

## 第24回キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE'04)

**主催** 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会

**共催** 日本分析化学会・日本分析化学会東北支部

**期日** 12月14日～16日

**会場** 東北大学記念講堂付設松下会館

(仙台市青葉区川内)

**参加費** 一般(主催, 共催学協会員): 当日 6,000 円, 予約 5,000 円(含講演要旨集代), 一般(会員外): 当日 7,000 円, 予約 6,000 円(含講演要旨集代), 学生: 2,000 円(含講演要旨集代).

**懇親会** 12月14日 18:00より

(東北大学川内キャンパス厚生会館)

**懇親会参加費** 当日 5,000 円, 予約 4,000 円

**連絡先・問合先** 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 07

東北大学大学院環境科学研究科 自然共生システム学講座

星野 仁 (事務局: 壹岐伸彦, 高橋 透)

電話: 022-217-7222 FAX: 022-217-7223

E-mail: [sce04@analchem.che.tohoku.ac.jp](mailto:sce04@analchem.che.tohoku.ac.jp)



# 第24回キャピラリー電気泳動シンポジウム

(於 東北大学記念講堂付設松下会館)

## プログラム

第一日 12月14日 (火)

13:00

開会挨拶 電気泳動分析研究懇談会委員長, 実行委員長

13:10-14:20 座長 高柳 俊夫

I-1 招待講演

温度による濡れ変化を用いる微小流路における溶液流れ制御

(名大院工) 齋藤 徹

L-1 CEC における異性体分離に対する電圧印加の影響

(名工大院工) ○北川慎也, 中川浩行, 荒木修喜, 津田孝雄

L-2 キャピラリーエレクトロクロマトグラフィーのためのカラム作製

(浜松医大医) ○鈴木浩司・藤本忠蔵

14:30-15:50 座長 藤本 忠蔵

L-3 マイクロチップ化蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動システムの構築と評価: マイクロチップへの溶液分注・導入操作の自動化

(1 浜松ホトニクス中研, 2 浜松ホトニクスシステム, 3 帝京大薬) ○松本 浩幸<sup>1</sup>, 高本 尚宜<sup>1</sup>, 久田 素<sup>2</sup>, 志村 清仁<sup>3</sup>, 笠井 献一<sup>3</sup>

L-4 マイクロフリーフロー電気泳動モジュールを使用した等電点電気泳動: 酸性領域での pH 勾配形成

(1 城西大理, 2 オリンパス光学) ○小林英三郎<sup>1</sup>, 大森義和<sup>1</sup>, 田島信芳<sup>2</sup>

L-5 アダマール変換マイクロチップ電気泳動法の開発

(九大院工) ○畑和貴 金田隆 今坂藤太郎

L-6 キャピラリーアセンブルド・マイクロチップ (10): 多層流形成を利用した前処理プロセスと電気泳動分離プロセスの集積

(兵庫県大院物質理学) ○久本 秀明, 竹田 正義, 柴森 亜紀, 寺部 茂

16:00-17:20 座長 福士 恵一

L-7 水-ポリエチレングリコール系でのイオンの溶媒和と非イオン性ミセルの静電ポテンシャル

(東工大院理工) ○大木 匠, 岡田 哲男

L-8 Investigation of ion association on using ethanol, dioxane and acetonitrile as buffer additives by capillary zone electrophoresis

(岡山大理) ○Julius Mbuna, 高柳 俊夫, 大島 光子, 本水 昌二

L-9 アニオン性金属錯体のキャピラリー電気泳動の高性能化—溶液内イオン間相互作用の制御因子としての尿素の利用

(東北大院環境) ○高橋 透, 後藤 慎吾, 壺岐 伸彦, 星野 仁

L-10 澱粉誘導体を添加剤に用いた CE 及びマイクロチップ電気泳動

(静岡県大薬, PRESTO) 行天 由香里, 今村 栄里子, ○加藤 大, 豊岡 利正

18:00-20:00

懇親会 (於 東北大学川内北キャンパス厚生会館)

## 第二日 12月15日 (水)

9:00-10:20 座長 江坂 幸宏

L-11 キャピラリー電気泳動を利用する細胞内糖転移酵素活性の比較解析

(近畿大薬) ○木下 充弘, 中村 仁美, 掛樋 一晃

L-12 2次元電気泳動上で検出される糖タンパク質の糖鎖解析

(近畿大薬) ○中西 康晴, 木下 充弘, 久保 兼信, 掛樋 一晃

L-13 ヒト IgG-Fc の糖鎖不均一性とキャピラリー電気泳動

(1 近畿大薬, 2 近畿大病院中央臨床検査部) ○久保 兼信<sup>1</sup>, 中西 康晴<sup>1</sup>, 前田 和成<sup>2</sup>, 森嶋 祥之<sup>2</sup>, 掛樋 一晃<sup>1</sup>, 岡部 亘雄<sup>1</sup>

L-14 マルチキャピラリー電気泳動装置によるタンパク質の特異的相互作用の解析

(1 帝京大薬, 2 日本カンタムデザイン, 3 都老人研プロテオーム共同研究セ) ○志村 清仁<sup>1</sup>, 木本 泉<sup>1</sup>, 笠井 献一<sup>1</sup>, 脇 卓真<sup>2</sup>, 岡田 政喜<sup>2</sup>, 戸田 年総<sup>3</sup>

10:30-11:50 座長 志村 清仁

L-15 希土類蛍光錯体を利用した蛋白質の SDS-時間分解キャピラリー電気泳動

(早大理工) ○山口 佳則, 橋野 仁一, 松本 和子

L-16 機能性微粒子を利用した生体試料高選択的分離・高感度検出の試み

(京大院工) ○岡本 行広, 北川 文彦, 大塚 浩二

L-17 プロテインフィッシングキャピラリー電気泳動法の開発

(九大院工) ○井上 淳司, 金田 隆, 今坂藤太郎

L-18 マイクロチップ電気泳動を用いた迅速微生物分離

(1 産総研, 2 愛媛県織産試, 3 愛媛大) ○鳥村, 政基<sup>1</sup>, 新谷, 智吉<sup>2</sup>, 佐藤, 浩昭<sup>1</sup>, 田尾 博明<sup>1</sup>, 真鍋 敬<sup>3</sup>

13:00-13:30 座長 久本 秀明

I-2 招待講演

マイクロチップ化学とマイクロ多相流

(東大院工, KAST, JST) 火原 彰秀

13:40-15:10 座長 豊岐 伸彦

パネルディスカッション

15:20-16:50

ポスター発表

P-1 マイクロ向流抽出の基礎検討

(東大院工) ○青田 新, 火原 彰秀, 北森 武彦

P-2 循環型マイクロチャネルを用いた液液濃縮抽出

(1 神奈川科学技術アカデミー, 2 東大院工) ○菊谷 善国<sup>1</sup>, 岩山 忍<sup>2</sup>, 青田 新<sup>2</sup>, 火原 彰秀<sup>1,2</sup>, 渡慶次 学<sup>1</sup>, 北森 武彦<sup>1,2</sup>

P-3 毛管現象を利用したマイクロチャネルの部分的化学修飾法とマイクロ気液プロセス

(東大院工, 神奈川科学技術アカデミー, JST) ○火原 彰秀, 岩山 忍, 上野 雅晴, 松岡 晋弥, 菊谷 善国, 渡慶次 学, 北森 武彦

P-4 疑似血管チップを用いた血管内皮細胞の応答計測システムの開発

(1 東大院工, 2 CREST, JST, 3 東大院農生命, 4 神奈川科学技術アカデミー, 5 東大院医) ○田中 有希<sup>1,2</sup>, 佐藤 記一<sup>2,3,4</sup>, 上村 公一<sup>5</sup>, 吉田 謙一, 北森 武彦<sup>1,2,4</sup>

P-5 化学発光検出を用いたマイクロチップ ELISA の開発と細胞刺激応答の検出

(東大院農生命) 宇井勇人, 徳山孝仁, 藤井紳一郎, 安補充, ○佐藤記一

P-6 汎用・高感度熱レンズ顕微鏡の開発

(1 科学技術振興機構, 2 マイクロ化学技研, 3 東大院工, 4 神奈川科学技術アカデミー) ○馬渡 和真<sup>1</sup>, 比企 伸一郎<sup>2</sup>, 火原 彰秀<sup>3</sup>, 渡慶次 学<sup>4</sup>, 北森 武彦<sup>1,2,3,4</sup>

P-7 逆相モノリス型シリカを用いるオンチップ液体クロマトグラフィー

(北大院工) ○石田 晃彦, 吉川 雄大, 夏目 大道, 谷 博文, 上館 民夫

P-8 蛍光誘導体化物質のマイクロチップ電気泳動分離における添加剤の効果

(産総研ヒューマンストレス) ○東 哲司, 田中 喜秀, 鳴石 奈穂子, 脇 田慎一

P-9 キャピラリー電気泳動法による微生物の迅速な分析～陰イオン性糖ポリマーによるピーク形状

の改善

(1 産総研環境管理2, 愛媛県繊維試) ○稲垣 真輔<sup>1</sup>, 鳥村 政基<sup>1</sup>, 孫 麗偉<sup>1</sup>, 關根 朝美<sup>1</sup>, 佐藤 浩昭<sup>1</sup>, 田尾 博明<sup>1</sup>, 新谷 智吉<sup>2</sup>

- P-10 電気化学アプローチによるグアニン類縁体の酸化損傷研究  
(1 岐阜薬大, 2 京大院農, 3 産総研環境管理) ○村上 博哉<sup>1</sup>, 江坂 幸宏<sup>1</sup>, 後藤 正志<sup>1</sup>, 酒向 孫市<sup>1</sup>, 加納 健司<sup>2</sup>, 鳥村 政基<sup>3</sup>, 田尾 博<sup>3</sup>
- P-11 配位子交換マイクロチップ電気泳動による NBD-アミノ酸のキラル分離  
(都立大院工) ○沈 輝, 中嶋 秀, 川田 勝彦, 中釜達 朗, 内山 一美
- P-12 キャピラリー電気泳動における Dynamic pH junction によるペプチドのオンライン試料濃縮  
(兵庫県立大院物質理学) ○今見 考志, 寺部 茂
- P-13 キャピラリー電気泳動法を用いたアミノ酸の分析  
(大塚電子) ○佐藤 康博
- P-14 抗ウイルス作用のある藍藻硫酸多糖スピルランとその分解産物のキャピラリーゾーン電気泳動における実効移動度とストークス半径 (第2報)  
(1 杏林大保健基礎物理, 2 杏林大保健病態, 3 富山医薬大薬, 4 富山医薬大医) ○横尾広光<sup>1</sup>, 平岡 厚<sup>2</sup>, 李 貞範, 林 利光<sup>3</sup>, 林 京子<sup>4</sup>
- P-15 CE-MS を用いた細胞内物質の解析  
(1 武蔵野大薬学部, 2 静岡県大学, 3. PRESTO) ○加藤 (酒井) くみ子<sup>1,2</sup>, 恩田 優子<sup>2</sup>, 加藤 大<sup>2,3</sup>, 楯 直子<sup>1</sup>, 豊岡 利正<sup>2</sup>
- P-16 キャピラリー電気泳動-質量分析法を用いた燃料電池劣化機構に関する研究  
(1 産総研環境化学, 2 産総研ユビキタスエネルギー) ○竹田 さほり<sup>1</sup>, 城間 純<sup>2</sup>, 安田和明<sup>2</sup>
- P-17 高アルカリバッファと表面未修飾キャピラリーカラムを用いた CE/MS による陰イオンの分析  
(横河アナリティカルシステムズ) ○野上 知花, 澤田 浩和
- P-18 オンライン電気透析-フリーフロー電気泳動装置の開発  
(広島大院工) ○梶村 康平, 育田 夏樹, 廣川 健
- P-19 グラジエント充填カラムを用いたキャピラリー電気クロマトグラフィー  
(名工業大院工) ○小田豊治, 北川慎也
- P-20 電気泳動の原点: Reuss の実験再訪  
(1 神戸大海事, 2 阪大名誉教授) ○豊田 純也<sup>1</sup>, 福士 恵一<sup>1</sup>, 高木 俊夫<sup>2</sup>
- P-21 マイクロチップ電気泳動における過渡的等速電気泳動前濃縮過程の直接観察  
(広島大院工) ○高山 洋一, 育田 夏樹, 廣川 健
- P-22 過渡的等速電気泳動前濃縮-CZE による生体関連試料中カチオンの分析(2)  
(1 広島大院工, 2Vernadsky Institute) ○岡本 光<sup>1</sup>, Andrei R. Timerbaev<sup>2</sup>, 廣川 健<sup>1</sup>
- P-23 過渡的等速電気泳動前濃縮を用いたキャピラリー電気泳動法の半導体分野への応用

(大塚電子) ○笹 一志

- P-24 キャピラリー電気泳動による粒子状クロムのスペシエーション  
産業医学総合研究所 鷹屋 光俊
- P-25 新規芳香族 EDTA 類縁体を用いる遷移金属イオン錯体の超高感度直接蛍光検出 CE の開発  
(北見工大工) ○段坂 直樹, 齋藤伸 吾, 星 座
- P-26 超微量金属錯体の速度論的識別モードキャピラリー電気泳動法におけるシアノホルマザン配位子の検討  
(東北大院環境) ○高橋 透, 竹原 由香, エスカンドル エイドリアン カンボサノ, 壹岐 伸彦, 星野 仁

### 第三日 12月16日 (水)

9:00-10:20 座長 北川 慎也

- L-19 ミセル動電クロマトグラフィーにおけるデータの標準化(V)  
(広島大院工) ○育田 夏樹, 伴 知晃, 山崎 泰二, 廣川 健
- L-20 サーフアクタントグラジエント-ミセル動電クロマトグラフィー  
(岐阜薬科大) ○江坂 幸宏, 後藤 正志
- L-21 キャピラリー電気泳動を用いたノニルフェノールの高感度分析  
(兵庫県大院物質理学) ○坪田 佳奈美, 寺部 茂
- L-22 キャピラリー電気泳動におけるオンライン錯形成/スウィーピング法による微量金属カチオンの高感度分析法の検討  
(兵庫県大院物質理学) ○磯尾 賢太郎, 寺部 茂

10:30-11:50 座長 竹田 さほり

- L-24 インターフェースチップの利用による熱レンズ顕微鏡検出のキャピラリー電気泳動への適用とその基礎的性能の評価 (3)  
(1 京大院工, 2 日本板硝子) ○津瀬鹿 毅<sup>1</sup>, 末吉 健志<sup>1</sup>, 内山 堅慈<sup>2</sup>, 服部 明彦<sup>2</sup>, 北川 文彦<sup>1</sup>, 大塚 浩二<sup>1</sup>
- L-23 キャピラリー電気泳動\_質量分析法によるヒ素化合物の分析  
(1 京大院工, 2 島津製作所) ○塩見 和孝<sup>1</sup>, 北川 文彦<sup>1</sup>, 向畑 和夫<sup>2</sup>, 荒井 昭博<sup>2</sup>, 大塚 浩二<sup>1</sup>
- L-25 A discriminate on-line sample preconcentration technique for phosphopeptide analysis in CE-MS  
(兵庫県大院物質理学) ○Monton Maria Rowena, Shigeru Terabe

L-26 生体成分の高性能分析を目指したマイクロチップ電気泳動-質量分析法の開発 (2)

(1 京大院工, 2 島津製作所) ○亀田 卓嗣<sup>1</sup>, 北川 文彦<sup>1</sup>, 荒井 昭博<sup>2</sup>, 鈴木 功一<sup>2</sup>, 中村 伸<sup>2</sup>, 大塚 浩二<sup>1</sup>

11:50

次回開催予告

閉会挨拶 電気泳動分析研究懇談会委員長, 実行委員長

木村一寛 発表

次回開催おこ

◎

福士

12:00

解散



# 招待講演

# SCE '04

## I - 1

温度による濡れ変化を用いる微小流路における溶液流れ制御  
○ 齋藤 徹 名古屋大学大学院工学研究科  
Control of liquid flow in microchannels based on temperature-  
induced wettability change at channel walls  
Tohru SAITOH  
Graduate School of Engineering, Nagoya University

A temperature-induced liquid manipulation was examined in narrow channels modified inside with a thermo-responsive polymer; poly(*N*-isopropylacrylamide) [PNIPAAm], having the lower critical solution temperature at 32°C. The modification was performed by Bind-Silane coupling and the subsequent co-polymerization of *N*-isopropylacrylamide and methylene bis(acrylamide). The temperature-dependent wettability change (32° ⇔ 68°) on PNIPAAm-modified surfaces was extended to (35° ⇔ 86°) by the co-modification with octadecyltriethoxy silane, and to (25° ⇔ 104°) by the modification on frosted surfaces. A water plug in a PNIPAAm-modified channel could be moved and stopped by warming the portion of the channel. A liquid stream was successfully directed at the T-junction of a branched channel.

【緒言】マイクロ分析システムにおける課題の一つに、微小流路における溶液の効率的な操作が挙げられる。本研究では、細い流路における溶液導入の駆動力が毛細管現象によっており、それが流路壁面の濡れ特性に大きく依存することから、壁面の濡れ特性を調節することによる新たな流れ制御の可能性を検討した。濡れ特性の調節は、壁面を温度感応性高分子 ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) [PNIPAAm] で修飾し、修飾部分を加温・冷却することによって行った。さらに、温度による濡れ変化を拡大させることにより、微小流路中の溶液流れ、せき止め及び流れ切り替え等の基本操作を試みた。

【実験】微小流路としては、内径 50~200 μm の熔融シリカキャピラリーまたはガラス基板にサンドブラスト加工により幅及び深さ 200 μm の溝を刻んだものを用いた。ガラス表面を Bind-Silane で修飾した後、*N*-イソプロピルアクリルアミドとメチレンビスアクリルアミド共重合反応溶液中に浸して PNIPAAm 薄膜を形成させた。表面の濡れ特性は水滴接触角により評価した。溶液流れを顕微レンズ付デジタルカメラにより観察・撮影した。

【結果と考察】高分子修飾表面における濡れ特性変化： Fig.1 に PNIPAAm 修飾ガラス表面の各温度における水滴接触角を示す。室温では 32°と高い濡れ性を示す一方、臨界温度(約 32°C) 以上では 68°とポリスチレンに相当する濡れとなり、内壁に PNIPAAm 修飾したキャピラリーへの毛管現象による溶液導入の程度も温度によって大きく変化した。さらに、PNIPAAm とともに疎水性の大きなオクタデシルシラン (ODS) で修飾したガラス表面において、PNIPAAm と ODS の被覆率を最適化したところ、水滴接触角は室温では 35°とそれほど変わらない一方、臨界温度以上では 86°となり、濡れ性の差を拡大することができた (Fig.1)。しかし、流路への水の浸入を完全に抑え、溶液の停止や分配を実現するためには、撥水性 (接触角 > 90°) が必要と考えられる。そこで、フロストガラス表面に PNIPAAm 修飾したところ、水滴接触角は室温で 25°と低下したのに対し、臨界温度以上では 104°となり、温度に依存する良好な水濡れ性と撥水性とが実現した (Fig.2)。

溶液流れ制御： (送液) 内壁を PNIPAAm 修飾したガラスキャピラリー中の水滴を加温によって移動させることができた (Fig.3)。加温によって濡れ特性の勾配が生じ、水滴は濡れ性の低い箇所から高い箇所に移動したためと考えられる。実際、水滴の停止位置は PNIPAAm の臨界温度の前後であった。 (流れ停止) PNIPAAm-修飾したフロスト加工流路の溶液流れは、50°C に調節したヒーター先端による加温の地点で完全に停止し、加温を止めた直後に再び流れ始めた (Fig.4)。 (切り替え) T-字路分岐部分の一方を加温したところ、溶液は加温していない方向のみに流れた (Fig.5)。

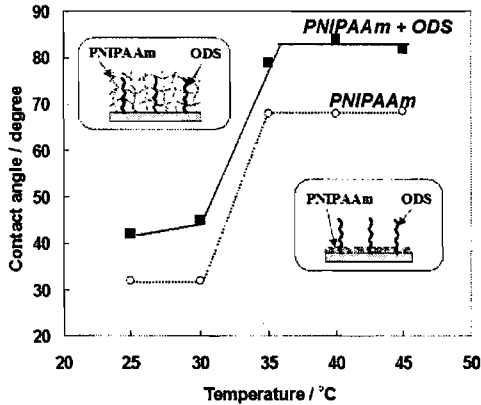


Fig. 1 Effect of ODS modification on thermo-responsive wettability of PNIPAAm-coated glass surface.

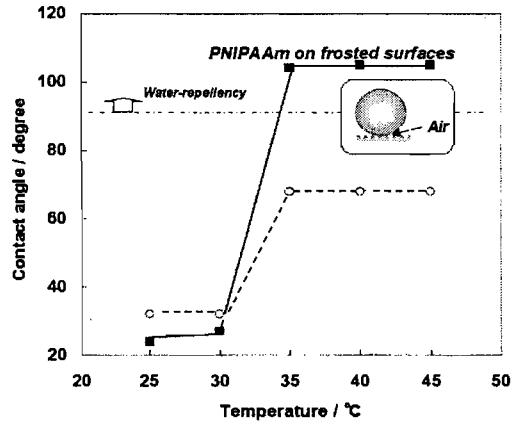


Fig. 2 Thermo-responsive wettability of PNIPAAm-coated frosted glass.

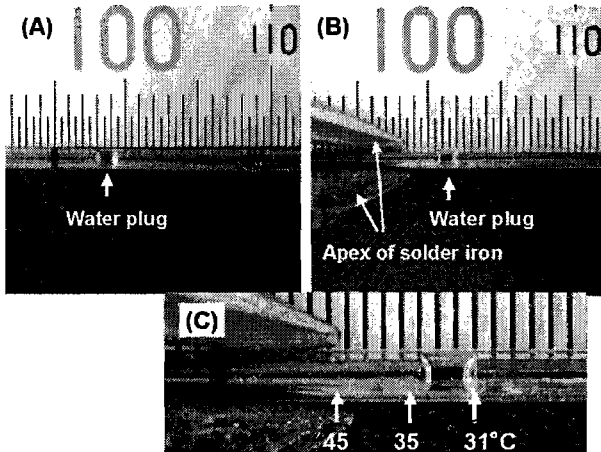


Fig. 3 Temperature-induced movement of a water plug in a PNIPAAm-coated glass capillary

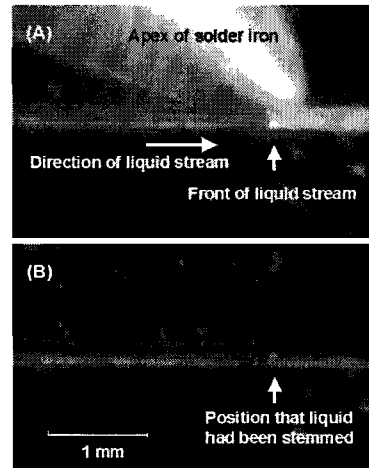


Fig. 4 Stop (A) and flow (B) of a liquid stream.

以上のように、濡れ特性の調節による微小流路中の溶液流れ制御の可能性が見出された。本方式は流路の微小化が進むほど有利になると考えられる。現在、本法の適用性や問題点について検討中である。

【文献】

*Anal. Sci.*, 18(2), 203-205 (2002).

*Chem. Lett.*, 33(7), 912-913 (2004).

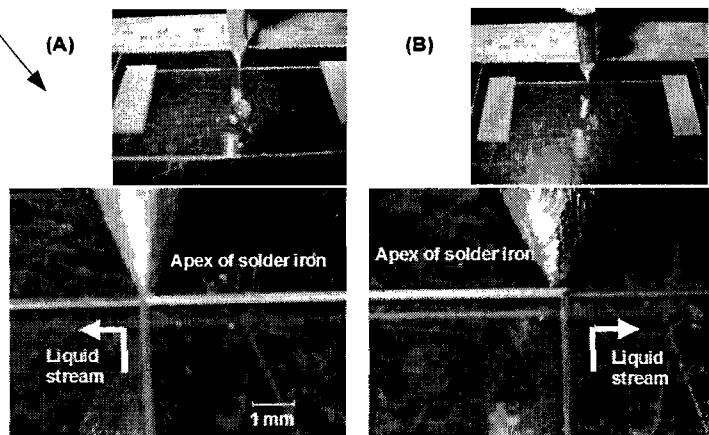


Fig. 5 Switching of liquid stream at a T-junction of a branched channel.

毛管現象  
10mE  
木. 20m  
↓  
×7.2213  
120mE  
↓  
蒸散. 水  
2.2mE  
3.2mE

人の葉  
つけたら  
ワックス修飾 - 毛  
↓  
Sand glass - 71mm 木. 20m 木. 20m 3.2mE

SCE '04

## マイクロチップ化学とマイクロ多相流

I - 2

火原彰秀

- 1) 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻
- 2) (財) 神奈川科学技術アカデミー (KAST)
- 3) 科学技術振興機構 (JST)

Microchip chemistry and micro multiphase flows  
Akihide Hibara

- 1) Department of Applied Chemistry, University of Tokyo
- 2) Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST)
- 3) Japan Science and Technology Agency (JST)

Micro chemical chip technology has advanced rapidly because of its favorable characteristics such as reduction of reagents and samples, high throughput, automation of chemical operations, and so on. We have investigated multiphase laminar flow of aqueous and organic phases. The multiphase flow can be utilized in solvent extraction and interfacial chemical reaction. In order to design chemical processes, stabilization and control method for the multiphase flow is indispensable. In this paper, the stabilization and control methods utilizing physical structure and chemical modification patterning are demonstrated. Furthermore, a novel microscopic optical measurement tool for interfacial processes in the multiphase flow is introduced.

### 【はじめに】

電気泳動法に代表される化学分析法やその他の化学操作を、小さな基板（マイクロチップ）上に集積化する研究は、試料・廃棄物量の低減，高速処理，自動化などの観点から注目を集めている。ガラス・シリコン・プラスチックの基板上に微小な流路（マイクロチャンネル）を作製するために、光リソグラフィやエッチングなど半導体加工技術を用いて化学分析操作・生化学操作などを集積化するため、分析化学・機械工学・電子工学など分野の研究者が協力して研究を進め、学際的な学術分野を創出してきた。この分野は、Micro Total Analysis Systems ( $\mu$ -TAS)またはLab on a Chip と呼ばれている。国際会議・国際シンポジウムも頻繁に開催されている。国内においても、化学・機械工学・電子工学などの学会において特別シンポジウムが開催されているのと同時に、これら異分野の研究者の定期的な学術交流の機会として「化学とマイクロ・ナノシステム研究会」という研究会を年2回開催している。

われわれの研究グループでは、インテグレートド・ケミストリー（集積化学）という概念を提出し、より一般的な化学操作を含む集積化学実験室の開発に取り組んできた。特に、物質の精製・分離に頻繁に用いられる溶媒抽出を集積化することに取り組んできた。溶媒抽出を実現するためには、水相と有機相をマイクロチャンネル中で接触させる必要がある。流れの中で複数の化学プロセスを連続して行うためにはただ接触させるだけでなく、プロセスを設計しやすい形で接触させる必要がある。そこでわれわれは、水相と有機相がマイクロチャンネル内で平行に流れる「マイクロ多相流」を提案し、実現してきた。このマイクロ多相流の特性やマイクロ多相流中での特異現象について紹介する。

## 【マイクロ化学プロセス】

図1は化学で一般的に用いられる溶媒抽出操作を一枚のチップに集積化する概念図を示している。通常の実験室スケールの実験では、分液漏斗とよばれるガラス器具に試薬と抽出相である有機溶媒を入れて、強く振盪することにより反応抽出を進行させ、最後に分光光度計により油相を測定する。我々は、この操作の全てを連続流中で、しかも複数段を自動的に集積化することに成功している。この連続流体化学プロセスを利用して、これまでに重金属の錯形成・抽出反応の集積化[1] (図1)、複数イオンの連続測定システムの集積化[2]、相間移動合成反応の集積化[3]、疑似生体膜系としての液膜輸送実験の集積化[4]、マイクロ向流抽出[5] (図2) などに成功している。

## 【マイクロ液液界面分光】

マイクロ多相流中の界面現象を計測するには、顕微分光法が必須のツールである。独自に開発した熱レンズ顕微鏡は、空間分解能  $1\mu\text{m}$  以下で単一分子程度の非蛍光性分子を定量できる方法であり、液相中の化学現象解析に非常に有効である。またレーザー蛍光 (LIF) 法も蛍光物質に対して有効である。しかし、全反射配置を含む TLM 法・LIF 法では、 $100\text{ nm}$  以下の空間分解能は原理上困難であり、 $1\sim 10\text{ \AA}$  の厚みしかない界面領域を選択的に計測することはできない。

われわれは、原理的に界面のみを計測できる手法である準弾性レーザー散乱 (QELS) 法に注目した。QELS 法は、熱揺らぎにより発生する界面張力波を計測する手法である。界面張力波の波長程度 ( $1\sim 10\text{ \AA}$ ) の空間を選択的に計測でき、界面張力・界面粘度・吸着分子密度などを計測可能な有効な手法である。しかし、注目しているマイクロ多相流界面を計測する顕微 QELS 装置はなかった。そこで、 $\mu\text{QELS}$  装置 (図3) を開発し、マイクロ多相流中の液液界面を計測することに成功した[6]。

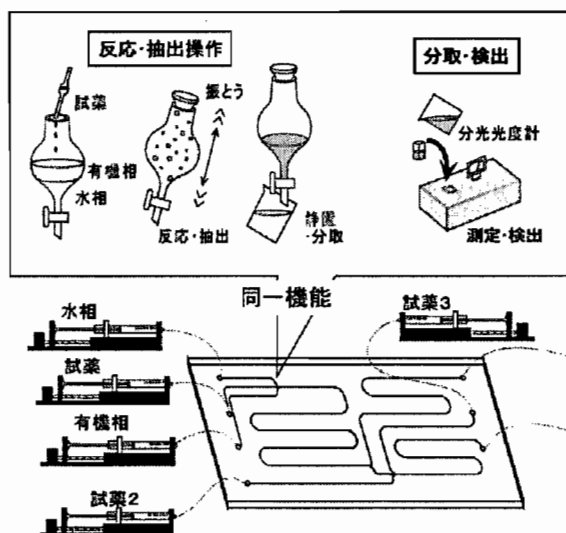


図1 化学プロセス集積化の例。

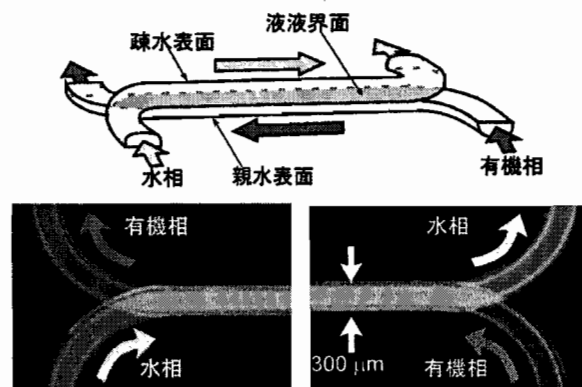


図2 マイクロ油水向流。

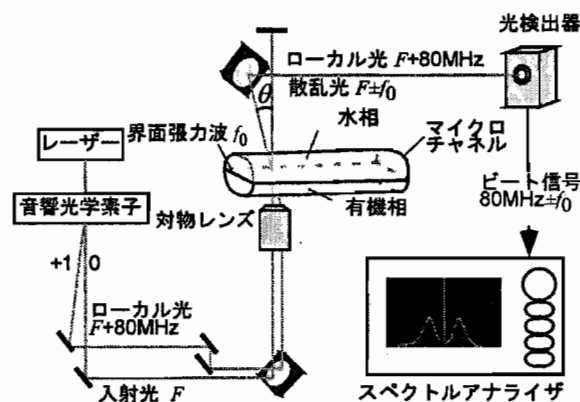


図3 顕微準弾性レーザー散乱装置。

- [1] Tokeshi et al., *Anal. Chem.*, **74**, 1565-1571 (2002).
- [2] Hisamoto et al., *Anal. Chem.*, **73**, 5551-5556 (2001).
- [3] Hisamoto et al., *Chem. Comm.*, **2001**, 2662-2663 (2001).
- [4] Surmeian et al., *Anal. Chem.*, **74**, 2014-2020 (2002).
- [5] Aota et al., *Proc.  $\mu\text{TAS}2003$* , 441-444 (2003)
- [6] Hibara et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14954 (2003).



# 一般講演 (口頭発表)

# SCE '04 CECにおける異性体分離に対する電圧印加の影響

## L - 1

○北川慎也、中川浩行、荒木修喜、津田孝雄  
名古屋工業大学大学院工学研究科物質工学専攻

### Effect of applied voltage on isomer separation in CEC

\*Shinya KITAGAWA, Hiroyuki NAKAGAWA, Shuki ARAKI, Takao TSUDA

Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology,

The effect of applied voltage on enantiomer separation in pressurized flow-driven capillary electrochromatography (pCEC) was studied. D- and L-amino acids, Tryptophan (Trp) and phenylalanine (Phe) enantiomers, were separated by pCEC using columns packed with teicoplanin-modified silica gels. The application of high voltage to the column varied the resolution between the D- and L-amino acid enantiomers. Further investigation revealed that this variation was due to a variation in the theoretical plate number. The pattern of variation in resolution of D- and L-Trp was similar to that of D- and L- Phe.

キャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)では、電圧印加により試料の保持挙動が変化することを我々は見出し、その現象について種々の検討を行ってきた。これまでの研究で、イオン交換固定相やODS-SAX混合固定相などを用いた分離では、電圧印加によりイオン・中性物質の保持挙動が変化することが明らかになっている[1-3]。今回、大環状グリコペプチドであるテイコプラニンで修飾された充填剤を用い、光学異性体分離への電圧印加の影響について検討を行った。

### 実験

実験装置は送液ポンプ(LC-6A, SHIMADZU, 京都)、インジェクター(0.5  $\mu$ l, model 7410, Pheodyne, USA)、高圧電源 (HVA 4321, エヌエフ回路設計ブロック, 横浜)、自作キャピラリーカラム(内径: 0.15 mm, 充填長: 14.8 cm, 全長: 24.1 cm, 充填剤: CHIROBIOTIC T, dp. 5 m)、紫外吸光検出器 (UV-970, JASCO, 東京) からなる。また、試料注入はスプリットインジェクションを用いた。

光学異性体試料として、D,L-トリプトファン、D,L-フェニルアラニンを用いた。移動相にはリン酸緩衝液(pH 6.0)/エタノール/アセトニトリル (80/50/10)を用いた。

### 結果

D,L-トリプトファン分離への電圧印加の影響をFigure 1に示した。マイナス5 kVの電圧を印加すると、溶出時間が早くなりピークが鋭くなることわかる。逆にプラス5 kVの電圧を

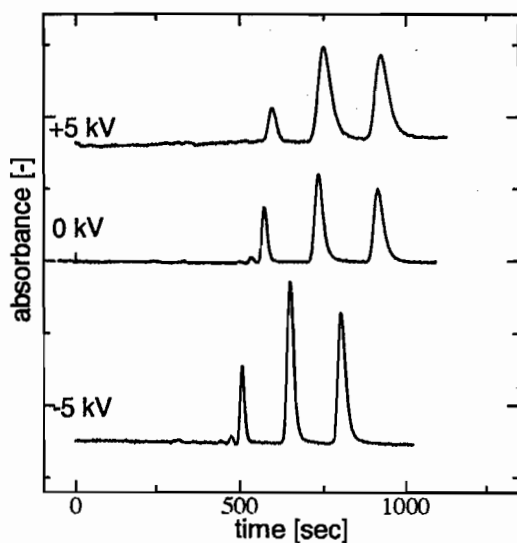


印加すると、溶出は遅くなり、ピークはブロードになっている。溶出時間の変化は電気浸透流によるものである。印加電圧とD,L-トリプトファン分離度の関係をFigure 2に示した。Figure 2が示すようにマイナスの電圧を印加することで分離度(Rs)が若干向上し、逆にプラスの電圧を印加すると分離度が急激に低下することがわかった。分離度は式(1)に示されるように、保持比、分離係数、理論段数から求めることが可能である。

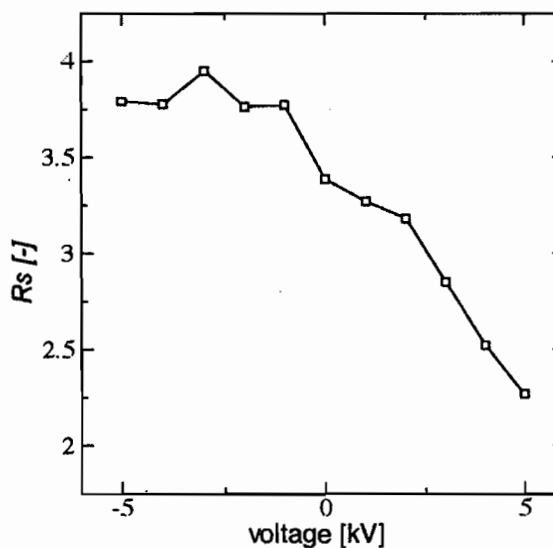
$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{1 + k} \quad (1)$$

今回の実験条件では、電圧印加により保持比が顕著に変化することはなかった。しかしながら、電圧印加によりD,L-トリプトファンの理論段数が大きく変化することがわかった。すなわち、Figure 2に示される分離度の印加電圧依存性は、主として理論段数の変化に由来することが明らかになった。この現象は印加電圧が、試料の固定相-移動相間での物質移動速度や拡散係数に対して影響を与えていることを示唆していると思われる。

また、D,L-フェニルアラニンを試料として用いた際の分離度と印加電圧の関係を調べたところ、D,L-フェニルアラニンの分離度も電圧印加の影響を受けることが明らかになった。その電圧依存パターンはD,L-トリプトファンとほぼ同一であった。



**Figure 1** Separation of D, L-Trp with or without application of electric field.  
samples: 1. thiourea, 2: L-Trp, 3: D-Trp; column: id. 0.15 mm, packed length: 22.6 cm, total length: 31.0 cm, packed material: CHIRO BIO TIC T; eluent: mixture of 5 mM phosphate buffer (pH 6), ethanol and acetonitrile (80/50/10, v/v/v); flow rate: constant pressure mode of 110 kgf/cm<sup>2</sup>; detection: UV 254 nm



**Figure 2** Relationship between applied voltage and electrochromatographic parameters of D, L-Trp.  
Conditions are the same as figure 1

- [1] Kitagawa, S.; Watanabe, H.; Tsuda, T., *Electrophoresis*, 1999, 20, 9-17.  
[2] Sato, M.; Kitagawa, S.; Tashita, H.; Tsuda, T., *Chromatography*, 2001, 22, 195-199.  
[3] Kitagawa, S.; Tsuda, T., *J. Chromatogr. A*, 2003, 995, 209-215.

# SCE '04

## L - 2

キャピラリーエレクトロクロマトグラフィーのための  
カラム作製  
○鈴木浩司・藤本忠蔵  
浜松医科大学・医学部・化学

### Column preparation for capillary electrochromatography

○Hiroshi Suzuki and Chuzo Fujimoto

Department of Chemistry, Hamamatsu University School of Medicine

Sol-gel method offers a versatile approach to the synthesis of organic-inorganic hybrid. By using the method, composites containing sulfo-group, long alkyl group and boron were prepared on the inner walls of fused silica capillaries and used for the stationary phase in open tubular capillary electrochromatography. The sulfo-group provided a substantial electroosmotic flow (EOF), while the long alkyl group provided reversed-phase chromatographic characteristics. The presence of Lewis acidic boron in the organic-inorganic hybrid structure would lead to enhanced dissociation of sulfo-group, and hence, increase in EOF.

[はじめに]

キャピラリーエレクトロクロマトグラフィー (CEC) はキャピラリー電気泳動と液体クロマトグラフィーの分離特性を併せ持つ。CEC のカラムには充填剤型、モノリス型、中空キャピラリー型などがあり、これらのカラム作製方法のひとつにゾルゲル法が用いられている。ゾルゲル法によるカラムの作製は、使用する前駆体の官能基の性質をカラム内壁に反映させることができること、作製が非常に容易などの利点がある。本研究ではゾルゲル法による新しい分離特性を有する CEC 用のカラム作製について検討した。まず、逆相分離の性質を持たせるために長鎖アルキル基 (オクチル基、オクタデシル基など) を導入する。次に、電気浸透流 (EOF) の発生のためにスルホ基を導入した。一般的に酸性泳動液中では未処理のフューズドシリカキャピラリーの内壁にあるシラノール基の解離が抑制されるため EOF は小さくなるが、スルホ基の導入により泳動液の pH に依存しない EOF を発生させることが可能である。さらに、ルイス酸性を示すホウ素を導入することによりスルホ基のプロトンの電離を促進して、より強い EOF の発生を目指した。長鎖アルキル基、スルホ基、ホウ素の三つの成分の割合を変えることで、カラムの疎水性と EOF の大きさをいろいろ変えることが可能である。このようなカラムをゾルゲル法により作製し、カラムの分離特性に関して検討した。

## [実験]

高圧電源部に松定プレセッションデバイセス 30P0.25-LD を用い、検出器は日本分光 870-CE を用いた。分離カラムには内径 50 $\mu$ m、全長 48.3cm、有効長 32.8cm のフューズドシリカキャピラリーを用いた。検出波長を 254nm、印加電圧を 20kV とした。試料注入法には落差法(20cm)を用いた。試料の注入時間は 5 秒とした。

カラムの作製は次のようにして行った<sup>1)</sup>。種々の割合の *n*-オクチルトリエトキシシラン、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン、ホウ酸トリイソプロピルをエタノール中で混合し、酸触媒下、60 $^{\circ}$ C で 12 時間加熱し、ゾルゲル反応を行った。続いて、3-メルカプトプロピルトリメトキシシランのメルカプト基を過酸化水素水で 60 $^{\circ}$ C、12 時間加熱することによってスルホ基に変換した。このゾルゲル溶液を予め水酸化ナトリウムで活性化したフューズドシリカキャピラリー内壁に導入したのち押し出し、室温、窒素気流下で乾燥後 110 $^{\circ}$ C で加熱乾燥して目的のカラムを得た。

## [結果と考察]

### ホウ素の導入について

未処理のキャピラリーカラムとスルホ基を導入したカラムの EOF を比較した。その結果、スルホ基を導入したカラムは未処理のカラムよりも EOF は増加していることがわかった。また、スルホ基のみを導入したカラムとスルホ基とホウ素を等モル比で導入したカラムを作製して EOF を測定した。その結果、ホウ素を導入することによって若干の EOF の増加が認められた。さらに、スルホ基、ホウ素、長鎖アルキル鎖を導入したものと未処理のキャピラリーを比較した場合においても EOF の増加が確認できた。

### 長鎖アルキル基の導入について

オクタデシル基の導入をはじめに検討したが、キャピラリーに導入する前にゾルゲル溶液が白濁した。このため、アルキル基としてオクチル基を導入することにした。オクチル基、スルホ基、ホウ素の組成比を種々の割合で変えてカラムを作製した。それぞれの比を 1:1:0、1:1:1、1:1:5 で調製したカラムについて分離を検討した。

### アルカリ処理

オクチル基、スルホ基、ホウ素の組成比 1:1:2 のゾルゲルで作製したカラムをアルカリ処理した。0.1N NaOH 処理 (6 時間) によって内壁表面は処理前と比べて表面積が増えることを SEM による観察から確認した。このカラムを用いて分離を行ったが、表面積の増加による分離への効果は得られなかった。

## [参考文献]

1) H.suzuki, Y. Yoshida, M.A. Mehta, M. Watanabe, T. Fujinami, *Fuel Cells*, **2002**, *2*, 46-51

# SCE '04 L - 3

## マイクロチップ化蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動システムの構築と評価: マイクロチップへの溶液分注・導入操作の自動化

○松本浩幸<sup>1</sup>、高本尚宜<sup>1</sup>、久田 素<sup>2</sup>、志村清仁<sup>3</sup> 笠井献一<sup>3</sup>

<sup>1</sup>浜松ホトニクス株式会社 中央研究所

<sup>2</sup>浜松ホトニクス株式会社 システム事業部

<sup>3</sup>帝京大学薬学部

### Development and Evaluation of Microchip-based Capillary Isoelectric Focusing System with Fluorescence Detection: Automatization of the process of dispensing and injecting solutions to the microchip

\*Hiroyuki Matsumoto<sup>1</sup>, Hisayoshi Takamoto<sup>1</sup>, Sunao Hisada<sup>2</sup>, Kiyohito Shimura<sup>3</sup>, Ken-ichi Kasai<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Central Research Laboratory, Hamamatsu Photonics K.K.

<sup>2</sup>System Division, Hamamatsu Photonics K.K.

<sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

We have developed a chip-based capillary isoelectric focusing system with a scanning laser-induced fluorescence detector, and both of high speed of focusing and high detection sensitivity achieved by this system. However, operability and reproducibility have left the problem, since the process of dispensing and injecting solutions to the microchip was manual operation. To solve this problem, we have improved this process and examined the development of the system which automated the process.

**【はじめに】** キャピラリー等電点電気泳動は試料の成分の濃縮と分離を同時に行い得るため、希薄な試料においても高い感度を得ることができる。さらに、超高感度な検出特性を有するレーザー励起蛍光検出法を組合せ (LIF-CIEF) することで、数 pM 以下の標識タンパク質やペプチドの分離検出が可能となり、超微量、超高感度な分離定量法として極めて有用である。一方、キャピラリー内で焦点化した試料を固定した一点で検出するには、試料を検出部位まで移動させる必要がある。この工程には pH 勾配の歪みや分離能の低下、再現性等、多くの問題が残されている。pH 勾配全体を検出することが可能となればこのような問題は解決される。そこでわれわれは、フォトリソグラフィとエッチング技術を用いて合成石英基板上に微小流路を設けた電気泳動チップを作製し、流路をレーザー光で走査しながら蛍光検出を行なう走査型レーザー励起蛍光検出等電点電気泳動 (Scanning LIF-CIEF) システムを構築し、本シンポジウムにて発表を行った<sup>1, 2)</sup>。一方、試料を含む両性担体溶液の微小流路への導入、微小流路両端の貫通孔部分への電極液の分注等の操作は手作業であり、操作性や再現性に課題が残されている。このような手作業の工程を自動化することができれば、構築した本システムのさらなる発展が期待される。本発表では電気泳動チップの微小流路への試料溶液の導入や微小流路両端の貫通孔部分への電極液の分注について、効果的な操作方法と自動化システムの構築について報告する。

**【実験】** チップ内流路を用いた Scanning LIF-CIEF システム の構築 縦 54 mm、横 90 mm、厚さ 1 mm の合成石英基板中に長さ 30 mm、幅 100  $\mu\text{m}$ 、深さ 25  $\mu\text{m}$  の微小流路をフォトリソグラフィとエッチング技術を用いて 5 mm 間隔で 3 本作製した。流路の両端に直径 2 mm、深さ 1 mm の円柱状の貫通穴を形成後、厚さ 180  $\mu\text{m}$  の熔融石英性カバープレートを熱融着した。作製した微小流路内壁はポリジメチルアクリルアミド (終濃度 4%) でコートした<sup>3)</sup>。

**蛍光標識ペプチドを用いたシステムの評価実験** N末端に1分子の tetramethylrhodamine が結合したペプチドを試料とし、0.1% Tween 20、0.3% TEMED、0.1% AcOH、1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1% メチルセルロース、および40倍希釈 Pharmalyte 3-10を含む試料溶液を一方の貫通孔に添加し、反対側の貫通孔を減圧にすることで微小流路に充填した。充填後、一方の貫通孔部分にセプタムを密着し、反対側の貫通孔に20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>（陽極液）を添加、吸引・廃棄、添加の操作を計3回繰り返す、最終的に貫通孔を20 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>（陽極液）で満たした。セプタムを密着し、反対側の貫通孔についても同様の操作にて20 mM NaOH（陰極液）で満たした（図1）。それぞれの貫通孔に電極を挿入して600 V/cmの電圧で焦点化を行った。光源として半導体励起 YAG レーザー（532 nm）を用い、測定は流路に沿って検出ユニットを走査（2秒/流路）して収束した試料からの蛍光を検出した。

**【結果と考察】** これまでの報告で使用した電気泳動チップは貫通孔が小さく（直径0.46 mm、図2）、微小流路内壁のコーティングにおいては1%ポリジメチルアクリルアミド溶液しか導入することができなかった。また、その形状により貫通孔を電極液で完全に置換・充填することが困難であった。今回、貫通孔を大きくすることで（直径2 mm、長さ1 mmの円柱状）4%ポリジメチルアクリルアミド溶液による微小流路内壁のコーティングが可能となり、電気浸透流の発生を極めて低く抑えることができた。さらに貫通孔を電極液で完全に置換・充填することも可能となった。この結果、分析の再現性が向上し、電気泳動チップの微小流路への試料溶液の導入や微小流路両端の貫通孔部分への電極液の分注の操作（図1）について分注ロボットを応用した自動化システムを構築することが可能となった。現在、本システムの作製・評価を行っている。

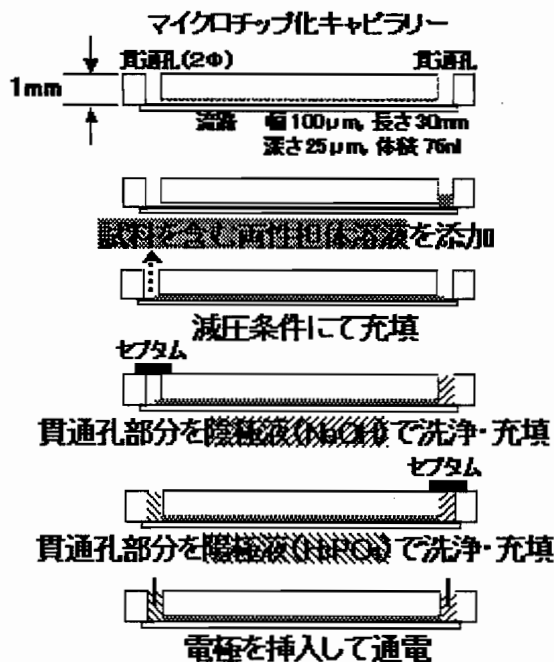


図1 マイクロチップ化キャピラリーへの試料溶液、電極液の分注・導入方法

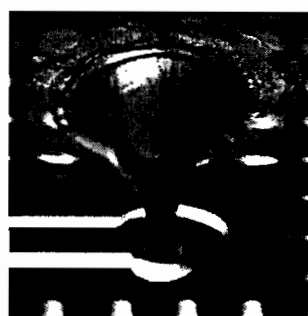


図2 これまで使用してきたマイクロチップ化キャピラリーの微小流路に連結する貫通孔部分

**【謝辞】** 本研究の一部は(独)農業・生物系特定産業技術研究機構 生物系特定産業技術研究支援センター（生研センター）が実施する「新事業創出研究開発事業」の一環として行われた。

**【文献】**

- 1) 松本浩幸、石田雅之、岡崎茂俊、伊藤由紀子、久田 素、高本尚宜、志村清仁、笠井献一 SCE'99 発表要旨集, pp82 (1999)
- 2) 松本浩幸、高本尚宜、高橋雅彦、久田 素、志村清仁、笠井献一 SCE'02 発表要旨集, pp21 (2002)
- 3) Wan, H., Ohoman, M., Blomberg, L., *J. Chromatogr. A*, **924**(2001) 59-70

SCE '04  
L - 4

## マイクロフリーフロー電気泳動モジュールを使用した 等電点電気泳動:酸性領域でのpH勾配形成

○小林英三郎<sup>1</sup>、大森義和<sup>1</sup>、田島信芳<sup>2</sup>

城西大・理<sup>1</sup>、オリンパス光学工業<sup>2</sup>

### Isoelectric Focusing by Microfabricated Free Flow Electrophoresis Module:pH Gradient Formation in Acidic Range

Hidesaburo Kobayashi\*<sup>1</sup>, Yoshikazu Ohomori<sup>1</sup>, Nobuyoshi Tajima<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Josai University, Saiatama 350-0295

<sup>2</sup>Olympus Optical Co.,Ltd192-8507 (Hachiohji), Japan

#### Abstract

By using free flow electrophoresis system, mFFE (microfabricated FFE), we studied formation of pH gradient on isoelectric focusing condition. In this study pH gradients were formed in range 2.5-5.0 under 6kV electrophoresis voltage and residence time within 30 seconds in separation bed. These results might be useful for separation of native proteins and provide proper samples for proteomics analysis, especially, for protein-protein interaction studies.

Keywords: microfabrication, mFFE, isoelectro focusing, pH gradient, native protein.

#### はじめに

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 (mFFE: microfabricated free flow electrophoresis module) はマイクロ・フルーディクス空間を形成し強い層流形成が起こるので、自由溶液中であっても安定な電気泳動分離が期待できる。このモジュールを用いたDNAの共雑タンパクからの分離[1]、色素試料を用いた電気泳動の解析方法[2]、連続電気泳動 (continuous free flow electrophoresis) を用いた試料の分取システムの作製[3]については既に報告した。

近年、プロテオーム研究が盛んになり、微量のタンパク質を網羅的に解析する方法が必要とされ、迅速な分離方法の展開が注目されている。我々は mFFE を用いた分離システムを構築し、迅速で回収率の高い等電点電気泳動分離方法の確立を目的に条件検討を行っており、昨年、本シンポジウムにおいてキャリアアンフォライトを用いた等電点勾配形成について報告した[4]。mFFE システムを用いたフリーフロー電気泳動では、分析対象になる試料の分離槽滞留時間を 30 秒前後とすることができ、タンパク質の迅速な等電点電気泳動分離を達成した[5]。さらに、本年度は pH 勾配範囲を狭めた領域での等電点分離はより詳細なタンパク質分離を試みたことを報告する。今回の報告は酸性領域でのタンパク質分離挙動を検討することを目的としており、これら検討結果がタンパクの等電点電気泳動分離に使用可能であればハイスループットの分離を行えるばかりでなく、未変性のタンパク溶液を得ることができるので、タンパク相互作用の研究試料調製用分離装置として使用可能となる。

#### 実験装置および条件

**電気泳動:** パイレックスガラス mFFE モジュール (泳動分離槽 : w 56.5 x 35mm, d 30 $\mu$ m) を電気泳動システム (mFFE/BBM) に組み込み、mFFE モジュール下部には 19 チャンネルのサンプル回収装置 (MFS) を接続してモジュールを通過した溶液の採取を可能とした。分離槽は 80% エタノールで洗浄後、電気浸透流を軽減するため 0.01% HPMC を 7 分間流下し、その後、0.5% Ampholite (pH 2.5-5.0) (1% glycerine 及び 10% EtOH を含む) を 5 分間流下してから加電

を開始した。泳動分離槽への溶液送り込み速度は全て 180  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした。電極槽は陽極に水酸化ナトリウム (10mM in 10% EtOH)、陽極にリン酸 (10mM in 10% EtOH) を使用した。印加電圧は 4kV から 6kV までの 1kV おきとし、それぞれの電圧下で電気泳動を行い、20 分間に流下した分離溶液を 19 ポートからそれぞれ 190  $\mu\text{L}$  ずつ分取した。タンパク質試料溶液は分離槽の中央 (ポート 9) 上端から注入 (flow rate : 8.47  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) した。

**pH 計測** : HORIBA B-212 twin pH により分取溶液の pH を計測した。

**HPLC** : HPLC システム (Shimadzu LC-9A) にモノリスタイプ逆相系カラム (MERCK Chromolith performance RP-4e 100 x 4.6mm) を用い、アセトニトリルグラジエント (0-80% acetonitrile in 0.1%TFA) により溶出し、280 nm での検出により mFFE で分取した溶液のタンパク質同定を行った。

### 結果および考察

**溶液回収** : 電極槽に近いポートでは電極緩衝液の早い流速 (240  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) に若干の影響を受けており、19 ポート相互間での採取量 (190  $\mu\text{L}$ ) には若干のばらつきがあり、また、数箇所のポートでは溶液流下量が少ないものが存在したものの、全ポート総回収液量はそれぞれの電気泳動電圧において大きな差はなかった。

**pH 勾配の形成** : 印加電圧 0kV、すなわち電圧をかけずに流下した場合、ポート番号 2 から 18 の分画ではアンフォライト溶液の初期値 pH4.2 を示したが、ポート 1 およびポート 19 の分画ではそれぞれ 0.2 および 0.1 pH ユニットだけそれぞれ塩基性側および酸性側へシフトしていた。ここでは電極液の分離槽への漏出が考えられるが、分離槽内の実距離では 1mm に相当しており、主たる分離場に影響を与えないと考えられる。

今回設定した最大印加電圧 6kV

(1.7kV/cm) では、ポート番号 2 から 18 までの分画では pH 5.0 から 3.6 の酸性領域の pH 勾配が得られた (Fig. 1)。今回の電気泳動条件では pH 勾配の形成が不完全であると思われるが、BSA (pI 4.9) を試料とし mFFE による分離を行い、各ポートから得られた分画溶液を HPLC で分析した結果も報告する。

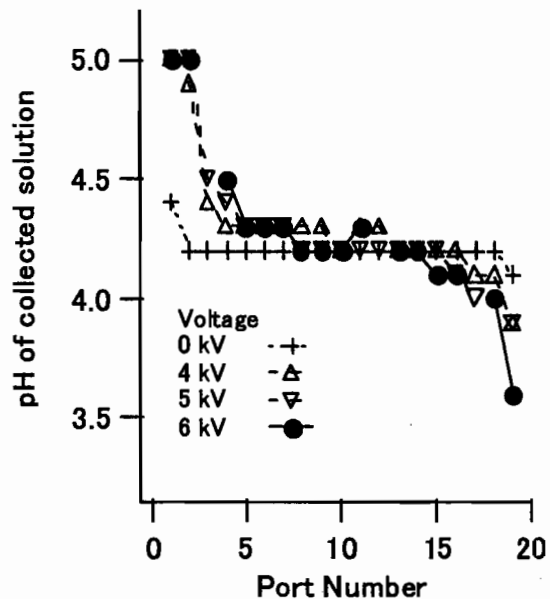


Fig.1 pH profiles of collected solutions from the ports of mFFE system under various electrophoresis voltages.

### 文献

1. N. Tajima, H. Suzuki, K. Kano and E. Shinohara, The 22nd International Symposium on Capillary Chromatography, Gifu (Japan), Nov. 8-1, 2, 1999.
2. 小林英三郎、田島信芳ら第21回キャピラリー電気泳動シンポジウム2001年(神戸)予稿集 P10, P11, L12.
3. H. Kobayashi, K. Shimamura, T. Akaida, K. Sakano, N. Tajima, J. Funazaki, H. Suzuki and E. Shinohara J. Chromatogr. A, 990(2003) 169-178
4. 小林英三郎、田島信芳ら第23回キャピラリー電気泳動シンポジウム2004年(岡山) pp 27-28.
5. H. Kobayashi, N. Aizawa, Y. Ohomori, N. Tajima, E. Shinohara, RAPID AND CONTINUOUS ISOELECTRIC FOCUSING SEPARATION OF PROTEINS BY MICROFABRICATED FREE FLOW ELECTROPHORESIS MODULE, 14th International Symposium on Capillary Electrophoresis Techniques, Rome (Italy), Sept. 2004.

SCE '04  
L - 5

アダマール変換マイクロチップ電気泳動法の開発  
○畑和貴, 金田隆, 今坂藤太郎  
九大院工

## Hadamard Transform Microchip Electrophoresis

Kazuki Hata, Takashi Kaneta and Totaro Imasaka

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University*

Improvement in the sensitivity of microchip electrophoresis by means of Hadamard transform technique is demonstrated. The sample and buffer solutions are electrokinetically injected into the separation channel according to a code determined by a Hadamard matrix and then detected by laser-induced fluorometry. In the case of using rhodamine B as a sample, 8-fold improvement can be obtained in the S/N ratio in the electropherogram by Hadamard transform technique, compared with that obtained by single injection method. This value is theoretically expected when a 255-order matrix is used. The limit of detection (LOD) is determined at 25 pM for rhodamine B. The improvement factor can be enlarged by the use of larger order of Hadamard matrix. This method was also employed to resolve a mixture of amino acids. Even the analysis of a sample containing multi-component, the S/N ratio can substantially be improved. It should be noted that this technique is applicable not only to fluorescence spectrometry but to absorption spectrometry and other detection system used in conventional microchip electrophoresis.

### 【はじめに】

キャピラリーまたはマイクロチップ電気泳動において、その分析感度向上のために数学的手法を用いる研究が行われている。我々は、それらの数学的手法の1つである、アダマール変換法を利用してキャピラリー電気泳動の感度向上を達成できることを明らかにした。アダマール変換キャピラリー電気泳動法は、アダマール行列に基づくコードに従って試料を多重注入することにより、S/N比を向上できる高感度な分離分析法である。本研究では、マイクロチップ電気泳動法にアダマール変換を適用することで、電気泳動により試料を多重注入する、汎用性に優れた高感度な電気泳動分析装置の開発を行った。

### 【実験】

アダマール変換電気泳動法では、1と0の成分からなるアダマール行列から導かれるコード(アダマール変換コード)に基づき、試料の多重注入を行う。この時、多数のピークから構成された電気泳動図が得られ、これをアダマール逆行列を用いて変換することにより、S/N比を改善した電気泳動図を得ることができる。本研究ではマイクロチップ電気泳動法において、パソコンのプログラムに基づいた Gated injection 法の制御により、アダマール変換コードに従った試料の多重注入を行った。以前、試料に Cy5 を使い、半導体レーザー(波長 635 nm)を励起光源としたアダマール変換マイクロチップ電気泳動法について報告したが<sup>1)</sup>、今回は単一成分を含む試料を用いて本法



の検討を行った。励起光源には半導体レーザー励起 YAG レーザー(波長 532 nm、出力 10 mW)を、試料にはローダミン B またはローダミン B イソチオシアネート(RBITC)により蛍光標識したアミノ酸(グルタミン酸、フェニルアラニン)を、泳動溶液には 4 mM のホウ酸緩衝溶液(pH 9.0)を用いた。

#### 【結果と考察】

まず、単一成分のみを含む試料として  $1.0 \times 10^{-9}$  M に調製したローダミン B を用いて測定を行った。図 1(a) に 0.5 秒間試料を導入して得られた電気泳動図を示す。この時の S/N 比は 4.5 と算出された。続いて、試料注入間隔を 0.5 秒として、アダマール変換コードに従った試料の多重注入を行ったところ、理想的な多重注入の電気泳動図とよく一致した蛍光信号の増加・減少が確認できた。この試料の多重注入により得られた電気泳動図を逆変換したところ、図 1(b) に示すデータが得られた。ローダミン B に由来する 1 本のピークのみが観測され、また S/N 比が顕著に向上していることがわかる。この時の S/N 比は 34.1 と算出され、本測定において理論的に予想される値である 8.02 倍とほぼ同等の 7.6 倍の S/N 比向上が達成された。また、低濃度領域( $\sim 1.0 \times 10^{-9}$  M)における蛍光強度の濃度依存性について検討したところ、良好な直線性が得られ、濃度  $2.5 \times 10^{-11}$  M のローダミン B のアダマール逆変換図(図 2)においても明瞭な蛍光信号が確認できた。

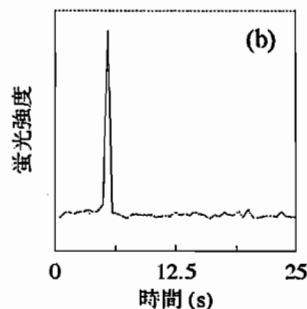
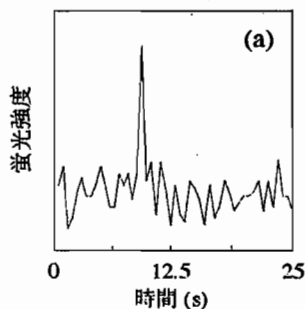


図1 1.0 nM ローダミン B の電気泳動図(a)と逆変換図(b)

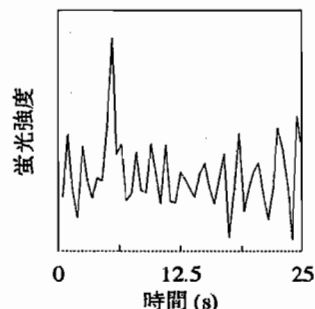


図2 25 pM ローダミン B の逆変換図

通常のマイクロチップ電気泳動法同様、アダマール変換マイクロチップ電気泳動法も多成分を含む試料に対して適用可能である。蛍光色素 RBITC により標識した 2 種のアミノ酸を試料として用い、これについて検討した。グルタミン酸、フェニルアラニンのそれぞれを RBITC で標識し、等量混合させて試料溶液とした。2 成分の分離分析においても、試料注入間隔を 0.5 秒としてアダマール変換法を適用することにより得られた電気泳動図は、試料を 1 度だけ注入して得られる電気泳動図と比較して S/N 比が向上した。

本手法は、蛍光検出法以外にも吸光検出法や電気化学検出法など、通常のマイクロチップ電気泳動法において利用される全ての検出手法に適用可能であり、汎用性に優れた高感度分離分析法として広く活用が期待される。

#### 【文献】

1. K. Hata, Y. Kichise, T. Kaneta, T. Imasaka, Anal. Chem., 75 (2003) 1765.

# SCE '04 L - 6

## キャピラリー - アセンブルド・マイクロチップ (10) 多層流形成を利用した前処理プロセスと電気泳動分離 プロセスの集積

○久本秀明, 竹田正義, 柴森亜紀, 寺部茂  
兵庫県大院・物質理

### Capillary-Assembled Microchip (CAs-CHIP)(10): Integration of Pretreatment Process Based on Multiphase Flow and Capillary-Electrophoresis Separation

○Hideaki Hisamoto\*, Seigi Takeda, Aki Shibamori and Shigeru Terabe

Graduate School of Material Science, University of Hyogo

An integration of pretreatment process based on multiphase flow and capillary-electrophoresis separation is performed by using capillary-assembled microchip (CAs-CHIP). When a solution containing high molecular weight and low molecular weight samples is made in contact with pure water, low molecular weight samples, which have larger diffusion coefficients compared to high molecular weight samples, can be collected into pure water. The collected solution containing low molecular weight samples is introduced into separation capillary to be analyzed by CE. This type of system can be applicable for CE analysis requiring a pretreatment involving protein removal. Here, a fluorescently labeled protein and rhodamine-based molecules are selected as model samples, and feasibility study is performed.

**はじめに** 我々は最近、新しい化学機能集積マイクロチップとして、化学修飾角型キャピラリーを PDMS 製の格子状チャネルネットワークに埋め込んで作製する“キャピラリー - アセンブルド・マイクロチップ(CAs-CHIP)”を考案した。<sup>1</sup>これは多種類の化学修飾角型キャピラリーを埋め込むことによって多彩な機能を有するマイクロチップが作製可能であり、これまでに化学センシングキャピラリーを用いたマルチセンシングチップ、温度応答性ポリマー修飾キャピラリーを用いた流体制御チップ等を報告してきた。本研究では、この CAs-CHIP をキャピラリー電気泳動(CE)における前処理チップとして用いることを着想した。これまでもフローインジェクション分析の流路やマイクロチップを分離分析の前処理デバイスとして開発する研究は数多い。<sup>2,4</sup>しかしながら、CAs-CHIP を用いれば、触媒反応キャピラリーを用いた反応前処理や固相修飾キャピラリーを用いた濃縮前処理のみならず、平面マイクロ流路の特徴である多層流分離を用いた前処理など、従来法よりも高度かつ多彩な前処理が実現できる可能性がある。しかも CE 分離に用いるキャピラリーに化学修飾キャピラリーを用いれば、通常の CE 分離のみならず、CEC モードでの分離も実現可能と考えられ、多彩な CE 分析が可能になると考えた。

ここでは、多層流形成を CE 分離における前処理プロセスとして使うことから着手した。分子量の大きな成分と小さな成分を含む試料溶液を、それらを含まない溶液と接触させて多層流を形成させると、試料に含まれる成分のうち、拡散係数の大きな低分子量成分を取り出すことが可能である。<sup>5</sup>この特性を用いれば、生体関連試料分析における除タンパクプロセスを集積可能と考えた。本研究では、上記を実現するためのモデル実験として蛍光修飾タンパクと蛍光性低分子を用い、多層流形成条件下の低分子量成分分離・試料注入・CE 分離を試みたので発表する。

**実験** 内辺 50  $\mu\text{m}$ 、外辺 300  $\mu\text{m}$  の正方形断面を有する角型キャピラリーを、幅・深さ 300  $\mu\text{m}$  の流路を格子状に作製した PDMS 基板に埋め込み、図 1 に示すような流路を作製した。導入口 1 からはローダミン B (RB)、スルフォローダミン (SR)、フルオレセイン修飾ウシ血清アルブミン (F-BSA: M.W.: 約 66000) を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 8)、導入口 2、3 からは試料を含まない緩衝液を導入した。分離キャピラリーへの試料注入は、導入口 3 につないだシリンジポンプの ON-OFF 制御によって行った。CE 分離後の検出には、アルゴンイオンレーザー (488nm) を使ったレーザー励起蛍光法を用いた。

**結果と考察** 導入口 1、2 から試料を含む緩衝液と含まない緩衝液を導入・合流させたところ、合流点以降に二層流形成が確認できた。分離キャピラリー端面において低分子量成分のみを注入可能な条件を検討した結果、それぞれの溶液が 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  である場合に、F-BSA が拡散せず RB、SR のみを注入可能であることがわかった。次に、導入口 3 から緩衝液を 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  で導入し、分離キャピラリーを緩衝液で満たした後、ポンプの ON-OFF 制御に基づく試料注入・電気泳動分離 (印加電圧: 5 kV) を試みた。ここでは導入口 2 の緩衝液を用いて多層流分離を行う場合と、用いずに全ての試料を導入した場合のエレクトロフェログラムを比較した。その結果、全ての試料を導入した場合には F-BSA によるブロードなピークが見られたのに対し、多層流分離後は、RB、SR に基づくピークのみが見られ、本研究のコンセプトが実現可能であることがわかった。今後、種々の条件最適化、機能キャピラリーの適用によって、多彩な前処理・CE 分離への適用が期待できる。

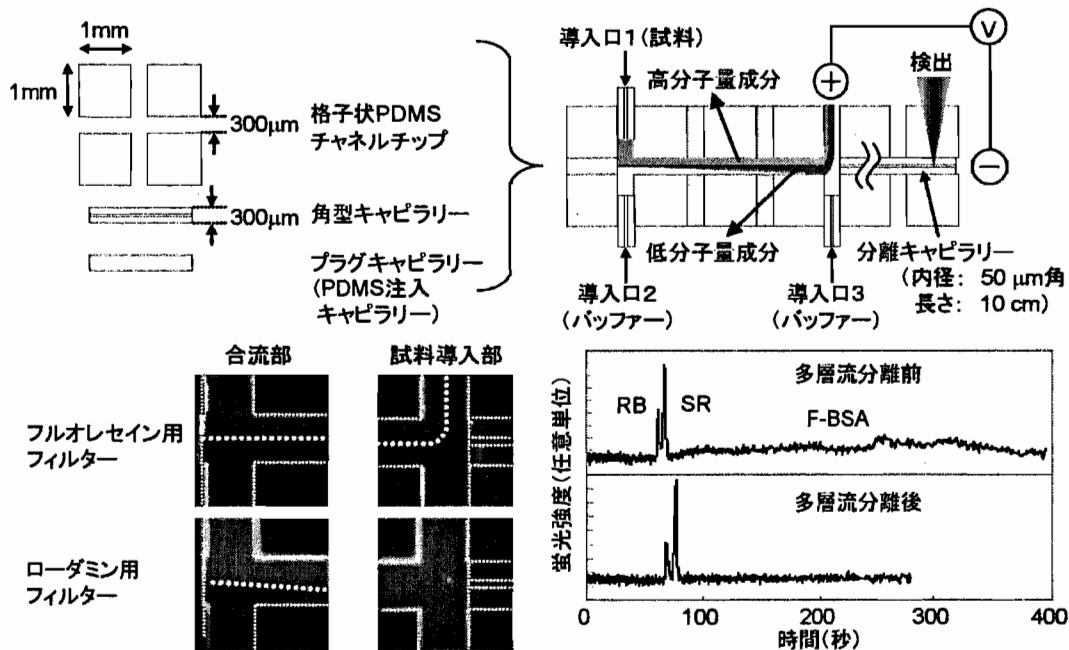


図1 CAs-CHIPのデザインと多層流分離・CE分離プロセス

参考文献

- (1) Hisamoto, H.; Nakashima, Y.; Kitamura, C.; Funano, S.-i.; Yasuoka, M.; Morishima, K.; Kikutani, Y.; Kitamori, T.; Terabe, S. *Anal. Chem.* 2004, 76, 3222-3228.
- (2) Kuban, P.; Karlberg, B. *Trends Anal. Chem.* 1998, 17, 34-41.
- (3) Saito, Y.; Jinno, K. *J.Chromatogr. A* 2003, 1000, 53-67.
- (4) Lichtenberg, J.; de Rooij, N.F.; Verpoorte, E. *Talanta* 2002, 56 233-266.
- (5) Brody, J.P.; Yager, P. *Sens.Actuators A* 1997, 58, 13-18.

# SCE '04 L-7

水-ポリエチレングリコール系でのイオンの溶媒和と  
非イオン性ミセルの静電ポテンシャル

○大木 匠、岡田哲男  
東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻

## Solvation of ions in water-polyethyleneglycol systems and electrostatic potential of nonionic micelles

Takumi Ohki, Tetsuo Okada

*Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology*

Electrophoretic measurements of micellar mobility have revealed that polyoxyethylenated nonionic surfactant micelles in electrolyte aqueous solution, for example in 50mM NaClO<sub>4</sub>, 25mM (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub> and 50mM NaCl, have negative zeta potential. These results require that the number of anions partitioned in the micelles be larger than that of cations. Although the excess of negative charges is obvious, it is uncertain whether anions are preferably solvated in the micelle or cations are expelled from the micelles.

In order to determine the solvation energy of single ions in the micelle, we have performed ion transfer voltammetric measurements at micro tetraethyleneglycol aqueous solution | nitrobenzene solution interfaces, where tetraethyleneglycol aqueous solution has been selected as a model for polyoxyethylene chain layers in the micelles.

From this measurement, we have found that the concentration of ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> in the micelles is higher than that in aqueous solution while the concentration of (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup> in the micelles lower than that in aqueous solution.

### 【序論】

非イオン性界面活性剤ミセルは、それ自身では電荷を持たない。しかしながら、電解質水溶液中においては、陽イオンと陰イオンのミセルへの分配の違いにより、電荷を帯びる可能性がある。このようなミセルの電荷は電気泳動により評価可能である。

ポリオキシエチレンを親水基とする非イオン性界面活性剤ミセルに関して測定したところ、C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>O (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>H のミセルは、50mM

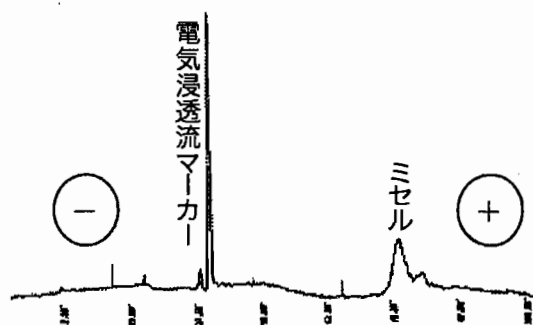


図1 50mM ヘキサエチレングリコールドデシルエーテル, 25mM (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub>水溶液の電クロフェログラム

NaClO<sub>4</sub>水溶液中では-10.7mVのξ-ポテンシャルをもち、25mM (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub>水溶液中では、-11.9mV、また、50mM NaCl水溶液中では(値は測定できないものの)負のξ-ポテンシャルをもつことがわかった。また、25mM (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub>水溶液中のC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>Hミセルでは、ξ-ポテンシャルは-21.1mVであった(図1)。これらの結果は、ポリオキシエチレン中のエーテル酸素のルイス塩基性のために、陽イオンの方が分配されやすいはずであるというこれまでに指摘されてきた考え方とは矛盾する。

しかし、ポテンシャルからでは、界面活性剤に陰イオンが分配されやすいのか、それとも単に陽イオンが分配されにくいのかはわからない。これを解明するには個々のイオンについてミセル表面での溶媒和を評価する必要がある。そこで、液液界面ボルタンメトリーを用いて、水-テトラエチレングリコール系(テトラエチレングリコール水溶液は、ポリオキシエチレンを親水基とする非イオン性界面活性剤ミセルのモデル)でのイオンの溶媒和を検討した。

### 【実験】

用いた電気化学セルの様式を下に示す。

Ag/AgCl | 10mM MgCl<sub>2</sub>(W) | 0.1mM ※, 10mM MgSO<sub>4</sub>(W+tetraEG) ||

10mM Ph<sub>3</sub>P=N=PPh<sub>3</sub>BAr<sub>4</sub>(NB) | 10mM Pn<sub>4</sub>NBAr<sub>4</sub>(NB) | 10mM Pn<sub>4</sub>NCl(W) | AgCl/Ag

但し、W：水；NB：ニトロベンゼン；tetraEG：テトラエチレングリコール；Ph：フェニル基；Ar：3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル基；Pn：ペンチル基を意味し、※は被測定イオンを含む塩であり、被測定イオンが陽イオンのときカウンターイオンとしてSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を用い、陰イオンのときはMg<sup>2+</sup>を用いた。

### 【結果及び考察】

被測定イオンを水系媒体相に加えると、このイオンの有機相へ移動することによるボルタモグラフが得られた(図2)。ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>と(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>の半波電位の差から標準移動自由エネルギーを求めた。

ξ-ポテンシャルからミセル1個あたりの負電荷過剰数を計算すると、25nmol・dm<sup>-3</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub>水溶液中では、C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>Hミセルで5個、C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>Hミセルで10個となっ

た。ここから、テトラエチレングリコール水溶液中のテトラエチレングリコールの濃度が20%(v/v)において、負電荷過剰数が5個で、水からテトラエチレングリコール水溶液へのClO<sub>4</sub><sup>-</sup>の標準移動自由エネルギーは、-1.4kJ/mol、(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>は3.4kJ/molとなり、負電荷過剰数が10個のときは、それぞれ-3.2kJ/mol、1.6kJ/molとなった。

これより、ミセル中では、水中に比べて、ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>の濃度が増加し、(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>は減少していることがわかった。

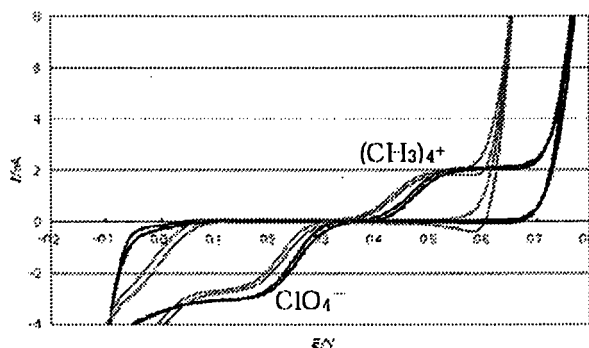


図2 ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>と(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>のボルタモグラフ

- 0%(v/v)テトラエチレングリコール水溶液
- - - 5%(v/v)テトラエチレングリコール水溶液

# SCE '04 L – 8

## Investigation of ion association on using ethanol, dioxane and acetonitrile as buffer additives by capillary zone electrophoresis

OJulius Mbuna, Toshio Takayanagi, Mitsuko Oshima, Shoji Motomizu  
*Faculty of Science, Okayama University*

Investigation of ion association between inorganic anions and tetraalkylammonium ions is important because it increases knowledge on selectivity of inorganic anions and understanding of association theories. In this work, ion association between inorganic anions and tetraalkylammonium ions was analyzed in aqueous and several mixed organic-water media. The mobilities of inorganic anions were measured by a slightly modified William-Vigh method. Dioxane had a more significant effect on the mobilities of most inorganic anions than either ethanol or acetonitrile, which produced only a slight effect. Similarly, associations in dioxane buffers led to a larger change in association constant,  $K_{\text{ass}}$  than either ethanol or acetonitrile.

### Introduction

Selectivity is important for accurate identification and quantification of analytes. As far the separation of inorganic anions is concerned, selectivity can be improved by use of association mechanism or addition of organic solvents<sup>1</sup>. Studies which combine the use of both the association mechanism and organic solvents are likely to improve analytes selectivity and provide further clarification on the suitability of association theories<sup>2</sup> to CE separations. Fairly extensive works<sup>3-4</sup> on strong ion association in aqueous, mixed organic-water and organic solvents have already been reported. However, investigations of weak ion association involving inorganic anions are few. This work investigates ion association between the inorganic anions and symmetrical tetraalkylammonium ions in aqueous, ethanol-water (0-80% v/v), dioxane-water (0-64% v/v), and acetonitrile (0-80% v/v) buffers.

### Experimental

Ion association between inorganic anions ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HCrO}_4^-$ ,  $\text{ReO}_4^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ,  $[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]^{3-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) and five symmetrical tetraalkylammonium ions,  $\text{R}_4\text{N}^+$  (R = methyl, Me; ethyl, Et; propyl, Pr; butyl, *n*-Bu; *n*-pentyl, Am) in aqueous and mixed organic- aqueous media was investigated by CZE at 25°C. The anion's effective mobilities were measured in either a formate (3.8) or acetate buffer (pH 4.0) using negative separating potential (-10 kV) and the direct detection of anions was made at anode by UV absorption ( $\lambda = 220 \text{ nm}$ ). Coated capillary was used for associations carried out in aqueous media to obtain reference mobilities of anions. Ordinary fused silica capillary was used for measurement of anion's mobilities in organic-water buffers using the slightly modified William-Vigh method.

The modified method allowed a faster measurement of mobilities of anions. The respective ion association constants,  $K_{\text{ass}}$  between the tetraalkylammonium ions and small inorganic anions were determined by Non Linear Least Squares Method treatment of the measured effective mobilities.

### Results and Discussion

In absence of the pairing cation, the mobilities of most anions in aqueous solutions were lower than those measured in organic aqueous solutions mainly due to increase in viscosity. Hexacyanoferate (III) ion generally showed a more extensive interaction in all types of media while bromide showed the least interaction with the tetraalkylammonium ions. Anions mobilities underwent a more pronounced change in dioxane-water buffers than in ethanol-water and acetonitrile-water buffers. Ethanol and acetonitrile had a slight effect on the mobilities of anions. However, the mobilities in ethanol were slightly lower than those in acetonitrile. Interestingly, at some compositions, the mobilities of some anions in acetonitrile were slightly higher than those determined in water. It was observed that  $K_{\text{ass}}$  determined in aqueous media compared favourably with those previously obtained by other methods e.g. conductometry<sup>5</sup>. The  $K_{\text{ass}}$  determined in dioxane-water solution were higher than those determined in water, ethanol-water and acetonitrile-water. The trend in the magnitude of  $K_{\text{ass}}$  followed the order: Dioxane-water > ethanol-water  $\approx$  Acetonitrile-water > water. Despite an increase in  $K_{\text{ass}}$  as the amount of dioxane was increased, which is consistent with the Bjerrum theory<sup>2</sup>, a comparison of  $K_{\text{ass}}$  values from other organic-water media studied, showed that ion association in CE is not entirely dependent on dielectric constant. Other interactions e.g. ion-solvent, may need to be considered to explain ion association in CE environment.

### References

1. A. G. Diress, C. A. Lucy, *J. Chromatogr. A.*, 1027 (2004) 185.
2. H. S. Haned, B. B. Owen in: *The physical chemistry of the electrolyte solutions* 3<sup>rd</sup> edn Reinhold, New York, 1964, 291-294.
3. T. Takayanagi, E. Wada, S. Motomizu, *Analyst* 122 (1997) 57.
4. L. C. Manege, T. Takayanagi, M. Oshima, T. Iwachido, S. Motomizu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 72 (1999) 1301.
5. E. Hogfeldt, in *Stability Constants of Metal-Ion Complexes (part A)*, Pergamon Press, Oxford (1982) p.187.

SCE '04  
L - 9

アニオン性金属錯体のキャピラリー電気泳動の高性能化  
—溶液内イオン間相互作用の制御因子としての尿素の利用  
東北大院環境

○高橋 透, 後藤 慎吾, 豊岐 伸彦, 星野 仁

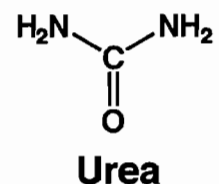
Improvement of The Separation of Capillary Electrophoresis  
of Anionic Metal Chelates ; The Use of Urea as Control  
Factor for Interionic Interaction

Graduated School of Environmental Studies, Tohoku University

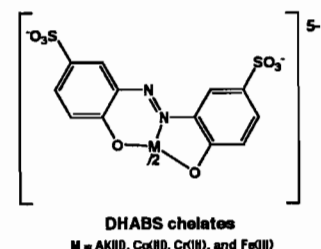
\*Toru Takahashi, Shingo Gotoh, Nobuhiko Iki, Hitoshi Hoshino

A successful use of the water structure breaking agent, urea, for controlling the hydrophobic interaction or the hydrogen-bonding at work in the ion-association (IA) capillary electrophoresis (CE) and the CE separation system based on the hydrogen-bonding ability of analyte and poly(ethylene glycol) (PEG) was demonstrated. In the IA-CE of anionic metal chelates of 2,2'-dihydroxyazobenzene-5,5'-disulfonate (DHABS) with tetrapentylammonium (TPA<sup>+</sup>) bromide as an ion association agent, the addition of urea in the electrophoretic buffer brought out the resolution enhancement of DHABS chelate. In a 3 M urea solution system, the diminution of ion-association constants between DHABS chelate and TPA<sup>+</sup> was confirmed. On the other hand, in the CE separation system based on the hydrogen-bonding ability of analyte and PEG of DHABS chelates, the diminution of migration time of DHABS chelate without the reduction of peak resolution of them was achieved by the addition of urea in the electrophoretic buffer.

【緒言】 キャピラリー電気泳動 (CE) の分離の高性能化を目的として、泳動緩衝溶液に溶質と会合体を形成する適当な相互作用試薬を添加して、溶質の電気泳動移動度を制御し、より精密な分離を達成する手法が知られている。例えば、泳動緩衝溶液に溶質と反対の電荷を有するイオン対試薬を添加してイオン会合体を形成させて溶質の見かけの電荷と分子量とを変えてそのイオン泳動を制御するイオン会合 (IA) CE, および、ポリエチレングリコール (PEG) を添加して PEG と溶質との水素結合を介した会合体を形成させて溶質の見かけの分子量を変える方法が知られている。IA-CE 系, および、PEG との水素結合を利用する系の各々の系におけるイオン泳動制御パラメーターは、それぞれ、疎水性相互作用、水素結合であるが、我々は、これらを“水構造破壊剤”である尿素を利用して制御し、より精密な分離を達成することを着想した。タンパクの変性剤としても知られる尿素は、これを水に加えると水素結合ドナー、アクセプターのいずれともなり、水分子同士の水素結合ネットワークを断ち切って、水の構造性を破壊する事が知られている。



【実験】 CE 装置；日本分光製 CE-870 紫外・可視吸光検出器と松定プレシジョン製 HCZE-30PNO 高圧電源装置からなる house-made 装置, および、大塚電子製 CAPI-3200 を用いた。これらの装置に、全長 62 cm, 有効長 50 cm の熔融シリカキャピラリー (内径 50 μm) を装着して用いた。試料の注入は落差法を用いて行った。CE 緩衝液；リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) にイオン対試薬として臭化テトラベンチルアンモニウム (TPABr) を加えたもの、または、ホウ酸緩衝溶液 (pH 9.0) に PEG (分子量 1,000 500,000) を加えたものに、0.1 ~ 5 M の尿素を添加した。金属錯体溶液；金属イオン溶液





(Al(III), Co(III), Cr(III), Fe(III)) に配位子試薬溶液 (2,2'-ジヒドロキシアゾベンゼン-5,5'-ジスルホン酸 : DHABS) と pH 緩衝液 (Tris-HCl, pH 7.9) を加え, 60 °C で 15 分間加熱し錯形成させた。

**【結果と考察】 IA-CE 系** 10 mM TPABr を含む泳動緩衝液に 0 ~ 2 M の尿素を添加したときの, エレクトロフェログラムを Fig. 1 に示す。尿素を添加しない場合, Co(III) 錯体と Cr(III) 錯体の分離が不十分であったが, 泳動緩衝溶液に尿素を添加する事でそのピーク分解能を調製する事が可能であった, 特に 1.5 M の尿素の添加で, 四種類の金属錯体のベースライン分離に近い良好な分離が得られた。すなわち, IA - CE 分離におけるピーク分解能の新しい制御因子として, 尿素が有効であることがわかった。一方, 泳動緩衝溶液中の TPABr 濃度の変化に対する DHABS 錯体の電気泳動移動度の変化から TPA<sup>+</sup> と DHABS 錯体のイオン会合定数を算出したところ, 尿素 (3 M) を添加した泳動緩衝溶液のイオン会合定数は, 添加しない泳動緩衝溶液のそれに対して小さかった。TPA<sup>+</sup> と DHABS 錯体とのイオン会合においては疎水性相互作用の寄与するところが大きい, 上の結果は, 尿素を用いてその制御が可能であることを示している。

また, 泳動緩衝溶液における尿素および有機溶媒 (アセトン (AcCN), エタノール (EtOH), エチレングリコール (EtG), ジメチルホルムアミド (DMF), メタノール (MeOH)) の濃度変化に対する電気浸透流速 ( $\mu_{eof}$ ) の変化を Fig. 2 に示す。有機溶媒系では, 濃度の増加に伴って大きく  $\mu_{eof}$  が減少したのに対し, 尿素を加えてもあまり  $\mu_{eof}$  は減少しなかった。さらに, 尿素を添加した場合だけピークの半値幅が減少 (ピークが尖鋭化) した。これらは, 尿素を CE 泳動緩衝溶液モディファイアとして用いると, 泳動時間の短縮とピーク分解能の向上を同時に達成できる可能性があることを示唆するものである。

**PEG との水素結合を利用する系** 泳動緩衝溶液に PEG を添加すると, 金属錯体は PEG 分子内のポリオキシエチレン鎖の水和水を經由した水素結合による一種の会合体を形成し, 4 種類の金属錯体の相互分離が可能となる。一方, PEG (分子量 20,000) を含む泳動緩衝液中に尿素を添加したところ, 尿素濃度が 0.8 M 程度の時, 分離能を損なうことなく分離時間の短縮を達成することができた。すなわち, 本系においても分離選択性の制御因子として, 尿素が有効であることがわかった。すべての金属錯体の電気泳動移動度は, 尿素濃度の増加に伴って減少し, やがて一定値に収束した。これは, 尿素的添加により, 錯体と PEG との相互作用が増大したことを示唆している。さらに, PEG の分子量の違いによる尿素的効果についても検討したところ, 尿素的添加に起因する PEG のコンホメーション変化により, 金属錯体に対する PEG の水素結合能が変化することも示唆された。

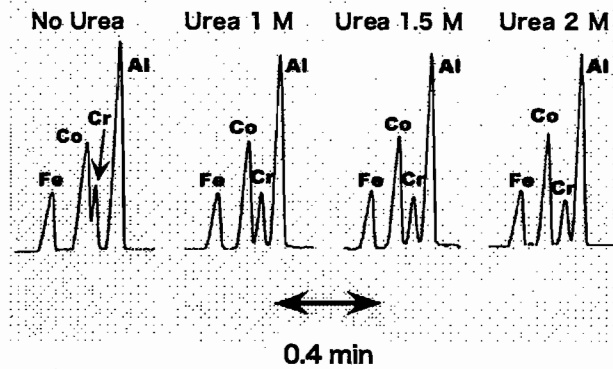


Fig. 1 Electropherograms of DHABS Chelates with aqueous urea electrophoretic buffer solutions. Electrophoretic buffer;  $[H_2PO_4]^- = 5$  mM (pH 7),  $[TPABr] = 10$  mM. Capillary; L = 62 cm, l = 50 cm.

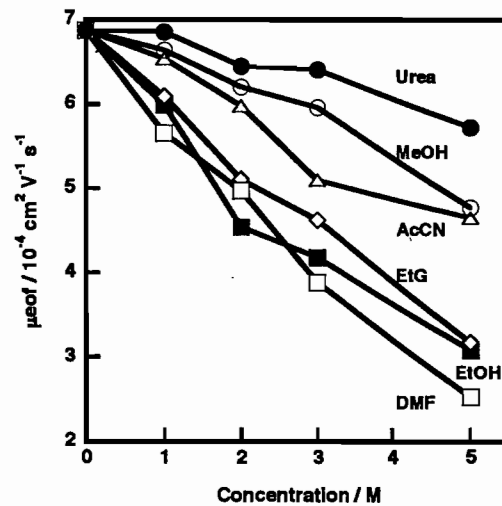


Fig.2 Variation of electroosmotic mobilities,  $\mu_{eof}$ , as a function of concentration of modifiers.

# SCE '04 澱粉誘導体を添加剤に用いた CE 及び L-10 マイクロチップ電気泳動

行天 由香里<sup>1</sup>、今村 栄里子<sup>1</sup>、○加藤 大<sup>1,2</sup>、豊岡 利正<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>静岡県立大学薬学部、<sup>2</sup>PRESTO (科学技術振興機構)

CE and microchip electrophoresis using starch derivatives as additives

Gyoten Yukari, Imamura Eriko, Kato Masaru, Toyo'oka Toshimasa

School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

PRESTO, Japan Science and Technology Agency

Starches occur abundant in nature. Most of them have branched structures of polysaccharides, amylopectin. Because the secondary structure is dendrimer, they are expected as new separation materials.

Plastic microchips are very promising analytical devices for its characteristics that they are less fragile and suitable for mass production. However, due to its hydrophobicity, the surface strongly interacts with nonpolar analytes or species containing hydrophobic domains, resulting in significant uncontrolled adsorption on channel walls. We developed the poly(methyl methacrylate) surface treatment by dynamic coating additives that considerably decreases adsorption of analytes to channel walls. Among the additives studied, quaternary ammonium starch derivatives suppressed the adsorption of fluorescently labeled compounds effectively. The effect was valid over the wide pH range from 2.5 to 8.0. In addition, this cationic starch derivative was found to possess good solubility and low viscosity.

## 1. 目的

澱粉は、天然に多量に存在する高分子であり、D-グルコースが $\alpha$ -1,4結合した直鎖構造を有するアミロースとさらに $\alpha$ -1,6結合による分岐を有するアミロペクチンの混合物である。特にアミロペクチンは、図1に示す房形構造と呼ばれる特徴的な2次構造を示すが、現在までにCEもしくはマイクロチップ電気泳動(MCE)の添加剤として用いられた報告はない。

マイクロチップを用いた分析法は、微量な試薬で短時間に分析できることから、優れた分析法として、多くの人々によって研究されている。現在までに、マイクロチップの基材として、ガラスとプラスチックの2種類が利用されているが、プラスチック製マイクロチップは、大量生産に適していることから簡便な検査に利用するのに適した材料である。しかしながらプラスチック製マイクロチップで生体試料を分析すると、プラスチック表面の非特異的な吸着によって良好に分離できない、という問題があった。そこで本研究では、澱粉誘導体に注目し、添加剤としての有効性をCEおよびMCEで検討した。

## 2.方法

マイクロチップ電気泳動装置には SV-1100 (日立)、高圧電源には LabSmith HVS448 (LabSmith)、PMMA 製マイクロチップには *i*-chip 3 DNA (日立化成) 用いた。キャピラリー電気泳動には、P/ACE5000 (Beckman) を用いた。澱粉誘導体は、日澱化学より提供されたものを使用した。

## 3.結果・考察

### 3.1 マイクロチップ電気泳動

カチオン、アニオン、ノンイオン性の澱粉誘導体を泳動液に添加し、NBD-F で蛍光誘導体化した Asp の分離を PMMA 製マイクロチップで行った。その結果、カチオン澱粉 (図 1) が、蛍光誘導体化した Asp の分離に有効であった。そこでさらに他のアミノ酸やペプチド及びタンパク質の蛍光誘導体の分離に応用した結果、カチオン澱粉は、これらの吸着も抑制し、良好に分離することが明らかとなった (図 2)。またこの添加剤は、広い濃度範囲 (pH 2-8) で有効であり、陰極から陽極方向に EOF を発生させた [1]。

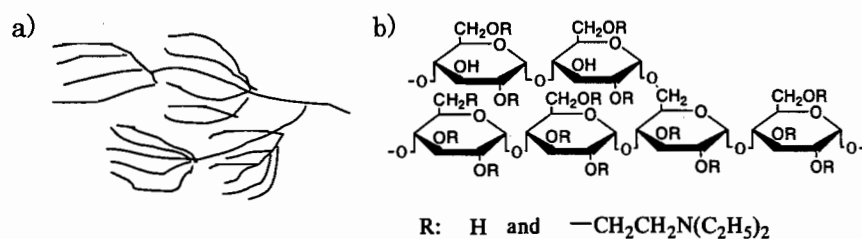


図 1 アミロペクチンの房型モデル(a)および実験に用いたカチオン澱粉の構造(b)

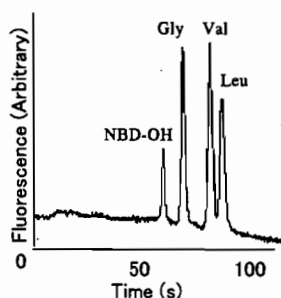


図 2 プラスチック製マイクロチップによるアミノ酸の分離

条件：泳動液 3%のカチオン澱粉を溶解させた 10mM リン酸緩衝液(pH 7.0)

### 3.2 キャピラリー電気泳動

上記の検討で有効であった澱粉誘導体の有効性を詳細に検討するために、キャピラリー電気泳動の添加剤として、カチオン澱粉を用いた。澱粉の中でアミロースとアミロペクチンのどちらの成分が添加剤として効果的であるかを調べるために、アミロペクチンのみを添加剤として用いた。その結果アミロペクチンのみでもキャピラリー内壁へのタンパク質の吸着を抑制し、良好に泳動できることが明らかとなった。

## 4.参考論文

[1] M. Kato, Y. Gyoten, K. Sakai-Kato, T. Nakajima, T. Toyooka, Anal. Chem. in press.

# SCE '04 L-11

## キャピラリー電気泳動を利用する細胞内糖転移酵素活性の比較解析法

○木下充弘、中村仁美、掛樋一晃  
近畿大学薬学部

### Comparative studies of glycosyltransferase activities in human cancer cells using capillary electrophoresis

Mitsuhiro Kinoshita\*, Hitomi Nakamura, Kazuaki Kakehi

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*

Glycosyltransferase plays a key role in biosynthesis of glycoconjugates, and its precise specificity and the specific expression are quite important for the understanding of their biological functions. In the present study, we employed a mixture of oligosaccharides as substrate, and analyzed the enzymatic products using laser-induced fluorescence detection/capillary electrophoresis (LIF-CE). We show that the present technique is quite useful for comparative studies of glycosyltransferase activity in human cancer cells.

遺伝子解析技術の進歩により、100を超える糖鎖転移酵素が既にクローニングされ、さらにノックアウトマウスあるいはトランスジェニックマウスを利用して遺伝疾患や癌転移に関わる糖転移酵素遺伝子が明らかにされている。一方、複合糖質の生合成は複数の酵素の作用により行われるため、糖鎖の生合成メカニズムやその役割を知るためには、複数の酵素活性を網羅的に解析し、糖鎖生合成関連酵素群の協調作業を知らなければならない。すなわち酵素基質として糖鎖混合物を分離精製することなく用い、個々の糖鎖に対する特異性を一斉解析する手法は極めて有用であると考えられる。本研究ではキャピラリー電気泳動の高分解能分離を利用し、蛍光性糖鎖混合物を酵素基質として用い、ヒト癌細胞中に存在する糖転移酵素活性を一斉解析し、個々の糖鎖に対する特異性ならびに細胞間における酵素活性を比較解析する手法について報告する。

**【実験】試料** 鶏卵黄由来糖ペプチドを原料として化学法および酵素法を組み合わせ得られた12種類のシアロおよびアシアロ複合型糖ペプチドを用いた。**糖ペプチドの蛍光標識** 糖ペプチド試料1 nmolを50 mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH 9.5, 200  $\mu$ l)に溶解後、5-Carboxyfluorescein succinimidyl ester (5-FAM, 50 nmol)を加え、4°Cで12時間反応させた。反応後 SephadexG50 のゲルろ過クロマトグラフィーにより最初に溶質される蛍光性画分を集め濃縮した。CE 装置, Beckman MDQ Glycoprotein System: キャピラリー, フューズドシリカキャピラリー (有効長 60 cm, 内径 50  $\mu$ m); 緩衝液, 0.1 M トリス-ホウ酸緩衝液(pH 8.3); 電圧, 20 kV; 試料導入、加圧法 (1 p. s. i 5 秒); 検出, Ar レーザー励起蛍光検出 (ex 488 nm, em 520 nm). **酵素反応** 上記標識糖ペプチド試料 2 pmol を 6  $\mu$ l の酵素反应用緩衝液に溶解し、50 nmol (2  $\mu$ l)

の糖ヌクレオチドと酵素溶液あるいは細胞可溶化液 2 $\mu$ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 6 時間反応させた。沸騰水浴中で 3 分間加熱し、酵素を失活除去した後上清を減圧乾固し、20  $\mu$ l の超純水に溶解し分析試料とした。

【結果】

5-FAM によりラベル化した複合型糖鎖含有糖ペプチド 6 種類を含む混合物を基質とし、市販の  $\beta$ 1-3GalT、 $\alpha$ 1-3FucIV、 $\alpha$ 2-3ST の 3 種の糖転移酵素について一斉解析を試みたところ、10 分以内に個々の糖鎖に対する各酵素の反応性を一斉に決定することができた。特に  $\alpha$ 1-3FucIV についてはモノシアロ及びジシアロ 2 本鎖糖鎖にフコースが 1 または 2 残基結合した酵素生成物とその原料を完全に分離することができ、キャピラリー電気泳動の高分解能を利用する本手法が、糖転移酵素の基質特異性の解析に有効であることがわかった。応用例としてヒト組織球性リンパ腫 (U937)、慢性骨髄性白血病 (K562、CCRF-SB)、T 細胞リンパ腫 (Jurkat) 及び結腸癌 (HCT15) 細胞の可溶性画分を酵素源とし、シアル酸、ガラクトース、フコースの転移活性を追跡したところ、全ての細胞種において高いガラクトース転移活性が認められた。一方、シアル酸およびフコースについては細胞種毎に特徴的な転移酵素活性パターンを示した。本法は糖鎖混合物を基質として用いて酵素の基質特異性を一斉に解析することができるため、いくつかの糖鎖混合物セットを用いることで、酵素の基質特異性の詳細な比較解析に有効であり、細胞中に微量に存在する糖転移酵素群の一斉解析に有力な手段となると考えられる。

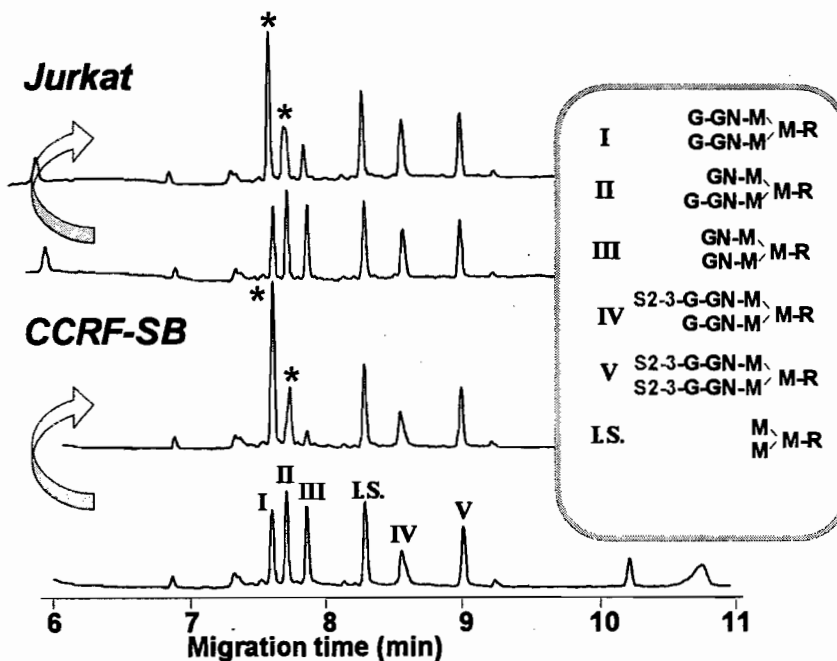


Fig.1 Simultaneous determination of galactosyltransferase activities in human lymphoma cells. The peaks of the product are marked with \*.

SCE '04  
L-12

## 2次元電気泳動上で検出される糖タンパク質 の糖鎖解析

○中西康晴、木下充弘、久保兼信、掛樋一晃  
近畿大学薬学部

### Carbohydrate analysis of glycoproteins detected on 2D-PAGE gel

Yasuharu Nakanishi, Mitsuhiro Kinoshita, Kanenobu Kubo, Kazuaki Kakehi  
*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University*

The present study reports a generally applicable and sensitive method for profiling of N-glycans from glycoprotein separated on SDS-PAGE or 2DE. N-Glycans of the separated glycoprotein were released by in-gel digestion with N-glycanase F. Analysis of N-glycans was performed with a laser-induced fluorescence detection/capillary electrophoresis (LIF-CE) and on-line sample concentration method to improve sensitivity. The present technique was successfully applied to characterize N-glycans of glycoprotein at a few pmol levels. We examined the change of N-glycans of IgG samples from myeloma patients.

ポストゲノム時代の到来とともに2次元電気泳動やペプチドマスフィンガープリンティングなどタンパク質の網羅的解析技術の進歩は目覚ましい。今後ポストプロテオーム時代に向け、プロテオーム解析技術と連動したタンパク質翻訳後修飾解析技術の開発が望まれる。本研究では代表的なタンパク質翻訳後修飾の一つである糖鎖によるタンパク質修飾を網羅的に解析するために、SDS-PAGE または2次元電気泳動により分離された微量の糖タンパク質から糖鎖を遊離後、蛍光標識しレーザー励起蛍光検出キャピラリー電気泳動を用いて糖鎖を高感度で分析する技術を開発した。開発した手法を用いて多発性骨髄腫患者より得られた血清糖タンパク質糖鎖の癌性変化を解析した結果について報告する。

【方法】糖タンパク質試料  $\alpha_1$  酸性糖タンパク質(AGP)、トランスフェリン、エリスロポエチン及び多発性骨髄腫患者由来 IgG 糖タンパク質のゲル内消化 SDS-PAGE 及び2DE 後の糖タンパク質を含むゲル片を洗浄脱水後、N-グリカナゼ F を含む緩衝液により膨潤させ、37°C 16 時間加温した。反応後ゲル片から水を用いて遊離糖鎖を回収した。糖鎖分析 糖鎖試料を 0.7 M 3-アミノ安息香酸(3AA)/2M NaBH<sub>3</sub>CN 溶液(DMSO-AcOH、7 : 3、20  $\mu$ l)に溶解し、50°C で 1 時間反応を行った。反応後、固相抽出カートリッジを用い、過剰試薬を除去して分析試料とした。キャピラリー電気泳動 装置には Beckman MDQ を使用し、キャピラリーには DB-1 キャピラリー(内径 100  $\mu$ m、有効長 20 cm)、泳動用緩衝液には 10%PEG70000 を含む 100 mM Tris-borate (pH 8.3)を用いた。試料導

入は電氣的導入法により行い、検出は He-Cd レーザー励起蛍光検出(Ex 325 nm, Em 405 nm)を用いた。

【結果・考察】

CEによる糖タンパク質糖鎖の高感度分析

微量の糖タンパク質糖鎖を高感度に分析する方法としてAGPを用いて感度向上のための条件検討を行った。加圧法における検出感度はAGPタンパク質として10 µg (240 pmol)であったのに対し、電氣的導入法による試料溶液と緩衝液界面における濃縮効果を利用することで、60倍から90倍まで試料を濃縮することに成功し、100 ng~200 ng (2 pmol~5 pmol)のタンパク質を検出するのに十分な感度を得ることができた。

糖タンパク質のゲル内消化と糖鎖分析

AGPを2次元電気泳動により分離し、CBB染色で検出された糖タンパク質のバンドをアセトニトリルで洗浄脱水し、N-グリカナーゼF溶液を加え酵素反応後、水で遊離糖鎖を回収する方法により、ゲル電気泳動、染色、ゲル内消化、糖鎖の回収の全工程において試料の大きな損失なく糖鎖分析を行なうことができ、分析の再現性も良好であった。また糖タンパク質のpIの違いに基づき分離されたグライコフォームごとに糖鎖分析を行なったところ、低pH側ではシアル酸含量が多く、高pH側ではシアル酸含量が少ない傾向が見られた。

多発性骨髄腫患者由来IgGの糖鎖分析

確立した手法を多発性骨髄腫患者由来IgGの癌性変化の解析へと適用した結果、ゲル電気泳動では癌性変化に基づく差は観察されなかったが、糖鎖分析の結果から糖鎖の非還元末端構造が著しく異なり、特にアシアロ複合型2本鎖からガラクトースが1残基欠損したIIの糖鎖の増加が顕著であるとともに、アガラクト複合型2本鎖Iの糖鎖の減少が観察され、癌化に伴い糖鎖構造が著しく変化することがわかった。これらのデータは、従来のセルロースアセート膜電気泳動法ではわからなかった症状の進展が追跡可能なことを示すと考えられる。

本法はゲル電気泳動により分離された微量の糖タンパク質中の糖鎖を高感度に分析できるため、プロテオーム解析と糖鎖解析の架け橋となる技術として期待できる。

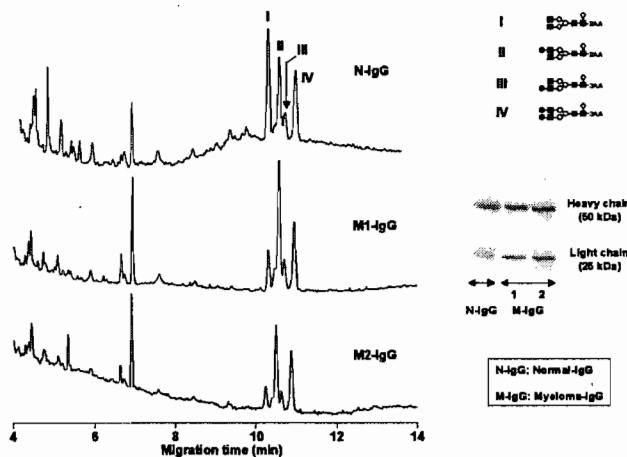


Fig. 1, Analysis of carbohydrate chains in IgG derived from a healthy subject and myeloma patients. Abbreviations: ■, N-acetylglucosamine; ○, mannose; ●, galactose; ◇, fucose; 3AA, 3-aminobenzoic acid

# SCE '04 L-13

## ヒト IgG-Fc の糖鎖不均一性とキャピラリー電気泳動

○久保兼信<sup>1</sup>、中西康晴<sup>1</sup>、前田和成<sup>2</sup>、森嶋祥之<sup>2</sup>、掛樋一晃<sup>1</sup>、岡部亘雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>近畿大学・薬学部、<sup>2</sup>近畿大学病院・中央臨床検査部

### Study of human IgG-Fc glycoforms using capillary zone electrophoresis with linear polyacrylamide-coated capillaries

Kanenobu Kubo<sup>1</sup>, Yasuharu Nakanishi<sup>1</sup>, Kazushige Maeda<sup>2</sup>, Yoshiyuki Morishima<sup>2</sup>, Kazuaki Kakehi<sup>1</sup>, Nobuo Okabe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

<sup>2</sup>Department of Central Clinical Laboratory, Kinki University Hospital

We examined the composition of electrolyte solution which is suitable for the glycoform separation of the immunoglobulin G-fragment crystallizable (IgG-Fc), and found that 0.1 M  $\beta$ -alanine-acetic acid at pH 4.5-4.6 was the most suitable. The profiling of three kinds of IgG-Fc preparations, which were obtained from one polyclonal IgG and two monoclonal IgG1, was compared by CZE using the conditions above. One of the monoclonal IgG1-Fc showed easily more than 15 peaks. Such resolution can't be explained only by the number of sialic acid residues included into the IgG1-Fc. We have to consider conformational effect of the Fc domain which influences charge density of Fc glycoforms. Thus, 0.1 M  $\beta$ -alanine-acetic acid at pH 4.55 was useful for the analysis of sialo-Fc glycoforms by CZE using linear polyacrylamide-coated capillaries.

「はじめに」 免疫グロブリン (Ig) G 分子の不均一性は通常、大別すると Fab 領域と Fc 領域の二つに由来する。前者は主にアミノ酸残基の、また後者はアスパラギン結合糖鎖のそれぞれの組成と構成によって、電荷および構造上、高度な不均一性を示す。キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) は高分解能を示す分離・分析手法で知られるが、上述のポリクローナル IgG 分子自体を標的とした直接的な IgG グリコフォーム分離には有効に機能しない。しかし、アミノ酸配列が均一な単クローン性 Ig についてはそれ自体のグリコフォーム分離が可能である (K. Kubo and Y. Morishima, Jpn J Electroph., 45 (2001) 185-191)。

そこで本研究では、Fc 領域に着目して 1) IgG-Fc のグリコフォーム分離に適した CZE 条件、2) 健常人および単クローン性免疫グロブリン (M 蛋白) 血症患者由来の IgG-Fc のプロファイリングについて報告する。

「実験」 IgG の調製 ヒト血清 0.2-1 ml (10-20 mg) を HiTrap Protein G HP column (1ml, binding buffer, 0.1 M NaPB containing 1M NaCl, pH 7.0; elution buffer, 0.1 M Glycine-HCl, pH 2.6) に適用し elution fraction に IgG を得た。 IgG-Fc の調製 IgG 2.5 mg (0.1-0.2 ml)+Digestion Buffer (0.3-0.4 ml)+Immobilized Papain (0.5 ml, 50 % Slurry, PIERCE) を 37°C で 5h 反応。反応物は HiTrap Protein G HP column 上記処方に従って Fc





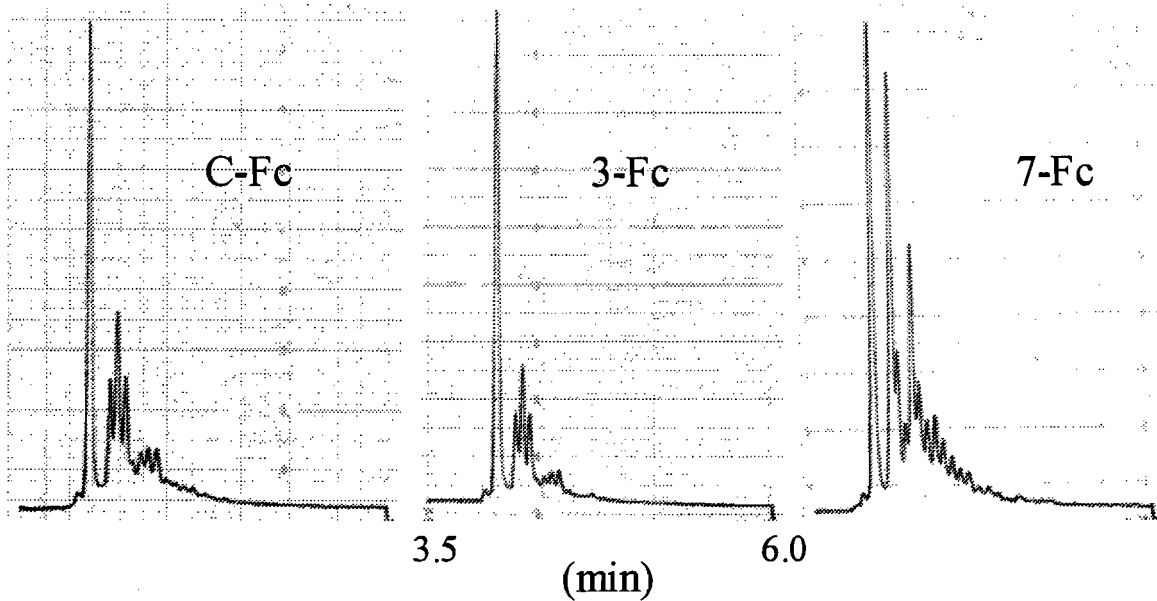
と Fab に分画した。これらを濃縮後、G3000SWXL column にかけて精製・濃縮し、CZE 試料としての Fc と Fab を調製した。 CZE キャピラリー(id, 75  $\mu$ m)そして電解液は、それぞれ直鎖アクリルアミド(7%)コートキャピラリーと 0.1 M  $\beta$ -アラニン - 酢酸緩衝液, pH 4.55 を用いた。Fc の CZE (Quanta-4000 CE system, Waters)は 20 kV/室温(27°C)で行った。

UD

「結果・考察」 CZE 電解液の設定 個々の mono-IgG は固有の pI を示す。それゆえ、CZE 分離の成否は、個々の mono-IgG に適した CZE 条件 (pH や電解質濃度) の選択と言う煩雑な操作に掛かっている。しかし、IgG-Fc 領域に関しては、ある特定の一種の CZE 条件の設定で poly-IgG および mono-IgG 由来 Fc に適用可能である。検討の結果、電解液としては 0.1 M  $\beta$ -アラニン - 酢酸、pH 4.55 が最良であった。コントロール(C-IgG)と二人の M 蛋白血症患者(3-IgG1, 7-IgG1)由来のそれぞれの IgG-Fc 試料(C-Fc, 3-Fc, 7-Fc)についての CZE 結果を図に示した。

塩の？  
うしんす

IgG-Fc のプロファイリング 糖鎖分析より、7-Fc ではモノシアロ糖鎖が非常に多く、3-Fc では極微量であった。7-Fc で見られる多数のピークは、シアリダーゼ処理によって、その殆どが最初に検出される大きなピーク位置に移動した。シアリダーゼ処理後のそれぞれのアシアロ-Fc の CZE 図は酷似しており、また 3 種の中性糖鎖の増加が確認された。これらの結果は、7-Fc で認められる十数本のピークの殆どはモノシアロ糖鎖を一つまたは二つ含むシアロ-Fc であるが、それら Fc 成分の CZE 分離はモノシアロ - モノシアロ/モノシアロ - アシアロ糖鎖のペアリング時の陰電荷の変化のみに帰することはできない。中性糖の CE において、異性体分離が可能であることを考慮にいれば、1) シアル酸の結合部位特異性が N-結合型糖鎖群にそれぞれ固有の変化を引き起こし、それが 2) シアロ-Fc に特徴的な構造変化をもたらし、その結果 3) シアロ-Fc の電荷/体積のバランスが微妙に変化することによって、CZE グリコフォーム分離が達成されていると考えられる。



poly IgG Fab  
Mono "   
↑  
u(1) 3.5

# SCE '04 マルチキャピラリー電気泳動装置によるタンパク質の特異的相互作用の解析

## L-14

○志村清仁<sup>1</sup>、木本泉<sup>1</sup>、笠井献一<sup>1</sup>、脇 卓真<sup>2</sup>、岡田政喜<sup>2</sup>、戸田年総<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>帝京大薬、<sup>2</sup>日本カンタムデザイン(株)、<sup>3</sup>都老人研プロテオーム共同研究センター

### Analysis of Specific Interactions between Proteins by Multiplexed Capillary Electrophoresis Instrument

Kiyohito Shimura<sup>1</sup>, Izumi Kimoto<sup>1</sup>, Ken-ichi Kasai<sup>1</sup>, Takuma Waki<sup>2</sup>, Masaki Okada<sup>2</sup>, Toshifusa Toda<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University*, <sup>2</sup>*Quantum Design Japan*, <sup>3</sup>*Proteome Collaboration Research Center, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*

Utility of a 96 multiplexed capillary electrophoresis instrument was evaluated for the analysis of protein-protein interactions. Interactions between fluorescence-labeled proteins and unlabeled proteins were analyzed by zone electrophoresis of pre-equilibrated samples in combination with mobility moment analysis. The instrument allows a through-put of about 20 s for each sample. Dissociation constants ( $K_d$ ) could be determined except for the complexes with very high affinity ( $K_d < 1$  nM) and that with little change in mobility on association.

#### はじめに

自由溶液中での分子間相互作用解析法の多くは複合体形成に伴う分子サイズの変化に基づいている。電荷が分離に大きな役割を果たす電気泳動法は、相互作用解析において独自の地位を占めている。プロテオームレベルの相互作用解析においてキャピラリー電気泳動あるいはマイクロチャンネル電気泳動が果たしうる役割は極めて大きい。解析の効率を高める方法の一つは、マルチキャピラリー化、マルチチャンネル化である。米国 SpectruMedix 社は96本のキャピラリーを用いて96試料のゾーン電気泳動を同時に行うことのできる装置 HTS9610 を開発した。マルチキャピラリー電気泳動装置による高能率相互作用解析の可能性について、HTS 9610 で得た最近の実験結果を報告する。

#### 実験

本装置のキャピラリーカートリッジは内径 50 $\mu$ m、外径 150 $\mu$ m、長さ 52cm の熔融シリカキャピラリー96本を束ねたものである。陽極端は96穴のマルチウェルトレイの各ウェルに適合するように配置され、これに添うように96本の電極が設置されている。下部には電極液と試料の入ったマルチウェルトレイをそれぞれ6個ずつ載せることができる2段の回転ラックがあって、陽極端の下に、エレベータによって必要なトレイが運ばれる。陰極端は送液ポンプに接続され、洗浄液や電気泳動緩衝液はこのポンプによってキャピラリーに送られる。試料の注入は、陰極側の流路を送液ポンプから減圧室 (-1psi) に切り換えることによって、陽極側から圧力注入される。試料の検出は陽極端から 35cm の位置で Ar イオンレーザー励起による蛍光をスペクトルに分けて CCD カメラで取り込む。

蛍光標識コンカナバリンA、蛍光標識トリプシン、蛍光標識インスリンを調製し、それぞれオボアルブミン、タンパク質性トリプシンインヒビター、抗インスリン抗体との相互作用を解析した。いずれの場合も相互作用する分子を一液中に混合して注入した。蛍光強度を移動度に対してプロットした泳動図について移動度モーメントを計算し、相手分子非存在下における移動度モーメントからの変化を指標として相互作用を解析した。移動度モーメントの計算はモーメント解析ソフト Momaffit (日本カンタムデザイン社) を用いた。

## 結果

### 1. 標識レクチンと糖タンパク質の相互作用解析

レクチンであるコンカナバリン A (conA) と糖タンパク質であるオバルブミンの相互作用を解析した。FITC 標識 con A と様々な濃度のスクシニル化オバルブミン (s-Ova) の混合液を調製し、ゾーン電気泳動を行って、スクシニル化オバルブミン濃度と移動度モーメントの変化の関係を調べた (Fig. 1)。約  $1 \mu\text{M}$  という解離定数が求められたが、より強い相互作用も見られた。

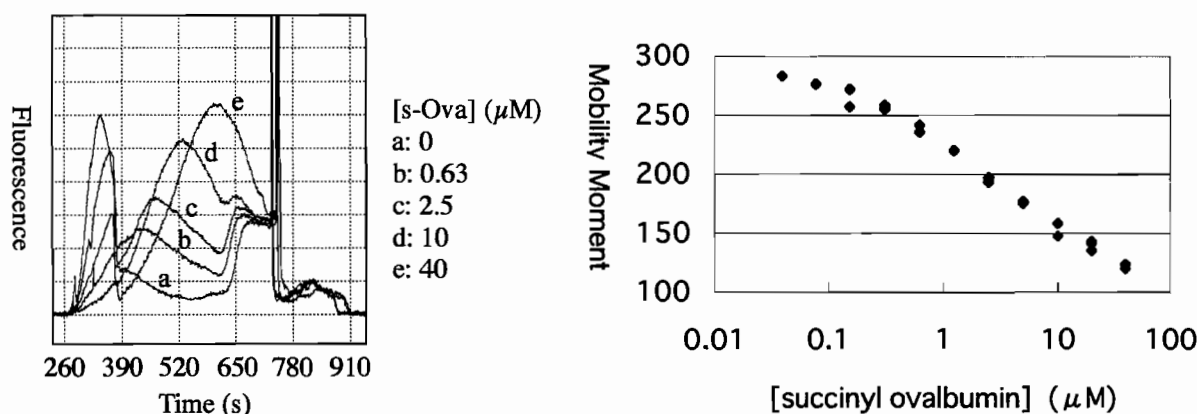


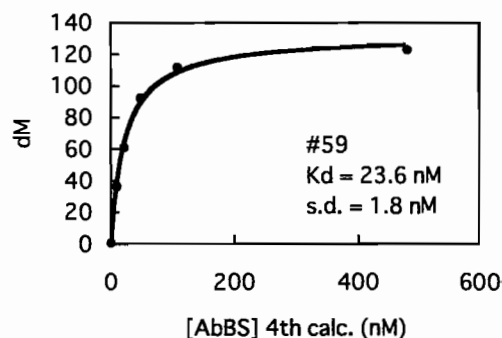
Fig.1 Zone Electrophoresis of FITC-con A with succinylated ovalbumin  
(A) Electropherograms, (B) mobility moment as a function of the concentration of succinylated ovalbumin.

### 2. 標識トリプシンとタンパク質タンパク質性トリプシンインヒビターの相互作用解析

蛍光標識トリプシンと様々な濃度のタンパク質性トリプシンインヒビターの混合液のゾーン電気泳動を行い、蛍光信号について移動度モーメント解析を行った。相互作用は見られたが、低濃度領域においても結合はほぼ飽和しており、解離定数の決定にはより高い検出感度が必要だった。

### 3. 標識インスリンと抗インスリンモノクローン抗体の相互作用解析

蛍光標識インスリンと各種の抗インスリンモノクローン抗体の混合液についてゾーン電気泳動を行い、標識インスリンピークの移動度モーメントを解析した。84本のキャピラリーを用いて7種のモノクローン抗体について一度の電気泳動で解離定数を決定した (右図)。複合体形成に伴う移動度の変化が小さい場合には決定値の精度が低くなる傾向が見られた。また、相互作用が強い場合 ( $K_d < 1 \text{nM}$ ) にも精度の高い決定は難しかった。



## 考察

複合体形成に伴う移動度の変化が小さい場合には、当然のことながら相互作用解析の精度は低下する。解析対象が組換えタンパク質の場合には、荷電性テールの付加などで分子の電荷を調節することによりこの問題を回避できるだろう。化合物ライブラリから特定のタンパク質に対する結合性リガンドの探索する目的には、タンパク質-タンパク質相互作用の阻害を指標とすることにより、マルチキャピラリー電気泳動装置をもちいて分子レベルの機能的スクリーニング系を構築できると考えられる。

# SCE '04 L-15

希土類蛍光錯体を利用した蛋白質の SDS-時間分解キャピラリー電気泳動

○山口佳則<sup>1</sup> 橋野仁一<sup>2</sup> 松本和子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>早稲田大学先端科学・健康医療融合研究機構 生命医療工学研究所

<sup>2</sup>早稲田大学理工学部化学科

Highly sensitive protein detection by SDS-capillary gel electrophoresis using a lanthanide fluorescence dye

Yoshinori Yamaguchi<sup>1</sup>, Kimikazu Hashino<sup>2</sup>, Kazuko Matsumoto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical engineering, Waseda University

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Waseda University

A new synthesized biological labeling dye, 2,2',2'',2'''-{{(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino-biphenyl-4-yl]-2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diyl}bis(methylenenitrilo)tetrakis(acetic acid) (DTBTA), was prepared and employed for sodium dodecyl sulfate (SDS) capillary gel electrophoresis. Although many metal complexes, including lanthanide complexes are decomposed in an electric field, the lanthanide complex, DTBTA-Eu<sup>3+</sup> was shown to be stable in the presence of a high electric field (<8kV). DTBTA-Eu<sup>3+</sup> originally has suitable characteristics for a biological labeling dye, that are high quantum efficiency, large Stokes shift and long fluorescence life time. Utilizing DTBTA-Eu<sup>3+</sup>, a mixture of proteins was efficiently separated by SDS-capillary gel electrophoresis coupled with time-resolved fluorescence detection. In addition to efficient separation, streptavidin(SA) was detected at concentration under 50pM using this highly sensitive technique. In this paper, we will report the detail of time-resolved fluorescence detection and using a lanthanide complex as a labeling dye. Furthermore, we will discuss the possibility of detecting less than a few hundred molecules by using lanthanide complexes.

【概要】希土類蛍光錯体は蛍光が強いことに併せて、ストークスシフトが大きいこと及び蛍光寿命が長いので、免疫アッセイ等で特に高感度測定が必要な場合に使用されているが、電気泳動と組み合わせた検出系、特に希土類蛍光錯体によって標識された蛋白質の分離分析には応用されなかった。その理由として、一つには、EDTA を含む緩衝液中では錯体を形成する金属がキレートされること、また、電圧を印加することによって不安定になり、錯体由来の蛍光が大幅に落ちてしまうためである。一方、キャピラリー電気泳動は蛋白質を分離分析する手法として重要な分離分析の方法であるが、その検出方法は一部でレーザー励起蛍光 (LIF) による測定が見られるが、多くはサンプルの赤外吸収を利用することによって行われており、その検出感度は $\mu$ モルオーダーの微量分析程度である。今回、我々は、新規に開発した希土類蛍光錯体 (2,2',2'',2'''-{{(4,6-dichloro-1,3,4-triazin-2-yl)amino-biphenyl-4-yl]-2,2':6',2''terpyridine-6,6''-diyl}bis(methylenenitrylo)tetraacetic acid, DTBTA)) を標識した蛋白質の SDS-キャピラリーゲル電気泳動による分離、遅延蛍光測定による検出を試みたので報告する。

【方法】 SDS-PAGE の分子量マーカーとして汎用されている 5 種類の蛋白質 (Lysozyme,

MW=14,300、 $\beta$ -Lactoglobulin, MW = 18,300、Trypsinogen, MW = 24,000、Albumin, egg, MW = 45,000、BSA (Bovine Serum Albumin), MW = 66,000) を DTBTA-Eu<sup>3+</sup>で標識し SDS・キャピラリーゲル電気泳動の方法で分離分析を行った。また、検出感度を評価するためにストレプトアビジンを DTBTA-Eu<sup>3+</sup>で標識し、その濃度を変化させて定量分析を行った。その泳動条件は内部をポリアクロマイドコーティング、内部にヒドロキシエチルセルロースを充填したキャピラリーを利用した。検出には標識剤の3つの優れた特徴を生かすために時間分解の方法を用い、光源としてキセノンフラッシュランプを用い、350nm の励起光による 615nm の蛍光を遅延時間 100 $\mu$ sec の条件でフォトンカウンティングにより測定した。

【結果と考察】蛋白質の DTBTA-Eu<sup>3+</sup>で標識された分子量マーカーは、分子量が 13400 の Lysozyme から分子量 66000 の BSA までの間で、その泳動時間と分子量の間には直線性が見られた。この結果は別に行ったスラブゲル電気泳動の結果と一致した。さらに、エレクトロフェログラム中に見られるそれぞれのタンパク質の濃度はリゾチーム、 $\beta$ ラクトグロブリン、トリプシノーゲン、卵白アルブミン、牛血清アルブミンについて、それぞれ  $8 \times 10^{-9}$ M、 $6.6 \times 10^{-9}$ M、 $5.4 \times 10^{-9}$ M、 $2.8 \times 10^{-9}$ M、 $2 \times 10^{-9}$ M である。このデータから、検出限界 (S/N=3) を評価したところこれらの分子マーカー蛋白質について、それぞれ、 $4 \times 10^{-9}$ M、 $5 \times 10^{-9}$ M、 $1 \times 10^{-9}$ M、 $1 \times 10^{-9}$ M、 $5 \times 10^{-10}$ M であった。これらの検出限界はこれまでに報告されている Dovichi らの研究による検出限界 ( $\beta$ ラクトグロブリン:  $3 \times 10^{-8}$ M、卵白アルブミン:  $8 \times 10^{-9}$ M、牛血清アルブミン:  $4 \times 10^{-9}$ M) より約 6~8 倍の感度が得られた。さらに、この標識剤による検出限界を評価するために行った、ストレプトアビジンの分析では、検出感度が  $5 \times 10^{-11}$ M (S/N=3.9) であった。この希土類蛍光錯体は蛋白質に容易に標識できると共に、水溶液中で強い電場を印加しても安定に強い蛍光を保持する標識剤であり、また、DTBTA のユウロピウム錯体 (DTBTA-Eu<sup>3+</sup>) を用いることにより、溶媒や分子篩いの媒体が発する蛍光を除去し、より高感度に生体物質を測定できることを確かめることが出来た。

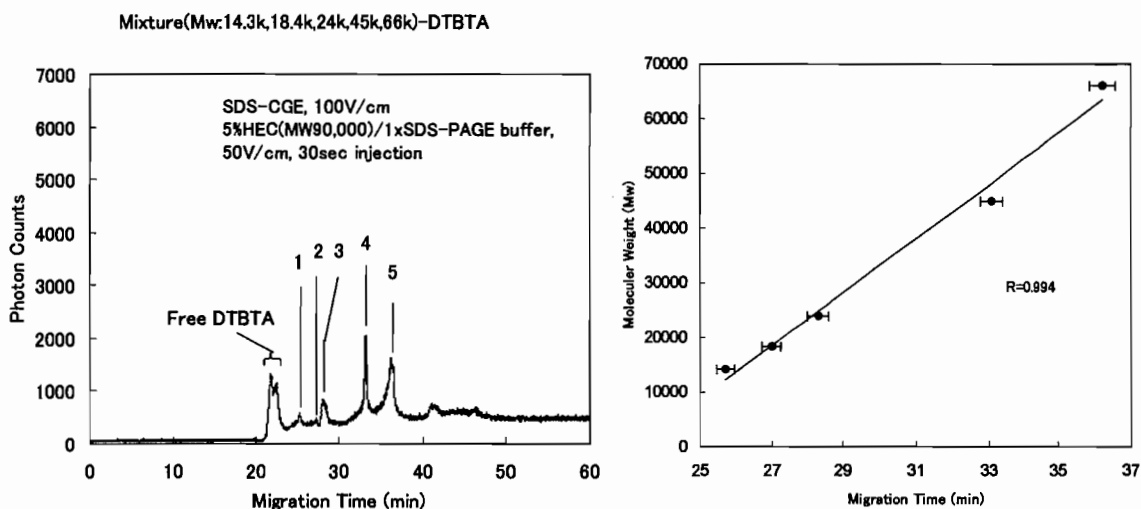


図 タンパク質ラダーの SDS-CGE. キャピラリー:フューズドシリカ管 (内径 75 $\mu$ m, 有効長 20cm)、泳動液:SDS-PAGE バッファー pH8.3 印加電圧:100V/cm. ピークの帰属: 1:Lysozyme, 2: $\beta$ -Lactoglobulin, 3:Trypsinogen, 4:Albumin, egg, 5:BSA (Bovine Serum Albumin)

# SCE '04 L-16

## 機能性微粒子を利用した生体試料の高選択的分離・高感度検出の試み

(京大院工)○岡本 行広、北川 文彦、大塚 浩二

### An attempt to the high selectivity separation and the high sensitivity detection of biomolecules using functional microspheres

Yukihiro Okamoto, Fumihiko Kitagawa, Koji Otsuka  
Graduate School of Engineering, Kyoto University

Despite the high selectivity of affinity capillary electrophoresis (ACE), there are still several problems, e.g., low detectability, need for sample derivatization, and difficulty in the fixation of affinity ligands. To overcome these problems, fluorescent molecules and affinity ligands were immobilized on the magnetic microspheres by the layer-by-layer deposition method. The fluorescent microscopic measurements and capillary electrophoresis were employed to characterize the prepared microspheres. Consequently, we can estimate that the fluorescent molecules and affinity ligands were immobilized on the magnetic microspheres and the prepared microspheres possess the affinity for lipoproteins. By using the functional microspheres, the enhancement of the sensitivity in ACE was successfully attained.

#### 1. はじめに

アフィニティーキャピラリー電気泳動(ACE)は特定の生体成分を分離・分析する有力な方法の一つであるが、ターゲット分子と特異的に相互作用するアフィニティーリガンドの固定化が困難であることなどの問題が指摘されている。そこで、本研究では磁気微粒子および電解質高分子の交互浸漬法(LbL法)に着目し、LbL法により磁気微粒子上に蛍光物質およびリガンド分子を固定化することで、レーザー励起蛍光検出法(LIF)における蛍光標識に関する問題の解決を図るとともに、ACEにおけるリガンドの固定化方法・部位および固定化量に関する問題の解決をも図った。さらに、磁気微粒子の特質を生かして、試料の精製および試料の大量導入、濃縮による検出の高感度化について検討し、ACEの更なる高性能化を試みた。

#### 2. 実験

LbL法により磁気微粒子(表面官能基:カルボキシル基、粒径:1.1  $\mu\text{m}$ )上に固定化する試料として、カチオン性高分子であるポリエチレンイミン(PEI)にイソチオシアン酸ローダミンB(RITC)が結合した物質、リポタンパクと親和性のあるアニオン性高分子のデキストラン硫酸ナトリウム(DxS)を選択し、磁気微粒子をRITC水溶液、DxS水溶液に交互に浸漬し、磁場による回収、洗浄を行うことで磁性、蛍光、アフィニティーを有する機能性微粒子を作製した。機能性微粒子の作製の評価および機能評価は、蛍光顕微鏡観察およびキャピラリー電気泳動(CE)装置(ポリビニルアルコール固定化キャピラリーを使用)を用いて電気泳動移動度を測定することで行った。また、今回作製した機能性微粒子とリポタンパクを用いて磁場を印加することで、キャピラリー内で粒子を捕捉・濃縮し、標的分子の精製および高感度検出を試みた。

### 3. 実験結果および考察

磁気微粒子に PEI-RITC、DxS を固定化していくと、電気泳動移動度の符号が反転した(Table 1)。また蛍光顕微鏡観察により、今回作製した磁気微粒子はローダミン同様の蛍光特性を有することがわかった。以上の結果より、磁気微粒子上に蛍光物質およびリポタンパクのリガンドを固定化できたことがわかった。またキャピラリー表面と作製した粒子の相互作用を考慮

することで、様々な粒子を CE で分離・分析できることが予想される。次に、作製した磁気微粒子にリポタンパク(高密度リポタンパク: HDL、低密度リポタンパク: LDL)を結合させると、泳動時間に変化が生じた。これは、リポタンパクと DxS の親和性によりリポタンパクが粒子に結合し、粒子表面の電荷および Stokes 径が変化したためと考えられる。このことより、作製した機能性磁気微粒子はリポタンパクに対する親和性があることがわかった。次に磁場を利用した ACE の高感度化について検討を行った。試料導入口より 6 cm の位置に磁石を置き、5 分間の電氣的注入によりリポタンパク固定化磁気微粒子を大量導入した後、磁場により保持されなかった成分の除去を行った。そして、磁場を除去し粒子を泳動させたところ 150~180 秒後に微粒子に由来するピークが検出された(Fig. 1)。この際、磁場を印加することなく 5 秒間電氣的注入した場合と比較して、25 倍から 40 倍の濃縮率を達成した。試料注入時間、注入時の電圧の検出感度への影響、検出限界などについての詳細についても報告する予定である。

Table 1. Migration time and RSD (n = 5)

Sample	Migration time (min) <sup>a</sup>	RSD (%) <sup>b</sup>
Magnetic microspheres (COOH modified surface)	2.5	0.60
PEI-RITC coated microspheres (DxS, PEI-RITC) coated microspheres	- 8.8 <sup>c</sup>	0.72
LDL binding microsphere	4.9	1.2
HDL binding microspheres	2.9	1.1

<sup>a</sup> mean value (n = 5)

<sup>b</sup> n = 5

<sup>c</sup> Minus indicates samples migrated from anode to cathode.

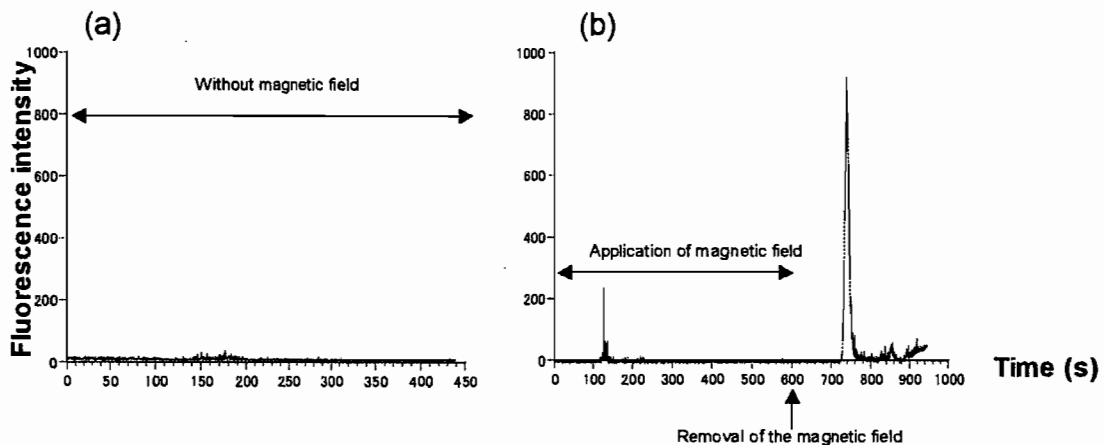


Fig. 1. Enhancement of the detection sensitivity by using the multi-functional magnetic microspheres. Electrokinetic injection, 15 kV for (a) 5 s, (b) 300 s.

SCE '04  
L-17

プロテインフィッシングキャピラリー電気泳動法の開発

○井上淳司, 金田隆, 今坂藤太郎

九大院工

## Development of Protein-Fishing Capillary Electrophoresis

Junji Inoue, Takashi Kaneta and Totaro Imasaka

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University

Western blotting technique has widely been employed for detecting a specific protein. However, this method is time consuming and difficult in automation. We propose a noble method for detecting a specific protein based on capillary electrophoresis (CE), "protein-fishing capillary electrophoresis". The technique includes capillary electrophoretic separation and an immunological reaction for capturing a specific protein. Protein samples are injected into the capillary and separated by applying a high potential. Two detection points are made on the capillary. Antibody-immobilized particles are packed between the two detection points in the capillary. All of the proteins separated by CE are detected at the first detection point. Only a protein which can react with the immobilized antibody is captured by immunological reaction on the packed particles, and then a peak corresponding to the target protein is disappeared at the second detection point. To develop the proposed method, separation conditions and methods for packing particles are investigated.

### はじめに

スラブゲル電気泳動と抗原抗体反応を組み合わせたウェスタンブロッティング法は感度・特異性が高く、従来からタンパク質の特異検出法として利用されている。しかしながら、ウェスタンブロッティング法は自動化が困難であり、分析に長時間を要するといった欠点をもつ。本研究では、2点検出法を利用するキャピラリー電気泳動に抗原抗体反応を組み合わせることで、オンラインでのタンパク質の特異的検出を短時間のうちに達成できるプロテインフィッシングキャピラリー電気泳動法を開発することを目的とした。本手法を実現するためにタンパク質の分離条件、並びに微粒子の充填方法について検討を行った。

### 実験

本研究では、二箇所を検出窓を設けたキャピラリーを用いた。本実験で使用した、UV-VIS 吸光



光度検出器は参照側と検出側の二つの光路を備えている。一点目の検出点として参照側を、第二点目の検出点として検出側を利用した。その結果、光吸収を持つ成分が第一点目を通過すると負のピークが、二点目を通過すると正のピークが観測される。二箇所を検出窓に微粒子を充填するために、検出窓間にフリットを設け、目的タンパク質を抗原として認識する抗体を固定化した粒子を充填した。また、磁性粒子を用いる場合には、フリットは設けず、磁石によりキャピラリーの外部から磁性粒子を保持させた。試料タンパク質にはウシ血清アルブミン(BSA)とラクトアルブミン(LA)を、粒子に固定化する抗体には抗BSAを用いた。タンパク質の検出は市販のUV検出器により行い、検出波長は280 nmとした。

### 結果と考察

先の検討結果において、微粒子を充填した場合としない場合とで、大きな電気浸透流の変化が観測された。このため、微粒子を充填することで分析時間が長くなり、再現性の高い分離を実現することが困難であった。そこで、キャピラリー内壁をコーティングして、電気浸透流のない条件でのタンパク質の分離について検討した。このとき、試料注入側を負極、検出器側を正極として、タンパク質は陰イオンとして泳動を行った。ポリビニルピロリドン(PVP)をコーティング剤として電気浸透流の抑制に関して検討した。まず、フリットを作製していない状態で、タンパク質試料の分離と二点でのUV検出を行った。試料を落差法によりキャピラリーに注入して得られた電気泳動図を図1に示す。予想されるように、はじめに2本の負のピークが、その後2本の正のピークが検出することができた。この結果から、PVPをコーティング剤として用いることで、電気浸透流が抑制でき、電気浸透流の変化を考慮することなくタンパク質を分離することができる可能性が示唆された。今後は、キャピラリー内での抗原抗体反応を実現するために、微粒子の保持方法についての検討を行う予定である。

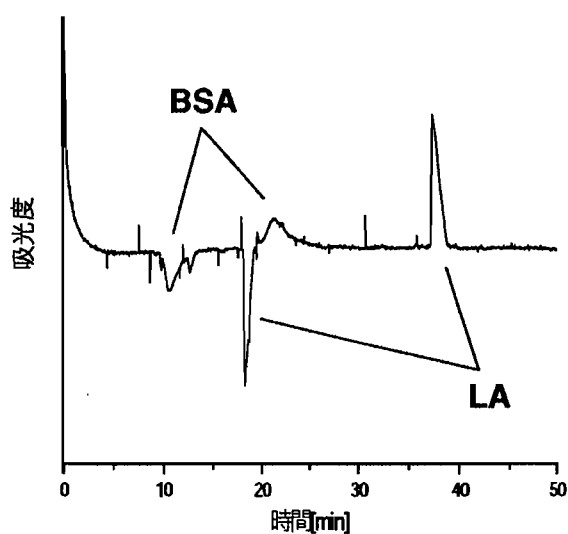


図1：2点検出によるBSA,LAの電気泳動図

# SCE '04 L-18

## マイクロチップ電気泳動を用いた迅速微生物分離

○鳥村政基<sup>1</sup>, 新谷智吉<sup>2</sup>, 佐藤浩昭<sup>1</sup>, 田尾博明<sup>1</sup>, 真鍋敬<sup>3</sup>

<sup>1</sup>産総研・環境管理技術研究部門, <sup>2</sup>愛媛県織産試, <sup>3</sup>愛媛大・理

### Rapid Microbial Separation by Microchip electrophoresis

Masaki Torimura\*<sup>1</sup>, Tomoyoshi Shintani<sup>2</sup>, Hiroaki Sato<sup>1</sup>, Hiroaki Tao<sup>1</sup>, Takashi Manabe<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Measurement Technology Research Group, Research Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<sup>2</sup> Textile Industrial Institute of Ehime Prefecture

<sup>3</sup> Faculty of Science, Ehime University

We developed and optimized a system coupling microchip capillary electrophoresis (MCE) and laser-induced fluorescence (LIF) detection for the analysis of microorganisms. The MCE-LIF system successfully separated pure cultures of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* within 200 s. The results indicate that the MCE system can be conveniently used for rapid and highly sensitive detection of microorganisms. Thus, MCE can provide a cheap and simple method for the on-line detection of microbial contamination.

#### はじめに

医療・環境衛生・食品等、多くの分野において微生物検査は、培養法という従来型の検査方法に依存している。培養法は検査結果が出るまでに何日もかかるため、病原菌などによる惨事を招いてしまうことが問題となっている。こうした背景から、微生物検査の分野では新しい迅速技術の開発が強く期待されている。近年、微生物の迅速分離検出法としてキャピラリー電気泳動を用いた手法が注目され、食品等の実サンプルの検査への応用も研究レベルで始まっている。本研究では、キャピラリー電気泳動における微生物の高性能分離条件を考慮し、複合微生物を高感度に検出できるマイクロチップ電気泳動法の開発を試みた。これまでキャピラリー電気泳動技術で実現されている微生物分離をしのぐ迅速性を期待し、マイクロチップキャピラリー電気泳動による微生物検出について検討した。

#### 実験

マイクロチップキャピラリー電気泳動装置はMCE-2010-LEF(島津製作所)を用いた。マイクロチップは流路幅 100  $\mu\text{m}$ 、ローディングアームの上下でオフセットを取らない D type と、オフセットを 500  $\mu\text{m}$  をとった TwinT type を用いた (Fig. 1)。検出用励起光源は、励起波長 488 nm の半導体レーザー光を使用した。尚、泳動前に予め 1 N NaOH で 0.5 mL、超純水で 0.5 mL 及び泳動緩衝液で 0.5 mL 洗浄したものを使用し、サンプルを 3  $\mu\text{L}$  添加し、電気泳動及び検出を行った。

*Lactobacillus bulgaricus* B5b、*Streptococcus thermophilus* 510 (乳技協)、*Saccharomyces cerevisiae*K-9 (日醸協) を培養後、それぞれの培養液から 500  $\mu\text{L}$  を 1.5 mL 容量のサンプル

チューブにとり、600×gで2分間遠心 (model Himac CF15D2 : 日立) し、0.85%(w/v)NaClにより洗浄し、TB緩衝液(0.1M Tris, 0.1 M Boric acid, pH7.0)に溶解し $6\sim 8\times 10^8$ 個/mlに調整した。これにLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits (Molecular Probes社製)のSYTO9溶液Aを0.75  $\mu$ L添加し、暗所で室温15分放置した後、マイクロチップ電気泳動に供した。チャンネル内の泳動微生物の挙動観察は、蛍光顕微鏡に設置した高感度カメラ (AP imager : 浜松ホトニクス) を使用し、取得した動画は動画計測ソフトウェア (Move-tr : ライブラリー) を用いて解析した。

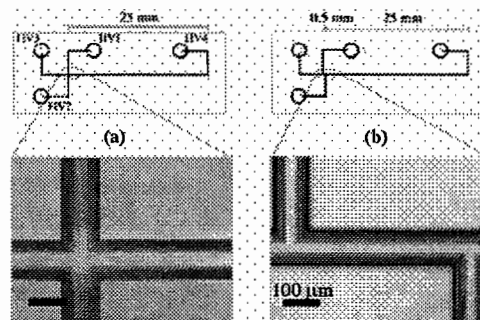


Fig.1 細胞注入を評価したマイクロチップ

## 結果

乳酸菌、酵母のマイクロチップへのサンプル注入の様子を Fig.2 に示す。シンプルクロスタイプ (Fig. 1(a)) のマイクロチップでは分離チャンネルへの導入量に低い再現性しか得られなかったが、TwinT タイプ (Fig. 1(b)) を用いることにより大幅にそれを改善することができた。また、今回用いた3種類の微生物については、導入細胞数が多いとチャンネル内でスタッキングが起こしやすいことがわかった。複数種類の菌体混合物を分離チャンネルへ導入して泳動する挙動を顕微鏡観察したところ、酵母と乳酸菌群が分離チャンネル導入後のわずか1.0秒後にほぼ完全分離が実現されることが確認できた (Fig. 2)。

マイクロチップ電気泳動による微生物細胞分離においては、採用する泳動液の成分が非常に重要な因子となる。この点について、詳細な報告および議論を行う予定である。

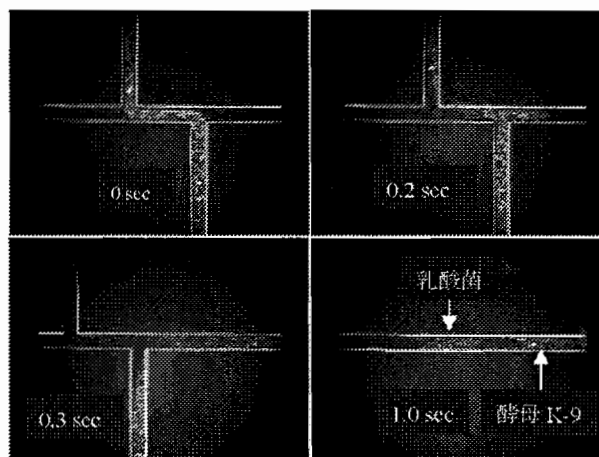


Fig.2 酵母、乳酸菌の注入と分離

## 謝辞

本研究は、経済産業省の地域新生コンソーシアム研究開発事業の一環として委託を受け実施したものである。

## 文献

1. Torimura, M., Ito, S., Kano, K., Ikeda, T., Esaka, Y. and Ueda, T., *J. Chromatogr. B.*, 721 (1999) 31-37.
2. Shintani, T., Yamada, K. and Torimura, M., *FEMS Microbiol. Lett.*, 210 (2002) 245-249.
3. Shintani, T., Torimura, M., Sato, H., Tao, H. and Manabe, T., *Anal. Sci.*, in press.

# SCE '04 ミセル動電クロマトグラフィーにおけるデータの標準化(V)

L-19 ○育田夏樹、伴 知晃、山崎泰二、廣川 健  
広島大学大学院工学研究科

## Standardization of electropherograms obtained in micellar electrokinetic chromatography (V)

Natsuki Ikuta, Taiji Yamasaki, Tomoaki Ban, Takeshi Hirokawa  
Graduate School of Engineering, Hiroshima University

We have developed some conversion methods from MEKC electropherograms with migration time axis into that of capacity factor axis considering the temperature increase and relaxation of potential gradient (RPG) in the separation capillary. It has been demonstrated that the electropherograms with capacity factor axis was very useful for qualitative analysis. The peak position did not change in the converted electropherograms even if the hardware condition was changed. The reproducibility of peak position is important not only in the qualitative analysis but also in the quantitative analysis, since the change of migration time directly affects peak areas. Then we constructed a simple model describing the peak areas and developed the reproducible methods for the quantitative analysis.

### はじめに

ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)などのキャピラリー電気泳動(CE)では、定性指標である泳動時間に異なる装置間でのデータの互換性がないため、得られた結果を解析するには標準試料との比較が必要である。そこで我々はキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)で成功した温度係数法を参考に、MEKCの定性指標の標準化法の開発を行った。MEKCでは容量比の違いによって分離が決定するため、基準温度での容量比が試料と電解液に固有な定性指標として扱うことが可能である。しかしながら、容量比の温度係数は物質に大きく依存するため、その温度係数を調べるために、発熱が十分無視できる程度の低電圧で、キャピラリーの設定温度を変えて容量比を測定し、温度係数を決定する必要があるが、理論的予測がある程度可能であることがわかった。しかしながら、泳動時間が異なることによって生じる問題として、フェログラム上での面積が異なるために正確な定量分析を妨げることがあげられる。そこで、本講演では定量分析において温度係数法により問題が解決できるかどうか理論および実験的に検討した結果について議論する。

### 理論

検出器の直前まで目的の試料  $i$  が泳動してきたと考える。このときのキャピラリー内における試料の濃度分布は(図 1 a に示すように)以下の式で与えられると仮定する。

$$f_i(x-v_i t) = \begin{cases} 0 & (x-v_i t > d/2, x-v_i t < -d/2) \\ C_i & (-d/2 \leq x-v_i t \leq d/2) \end{cases} \quad (1)$$

ここで、 $x$ ,  $v_i$ ,  $t$ ,  $d$  はそれぞれ、キャピラリー中の位置、試料  $i$  の泳動速度、泳動時間、試料の幅である。このキャピラリー中の分布を測定したとき、絶対量  $Q$  (単位は mol) は以下のようになる。

$$Q_i = C_i d S \quad (2)$$

ここで、 $S$  はキャピラリーの断面積である。

### 速度補正法

試料が検出される間、キャピラリー内でのプロファイルが一定であると仮定する。有効長  $l$  の位置に検出器を固定したとき、フェログラム上で得られた面積を使って絶対量  $Q$  を表すと、

$$Q = A_i S v_i \quad (3)$$

となる。もし浸透流速が測定ごとに違っていと仮定すると、 $A_i$  だけを使った定量分析では  $v_i$  の変化による誤差が生じる。従って、 $A_i$  に速度を掛けた定量指標  $I_i$  を用いると、便利である。

$$I_i = Q/S = A_i v_i = A_i l / t_i \quad (4)$$

また、この方法は電気泳動のみならず、クロマトグラフィーやフローインジェクションなど試料の流れを検出する分析法に応用することも可能である。また、正確な断面積が分かれば、式4を使って正確な絶対量を得ることができる。

### 容量比補正法(MEKCにおける温度係数法の定量分析への応用)

ほとんどのキャピラリー電気泳動装置には検出器が一つしかないので、電位勾配の緩和効果や容量比の温度変化のために  $v_i$  を正確に測定することが困難な場合がある。そこで、容量比の温度依存性を除去できる MEKC における温度係数法を用いることで、この問題が解決することを期待した。

ピーク先端が検出されたとき、ピークの中央は  $l-d/2$  の位置にいることから、 $k_s$  は以下のように表される。

$$k_s = \frac{lv - (l-d/2)v_{eof}}{(l-d/2)v_{mic} - lv} \quad (5)$$

同様にして、ピーク中央後端の泳動時間における移動度  $m_s$  は以下のように表される。

$$k_s = \frac{lv - (l+d/2)v_{eof}}{(l+d/2)v_{mic} - lv} \quad (6)$$

従って、横軸を移動度にしたときに得られる面積  $A_{mob}$  は

$$A_k = C_i (k_s - k) \\ = \frac{C_i d (1+k) (t_{mic} + kt_{eof})}{l(t_{mic} - t_{eof})} \quad (7)$$

ここで、一般にゾーン電気泳動では  $l \gg d$  であるので  $d^2$  を無視している。

$A_k$  を用いて全量  $Q$  を表すと

$$Q = \frac{A_k S l (t_{mic} - t_{eof})}{(1+k)(t_{mic} + kt_{eof})} \quad (8)$$

となる。このとき容量比に  $k = (1 + \beta \Delta T)$  の温度依存性があるとすると、8式は次のように表される。

$$Q = \frac{A_k S l (t_{mic} - t_{eof})}{\{1 + (1 + \beta \Delta T)k\} \{t_{mic} + (1 + \beta \Delta T)kt_{eof}\}} \quad (9)$$

ここで、 $\beta$  は容量比の温度係数、 $\Delta T$  は基準温度からの温度のずれを示す。講演では、この方法の実験への応用について詳しく説明する。

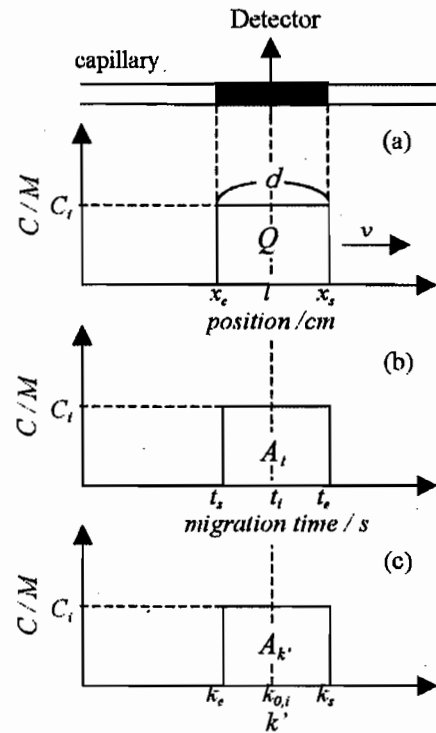


図1、キャピラリー中の試料の分布モデル (a)~(c)はそれぞれ横軸をキャピラリー中の位置、泳動時間、容量比としたときの濃度分布。試料が検出される間、拡散や濃縮が起こらないと仮定する。

# SCE '04 L-20

## サーファクタントグラジエントー ミセル動電クロマトグラフィー

○江坂幸宏・後藤正志  
岐阜薬科大学

### Surfactant-gradient micellar electrokinetic chromatography

Yukihiro Esaka\*, Masashi Goto  
Gifu Pharmaceutical University

Surfactant-gradient method in MEKC should be useful to decrease analysis time and to improve separation simultaneously when analytes of a very wide hydrophobicity are to be separated. In the present separation system in which EOF is virtually eliminated, micelles migrate most fast compared with all solutes and thus, the micelles of the composition of surfactants in inlet reservoir pass through all analytes, during separation of the analytes. This means we can perform surfactant gradient elution by a simple and practical method, namely changing running solution of inlet reservoir with different concentrations of surfactants during a run. We performed stepwise and linear gradient elution of organic anions, organic cations and neutral analytes.

#### 1. はじめに

MEKCにおいて高性能・高機能分離を追求する見地から、分離進行中に分配相特性を変化させるグラジエント溶出法を検討している。逆相 HPLC におけるグラジエント溶出と原理的に同等の意味を持つ溶液相側を変化させる手法は初期の研究で提案されている。一方、ミセル相側を変化させる手法は、構造分配相(ミセル)が動的かつ熱力学的平衡により随時組成変化可能の MEKC に特異的な構造分配相変化型と位置付けられる。さらには溶質の配向性は一般に溶液相より構造分配相において強いため、溶質認識能力も構造分配相によるところが多く、結果として、構造分配相変化型において溶媒相変化型より高選択性を発現する可能性がある。本法では、浸透流を抑制した系では、入りリザーバーの界面活性剤組成・濃度を変化させるという実用的な方法で、分離に関わるミセル相を逐次変化させられることを利用している。これまでに混合系の組成を変化させる組成グラジエント法によって、有機アニオンを対象として分離と分離時間の双方に関する顕著な改善が可能であることを示してきた。今回は、荷電・中性試料双方を対象に、界面活性剤濃度を変化させるグラジエント溶出を検討した。また、シンプルな装置によるリニア・グラジエント法の導入も行った。それらについて本手法の問題点・解決法なども含めて述べる。

#### 2. 方法

キャピラリー (0.05 mm i.d.) には、浸透流抑制を目的に poly-*N,N*-dimethylamide 内部コーティングを施した全長 50 cm (有効長 30cm) を主に、一部ノンコーティング(酸性条件下使用)のものを全長 60 cm (有効長 30cm) で用いた。界面活性剤には、cetyltrimethylammonium chloride(CTAC)もしくは SDS を使用した。泳動液は、10mM リン酸緩衝液(pH 7.2 もしくは pH 2.3) をベースに CTAC か SDS を溶解し、必要に応じて電気抵抗調節のため塩化ナトリウムを適宜加えて調製した。グラジエント溶出は、inlet 側のリザーバー組成を分離過程に変化させる方法で導入した。試料注入は落差法で行った。印加電圧は 8 または 10 kV(有効長 60cm の際)で電流はそれぞれ 15  $\mu$ A と 20  $\mu$ A 前後となった。

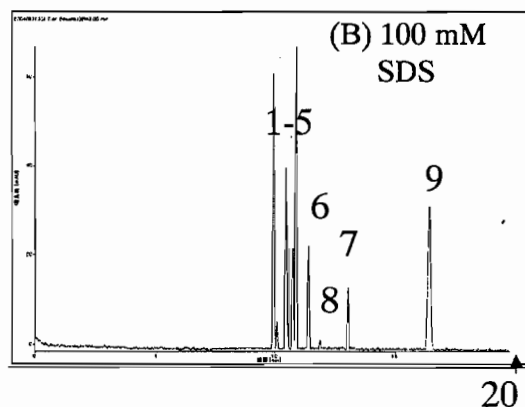
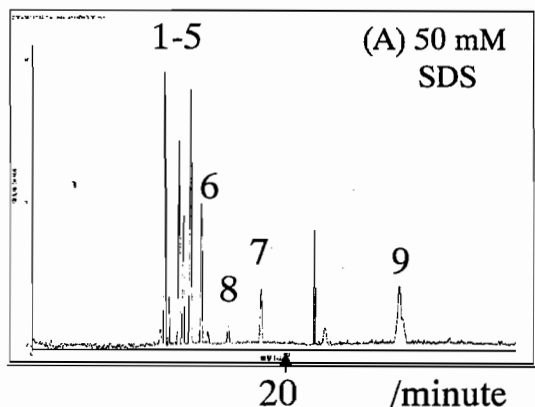
#### 3. 結果と考察

濃度グラジエント法は、基本的には界面活性剤の濃度をパラメーターに分配相体積比を変

化させてリテンションファクターを変化させる方法であり、第一に広い疎水性範囲を持つ試料群の分離に有用であると考えられる。ただ、実際にイオン性界面活性剤の濃度を大きな範囲で変化させてグラジエント溶出を行うためには、各濃度ゾーンの移動速度をほぼ一定にするために、各濃度ゾーン内の電場勾配を揃えるように泳動液の電気抵抗を適当な電荷質（ここでは塩化ナトリウムを使用）で調整することが必須であった。この分離系では、ミセルマーカを先頭に基本的に疎水性の強い順番に溶出する。ここでは、疎水性の強い試料を相比の小さなゾーンで十分に分離し、そのままでは著しく溶出が遅れる比較的親水的な試料を相比の大きなゾーンで溶出を早める方法を取り、CTAC 濃度を 10mM から 100mM まで変化させて、15 種の置換ベンゼン類、10 種の安息香酸類各群の分離を通して、分離向上と時間短縮両面から本法の有用性を確認した。

ところで、本手法でイオン性試料を分離する際に、試料の疎水性が低くミセルとの相互作用が十分でない場合、ミセルとの反対電荷によって注入後キャピラリーからリザーバーに試料が出て行ってしまいうケースがある。この場合、検出器の方向に移動させるのに十分な濃度のミセルゾーンを後から導入しても、この試料がキャピラリー内に存在しないため検出できない。キャピラリーの中間まで注入してからグラジエント溶出することで全試料を分離最適化して検出することが理屈上可能であるが、圧力注入ではピークの広がりや深刻であった。この点 CZE による中間までの注入とグラジエント溶出は良好な結果を与えた。

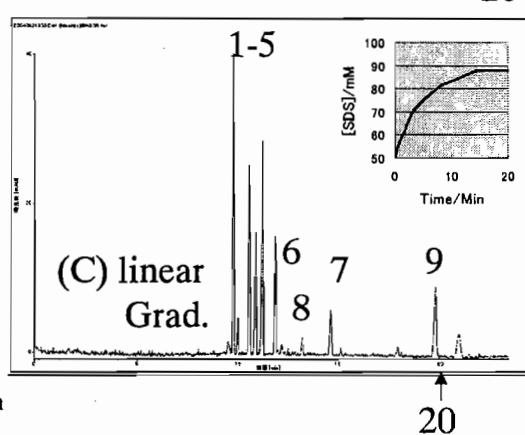
細かいグラジエントプログラムを実行するためには、リニア・グラジエント法の導入が求められる。リニア・法導入のためのシンプルな手法を考案した。スターラーの設置された入口側リザーバーに界面活性剤が低濃度の初期溶液を少量入れて攪拌しながら、泳動中に高濃度溶液をチューブ経由で連続的に落差で入口リザーバーに導入する。チューブ内径と落差高で混入速度を容易に調節できる。ここでは SDS 含有酸性リン酸緩衝液 (pH 2.3) を用い、生体アミン類をモデルにリニア・グラジエント溶出が達成されたことを確認した(下図)。



Separation of seven biological amines and two benzaldehyde: (A) in the presence of 50 mM SDS, (B) 100 mM SDS; and with (C) a linear gradient program

1. Serotonine, 2. Tyramine, 3. 3-Hydroxytyramine,
4. Phenylalanine, 5. 3-MeO-tyrosine, 6. Adrenaline,
7. Noradrenaline, 8. Toldaldehyde, 9. benzaldehyde

non-coated capillary ,0.05mm i.d.x600mm(effective length,300mm); applied potential (current) 8.0kV ((A)20  $\mu$  A (B)23  $\mu$  A (C)20  $\mu$  A) running solutions, micellar solutions in 10 mM Phosphate buffer (pH 2.3) in the presence of 20 mM NaCl, injection, anodic side, detection wavelength 200nm.



# SCE '04 L-21

キャピラリー電気泳動を用いたノニルフェノールの高感度分析  
○坪田佳奈美、磯尾賢太郎、寺部 茂  
兵庫県立大学大学院・物質理学研究科

## High sensitivity analysis of nonylphenols by capillary electrophoresis

Kanami Tsubota\*, Kentaro Isoo, Shigeru Terabe

*Graduate School of Material Science, University of Hyogo*

Although, nonylphenol (NP) is concerned with its endocrine disrupting effect, nonylphenol polyethoxylate (NPOE), which degrades into NP, is still used as a detergent. On the other hand, some research groups are trying to degrade nonylphenol which has more than 200 isomers by using bacteria. We could know the difference in degradation rates among NP isomers. Cyclodextrin-modified-micellaer electrokinetic chromatography (CD-MEKC) was performed to separate NP isomers. We found that 100 mM phosphate buffer (pH 2.0) containing 10 mM hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin, 20 mM sodium dodecyl sulfate and methanol (20%) was the optimum back ground buffer. To enhance the sensitivity of NP, sweeping technique was applied for on-line preconcentration. As a result, 60 distinguishable peaks of NPs were obtained and we achieved 30 ppb for detection limit at the best.

### 1. はじめに

近年、内分泌攪乱性の疑いが指摘されているノニルフェノールは、生活廃水を介して河川に排出され、海洋水域などの底質に蓄積することで問題となっている。一方で、ノニルフェノールを細菌で分解する研究が進められる中、理論上 200 種類以上存在するとされる  $p$ -ノニルフェノール ( $p$ -NP) を高分離かつ高感度に分析する方法の確立が求められている。また、異性体を正確に分離することで、どの異性体が事実上生態系に影響を与えているかを調べることに貢献すると考えられる。

我々はこれまでに、より優れた分離を目指し、かつ高感度な分析を可能にする目的で、酸性条件下においてスウィーピング-CD-MEKC を適用する検討を行ってきた。その結果、S/N 比が改善され、さらに約 60 本のピークを確認することが可能となった。また、本法により最も高感度に検出されたもので 30 ppb の検出限界を得ることができた。本研究では、さらなる高分離・高感度化を目指すために、新規添加剤の適用などの各種条件の最適化に関する検討を行い、さらに数種の異性体ピークの同定を試みた。



## 2. 実験

キャピラリー電気泳動装置にはAgilent 3D/CE システムを使用し、キャピラリーは内径 50  $\mu\text{m}$ 、全長 76.5 cm (有効長 68 cm) の内面未処理フューズドシリカキャピラリーを用いた。電気泳動溶液 (BGS) には、界面活性剤として硫酸ドデシルナトリウム (SDS) および有機溶媒を、さらに異性体を分離するためにシクロデキストリン含むリン酸塩緩衝液を使用した。試料導入はすべて加圧法 (50 mbar) により行い、測定時の印加電圧は-25 kV、装置設定温度は 25°C、検出波長は 195 nm とした。試料溶液は、泳動溶液と電気伝導率をほぼ等しくさせたリン酸塩緩衝液を用い、通常よりも長い時間の試料導入を行い、スウィーピングを行った。

## 3. 結果

まず、CD-MEKC による *p*-ノニルフェノールの分離について、泳動溶液の組成、SDS の濃度、CD の種類と濃度、有機溶媒の添加効果について検討を行った。結果として、異性体を分離するために、10 mM ヒドロキシプロピル- $\gamma$ -CD (HP- $\gamma$ -CD)、また 20 mM SDS および 20%メタノールを 100 mM リン酸塩緩衝液に添加し pH を 2.0 に調製した泳動溶液を用いた時に、Figure 1A に示すように最も良好な分離を得ることができた。そこでこの条件下において、スウィーピングを適用した結果が Figure 1B であり、濃縮効果による濃度感度の向上、および良好な分離を得ることができた。さらに、数種の異性体ピークの同定を行った。現在、本法における河川泥中の NP の検出について検討中であり、その結果についても報告する。

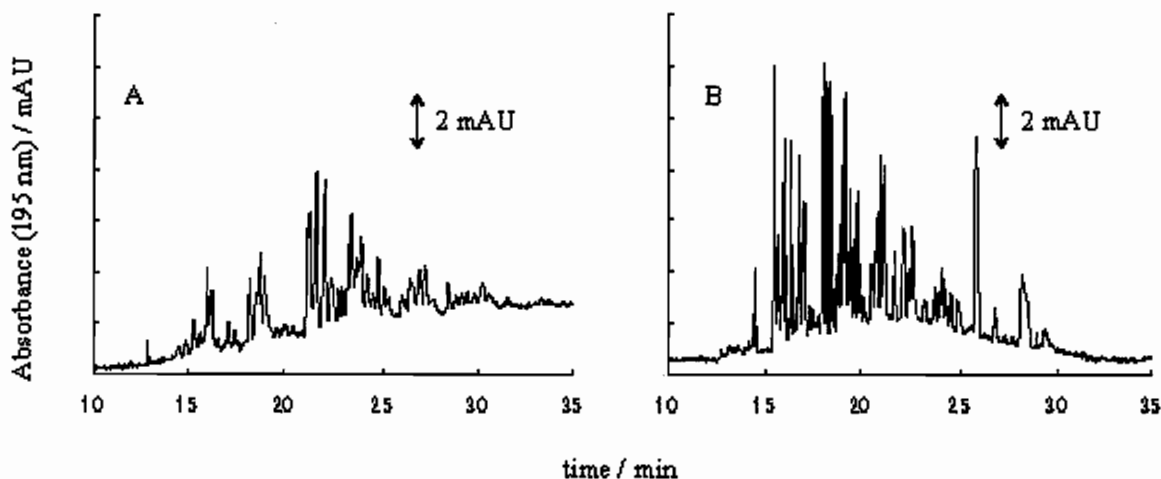


Figure 1. CD-MEKC separation (A) and sweeping-CD-MEKC separation (B). Conditions: BGS, 20 mM SDS, 10 mM HP- $\gamma$ -CD and 20% MeOH in 100 mM phosphate (pH 2.0); Injection, 50 mbar for 3 s (A), 350 s (B); Sample concentration, 500ppm (A), 50 ppm (B).

# SCE '04 L-22

## キャピラリー電気泳動におけるオンライン錯形成/ スウィーピング法による微量金属カチオンの高感度 分析法の検討

○磯尾賢太郎, 寺部 茂  
兵庫県立大院・物質理学

### High sensitivity analysis of trace metal cations using on-line complexation/sweeping in capillary electrophoresis

Kentaro Isoo\*, Shigeru Terabe

Graduate School of Material Science, University of Hyogo

To improve the detection sensitivity of metal ions in capillary zone electrophoresis, an effective method, sweeping via dynamic complexation, was developed. In this sweeping method using a complexing reagent as the carrier for sweeping, dynamic complexation to form a UV-absorbing chelate and on-line preconcentration occur simultaneously during a run. Cyclohexane-1,2-diaminetetraacetic acid (CDTA) was used to evaluate the separation efficiency and detection sensitivity of sweeping via dynamic complexation in the presence of high EOF. Under optimum conditions, good resolution and limits of detection in the low ppb levels were obtained for the test metal ions. Furthermore, 2,6-pyridinedicarboxylic acid (2,6-PDCA) was used to achieve a reasonable separation and to improve the detection sensitivity for  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  by sweeping via dynamic complexation, affording 31- and 72-fold enhancement in terms of peak heights, respectively.

#### 1. 緒言

近年、我々はキャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) において、金属イオンを高感度に分析するための新たなオンライン試料濃縮法を開発した[1]。本手法は、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) において開発されたスウィーピング法[2]の原理を応用するもので、濃縮キャリアーとして安定な錯体を形成する配位子を利用することで、金属イオンの UV 吸収の強い化合物への誘導体化および濃縮を同時にオンラインで行うことができる。したがって、複雑な前処理を伴わずに金属イオンの効率的な高感度分析が可能となる。我々は、これまでに、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) およびシクロヘキサン-1,2-ジアミン四酢酸 (CDTA) を用いて、弱酸性条件下において本手法を適用し、ppb レベルの金属イオンの高感度分析が可能であることを明らかにしてきた[1,3]。本研究では、さらに分離選択性の向上を目指し、電気浸透流 (EOF) が大きく存在する塩基性条件下において、CDTA を用いたオンライン錯形成/スウィーピング法の適用に関する検討を行った。また、 $\text{Fe}^{2+}$  および  $\text{Fe}^{3+}$  の同時高感度分析を可能とするために、錯形成試薬として 2,6-ピリジンジカルボン酸 (2,6-PDCA) を用いる検討も行い、その結果についても報告する。

#### 2. 実験

キャピラリー電気泳動装置は Agilent 3D/CE システムを、キャピラリーは内径 50  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーを使用した。オンライン錯形成/スウィーピングにおいて、試料は、CDTA または 2,6-PDCA を含まず、かつ電気伝導率が泳動溶液と同じになるように調製した溶液で希釈することにより調製した。そして、試料溶液をキャピラリー内に大量に導入した後、電圧を印加することでオンライン錯形成/スウィーピング法を行った。検出波長は、CDTA および 2,6-PDCA を用いた場合、それぞれ 200 nm および 214 nm とし、また、装置設定温度はそれぞれ 25°C および

30°Cとした。

### 3. 結果

#### <塩基性条件下における CDTA によるオンライン錯形成 / スウィーピング法>

塩基性条件下では、強い電気浸透流 (EOF) 存在するため、陰イオン性の CDTA および CDTA 錯体も陰極方向へ移動する。したがって、正電圧を印加して実験を行った。また、EOF により大量に導入される試料ゾーン長さも、EOF が存在しない場合または非常に小さい場合に比べて短く制限される。一方、試料マトリックス中の共存成分によっては、スウィーピングによる濃縮効果に大きく影響を及ぼすことがある。Fig. 1A は試料マトリックスに酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) を用いた場合の結果である。Fe<sup>3+</sup>は酢酸イオンと安定な錯体を形成するため、CDTA との錯生成効率が低下し、うまく濃縮できなかったと考えられる。一方、試料マトリックスに塩化ナトリウム溶液を用いた場合 (Fig. 1B)、すべての金属イオンにおいて濃縮されたピークを検出することができているが、CDTA に対して他の金属イオンと競合するナトリウムイオンが非常に多く存在するために、Fig. 1A に比べて全体的に感度が低下している。しかしながら、Fig. 1B に対して塩化ナトリウムの濃度を3倍まで変化させた場合でも、濃縮効率には大きな影響は見られなかった。

#### <2,6-PDCA を用いたにオンライン錯形成 / スウィーピング法による Fe<sup>2+</sup> および Fe<sup>3+</sup> の同時高感度分析>

2,6-PDCA を錯形成試薬として用い、Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>混合試料にオンライン錯形成 / スウィーピング法を適用した結果を Fig. 2 に示す。pH 4.0 では EOF が小さく、また、臭化テトラデシルトリメチルアンモニウム (TTAB) を添加することで EOF をほぼゼロに抑制できた。したがって、陰イオン性 2,6-PDCA および 2,6-PDCA-Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>錯体はいずれも陽極方向へ移動することから、負電圧を印加して実験を行った。その結果、Fig. 2 に示す通り、Fe<sup>2+</sup> と Fe<sup>3+</sup> の完全分離と、オンライン錯形成 / スウィーピングによる高感度な測定が可能となった。また、通常の CZE で 2,6-PDCA-Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>錯体を分析した場合に比べて、Fe<sup>2+</sup> は 70 倍、Fe<sup>3+</sup> は 30 倍程度の濃度感度の向上を得ることができた。

### 4. 参考文献

- [1] K. Isoo, S. Terabe, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6789-6798.
- [2] J.P. Quirino, S. Terabe, *Science*, **1998**, *282*, 465-468.
- [3] K. Isoo, S. Terabe, *Chromatographia*, in press.

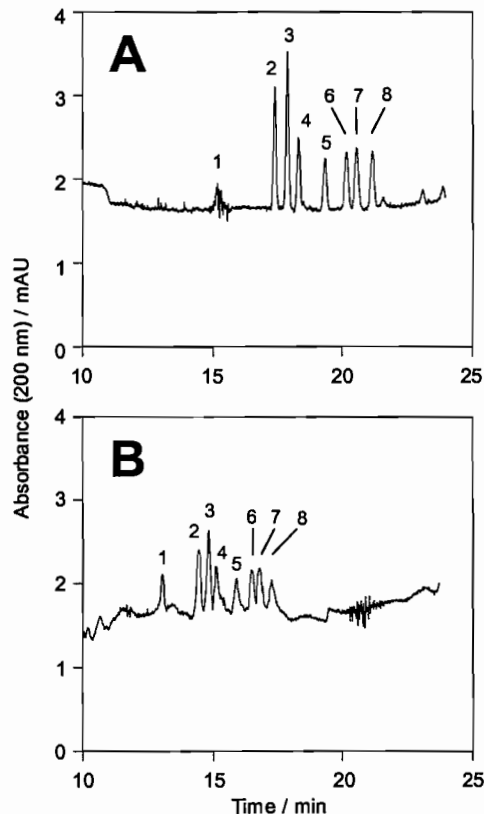


Fig. 1. Sweeping via dynamic complexation with CDTA. Conditions: BGS, 40 mM borate / 1 mM CDTA / 2.5 % ethylene glycol (pH 10.0); capillary, 50  $\mu$ m i.d.  $\times$  55 cm (effective, 46.5 cm); applied voltage, 14 kV; sample, 0.05-0.4 ppm in acetate (A), NaCl (B); sample injection, 50 mbar  $\times$  100 s; peaks, (1) Fe<sup>3+</sup>, (2) Ca<sup>2+</sup>, (3) Mg<sup>2+</sup>, (4) Cd<sup>2+</sup>, (5) Co<sup>2+</sup>, (6) Ni<sup>2+</sup>, (7) Zn<sup>2+</sup>, (8) Cu<sup>2+</sup>.

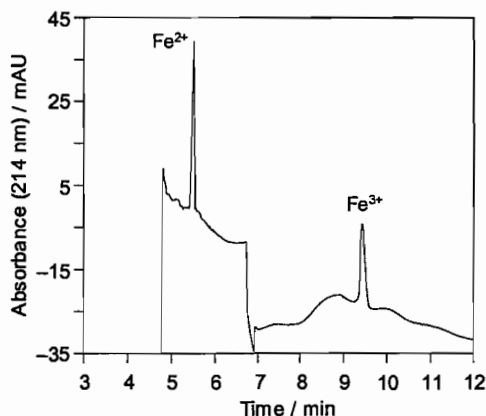


Fig. 2. Analysis of Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> by sweeping via dynamic complexation with 2,6-PDCA. Conditions: BGS, 12.5 mM 2,6-PDCA / 0.25 mM TTAB / 1% acetonitrile (pH 4.0); capillary, 50  $\mu$ m i.d.  $\times$  55 cm (effective, 46.5 cm); applied voltage, -20 kV; sample, Fe<sup>2+</sup> (1 ppm), Fe<sup>3+</sup> (0.5 ppm); sample injection, 50 mbar  $\times$  150 s.

SCE '04  
L-23

## キャピラリー電気泳動-質量分析法による ヒ素化合物の分析

○塩見 和孝<sup>1</sup>, 北川 文彦<sup>1</sup>, 向畑 和夫<sup>2</sup>, 荒井 昭博<sup>2</sup>,  
大塚 浩二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京大院工, <sup>2</sup>(株)島津製作所

### Analysis of Arsenic Compounds by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry

Kazutaka Shiom<sup>1</sup>, Fumihiko Kitagawa<sup>1</sup>, Kazuo Mukai<sup>2</sup>, Akihiro Arai<sup>2</sup>,  
Koji Otsuka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Kyoto University, <sup>2</sup>Shimadzu Corporation

Elemental speciation of arsenic has received considerable attention due to its high toxicity. The coupling of high performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry has been applied for the speciation of arsenic compounds. However, the signal identification by the retention time matching at  $m/z$  75 ( $As^+$ ) is difficult because of the coelution of several arsenic species, e.g., As(III) and monomethylarsonic acid. In this study, capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) was applied to the analysis of less toxic organic arsenic and highly toxic inorganic arsenic compounds. Eight arsenic species were successfully detected in single run by changing the polarity of the ESI probe from positive to negative during the MS analysis.

**Key word:** capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry, arsenic compounds

#### 【はじめに】

キャピラリー電気泳動 (CE) は、高い分離能を有することと、分析に必要なサンプル量が微量であることから、様々な分野における分析への応用が広がっている。その中でも水溶性物質に対する高い分離能力から、水溶性の農薬、薬物、毒物等の分析への応用に対して期待されている。しかしながら、市販のCE装置の検出器としては、UV検出器や蛍光検出器が一般的に用いられ、これらの検出器はその検出感度と定性能力が必ずしも十分ではない。そこで質量分析装置 (MS) をCEの検出器として使用することにより、より一層高い定性能力と検出感度とが実現できるものと期待される。本研究では、CE-MS法を用いて、人体に有害な無機ヒ素及びその代謝物である有機ヒ素化合物に加え、無害な有機ヒ素化合物も同時に分析できる条件を確立することを目的として実験を行った。CEの分離条件に関してはUV検出、MS検出におけるピークの同定にはエレクトロスプレーイオン化-MS/MS (ESI-MS/MS) 検出、CE-MS検出の最適化についてはESI-MS検出による検討を行った。

#### 【実験】

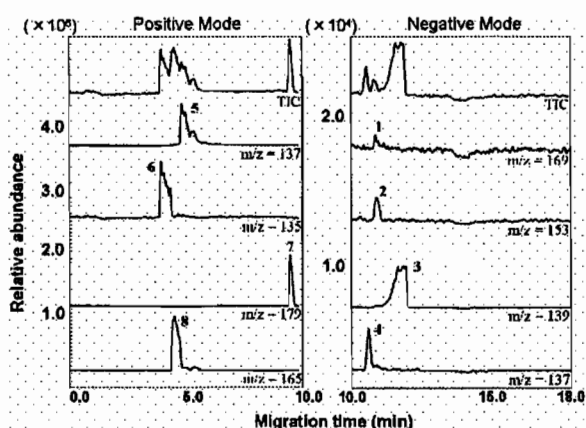
実験には1 ヒ酸 ( $As(V)$ ), 2 亜ヒ酸 ( $As(III)$ ), 3 モノメチルアルシン酸 (MMAA), 4 ジメチルアルシン酸 (DMAA), 5 トリメチルアルシンオキシド (TMAO), 6 テトラメチル

As  
塩見  
とくお  
向畑  
とくお

アルソニウム (TMA), 7 アルセノベタイン (AB) および8 アルセノコリン (AC) を試料として用いた。UV検出 (CE-UV) およびESI-MS/MS検出 (CE-ESI-MS/MS) の実験においてはAgilent Technologies製3D CEシステムを, ESI-MS検出 (CE-ESI-MS) の実験においては自作のCEシステムを使用して試料の分離を行った。分離においては内径50  $\mu\text{m}$ , 有効長42~51.5 cmのフューズドシリカキャピラリー素管を用い, 印加電圧を25~30 kVとした。CE-UVにおける泳動液は, 陽イオン性の試料に対しては0.5 mMデシルトリメチルアンモニウムヒドロキシドを含む20 mMジピコリン酸水溶液 (pH 12.1) を, 陰イオン性の試料に対しては2.5 mM 3,4-ジアミノ安息香酸を含む50 mM ギ酸水溶液 (pH 2.95) を用い, ~270 nmにおける間接吸光法により検出を行った。CE-ESI-MSおよびCE-ESI-MS/MSの検出においては, 島津製作所製LCMS-2010A及びサーモフィニガン製LCQ (イオントラップ型質量分析装置) を用い, 泳動液には5~50 mMギ酸水溶液 (pH 2.9~3.2) を, シース液には1%酢酸を含む50%メタノール水溶液を用いた。

### 【結果と考察】

はじめにCE-UV測定により8種類の無機ヒ素及び有機ヒ素化合物を一斉分析可能な条件を検討した。その結果, 陰イオン分析条件では4種類の陰イオン性試料 (1~4) の分離・検出ができたが, 残りの4種類の陽イオンは検出されなかった。また, 陽イオン分析条件では6種類の試料 (3~8) の分離・検出が可能であったが, 無機ヒ素 (1, 2) のピークは検出されなかった。CE-ESI-MS/MS装置を用いて8成分のinfusion分析を行い, MS及びMS/MSスペクトルを確認した後, 陽イオン分析条件でCE-MS測定を行ったところ, 陽イオン性の4成分 (5~8) は良好に分離したが, 陰イオン性の4成分 (1~4) は分離せず, 1本のピークとして検出された (Fig. 1)。次にCE-ESI-MS装置を用いて分析条件の最適化を行った後, 8種類の無機ヒ素及び有機ヒ素化合物を一斉分析可能な条件を検討したところ, 5~8の陽イオン性試料の泳動が終わる10.2分でESIプローブに印加する電圧極性をpositiveからnegativeに反転させることにより, 8種類の試料を一度の分析で検出することができた。



ヒ素  
↓  
有機ヒ素が  
多く含まれる

**Fig. 1** A CE-ESI-MS analysis of eight arsenic species. Separation length, 55 cm; separation buffer, 50 mM formic acid (pH 2.95); ESI voltage, 5.0 kV for the positive and -3.5 kV for the negative mode; sample concentration, 250 ppm.

### 【謝辞】

本研究を行うにあたり, CE-ESI-MS (MS) 測定についてご協力いただいた, 兵庫県立大学物質理学研究科寺部茂教授, 久本秀明助教授並びに大学院生のMaria Rowena N. Montonさんに深謝いたします。

### 【文献】

尾崎祐人, 大塚浩二, 寺部茂; キャピラリー電気泳動/質量分析, ぶんせき, 2, 161-170 (1999).

# SCE '04 インターフェースチップの利用による熱レンズ顕微鏡検出の キャピラリー電気泳動への適用とその基礎的性能の評価 (3)

L-24 ○津禰鹿 毅<sup>1</sup>, 末吉 健志<sup>1</sup>, 内山 堅慈<sup>2</sup>, 服部 明彦<sup>2</sup>, 北川 文彦<sup>1</sup>,  
大塚 浩二<sup>1</sup>

京大院工<sup>1</sup>, 日本板硝子<sup>2</sup>

## Fundamental Studies on Thermal Lens Microscopic Detection in Capillary Electrophoresis Using an Interface Chip. 3

Takashi TSUNEKA<sup>1\*</sup>, Kenji SUEYOSI<sup>1</sup>, Kenji UCHIYAMA<sup>2</sup>, Akihiko HATTORI<sup>2</sup>, Fumihiko KITAGAWA<sup>1</sup>,  
Koji OTSUKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Material Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University

<sup>2</sup>Nippon Sheet Glass CO.,LTD.

A new methodology for detection in capillary electrophoresis (CE) by using thermal lens microscopy (TLM) is described. A simple way to combine CE with TLM (CE-TLM) is the on-capillary method. However, in such a case optical configurations of TLM become complicated because the capillary has a curved surface. The curved surface reduced the sensitivity and the reproducibility. To overcome this problem, an interface chip (IFChip) which has flat surfaces was connected to the capillary for the CE separation. In this study, a CE-TLM employing an IFChip system was investigated to make a highly sensitive detection scheme possible for the separation of nonfluorescent and neutral samples by micellar electrokinetic chromatography and its fundamental characteristics will be discussed.

### 【はじめに】

キャピラリー電気泳動 (CE) の検出法において、レーザー光を利用した高感度検出法、すなわちレーザー励起蛍光 (LIF) 検出や熱レンズ顕微鏡 (TLM) 検出などの適用が期待されている。TLM は光熱変換現象を利用した検出法であり、非蛍光性試料を高感度に検出することができるため、蛍光誘導体化を必要としないという特徴を有している。しかしながら、この検出法をそのまま CE へ適用することは、キャピラリーの曲面におけるレーザー光の散乱・屈折による検出感度および再現性の低下を招く可能性がある。その解決法として、流路断面が半円形であるインターフェースチップ (IFChip) を TLM 検出部に利用し、励起レーザー光の導入面を平面にすることにより、TLM の高感度検出を可能にする手法が開発されている。本研究においては、ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) に IFChip を利用した MEKC-TLM による中性試料の分離検出についての検討を行い、その性能の基礎的評価を行った。

### 【実験方法】

今回用いた IFChip はパイレックスガラス製で、フォトリソグラフィとウェットエッチングにより作製した。幅 100  $\mu\text{m}$ 、深さ 30  $\mu\text{m}$  の断面が半円形の流路を有しており、フューズドシリカキャピラリー (50  $\mu\text{m}$  I.D., 365  $\mu\text{m}$  O.D.) との接続口をチップ端面に設けたものである (Fig. 1)。チップ部分を含めたキャピラリーの全長を 45 cm、有効長を 30 cm とした。また比較のため、同一の全長と有効長を持つキャピラリーを作製し、MEKC-TLM 分析用に用いた。MEKC 分析においては、泳動液に SDS を含むリン

酸塩緩衝液 (pH 7.0) を、試料として Sudan I と Sudan R を用いた。検出には、励起波長 488 nm、プローブ光波長 670 nm の TLM (ITLM-11, マイクロ化学技研) を用いた。

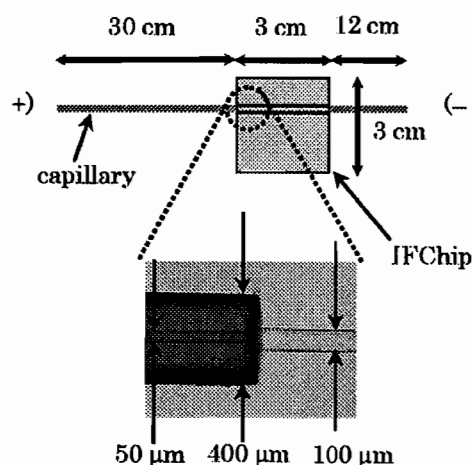
### 【結果および考察】

Sudan I, Sudan R 混合試料の MEKC-TLM 分析を行ったところ、比較的良好な感度でピークが検出され、ベースライン分離を達成した (Fig. 2)。オンキャピラリー検出と IFChip 検出との比較をしたところ、検出時間の再現性 (相対標準偏差 RSD) においては、IFChip の 5.7% に比べ、オンキャピラリーによる検出の方が 0.31% と良好であった (Table 1)。これは、キャピラリーの外径が 365  $\mu\text{m}$  であるのに対して IFChip のキャピラリー接続部の直径が  $\sim 400$   $\mu\text{m}$  であることから、接続部においてデッドボリュームが発生していることに起因するものと考えられる。一方、熱レンズ信号強度の再現性について比較したところ、オンキャピラリーによる検出が 14.4% RSD であるのに対し、IFChip では 6.7% RSD となり IFChip 検出の方で高い再現性が達成されていることがわかった。これは、検出部位を半円形にしたことにより、レーザー光の散乱・屈折が低減したためであると考えられる。また、IFChip 検出ではオンキャピラリー検出に比べ、理論段数の低下が確認された。この原因を明らかにするために、泳動液に蛍光ビーズを添加し、蛍光画像による測定を行ったところ、キャピラリーと IFChip との接続部において流れの乱れが確認された。これは、分離用キャピラリーの材質がフューズドシリカであるのに対し、IFChip の材質がパイレックスガラスであるため、キャピラリーと IFChip との境界面において電気浸透流速の差が生じていることに起因するものと考えられ、この流れの乱れが理論段数に影響を及ぼしたものと考えられる。

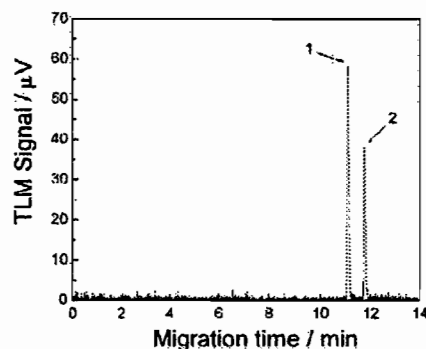
石英製 IFChip を用いた MEKC-TLM 分析結果についても報告する予定である。

**Table 1** RSD (n = 5 within 3 days) and theoretical plate in the MEKC-TLM analyses of Sudan I

	RSD (%)		Theoretical plate
	migration time	TLM signal	
IFChip	5.7	6.7	55000
On-capillary	0.31	14.4	110000



**Fig. 1** Schematic of an IFChip for CE-TLM.



**Fig. 2** Electropherogram of sudan derivatives in MEKC-TLM analysis by using the IFChip. 1: 10 ppm Sudan I, 2: 5 ppm Sudan R.

### **Abstract**

A method based on field-enhanced sample injection (FESI) for negative ions to effect discriminate introduction of phosphopeptides over nonphosphopeptides in a mixture is described. Phosphopeptides are more acidic than their nonphosphorylated counterparts; hence, by exploiting charge discrimination, they can be more efficiently introduced into the capillary when negative voltage is applied for injection. More than three orders of magnitude improvement in detector response was achieved, with the phosphopeptides focused better. The method was applied to tryptic digests of bovine casein, permitting their direct analyses at the nM levels.

### **1. Introduction**

There is special interest in phosphopeptides because phosphorylation is one of the most important post-translational modifications in proteins. However, phosphopeptide analysis is not straightforward because the phosphorylated species are often present in much lower quantities than the nonphosphorylated ones. Hence, methods for their selective enrichment are generally preferred. Using capillary electrophoresis (CE) – mass spectrometry (MS) for their analysis, an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) column<sup>1</sup> or a solid-phase extraction (SPE) device<sup>2</sup> for improving sensitivity were employed preceding electrophoretic separation of the components.

The use of on-line preconcentration techniques in CE as a means of compensating for poor detection limits is rather popular. These permit injections of larger-than-usual volumes of sample into the capillary without compromising resolution and efficiency. One of the most commonly used is FESI<sup>3</sup>, in which the sample is prepared in a low conductivity solution and electrokinetically injected into a capillary filled with a high conductivity background solution (BGS). A high electric field is established at the injection point and permits introduction of large amounts of ions, which subsequently slow down and focus into narrow bands upon reaching the BGS region. As the amount of ions injected is a function of both the analyte's concentration and mobility, there exists a bias against low abundance components and less mobile species. In a mixture with a wide dynamic concentration range, a logical way to offset the concentration bias against the minor components is to set-up the analytical conditions to favor their injection because of their charges.

To enable direct analysis of phosphopeptides using CE, we developed a technique based on FESI. To cut down on the analysis time, we used a Successive Multiple Ionic Polymer Layer (SMIL)<sup>4</sup>-coated capillary in which a high electroosmotic flow (EOF) was present independent of pH. The analytes were injected by applying negative voltage in the inlet, and separated in a moderately acidic BGS, whereby the phosphopeptides were anionic while the nonphosphopeptides were cationic. Application to identifying phosphopeptides in tryptic digests is shown.

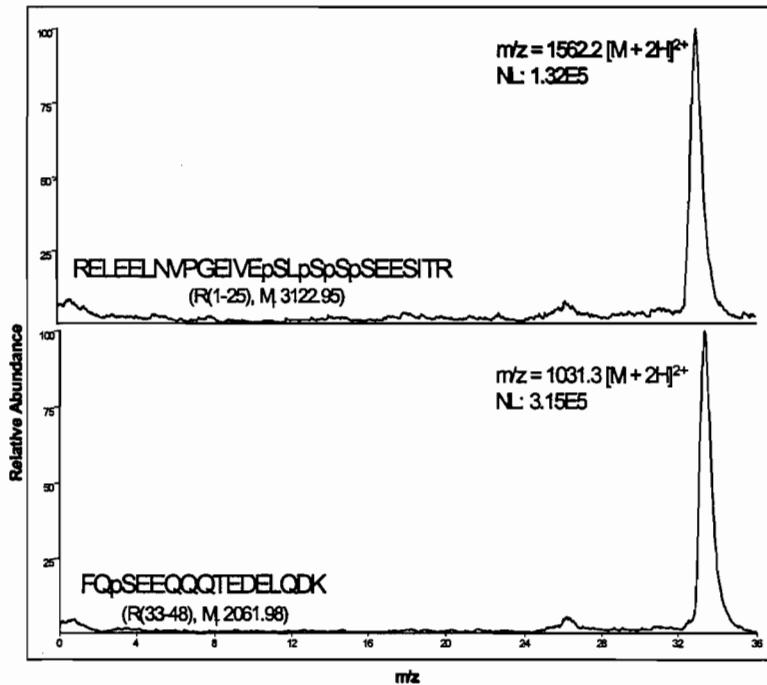


## 2. Experimental

CE experiments were conducted using a Hewlett-Packard <sup>3D</sup>CE System (Waldbronn, Germany), equipped with silica capillaries from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ), uncoated or SMIL-coated in-house. It was coupled to an LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA) using the standard ESI interface. The sheath gas, delivered at the rate of 3 mL/min, was composed of 50% methanol, 49% water, 1% acetic acid). Mass spectra were recorded using positive ion polarity.

## 3. Results and Discussion

For system evaluation, a mixture of some standard peptides and their phosphorylated analogues was used. Results using water as sample matrix show that as much as three orders of magnitude improvement in response for the phosphopeptides were obtained, while the nonphosphopeptides were hardly focused or not at all.



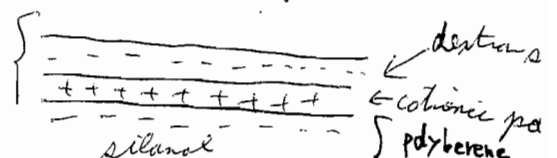
Conditions: capillary, SMIL-coated, 50  $\mu$ m i.d., 60 cm effective length; BGS, 75 mM ammonium acetate, pH 5.5; injection: water at 50 mbar for 60s, sample at -10 kV for 450s; applied voltage, 21 kV; concentration, 2 ppm. Other conditions are the same as given in the Experimental.

The technique was applied to the analysis of tryptic digests of alpha and beta-casein (Figure 1). In direct infusion experiments using a high concentration of these mixtures, the signals for the phosphopeptides were hardly detected because they were obscured by those due to the high abundance components. But with our preconcentration technique, their discriminate injection was effected, hence, they could be detected even at nM levels (based on the intact protein) of the digests. Localization of the site of phosphorylation was performed via tandem MS.

## 4. References

1. P. Cao, J.T. Stults, *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 225.
2. D. Figeys, G.L. Corthals, B. Gallis, D.R. Goodlett, A. Ducret, M.A. Corson, R. Aebersold, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2279.
3. R.-L. Chien, D.S. Burgi, *J. Chromatogr.* 1991, 559, 153.
4. H. Katayama, Y. Ishihama, N. Asakawa, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 225.

double layer ionic polymer coating



# SCE '04 L-26

## 生体成分の高性能分析を目指した マイクロチップ電気泳動-質量分析法の開発 (2)

○亀田 卓嗣<sup>1</sup>、北川 文彦<sup>1</sup>、荒井 昭博<sup>2</sup>、鈴木 功一<sup>2</sup>、  
中村 伸<sup>2</sup>、大塚 浩二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京大院工、<sup>2</sup>島津製作所

### Development of Microchip Electrophoresis-Mass Spectrometry for High Performance Separation of Biogenic Compounds. 2

Takahide KAMEDA<sup>1</sup>, Fumihiko KITAGAWA<sup>1</sup>, Akihiro ARAI<sup>2</sup>, Koichi SUZUKI<sup>2</sup>,  
Shin NAKAMURA<sup>2</sup>, and Koji OTSUKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Kyoto University, <sup>2</sup>Shimadzu Corporation

Mass spectrometry (MS), which has the advantages of no needs for the derivatization of analytes and the structural information capability, is one of useful techniques for analyzing biogenic compounds. On the other hand, microchip electrophoresis (MCE) is capable of rapid separation and small amount of sample required. We have explored an MCE-MS system using an electrospray ionization (ESI) interface. In this MCE-MS system, a spray nozzle attached to the exit of the separation channel of a quartz microchip was employed to build the ESI interface. Some basic drugs were separated within 1 min by using an uncoated quartz microchip. In this study, the MCE-ESI-MS analysis of basic drugs were investigated with a SMIL coating microchip. Pindolol and sulphuride were successfully separated and detected within 1 min with the plate height of  $\sim 2.1 \times 10^{-5}$  m for pindolol. Analysis of biogenic compounds such as proteins in MCE-ESI-MS and optimization of the analytical conditions will also be discussed.

Key Word: microchip electrophoresis / mass spectrometry / ESI interface / basic drugs / proteins.

#### 1. 緒言

分離・検出等の一連の操作を集積化したマイクロチップ上で行う微小統合化学分析システム ( $\mu$ -TAS) の研究の一環として、超高速・高性能分析が可能なマイクロチップ電気泳動 (MCE) にエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) を組み合わせた MCE-ESI-MS の開発と同法の基礎的な性能についての検討がなされてきた<sup>1,2</sup>。われわれは、誘導体化が不要で試料の構造情報が得られる MS 検出の利点をふまえ、タンパク質などの生体関連物質の分析を中心に、MCE-ESI-MS による高速分離・高性能検出の実現を目指した研究を進めている。タンパク質の MCE 分析においては、流路内壁への試料の吸着が問題となることが予想される。本研究では、流路内壁に successive multiple ionic-polymer layer (SMIL) コーティング処理を施すことにより、タンパク質の吸着を軽減できる点に着目し<sup>3</sup>、SMIL コーティングを施したマイクロチップによる MCE-ESI-MS 分析について検討を行ってきた。本報告では、安定したイオン化が得られる分析条件の最適化を行い、再現性等の基礎的分析性能について検討を行った結果について述べる。

## 2. 実験

イオン化はノズル (外径 360  $\mu\text{m}$ 、内径 20  $\mu\text{m}$ 、先端部内径 10  $\mu\text{m}$ 、長さ 25 mm の先細フューズドシリカキャピラリー) の先端部からスプレーを発生させる ESI 法を採用し、液絡を通じて 3.0 kV の電圧を印加した。石英製マイクロチップ (幅 50  $\mu\text{m}$ 、深さ 20  $\mu\text{m}$ 、分離流路長 58.9 mm) の分離チャンネル outlet 側のスプレーノズル接続部は、デッドボリュームが最小になるように端面を平らに加工した。SMIL コーティングチップは、NaOH 水溶液で活性化した流路に 5% polybrene を 15 分間注入しカチオン性ポリマー層を修飾した後、アニオン性ポリマーである 3% dextran sulfate を 15 分間注入することで、最外層に負電荷を有する安定したポリマー層を固定化することで作製した。MS 装置には四重極型質量分析計 LCMS-2010 A (島津) を用いた。試料はゲート導入法により注入し、分離時の印加電圧は 400 V/cm とした。泳動緩衝液には炭酸塩 (pH 8.7)、酢酸塩 (pH 5.7)、ギ酸塩 (pH 2.8) 溶液を用い、必要に応じて 10~50% (v/v) アセトニトリルを添加した。

## 3. 結果・考察

未コーティングマイクロチップを用いた医薬品成分 (pindolol 及び sulpiride) の MCE-ESI-MS 分析においては、試料導入時間を 0.1 秒に短縮し、アセトニトリルの含有量を 50% (v/v) にすることにより、1 分以内に良好な分離が達成された<sup>4</sup>。そこで本研究では、酸性条件下においても速い電気浸透流 (EOF) を得ることができる SMIL コーティング処理を施したマイクロチップを用いた分析について検討を行った。はじめにチオ尿素を用いて EOF 速度の測定を行った。ギ酸塩緩衝液 (pH 4.0) を泳動液に用いた条件では、未コーティングマイクロチップにおける電気浸透移動度 ( $\mu_{\text{eo}}$ ) は、 $2.6 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{S}$  であったのに対し、SMIL コーティングマイクロチップにおける  $\mu_{\text{eo}}$  は  $4.4 \times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{S}$  となり、弱酸性条件下でも速い EOF が生じていることから、SMIL コーティングがチャンネル内面に施されていることが確認された。したがって、酸性条件下においても電気的注入法による試料導入が可能となり、塩基性タンパク質等の高速分析にも利用できるようになった。さらに、SMIL コーティングチップを用いて医薬品成分の分析を行ったところ、1 分以内に両成分を検出した (Fig. 1)。このときの pindolol の理論段高さは、 $\sim 2.1 \times 10^{-5} \text{ m}$  であった。SMIL コーティング条件及び ESI 条件についてさらなる検討を行い、ペプチドやタンパク質等の生体関連物質の分析結果についても報告する予定である。

## 4. 参考文献

- 1) Tachibana, Y. et al.; *J. Chromatogr. A* 2003, 1011, 181.
- 2) Tachibana, Y. et al.; *J. Chromatogr. A* 2004, 1025, 287.
- 3) Katayama, H. et al.; *Anal. Chem.* 1998, 70, 2254.
- 4) 亀田他, 第 10 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会講演要旨集, PC25 (2004).

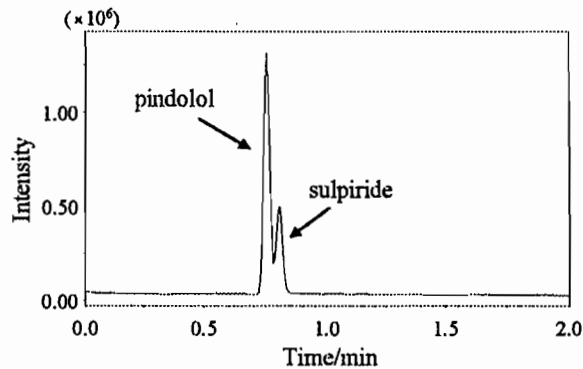
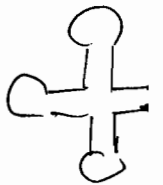


Fig. 1. Separation of pindolol and sulpiride. Sample concentration, pindolol 300 ppm, sulpiride 100 ppm; microchip, SMIL coating chip; running buffer, 50 mM ammonium carbonate–ammonium hydrogencarbonate buffer (pH 8.7) containing 30% (v/v) acetonitrile.



試料導入

4.86  
+ 5.70  
+ 5.86

試料導入

4.86  
+ 5.70  
+ 5.86

4.86  
+ 5.70  
+ 5.86



**一般講演**  
**(ポスター発表)**

マイクロ向流抽出の基礎検討

○青田 新<sup>1</sup>、火原 彰秀<sup>1,2,3</sup>、北森 武彦<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> 東大院工・<sup>2</sup> KAST・<sup>3</sup> JST

Fundamental Study of a Micro Counter-Current Extraction

\*Arata Aota<sup>1</sup>, Akihide Hibara<sup>1,2,3</sup> and Takehiko Kitamori<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Applied Chemistry, School of Engineering, The University of Tokyo

<sup>2</sup> Micro Chemistry group, Kanagawa Academy of Science and Technology

<sup>3</sup> Japan Science and Technology Agency

Abstract

We successfully demonstrated a micro counter-current extraction with high recovery efficiency. A two-phase micro counter-current flow can be realized by patterning hydrophilic and hydrophobic characteristics of microchannel walls. We applied the two-phase micro counter-current flow to the micro counter-current extraction. Co-2-nitroso-5-dimethylaminophenol complex in toluene (10 μM) was extracted by water. We studied a number of theoretical plates as a flow rate of the two phases was varied. We realized a maximum percent extraction of 97.7 %, namely the number of theoretical plate was 4. This system is expected to be applicable to heavy metal recovery and biomolecule separation.

【はじめに】

我々はマイクロ空間内における分子拡散距離が短い、比界面積が大きい等の特性を活かして、一枚のマイクロチップ上で複数の化学プロセスを連続多相流下で可能にする高効率抽出システムを実現した[1]。さらに高効率な抽出システムを実現するために、高回収率溶媒抽出法である向流抽出法に着目した。マイクロ空間では重力より界面張力が支配的となるため、マイクロチャンネル壁面を親水/疎水部分にパターニングすることによりマイクロ二相向流を実現できる[2]。また、マイクロ二相向流を利用することで、理論段数が1段である従来の順流抽出に対し、多段的な向流抽出を実現した(図1)[2]。また、マイクロ二相向流は渦流形成など、層流とは異なる流れを形成するため、拡散のみでなく混合が促進する効果も期待できる。

そこで本研究では、マイクロ二相向流を利用したマイクロ向流抽出における流量と抽出効率・段効率の関係について検討することを目的とした。

【実験】

パイレックスガラス基板にフォトリソグラフィとウェットエッチング法によりマイクロチャンネルを作製した。有機相の流れるチャンネル壁面をオクタデシルシラン(ODS)修飾により疎水

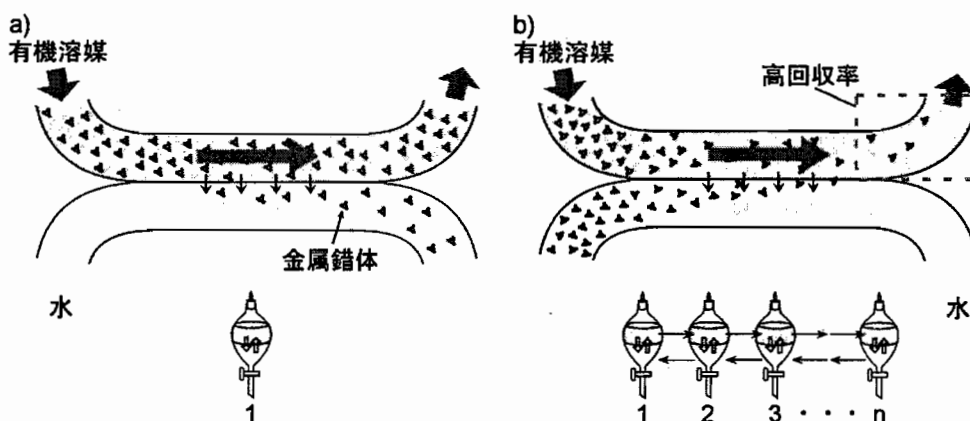


図1 マイクロ溶媒抽出の概念図 a) マイクロ順流抽出 b) マイクロ向流抽出

性にし、水相の流れるチャンネル壁面をガラスの持つ親水性を保持することでマイクロチャンネルの壁面を親水/疎水部分にパターニングしたマイクロチップを作製した(図2)。マイクロチャンネルは幅300 $\mu\text{m}$ 、深さ100 $\mu\text{m}$ 、合流部は20mmである。10 $\mu\text{M}$  Co-2-nitroso-5-dimethylaminophenol (Co-DMAP) 錯体トルエン溶液を水で抽出した。分配比(油相中濃度/水相中濃度)は0.65である。流量は水相と有機相を等流量とし、流量0.10~1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ の条件におけるマイクロ向流抽出を試みた。Co-DMAP 錯体は熱レンズ顕微鏡(TLM) [3]により検出した。

### 【結果と考察】

作製したチップを用いてマイクロ二相向流を形成し、マイクロ向流抽出を試みた。図3に流量とTLM信号強度の関係を示す。ブランクは純溶媒でのTLM信号強度を示している。TLM信号強度は溶媒依存性が大きいため、油水のTLM信号強度は大きく異なる値がでていいる。油相中の熱レンズ信号強度は抽出前と比べ小さくなっており、流量0.15 $\mu\text{l}/\text{min}$ で最小となっている。このとき抽出効率が最大となり、抽出百分率は97.7%である。流量0.15 $\mu\text{l}/\text{min}$ で抽出効率が最大となる原因は、TLM信号強度の流速依存性か、あるいは流れが層流でなくなり混合が促進したためと考えられる。実際にマイクロ二相向流の流れを可視化した結果、層流でない流れを観測した[4]。

抽出前後の油相中のTLM信号強度変化から理論段数を計算した結果を図4に示す。理論段数は最大で4段を実現した。高回収率マイクロ向流抽出は重金属の回収や生体分子の分離への適用が期待でき、マイクロ化学プロセスとして非常に効果的である。

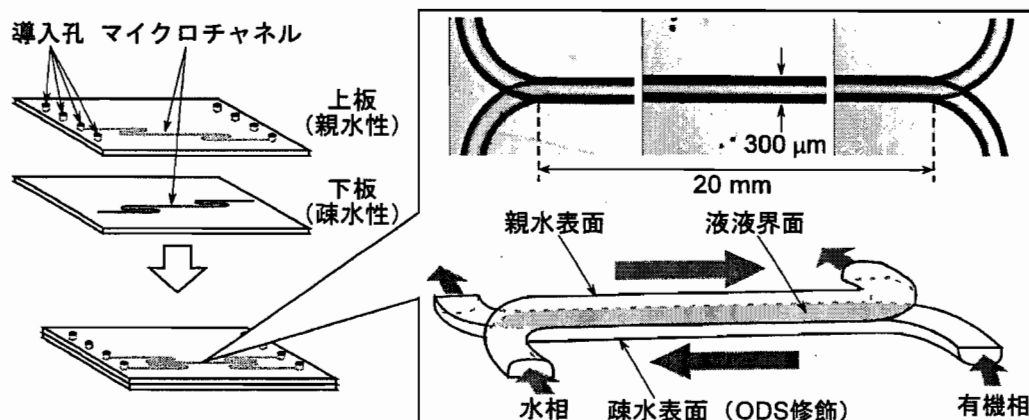


図2 親水/疎水パターニングマイクロチップ

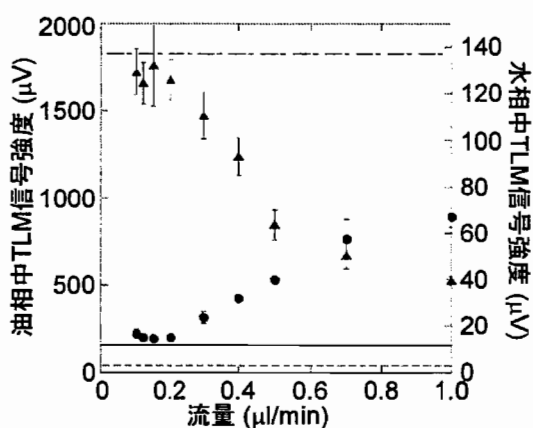


図3 流量と熱レンズ信号強度の関係

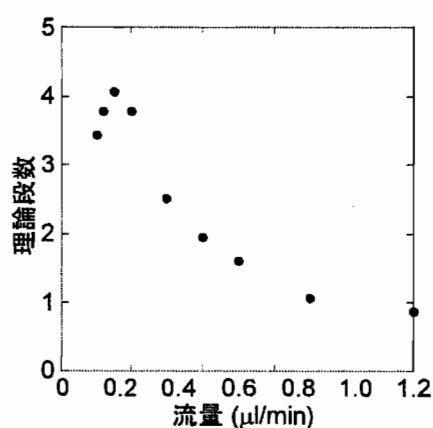


図4 流量と理論段数の関係

### 【参考文献】

- [1] M. Tokeshi, et al., *Anal. Chem.*, 74, 1565-1571 (2002).
- [2] A. Aota, et al., *Proceeding of micro total analysis systems 2003*, 441-444 (2003).
- [3] T. Kitamori, et al., *Anal. Chem.*, 74, 52A-60A (2004).
- [4] A. Aota, et al., 第9回化学とマイクロ・ナノシステム研究会講演要旨集, 92 (2004)

# SCE '04 P - 2

循環型マイクロチャネルを用いた液液濃縮抽出

○菊谷 善国<sup>1</sup>、岩山 忍<sup>2</sup>、青田 新<sup>2</sup>、火原 彰秀<sup>1,2</sup>、  
渡慶次 学<sup>1</sup>、北森 武彦<sup>1,2</sup>

1 神奈川科学技術アカデミー、2 東大院工

## Liquid-Liquid Extraction Using A Circulation Microchannel

○Yoshikuni Kikutani<sup>1</sup>, Shinobu Iwayama<sup>2</sup>, Arata Aota<sup>2</sup>, Akihide Hibara<sup>1,2</sup>,  
Manabu Tokeshi<sup>1</sup>, Takehiko Kitamori<sup>1,2</sup>

1 Kanagawa Academy of Science and Technology,

2 Graduate School of Engineering, the University of Tokyo

A microchannel structure comprised of a shallow small circular channel and a deeper channel tangent to the circular channel was fabricated by using two-step photolithography. Wall of the shallow microchannel was selectively made hydrophobic by introducing ODS reagent using capillary action.

Repulsive force of the hydrophobic surface against water enabled formation of a stable liquid-liquid interface between toluene in the circular channel and aqueous solution flowing in the deeper channel. Micro liquid-liquid concentration extraction to nano-litter organic solvent became possible with this microchannel structure. Aqueous solution of methyl red was used as a model sample, and the concentration extraction process was monitored by a thermal lens microscope.

It was also possible to selectively make the deeper channel hydrophobic. For this reversed mode of surface modification, solution with relatively high melting point was introduced to the circular channel and frozen to act as a masking material for ODS reagent.

Water containing fluorescent micro beads was introduced to the hydrophilic circular channel and toluene was flowed in the ODS-modified deeper channel. Motion of the beads in the circular channel was observed, and it was suggested that dragging force at the liquid-liquid interface had some stirring effect.

【はじめに】

極微量でも生体に徐々に蓄積されて悪影響を及ぼす有機物質は、環境分析における最も重要な対象の一つである。このような対象の分析には、希薄な試料溶液の濃縮抽出が有効である。

一方、近年マイクロ化学チップを用いた分析手法が注目を集めている。試薬量・廃液量の低減や、高速分析、小型システムを実現する上で大きな可能性を持ち、また実際に幾つかの分野で顕著な実績が成されてきている手法であるが、基本的にフロー下の操作が主であり、溶液を止めて行なう液々濃縮抽出は、十分に研究されているとは言えない。抽出相を一定箇所に留めながら、サンプル溶液を連続的にそれに接触させていくことは、微細流路を送液する際にかかる圧力に抗して抽出相を安定に保持する何らかの工夫が必要となる。

本研究では、部分的に疎水化処理した循環型マイクロチャネル構造を利用し、マイクロチップ内でのナノリットルスケールの濃縮抽出を試みた。



【実験】

2段階のフォトリソグラフィによって浅い円形のチャンネル（深さ 12 $\mu\text{m}$ ）と、それに接するより深いチャンネル（最深部 56 $\mu\text{m}$ ）を加工した（図1）。浅い円形部の内径が 270、浅いチャンネルと深いチャンネルが接する円が 460、深いチャンネルの外径が 740 $\mu\text{m}$  である。

浅い円形のチャンネルには溶液導入用チャンネルが設けられており、オクタデシルトリメトキシシラン（ODS）のトルエン溶液を、キャピラリー作用によって導入し、浅いチャンネル部分の壁面のみを選択的に疎水化した。また、これとは逆に、DMSO（m.p. 18 $^{\circ}\text{C}$ ）を浅いチャンネルに導入後凍結させ、深いチャンネルの器壁を ODS 化することも行なった。

メチルレッド水溶液のトルエンへの抽出をモデル系として、抽出システムの評価を行なった。疎水化した浅い循環型チャンネル部分をトルエン溶液で満たし、メチルレッド水溶液を外部のポンプから一定流速で深いチャンネルに流し、接触させた。微小領域の吸光を高感度に測定可能な熱レンズ顕微鏡（TLM）を用い、浅い円形チャンネルの下流付近の濃度変化をモニタリングした。

また、親水的な浅い循環チャンネル部に蛍光ビーズを含む水溶液を満たし、疎水化した深いチャンネルにトルエンを送液して、蛍光顕微鏡でビーズの動きを観察した。

【結果と考察】

疎水化した円形チャンネルをトルエンで満たし、油水界面を崩さずに、外接するチャンネルに流量約 20 $\mu\text{L}/\text{分}$ まで水を流すことができた。

外接するチャンネルに、3 $\mu\text{M}$ のメチルレッド水溶液と純水を切り替えながら流速 2 $\mu\text{L}/\text{分}$ で送液した時の、トルエン中のメチルレッド濃度の経時変化を図2に示す。水から色素水溶液への切り替え後約 20分、色素水溶液から水への切り替え後約 10分で有機相中のメチルレッド濃度は水相と平衡に達するようになる。濃度変化は滑らかな推移をせず、拡散のみではなく、円形チャンネル内の不規則な流れによる攪拌効果の存在が示唆される。濃縮率はこの系では約 10倍となる。

有機相中の流れを蛍光ビーズにより可視化することは、蛍光色素が有機溶媒に溶け出してしまうなどして困難だったため、円形チャンネル部分が親水性となるよう表面処理したチャンネルについて、外接する深いチャンネルにトルエンを流速 20 $\mu\text{L}/\text{分}$ で送液し観察したところ、界面の極近傍に特に速い油相の流れに沿った流れが存在し、界面から離れた部分では小さく循環する流れが不規則にできることが、水相中に分散したビーズの動きとして確認された。これは油水界面での引きずり応力を用いた溶液駆動が可能であることを示している。

この新規な攪拌効果は、今後高効率な濃縮抽出やその他のマイクロ化学操作へ応用されるものと期待される。

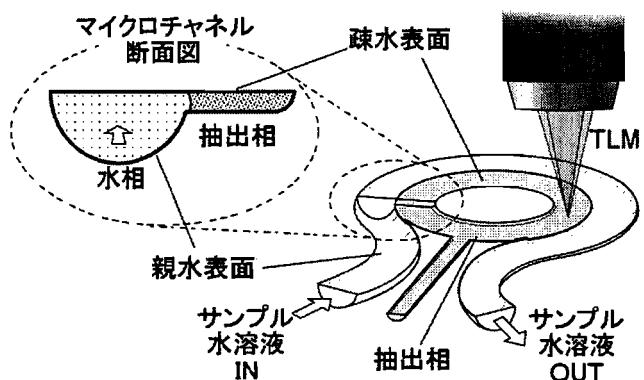


図1 循環型マイクロチャンネル構造とそれを用いた濃縮抽出

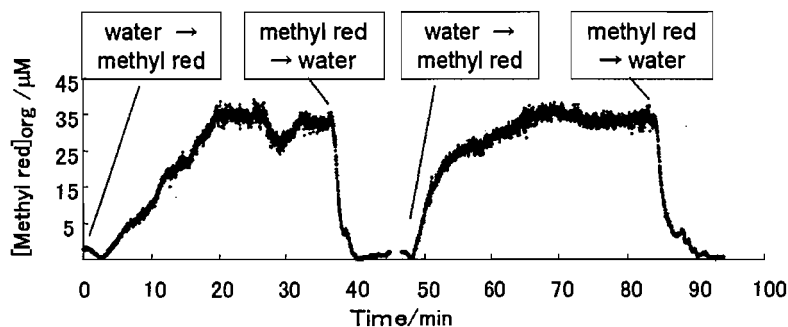


図2 円形マイクロチャンネル構造を利用した水溶液からトルエンへのメチルレッドの抽出：トルエン溶液中のメチルレッド濃度の時間変化

# SCE '04 P - 3

## 毛管現象を利用したマイクロチャネルの部分的化学修飾法とマイクロ気液プロセス

○火原彰秀、岩山忍、上野雅晴、松岡晋弥、菊谷善国、渡慶次学、北森武彦

- 1) 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻
- 2) (財) 神奈川科学技術アカデミー (KAST)
- 3) 科学技術振興機構 (JST)

Capillarity Restricted Microchannel Modification Method and Micro Gas-liquid Processes  
Akihide Hibara, Shinobu Iwayama, Masaharu Ueno, Shinya Matsuoka, Yoshikuni Kikutani, Manabu Tokeshi, Takehiko Kitamori

- 1) Department of Applied Chemistry, School of Engineering, University of Tokyo
- 2) Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST)
- 3) Japan Science and Technology Agency (JST)

A surface modification control method for microchannels was developed for gas-liquid microchemical operations in microchips. In this method, shallow and deep microchannels were modified with hydrophobic and hydrophilic groups, respectively. This patterning was prepared based on principle of capillarity. Gas-liquid micro operations were demonstrated.

### 【はじめに】

近年数十から数百マイクロメートルの空間、特にマイクロチャネル構造を利用し、分析化学システムを集積化する研究が盛んである。これまでにわれわれの研究グループでは、マイクロチャネル中での油水の多相流（マイクロ多相流）を制御・応用する手法について検討してきた。マイクロ多相流の制御に関しては、物理的な形状（ガイド構造）を利用する方法[1]と化学修飾塗り分け法[2,3]について検討してきた。特に化学修飾塗り分け法は、油水のマイクロ多相流安定化に有効であった。またマイクロ多相流を利用することにより、コバルト湿式分析の集積化[1]・選択的イオン対抽出[4]・液膜輸送[5]などを実現してきた。

集積化した化学プロセスは、分析の高効率化・高機能化に大きく寄与する可能性をもっているが、気液操作に関してはほとんど報告がない。気液混在のプロセスは、気液相変化に伴う大きな体積変化や、粘度・密度などが気液間で大きく異なることなどから、実現が困難であった。

本研究では、マイクロチャネルの一部のみを望みの官能基で修飾する方法を開発し、その塗り分け構造を気液化学プロセスに応用することを目的とした。

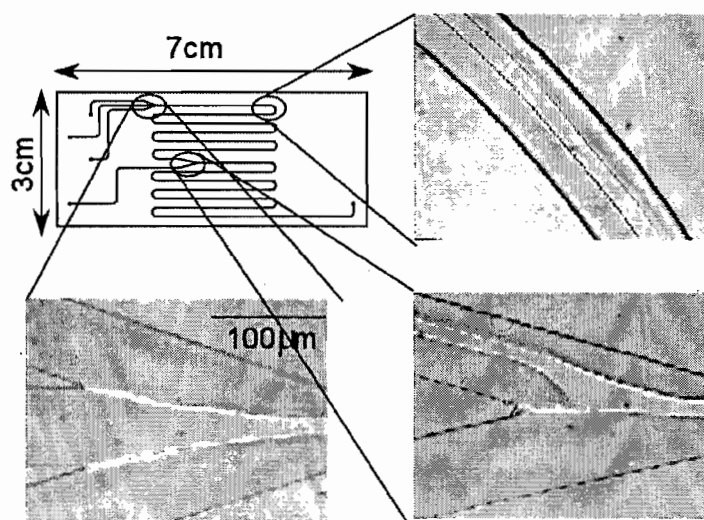


図1 水/酢酸エチル/水のマイクロ多相流の例。

### 【原理と実験】

深さおよび表面の異なる 2 本の隣接するチャンネルを用い、毛管現象を利用する手法を考案した[6]。チャンネルの形状を図 2 a に示す。深いメインチャンネルと浅いサイドチャンネルが隣接しており、サイドチャンネルにのみ疎水修飾を施す。サイドチャンネルの導入孔に修飾溶液を滴下し、毛管現象を用いて緩やかにチャンネル内に溶液を導入する。すると、深さが急激に変化するメインチャンネルとの境界部分で、濡れ性と表面積変化のバランスにより、溶液はメインチャンネルには入らずサイドチャンネルのみを毛管力により流れる (図 2 b)。その状態でしばらく静置した後、メインチャンネル側から空気によって溶液を追い出すことにより、サイドチャンネルのみを部分的に修飾した (図 2 c)。

### 【結果と考察】

部分的化学修飾の例として、サイドチャンネルのみを疎水化した。部分的修飾を確かめるために、メインチャンネルに水を流したところ、水がサイドチャンネルに入らないことを確認した。次に、水がサイドチャンネルに漏れ出す圧力が、ラプラス圧とよく一致することを確認した。

以上で得られた知見を元に、実際に気液化学プロセスへ応用した。まず、水中に気泡の導入し、除去するチャンネル構造を作製した (図 3 a)。次にマイクロ空間中で気液の向流を実現し、水中の溶存酸素を窒素により脱気した (図 3 b)。これらのプロセスが、設計通りに動作することを確認した。

本研究で開発した、部分的化学修飾法は、マイクロ空間の特徴を活かした手法であり、気液化学プロセス以外にも広い範囲で適用可能である。

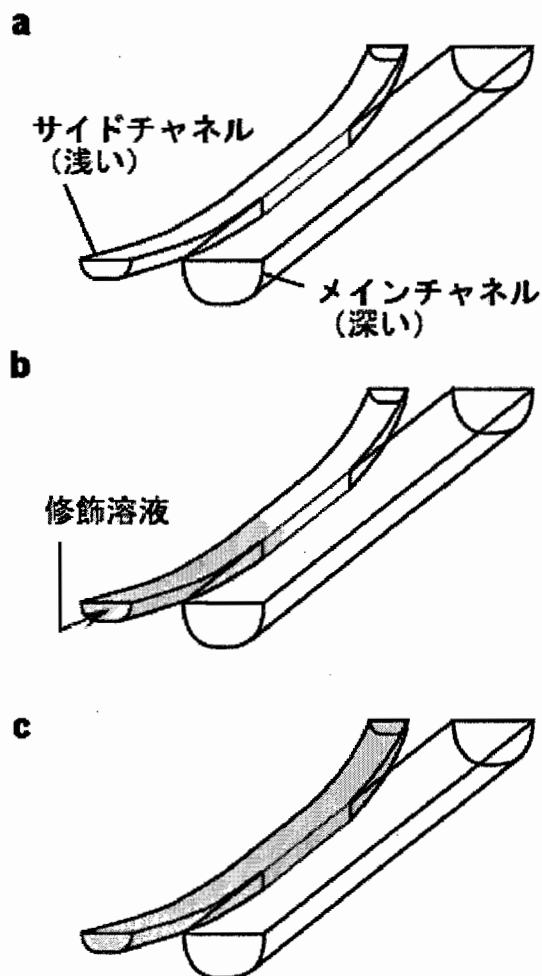


図 2 毛管現象を利用したマイクロチャンネルの部分的化学修飾法 (CARM 法)。

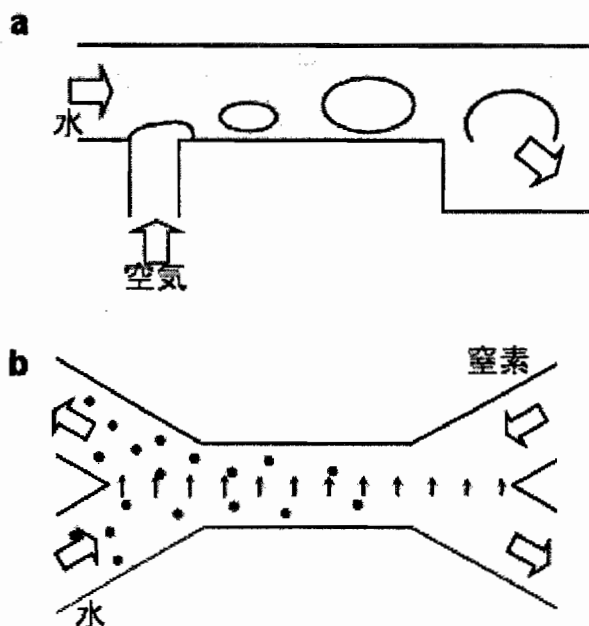


図 3 (a) 気泡導入・除去プロセス。(b) 気液向流脱気プロセス。

- [1] Tokeshi *et al.*, *Anal. Chem.*, **74**, 1565 (2002).
- [2] Hibara *et al.*, *Anal. Chem.*, **74**, 1724 (2002).
- [3] Hibara *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14954 (2003).
- [4] Hisamoto *et al.*, *Anal. Chem.*, **73**, 5551 (2001).
- [5] Surmeian *et al.*, *Anal. Chem.*, **74**, 2014 (2002).
- [6] Hibara *et al.*, *Anal. Chem.*, in press.

# SCE '04 P-4

疑似血管チップを用いた細胞の剪断応力応答計測システムの開発

○田中 有希<sup>1,2</sup>, 佐藤 記一<sup>2,3,4</sup>, 上村公一<sup>5</sup>, 吉田謙一<sup>5</sup>, 北森武彦<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科, <sup>2</sup>CREST, JST, <sup>3</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科, <sup>4</sup>神奈川科学技術アカデミー, <sup>5</sup>東京大学大学院医学系研究科法医学講座

**Development of response measurement system of human cells using vascular chip**  
○TANAKA, Yuki<sup>1,2</sup>; SATO, Kiichi<sup>2,3,4</sup>; UEMURA, Koichi<sup>5</sup>; YOSHIDA, Kenichi<sup>5</sup>; KITAMORI, Takehiko<sup>1,2,3</sup>

*Univ. of Tokyo, School of Engineering*<sup>1</sup>, *CREST, JST*<sup>2</sup>, *KAST*<sup>3</sup>, *Univ. of Tokyo, School of Agricultural and Life Sciences*<sup>4</sup>, *Univ. of Tokyo, School of Medicine*<sup>5</sup>

We developed a microchip-based cell culture system and a culture of human cells was realized in the system. The cultured cells in the microchip experienced a significant decrease in viability because of a shortage of dissolved oxygen. To overcome it, a continuous medium flow oxygen and nutrition supplying is efficient, however, the flow caused shear stress on cells. In microchip systems, shear stress and other fluid conditions are easily controlled. We utilized these advantages into vascular-like experimental systems to study the effects of shear stress. The albumin synthesis and morphology of hepatocytes under various shear stress conditions were examined.

はじめに

当研究室では、化学システムをマイクロチップ上に集積化する「化学反応の集積化」の応用として、細胞を利用したシステムについて研究を進めている。マイクロチップ内で細胞を健全な状態で培養する際に問題となると予想され、検討すべき点として、閉じた微小空間であるため、培地の供給が必要であること、が挙げられる。すなわち、マイクロチップ空間は、マイクロチャンネルを血管とみなすと、微細流路からなる生体類似環境であるため、組織の細胞が血液の供給を受けるのと同様に、マイクロチャンネルを通じて新しい培地や酸素等を絶えず供給することが、マイクロチャンネル全体で長期間にわたって良好な細胞培養を実現するために不可欠であると言える<sup>1</sup>。しかしながら、マイクロチャンネル内の流体は層流となって流れているため、壁面付近に生じた速度勾配により剪断応力が生じる。この剪断応力は、マイクロチャンネル底面に接着して生存している細胞に対して引き剥がすような力を加えることとなるため、細胞そのものが剥がれる、あるいは細胞に対してストレスとなることが推測される。マイクロチャンネル内の剪断応力は、マイクロ流体制御技術により、精密に制御できるという特長を活かし、この剪断応力がマイクロチャンネル中の細胞に対して与える影響を調べる実験を行った。本発表では、剪断応力の影響を調べ、細胞を健全な状態で培養するための条件の探索と、剪断応力ストレス下での細胞応答を調べた結果について述べる。

## 実験

ガラスマイクロチップ中（流路幅 250  $\mu\text{m}$ 、深さ 100  $\mu\text{m}$ ）に細胞を培養して実験

を行った。用いた細胞は、ヒト由来肝細胞株 HepG2 とヒト正常ヒト大動脈血管内皮細胞の 2 種類である。ガラス表面は細胞接着性タンパク質であるコラーゲンを用いて、細胞が接着しやすいように修飾した。マイクロチップ中に細胞を導入し、5 %CO<sub>2</sub>、37 °C のインキュベータ中で培地を灌流しながら培養した。培地の灌流速度、粘度を変化させることで、細胞に負荷する剪断応力を制御し、細胞の形態・物質合成能についてモニタリングし、剪断応力の影響を考察した。

### 結果と考察

細胞に負荷する剪断応力を変化させると、3時間以内に細胞の形態が伸展したり、はがれたりして変化することを確認した。これは、肝細胞 (図1) でも血管内皮細胞でも同様に観察された。

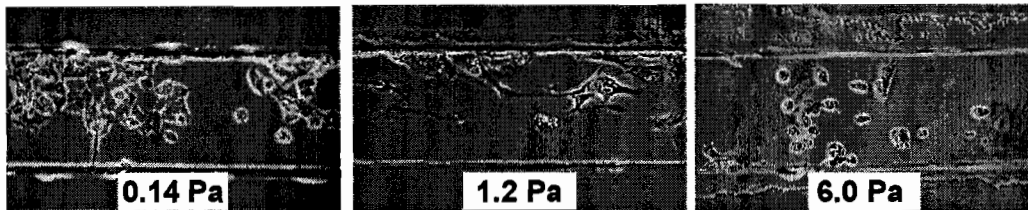


図1 剪断応力を負荷した肝細胞の形態変化

肝細胞は、一般に、生体外で機能を維持したまま培養を行うことが困難であるが、ストレスを低減することが機能を良好に維持するために必要であると考え、剪断応力条件を最適化した。剪断応力を負荷して培養した肝細胞が合成するアルブミンの量を ELISA法で測定したところ、剪断応力を大きくすると、アルブミン合成能が低下していくことが確認できた。(図2)

また、血管内皮細胞は、高血圧などのストレスを受けると、傷害を抑制する一酸化窒素の産生が低下し、これが心血管病の原因とされている。そこで、剪断応力を受けた血管内皮細胞が産生する一酸化窒素の量を蛍光法で検出したところ、剪断応力負荷後1時間で、一酸化窒素産生量の低下が見られた。

これらの実験結果を利用して、薬剤のスクリーニングやアッセイについて、現在検討を進めている。

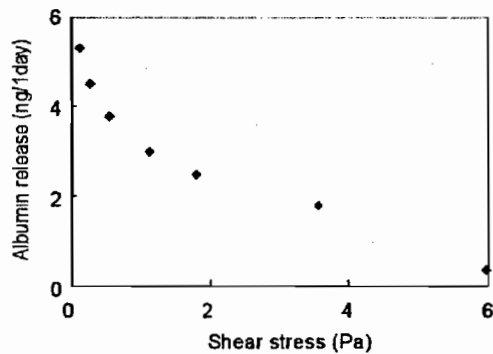


図2 剪断応力と肝細胞の Albumin 合成量

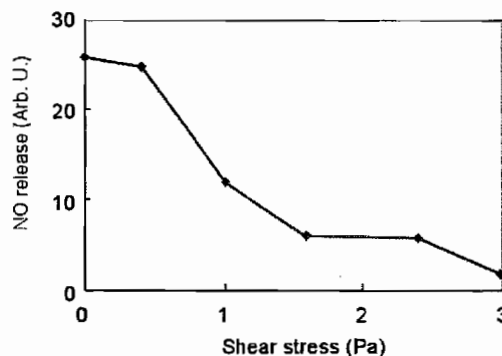


図3 剪断応力と血管内皮細胞の NO 産生量

### 参考文献

1. Y. Tanaka, et al., Proceedings of Micro Total Analysis Systems 2003, 777

# SCE '04 化学発光検出を用いたマイクロチップELISAの 開発と細胞刺激応答の検出 P - 5

宇井勇人、徳山孝仁、藤井紳一郎、安保充、○佐藤記一  
(東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻)

**Development of microchip-based-ELISA system using chemiluminescent detection and its application to cell response assay**

**Hayato Ui, Takahito Tokutyama, Shin-ichiro Fujii, Mitsuru Abo, Kiichi Sato\***

**Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo**

Monitoring a cellular response to a stimulus is one of the most important experiments in life sciences including drug screening. Because the conventional systems, however, were rather time-consuming and troublesome, and require many precious cells and reagents, a novel system resolving these problems is desired. To overcome these drawbacks, system integration into a microchip seems to be effective. In this study, cell culture and ELISA hybrid microchip system was developed to measure a specific protein released from cells. Major elements to develop the system are realization of easy cell culture by simple operation and highly sensitive determination by ELISA. For cell culture, PDMS microchip with membrane filter to retain cells without cell damages was designed and fabricated. ELISA microchip was made by glass and chemiluminescence detection system was constructed. By combination of these two chips, microchip-based bioassay system was developed. The system was applied to measure tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) released from murine macrophage which is a major method to find immunostimulation drugs.

## 1. はじめに

細胞の刺激応答の計測は生命科学において重要な実験手法であり、基礎生命科学研究から、創薬におけるドラッグスクリーニングや化学物質の細胞毒性試験などの応用研究まで幅広く行われている。しかしながら、従来法では多くの貴重な細胞を用いたり煩雑な操作が必要なため、より少ない細胞を用い簡便にアッセイ可能な新たな分析手法が求められている。近年世界的に注目を集めている  $\mu$ -TAS では、一連の実験手順をマイクロチップ上に集積することが可能であり、使用試薬の少量化、分析に要求される時間の短縮、操作の簡便化が期待され、実用化研究が進められている。

我々は、マイクロチップを単に化学分析に応用するだけでなく、細胞の持つ特異的な機能を利用することにより、さらに高機能なマイクロチップシステムを構築することを目的に研究を行ってきた。これまでに細胞を用いたマイクロシステムについてはいくつか報告があるものの、これまではマイクロチップにおける細胞保持は、接着系細胞自

身の接着能を利用した保持方法が主流であったが、我々はフィルターを用いた保持法を開発し、接着系だけでなく浮遊系細胞への応用を検討してきた<sup>1</sup>。本研究では、これをさらに応用し、一般的な生化学分析手法である ELISA 法を組み合わせた細胞刺激応答バイオアッセイシステムをマイクロチップ上に集積化し、化学発光を検出手段とするオンラインアッセイシステムを構築した。ここではモデル実験としてマクロファージから放出される腫瘍壊死因子 TNF- $\alpha$  の分析を試みた。

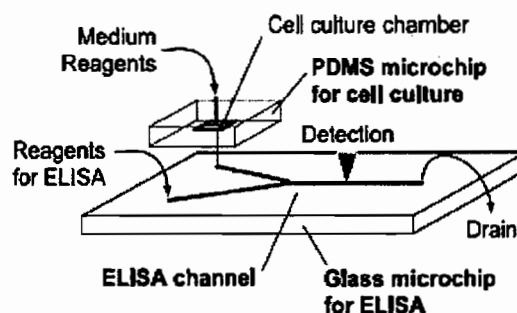


Fig. 1 Cell culture-ELISA hybrid microchip

## 2. 実験

TNF- $\alpha$  は免疫反応において標的細胞をアポトーシス誘導するサイトカインである。本研究では、マウスより採取したマクロファージから刺激に応じて産出される TNF- $\alpha$  の定量を簡便に行うことができるフロー型マイクロシステムについて、2 種類の素材からなるマイクロチップを用いて検討した。細胞保持・刺激応答反応を行う部分は酸素透過性を持ち加工が容易な PDMS (ポリジメチルシロキサン) を、ELISA の反応と検出部分は形状が安定で透明度が高いなどから検出に適しているガラスを用いた。細胞としては常法に従って調製したマウス (C3H/HeN、7 週齢、雄) 腹腔マクロファージを用い、膜材によりマイクロチップ内への保持を行った。代表的なマクロファージ活性化物質である大腸菌由来のリポ多糖を添加することによって産出される TNF- $\alpha$  を流路途中にせき止めた  $\phi 25 \mu\text{m}$  のビーズ上でサンドイッチ ELISA を行った。検出には化学発光検出を用いた。

## 3. 結果・考察

マイクロチップ ELISA により、常法の定量限界 5 pg/ml に対し、1 pg/ml まで定量することができ、また分析時間も約 7 時間から 90 分にまで短縮することができた。また細胞保持では 1  $\mu\text{l}$  程度のマイクロチャンバーに約  $1 \times 10^4$  個を接着のための前培養なしに保持し、活性化物質の評価検定をオンラインで行うことができた。本法は細胞種および測定法に汎用性があり、今回測定した TNF- $\alpha$  以外にも細胞の刺激応答と ELISA を組み合わせた系に広く用いることが可能であると考えられる。

1. T.Tokuyama, S.Fujii, M.Abo and A.Okubo, Micro Total Analysis Systems 2002, pp.832-834

# SCE '04 P - 6

## 汎用・高感度熱レンズ顕微鏡の開発

○馬渡和真<sup>1</sup>、比企伸一郎<sup>2</sup>、火原彰秀<sup>3</sup>、渡慶次学<sup>4</sup>、北森武彦<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>科学技術振興機構、<sup>2</sup>マイクロ化学技研(株)、<sup>3</sup>東大院工、<sup>4</sup>神奈川県科学技術アカデミー

### Development of wide applicable and sensitive thermal lens microscope

OKazuma Mawatari<sup>1</sup>, Shinichiro Hiki<sup>2</sup>, Akihide Hibara<sup>3</sup>, Manabu Tokeshi<sup>4</sup>, Takehiko Kitamori<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Japan Science and Technology Agency, <sup>2</sup>Institute of Microchemical Technology, <sup>3</sup>The University of Tokyo, <sup>4</sup>Kanagawa Academy of Science and Technology

**[Abstract]** Thermal lens microscope (TLM) is an ultra-sensitive method for detecting non-fluorescent samples in microspace. TLM is a kind of optical absorption spectrophotometry with comparable sensitivity to laser induced fluorescence method. In this presentation, the applicability of TLM is extended from visible to ultra violet (UV) light absorbing samples by UV laser excitation. The detection limit of  $9.2 \times 10^{-7}$  in absorbance unit was obtained and about 2 orders superior to spectrophotometry. Furthermore, TLM was developed for individual nanoparticles counting with visible laser excitation. Individual gold nanoparticles of 15 nm in diameter could be detected, and the detection limit of 5 nm, that was about 1 order lower in diameter than laser scattering method, was obtained.

**[精言]** マイクロチップは化学、バイオ分析など幅広く用いられてきており、それに伴い高感度で汎用的な検出法がますます重要になってきている。これまで高感度な検出法として蛍光法が用いられてきたが、蛍光性物質に限定されるため、汎用性が低かった。当グループでは光吸収後の熱を高感度に測定する熱レンズ顕微鏡を開発し、平均単一分子レベルの濃度での定量を実証してきた<sup>1)</sup>。実際にマイクロチップ上の検出器として、免疫分析、環境分析、生化学分析など幅広く用いられてきた。また、デスクトップサイズの実用化も実現してきた<sup>2)</sup>。現在、生体分子の非標識測定などを対象として、さらに汎用性を広げるために紫外光励起熱レンズ顕微鏡を開発している。また、感度についても単一分子・ナノ粒子カウンティングを実現するための開発を行っている。そこで本研究では、紫外励起による汎用化およびカウンティングに向けた高感度化について報告する。

### 【熱レンズ顕微鏡による単一ナノ粒子カウンティングの原理】

従来の熱レンズ顕微鏡の原理を図1左に示す。熱レンズ顕微鏡では、試料の吸収波長にあわせた励起光および別の波長のプローブ光を同軸で対物レンズにより集光照射する。試料が励起光を吸収し発熱した後、屈折率分布(熱レンズ効果)を生じる。熱レンズ効果によるプローブ光の光路変化を、ピンホールの透過光量変化として検出する。この場合、応答時間は数秒レベルで

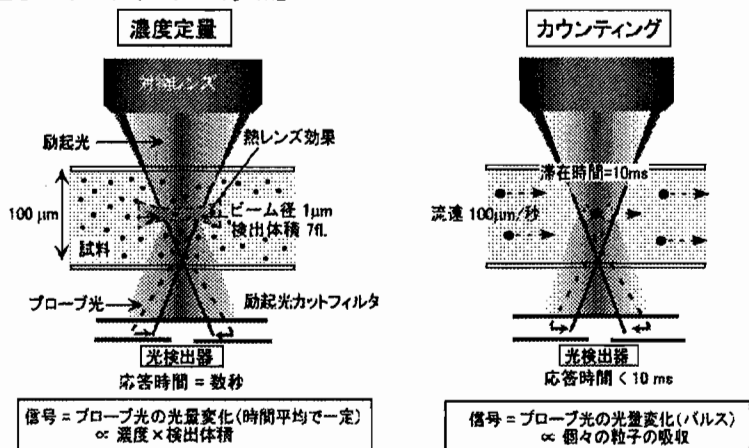


図1 従来の熱レンズ顕微鏡(左)およびカウンティングの原理



あるので、この定常的な光量変化から濃度定量が可能となる。ナノ粒子カウンティングの場合も光学配置は同様である。(図1右)フロー条件下で個々のナノ粒子は励起光のスポットを10ミリ秒程度で通過する。このときに過渡的に粒子周り生じた屈折率変化を、同様にピンホールの透過光量変化として検出する。応答時間を10ミリ秒以下とすることで、個々のナノ粒子の通過によるパルス波形として検出する。

**【実験】**紫外熱レンズ顕微鏡の励起光源には波長266nm(4.3mW)を用いた。また、プローブ光源には波長670nm(0.9mW)を用いた。対物レンズは開口数0.4とした。光学系は紫外光対応の低吸収材料で構成した。カウンティングの励起光源には、波長514nm(40mW)を用いた。また、プローブ光源には波長633nm(3mW)を用いた。対物レンズは開口数1.2とした。共に励起光は周波数1kHzで強度変調し、プローブ光の透過光量変化のうちの同期成分をロックインアンプにより検出した。時定数は、紫外熱レンズ顕微鏡は1秒、カウンティングは1ミリ秒とした。また、マイクロチャネルは深さ100 $\mu$ mを用い、シリンジポンプにより送液した。

**【結果と考察】**紫外熱レンズ顕微鏡によるアデニン水溶液の非標識直接定量について検討した。熱レンズ信号強度の流速依存性を検討した結果、平均流速20mm/秒で感度が最適となった。この流速条件で検量線を作成したところ(図2)、 $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$ Mで良好な直線関係が得られた。このとき、 $S/N=2$ から求めた検出限界は $7 \times 10^{-9}$ Mであり、吸光度換算で $9 \times 10^{-7}$ Absであった。このように、紫外熱レンズ顕微鏡により、吸光光度法とくらべて約2桁の高感度化を実現した。

次にカウンティングについて検討した。試料には粒径15nmの金コロイド水溶液を用いた。平均流速100 $\mu$ m/秒で測定したところ、濃度定量の場合と異なりパルス的な信号が得られた。(図3)また、このパルス信号は純水(ブランク)では観測されなかった。さらにプローブ光のみの照射の場合もパルス信号は観測されなかった。このパルス信号のカウント数は $1.5 \times 10^{11}$ ~ $3.6 \times 10^{12}$ 個/Lの範囲で直線的に増加した。これらの結果から、得られたパルス信号は個々のナノ粒子の通過による光熱変換効果に由来する信号であると結論づけた。このパルス波高の平均値は15nm~80nmの範囲で単調的に増加した。実験的に検出された最小粒径は5nmであり、これはモル吸光係数換算で $9 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ であった。したがって、 $10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 程度の分子であれば90倍程度の感度向上で可能となる。これは有機溶媒による増強効果(10-40倍)により可能なレベルである。今後、最適化により単一分子カウンティングを目指していく。

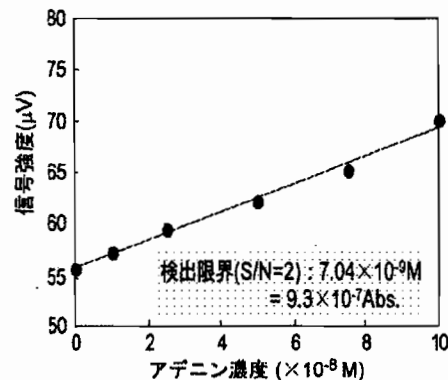


図2 アデニン水溶液の検量線

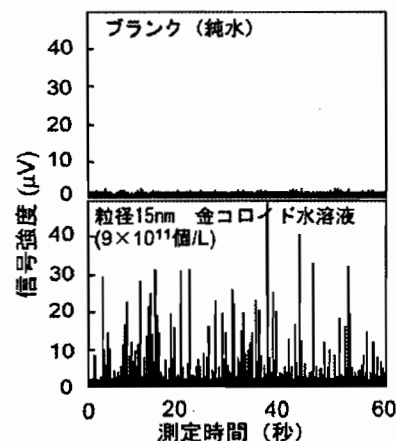


図3 ナノ粒子カウンティング波形

- 1) Kitamori, T.; Tokeshi, M.; Hibara, A.; Sato, K. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 52A-60A.
- 2) Hiki, S.; Tokeshi, M.; Hibara, A.; Kitamori, T. *Bunseki Kagaku* **2003**, *52*, 569-574.

# SCE '04 P - 7

逆相モノリス型シリカを用いる  
オンチップ液体クロマトグラフィー

○石田晃彦, 吉川雄大, 夏目大道, 谷博文, 上館民夫  
北大院工

## On-Chip Liquid Chromatography System Using Reversed Phase Monolithic Silica

Akihiko Ishida, Takahiro Yoshikawa, Masamichi Natsume, Hirofumi Tani, Tamio Kamidate  
Graduate School of Engineering, Hokkaido University

Microfabricated devices for liquid chromatography system were developed. The device consists of a glass wafer having 20-nl injector and approximately 40-cm separation channels (width 400  $\mu\text{m}$  and depth 30  $\mu\text{m}$ ) were fabricated. The injector channel had double-T shape. The separation channel was containing monolithic silica modified with octadecyltrichlorosilane. Mobile phase was delivered with a syringe pump. Detection was performed using a HPLC electrochemical detector. Column efficiency was evaluated by the separation of mixtures of catechins with the devices. This device provided good separation; the numbers of theoretical plates were 7100 for (+)-epicatechin, 6300 for (-)-epigallocatechin galate, and 7600 for (-)-epicatechin.

【緒言】固定相との相互作用に基づく液体クロマトグラフィー (LC) は, 様々な分析システムをマイクロチップ上で実現しようとするマイクロデバイスにおいて, 重要な役割をはたすことが期待される. また, LCのように汎用性が高く, 高度な利用技術の蓄積がある分離システムをマイクロデバイスに組み込むことは有用である. さらに, LCは多様な組成の移動相に適用できるという利点を持つ. そこで, 本研究では, 様々なマイクロ分析システムにおけるLCの応用可能性に着目して, ポンプを送液の駆動力とするオンチップLCを開発した. LCチップの作製においては, 固定相としてオクタデシルシリル修飾したモノリス型シリカを利用し, これをインジェクターとともに集積化した. 本研究では, 集積化インジェクターの試料導入体積とその精度を検討した. さらに, このオンチップLCをカテキン類の分離に適用し, その性能を評価した.

【実験】LCチップは, フトリソグラフィーおよびウェットエッチングにより溝 (幅 400  $\mu\text{m}$ , 深さ30  $\mu\text{m}$ ) を形成したガラス基板 (3.5  $\times$  3.5 cm) と別のガラス基板を接合することにより作製した. チャンネル内に逆相型固定相を形成するため, まずテトラメトキシシラン, およびポリエチレングリコール, 尿素, 酢酸の混合液を排出口から導入し, モノリス型シリカを形成させた. 次に, シリカ表面をオクタデシルトリクロロシランで修飾した. 測定のため, 作製した LC チップをシリンジポンプおよび HPLC 用電気化学検出器 (セル体積 400 nl) と接続した. 試料には (+)-カテキン(CA), (-)-エピカテキン(EC), (-)-没食子酸エピガロカテキン(EGCg)を用いた.

【結果と考察】インジェクターは, ダブル T 型の手動による流路切り替え方式で, 試料導入体積を 20 nl として設計した. インジェクターだけを搭載したマイクロデバイ

スにおいて、蛍光色素をインジェクトし、その様子を蛍光顕微鏡下で観察することで、このインジェクターが想定どおり動作することを確認した。さらに、その注入体積と精度を試料応答のピーク面積をもとに算出した。その結果、試料導入体積は、 $26 \pm 5$  nl ( $s \pm \sigma, n=20$ ) であった。

次に、分離チャンネル内にモノリス型シリカを形成させた LC チップを作製した。分離チャンネルのジオメトリーは、約 40 cm 長の折りたたみ型とし、ターン部分はそのチャンネル幅が徐々に直線部分の 1/2 となるようなテーパ型とした。ターン部分をテーパ型とすることで、サンプルバンドの拡散を抑制することが期待できる。テーパ型ターンをもつデバイスとまたないデバイスを用いて、3 種類のカテキン類の分離を行なった (Fig. 1)。その結果、どのデバイスでも十分な分離はできたが、テーパ型ターンをもつデバイスはよりシャープなピークを与えた。テーパ型ターンのないデバイスとあるデバイスでの CA の理論段数はそれぞれ 5500 段、7100 段であった。したがって、テーパ型ターンが分離能の向上に寄与していると推察できる。なお、折れ曲がりがない条件として、40 cm 長のモノリスシリカを充填したキャピラリーチューブ (50  $\mu$ m 径) を使用した場合、CA の理論段数は 10000 段であった。

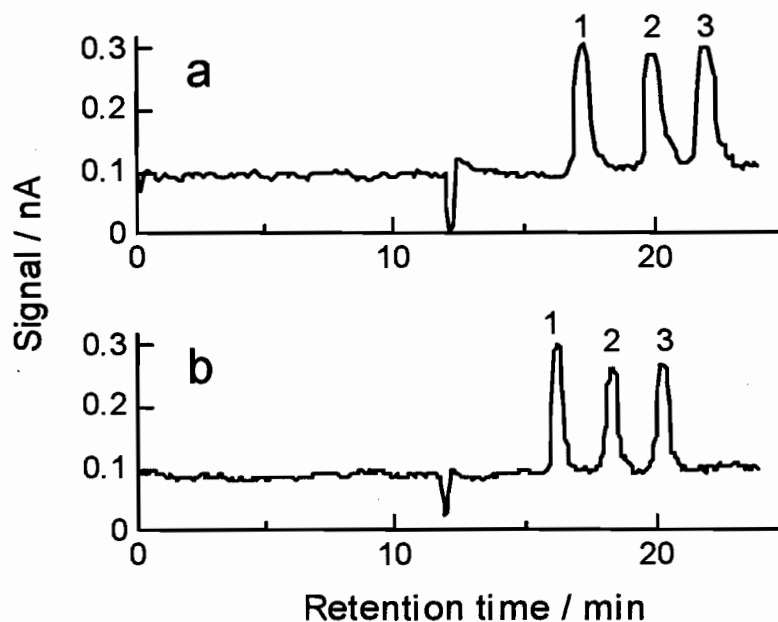


Fig. 1 Chromatographic separation of catechins using LC chips without (a) and with (b) tapered turns. Peaks: 1, CA (1 mM); 2, EGCg (1 mM); 3, EC (1 mM). LC conditions: mobile phase, methanol: 50 mM phosphate buffer (pH 2.0) (3:2, v/v); flow rate, 300 nl/min; applied potential, +0.4 V vs. Ag/AgCl.

以上、本研究では、オンチップ LC のさらなる分離性能の向上と検出部の集積化が課題であるが、カテキン類の良好な分離を達成したことにより、オンチップ LC の有用性を確認することができた。

SCE '04  
P - 8

## 蛍光誘導体化合物のマイクロチップ電気泳動 分離における添加剤の効果

○東 哲司、田中 喜秀、鳴石 奈穂子、脇田 慎一  
産総研 ヒューマンストレスシグナル研究センター

### The Effect of Buffer Additives on Microchip Electrophoresis Separation of Fluorescence Labeled Analytes

\*Tetsuji Higashi, Yoshihide Tanaka, Nahoko Naruishi, Shin-ichi Wakida

Human Stress Signal Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

The aim of our research is to develop a high-throughput assay of glucocorticoids in biological fluids. Fluorescent labeled glucocorticoids were analyzed with microchip capillary electrophoresis using a poly(methylmethacrylate) (PMMA) chip because the disposable plastic chip is preferable for clinical diagnostic use. In our previous method, methylcellulose was added to the separation buffer in order to prevent the surface adsorption of some analytes. Nevertheless, the peak tailing for DTAF-labeled corticosterone was still observed using a PMMA chip as compared to the use of a polyacrylamide coated quartz chip. Several additives such as the other hydrophilic polymers, non-ionic surfactants and amphoteric electrolytes was attempted to improve the peak shapes. Among these additives, *N*-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid (CHES) was effective for obtaining the good peak shape.

#### はじめに

ヒトや動物がストレスを感受するとACTHの分泌が亢進し、糖質コルチコイドの分泌が増加する<sup>1)</sup>。我々は、このような糖質コルチコイドの迅速アッセイを目指し、マイクロチップ CE-蛍光検出法を利用したコルチゾールやコルチコステロンの分析法を開発している。マイクロチップには、大別すると石英製とプラスチック製が利用されている。しかし、血液・唾液などの生体試料を測定するには、分析コストや衛生面を考慮すると使い捨て可能なプラスチック製チップの使用が望ましい。そこで、ポリメチルメタクリレート (PMMA) 製チップを用いて分析メソッド開発を行っていたが、内壁処理された石英製チップでは見られない試料ピークのテーリングが観察された。この原因として、蛍光ラベル化コルチゾール等の PMMA チップへの吸着が考えられた。

本研究では、様々な添加剤を泳動溶液に加え、分離チャンネルでの試料吸着抑制効果について調べた。添加剤として、セルロース誘導体やポリエチレングリコール (PEG) などの親水性ポリマー、*N*-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸 (CHES) のような両性電解質などを検討したので報告する。

## 実験

マイクロチップ CE 装置には、島津製 MCE-2010 LIF と日立製コスモアイ SV1100 を用いた。MCE-2010 LIF では石英製マイクロチップ (TypeD: 幅 110  $\mu\text{m}$ 、深さ 50  $\mu\text{m}$ 、有効分離流路長 20 mm、ポリアクリルアミド内壁処理) を、SV1100 では PMMA 製マイクロチップ (幅 100  $\mu\text{m}$ 、深さ 30  $\mu\text{m}$ 、有効分離流路長 30 mm) を使用した。泳動溶液は 0.4% (w/v) メチルセルロース (MC) を含む 100 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 9.5) を基本とし、PEG や CHES などを添加した。コルチコステロンを 5-(4,6-ジクロロトリアジニル)アミノフルオレセイン (5-DTAF) で蛍光ラベル化したのち、試料として用いた。吸着抑制効果については、試料ピークの理論段数により評価した。

## 結果

PMMA 製チップで 0.4% MC を含む泳動溶液を用いた場合、電気浸透流 (EOF) はほとんど抑制される。また、MC 添加で試料吸着抑制効果も期待できる。一方、石英製チップは、EOF を抑制させるためにポリアクリルアミドで内壁処理したものをを用いた。

石英製チップと PMMA 製チップの結果を Fig. 1 に示す。いずれのチップでも DTAF ラベル化コルチコステロンを分離・検出できたが、PMMA 製チップでは MC 添加のみで試料吸着を抑制することができなかつた。そこで、この泳動溶液に PEG や CHES などを添加し、更なる吸着抑制効果を期待して比較検討を行った。その結果、PEG 添加では吸着抑制効果は認められなかつた。一方、CHES 添加でピーク形状は改善され、理論段数は約 2 倍向上した (Fig. 2)。現在、より効果的な吸着抑制効果を持つ添加剤を探索中である。

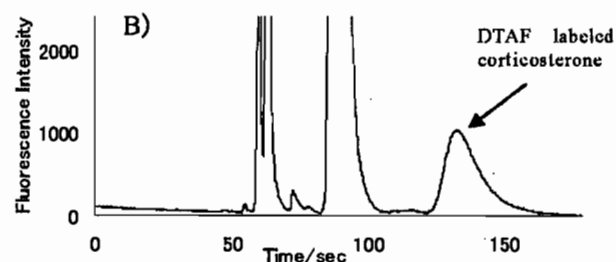
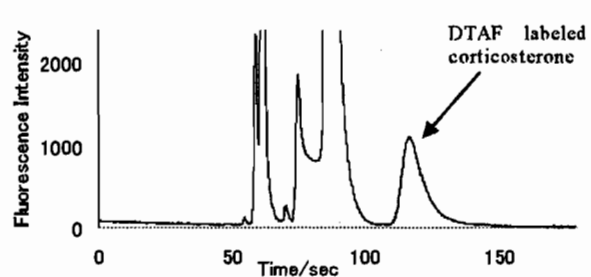
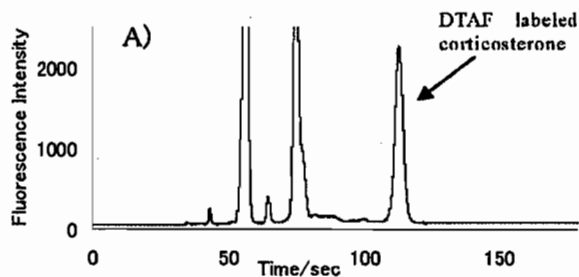


Fig.2 The additive effect of CHES to the buffer.  
PMMA chip, 100mM borate buffer with 0.4% (w/v) MC and 75mM CHES (pH 9.5).

Fig.1 The difference between polyacrylamide coated quartz (A) and PMMA (B) chips.  
100 mM borate buffer with 0.4% (w/v) MC (pH 9.5).

## 文献

- 1) 脇田慎一, 申 双竜, 宮道 隆, 竹田さほり, 二木鋭雄, 日本分析化学会第 52 年会講演要旨集 (2003) 344

SCE '04  
P - 9

キャピラリー電気泳動法による微生物の迅速な分析  
～陰イオン性糖ポリマーによるピーク形状の改善～

○稲垣真輔<sup>1</sup>, 鳥村政基<sup>1</sup>, 孫麗偉<sup>1</sup>, 關根朝美<sup>1</sup>, 佐藤浩昭<sup>1</sup>,  
田尾博明<sup>1</sup>, 新谷智吉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門, <sup>2</sup>愛媛県繊維産業試験場

**Rapid Analysis of Microorganisms by Capillary Electrophoresis  
-Improvement of Peak Shapes Using Anionic Carbohydrate Polymers-**

Shinsuke Inagaki\*<sup>1</sup>, Masaki Torimura<sup>1</sup>, Liwei Sun<sup>1</sup>, Tomomi Sekine<sup>1</sup>, Hiroaki Sato<sup>1</sup>, Hiroaki Tao<sup>1</sup>,  
Tomoyoshi Shintani<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Measurement Technology Research Group, Research Institute for Environmental Management  
Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<sup>2</sup> Textile Industrial Institute of Ehime Prefecture

Capillary electrophoresis was applied to the rapid discrimination and quantification of microorganism. In general, it is difficult to detect microorganisms since the peak shapes apt to be broad. However, addition of an appropriate amount of anionic carbohydrate polymer such as sodium alginate or sodium dextran sulfate to the running buffer solution made it possible to obtain a reproducible sharp peak. Using these polymers as buffer additives, the number of theoretical plates was about 10 times higher than that without using buffer additives. In this study, we examined the effect of anionic carbohydrate polymers as buffer additives, using lactic bacteria for specimen as a representative example of microorganism.

はじめに

医療や食品など様々な分野において、微生物の種類や量を迅速に把握する必要性が求められている。これまでの検査法では標的とする細菌の増殖特性に見合った培地で数日間培養する必要があり、結果が得られるまでに長時間要するため迅速性といった観点において不十分であった。多くの実試料においては、多種の菌種が混在する試料中から目的とする菌種を逃すことなく分離検出しなくてはならず、また分離した細菌を速やかに同定することが望まれる。

このような背景のもと、近年、微生物の分離へキャピラリー電気泳動 (CE) を適用する研究が進められている。開発当初、CE による微生物細胞分離で得られるピーク形状は非常にブロードになる傾向が観察され、実際に複数微生物を分離・検出することは困難と考えられた。しかし、その後の研究により、泳動液に特定の添加剤を添加することにより、当初では考えられなかった高分離能で微生物細胞を分離することが可能になってきた。Armstrong らは添加剤としてポリエチレンオキサイド (PEO) に着目し、微量 PEO 添加によりキャピラリー内での細胞凝集が促進された結果、細胞ピークの理論段数が劇的に改善されることを報告している [1]。しかしながら、PEO を添加剤として用いた場合、試料注入した細菌の濃度により泳動時間が変化し、その濃度が高いほど電気泳動移動度が減少するという特異的な現象が観測されている。したがって、泳動時間から細菌の種類を同定することが難しいという問題点を抱えている。我々はこれに対し、陰イオン性の糖ポリマーであるアルギン酸ナトリウムを添加剤として用いることにより、乳酸菌のピーク形状が改善されることを示し、その機構について考察した [2]。本研究では CE による微生

物の迅速な分析法の確立を目的に、泳動液に対する陰イオン性の糖ポリマーを中心とする各種添加剤の効果について詳細な評価を行った。

## 実験

キャピラリー電気泳動装置として Bio-Focus CE 3000 (Bio-Rad) を用いた。キャピラリーは内壁が未修飾のもの (内径 50  $\mu\text{m}$   $\times$  全長 24 cm, 有効長 20 cm) を泳動前毎に 1.0 M NaOH, 超純水および泳動液で十分に洗浄して使用した。各種微生物細胞は培養後, それぞれの培養液から 1.0 mL 採取したものを 1,000  $\times$  g で 2 分間遠沈洗浄し, 泳動液に再懸濁させたものを試料として用いた。乳酸菌試料は日本乳業技術協会から購入し, MRS 培地を用いて 37  $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養を行った。

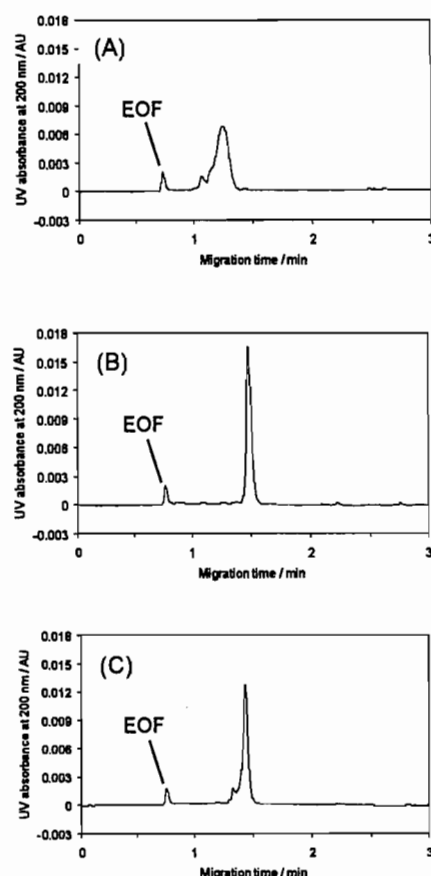
## 結果と考察

Fig. 1 に乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii sub. bulgaricus* B-5b のエレクトロフェログラムを示す。泳動液にポリマーを添加しない場合, 細胞ピークは注入バンド幅に対し非常にブロードなピークを呈するが, 泳動液に適量のアルギン酸ナトリウムを添加することにより, 非常にシャープなピークが得られた。両者の理論段数を比較したところ, アルギン酸ナトリウムを添加することにより, その値は約 10 倍上昇した。また, これ以外の陰イオン性の糖ポリマーとして, デキストラン硫酸ナトリウムやヘパリンナトリウム, コンドロイチン硫酸 C ナトリウムなどを用いた際に同様の効果が観測された。これらの添加剤を用いた場合には, PEO 添加時に観察される電気泳動移動度の注入細菌濃度依存性は見受けられず, 泳動時間からその細菌種を推定することが十分可能と考えられた。さらに, これら陰イオン性の糖ポリマー添加条件下での注入細菌数とピーク面積とは, 注入細菌数が 100~2,000 個の範囲において比例関係にあり ( $r^2 = 0.997$ ), 定量的な測定も可能であった。また, 蛍光染色細菌の場合, レーザー蛍光検出器を用いた測定で 1 細菌の検出が可能であった。

これらの添加剤によりピーク形状が改善する機構解明と, 本法の乳酸菌製剤分析等へ応用について詳細を報告する。

## 文献

1. D. W. Armstrong, M. Girod, L. He, M. A. Rodriguez, W. Wei, J. Zheng and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5523.
2. 稲垣真輔, 鳥村政基, 孫麗偉, 佐藤浩昭, 田尾博明, 新谷智吉, 第 65 回分析化学討論会講演要旨集, p.288.



**Fig. 1 Electropherograms of cultured cells of *L. bulgaricus* B-5b.** Conditions: running buffer: (A) 10 mM borate buffer (pH 9.0), (B) 10 mM borate buffer containing 0.075 % (w/v) sodium alginate, (C) 10 mM borate buffer containing 0.075 % (w/v) sodium dextran sulfate, applied voltage 10 kV.

○ 村上博哉<sup>1</sup>・江坂幸宏<sup>1</sup>・後藤正志<sup>1</sup>・酒向孫市<sup>1</sup>・加納健司<sup>2</sup>・  
鳥村政基<sup>3</sup>・田尾博明<sup>3</sup>

<sup>1</sup>岐阜薬科大学, <sup>2</sup>京大院農, <sup>3</sup>産総研・環境管理

Study of oxidative damage of guanine adducts using an electrochemical approach

Hiroya Murakami<sup>1</sup>, Yukihiko Esaka<sup>1</sup>, Masashi Goto<sup>1</sup>, Magoichi Sako<sup>1</sup>,  
Kenji Kano<sup>2</sup>, Masaki Torimura<sup>3</sup>, Hiroaki Tao<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Gifu Pharmaceutical University, <sup>2</sup>Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

<sup>3</sup>Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial  
Science and Technology(AIST)

To reveal the genotoxicity of cyclic 1 $\beta$ -propanoguanine (CPr-Gua) as a guanine adduct in DNA induced by acetaldehyde(AA), electrolysis solutions of the adduct were analyzed by LC/MS and CE to characterize its oxidative products. Interestingly, time course of UV absorption spectra during the oxidative electrolysis indicated some isosbestic points suggesting formation of a single major product. The expected structure of the major product will be an unknown one and seems to be potent one causing misreading of DNA base sequences. Because of relatively mild oxidative condition of the present electrolysis compared with previous method using strong oxidants, the product would be a more possible form in DNA related to CPr-Gua and may be an important form as a candidate accounting for genotoxicity of CPr-Gua.

## 1. 緒言

最近、日本人に多いアセトアルデヒド分解酵素2型(ALDH2)欠損の遺伝子素養を持つヒトの飲酒による発ガンリスクは健常人の最大百倍にも達することが明らかにされた。これは代謝物アセトアルデヒド(AA)が関与する発ガンメカニズムの存在を示す決定的な証拠と考えられる。飲酒や喫煙により摂取されるAAはアルデヒド基由来の高い反応性により核酸塩基を修飾する可能性から発癌性を疑われてきた。我々はAA由来グアニン付加体であるcyclic 1- $\beta$ -propanoguanine (CPr-Gua)と $\beta$ -ethylguanine (Et-Gua)に注目し、これら損傷塩基による変異、発癌の可能性を検討してきた。特に前者は、培養細胞へのAAの暴露実験において明確な生成が確認され、また核内でDNAと複合体形成しているヒストンの存在によって顕著にその生成が促進されるため、DNA中のAAによるguanineの主損傷形態として有力である。CPr-Guaが発ガンに関わるとすれば塩基配列のミスリーディングの機構が存在するはずであるが、現在のところよくわかっていない。

ところで、斎藤らはDNA配列上でGGG tripletなどの酸化されやすい部位が存在すると、DNA鎖上を電子が移動し、そこに酸化反応が集中するという現象を報告している[1]。一般に、核酸塩基のアルキル化は、アルキル基の電子供与性によって塩基の酸化電位を負にシフト(つまり酸化されやすく)させる。これらを背景に、我々はCPr-Gua生成後の後続反応により生成する損傷体が遺伝毒性を示す可能性を検討している。最初、過硫酸アンモニウムを用いた化学酸化を行い、分解物をLC/MSを用いて同定を行った。その結果、化合物I (Fig.1)を生成する主経路が確認された。このIの構造はguanineとは非常に異なった塩基対合を作る可能性があり注目している(Fig.2)[2]。一方で、過硫酸アンモニウムによる作用は酸化ストレスとしては大変厳しいものであるため、生体環境内の反応を反映しているかに疑問が残る。今回、任意の酸化電位を設定できる、より穏やかな酸化条件での検討が可能な電解酸化を採用し、CPr-Guaに酸化ストレスをかけることにより生成する酸化生成物をLC/MS及びCEを用いて分析・同定を行い、その損傷体の意味を考察した。



## 2. 実験

CPr-deoxyguanosine(CPr-dG)もしくは CPr-guanosine(CPr-G)を 10mM リン酸緩衝液 (pH7.0)に  $4.2 \times 10^{-5}$ M の濃度に溶解したものを調製し、これを北斗電工製の HSV-100 ポテンシostatを用いてバルク電解した。電解電位は 900 から 1250mV(vs.Ag/AgCl)に 適宜設定した。紫外吸光スペクトルの経時変化測定では、島津 Multispec-1500 分光度計に設置した光学セル内で微小対極を用いる一層式の電解を行い、スペクトルをリアルタイムで計測した。

LC/MS 分析には Hewlett Packard 社製 HP1100-LC/MSD 装置を用いた。分離では ODS カラムを用い、移動相には水とメタノールの混液を使用した。CE 装置は、松定プレジジョンデバイセズ製 HCZE-30PNO 高圧電源と PC 接続日本分光製 MD-2010Plus マルチ検出器からなり、キャピラリーは内径  $50 \mu\text{m}$  全長 60cm(有効長 30cm)のものを用いた。泳動液にはホウ酸錯化を利用するために 100mM ホウ酸緩衝液(pH9.2)を用いた。印加電圧はともに 10 kV に設定した。

## 3. 結果と考察

CPr-dG の電解酸化に伴う、電解溶液の UV スペクトルの経時変化には明確な二箇所の等吸終点が存在し (Fig.3)、電解酸化による反応がほぼ定量的に一生成物を生成するシンプルな反応であることが示された。LC/MS (陽イオン検出) による解析では、主生成物は  $m/z=326$ (おそらく  $M+H^+$ )の分子量 325 の物質と思われる、化合物 I の生成経路スキーム、化学酸化による穏やかな酸化条件、吸収スペクトル形状等から総合的に判断して、I に至る中間生成物である II (Fig.1) であると推測される。一方、この電解酸化物は非常に親水性が高い上に ODS カラムへの吸着性が高く、逆相 HPLC 分離では主生成物が単成分であるとの確認が不十分であった。そこで充填剤の存在しない CE の活用を検討した。即ち CPr-G の酸化分解物をホウ酸錯体として分離し、主生成物が完全に単成分であること、そしてそのスペクトルが電解最終スペクトルと一致することを確認した。CE の結果はデオキシ体の結果ではないが、スペクトルの比較の結果、デオキシ体においても同じ反応が起こっているものと考えられる。今後、CE/MS による分子量測定を予定している。

過硫酸アンモニウムの標準酸化還元電位は 2010mV と電解電位に比較して著しく高い。生体内での反応が一般に穏やかであることを考えれば、I の構造より II の構造のほうが CPr-dG の酸化形態としては重要である可能性を示唆している。非常に興味深いことに、guanosine や Et-dG の経時電解スペクトル変化においても、同様な等吸終点を得られており、現在同様のアプローチで生成物の同定を進めている。

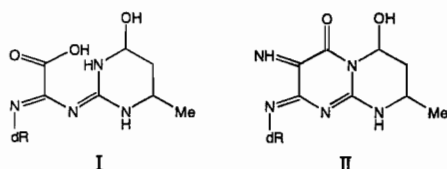


Fig 1:oxidative degradation products of CPr-dG

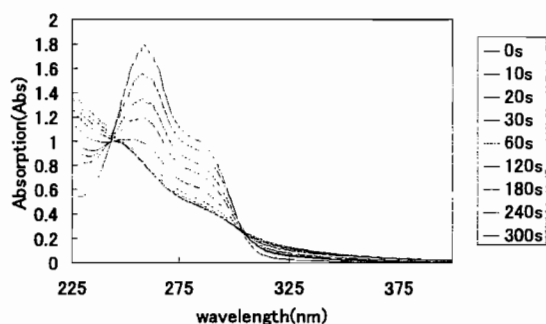


Fig3:Absorption spectra of electrolytic oxidative solution of CPr-dG (Electrolysis conditions : at 1.25 V vs Ag/AgCl; in pH 7.0 phosphate buffer; anaerobic condition; concentration of CPr-dG, 130 $\mu\text{M}$ ).

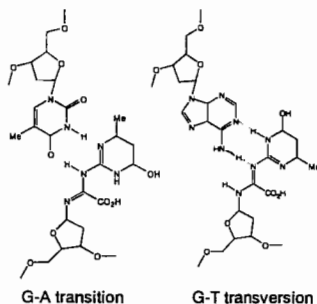


Fig2:Possible base-pairs of the ring-opened product I

# SCE '04 P-11

## 配位子交換マイクロチップ電気泳動による NBD-アミノ酸のキラル分離

○沈輝, 中嶋秀, 川田勝彦, 中釜達朗, 内山一美  
東京都立大学大学院工学研究科応用化学専攻

### Chiral Separation of NBD-amino Acids by Ligand Exchange Micro Chip Electrophoresis

Hui Shen, Hizuru Nakajima, Katsuhiko Kawata, Tatsuro Nakagama, Katsumi Uchiyama

*Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo Metropolitan University*

Chiral separation of NBD-amino acids by ligand exchange microchip electrophoresis (LE-ME) was studied. The migration behaviors of eleven NBD-DL-amino acids were investigated by ligand exchange capillary electrophoresis (LE-CE). The enantiomer of five NBD-amino acids (Ser, Thr, Val, Phe and His) could be separated by LE-CE using 20mM ammonium acetate buffer (pH 9.0) containing 10mM copper acetate, 20mM L-prolineamide and 1 mM SDS. Under this condition, the enantiomeric separation of these five NBD-amino acids by LE-ME was investigated. The enantioseparation of NBD-Ser, -Thr and -His could be successfully accomplished by LE-ME. The migration time obtained on LE-ME was shorter than that obtained on LE-CE, while  $\alpha$  and  $R_f$  values obtained on LE-ME was superior to that obtained on LE-CE.

【緒言】光学異性体の分離は分離科学において最も重要な課題の一つである。演者らはこれまでに、配位子交換-キャピラリーミセル動電クロマトグラフィーを提案し、光学異性体と位置異性体の同時分離法を開発した<sup>1)</sup>。また、ゾル-ゲル法と化学修飾法を用いた、アミノ酸アミドをキラルセクターとする配位子交換型のキラルモノリスカラムを開発し、アミノ酸、ヒドロキシ酸およびペプチドなどの生化学的に重要な光学異性体を分離することに成功した<sup>2-3)</sup>。一方、近年、分析装置の小型化、分析時間の短縮化、試薬量の低減などの目的から、一連の化学分析操作を数センチ角のマイクロチップ上で行う $\mu$ -TASに関する研究が世界的に注目されている<sup>4)</sup>。光学異性体の分離においてもマイクロチャンネルを分離場として用いることで上記目的が達成されることは明白である。しかし、マイクロチップによる光学異性体分離に成功した例はきわめて少ない。これはマイクロチップの場合、分離場の長さが短く光学異性体の分離が極めて困難であるためと考えられる。そこで本研究では高いキラル認識能を持つ配位子交換をマイクロチップ電気泳動に適用し、種々のアミノ酸誘導体の光学異性体分離について検討した。

【実験】フューズドシリカキャピラリーは内径 100 $\mu$ m, 長さ 60cm, 有効長 30cm のものを使用し, 印加電圧は-8000V とした。試料には 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) でラベル化したアミノ酸を用い, 検出は 488nm の Ar<sup>+</sup>レーザーを用いるレーザー誘起蛍光法(LIF)により行った。マイクロチップは Micralyne 製 Borofloat glass マイクロチップ MC-BF4-SC(分離チャンネル幅 50  $\mu$ m, 深さ 20  $\mu$ m, 長さ 90 mm, 有効長 20~70mm)を用い, 印加電圧は-2080V とした。検出は 473nm の固体ブルーレーザーを用いる LIF により行った。

【結果および考察】配位子交換の原理は, 試料-金属イオン-キラルセクターの三成分間で三元錯体 (ternary complex) が形成することに基づく。互いに逆の立体配置を有するアミノ酸配位子からジアステレオメリックな錯体が形成され, これらの錯体の安定性の違いによってアミノ酸エナンチオマーの移動時間に差が生じて分離が達成される。これまでの研究により, Cu(II)とアミノ酸は 1:2 で反応し錯体を形成することが明らかになっている。そこで, 泳動液に 10mM 酢酸銅, 20mM L-プロリンアミドおよび 1mM SDS を含む 20mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 9.0)を用い, 配位子交換-キャピラリー電気泳動(LE-CE)により 11 種類の NBD-アミノ酸(Ser, Glu, Asp, Thr, Val, Trp, Phe, DOPA, PheGly, His および Pro)の分離を試みた。その結果, LE-CE により 5 種類の NBD-アミノ酸(Ser, Val, Thr, His および Phe)の光学異性体分離が可能であることが分かった。そこで, これら 5 種類の NBD-アミノ酸の配位子交換-マイクロチップ電気泳動(LE-ME)による光学異性体分離について検討した。LE-ME では NBD-Ser, -Thr および-His の光学異性体を分離することができた。Fig. 1 にこれらのエレクトロフェログラムを, また, Table 1 に LE-CE および LE-ME において得られた NBD-DL-Ser, -Thr および-His の分離係数 $\alpha$ および分離度  $R_s$  値を示す。いずれのアミノ酸誘導体についても, LE-ME における泳動時間は LE-CE よりも短く, LE-ME において得られた  $R_s$  値は LE-CE よりも大きかった。これは, マイクロチャンネルの幅と深さがキャピラリーの内径よりも小さく, 拡散によるピークゾーンの広がりが小さいためと推測される。

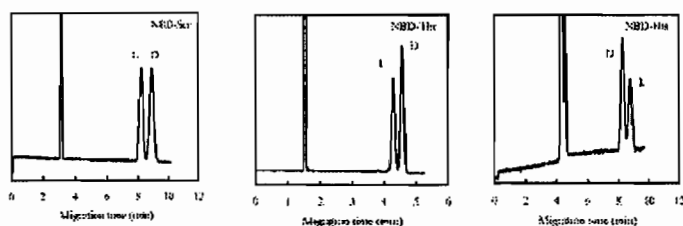


Fig. 1 Electropherogram of NBD-DL-amino acids obtained on LE-ME.

Table 1 Comparison of  $\alpha$  and  $R_s$  values obtained on CE with that obtained on ME.

Amino acid	CE		ME	
	$\alpha$	$R_s$	$\alpha$	$R_s$
NBD-DL-Ser	1.04	1.19	1.09	1.45
NBD-DL-Thr	1.07	1.39	1.06	1.62
NBD-DL-His	1.04	1.10	1.06	1.19

#### 【参考文献】

- 1) Z. Chen, J. Lin, K. Uchiyama and T. Hobo, *J. Chromatogr. A*, **813** (1998) 369.
- 2) Z. Chen and T. Hobo, *Anal. Chem.*, **73** (2001) 3348.
- 3) Z. Chen and T. Hobo, *Electrophoresis*, **22** (2001) 3339.
- 4) K. Uchiyama, H. Nakajima and T. Hobo, *Anal. Bioanal. Chem.*, **379** (2004) 375.

## A Dynamic pH Junction Technique for On-line Sample Preconcentration of Peptides in Capillary Electrophoresis

○Koshi Imami, Maria Rowena N. Monton, Shigeru Terabe

*Graduate School of Material Science, University of Hyogo*

A dynamic pH junction technique is used as on-line sample preconcentration method in capillary Electrophoresis to improve detection sensitivity. The focusing mechanism is due to a change in an analyte's migration velocity following a reversal of its electrophoretic direction from the sample matrix to the background solution (BGS). We report selective focusing of some peptides by using a dynamic pH junction. The effects of the pH and the concentration of the sample matrix, and the length of sample injection on efficiency of this technique were evaluated. The size of the original sample plug was reduced by as much as 38-fold, and improvement in detector response in terms of peak height by more than 100-fold was obtained. As this method is compatible with relatively high-conductivity matrices, it can be utilized for the analysis of real samples.

**はじめに** キャピラリー電気泳動 (CE) 分析では、UV検出部の光路長が非常に短いことや、良い分離を得るためには試料注入量が制限されることによる濃度感度の低さが本質的な問題となっている。この問題を解決するためには試料濃縮が必要である。試料濃縮には大きく分けて、CE分析の前に濃縮を行う固相抽出などのオフライン試料濃縮と、キャピラリー内で濃縮・分離するオンライン試料濃縮の二つがある。オフライン試料濃縮では手間、時間を要することからスタッキング、スウィーピング、ダイナミック pH ジャンクションなどのオンライン試料濃縮法が多種開発されている。

ここでは、血圧調節に関わるアンギオテンシン類ペプチドを用い、ダイナミック pH ジャンクションによる濃縮を試みた。ダイナミック pH ジャンクションとは、試料溶液と泳動液を異なる pH に調整した際に、両溶液界面において試料の移動度が変化することを利用した濃縮法である。ペプチド類は、両性化合物でありダイナミック pH ジャンクションの濃縮原理が最大限に活用できるにも関わらず報告例が極めて少ない。そこで本研究では、塩基性泳動液で満たしたキャピラリー内に酸性溶液に調製した試料を従来の CE での試料注入時間 (1~5 s) と比べて大量に注入し (60~100 s)、正電圧を印加して電気泳動を行った。試料導入直後の試料ゾーンは酸性であるためペプチドは正に帯電しているが、陽極方向へ移動する OH<sup>-</sup> の試料ゾーンへの侵入とともに試料ゾーンでの pH が増加し、ペプチドは負に帯電する。その際、試料の移動方向が陰極方向 (検出器方向) から陽極方向に逆転し、試料ゾーンと泳動液ゾーンとの界面で濃縮が起こる。濃縮された試料ゾーンはその後、EOF によって陰極側まで移動され検出される。

本研究では、試料溶液中の pH、注入量、試料溶液濃度をパラメーターとして濃縮挙動への影響を検討した。高い等電点を持つペプチドは pH 変化に伴う電荷変化が少ないため、上述の条件では濃縮が困難だが、試料溶液を塩基性に、泳動液を酸性にすることで濃縮効果が得られたため、この結果についても報告する。

## 実験条件

装置は Hewlett-Packard 3DCE System を使い、フューズドシリカキャピラリー (内径 50  $\mu\text{m}$ 、有効長 50 cm、全長 58.5 cm) を使用した。200 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 11) を泳動液とし、試料のブラジキニン (RPPGFSPFR、 $pI = 12.00$ )、 $[\text{Sar}^1, \text{Ile}^8]$ -アンギオテンシン II (Sar-RVYIHPI、 $pI = 8.75$ )、アンギオテンシン I (DRVYIHPFHL、 $pI = 6.92$ )、アンギオテンシン II (DRVYIHPF、 $pI = 6.74$ ) は 200-1300 mM 酢酸塩緩衝液 (pH 3.5-4.5) に溶解させた。試料注入は圧力法 (50 mbar) で行い、印加電圧+15 kV、検出波長 200 nm で測定を行った。

## 結果

実験から得られた代表的な電気泳動図を図 1 に示す。試料溶液と泳動液の pH としてそれぞれ 4.25、11.0 を用いた場合、中間の pH 付近に  $pI$  を持つアンギオテンシン I、II を選択的に濃縮可能であり、約 100 倍以上の濃縮効果が得られた。高塩濃度下の生体試料の濃縮においては、試料ゾーンの伝導率が泳動ゾーンよりも高くなるために、DESTACKING 効果によってピークがブロードになることが問題であった。ダイナミック pH ジャンクションでは、移動度の変化が両溶液間の伝導率差よりも pH に大きく依存するため、高伝導率試料溶液でもピークがブロードにならずに濃縮効果が得られ<sup>1</sup>、脱塩処理なしで生体試料分析が実現できる可能性がある。また、試料溶液を塩基性、泳動液を酸性に調整した条件では、高い等電点( $pI = 12$ )をもつブラジキニンに対しても約 100 倍の濃縮効果が得られた。

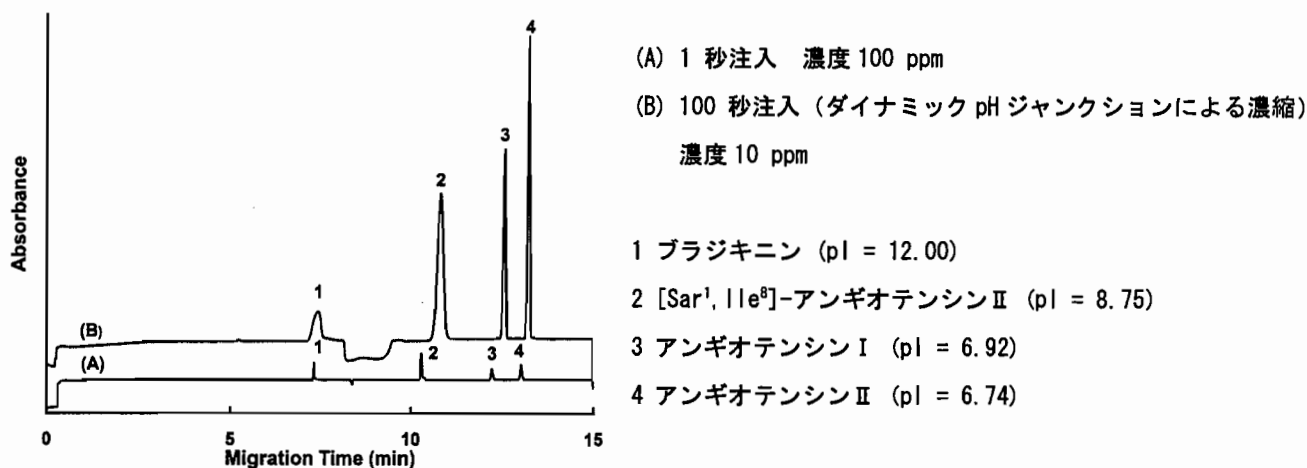


図 1 ダイナミック pH ジャンクションによるペプチドの濃縮

## 参考文献

- (1) Philip Britz-McKibbin and David D. Y. Chen *Anal. Chem.* 2000,72,1242-1252

# SCE '04 P - 13

キャピラリー電気泳動法を用いたアミノ酸の分析

○佐藤康博

大塚電子株式会社

**Analysis of Amino Acids by Capillary Electrophoresis**

Yasuhiro Sato.

Otsuka Electronics Co.

## Abstract

Foods, nutrients, medical supplies etc. contain amino acids or are supplemented with them. Amino acid analysis is therefore important for research and quality control of such commodities. In the present study, capillary electrophoresis was applied to amino acid analysis. Neither pre- nor post-column derivatization was made. By the use of indirect UV absorption technique, seventeen kinds of amino acids were successfully separated and detected by the use of 15 mM heptanesulfonate as the electrolyte. The detection limits were 2 to 5 ppm or lower for most of amino acids. The limit was found further decreased down to as low as 0.5 to 1 ppm or lower for the aromatic amino acids.

## はじめに

アミノ酸は天然のタンパク質を構成する化合物で栄養学上非常に重要な成分である。そのため、アミノ酸は食品、栄養補助剤、化学調味料、医薬品など幅広い製品に利用されている。アミノ酸を簡単に精度高く測定することは、製品の品質管理や研究開発において非常に重要である。

アミノ酸の分析は、一般にアミノ酸を誘導体化することによってイオンクロマトグラフィー(IC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)などにより分析されている。しかし、試料の前処理が煩雑になりやすいことや、測定時間が長いといった問題点もある。

そこで今回、キャピラリー電気泳動を用い、アミノ酸を誘導体化せずに分析できる測定条件について検討をおこなった。

## 実験

キャピラリー電気泳動装置は、大塚電子社製CAPI-3300を用いた。キャピラリーは内径75 $\mu$ m、全長80.0cm、有効長67.5cmの合成シリカ製のものを使用した。条件検討の際には、電気浸透流反転剤を含み、紫外吸収剤を欠いた陰イオン分析用泳動液(pH11.0) (大塚電子)<sup>1), 2)</sup>を用い、ヘプタンスルホン酸(和光純薬)の添加濃度を変化させた。検出はダイレクトUV法により、200nmあるいは220nmで行った。印加電圧は-20kVであった。試料の醤油と日本酒は、どちらも市販品を使用した。

## 結果と考察

測定の対象としたアミノ酸は合計17種類 (Asp, Glu, Cys-Cys, Tyr, Gly, Ser, Ala, Thr, Met, Val, His, Phe, Leu, Ile, Trp, Pro, Lys) である。これらのアミノ酸は、陰イオン分析用泳動液へのヘプタンスルホン酸の添加量が高くなるにつれ分離は向上する傾向が見られたが、他方で測定時間が長くなる傾向が認められた。分析時間を考慮に入れると、15mMヘプタンスルホン酸の添加が分析に最適と考えられた (Fig.1)。

各アミノ酸の検出限界は、紫外吸収の少ないアミノ酸については2~5ppm、それが多い芳香族アミノ酸 (Tyr, Phe, Trp) については0.5~1ppmであった。このように、芳香族アミノ酸については他のアミノ酸よりも高感度分析が可能であることがわかった。また、芳香族アミノ酸3種およびMet、Hisについては220nmに紫外吸収があるので、選択的な検出およびスペクトル情報の活用が可能であることがわかった。

以上に述べた分析条件において、市販の醤油および日本酒中のアミノ酸を分析した結果について報告する。

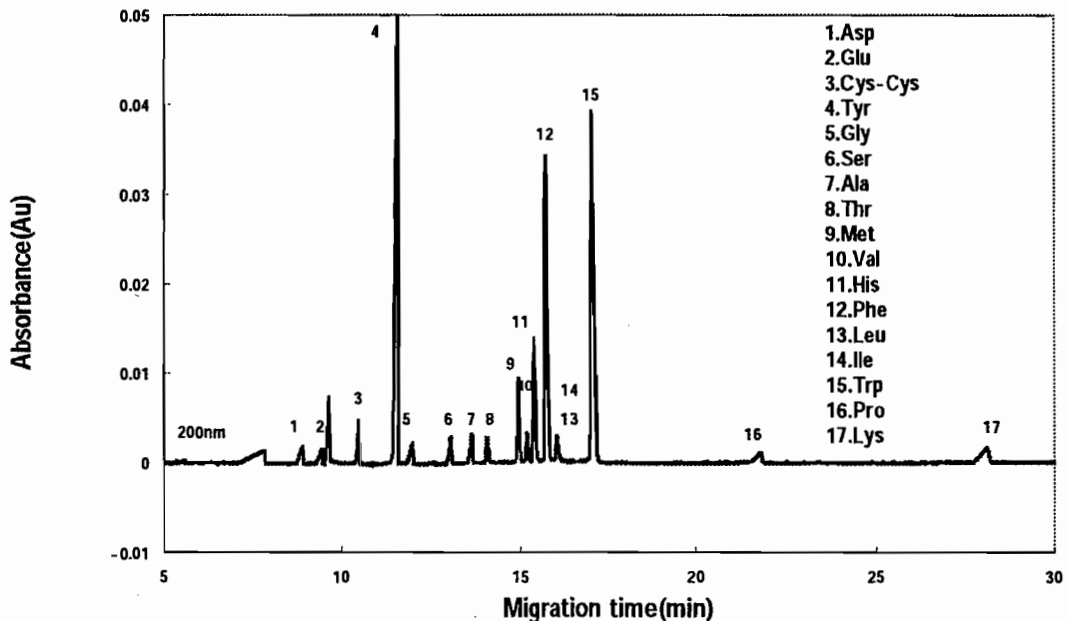


Fig.1 Electropherogram of amino acids (each 50ppm)

## 文献

1. 佐藤康博、第18回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集、107-108(1998)
2. 佐藤康博、第20回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集、156-157(2000)

# SCE '04 P-14

抗ウイルス作用のある藍藻硫酸多糖スピランとその分解産物のキャピラリー電気泳動における実効移動度とストークス半径 (第2報)

○横尾広光<sup>1</sup>, 平岡厚<sup>2</sup>, 李貞範<sup>3</sup>, 林利光<sup>3</sup>, 林京子<sup>4</sup>  
杏林大・保健・<sup>1</sup>基礎物理学, <sup>2</sup>病態生化学, 富山医科薬科大・<sup>3</sup>薬, <sup>4</sup>医

Real Electrophoretic Mobility and Stokes Radius of Spirulan and Its Degradation Products in Capillary-Zone Electrophoresis (II)

○ Hiromitsu Yokoo<sup>1</sup>, Atsushi Hiraoka<sup>2</sup>, Jung-Bum Lee<sup>3</sup>, Toshimitsu Hayashi<sup>3</sup> and Kyoko Hayashi<sup>4</sup>

*Department of <sup>1</sup>Elementary Physics and <sup>2</sup>Pathological Biochemistry, Kyorin University School of Health Sciences, <sup>3</sup>Faculty of Pharmaceutical Science and <sup>4</sup>School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University*

We analyzed Na-Spirulan (Na-SP) (MW: 278,000), an algal acidic polysaccharides with antiviral activities, and its degradation products (MW: 11,000-73,500) by CZE, and reported previously that the activities may be associated with undissociated sulfates. In this study, we have further elucidated that the ratio of the values of  $Q$  (electric charge) and  $r$  (Stokes radius) for the individual sample varies with MW, suggesting differences between spheroidal cases and stick cases in the elongated spheroidal model with the hydrated skin over the surface and the central domain of undissociated sulfates. It has been revealed using the CZE data and our model that the sugar molecules with MWs near 12,200 have the stick form and that the stickness of the molecules with MWs below 10,000 gives disappearance of the central domain responsible for the activities.

1. はじめに: スピラン (SP) は藍藻類が産生する硫酸基とカルボキシル基 (ウロン酸) を持つ酸性多糖であり、*Spirulina platensis* の Ca-SP は抗 HIV 活性を持つ。抗ウイルス活性は硫酸基に由来し、分解産物も活性を示すが、MW が低くなると活性が低下し MW 1 万以下では消失する。<sup>1)</sup> 我々は、Na-SP (MW: 278,000) とその分解産物 (MW: 11,000-73,500) の CZE における挙動<sup>2)</sup> より、この活性が、立体構造により守られている分子内部の電離が抑制された硫酸基の数と相関していることを見出した。<sup>3)</sup> 今回は、これら分子の液体中での立体構造の形状を知るため、さらに CZE のデータを用いて検討した。

2. 測定: CZE (条件は既報<sup>2)</sup>) における温度 5 点での実効移動度に各温度の水の粘性率を乗じて、 $Q$  (分子と周囲の「衣」が持つ電荷) を  $r$  (粘性抵抗を表すストークス半径) で除した商 ( $Q/r$ ) と正比例のする値を求め、分子量との相関を検討した。



3. 結果及び考察:  $Q/r$  値は MW12,200 近辺では一定だが、MW がより大きくなると減じ始める (Fig. 1)。薄い「衣」と非電離硫酸基の「中空」領域を持つ模型(Fig.2)では、球状ならば、 $Q$  は表面積に、 $r$  は分子径に比例するので、 $Q/r$  値は MW の  $1/3$  乗に比例し、棒状では MW の  $0$  乗に比例する。分子の棒状化 (Fig.3) による、粘性抵抗  $\eta$  である  $r$  の変化を考慮に入れて、模型と測定値から、MW12,200 近辺では棒状であり、278,000 でも球状ではない、と言える。MW 低下と棒状化は分子内電離抑制領域の消失にもつながる。

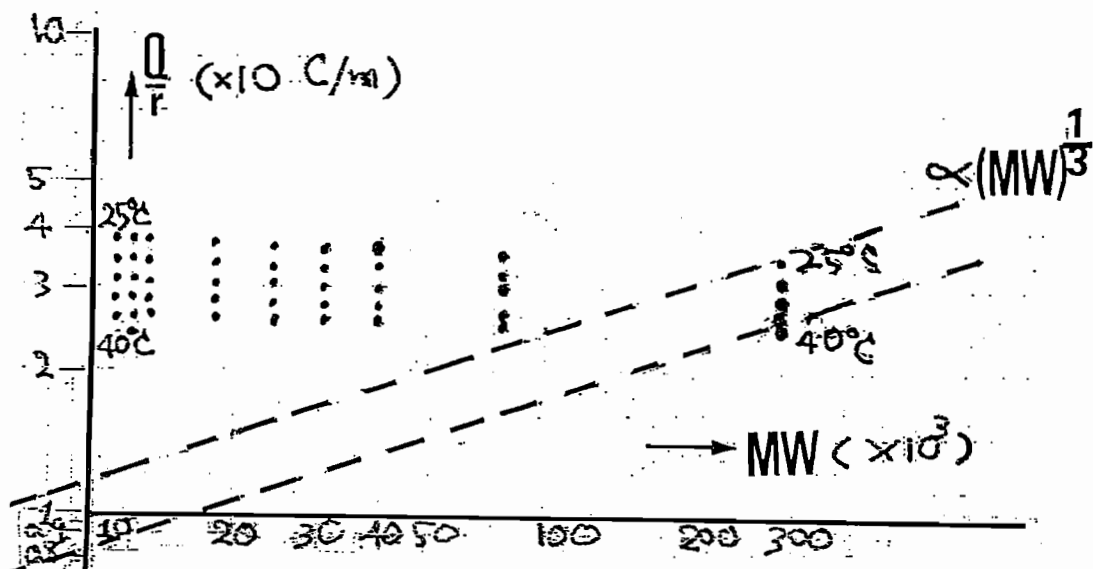


Fig. 1. Correlation between the values of  $Q/r$  and MW

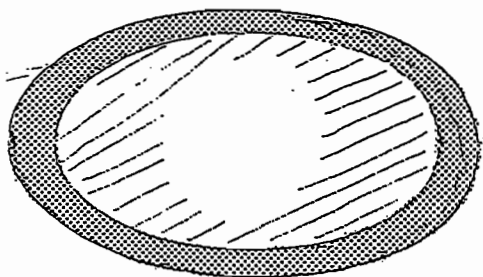


Fig. 2.

The model with skin and central domain

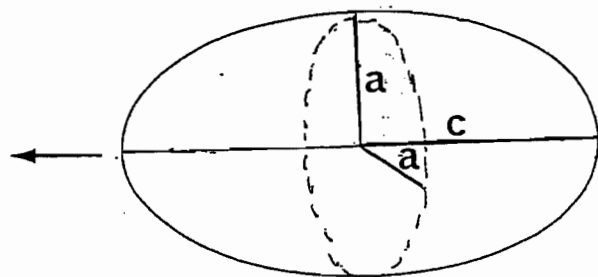


Fig. 3

Moving elongated spheroid

- 1) Lee, J.B., et al., Chem. Pharm. Bull., 49, 108-110 (2001)
- 2) 横尾広光他, 第 23 回キャピラリー電気泳動シンポジウム要旨集, p95 (2003)
- 3) 平岡厚, 平成 16 年度杏林大学学術フロンティア報告書, p57 (2004)
- 4) Lamb, H., Hydrodynamics, 6<sup>th</sup> ed. p604 (1932)

# SCE '04 P-15

## CE-MS を用いた細胞内物質の解析

恩田 優子<sup>1</sup>、○酒井（加藤） くみ子<sup>1,2</sup>、加藤 大<sup>1,3</sup>、  
楯 直子<sup>2</sup>、豊岡 利正<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 静岡県立大学薬学部、<sup>2</sup> 武蔵野大学薬学部、<sup>3</sup>PRESTO（科学技術  
振興機構）

### Analysis of intracellular substances by CE-MS

Yuko Onda, Kumiko Sakai-Kato, Masaru Kato, Naoko Tate, Toshimasa Toyo'oka

<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy /Research Institute of Pharmaceutical Sciences,  
Musashino University

<sup>3</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency

In the postgenomic era, new areas of biological research are needed to relate gene expression to phenotype. The analysis of intracellular substances including proteins and metabolites may offer a profound understanding of physiological activities of cells. Because thousands of different metabolic substances exist in a cell, an analytical method with high resolution is required for a systematic and comprehensive analysis. The combination of capillary electrophoresis (CE) that offers rapid analysis and efficient resolution and mass-spectrometry (MS) with excellent selectivity and sensitivity is expected to enable the comprehensive analysis of diverse classes of intracellular components. In this presentation, we report the analysis of intracellular substances, especially small organic molecules, in HepG2 cells using CE-MS.

#### 1.目的

ヒトゲノム配列の解読が終了した現在、生命科学の次の研究ターゲットはプロテオーム、メタボロームといった、ゲノムにより制御されているタンパク質や情報伝達物質などの生体内物質の動態である。生体内には、低分子化合物でも 1000 種類以上存在すると報告され、それらを網羅的に計測するには、非常に高い分離能を有する分離法が必要である。CE は高分離能を有し、さらに高分解能である MS を組み合わせることにより、混合試料中の構成成分の多くが分離検出されると考えられる。そこで本研究では、ヒト肝癌細胞由来の HepG2 細胞を用い、その細胞内物質の測定を試みた。

#### 2.方法

CE には Hewlett Packard <sup>3</sup>DCE system を、MS には AccuTOF（日本電子）を用いた。試料の前処理条件や、細胞内物質の分離条件は、曾我らの報告[1]を参考に行った。

### 3.結果・考察

アミノ酸混合標準液 H 型（和光純薬）に内標である methionine sulfone を添加した試料を用い、分離条件を検討した。内径 50 及び 75 $\mu\text{m}$  のキャピラリーを比較した結果、内径の細い 50 $\mu\text{m}$  キャピラリーの方が良好に分離された。泳動液に用いるギ酸濃度について検討した結果、濃度が 1 M の時にアミノ酸が良好に分離された（図 1）。

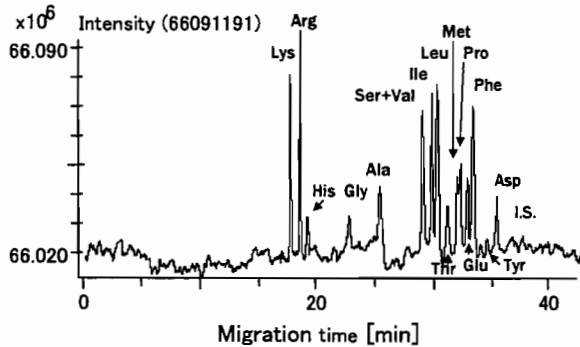


図 1 内標を添加したアミノ酸混合液 H 型（和光純薬）を分離した時のエレクトロフェログラム

次にシース液として 10mM 酢酸アンモニウム/MeOH=1/1 と 1% 酢酸/MeOH=1/1 とを用いた結果、酢酸を用いた方が 4 倍程度 S/N 比が増加した。

以上の泳動条件およびシース液条件を用いて HepG2 の分析を行った。その時の TIE(total ion electropherogram)を図 2 a に示した。この TIE より CODA(component detection algorism)クロマトグラムを用いて m/z が 0.25 刻みでマスエレクトロフェログラムを作製し、観測されたピークに関してはマススペクトルを作製し、ピークの同定を行った。ピークの同定には、泳動時間、質量電荷比、同位体比および KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)を用いた。図 2 b に m/z=89.955-90.155 の SIE(selected ion electropherogram)を示した。 $\beta$ -Ala、Ala 及び sarcosine が検出された。現在までに、標準品を有しているアミノ酸 21 種類の同定を行った。今後はより多くの標準品を入手し同定を行うと共に、アニオン化合物の測定を行う予定である。

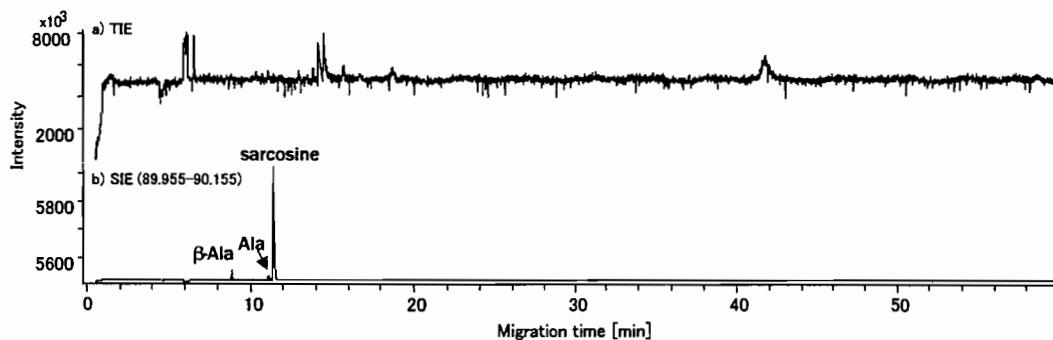


図 2 HepG2 を分析した時の TIE (a)及び SIE (b)

### 4.参考文献

[1] Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T, J. Proteom. Res. 2, 488-494 (2003)

SCE '04  
P-16

キャピラリー電気泳動-質量分析法を用いた燃料電池劣化機構に関する研究

○竹田さほり<sup>1</sup>, 城間 純<sup>2</sup>, 安田和明<sup>2</sup>

産業技術総合研究所

<sup>1</sup>環境化学技術研究部門, <sup>2</sup>ユビキタスエネルギー研究部門

**Investigation of the degradation of fuel cell by capillary electrophoresis-mass spectrometry**

Sahori Takeda\*<sup>1</sup>, Zyun Siroma<sup>2</sup> and Kazuaki Yasuda<sup>2</sup>

*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*

<sup>1</sup> *Research Institute for Innovation in Sustainable Chemistry*

<sup>2</sup> *Research Institute for Ubiquitous Energy Devices*

The application of capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) was investigated to the separation and identification of ionic components generated by degradation of fuel cell membrane. Model degraded sample was prepared by Fenton oxidation of Nafion<sup>®</sup> membrane. Model and control samples were dissolved in water-ethanol or water-isopropanol 1:1 mixed solution, and used for the investigation. In the direct MS detection, as for the cationic components, only the compounds thought to be originated from contamination were detected. As for the anionic components, on the contrary, an unknown compound was observed at m/z 297. In the investigation of CE-MS, the component is successfully separated and the result suggested that this component is a highly acidic compound.

はじめに

固体高分子形燃料電池の実用化には耐久性の実証が不可欠であるが、その劣化機構についてはまだ十分な解明がなされていないのが現状である。そこで本研究では、劣化機構解明の基礎的研究において、固体高分子電解質膜である Nafion<sup>®</sup> の劣化によって生じる可能性のあるイオン性成分の分離・同定を行うため、キャピラリー電気泳動-質量分析法 (CE-MS) による測定について検討した。

実験

CE-MS 装置は、ベックマン・コールター社製 P/ACE MDQ およびブルカー・ダルトニクス社製 Esquire3000plus を CE 用エレクトロスプレーイオン化 (ESI) インターフェースにより接続したものをを用いた。キャピラリーには内径 50 μm、外径 375 μm、長さ 80 cm の内面未処理のフューズドシリカ管を用いた。試料は、Nafion<sup>®</sup> 膜をフェントン試薬を用いて処理した模擬劣化試料および処理操作を行っていない対照試料を、それぞれ水:エタノールあるいは水:イソプロパノール=1:1 の混合溶液に 0.5~1 wt% の濃度でオートクレーブ中で溶解させたものをを用いた。CE-MS における試料注入は加圧法 (2.0 psi, 10 あるいは 30 秒) で行った。泳動溶液は、酸性条件では 50 mM ギ酸、中性

～アルカリ性条件では 25 mM 酢酸アンモニウムおよび 50 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液を用いた。シース溶液は泳動溶液とイソプロパノールあるいはメタノールの 1:1 混合溶液とした。CE の印加電圧は酸性条件では -25 kV、中性～アルカリ性条件では +25kV あるいは +30 kV に設定した。試料の直接導入およびシース溶液の流速は 4  $\mu$ L/min とし、ネブライザーガス圧を 8.0 psi、ドライガスの流量および温度をそれぞれ 4.0 L/min、300  $^{\circ}$ C に設定して測定を行った。

## 結果と考察

まず試料溶液を直接導入し、陽イオンおよび陰イオン検出モードで  $m/z$  50～600 の範囲でそれぞれ MS 測定を行った。ESI 電圧について検討した結果、放電の起こらない最小/最大電圧はそれぞれ -4 kV (陽イオン検出) および +3 kV (陰イオン検出) であったので、以降これらの条件で測定を行うこととした。その結果、いずれの試料についても、陽イオン検出モードでは複数のピークが得られたが、いずれもその  $m/z$  より何らかの原因でコンタミネーションしたフタル酸エステル系可塑剤等に由来するものと推測された。一方、陰イオン検出モードでは  $m/z$  297 に比較的大きな成分のピークが観測された。

次いで、この陰イオン成分の分離と同一化を行うため、CE-MS による測定について検討した。当初、泳動溶液として 25 mM 酢酸アンモニウム水溶液を用い、シース溶液をイソプロパノールとの 1:1 混合溶液、印加電圧を +25 kV として陰イオン検出を行った場合、30 分以内にピークは検出されなかった。これについては、対象となる陰イオン成分の電気泳動速度が電気浸透流に比べて比較的速いためではないかと考えられた。そこで、シラノール基の解離を抑えるため 50 mM ギ酸を泳動溶液に用いて酸性条件とし、印加電圧を反転させ -25 kV で測定を行った。ESI の陰イオン検出においては、いくつかの文献でシース溶液にイソプロパノールを用いると感度が向上することが報告されているが、この条件でイソプロパノールを用いた場合は CE の電流値が安定せず、メタノールを用いることにより測定が可能であった。その結果、泳動時間 16 分程度で  $m/z$  297 の成分が CE のピークとして検出され、この成分はギ酸酸性下においても解離し陰イオンとして泳動する強酸性成分ではないかと推測された。

さらに、再度アルカリ性条件で電気浸透流下での検出を行うために、50 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液を泳動溶液として用いると共に、測定前に 0.1 M アンモニア水での洗浄過程を導入し、シース溶液にイソプロパノールとの 1:1 混合溶液、印加電圧を +30 kV として測定を行ったところ、酸性条件よりも速く約 7 分程度で  $m/z$  297 の陰イオン成分を検出することが可能となった。現在、この成分の構造推定や、異なる  $m/z$  の成分についての探索を検討中である。

## 謝辞

本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託を受けて実施した。

# SCE '04 P-17

## 高アルカリバッファと表面未修飾キャピラリーカラム を用いた CE/MS による陰イオンの分析

○野上 知花、澤田 浩和  
横河アナリティカルシステムズ株式会社

**CE/MS using alkaline buffer solution and uncoated fused-silica capillary  
for the analysis of anions**

\*Chika Nogami and Hirokazu Sawada  
Yokogawa Analytical Systems, Inc.

**Highly Ionic compounds can be separated and detected easily by CE/MS. Nowadays CE/MS attracts a lot of interests as alternative instrument to analyze highly ionic compounds instead of LC/MS.**

**In this study, we investigated CE/MS analysis on small molecular anions mainly small multivalent carboxylic acids. They could be separated under simple analytical condition based on our previous research. The method with alkaline running buffer solution and bare fused silica capillary was applied to the analysis of food sample.**

<はじめに>

CE/MS は高いイオン性を持つ化合物を分離し高感度に検出することができる。近年では、CE 単体では不十分であった感度や定性能を補う有効な検出器として注目を集めている。

イオン性が高い物質は一般に LC の逆相分離条件下ではカラムに保持されにくいため、分析条件の最適化に時間を要することがめずらしくない。分離を向上させるために、イオンペア試薬を移動相に添加する手法もあるが、LC/MS における検出感度を著しく低下させる。また、イオン交換カラムは、使用できる移動相の種類が限られるため、LC/MS に不適である場合が多い。

一方、CE/MS では、化合物のイオン性の違いを分離に利用するので、中空のキャピラリーで分離が可能となる。特に、内面未処理のフューズドシリカキャピラリーを用いると、広い pH 範囲 (2~12) のバッファを使用できる上、非常に安価であるのでコストパフォーマンスが高いという利点がある。また、充填剤への影響を考慮しなくてよいため、前処理が容易で、夾雑物の多い試料の分析に適している。

CE/MS 分析では、揮発性バッファとして酢酸、ギ酸、酢酸アンモニウム、ギ酸アンモニウムを用いるが、いずれも測定対象化合物がイオン性を有する pH に調整する。試料はイオン性を有した状態でイオンソースへと導かれるので、大気圧エレクトロスプレーイオン化 (AP-ESI) に効果的である。また、使用するシースの組成や pH 等を最適化することにより、より高感度な検出が期待される。

本研究では、高 pH の揮発性バッファと内面未処理のフューズドシリカキャピラリーを用い、多価の有機酸を含む低分子有機酸を CE/MS で測定した。本分析条件の概念図を Fig. 1 に示す。陰イオンは陽極であるキャピラリー入り口方向へ泳動するが、陰極となる MS 方向へ生じる移

動度の大きい電気浸透流 (EOF) によって、MS 方向へ運ばれる。その結果、MS にて陰イオンを検出することができる。先の報告<sup>1)</sup>をもとにさらに最適化を行ない、実試料として飲料中の有機酸を高感度かつ良好な再現性で測定したので報告する<sup>2)</sup>。

#### <実験>

マレイン酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、iso-クエン酸、等の低分子有機酸を測定対象化合物とした。測定試料のリンゴジュースは超純水で 200 倍に希釈した。分析に使用した装置を以下に示す。キャピラリー電気泳動装置 (Agilent CE system)、イオントラップ型質量分析計 (Agilent 1100 MSD/Trap) 或いは四重極型質量分析計 (Agilent 1100 MSD)、シース液用ポンプ (Agilent 1100 Binary Pump)、CE と MSD を接続するインタフェース (G1603A Agilent CE-MS Adapter Kit) 及びスプレー (G1607A Agilent CE-ESI-MS Sprayer kit)、全ての装置を一括制御するソフトウェア (Agilent ChemStation)。

キャピラリーには、内面未処理のフューズドシリカキャピラリー (内径 50 $\mu$ m、全長 80cm 或いは 100cm) を使用した。泳動バッファには、20mM ギ酸アンモニウムを基本とし、0.1N アンモニア水で pH 調製したものをを用いた。シース液には、5mM アンモニウム in 50%メタノール水溶液を用いた。印加電圧+20kV 或いは+30kV、注入は加圧法で行なった。

#### <結果と考察>

pH10 において目的の有機酸が良好に分離した。また、シース液の組成、流量などの各種パラメーターの最適化を行なうことで、感度の向上を図ることができた。本分析条件は、高感度かつ良好な再現性を示し、実試料分析にも対応でき、コストパフォーマンスに優れた汎用性の高い陰イオン分析条件であることが確認された。これらの結果に基づき、他イオン性物質の分析についてさらに検討を進めている。

#### <文献>

- 1) C. Nogami, H. Sawada, H. Yanai, in : Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Symposium on Capillary Electrophoresis, 2002, p. 63.
- 2) H. Sawada, C. Nogami : Analytica Chimica Acta, 507 (2004) 191-198

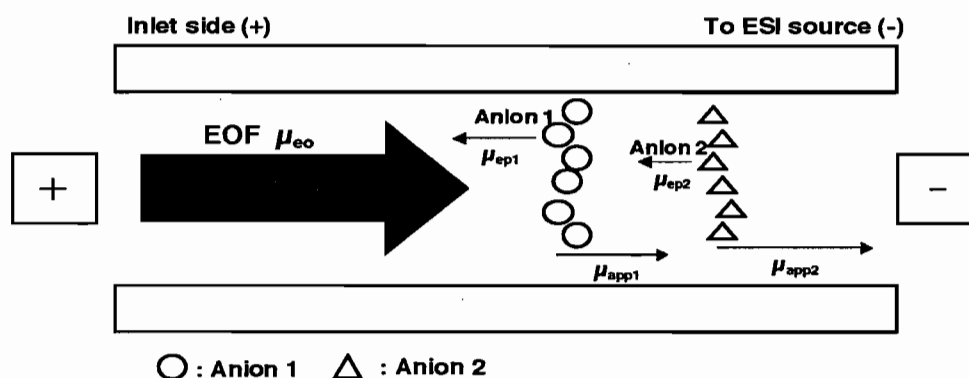


Fig.1 The schematic illustration of anion analysis by CE/MS using alkaline buffer solution and an uncoated fused-silica capillary

# SCE '04 P-18

## オンライン電気透析-フリーフロー電気泳動装置の開発 (II)

○梶村康平、育田夏樹、廣川健  
広島大学大学院工学研究科

### Development of Online Electrodialyzer - Free Flow Electrophoresis apparatus (II)

Kouhei Kajimura, Natsuki Ikuta, Takeshi Hirokawa  
*Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

A convenient sample-preparation method is necessary for the analysis of biopolymers such as DNA and proteins in bio-samples. Although free flow electrophoresis (FFE) can be used for such purpose, coexisting chloride (about 0.9% as NaCl in biofluids) hindered efficient fractionation. Then the samples were dechlorinated by an online electrodialyzer (ED) and fed to a free flow electrophoresis unit (ED-FFEU). Consequently, DNA and proteins in chicken muscle could be successfully separated. In this paper, we discussed the design of ED and FFE separation of the above sample.

#### 緒言

ヒトゲノム解析が終了し、全てのタンパク質の機能・構造を明らかにするプロテオーム解析やメタボローム解析が急がれている。これらの研究を進める上で、生体試料の分離・検出法として電気泳動が用いられている。フリーフロー電気泳動 (FFE) では試料の連続分取が可能であり、生体試料中タンパク質と DNA の粗分離・分画に有効であると考えられる。しかしながら、FFE における泳動距離は短く、十分な電気量が供給できないため、試料中の塩の影響を受けて十分な分離ができないことがある。特に体液には約 0.9%の塩が存在するため、この塩と目的成分に分離に多くの電気量が消費されてしまう。従って、目的成分を効率的に分離・分取するには試料の脱塩が必要不可欠である。そこで本研究では、電気透析により、生体試料中の DNA やタンパク質等を少ない電気量で分離できる塩濃度まで脱塩し、その後 FFE で分離分取する目的で、「オンライン電気透析-フリーフロー電気泳動装置」(ED-FFEU)の開発を行った。電気透析を行なうことで  $\text{Na}^+$  や  $\text{Cl}^-$  などの小さなイオンは脱塩されるが、DNA やタンパク質などの高分子イオンは試料中に留まる。その結果、高分子イオンの分離の場が大きくなり効率的な分離が期待できる。

#### 実験

ED-FFEU 全体の概要を図 1 に示す。フリーフロー電気泳動装置には Dr. Weber 社製 OCTPUS を用いた。この装置は泳動槽本体、高電圧電源装置、泳動槽の温度調節器で構成されている。泳動層厚さを 0.4mm、泳動層角度  $45^\circ$ 、サンプルフロー 0.055ml/min、メディアフロー 3.27ml/min、印加電圧は 200V、陽極液に HCl10mM (pH8.10 tris で調整)、陰極液にプロピオン酸 40mM (pH8.10 tris で調整) とした。電気透析装置は本体にアクリル、電極に白金電極、イオン交換膜にアンプレックス (旭化成) を



用いて製作した。陽極液にプロピオン酸 100mM、陰極液に NaOH100mM を用いた。電極間電流 10mA、電圧 3V を印加した。試料は鶏肉 2g をホモジナイズし、TE バッファー 10ml で抽出したものを使用した。この試料溶液の塩濃度は NaCl 換算で 0.13% であった。

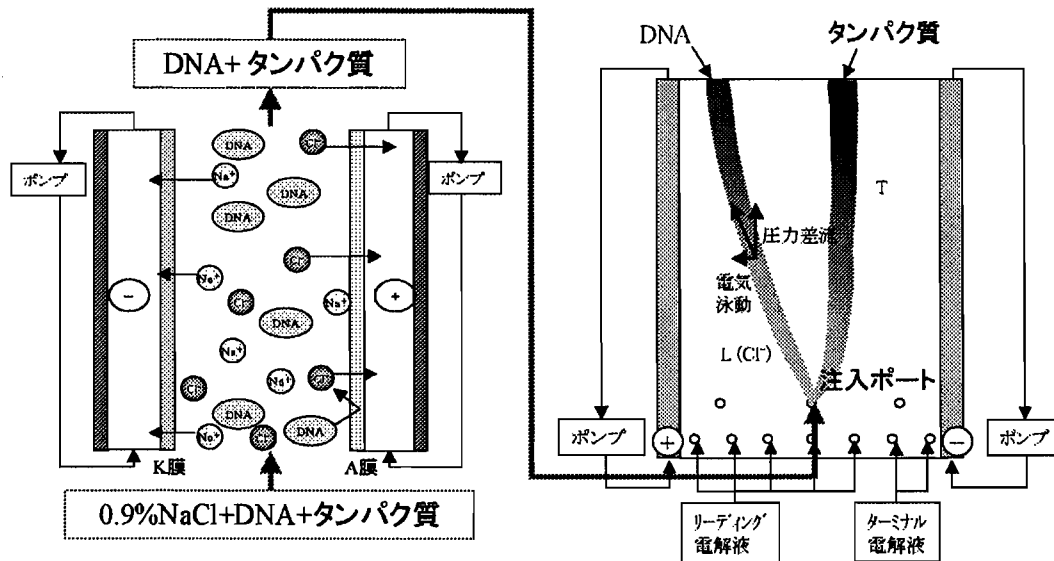


図1 オンライン電気透析-フリーフロー電気泳動装置の概略図

### 結果および考察

DNA とタンパク質の分離に対する電気透析の効果を検証した結果を図2に示す。電気透析を行わなかった場合、検出されたピークは2つだった。これは共存イオンが多く、DNA とタンパク質などの分離に必要な電気量が十分でなかったためと考えられる。

一方、電気透析を行った場合、ブロードであったピークがシャープになり、かつピークが3本に分離しており、分離能が向上していることがわかる。UV吸収スペクトルからフラクション No.30~40 のピークは DNA、残りのピークはタンパク質であった。そこで、試料成分中の小イオン濃度を電気透析前後で比較するため CZE で測定したところ、電気透析前には多く存在した  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、リン酸などが電気透析後では電導度から 99.5% 除去できていることが確認できた。以上のことから、ED による小イオンの選択的除去により DNA やタンパク質などの分離に使われる電気量が増えた結果、FFE の分離能が向上したことが確認できた。

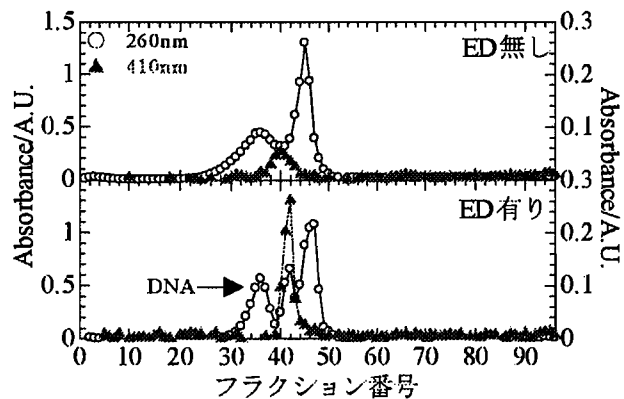


図2 電気透析の効果

# SCE '04 P-19

## グラジエント充填カラムを用いたキャピラリー電気クロマトグラフィー

○小田豊治、北川慎也

名古屋工業大学大学院工学研究科物質工学専攻

### Capillary electrochromatography using gradient column

Toyoharu Oda\*, Shinya Kitagawa

Department of Materials Science and Engineering, Graduate School of Engineering,  
Nagoya Institute of Technology

The gradient column was developed to achieve high performance separation by simple equipment. The gradient column was packed with two kinds of packing materials (teicoplanine and anion-exchanger modified silica-gel particles), and its mixing ratio was programmed at the position of the column. To evaluate the gradient column, the separation of D,L-tryptophan by pressurized flow-driven capillary electrochromatography was performed. The separation factor of D,L-tryptophan was decreased with application of negative voltage. Namely, the similar effect of gradient elution could be induced by the application of negative voltage.

#### [緒言]

クロマトグラフィーでは、分析時間の短縮・高性能分離を行うために、移動相組成を順次変化させてゆくグラジエント溶離が良く用いられる。移動相組成のグラジエントを行うためには、通常、複数のポンプや適切なミキサーなど種々の装置が必要であり、装置の複雑化が避けられない。我々は、より簡便なシステムで移動相組成のグラジエント法と同等な効果を得ることが可能である「グラジエント充填カラム」の開発を行った。すなわち、カラムの部位により、試料の線流速及び試料の保持比が変化するカラムを開発した。開発したグラジエント充填キャピラリーカラムを、圧力差流を用いるキャピラリー電気クロマトグラフィーにより評価を行った。

#### [実験]

実験装置は送液ポンプ(LC-10AD, 島津, 京都)、インジェクター(model 7410, RHEODYNE, USA)、自作キャピラリーカラム(内径: 0.15 mm, 充填長: 23.5 cm, 全長: 35.0 cm)、紫外線検出器(CE-2075, JASCO, 東京)、直流電圧装置(HCZE-30 PNO.25-LDS, 松定プレシジョン, 東京)からなる。試料注入はスプリットインジェクション法を用いた。グラジエント充填カラムは2種類の充填剤の混合比を調整し、混合した充填剤をスラリー充填することで作成した。充填剤にはテイコプラニン修飾充填剤(CHIROBIOTIC T, dp 5 μm, 東京化成)と陰イオン交換充填剤(SAX, TSK gel

IC-Anion-SW, dp 5  $\mu\text{m}$ , 東ソー) の二種類を用いた。充填剤の混合比はカラム入り口から出口方向に対して、テイコプラニン修飾充填剤の混合比を大きくした。グラジエント充填カラムの充填剤の混合比と充填長は、カラム入り口から出口方向に対して、テイコプラニン修飾 : SAX = 5 : 5 (6.0 cm)、7.5 : 2.5 (8.5 cm)、10 : 0 (9.0 cm) である。作製したカラムを用いて D,L-トリプトファンの分離を行った。高電圧はカラムの出口側に印加した。

[結果]

Figure 1 にグラジエント充填カラムを用いた D,L-トリプトファンの電気クロマトグラフィーによる分離例を示した。電圧印加により発生する電気浸透流の影響を除去するため、Figure 1 の時間軸 (x 軸) には、 $t_R/t_0$  を用いている。ただし、 $t_0$  はチオ尿素の溶出時間を用いた。D,L-トリプトファンの保持時間の差は、カラム出口側にマイナスの電圧を印加すると大きくなり、カラム出口側にプラスの電圧を印加すると小さくなった。Figure 2 に D,L-トリプトファンの分離係数と印加電圧の関係を示した。電圧を印加することにより分離係数が変化し、マイナスの電圧を印加すると D,L-トリプトファンの分離係数が、電圧の大きさに比例するように小さくなった。これは、グラジエント充填カラムに電圧を印加することにより、保持の大きいサンプル(D-トリプトファン)の溶出時間がより短縮されたためである。グラジエント充填カラムを用いることで、移動相組成のグラジエントと同等の効果が得られることが確認できた。

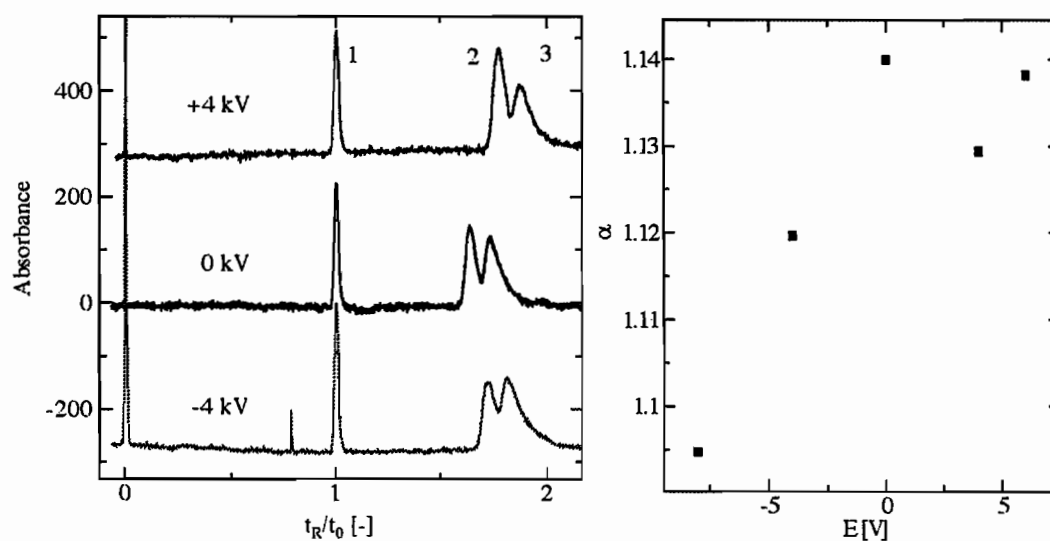


Figure 1 Separation of chiral compounds by p-CEC. Sample: 1.thiourea, 2.L-Tryptophan, D,L-Tryptophan on applied voltage 3.D-Tryptophan; Column: i.d. 150  $\mu\text{m}$ , whole length 35.0 cm, packed length 23.5 cm; Eluent: 1 mM Potassium dihydrogenphosphate; Detection: 254 nm

Figure 2 Variation in Resolution of using gradient column.

# SCE '04 P - 20

## 電気泳動の原点：Reussの実験再訪

○豊田純也<sup>(1)</sup>, 福土恵一<sup>(1)</sup>, 高木俊夫<sup>(2)</sup>

(1)神戸大・海事科学, (2)大阪大学名誉教授

### Origin of Electrophoresis: Revisit to the Experiment of Reuss

Junya Toyoda<sup>(1)</sup>, Keiichi Fukushi<sup>(1)</sup>, Toshio Takagi<sup>(2)</sup>

(1) Faculty of Maritime Sciences, Kobe University, (2) Prof. emeritus, Osaka University

A Russian physicist Reuss observed electroosmosis and electrophoresis for the first time in 1807. In the present study, the historical experiment was followed as to be acquainted with the basic electrokinetic phenomena, electroosmosis and electrophoresis. A couple of glass tubes were inserted into a wet block of potter's clay in a plastic box being suitably separated, and were filled with tap water or deionized water. A couple of platinum wires were inserted into the tubes to work as an anode and a cathode, respectively. Serially connected dry batteries or a constant power supply working in either voltage or current mode was used to supply electric current. After electric current was supplied, clay particles were observed to ascend into water increasingly from the clay surface in the bottom of the anode tube. This phenomenon can be attributed to the electrophoretic migration of clay particles. On the other hand, the water level in the cathode tube began to rise while that at the anode behaved in contrary. This phenomenon can be ascribed to electroosmosis. Thus the experiment of Reuss was successfully reproduced. Effects of the applied voltage, the distance between the electrodes, and kinds of potter's clay on the electroosmosis and electrophoresis were examined in detail. The experiment will be demonstrated at the poster site of the Symposium.

#### はじめに

現在まで、キャピラリー電気泳動法 (CE) に関する論文は引き続き発表されているが、CE それ自体は、いまだ実用的分析法として市民権を確立するまでには至っていない。一方では、マイクロチップ電気泳動法が提唱され、従来の電気泳動の枠を越えて広範囲な研究も行われるようになってきたが、新たな研究の方向性を見いだす時期に来ているのではないかと考える。このような時期にあって、電気泳動法の原点である電気浸透および電気泳動現象について改めて考えることは意義深いものと思われる。それが CE の将来について考えるきっかけとなり、新たな展開につながることを期待される。

上記二つの現象は、Tiselius の学位論文<sup>1)</sup>にも記されているように、1807 年、ロシアの物理学者 Alexander Reuss により初めて実験的に観察されたと言われている。その後、高木<sup>2)</sup>は Reuss の実験を追試し、両現象を確認した。そこで本研究では、Reuss の実験をより詳細に行ってみることにした。すなわち、水を入れた 2 本のガラス管を粘土に立て、両ガラス管内の電極に電圧を印加できるようにした簡単な装置を組み立て、電気浸透および電気泳動現象を観察した。この際、印加電圧、電極間の距離、粘土の種類等を変化させ、これらが電気浸透流および電気泳動の速度に与える影響について検討した。以上の結果について報告する。

## 実験

本研究に用いた装置を図1に示す。プラスチック容器(33×105×65 mm)に市販の陶芸用粘土を充填し、2本のガラス管(長さ61 mm)を7 mmの深さまで挿入した。ガラス管内に40 mmの高さまで水を満たし、両ガラス管内に挿入された電極(直径0.7 mm, 長さ66 mmの白金線)間に電圧を印加した。電源として、9 V乾電池を直列に接続したもの、あるいはアトー製AE-8150電気泳動用電源装置を使用した。一定時間ごとに、上昇した陰極側水面高さおよび陽極側粘土粒子高さを測定した。(1)印加電圧(18~54 V), (2)両電極間の水平距離(2~6 cm), (3)電極先端と粘土表面との距離(2.5~20 mm), (4)ガラス管内径(6, 8, 10 mm), (5)粘土の種類(信楽赤土, 信楽古陶土, 志野土), (6)水の種類(水道水あるいは蒸留水)を変化させ、水面および粘土粒子の上昇速度に対する影響を調べた。

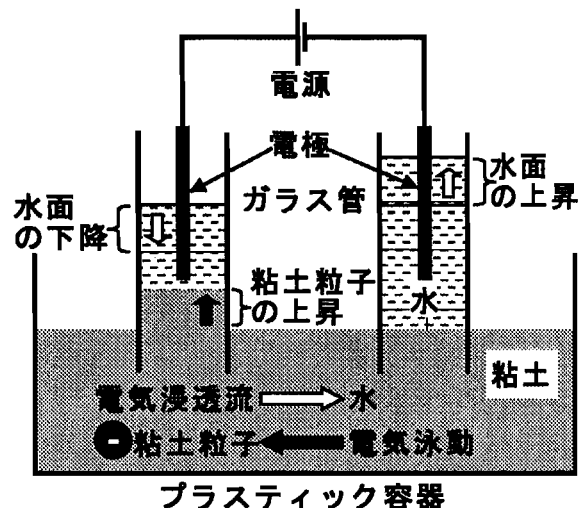


図1 実験装置

電源: 9 V乾電池を直列に接続, あるいは定電圧定電流電源; 電極: 直径0.7 mm, 長さ66 mmの白金線; ガラス管: 内径6~10 mm, 長さ61 mm; 粘土: 陶芸用; プラスチック容器: 33×105×65 mm.

## 結果と考察

電源として乾電池を使用した場合、陰極側水面上昇速度(電気浸透流速)に関する結果は以下の通りである。(1)印加電圧: 陰極側水面上昇速度は電圧の上昇とともに増大し、最初の5 mm上昇に要した時間に比べて、次の5 mm上昇に要した時間の方が短かった。これは、粘土粒子が上昇した分、電極先端と粘土表面との距離が短縮されたためである。なお、45 Vと54 Vとでは、水面上昇速度に大きな差はなかった。(2)両電極間の水平距離: 水面上昇速度に大きな変化は見られなかった。粘土塊部分の流路が非常に狭いため、あまり影響がなかったものと思われる。(3)電極先端と粘土表面との距離: 距離が短くなるにつれて、水面上昇速度は増大した。これは、粘土塊内の電位勾配が増大し、電気浸透流速が増大したためであると考えられる。なお、2.5 mmと5.0 mmとではほとんど差が見られなかった。(4)ガラス管内径: 粘土塊内の状況は管径とは無関係であり、電気浸透流速にはほとんど影響がなかった。(5)粘土の種類: 粘土粒子のコロイドは、志野土>信楽古陶土>信楽赤土の順に安定であり、コロイドが安定な粘土ほど電気浸透流速は高かった。(6)水の種類: 水道水の方が蒸留水より電気浸透流速が高かった。水道水の場合、電流値が高く、その結果、粘土塊内の電位勾配が増大したためであると推定される。なお現在、定電圧定電流電源を使用し、陽極側粘土粒子上昇速度に関する実験を含め、同様の実験を行っている。

- 1) A. Tiselius: "The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins", *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Uppsala.*, Ser. 4, Vol.17, No.4, pp. 1-107 (1930).
- 2) 高木俊夫: "電気泳動の歴史", pp. 1-113 (1997) (アトー(株)).

# SCE '04 P-21

## マイクロチップ電気泳動における過渡的等速電気泳動 前濃縮過程の直接観察

○高山 洋一, 育田 夏樹, 廣川 健  
広島大学大学院工学研究科

### Direct observation of the transient isotachophoretic preconcentration process on microchip devices

Yohichi Takayama\*, Natsuki Ikuta, Takeshi Hirokawa  
*Graduate School of Engineering, Hiroshima University*

Transient isotachopheresis (tITP) is an effective on-line preconcentration method for capillary electrophoresis and microchip electrophoresis. We have developed a high-sensitive microchip gel electrophoresis (MCGE) method on a single channel microchip for the analysis of DNA fragments and SDS-proteins by using electrokinetic injection with tITP preconcentration. However, tITP on a conventional cross-geometry microchip is difficult because the voltage at the cross part may change during the migration process. In this study, we directly observed the tITP-CZE process on the cross-geometry microchip varying reservoir voltages to develop a new analytical method. The procedures preventing the split of samples at the cross part and achieving smooth transition from tITP to zone electrophoresis were studied considering the results obtained by computer simulation.

#### はじめに

マイクロチップ電気泳動(MCE)では、有効分離チャンネル長が短く、試料仕込み体積も少ないため、分離能および濃度感度が低いという問題がある。この問題を解決するため、過渡的等速電気泳動(tITP)によるオンライン前濃縮法を適用することにより、DNA断片やSDSタンパク質の検出感度を通常法に比べ20~30倍向上することに成功している[1-2]。これらの実験にはシングルチャンネルマイクロチップを使用した。従来型のクロスチャンネルチップ(図1)においてtITP前濃縮を行う場合、各ポートに一定電圧を供給したままでは、クロス部に到達した試料ゾーンが乱れてしまい、濃縮効果を十分に発揮できない。本研究では、この問題を解決するメソッドを開発するため、顕微鏡下でtITPの直接観察を行い、シミュレーションの結果と共に、ポート電圧の分離挙動に対する影響を検討した。

#### 実験

tITP挙動の直接観察のため、CCDカメラ(東芝製)、高圧電源(松定プレシジョン製)、およびマイクロチップからなる装置を製作した。電解液および試料注入操作はシリンジを用いて手動で行った。まず、マイクロチップにリーディング電解液(LE: 50mM HCl, 2%HPMC, クレアチニンでpH4.8に調整)を充填した後、マイクロピペットを用いて試料導入Port(図1のPort3)にアニオン色素(SPADNS, ギニアグリーンB)を充填し、電氣的注入を行った。次に、Port3をターミナル電解液(TE: 10mM カブロン酸, 2%HPMC, クレアチニンでpH4.8に調整)で置換し、tITP前濃縮を行った。その後、Port3をLEで置換し、ゾーン電気泳動(ZE)

に移行させて各試料ゾーンを分離した。

### 結果と考察

試料および電解液を Port3 から注入する場合、Port1 および Port2 への印加電圧 ( $V_1, V_2$ ) およびクロス部の電圧 ( $V_{cross}$ ) がクロス部以降の試料泳動挙動に影響する。そこ

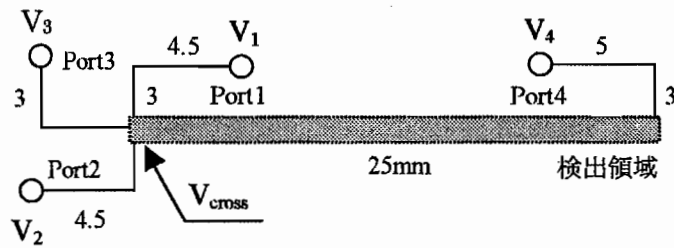


図1 クロスチップの概略図

で、 $V_3, V_4$ をそれぞれ 0V(アース), 400V に固定し、 $V_1=V_2$ を 0, 50, 100, 150, 200V と変化させて泳動挙動を観察した。いずれの条件でも、試料ゾーンはクロス部到達前に等速電気泳動(IITP)の定常状態になった(図2)。しかしその後の挙動は  $V_1=V_2$  の値によって大きく異なっていた。図3に示すように、 $V_1=V_2=0\sim 150V$  の場合、一旦試料の一部が Port1,2 方向へリークした後、LE が Port1,2 方向から Port4 方向へ流入した。シミュレーションによると、この現象は  $V_{cross}$  が一定でなく、試料がクロス部通過時に  $V_1=V_2 < V_{cross}$  となったためと考えられる。この結果、クロス部通過後の試料は ZE に移行し、試料ゾーンが次第に広がった。ただし、その広がりには  $V_1=V_2$  が 150V に近づくにつれ抑えられた。これは Port1,2 からの LE 流入が少なくなるためと考えられる。一方、 $V_1=V_2=200V$  の場合、 $V_1=V_2 > V_{cross}$  となり、試料ゾーンが Port1,2 方向へ流出したが、その後は IITP 状態が継続した。以上の結果より、クロス部到達時に IITP ゾーンを保つためには、Port1,2 方向への電流がゼロになるように  $V_1, V_2$  を動的に設定し、通過後は電流が流れるように電圧を設定すれば自動的に ZE に移行させることができると考えられる。以上の考察を元に、今後は Port3 を LE で置換することなく、自動的に iITP-CZE に移行させて試料を分離するシステムについて検討する予定である。このためには、時間とともに変化する各 Port の電流値をモニターし、iITP から ZE への移行を自動的に制御できるシステムを構築する必要がある。講演ではシミュレーションの結果や実測した泳動挙動の動画を用いて詳しく報告する。

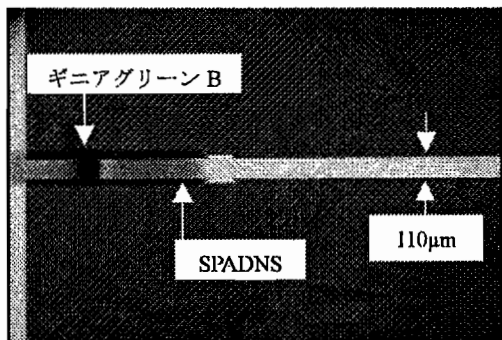


図2 定常状態の様子( $V_1=V_2=50V$ )

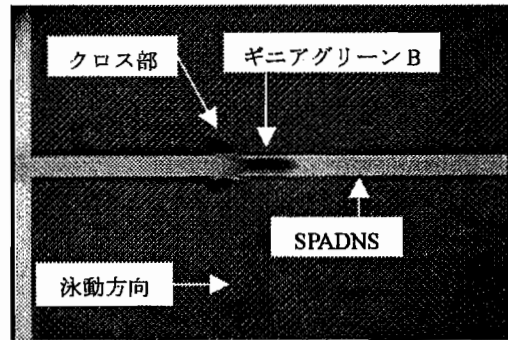


図3 LE 流入の様子( $V_1=V_2=50V$ )

### 文献

- [1] Z.Q.Xu, T.Hirokawa, T.Nishine, A.Arai, *J.Chromatogr. A*, 990 (2003) 53.
- [2] Z.Q.Xu, T.Ando, T.Nishine, A.Arai, T.Hirokawa, *Electrophoresis*, 24 (2003) 3821.

SCE '04  
P - 22

過渡的等速電気泳動前濃縮-CZE による  
生体関連試料中カチオンの分析(2)

○岡本 光<sup>1</sup>, Andrei R. Timerbaev<sup>2</sup>, 廣川 健<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大学大学院工学研究科、<sup>2</sup>Vernadsky Institute

Capillary zone electrophoresis determination of cations in biological fluids using on-line  
preconcentration by transient isotachoporesis (2)

Hikaru Okamoto<sup>1</sup>, Andrei R. Timerbaev<sup>2</sup> and Takeshi Hirokawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chemistry and Chemical engineering, Graduate School of Engineering, Hiroshima University

<sup>2</sup>Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Capillary electrophoresis (CE) with indirect UV detection was used for the simultaneous determination of lithium, magnesium, calcium, creatinine, carnitine and a number of amino acids in human serum. The target analytes, displaying cationic functions under acidic electrolyte conditions, were separated with positive separation voltage polarity using 10 mM 4-methylbenzylamine, 4.5 mM citric acid, 25% (v/v) methanol at pH 4.05 as background electrolyte providing optimal separation. When analyzing real samples, however, some peaks were broadened due to essentially destacking conditions. In order to maintain the separation efficiency and also enhance the detection sensitivity, transient isotachoporesis (tITP) sample stacking was applied. The limit of detection values with tITP preconcentration were 0.11-0.26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for metal cations, 1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for creatinine and 9.8-25.1  $\mu\text{M}$  for histidine, lysine, arginine and ornitine. The accuracy of the developed tITP-CZE system was verified by consistent results for  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and creatinine obtained in analyzing two serum certified reference materials. Sample preparation required was only ultrafiltration and acidification (to release protein-bound alkaline earths), and working ranges for individual analytes corresponded well to clinical concentration ranges.

**【はじめに】** キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) において高塩濃度試料中微量成分を分析する際、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  のような大量成分が妨害する場合が多い。我々は海水 ( $\text{NaCl}$  濃度 約 3 %) 分析においては、共存する  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  を試料の希釈無く同時に分析できることを報告している[1]。これは、支持電解液に錯形成剤(クエン酸)を添加して主成分イオン( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )の移動度に差をつけ、 $\text{Li}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  に対して試料組成に基づく過渡的等速電気泳動前濃縮 (tITP、 $\text{Na}^+$ :リーディングイオン、 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ :ターミナルイオン)を適切に用いることにより達成された。本研究では human serum ( $\text{NaCl}$  濃度 約 0.8 %) 中のカチオン分析を目的として、海水中  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  分析用に開発した支持電解液を改良・最適化し、過渡的等速電気泳動前濃縮による高感度化を試みた。

**【実験】** 試料としては標準試料 (NIST 909b human serum Level I と II) および市販の human serum (Sigma, lot Nos. 22K8948 と 034K8937) を、限外ろ過 (MWL 5000) により除タンパクして用いた。支持電解液は 10 mM 4-methylbenzylamine (UV 可視化試薬)、0-4.0 mM クエン酸、0-25 % (v/v) メタノールを含み、2-エチル-n-酪酸で pH 4.05-4.80 に調節して用いた。ターミナル電解液としては 0.3 M HC を用いた。電気泳動装置は CAPI-3200 (大塚電子) を用いた (キャピラリー内径 75  $\mu\text{m}$ 、全長 100 cm、有効長、87.7 cm)。試料注入は落差法 (試料注入) および吸引法 (ターミナル電解液注入) で行った。印加電圧は +30 kV、検出は間接 UV 吸収 ( $\lambda=214 \text{ nm}$ ) で行った。



**結果と考察】** Fig.1 に海水中  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  分析用電解液を用いて得られた human serum のエレクトロフェログラムを示した。 $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  およびクレアチニンの濃縮不十分なピーク (図中番号 8-10) が観察された。これは試料中に最も高濃度で存在する  $\text{Na}^+$  イオン (約 3000 mg/l) がこれらイオンの濃縮に影響した結果である。もし、試料中に  $\text{Mg}^{2+}$  より移動度が小さいイオンが高濃度で存在するならば、海水分析の場合、 $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  イオン)、試料組成に基づく tITP による濃縮を期待できるが、本試料中には存在しないので、濃縮のためにはターミナル電解液を試料導入後に充填する必要がある。Fig.2 に tITP-CZE により得られたエレクトロフェログラムを示した。tITP の効果により Fig. 1 で濃縮不十分であったピークの濃縮が確認できた。また、Fig.1 で検出できなかったカルニチンを検出できた。しかしながら、本電解液では未分離の部分 Fig.2 中の 2-3、5-7 および 9-10) が存在する。そこで、電解液条件 (pH, 錯形成試薬濃度、有機溶媒濃度) を改良し、分離最適化を行なった。最適電解液条件で得られたエレクトロフェログラムを Fig.3 に示した。

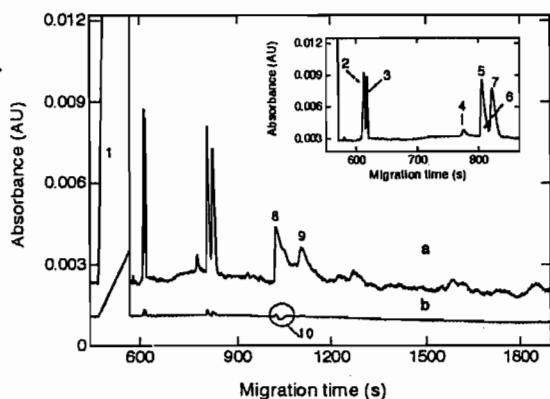


Fig.1. 海水中  $\text{Li}$ ,  $\text{Sr}$  分析用電解液を用いた CZE により得られた human serum のエレクトロフェログラム。試料 human serum (Lot 22K8948, SIGMA) +  $\text{Li}$  (4 ppm). 支持電解液: 10 mM 4-メチルベンジルアミン, 1.5 mM クエン酸, pH 4.8 (2-エチル-n-酪酸)。試料注入 落差法 (80s, 12 mm)。検出: a) 214 nm, b) 230 nm (creatinine)。1:  $\text{Na}$ , 2:  $\text{Li}$ , 3: unknown, 4: Orn, 5: Lys, 6: His, 7: Arg, 8:  $\text{Ca}$ , 9:  $\text{Mg}$ , 10: creatinine。

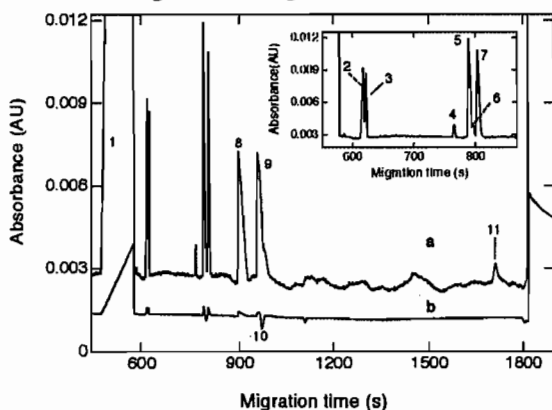


Fig.2. tITP-CZE により得られた human serum のエレクトロフェログラム。ターミナル電解液 (T) 0.3 M  $\text{HCl}$ 。試料注入 落差法 (80s, 12 mm), T 注入 0.5s (吸引法)。11: carnitine。他の条件は Fig.1 と同じ。

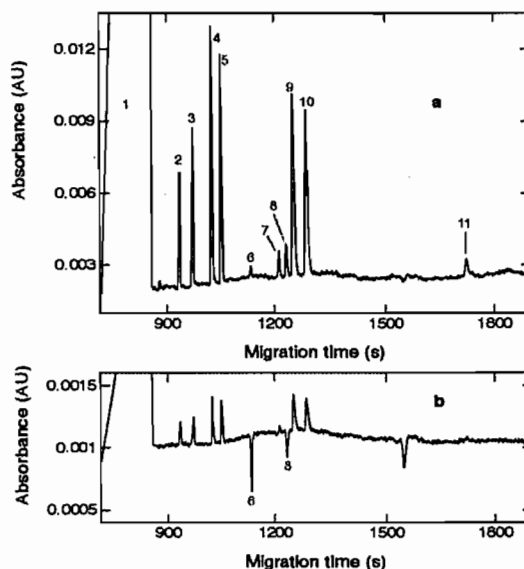


Fig.3. 最適電解液条件で得られた human serum のエレクトロフェログラム。支持電解液: 10 mM 4-メチルベンジルアミン, 4.5 mM クエン酸, 25% メタノール, pH 4.05 (2-エチル-n-酪酸)。1:  $\text{Na}$ , 2: unknown, 3:  $\text{Li}$ , 4:  $\text{Ca}$ , 5:  $\text{Mg}$ , 6: Creatinine, 7: Orn, 8: His, 9: Lys, 10: Arg, 11: carnitine。他の条件は Fig.2 と同じ。

定量分析のためには、限外ろ過前の試料に対し 100mM 相当の塩酸を添加する必要がある。これは、試料中に共存するタンパク質から  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  イオンを解離させるためである。標準試料 NIST 909b human serum Level I と II) を試料中  $\text{Na}^+$  を内標準とみなして標準添加法により定量した結果は、 $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ 、クレアチニンに関して保証値とよく一致した。

文献[1] H. Okamoto, Y. Okamoto, T. Hirokawa and A.R. Timerbaev, *Analyst*, 128(12) (2003) 1439.

SCE '04  
P-23

過渡的等速電気泳動前濃縮を用いたキャピラリー  
電気泳動法の半導体分野への応用

○笹 一志  
大塚電子株式会社

**Application of Capillary Electrophoresis with transient isotachophoretic  
preconcentration for the Manufacturing of Semiconductors.**

Katsushi Sasa\*

Otsuka Electronics Co.

For the quality control of large-scale integrated circuits of semiconductor, ionic contaminants both in the materials and the solutions should be determination in every processes of the manufacturing. Capillary electrophoresis is suitable for the purpose because of short analysis time and simplicity in sample handing. Capillary electrophoresis(CE) in combination with transient isotachophoresis(IITP) as on-line pre-concentration technique was applied to analyses of cations and inorganic ions in the materials and the solutions using manufacturing of semiconductors.

**【はじめに】**

半導体分野において、キャピラリー電気泳動法は薬液の成分分析や材料中の不純物のイオン分析に良く使用されている。しかし、それに従って、微量成分分析の要求が望まれるようになった。キャピラリー電気泳動 (CZE) の高感度検出に、過渡的等速電気泳動 (IITP) - CZE によるオンライン濃縮法がある。この濃縮法は、海水中のヨウ素イオンなどの無機陰イオン分析に応用されている<sup>1) 2)</sup>。

今回、この濃縮法を用いて陽イオンと無機陰イオン分析をおこない従来の試料導入方法と濃度感度の比較をおこなった。そして、半導体分野に用いられている薬液や材料中の微量イオン成分の分析へ応用した。

**【実験】**

キャピラリー電気泳動装置として大塚電子 CAPI-3300 を用い、これに内径 75  $\mu$ m, 全長 80cm (有効長 67.5cm) の熔融シリカキャピラリーを装着して測定をおこなった。

陽イオン分析には、イミダゾール緩衝液の泳動液を用いて分析をおこなった。

また、無機陰イオン分析には電気浸透流を反転させるジエチレントリアミンを含んだモリブデン酸緩衝液の泳動液を用いて分析をおこなった。

それぞれのイオンの標準液は、関東化学社製のイオンクロマト用試薬をもちいた。

検出感度の比較は、落差法の試料導入でその注入量は落差 25mm, 注入時間 90s でおこなった。また、IITP 前濃縮における試料導入は吸引法 (減圧 0.5kgcm<sup>-2</sup>) でおこなった。

### 【結果と考察】

tTTP 前濃縮とは、一次的に等速電気泳動をおこなうことで濃縮させる方法である。この方法は、陽イオンや無機陰イオンなどのイオン分析に有効な方法である。図に試料導入法の落差法と tTTP 前濃縮による陽イオン混合液 ( $K^+$ ,  $Na^+$  各 0.5ppm) の測定結果を示す。TITP 前濃縮は、リーディング液として  $NH_4^+$ 、ターミナル液として  $Ca^{2+}$  を用いておこなった。

その結果、tTTP 前濃縮は落差法より 10 倍以上の感度が得られることがわかった。

検量線においても、0.05 から 1.0ppm の範囲で  $K^+$  と  $Na^+$  とともに相関係数、 $R^2=0.9999$  と良好な結果が得られた。

また、塩素などの無機陰イオンにおいても同様な結果が得られ、半導体分野に用いられる薬液や材料中のイオン分析をおこなった。

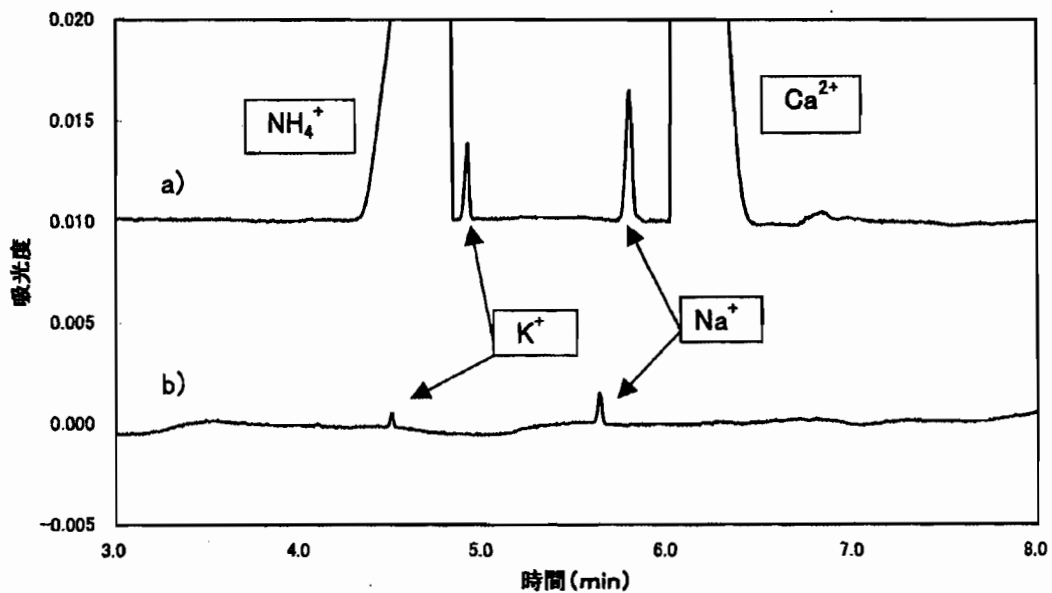


図. 陽イオン分析 ( $K^+$ ,  $Na^+$  : 各濃度 0.5ppm) のフェログラム  
a) tTTP 前濃縮    b) 落差法による試料導入

### 【参考文献】

1. K. Yokota, K. Fukushi, N. Ishio, N. Sasayama, Y. Nakayama, S.-I. Wakita, *Electrophoresis*, 24(2003)2244
2. T. Hirokawa, T. Ichihara, K. Ito, A. R. Timerbaev, *Electrophoresis*, 24(2003)2328

# SCE '04 P - 24

キャピラリー電気泳動による粒子状クロムのスペシエーション

鷹屋 光俊

独立行政法人産業医学総合研究所

Speciation of chromium in particulate matters using

Capillary Electrophoresis

Mitsutoshi Takaya

National Institute of Industrial Health

Analytical methods for chemical state of a fume constitution element such as manganese and chromium are needed to control the toxicity of weld fume. In preset study, speciation of chromium in particulate matter was investigated. Chromium was detected UV absorption at 330nm as tris-acetylacetonato chromium and isolated from acetylacetonone by MEKC using SDS. Chromium (III) changes to acetylacetonone complex in the neutral and weak basic water solution, chromium (VI) changes to the complex on the strong acidic condition, respectively. Oxides of the chromium and acetylacetonone were made to react without solvent. Chromium (III) had no reaction with acetylacetonone, absolutely. As for the chromium (VI), tris-acetylacetonato chromium was formed quantitatively. Therefore, chromium oxide (VI) can be analyzed selectively from this result. And, the analysis of the chromate becomes possible by optimizing a condition.

Keywords, capillary electrophoresis, MEKC, chromate, acetylacetonone, speciation

1.はじめに 多くの金属類はその化学状態により有害性が異なり、元素濃度に加え、酸化状態等の化学状態を知るスペシエーションが必要とされている。液体試料のスペシエーションは、HPLCやイオン交換法等が多く用いられ、CEも有望な方法の一つとされている。一方、試料が固体の場合、溶解操作そのものが化学状態を変化させる反面、抽出試薬・条件を制御して、特定の化学種のみ溶液中に固液抽出することが可能である。本研究では、この選択的抽出によるスペシエーションの一つとして、粒子状クロム化合物に対し、アセチルアセトン（以下AA）を無溶媒で作用させることにより酸化クロム(VI)のみを選択的に錯体とした。このクロムのAA錯体(CrAA<sub>3</sub>)をSDSによるMEKCで未反応のAAより分離することにより酸化クロムを分析する方法を開発した。この方法の概要と、CrAA<sub>3</sub>のCEによる分析条件の最適化について報告する。

## 2. 実験及び結果

2-1 試薬・機器 標準試料として、金属のアセチルアセトン錯体（同仁）、金属酸化物（高純度化学）、クロム酸塩（和光純薬、メルク）を用いた。その他の試薬は、各社の特級試薬を用いた。CEはHP(現Agilent)製

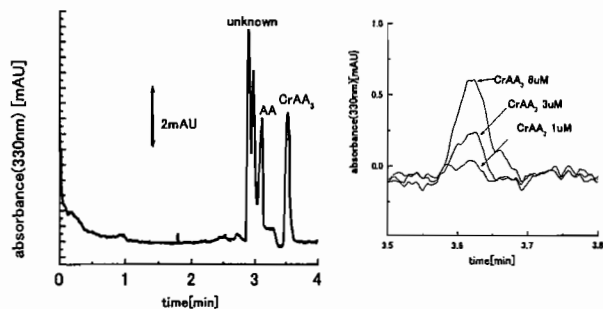


図1 CrAA<sub>3</sub>のエレクトロフェログラム (左図30μM)

右図CrAA<sub>3</sub>付近の拡大図

## 2-2 クロムAA錯体のCEによる分析

クロムとAAは反応する速度が遅い反面、分解速度も遅く、過剰量のAAと錯体をキャピラリー中で分離しても錯体が分解することは無く、泳動バッファーにAAを加える必要は無かった。この他、キャ

ピラリー径・温度・印加電圧・SDS添加量などを変化させ最適値を求めた。(図1左) その結果、

試料中に予め 0.1% の AA を加え錯体とした試料で、キャピラリー全長/有効長/内径が 480mm/400mm/75  $\mu$ m 印加電圧 30kV, 泳動液 100mM TRIS-塩酸 pH8.0, 17mM SDS, 温度 20 $^{\circ}$ C, 検出波長 330nm の条件で 3  $\mu$ M のクロムの検出を可能にした。(図 1 右)

### 2-3 粒子状クロム酸化物と AA の反応

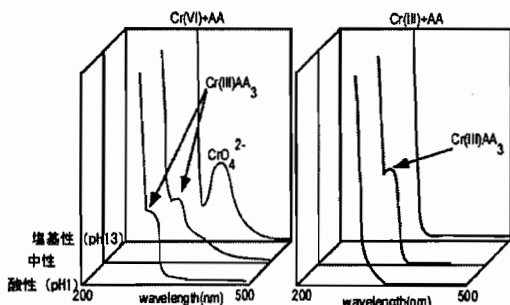


図 2 水溶液中の Cr と AA の反応

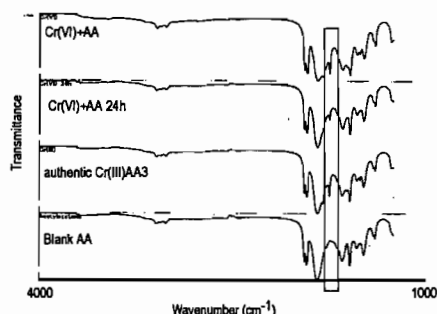


図 3 クロム酸化物と AA の反応生成物の

#### IR スペクトル

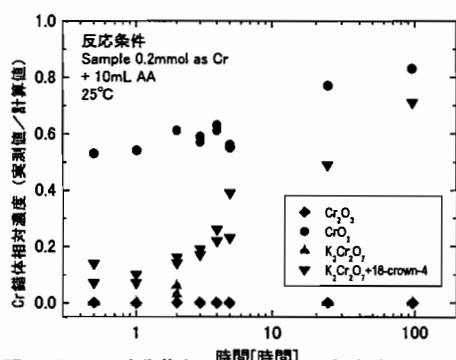


図 4 クロム酸化物と AA の反応で生成する CrAA3 濃度の時間変化

2-1 で開発した CE による CrAA<sub>3</sub> の分析法の応用として水溶液中のクロム(III)とクロム(VI)の分別分析を行うこととし、水溶液中のクロム(III)イオンおよびクロム(VI)酸イオンとアセチルアセトンとの反応を UV 吸収により調べた。その結果、中性-弱塩基領域においてクロム(III)が錯体を生成する反応の他、酸性領域でクロム(VI)が CrAA<sub>3</sub> を生成する反応が観測された。

(図 2) この反応をクロム(VI)の選択的検出に応用するために、反応条件の最適化を試みたが、定量的に反応は進行しなかった。クロム(VI)と AA の直接反応は、酸性条件で進行する傾向があることは確認できたので、より強い酸性条件として水を用いず、粒子状の酸化クロムと AA を反応させることにより CrAA<sub>3</sub> が生成することを IR により確認した(図 3)。この反応の反応収率の時間変化を CE で測定したのが図 4 である。図に示すように、粒子状クロム化合物に AA を直接作用させることにより無水クロム酸のみを選択的に検出可能だった。また、ニクロム酸カリウムでは、AA との反応は進行しなかったが、カリウムをクラウンエーテルでマスクすることにより、AA とニクロム酸の反応は進行した。これにより、粒子状クロムと AA との反応と、CE による検出の組み合わせは、粒子状クロムをクロム(III)とクロム(VI)の酸化別分析の他、クロム(VI)の存在状態も区別可能なスペシエーション法として適用可能であることが分かった。

### 3 おわりに

アセチルアセトンは、錯形成・溶媒抽出試薬として広く用いられているが、無溶媒で用いることにより、酸化物を選択的に分析できるという新たな機能を見い

だした。クロム以外の金属で行った予備的実験の結果では、一般に有害性が高いとされる価数の高い(酸化力のある)化合物がアセチルアセトンとの反応速度が大きいという傾向があり、毒理学や環境管理の分野で、有用な試薬となる可能性がある。現在、クロムの他マンガン、バナジウムなどの酸化状態別分析の条件決定や、溶接ヒュームなどの実試料への応用を検討中である。

文献 鷹屋光俊：作業環境, 25(2), 64-71, 2004

SCE '04  
P-25

新規芳香族 EDTA 類縁体を用いる遷移金属イオン錯体の  
超高感度直接蛍光検出 CE の開発

○段坂直樹, 齋藤伸吾, 星座  
北見工業大学工学部

Ultratrace determination of transition metal complexes with an aromatic EDTA  
derivative using LIF-CE with direct fluorometric detection

○Naoki Danzaka, Shingo Saito, Suwaru Hoshi

*Department of Applied and Environmental Chemistry, Kitami Institute of Technology*

#### Abstract

In this study, we developed a direct laser-induced fluorescence capillary electrophoresis (LIF-CE) for transition metal complexes with a synthesized aromatic polyaminocarboxylate as a pre-capillary derivatizing agent. The agent possesses both a Methyl-EDTA moiety to bind with metal ion and a fluorescein moiety as a fluorophore. The complexes with transition metal ions have emissive characteristics, when even the metal ions are paramagnetic. This seems to relate to distance between a fluorophore and a chelating moiety. Applying to LIF-CE ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ), the complexes with  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  ions were selectively detected and completely separated, while other metal complexes ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$ ) were undetectable. This implies that the detected complexes were kinetically inert and others were labile, since the complexing agent was not added to electrophoretic carrier solutions and dissociation reactions took place for active complexes. The low ppt-level detection was achieved for four detected metal ions (4.2 ppt for  $\text{Mn}^{2+}$ ) without any concentration steps. This pre-capillary system was applicable to environmental samples.

【緒言】従来の金属イオンに対するキャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) の問題点として、以下の点が挙げられる。1) 最も一般的な紫外外部吸光検出法では、試料マトリクスの影響を大きく受けること。2) 金属間分離にオンキャピラリー錯平衡を伴う場合、泳動液中に錯形成試薬 (吸光/蛍光試薬) が存在するため、バックグラウンドノイズの揺らぎが大きくなり高感度検出が困難であること。特に蛍光検出 CE の多くは間接検出で行われており、高感度検出が困難である ( $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{ M}$  レベル)。そこで、オンライン濃縮による高感度検出法が開発されているが、検出時における再現性、測定試料の導電率が検出特性に大きく作用する等の問題点も存在する。そこで感度、選択性の最も良い直接蛍光検出法が望ましいが、a) 常磁性金属イオンは、通常、発蛍光性錯体を形成しないことと、b) ブランクレベルを下げるために発蛍光性配位子を泳動液に添加しない場合には、錯体の解離反応不活性が検出に必要となるため、これまで用いられてこなかった。本研究で我々は、新規な芳香族ポリアミノカルボン酸を合成することにより、上記の問題点を克服し、オンライン濃縮を用いることなく遷移金属イオンに対する ppt レベルのプレキャピラリー誘導体化-直接蛍光検出法の開発に成功した。配位子設計として配位子は常磁性金属とも発蛍光性錯体

を形成し、かつ速度論的に安定な錯体を形成することが必要となる。本研究では、発光部位と錯形成部位の間にスペーサーを導入し、両部位間距離を長くすることにより発光性を持たせ、かつ錯形成部位として Methyl-EDTA 骨格を有する配位子 L (Fig. 1) を合成し、その CE 分離検出挙動を調査した。

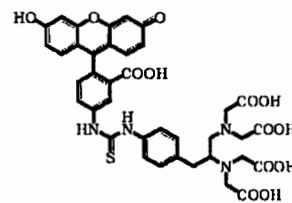


Fig. 1 Chemical structure of L.

【実験】装置条件：高電圧電源は松定プレジジョン製 HCZE-30P，レーザー誘起蛍光検出器は Picometrics 製 ZETALIF を用い CE 装置を作製した。Ar レーザーの出力は 15.5 mW，励起波長は 488 nm とした。試料の調整および CE 条件：Fluoresceinisothiocyanate isomer-I (FITC-I) および 1-(4-aminobenzyl) ethylenediaminetetraacetic acid (ABEDTA) 溶液を混合し、恒温槽で 50℃ に保ち暗所に静置 (~12 時間, pH 5.00) することで FITC-ABEDTA (以下 L, Fig. 1) の合成を行った。金属イオンを含む試料溶液に合成した L および pH 緩衝溶液 (pH 10.0) を添加し、水で定容とし錯形成反応完了後、落差法により 10 nL 注入した。泳動溶液はリン酸 pH 緩衝溶液 40 mM (pH 12.00) およびドテシル硫酸ナトリウム (SDS) 10 mM を添加したものをを用いた。また、印加電圧は 20 kV とした。

【結果と考察】フルオロセインを基本骨格とするアミノ基蛍光ラベル化試薬である FITC-I に ABEDTA を反応させ、芳香族 EDTA 類縁体 L を合成した。L の光吸収バンド ( $\epsilon_{\max} = 493$  nm) は Ar レーザーの発振波長 (488 nm) とほぼ一致するため、レーザー誘起蛍光 (LIF)-CE 法の検出感度を最大限に利用できる。CE に適用する前に、合成した L と  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  および  $\text{Hg}^{2+}$  の金属イオン錯体のバッチ系での蛍光測定を行った。その結果、配位子設計通りに、上記金属錯体において発光性 ( $\lambda_{\text{ex}} = 493$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 513$  nm) を確認できた。これらの金属錯体をプレキャピラリー誘導体 LIF-CE に適用した結果、 $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ -L 錯体および試薬の完全分離を達成し、直接蛍光検出することに成功した (Fig. 2)。これは上記 4 つの金属錯体が解離不活性であることに基づいていると考察した。一方、 $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  および  $\text{Hg}^{2+}$ -L 錯体は検出する事ができなかった。これはキャピラリー内においてこれら金属錯体がオンキャピラリー解離したことによると考察した。このことは本法では解離速度論的および空間的分離が重疊して作用していることを示唆している。通常、金属イオンの CE 分離では動的な錯形成平衡を用いることが多いが、本法は錯形成試薬を泳動液に添加しないため、錯体それ自体の移動度の差異により空間的分離がなされている。検出に際し、他の金属イオンによる妨害はほとんど無く、検出感度は  $\sim 10^{-11}$  M と高感度検出が可能であった。また実試料として河川水標準物質 (JAC 0031) に適用した結果、認証値と一致し測定可能であった。

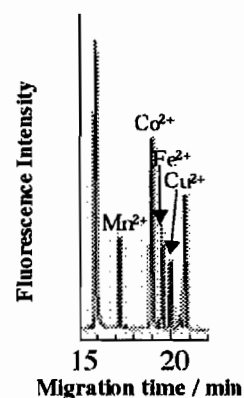


Fig. 2 Typical electropherogram of metal-L complexes. Sample: [metal] =  $2 \times 10^{-7}$  M, [L] =  $1 \times 10^{-6}$  M, [Borate] = 2 mM Carrier buffer (pH 12.00): [phosphate] = 40.0 mM, [SDS] = 10.0 mM

SCE '04  
P - 26

## 超微量金属錯体の速度論的識別モードキャピラリー電気泳動法におけるシアノホルマザン配位子の検討

東北大院環境

○高橋 透, 竹原 由香, エスカンドル エイドリアン カンボサノ, 壹岐 伸彦, 星野 仁

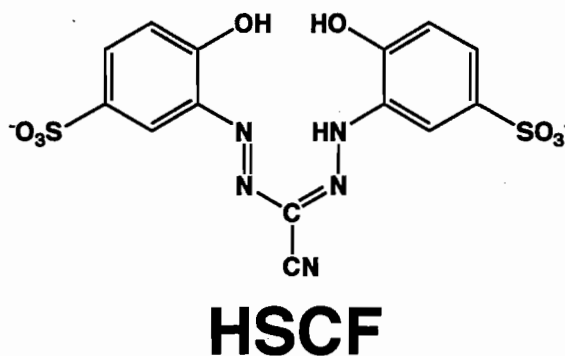
Cyanoformazanes as Pre-capillary Chelating Reagent in Kinetic Differentiation Mode  
Capillary Electrophoresis for Ultratrace Metal Complexes

Graduated School of Environmental Studies, Tohoku University

\*Toru Takahashi, Yuka Takehara, Escandor Adrian, Nobuhiko Iki, Hitoshi Hoshino

1,5-bis(hydroxyl-5-sulfophenyl)-3-cyanoformazan (HSCF) and its derivatives have been examined as pre-capillary derivatization reagents for the determination and separation of ultratrace metal ions by kinetic differentiation mode (KD) capillary electrophoresis (CE), where only kinetically inert complexes should be detected because of no addition of the chelating reagent in an electrophoretic buffer. Surprisingly, Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions were detected as HSCF chelates in the CE separation stage, although they had been thought to form kinetically labile complexes judging from their large rate constants for water exchange on their aqua complexes.

**【緒言】** 速度論的識別モード (KD-) キャピラリー電気泳動 (CE) システムは、泳動緩衝溶液に配位子を添加しない金属イオンのプレキャピラリー誘導体化 CE である。それ故、配位子由来のバックグラウンド吸収がなく、検出器の性能を十分に活用した高感度検出が可能となる。さらに、キャピラリー中では金属錯体近傍から遊離の配位子が常に除去されるため、速度論的に不安定（解離反応活性）な錯体は泳動中に遊離して検出されず、速度論的に安定（解離反応不活性）な錯体だけが検出される。これまで、KD-CE 用適合配位子としていくつかの配位子系が検討されてきた<sup>1)</sup>が、ここでは、特に、金属イオンと比較的剛性の高い錯体構造を有する錯体を形成することが期待される。四座ホルマザン配位子に着目した、ホルマザン化合物として、水溶性アニオン錯体を生成する 1,5-bis(hydroxyl-5-sulfophenyl)-3-cyanoformazan (HSCF) を検討した。HSCF は、O, O, N, N を配位原子とする四座配位子で多くの場合金属イオンと 1:1 錯体を生成する。



**【実験】** 試薬：使用した試薬類は、すべて市販特級品あるいは分析用規格のものを用いた。



配位子 (HSCF) は、シアノ酢酸とアミノスルホフェノールとをジアゾカップリングさせることで合成した。CE 装置：大塚電子製 CAPI-3200 に全長 51 cm, 有効長 39 cm の熔融シリカキャピラリー (内径 50  $\mu\text{m}$ ) を装着して用いた。試料の注入は落差法 ( $\Delta h = 2.5\text{cm}$ , 60 sec) を用い、分離は定電圧モード (20 kV) で行った。検出波長は 600 nm とした。金属錯体溶液：金属イオン溶液 ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{VO}_2^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ) に配位子溶液および、緩衝溶液 (MOPS, pH 7) を加え、60°C で 10 分間加熱し錯形成させた。

**【結果と考察】** バッチ系において、HSCF は、今回調査したすべての金属イオン ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{VO}_2^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) と概ね pH 3-9 の範囲で定量的に錯形成するが、KD-CE 系 (泳動緩衝溶液の pH 8.84) では、 $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{VO}_2^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  の金属錯体種がフェログラム上にピークを与えた (Fig. 1)。 $\text{Mn}^{2+}$  に由来するピークは、その泳動時間から考えて、錯形成反応に伴って  $\text{Mn}^{2+}$  から  $\text{Mn}^{3+}$  した錯体であること、HSCF と三座 (O, O, N) で配位していることなどが示唆される。一方、ここで注目すべきは、アコ錯体の配位水分子の交換速度定数から考えて、通常は解離反応活性と考えられている  $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$  のピークが検出されていることである。

これは、HSCF 錯体の比較的剛性の高い錯体構造に起因するものであると考察した。HSCF をプレキャピラリー誘導体化試薬として用いる KD-CE 法の超微量  $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$  定量法としての可能性を検討した。 $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$  の検量線は  $10^{-7} \sim 10^{-5}$  M の範囲で良好な直線性を示し、ブランクシグナルの  $3\sigma$  から算出した検出限界は、それぞれ 0.557  $\mu\text{M}$  および 2.29  $\mu\text{M}$  (2.79 fmol および 11.5 fmol, 但し、試料注入量 5 nl に対する絶対量感度) と極めて高感度であった。

以上、今回検討した HSCF は、KD-CE 法のプレキャピラリー誘導体化試薬として有用であることがわかった。ハードなドナー原子 (O) を導入した HSCF の KD-CE システムでは比較的ハードな金属イオンに対する選択性を示した。この様なドナー原子の違いによる金属イオン選択性の発現を期待して、比較的ソフトなドナー原子 (N) を導入したホルマザン配位子を新たに設計、合成し、現在その KD-CE システムでの検討を行っている。

**【文献】** 1) 壹岐伸彦, 分析化学, 51, 495 (2002).

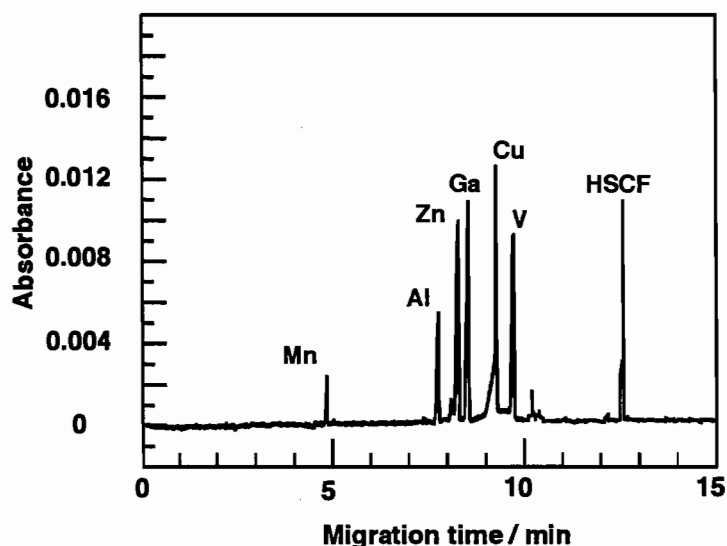


Fig1. Typical electropherogram of metal HSCF chelates. Sample :  $[\text{M}] = 3 \times 10^{-5}$  M,  $[\text{HSCF}] = 1 \times 10^{-3}$  M,  $[\text{MOPS}] = 5 \times 10^{-2}$  M (pH 7.0). Electrophoretic buffer :  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 1 \times 10^{-2}$  M (pH 8.84).

