 30%OFF

キャピラリー電気泳動装置を用いた分析でのユーザーガイドであり、また本装置からの測定データについて、今回大幅に改善し、種類を増やしました。追加機能に、日本語版の標準システム、各々の測定に最適化されたソフトウェア、30%OFFの割引、各種からの要望に広く対応されるようなアップデートをするため、今後も新製品を予定しています。

さらに使いやすくなったソフトウェア

- ◆習得しやすい画面構成
Windows対応、日本語表示、機能重視でシンプルな画面表示、簡単な条件設定
- ◆カスタマイズできるレポート機能

トータルサポート体制

- ◆充実した分析技術
- ◆品質管理に適したGLP対応

HPCE法のメリットを最大限に活かしたシステム

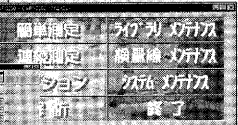
- ◆イオンクロマトや有機酸分析の常識をくつがえすメリット
- ◆微量サンプル、短時間、高分離能分析

安心のハードウェア

- ◆確実なデータ測定を保障するハードウェア



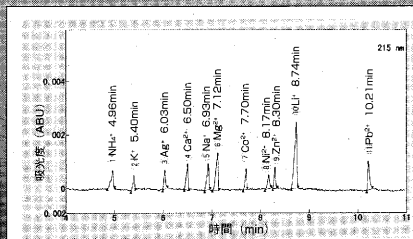
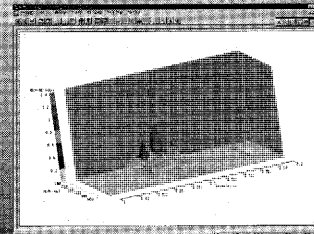
パスワード入力



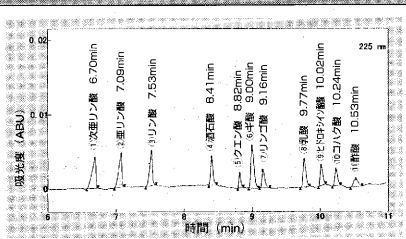
メニュー表示



簡単測定条件設定



陽イオン分析フェログラム



無機陰イオン・有機酸分析フェログラム

大塚電子株式会社

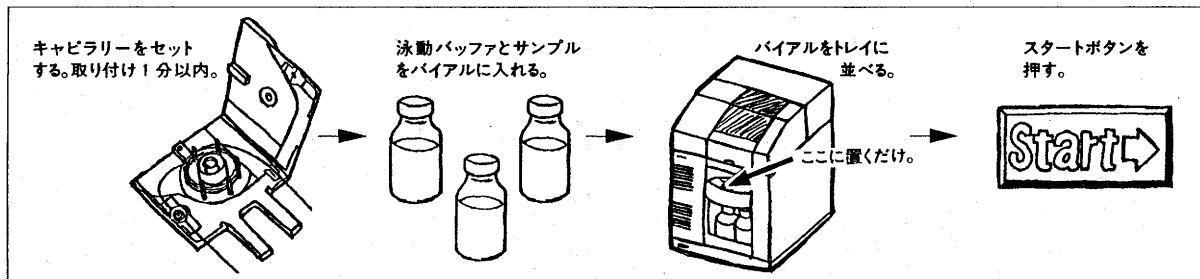
●計測事業部 〒192-0082 東京都八王子市東町1-6 橋元LKビル2F TEL. (0426) 44-4951 FAX. (0426) 44-4961
東日本営業 e-mail: tokyo.office@photal.co.jp
●計測事業部 〒573-1132 大阪府枚方市招提田近3丁目26-3 TEL. (0720) 55-8554 FAX. (0720) 55-9100
大阪営業 e-mail: osaka.office@photal.co.jp

ホームページアドレス: <http://www.photal.co.jp>

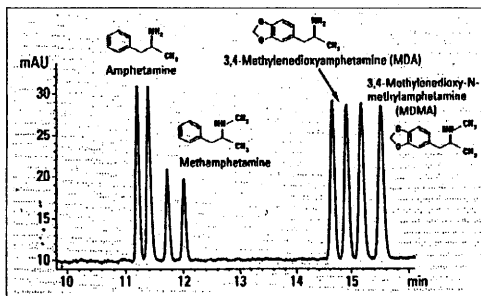
使えば天国。

HPキャピラリー電気泳動用アプリケーションキット

今までキャピラリー電気泳動って操作は簡単そうだけど、分析条件を決めるのはむずかしそう。そんなイメージあったでしょう。そこで、HP社のキャピラリー電気泳動システムを、より簡単にお使いいただくためにアプリケーションキットをご用意しました。本当に簡単、使えば天国です。

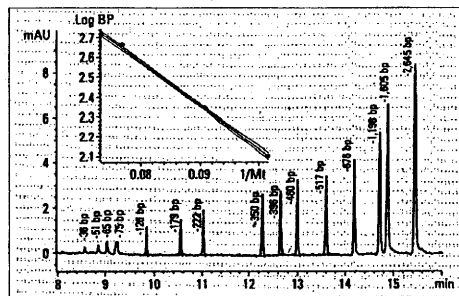


●キラルメソッド開発キット



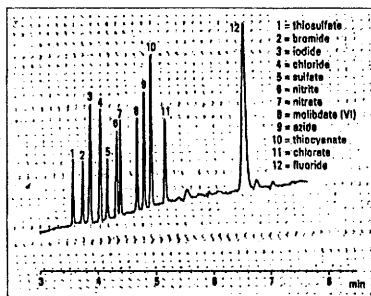
▲アンフェタミン類の光学分割

●ds DNA分析キット



▲DNA制限酵素フラグメントの分析

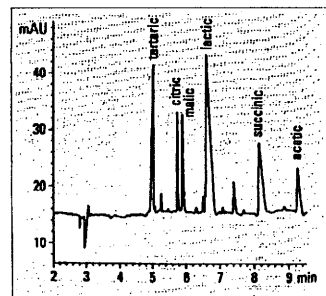
●無機陰イオン分析キット



▲陰イオン標準液の分離



●有機酸分析キット



▲日本酒中の有機酸の分析

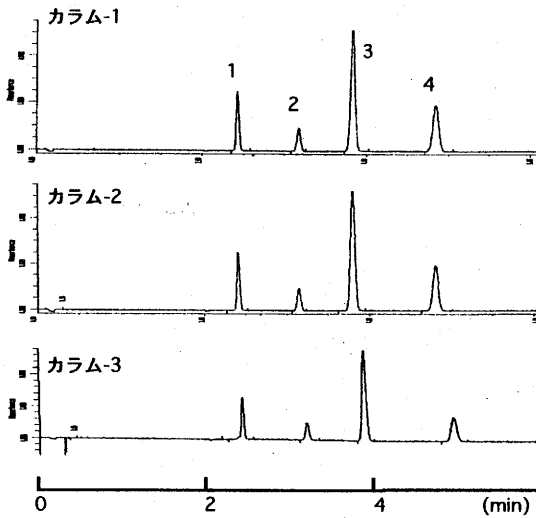


キャピラリー電気泳動システム

- オリゴヌクレオチド分析キットも発売中
- 来春、新キット発売予定

電場充填キャピラリーカラム

マイクロLC、キャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)用に開発されたキャピラリー充填カラムです。カラムへの充填方法として高電圧による電場充填法を採用しました。内径100 μ mまたは150 μ mのフーズドシリカキャピラリーにODSシリカゲル充填剤、イオン交換ポリマーゲル充填剤(カチオン交換、アニオン交換)を充填したカラムが利用できます(充填長さ5~40cm)。



キャピラリー電気泳動装置: Beckman P/ACE system 5510
 カラム : 内径100 μ m (外径375 μ m) カラム全長27cm, 充填長20cm
 充填剤 : Chemcosorb 3-ODS-H
 移動相 : 5mM THs-HCl (pH=8.0) / アセトニトリル=1/9 (v/v)
 電圧 : 700v/cm, カラム温度: 20 $^{\circ}$ C, 試料注入法: 電圧, 10kV/3s, 検出: UV254nm
 試料 : 1. アセトン, 2. 安息香酸エチル, 3. ビフェニル, 4. アントラセン

図-1 カラム間再現性の検討結果

<電場充填キャピラリーカラムの特長>

- ・電場充填による優れた分離効率
電場充填法により均一に充填された長いカラム、カラム間格差の小さいカラムが製造可能となりました。
- ・高耐圧性
特殊カラムフリット(特許申請中)により、高耐圧性(100kgf/cm²)も実現しました。電気浸透流に加えて圧力差流を用いる場合やマイクロLCカラムとしても使用できます。
- ・優れた再現性
電気浸透流及び各試料の保持時間の再現性に優れています。

フーズドシリカキャピラリー

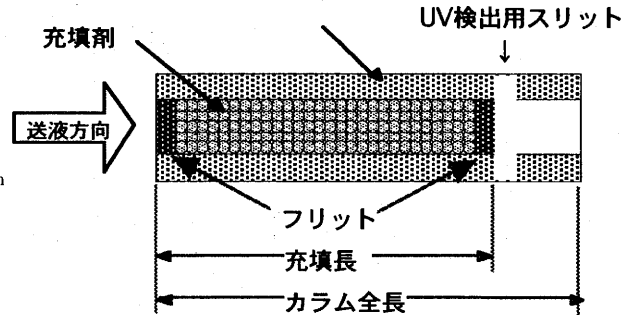
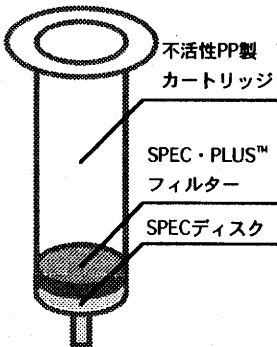


図-2 電場充填キャピラリーカラムの構造

ディスクカートリッジタイプ 固相抽出カラム



<特長>

- ・高い機械強度を持つガラスファイバーに高性能シリカゲルを含ま
- ・生体試料の目詰まりを防ぐ高性能プレフィルターを内蔵(SPEC・PLUS)
- ・高回収率、優れた再現性
- ・高流量で洗浄可能→作業時間の短縮化が可能
- ・省溶媒(従来の1/5~1/10の溶媒量)
- ・自動化が容易(各種前処理ロボットに対応)
- ・15種類の化学結合相→C18AR(耐酸性ODS), C18, フェニル, C8, C2, CN, NH₂, PSA, Si, SCX, SAX, MP1, MP3など

<製品>

- ・3, 10, 15mL容カートリッジカラム
- ・SPEC・PLUS・96-WELL PLATE
- ・SPEC・PLUS™・PT(ディスクカートリッジ内蔵ピペットチップ)



