博士論文要録

新規添加剤を用いるキャピラリー電気泳動法における 分離能改善の研究

森 勝 伸

学位授与：北海道大学（2001年9月28日）

キャピラリー電気泳動（CE）は、内径 100 μm 以下のキャピラリー管内に電解質溶液を満たし、その両端に高電圧を印加して電気泳動する分析法であり、高理論段を有し、高い分離能を示すことができる分離分析法として注目されている。しかし、CE の実際試料への適応のためには、幾つかの問題点がある。例えば、生体試料を対象とする場合、通常の溶融シリカ製キャピラリーの内壁表面が負に帯電しているため、塩基性タンパク質との強い静電吸着が発生し、タンパク質あるいはそれらを含む試料の分析を困難にさせる。また、海水のような高濃度の塩を含む試料を対象とする場合、電流値の急激な上昇に伴うジュール熱の発生が見られ、通常の CE にはあまり向いていない。更に、工業廃棄物や環境ホルモンといった有機汚染物質は、多くの構造異性体や位置異性体が含まれるため、それらに対応して高い分離能を有する泳動システムの開発が急務とされている。本研究では、これらの問題を解決するため、主に新規添加剤を導入することで新たな泳動系の開発を行い、その分離に対する最適化を図った。

第1章“序論”では、CE が有する特徴、現在までに至る歴史、そして分析分野における位置付けを示した。更に、CE が抱える未解決な問題と幅広い分析試料に対する分離改善の必要性を背景に、研究の目的とその概要について述べている。

第2章“キャピラリー電気泳動の原理、装置及び解析法”では、CE の分離原理及び装置図を示し、本研究で用いられた泳動系において得られたデータの解析方法について簡潔にまとめた。

第3章“キャピラリー電気泳動におけるタンパク質吸着の抑制剤としての両性界面活性剤の利用とその応用”では、キャピラリー内壁表面上へのタンパク質の吸着を抑制するための修飾剤の検討を行った。幾つかの界面活性剤と親水性ポリマーをそれぞれ泳動液に添加し、糖タンパク質であるアビジンとその関連物質を含む6種類のタンパク質のキャピラリー内壁表面への吸着抑制効果について調べた。結果として、両性イオン界面活性剤を泳動液に添加

することにより、pH 5 から 9 までの広領域の泳動条件下において、タンパク質の電荷にかかわらず、ピーク理論段や泳動時間について高い再現性を得ることができた。更に、この泳動系にアビジン-色素（HABA）複合体を添加し、アビジンに対し強い親和性を有する水溶性ビタミンである、ビオチンとの交換反応を利用したビオチンのオンライン高感度分析を行った。その結果、キャピラリーカラム内での交換反応によるビオチンのピークが試料濃度に依存しながら増大することが分かり、ビタミン剤中のビオチンの定量を簡便に行うことができた。

第4章“両性イオンミセルキャピラリー電気泳動における無機陰イオンの泳動挙動”では、無機陰イオンに対する両性イオンミセルへの分配作用に注目し、だ液中及び海水中的無機陰イオンの成分分析を行った。基礎実験として、両性イオンミセルの濃度増加に対する無機陰イオンの移動度の変化を調べたところ、水和の程度が小さく、極性の大きいイオン（ヨウ化物あるいはチオシアン酸イオン）に対し大きな移動度の変化が見られた。このミセルはタンパクの吸着抑制効果もあることから、除タンパク前処理を行わずにヒトだ液試料中の亜硝酸、硝酸そしてチオシアン酸イオンの分離定量を可能とした。更に通常の CE において困難であった高塩濃度を含む試料に対しては、両性イオンミセルを添加することによって、キャピラリー内の電流値の急激な上昇に伴うベースラインの乱れを抑え、海水中の臭素と硝酸イオンの分離定量を行うことができた。

第5章“スルホン化 β -シクロデキストリンを用いるキャピラリー電気泳動によるアルキルフェノール類、ビスフェノール A 及びビスフェノール S の泳動挙動”では、長鎖の異なるアルキルフェノール類とビスフェノール類の構造異性体の分離改善のために、スルホン化 β -シクロデキストリン（SCD）を用いて検討を行った。pH 8 以下の泳動条件において電気的中性であるフェノール類は、電気浸透流（electroosmotic flow, EOF）と同じ泳動速度で有するため、通常の CE ではほとんど分離が達成されなかったが、SCD の添加により、包接された中性分子が負電荷を有することになり、EOF よりも遅れて検出され、分離能を改善することができた。また、その結合作用は、試料の疎水の程度、分子サイズあるいは官能基の位置によって異なるため、多くの構造異性体を有する 4-ノニルフェノール混合物の分離にも適用することができた。

現連絡先の機関 独立行政法人産業技術総合研究所中部センター瀬戸サイトセラミックス研究部門環境材料化学研究グループ：489-0884 愛知県瀬戸市西沢町 110

学会受付 2001 年 12 月 19 日

第6章 “陽イオン性ジアザクラウンエーテルの合成と、位置異性体を含む芳香族陰イオンのキャピラリー電気泳動分離における選択的添加剤への応用” では、12-crown-4 と 18-crown-6 の類似体からなる2種類の陽イオン性ジアザクラウンエーテルを合成し、CEでの新規な添加剤としての可能性について調べた。分析対象物は、位置異性体を持つ二価の芳香族陰イオンを用いた。泳動液へジアザクラウンを添加することにより、3種のフタル酸類、2種のナフタレンジカルボン酸類そして3種のナフタレンジスルホン酸類の位置異性体を2 mM以下の低濃度で同時に完全分離することができた。また、これらの陰イオンの分離挙動あるいは移動度に対する影響は、いずれも環サイズの小さいジアザクラウンが優れていることが分かった。この実験で示された陰イオンの移動度は、主にクラウン分子内の陽イオンとのイオン対生成の差によって制御されているものと考えられる。更に、イオン対生成定数の算出から、陰イ

オンの官能基の位置、あるいは種類によって選択性が異なることが分かった。

第7章 “総括” では、本論文の主な結果と知見をまとめた。

公表論文

- 1) 田中俊逸, 児玉 心, 森 勝伸: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 503 (1997).
- 2) M. Mori, K. Kodama, W. Hu, S. Tanaka: *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **22**, 3139 (1999).
- 3) S. Tanaka, M. Mori, K. Kodama, W. Hu: *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, **23**, 197 (2000).
- 4) M. Mori, H. Naraoka, H. Tsue, T. Morozumi, T. Kaneta, S. Tanaka: *Anal. Sci.*, **17**, 763 (2001).
- 5) M. Mori, W. Hu, J. S. Fritz, T. Hirohito, T. Kaneta, S. Tanaka: *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **370**, 429 (2001).
- 6) M. Mori, H. Tsue, S. Tanaka: *J. Chromatogr. A*, **922**, 399 (2001).

☆

Digest of Doctoral Dissertation

Studies on improvement of resolutions in capillary electrophoresis using novel additives

Masanobu MORI

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology at Seto,
110, Nishiibara-cho, Seto-shi, Aichi 489-0884

(Awarded by Hokkaido University dated September 28, 2001)

Studies on capillary electrophoresis (CE) were attempted in order to develop novel and simple migration systems to control the electroosmotic and electrophoretic mobility and to improve the resolution. First, a zwitterionic surfactant (Zwittergent-3-14) was very useful to suppress the adsorption of proteins to the capillary wall and to control the electrophoretic mobility of inorganic anions by modifying the electroosmotic flow. This system was successfully applied to the determination of ionic components in real samples as follows (1) a vitamin (biotin) in a tablet, (2) NO_2^- , NO_3^- , and SCN^- in human saliva samples, and (3) Br^- in seawater. Second, some charged cyclic compounds were examined as CE additives for the separation of structural and positional isomers. Negatively charged cyclodextrin (sulfonated- β -cyclodextrin) was effective in the separation of several alkylphenols and bisphenols. Under the optimized CE condition, the structural isomers of nonylphenol could be successfully distinguished by more 20 individual peaks. Cationic diazacrown ethers having quaternary ammonium ions were useful as CE additives to improve the resolution among the positional isomers of divalent aromatic anions. The ion association constants between the cationic diazacrown and analyte anions were evaluated and the separation mechanism was considered. These studies using several novel additives provided an improvement in the peak efficiency, the peak resolution and the peak reproducibility in CE separation.

(Received December 19, 2001)

Keywords : capillary electrophoresis; additives; zwitterionic surfactant; sulfonated- β -cyclodextrin; cationic diazacrowns.