

博士（地球環境科学） 森 勝 伸

学位論文題名

Study on improvement of resolutions  
in capillary electrophoresis using novel additives

(新規添加剤を用いるキャピラリー電気泳動法における分離能改善の研究)

学位論文内容の要旨

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

本論文は、7章から構成されている。第1章は、キャピラリー電気泳動(CE)が有する特徴、現在までに至る歴史そして分析分野における位置付けを示した。さらに、CE が抱える未解決な問題と幅広い分析試料に対する分離改善の必要性を背景に、本研究が行ってきた研究の目的とその概要について述べている。第2章は、CE の分離原理、そして解析方法について、本法で用いた泳動系を中心簡潔にまとめた。第3章は、両性イオン界面活性剤を用いたキャピラリー内壁表面上へのタンパク質の吸着抑制効果について検討し、その応用についても述べている。第4章は、両性イオン界面活性剤が持つ無機陰イオンに対する分配作用の検討と、その応用として唾液と海水に含まれる無機陰イオンの分離定量について示している。第5章は、負電荷を有するシクロデキストリンを用い、中性化学種であるアルキルフェノール類およびビスフェノール類の分離挙動について調べた。第6章は、本研究において合成した陽イオン性ジアザクラウンエーテルが持つ選択性を、位置異性体陰イオンの分離分析を通して考察している。第7章は、総括であり、本論文の主な結果と知見をまとめた。以下、第3章から6章までの概要を述べる。

第3章では、キャピラリー内表面上へのタンパク質の吸着を抑制するための修飾剤の検討を行った。陰イオン性、陽イオン性、非イオン性そして両性イオンの界面活性剤と、ポリビニルアルコールのような親水性ポリマーをそれぞれ泳動溶液に添加し、糖タンパク質のアビジンとその関連物質を含む六種類のタンパク質の分離挙動について調べた。結果として、両性イオン界面活性剤の利用は、pH5~9 の比較的広領域において、ピーク理論段や泳動時間の再現性において最も優れていることがわかった。また、この泳動系を用い、さらに電解質溶液

にアビジン-色素(HABA)の複合体を添加し、アビジンに対する HABA とビオチンとの交換反応を利用した、ビオチンのオンライン高感度分析を行った。その結果、カラム内での交換反応によるビオチンのピークが試料濃度に依存しながら増大することがわかり、ビタミン剤中のビオチンの定量を簡便に行うことができた。

第4章では、無機陰イオンに対する両性イオンミセルと分配作用に注目し、唾液中及び海水中の無機陰イオンの成分分析を行った。基礎実験として、両性イオンミセルの濃度に対する無機陰イオンの移動度の変化を調べたところ、水和度が小さく、極性の大きいチオシアノ酸イオンが最も大きな移動度の変化を与えた。このミセルはタンパクの吸着抑制効果もあることから、除タンパク質前処理なしの唾液試料を用い、亜硝酸、硝酸そしてチオシアノ酸イオンのベースライン分離が達成された。また、これらの定量結果から、喫煙者のチオシアノ酸イオンの濃度は、非喫煙者のそれの2倍～10倍近く検出されることもわかった。さらに高塩濃度を含む海水の分析では、通常の電気泳動において、キャピラリーの電流値の上昇に伴うベースラインの大きな乱れが観察されるが、両性イオンミセルの添加は、電流値の急激な上昇を抑え、海水中の臭素と硝酸イオンの分離定量を簡便に行うことができた。

第5章では、主に光学異性体分離に利用されるスルホン化β-シクロデキストリン(SCD)を長鎖の異なるアルキルフェノール類とビスフェノール類の分離能改善のために用いられた。イオン性修飾剤が添加されていない場合、フェノール類は電気的中性であるため、EOFと同じ速度で泳動され、分離はほとんど達成されなかった。一方、SCDの添加は、包接された中性分子が負電荷を有することになり、EOFよりも遅れて検出される。また、その結合作用は、試料の疎水度、分子サイズあるいは官能基の位置によっても異なるため、フェノール同士の分離能改善だけでなく、ノニルフェノールの構造異性体分離も、大幅に改善することができた。

第6章では、12-crown-4と18-crown-6の類似体からなる2種類の陽イオン性ジアザクラウンエーテルの新規CE添加剤としての可能性を調べた。その第1段階として、位置異性体をもつ2価の芳香族陰イオンの分離能改善について検討した。ジアザクラウンの添加は、3種のフタル酸類、2種のナフタレンジカルボン酸類そして3種のナフタレンジカルボン酸類、計8種の異性体の完全分離を2mM以下の低濃度で達成することができた。また、これら陰イオンの分離挙動あるいは移動度に対する影響は、いずれも環サイズの小さいジアザクラウンが優れていることがわかった。この実験で示された陰イオンの移動度は、主にクラウン分子内の陽イオンとのイオン対生成の差によって制御されているものと考えられる。さらに、イオン対生成定数の算出から、スルホン酸基を有する陰イオンの方が、カルボキシル基を有する陰イオンよりも強い結合性があることがわかった。これにより、陽イオン性ジアザクラウンが位置異性体分離に対する優れた選択的添加剤として利用できるものと考えられる。

以上、本研究では、CEでは比較的困難とされていくつかの試料を対象とし、分離能を改善するための新規添加剤を導入した泳動システムを開発し、それらの分離分析に適応した。その結果、簡便な泳動系でありながら、それぞれ分離能を改善することができ、一部は実試料への応用分析も可能とした。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 田中俊逸  
副査教授 長谷部清  
副査教授 中村博  
副査教授 坂入信夫

## 学位論文題名

### Study on improvement of resolutions in capillary electrophoresis using novel additives

(新規添加剤を用いるキャピラリー電気泳動法における分離能改善の研究)

キャピラリー電気泳動(CE)は、内径 100 $\mu\text{m}$ 以下のキャピラリー管内に電解質溶液を満たし、その両端に高電圧を印加し、電気泳動する分析法であり、高理論段・高分離能を示す分離分析法として注目されている。しかし、実試料分析への適応のためには、解決しなければならないいくつかの問題点がある。例えば、生体試料を対象とする場合、溶融シリカ製キャピラリーの内壁表面が負に帯電しているため、塩基性タンパク質との強い静電吸着が発生したり、工業廃棄物や環境ホルモンといった有機汚染物質には、多くの構造・位置異性体が含まれるため、通常の CE 法では、分離分析が困難なことが多い。それゆえ、本研究では、これらの問題を解決するため、主に新規添加剤を導入することで、新たな泳動系の開発を行い、それらの分離に関する最適化を計った。

本論文は、7 章から構成されている。第 1 章は、CE が有する特徴、現在までに至る発展の歴史と CE の分析分野における位置付けを示した。さらに、CE が抱える未解決な問題と、幅広い分析試料に対する分離改善の必要性に関する背景を示すとともに、本研究が目指す目的と研究概要について述べている。第 2 章は、CE の分離原理、そして解析方法について、本法で用いた泳動系を中心に簡潔にまとめられている。

第 3 章では、キャピラリー内壁表面上へのタンパク質の吸着を抑制するための修飾剤の検討を行った。種々のイオン性界面活性剤と親水性ポリマーをそれぞれ泳動溶液に添加し、電荷の異なる 6 種類のタンパク質の分離挙動について調べた。結果として、両性イオン界面活性剤(Zwittergent-3-14)の利用が、ピークの高い理論段数を保持するとともに、泳動時間の再現性が広い pH 範囲においても保たれることができた。さらに、この泳動系にアビジン-色素(HABA)の複合体を添加し、アビジンに対する HABA とビオチンとの交換反応を利用した、ビオチンのオンライン高感度分析法を開発した。その結果、カラム内での交換反応によるビオチンのピークが試料濃度に依存しながら増大することが分かり、多くのマトリックスを含むビタミン剤中のビオチンの定量を簡便に行うことができた。

第4章では、両性イオンミセル(Zwittergent-3-14)への無機陰イオンの分配作用に注目し、唾液及び海水中の無機陰イオンの分離定量を行った。両性イオンミセルの濃度に対する無機陰イオンの移動度の変化を調べたところ、水和度が小さく、極性の大きいチオシアノ酸イオンが最も大きな移動度の変化を与えた。このミセルはタンパク質の吸着抑制効果もあることから、ヒト唾液試料中に含まれる亜硝酸、硝酸そしてチオシアノ酸イオンの分離定量を除タンパク前処理なしで行うことができた。これらの定量結果から、喫煙者のチオシアノ酸イオンの濃度は、非喫煙者の2倍～10倍高く検出されることも分かった。さらに高塩濃度を含む試料では、通常のCEにおいて見られる急激な電流値の上昇に伴うベースラインの乱れが、両性イオンミセルの添加によって抑えられ、海水中の臭素と硝酸イオンの分離定量を希釈なしで直接分析することができた。

第5章では、スルホン化シクロデキストリン(SCD)を長鎖の異なるアルキルフェノール類とビスフェノール類の分離能改善のために用いた。SCDがない場合、フェノール類は電気的中性であるため、EOFと同じ速度で泳動され、分離は困難であったが、SCDの添加により、中性分子を負に帯電させ、EOFよりも遅れて検出するとともに、各アルキルフェノールのシクロデキストリンとの包接作用の差に基づいて分離が達成された。この泳動系での結合作用は、試料の疎水度、分子サイズあるいは官能基の位置によって異なるため、フェノール類の分離能改善とともに、ノニルフェノールの構造異性体分離も、大幅に改善することができた。

第6章では、12-crown-4と18-crown-6の類似体からなる2種類の陽イオン性ジアザクラウンエーテルの新規CE添加剤としての可能性を調べた。位置異性体を持つ2価の芳香族陰イオンの分離能改善について検討した結果、ジアザクラウンの添加は、3種のフタル酸類、2種のナフタレンジカルボン酸類、そして3種のナフタレンジカルボン酸類の計8種類の位置異性体陰イオンを、2mM以下の低濃度で完全分離することができた。また、これら陰イオンの分離挙動あるいは移動度に対する影響は、いずれも環サイズの小さいジアザクラウンが優れていることが分かった。この実験で示された陰イオンの移動度は、主にジアザクラウン分子内の陽イオンとのイオン対生成の差によって制御されているものと考えられる。イオン対生成定数の算出から、スルホン酸基を有する陰イオンの方が、カルボキシル基を有する陰イオンよりも強い結合性があることが示された。また、分子動力学計算から、第4級アンモニウムイオンのN<sup>+</sup>–N<sup>+</sup>間の距離よりも、位置異性体の官能基のO–O間の距離が2Å長いときに最も大きい相互作用を示すことが分った。陽イオン性ジアザクラウンエーテルによって得られた分離能は2個の第4級アンモニウムイオンを持つ直鎖型のものよりも優れ、特に分離の困難だったフタル酸類の完全分離を可能とした。これにより、陽イオン性ジアザクラウンが位置異性体分離に対する優れた選択的添加剤として利用できるものと考えられる。

以上、本研究では、CEでは比較的困難とされていたいくつかの試料を対象とし、分離能を改善するための新規添加剤を導入した泳動システムを開発し、それらの分離分析に応用した。その結果、簡便な泳動系でありながら、それぞれの分離能を大幅に改善するとともに、一部は実試料への応用分析をも可能とした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。