

学位論文題名

新しい移動度制御手法に基づくキャピラリー
電気泳動分離に関する研究

学位論文内容の要旨

キャピラリー電気泳動法は、高速液体クロマトグラフィーと比較しても取扱いが容易であり、試料の微量化及び高感度、高精度な多成分の分離定量として大きな可能性を有している。しかしこの方法の高機能化のためには、目的化学種の移動度制御を容易とする泳動系設計の手法の開発が必須である。本論文は高分離能をもつ新しい泳動系の開発、ならびにそれら系内での泳動機構の解明を目的としたものである。

等速電気泳動法においては取扱いの容易な水溶液系の利点に着目し、移動度制御にターミナルゾーンとの錯形成平衡を活用する泳動系を探索した。ついでキャピラリーゾーン電気泳動法に関しても、錯形成平衡の導入を計った。さらにはミセル溶液系を泳動溶液としミセルへの分配平衡を活用する手法に検討を加えた。この系での中性分子種の分離におけるグルコースの添加効果について詳細に検討した。また陰イオン種の分離のために陽イオン界面活性剤ミセルを活用する泳動系を開発し、その有用性を明らかにした。その泳動機構に関する新しい理論式を導入して、陽イオン界面活性剤と陰イオンとのイオン対生成定数、並びにミセルへの分配定数を求めて評価した。

本論文は、8章からなる。第1章は序論であり、キャピラリー電気泳動法の問題点を指摘しつつ、本研究の目的を述べた。

第2章では、キャピラリー電気泳動法において分類される等速電気泳動法、キャピラリーゾーン電気泳動法、及びミセル動電クロマトグラフィーについて概説した。

第3章では、等速電気泳動法における泳動系として、ターミナルゾーンを目的化学種の錯化剤供給源とする新しい泳動系を開発した。泳動系は、重金属イオンを対象とし、塩酸-Tris緩衝溶液をリーディング液、シアン化カリウムをターミナル液としたものである。この系に導入された重金属イオンは一旦ターミナル側へ泳動されるが、シアン化物イオンとの錯形成反応により負の電荷をもつシアノ錯体に変換され、リー

ディング側に泳動される。リーディングイオンの濃度を 5 mM, pHを7.5としたとき、コバルト、銅、銀、亜鉛、カドミウム、水銀イオンの6種の重金属イオンがシアノ錯体として分離できる。移動度の近接する金イオン、銀イオンのシアノ錯体、及び移動度の大きなためにリーディングゾーンと混合ゾーンを形成するニッケル、白金、パラジウムのシアノ錯体の相互分離については、鉄(II)フェナントロリン錯体とのイオン対平衡を活用することで、相互分離が可能となった。用いたリーディング液は、塩酸-Tris緩衝溶液にイオン対形成試薬としてトリス(1,10-フェナントロリン)鉄(II)イオンを加え、リーディングイオン(Cl^-)のトータル濃度が6 mMとなるように調整した20%のアセトニトリル水溶液である。

第4章では、ターミナルイオンとの錯形成平衡を利用するカテコール誘導体の分離について述べた。カテコール類は中性領域において非イオン種として存在し、アルカリ性ではo-キノンを生成しやすく、いずれの領域においても通常それらの泳動分離は困難とされている。そこでカテコール類がホウ酸の共存下において負電荷をもつ化学種となることに着目して、カテコール類の分離のための泳動系を検討した。pH 7.5の塩酸-Tris緩衝溶液をリーディング液に、ホウ酸をターミナル液とする泳動系を用いたとき、ピロカテコール等の中性化学種とプロトカテキユ酸のような陰イオン性化学種を含む10種のカテコール類のうち、ピロカテコールとピロガロールは混合ゾーンを形成するが、これを含めて10種すべてが検出できた。pKa=8.4の4-クロロカテコールについてもその有効移動度を増大できた。これらの結果はターミナルゾーンが錯化剤であるホウ酸の供給源として機能し、カテコール類を泳動可能な陰イオン化学種に変換し、またそれらの移動度差拡大に有効に働いていることを示すものである。

第5章では、キャピラリーゾーン電気泳動法によるカテコールアミンの分離における分離能の改善手法について述べた。カテコールアミンの分離において、泳動系内のホウ酸との錯形成反応を導入することで分離能を大きく向上できた。カテコールアミン類の移動度差はホウ酸濃度の増加と共に大きくなる。この系では分離能を支配する因子として電気浸透流の大きさと方向が目的化学種の有効移動度に対して重要な支配因子となることに着目した。すなわち種々の炭素鎖の長さの異なる陽イオン界面活性剤の電気浸透流に対する影響について検討して、この電気浸透流を陽イオン界面活性剤によって制御することを試みた。200 mMのホウ酸、100 mMの水酸化カリウム、及び0.1 mM臭化テトラデシルトリメチルアンモニウムを含む溶液を泳動溶液としたと

き0.1 pmolレベルの10種のカテコールアミンを完全に分離することができ、陽イオン界面活性剤の添加により分解能を大きく向上できることを見いだした。

第6章では、陽イオン界面活性剤を用いる陰イオンのミセル動電クロマトグラフィーについて述べた。陰イオンとして無機陰イオン、及びフェニルカルボン酸イオンを取り上げ、陽イオン界面活性剤に塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC)を用い、これが陰イオンの移動度に与える影響について検討を行い、CTAC存在下での陰イオンの泳動機構に考察を加えた。すなわち、陰イオンの有効移動度のCTAC濃度依存性は、ヘミミセル形成によるキャピラリー壁との相互作用、陽イオン界面活性剤モノマーと陰イオンとのイオン対生成平衡、陽イオン界面活性剤ミセルへの分配平衡の三つの過程からなることを明らかにした。また、陽イオン界面活性剤存在下での陰イオンの泳動挙動を取り扱う基本的な方程式を導出し、この式に基づきイオン対生成定数、及びミセルへの分配係数を求めることができることを示した。

第7章では、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用いるミセル動電クロマトグラフィーにおいて、グルコースの添加が試料の有効移動度差を拡大し、ヌクレオシドの分離能が大きく改善できることを示した。すなわちSDSの臨界ミセル濃度はグルコース濃度の増加と共に減少し、これに伴いミセルの見かけの移動度が小さくなり、ヌクレオシドの有効移動度差が広がることと考えられた。さらに溶質のミセルへの分配に与えるグルコースの影響を検討するため、種々の官能基を持つ化合物を用いてそれらのミセルへの分配係数を測定し、グルコース濃度の増加と共に親水性官能基を持つ化合物の分配係数が選択的に減少することを明らかにした。これらの知見からグルコースの添加は親水性化合物や疎水性の大きな化合物の分離選択性を改善する為の有効な手法であることが示された。

第8章では、本研究で得られた成果を総括した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 多賀光彦
副査 教授 梅澤喜夫
副査 教授 中村博
副査 教授 佐々木陽一

学 位 論 文 題 目

新しい移動度制御手法に基づくキャピラリー電気泳動分離に関する研究

本論文はキャピラリー電気泳動法に、新しい移動度制御手法を導入して、高精度、高分離能を有する泳動系を開発すると共に、それら系内での泳動機構に関しても解明しようとしたものである。

本論文は、8章からなる。申請者はまず、第1章において、キャピラリー電気泳動法の問題点を指摘しつつ、本研究の目的を述べている。

第2章では、キャピラリー電気泳動法に分類される等速電気泳動法、キャピラリーゾーン電気泳動法、並びにミセル動電クロマトグラフィーについて概説している。

第3章では、等速電気泳動法における泳動系として、ターミナルゾーンを錯化剤供給源とする新しい泳動系を開発し、コバルト、銅、銀、亜鉛、カドミウム、水銀イオンの6種の重金属イオンをシアノ錯体として分離することに成功している。その際、移動度の近接する金イオン、銀イオンのシアノ錯体、及び移動度が大きいためリーディングイオンと混合ゾーンを形成するニッケル、白金、パラジウム-シアノ錯体については、鉄(II)フェナントロリン錯体とのイオン対平衡を活用することで、それらの相互分離法を完成させている。

第4章では、ターミナルイオンとの錯形成平衡を利用するカテコール誘導体の分離について述べている。カテコール類は中性領域において非イオン種として存在し、アルカリ性では o -キノンを生成しやすく、いずれの領域においても通常それらの泳動分離は困難とされている。申請者はカテコール類がホウ酸と負電荷をもつ錯体を生成す

ることに着目して、ホウ酸をターミナル液とし、塩酸-Tris緩衝溶液をリーディング液とする泳動系を開発し、ピロカテコール等の中性化学種とプロトカテキユ酸のような陰イオン性化学種を含む10種のカテコール類について、泳動分離が可能であることを示している。

第5章は、キャピラリーゾーン電気泳動法の分離能改善に関するもので、カテコールアミンを対象として検討を行っている。この手法において、泳動系内でのホウ酸との錯形成反応の活用がカテコールアミンの分離能を大きく改善することを明らかにしている。次いでこの系では電気浸透流の大きさと方向が目的化学種の有効移動度に対して重要な支配因子となることに着目し、炭素鎖の長さの異なる種々の陽イオン界面活性剤による電気浸透流の制御法を詳しく検討して、0.1 pmolレベルの10種のカテコールアミンの完全分離法を確立している。

第6章では、陽イオン界面活性剤を用いる陰イオンのミセル動電クロマトグラフィーについて述べている。陰イオンとしては無機陰イオン、及びフェニルカルボン酸イオンを、陽イオン界面活性剤には塩化セチルトリメチルアンモニウム(CTAC)を用いて、CTAC存在下での陰イオンの泳動挙動とその機構に関して詳細な考察を行っている。すなわち、陰イオンの有効移動度のCTAC濃度依存性は、ヘミミセル形成によるキャピラリー壁との相互作用、陽イオン界面活性剤モノマーと陰イオンとのイオン対生成平衡、陽イオン界面活性剤ミセルへの分配平衡の三つの過程からなることを明らかにした。次いで、陽イオン界面活性剤存在下での陰イオンの泳動挙動を取り扱う基本的な方程式を導出し、この式がイオン対生成定数、及びミセルへの分配係数の測定に有用であることを示した。

第7章は、ドデシル硫酸ナトリウムを用いるミセル動電クロマトグラフィーに関するもので、グルコースの添加によって試料化学種間の有効移動度差が拡大でき、各種スクレオシドの分離能を大きく改善できることを見いだしている。またこの効果に関し、グルコースの添加により親水性官能基を持つ化合物の分配係数が選択的に減少することを明らかにした。これらはグルコースの添加が親水性化合物や疎水性の大きな化合物の分離能、選択性の改善に極めて有効な手法であることを示すものである。

第8章では、本研究で得られた成果を総括している。

以上申請者はキャピラリー電気泳動法において、種々の新しい移動度制御手法を開発すると共にその泳動機構を解明している。これら一連の成果は、この分野における研究の発展に寄与するところ大である。参考論文は11編あり、いずれも国内外の権威ある英文誌に掲載されたものである。ここに審査員一同は、最終試験の結果とを合わせ、申請者が博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有すると認定した。