

# キャピラリー電気泳動

入門書



Agilent Technologies



## キャピラリー電気泳動

---

全面改訂第2版、著者 **Henk H. Lauer**、**Gerard P. Rozing**



電気泳動は 19 世紀初め、クロマトグラフィーよりも前に誕生しました。以来、初期には Kohlrausch や Tiselius、のちには Everaerts などの功績により、長い時間をかけて発展してきました。1980 年代の初めには、内径 100  $\mu\text{m}$  未満の極細のキャピラリーを用いた電気泳動を実施した Jorgenson により、電気泳動の様相が変化し、キャピラリー電気泳動が生まれました。それ以降、キャピラリー電気泳動は進化を続け、いまでは日常的に使用される技術になっています。アジレントをはじめとする機器メーカーは、キャピラリー電気泳動用の機器を開発し、多くの分析ラボを長年にわたって確実に支えてきました。キャピラリー電気泳動市場は、2000 年代初めの低迷を乗り越え、力強く回復しています。とりわけ、キャピラリー電気泳動と質量分析計との連結テクニックは大きく発展し、驚異的なスピードと感度で生体分子の複雑な構造を解明する優れた機能を備えるまでになりました。また、キャピラリー電気泳動には、複数の分離モードがあります。そのため、きわめて幅広い化合物の分離に使用することができます。低分子イオンやペプチド、タンパク質、配列 DNA および制限 DNA の断片、さらには細胞全体や非荷電分子の分離にも対応できます。

液体クロマトグラフィーと比較した場合、キャピラリー電気泳動には 1 つの大きな利点があります。よりシンプルな環境で分離プロセスを実行できるという点です。均質な溶液や分子ふるい効果のあるポリマーのほか、円筒などの単純な構造を用いた分離場での分離が可能です。分離場と時間における化合物の移動を説明する原理は、高度な数学手法により、簡単に公式化され、解くことができます。この点については、複数の研究者が大きく貢献しています。分離プロセスの基本原則を深く理解すれば、迅速な機器開発、高度なシミュレーションや分離予測が可能になり、新たな電気泳動分離メソッドの開発が容易になります。

この入門書は、電気泳動の初心者にも最適なガイドブックです。キャピラリー電気泳動がこの先も長く使用され、分離研究者の役に立ち続けることはまちがいありません。そして、その優美さと効率で、研究者たちを驚かせていくことでしょう。

*Bohuslav*

**Bohuslav Gaš**

教授

プラハ・カレル大学理学部



Tiselius が分離テクニックとして初めて電気泳動を使用して以来、キャピラリー電気泳動 (CE) は、さまざまな由来を持つ物質の分離に適用されてきました。Hjertén や Everaerts、Jorgenson の先駆的な研究を経て、1990 年代には、キャピラリー電気泳動の使用が爆発的に増加しました。分離上の問題を解決する創造的な方法や、業界の提唱するパリエーションメソッドが文献に登場しました。

そうしたアプリケーションの爆発的な増加が一段落した 21 世紀初めには、CE テクニックが分析科学者のツールとして重要なものであることが明らかになりました。薬局方の一般試験法、薬局方モノグラフの CE メソッド、製薬会社の新薬アプリケーション、バイオテクノロジー業界のスラブゲルメソッドに代わる CE メソッドなど、アプリケーションのいくつかはすぐに目に付くものです。製薬会社の多くは、キラル分離や低分子イオンの分離に CE を使用しています。多くのアプリケーションキットも、複数のサプライヤーにより提供されています。さらに、「隠れた」アプリケーションもあります。DNA/RNA アナライザやタンパク質アナライザなど、特定アプリケーション用の一部の機器では、分離メカニズムとして CE が使用されています。また、さらなる小型化により、CE は lab-on-a-chip の発展にも貢献しています。

現在の製薬業界において、CE テクニックの導入を促進するための課題は、機器やトレーニングのさらなる向上です。1980 年代後半から 90 年代に機器改良という点で大きく前進し、研究開発ラボや品質管理ラボで CE が使用されたことで、多くの教訓が得られました。そうした教訓を、新世代の機器に活かす必要があります。今後の機器改良のためには、電気泳動の基礎概念を踏まえることが重要です。トレーニングについては、熟練者が大いに必要とされています。CE メソッド開発はきわめて概念的なアプローチで、メカニズムを考える必要があります。また、CE の操作は液体クロマトグラフィーともスラブゲル電気泳動とも異なるため、「優れた CE 実習書」をもとにトレーニングをすることも重要です。

HP/アジレントの入門書第 1 版は、CE テクニックを熟知し、トレーニングを実施するうえで重要なツールでした。この改訂版も、それと同じくらい、あるいはそれ以上に役立つことを願っています。

**Dr. Cari Sanger – van de Griend**

シニア分析サイエンティスト、Solvay Pharmaceuticals BV  
New Chemical Entities Development NCED、ウェースプ、オランダ

**Pim Muijselaar**

<b>1. キャピラリー電気泳動の原理</b>	
1.1. キャピラリー電気泳動 (CE) の歴史的背景、現状、アプリケーション	2
1.2. 基本的な構成要素	4
1.3. 理論	5
1.3.1. 電気泳動	5
1.3.2. 電気浸透流 (EOF) と EOF のコントロール	7
1.3.3. 移動度および移動時間	12
1.3.4. ゾーンの拡散と効率	14
1.3.4.1. 管軸方向の拡散	14
1.3.4.2. ジュール熱	17
1.3.4.3. 注入プラグ長	22
1.3.4.4. 溶質と壁面の相互作用	23
1.3.4.5. 電氣的拡散	25
1.3.4.6. バッファの液面高さの不一致	29
1.3.4.7. 検出器	29
1.3.5. 分離度	30
1.4. キャピラリー電気泳動の特徴	31
<b>2. 分離モード</b>	
2.1. キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)	34
2.2. ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)	37
2.3. キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC)	43
2.4. キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)	49
2.5. キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF)	53
2.6. キャピラリー等速電気泳動 (CITP)	55
<b>3. 機器</b>	
3.1. 高圧電源	58
3.2. 試料の注入	59
3.2.1. 圧力変化を利用した注入法	60
3.2.2. 電氣的移動法	64
3.2.3. オンキャピラリー濃縮法	65
3.2.3.1. 電場増幅試料スタッキング (FASS) と電場増幅試料注入 (FASI)	65
3.2.3.2. 等速電気泳動による試料スタッキング	68
3.2.3.3. 高塩スタッキング	72
3.3. 温度調節	73
3.4. 検出	73
3.4.1. 紫外-可視吸光検出法	74
3.4.1.1. ノイズ、感度、検出器のリニアリティ	75
3.4.1.2. 光路長の長いキャピラリー (バブルセルキャピラリー)	77
3.4.1.3. スペクトルデータの応用	81

3.4.1.4. 間接光度検出	87
3.4.2. レーザー誘起蛍光 (LIF)	90
3.4.3. 非接触電気伝導度検出 (CCD)	96
3.5. フラクションコレクション	101
3.6. 質量分析検出および ICP-MS と組み合わせた キャピラリー電気泳動	107
3.6.1. CE-MS インターフェースの基礎	108
3.6.2. 電氣的接続インターフェース	109
3.6.3. 圧力インターフェース	110
3.6.3.1. CE-MS のシースフローインターフェース	111
3.6.3.2. CE-MS のシースレスインターフェース	113
3.6.4. その他のイオン化手法	115
<b>4. 実際の操作と メソッド開発</b>	
4.1. 分離キャピラリー	118
4.1.1. 未修飾フューズドシリカ	118
4.1.2. 壁面コーティングキャピラリー	121
4.1.2.1. 恒久的コーティングキャピラリー	122
4.1.2.2. 動的コーティングキャピラリー	123
4.2. 電解液の交換とキャピラリーのコンディショニング	129
4.2.1. バッファの交換	129
4.2.2. キャピラリーのコンディショニング	131
4.2.3. 一般的なバッファ系	132
4.3. トラブルシューティング	133
4.4. メソッド開発	137
4.4.1. はじめに	139
4.4.2. キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)	141
4.4.2.1. PeakMaster によるシミュレーション	145
4.4.3. ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)	147
4.4.3.1. エナンチオマーの分離	149
4.4.4. キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC)	152
4.4.5. CE-MS	153
4.4.5.1. 圧力インターフェースと電氣的接続	153
4.4.5.2. ネブライザーガス圧力の設定	155
4.4.5.3. シース溶媒の移動、シース溶媒の組成	155
4.4.5.4. CE-MS におけるバッファ選択	156
4.4.6. キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)	157
4.4.7. キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF)	159
<b>参考文献</b>	161-166
<b>索引</b>	167-173



## キャピラリー電気泳動の原理

---

## キャピラリー電気泳動の原理

### 1.1. キャピラリー電気泳動 (CE) の歴史的背景、現状、アプリケーション

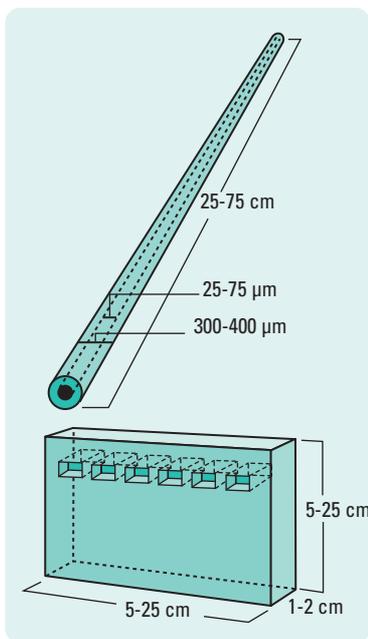


図 1.1  
スラブゲル電気泳動とキャピラリー電気泳動の比較

電気泳動は、溶液中で電場により荷電物質（イオン）が移動する現象と定義されています。分離手法としての電気泳動は、1937年に Tiselius により開発されました。Tiselius の研究により、試験管に入れたバッファ溶液の間にタンパク質混合液を配置して電圧を印加すると、タンパク質がそれぞれの電荷や移動度に応じた速度で、ある方向に移動することが明らかになりました。分離科学における研究が認められ、Tiselius はノーベル賞を受賞しました。

Tiselius が示したように、自由溶液における分離効率は、熱拡散と熱対流により制限されます。そのため、電気泳動は従来、ポリアクリルアミドやアガロースゲルといった対流の起こりにくい媒体で行われてきました。核酸やタンパク質などの生体高分子を、その分子サイズによって分離を行う場合には、おもにスラブやチューブ状にしたゲルが使用されてきました。

スラブゲル電気泳動は、もっとも広く使用されている分離テクニックの1つですが、一般に分析時間の長さ、効率の低さ、検出や自動化の難しさといった弱点があります。

スラブゲル電気泳動に代わる手法としては、ナローボアのオープンチューブやキャピラリーで電気泳動分離を行う方法があります。両テクニックのサイズの違いを図 1.1 に示しています。

内径の非常に細いキャピラリーは電気伝導性が低いため、熱の発生量が少なく、原理上対流は生じません。そのため、オープンチューブでの電気泳動には、必ずしもゲル媒体を使用する必要がなく、従来のゲル媒体と同様に自由溶液での電気泳動が可能となりました。

オープンチューブ電気泳動の初期の研究は、1967年に Hjertén によって報告されました。当時は内径がミリメートル単位のキャピラリーしか入手できなかったため、Hjertén はキャピラリーを縦軸に沿って回転させることで、対流の影響を最小限に抑えました。のちに Virtanen が、その後 Mikkers と Everaerts が内径約 200- $\mu\text{m}$  のガラスやテフロン製のキャピラリーを用いて電気泳動を行いました。1980年代初めには、Jorgenson と Lukacs が内径 75- $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーを使用し、この技術をさらに発展させました。Jorgenson は、実験パラメータと分離との関係を報告してキャピラリー電気泳動 (CE) の理論付けを行い、分析技術としての CE の可能性を示しました。

1990年代になると、これまで研究ラボで使用されていたCEは、(バイオ)医薬品、法医学、臨床、食品、環境、化学、生化学といった分析分野における実用アプリケーションに発展しました。CEと質量分析と組み合わせた手法(CE-MS)やチップ上でのマイクロ流体システムが広まり、さらなる小型化が分析手法や分析機器の今後の発展にかかっています。この時期には、CEに関連した多数の論文や書籍が発表されています。

現在、CEではバッファが充填された内径25~150  $\mu\text{m}$ のキャピラリーが多く使用されています。キャピラリーの使用には多くの利点がありますが、特にジュール熱(バッファを充てんしたキャピラリーなどの導体に電流が流れる際に生じる熱、1.3.4.2項参照)による悪影響を抑えることができるのが利点となります。キャピラリーは電気抵抗が大きいため、ジュール熱の発生を最小限に抑えながら、きわめて高い電場(100~500 V/cm)を印加することが可能です。さらに、キャピラリーは容積に対する表面積の比率が大きいため、発生した熱を効率的に放散することができます。高電場を用いることにより、分析時間が短くなり、効率と分離能が向上します。 $10^5$ を超える理論段数が得られることもあります。これは、電気浸透流のプラグフロー流速分布によるものです。電気浸透流とは、キャピラリー内の溶液の大きな流れを生じさせる電気泳動上の現象を指します。この流れは、電荷にかかわらず、あらゆる溶質を同時に分析することも可能にします。また、多くの分離モードによる多様な分離メカニズムや選択性、最小限の必要サンプル量(1~50 nL)、オンキャピラリー検出、定量分析や自動化の可能性など、さまざまな利点がCEで得られます。

CEの最大の利点の1つは、幅広いアプリケーションです。もともとは生体高分子の分析テクニックと考えられていましたが、アミノ酸、キラル薬物、ビタミン、農薬、無機イオン、有機酸、染料、界面活性剤、ペプチドやタンパク質、炭水化物、オリゴヌクレオチドおよびDNA制限断片、さらには細胞全体やウイルス粒子などの化合物の分離にも有効であることが証明されています。

CEの分離のメカニズムは、クロマトグラフィーのメカニズムとは異なります。そのため、クロマトグラフィーの相補的な分析手法として利用することができます。また、CEはメソッド開発が容易で、必要なサンプル量が少なく、有機廃棄物が生じません。性能の向上や使用法の標準化により、CEはす

で大きな発展を遂げています。そうした発展としては、移動時間やピーク面積再現性、定量分析の向上のほか、オンキャピラリー濃縮による感度の向上、電気浸透流をコントロールして溶質とキャピラリー内壁との反応を抑えるキャピラリーコーティングの開発、低粘度の再充填可能な分子ふるいポリマー、オープンチューブ用の固定相、モノリスカラムや粒子充填カラムなどが挙げられます。

本入門書では、キャピラリー電気泳動に応用されるさまざまな電気泳動様式の基本概念、理論、メカニズムを説明します。また、検出やアプリケーション、メソッド開発、オンチップ電気泳動などの関連テクニックにおける最新の成果も紹介します。

## 1.2. 基本的な構成要素

CEのおもな特徴の1つは、機器の構造が全体的に単純であることです。一般的なキャピラリー電気泳動システムの概略図を図1.2に示しています。簡単に言えば、極細の管径のフューズドシリカキャピラリーの先端は、バッファリザーバに浸けられています。キャピラリー内はリザーバと同じバッファが満たされています。リザーバ内には、高電圧を印加するための電極もセットされています。

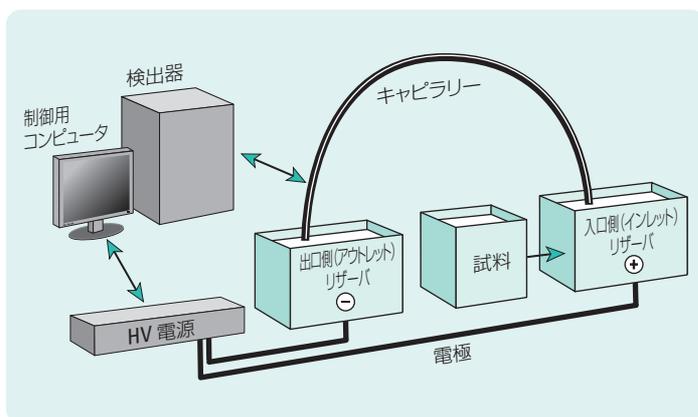


図 1.2  
CE 機器の基本的な構成

サンプルをキャピラリーに注入する際には、リザーバの一方（通常は陽極側）をサンプルリザーバと交換し、電場か加圧のいずれかを適用します。バッファリザーバに戻した後、電場を加えて分離を行います。キャピラリーの反対側の端で、キャピラリー壁を通して直接、光学的に検出されます。本入門書では、注入、分離、検出、定量分析、装置、自動化などに関する理論と実用的な情報を解説します。

## 1.3. 理論

### 1.3.1. 電気泳動<sup>1, 2, 3, 4</sup>

電気泳動による分離は、電場中での溶質の移動速度の差に基づいています。イオンの速度は、方程式 1.1 で表されます。

$$1.1 \quad \mathbf{v} = \mu_e \mathbf{E}$$

$v$  = イオンの移動速度  
 $\mu_e$  = イオン固有の電気泳動移動度  
 $E$  = 電場の強さ

電場は単純に、印加する電圧とキャピラリーの長さの関数となります（単位 volts/cm）。与えられたイオンと溶媒に対して、移動速度は定数となり、そのイオンに特有なものとなります。移動速度は、イオン化した物質（分子または粒子）にかかる電気力と、媒体中を移動する際の摩擦力により決まります。

電気力は、以下の式で表されます。

$$1.2 \quad \mathbf{F}_E = q \mathbf{E}$$

摩擦力（球形イオンの場合）は、ストークスの法則により表されます。

$$1.3 \quad \mathbf{F}_F = -6 \pi \eta r \mathbf{v}$$

$q$  = イオンの電荷  
 $\eta$  = 溶液の粘度  
 $r$  = イオン半径  
 $v$  = イオンの移動速度

電気泳動の間に、これらの力のバランスにより決定する定常状態に到達します。この時点で両方の力が等しくなりますが方向は反対です。

1.4

$$q E = 6 \pi \eta r v$$

移動速度についてこれを解き、(1.4) 式を (1.1) 式に代入すると、物理的パラメータによって移動度を表す式が得られます。

1.5

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

この式から、イオン半径が小さくて高電荷のイオンは高移動度を持ち、一方大きくて電荷の小さいイオンは低い移動度しか持たないことが明らかになります。標準的な表で見られる電気泳動移動度 ( $\mu_e$ ) は、物理的に一定で、溶質が完全に帯電した時点 ( $\alpha_i = 1$ ) で決定され、無限希釈に外挿されます。実際には、これは実験的に決定された移動度により異なります。後者を有効移動度と呼びます。

1.6

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha_i \cdot \mu_e$$

$\alpha_i$  = 分子のイオン化度 (または解離度)。 (クロマトグラフィーで用いられる選択性  $\alpha = k_2/k_1$  と混同しないこと)

有効移動度は、pH (すなわち溶質の  $pK_a$ ) と使用するバッファ組成により大きく異なります。絶対移動度と有効移動度の違いを、図 1.3 に示しています。

ここでは、2つの溶質が完全に解離した状態では、同一の電気泳動移動度を持つと仮定します。移動度の表をみると、このような溶質は移動速度の差が無いことになるので分離できないと考えられます。しかし、これらの溶質は、pH をコントロールすることで、異なる解離度と移動度を持つようになります。(以降の項では、有効移動度を単純に  $\mu_e$  で表します)

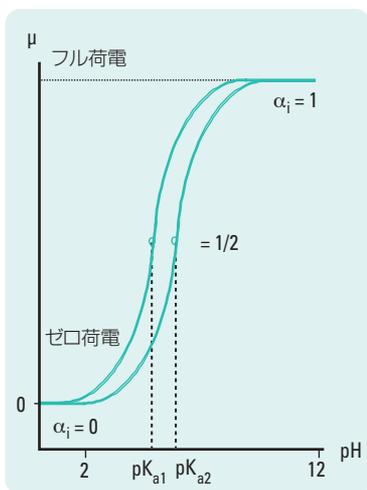


図 1.3  
pH と 2 種の弱酸の移動度の関係

### 1.3.2. 電気浸透流(EOF)と EOF のコントロール

電気浸透流 (electro-osmotic または electroendosmotic flow, EOF) は、CE にとって非常に重要な要素です。EOF はキャピラリー中の液体全体の流れであり、キャピラリー内壁の表面電荷がそのもとになっています。内壁における電気二重層に対して電圧を印加すると EOF が生じます (図 1.4)。溶質がキャピラリーの中にとどまる時間は、EOF の速度と溶質自身の移動度によって決まります。溶質の泳動時間に対する EOF の影響は、キャピラリーの長さに関係しますが、選択性には影響を与えません。

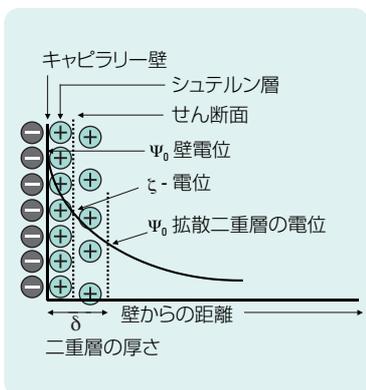


図 1.4  
キャピラリー壁における電気二重層の図<sup>2</sup>

電解質溶液では、ほとんどの固体表面は過剰の電荷を帯びています。これは、表面のイオン化や、表面へのイオン種の吸着から生じるものです。フューズドシリカについても、この両方の現象がおきているものと予想され、多数のシラノール ( $\text{SiOH}$ ) のイオン化 ( $\text{SiO}^-$ ) が、EOF に最も大きな影響を与えます (図 1.5A)。表面シラノール基の  $\text{pK}_a$  は、測定が困難でほとん

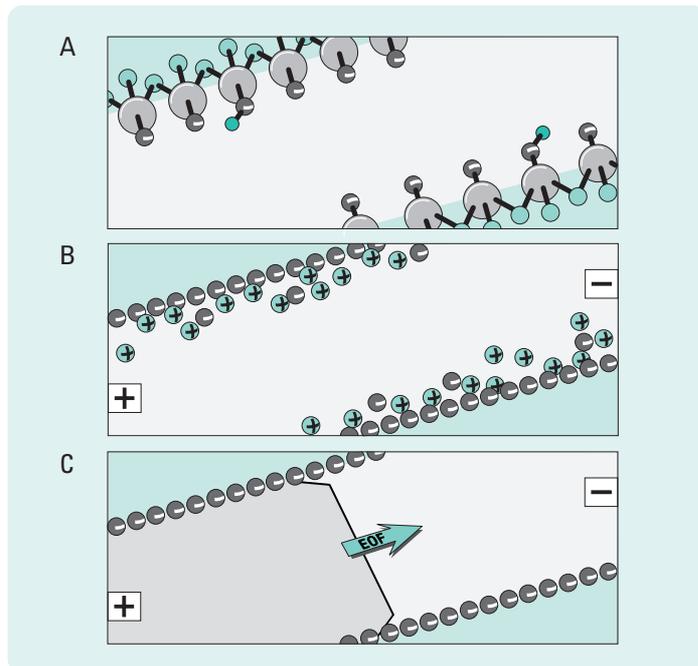


図 1.5  
電気浸透流の発生 A)フューズドシリカ表面( $\text{Si-O}^-$ )が負に帯電する B)水とされた陽イオンが内壁表面に引き寄せられる C)電圧を印加すると陰極へ向かう流れが発生する(プラグフロー)

どの場合は不明ですが、一般的な EOF においては、EOF は pH 4 以上で明確に発生します。テフロンなどの非イオン性材質でも EOF が生じます。これは、陰イオンの吸着から生じるものと考えられます。

対イオン（たいていは陽イオン）は、電荷のバランスをとるために内壁表面に引き寄せられて拡散二重層を形成し、壁面に非常に近いところでは電位差が生じます（図 1.5B）。これはゼータ電位（zeta potential； $\zeta$ ）として知られています。電圧をキャピラリーの両端に加えると、拡散二重層を形成している陽イオンは陰極の方に引かれます。シラノール基は管壁に固定されているので、移動することは出来ませんが、陽イオンは溶液に溶解しているので、陽イオンの移動によってキャピラリー中の全溶液は陰極の方へ引っ張られます。この過程は図 1.5C に模式的に示してあります。EOF の大きさは、以下のように速度または移動度の式として表すことができます。

1.7

または

$$v_{\text{EOF}} = (\varepsilon \zeta / \eta) E$$

$$\mu_{\text{EOF}} = (\varepsilon \zeta / \eta)$$

$v_{\text{EOF}}$  = 移動速度

$\mu_{\text{EOF}}$  = EOF の“移動度”

$\zeta$  = ゼータ電位

$\varepsilon$  = 溶液の誘導率

（移動度は印加電圧とは独立した式で表されます）

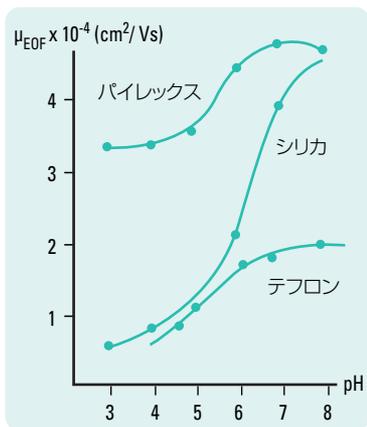


図 1.6 種々のキャピラリー材質での電気浸透流への pH の影響。<sup>5</sup>

ゼータ電位は基本的にキャピラリー内壁の表面電位によって決まります ( $\zeta \approx \Psi_0$ )。この表面電位は pH に大きく左右されるので、EOF の大きさは pH に依存します。高い pH では、シラノール基のイオン化が大きくなるため、イオン化が抑えられる低い pH のときより、EOF は著しく大きくなります。EOF の大きさは、条件にもよりますが、pH 2~12 の間で 1 桁以上変化させることができます。図 1.6 では、フューズドシリカや他の材質における pH の影響を示しています。電気二重層の理論からもわかるように、ゼータ電位はバッファのイオン強度にも左右されます。バッファイオン強度が増加すると、電気二重層は縮小し、ゼータ電位が減少するので、EOF も減少します（図 1.9 参照）。

キャピラリーにおける EOF の特徴は、図 1.5C と 1.7A に示すように、流速分布が平面的であることです。流れの電気的な駆動力はキャピラリーに沿って（すなわち内壁面で）一様に分布しているため、キャピラリー内での圧力降下が起こらず、流れはくまなく均一になります。この平面的な流れには、溶質ゾーンの拡散を起こさないという利点があります。これは、外部ポンプを用いた際の流れが、壁面との摩擦やバルク溶液を構成する液体層（薄層）でのスライドの影響により、放物面的な分布をもつ層流になるのとは対照的です（図 1.7B）。

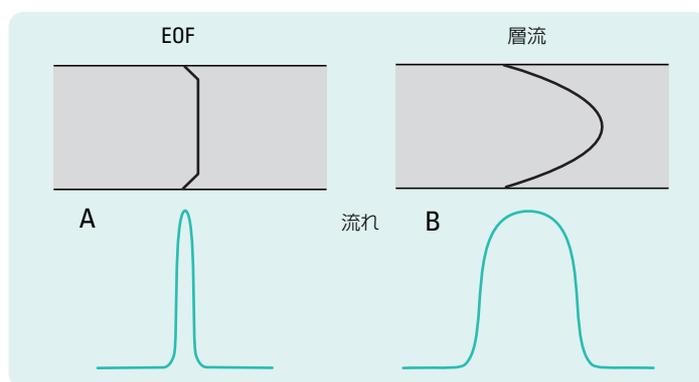


図 1.7 A、B  
電気駆動および圧力駆動の流れにおける流速分布と溶質ゾーンの関係

図 1.7A は、EOF 分布を示しており、管壁に近い部分の流速が中心より若干早くなっていることを示しています。この流速の減少は、管壁との摩擦によって生じるものです。しかしこの部分は、管壁に近いごくわずかな厚さしかもっていないので、溶質ゾーンの拡散にはほとんど影響ありません。また、EOF とその流速分布は、一般にはキャピラリー直径には影響されません。ただし、キャピラリーの内径が大きすぎる ( $\geq 200 \sim 300 \mu\text{m}$ ) 場合は、分布は乱れます。これは、表面張力が不十分で、内壁面で生じる速度では、液体の中心部を均一に引き寄せることができないためです。EOF 速度分布がピーク形状や他のゾーン拡散要因に及ぼす影響の詳細については、1.3.4 項 “ゾーンの広がりと効率” で説明しています。

EOF のもう 1 つの利点は、電荷に関係なくほとんどすべての種を同じ方向に移動させることです。通常の条件下（すなわち、負に帯電したキャピラリー内表面）では、流れは陽極（プラスの電極）から陰極（マイナスの電極）に向かいます。EOF の速度は陰イオンの電気泳動移動度よりも 1 桁以上大きいため、陰イオンも陰極へ向かって押し流されます。従って、陽イオン、中性物質および陰イオンは、全て同じ方向へ「移動」することになり、1 回の測定で電気泳動分析を行うことができます。この過程を図 1.8 に示します。陽イオンは、電気泳動の方向と EOF の方向が同じため、最も速く移動します。中性物質はお互いに分離されませんが、すべて EOF と同じ速度で運ばれます。陰イオンは、電気泳動の方向が EOF と逆ですが、EOF によって陰極の方へ運ばれて最も遅く移動します。

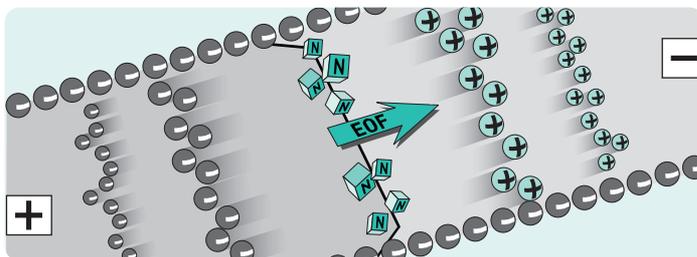


図 1.8  
キャピラリーゾーン電気泳動での浸透流と溶質の移動(溶質の電荷や大きさによって移動度は異なります)

キャピラリー内壁の電荷を (pH や添加剤により) 調節することで、EOF を減少させることができます。場合によっては、EOF を逆転させることも可能です。こうした条件下では、陰イオンと陽イオンは反対方向に移動します。

EOF は一般的に有用ですが、コントロールする必要もあります。たとえば、高い pH では EOF が速すぎて、十分に分離される前に溶質が流出してしまうことがあります。逆に、低い pH や中程度の pH では、クーロン力の相互作用により、負に帯電した壁面に陽イオン性の物質が吸着することがあります。この現象は、特に塩基性タンパクを分離する場合に問題となります。さらに、等電点電気泳動、等速電気泳動、キャピラリーゲル電気泳動などの分離モードでは、EOF を抑えたり、排除したりすることが求められます。

基本的に EOF をコントロールするには、キャピラリー内表面の電荷またはバッファの粘度を変える必要があります。そのためには、以降のパラグラフで説明しているように、複数の方法があります。キャピラリー内壁面の表面電荷に影響を与える条件（バッファの pH など）は、溶質の移動度にも影響を与える点に注意してください。良好な分離を得るためには、EOF と溶質の移動度の両方の性質を考慮し、分離を最適化させる必要があります。

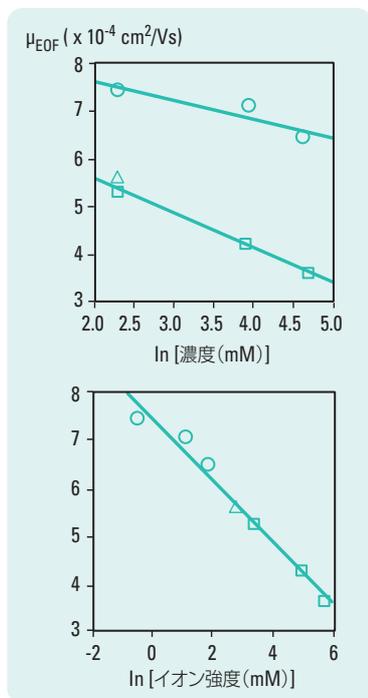


図 1.9  
バッファ濃度とイオン強度が電気浸透流に与える影響。<sup>6</sup>

丸 = ホウ酸バッファ

四角 = リン酸バッファ

三角 = 炭酸バッファ、すべて pH 8

EOF の速度は、(1.7) 式で示されているとおり、電場を弱めることでもっとも簡単に減少させることができます。ただしこの方法は、分析時間、効率、分離能に悪影響を与えます。実際的には、バッファの pH の変更により、EOF を最も劇的に変化させることができます (図 1.6)。ただし、pH を変えると、溶質の電荷と移動度にも影響を与える可能性があります。低い pH のバッファでは、キャピラリー表面と酸性溶質の両方がプロトン化し、高い pH のバッファでは、その両方が脱プロトン化します。そのため、適切なバッファの pH 範囲を選択するには、溶質の  $pK_a$  または  $pI$  (両性イオン物質の場合) を考慮する必要があります。

EOF は、バッファの濃度やイオン強度の影響を受けることもあります。この影響の大きさを図 1.9 で説明します。バッファ濃度が高いと、壁面の有効電荷が減るので、溶質と壁面とのクーロン的な相互作用を抑制する効果が生じます。ただし、バッファの濃度が高くなるとキャピラリー内で発熱しやすくなるので、高濃度バッファの使用はある程度制限されます (発熱の影響は 1.3.4.2 項 “ジュール加熱” で説明します)。一般的に用いられるバッファ濃度の範囲は 10~50 mM ですが、100~500 mM 以上の濃度で用いる場合もあります。一般的なバッファ濃度 (10~50 mM) では、バッファの固有粘度の変化のため、機器制御による温度変更が EOF をコントロールする容易かつ有効な方法といえます (1.7 式参照)。

最後に、EOF は、バッファに添加剤を加えたり、共有結合型のコーティングによりキャピラリー壁の状態を変えることでコントロールすることができます。これらのコーティングにより表面電荷の状態が変化するので、EOF を増加したり、減少させたりまたは反転させることができます。コーティングに関する詳細は、4.1 項を参照してください。

EOF のコントロールに関するすべてのメソッドと可変要素を表 1.1 にまとめています。

方法	効果	備考(以降の項を参照)
電場	電場に比例する EOF の変化	電場を強めると、キャピラリー発熱が増加。ショートとスパークにつながることもある
バッファの pH	低い pH で EOF が減少、高い pH で増加	溶質の電荷が変わる可能性 (図 1.6)
イオン強度 /	低イオン強度で EOF が増加	イオン強度を高めると、電流が高くなり、ジュール熱が発生する可能性がある 低イオン強度ではバッファキャパシティが低くなり、サンプルが吸着したり、サンプルのスタッキングが制限されたりする可能性がある (3 章参照) 電解液とサンプルの導電率が異なると、ピーク形状が歪む
温度	粘度変化による EOF の変化 (2~3 %/°C)	キャピラリー温度をコントロールする必要がある
バッファへの有機溶媒の添加	ゼータ電位と粘度が変化	複雑な変化、影響は実験的に測定。選択性が変化する場合有り
電解液への添加剤 (界面活性剤など)	EOF の大きさと方向の変化。陰イオン性界面活性剤で EOF が増加、陽イオン性界面活性剤で EOF が減少	疎水性相互作用やイオン相互作用によるキャピラリー内壁への動的な吸着
中性親水性ポリマー	表面の変化を防ぎ、粘度を増加させることで EOF をコントロールしながら減少	親水性相互作用によるキャピラリー内壁への吸着。溶質/内壁の相互作用を抑制
共有結合表面コーティング	コーティングの変化および極性により EOF が変化	多くの種類(親水性または荷電)。安定性に乏しい。表面特性が変化し、溶質/表面の相互作用が生じる可能性がある

表 1.1  
EOF をコントロールする方法

### 1.3.3. 移動度および移動時間

溶質が検出器まで移動するのに要する時間を“移動時間 (マイグレーションタイム)”と呼び、これは移動距離を移動速度で割った値で示されます。みかけの溶質移動度は、この移動時間とその他の実験的パラメータにより、次式を使って計算されます。

1.8

$$\mu_a = \frac{l}{t_a E} = \frac{lL}{t V}$$

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$$

V = 印加電圧

l = 有効キャピラリー長 (検出器まで) (cm)

L = トータルキャピラリー長

t<sub>a</sub> = 移動時間(分析対象イオン)

E = 電場の強さ (V/cm)

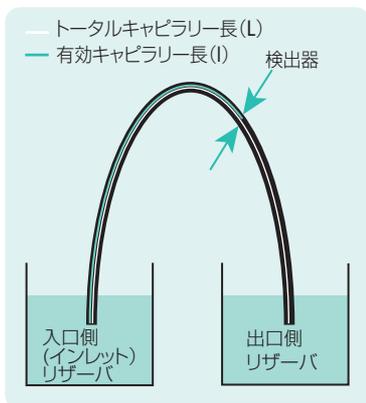


図 1.10 有効キャピラリー長とトータルキャピラリー長の定義

有効キャピラリー長 (l) とトータルキャピラリー長 (L) の違いについて図式的に示します (図 1.10)。有効キャピラリー長とは注入口から検出部までの長さです。キャピラリーのウィンドウ部で光学的にピークを検出する場合、一般的に有効キャピラリー長は、トータルキャピラリー長より 5~10 cm 短くなります。キャピラリー外で検出する場合 (例えば質量分析) は、この 2 つの長さは同じになります。分析対象イオンの移動時間 (t<sub>a</sub>) とみかけの移動度 (μ<sub>a</sub>) は有効キャピラリー長により定義され、電場はトータルキャピラリー長により定義されるので (E = V/L)、この両方の長さを知ることが重要となります。

ビタミン分離を用いた各種の移動度の計算例を図 1.11 に示しています。

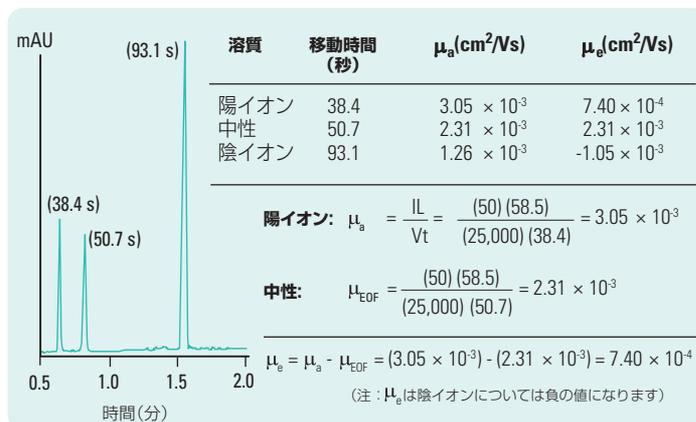


図 1.11 電気浸透流の移動度と有効溶質移動度の計算例

### 1.3.4. ゾーンの拡散と効率

電気泳動における分離は、溶質の移動度の差に基づいています。2つの溶質ゾーンを分けるために必要な差は、溶質ゾーンの幅と移動時間の差によって決まります。このゾーンの幅は、溶質に働くゾーン拡散のプロセスに強く影響されます。拡散が起きると、溶質ゾーンの幅が広がり、分離を達成するには移動度の差を大きくしなければならないため、拡散をコントロールする必要があります。

#### 1.3.4.1. 管軸方向の拡散

溶質ゾーンの広がり、そのゾーン内における溶質の速度の差から生じます。したがって、ベースラインでのピーク幅 ( $w_b$ ) として定義することができます。ガウス分布しているピークについては、以下の式が成立します。

1.9

$$w_b = 4\sigma$$

$\sigma$  = ピークの標準偏差  
(時間、長さ、または容積で表す)

また、分離効率を理論段階数  $N$  で表すと次のようになります。

1.10

$$N = \frac{l}{\sigma^2}$$

$l$  = 有効キャピラリー長。以下の式のよ  
うに、HETP (単位長あたりの拡散ま  
たは理論段に相当する高さ) ( $H$ ) と  
関連付けることができます。

$$H = \left( \frac{l}{N} \right)$$

理想的な条件 (すなわち、注入プラグ長が小さく、溶質とキャピラリー壁との相互作用がない場合など) では、CE における溶質ゾーンの広がり、に影響を与えるのは、縦方向または (キャピラリーに沿った) 管軸方向の拡散のみと考えることができます。管径 (キャピラリーの断面) 方向の拡散は、プラグ流速分布の特性のため重要ではありません。また、対流による拡散も、キャピラリーの抗対流特性のため重要ではありません。したがって、

分離効率は次式のとおり、クロマトグラフィーにおける分子拡散項に関連付けることができます。

$$1.11 \quad \sigma^2 = 2 Dt = \frac{2DIL}{\mu_a V} = \frac{2DI}{\mu_a E}$$

D = 溶質の拡散係数  
L = トータルキャピラリー長

(1.11) 式を (1.10) 式に代入すると、電気泳動の理論段数に関する基本的な式が得られます。

$$1.12 \quad N = \frac{\mu_a VI}{2DL} = \frac{\mu_a EI}{2D}$$

(1.12) 式から、強い電場を印加する理由が明らかにわかります。これは、強電場下ではキャピラリー中に溶質がとどまる時間が短く、拡散する時間がないという単純な理由によります。さらに、この式からは、タンパク質や DNA のような高分子は拡散係数が小さいため、小さな分子よりもゾーンの広がりが少ないことがわかります。拡散係数を表 2 に示します。

	D (x 10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> /s)
塩化水素	3.05
塩化ナトリウム	1.48
グリシン	1.06
クエン酸	0.66
シトクロムC	0.11
ヘモグロビン (ヒト)	0.069
タバコモザイクウィルス	0.0046

表 1.2  
分子(25 °C水中)の拡散係数

理論段数は、例えば、次式を使用してフェログラムから直接求めることができます。

$$1.13 \quad N = 5.54 \left( \frac{t}{w_{1/2}} \right)^2$$

t = 移動時間  
w<sub>1/2</sub> = ピーク半値幅

(1.15) 式はガウス分布のピークに対してのみ適用できます。第 2 の中心ピークモーメント (μ<sub>2</sub> = σ<sup>2</sup>) にもとづく相違 (σ<sup>2</sup>) 計算の使用などにより、あらゆる非対称性を考慮に入れる必要があります。

実際には、測定により求められた分離効率 (1.15) 式は、計算上の分離効率 (1.14) 式よりも一般的に低くなります。これは、理論計算上は、管軸方向の拡散によるゾーン幅の広がりしか考慮していないためです。次項に述べるように、バンドの広がりをおこす他の要因が存在することがよくあります。

CE でのゾーンの広がり、管軸方向の拡散のほかにも多くの要因があります。その中でも重要なものは、ジュール熱の発生によっておきる温度勾配、注入プラグ長およびキャピラリー内壁と溶質の相互作用です。幸いなことに、通常これらの要因は、以下に述べるような方法でコントロールすることができます。CE におけるバンドの広がり種々の要因とそのメカニズムを表 1.3 に示します。

原因	コメント
管軸方向の拡散	分離効率の基本的な限界を決定。拡散係数が小さい溶質ほど狭い溶質ゾーンを形成(1.3.4.1.)
ジュール熱	放射状の温度勾配および放物面的な流速分布が生じる(1.3.4.2.)
注入プラグ長	拡散をコントロールできるゾーン長さより小さくする。検出限界の問題によりしばしば理想的な注入プラグ長より長くする必要が生じる(1.3.4.3.)
試料吸着	溶質とキャピラリー壁との相互作用はピークテーリングの原因となる(1.3.4.4.)
試料とバッファの導電率の違い(電気的拡散)	溶質の導電率が泳動バッファよりも高いとピークがリーディングし、低いとピークがテーリングする(1.3.4.5)
バッファの液面高さの不一致	層流の発生(1.3.4.6.)
検出器のスリットの長さ	ピーク幅より小さいこと(1.3.4.7.)

**表 1.3**  
拡散の原因

(1.13) 式で示されているゾーンの広がり、分子拡散がバンドの広がり唯一の要因であるという仮定から導かれています。システムにおける全分散 ( $\sigma_T^2$ ) により、拡散をさらに適切な式で表すことができます。全分散はバンドの広がり要因となっている個々の分散の和で示されます。

$$1.14 \quad \sigma_T^2 = \sigma_{DIF}^2 + \sigma_{INJ}^2 + \sigma_{TEMP}^2 + \sigma_{ADS}^2 + \sigma_{DET}^2 + \sigma_{Electrodispersion}^2 + \dots$$

下の添字はそれぞれ分子拡散 (DIF)、注入 (INJ)、温度勾配 (TEMP)、吸着 (ADS)、検出 (DET) および電気的拡散 (Electrodispersion) を表しています。

(1.16) 式中の何れかの項が拡散項を支配する場合は、理想的限界を得ることができず、(1.14) 式は無効になります。この場合、電圧を増やすことによって、分離効率と分解能を若干改善することができます。

### 1.3.4.2. ジュール熱

微小管径のキャピラリー中で電気泳動を行う主な利点は、従来電気泳動の技術を制限してきた発熱の影響を減少させることです。発熱は非均一な温度勾配や粘度の局部的変化などにより、溶質ゾーン幅の広がりを起こす可能性があります。分離効率および分解能に関する理論式からみると、できるだけ強い電場を使用するほうが有利ですが、キャピラリーの寸法や温度コントロール方法によらず、印加できる電圧の大きさはジュール熱の発生によって大きく制限されます。

電流が流れることで発生する熱がジュール熱です。温度の上昇は、発生した電力（電圧と電流の積）に依存し、キャピラリーの寸法、バッファの導電率、および印加電圧によって決まります。発生した電力が熱の放散を上廻ると、結果として温度は大きくなり上昇します。一般に、発生する電力は 0.5~5 W/m の範囲です。10 °C 程度の温度上昇は一般的に起こりますが、70 °C 以上の温度上昇が起きることもあります。

一般的に、温度の絶対的な上昇は問題にはなりません。温度勾配は悪影響を及ぼします。熱は、キャピラリー壁を通して放散されるので、外壁よりもキャピラリー中心部の温度が高くなることがあります。このような温度勾配により、キャピラリー横断面で泳動バッファの粘度差が生じ、ゾーンの変形が生じます。種々の内径のキャピラリーでおきるこの現象を、図 12 に示します。温度 1 °C の変化より、2~3 % の粘度の変化（移動度で 2~3 % の変動）が生じるため、キャピラリー温度のコントロールは非常に重要です。

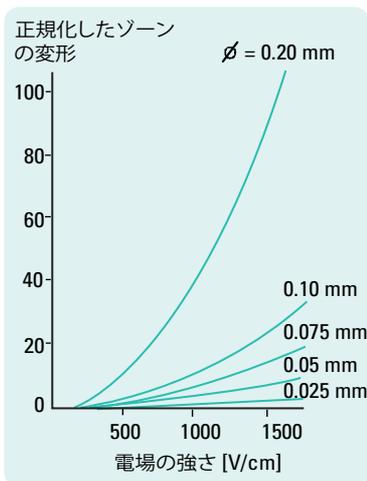


図 1.12  
ジュール熱と温度勾配が溶質ゾーンの変形に及ぼす影響  $\delta$  ( $\phi$ =キャピラリー内径)

キャピラリーの中心部と周囲との熱勾配を図 1.13 に示します。この図に示すとおり、温度差はキャピラリー内径 ( $r_1 = 25 \mu\text{m}$ )、フューズドシリカ壁の厚さ ( $155 \mu\text{m}$ )、ポリイミド被覆の厚さ ( $15 \mu\text{m}$ )、それぞれの熱伝導度、周囲に対する熱伝導係数 ( $h$ ) に左右されます。

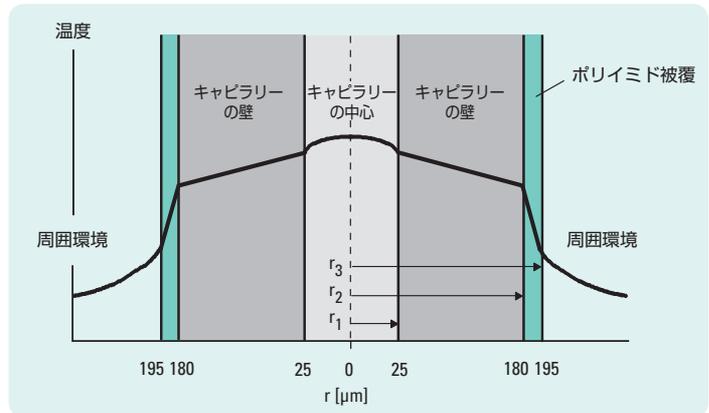


図 1.13

キャピラリー中心部から周囲への温度勾配。 $r_1$ 、 $r_2$ 、 $r_3$  はそれぞれ、キャピラリーの内半径、フューズシリカの外半径、ポリマー被覆を含む外半径です。 $r_1 = 25$  まいく m、 $r_2 = 180 \mu\text{m}$ 、 $r_3 = 195 \mu\text{m}$

理論的には、次式で表すことができます。

1.15

$$\Delta T_T = \frac{Qr_1^2}{2} \left[ \frac{1}{2\kappa_1} + \frac{1}{\kappa_2} \ln \left( \frac{r_2}{r_1} \right) + \frac{1}{\kappa_3} \ln \left( \frac{r_3}{r_2} \right) + \frac{1}{r_3} \left( \frac{1}{h} \right) \right]$$

$$\Delta T_T = T_0 - T_s$$

$T_0$  = キャピラリー中心線の温度

$T_s$  = 周囲環境の温度

$Q$  = 電力密度

$r$  = 半径 (1、2、3はそれぞれ、図 1.13 で説明している半径に対応)

$\kappa$  = 熱伝導度 (1、2、3はそれぞれ、パフファの熱伝導度、フューズシリカの熱伝導度、ポリマー被覆の熱伝導度)

$h$  = キャピラリーから周囲環境への熱伝導率

実際のほとんどのケースでは、全体的な温度上昇の大きさ ( $T_0 - T_s$ ) は、(1.17) 式の最後の項に左右されます。

1.16

$$T_0 - T_s \approx \frac{Qr_1^2}{2r_3h} = \Delta T_{w-s}$$

$\Delta T_{w-s}$  = キャピラリー外壁と周囲環境の温度差

その理由は、キャピラリー外壁 (w) と周囲環境 (s) 間における熱伝導 (h) の抵抗が、一般に他の抵抗よりもずっと大きくなるためです。

(1.17) 式の最初の項は、キャピラリー中心線と内壁の温度差のみを表しています。

1.17

$$\Delta T_{cap} = T_0 - T_1 = \frac{Qr_1^2}{4\kappa_1} = \frac{Eld^2}{16\kappa_1}$$

$T_1$  = キャピラリー内壁の温度  
(境界条件、 $r = r_1$ ,  $T = T_1$ )

$I$  = 電流密度 (A/cm<sup>2</sup>)

$d$  = キャピラリー内径

各キャピラリーインターフェース (図 1.13 と (1.17) 式を参照) 間の温度差を計算した例を表 1.4 に示しています。

表 1.4 は、(1.18) 式の妥当性を示しています。また、特定の条件下では、内径  $\geq 75 \mu\text{m}$  のキャピラリーを使用する際には、(気体または液体による) キャピラリーの冷却が必須であることも示されています。

(1.17) 式と表 1.4 は、外径が大きくて内径の小さいキャピラリーの使用が有利であることを示しています。前述の通り、数百 V/cm を加えたときでも、容積が小さければ発熱量は抑制されます。さらに、内容積に対しての内表面積比が高いと、キャピラリー壁を通しての熱の拡散効果があります。また、外径が大きいと、ポリイミドの熱絶縁特性が減少するので周囲への熱

伝導が促進されます。ポリイミド被覆はわずか数  $\mu\text{m}$  の厚さしかありませんが、熱伝導率が小さいので熱伝達を著しく制限します。

過度の発熱や温度勾配が発生している可能性を示す現象はいくつかあります。その例の1つとして、電圧を増加した場合に、効率が下がったり、EOFや溶質の移動度が不均衡かつ非直線的に増加したりする現象があります。

半径 ( $\mu\text{m}$ )	電流 ( $\mu\text{A}$ )	$\Delta T_{\text{cap}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_{\text{FS}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_{\text{Pi}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_{\text{w-s}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_{\text{T}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_0$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
25	11.8	0.05	0.08	0.04	6.0 (h = 50)	6.2	31.2
					1.2 (h = 250)	1.4	26.4
					0.6 (h = 550)	0.8	25.8
50	47.1	0.19	0.19	0.16	24.0 (h = 50)	24.5	49.5
					4.8 (h = 250)	5.3	30.3
					2.2 (h = 550)	2.7	27.7
75	106.0	0.42	0.29	0.37	54.1 (h = 50)	55.2	80.2
					10.8 (h = 250)	11.9	36.9
					4.9 (h = 550)	6.0	31.0
100	188.5	0.75	0.33	0.66	96.3 (h = 50)	98.0	123.0
					19.3 (h = 250)	21.0	46.0
					8.8 (h = 550)	10.5	35.5
125	294.5	1.17	0.29	1.00	150.3 (h = 50)	152.8	177.8
					30.1 (h = 250)	32.6	57.6
					13.7 (h = 550)	16.2	41.2

**表 1.4**

**キャピラリー中心から周囲環境への温度勾配の計算例。条件:**  $E = 300 \text{ V/cm}$ ;  $I$  (電流密度)  $= 0.6 \text{ A/cm}^2$ ;  $i = I \times \pi r_1^2$  (キャピラリー横断面)、 $\kappa_1$   $25^{\circ}\text{C}$  (水)  $= 6.0 \times 10^{-3}$ ;  $\kappa_2$  (FS)  $= 1.40 \times 10^{-2}$ ;  $\kappa_3$  (Pi)  $= 1.55 \times 10^{-3}$  (単位はすべて  $\text{W/cm K}$ )、 $h$  (停滞気体)  $= 50$ ;  $h$  ( $v_{\text{air}} = 2 \text{ m/s}$ )  $= 250$ ;  $h$  ( $v_{\text{air}} = 10 \text{ m/s}$ )  $= 550$  ( $\text{W/m}^2 \text{ K}$ );  $v_{\text{air}}$  = キャピラリーの気体速度; FS (フューズドシリカ); Pi = ポリイミド (ポリマー層、キャピラリー外表面の被覆)、 $r_1$  は可変 (25~125  $\mu\text{m}$ )、 $r_2 = 167 \mu\text{m}$ ;  $r_3 = 187 \mu\text{m}$ ; ポリイミド層 (Pi)  $= 20 \mu\text{m}$

この計算では、 $r_2$  と  $r_3$  は図 1.13 ( $i = 0$ 、 $T_0 = T_s = 25^{\circ}\text{C}$ ) で示した値とわずかに異なっています。

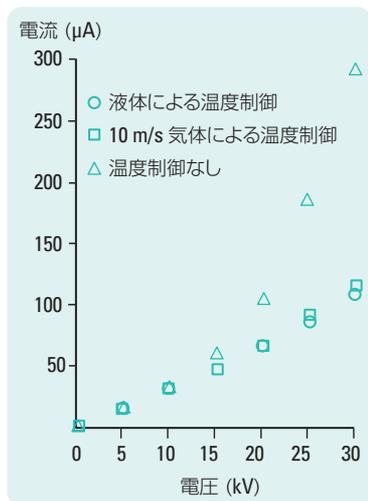


図 1.14  
オームの法則のプロットによるジュール熱のモニタリング

また、電圧に対して電流が直線的に増加（オームの法則）しない場合は、キャピラリー内のバッファの温度が上昇していることを示しています（図 1.14）。

ジュール熱をコントロールする種々の方法を表 1.5 に示します。(1.17) 式を見ると、電力の減少 (Q) に比例して温度勾配も減少することがわかります。電力を減少させるには、印加電圧を低くする方法か、イオン強度を低くしたり ( $I = 1/2 \sum_i c_i z_i^2$ ) バッファイオンの移動度を小さくしたりすることで、バッファの導電率を減少させる方法があります。後者の方法は有効ですが、実用上は制限されます。バッファの濃度を下げると緩衝能が低下し、溶質と壁面の相互作用が増加する可能性があるためです (1.3.4.4 項参照)。

また、上記以外にも、Tris、ホウ酸塩、ヒスチジン、CAPS のような、大きくてかつ最小の荷電をもつイオンを含む移動度の小さいバッファを使用する方法があります。バッファの選択に関する詳細は、4 章を参照してください。

温度差をできるだけ小さくするには、キャピラリーの内径 (d) を小さくし、電流を小さくする方法が有効です [ $i = \kappa \cdot E \cdot (\pi d^2)/4$ ]。そのため、5~10 μm といった小さい内径をもつキャピラリーが使用されたことがあります。しかし、内径が小さいと、検出や試料注入、キャピラリーのつまりといった点で問題が生じることが文献で報告されているため、そうしたキャピラリーは一般的な使用には適していません。

キャピラリー中心と周囲環境の温度差を小さくして安定させるためには、キャピラリー外壁からの熱の除去もきわめて重要となります。液体や高速空気循環によりキャピラリーを一定温度に保つ冷却システムを使えば、効果的に熱を除去することができます。温度制御の詳細については、3 章の 3.3 項で説明しています。

方法	効果
電場を小さくする	発熱は比例して減少 分離効率と分解能は劣化
キャピラリー内径を小さくする	電流は顕著に減少 感度が低下(経路長、3 章参照) 試料の吸着が増加する場合有り
バッファのイオン強度や濃度を減少	電流は比例して減少 ソーン幅に影響する場合有り (1.3.4.5 参照) 試料の吸着が増加する場合有り
効率的な温度調整	温度を一定にする キャピラリーから熱を除去

表 1.5  
ジュール熱および温度勾配をコントロールする方法

## 1.3.4.3. 注入プラグ長

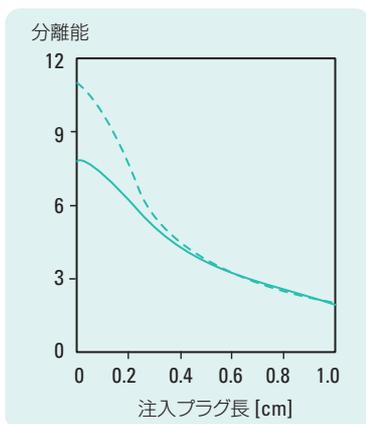


図 1.15  
注入プラグ長が分離能に及ぼす影響<sup>9</sup>

計算に用いた値：

上の曲線 = 20 kV,

下の曲線 = 10 kV,

$\mu_{e1} = 3.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ,

$\mu_{e2} = 3.15 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ,

$\mu_{EOF} = 3.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ,

拡散係数 =  $7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

注入に関しては試料のプラグ長を最小にすることが重要です。この長さが拡散によって生じるバンドの広がりよりも長いと、分離効率と分解能に悪影響を与えます。図 1.15 に注入プラグ長が分解能に及ぼす影響を示します。

サンプル溶液が長方形プラグとしてキャピラリーに注入されると仮定すると、注入が全分散に与える影響は次式で示されます。

1.18

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{w_i^2}{12}$$

$w_i$  = 注入プラグ長

理想的には、注入プラグ長は拡散の標準偏差  $(2Dt)^{1/2}$  より小さくしなければなりません。その正確な長さは、溶質の拡散係数と分析時間の両方により決定されます。高分子は小さな溶質より拡散係数が 100 倍低い場合があるため、試料プラグ長が分離効率に大きな影響を及ぼします。注入プラグ長と拡散係数が分離効率に及ぼす影響を表 1.6 に示します。

注入プラグ長 (mm)	N (D=10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> /s)	N (D=10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> /s)
1	238,000	1,400,000
2	164,000	385,000
10	81,000	112,000

表 1.6

注入プラグ長と拡散係数が分離効率に及ぼす影響

注入プラグ長の実際的な限界は、キャピラリーのトータル長の 1~2% 未満です。70 cm のキャピラリーでは、1% の長さが 7 mm になります (内径 50  $\mu\text{m}$  の場合、14 nL になります)。現在の装置では、このような微小の容積でも再現性よく注入することができますが、一般的な分析条件では、検出限界の問題のために、もっと長い注入プラグ長が必要とされることがあります。効率を落とさずに検出限界を向上させる方法については、3 章を参照してください。

#### 1.3.4.4. 溶質と壁面の相互作用

溶質とキャピラリー壁面の相互作用は、CEの効率に悪影響を与えます。相互作用の程度により、ピークのテーリングや吸着が起こる可能性があります。フューズドシリカ壁への吸着のおもな原因は、陽イオン性溶質と負に帯電した壁とのイオン相互作用や、親水性および疎水性の相互作用です。キャピラリーは、表面積が内容積に比べ大きいので、熱伝導には有利ですが、吸着のリスクは増加します。特に、大きなペプチドとタンパク質は、多くの電荷と疎水性部を有しているため、吸着現象が顕著に現れます。

基本的に、そうした相互作用は、クロマトグラフィー的な性質によるものと考えられます。以下でもそのように扱っています。吸着による分散は次式によって示されます。

$$1.19 \quad \sigma_{ads}^2 = \frac{k'v_{EOF}l}{(1+k')^2} \left( \frac{r^2k'}{4D} + \frac{2}{K_d} \right)$$

$k'$  = 容積比

$v_{EOF}$  = 電気浸透流速度

$D$  = 溶質の拡散係数

$l$  = 有効キャピラリー長

$K_d$  = 1次解離定数

$r$  = キャピラリー内径

容量係数は、液体クロマトグラフィーと同様に定義されます。

1.20

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

$t_r$  = 保持される溶質の溶出時間

$t_0$  = 保持されない溶質の溶出時間

(1.21) 式は、軸方向の拡散（キャピラリーの断面方向）と吸着・脱着速度論 ( $K_d$ ) の両方を表しています。分散は容積比の大きさに強く影響されます。図 1.16 および表 1.7 に示すとおり、溶質とキャピラリー内壁の相互作用は小さくても、分離効率に非常に大きな影響を与える可能性があります。0.1 未満の容積比でも悪影響を与えることがあります。実際に、たんぱく質の分離は 0.01~0.1 の間の容量比を示します。したがって、 $10^6 \sim 10^4$  の理論段数が期待できます。

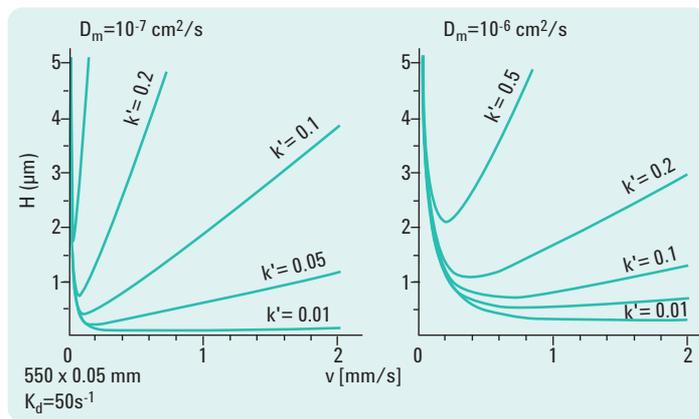


図 1.16

タンパク質-壁面相互作用が HETP(理論段高さ)に及ぼす影響。左図: 拡散係数  $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。右図: 拡散係数  $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

$k'$	$H (\mu\text{m})$	$N$
0.001	0.04	$1.3 \times 10^7$
0.005	0.24	$2.3 \times 10^6$
0.010	0.55	$1.0 \times 10^6$
0.050	5.4	$1.0 \times 10^5$
0.100	16.2	$3.4 \times 10^4$

表 1.7

吸着が効率に及ぼす影響

条件:  $D = 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ;  $v_{\text{EOF}} = 1 \text{ mm/s}$ ;  $l = 55 \text{ cm}$ ;  $L = 60 \text{ cm}$ ;  $K_d = 50 \text{ s}^{-1}$ ;  $r = 25 \mu\text{m}$ 。

注: 吸着分子の平均脱着時間は  $t_d = 1/K_d$  で表されます。

したがって、 $K_d = 50 \text{ s}^{-1}$   $t_d = 0.02 \text{ 秒}$ 、 $K_d = 10 \text{ s}^{-1}$ 、 $t_d = 0.1 \text{ 秒}$ となります。

溶質-壁面の相互作用を減らす方法には様々なものがあります。

詳細は 4 章で説明しています。

### 1.3.4.5. 電気的拡散<sup>10</sup>

この項では、CEにおける電気的拡散現象を、定性的な方法で説明します。

CEでは、キャピラリーにはバッファ溶液またはバックグラウンド電解液(BGE)が入っています。電場を適用すると、それぞれの速度でゾーンが移動し、これらの液体中で分析対象のイオンが分離します。分析対象イオンの分離中は、BGEは一定の条件を保つ必要があります。この条件が試料組成に影響を受けないようにしなければ、試料を移動時間で同定することはできません。

分析対象物のゾーンの速度は、分析対象イオンの有効移動度( $\mu_e$ )とそのゾーンにおける局所的な電場の強さ(E)により決まります。BGEの役割は、この2つの要素を一定に保つことです。BGEのpHを一定に保てば、イオン種の有効移動度を一定に保つことができます。BGEとして、弱酸と弱塩基(この場合 $\mu_e$ はpHの関数)だけではなく、強酸と強塩基も分離するバッファ溶液が用いられるのはそのためです。強酸および強塩基化合物の場合、分析間で一定のEOFを維持するためには、pHを一定かつ安定に保つ必要があります。

ゾーンに分析対象イオンが存在すると、そのゾーンの局所的な電場に影響が出ます。これは、電流(i)が溶液中の局所的な電場の強さおよび導電率( $\kappa_e$ )に比例することに起因します。このことは、次式で表されます。

1.21

$$i = A \cdot \kappa_e(x) \cdot E(x)$$

A = キャピラリーの断面 [( $\pi d_c^2$ )/4]

$\kappa_e(x)$  = 局所的な導電率

E(x) = 局所的な電場の強さ

電流はキャピラリーのトータル長で一定です。このことは、導電率が純粋なBGEの導電率よりも高くなる場所(ゾーン)では、局所的な電場の強さが小さくなり、低くなる場所では大きくなることを示しています。ゾーンの分析対象イオンはほぼ必ず、局所的な導電率をある程度変化させ、その導電率と純粋なBGEの導電率の差は、分析対象物の濃度が増加するに従って大

きくなります。そのため、分析対象物のゾーンの速度は、分析対象物の濃度に依存しています。ただし、適切なバッファ溶液（BGE など）を使えば、この効果を最小限に抑えることができます。

局所的な電場の強さが分析対象イオンの濃度により変化すると、電気的拡散と呼ばれるプロセスにより、ゾーンの広がりが生じることがあります。

この現象を図 1.17 に示しています。まず、分析対象物を含む溶液の導電率が分析対象物の濃度に応じて増加すると仮定すると（図 1.17A）、電場の強さ、さらには分析対象イオンの泳動速度は、分析対象物の濃度が高いゾーンの部分では比較的低くなります。

ももとの濃度分布は左右対称で三角形のガウス分布的ですが、リーディング側が頂点（ピーク頂点）よりも速い速度で移動するため、分布は変形します。また、ももとの左右対称ピークのテーリング側は、頂点に追いつきます。そのため、三角形だった濃度分布は、前方が緩やかで、後方が

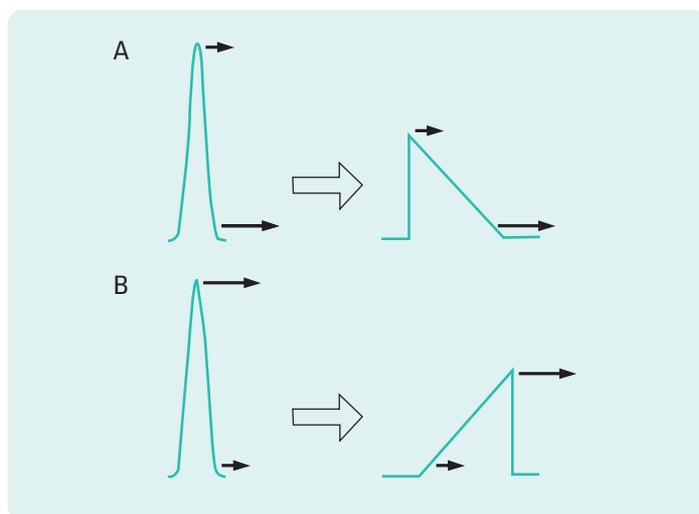


図 1.17  
分析対象物の濃度に応じて、移動速度が減少した場合(A)と増加した場合(B)のゾーンの広がりやピーク形状の歪み<sup>10</sup>

急になります。電気泳動の間に、高速で動く前方と、それよりも遅く動くピーク頂点の差は確実に大きくなります。図 1.17B で示す 2 つ目の例では、分析対象物を含む溶液の導電率が、分析対象物の濃度に応じて減少しています(分析対象イオンの移動度が BGE イオンの移動度よりも低い場合など)。この場合、電気泳動の間に、ゾーンの前方はピークの頂点に追いつかれ、テーリング側で継続的に遅れが生じます。その結果、ピークが変形し、前方がシャープになり、後方が緩やかになります。いずれのケースでも、これはゾーンの広がりにつながります。

電気的拡散は、CZE では一般的な現象です。サンプル量が増えるほど影響が顕著になるため、サンプルオーバーロードとも呼ばれます。

オーバーロードの発生は、以下の現象から判断することができます。

- サンプル量が増えるにつれ、左右対称のピークが変形し、ピークのテーリングまたはフロンティングが生じる。1 つのエレクトロフェログラムで、テーリングとフロンティングの両方が見られることもあります。
- サンプル注入量が増えるにつれ、三角形のピークの幅が広がる。
- ピーク高がサンプル注入量と比例的に増加しない(ピーク幅の広がりが原因)。
- 注入量を増やすと、ピーク頂点の移動時間がわずかに変化する。
- BGE の塩濃度を高くすると、オーバーロード効果が減少する。

幅広い有効移動度をもつ溶質を含む複雑なサンプルの場合、電気的拡散は特に顕著になります。無機イオンおよび有機酸の分離例を図 1.18 に示しています。

有効移動度が高い場合と低い場合のピークのフロンティングとテーリングに注目してください。

電気的拡散、サンプルスタッキング、間接的光度検出(3章参照)といった CE の重要な特徴の多くは、電気泳動中の質量移動を表す移動境界方程式により、理論的に予測することができます。

複数のイオン種を含むシステムについては、簡潔な一般解をもつ方程式が 1897 年に Friedrich Kohlrausch<sup>12</sup> により導出されています。この一般解は、Kohlrausch 調整関

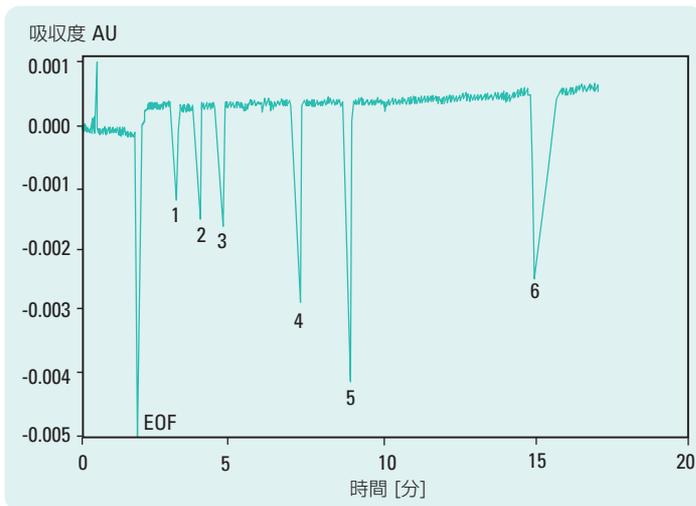


図 1.18

電氣的拡散による溶質のフロンティングとテーリング。<sup>11</sup>

ピーク: 1)塩化物、2)塩素酸塩、3)フッ化物、4)酢酸塩、5)プロピオン酸塩、6)MES

条件: 検出 = 間接 UV、バッファ = 0.01 M 安息香酸、Tris および 0.05 % MHEC 添加により pH 8 に調整して EOF を抑制、サンプル濃度 =  $5 \times 10^{-4}$  M、検出波長 = 254 nm、 $V = -25$  kV、 $l = 50$  cm、 $L = 57$  cm、 $id = 75$   $\mu$ m

数 (KRF) と呼ばれ、次式で表されます。

$$1.22 \quad \sum_i \frac{|z_i| c_i}{\mu_i} = \omega$$

$z_i$  = イオン  $i$  の原子価

$c_i$  = 濃度

$\mu_i$  = 移動度

$\omega$  = 定数 (バッファ溶液における任意の  
ポイントの Kohlrausch 値)

KRF と本章の説明は、Gas らによる PeakMaster などの CE 分離のモデリングやシミュレーションの基礎となっています。

(<http://www.natur.cuni.cz/~gas/>).

### 1.3.4.6. バッファの液面高さの不一致

1.3.4 項 (表 1.3) で述べたように、バッファリザーバの液面高さのレベルを等しく保つことは、分析効率および泳動時間の再現性にとって重要な要素です。入力リザーバから出力リザーバ、またはその逆方向のサイフォン現象が起きると、キャピラリー内で層流が起きてしまいます。この現象により、再現性だけでなく、分析効率も損なわれてしまいます。バッファ液面レベルが一定でない場合の影響の大きさは、キャピラリーの内径と長さ、およびバッファの粘度によって異なります。短くて内径の大きいキャピラリーを使い、高い温度で分析する場合に、もっとも影響が大きくなります。内径 50- $\mu\text{m}$  のキャピラリーの場合、液面高さが 2 mm 違うと、泳動時間は 2~3% 程度変化することがわかっています。内径 100- $\mu\text{m}$  のキャピラリーでは、この変化の割合は約 10% にもなります。

バッファ液面高さの自動レベル合わせ機能では、バッファ交換の際にユーザーが設定した液面レベルまで、正確にバッファが送り込まれます。この機能を使えば、EOF の動きにより生じる泳動バッファの液面の高さの違いを補正することもできます。この場合、バッファバイアルをいったん空にする必要はありません。

### 1.3.4.7. 検出器

検出器の出力は、最終容積 (検出器セル) で平均したシグナルを表しています。ここで導入される分散 ( $\sigma_{\text{det}}^2$ ) は最終注入プラグのものと同じです。

1.23

$$\sigma_{\text{det}}^2 = \frac{w_d^2}{12}$$

$w_d$  = 検出器セル長

CE アプリケーションでは、 $w_d$  が入力されるサンプルゾーン長の 3 分の 1 程度である場合は、一般にシステムの全分散 (1.16 式の  $\sigma_T^2$ ) におけるこの分散の影響は無視することができます。

## 1.3.5. 分離度

試料成分の分離は、分離科学の最終的な目的です。分離度は次式で定義されます。

1.24

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma}$$

t = 移動時間

w = ベースライン上のピーク幅（時間で表す）

$\sigma$  = 標準偏差添字の 1 と 2 は 2 つの容積を表す

(1.26) 式の分子は異なる移動度による分離プロセスを表し、分母はそれに対するゾーンの広がりのプロセスを表しています。CZE での分離は、選択性ではなく、おもに効率により実現します。これは、選択性が重要となる液体クロマトグラフィーとは対照的です。溶質ゾーンが非常にシャープなため、溶質の移動度の差がわずかであっても (0.05 以下でも) 十分な分離が得られることがあります。もちろん、分離するのに十分な移動度の差があるなら、バンドの広がり的大小さはあまり問題にはなりません。

2 つの成分の分離度は、分離効率に関する式として表すこともできます。

1.25

$$R = \frac{1}{4} N^{1/2} \left( \frac{\Delta\mu_a}{\bar{\mu}_a} \right)$$

where  $\Delta\mu = \mu_{a2} - \mu_{a1}$

$$\bar{\mu}_a = \frac{\mu_{a2} + \mu_{a1}}{2}$$

**注**：時間または速度は移動度で置き換えることができます。(1.12) 式を (1.25) 式に代入すると、分離効率 N を計算せずに実際に用いることのできる分離度の理論式 (1.26) が得られます。この式は、EOF が分離度に及ぼす影響も示しています。

1.26

$$R = \left( \frac{1}{4\sqrt{2}} \right) (\Delta\mu_a) \left( \frac{V}{D(\bar{\mu}_a + \mu_{E0F})} \right)^{1/2}$$

分離率は印加電圧 (1.14 式) に比例して上がりますが、分離度は印加電圧と平方根の関係にあるので、同じような効果は見られません。分離度を 2 倍にするためには、印加電圧を 4 倍にする必要がありますが、そうした手法は、ジュール熱の発生による制限を受けます。(1.28) 式から、 $\mu_a$  と  $\mu_{E0F}$  の大きさが等しくて符号が反対であるときに無限の分離度が得られることがわかります。すなわち、イオンが E0F と同じ速さで反対方向に移動するときです。ただし、この場合、分析時間も無限大になってしまいます。分析パラメータは分離度と分析時間を考慮して設定しなければいけないのが明らかになります。

## 1.4. キャピラリー電気泳動の特徴

- 電気泳動には、ナローポア (内径 25~75- $\mu\text{m}$ ) のフューズドシリカキャピラリーが用いられる
- 高電圧 (10~30 kV) および高電場 (100~500 V/cm) がキャピラリーに適用される
- キャピラリーの高い電氣的抵抗により、電流の発生と内部の発熱が抑制される
- 高い効率 ( $N > 10^5 \sim 10^6$ ) と短い分析時間
- 外部検出セル (DAD) またはオンライン MS によるオンキャピラリー検出 (DAD、CCD、LIF)
- 必要なサンプル量が少ない (注入量 1~50 nL)
- 多くのモードにより、選択性が変化し、広い範囲のアプリケーションに対応
- 水性および非水性媒体で実行可能
- メソッド開発が簡単
- 自動化された機器



## 分離モード

---

### 分離モード

キャピラリー電気泳動の応用範囲の広さは、分離モードの多さに由来しています。この点は液体クロマトグラフィーとよく似ています。基本的に、各種の CE 分離モードは、ある程度は液体クロマトグラフィーで用いられる基本的な分離モードと同様です。以下の表 2.1 は、それを示しています。

液体クロマトグラフィー	電気泳動
<b>溶出:</b> 移動相と固定相の分配にもとづく分離 逆相、イオン交換、順相、疎水性相互作用	<b>溶出:</b> ゾーンとの速度差にもとづく分離 キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)、 ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)、キャピラリー電気クロマト グラフィー (CEC)
<b>分子ふるい:</b> サイズと形状に応じた固定相内 の移動度にもとづく分離 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)	<b>分子ふるい:</b> サイズと形状に応じた 固定相またはゲル内の移動度にもと づく分離 キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)
<b>クロマトフォーカシング:</b> イオン交換固定 相において移動相が生成する pH 勾配にもと づく分離	<b>キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF):</b> 泳動バッファにおける固定 相 pH 勾配の動きにもとづく分離
<b>置換クロマトグラフィー:</b> 固定相における 強吸着ゾーン (ディプレッサー) の動きにも とづく分離 試料分子は、ディプレッサーの前のゾーン として溶媒の速度で動く	<b>キャピラリー等速電気泳動 (CITP):</b> 電解液のリーディング液からターミナ ル液までの電場勾配の動きにもとづ く分離 すべての試料分子は、一定濃度で結び ついたゾーンとして、同じ速度で動く

**表 2.1**  
**分離モード**

HPLC と CE の分離モードは原理的にはよく似ていますが、基礎となるメカニズムは異なります。特に、CE の「溶出」モードには大きな違いがあります。そのため、分離の選択性、すなわ試料成分が溶出する順序は、HPLC 分離と CZE や MEKC、CEC 分離とでは大きく異なります。HPLC と CE では分離メカニズムが異なるため、試料に関して補完的な情報が得られます。たとえば、HPLC で共溶出する物質を、CE で分離することができます。

分配およびサイズ排除クロマトグラフィーが広く用いられている液体クロマトグラフィーとは異なり、キャピラリー電気泳動では、すべてのモードが実践的に使用されています。ただし、各 CE モードの機能と長所や、それぞれのモードにもっとも適した用途を理解することが大切です。

たいていの場合、各モードは、バッファ組成を変えるだけで実行できます。最先端の機器では、個別の設定が備わっており、各モードに対応することができます。

前章（1章）では、電解液を満たしたキャピラリーの軸に沿って適用した電場における帯電分子の動きの基礎を説明しました。帯電分子のゾーンのスピードや形状、幅に影響を与える要因も説明しました。次の項では、基本的な操作と関連アプリケーションを中心に、各モードの分離の基礎を説明します。

## 2.1. キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)

キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) は、もっともシンプルな CE です。CZE では、キャピラリーを電解液（泳動バッファ）で満たし、サンプルを注入口で導入し、電場を印加します。図 2.1 と 1.11 項で説明するように、溶質がそれぞれ独立したゾーンの状態で、異なる速度で移動することにより、分離が起こります。

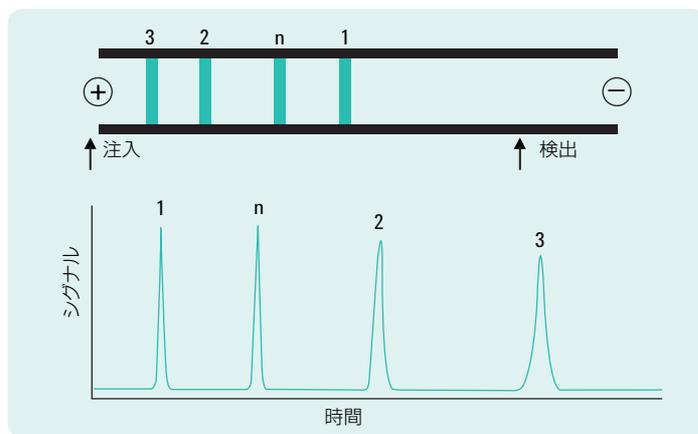


図 2.1

キャピラリーゾーン電気泳動での浸透流と溶質の移動（溶質の電荷や大きさによって移動度は異なります）陽イオン物質（1）は移動度がもっとも高く、その後に中性物質（n）、陰イオン物質（2、3）が続いています。

各溶質の速度は、(1.1) 式で示されます。1.3.1 項で説明したように、電気泳動移動度は、物質に固有の特性で、おもにイオンの電荷/サイズ比により決まります。小さくて電荷の高いイオンは速く動き、大きくて電荷の低いイオンはゆっくり動きます。溶質は反対の極をもつ電極の方向へ移動します。つまり、陰イオンは陽極へ、陽イオンは陰極へ移動します。

電気泳動移動のほかに、EOF (1.3.2 項参照) の影響により、溶質ゾーンもキャピラリー内を移動します。EOF の方向は、陰イオンと陽イオンいずれかの動きの方向と同じで、検出ポイントに向かって動きます (図 2.1)。

したがって、1 回の CZE 分析で、陰イオン性溶質と陽イオン性溶質の両方を分析することが可能です。たいていの場合、EOF は電気泳動移動度よりもずっと大きいため、EOF と反対へ動くイオンは、検出器へ流されることとなります。中性溶質はすべて EOF と一緒に動き、分離されません (中性溶質を分離する方法については 2.2 項および 2.3 項を参照)。

CZE では、溶質の電気泳動移動度と電気浸透流をコントロールすることが不可欠です。つまり、CZE における分離を最適化し、コントロールするためには、1 章で説明したように、有効イオン移動度や EOF、ゾーン幅に影響を与えるすべての要素を考慮する必要があります。分析時間、検出順序、分離の再現性は、メソッド全体で重要なパラメータとなります。

EOF に影響を与える要素については、表 1.1 にまとめています。電気泳動移動度は、電荷/サイズ比に影響を与えるすべての要素に左右されます。電解液 (泳動バッファ) の pH を調節すれば、イオンのイオン化度を変更することができます。これにより、電荷/サイズ比が変化し、電気泳動移動度が変化します (図 1.3 参照)。また、使用するバッファの種類 (無機、有機、両性イオン) や有機溶媒の存在も、移動度や EOF に大きな影響を及ぼします。こうした影響については、4.4.1 項で説明しています。

ゾーンの広がりに影響を与える壁面の相互作用は、pH により抑制することができます。低 pH (< 2~3) では、フューズドシリカキャピラリー内表面の弱酸性シラノール基がプロトン化し、非荷電となります。これにより、ゼータ電位 (1.3.2 項参照) が小さくなり、EOF はほぼゼロになります。タンパク質 (およびその他の物質) も、低 pH でプロトン化し、正の電荷を帯びるため、中性のキャピラリー表面にクーロン作用により引き付けられずに

陰極に移動します。反対に高 pH (>8~10) では、壁面と試料の両方が脱プロトン化して負の電荷を帯び、溶質と壁面の相互作用は電荷斥力により抑制されます。タンパク質の高効率分離を例に、この仕組みを図 2.2 で示しています。

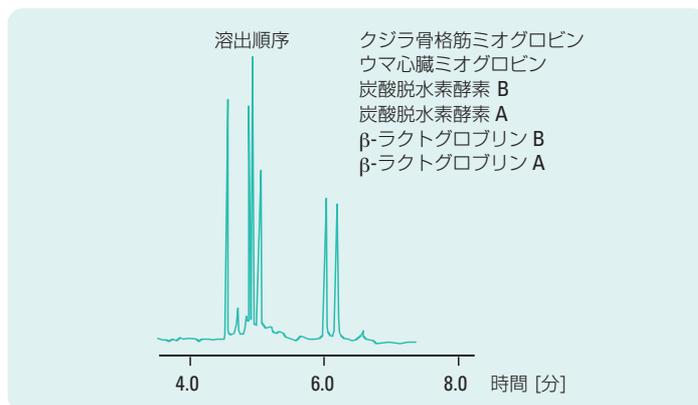


図 2.2  
溶質 pI を上回るバッファ pH を用いたタンパク質の CZE 分離<sup>13</sup>  
条件: 20 mM ホウ酸/バッファ pH 8.25、V = 30 kV、l = 55 cm、L = 101 cm、  
id = 52 μm、i = 38 μA

## 2.2. ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) は、電気泳動とクロマトグラフィーを組み合わせた分離モードです。1984年に寺部らにより報告<sup>14</sup>された MEKC は、生物製薬分析で広く使用されている実用的な CE モードであり、食品や環境、臨床などの分析での使用も増加しています。この分離モードの大きな特長は、荷電物質と同様に中性物質の分離にも、電気泳動の技術が応用できることです。

MEKC では、泳動バッファに界面活性剤を加えることにより、中性物質の分離を行います。界面活性剤は、臨界ミセル濃度 (例えば SDS の場合 8~9 mM) を超える濃度で、個々の界面活性剤分子の集合体であるミセルを形成します。界面活性剤分子の疎水性の尾の部分は親水性バッファと相互作用しないので中心に集まり、電荷をもった頭の部分はバッファのほうを向くた

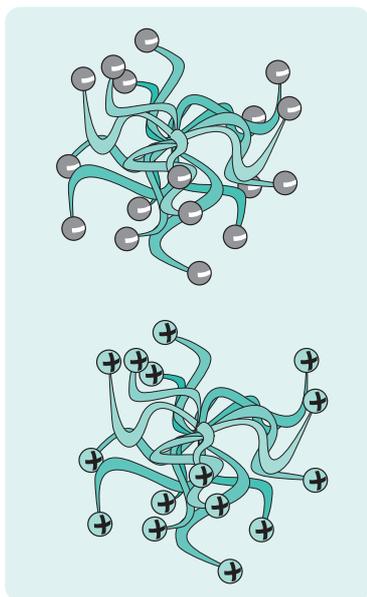


図 2.3  
陽イオン性および陰イオン性ミセルの構造

め、多くの場合ミセルは球形になります。ミセルの構造を図 2.3 に示します。

界面活性剤のミセルは通常帯電しているため、その電荷の種類によって、EOF の方向か、または逆方向に移動します。SDS のような陰イオン性界面活性剤は、陽極の方向つまり EOF とは反対の方向に移動します。ただし中性またはアルカリ性の pH では、EOF の速度は一般的にミセルの移動速度よりも速いので、ミセルは、実際には EOF の方向に移動します。移動している間に、クロマトグラフィーと同様の疎水性相互作用と静電的相互作用により、ミセルと泳動バッファとの間で溶質が分配されます。ミセルはクロマトグラフィーと同様、固定相として働きます。ただし、クロマトグラフィーと違って、この固定相は移動します。

中性物質は、ミセルにとりこまれる割合の違いによって分離されます。ミセルは中性物質を EOF と逆の方向に運ぶので、溶質とミセルとの相互作用が多くなるほど、溶質の移動時間は長くなります。ミセルと相互作用しない溶質は、EOF と同じ速度で移動します。疎水性がより大きい化合物は、ミセルとの相互作用が強くなるので、より長く“保持されます”。このミセルと中性物質との相互作用の差により、分離が起こります。MEKC での分離過程の概要を、図 2.4 に示します。

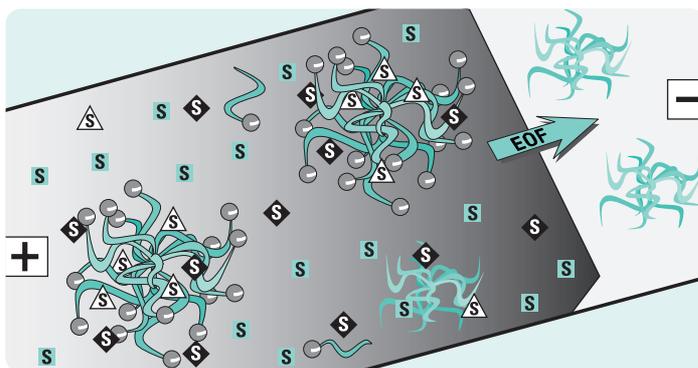


図 2.4  
MEKC における分離(s=溶質)

MEKCによる中性溶質の分離のメカニズムは、本質的にクロマトグラフィーと同じなので、クロマトグラフィーで用いる式に多少変更を加えることで説明できます。

移動相中の溶質の全モル数に対するミセル中の溶質の全モル数の比（擬似固定相）、すなわち容量比（ $k'$ ）は、次の式で示されます。

$$2.1 \quad k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0 \left(1 - \frac{t_r}{t_m}\right)} = K \left( \frac{V_s}{V_M} \right)$$

- $t_r$  = 溶質の保持時間
- $t_0$  = EOF の速度で移動する保持されない溶質の移動時間（デッドタイム）
- $t_m$  = ミセル保持時間
- $K$  = 分配係数
- $V_s$  = ミセル相の容積
- $V_M$  = 移動相の容積

この式は、クロマトグラフィーにおける $k'$ の式を、擬似固定相の移動を説明するために修正したものです。 $t_m$ が無限大のとき、すなわちミセルが真に固定された場合に、この式はクロマトグラフィーで通常用いられている式と同じ形になります。MEKCによる2つの物質の分離度は、次の式で表されます。

$$2.2 \quad R = \underbrace{\left( \frac{N^{1/2}}{4} \right)}_{\text{効率}} \underbrace{\left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)}_{\text{選択性}} \underbrace{\left( \frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right) \left( \frac{1 - \left( \frac{t_0}{t_m} \right)}{1 + \left( \frac{t_0}{t_m} \right) k'_1} \right)}_{\text{容量比}}$$

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

式(2.2)より、分離度が、効率、選択性、容量比の最適化によって改善できることが分かります。容量比は、界面活性剤の濃度を変化させるだけで

容易に調整できます。一般的には容量比は、界面活性剤の濃度に比例して増大します。ただし、イオン性界面活性剤を特に高濃度で使用する際は、電流の増加が問題になります。中程度の電場強度で発生する電力は 5~10 W/m を超えます。ナローポアキャピラリー (25~50  $\mu\text{m}$ ) でも、極端に強い電場の使用は避け、キャピラリーの温度調節を効率的に行う必要があります (3.3 項参照)。

MEKC では、溶質は  $t_0$  と  $t_m$  の間に溶出します。分離度は、タイムウィンドウと呼ばれる溶質の溶出範囲を広げることにより改善されます。中性溶質を分離する場合、全ての溶質は  $t_0 \sim t_m$  に溶出します (図 2.5 参照)。ミセルと全く相互作用しない親水性溶質は EOF と同じ時間に溶出し、ミセルに完全に保持される溶質 (例えば Sudan III) はミセルと同じ時間に溶出します。タイムウィンドウの幅はかなり狭いことが多いのですが、分離効率が高いのでピークの分離能をあげることができます。タイムウィンドウを広げるには、中間的な速さの EOF と高い移動度をもつミセルを使用することが望ましいと言えます。

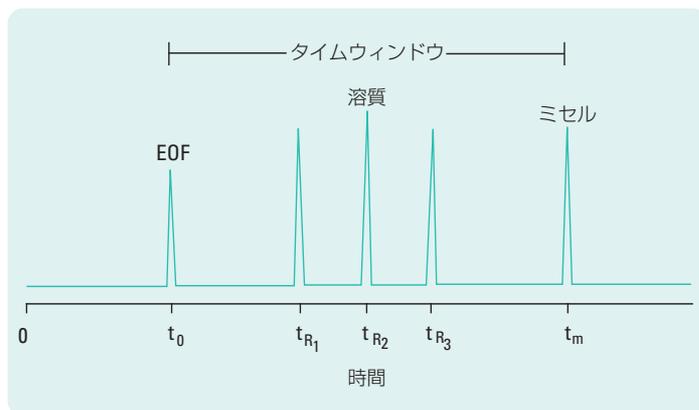


図 2.5  
MEKC モードにおける中性溶質の溶出のタイムウィンドウ

MEKC では、選択性を容易に変えることができます。界面活性剤の種類を変えると、ミセルの物理的性質 (サイズ、電荷、外形) が変化するので、選択性を劇的に変化させることができます。これは、LC で固定相の変更により

選択性を変える方法と似ています。界面活性剤は、陰イオン性、陽イオン性、両性があり、これらの混合物も用いることができます (表 2.2)。また、これらの界面活性剤ごとに、アルキル鎖の長さや構造の違うものを利用できます。胆汁酸塩や乳化剤、水中油 (o/w) および油中水 (w/o) を使うこともできます<sup>15</sup> (マイクロエマルジョン動電クロマトグラフィー (MEEKC) と呼ばれます)。さらに、選択性を変化させるために、バッファ濃度や pH、温度を変えたり、尿素、金属イオン、キラルセレクトアのような添加剤を使用することができます。

	界面活性剤	臨界ミセル濃度 (mM)	凝集数
陰イオン性	SDS	8.2	62
陽イオン性	DTAB	14	50
	CTAB	1.3	78
中性	オクチルグルコシド	—	—
	n-ドデシル-β-D-マルトシド	0.16	—
	Triton X-100	0.24	140
両性	CHAPS	8	10
	CHAPSO	8	11
胆汁酸塩	コール酸	14	2-4
	デオキシコール酸	5	4-10
	タウロコール酸	10-15	4

**表 2.2**  
MEKC で使用される界面活性剤

**注:** バッファ溶液中の界面活性剤の CMC は、通常は水中における CMC よりも低くなります。たとえば、水中における SDS の CMC は 8 mM ですが、一般的なバッファ溶液中では 3 mM に低下します。

クロマトグラフィーと同じように、泳動バッファに有機溶媒を添加して、溶質とミセルの相互作用をコントロールすることができます。メタノール、アセトニトリル、2-プロパノールといった有機溶媒を使用できます。泳動バッファに対して、有機溶媒を数%から 50% (v/v) の濃度で添加すると、溶質とミセルの疎水性相互作用は弱くなり、クロマトグラフィーの相互作用をより速めることができます。

MEKC に使用される界面活性剤は、キャピラリーの内壁とも相互作用するの

で、溶質とキャピラリー内壁間で相互作用がおきる場合と同様に、EOFに大きな影響を与えます。溶質とミセルの移動方向は、ミセルの電荷や EOF の速度により変化します。一般的に EOF を適切な速度に保ち、ミセルを EOF の方向に移動させるには高い pH のバッファを使用します。

(生物) 製薬分野では、錠剤や軟膏、注射薬中の有効成分の分析に MEKC が用いられています。SDS ミセルを使用して、感冒剤中の有効成分を分離した例を図 2.6 に示しています。

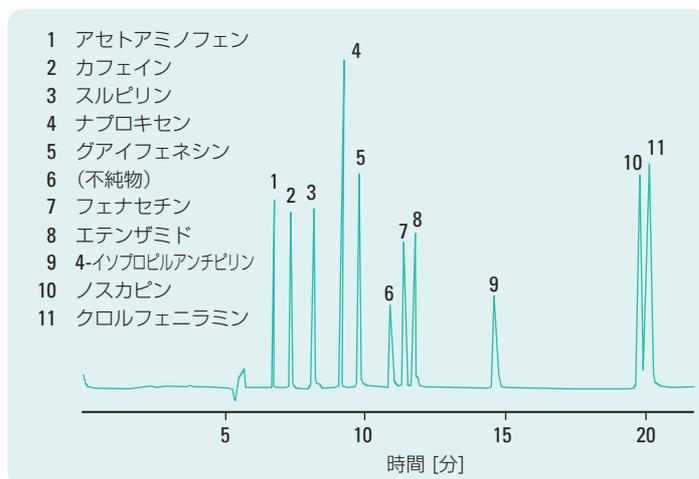


図 2.6

### MEKC を用いた風邪薬成分の分離

条件: 20 mM リン酸-ホウ酸-100 mM SDS, pH 9.0, V = 20 kV, L = 65 cm,

MEKC と MEEKC では、温度が CMC と分散係数 (K) に影響を与えるため、温度のコントロールがきわめて重要となります。温度が上がると、CMC が上昇してミセル濃度 (Cmicelles) が低下し、 $k'$  に影響が出ます。分散係数 (K) も温度が上がると低下します。

### 2.3. キャピラリー電気クロマトグラフィー(CEC)

キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) は、小型の液体クロマトグラフィーの一形態で、電場を用いて液体を充てんクロマトグラフィーカラム中で移動させます (EOF)。もともとのアイデアは 1974 年に Pretorius が発明したもので<sup>16</sup>、長らく無視されていましたが、1981 年に Jorgenson と Lukacs により見直されました<sup>17</sup>。しかし当時は、CEC はキャピラリー電気泳動の急速な発展の陰に隠れていました。80 年代後半に、Knox と Grant<sup>18,19</sup> が CEC の主要パラメータを詳細に研究したことから、CEC は爆発的に発展し、約 2 年でそれまでの倍に拡大しました。

CEC では、内径 50~200  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーに充てんされた固定相を用いて分離を行います。固定相としては、おもに HPLC タイプのシリカベース逆相充てん剤 (1~5  $\mu\text{m}$ ) が使用されます。移動相には通常、逆相分離に用いられる有機溶媒/水性バッファなどの混合溶媒が使用されます。充てんキャピラリーに電場を適用すると、電気浸透流が生じます (1.3.2 項参照)。この電気浸透流が、充てんキャピラリー内で溶質と移動相を動かします。溶質が非荷電の場合は、溶質と移動相および固定相間の分配により分離を行います。分離する溶質が帯電している場合は、そのほかに電気泳動速度が生じ、それが分離に影響します。このテクニックは、CZE とよく似ています。そのため、キャピラリー電気泳動に使用する装置を使えば、大きな修正を加えずに、CEC を実施することができます。CEC のシステム概略を図 2.7 に示しています。

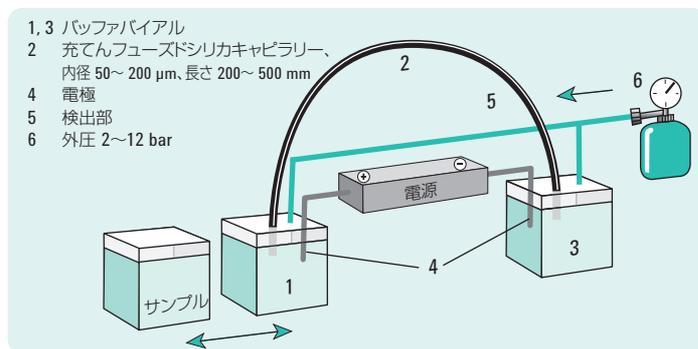


図 2.7  
CEC のシステム概略図

1.3.2項では、キャピラリー壁面の電気二重層に電場を適用することにより、キャピラリー内で液体のバルク流（EOF）が生じる理由を説明しました（図 2.8 で再度説明）。

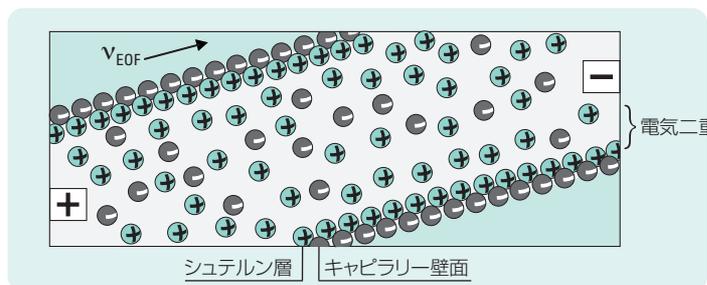


図 2.8  
電解液を満たしたフューズドシリカキャピラリーにおける固体/液体界面図

この流れの速度 ( $v_{EOF}$ ) は、次式で表されます。

$$2.3 \quad v_{EOF} = \frac{\varepsilon \zeta E}{\eta} \approx \frac{\varepsilon \psi_0 E}{\eta} = \frac{\sigma^* E}{\delta \eta}$$

$\varepsilon$  = 溶液の誘電率

$\zeta$  = ゼータ電位  $\approx \psi_0$  (壁面電位)

$\sigma^*$  = 滑り面 ( $\zeta$  が影響を与える場所) の電荷密度

$\delta^{-1}$  = 二重層厚さ

$\eta$  = 溶液の粘度

$E$  = 電場強度

逆二重層厚さ ( $\delta$ ) は、次式で表されます。

$$2.4 \quad \delta = \sqrt{\frac{\varepsilon RT}{2F^2 I}}$$

$R$  = ガス定数

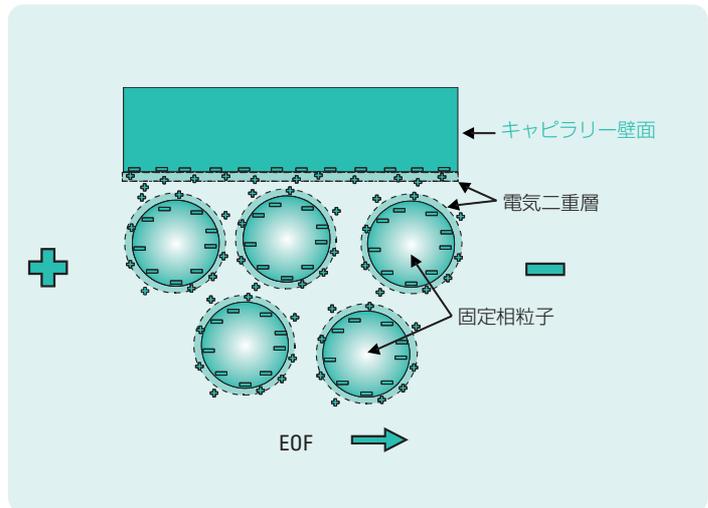
$T$  = 温度

$F$  = ファラデー定数

$I$  = イオン強度

( $= 1/2 \sum C_i z_i^2$ ;  $C_i$  = バッファ濃度、 $z_i$  = イオン価数)

キャピラリーにシリカベースの粒子を充てんすると、粒子内やその周辺でも二重層が形成されます。軸方向の電場を適用すると、溶媒は陰極のほうへ動き始めます。これを図 2.9 に示しています。



**図 2.9**  
充てんキャピラリーにおける電気浸透流の発生図 20

(2.3) 式各パラメータに、ゼータ電位 100 mV (pH 4 の水性バッファ溶液における未修飾シリカ表面の一般的な値) のような適切な値を代入すると、0.8 mm/s (100 V/cm の場合) から 3.2 mm/s (400 V/cm の場合) の速度で EOF が生じます。高電流のカラム内でのガス放出や気泡形成を避けるために、インレットおよびアウトレット側のバッファバイアルに 2~12 bar の圧力をかけます。実際に CEC カラムで生じた EOF を測定し、結果を図 2.10 に示しました。

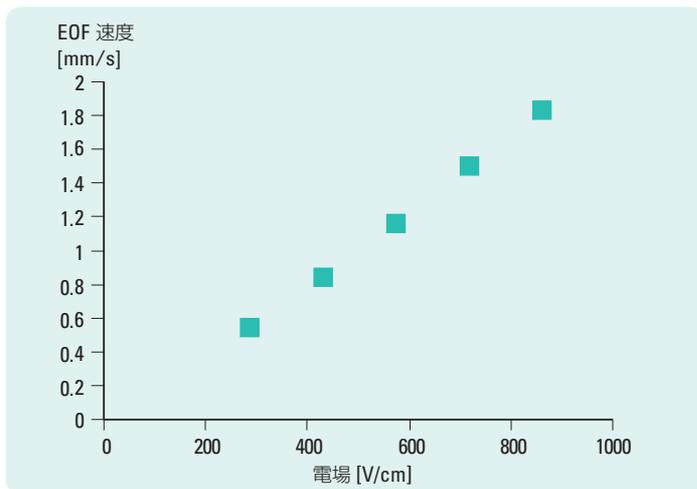


図 2.10

印加電圧による充てんキャピラリー中の EOF 変化 (実験値)<sup>21</sup>

条件: カラム: CEC-Hypersil C18、3 μm、250(335) x 0.1 mm; 移動相: アセトニトリル/25mM モルホリノ-エタンスルホン酸 (MES) pH 6 = 80/20、温度: 20 °C

粒子を充てんしたキャピラリーで生じた EOF の流速分布は、オープンチューブキャピラリーにおける流速分布と同じになります (図 1.7A、1.3.2 項)。これを図 2.11 に示しています。

圧力による生じる流速は、管径により異なります。溶質はカラム内で流れる速い経路と遅い経路をたどることがあり、これがゾーンの広がりにつながります。電気を用いたシステムでは、流速は管径にほとんど左右されないので、管径を変更しても、溶質の流速は変わりません。これにより、ゾーンの拡散が抑えられます。

これにより、圧力を用いた送液と比較して、電気を用いた場合のキャピラリー HPLC カラムの HETP は、粒子サイズや容量比、速度により異なりますが、正味 30~60 % 低下します。このことは、図 2.12 のクロマトグラムに示されています。この図では、各ピークの効率率は 60,000 ~ 70,000 段です。HPLC モードでは、カラムの段数は最大で 25,000 ~ 30,000 になります。

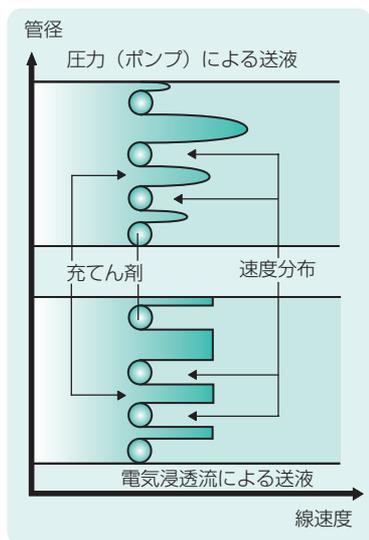


図 2.11

電気駆動および圧力ポンプ駆動におけるキャピラリー中の速度分布図

溶媒和陽イオンにかかる電気力は、カラム全体において等しくなります。それに対して、カラム注入口にかかる圧力は、カラムの長さに沿って直線的に消散します。充てんキャピラリーにおいて特定の速度で液体を動かすのに必要な圧力は、充てん剤粒径の逆二乗に比例して増加します。また、充てんキャピラリーの長さにも直線的に比例して増加します。そのため、HPLCにおいて、粒子径を小さくしたりカラムを長くしたりして分離の効率を高めようとする場合は、圧力の大幅な増加や分析スピードの低下といった制約がともないます。

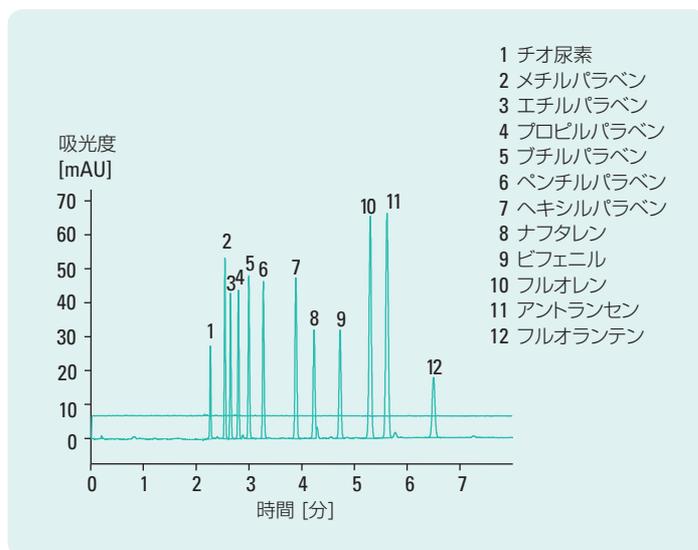


図 2.12  
CEC 分離の例。測定条件は図 2.10 と同じ。電圧 25 kV  
電氣的注入法によりサンプルを注入<sup>21</sup>

電気駆動の場合、そうした現象は起こりません。そのため、CEC は HPLC に比べて、小さい粒子を充てんした長いカラムを効率的に使用することができます。例として、3 μm 粒子を充てんした長さ 40 cm のカラムで得られたクロマトグラムを図 2.13 に示しています。

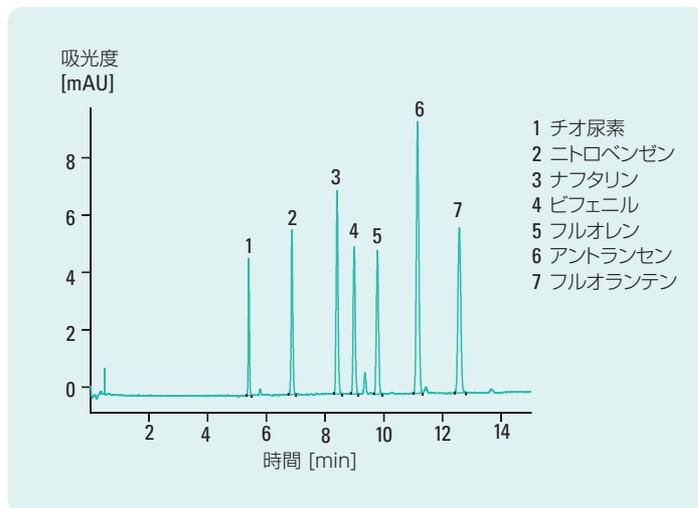


図 2.13

### 高効率カラムによる CEC 分析例(100,000 段)

条件: カラム: Spherisorb ODS1, 3  $\mu\text{m}$ , 400 (485) x 0.1 mm;

移動相: アセトニトリル/Tris 50 mM, pH 8、80/20; 電圧 30 kV、温度: 20  $^{\circ}\text{C}$ <sup>22</sup>

ピークの効率は平均 100,000 段です。

電気駆動の場合、送液メカニズムが向上すれば、ゾーンの広がりや少なくなり、背圧もなくなります。その結果、CEC では、最終的に HPLC に比べて 3~10 倍の分離効率を得られることが予想できます。これにより、現在の HPLC 分離と同じ時間で、1メートルあたり 250,000~1,000,000 段数というカラム段数が得られます。ただし、上述の処理を適用できるのは、移動相と固定相の間での分配のみにより分離される中性の溶質です。イオン性の溶質の場合、正味電荷に応じて速度が増減します。そのため CEC は、中性や弱酸性/弱塩基性の溶質の高効率分離に適したテクニックといえます。キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE) は、強酸や強塩基といった電荷の強い溶質に適しています。

**まとめ:**

充てんキャピラリー内の電気浸透流は、おもに以下の3点で、圧力により生じる層流とは異なります。

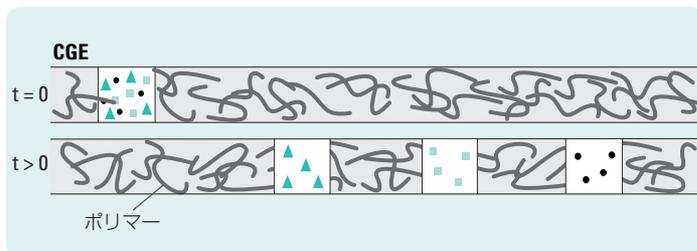
- a) 粒子間のチャンネルの流速分布はプラグ流速となり、速度はチャンネルの幅に左右されません。そのため、電気駆動の流れの場合、圧力ポンプ駆動の流れに比べて、充てんキャピラリーにおける横断面的な流速の差異がずっと少なくなります。
- b) 流速は粒子サイズにほぼ左右されません。カラムの背圧が生じません。
- c) 充てん剤における電気二重層の存在は、EOFを生成するための前提条件となります。そのため、EOFの大きさは、使用する固定相と移動相に左右されます。これらの要因が、HPLCカラムの場合に比べて、CECカラムで生じるゾーンの広がり(HETP)に好ましい影響を及ぼします。

粒子充てんキャピラリーから、コーティング固定相をもつオープンチューブ<sup>23</sup>やモノリシック相のフリットレスキャピラリー<sup>24,25</sup>へのCECの拡張も報告されています。こうしたCECに関する理論の詳細については、参考文献20、21を参照してください。

## 2.4. キャピラリー ゲル電気泳動 (CGE)

スラブゲル電気泳動は、おもに分子生物学の分野で、タンパク質や核酸といった高分子をサイズ別に分離する際に使用されています。タンパク質をサイズ別に分離するためには、まずドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で飽和させ、変性させる必要があります。その後、「分子ふるい」として機能する適切なポリマーを用いた溶質の電気泳動により、サイズに応じて分離します。

キャピラリーを用いたゲル電気泳動(CGGE)の形態を図2.14に示しています。



**図 2.14**  
CGE におけるサイズ分離

帯電した溶質がポリマーの網の目を移動するとき、大きな溶質は小さな溶質よりも大きな抵抗を受けます。DNA や、SDS で飽和したタンパク質のような高分子は、分子サイズにかかわらず同じ質量電荷比をもつので、ゲルを使わなければ分離することができません。つまり、DNA を例にすると、DNA 鎖のヌクレオチドの数が増えても、等量の質量と電荷が加算されるだけなので、自由溶液中での移動度は変わりません。

キャピラリーゲル電気泳動は、従来のスラブゲルやチューブのゲル電気泳動と分離メカニズムが同じなので、直接比較することができます。ただし、キャピラリー電気泳動には、ジュール熱の影響を受けずに 10~100 倍の電場をかけられることや、キャピラリー上での直接検出や自動化が可能なことなど、従来のスラブゲル電気泳動と比べて多くの利点があります。また、キャピラリーのなかでは対流が起こらない（つまり、温度勾配がないため、対流により生じる混合が起こらない）ので、対流の影響を抑えるゲルを使用する必要はありません。対流の影響を抑えるゲルでは構造や形状を固定する必要があり、これは特定の濃度や組成でしか使用できません。キャピラリー形式では、そうした要件を無視し、新たに作成した「ゲル」を適用することができます。スラブゲル電気泳動の利点は分取が容易なことですが、CE でも、管径の大きいキャピラリー（内径 >100~200  $\mu\text{m}$ ）や低い電場を使用することで、ある程度の方取を行うことができます。スラブゲル電気泳動でのマルチレーン法（以前は DNA シーケンシングで使用されていたもの）は、交換可能な分子ふるい用「ゲル」で満たしたキャピラリーアレイで代用されるようになっています。

スラブやチューブのゲル電気泳動では、従来、架橋型ポリアクリルアミド

とアガロースが用いられてきました。架橋型ポリアクリルアミドは小さい細孔をもち、タンパク質の分離に使用されます。アガロースは粗い隙間をもち、DNAの分離に適しています。

CGEにおいて、“ゲル”という言葉は幾分あいまいに使用されています。ゲルとは通常、スラブゲル電気泳動で使われる固体に似た構造を意味します。CGEで使用される“ゲル”の多くは、固体の性質をもたない（もつ必要がない）ので、“網状ポリマー”という表現のほうが適切かもしれません。CGEで用いられるポリマーには、共有結合で架橋したものの、水素結合したものの、バッファ溶液中に溶解しただけのもの（非架橋ポリアクリルアミド、メチルセルロースなど）があります。非架橋ゲルのポリマーの構造は、架橋ゲルの構造と基本的に違いますが分離メカニズムは同じです。従って、どのタイプのゲルを使用しても高分子のサイズ分離が可能です（表 2.3）。

ポリマー	濃度	主なアプリケーション
<b>架橋型ポリマー</b>		
ポリアクリルアミド/ bis-アクリルアミド	2–6 % T, 3–6 % Co	オリゴヌクレオチド、DNA シーケンシング 非変性タンパク質、SDS 変性タンパク質
<b>直鎖型ポリマー</b>		
ポリアクリルアミド	< 0.1–6 %	制限酵素フラグメント
ヒドロキシアルキルセルロース、 ポリビニルアルコール、 デキストラン	6–15 %	オリゴヌクレオチド、DNA シーケンシング、タンパク質
アガロース	0.05–1.2 %	制限酵素フラグメント、 タンパク質

**表 2.3**  
**CGE モードで用いられるポリマー**

現在のところ、DNA シーケンシングの分離マトリックスとしては、一般に直鎖型ポリアクリルアミド（LPA）とポリジメチルアクリルアミド（PDMA）が使われています。この2つは、商用シーケンサーや遺伝的アナライザでもよく使用されるようになっていきます。

架橋型ポリアクリルアミドをキャピラリー中で *In situ* 調製する際には、細心の注意が必要です。この種のゲルは欠点が多いため、実用的な CGE には適しません。現在では、直鎖型ポリマーが代わりに使用されるようになっていきます。

直鎖型ポリマーは、ポリマー溶液の性質をもつのでより柔軟性に富んでいま

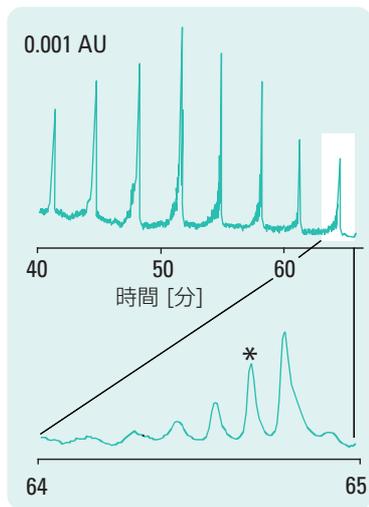


図 2.15  
架橋ポリアクリルアミドを用いた CGE によるポリデオキシチミジン酸混合物、p(dT) 20-160 の分離<sup>26</sup>

条件: Bis-架橋ポリアクリルアミド (6% T, 5% C)、100 mM Tris、25 mM ホウ酸、7 mM 尿素、pH 7.6、E = 200 V/cm、i = 8.2 mA、l = 100 cm、id = 75  $\mu$ m、 $\lambda$  = 260 nm、ポリアクリルアミドコーティングキャピラリー

す。直鎖型ポリマー溶液もキャピラリー中で重合させることができますが、一般的にキャピラリー中で重合させる必要はありません。あらかじめ重合させたポリマーを泳動バッファに溶かして、キャピラリー中に加圧法で充てんできます。ポリアクリルアミドは広範囲な濃度 (1% 未満から 20% 以上まで) で使用できます。一般に、必要なポリマー濃度は試料のサイズに逆比例します。

ポリマー溶液の粘度が低い場合には、加圧法で試料を注入することができます。また、ポリマー溶液を繰り返しキャピラリーに充てんすることもできます (濃度と粘度による)。泡の発生やその他の失敗の影響が減少するので安定性は高くなります。ゲルの粘度が低い程、良好な内壁コーティングを必要とします。CGE では、どのゲルを用いる場合でも、EOF を消すためにキャピラリー内壁のコーティングが必要です。

CGE と CZE はともに“ゾーン”電気泳動手法であるため、分離能と効率率はほとんど同じになります。CGE と CZE の明らかな違いの 1 つは、CGE が DNA 分離において非常に高い分離効率をもつことです。図 2.15 を見ると、架橋ポリアクリルアミドを用いた 1 本鎖オリゴヌクレオチドの分析で、CGE は 10<sup>7</sup> 段/m 以上の分離効率が得られることがわかります。

PCR 産物を非架橋ポリアクリルアミドにより分析した例を図 2.16 に示しています。これは、アシンメトリック PCR 法により生成された 1 本鎖 DNA の分析例です。ピークの同定には、DNA のスタンダードから作成した検量線を用

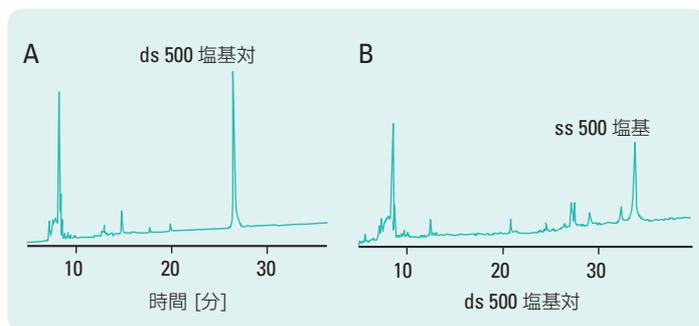


図 2.16  
1 本鎖および 2 本鎖 DNA の PCR 分析<sup>26</sup>

条件: 非架橋ポリアクリルアミド (9% T)、100 mM tris-ホウ酸、pH 8.3、E = 300 V/cm、i = 9  $\mu$ A、l = 20 cm、L = 40 cm、id = 75  $\mu$ m、 $\lambda$  = 260 nm、PA コーティングキャピラリー

いています。1本鎖 DNA はランダムな 3次元構造をとるため、同じサイズの 2本鎖 DNA よりも移動が遅くなります。また、アシンメトリック PCR 法では選択性が低下するため、通常の PCR 法に比べて副生成物が多くなります。

CZE と同じく、CGE の選択性は、キラル選択剤、イオン対試薬、その他の錯化剤 (DNA ではエチジウムブロマイド、タンパク質では SDS など) を添加して変更することができます。これらの化学物質は、ゲルと共有結合することもあれば、泳動バッファに追加されるだけのこともあります。

## 2.5. キャピラリー等電点電気泳動(CIEF)

キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF) は、ペプチドやタンパク質をその等電点 (pI) にもとづいて分離する“高分解能”の電気泳動テクニックです。CIEF を使用すると、等電点が 0.005 pI 単位程度の差しかないタンパク質を分離することができます。CGE と同じく、CIEF はよく知られたスラブゲル電気泳動テクニックで、キャピラリー電気泳動にも応用されるようになっています。

CIEF では、アンフォライト (両性電解質) を使ってキャピラリー内に pH 勾配を形成させます。アンフォライトは、酸性基と塩基性基の両方を持つ両性分子で、CIEF 実験で必要とされる pH 領域 (たとえば pH 3~9) にわたる pI 値をもっています。キャピラリー中に、溶質とアンフォライトの混合物を満たし、pH 勾配を形成させます。塩基性溶液を陰極側に、酸性溶液を陽極側において電場をかけると、アンフォライトとタンパク質は電荷をもたない状態になる領域 (それぞれの pI) に達するまでキャピラリー中を移動します。この過程は“フォーカシング”と呼ばれています。タンパク質は、異なる pH の領域に拡散すると荷電を持つため、再度電荷がゼロになるもとの位置に泳動され、結果としてきわめて狭いゾーンを形成します。この過程の概略を図 2.17 に示します。

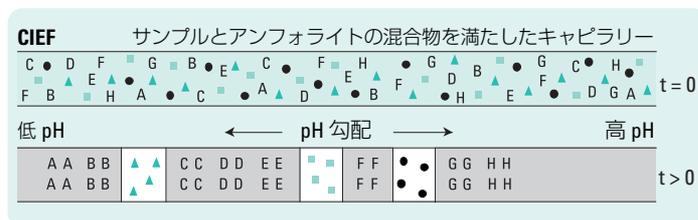


図 2.17 CIEF の概略図。A、B、C、D、E、F、G、H はアンフォライト分子を示しています。▲と■と●は、ペプチド、タンパク質などの溶質分子を示しています。

“フォーカシング”の進行度は、電流値の変化によってわかります。“フォーカシング”が終了してしまうと定常状態となり電流は流れません。フォーカシングの後、加圧により溶質とアンフォライト（電場を維持しながら）移動させることにより、ゾーンが検出器を通過します。加圧のほか、リザーバの一方に塩を追加したり、両方のリザーバに酸や塩基を追加したりする方法で移動させることもあります。

CIEFにおけるゾーン幅、 $4\sigma$ （ $\sigma$ は標準偏差）は、次式で表されます。

$$2.5 \quad \sigma = \left[ \frac{D}{\left( \frac{d\mu}{dpH} \right) \left( \frac{dpH}{dx} \right)} \right]^{1/2}$$

pIの差にもとづく分離度は、次式で表されます。

$$2.6 \quad \Delta pI = 3 \left[ \frac{D \left( \frac{dpH}{dx} \right)}{E \left( -\frac{d\mu}{dpH} \right)} \right]^{1/2}$$

D = 拡散係数 (cm<sup>2</sup>/s)

E = 電場 (V/cm)

dpH/dx = ゾーンでのpH勾配

dμ/dpH = あるpIでの移動度の勾配  
(そのpIに近いタンパク質の  
電荷に依存する)

(2.6) 式が示すように、電場が強い場合や等電点における移動度勾配が高い場合、キャピラリー長におけるpH勾配が緩やかな（範囲が小さい）場合に、高い分離能を得ることができます。

CIEFでは、EOFが発生すると、“フォーカシング”が達成される前にアンフォライトがキャピラリーから流れ出てしまう可能性があるため、EOFを抑えるか消す必要があります。EOFは、キャピラリー内壁の動的不活性化か、共有結合による内面コーティングによって抑制することができます。動的不活

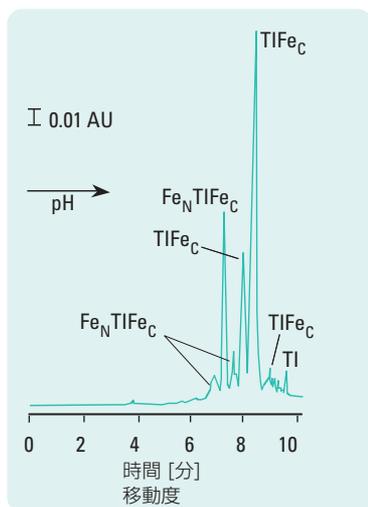


図 2.18  
CIEF によるトランスフェリン異性体の分離<sup>27</sup>

## 2.6. キャピラリー等速電気泳動 (CITP)

性は簡単に使える利点がありますが、再現性のある EOF を得るのは困難です。動的不活性化と共有結合によるコーティングは、どちらもキャピラリー内壁へのタンパク質の吸着を抑制します。

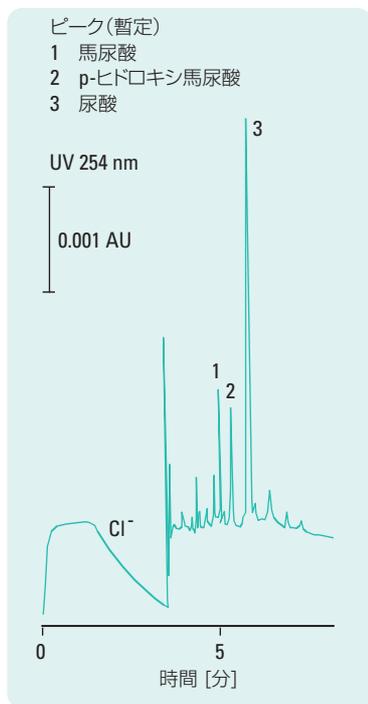
溶質はキャピラリー中にアンフォライトと一緒に注入されるので、他の CE 手法に較べて格段に多量の溶質を注入する事ができます。ただし、両性イオン分子の pI における溶解度はきわめて低くなります。また、フォーカシングポイントでは、溶質の濃度が最大になります。そのため沈殿が生じるので、注入できる試料量は制限されます。

CIEF は、タンパク質の pI の測定や異性体の分離、他の方法では分析の難しい免疫グロブリンやヘモグロビンを含むタンパク質の分離、また希釈生体液の分析などに利用されています。また、トランスフェリン異性体の分離に CIEF を利用した例を図 2.18 に示します。

最近では、全カラムイメージング CIEF の技術<sup>28, 29</sup> が商用化されています。このメソッドでは一般に、長さ 50 mm、内径 100  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーと、280 nm の波長を用いた UV 吸収イメージング検出器が使用されます。

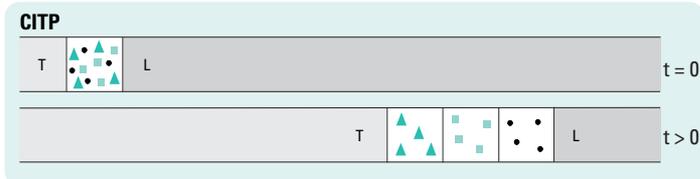
キャピラリー等速電気泳動 (Capillary isotachopheresis; CITP) は、“境界面が移動する” 電気泳動技術です。CITP では、2 つのバッファシステムの組み合わせによって、溶質のすべてが連結あるいは分離したバンドとして、同じ速度で移動するような状態を作り出します。各溶質ゾーンは、“リーディング液” と “ターミナル液” にはさまれた状態で泳動されます。CITP では、1 回の分析で陽イオンまたは陰イオンを分析できます。

例えば陰イオン分析では、“リーディング液” に用いるバッファは、溶質よりも有効移動速度が大きな陰イオンを含んでいる必要があります。同様に、“ターミナル液” に含まれる陰イオンは、溶質よりも低い移動度を持っていなければなりません。電場がかかると、陰イオンは陽極方向へ移動を開始します。リーディング液の陰イオンが最も大きい移動度を持っているので最も早く移動し、次に 2 番目に高い移動度を持つ溶質中の陰イオンが続きます。CITP では、各々の陰イオンは別々のゾーンを形成して移動しますが、これら全てのゾーンの移動速度は、リーディング液の陰イオンの移動速度と同じになります。CITP の分離の過程を図 2.19 に示します。



**図 2.20**  
尿毒症血清の CZE 分析における CITP のスタッキング効果<sup>31</sup>

条件: 10 mM MES、ヒスチジン、pH 6.05、0.05 % メチルヒドロキシエチルセルロース、定電流 = 35 mA、 $l = 25$  cm、 $id = 200$   $\mu$ m、PTFE キャピラリー



**図 2.19**

CITP の概略図。T はターミナル液、L はリーディング液、▲、■、●は溶質分子を表します。

CITP モードでゾーンの移動速度が定常状態になるのは、各ゾーンでの電場が違うためです。電場は、一定の速度が保たれるように自動的に調整されるので (速度 = 移動度  $\times$  電場)、最高の移動度を持つ溶質ゾーンには最小の電場がかかります。この現象により、ゾーン間の明確な境界面が維持されます。あるイオンが隣接したゾーンに紛れ込むと、速度が変化するので、すぐに元のゾーンに戻ります。

CITP のもう 1 つの興味深い特長は、各ゾーンでの濃度が一定であり、それがリーディング液の濃度によって決まることです。通常、CITP は一定電流モードで行われるので、各ゾーン中の各イオンの濃度と移動度の間には、一定の比率が存在します (いわゆる Kohlrausch 調整関数 (KRF)<sup>30</sup>、1.3.4.5 項参照)。リーディング液よりも低い濃度を持つゾーンは、適切な濃度になるまでゾーンの幅がせまめられ、高い濃度をもつゾーンは幅が広がられます。CITP における、この溶質の濃度縮原理は、CZE、MEKC、または CGE での事前濃縮に利用されています (3.2.3 項を参照)。ほとんどの場合、複数のモードが混じっているため、真の CITP 定常状態は得られません。それでも分離についてみると、キャピラリーの 30~50 % が試料で満たされている場合でも、かなり良好な分離を得ることができます。CITP の欠点は、リーディングイオンとターミナルイオンの両方を含み、なおかつ希望する pH をもつバッファを探すのが難しいことです。また、CITP におけるもう 1 つの制約は、陽イオンと陰イオンを 1 回の測定で同時に分析できないことです。

ゾーンの濃縮は、高濃度のリーディングイオンかターミナルイオン、あるいはその両方を試料へ添加すること (試料への塩の添加) によって行うことができます。この現象による分離の改良例を図 2.20 に示します。この試料は、目的溶質に高濃度の塩 (およそ 110 mM 以上) を含んでいます。最初に溶離されたピークの理論段数は  $10^6$  段以上を示し、理論値よりも著しく高いものになっています。この例は、CITP 効果が、特に複雑な試料の場合、いかに偶発的に発生するかを示しています。



## 機器

### 3.1. 高圧電源

キャピラリー電気泳動では、直流 (DC) 電源を用いて、電圧は 30 kV まで、電流は 200~300  $\mu$ A の範囲で使用されます。移動時間の再現性を高くするためには、電圧を安定に保つ ( $\pm 0.1\%$ ) 必要があります。未修飾フューズドシリカキャピラリーを使用する場合、EOF は陰極の方向へ動きます (1.3.2 項参照)。検出ポイントはキャピラリーのアウトレット側になるため、陰極をその先端に配置します。この場合、キャピラリーのインレット側が陽極となり、試料注入はこの先端から行います。

電源は、極性を変えることができるものがが必要です。EOF を反転させる場合 (陽イオンによる内壁面の被覆または pH の変化などによる)、電極の極性を逆転させて、電場の方向を変える必要があります。この場合、陰極を注入端に切り替えます。

検出器の構造上、キャピラリーのインレット端とアウトレット端は、あらかじめ決まっているので、極性の切り替えは電源で行う必要があります。もっとも良い方法は、直流電源を使用することです。この種の電源を用いる場合は、高圧電極と接地電極の位置が固定されていることを理解する必要があります。つまり、高圧電極は接地電極に対して、正にも負にもなり得ます。

一般的に使用されるのは定電圧モードですが、定電流あるいは定電力モードのほうが適している場合もあります。特に、等速電気泳動を行う場合や、キャピラリー温度が適切に制御できない場合は、定電流または電力モードが有効です。キャピラリーの温度制御ができない場合、定電圧モードでは、温度が変わるとバッファの粘度と移動時間が変化してしまいます。定電流モードを用いると、この粘度の変化が印加電圧の変化で相殺され、移動時間を一定に保つことができます。そのため、定電流あるいは定電力モードで使用できる高圧電源が必要です。その他の電源特性として、分析中に電圧、電流または電力のグラジエントを行える機能 (電場プログラミングとも呼ばれます) が必要です。電場プログラミングにより分析開始時に電圧を徐々に高めれば、急速な発熱やバッファの熱膨張、キャピラリーからの試料の流出を防ぐことができます。また、電場プログラミングは複雑な試料の分析時間を短縮するのにも役立ち、フラクションコレクタでは多くの場合で電場プログラミングが必要となります。近接した狭い溶質ゾーン (5~10 秒など) を高電場条件下で扱うのは容易ではないため、分

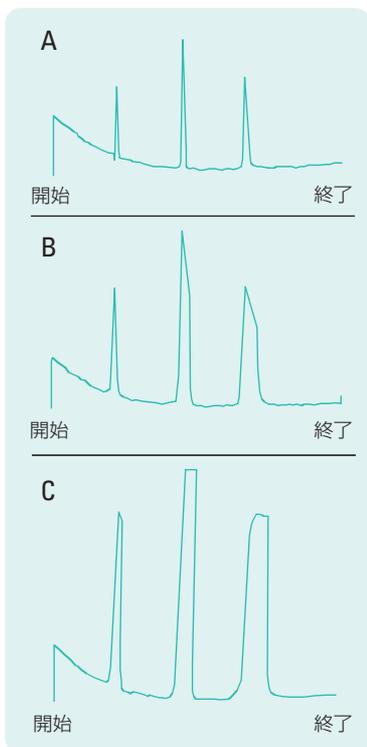
取の直前に電場を弱めれば、タイムウィンドウを広げて分取に必要なタイミングを正確にはかることができます（3.5項参照）。

## 3.2. 試料の注入

CE では、ごく少量の試料をキャピラリーに注入します。分離キャピラリーの容積（内径 0.025～0.15 mm、長さ 150～1000 mm）が小さいので、当然のことながら試料注入量もごく微量になります。経験的に、試料のプラグ長をキャピラリーのトータル長の 1～2% 以下にすると良い結果が得られます。これはキャピラリーの内径にもよりますが、数ミリメートルの注入プラグ長（1～50 nL）に相当します。試料が 5  $\mu$ L もあれば多数回の注入が十分可能なので、試料の量が限られている場合には利点となります。ただし、試料の濃度が非常に低い場合は検出が困難になる場合もあります。

過剰量の試料を注入すると、分解能を損ねるような 2 つの現象がおきる可能性があります。第一に、拡散を抑えることのできるゾーン幅よりも注入プラグ長が大きくなると（最大注入プラグ長の計算方法については、3.2.1 項”圧力変化を利用した注入法”で説明します）、ピーク幅が相応して増大します。第二に、泳動バッファと試料ゾーンの導電率が異なるため、電場の不均一性によりピーク形状が悪化します。

試料を定量的に注入するため、多くの注入方法が試みられています。一般的には、圧力変化を利用した方法と電気的移動法の 2 つの方法が用いられています（図 3.2）。どちらの場合も、注入される試料の容量は既知量にはなりません、計算上もとめることは可能です。以下の 2 項に詳述しましたが、注入量にかわる定量可能なパラメータとして、圧力変化を利用した注入法の場合は圧力と時間、電気的移動法の場合は電圧と時間を用いることができます。



**図 3.1**  
過剰量の試料の注入によるピーク形状への影響。分析開始時間のゾーン：A = 0.6 cm, B = 2.0 cm, C = 3.0 cm

### 3.2.1. 圧力変化を利用した注入法

圧力変化を利用した試料注入法は、最も広く使われています。この試料注入法には、キャピラリーの注入側を加圧する方法、キャピラリーのアウトレット側を減圧する方法、注入側バイアルの位置をアウトレットバイアルより上にあげ、サイフォン現象を利用して注入する方法があります（図 3.2）。これらの圧力変化を利用した注入では、注入される試料の容量は試料中のマトリックスにほとんど影響されません。

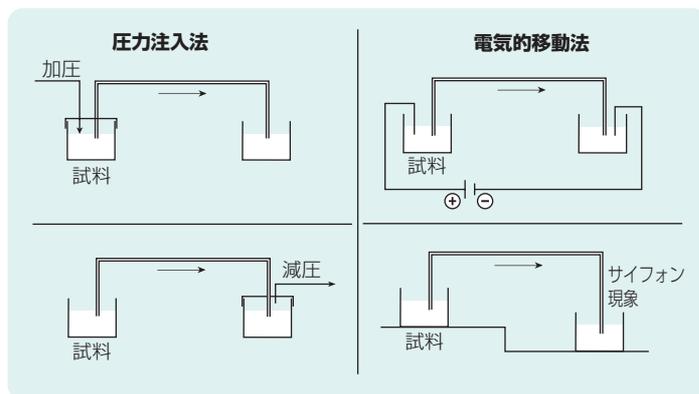


図 3.2  
試料注入法

試料の注入量 ( $V_{inj}$ ) は、キャピラリーの内径、キャピラリー中のバッファの粘度、圧力差および時間の関数となります。注入量は、Hagen-Poiseuille の式によって計算できます。

3.1

$$V_{inj} = \frac{\Delta P d^4 \pi t_{inj}}{128 \eta L}$$

$\Delta P$  = キャピラリー両端間の圧力差

$d$  = キャピラリー内径

$t_{inj}$  = 注入時間

$\eta$  = バッファの粘度

$L$  = トータルキャピラリー長

一般的に用いられる注入圧力は、25~100 mbar の間で、時間は 0.5~5 秒位になります。圧力・時間・キャピラリー内径の関数として (3.1) 式を用いて

求められた注入プラグ長と容量を表 3.1 に示します。

キャピラリー内径	10 μm	25 μm	50 μm	75 μm	100 μm
注入圧力 × 時間、 (mbar × s)	$V_p$ (nL), $l_p$ (mm)				
25	0.0008, 0.01	0.03, 0.06	0.5, 0.25	2.6, 0.59	8.2, 1.04
50	0.0016, 0.02	0.06, 0.12	1.0, 0.50	5.2, 1.18	16.4, 2.08
75	0.0024, 0.03	0.09, 0.18	1.5, 0.75	7.8, 1.77	24.6, 3.13
100	0.0032, 0.04	0.12, 0.24	2.0, 1.00	10.4, 2.26	32.8, 4.16
150	0.0048, 0.06	0.18, 0.36	3.0, 1.50	15.6, 3.54	49.2, 6.26

**表 3.1**  
**圧力・時間・キャピラリー内径から求められる試料の注入プラグ長と容量**  
 $V_p$  = プラグ容量 (nL);  $L$  = 75 cm;  $\eta$  = 1cP;  $T$  = 20 °C、 $l_p$  = プラグ長 (mm).

分離能を大きく損なわない最大注入プラグ長  $w_i^{\max}$  を計算するためには、分離システムにおけるトータルゾーン拡散について (1 章 1.16 式の  $\sigma_T^2$ )、以下のように仮定します。

分子拡散 ( $\sigma_{DIF}^2$ ) および試料注入 ( $\sigma_{INJ}^2$ ) 以外のすべてのゾーン拡散要因を無視すると、トータルゾーン拡散は次式で表されます。

$$3.2 \quad \sigma_T^2 = \sigma_{DIF}^2 + \sigma_{INJ}^2 = 2Dt_D + \frac{w_i^2}{12}$$

注入による分離能の低下が 10% (理論段数では約 20% 低下に相当) まで許容できる場合、(3.2) 式の 2 項の標準偏差は、次のように計算できます。

$$3.3 \quad \sigma_{INJ} \approx 0.5\sigma_{DIF}$$

(3.2) 式および (3.3) 式を (3.1) 式と組み合わせると、次のようになります。

$$3.4 \quad w_i^{\max} = \sqrt{6Dt_D} = \frac{\Delta P t_{inj} d^2}{32\eta L}$$

(3.4) 式を用いれば、推定上の分析対象物の移動時間と泳動バッファにおけるその拡散係数から、最大注入プラグ長を計算できます。そこから、適切な圧力注入パラメータ ( $\Delta P \times t_{inj}$ ) がわかります。その結果を表 3.2 に示しています。

D (cm <sup>2</sup> /s)	t <sub>D</sub> (s)	w <sub>i</sub> <sup>max</sup> (mm)	L (cm)	id (μm)	V <sub>inj</sub> (nL)	ΔP × t <sub>inj</sub> (mbar × s)
10 <sup>-5</sup>	500	1.73	50	75	7.7	49.3
				50	3.4	110.9
				25	0.9	443.4
	200	1.10	20	75	4.8	12.5
				50	2.2	28.0
				25	0.5	112.2
10 <sup>-6</sup>	500	0.55	50	75	2.4	15.6
				50	1.1	35.1
				25	0.3	140.2
	200	0.35	20	75	1.5	3.9
				50	0.7	8.9
				25	0.2	35.5

**表 3.2**  
推定拡散係数と移動時間の関数として求められた最大注入プラグ長と、注入パラメータ、キャピラリー内径とバッファ粘度の決定との相関関係(η = 20 °C で 1 cP)

この表を見ると、短くて内径の小さいキャピラリーを使用する場合、大きい分子（小さい内径）では小さい分子よりも注入ゾーンを狭くする必要があります。

サイフォン注入に (3.1) 式を適用する場合、圧力差は次式により求められます。

$$3.5 \quad \Delta P = \rho g \Delta h$$

ρ = バッファの密度

g = 標準重力加速度 (9.807 m/s<sup>2</sup>)

Δh = リザーバ高さの差

サイフォン注入では、一般的にサンプルバイアルをアウトレット側バイアルよりも5~10 cm高い位置におき、10~30秒間保持して注入を行います。サイフォン注入は、主に加圧/減圧注入が適用できない場合に用いられます。検出感度の制約がなければ、注入プラグ長は最小におさえるべきです。しかし、構造上、注入時間が短くなると一般的に注入の再現性は悪くなります。特に、キャピラリーが短い場合や、管径が大きい場合、または濃度の高い試料を用いる場合にこのことがあてはまります。フィードバックの機能のある圧力/時間の積算プロファイルを用いて、加圧注入を開始してから圧が安定するまでの時間の遅れと圧力変動を補正することにより、再現性は著しく改善されます。

サイフォン注入の場合、必要量以上の試料の注入を防ぐためには、サンプルリザーバとバッファリザーバの液面レベルを等しい高さに保つことが重要です。サイフォン式注入では、ピーク面積の再現性が悪くなる場合があります。キャピラリーを単純にサンプルバイアルに浸しただけでも、キャピラリーの小さな動きによって注入が起こることが知られています。この現象はゼロ注入現象と呼ばれています。あまり一般性はありませんが、濃縮された試料の定量分析を行う場合には、注入量を定量的に扱いやすくすることを考慮に入れるとよいでしょう。

機器の構造から見ると、注入量の再現性は、相対標準偏差 (RSD) で1~2%以下にすることが可能です。しかし、ピーク面積の再現性は、試料とキャピラリー内壁との相互作用、温度の変動、シグナル/ノイズ比が小さいときのピークの積分方法などに影響を受けます (ピーク面積と移動度の再現性に影響を与える要因については、4章を参照してください)。

注入量を一定に保つためには、キャピラリーの温度を精密に ( $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ) 制御する必要があります。注入量は、キャピラリー内のバッファの粘度変化によって、移動時間と同じく  $1^{\circ}\text{C}$  あたり 2~3% 変動します。ただし、試料の粘度については、試料のプラグ容積がキャピラリー中の全内容積に比べてきわめて小さいので、注入量にあまり影響を与えません。

## 3.2.2. 電氣的移動法

電氣的移動法または電氣泳動による注入法は、インレットバッファバイアルをサンプルバイアルに置き換えた後、電圧をかけることによって行われます(図 3.2)。通常、10~30 秒の注入時間で、分離に用いる電圧の3分の1ないし5分の1の強さの電場を印加します。電氣的移動法による注入では、試料成分は電氣泳動的な移動と EOF のポンプ作用の両方によってキャピラリー中に注入されます。電氣的移動法の特徴は、注入される試料の量が個々の溶質の電氣泳動移動度に依存していることです。移動度の高いイオンは移動度の低いイオンよりも多量に注入されるので、イオン種による注入量の違いが発生します。

注入量  $Q$  (g またはモル数) は次式で計算することができます。

3.6

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{EOF}) V \pi r^2 C t_{inj}}{L}$$

$\mu_e$  = 試料成分の電氣泳動移動度

$\mu_{EOF}$  = EOF の移動度

$V$  = 電圧

$r$  = キャピラリー半径

$C$  = 試料成分の濃度

$t_{inj}$  = 注入時間

$L$  = トータルキャピラリー長

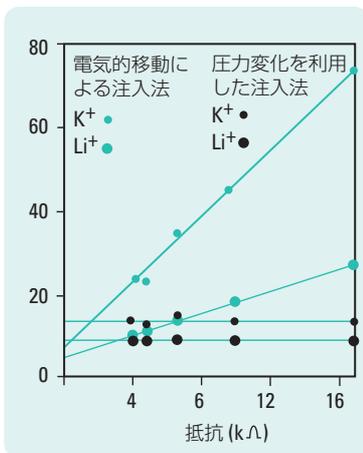


図 3.3

圧力変化を利用した注入法と電氣的移動による注入法における試料溶液の抵抗と注入量の関係<sup>32)</sup>

(3.6) 式が示すとおり、試料の注入量は、注入時間のほかに、EOF、溶質濃度、溶質の移動度に依存しています。大量の塩が溶解している場合、マトリックス効果により試料の導電率が変化します。その結果、試料の抵抗が変化し(電場の変化を誘導:  $E = V/L$ )、図 3.3 に示すように、注入量も変化します。このような現象のために、電氣移動法は一般に圧力変化を利用した注入法よりも再現性が劣ります。

注入精度に関しては問題がありますが、電氣的移動法はきわめて簡単で、特別な機器も必要ないので、粘度の高いバッファやゲルを充てんしたキャピラリーを使用する場合など、圧力変化を利用した注入が有効でないときに効果を発揮します。

### 3.2.3. オンキャピラリー 濃縮法

試料注入時や注入の直後に、キャピラリー内で試料を濃縮し、感度を高める方法がいくつか報告されています。これらの注入方法は、機能としては HPLC で用いられる固相抽出 (SPE) や固相マイクロ抽出 (SPME) テクニックと同じであると考えられます。キャピラリー電気泳動では、これは試料ゾーンと泳動バッファの間の電場強度の違いにもとづく方法で、“スタッキング”と呼ばれています。

#### 3.2.3.1. 電場増幅試料スタッキング (FASS) と電場増幅試料注入 (FASI)

1 章 (1.3.4.5 項 “電氣的拡散”) では、試料の導電率が泳動バッファ (=バックグラウンド電解液 (BGE); バックグラウンド溶液 (BGS) とも呼ばれます) の導電率よりも高くなったときに、分離の初期に試料ゾーンが広がることを説明しました。しかし、逆の現象も起こります。試料マトリックスの導電率が泳動バッファ (BGE) の導電率よりも大幅に低くなると、試料ゾーンは圧縮されます。このフォーカシング効果を利用すれば、キャピラリーへの試料の充てん率を高めることができます。

試料の塩含有量 (溶液イオン強度) を低くすると、注入された試料の容積が大きくても、過度のゾーンの広がりが起きなくなります。こうした濃縮テクニックは、圧力注入法を行う場合には電場増幅試料スタッキング (FASS)、電氣的移動法を用いて注入を行なう場合には電場増幅試料注入 (FASI) と呼ばれます。

浸透流と同じ方向に移動する分析対象イオンの場合 (通常は陽イオン)、電氣的移動法による注入と同時に試料事前濃縮を組み合わせることができます。試料の導電率が十分に低い場合 (たとえば、試料マトリックスが純水の場合)、通常の注入時間 (10~30 秒) でも電場増幅の影響により大量の試料陽イオンをキャピラリーに導入することができます。スタッキング (ゾーンの鋭化) は、試料溶液と BGE の間の界面で自動的に行われます。たいていの場合は、BGE と試料の境界におけるスタッキングプロセスの乱れを制御するために、少量の水を初めに導入することが推奨されます。最後に、試料バイアルをバッファバイアルと取り替え、電気泳動を開始します。図 3.4 に、電氣的移動法を用いた注入による電場増幅の効果を示しています。

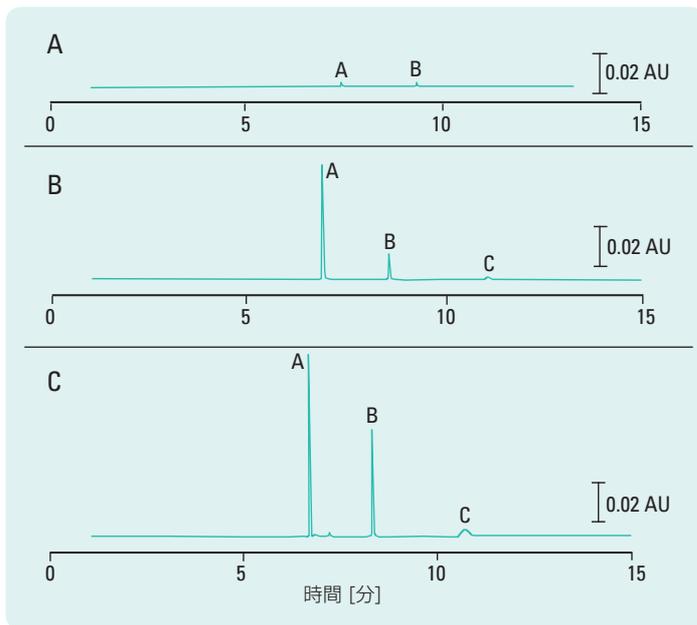


図 3.4  
電場増幅試料注入<sup>33</sup>。A)バッファに溶解した試料; B)水に溶解した試料; C)B  
の試料を注入する前に短いプラグ長で水を注入した場合

電氣的な電場増幅手法の欠点は、注入する試料イオンの量が、実際の試料の導電率に大きく左右されることです。この導電率をコントロールできないと、結果の信頼性が低くなります。

そのため、圧力注入によるスタッキング手法がより頻繁に用いられています。この手法では、時間制御した圧力差により、導電率の低い試料溶液が長いプラグ長で注入されます。導電率の差により、電場適用後の分離初期に試料ゾーンが鋭化します。

特定の試料の導電率が予想ほど低い場合には、ピーク分解能に影響が出ますが、ピーク面積の信頼性は保たれます。圧力注入による電場増幅試料スタッキング (FASS) の概略を図 3.5 に示しています。

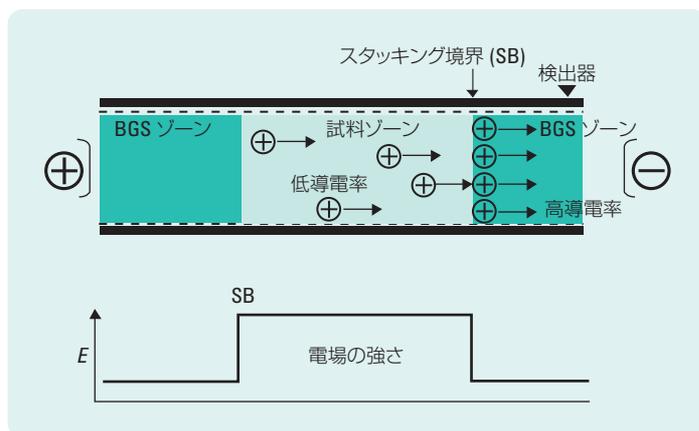


図 3.5 FASS 原理の概略図

分離効率を悪化させずに注入できる試料の量は、スタッキングを行わない場合に比べて、100 倍以上多くなることもあります。分離を悪化させずに実現できるスタッキングの濃縮率は、第一に試料の導電率の上限に依存します。ただし、その他の制約もあります。まず、試料プラグのジュール熱を考慮する必要があります。試料マトリックスの導電率が BGE の導電率よりも大幅に低い場合、試料プラグで電圧のが降下し、キャピラリーのその部分の電場が平均よりも高くなります。これにより、試料プラグで過度の熱が発生し、ガス放出や沸騰につながります。この過度の熱の発生は、試料の導電率が低く、プラグ長が比較的短い場合に特に大きくなります。この場合、スタッキングの効果を十分に活用することはできません。試料ゾーンにおける大幅な温度上昇は、キャピラリーを温度制御している場合でも報告されています。この現象の例を図 3.6 に示しています。

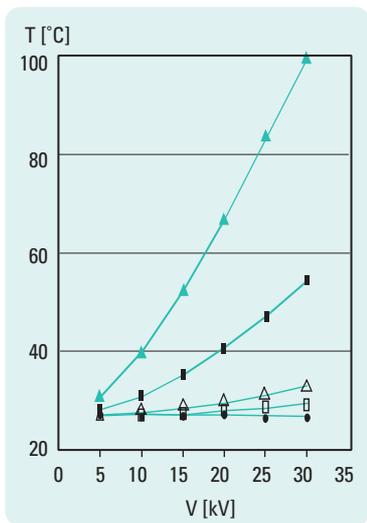


図 3.6 スタッキング条件下での試料ゾーンと泳動バッファの推定温度<sup>35</sup> 黒い記号= 試料ゾーン; 白い記号= バッファ  
条件: 10 mM トリシン、pH 8.0、0 mM NaCl (●)、25 mM NaCl (■)、50 mM NaCl (▲) を含む

試料のスタッキングにおけるその他の制約は、試料溶液を含む部分のキャピラリーと、BGE を含むその他の部分のキャピラリーで発生する電気浸透流の差に関係しています。導電率の低い試料プラグでは、電場の強さはキャピラリーのその他の部分よりも大きくなります。さらに、電気浸透流の移動度は、一般に塩濃度が低下すると上昇します。この2つの影響により、試料プラグにおける電気浸透速度は、BGE における速度よりも高くなります。これにより、試料プラグとバッファゾーンの間で差が生じ、キャピラリーの両部分における浸透流速分布と同様に、放物線的な流速分布がプラグに加わります。この放物線的な流速分布は、実際の分離の際に、試料プラグと BGE の両方におけるゾーンの広がりとなります。電気浸透流の差が大きいと、試料ゾーンは比較的長くなり、得られる段数が減少します。試料プラグと BGE における電気浸透移動度を操作し、より良い組み合わせをつくれれば、ピークの広がりを抑え、キャピラリーに注入できる試料容積を増やすことが可能です。

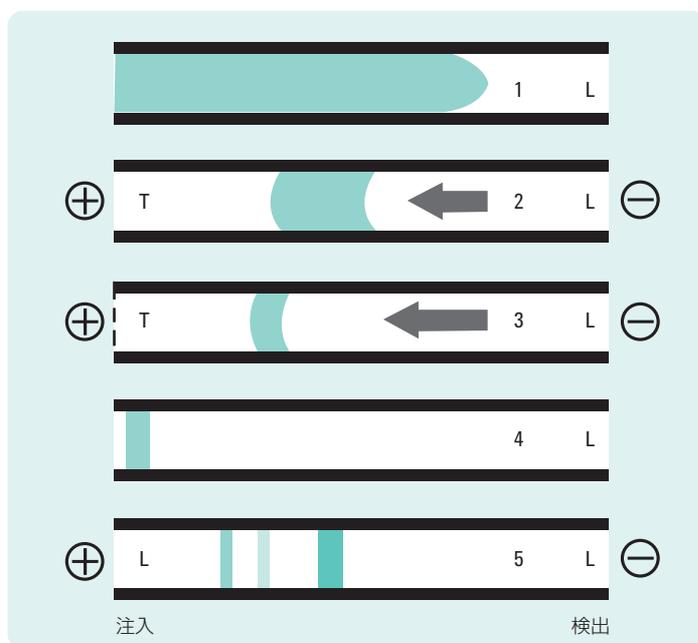
分析対象物が弱陽イオンまたは弱陰イオンの場合は、pH 操作（動的 pH 接合）により試料スタッキングを行うこともできます<sup>34</sup>。この方法が可能なのは、試料の pH が BGE の pH と異なり、各分析対象イオンの有効移動度も異なる場合です。そのため、試料の移動度が BGE における移動度よりも大幅に大きくなるように、試料と BGE の pH を選択する必要があります。これにより、圧力により長い試料プラグを注入し、分離の初期に圧縮することが可能になります。

### 3.2.3.2. 等速電気泳動による試料スタッキング

不連続バッファシステムは、導電率の低くない試料のスタッキングに用いられています。こうしたケースのスタッキングは、等速電気泳動（ITP）の原理にもとづいています。ITP（2.6 項参照）では、試料溶液はリーディング液（L）とターミナル液（T）に挟まれています。リーディング液には、分析対象イオンよりも移動度が大きい共通イオンが含まれています。ターミナル液には、分析対象イオンよりも移動度が小さい共通イオンが含まれています。このようなシステムでは、電気泳動の際に、分析対象イオンはリーディングイオンに追いつけず、ターミナルイオンは分析対象イオンに追いつけません。その結果、分析対象イオンのシャープ（純粋）なゾーンが形成されます。このゾーンは、それぞれの移動度に従って、連続する2つの電解液の間をすべて同じ速度で移動します。ITP では、純粋な分析対象イ

オンのゾーンの濃度は、試料溶液におけるももとの濃度に関係なく、リーディング液とターミナル液の組成により決定されます（Kohlrausch 調整関数に従う）。そのため、ITP においては、試料の濃縮やスタッキングは一般的な現象になっています。

(オンキャピラリー) ITP-CZE を陽イオンのスタッキングに応用した概略を図 3.7 に示しています。



**図 3.7**  
流体力学的な背圧を用いた陽イオンのオンキャピラリー ITP-CZE 手順を示す概略図<sup>36</sup>

CZE のバックグラウンド電解液はリーディング液 (L) として働きます。このリーディング液には、分析対象イオンよりも移動度の高い共通イオンを含むものを選びます。まず、キャピラリーを L で満たします。次に、試料溶液を長いプラグで圧力により注入します。次に、キャピラリーのインレットを、ターミナル液 (T) を入れたバイアルに配置し、電圧をかけて分析対

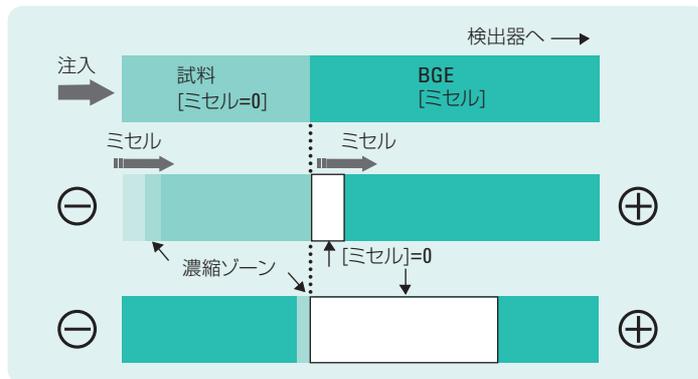


図 3.8  
EOF 抑制条件下でのスウィーピングの原理の概略図

象ゾーンの等速電気泳動フォーカシングを行います。電気浸透流により T がキャピラリーに入りすぎるのを防ぐために、キャピラリーのアウトレット側に圧力をかけます。フォーカシングが終了したら、前に用いた圧力よりも強い背圧により T の残りをキャピラリーから除去し、L を入れたバイアルにキャピラリーのインレットを配置します。その後、スタッキングされた分析対象物ゾーンを電気泳動により実際に分離します。ゾーン電気泳動分離の際には、若干異なる ITP 手順を用いれば、T を BGE として使うこともできます。陰イオンについても、同様の手法が開発されています。理論的には、他の電解液 (CZE 分離に使用しないもの) の導入を避けることができれば、ITP-CZE により数桁の濃縮が可能です。他の電解液が存在している場合、CZE モードを開始すると、分析対象物ゾーンが脱スタッキングし、エレクトロフェログラムのピークの広がりや変形につながります。

スウィープされるゾーンの長さは、次式で表されます。<sup>37</sup>

3.7

$$l_{\text{sweep}} = l_{\text{inj}} \left( \frac{1}{1+k'} \right)$$

$l_{\text{sweep}}$  と  $l_{\text{inj}}$  はスウィーピングの前および後の試料ゾーンの長さ、 $k'$  は試料マトリックスにおける容量比で、BGE のものとは異なる

忘れてはならないのは、最大注入プラグ長を有効キャピラリー長の90%未満にすることです。ある程度の長さは、分離で使用できるようにする必要があります。

$k'$  を最大にするためには、有機溶媒やシクロデキストリン（分離能と動態を向上させるために使用）などの添加剤を試料マトリックスに加えないようにします。特に、EOF抑制条件下では、スウィーピングの濃縮効率により、従来の注入時よりも約3桁大きい検出器シグナルが生じます。この強力な試料濃縮の例を、図3.9に示しています。

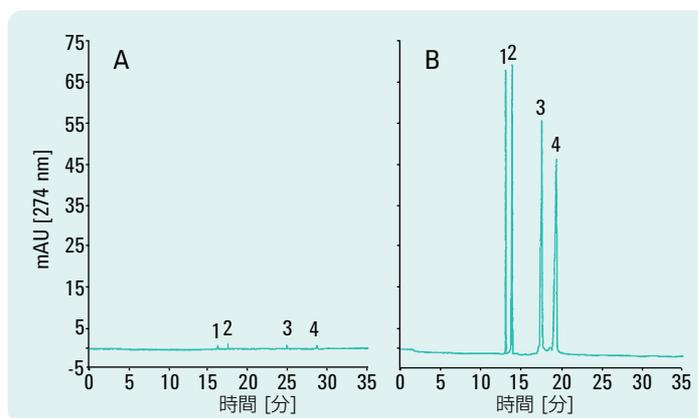


図 3.9

#### 塩基性バッファを用いた中性キャピラリー（ほぼ EOF なし）におけるスウィーピング<sup>37</sup>

**条件:** BGE: 50 mM SDS/20 mM ホウ酸 (pH 9.3) + 20 % MeOH; 試料: ホウ酸バッファ中ステロイド、BGE の導電率に調整; 注入プラグ長: 0.64 mm (A)、42 cm (B); -30 kV; 分析対象物の濃縮: ~ 20 ppm (A)、2 ppm (B); ピーク: 1) プログステロン、2) テストステロン、3) ヒドロコルチゾン、4) コルチゾン; キャピラリー: celect N, Lff = 57 cm、Ltot = 65.5 cm

中性物質のほか、帯電物質（イオン）も、ミセルが反対の電荷をもっていればスウィーピングテクニックにより濃縮することができます。この方法では、静電的相互作用が強いため、大きい容量比 ( $k'$ 、 $s$ ) が得られます。したがって、陽イオン性物質は SDS ミセルにより、陰イオン性物質（芳香族スルホン酸塩やカルボン酸塩）は CTAB ミセルにより濃縮することになりま

### 3.2.3.3. 高塩スタッキング

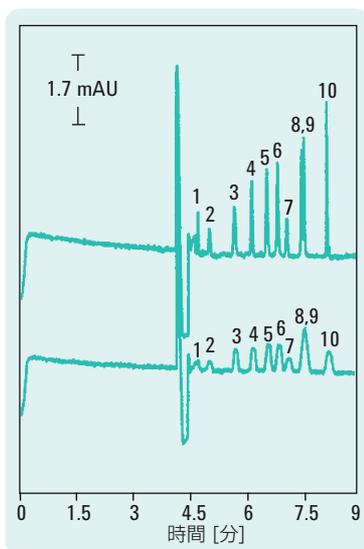


図 3.11  
高塩スタッキングによる 10 種類のアルカロイドの分離<sup>38</sup>

下図: 試料マトリックスは BGE; 上図: 試料マトリックスは 150 mM NaCl; ピーク:

- 1) ニコチン、2) アコニチン、3) コルチコシド、4) ストリキニン、5) チオコルチコシド、6) コルヒチン、7) ベンゾインメチルエーテル、8) ヨヒンビン、9) チオコルヒチン、10) エメチン

条件: BGE: 10 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /80 mM コール酸ナトリウム;  $L_{\text{eff}} = 50$  cm、 $L_{\text{tot}} = 60$  cm; inj = 10 mm (690 mbar x s); 25 kV (47  $\mu\text{A}$ );

す。スウィーピングの濃縮効率は、擬固定相（帯電シクロデキストリン、CD、マイクロエマルジョン）や錯体形成反応の使用（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）またはホウ酸による金属イオンおよび糖のスウィーピング）においても報告されています。

この事前濃縮手法は、注入した試料プラグの陰極側（検出器側）におけるミセル（コール酸ナトリウム（SC）など）のスタッキングという方法により、MEKC でも適用されます。ミセルをスタッキングするためには、試料ゾーンの導電率が BGE の導電率の約 1.5~2.5 倍である必要があります。この場合、BGE の電場が試料ゾーンの電場よりも高くなります ( $E_{\text{BGE}} > E_{\text{SZ}}$ )。分離電圧を印加すると、試料ゾーンの検出器側でミセルが濃縮されます。陽イオン性物質ここで回収され、強い EOF を伴う通常の MEKC メカニズムによりさらに移動します。このスタッキングモードを図 3.10 に示しています。

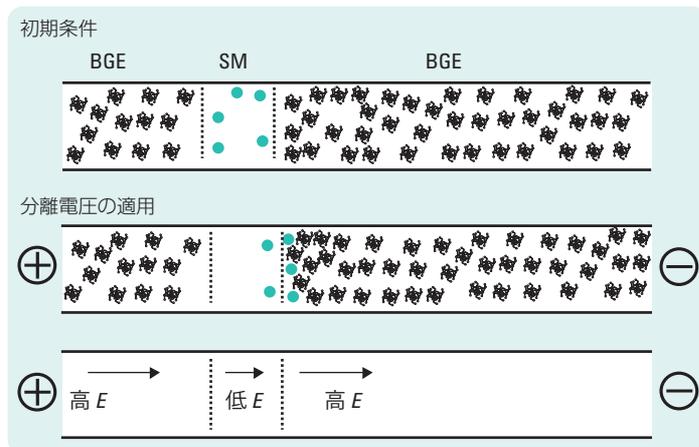


図 3.10  
高塩スタッキングのメカニズム; 試料マトリックスのイオン強度は、BGE のイオン強度の 1.5~2.5 倍になるように調整しています。

アルカロイド物質における高塩スタッキングの効果を図 3.11 に示しています。この例では、成分 1 と 2 もスタッキングされ、 $k'$  値の低い物質における高塩スタッキングの効率が示されています。

### 3.3. 温度調節

分析の再現性を得るためには、キャピラリー温度を効果的に制御することが重要です。試料の注入量（オートサンブラのバッファと試料バイアルの温度を制御する必要もあります）と移動時間はバッファ粘度に大きく依存するので（1℃あたり2～3%）、温度を±0.1℃に調節することが非常に有効な方法です。また、キャピラリーが周囲温度の変化による影響を受けないようにする必要があります。キャピラリーの温度調節法としては、一般に、高速の空気を循環させる方法と液体に浸す方法があります。理論的には、液体による温度調節のほうが効率は良いのですが（ $k_{\text{Liquid}} > k_{\text{Air}}$ ）、約10 m/秒の強制空気循環による温度調節でも、CEで発生する熱量に十分対応することができます。オームの法則のプロットで示されるように（図1.14および表1.4）、約5 W/mまでの範囲では、2つのシステムの温調効率はほとんど同じです。電力の発生量をもっと大きくなれば液冷システムのほうが有効ですが、一般にCEの分析はそのような条件化では行いません。空気循環式温度調節システムは、液体冷却法に比べて機器の構造が簡単で、分離キャピラリーが扱いやすいという利点があります。

キャピラリー温度を調節する主な目的は、ジュール熱を除去して温度を一定に保つことにありますが、CZE分離を最適化するためのパラメータとして温度調節が利用されることもあります。温度の上昇や下降により、粘度やEOF、分析時間が変化します。また、化学平衡やカインेटクスを変化させるために利用されることもあります。

### 3.4. 検出

CEにおける検出は、キャピラリーの内径がごく細いために、きわめて難しい面があります。CE分析でキャピラリーに導入される試料の量はわずかなノリットル単位ですが、比較的高濃度の試料溶液や事前濃縮が行われる場合もありますので、CEを“極微量”分析ということはできません。こうした困難を解決するために、CEでは種々の検出手法が用いられていますが、その多くは液体クロマトグラフィーで用いられる方法と類似しています。検出法のなかでは、HPLCと同様に、紫外-可視吸光による検出法がもっとも一般的です。表3.3に、CEで用いられる検出法と、それぞれの検出下限や利点/欠点をまとめています。

検出方法	質量検出下限 (moles)	濃度検出下限 (molar)*	利点/欠点
紫外-可視吸光	$10^{-12} - 10^{-15}$	$10^{-5} - 10^{-7}$	汎用的 DADによりスペクトル情報の利用が可能
蛍光	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$	高感度 試料の誘導体化が必要な場合が多い
レーザー 誘起蛍光	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-9} - 10^{-12}$	きわめて高感度 試料の誘導体化が必要な場合が多い 高コスト
電気化学	$10^{-18} - 10^{-19}$	$10^{-10} - 10^{-11}$	高感度 選択性は高いが、酸化還元反応を起こすものだけを測定可能堅牢でない
電気伝導度	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-6} - 10^{-7}$	汎用的
質量分析	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$	高感度 構造情報を提供 CEとMSのインターフェースが複雑
間接吸光、 蛍光、 電気化学	直接検出法の 1/10~1/100	—	汎用的 直説法より感度が低い

表 3.3

検出法のおもな指標<sup>39</sup> \*注入量を 10 nL とする

### 3.4.1. 紫外-可視吸光 検出法

紫外-可視吸光検出法は、ほとんど万能といえる検出特性をもつために最も広く用いられている検出方法です。フーズドシリカキャピラリーを用いた場合、200 nm 以下から可視部までのスペクトルを検出できます。また、オンキャピラリーで検出できるので、スラブゲル電気泳動に比べて分析効率が著しく高くなります。検出部のウィンドウ（セル）はキャピラリー中にあるので、デッドボリュームが生じたり、成分が交じり合ってゾーンの幅が広がることはありません。実際には検出セル内においても分離が進行しています。光学検出器すべてについていえることですが、高い分解能を得るためには、軸方向の検出経路長を検出器に入る溶質ゾーンの幅よりも短くする必要があります。もっとも適切な方法は、各々のキャピラリーサイズにあった光学スリットを用いることです。CEでのピーク幅は一般的に2~5 mmの範囲なので、スリットの長さはこの数値の1/3以下にする必要があります。

### 3.4.1.1. ノイズ、感度、 検出器の リニアリティ

光路長が短いので、検出器の設計が重要となります。光学スリット部位で透過量が最大になり、同時に検出器に届く迷光が最小限に抑えられるように、光学ビームは厳密に焦点が絞られ、直接キャピラリーに入射させるようにしなければなりません。これは、ノイズ、感度、検出器のリニアリティの面から見て非常に重要です。

感度は検量線（試料濃度に対する検出器のシグナル）の傾きとして定義されます。傾きが急であるほど感度が高いことを示しています。ベールの法則で定義されるように、吸光検出器での溶質の吸光度  $A$  は、光路長 ( $b$ )、濃度 ( $C$ ) およびモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) に比例します。

3.8

$$A = b C \epsilon$$

$CE$  では、光路長が短いことが感度 (3.8 式の  $A/C$ ) を制限するおもな要因になります。キャピラリーは円柱状で湾曲しているため、キャピラリーの中心部を透過する光は、光源の光のほんの一部です。キャピラリー内の実際の光路長 ( $b_e$ ) は、その内径  $d_c$  ( $b_e \approx 0.8 d_c$ ) よりも小さくなります。実際の光路長は、濃度およびモル吸光係数が既知の溶質をキャピラリーに満たすことで求められます。

低波長の紫外光を使用して高感度検出を行うことができます。例えば、ペプチドや糖類には強い発色団がありませんが、200 nm 以下の波長を用いると検出することができます (図 3.12)。低波長域での検出にはこの波長域での吸収が少ない泳動バッファを使用することが重要です。その理由は、バックグラウンドの吸収が高いとベースラインノイズが増え、シグナルが減少するからです。低波長での吸収が少ないバッファとしてはリン酸塩やホウ酸塩があります。N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES)、3-[シクロヘキシルアミノ]-1-プロパンスルホン酸 (CAPS)、tris (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris) といった生物学的な分析で用いられるバッファの多くは、波長約 215 nm 以下での使用には不適当です。[注: Tris バッファの pH は温度に大きく左右されます (1 °C 上昇あたり約 -0.01 pH 単位) ]

ベールの法則からの逸脱が起きるところが、定量分析の限界となります。試料の濃度が高くなると、吸収飽和と呼ばれる逸脱が生じ、感度 ( $A/C$ ) が低くなります。最終的には、これが検出器のリニアリティを定義します。理想としては、全光量がキャピラリーの壁部ではなく、中心部を通過しなければなりません。

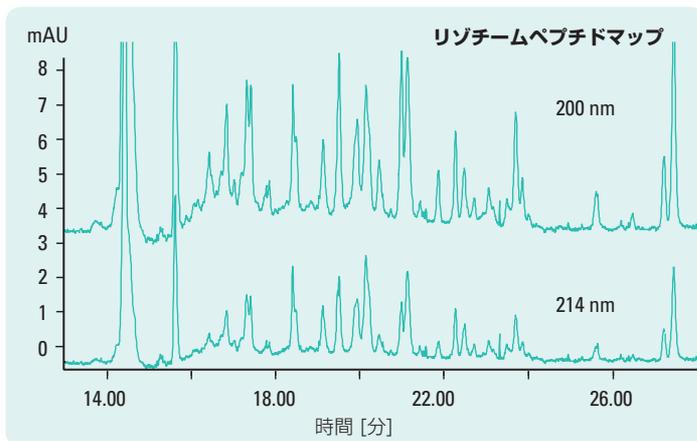


図 3.12  
低波長での検出による S/N 比の改善

狭い光学ビームがキャピラリー中心部を通過できるような狭い光学スリットをもつものが、優れた検出器の設計といえます。この場合、実際の光路長はキャピラリーの内径と等しくなり ( $b_e = d_c$ )、検出器の最大感度 ( $A/C^{\max}$ ) を (3.8) 式から求めることができます。そうした狭い光学ビームの欠点は、フォトダイオードに到達する光子の量が少なく、ベースラインノイズが大きくなることです。

スリットを大きくして光の通過量を増やすと、フォトダイオードに入射する光量は増加し、ベースラインノイズと感度の両方が減少します（ただし実際の光路長も減少します）。しかし、スリットを広げることでキャピラリー壁を通る迷光が増えれば、感度がさらに低下し、検出器のリニアリティが狭められます。ノイズと感度、検出器のリニアリティの相互依存性を図 3.13 に示しています。

スリットをキャピラリーの長さ方向に大きくすれば、分解能が犠牲になります。個々の分析に応じて、感度、検出器のリニアリティ、分解能を最適化するようにスリットのサイズ（幅や長さ）を選択することも必要です。CE ではサイズが小さくて湾曲したキャピラリーを使用するため、CE における検出器のリニアリティは、LC のリニアリティよりも大幅に低くなります（CE では 0.4~0.7 AU、LC では 1.2~1.5 AU）。

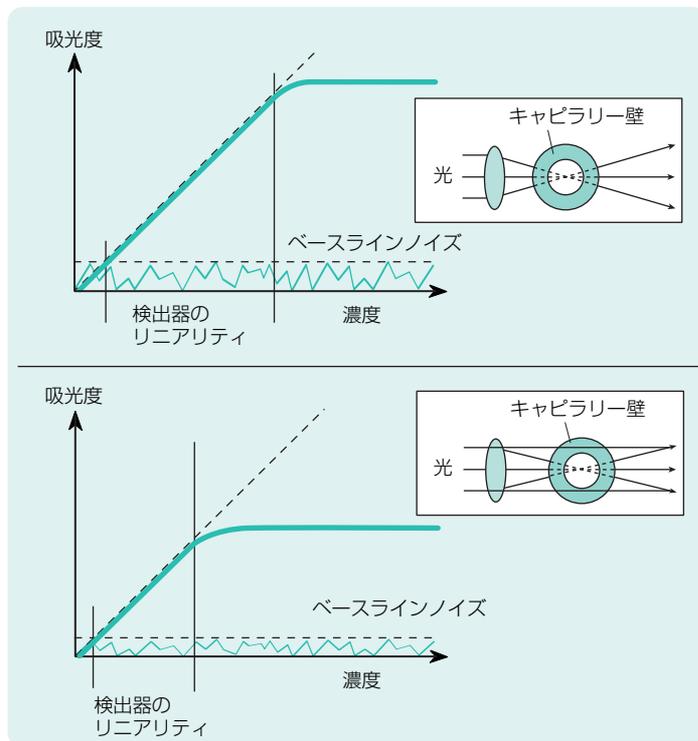


図 3.13 感度 (A/C)、検出器のリニアリティ、ベースラインノイズにおけるキャピラリー内の光路の影響

### 3.4.1.2. 光路長の長いキャピラリー (パルスセルキャピラリー)

検出感度やリニアリティを改善するには、キャピラリーの内径を大きくし、光路長を長くする方法があります。

しかし、この方法は、電流が増加してキャピラリー内の発熱につながりますので、利用が制限されます。例えば、キャピラリー内径を2倍にすると吸光度も2倍になりますが、電流値は4倍になります。特殊な設計のキャピラリーを使用すれば、キャピラリー全体の内径を大きくせずに光路長を延長することができます。そうした設計の3つの例を図3.14に示しています。

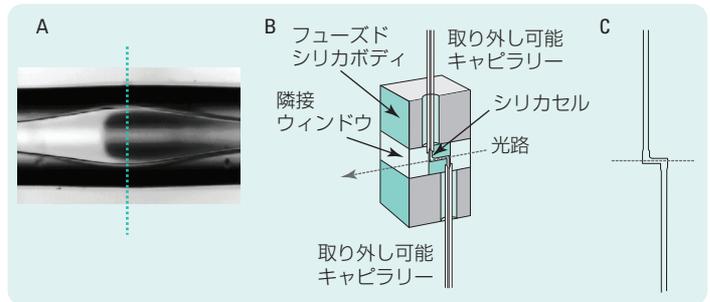


図 3.14

光路を延長したフローセルデザイン。A = 色素の先端が延長した光路を通過しているバブルセル; B = 高感度セル; C = Z-セル

バブルセルは分離効率と分解能をほとんど損なうことなく、光路長を延ばすことのできる独特な方法です。バブルセルとは、キャピラリーの中の検出部分だけを“バブル”状にふくらませたものです。バブル形にするのは検出部分だけなので、電流値が増大することはありません。バブルの領域では電気抵抗が減少し、したがって電場も弱くなります。さらに、バブル部分では容積が大きくなるに従い流速がおちます。溶質ゾーンの先端部がこのバブルに入ると、移動速度が徐々に緩やかになり、注入の際の電気泳動的なスタッキングと同様にゾーンの濃縮（スタッキング現象）が起きます。バブル部分での溶質ゾーンは直径方向（キャピラリーの断面方向）に拡散し、縦方向（キャピラリーの長さ方向）には縮小します。つまり試料濃度は変化せずに光路長が長くなることとなります（図 3.15）。図 3.14 は、バブルセル部分における色素ゾーンの先端を、実際に撮影したものです。

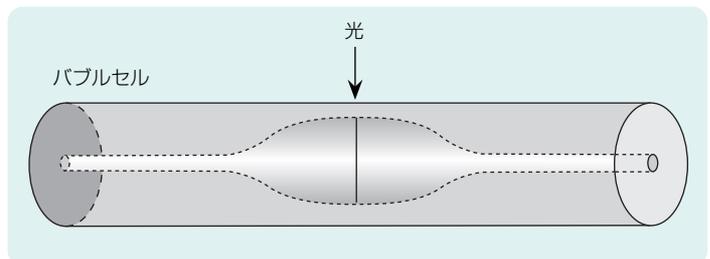
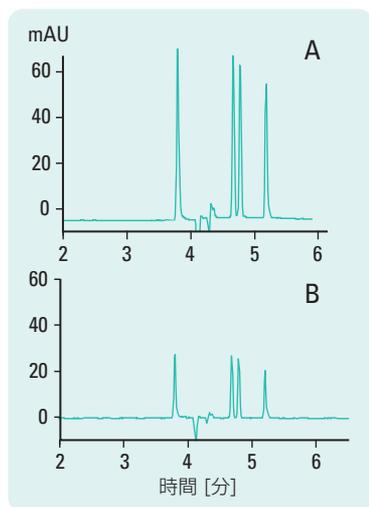


図 3.15

光路長を長くしたキャピラリーの概略(バブルセル)



**図 3.16**  
**ペプチド分析例: A) 光路長を延長したキャピラリー、B) 通常の長さのキャピラリー**  
**条件:** A) 内径 = 50  $\mu\text{m}$  と 150  $\mu\text{m}$  検出セル; B) 内径 = 50  $\mu\text{m}$

神経ペプチドの分離におけるバブルセルの性能を図 3.16 に示しています。この分析で用いたバブルセルの内径は、キャピラリー内径の 3 倍です (キャピラリー内径 50  $\mu\text{m}$  に対してバブルセル内径 150  $\mu\text{m}$ )。これによって、シグナルは内径 50  $\mu\text{m}$  のスタンダードキャピラリーの場合に比べて 3 倍近く増加します。この図では、バンドの広がりもほとんど見られません。さらに、バブルセルでの吸光度が増大するので、検出限界が向上し、リニアリティも広がります。

フローセルの光路を長くする別の方法を、図 3.14C に示しています。

この設計では、キャピラリーが Z 型に曲がり、横軸の部分が光学セルとして使用されます。このセルへの光のカップリングとフォーカシングは、ファイアボールレンズにより行われます。光の一部は漏出するかフューズドシリカに捕捉され、残りの部分はシリカ/空気表面での全反射により、キャピラリー内の溶液中を透過します。キャピラリーはあらかじめ調整され、各種の機器に合わせて製造されるキャピラリーホルダーに固定されています。

キャピラリーの横軸部の長さは 3 mm です。これは CE 分離の溶質ゾーンに応じた長さです。この種のセルにおける屈折や反射による光の誘導は、きわめて不安定になります。これは、軸方向から光を受けるキャピラリーの光学特性に溶液の屈折指数が大きな影響を及ぼし、光の一部が溶液ではなくキャピラリー壁を通過するためです。効果的な光路長は 3 mm 未満です。

こうした Z 型のフローセルに特有の欠点は、図 3.14B および 3.17 で示すセル設計により解消できます。

このセル設計では、フューズドシリカボディに、フラットな隣接ウィンドウと、迷光を減らす黒のフューズドシリカセルを組み合わせています。光路長は 1.2 mm (光路長 100 mm のバブルセルの 12 倍なので感度が向上) で、これにより検出器セル容積は明確に 12 nL と定義されます。セルに隣接するフラットなウィンドウにより、スペクトル分析能が向上します。

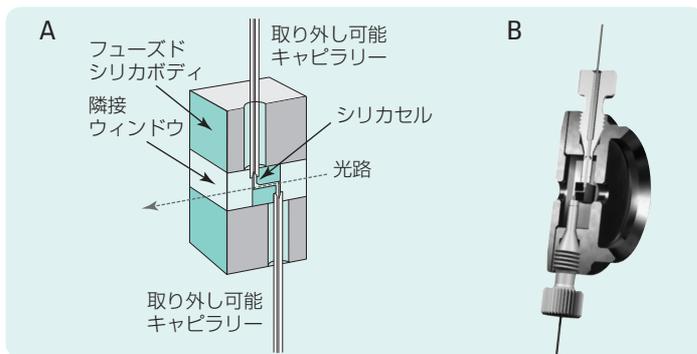


図 3.17  
マイクロ HPLC および LC で使用される高感度セル。A) 構成の概略、B) 実際の高感度セルの代表的な例

図 3.18 と 3.19 で示すように、高感度セルは、実際的な検出器のリニアリティ（リニアリティからの逸脱は 1400 mAU までで < 1%、2200 mAU までで < 3%）とシグナルノイズ比 (S/N) を大きく向上させます。S/N 比は内径 75  $\mu\text{m}$  キャピラリーでは 62.5 ですが、高感度セルでは 650 に上昇します。

この例では、S/N は実際には 16 倍（両セルの光路比）の増加が予想されますが、実際に得られた値は約 10 倍です。これは、吸光度（シグナル）が高い高感度セルでは、それに比例してノイズも増えるためです。

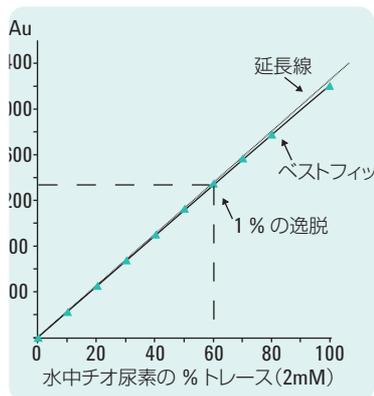


図 3.18  
水中チオ尿素の分析における高感度セルの検出器リニアリティの測定

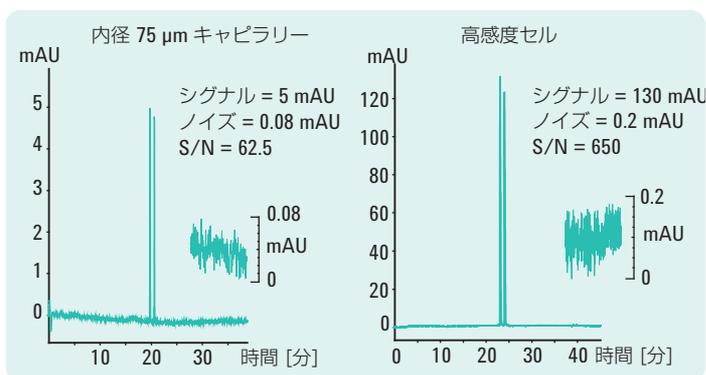


図 3.19  
高感度セルと内径 75  $\mu\text{m}$  キャピラリーのシグナル/ノイズ比の比較

図 3.20 で示すように、この種のセルで実現される感度は、薬剤成分の鏡像体過剰率を測定する必要がある場合にきわめて有効となります。

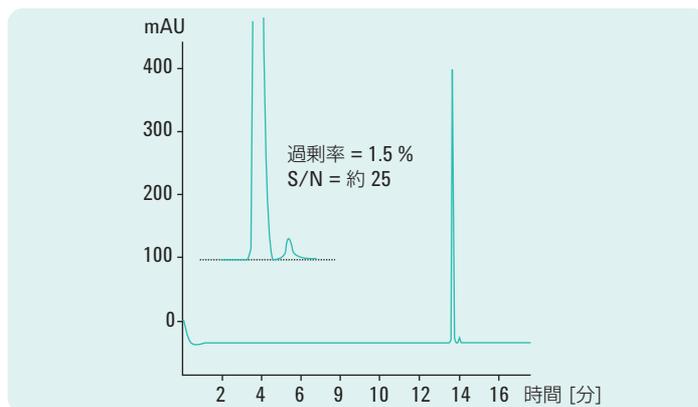


図 3.20

#### 鏡像体過剰率の測定

**条件:** メインピーク (+/-) エピネフリン (100  $\mu$ M); 20 mM ジメチル- $\beta$ -シクロデキストリン / 50 mM tris-リン酸 pH 2.4;  $L_{\text{eff}} = 40$  cm;  $i_d = 75$   $\mu$ m; 注入: 150 mbar x s; 30  $^{\circ}$ C;  $\lambda = 200$  nm 高感度検出セル

### 3.4.1.3. スペクトルデータの応用

HPLC と同じく、CE でも、ピーク同定やピーク純度の評価といった目的で、多波長 UV 検出を利用することができます。しかし CE では、データ取り込み速度の要件が厳しくなります。移動時間が数分で、段数が数十万になるため、トータルピーク幅が 1 秒未満になることもあります。ダイオードアレイ検出器 (DAD) を用いると、サイクルタイム (すべてのダイオードをポーリング) は  $\leq 10$  ms になります。このサイクルタイムなら、バイアスを生じずにピーク形状とスペクトルを十分に記録することができます。<sup>40</sup>

波長範囲 190-600 nm で、アレイ上にダイオードがある DAD の概略を図 3.21 に示しています。

DAD を使えば、紫外-可視域でスペクトルを継続的に取り込むことができます。すべての波長が同時に取り込まれるので、スペクトル取り込み時の感度のロスはありません。ピーク分離に適切な条件を開発する際には、以下

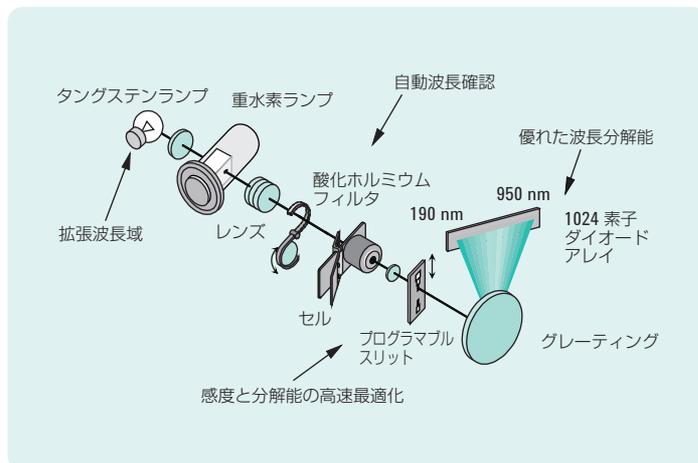


図 3.21  
ダイオードアレイ検出器の光学設計

の複数の方法でスペクトルデータを処理することができます。

- スペクトルデータからエレクトロフェログラムシグナルを抽出し、各ピークの最適な検出波長を決定する
- スペクトルライブラリ検索を実行し、定量的同定を行う
- エレクトロフェログラムシグナルの比率を計算し、ピーク純度を評価する
- ピーク純度をチェックし、(未知の) 不純物を検出する

波長と時間に対するピーク強度 (吸光度) を示す方法としては、3次元 (3D) プロット (図 3.22) があります。このプロットから、特定波長における最高のピーク強度がわかります。

もう1つのより実用的な方法は、スペクトル情報を等高線図で表示することです。この等高線図は、等吸光度プロットとも呼ばれます。このテクニックでは、任意の波長および時間面における等しい吸光度を結んだ同心円的なラインとしてスペクトル情報をプロットします (2D プロット、等しい高度を示す地形図で見られるものと同じです)。このプロットにより、図 3.23 で示すように、すべてのスペクトル情報を同時に調べることが可能になります。

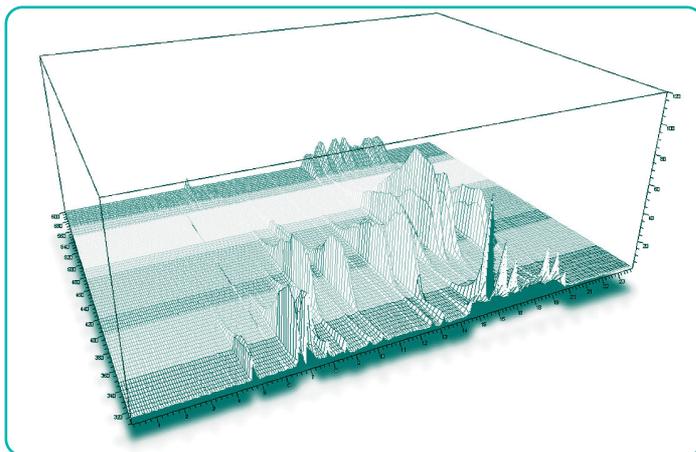


図 3.22  
エレクトロフェログラムの 3D プロット

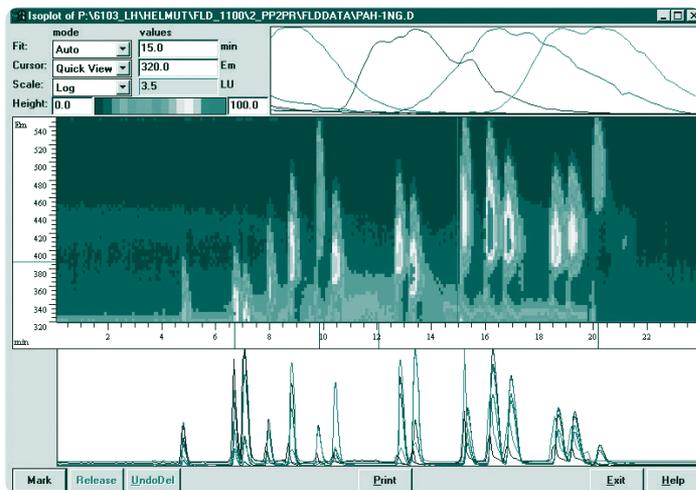


図 3.23  
スペクトル情報の等吸光度プロットと、最適な強度に関する情報および化合物スペクトル

この図は 3 つの部分に分けることができます。中央は等吸光度プロットで、分析全体を表示しています。吸光度の高低により色分けされています。

下段には、等吸光度プロットでを水平の線に沿ってカットしたした場合の3つのエレクトロフェログラムが示されています。これにより、エレクトロフェログラムの各ピークに最適な波長を選択することができます。上段には、1つのスペクトルが表示されています。これは、等吸光度プロット上で垂直線を特定のピークの輪郭まで動かすことで得られます。この方法で、スペクトルにより化合物を同定することができます。

スペクトルにより未知化合物を同定するためには、1つまたは複数のライブラリに保存されたスペクトルと比較する必要があります。通常、これを実行する際には、比較するスペクトルを正規化します。正規化とは、一最高強度を同じ値に設定することにより、両方のスペクトルを固定値に変更することを意味します。その後、視覚的に比較できるように、スペクトルを重ねて表示します。これは自動化操作にはあまり適さないため、統計的手法を用いて正規化化合物のスペクトルと未知化合物のスペクトルの類似性（マッチファクタまたは相関係数）を計算します。

そうしたピーク純度の確認の例を図3.24に示しています。ここでは、スペクトルがピークの上り勾配、頂点、下り勾配で取り込まれ、正規化されています（これらのスペクトルの正規化により、検出器を通過する溶出成分の濃度変化が相殺されます）。視覚的な比較でも、計算により求められた純

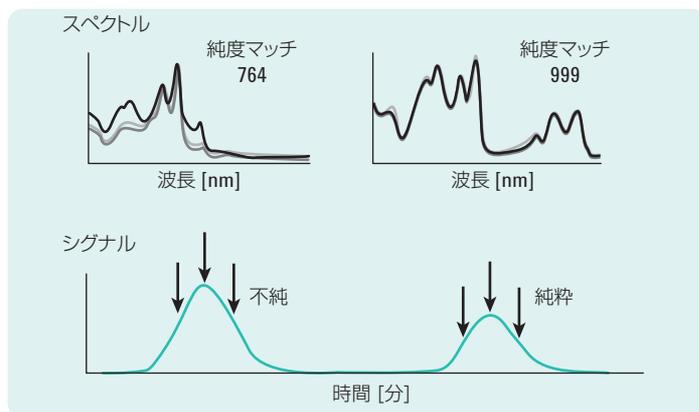


図 3.24  
スペクトルの重ね表示とマッチファクタの計算による純粋なスペクトルと純粋でないスペクトルの比較

度マッチファクタでも、純粋なピークと純粋でないピークの違いが明らかに見てとれます。3、5、7、9 またはピークのすべてのスペクトルのマッチファクタを計算すれば、精度を高めることができます。

**注:** 990 を超えるマッチファクタは、一般にスペクトルが類似であることを示します。900~990 の値は、一部に類似性があることを示していますが、結果を慎重に解釈する必要があります。900 を下回る値は、スペクトルが異なることを示します。

ピーク純度を確認する別の方法としては、ピークの濃度分布における複数波長の吸光度比をプロットする方法があります。どの化合物でも、比 (R) はピーク高にかかわらず一定になります。したがって、ピーク分布でこの比をプロットすると長方形の形状になり (成分が純物質の場合)、長方形の高さは吸光度比と等しくなります。波長を慎重に選べば、この比は各化合物に固有のものになります。この例を図 3.25 に示しています。ここでは、1.5、5.3、2.8 の比を測定し、ピーク 1、2、3 をそれぞれ成分 B、C、A と同定しています。

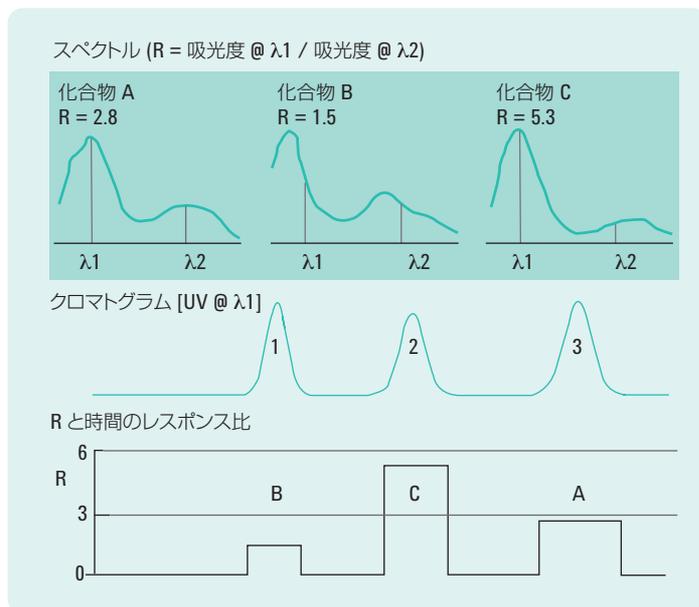


図 3.25 シグナル比のプロットによるピーク純度確認

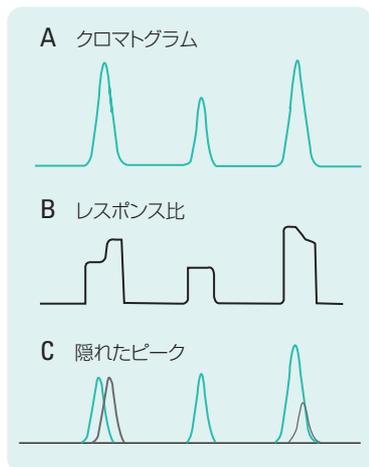


図 3.26  
シグナル比のプロットによる分離されない隠れたピークの発見

レスポンスの比率計算では、分離されていない隠れたピークを見つけ出すこともできます。図 3.26 に、 $\lambda_1$  で記録されたクロマトグラム（またはエレクトロフェログラム）[A] を示しています。この図では 3 つのピークが見られます。[B] の  $\lambda_1 / \lambda_2$  レスポンスでは、ピーク 1 およびピーク 3 と予想される長方形の形状が見てとれません。こうした不規則なレスポンス比が生じるのは、[C] に示すように、分離されない隠れたピークが存在しているためです。

ピーク純度が十分に確認されたら、利用可能なライブラリで同一のスペクトルを検索し、化合物を同定することができます。例を図 3.27 に示しています。ここでは、CE ピークのスペクトルが HPLC 化合物ライブラリのも的一致しています。

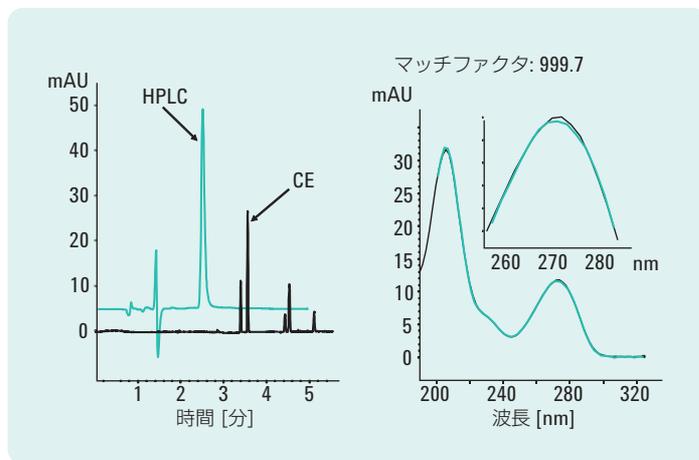


図 3.27  
HPLC 化合物ライブラリ検索による CE ピークの同定

#### 3.4.1.4. 間接光度検出

紫外吸収を示さず、直接分光テクニックでは測定できない物質の間接光度検出が、HjerténによりCEに導入されました。<sup>41</sup> 間接的に検出される物質の例としては、無機イオンや単純な有機イオン、糖などがあります。こうした化合物は通常、きわめて短い波長域 (< 190 nm) 以外では、紫外吸収を示しません。

間接光度検出では、効果的な検出特性（紫外吸光度が高いなど）を持つイオン化合物がモニタリングイオンとして用いられます。この化合物は同時に、BGEの構成成分の1つにもなります。ゾーン内に光を吸収しない分析対象物が存在すると、BGEイオンの濃度が変化します。図3.28に示すように、この分析対象物ゾーンが検出器を通過するとき、同時に生じるモニタリングイオンの濃度変化により分析対象物が検出されます。

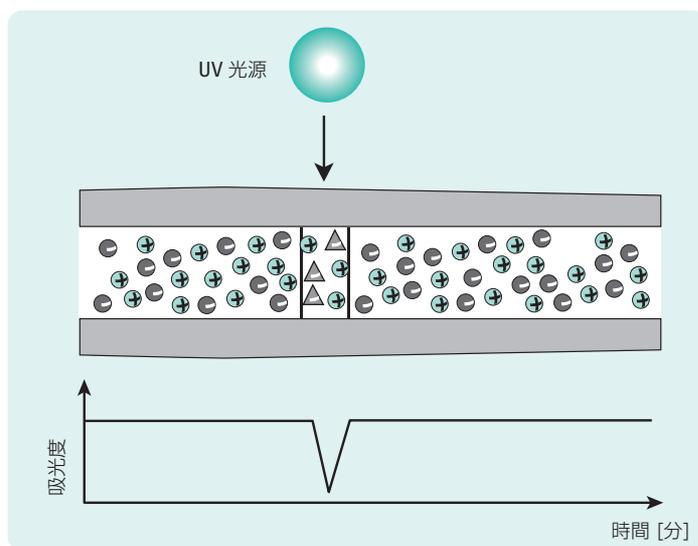


図 3.28  
CEにおける間接 UV 検出の概略図

間接検出は汎用的ですが、選択的な検出方法ではありません。間接検出のメカニズムは、電気的に中性を保ったうえで、1つのモニタリングイオンが同じ電荷をもつ1つの分析対象イオンにより置換されることで説明されま

す。この説明はかなり単純化されているため、電気泳動の移動プロセスを表す方程式を Kohlrausch 調整関数 (KRF、1.3.4.5 項参照) により直接解いた場合には、矛盾が生じることもあります。

KRF に基づく計算では、置換比 (1 つの分析対象イオンで置換される BGE イオンの数) は 1 より大きくなることもあり、モニタリングイオンと反対の電荷をもつ分析対象イオンでも検出されることがあります。特定の分析対象物と BGE の組み合わせの場合、置換比は伝達比 (TR) とも呼ばれます。

伝達比は、ゾーンに分析対象物 (a) が存在する場合の分析対象物の濃度に対するモニタリングイオンの濃度 ( $C_m$ ) の変化として定義されます。<sup>42</sup>

3.9

$$TR = -\frac{\Delta C_m}{C_a}$$

**ほとんどの実際のアプリケーションでは、分析対象物が存在する場合にはベースラインシグナルの減少が観察されるため(図 3.28)、この方程式ではマイナス記号が付加されます。**

$C_m$  の変化をモニタリングする際には、伝達比が特定のアプリケーションで得られる感度の尺度となります。微量分析では、伝達比に対する BGE 組成の最適化が重要です。予想される分析対象物の濃度が比較的高く、検出下限の低さがそれほど重要でない場合は、試料キャパシティに応じて BGE を最適化するほうが良いでしょう。

間接吸光検出における検出濃度下限 (CLOD) は、感度 (TR) とベースラインノイズに左右されます。BGE に光を吸収する成分が含まれていない場合は、ベースラインノイズはシステムノイズと呼ばれます。光を吸収する BGE が存在する場合は、モニタリングイオン濃度のすべての変動がノイズとして検出されます。これはおもに、キャピラリー上の各スポットにおける不均等な熱拡散により生じます。したがって、間接吸光検出では、このベースラインノイズが優勢となります。また、このノイズは  $C_m$  に比例します。BGE がモニタリングイオンとその対イオンのみで構成される場合、 $C_m = C_{BGE}$  となります。そうした単純な BGE では、CLOD は次式で表されます。

$$3.10 \quad \text{CLOD} = \frac{\text{Noise}}{\text{Sensitivity}} = \frac{N}{TR} \approx \frac{C_{\text{BGE}}}{TR} = \frac{A_{\text{BGE}}}{\epsilon_{\text{BGE}} b_e TR DR}$$

$A_{\text{BGE}}$  = BGE の吸光度 =  $\epsilon_{\text{BGE}} b_e C_{\text{BGE}}$

DR = ダイナミックレンジ =  $A_{\text{BGE}} / \text{ベースラインノイズ}$

$b_e$  = 検出器の有効経路長

$\epsilon_{\text{BGE}}$  = BGE のモル吸光係数

上記の特性の概要を図 3.29 に示しています。

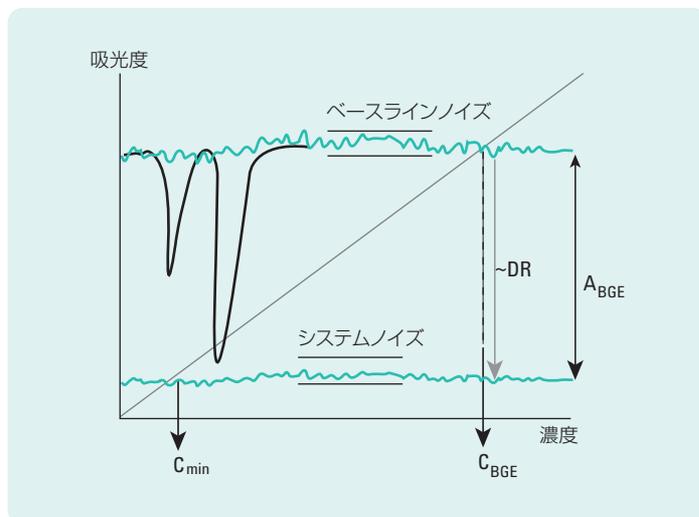


図 3.29  
間接 UV 検出の特性

(3.10) 式から、CLOD の最適化は TR と DR に依存していることがわかります。TR (>1) の最適化は、分析対象物とモニタリングイオンの組み合わせについて相応の知識が必要となるため、容易ではありません。TR とは対照的に、DR については、モル吸光係数 ( $\epsilon_{\text{BGE}}$ ) が高い BGE、つまり  $C_{\text{BGE}}$  をできるかぎり低く保てる BGE を見つけることで最適化できます (高い BGE 濃度では、試料キャパシティが高くなりますが、ノイズのレベルや、検出器の直線性を有する範囲を超える可能性も高くなります)。したがって、低い検

出下限（低い  $C_{BGE}$ ）と高い試料キャパシティ（高い  $C_{BGE}$ ）との間で、最適なポイントを見つける必要があります。多くのアプリケーションでは、一般に 5~10 mM というモニタリングイオン濃度が用いられます。この場合、検出下限は  $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$  M になります。

BGE としては、大きさの小さく、紫外吸収を有するイオンの塩を使用します。陰イオンの検出では、一般にクロム酸塩、安息香酸エステル塩、フタル酸エステル塩、ソルビン酸をモニタリングイオンとして使用されます。陽イオンについては、一般にイミダゾールやピリジンが推奨されます。他のイオン化合物を BGE に追加すると、TR と DR の両方が影響を受けることがあるので、そうした手法は最小限に抑える必要があります。

間接吸光検出と比べると、間接蛍光検出では検出下限が低くなります（最大 10 倍）。これはおもに、2 つの検出メソッド間のノイズ特性の違いが原因です。

**注:** この 2 つの間接光度検出テクニックの他に、間接的な非接触電気伝導度検出も説明しています（3.4.3 項参照）。

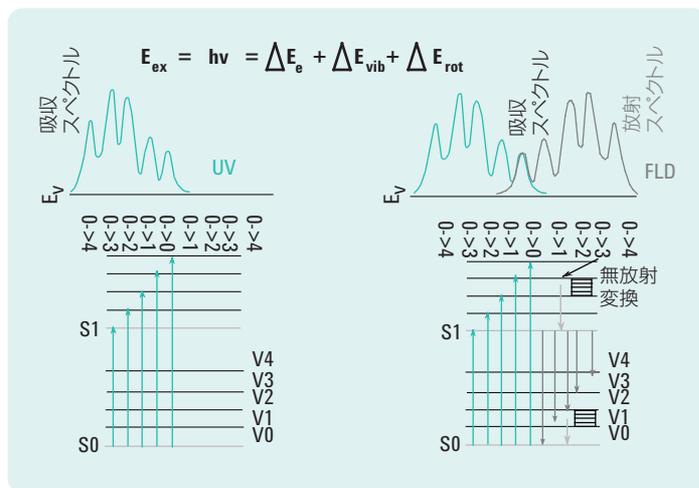
### 3.4.2. レーザー誘起蛍光 (LIF)

紫外可視分光光度検出では、分析対象分子が別個のエネルギーを吸収し（エネルギーを持つ光子  $h\nu_{0,1}$ ）、高いエネルギーレベルに到達します（ $S_0 \rightarrow S_1$ : 励起）。分子がすぐにこの光子を放出し、低エネルギーレベル  $S_0$  に戻ると、もともとの強度の低い透過光が直接相殺され、吸光度は測定できません。さいわい、隣接する溶液分子との衝突により分子が余分なエネルギーを失うため、そうした効果は生じません。したがって、入射ビーム光の光子エネルギーは、熱に変換されます。

一部のケースでは、このエネルギーの変換が生じません。この場合、エネルギーを持つ光子  $h\nu_{0,1}$  を放出する前に、分子は一定の期間（通常、約  $10^{-6}$  秒という極めて短い期間）、余分なポテンシャルエネルギーを保持します。この現象は蛍光と呼ばれます。一般に、蛍光が生じるのは、芳香族環など、強固な平面構造をもつ分子に限られます。

しかし、高電子エネルギーレベルにとどまる短い時間のあいだに、分子が低エネルギーレベルに戻る可能性もあります。まず、吸収されたエネルギーの一部が消散し、もっとも低い一次励起エネルギーレベル (S1) の電子状態になります。その後、通常は 1~100 ns 後に、分子は基底状態 (S0) の振動エネルギーレベルに戻ります。

これは一般に、放出された光子はランダムな方向性をもつことを意味しています。また、蛍光放射の波長は吸収放射の波長とは異なるため、完全な蛍光放射スペクトルは、吸収スペクトルと似た形ながら、長波長側 (低い光子エネルギー) ヘシフトします。このプロセスの例を図 3.30 に示しています。



**図 3.30**  
**溶液中分子の吸収スペクトルと放射蛍光スペクトル (V0~V4 は基底状態 (S0) の振動エネルギーレベルまたは次に高い一次励起電子エネルギーレベル S1 の振動エネルギーレベル)**

蛍光化合物のゾーンが検出器ウィンドウを通過する際の予想されるシグナル (S) は、おおよそ次式で表されます。

3.11

$$S \approx k I_0 V_{\text{cell}} \Phi_i \epsilon_i C_i$$

$k$  = 最適なシステムの収集効率  
(光検出器に向かう放射光のフラクション)

$I_0$  = 最適なセルにおける励起光強度

$V_{\text{cell}}$  = 最適なセルにおける照射溶液量

$\Phi_i$  = 蛍光量子収率

$\epsilon_i$  = モル吸光係数

$C_i$  = 分析対象物の濃度

(3.11) 式は、高感度な検出器には、強力な放射源と放射光を効率的に収集できることが必要であることを示しています。しかし、任意の化合物の蛍光量子収率は予測が困難です。1 という量子収率も観察されていますが、量子収率が 0.1 の化合物もすでに「強い」蛍光と見なされていることがあります。

分析対象物の蛍光シグナルは、常にある程度のバックグラウンドシグナルとともに計測されます。このバックグラウンドは、フローセル壁における励起放射の散乱や、溶液中の蛍光不純物、さらには溶媒のレイリー散乱およびラマン散乱により生じます。バックグラウンドを低くするためには、スペクトルフィルタリングや励起波長とそれより長波長の空間分解能により、最適な蛍光波長を選択することが特に重要です。バックグラウンドシグナルのノイズは、達成可能な CLOD を決定する要因となります。この検出下限は、吸光度検出よりも 1~3 桁ほど低くなることもあります。

CE では、励起光源としてレーザーを使用します。レーザーを用いれば、検出容量の小さい光学セルとして機能するフューズドシリカキャピラリーの特定部分に、高い強度の光を照射することができるためです。CE における容量の小ささという欠点（分離効率を保つのに必要な  $V_{\text{cell}}$  値の低さ）は、検出器ウィンドウでの励起光の強度を増加させたり、照射量を拡張したセル（バブルセルや高感度セル）の使用によって補うことができます。

レーザー誘起蛍光 (LIF) は、1985 年に Gassman らにより<sup>43</sup>、1986 年には Burton らにより<sup>44</sup> CE に導入されました。ランプをベースにした複数の蛍光検出器設計 (レーザーにも対応可能) が、現代の LIF 検出器の基礎となりました。

このランプベースの光学設計をさらに発展させ、レーザーを応用したものを図 3.31 に示しています。ボールレンズにより、レーザー光がキャピラリーに照射されます。すでに示したように、放射光の収集と励起ポジションを等しく分離することで、放射光の高フラクシオンを回収し、適切にフィルタリングすることが可能になります。これにより、高いシグナル/ノイズ比が得られます。

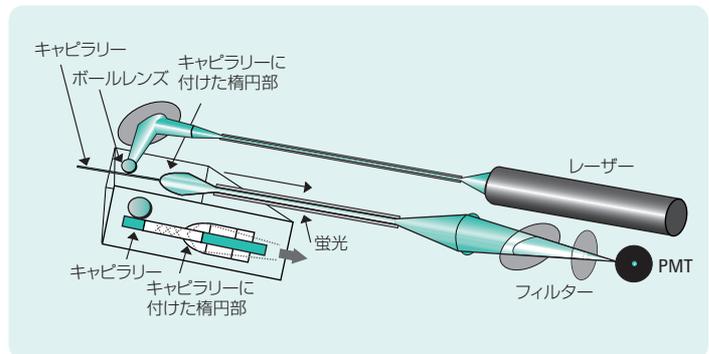


図 3.31

**非共線光学設計の LIF。** ボールレンズは開口部がきわめて大きく、レーザーによるキャピラリーセル内部への照射を最適化することで、蛍光強度を最大化します。ボールレンズには、励起光をフローセルに正確に照射する働きもあります。楕円部は励起放射を集め、放射フィルタと PMT へ伝達します。(Pico-metrics SA の許可により転載)

交換可能なキャピラリー LIF カセットシステムを用いてこの光学設計を慎重に設定することで、レーザーの再照射や、キャピラリーやレーザーを交換した際の光電子増倍管を用いた放射光ビームの再調整を避けることができます。

レーザーの使用には、以下のような明らかな利点があります。

- レーザーにより生じる光は単色なので、最適な励起の選択性が得られる
- 光線が平行なレーザーはキャピラリーの照射が容易で、検出セルで高い放射照度が得られる

LIF アプリケーションでは、レーザーのパワーを極端に高くする必要はありません。数ミリワットの線出力で、十分に高感度を得られます。パワーをより高くしても、通常はシグナル/ノイズ比は改善されません。これには、複数の要因があります。まず、光強度がきわめて高いと、蛍光化合物は飽和する（分子の大部分がすでに励起状態にある）傾向があります。そのため、光強度を高くしても、レスポンスは高くなりません。2つ目の要因は、蛍光化合物の光崩壊が生じる可能性があることです。光の影響を受けやすい化合物では、光子を吸収すると、分子が崩壊することがあります。この現象が起きる場合は、蛍光強度に上限が生じ、低い強度の励起ビーム光を使用することが必要となります。シグナル/ノイズ比が改善されない3つ目の要因は、励起光の強度が高くなると、光源（レーザー）が不安定になることです。バックグラウンドのシグナルとノイズは励起光の強度に比例するため、放射照度を高くしても、シグナル/ノイズ比は向上しません。

蛍光はどちらかといえば稀な現象なので、天然の蛍光を用いたこの検出モードの応用には限界があります。しかし、蛍光検出に特有な選択性と感度を活用するために、HPLC や CE で分離を行う前に、ある種の化合物を蛍光誘導体化する試薬が数多く開発されています。そうしたプレカラム誘導体化手法のほとんどでは、分析対象分子の特定の官能基に蛍光部を共有結合で誘導体化する方法が用いられています。

多くの標識試薬が市販されています。一般的に利用されている試薬と、それぞれの最適な励起および放出波長を表 3.4 にまとめています。

官能基	試薬	$\lambda_{ex}$ [nm]	$\lambda_{em}$ [nm]
1級アミン	0-フタルアルデヒド(OPA)、フルオレスカミン、	325/340	455
	3-(4-カルボキシベンゾイル)-2-キノリン-カルボ	390	475
	キシアルデヒド(CBOCA)、5-フロイルキノリン- 3-カルボキシアルデヒド(FQ)	442 488	550
1級または 2級アミン	ダンシルクロリド、フルオロニトロベンゾオキサジ	350	530
	アゾール(NBD-F)、9-クロロギ酸フルオレニルメチル	470	530
	(FMOC)、フルオレseinイソチオシアネート(FITC)	260, 488	305, 525
ヒドロキシシル基	イソシアン酸ナフチル	310	350
	アントロイルニトリル	370	470
アルデヒド基 またはケトン	還元的アミノ APTS	365	505
	ダンシルヒドラジン(Dns-H)		
カルボン酸	アントリルジアゾメタン(ADAM)	365	412
チオール	N-アクリジニルマレイnimド(NAM)	355	465
	OPA	340	455
アルギニン残基	ベンゾイン	325	440
チロシン残基	4-メトキシ-1,2-フェニレンジアミン	325	438
Phe, Tyr, Trp	固有蛍光	257 280	305, 325

**表 3.4**  
**プレカラム蛍光標識用の試薬**

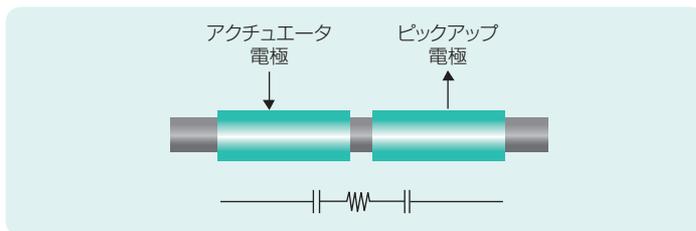
多くの場合、HPLCのプレカラム誘導体化手順がCEでも応用が可能です。その他のケースについては、CE用の特別な標識試薬が開発されています。こうした試薬が開発されているのは、LIFで使用される種類のレーザーに適し、LIFのレーザースペクトルに対応する励起波長をもつ誘導体が必要なためです。こうした誘導体化試薬としては、有名なOPA試薬(ただし反応は遅い)に代わって使用されるナフタレン-2,3-ジカルボキシアルデヒド(NDA)があります。NDAは、442 nmのHeCdレーザーで励起させた場合に、強い吸光度(および高い蛍光強度)を示します。<sup>45,46</sup> そのほか、ある種の誘導体の電気泳動特性が必要とされるために、特別な誘導体化試薬が用いられることもあります。類似する化合物を完全に分離する場合、たいていはEOFと反対に移動させたほうが容易になります。そのため、EOFが陰極に向かうBGEでは、負の電荷をもつ誘導体が効果を発揮します。そうした誘導体試薬の例としては、オリゴ糖の誘導体化に用いられる1-アミノピレン-3,6,8-トリスルホン酸(APTS)があります。<sup>47</sup> この試薬は3つの強酸基をもつため、糖誘導体化の分離において広いpH範囲を利用できます。

### 3.4.3. 非接触電気伝導度検出 (CCD)

ナローチューブを用いた電気泳動の初期の研究(1967~1980年)では、電気伝導度検出は標準的な検出手法として用いられていました。しかし、フューズドシリカキャピラリーを用いたCEが登場したことで(1981年)、分光光度検出(UVや蛍光)が理想的となり、電気伝導度検出はしばらくの間、軽視されることになりました(1987年まで)。それでも、CEにおける伝導度検出の利用には、いくつかの利点があります。1つ目は、原理的に汎用性が高く、他の手法では検出が難しい無機イオンなどの化合物に適している点です。2つ目は、検出器に必要な容量が少なく、問題なく低い検出下限を得られるという点です。

続く10年のあいだに、CEにおける電気伝導度検出を復活させるために、真剣かつ有望な試みがなされてきました。その成果としては、キャピラリー内の検出電極<sup>48,49</sup>、エンドカラム検出<sup>50,51</sup>(キャピラリーアウトレットに1つの検出電極を配し、反対側にHV電源を接地)、「オープンアーキテクチャ」を用いたエンドカラム検出などがあります。3つ目の例(1996年)<sup>52</sup>では、キャピラリーの交換が容易で、検出容量を精密に設定することが可能です。このタイプのエンドカラム検出では、無機イオンの検出下限は、間接UV検出に比べて10倍も向上します( $10^{-5} \sim 10^{-6} \text{M} \approx 1 \text{ ppm} \sim 100 \text{ ppb}$ )。ただし、この構成は実際のCEでは利用されませんでした。そのおもな理由は、非接触電気伝導度検出(CCD)が登場したことです。CCDの登場により、BGEと電極が接触する際に生じるすべての問題が解決しました。

非接触電気伝導度検出器は、1980年にGašらによりエレクトロマイグレーション分離テクニックに導入されました。<sup>53</sup>18年後、Zemannら<sup>54</sup>がCE用の同軸CCDを開発しました。この検出器では、特定の距離でキャピラリーのまわりに配置された2つのステンレス製チューブが電極として機能します。アクチュエータ電極に発振周波数(30~600kHz)を適用すると、この電極とキャピラリー内の液体との間で容量性遷移が生じます。電極間の検出ギャップを通過したのちに(オームレジスタとして機能)、電解液とピックアップ電極との間で2度目の容量性遷移が生じます。分析対象物の通過によりギャップの電気伝導度(=1/抵抗)が変化すると、ピックアップ電極により感知されます。



**図 3.32**  
**CCD 原理の概略図。下図; 電気的等価、コンデンサ、オームレジスタ、コンデンサ**

分離キャピラリーのまわりに円筒状の金属製電極を配した簡単な CCD の構造を図 3.32 に示しています。

CCD には以下のような利点があります。

- オンキャピラリー検出
- 電極が汚染されない
- 接続が不要
- 他の検出システム (UV、LIF、MS) との連結
- 充てんキャピラリー (CEC) に使用できる
- フューズドシリカ以外の材質 (Peek、テフロン) を使用できる
- 無機イオンと小型有機イオンの検出下限が ppm から ppb 域へ向上

最適な感度を得るためには、分析対象物ゾーンと BGE の伝導度の違いをできるだけ大きくする必要があります。しかし、この条件は、BGE のバルク特性を測定する伝導度検出器に固有の問題につながります。BGE 組成やその温度の変動は、そのままベースラインの不安定化につながります。さらに、BGE のバックグラウンド伝導度が高いとノイズレベルが高くなり、検出下限に悪影響が出ます。反対に、BGE の伝導度が低いと、オーバーロードにつながりやすくなります (1 章の 1.3.4.5 項 “電気的拡散” 参照)。したがって、電気伝導度検出で有効となる妥協策としては、比較的高い濃度で両性バッファを使う方法などが考えられます (MES、CAPS、アミノ酸両性イオンやその混合物)。

CCD で検出した陰イオンと陽イオンの分離例を図 3.33 と 3.34 に示しています。

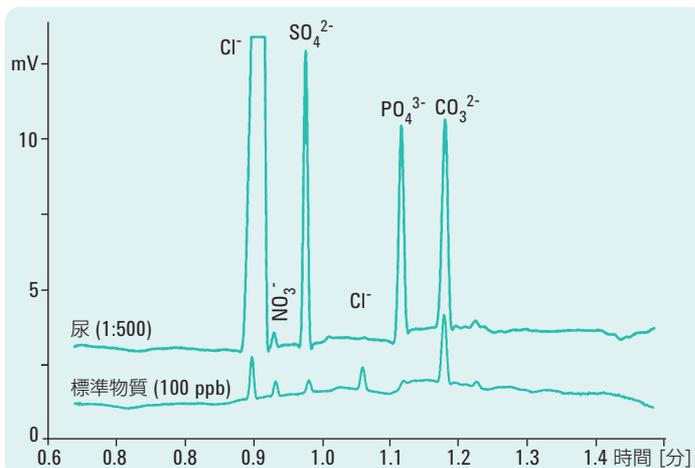


図 3.33

**尿試料(500 倍に希釈)に含まれる陰イオンの CZE 分析**

**条件:** バッファ: 7 mM ソルビン酸/15 mM アルギニン + 0.001 % 水酸化ヘキサジメトリン(HDB)、pH 9.0;  $L_{\text{tot}} = 50$  cm;  $L_{\text{eff}} = 37$  cm;  $id = 50$   $\mu\text{m}$ ; 注入: 200 mbar x s; 印加電圧: 30 kV

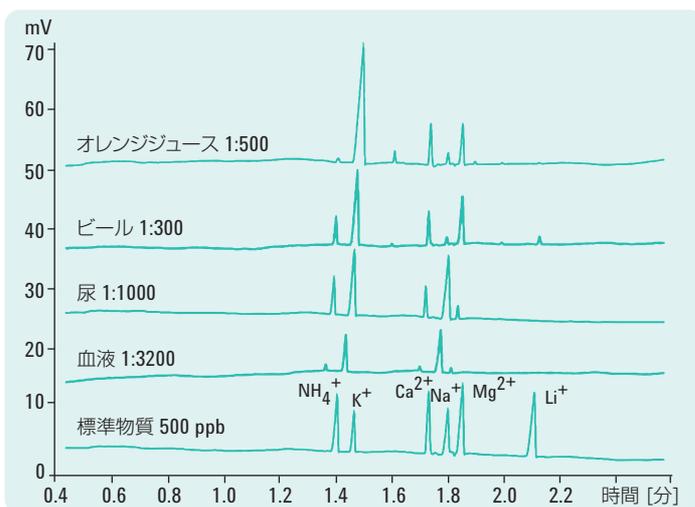


図 3.34

**複数の希釈試料に含まれる陽イオンの CZE 分析**

**条件:** バッファ: 25 mM MES/25 mM ヒスチジン + 1 mM 18-クラウン-6-テトラカルボン酸、pH 6.1;  $L_{\text{tot}} = 50$  cm;  $L_{\text{eff}} = 46$  cm;  $id = 10$   $\mu\text{m}$ ; 注入: 840 mbar x s; 印加電圧: 30 kV

このエレクトロフェログラムの標準トレースは、陰イオンで ppb レベルの低い検出下限が得られることを示しています。図 3.34 は、複数の希釈試料に含まれる陽イオンを、内径 10  $\mu\text{m}$  のキャピラリーを用いて分離および検出した結果を示しています。

この例では、クラウンエーテルが陽イオンと複合体を形成し、 $\text{K}^+$  イオンと  $\text{NH}_4^+$  イオンが分離されています。また、標準トレースは、陽イオンでも ppb レベルの検出が可能であることを示しています。このレベルの検出は、内径 10  $\mu\text{m}$  キャピラリーを用いた場合、UV 検出ではほぼ不可能です。

最近では、単糖類や二糖類<sup>55</sup>、誘導体化していない必須アミノ酸<sup>56</sup>、水中のハロ酢酸<sup>57</sup>、金属イオン<sup>58</sup>の分離を行う際に CCD が用いられています。

こうしたアプリケーションの一例を図 3.35 A と B に示しています。ここでは、ビールや酵母などの試料に含まれる誘導体化していない必須アミノ酸を、CZE-CCD により分離したフェログラムが示されています。分 EOF が抑制されているため、すべてのアミノ酸で優れた移動時間の再現性が得られています (RSD < 0.3%)。各アミノ酸の検出下限は 9.1~29  $\mu\text{M}$  (~1~3 ppm) の範囲内でした。

水中のハロ酢酸の分離<sup>57</sup>では、複数のバッファシステムを選択できることが報告されています (PeakMaster シミュレーションプログラムにもとづく。4.4.1.1 項参照)。そのため、直接 CCD だけでなく、間接 CCD でも化合物を検出できます。いずれの検出メソッドでも、0.1 ppm レベルのハロ酢酸の定量が可能です。

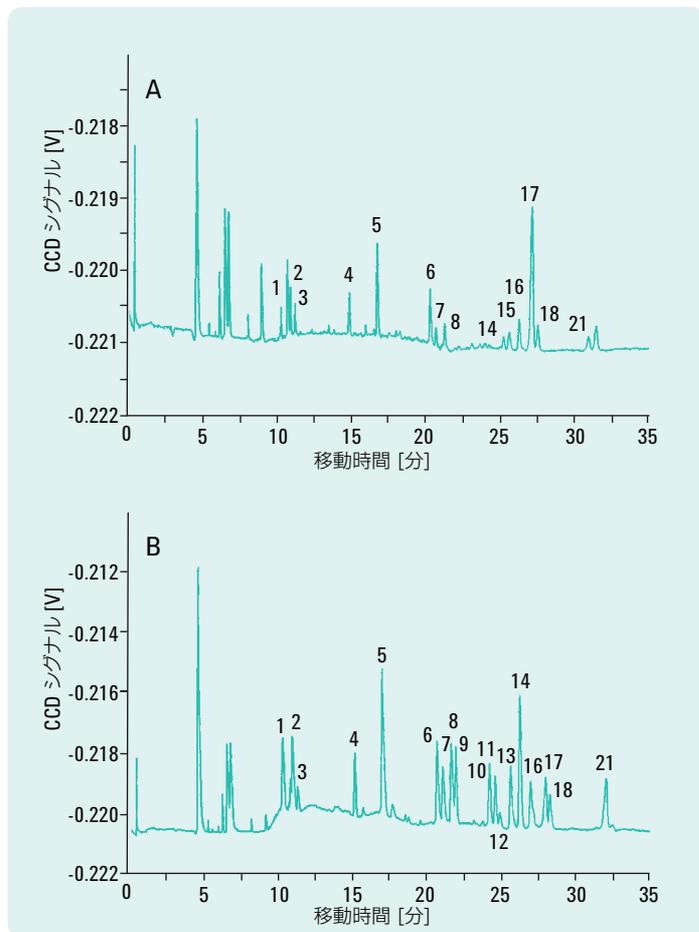


図 3.35

CZE-CCD で測定したアミノ酸の分離の (A) Budvar ビール; (B) Pangamin 酵母<sup>56</sup>

条件: 2.3 M 酢酸 (pH 2.1) + 0.1 % HEC;  $L_{\text{eff}} = 66.5 \text{ cm}$ ;  $L_{\text{tot}} = 80 \text{ cm}$ ;  $id = 50 \mu\text{m}$ ; 注入: 300 mbar x s; 電圧: + 30 kV; 電流: 15.4  $\mu\text{A}$ ; 温度: 25 °C; 検出: CCD; ピーク: 1, Lys; 2, Arg; 3, His; 4, Gly; 5, Ala; 6, Val; 7, Ile; 8, Leu; 9, Ser; 10, Thr; 11, Asn; 12, Met; 13, Gln; 14, Trp; 15, Glu; 16, Phe; 17, Pro; 18, Tyr; 21, Asp

### 3.5. フラクション コレクション

CEは基本的には小型化された分離テクニックですが、分離効率に優れ、自由溶液中での分離の行うことが可能なため、分取への応用という点でも以前から関心を集めています。目的化合物の大量分取は難しいですが、少量の精製化合物を分取する場合には有効なテクニックです。分離、分取されたフラクションを捕集し、以下のような実験を行うことが可能です。

- DNA断片やペプチドのシーケンシング
- MSによるオフライン同定やMALDI-TOFによる分子量測定
- 単一物質における生物学的活性の分析
- 再注入による捕集したピーク純度の確認

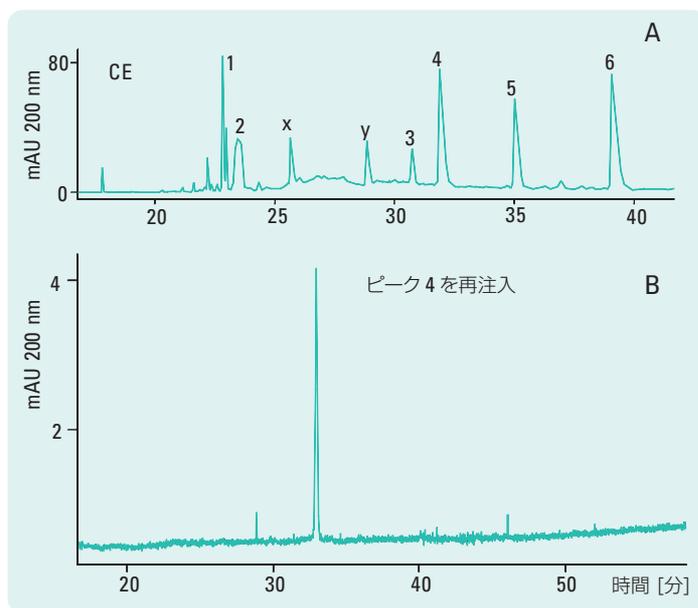
1回の分析で十分な物質量を得られない場合は、自動的に複数回の捕集を行うように設定することができます。分取CE分析の例を図3.36Aに示しています。ここでは、オーバーロード条件下で内径100 $\mu$ mキャピラリーを用いて、組み換えタンパク質(GroEs)のトリプシン消化物を分離しています。捕集したフラクションを内径50 $\mu$ mキャピラリーに再注入し、純度を確認しました(図3.36B)。

図 3.36

**CZEによる組み換えGroEsのトリプシン消化物の分取的分離(A)と捕集したフラクションの純度確認(B)。**

**条件(A):** バッファ: 105 mMリン酸, pH 2.0; サンプル: 組み換えタンパク質 GroEsのトリプシン消化物; 有効長: 87.5 cm; トータル長: 96 cm; id: 100  $\mu$ m; キャピラリーおよびサンプルトレイの温度: 15  $^{\circ}$ C; 電圧勾配, 0~3分: 0~10 kV, 3~10分: 10~20 kV, 10~20分: 20~25 kV, 20~40分: 25~30 kV; 注入: 350 mbar x s.

**条件(B):** 同一バッファ; サンプル: (A)のピーク4; 有効長: 56 cm; トータル長: 62.5 cm; id: 50  $\mu$ m; 検出ポイントの内径: 150  $\mu$ m; キャピラリーおよびサンプルトレイの温度: 15  $^{\circ}$ C; 電圧: 30 kV; 注入: 200 mbar x s



分取CE分析におけるサンプルコレクションの概略を図3.37に示しています。

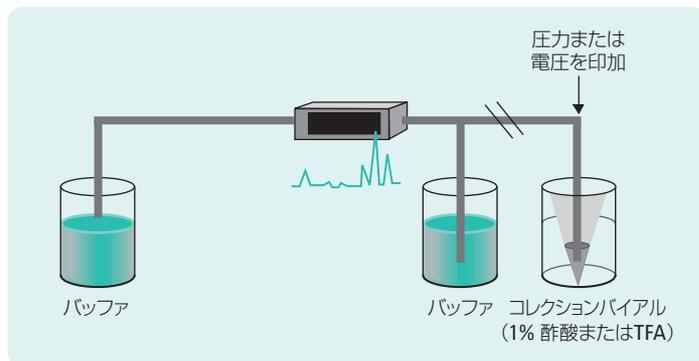


図 3.37  
サンプルコレクションの概略図

サンプルを回収する前に、複数の事項を考慮する必要があります。

- 内径 75 または 100  $\mu\text{m}$  のキャピラリーを使用する; 75  $\mu\text{m}$  の場合、通常は複数回のコレクションが必要となりますが、100  $\mu\text{m}$  の場合は 1 回で十分な場合もあります。
- 検出器からキャピラリー端までの時間を計算し、バッファからコレクションバイアルへの切り替えをプログラムする。
- できるだけ多くの試料をロードする（オーバーロードの限界については以下で説明します）。
- 複数回のコレクションでは、移動時間を一定にすることが不可欠です。
- 最小容量が 5~50  $\mu\text{L}$  の円錐マイクロバイアルに回収する。
- 狭いゾーンでの回収を容易にするために溶出の際に電圧を下げて一時的にピーク幅を広げる。
- コレクションバイアルにバッファ（または希釈したバッファ）を入れ、電気的移動による溶出中の電気的接続を維持する。

分取時のキャピラリーの温度上昇を予測するために、文献で見られる複数の同一バッファ条件をもとに、 $\kappa_g = i/E A_a$  ( $i$ ,  $E$ ,  $A_a$  はそれぞれ電流、電場の強さ、キャピラリー横断面) を適用し、導電率 ( $\kappa_g$ ) の推定値を求めました [(1.23) 式、1.3.4.5 項]。15  $^{\circ}\text{C}$  で補正すると、 $\kappa @ 15^{\circ}\text{C} \approx 0.005 \Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$  になります。

この値をもとに、分取用のキャピラリーに高電圧（20、25、30 kV）を印加した場合の値を示す表 3.5 を作成しました。比較のために、分析キャピラリー（内径 50  $\mu\text{m}$ ）の計算値も示しています。

電圧 (kV)	電場 (V/cm)	電流 ( $\mu\text{A}$ )	電流密度 ( $\text{A}/\text{cm}^2$ )	$\Delta T_{\text{cap}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_{\text{T}} \approx \Delta T_{\text{w-s}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_0$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$V_{\text{inj}}$ (nL)	$L_{\text{inj}}$ (mm)	$N_{\text{est}}$
<b>分取キャピラリー</b>									
							81.3	10.4	40,000
20	208.3	81.8	1.04	0.22	2.5	17.5			
25	260.4	102.2	1.30	0.34	4.0	19.0			
30	312.5	122.7	1.56	0.50	5.7	20.7			
<b>分析キャピラリー</b>									
30	480	47.1	2.4	0.30	3.4	18.4	4.5	2.3	90,000

表 3.5

分取用および分析用キャピラリーの実験条件下におけるキャピラリー中心と壁内の温度差 ( $\Delta T_{\text{cap}}$ )、キャピラリー中心と周囲環境の温度差 ( $\Delta T_{\text{T}}$ )、キャピラリー中心の上昇温度 ( $T_0$ ) の計算値 (図 3.36、A と B) (温度計算の説明については、1.3.4.2 項“ジュール熱”を参照)

分取用のキャピラリーに 350 mbar x s で注入すると、注入量の計算値が 81.3 nL (15  $^{\circ}\text{C}$ )、プラグ長が 10.4 mm (有効長の最大 12%)、推定段数 ( $N_{\text{est}}$ ) が最大 40,000 となるので、注入オーバーロードが生じることは明らかです。これに対して、分析キャピラリーでは、200 mbar x s で注入量が 4.5 nL、プラグ長が 2.3 mm (有効長の最大 0.4%)、推定段数が最大 90,000 となります。

バンドの広がり の唯一の原因が拡散であるとする場合、図 3.36B のピーク 4 で示されるトリプシン消化物ペプチド (MW = 1012 Da、オフライン MALDI-TOF により測定、推定拡散係数:  $D^{20\text{ }^{\circ}\text{C}} \approx 3.10 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) においては、分析用キャピラリーの段数は  $N = L_{\text{eff}}^2 / 2Dt \approx 250,000$  となります。この化合物の左右対称ピークにおける実験上の推定段数は 90,000 であることから、他の拡散要因 (1.3.4 項参照) が関係していることは明らかです。もっとも可能性の高い要因は、ジュール熱 ( $\Delta T_{\text{cap}} = 0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、表 3.5)、壁面への吸着、注入口から捕集用アウトレットリザーバへのサイフォン現象です。

段数を犠牲にして回収率を向上させることができるのは、分取用キャピラリーの例で示されているように、分離能が問題にならない場合のみです。図 (3.36, A) と表 3.5 は、この分取例においては、分析用キャピラリーの使用時に比べて、注入オーバーロードが段数に深刻な悪影響を与えていることを示しています (最大 50,000 段数または 56 %)。これはピークのオーバーラップや極端なピークの歪みにはつながりませんが、(15 °C の分析温度における) ジュール熱による半径方向の温度勾配 [ $\Delta T_{\text{cap}}(\text{max}) = 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ] は避けることができません。

半径方向の温度勾配、サイフォン現象、注入プラグ長のオーバーロードによる分離効率の低下のほか、高濃度 (BGE の濃度と比較した場合) の分析対象イオンを注入した場合にも、分離効率の低下が生じます。ゾーンでの分析対象イオンの濃度が高いと、局所的な電場が乱れ、電気的拡散が生じます (1.3.4.5 項参照)。この場合、ゾーンにおける分析対象物のみかけの移動度 ( $\mu_a$ ) は濃度の関数として表され、三角形の濃度分布が得られます。これは次式で表されます。<sup>59</sup>

$$3.12 \quad \mu_a(c) = \mu_0 \cdot \left( 1 + \beta_E \cdot \frac{c}{c_b} \right)$$

$c$  = ゾーンにおける局所的な分析対象物の濃度

$c_b$  = BGE の塩濃度

$\mu_0$  = 無限拡散における分析対象物の移動度

$\beta_E$  = エレクトロマイグレーション定数

分析対象物の量が増加すると、ゾーン内での分析対象物濃度の幅が広くなり、見た目の移動度の差が大きくなることで、結果的にゾーンが広がります。(無次元) エレクトロマイグレーション定数 ( $\beta_E$ ) は、オーバーロードに関する分析対象物/BGE の感受率を示しています。<sup>60</sup> 適切な BGE 組成を選択することにより、電気的拡散を最小限に抑えることができます。しかし実際には、完全に避けることはできません。最適な条件下では、 $\beta_E$  値は 0.1 ~ 1 が現実的です。

(3.12) 式を派生させると、オーバーロード条件下で得られる段数は、注入する分析対象物の濃度に反比例することがわかります。1回の分析で精製できる分析対象物の最大量 ( $Q_i^{\max}$ , 単位モル) と分離に必要な段数 ( $N_{\text{req}}$ ) との関連を示す近似式は、次のようになります。<sup>59</sup>

3.13

$$Q_i^{\max} \approx \frac{8}{N_{\text{req}}} \cdot \frac{1000 c_b}{\beta_E} \cdot \frac{1}{4} \pi d_c^2 \cdot L$$

BGE 塩濃度 ( $c_b$ ) は mol/L (M)、 $d_c$  と  
L はキャピラリー内径とトータル長

(3.13) 式に従えば、CE システムの試料キャパシティを最大化するためには、次のことが必要であるといえます。

- 精製する試料成分の電気泳動特性に応じて BGE 組成を調整し、オーバーロードへの感受率を低くする ( $\beta_E$  の値を低くする)。
- バッファの溶解度や試料成分により決定される限界の範囲内で、高い濃度の BGE を用いる (試料分解の原因となる温度上昇を引き起こさない範囲内)。
- 比較的低い電圧を用いる。ただし、必要な段数を得られる十分な高さは維持する。
- 許容できる分析時間の範囲内で、長いキャピラリーを使用する。
- 許容できる温度上昇の範囲内で、大きな内径をもつキャピラリーを使用する。

分取 CE の欠点は、キャピラリーの一部を効率的に冷却できない点です (隔離導体からキャピラリーカセット、ボトルなど)。そのため、印加できる電力は、そうした部分の最大許容温度に制限されます。

表 3.6 では、通常分析 CE アプリケーションの動作条件と性能を、上述の方法で最適化した (連結) 分取アプリケーションのものと比較しています。分析システムと比べると、分取システムの分析 1 回あたりの最大キャパシティ ( $Q_i^{\max}$ ) は 100 倍、生成速度 (mol/s) は 10 倍になっています。

パラメータ	分析	分取
V (kV)	25	10
$L^{\text{tot}}$ (m)	0.5	1
$d_c$ ( $\mu\text{m}$ )	50	100
$C_b$ (mM)	10	125
$t_{\text{run}}$ (min)	6	60
$N^*_{\text{max}}$	500,000	200,000
P (W/m)	0.5	1
$\Delta T_T$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	5	10
$Q_i^{\text{max}, **}$ (pmol)	2	200

表 3.6

分析およびマイクロ分取 CE システムの動作条件と性能の比較

\*オーバーロードなしで得られる段数

\*\* $N_{\text{req}} = 100,000$  の最大注入量

注:  $\Delta T_T$  は単位長さあたりの電力 (P) に比例します [ $P = Q \cdot d_c^2/4$ , 単位 W/m, 1.3.4.2 項の (1.17) 式]。先ほどの実験例 (図 3.36, A および B) をもとにこのパラメータ (P) を計算すると、分取キャピラリーでは 30 kV ( $P = 1.2$ ) ; 25 kV ( $P = 0.9$ ) ; 20 kV ( $P = 0.5$ )、分析キャピラリーでは 30 kV ( $P = 0.7$ ) となります。

これらの計算値から、分取および分析実験で 30 kV を適用すると、各種条件により示された温度限界を超えなくても電力限界を超えることがわかります (表 3.5 および 3.6)。

### 3.6. 質量分析検出 および ICP-MS と組み合わせた キャピラリー 電気泳動

質量分析 (MS) は、キャピラリー電気泳動の検出テクニックとしてきわめて広く利用されるようになってきました。どちらのテクニックも、複雑な混合物に含まれる物質の分離や同定、定量という点で、高い潜在能力をもっています。この2つを組み合わせれば、片方のテクニックの制約を、他方の特性により補うことができます。たとえば、同じ分子量をもつ同重体の溶質は、MS では区別できません。しかし、CE などの分離テクニックを使うことにより容易に分離し、その後 MS で同定することができます。反対に、CE 分離で共溶出する溶質でも、分子量の違う溶質や異なるフラグメンテーションを示す溶質は、MS で簡単に区別することができます。

ただし、液体クロマトグラフィーの場合と同じく、MS 検出と CE の組み合わせには、液相中での分離技術と真空系での検出技術を組み合わせるといった難問が伴います。CE の場合、分離に要する溶媒量が少ないため、この問題はある程度まで緩和されます。したがって、CE の溶解液をエレクトロスプレーイオン化 (ESI) により MS で検出する方法が、理想的な組み合わせといえます。特に、CE で一般的な超低流速で ESI を使用すると、イオン化収率と感度が劇的に向上します。また、ESI は、CE で分離対象となる極性物質やイオン性化合物のイオン化に適しているという点があります。

ただし、CE と MS の組み合わせについては、新たな難問も浮上しています。CE と ESI は両方とも、電場を利用するテクニックです。これを組み合わせる場合、CE 分離装置の電極を ESI の電極としても利用し、ESI 電場をつくります。しかし、CE と ESI の電流は数桁単位で異なることがあるため、ここで大きなミスマッチが生じます。また、電極が反対の極性になることもあるので、電氣的構成を慎重に設定することが求められます (3.6.2 項参照)。

この問題を解決するための複数の手法が、文献で発表され、実用化されています。<sup>61</sup> 次項では、組み合わせのもっとも重要な側面を説明します。この技術の現状については、多くのレビューが発表され、最新情報が提供されています。<sup>62-65</sup>

### 3.6.1. CE-MS インターフェースの基礎

溶質を液相から質量分析計に移すためには、気体状のイオンに変換する必要があります。その後、そうしたイオンは、電子や光子との衝突や、イオン源または MS 内での電荷移動プロセスにより(コリジョンガスなどのプロセス)、ラジカルイオンに変化します。

エレクトロスプレーイオン化は、分離場からの液体流を MS と直接オンライン接続し、大気圧および周囲温度においてイオン化させる手法として、もっとも広く使われている手法です。一般的な ESI の概略を図 3.38 に示しています。<sup>66,67</sup>

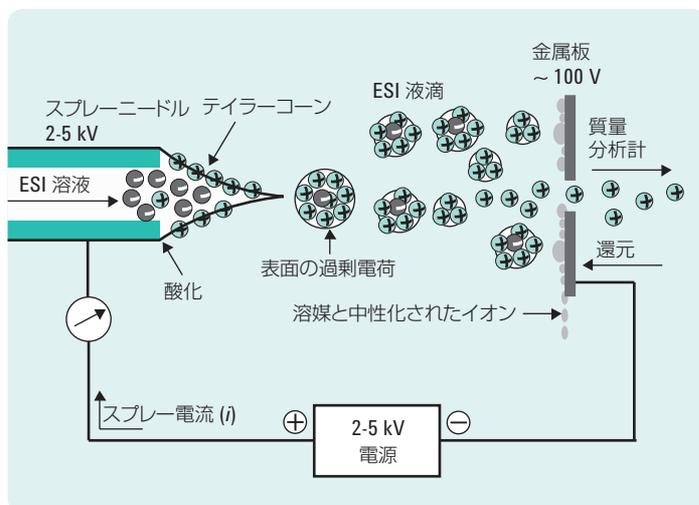


図 3.38  
エレクトロスプレーイオン化プロセスの解説図

CE-MS では nL/min レベルの流量でキャピラリーの末端を出た溶媒は、電場できわめて小さな液滴(スプレー)を形成します。この液滴はすぐに中性の溶媒分子を失います。その結果、液滴サイズが小さくなり、表面電荷が急激に上昇します。その後、液滴は破裂(クーロン分裂)してさらに小さな液滴になり、同じプロセスが繰り返されます。最終的に、気体状の溶質イオンだけが残り、MS の入口へ運ばれます。気体状の溶質イオンは、複数の電荷をもつことがあります。

ナノフロー HPLC では、MS の入口部を高温にする手法や、乾燥ガス流をニードル先端に送る手法、逆相 HPLC で用いられるアセトニトリルなどの有機溶媒を使用する手法などにより、このプロセスを効率化させます。エレクトロスプレー電場および電流の方向は、ナノ ESI では重要ではありません。それに対して、MS と組み合わせた CE では、適用する電場の方向と電流の方向は、電氣的接続インターフェースに大きな影響を及ぼします。この点を次項で説明します。

### 3.6.2. 電氣的接続 インターフェース

CE では、分離キャピラリーのインレットに高電圧を印加します。そのため、戻り電流を確保するために、分離キャピラリー末端の電極の接地を安定させる必要があります。通常、アウトレット側の電極を接地電極とします (3.1 項参照)。

エレクトロスプレーを形成させるためには、分離キャピラリーのアウトレット側と MS のインレット (MS キャピラリー) 側の間にも高電場が必要です。もっとも簡単な配置は、CE のアウトレットキャピラリー (またはネブライザー先端) を接地し、エレクトロスプレー電圧を MS に印加するというものです。この電位が負の場合は、正イオンが MS に入ります。これを Positive ion モードと呼びます。電位が正の場合は、負イオンが MS に入ります。これを Negative ion モードと呼びます。アジレントや Bruker などの MS ベンダーは、MS 側にエレクトロスプレー電圧を印加するデザインの機器を提供しています。

反対に、キャピラリー末端 (またはネブライザー先端) に CE-MS の高電圧をかける場合は、回路について考慮すべき重要事項が生じます。この場合、バックグラウンド電解液 (BGE) が運ぶ電流は、CE 機器の高電圧電源からキャピラリー末端 (またはネブライザー先端) に移動します。同時に、エレクトロスプレー内の気体状イオンが、エレクトロスプレー電位から生じた電流を運びます。この 2 つの電流は、3 桁程度異なることがあります ( $\mu\text{A}$  に対して  $\text{nA}$ )。そのため、エレクトロスプレー用の MS 電源が、CE の BGE から入ってくる高電流により損傷を受ける恐れがあります。こうした場合、レジスターシークにより電流の接地回路をつくる改造が必要になります。ただし、CE 分離における電圧が、エレクトロスプレー電位の正負に応じて、エレクトロスプレー電圧分増減する恐れもあります。そのため、分析中にイオン化の極性を切り替えたり、電位を変化させたりすると、CE 分離に影響が出てしまいます。

概略を図 3.39 に示しています。

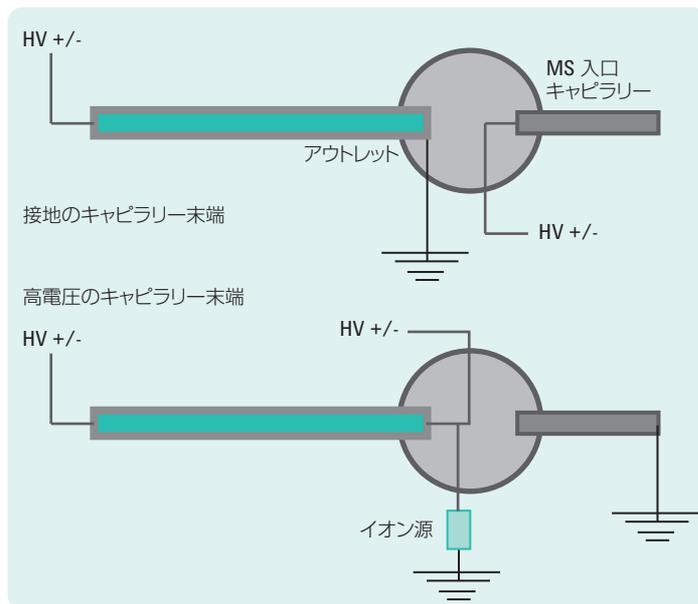


図 3.39  
CE-MS の電氣的インターフェース

### 3.6.3. 圧力 インターフェース

3.6.2 項で述べたように、CE の戻り電流を確保するために、CE キャピラリー末端と機器の接地側の間で接地を安定させる必要があります。標準的な CE システムでは、分離キャピラリー末端のバイアルに電極を入れる方法が用いられます。CE-MS の場合は、このバイアルを使用せず、バックグラウンド電解液と機器の接地を別の方法で確保する必要があります。

閉回路とは別に、エレクトロスプレーを形成するためには、圧力による流速が必要となります。圧力による流量は、CE 分離の電気浸透流の大きさと、分離場の寸法に関連しています。LC エレクトロスプレーニードルでは、スプレーキャピラリーの寸法が用いられます。実際には、EOF から生じる流量は 1~100 nL/min 程度です。ただし、LC エレクトロスプレーニードルでは、数

$\mu\text{L}/\text{min}$ が必要となります。一方、2章で述べたように、ある種の分析条件では、EOFが生じないことがあります。その場合は、補助的な流れによりスプレーを形成する必要があります。

CEとMSのインターフェースにおける圧力および電氣的接続上の要件を満たす手法については、以下の一般的なアプローチが開発され、一部が実用化されています。

- A. シースフローインターフェース
- B. シースレスインターフェース

### 3.6.3.1. CE-MSの シースフロー インターフェース

Smithらは、前述の電氣的接続および圧力上の要件を満たすCE-MSインターフェースの概念を確立しました。<sup>68</sup> このアプローチは、三軸キャピラリーネブライザーと呼ばれるもので、アジレントにより商品化されています。概略を図3.40に示しています。

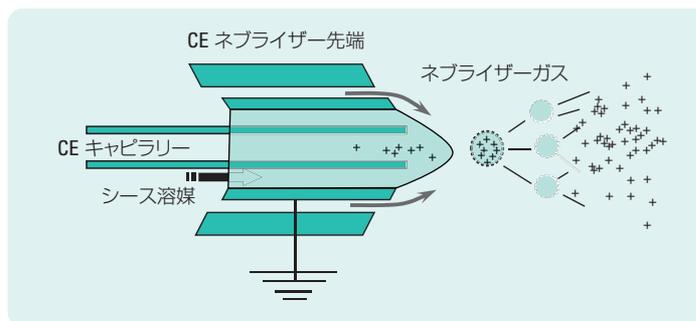


図 3.40  
三軸シースフロー CE-MS ネブライザー

CE分離キャピラリーは、この構造の一番内側のチューブに相当し、スプレー先端を形成します。シース溶媒はCEキャピラリーの外側を流れ、CE分離のBGEと液体接触します。シース溶媒を運ぶキャピラリーは接地されています。3本目のチューブは、安定したスプレーを支援する窒素などのネブライザーガスを供給します。

このデザインであれば、EOF に関係なく、つねに安定したエレクトロスプレーを維持できます。また、電気的接続も安定に確保されます。さらに、シースフローの pH を変更することで、バックグラウンド電解液の pH にかかわらず、イオン化の際の陽イオンまたは陰イオンの形成を促進できるという利点もあります。通常、シース流の組成は、メタノール、アセトニトリル、イソプロパノールと、酢酸やギ酸、アンモニア（陰イオンの場合）などを添加した混合液となります。流量は 1~10  $\mu\text{L}/\text{min}$  です。

欠点としては、溶質がネブライザー先端で希釈されるという懸念があります。特に、EOF が小さい場合、こうした問題は顕著になります。ESI インターフェースは濃度検出器のように機能し、（シースの）流れが増加するとレスポンスが低下するため、この点は大きな欠点になります。また、シースフローを持続させるために、システムにポンプを追加する必要があります。

そのため、実際の状況では、シースフローの流量と組成、ネブライザーガス、ESI 電圧、温度などの多くのパラメータを設定し、値を最適化する必要があります。こうしたすべてのパラメータについて、最適な設定を見つけるためには、複数パラメータの最適化実験を実施する必要があります。

実際の状況においては、溶質分子が液体から直接気体状イオンになる ESI は、高分子化合物のイオン化に特に有効であることが証明されています。そのほかの利点としては、溶質分子が複数の電荷をもつことが可能で、質量電荷比が低下するため、質量分析計の測定可能な質量範囲内で分析できるという点があります。こうした ESI の利点は、CE を分離モードに用いる場合にも大きな効果を発揮します。

シースフローインターフェースは、現在商用化されているもののなかで、もっとも堅牢な CE-MS インターフェースであることが証明されています。次項では、シースレスフロー CE-MS 手法について説明します。ただし、著者の知る限りでは、この手法の装置は商用化されていないため、自作する必要があります。

### 3.6.3.2. CE-MS の シーレス インターフェース

シーフローを使わずに CE と MS を連結する利点は、インターフェースで希釈が生じず、感度が高くなることにあります。しかし実際には、この利点を実現するのは困難です。

シーフローを用いない CE と MS のインターフェースについては、最近の総説のなかで、Chen が各種のアプローチを包括的に説明しています。<sup>69</sup> いずれのケースでも、程度の差こそあれ、独創的なアプローチが解説されています。各種のアプローチを図 3.41 に示しています。これまでのところ、こうしたアプローチのなかで商用化されたものはありません。まだ確立されていないこの種のインターフェースを準備するためには、高度な実用技術が求められます。

これらのインターフェースでは、1 つの根本的な問題が解決されていません。前述したように、CE フローには戻り電流の回路が必要です。BGE と電極のインターフェースには、この流れを運ぶ電気化学的プロセスが存在します。陽極では酸素が発生し、陰極では水素が発生します。CE キャピラリーのアウトレットが陰極と陽極いずれとして機能する場合でも、気泡が形成され、抵抗などに大きな影響を与えます。そうした気泡が流し出されるデザインのとおり三軸インターフェースとは異なり、シーレスインターフェースでは、この気泡が大きな問題となります。

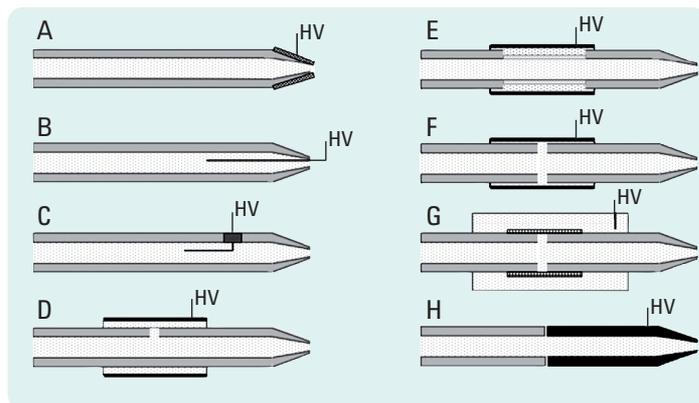


図 3.41

シーレスインターフェースで電気的接続を構築するための各種手法。A) エミッター先端に導電層を適用、B) 先端にワイヤを挿入、C) ホールにワイヤを挿入、D) 金属シースによるスプリットフロー、E) 金属スリーブ内部に多孔性のエッチングキャピラリー壁、F) 金属スリーブにより接合、G) 微小透析接合、H) 導電性エミッターチップによる接合<sup>69</sup>

最近では、この電気化学的プロセスに関連する問題を解決した CE と MS のシーレスインターフェースを Moini が発表しました。<sup>70</sup> このインターフェースの設計を図 3.42 に示しています。

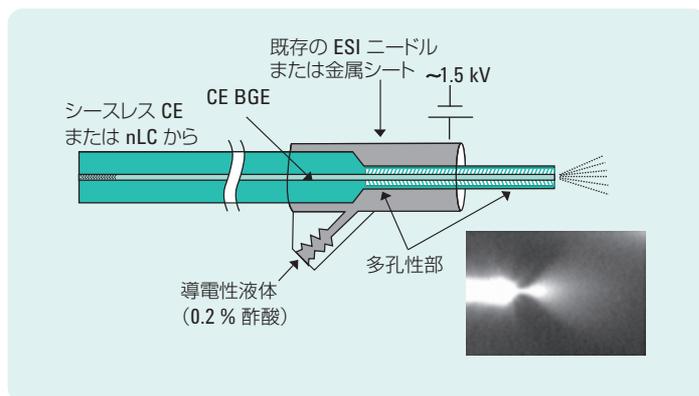


図 3.42 シースレス流 CE-MS インターフェース(Moini より)<sup>70</sup>

ポリイミドコーティングがフューズドシリカ CE キャピラリーから除去され、フッ化水素により、外径約 80~90  $\mu\text{m}$  にガラスがエッチングされています。このエッチングにより、キャピラリーの末端が多孔性になり、キャピラリー外の液体との圧力および電気的接続が構築されます。このキャピラリー外の液体は、エッチングされたフューズドシリカキャピラリーを囲む同心円の電極チューブに入っています。このチューブが接地されるか、ESI 電圧がかけられます。電極チューブと CE キャピラリーの間の液体は停滞しています。電極のプロセスは CE キャピラリーの外で起きるため、CE の電場と流れは乱されません。

本稿執筆時点で、このインターフェースは Beckman-Coulter からテスト提供されています。

### 3.6.4. その他のイオン化手法

エレクトロスプレーイオン化は、極性や電荷の高い分子に適した汎用的なイオン化モードであることが証明されています。極性の低い分子は、エレクトロスプレープロセスではそれほどイオン化されません。CEではおもに帯電した分子が扱われるため、CEのイオン化モードとしては、エレクトロスプレーが広く使われています。ただし、イオン化率が低くなり、感度が低くなるケースも多くあります。

さらに、エレクトロスプレーイオン化で使用するべき揮発性バッファは、多くの場合、CE分離性能を損ないます。また、エレクトロスプレーイオン化では、質量分析計はおもに濃度を感知する検出器として機能するため、溶質信号強度は全体の流速に依存し、シーズ溶媒の流速に大きな影響を受けることとなります。

HPLC/MSでは、ESIのほか、大気圧化学イオン化(APCI)や大気圧光イオン化(APPI)が広く用いられています。両テクニックの概略を図3.43に示しています。

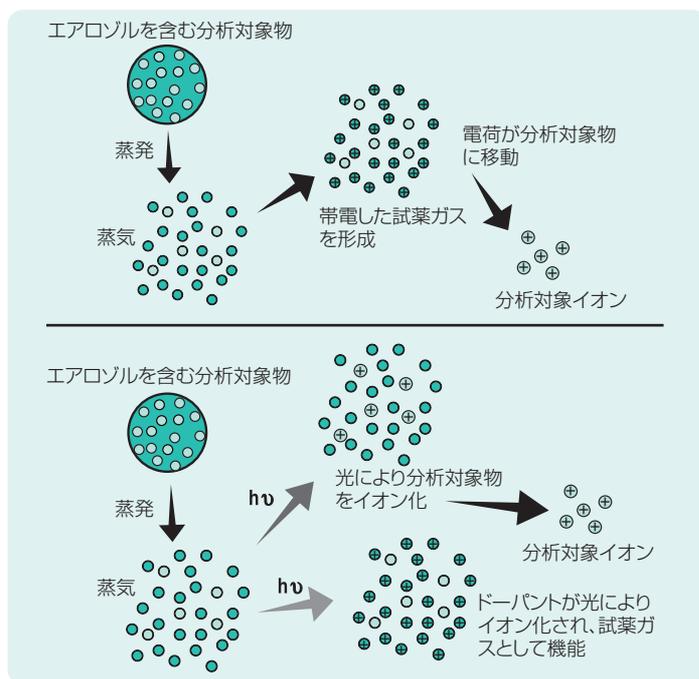


図 3.43  
APCI プロセス(上)と APPI プロセス(下)の概略図

重要なのは、これらのイオン化プロセスでは、溶質分子をガス状態へ変換する必要があるという点です。そのため、インターフェースには、溶離液スプレーから溶質分子を蒸発させる加熱ゾーンが必要です。その後のゾーンで、コロナ放電か高エネルギー光により電子が溶質分子に受け渡され、溶質イオンがMSに入ります。この仕組みを図3.44に示しています。

CEと組み合わせる場合は、HPLCの二軸ネブライザー（図3.44のネブライザー）を、ESIで用いられる同様の三軸ネブライザーに置き換えます（若干の高さ調節が必要となります）。ペーパライザーは通常、200～300℃で加熱されます。したがって、実際の状況では、CE-MSのAPPIとAPCIインターフェースはいずれも、十分な揮発性を持つ低分子量物質（<1000 Dalton）に制限されます。ペプチドやタンパク質といった高分子量の物質は、この手法ではイオン化できません。

マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）は、液相分離で広く使われているインターフェース手法です。実際の状況では、溶質が溶液中で分離され、MALDIターゲット上に配置されます。ただし実質的には、これはオンラインインターフェースモードではありません。たとえば、HPLC分離では、分離により得られた溶離液をターゲットに「スポットティング」します。CEでも同様のプロセスが適用されます。CE-MALDI-MSの前処理手順としては、3.5で説明したフラクションコレクション手法が最適です。

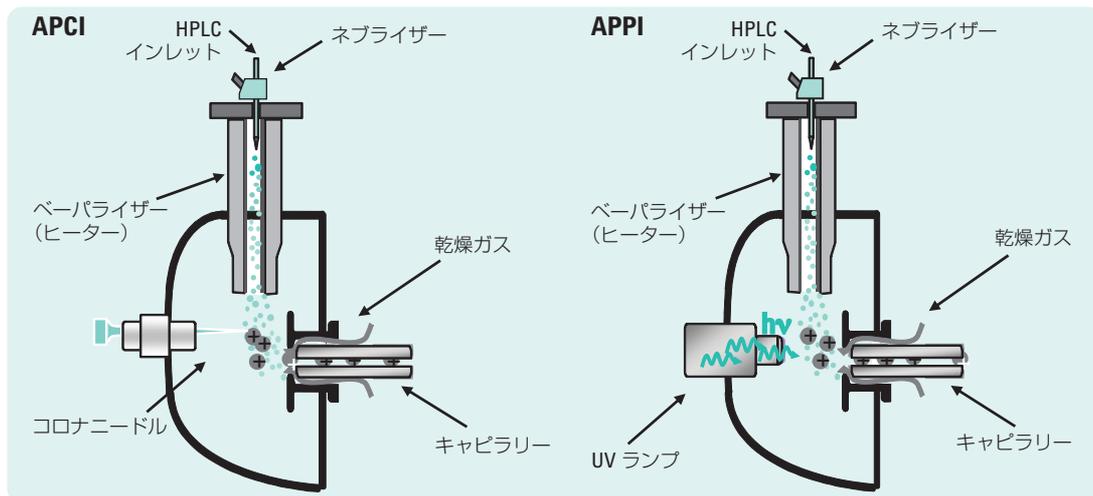


図 3.44 HPLCにおける一般的な APCI および APPI インターフェースの図

## 実際の操作とメソッド開発

---

### 実際の操作とメソッド開発

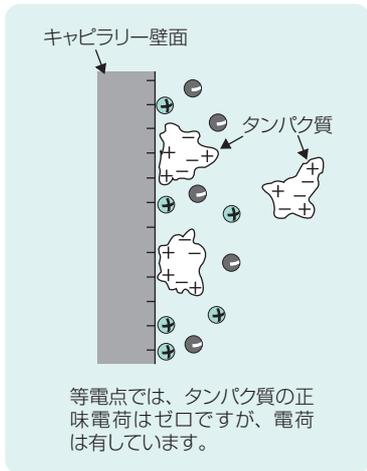
#### 4.1. 分離キャピラリー

電気泳動用のキャピラリー材質に適した特性としては、化学的および電氣的に不活性であること、UV可視波長域で光を透過すること、柔軟性と堅牢性に優れていること、安価であることなどがあります。この要件にもっとも合う材質が、キャピラリー材質として現在もっとも広く利用されているフューズドシリカチューブです。フューズドシリカ (FS) チューブは、光学検出用のフローセルやガスクロマトグラフィー (GC) カラムに利用されています。GCカラムとよく似たFSキャピラリーは、堅牢性を高め取り扱い易くするために、ポリイミドの保護層でコーティングされています。光学検出の場合、ポリイミド保護層の一部を除去すれば、検出窓を容易につくることができます。保護層を除去する際には、電気アークや電熱線、あるいは濃硫酸液滴を用いて、数 mm 程度のポリイミドを焼き剥がします。ポリイミドコーティングを除去する専用ツールも市販されています。ポリイミドを除去した部分は堅牢性が低くなるため、検出窓のあるキャピラリーを扱う際には注意が必要です。

内径 10~200  $\mu\text{m}$  で、幅広い外径のフューズドシリカキャピラリーが市販されています。一般には、内径 25~100  $\mu\text{m}$ 、外径 350~400  $\mu\text{m}$  のキャピラリーが使用されます。分析時間を短くするためには、できるかぎり短いキャピラリーを使用する必要があります。有効長は、短いもので CGE 用の 10 cm から、複雑な試料の CZE 分離用の 80~100 cm 程度が用いられます。もっとも一般的な有効長は、25~75 cm です。分取に必要な時間や分析のサイクル時間を確保するためには、印加する電場で分離キャパシティを効率的に活用できるよう、全長に対する有効長の割合をできるだけ大きくするとよいです。フラクションコレクションに必要な時間や分析サイクルタイムを適切に決定するためには、全長は機器の構成（すなわち、検出部からアウトレットリザーバまたはアウトレットバイアルまでの距離）にもよりますが、一般に 5~15 cm 有効長より長くなります。

##### 4.1.1. 未修飾フューズドシリカ

実際の CE では、素管（未修飾）フューズドシリカキャピラリーが第 1 の選択肢となります。しかし、未修飾フューズドシリカキャピラリーの内表面は化学的に不活性ではなく、この問題は CE が導入された初期にすぐに明らかになりました。たとえば、CE によるタンパク質分離を行うと、溶質と表面の相互作用と EOF 制御の問題が観察されました。この問題を解決する方法は、1.3.2、1.3.4.4、2.1 項ですでに説明しました。より明確にするために、この一般的な問題をもう 1 度、図 4.1 で説明しています。この図では、「中性」（または電荷的にバランスのとれた）タンパク質がフューズドシリカキャ



**図 4.1**  
pH がタンパク質の pI と等しい場合のタンパク質とキャピラリー壁面との相互作用

ピラリーの壁面と相互作用することが示されています。

溶質と表面との相互作用を抑える簡単で一般的な手法としては、以下のものがあります。

- 極端な pH（低または高 pH）で測定を行う
- イオン強度の高いバッファを使用する

多くの場合、このような手法だけでは十分ではありません。また、非生物学的な pH 域におけるタンパク質の変性や、イオン強度の高い BGE による過度のジュール熱の発生など、その他の制約も生じます。より小さい内径のキャピラリーを使用すればジュール熱を抑えることができますが、キャピラリーの容積に対する表面積の比率が大きくなるため、内径の大きなキャピラリーに比べて、一般にタンパク質と表面との相互作用は悪化します。

溶質と表面との相互作用を抑えるための他の方法としては、キャピラリー壁面の修飾があります。基本的な手法として以下の 2 つが挙げられます。

- 共有結合相または物理吸着相による壁面の恒久的な修飾
- 泳動バッファ添加剤を用いた動的な不活性化

それぞれの手法を、4.1.2 および 4.1.3 項で説明します。

再現性の高い分離メソッドを実現するためには、壁面の修飾のほかに、新たなキャピラリーや使用したキャピラリーを適切な溶媒で前処理することや、プロトコルに厳密に従って保管することも重要となります(4.2 項参照)。

未修飾キャピラリーおよびコーティングキャピラリーを使用する際に見てごされがちな他の要素としては、以下の 2 つが挙げられます。

- キャピラリー末端の影響
- キャピラリーのバッチ間変動

ピークテーリングや試料のキャリーオーバーを防ぐためには、キャピラリー末端が平坦で損傷がない状態でなければなりません。損傷したキャピラリーに注入した場合に生じるピークテーリングの例を図 4.2 に示しています。左の図でピークが左右対称から大きく外れている理由は、キャピラリー末端が平坦でない場合に生じる電場の強い歪みにあります。これにより、キャピラリーインレットの局所的な EOF や電気泳動速度が変化してしまいます。

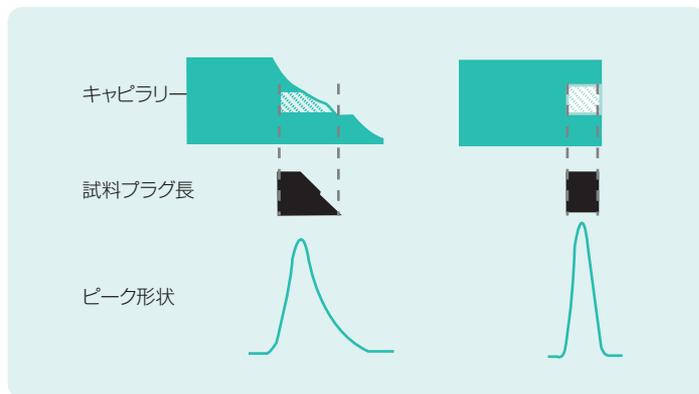


図 4.2  
キャピラリー注入末端の変形がピーク形状に与える影響

セラミックカッターを用いてキャピラリー表面に切り込みを入れ、折り取るのはよくありません。ほとんどの場合、切断面が図 4.2 の左図のようになり、端の部分が残ってしまいます。

CE の非水モード (NACE) などでは、アセトニトリルなどの有機溶媒が使われることがあります。こうした有機溶媒はポリイミドコーティングを膨潤させることがあります。その場合、コーティングがキャピラリーから浮き上がり、インレット側を塞いでしまいます。そのため、有機溶媒、特に CE 分離でアセトニトリルを用いる場合、インレット (およびアウトレット) のポリイミドを 1~2 cm 除去したほうが良いでしょう。

フューズドシリカチューブは、不活性ガスの存在下の 2000 °C 前後の温度でシリカ母材から延伸されます。この時、キャピラリー表面に存在するシラノール基は完全に縮合し、シロキサン結合を形成します。延伸加工では、キャピラリーの外側にポリイミド被覆が施され、これによりフューズドシリカは柔軟性を保ちながら、高い堅牢性と耐圧性を獲得します。そのため、新品のキャピラリーの内表面は、きわめて疎水性が高くなっています。しかし時間とともに、内表面は湿気により、またその後は CE の BGE により、徐々に加水分解されます。

そのため、キャピラリーのバッチ間変動は、表面の残存シラノール基の量

に強く依存しています。また、シリカ中の（金属）不純物の量にも、ある程度の影響を受けます。そのため、キャピラリー表面の加水分解を確実に再現性の高い状態にするためには、前処理とプレコンディショニング方法が重要となります。分析毎に行う洗浄方法や BGE による簡単な再コンディショニングも、日常的に行われる手法の一部です。

#### 4.1.2. 壁面コーティング キャピラリー

キャピラリーガスクロマトグラフィーと同様に、恒久的なコーティングを表面に施すことで、キャピラリー内壁を不活性化できます。GC キャピラリーカラムでは、まず表面を完全に加水分解させたのちに、表面不活性化コーティングと液相コーティングを施します。GC では、コーティングによる GC カラムの不活性化と、特定の保持特性の付与は、関連した働きを考えると考えることができます。

CE では、シラノール基の解離（前項参照）、不活性化、表面特性の改質といった現象は、それぞれ別の働きをしないと考える必要があります。たとえば、陰イオン性物質の CE 分離では、極性を逆転させた電場を用いて（検出器側を陰極）、シラノール基が完全に解離した負電荷表面のキャピラリーにおいて高 pH バッファ条件下で分離するのは一般的な手法です。このような条件では、陰イオンは負電荷表面と相互作用しません。EOF が大きいため、本来 EOF と反対の方向へ泳動する陰イオンは EOF に運ばれて検出部に到達します。

CE では、次の目的で表面修飾を行います。

- a. 溶質と表面との相互作用を抑制する。相互作用があると、遅い吸着/脱着によりゾーンの拡散やピークのテーリングの原因となります。
- b. 電気浸透流の大きさと方向をコントロールする。

表面修飾には、次の手法が用いられます。

- 化学結合または物理的吸着による恒久的コーティング
- BGE またはプレコンディショニング電解液に表面修飾剤を加え、平衡を利用する動的コーティング

次項で詳細を説明します。

#### 4.1.2.1. 恒久的コーティングキャピラリー

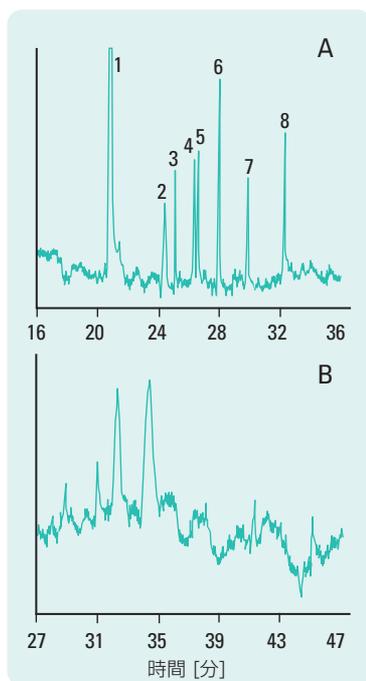


図 4.3

アリルペンタフルオロ(PFP)でコーティングしたキャピラリーによるタンパク質分離の向上。コーティングキャピラリー(上)、コーティング無のフューズドシリカ(下)<sup>72</sup>

ピーク: 1, ニワトリ卵白リゾチーム; 2, DMSO (EOF マーカー); 3, ウシリボヌクレアーゼ A; 4, ウシ臍臓トリプシノーゲン; 5, クジラミオグロビン; 6, ウマミオグロビン; 7, ヒト炭酸脱水酵素; 8, ウシ炭酸脱水酵素

条件: バッファ: 200 mM リン酸 pH 7.0 + 100 mM KCl; 有効長: 100 cm; id: 20  $\mu$ m; 電場: 250 V/cm; 検出: 219 nm

恒久的な表面修飾については、多くの手法が文献で報告されています。代表的なものとしては、その後の反応に用いられる官能基(ビニル基やエポキシ基など)を含む簡単なシリル化剤との反応があります。この反応に続いて、適切なモノマーとの重合反応または適切な分子との結合により修飾を行います。(メタ)アクリルアミドとビスアクリルアミドを混合したものをいれれば、タンパク質分離に最適なきわめて安定した低い EOF を示す不活性化キャピラリーを得ることができます。

シリル化剤と表面シラノールとの直接結合も導入されています。不活性化には、アリルペンタフルオロ基(PFP)や多糖類などのさまざまな物質が用いられます。図 4.3 のエレクトロフェログラムは、コーティングキャピラリーによるタンパク質分離の改善を示しています。残念ながら、シロキサン結合(Si-O-Si)は pH  $\approx$  4~7 でのみ安定であり、通常は加水分解が長期的堅牢性の妨げとなります。

物理的吸着手法では、ポリマー(PEG など)を内表面に沈積させたのちに、架橋結合試薬を用いて反応させます。または、ポリビニルアルコールを内壁に沈積させたのちに、150  $^{\circ}$ C でポリマーを加熱します。どちらの方法でも、ポリマーは一般的な BGE に対して不溶性となり、EOF を効果的に抑制できます。

改質の方法により、EOF を低減したり、コントロールしたり、反転させることができます。たとえば、ポリアクリルアミドやポリエチレングリコールを用いた中性物質による改質では、EOF が低減されます。これは、実際の壁面電荷が低下し、壁面の粘度が増加するためです。陽イオン性物質による改質では、EOF が反転します。タンパク質やアミノ酸などの両性物質を用いた改質では、コーティングの pl やバッファの pH に応じて EOF が反転します。

こうした修飾は恒久的なもので、メンテナンスはほとんど必要ありません。しかし、キャピラリーは使用後に必ず洗浄するので(コーティングされていても吸着が生じることがあります)、洗浄溶液や加圧による送液に耐えられるコーティングでなければなりません。

恒久的コーティングキャピラリーは、CE 機器や消耗品のサプライヤーが提供しています。恒久的コーティングの作製にはコストがかかるため、恒久的コーティングキャピラリーは標準的なフューズドシリカキャピラリーよりも大幅に高価になります。

#### 4.1.2.2. 動的コーティング キャピラリー

現在では、結合相や吸着相に代わるキャピラリー内壁表面特性の不活性化/修飾手法として、泳動バッファへの修飾剤添加が広く用いられるようになってきました。修飾剤がバッファに含まれているので、コーティングが継続的に再生され、恒久的なコーティングを必要としません。

動的コーティングには、次のような利点があります。<sup>73</sup>

- 作製が容易
- 標準的で安価なフューズドシリカキャピラリーを使用できる
- ほとんどのケースで費用が安くすむ
- 幅広いバッファ濃度に対応可能

ただし、修飾剤については、検出を干渉せず、光学および質量分析検出に対応できるものを使う必要があります。

添加剤は壁面との相互作用を生じ、表面の電荷や疎水性特性を変化させます。こうした修飾剤は、バッファへ添加するだけなので、導入や最適化が容易です。

CEのバッファ添加剤としてもっとも広く使われているのが、臨界ミセル濃度 (CMC) より低い濃度の界面活性剤です。CZEでは、さまざまな種類の界面活性剤を使用できます (陰イオン性、陽イオン性、両性、非イオン性など)。イオン性界面活性剤分子は、疎水性溶質の可溶化剤、イオンペア試薬、内壁表面の修飾剤として機能します。界面活性剤と溶質との相互作用は、以下の2つのメカニズムにより生じます。

- 1) 界面活性剤の親水基末端とのイオン性相互作用
- 2) アルキル鎖と溶質の疎水性部との疎水性相互作用

溶質との相互作用のほか、界面活性剤の多くは、キャピラリー壁面に吸着し、表面の電荷状態を変化させます。これにより、EOFを変化させると同時に、溶質の壁面への吸着を抑えることができます。界面活性剤の電荷により、EOFを増減したり、反転させたりすることが可能です。たとえば、臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) などの陽イオン性界面活性剤をバッファに添加すれば、EOFを反転させることができます。図4.4に示すように、CTAB分子はイオン性相互作用により壁面に吸着します。遊離しているCTAB分子と壁面に吸着しているCTAB分子の疎水性相互作用により、正の表面電荷が生じます。

界面活性剤の濃度が CMC を超えると、分離メカニズムが大きく変化します。これは別のモードの CE、すなわちミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) になります。MEKC については、2.2 項で説明しました。いくつかの動的改質手法を表 4.1 にまとめています。

種類	効果	コメント
低または高 BGE pH	壁面と溶質の電荷差をなくし、クーロン力の相互作用を抑える	pH 2~12 低 pH では EOF はほぼ抑制 高 pH では EOF は超高速 但しタンパク質変性の可能性 電荷差を小さくすることで、ピークキャパシティが減少することがある
高 BGE イオン強度/濃度	クーロン力の相互作用を抑える	EOF が減少 ジュール熱による制約を受けることが多い
中性親水性ポリマー(アルキルセルロース、PEO、ポリビニルアルコール、デキストラン、ポリアクリルアミド)	壁面の電荷を抑制し、EOF を小さくする	粘度が上昇 高濃度で使用する場合は、サイズによる分離が可能 (CGE)
陽イオン性ポリマー*(PEI、ポリブレン、PDADMAC、PolyE-323、Poly-LA 313、キトサン) 連続的多重イオン性高分子層 (SMIL)*コーティング (PB-DS、PB-DS-PB、PB-PVS、PDADMAC-PSS、Ceofix)	イオン性相互作用によりキャピラリー表面を不活性化する	半恒久的コーティング EOF が反転
1 本鎖型界面活性剤 陰イオン性 (SDS) 陽イオン性 (CTAB) 非イオン性 (BRIJ & TWEEN シリーズ) 両性イオン (CHAPS) 2 本鎖型界面活性剤* 陽イオン性 (DDAB、2C <sub>14</sub> DAB、DLPC) 両性イオン (DLPC2C <sub>12</sub> 、DMPC2C <sub>14</sub> )	疎水性相互作用またはイオン性相互作用によりキャピラリー表面を不活性化する	幅広い界面活性剤 使いやすい CMC を超えると MEKC EOF の減少または反転が可能 タンパク質が不可逆的に変性する可能性 逆相と組み合わせ使用が可能 - LC 表面 - 2 本鎖型界面活性剤: 半恒久的
(アミン)/第 4 級アミン (スベルミン、TEA、DETA、ジアミノプロパン)	EOF を減少または反転させる	イオン対試薬としても機能

\* これらの界面活性剤は半恒久的なものです。そのため、分離の際の BGE に常に界面活性剤が含まれている必要はありません。PEI = ポリ (エチレンジアミン); PB = ポリブレン; PEO = ポリ (エチレンオキシド); PDADMAC = ポリ (ジアリルジメチルアンモニウムクロリド); DS = 硫酸デキストラン; PVS = ポリ (ビニルスルホン酸); PSS = ポリ (スチレンスルホン酸); SDS = ドデシル硫酸ナトリウム; CTAB = 臭化セチルトリメチルアンモニウム; CHAPS = 3-[(3-コラミドプロピル) -ジメチルアンモニウム]-1-プロパンスルホン酸; DDAB = ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド; DLPC = 1,2-ジラウロイル-sn ホスファチジルコリン; DMPC = 1,2-ジミリストール-sn-グリセロ-3-ホスホコリン; スベルミン = ジアミノプロピルテトラメチレン-ジアミン; TEA = トリエタノールアミン; DETA = ジエチレントリアミン (すべてのポリマーおよび界面活性剤の適切な名称については、参考文献 74 を参照)

**表 4.1**  
動的不活性化およびコーティングメソッド<sup>74</sup>

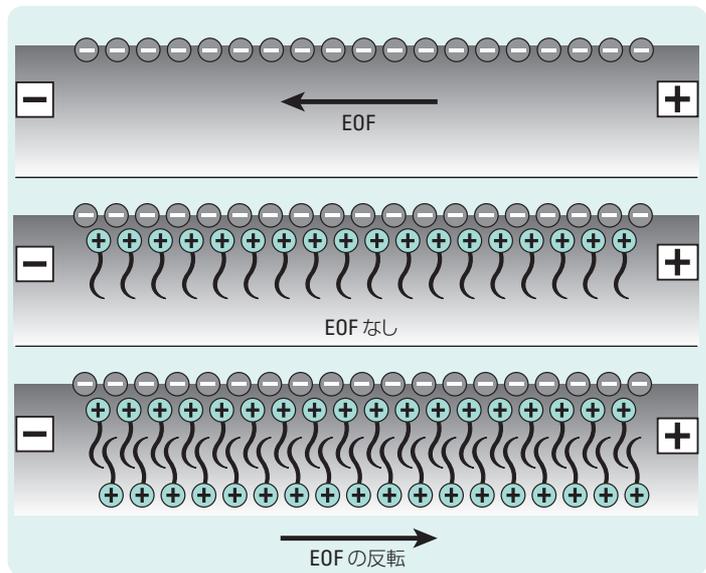


図 4.4  
陽イオン性界面活性剤による電気浸透流の抑制と反転

動的コーティングの欠点は、キャピラリー表面だけでなく溶質も影響を受けることです。また、極端な pH の使用や界面活性剤の添加により、生体試料測定時に悪影響となる場合があります。その他の制約として、再現性の高い表面状態や安定な EOF を得るために平衡時間を必要とする点があります。さらに、質量分析や酵素アッセイといったポストカラム分析は、添加剤の影響を受けます。特に、高濃度の添加剤の影響は大きくなります。

一方で、スperlミンや CTAB を用いた動的コーティングに代わり、コーティング剤を BGE に添加しない半恒久的コーティングや静的非共有結合コーティングなどが使われるようになりました。こうした傾向は、2 本鎖型界面活性剤、重合性リン脂質界面活性剤、物理的吸着ポリマーコーティングの使用で示されています (表 4.1 参照)。

塩基性タンパク質 ( $pI > 7$ ) 分離における 1 本鎖型および 2 本鎖型界面活性剤の使用例を図 4.5 に示しています。

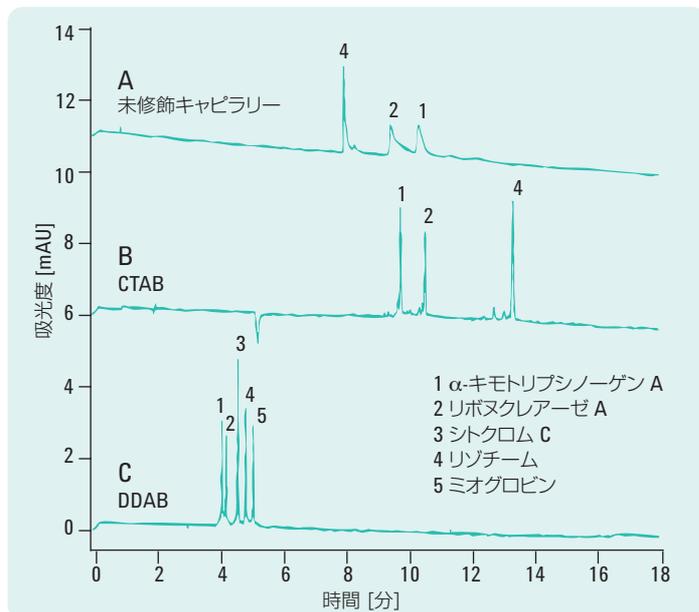


図 4.5

pH 3.0 における 5 種類の塩基性タンパク質の分離。(A) 未修飾フューズドシリカキャピラリー; (B) CTAB-コーティングキャピラリー; (C) DDAB-コーティングキャピラリー<sup>75</sup>

条件: 50 cm x 50 μm id キャピラリー (検出器まで 40 cm); UV 検出 214 nm; 印加電圧(A)+15 kV (B, C)-15 kV; BGE、25 mM リン酸(pH 3.0)

(A)界面活性剤を含まず;(B)0.5 mM CTAB(C)0.1 mM DDAB

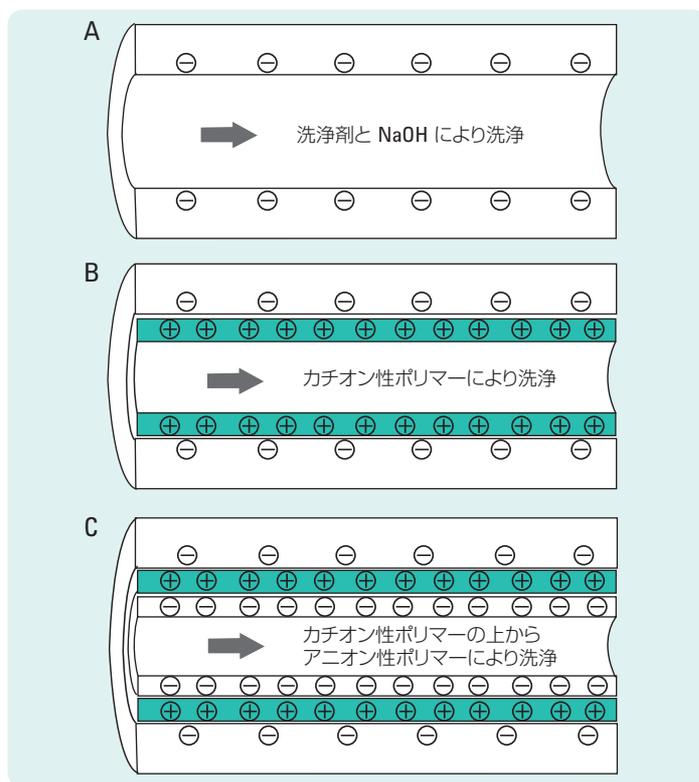
(B)では、40 分の分析において、ミオグロビンのピークが観察されませんでした。

この図は、CTAB または DDAB を BGE に添加すると、EOF が反転することを明らかに示しています。一般に、CTAB などの 1 本鎖型界面活性剤は BGE に添加する必要があるため、通常は動的コーティングのみに用いられます。DDAB などの 2 本鎖型界面活性剤は半恒久的コーティングなので、BGE に添加しなくても効果が出ます。

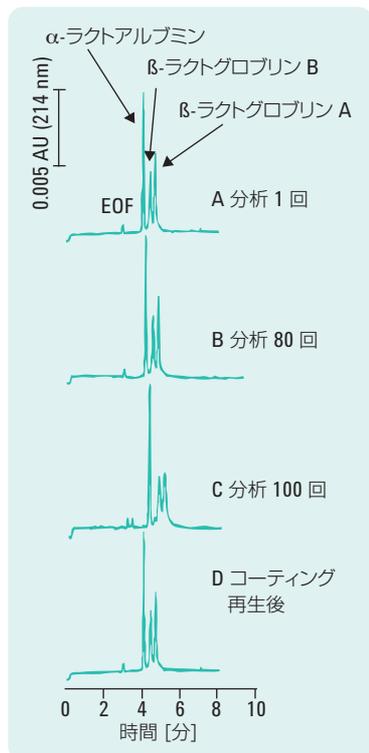
CTAB コーティングキャピラリーを使用した場合には、5 種類のうち 3 種類のタンパク質が 15 分以内で分離されました。分離効率は 500 000 段数/m でした。それ以外の 2 種類のタンパク質は、キャピラリーから溶出しませんでした。また、検出された 3 種類のタンパク質の回収率は最高 80 % にとどまり

ました。それに対して、DDAB コーティングキャピラリーでは、5 種類すべてのタンパク質が 6 分未満で分離されました。分離効率は 500 000 段数/m で、回収率は 85~100 % でした。このことは、2 本鎖型界面活性剤の DDAB は、1 本鎖型界面活性剤の CTAB に比べて表面被覆率が高く、より効果的にタンパク質の吸着を抑制できることを示しています。

図 4.6 では、カチオン性ポリマーコーティングと Successive multiple ionic-polymer layer (SMIL) コーティング<sup>76</sup> の手順概略を示しています。



**図 4.6**  
 カチオン性ポリマーコーティング(手順 A-B)と SMIL コーティング(手順 A-C)のコーティング手順。A) シラノール基の活性化; B) カチオン性ポリマー層の吸着; C) 第 2 層のイオンポリマー層となるアニオン性ポリマーの吸着



**図 4.7**  
SMIL-DS コーティングキャピラリーを用いた酸性タンパク質の分離<sup>76</sup>

**条件:** 27 cm x 75  $\mu$ m id キャピラリー (検出器まで 20 cm) ; バッファ: リン酸 pH 7.0 (I = 0.05) ; +7 kV; 温度: 25  $^{\circ}$ C; 試料: 0.1 mg/mL タンパク質; 注入: 140 mbar x s; 再生溶液: 0.1 M HCl

SMIL の最初の試みは、SMIL-DS [=PB-DS、ポリブレンの第 1 層のあとに硫酸デキストランの第 2 層] でした。SMIL-DS により生じる EOF、DS に含まれるスルホン酸基の強酸特性の影響により、pH 2~11 の範囲で一定になりました。モデルとして用いた 3 種類の酸性タンパク質において、SMIL-DS コーティングキャピラリーは中程度の分離効率 (300~500 x 10<sup>3</sup> 段数/m) を示しました。EOF のキャピラリー間 RSD は 0.6 % (n=3) で、酸性タンパク質の移動時間の再現性は 0.5~0.8 % (n=3) でした。SMIL-DS キャピラリーは 100 回の連続分析で安定性を示しました。SMIL コーティングの多重層により、1 重ポリマー層コーティングキャピラリーよりもコーティングの安定性が上昇したと著者らは述べています。SMIL-DS コーティングは、1 M NaOH、メタノール、アセトニトリル、5 M 尿素に対して安定性を示し (EOF の安定性から判断)、0.1 M HCl により劣化が確認されました。そこで、0.1 M HCl で洗浄したのちに SMIL-DS コーティング手順を繰り返すことにより、SMIL-DS コーティングキャピラリーを再生させました。図 4.7 に示すように、この操作により分離効率が元のレベルに戻りました。

PDADMAC-PSS<sup>77</sup> コーティングでは、さらに結果が向上しました。陰イオン性の移動度マーカを用いた EOF の複数回の分析の再現性は 0.5 % 未満、他の試料を挟んだ 2 週間にわたる反復分析の再現性は 1.5 % 未満でした。モデルとして用いたタンパク質 (図 4.5 で使用したもの、ただし 20 mM リン酸バッファを使用) について、pH 4.0 において高い効率 (437~803 x 10<sup>3</sup> 段数/m) が得られました。この効率は、PDADMAC のみでコーティングしたキャピラリーに比べて、90 % も上昇しています。

CE におけるダイナミックコーティングの使用は、近年 Lucy 等により検証されています。<sup>74</sup>

## 4.2. 電解液の交換と キャピラリーの コンディショニング

### 4.2.1. バッファの交換

バッファの交換は、移動度の再現性を保つためには欠かせません。溶液が電気分解されると、泳動バッファの pH が変わり、その結果、EOF が変化します。水性溶液では、陰極では水の電気分解によりヒドロニウムイオン ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) から水素 ( $\text{H}_2$ ) が ( $2\text{H}_3\text{O}^+ + 2e^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ )、陽極では水酸化物イオン ( $\text{OH}^-$ ) から酸素 ( $\text{O}_2$ ) が ( $4\text{OH}^- \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4e^-$ ) 生じます。こうした電気化学プロセスにより、バッファが劣化します。電気分解の程度は、発生する電流や総分析時間により異なります。pH 変化の程度は、バッファの緩衝能やバイアル容量のほか、キャピラリーコンディショニング洗浄液がアウトレットバイアルに流れこむ (推奨しません) が否かで決まります。こうしたことから、バッファを頻繁に交換することが推奨されます。バッファ交換の頻度を把握するためには、何回目の分析からバッファが劣化しはじめるのか (すなわち、移動時間の変化が観察されるタイミング) を調べる必要があります。頻繁なバッファ交換の効果の例を図 4.8 に示しています。

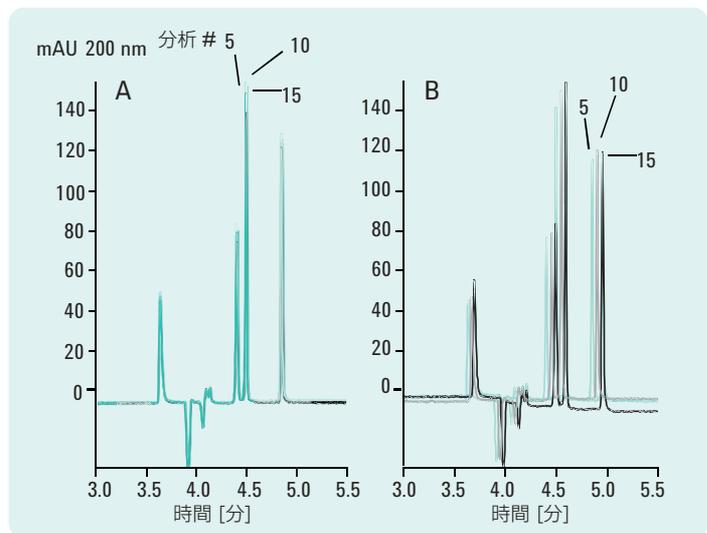


図 4.8

バッファの交換による移動時間再現性の向上例。分析 5 回目、10 回目、15 回目の結果の重ね表示。A) 5 回ごとに交換 B) 交換なし

条件: バッファ: 89 mM tris-ホウ酸 pH 8.2; 有効長: 56 cm; id, 50  $\mu\text{m}$ ; 印加電圧: 25 kV; 電流: 13  $\mu\text{A}$ ; 注入: 100 mbar x s; 検出: 200 nm

図 4.8 で示したピークの移動時間の RSD を表 4.2 にまとめています。この表は、バッファの交換と電圧コンディショニングにより、移動時間の高い再現性が得られることを明らかに示しています。

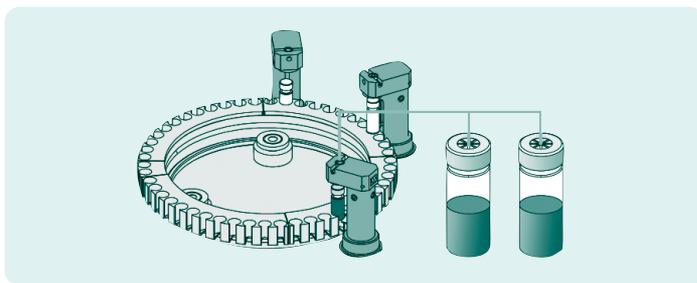
化合物	% RSD (移動時間, n=10)		
	交換なし	交換あり	交換 + 電圧
1. アセトアミノフェン	1.62	0.70	0.15
2. ニコチン酸	2.50	1.11	0.21
3. サリチル酸	3.00	1.21	0.25
4. ジヒドロキシ安息香酸	3.53	1.47	0.25

**表 4.2**

**バッファ交換および電圧コンディショニングを実施した場合としない場合の移動時間 %RSD の比較(図 4.8 より)**

自動バッファ交換（リプレニッシュメント）システムを操作する際には、リザーバの中身を廃液ボトルに移した後に、新しいバッファを補充します。大規模なバッファ交換システムでは、オートサンブラにバッファ用の2つのバイアルを配置するだけですむので、試料バイアルを試料トレイに数多く配置できます。また、大型のリザーバボトルから自動バッファ交換を行うと緩衝能に余裕があり、長期間にわたる自動分析を実施できます。

ランダムアクセスおよびバッファ液面高さの自動調整機能を備えた、バイアル充てんおよび再充てん用のシステム機構を図 4.9 に示します。



**図 4.9**

**バッファバイアルの充てんおよび再充てん用システム**

### 4.2.2. キャピラリーの コンディショニング

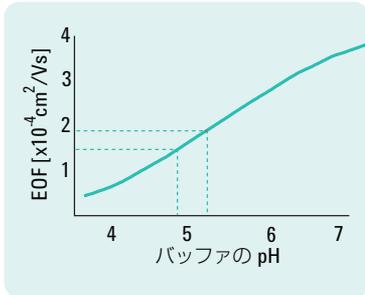


図 4.10  
EOF におけるバッファ pH の影響

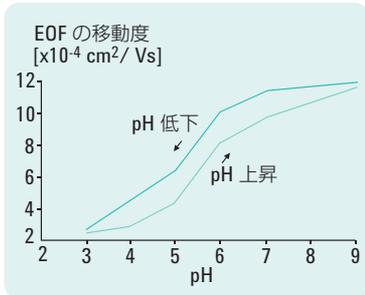


図 4.11  
未修飾フューズドシリカキャピラリーに  
おける EOF の pH ヒステリシス(履歴効果)

キャピラリーのコンディショニングは、堅牢な CE メソッド開発を行うための前提条件です。未修飾フューズドシリカの場合、バッファ pH が EOF コントロールの重要な要素となります。特に、pH 4~7 の範囲では、図 4.10 に示すように、わずかな pH の変化が EOF を大きく変化させます。図 4.10 では、pH  $5 \pm 0.18$  の変化により、EOF の移動度 (mEOF) が約 25% も変化しています。すでに述べたように、バッファの緩衝能が不十分だとバッファが劣化し、EOF 変化が生じやすくなります。そのため、電解液は適切な緩衝能を持つことが必要で、原則として分析対象物の  $pK_a \pm 1$  の範囲の pH でバッファを使用する必要があります。

EOF に影響を与えるその他の現象として、高 pH 条件から低 pH 条件 (またはその反対) へ、未修飾フューズドシリカキャピラリーをコンディショニングする場合があります。図 4.11 で示すように、pH 変化 (低 pH ~ 高 pH ~ 低 pH) があると、キャピラリー壁面でヒステリシス (履歴効果) が生じます。これを回避するためには、十分なコンディショニング洗浄を実施し、アプリケーションで使用する BGE の pH と壁面を平衡状態にする必要があります。こうしたことから、キャピラリーの使用履歴を記録することは良いことといえます。しかし、一般には 1 つのキャピラリーを 1 種類のメソッドまたは 1 種類の BGE の専用キャピラリーとして使用することが推奨されます。

キャピラリーの一般的なコンディショニング手法は、文献<sup>78-80</sup>で解説されています。以下で概要を説明します。

#### 新品キャピラリーのコンディショニング(コーティングまたは未修飾)

MeOH (5~10 分)、1 M NaOH、水 (各 5~10 分)、泳動バッファ (20 分) で洗浄、または 1 M NaOH (5 分)、5 分待機、水 (5 分)、泳動バッファ (20~30 分) で洗浄します。新品のコーティングキャピラリーの場合、一般に NaOH による洗浄は推奨されません。メーカーの説明書を確認してください。水による洗浄は、非水性 CE (NACE) アプリケーションには推奨されません。

#### 分析前の日々のコンディショニング

BGE の pH に応じて、0.1 M NaOH または 10% (v/v) リン酸 (各 10 分) で洗浄したのち、水 (10 分) で洗浄し、BGE (10 分) でコンディショニングします。一般には、電圧しながらコンディショニング (20 kV、BGE 洗浄間に 2 分) するとコンディショニング時間が短くできます。キャピラリーを毎日使用する場合は、洗浄 (酸または塩基、水) したのちに BGE 中で一晩保存すれば (キャピラリー末端を BGE に浸す)、翌日 BGE による短時間のコンディショニングだけで分析を再開できます。

**分析間のコンディショニング**

まず、バッファのみで洗浄してください。この方法なら、表面の平衡状態が乱されません（他の液体で洗浄すると平衡化が崩れます）。リン酸などの一部の BGE 成分はキャピラリー表面に吸着するため、必要な平衡時間に影響を及ぼします。中性または塩基性バッファを使用する場合、0.1 M NaOH（2分）で洗浄し、分析間にバッファで洗浄します（2分）。

**注:** 極端な高 pH の洗浄液は、どのコーティングにも適していません。

酸性バッファを使用する場合、10% (v/v) リン酸 ( $H_3PO_4$ , 2分) で洗浄し、分析間にバッファで洗浄します（2分）。

**注:** 極端な低 pH の洗浄液は、どのコーティングにも適していません。

複雑な試料マトリックス（生体試料など）の場合は、塩基や酸による洗浄よりも、SDS を含む BGE によるコンディショニングのほうが適していることがあります。泳動バッファに少量の SDS を加えると、精度も向上します。<sup>81</sup>

**注:** コーティングキャピラリーの場合、SDS が表面に不可逆的に吸着し、変化が生じることもある点にご注意ください。

**キャピラリーの長期保存**

未修飾フューズドシリカキャピラリーの場合、NaOH で適切に洗浄したのち、水で十分に洗浄してから、空のバイアルからの空気を流し乾燥させます。

**4.2.3. 一般的なバッファ系**

表 4.3 に、一般的に使用される CE バッファと、それぞれの最適な pH 範囲および UV 可視吸光検出における透過性をまとめています。

バッファ	使用可能な pH 範囲	UV 可視透過性の下限 (nm)
リン酸	1.1 – 3.1	195
ギ酸	2.7 – 4.8	200
酢酸	3.8 – 5.8	200
クエン酸	3.8 – 4.8	200
2-(N-)モルホリノ-エタンスルホン酸 <sup>1</sup>	5.1 – 7.1	230
クエン酸	5.4 – 7.4	200
ピペラジン-N,N-bis(2-エタンスルホン酸) <sup>2</sup>	5.8 – 7.8	215
リン酸	6.2 – 8.2	195
4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 <sup>3</sup>	6.5 – 8.5	230
N-トリスヒドロキシメチルグリシン (TRICINE)	7.1 – 9.1	230
トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)	7.3 – 9.3	220
ホウ酸	8.1 – 10.1	180
N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸 <sup>4</sup>	9.7 – 11.1	220

表 4.3

一般的な CE バッファ

略語: <sup>1</sup>MES、<sup>2</sup>PIPES、<sup>3</sup>HEPES、<sup>4</sup>CAPS

緑字: 両イオン性バッファ

### 4.3. トラブルシューティング

表 4.4  
CE でよく見られる症状のトラブルシューティング

表 4.4 に、CE 実験でよく見られる症状と、その考えられる原因、対策またはコメントをまとめています。

症状	考えられる原因	対策/コメント
<b>電流が不安定</b> 電流が生じない	キャピラリーが空/バッファバイアルに不適切な溶液が入っている	バッファバイアルを充てん/交換する
	キャピラリーの破損	空のバイアルをインレットに水の入ったバイアルをアウトレットに用意し、加圧を行う。アウトレットに気泡が生じるかどうかを確認する。気泡が生じない場合は、キャピラリーを交換する
	キャピラリーの詰まり	UV 吸収がある液体でキャピラリーを洗浄する。ベースラインの急上昇が観察される  詰まりが解消しない場合は、高圧で洗浄するか、装置から取り外してシリンジを用いて洗浄する
	安全連動装置が閉じていない	連動装置を閉じる
	複数の試料マトリックスによる大量注入(スタッキング)	通常の見現象 - 電流は分析中に安定する
	陰極/陽極バッファの違い	バッファの内容を確認する
	温度/電圧の変化	導電率のわかっているバッファを用いてオープン温度と電圧を確認する
電流の変動または消失	キャピラリー中の気泡	キャピラリーに液体を流す 印加電圧に勾配をつけて初期のジュール熱を抑制する バッファ中の気泡を除去する
	キャピラリーの破損またはひび割れ	バッファを流したあとに電流が繰り返し途切れる場合は、キャピラリーにひびが入っている可能性あり(「電流が生じない」の欄も参照)
	バッファに沈殿物/汚染物が混入	キャップを洗浄して乾燥させる、または新しいものと交換する
<b>不安定なベースライン</b> ベースラインのスパイク	バッファ中の微細気泡	0.2~0.45 mm フィルターでバッファをろ過する  バッファ中の気体を除去する
	試料の沈殿	試料成分がバッファに溶解するかどうかを確認する

**表 4.4**  
CE でよく見られる症状のトラブルシューティング

症状	考えられる原因	対策/コメント
<b>不安定なベースライン</b>		
ベースラインのノイズ	キャピラリーインターフェースの光学スリットの汚れ	メタノールまたは水で洗浄し、拡大鏡で確認する
	重水素ランプの劣化	DAD テスト機能を使い、ランプ出力と点灯時間を確認する – 交換する
	データ取り込み速度が大きい	ピーク幅を決定し、適宜速度を落とす
	検出波長でバッファが吸収される	吸収度が小さいバッファを使う、または C18 カラムでバッファを洗浄する
<b>フラットなベースライン(安定すぎる)</b>		
フラットなベースライン(安定すぎる)	キャピラリーの配置が不適切	検出器部分のキャピラリーカセットを取り付け直す
	電圧を印加できない	電圧設定と電流を確認する
	試料が注入されていない	キャピラリー末端がバッファに浸かっているか確認する
		バイアルの試料量とバイアルとキャップの漏れを確認する
		キャピラリーが試料中にのびているか確認する
		注入時間を確認する
		不適切な検出波長
ベースラインのドリフト	検出器ランプが点灯していない、または故障している	ランプを点灯させる、または交換する
	データシステムの問題	データシステムの機能を確認する
<b>ベースラインのドリフト</b>		
ベースラインのドリフト	キャピラリーの配置が不適切	検出部のキャピラリーやカセットを取り付け直す
	温度が安定していない	トップカバーを開けたのち、10~20 分かけて平衡状態にする
	検出器ランプが温まっていない	点灯後、15~30 分かけて平衡化する
<b>不規則なピーク形状</b>		
広いまたは平らなピーク	試料のオーバーロード	試料の注入量または濃度を下げる
	過度のジュール熱	電圧、バッファ濃度、キャピラリー内径を小さくする
ピークの歪み	試料とバッファのイオン移動度の不適合	移動度を適合させる、または試料とバッファの導電率の差を最大限にする
	試料のオーバーロード	試料の注入量または濃度を下げる

**表 4.4**  
CE でよく見られる症状のトラブルシューティング

症状	考えられる原因	対策/コメント
不規則なピーク形状 ピークテーリング	キャピラリー壁への吸着	極端な pH、高いバッファ濃度、バッファ添加剤（ジアミノプロパン、トリエタノールアミン、0.05% CTAB）、ポリマー添加剤（0.05% セルロース）、コーティングキャピラリーを使用する
	キャピラリー末端の破損またはバイアル表面への接触	キャピラリー末端が平滑に切断されているか確認する キャピラリーとバイアルとの距離を確認する
<b>低いシグナル</b>		
	注入量が不十分	マイクロバイアルの容量や気泡の有無を確認する バイアルキャップが適切に締まっているか確認する
	試料濃度が低すぎる	試料濃度を高くし、圧力流により確認する
	検出波長が最適でない	UV スペクトルを採取し、最大かつ適切なバンド幅を使う
	試料のスタッキングが不十分	試料とバッファの導電率の差を最大限にする
	キャピラリーの内径が小さすぎる	光路を延長したキャピラリーを使う
<b>移動時間の変動</b>		
	キャピラリー表面の変化 (pH の変化や吸着による)	キャピラリーのコンディショニングにより、表面を平衡状態にする、またはバッチ間のキャピラリーの差を避ける 極端な pH 変化を避ける (表面でヒステリシスが生じます)
	バッファ組成の変化 (電解、バッファの蒸発、アウトレットバイアルへのコンディショニング廃液の流入による)	バッファ濃度 (キャパシティ) を上げるか、定期的に交換するかして、バッファの劣化を最小限に抑える 蒸発を避けるには、バイアルキャップの締まりを確認する コンディショニング廃液の流路を確認する
	バッファバイアルの液面高さの不一致によるサイフォン現象	バッファ交換に液面高さの自動レベル合わせ機能を使用する [短く、内径の広いキャピラリー (75~100 μm) では特に重要]
	試料のオーバーロード	試料の注入量または濃度を下げる 低分子イオンの間接 UV 検出で特に顕著
	温度の変化	キャピラリーの温度を制御する

**表 4.4**  
CE でよく見られる症状のトラブルシューティング

症状	考えられる原因	対策/コメント
ピーク面積の再現性が低い	試料バイアル中の試料が不足、または注入時間が短すぎる	バイアルの試料量を確認する 注入時間を長くする
	試料の排出	試料後にバッファプラグを注入する、または電圧勾配を利用する
	試料のキャリーオーバー	キャピラリー末端が平滑に切断されているか確認する キャピラリー末端からポリイミドコーティングを除去する 両キャピラリー末端のバッファ浸漬をバイアル間で変更する
	電氣的移動法による注入後の試料の劣化	1 試料あたり注入 1 回にする
	試料の蒸発(特に少量 < 20 $\mu$ l の場合)	試料バイアルのキャップをしっかりと締める 試料トレイの温度を制御する(冷却)
	キャピラリー表面への試料の吸着(ピークテーリング、溶出しにくい成分)	極端な pH、高いバッファ濃度、バッファ添加剤(ジアミノプロパン、トリエタノールアミン、0.05% CTAB)、ポリマー添加剤(0.05% セルロース)、コーティングキャピラリーを使用する
	試料へのキャピラリーの浸漬によるゼロ注入	排除は不可能。注入量を増やす
	移動時間の変化	適切なピーク面積(A/t)を用いる
	低いシグナル/ノイズ比による不適切なピーク積分	積分パラメータをよく監視する
	温度の変化	キャピラリーの温度を制御する
	<b>ピークの問題</b>	
ピークがない	分離時間が短すぎる	分析時間を長くする
	他の原因:「電流が生じない」および「フラットなベースライン」を参照	キャピラリーを長くする
ピーク/スパイクが多すぎる	前回分析の残留物	キャピラリーを洗浄する
	試料の分解	試料を新しくする; 試料バイアルの温度を確認する
	気泡	バッファを泳動温度まで温める 電圧を下げる
	試料/バッファ中の固形物	試料/バッファをろ過する(0.20~0.45 $\mu$ m フィルター)

**表 4.4**  
CE でよく見られる症状のトラブル  
シューティング

症状	考えられる原因	対策/コメント
<b>ピークの問題</b>		
ピークが少なすぎる	不適切な波長 分離時間が短すぎる	波長の設定と精度を確認する 分析時間を長くする キャピラリーを長くする
	電氣的移動法による注入後の試料の劣化 分析対象物と壁面の相互作用	1 試料あたり注入 1 回; サンプルを新しくする バッファで洗浄する、または再コンディショニングする 分析条件を確認する
	壁面への吸着またはバッファの潤滑による EOF の障害	バッファで洗浄する、または再コンディショニングする バッファを交換する

## 4.4. メソッド開発

CE メソッドの開発をはじめの前に、堅牢なアプリケーションメソッドで分析したいと考えている化合物に関する情報をできるだけ集めることがきわめて重要です。

1. もっとも効率的で確実な方法は、化合物やメソッドに関連するアプリケーションキットの形で提供されている CE 機器メーカーの詳細なアプリケーションや技術ノートを調べることです。こうしたキットを利用すれば、堅牢で信頼性が高く、他のラボにも移管させやすいメソッドを適用することができます。この方法が使えない場合は、次のステップに進みます。
2. 化合物に特化したアプリケーションメソッドに関する科学文献を探します。多くの無料インターネットサービスでは、特定アプリケーションに関する科学文献を検索することができます。  
**http://scholar.google.com** は、関連情報を検索する場合に、特に広く利用できるインターネットブラウザプログラムです。例え関連する文献が見つかって、記述されているアプリケーションが信頼できる堅牢なものかどうか（すなわち、主要な実験パラメータの多くが変更されても耐えられるメソッドかどうか）を調べる必要があります。文献検索でも情報が得られない場合は、次のステップに進みます。

3. 分析者が所属する会社や研究機関内の専門知識を利用します。堅牢で移管可能な CE メソッドの開発は、分析メソッドの良し悪しが製品開発の効率に大きな影響を及ぼす製薬業界ではきわめて重要です。そのため、メソッドの開発方法に関する信頼性の高い情報は、製薬会社に所属する経験豊富な科学者から生まれます<sup>80, 82</sup>。これでもうまくいかない場合は、次のステップに進みます。

4. メソッドを一から開発します。

メソッドの目的として、品質管理（QC）ラボに移管するため、製品開発（生物医薬品）で使用するため、または、汚染や混入、プロセスに関する深刻な問題を解決するため等、さまざまな種類があります。メソッドを開発する際には、その目的を明確にしておく必要があります。

メソッドの目的が明確になったら、目的化合物について、分離能、移動時間の再現性、定量といったメソッドのパフォーマンス要件を決める必要があります。一般に、シンプルな BGE と十分な緩衝能を用いた CE メソッドは、きわめて堅牢なものになります。堅牢なメソッドは、比較的 CE 使用経験の浅い QC ラボにもうまく移管できることが明らかになっています。<sup>80</sup> CE メソッドのパフォーマンスを高めるためには、機器設定、注入手順、試料や標準試薬を含めた BGE の組成と前処理などの主要な実験パラメータを慎重に検討する必要があります。

2 章では、CE の基本的な 6 つのモードを説明しました。CE モードの選択は、分析する化合物の種類に強く依存しています。表 4.5 では、各モードに推奨されるアプリケーションをまとめています。

モード	分析対象物	主なアプリケーション
キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)	低分子イオン性有機化合物、無機イオン	定量; 不純物測定、薬剤安定性試験、QC、プロセス管理、腐食試験など
ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)	低分子イオン性および中性有機化合物	定量; 不純物測定、薬剤安定性試験、QC など
キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC)	低分子イオン性および中性有機化合物	あまり普及していない。固相抽出による事前濃縮
キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)	タンパク質、ペプチド、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA	バイオ薬剤研究; サイズ測定、純度確認 (PCR 産物)、特性解析 (電荷の不均一性、翻訳語修飾、糖鎖分析)、QC およびプロセス (発酵) 管理

モード	分析対象物	主なアプリケーション
キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF)	タンパク質、ペプチド	生物薬剤 pI 測定、同定
キャピラリー等速電気泳動 (CITF)	低分子イオン	事前濃縮テクニック

表 4.5  
CE モード、分析対象物、アプリケーション

### 4.4.1. はじめに

分析対象の化合物は、1 mg/mL までの濃度、かつあらゆる pH で、水や一般的な BGE に溶解しますか？水溶性に問題がある場合、少量（25 % v/v まで）のメタノールやアセトニトリルに溶解しますか？100 mM SDS を使えば、低分子中性化合物は溶解しますか？タンパク質試料では、7 M の尿素やエチレンジグリコールなどの可溶化剤が役に立ちますか？分析対象物は熱に対して不安定ですか？または特定の pH で不安定になりますか？溶質はイオン化しますか（pKa）？発色団を持っていますか？どのようなマトリックスに含まれていますか？どれくらいの数の成分が、どの程度の濃度で存在していますか？

こうした情報を集約しまとめれば、メソッド開発で役に立ちます。上記の質問の一部に対応したダイアグラムの例を図 4.12 に示します。

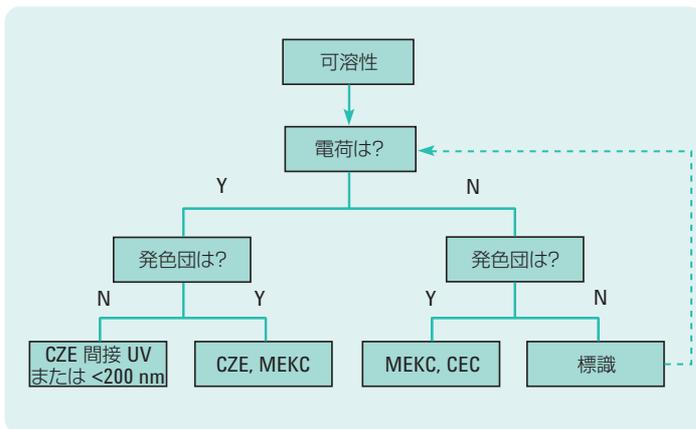


図 4.12  
CE メソッドを開発するためのフローチャート

化合物特性は試料化合物の重要な特性で、分析に影響を与えます。溶解性が低いと、定量やキャリブレーションが不正確になり、試料の沈殿によるキャピラリーの詰まりや電流の不安定化につながることがあります。化合物の安定性が低いと、未知ピークが多くなり、同定が難しくなります。化合物特性情報を得られない場合は、実際の実験（各種溶液中での溶解性の視認、DADの点灯による試料劣化の確認、200 nmにおける長期間のシグナル安定性、スペクトル変化の確認など）が必要となることがあります。

試料マトリックスにも注意が必要です。塩濃度の高いマトリックスに低濃度の分析対象物が含まれている場合は、電気的拡散によるゾーンの広がり（1.3.4.5項参照）や検出能の低下が生じます。こうした現象は、電気的移動法による注入を行っている場合、さらに悪化します（試料の導電率が高いため、導入される分析対象物の量がきわめて少なくなってしまいます）。そのため、過度の塩は除去する必要があります。試料中の塩を除去する手法には、以下のものがあります。

- 電気的移動法において注入を妨げるイオンを除去する透析\*（フロート透析では、塩が膜孔を通して水を入れた皿に拡散し、分析対象物 [DNA など] はそのまま残ります）
- C18カートリッジによる脱塩\*（たとえば、タンパク質のトリプシン消化物の正確なペプチドマッピングを可能にします）
- 脱イオン水を用いた試料の希釈（10～50倍）により、試料のスタッキングを可能にする手法（3.2.3項参照）
- 試料注入前に水プラグを注入し、イオンの注入ゾーンを減少させる手法
- 試料注入前（高導電率：リーディング液の形成により分析対象物をITP濃縮）および後（低導電率：ターミナル液の形成により分析対象物をITP濃縮）のバッファプラグ注入
- リーディング液とターミナル液で試料プラグを挟む手法（分析対象物のITP濃縮）  
（\*これらの手法は、実際にマトリックスから塩成分を除去するものです）

塩濃度の高いマトリックスの処理方法を選ぶためのフローチャートを図4.13に示します。

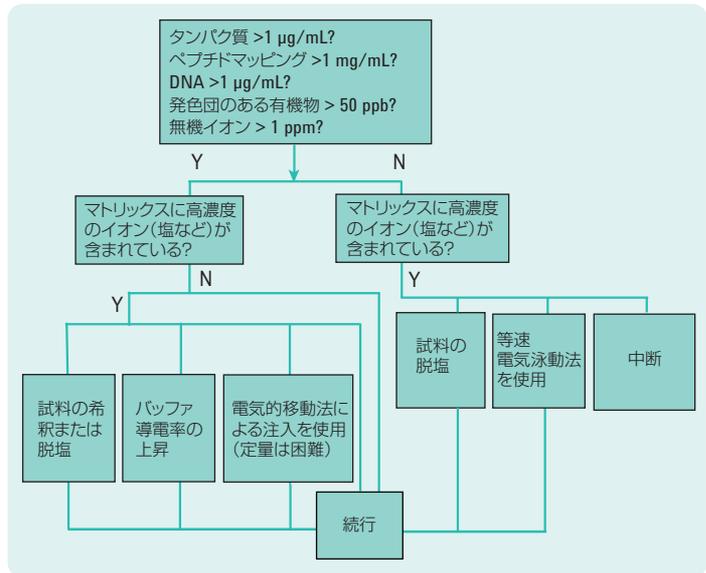
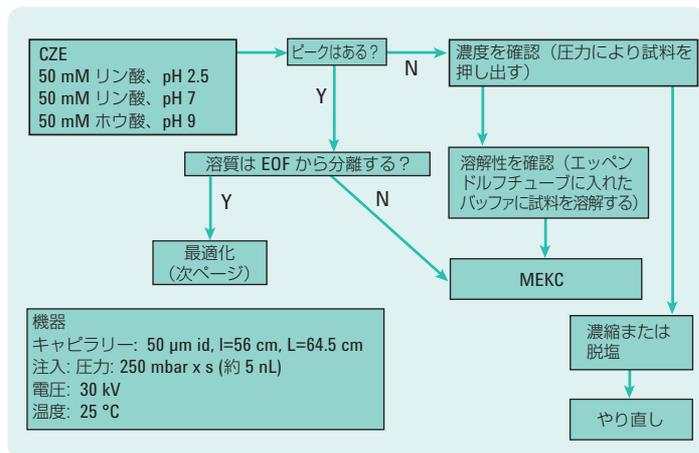


図 4.13 塩濃度の高いマトリックスの処理方法を示すフローチャート

#### 4.4.2. キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)

この CE メソッドは、幅広いイオン分子に使用されています (表 4.5 参照)。堅牢な CZE メソッドの開発は (他のすべての CE モードも同様です)、単純で堅牢な BGE の最適化が基礎となります。まず、pH 2~9 の範囲に対応する一連の単純な (または一般的な) バッファから検討を始めるのがよいでしょう。バッファ劣化の影響を抑えるには、pKa に近いバッファの pH を選択するのが良い方法です。図 4.14 のフローチャートが示すように、良い結果を得るためには、まず十分なキャピラリーのコンディショニング (4.2 項) と安定した EOF の構築 (1.3.2 項) が重要です。



**図 4.14**  
**適切な CZE メソッド開発における初期ステップのフローチャート**

CZE では、分析対象物はおもに移動度の差により分離します。移動度の差は、質量電荷比に影響を与えるあらゆる要因により生じます (1.3.3 項および 1.3.5 項参照)。化合物の有効移動度 ( $\mu_{\text{eff}}$ ) を変化させるためには、イオン化の程度 ( $\alpha_i$ ; 1.3.1 項) を変え、正味電荷 ( $q$ ) を変化させる必要があります。正味電荷は、以下により操作できます。

- バッファの pH
- バッファのイオン強度 ( $I$ )
- 錯体形成
- 界面活性剤 (イオンペア)
- 特定の色素標識 (FITC、APTS; 3.4.2 項)

化合物の質量は操作できませんが、化合物の流体力学的 (またはイオンの) 容積は、以下の影響を受けます。

- バッファイオン ( $I$ ) または異なるバッファ共イオンとの溶媒和
- 変性 (温度や SDS などの界面活性剤によるタンパク質の変性など)
- 電荷操作に関して説明した他の要素

完全にイオン化した物質の場合 [陰イオン ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ) および陽イオン ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) など]、これらのイオンの正味電荷は等しくなりますが、結晶半径が大きくなると、電荷順は以下ようになります:

F > Cl > Br, li > Na > K。これらのイオンが溶液中にある場合、溶媒和（イオン）容積も同じ順序になります。これにより、CZEにおいて、溶出順序の逆転が生じます。

しかし、低分子の弱酸および弱塩基では、これらの化合物が完全にイオン化された状態（ $\alpha_i = 1$ ）になっている場合、CZE分離はほとんど不可能です。この場合、化合物の電荷は等しくなりますが、イオン容積はきわめて近接したままになります。幸い、これらの化合物は通常  $pK_a$  が異なるため（図 1.3 参照）、適切なバッファ pH [ $pH = \sum(pK_a\text{'s}) / 2$  のバッファなど] を選択すれば分離できます。このようなバッファ pH と電荷の影響は、有名な Henderson-Hasselbach の式により計算することができます。

$$4.1 \quad pK_a = pH - \log \left( \frac{\alpha_i}{1 - \alpha_i} \right)$$

この (4.1) 式から導くと、 $\alpha_i$  は以下のように表されます。

$$4.2 \quad \alpha_i = \frac{10^{(pH - pK_a)}}{1 + 10^{(pH - pK_a)}}$$

一塩基性の酸および塩基の場合、  
 ここから電荷 (q) を計算できます。  
 $q = -\alpha$  (弱酸の場合)  
 $= (1 - \alpha)$  (弱塩基の場合)

ポリペプチドやタンパク質の場合、構成成分のアミノ酸 (AA) をそれぞれ独立した成分と考えれば、正味電荷と等電点 (pI) も計算できます。<sup>83,84</sup>

このように、CZE ではバッファ pH と化合物の正味電荷がわかっているならば、目的化合物の溶出順序を予測することができます。こうした予測に、ピーク形状や分離能、適切な移動時間の確認を組み合わせた実験確認は、図 4.15 に示すフローチャートに従って実行できます。

一般に、チャートで示したパラメータを最適化することにより、目的のメソッドが開発され、堅牢性のテストが可能になります。

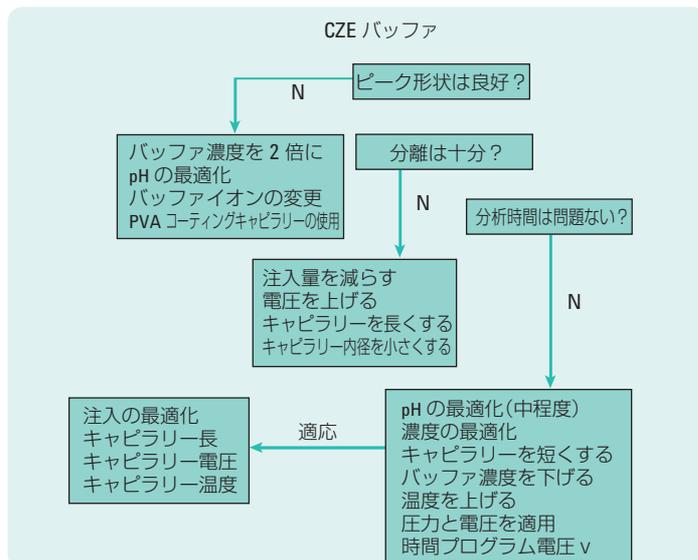


図 4.15  
最終的な CZE メソッドを最適化するためのフローチャート

化合物の分析時間とその定量という2つのメソッドパフォーマンス要件については、詳しく説明していません。化合物の分析時間が、割り当てられた分析時間の枠内に収まるかどうかを考慮するだけでは十分ではありません。原則として、化合物の移動時間 ( $t_m$ ) は再現性がなくてはなりません。移動時間が変動すると、定量のミスにつながります。移動時間の変動を抑えるためには、適切なキャピラリーコンディショニング (4.2 項) が不可欠です。移動時間の変動に関する対策については、トラブルシューティングの項 (表 4.4) を参照してください。EOF の若干の変動を解決できない場合は、絶対的な移動時間や移動度の代わりに、相対的な移動時間や移動度を使用すると効果が出る場合があります。

目的化合物の適切な定量は、あらゆる CE メソッドできわめて重要となります。CZE により分離するためには、化合物が異なる電気泳動移動度を持っている必要があります (1.3.3 項)。しかし電気泳動移動度が異なるという事は、化合物が検出器内に留まる時間にも違いが生じるため、注入量 (mol) やモ

ル検出器レスポンスが同じ場合でも、異なるピーク面積が記録されることとなります。こうした問題は、移動時間で補正したピーク面積 ( $A/t_m$ ) という標準化を用いることで解消します。定量の際に考慮すべき他の現象としては、以下のものがあります。

- 再現性のないピーク面積
- 低い検出器シグナル
- 不安定な（ノイズなど）ベースライン
- 不規則なピーク形状

こうした現象と、考えられる原因および対策については、4.3 項（トラブルシューティング）と 3.4 項（検出）で説明しています。

**定量に関する注意:** 内部標準 (IS) を使用すれば、注入が不完全な場合でも、注入量の変動を補正することができます。そのため、IS の使用を強く推奨します。

#### 4.4.2.1. PeakMaster によるシミュレーション

CZE メソッドを開発するためのきわめて効果的なツールが、Gas により開発されています。これは PeakMaster と呼ばれるシミュレーターです。このプログラムを使えば、CZE における BGE や分析対象物の挙動を予測することができます。

PeakMaster (PM) では、以下のことを計算できます。

- pH、イオン強度 (I)、緩衝能といった BGE の主要パラメータ
- 直接 UV または蛍光検出のシグナルレスポンス、間接光検出の伝達比 (TR = 感度; 3.4.1.4 項参照)、非接触電気伝導度検出 (CCD) のモル伝導度レスポンス (= 感度) といった分析対象物の主要パラメータ
- ピーク変形を引き起こす分析対象物の傾向 (= 電氣的拡散; 1.3.4.5 項)
- システムゴーストピークの位置 (= 固有ピーク)
- システム固有ピークの大きさ

PM は以下のことをシミュレーションします。

任意の電解液における試料成分のエレクトロフェログラム。

シミュレーションしたエレクトロフェログラムと実験により得られたエレクトロフェログラムの比較を、図 4.16 (シミュレーション) および (実験) に示しています。

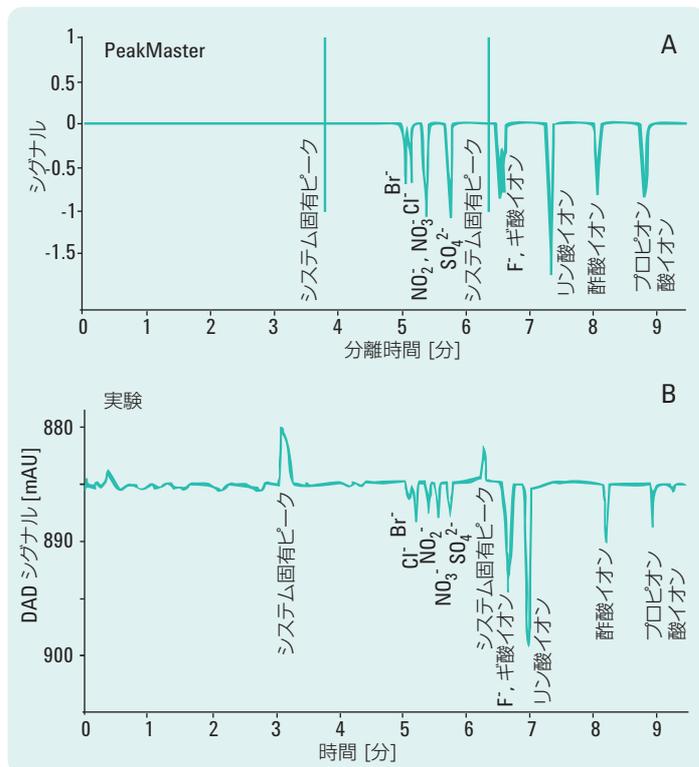


図 4.16

バッファ pH 12.1 における陰イオン混合物のレスポンス、ピーク形状、固有ピークのシミュレーション B) バッファ pH 12.1 における陰イオン混合物の実験で得られたエレクトロフェログラム

この実験では、市販バッファ [20 mM PDC (ピリジン 2,6 ジカルボン酸) に、電気浸透流を逆転させる 0.5 mM のテトラデシルトリメチルアンモニウムヒドロキシド (TTAOH) と約 55 mM の NaOH を添加し、pH = 12.1 にしたもの] で陰イオン混合物を測定し、間接 UV により出しています。

2 つの図は、分析対象物ピークと固有ピークの位置と形状がシミュレーションと実験で良好に一致していることを示しています。しかし、PM にはそれ以外の利点もあります。

PM は以下のことを予測します。

- 分析対象物ピークの変則的な拡散を生じさせるシステム固有ピークまたは共鳴現象の存在

PM は以下のことを可能にします。

- BGE 組成の最適化により、ゾーンの広がりを許容範囲内に抑えながら検出器感度を高めます。
- PM は使いやすいプログラムで（説明用のチュートリアルが含まれています）、参考 85 から無料でダウンロードできます。

#### 4.4.3. ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)

ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC) については、2.2 項で説明しています。MEKC は、試料中の分析対象物の大部分が電荷をもたない、あるいはわずかな電荷のみをもつ場合に用いられます。臨界ミセル濃度 (CMC) を超える濃度の界面活性剤により形成される擬似固定相により、ミセルとバルク溶媒 (BGE) の間で溶質の分配が生じます。そのため、RP-HPLC と同様、分析対象物の疎水性の差 ( $\alpha_{1,2} = k_2'/k_1'$  など、2.2 式参照) や分析対象物とミセルとの相互作用から生じる選択性の違いにより、分析対象物が分離されます。ほとんどの MEKC アプリケーションでは、分離の最適化と MEKC メソッドの開発は、RP-HPLC と近い流れになります。ただし、CEZ メソッド開発で説明したように、化合物の溶解性、安定性、試料マトリックス やキャピラリーのコンディショニング手順については、MEKC メソッド開発で検討する必要があります。こうした要素により、適切な BGE (バッファ) の選択肢や、中程度の EOF から高い移動度を示すミセルまでの溶出タイムウィンドウが決定されます (3.2.3 項の MEKC における試料スタッキングも参照)。適切なバッファを選択したら (初期 CEZ 実験などにより)、すでに説明したように基本的なメソッドパフォーマンス要件 (分離能、移動の再現性、適切な定量) を確認する必要があります。

HPLC になじみのある人にとっては当然のことですが、MEKC の分離能は、以下の影響を受けます。

- 界面活性剤の濃度または種類 (たとえば、 $k'$  は SDS 濃度が上がると上昇します)
- 温度 (一般に、温度が下がると  $k'$  も下がります)

- 有機溶媒（メタノール、プロパノール、アセトニトリル、通常は < 40 % v/v）が含まれている場合、添加剤の量が増えると保持力が低下し、同時にタイムウィンドウが広がります。
- pH（十分な EOF が生じる pH は通常 pH > 6; それよりも低いと EOF が低下することがあります; 移動時間が長くなったり、分析対象物の電荷が変化することもあります）

こうしたパラメータの微調整手順を、図 4.17 のフローチャートで示しています。通常は、このチャートに従えば最適化された MEKC メソッドが得られます。

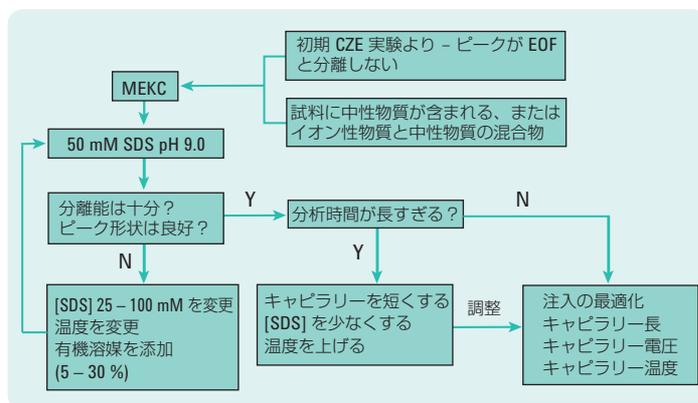


図 4.17  
MEKC の分離能および移動時間を最適化するためのフローチャート

**注:** 上記パラメータの変動 ([SDS 濃度]、温度、有機溶媒 %、pH) による分離能の変化は、分析対象物の順序の大幅な変化につながることがあります。溶出位置を把握するために、自作またはあらかじめ設定されたスペクトルデータベースを用いてスペクトルを確認することを強く推奨します。

### 4.4.3.1. エナンチオマーの分離

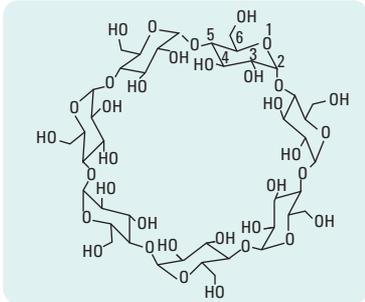


図 4.18  
キラルセクター( $\beta$ -シクロデキストリン)の構造

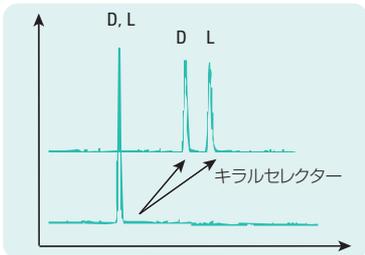


図 4.19  
分離を生じさせるキラルセクター

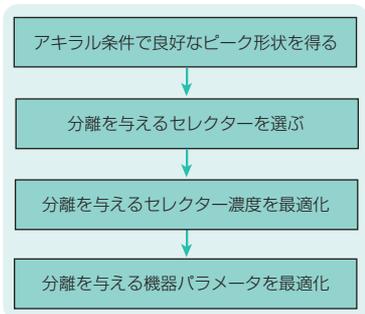


図 4.20  
キラルメソッド開発の初期手順およびその後の手順を示すフローチャート

ここで説明する手法は MEKC と CZE を組み合わせたもので、キラルミセルだけでなく、シクロデキストリンやコール酸塩といった非ミセルキラル選択剤も BGE に追加することができます。CE は汎用性とコスト効率に優れているので、HPLC よりも好まれることが多くなっています。そのため、CE によるエナンチオマー化合物の分析は、製薬業界で広く利用されています。CE によるキラル分離のメソッド開発と堅牢性のテスト手法については、製薬関連の科学者により数多く発表されています。<sup>80, 82</sup>

エナンチオマー（鏡像異性体）は、非対称の炭素中心を含む分子です。物理化学的な特性が等しい分子的鏡像であるため、通常の LC や CE での分離はきわめて困難です。固定相との結合 (LC) または BGE に添加した純度の高い他のエナンチオマー化合物（キラルセクター）との相互作用により、分離可能なジアステレオマーが形成されます。キラルセクターの例と、エナンチオマー対分離におけるキラルセクターの影響を、図 4.18 と 4.19 に示しています。

シクロデキストリン (CD) は、もっとも広く使用されているキラルセクターです。グルコース単位からなる物質で、円錐形の分子形状を有しています（底のないバケツに似ています）。グルコース単位は、各種の官能基（荷電または非荷電）により修飾できます。6、7、8 個のグルコース単位をもつ CD を、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CD と呼びます。エナンチオマー分子対の分離（キラル識別）は、分子対の一方が他方よりもバケツ型の CD の分子に近づきやすい（その結果、疎水性内包または水素結合が生じる）という性質を利用しています（立体反発）。CE では、荷電 CD を用いて中性エナンチオマーを分離し、非荷電 CD により荷電エナンチオマーを分離します。

一般に、キラル分析メソッドの開発は、キラルセクター (CD) を添加していない良好な CZE バッファから開始し、ラセミ物質の良好なピークを採取します。その後のキラル分離メソッドの開発手順を、複数のフローチャートで説明しています。そのうちの 1 つを図 4.20 に示しています。

次のチャート (図 4.21) は、荷電または中性エナンチオマーが試料に含まれている場合の選択肢を示しています。

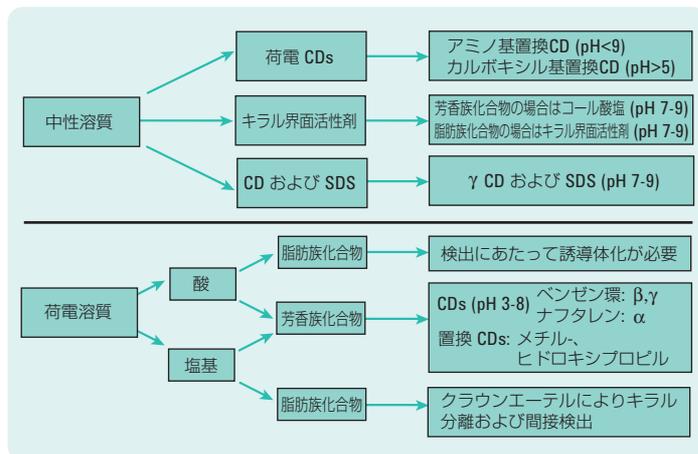


図 4.21

中性および荷電エナンチオマーの分析方法の最適化手順を示すフローチャート  
注：各種の CD、キラル界面活性剤などの種類は、試薬メーカーのカタログに明記されています。

中性エナンチオマーの場合、荷電 CD は特異的相互作用を与え、CD の電荷をもとに電場で識別されます。キラル界面活性剤も電荷をもち、その結果 MEKC 分離が生じます。CD と SDS を使用するケースでは、エナンチオマーが CD により識別され、SDS ミセルにより運ばれます。

荷電（または荷電可能な）エナンチオマーの場合、電荷を誘発するバッファをより慎重に選択する必要があるため、最適化は難しくなります。このアプローチをフローチャートで説明しています（図 4.22）。

エナンチオマー対のピーク形状（キラルセクターを追加せず）が良好な場合は、キラルセクターのスクリーニングを行います。ある程度の結果が得られたら、チャート（図 4.23）に示されているように、さらなる最適化を行います。

この続きの最適化では、CD 濃度、追加バッファ、機器パラメータなどを調整します。キラル分離を最適化するうえで重要となる機器パラメータは、温度です（図 4.23 参照）。温度は、 $pK_a$ （4.4.2 項）やエナンチオマーとキラル

セレクトターの錯体形成といった化学平衡に影響し、分子（タンパク質など）の構造変化を誘発することがあります。キラル分離の場合、一般に温度が低いとエナンチオマーの分離が向上しますが<sup>86</sup>、逆の効果も観察されています。<sup>87</sup>

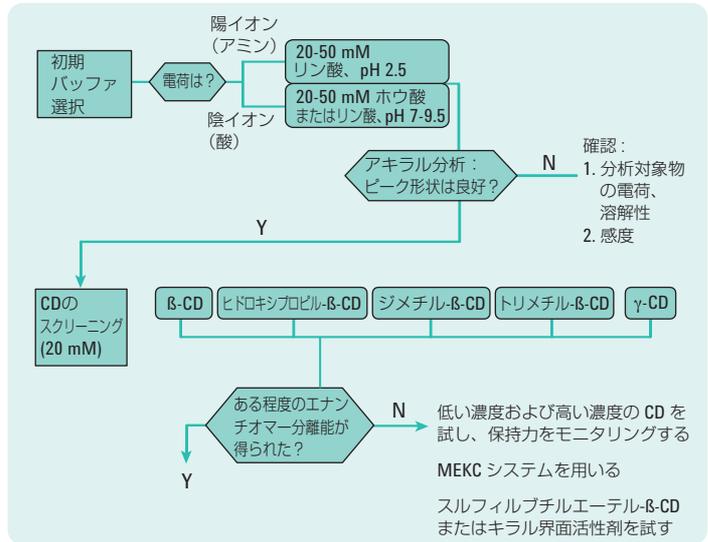


図 4.22 荷電エナンチオマー分析方法の最適化手順を示すフローチャート

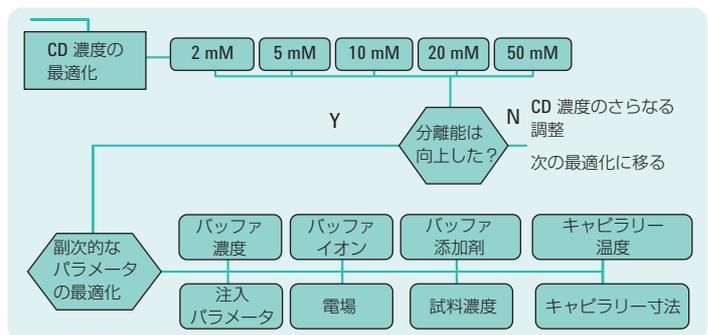


図 4.23 荷電エナンチオマー分離における最適化手順を示すフローチャート

#### 4.4.4. キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC)

HPLC と同じく、CEC では、試料化合物の分離に幅広い種類の移動相を使用できます。中性溶質を分離する場合は、HPLC と同じ最適化アプローチ (有機溶媒の種類と濃度のバリエーション) を用いることができます。CEC と HPLC の大きな違いは、CEC では、固定相が保持力と選択性だけでなく、EOF と溶媒の線速度にも影響を与える点です。2.3 項で説明したように、電気浸透流の速度は、EOF が生じる表面の電荷密度に依存しています。シリカベースの充てん粒子の場合、表面シラノール基の解離度と電荷密度は、溶離液の pH に強く影響されます。EOF の速度は、各種の逆相分配 固定相の pH のほか、有機溶媒濃度やバッファイオン強度 (I) といった化学パラメータにより変化することが明らかになっています。<sup>88,89</sup> CEC メソッド開発では、こうしたパラメータの変更が選択性 ( $\alpha$ )、効率 (N)、分離能 (R) に与える影響を推定することができます。まとめると、次のようになります。

溶出溶媒は、80 % アセトニトリルと 20 % バッファを混合して調製するのが最適です。アセトニトリルはメタノールの 2 倍の EOF を生じさせます。一方、保持しない EOF マーカーとしてチオ尿素を測定し、EOF 移動度の計算 ( $\mu_{EOF}$ ) に使用します。

バッファはアセトニトリルと混合する前に適切に調製します。適切な pH 範囲に対応し、選択性や効率に影響を及ぼさないバッファとしては、Tris (pH 8)、MES (pH 6)、酢酸ナトリウム (pH 4)、リン酸塩 (pH 2) などがあります。バッファのイオン強度を下げれば、EOF は上昇します。低いバッファ濃度 (20 ~ 50 mM など) と周囲温度以上のキャピラリー温度を用いるのが第一選択として推奨されます。ほとんどの RP-HPLC 相は、HPLC と CEC で同じ挙動を示します。HPLC から CEC へメソッドを移管する場合、アセトニトリルを修飾剤に使用していれば、たいていはグラジエント LC メソッドをアイソクラティック CEC メソッドに置き換えることができます。

当然のことながら、CEC に対する試料マトリックスの影響も大きいので確認する必要があります。このわかりやすい例を、Taylor ら<sup>90</sup> が示しています。Taylor らの例では、尿中のステロイドを数回注入したところ、カラムが使用不可能になりました。しかし、C8 と SAX 抽出 (SAX = 強陰イオン交換) により尿試料をクリーンアップした前処理を行ったところ、CEC カラムは 200 回以上の分析に耐えられるようになりました。

また、Euerby らは、HPLC メソッド開発で用いられている中性化合物分離に関する定説は、CEC に直接応用可能であると結論づけています。<sup>91</sup>

## 4.4.5. CE-MS

3.6 項で説明したように、質量分析による検出は CE 分離に強力な情報を与えます。MS では、分子量の精密測定（質量誤差が ppm レベル）や物質特異的なフラグメンテーション（マルチプルリアクションモニタリング）、気相イオン分子反応（電子移動解離）、ライブラリ検索などによる化合物の同定が可能です。

しかし、CE と組み合わせる際には、実際面で重要な条件を考慮し、設定を最適化する必要があります。ここでは、三軸チューブ CE-MS インターフェースを例に説明します。

### 4.4.5.1. 圧力インターフェースと電気的接続

3.6 項で説明したように、CE-MS では、CE の分離キャピラリーのアウトレット側を液体を介して接地させ、MS インレットの前で噴霧する必要があります。CE の分離キャピラリーはネプライザーをとおり、内側のステンレス製ニードルチューブから極僅かに突き出した位置で固定されます。安定性を保つため、CE キャピラリー末端の位置をネプライザーの位置調整リングで精密に調節する必要があります。良好な電気的接続のためにこのキャピラリー位置の調節は非常に重要です（図 4.24）。

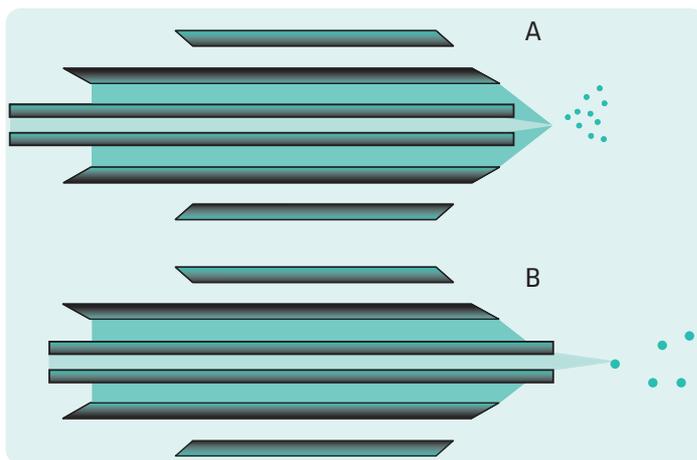


図 4.24

A) 最適な位置の CE キャピラリーでは、良好な電気的接続が得られています; B) CE キャピラリーの突き出しが大きすぎると、CE および ESI 電流が不安定になります。

CE 装置と MS インターフェースの構造や配置を考えると、CE インレットバイアルと MS インターフェースをつなぐためには、最短でも 50~60 cm ほどのキャピラリー長が必要となります。UV 可視検出を CE 装置で用いる場合は、さらに 20 cm が必要です。UV 可視検出の使用は、トラブルシューティング診断や最適化などの作業に適しています。

キャピラリー末端は塞がっていないので、インレットキャピラリーの液面の高さをアウトレットキャピラリー（ネブライザーの先端）の位置に合わせる必要があります。そうしないと、いずれかの方向でサイフォン現象が生じ、インレットバイアルが空になったり、分離キャピラリーにシース溶媒が引き込まれたりすることがあります。図 4.25 は、この重要なポイントを示しています。

3.6 項で説明したように、アジレントおよび Bruker 社の MS では、CE および ESI 電圧の両方が接地されています。ネブライザーと CE と MS 上の金属部分を接触させるようにし、金属製の接地ケーブルを用いることで接地できます。

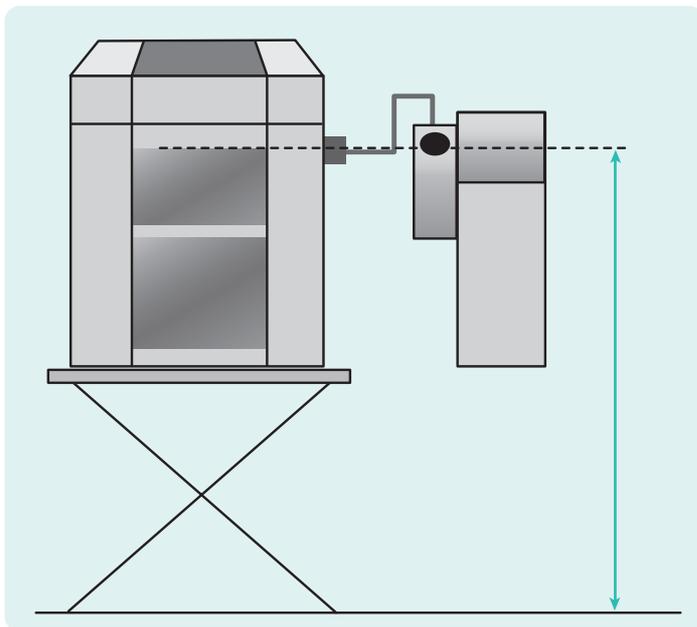


図 4.25  
サイフォン現象を防ぐためインレットバイアル液面の高さをアウトレット(ネブライザー先端)の高さと同じします。

#### 4.4.5.2. ネブライザーガス 圧力の設定

この構造のネブライザーは、安定したスプレー状態を維持するためにネブライザーガスを用います。通常は、乾燥した窒素ガスで十分です。通常 10~20 psi 程度にガス圧力を設定します。

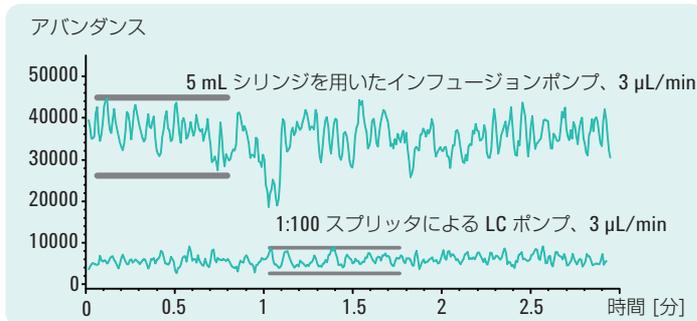
ネブライザーガスにより、キャピラリー中の溶質の動きにさらなる圧力流が加わる点にご注意ください。ネブライザーガスの圧力により、キャピラリー内で BGE を引っばる吸引効果が生じることがあります。この流れは圧力によるものなので、ゾーンの広がりが増加します。また、注入中にこの吸引効果が生じると、気泡がキャピラリー内に侵入し、電流が流れなくなることがあります。ゾーンの広がりは、インレットバイアルに負の圧力を加えてバランスをとることで解決できます。気泡の吸い込みは、試料注入時にネブライザーガスの圧力をゼロにすることで容易に回避できます。

#### 4.4.5.3. シース溶媒の移動、 シース溶媒の組成

シース溶媒は、BGE とシース溶媒を運び管との電気的接触をつくるためのものです。そのため、シース溶媒自体が導電性をもつ必要があります。シース溶媒に揮発性の有機酸または塩基（アンモニア）を低濃度添加することにより、シース液の導電性を得ることができます。シース溶媒の pH が BGE と異なる場合、BGE よりも多く供給されることから、溶質のイオン化状態はシース溶媒の pH が支配的になります。たとえば、pH 7 で CE 分離を行い、低 pH のシース溶媒を用いる場合、塩基性の溶質はシース溶媒の影響により陽イオンになります。反対に、アンモニアにより pH を高くしたシース液溶媒を用いることで、負イオンモードで MS 検出を行うことも可能です。

シース溶媒はほとんどの場合、アセトニトリル、メタノール、イソプロパノールといった水溶性有機溶媒で構成されています。水が混合物の約 1~20 % を占めます。シース溶媒の組成は、たいしては実験により最適化されます。

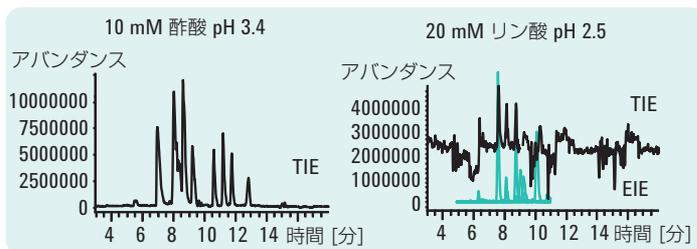
シース溶媒は流速 5~25  $\mu\text{l}/\text{min}$  で移動します。そのため、電動のインフュージョンポンプを使うこともできます。しかし、インフュージョンポンプによる送液は通常、プランジャーがシリンジ外筒を継続的に押し続けている間不安定になります。そのため、MS ベースラインシグナルにノイズが生じ、時には大きく変動することがあります（図 4.26）。



**図 4.26**  
 シース流送液を伴う CE-MS のベースラインシグナル。下図、アイソクラティック HPLC ポンプ、300  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、100:1 スプリット。上図、5 mL リザーバを用いたインフュージョンポンプ、3  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。プランジャーと外筒壁で瞬間的に摩擦が生じた際に、スティックスリップ(摩擦振動)現象が生じています。

### 4.4.5.4. CE-MS におけるバッファ選択

質量分析と組み合わせた CE 分離で用いるバッファは、揮発性を有し、溶質のイオン化を阻害しないものでなければなりません。図 4.27 で、10 mM 酢酸および 20 mM リン酸バッファのいずれかを用いた場合の 10 種類のペプチド混合物の分離を比較しています。



**図 4.27**  
**黒: トータルイオンエレクトロフェログラム。緑: 抽出イオンエレクトロフェログラム。**条件: キャピラリー: 75 cm (22 cm)  $\times$  50  $\mu\text{m}$ ; 注入: 150 mbar  $\times$  s; 電圧: 27 kV; 温度: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; 検出: 206/10 nm、参照 450/80 nm; シース溶媒: 0.5 % HAc を含む 50 % MeOH 4  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; ネブライザーガス: 10 psi; 乾燥ガス: 10 L/min、150  $^{\circ}\text{C}$ ; ES 電圧: - 4 kV; MS 検出: m/z 350-650; 試料: 0.16 mg/mL 10 種類のペプチド混合物

BGE に揮発性バッファの酢酸を用いると、アバンダンスが 3~5 倍も高くなるのが分かります。一方、不揮発性のリン酸バッファを用いた場合は、トータルイオンエレクトロフェログラムに多数のノイズが生じてしまいま

す。ペプチドのシグナルは弱くなり、かろうじて抽出イオンエレクトロフェログラムでシグナルを確認できる程度になります（右図の EIE）。低濃度の不揮発性バッファ（緩衝能が小さい）は感度が低いものの、高濃度の揮発性バッファを用いた場合よりややシャープなピーク形状を示します。しかし、不揮発バッファをした場合の感度の低下や MS の汚染のリスクは、CE-MS では避けられません。

実際の分析では通常、酢酸、ギ酸やその酢酸塩などのバッファが推奨されます。

#### 4.4.6. キャピラリーゲル電気泳動 (CGE)

キャピラリーゲル電気泳動 (CGE) については、2.4 項で説明しました。このタイプのゾーン電気泳動はおもに、核酸やタンパク質といった生体高分子をサイズにより分離する際に用いられます。

核酸の場合、ほぼすべてのメソッドが開発済みで、そうしたメソッドはヒトゲノム計画 (HUGO) 完遂に至るまでの副産物と言えます。そのため、多くの CE 機器メーカーが、どの機器でも使える調製済みの特定アプリケーション向け試薬や分析キットを提供しているのは、当然のことと言えます。そうしたアプリケーションには、以下のものがあります。

- 合成オリゴヌクレオチド\* (プライマー、標準 DNA ラダーなど)
- アンチセンス治療\* (チオリン酸)
- DNA 制限断片マッピング
- 遺伝疾患分析 (遺伝子上の点突然変異など)
- PCR 生成物分析\*
- 法医学 [タンDEM反復数 (VNTR)、短タンDEM反復 (STR) ]
- DNA-タンパク質の相互作用

\*で示すものは、物質のサイズ、純度、濃度を確認する広域 QA/QC プロトコルの対象となるアプリケーションです。

分離キットは通常、次のもので構成されます。コーティング/未修飾フェーズドシリカキャピラリー、分離マトリックス [デキストラン、セルロース、リニアポリアクリルアミドなどの交換可能なポリマーが溶解したバッファ (たいていは Tris-ホウ酸/EDTA/尿素 pH~8)], 必要に応じて校正用マーカー、DNA ラダーなど。

一般的な分離条件: キャピラリー、 $L_{tot} \approx 50$  cm、 $L_{eff} \approx 40$  cm;  $id = 75-100$   $\mu$ m; 電氣的注入 (-)、5~10 kV、5~20 秒間; 分離電圧 (-)、10~25 kV; 温度: 25~30 °C;

検出: 260/8 nm

ふるい分けマトリックスについては、いくつかの一般的な注意事項があります。

- 異なるフラグメントサイズをふるい分けられるように粘度を調節できること。
- 各分析毎に再補充し、以下に対応できること。
  - 1) 試料の安定性の向上
  - 2) 移動時間の再現性の向上
  - 3) キャピラリー汚染および試料キャリアオーバーの防止
  - 4) 150~200 回の分析を問題なく実施できるように 1 つのキャピラリーのコーティング寿命を延ばす
- 未修飾フューズドシリカを使用する場合、分析回数はコーティングの安定性に依存しません。

**注:** 実際の試料および PCR 生成物では、核酸試料マトリックスの塩濃度がきわめて高くなる場合があります。塩濃度の高い試料を扱うテクニックは、4.4 項の導入部で説明しました。

タンパク質のサイズ分析では、スラブゲル形式のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) が広く用いられています。サイズ分析を可能にするために、タンパク質を陰イオン性界面活性剤の SDS で処理し、一定の質量電荷比をもつ錯体を形成します (タンパク質 1 g あたり SDS 1.4 g)。ゲルが分子ふるいを形成し、そこで電気泳動分離が行われます。治療用タンパク質やモノクローナル抗体 (mAb) を生成する組み換えテクニックの登場により、キャピラリー形式の SDS-PAGE がスラブゲル形式に代わって用いられることが多くなっています。これはおもに、SDS-PAGE に比べて、CGE には以下の利点があるためです。

- 大量および少量の物質で高い分離能を実現
- 定量結果が向上
- タンパク質および抗体の不純物に関するプロセスの決定
- 自動化
- 分離結果の文書化

CGE 分析向けに、SDS 試料バッファおよびゲル (通常は特許製品) とともにキットが提供されています。こうしたキットは、試料の前処理にも使用されます (以下を参照)。このテクニックのメソッド開発は、以下のことを決定する手順により構成されます。

- タンパク質を完全に変性または還元させる試料前処理条件

- 内部標準 (IS) および補正ピーク面積 ( $A/t_m$ ) を用い、濃度の異なるタンパク質の定量性の確認
- 分離パラメータの最適化
- 最大の感度を得られる最適な検出波長 (たいていは高いバックグラウンド吸収を避けるために 280 nm を使用)
- 適切なデータ処理メソッド

**試料の前処理**<sup>92</sup> は、次の手順で行います。タンパク質または抗体 150 mg に 3  $\mu$ L IS (10 kDa MW マーカー)、10  $\mu$ L BME (rCE-SDS の場合、nrCE-SDS の場合は同量の 250 mM IAM) を加え、SDS 試料バッファで 150  $\mu$ L に調製します。混合し、75 °C の適切な温度で 10 分間遠心分離し、室温に冷却したのち、再び遠心分離にかけて混合します。この試料を注入します。

(r = 還元; nr = 非還元; BME =  $\beta$ -メルカプトエタノール; IAM = ヨードアセトアミド)

推奨される分離条件は次のとおりです。キャピラリー (未修飾フェーズドシリカ)、 $L_{tot} \approx 35$  cm、 $L_{eff} \approx 25$  cm; id = 50~75  $\mu$ m; 電氣的注入 (-)、10~15 kV、~20 秒; 分離電圧 (-)、10-15 kV; 温度: 20~30 °C; 検出: 215/20 nm (または色素標識による LIF)

一般に、CLOD 値 (3.4 項参照) は UV 検出で最大 0.1 % (w/w)、LIF で最大 0.01~0.05 % (w/w) です。

**注:** DNA、RNA、タンパク質のサイズ分離は、マイクロ流体キャピラリー電気泳動 (MCE) では標準的な手法です。MCE と CGE の根本的な違いは、CGE ではバッファやポリマー、電圧、キャピラリー長などを自由に選んで最適化できるのに対し、MCE では、こうしたパラメータはアプリケーションに特化してキットの開発時にすでに最適化されてパッケージ化されているため、ユーザーが最適化する必要がない (できない) という点です。

#### 4.4.7. キャピラリー等電点電気泳動 (CIEF)

従来の IEF は、等電点 ( $pI = \Sigma(pK_a)/2$ ) をもとにペプチドやタンパク質を分離する電気泳動テクニックです。分離は固定化した pH 勾配 (IPG) ストリップ上で行われ、ここでバッファグループ (アンフォライト) がポリアクリルアミドマトリックスに直接附着します。通常、これが 2D (二次元) 電気泳動の最初のステップ (1D) となります。その後、ストリップで分離されたタンパク質が SDS により処理され、SDS-PAGE による第 2 ステップでさらに分離されます。2D 電気泳動は現在でも、多くのプロテオームプロジェクトにおいて、複

雑なタンパク質混合物を分離する主要テクニックとして用いられています。CIEF (2.5 項参照) を用いた場合も、CE-SDS の項で説明したのと同じ利点 (自動化、高分離能、再現性、タンパク質および抗体および関連不純物の定量) が得られます。タンパク質とそのアイソフォーム (異なる pI 値をもつ) の電荷分布のモニタリングにより、アイソフォームのフィンガープリントが得られ、それぞれのアイソフォームを同定することができます。そのため、CIEF は現在、mAb 開発および製造 (QA/QC) や臨床化学といった分野において、以下を測定するために広く利用されています。

- 血清、尿、大脳皮質脊髄液 (CSF) 中のタンパク質; (疾病の前駆体)
- ヘモグロビン変異 (異常ヘモグロビン症の前駆体)
- アイソザイムパターン (乳酸脱水素酵素: LDH など)
- 糖鎖欠損トランスフェリン (代謝異常)
- リポタンパク質 (低および高密度リポタンパク質: LDL, HDL; 心血管異常のリスク)
- タンパク質修飾 (アミド分解および異性化)
- オリゴ糖構造分析

各種の pH 範囲およびポリマー濃度に対応するアンフォライトを含むポリマー (MC, HPMC) 溶液、pI マーカーなどの複数のアクセサリが提供されています (MC = メチルセルロース; HPMC = ヒドロキシ-プロピル-メチルセルロース)。

**試料の前処理**<sup>92</sup> は、一般に次のように行われます。適量 (~ 35 µg) のタンパク質または抗体を、適切なアンフォライトを含むポリマー溶液 (~ 0.2~0.4 % ポリマー) と混合し、pI マーカーを追加したのち、最終濃度を ~ 0.3 mg/mL (感度と分離能を得られる最適な濃度) とします。この溶液を脱気して注入します。

推奨される分離条件: キャピラリー (中性ポリマーでコーティング)、 $L_{tot} \approx 35\text{--}80\text{ cm}$ 、 $L_{eff} \approx 25\text{--}70\text{ cm}$ ;  $id = 50\text{ }\mu\text{m}$ ; ポリマー溶液中にアンフォライトや試料を含む溶液を圧力により注入し、キャピラリーを完全に満たす; フォーカシング: (陽極電解質、100 mM リン酸を含む 0.2~0.4 % ポリマー; 陰極電解質、20 mM NaOH を含む 0.2~0.4 % ポリマー)、30 kV で 15 分移動; 50 mbar プラス 30 kV、280 nm で検出; 温度: ~ 20~25 °C

**注:** 同定アッセイテストの場合、検出濃度下限 (CLOD) や定量濃度下限 (CLOQ) といった定量パラメータの確認は、通常必要とされません。重要なのは、最終試料溶液の塩の量を最小限に抑え、試料の干渉および沈殿のリスクを低減することです。

## 参考文献

---

**CHAPTER 1:****Principles of capillary electrophoresis**

1. P.D. Grossman, J.C. Colburn eds., "Capillary Electrophoresis – Theory and Practice", *Academic Press Inc., San Diego, (out of print; excellent introduction to CE theory), 1992.*
2. P.C. Hiemenz, R. Rajagopalan, "Principles of Colloid and Surface Chemistry", *Marcel Dekker Inc., 3<sup>rd</sup> edition, 1997.*
3. R.B. Bird, W.E. Stewart, E.N. Lightfoot, "Transport Phenomena", *John Wiley & Sons Inc., 2<sup>nd</sup> edition, 2001.*
4. J.P. Landers ed., "Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Techniques", *CRC Press, 2008.*
5. K.D. Lukacs, J.W. Jorgenson, "Capillary zone electrophoresis: Effect of physical parameters on separation efficiency and quantitation", *J. High Res. Chromatogr., 8, 407–411, 1985.*
6. B.B. Van Orman, G.G. Liversidge, G.L. McIntyre, T.M. Olefirowicz, A.G. Ewing, "Effects of buffer composition on electroosmotic flow in capillary electrophoresis", *J. Microcolumn Sep. 1990, 2, 176–180, 1990.*
7. A.S. Said, "Theory and mathematics of chromatography", *Hüthig Verlag, Heidelberg, 1981.*
8. S. Hjertén, "Zone broadening in electrophoresis with special reference to high performance electrophoresis in capillaries: An interplay between theory and practice", *Electrophoresis, 11, 665–690, 1990.*
9. X. Huang, W.F. Coleman, R.N. Zare, "Analysis of factors causing peak broadening in capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr., 480, 95–110, 1989.*
10. W.Th. Kok, "Capillary electrophoresis: instrumentation and operation", *Chromatographia Supplement, 51, 1–89, 2000.*
11. M.T. Ackermans, F.M. Everaerts, J.L. Beckers, "Quantitative analysis in capillary zone electrophoresis with conductivity and indirect UV detection", *J. Chromatogr., 549, 345–355, 1991.*
12. F. Kohlrausch, "Über Konzentrations-Verschiebungen durch Elektrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen", *Annalen der Physik und Chemie, 62, 14, 1897.*

**CHAPTER 2:****Modes of operation**

13. H.H. Lauer, D. McManigill, "Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing", *Anal. Chem., 58, 166–170, 1986.*
14. S. Terabe, Koji Otsuka, Kunimichi Ichikawa, Akihiro Tsuchiya, Teiichi Ando, "Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries", *Anal. Chem., 56, 111, 1984.*
15. S. Terabe, "Electrokinetic chromatography: an interface between electrophoresis and chromatography", *Trends in Anal. Chem., 8, 129–134, 1989.*
16. V. Pretorius, B.J. Hopkins, J.D. Schieke, "Electroosmosis: A new concept for high-speed liquid chromatography", *J. Chrom., 99, 23, 1974.*
17. J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, "Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries", *Anal. Chem., 53, 1298, 1981.*
18. J.H. Knox, I.H. Grant, "Miniaturisation in pressure and electroosmotically driven liquid chromatography: Some theoretical considerations", *Chromatographia, 24, 135, 1987.*
19. J.H. Knox, I.H. Grant, "Electrochromatography in packed tubes using 1.5 to 50  $\mu\text{m}$  silica gels and ODS bonded silica gels", *Chromatographia, 32, 317, 1991.*

20. M. Dittmann, K. Wienand, F. Bek, G. Rozing, *LC-GC Magazine*, 13, 800, **1995**.
21. M.M Dittmann, G.P. Rozing, "Capillary electrochromatography — a high-efficiency micro-separation technique", *J. Chromatogr. A*, 744, 63, **1996**.
22. N.W. Smith, M.B. Evans, "The analysis of pharmaceutical compounds using electrochromatography", *Chromatographia*, 38, 649, **1995**.
23. L.A. Colón, Glamarie Burgos, Todd D. Maloney, José M. Cintrón, Ramón L. Rodríguez, "Recent progress in CEC", *Electrophoresis*, 21, 3965, **2000**.
24. Nobuo Tanaka, Hisashi Nagayama, Hiroshi Kobayashi, Tohru Ikegami, Ken Hosoya, Norio Ishizuka, Hiroyoshi Minakuchi, Kazuki Nakanishi, Karin Cabrera, Dieter Lubda, "Monolithic silica columns for HPLC, micro-HPLC and CEC", *J. High Resol. Chromatogr.*, 23, 111, **2000**.
25. F. Svec, T.B. Tennikova, Z. Deyl, "Monolithic materials: Preparation, properties and applications", *Anal. Bio. Chem.*, 379, 8, **2004**.
26. Guttman, A.S. Cohen, D.N. Heiger, B.L. Karger, "Analytical and micropreparative ultrahigh resolution of oligonucleotides by polyacrylamide gel high performance capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, 62, 137–146, **1990**.
27. F. Kilar, S. Hjertén, "Fast and high-resolution analysis of human serum transferrin by high-performance isoelectric focusing in capillaries", *Electrophoresis*, 10, 23–29, **1989**.
28. J. Wu, J. Pawliszyn, "Capillary isoelectric focusing with a universal concentration gradient imaging system using a charge-coupled photodiode array", *Anal. Chem.*, 64, 2934, **1992**.
29. J. Wu, A. Watson, "Automated sample introduction for an imaged capillary isoelectric focusing instrument via high-performance liquid chromatography sampling devices", *J. Chromatogr. B*, 714, 113–118, **1998**.
30. F. Kohlrausch, "Über Konzentrationen – Verschiebungen durch Elektrolyse im Inneren von Lösungen und Lösungsgemischen", *Annalen der Physik und Chemie*, 62, 14, **1897**.
31. Th.P.E.M Verheggen, A.C. Schoots, F.M. Everaerts, "Feasibility of capillary zone electrophoresis with suppression of electroosmotic flow in completely closed systems", *J. Chromatogr.*, 503, 245–255, **1990**.

### CHAPTER 3: Instrumentation

32. X. Huang, M.J. Gordon, R.N. Zare, "Bias in quantitative capillary zone electrophoresis caused by electrokinetic sample injection", *Anal. Chem.*, 60, 375–377, **1988**.
33. R.L. Chien, D.S. Burgi, "Field-amplified sample injection in high performance capillary electrophoresis", *J. Chromatogr.*, 559, 141–152, **1991**.
34. P. Britz-McKibbin, D.D.Y. Chen, "Selective focusing of catecholamines and weakly acidic compounds by capillary electrophoresis using a dynamic pH junction", *Anal. Chem.*, 72, 1242, **2000**.
35. A. Vinther, H. Soeberg, "Temperature deviations of the sample zone in free solution capillary electrophoresis under stacking conditions", *J. Chromatogr.*, 559, 27–42, **1991**.
36. N.J. Reinhoud, U.R. Tjaden, J. van der Greef, J. Chromatogr., 1993, 641, 155, and N.J. Reinhoud, "Bioanalytical capillary electrophoresis", *thesis, Leiden (NL)*, 131–148, **1995**.
37. J.P. Quirino, S. Terabe, "Sweeping of analyte zones in electrokinetic chromatography", *Anal. Chem.*, 71, 1638–1644, **1999**.

38. D.S. Burgi, B.C. Giordano, "Online preconcentration for capillary electrophoresis", *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, Ed. J.P. Landers, CRC Press, 413–427, **2008**.
39. A.G. Ewing, R.A. Wallingford, T.M. Olefirowicz, "Capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, *61*, 292A–303A, **1989**.
40. L. Huber, S.A. George Eds, "Diode Array Detection in HPLC", *Chromatographic Science Series, Volume 62*, Marcel Dekker, **1993**.
41. S. Hjertén, K. Ellenbring, F. Kilar, J.L. Liao, A.J.C. Chen, C.J. Siebert, M.D. Zhu, "Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus", *J. Chromatogr.*, *403*, 47, **1987**.
42. W.Th. Kok, "Capillary electrophoresis: instrumentation and operation", *Chromatographia*, *51*, 1–89, **2000**.
43. E. Gassmann, J.E. Kuo, R.N. Zare, "Electrokinetic Separation of Chiral Compounds", *Science*, *230*, 813, **1985**.
44. D.E. Burton, M.J. Sepaniak, M.P. Maskarinec, J. *Chromatogr. Sci.*, *24*, 347, **1986**.
45. B. Nickerson, J.W. Jorgenson, *HRC J.High Resolut. Chrom.*, *11*, 533, **1988**.
46. S.D. Gilman, A.G. Ewing, *Anal. Chem.*, *67*, 58, **1995**.
47. A. Gutman, F.T.A. Chen, R.A. Evangelista, N. Cooke, *Anal. Biochem.*, *233*, 234, **1996**.
48. F. Foret, M. Deml, Y. Kahle, P. Bocek, *Electrophoresis*, *7*, 430, **1993**.
49. X. Huang, K.T. Pang, M.J. Gordon, R.N. Zare, *Anal. Chem.*, *59*, 2747, **1987**.
50. X. Huang, R.N. Zare, S. Sloss, A.G. Ewing, *Anal. Chem.*, *63*, 189, **1991**.
51. X. Huang, R.N. Zare, *Anal. Chem.*, *63*, 2193, **1991**.
52. C. Haber, W.R. Jones, J. Soglia, M.A. Surve, M. Mcglynn, J.R. Reineck, C. Krstanovic, *J. Capillary Electrophoresis*, *3*, 1, **1996**.
53. B. Gaš, M. Demjanenko, J. Vacik, *J. Chromatogr.*, *192*, 253–257, **1980**.
54. A.J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger, G.K. Bonn, "Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, *70*, 563–567, **1998**.
55. Alexandre Zatkovskis Carvalho, José A. F. da Silva, Claudimir L. do Lago, "Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection", *Electrophoresis*, *24*, 2138–2143, **2003**.
56. Pavel Coufal, Jiri Zuska, Tom van de Goor, Vonda Smith, Bohuslav Gas, "Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection", *Electrophoresis*, *24*, 671–677, **2003**.
57. V. Lopez-Avila, Tom van de Goor, Bohuslav Ga, Pavel Coufal, "Separation of haloacetic acids in water by capillary zone electrophoresis with direct UV detection and contactless conductivity detection", *J. Chromatogr. A*, *993*, 143–152, **2003**.
58. J. Tanyayiwa, P.C. Hauser, "High-Voltage contactless conductivity detection of metal ions in capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, *23*, 3781–3786, **2002**.
59. A. Cifuentes, X. Xu, W.Th. Kok, H. Poppe, "Optimum conditions for preparative operation of capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, *716*, 141, **1995**.
60. X. Xu, W.Th. Kok, H. Poppe, "Change of pH in electrophoretic zones as a cause of peak deformation", *J. Chromatogr. A*, *742*, 211, **1996**.
61. G. Ross, *LCGC Europe*, January **2001**.

62. Special Issue: *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, Electrophoresis*, 29(10), 1955–2239, **2008**.
63. Special Issue: *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, Electrophoresis*, 28(9), 1303–1473, **2007**.
64. Special Issue: *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, Electrophoresis*, 27(11), 2025–2259, **2006**.
65. W. Kolch, C. Neusüß, M. Pelzing, H. Mischak, "Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in clinical diagnosis and biomarker discovery", *Mass Spectrom. Rev.*, 24, 959, **2005**.
66. Cech N.B.; Enke C.G., "Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals", *Mass Spectrom. Rev.*, 20, 362, **2001**.
67. A.P. Bruins, "Mechanistic aspects of electrospray ionization", *J. Chromatography A*, 794, 345, **1998**.
68. Smith, R. D., Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Udseth, H. R., "Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface", *Anal. Chem.*, 60, 436–441, **1998**.
69. E. J. Maxwell and D.D.Y. Chen, "Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry", *Anal. Chim. Acta*, 627, 25–44, **2008**.
70. Mehdi Moini, "Simplifying CE-MS Operation. Interfacing Low-Flow Separation Techniques to Mass Spectrometry Using a Porous Tip", *Anal. Chem.*, 79, 4241–4246, **2007**.
71. E. Jane Maxwell, David D.Y. Chen, "Twenty years of interface development for capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, 627, 25–33, **2008**.
- CHAPTER 4:**  
**Practical operation and method development**
72. S.A. Swedberg, "Characterization of protein behavior in high performance capillary electrophoresis using a novel capillary system", *Anal. Biochem.*, 185, 51–56, **1990**.
73. C.A. Lucy, N.E. Barylá, K.K.C. Yeung, "Capillary Electrophoresis of Proteins and Peptides", *M.A.L. Strege (Ed.), Humana Press*, p. 1, **2004**.
74. C.A. Lucy, A.M. MacDonald, M.D. Gulcev, "Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 1184, 81–105, **2008**.
75. N.E. Barylá, J.E. Melanson, M.T. McDermott, C.A. Lucy, "Characterization of Surfactant Coatings in Capillary Electrophoresis by Atomic Force Microscopy", *Anal. Chem.*, 73, 4558, **2001**.
76. H. Katayama, Y. Yshihama, N. Asakawa, "Stable Capillary Coating with Successive Multiple Ionic Polymer Layers", *Anal. Chem.*, 70, 2254, **1998**.
77. T.W. Graul J.B. Schlenoff, "Capillaries Modified by Polyelectrolyte Multilayers for Electrophoretic Separations", *Anal. Chem.*, 71, 4007, **1999**.
78. S. Kaupp, R. Steffen, H. Wätzig, "Characterization of inner surface and adsorption phenomena in fused-silica capillaries in capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 744, 93–101, **1996**.
79. S. Kaupp, H. Bubert, L. Bauer, G. Nelson, H. Wätzig, "Unexpected surface chemistry in capillaries for electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, 894, 73–77, **2000**.
80. C.E. Sanger-van de Griend, "Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis; Vol. 9 of separation science and technology series", S. Ahuja, M.I. Jimidar (Eds), *Academic Press, Chapter 6*, **2008**.

81. H. Wätzig, C. Dette, "Capillary electrophoresis (CE): a review. Strategies for method development and applications related to pharmaceutical and biological sciences", *Pharmazie*, *49*, 83–96, **1994**.
82. M.I. Jimidar, P. van Nyen, W. van Ael, M. Desmet in "Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis; Vol. 9 of separation science and technology series", *S. Ahuja, M.I. Jimidar (Eds), Academic Press, in Chapter 4*, **2008**.
83. B. Skoog, A. Wichman, "Calculation of the isoelectric points of polypeptides from the amino acid composition", *Trends in Anal. Chem.*, *5*, 82–83, **1986**.
84. P.D. Grossman, K.J. Wilson, G. Petrie, H.H. Lauer, "Effect of buffer pH and peptide composition on the selectivity of peptide separations by capillary zone electrophoresis", *Anal. Biochem.*, *173*, 265–270, **1988**.
85. B. Gas, M. Jaros, V. Hruska, I. Zuskova, M. Stedry, "PeakMaster: a freeware simulator of capillary zone electrophoresis", *LC-GC Europe*, *18*, 282-288 <http://www.natur.cuni.cz/gas>, **2005**.
86. R. Kuhn, F. Stoecklin, F. Erni, "Chiral separations by host-guest complexation with cyclodextrin and crown ether in capillary zone electrophoresis", *Chromatographia*, *33*, 32–36, **1992**.
87. A. Westall, T. Malmström, P. Petersson, "An observation of unusual temperature effects for enantioselective CZE employing highly sulphated- $\beta$ -cyclodextrin", *Electrophoresis*, *27*, 859–864, **2006**.
88. M.M. Dittmann, G.P. Rozing, "Capillary electrochromatography — a high-efficiency micro-separation technique", *J. Chromatogr. A*, *744*, 63, **1996**.
89. M.M. Dittmann, G.P. Rozing, "Capillary electrochromatography: Investigation of the influence of mobile phase and stationary phase properties on electroosmotic velocity, retention, and selectivity", *J. Microcolumn. Separations*, *5*, 399–408, **1997**.
90. M.R. Taylor, P. Teale, S.A. Westwood, D. Perrett, "Analysis of Corticosteroids in Biofluids by Capillary Electrochromatography with Gradient Elution", *Anal. Chem.*, *69*, 2554, **1997**.
91. M.R. Euerby, C.M. Johnson, S.C.P. Roulin, P. Myers, K.D. Bartle, "Capillary electrochromatography in the pharmaceutical industry. Practical reality or fantasy?", *Anal. Commun.*, *33*, 403, **1996**.
92. A. Guo, G. Camblin, M. Han, C. Meert, S. Park, "Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis; Vol. 9 of separation science and technology series", *S. Ahuja, M.I. Jimidar (Eds), Academic Press, chapter 14*, **2008**.

The cited figures were adapted with permission of copyright owners.



**A**

absorption 吸収  
55, 74, 91, 94

additives 添加剤  
10, 11, 12, 41, 71, 119, 123, 125,  
135, 136

adhered phases 吸着相  
123

adsorption 吸着  
7, 8, 10, 12, 16, 21, 23, 24, 55, 104,  
121, 122, 123, 127, 135, 136, 137

amino acids アミノ酸  
3, 99, 100, 122, 143

anionic 陰イオン性  
7, 12, 35, 36, 38, 41, 55, 70, 71, 97,  
121, 123, 124, 146, 158

anions 陰イオン  
8, 10, 36, 55, 56, 68, 90, 98, 99,  
112, 121, 142, 146

apparent mobility みかけの移動度  
13, 104

application アプリケーション  
2, 3, 7, 15, 31, 43, 44, 45, 50, 51,  
53, 60, 66, 72, 81, 87, 88, 93, 105,  
106, 131, 137, 138, 139, 159

APTS APTS  
95, 142

autosampler オートサンブラ  
73, 130

**B**

Beer's law ベールの法則  
75

BGE (back ground electrolyte) BGE (バックグラウンド電解液)  
25, 26, 27, 65, 67, 68, 70, 71, 72,  
87, 88, 89, 90, 95, 96, 97, 104, 105,  
109, 111, 113, 119, 120, 121, 122,  
124, 125, 126, 131, 132, 138, 141,  
145, 147, 149, 155, 156, 157

bile salts 胆汁酸塩  
41

bonded phase 結合相  
34

borate ホウ酸塩  
11, 21, 37, 42, 52, 71, 72, 75, 129,

132, 157

bubble cell バブルセル  
78, 79

buffers バッファ  
11, 21, 42, 73, 75, 97, 115, 119,  
131, 132, 133, 141, 152, 156, 157,  
158, 159

**C**

calibration curve 検量線  
52, 75

capacity factor 保持係数  
23, 24, 39, 40

carbohydrates 糖  
3, 75

cationic 陽イオン性  
10, 12, 23, 35, 36, 38, 41, 58, 71,  
72, 97, 99, 122, 123, 124, 125, 155

cationic surfactants 陽イオン性界面活性剤  
12, 123

cations 陽イオン  
7, 8, 10, 36, 47, 55, 56, 65, 68, 69,  
90, 98, 99, 112, 142

CCD 31, 96, 97, 99, 100, 145

CE-MALDI-MS 116

CEC 34, 43, 45-49, 97, 138, 152

CGE 34, 49-53, 56, 124, 138, 157-159

CHAPS 21, 41, 124

CHAPSO 41

chemical bonding 化学結合  
121

chiral キラル  
3, 41, 53, 149-151

chiral analysis キラル分析  
149

CIEF 34, 53, 54, 55, 139, 159, 160

CITF 139

CITP 34, 55, 56

CMC 41, 42, 123, 124, 147

coatings コーティング  
4, 11, 54, 123, 124-128, 132

coefficient 係数 (率)  
18, 22, 24, 42, 62, 84, 103

conductivity 導電率  
12, 17, 20, 21, 25-27, 59, 64-68,  
71, 72, 74, 90, 96, 97, 102, 133-

- 135, 140, 145  
 convective broadening 対流による拡散  
 14  
 cooling 冷却  
 19, 21  
 coulombic interactions クーロン力の相互作用  
 10, 11  
 covalent coatings 共有結合型コーティング  
 11, 125  
 critical micelle concentration 臨界ミセル濃度  
 123  
 CTAB 41, 71, 123-127, 135, 136  
 cyclodextrins シクロデキストリン  
 71, 72, 149  
 CZE 27, 30, 34-37, 43, 48, 52, 53, 56,  
 69, 70, 73, 98-101, 118, 123, 138,  
 141-145, 147, 149
- D**
- DAD 31, 74, 81, 134, 140  
 DC power supply DC 電源  
 58  
 DDAB 124, 126, 127  
 DDAB-coated capillary DDAB-コーティングキャピラリー  
 126, 127  
 depletion 涸渇  
 129, 135, 136, 137, 141  
 detector cell 1 検出器セル  
 6, 29, 79  
 diffusion 拡散  
 2, 14-17, 22, 24, 59, 61, 62, 103  
 diffusion coefficient 拡散係数  
 22, 24, 62, 103  
 diode-array detectors ダイオードアレイ検出器  
 81  
 dispersion 拡散  
 9, 14, 17, 22, 46, 65, 103, 104, 140,  
 145, 147  
 DNA 3, 15, 50-53, 101, 138, 140, 157, 159  
 drugs 薬  
 3, 42  
 DTAB 41
- dynamic coating 動的コーティング  
 11, 54, 121, 123, 126, 128
- E**
- effect on efficiency 分離効率に及ぼす影響  
 22, 23  
 effective mobility 有効移動度  
 6, 21, 25, 55, 142  
 electric field 電場の強さ (V/cm)  
 2, 5, 7, 11, 12, 13, 21, 25, 43-45, 5-  
 56, 64, 66, 72, 102, 118, 122, 150  
 electroosmotic 電気浸透  
 7, 36, 45, 49, 67, 121, 125, 152  
 electrodispersion 電気的拡散  
 16, 25, 26, 27, 28, 97  
 electrokinetic 動電  
 34, 37, 59, 64-66, 124, 136, 137,  
 140, 157, 159  
 electronic ground state 電子の基底状態  
 91  
 environmental 環境  
 3, 37  
 EOF 7, 8, 9, 10, 11, 12, 20, 25, 28, 29,  
 31, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44,  
 45, 46, 49, 52, 54, 55, 58, 64, 70,  
 71, 72, 73, 95, 99, 111, 112, 118,  
 119, 121, 122, 123, 124, 125, 126,  
 128, 129, 131, 137, 141, 144, 147,  
 148, 152  
 ESI 107, 108, 112, 114, 115, 116, 153, 154  
 extended light path 延長した光路  
 78, 79, 135
- F**
- FASS 65, 67  
 field amplified sample injection (FASI) 電場増幅試料注入 (FASI)  
 65, 66  
 field programming 電場プログラミング  
 58  
 fluorescence spectrum 蛍光放射スペクトル  
 91  
 focusing フォーカシング  
 10, 53, 54, 55, 65, 69, 70, 79, 160

- fraction collection フラクションコレクション  
58, 101, 116, 118
- fused silica フューズドシリカ  
2, 4, 7, 8, 18, 20, 23, 31, 36, 43, 44,  
55, 58, 79, 92, 96, 97, 114, 118-  
120, 122, 123, 126, 131, 132, 158,  
159
- G**
- Gaussian peak ガウス分布しているピーク  
14, 15
- gels ゲル  
2, 50, 51, 64, 158
- GroEs 101
- H**
- Hagen-Poiseuille equation  
Hagen-Poiseuille の式  
60
- hemoglobins ヘモグロビン  
55
- HETP 24, 46, 49
- high velocity air 高速空気  
21, 73
- histidine ヒスチジン  
21, 56, 98
- HPLC 34, 43, 46, 47, 48, 49, 65, 73, 80,  
81, 86, 94, 95, 109, 115, 116, 147,  
149, 152, 156
- human genome project (HUGO)  
ヒトゲノム計画 (HUGO)  
157
- hydraulic flow 圧力による流れ  
29, 49, 110, 112, 155
- hydrodynamic 圧力変化を利用した (注入法)  
59, 60, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 122,  
142, 160
- hydrophobic 疎水性  
12, 23, 34, 38, 41, 120, 123, 124, 149
- Hyphenation 連結  
97
- I**
- immunoglobulins 免疫グロブリン  
55
- improper wavelength 不適切な波長
- In situ* 137  
51
- increase analysis time 分析時間を長くする  
136, 137
- inorganic ions 無機イオン  
3, 27, 96, 138
- internal diameters 内径  
21, 50, 118
- internal standard 内部標準  
145, 158
- ion mobility イオン移動度  
21, 36
- ionic イオン性  
7, 8, 11, 12, 21, 23, 25, 28, 36, 40,  
41, 64, 72, 87, 90, 119, 123, 124,  
127, 142, 143, 145, 152
- ionic strength イオン強度  
8, 11, 12, 21, 72, 124, 145, 152
- Iso-absorbance plot 等吸光度プロット  
82, 83, 84
- isoelectric focusing 等電点電気泳動  
10, 53
- isotachopheresis 等速電気泳動  
10, 55
- ITP 55, 56, 68, 69, 70, 140
- J**
- Joule heating ジュール熱  
3, 11, 12, 16, 17, 21, 50, 67, 103,  
104, 119, 124, 134
- K**
- Kohlrausch Regulation Function (KRF)  
Kohlrausch 調整関数 (KRF)  
28
- L**
- laminae 薄層  
9
- laminar flow 層流  
9, 16, 49
- leveling 液面調整  
29, 130, 135
- longitudinal 管軸方向  
2, 14, 16
- LPA 51

- M**
- mABs 158
- macromolecules 高分子  
2, 3, 22, 49, 51, 157
- magnitude 大きさ  
8, 10, 11, 12, 19, 24, 46, 49, 70, 71,  
92, 107, 109, 110, 121
- MALDI 101, 103, 116
- marker マーカー  
122, 128, 159
- mass spectrometry 質量分析  
3, 13, 107, 125
- matrix マトリックス  
60, 64, 65, 67, 71, 72, 116, 133,  
139, 140, 147, 152, 157, 158, 159
- MCE 159
- media 媒体  
2, 31, 64
- MEEKC 41, 42
- MEKC 34, 37-42, 56, 72, 124, 138, 147,  
148-150
- MHEC 28
- micellar electrokinetic chromatography  
ミセル動電クロマトグラフィー  
34, 37, 124
- micelle ミセル  
37, 38, 39, 40, 41, 42, 71, 123
- micelle migration ミセルの移動  
41
- migration time 移動時間  
4, 12-14, 25, 29, 38, 58, 62, 63, 73,  
99, 128-30, 136, 144, 148, 158
- migration time reproducibility  
移動時間の再現性  
29, 58, 99, 128, 129, 158
- mobility 移動度  
2, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17,  
20, 21, 25, 27, 30, 35, 36, 40, 50,  
54, 55, 56, 63, 64, 68, 69, 104, 128,  
131, 142, 152
- modifier 修飾剤  
12, 41, 121, 123, 148, 152
- molecular sieve 分子ふるい  
49, 158
- monolithic モノリシック  
4, 49
- monomer モノマー  
122, 123
- moving boundary 移動境界  
27, 55
- multi-wavelength UV detection  
多波長 UV 検出  
81
- N**
- nanoESI ナノ ESI  
109
- narrow-bore ナローボア  
2, 4, 17, 31, 119
- NDA 95
- nest ネスト  
103
- neutral 中性  
12, 36, 37, 38, 39, 40, 48, 71, 108,  
119, 122, 124, 132, 138, 139, 149,  
150, 152, 160
- Nobel Prize ノーベル賞  
2
- noise ノイズ  
63, 75, 76, 77, 80, 88-90, 92, 93,  
94, 97, 136
- O**
- Ohm's law オームの法則  
21, 73
- oligonucleotides オリゴヌクレオチド  
3, 51, 52, 157
- on-capillary detection  
オンキャピラリー検出  
3, 50, 74, 97
- OPA 95
- optical window 光学ウィンドウ  
74
- organic acids 有機酸  
3, 27
- P**
- parabolic flow velocity  
放物線的な流れ  
9, 68
- PCR 52, 53, 138, 157, 158
- PDMA 51

- peak area ピーク面積  
4, 63
- peak broadening ピークの広がり  
68
- peak efficiency ピーク効率  
3
- peak height ピーク高  
85
- peak problems ピークの問題  
136, 137
- peak purity ピーク純度  
81, 82, 84, 85, 86
- peak shape ピーク形状  
9, 12, 59, 120, 143, 145, 146
- peak tailing ピークテーリング  
16, 119, 121, 136
- peak width ピーク幅  
14, 16, 59, 81, 102
- peptide mapping ペプチドマッピング  
140
- peptides ペプチド  
3, 23, 53, 75, 101, 116, 138, 139, 156, 159
- pH 6, 7, 8, 10, 11, 12, 25, 28, 34, 36, 37, 38, 41, 42, 45, 46, 48, 52, 53, 54, 56, 58, 67, 68, 71, 75, 81, 95, 98, 100, 101, 112, 119, 121, 122, 124, 125, 126, 128, 129, 131, 132, 135, 136, 141, 142, 143, 145, 146, 148, 152, 155, 157, 159, 160
- pH extremes 極端な pH  
36, 119, 125, 135, 136
- pH gradient pH 勾配  
34, 53, 54, 159
- pharmaceuticals 製薬  
42
- physical adherence 物理的吸着  
121, 122
- plate number 段数  
15, 68, 103, 104, 105, 106
- plug length プラグ長  
14, 16, 22, 61, 62, 103, 104
- polyimide ポリイミド  
18, 20, 114, 118, 120, 136
- polymer ポリマー  
12, 20, 49, 50, 51, 52, 122, 124, 125, 127, 128, 135, 136, 160
- polymer network ポリマーネットワーク  
50, 51
- preconcentration 事前濃縮  
4, 56, 65, 72, 138, 139
- properties 特性  
11, 12, 15, 20, 79, 87, 95, 105, 107, 118, 123, 140
- proteins タンパク質  
2, 3, 15, 23, 37, 49-51, 53, 116, 118, 119, 122, 125-128, 138, 139, 140, 142, 143, 151, 157-160
- Q**  
quantitative analysis 定量分析  
3, 4, 5, 63, 75
- R**  
ratio signal plot シグナル比のプロット  
85, 86
- replenishment 交換  
29, 129, 130, 135, 137
- restriction fragments 制限断片  
3, 51
- reversal 反転  
123, 125, 146
- RSD 63, 99, 128, 130
- S**  
sample loading 試料注入  
21, 55
- SDS 37, 38, 41, 42, 49-51, 53, 71, 124, 132, 139, 142, 147-150, 158-160
- SDS-PAGE 158, 159
- selection 選択  
21, 84, 150
- separation efficiency 分離効率  
2, 48, 78, 92, 101, 104
- signal-to-noise シグナル/ノイズ比  
63, 76, 80, 94, 136
- SiOH 7
- size exclusion chromatography サイズ排除クロマトグラフィー  
34
- slab gel electrophoresis スラブゲル電気泳動

- sliding liquid layers 液体層でのスライド  
9
- slit size スリットのサイズ  
76
- SMIL 124, 127, 128
- sodium dodecyl sulphate-poly-acrylamide gel electrophoresis  
ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
158
- Solid Phase Extraction (SPE)  
固相抽出 (SPE)  
65
- Solid Phase Micro Extraction (SPME)  
固相マイクロ抽出 (SPME)  
65
- solute 溶質  
4-7, 9, 10, 11, 12, 13, 14-17, 20,  
21, 23, 24, 30, 35-39, 41, 53, 55, 56,  
59, 64, 74, 75, 79, 108, 112, 115,  
116, 118, 119, 123, 124, 139, 152
- solution ion strength  
溶液イオン強度  
65
- spectra スペクトル  
81, 83, 84, 85, 135
- stacking スタッキング  
12, 27, 65, 66, 67, 68, 69, 72, 78,  
133, 135, 140, 147
- Stoke's law ストークスの法則  
5
- stray light 迷光  
75, 76, 79
- STRs STR  
157
- Successive Multiple Ionic-polymer Layer coating (SMIL)  
連続的多重イオン性高分子層 (SMIL) コーティング  
127
- surface area-to-volume ratio  
容積に対する表面積の比率  
3, 23
- surfactants 界面活性剤  
3, 12, 37, 38, 40, 41, 123-126, 142,  
147, 150
- T**
- Teflon テフロン  
2, 8, 97
- temperature 温度  
11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 41,  
42, 46, 48, 50, 58, 63, 67, 73, 75,  
97, 100, 101, 102, 103, 104, 105,  
106, 108, 109, 112, 120, 128, 133,  
134, 135, 136, 142, 147, 150, 151,  
156, 157, 159, 160
- thermostating 温度制御  
40, 73
- transferrin isoforms トランスフェリン異性体  
55
- Tris 21, 28, 48, 52, 75, 81, 129, 132,  
152, 157
- tubular チューブ  
4, 46
- U**
- UV-visible UV-可視  
73, 74, 81, 118
- V**
- variable number of tandem repeats  
タンDEM反復数  
157
- velocity 移動速度  
3, 5, 6, 8-10, 12, 14, 16, 20, 21, 25,  
26, 30, 34, 36, 38, 43, 44-49, 55,  
56, 68, 73, 78, 119, 152
- viscosity 粘度  
4, 11, 12, 17, 29, 52, 58, 60, 62, 63,  
73, 122, 124, 158
- vitamin separation ビタミン分離  
13
- VNTRs VNTR  
157
- voltage 電圧  
5, 8, 17, 20, 21, 30, 47, 48, 58, 59,  
64, 67, 69, 72, 98, 100, 101, 102,  
103, 105, 109, 112, 114, 126, 129,  
130, 131, 133, 134, 136, 154, 156,  
157, 159

## W

- wall interaction 壁面の相互作用  
137
- wall modification 壁面の修飾  
119
- wavelength setting 波長設定  
134, 137
- whole-column imaging CIEF  
全カラムイメージング CIEF  
55

## X, Y, Z

- Z-shaped flow cell Z型フローセル  
79
- zeta potential ゼータ電位  
8, 12, 36, 45
- zonal electrophoresis  
ゾーン電気泳動  
49, 157
- zones  
ゾーン  
9, 14, 16, 25, 27, 30, 34, 35, 36, 53,  
54, 55, 56, 59, 62, 65, 66, 68, 69,  
70, 102
- zwitterionic 両性イオン  
11, 41, 53, 55, 123, 124, 132



[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2009-2016  
Printed in Japan, October 31, 2016  
Publication Number 5990-3777JAJP



**Agilent Technologies**