

Webで学ぶ

【入門】 キャピラリー電気泳動

本資料の掲載情報は、著作権により保護されています。本情報を商業利用を目的として、販売、複製または改ざんして利用することはできません。

大塚電子株式会社

- 大阪本部
- 東京支店
- 東北営業所
- 東海営業所
- 九州営業所

〒540-0021 大阪市中央区大手通三丁目1番2号 エスリードビル大手通6F
〒192-0082 八王子市東町1-6 橋完LKビル4F
〒980-0021 仙台市青葉区中央2-2-10 仙都会館5F
〒460-0008 名古屋市中区栄3-2-3 名古屋日興証券ビル4F
〒810-0001 福岡市中央区天神1-9-17 福岡天神フコク生命ビル15F

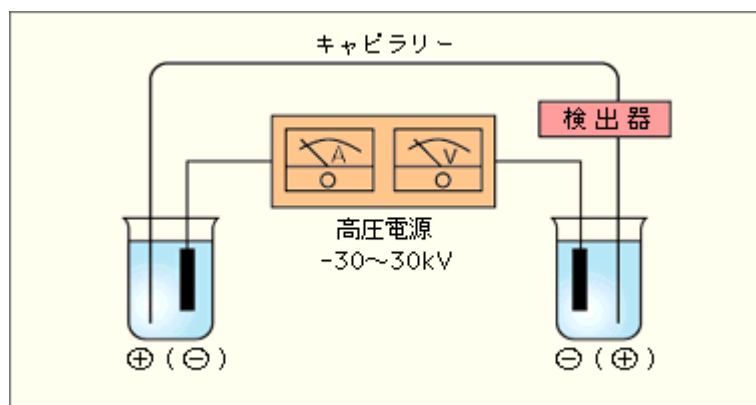
TEL.(06)6910-6522
TEL.(042)644-4951
TEL.(022)208-9645
TEL.(052)269-8477
TEL.(092)717-3338

ホームページ <http://www.otsukael.jp>

【入門】キャピラリー電気泳動

1.キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis: CE) とは？

シリカ製の中空キャピラリー（内径 $100\mu\text{m}$ 以下；長さ約 80cm ）内に緩衝液 (buffer) を満たします。キャピラリーの片端に、極微量の試料を加えてから、両端に電圧 ($-30\sim+30\text{kV}$) を掛け、電気泳動をおこないます (図1)。



【 図 1 】

移動速度は、試料成分毎に、荷電、大きさ、形といった特性の違いにより、多くの場合に差異があります。このために、多様な試料成分を分離することができます。キャピラリーの他端で、移動してくる試料成分を検出します。種々様々な検出方法が使用されていますが、もっとも基本的であるのは吸光度測定であり、フォトダイオードアレイあるいはフォトマルで検出が行われています。電場を掛け始めてから検出されるまでの時間、ピークの高さ・面積、そして吸光スペクトルにより、各成分の定性・定量が可能です。

試料の分離が起こる原因は様々であり、キャピラリー電気泳動では、それらを巧みに使い分けて、活用しています。試料成分のどのような特性に主として着目するかによって、キャピラリー電気泳動を、五種の方式に大別することができます。それぞれにおいて、着目する特性は、電気泳動 (electrophoresis)、動電クロマトグラフィー (electrokinetic chromatography)、分子ふるい (molecular sieving)、等電点 (isoelectric point)、等速電気泳動 (isotachopheresis) です。

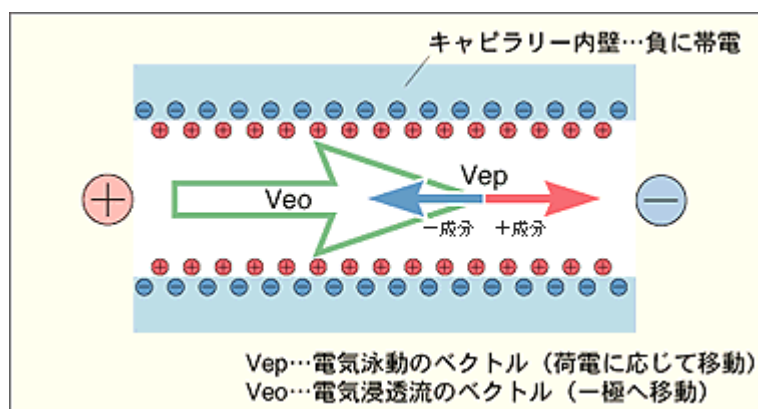
2.キャピラリー電気泳動における分離方式

(1) 電気泳動

キャピラリー内に緩衝液を満たし、一端から試料を注入し（通常はプラス極側）、両端に電場をかけます。その名の通り、もっとも基本的な方式です。この方式を、自由ゾーン電気泳動 (free zone capillary electrophoresis) と呼ぶことがあります。他の介在物のない緩衝液、つまり自由溶液 (free solution) を

【入門】キャピラリー電気泳動

媒体とするので、この名前が使われるのです。他の方式は、これに色々手を加えて生まれてきたと、云えるでしょう。試料各成分はその電気泳動移動度に応じた速度で移動します。これが電気泳動です。正に荷電した成分はマイナス極側へ、負に荷電した成分はプラス極へと移動します。プラス極側に試料を添加したら、負に荷電した試料成分は、キャピラリーから出てしまうと、心配されることでしょう。でも、大丈夫です。シリカ製のキャピラリーを用いていますと、表面の負荷電が原因して、電気浸透流という流れが、常にマイナス極側に流れています（図2）。



【 図 2 】

それは、随分と速い流れで、負荷電を持っているものでも、それに逆らってプラス極側に移動できるものは、滅多にありません。試料成分は、電気泳動による移動速度 (V_{ep}) と電気浸透による移動速度 (V_{eo}) のベクトル和で移動するのです。絶対値について、 $V_{eo} < V_{ep}$ となることは稀ですから、試料は荷電の正負に関わりなく、全てがマイナス極側に移動して、検出されます。無機から有機にわたる様々なイオンの分析に、広く活用されています。高分子化合物では、蛋白質への適用がもっとも成果を挙げています。核酸や合成高分子電解質は、電気泳動において特殊な振る舞いを示すので、必ずしも高い分離能が期待できません。それらへの、この方式の適用にあたっては、注意が必要です。

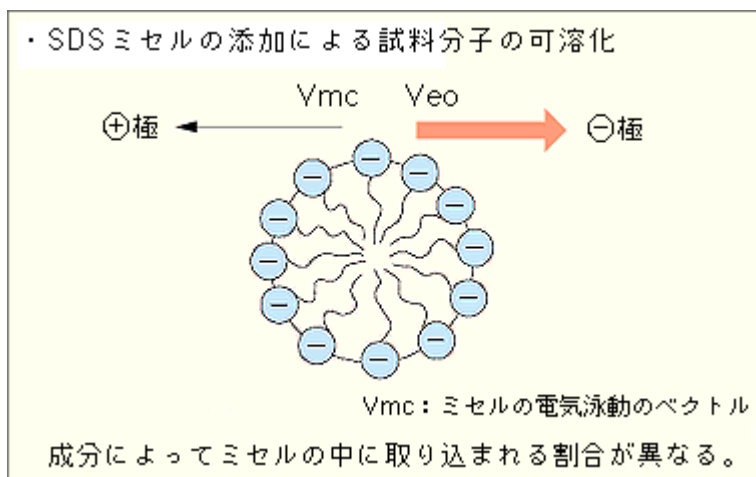
(2) 動電クロマトグラフィー

電氣的に中性である複数の成分が試料中に存在している場合には、それらを電気泳動で分離することは不可能でした。しかし、巧妙な方式が工夫されて、本来は電気泳動しない試料もキャピラリー電気泳動の対象になる局面が開かれました。

硫酸ドデシルナトリウム（ドデシル硫酸ナトリウムと呼ばれることが多く、SDSと略称されています）は代表的な陰イオン性界面活性剤です。その陰イオンは、ある濃度（限界ミセル濃度（critical micelle concentration: CMC））以上になると100個近くが会合して、ミセルと呼ばれる負に荷電した集合体を形成します。

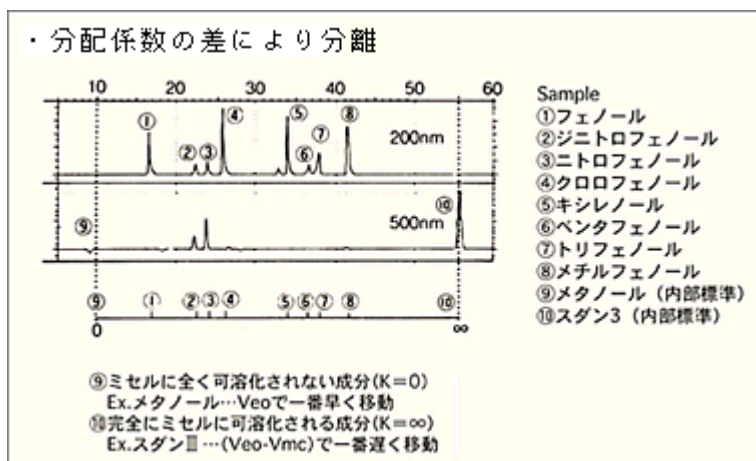
【入門】キャピラリー電気泳動

キャピラリー電気泳動において、緩衝液にSDSをCMCを充分に超える濃度になるように加えておきます。ミセルは、プラス極側に V_{mc} （符号マイナス）の速度で移動しようとはしますが、速度が V_{eo} の電気浸透流に逆らいきれず、マイナス極側に $V_{eo} + V_{mc}$ の速度で移動して行きます。SDSミセルは、様々な物質を捉えます。すべてが、ミセルに取り込まれる成分は、ミセルと行動を共にするので、もっとも長い時間を要して、検出部にたどり着くでしょう。他方、まったくミセルに取り込まれない成分は、電気浸透流と同じ速度で移動して、比較的速やかに検出部に到着して行きます（図3）。



【 図 3 】

つまり、試料成分はミセルへの親和性、言い換えれば分配係数、が低いものから高いものへと、順番に分離されて検出されることとなります。一群のフェノール類の混合物を試料としますと、見事に各成分が分離されます（図4）。



【 図 4 】

【入門】キャピラリー電気泳動

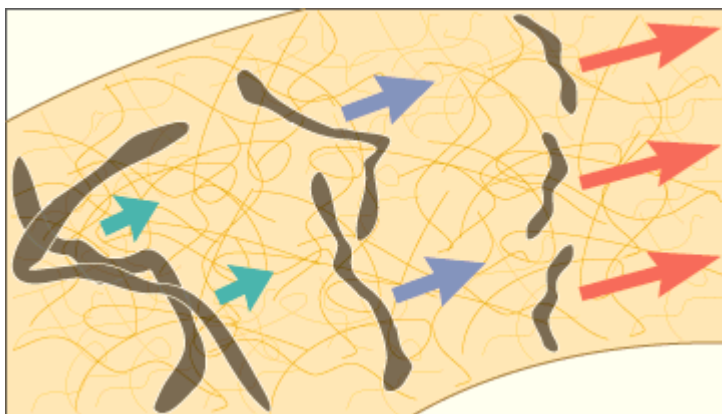
ミセルに親和性の高いものといえば、親油性のもの、あるいは両親媒性のものがあります。クロマトグラフィーにおいては、移動相と固定相のあいだの分配係数の差異にもとづいて、試料成分を分離しています。上記の場合には、ミセルは固定されてはいませんが、擬似的な固定相と見なすことができます。それで、電気泳動の一種ではありますが、この方式にはミセル動電クロマトグラフィーという名称が使われています。動電という用語は聞き慣れないと感じる方も多いでしょう。これは、電気浸透が動電現象と呼ばれるものの一種であることに、由来しています。

ここでは、荷電のないものを取り上げて話を進めてきましたが、荷電を持っていても、ミセルに親和性があれば試料になりうるでしょう。ただし、この種のもの、取り込まれるとミセルの電気泳動挙動を左右するので、副次的な要素が加わることは、承知しておかねばなりません。SDS 以外の界面活性剤を用いる、あるいは二種類以上の界面活性剤を用いることによって、ミセル動電クロマトグラフィーに、色々の変種を導入できます。

(3) 分子ふるい

今日、数ある電気泳動法のなかで最も多くの人々に使用されているのは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動です。ゲル電気泳動においては、分子のサイズが大である程、ゲルの網目構造より受ける抵抗が大きいため、遅く電気泳動されます。これを、分子ふるい(molecular sieving) 効果と呼んでいます。この結果、本来の自由溶液中の電気泳動と比較すると、試料各成分のサイズに関して著しく敏感な分離を行うことができます。

ポリアクリルアミドゲルを形成させる場所をキャピラリー内に替えると、この高い分離能をキャピラリー電気泳動に持ち込むことができます(図5)。



【 図 5 】

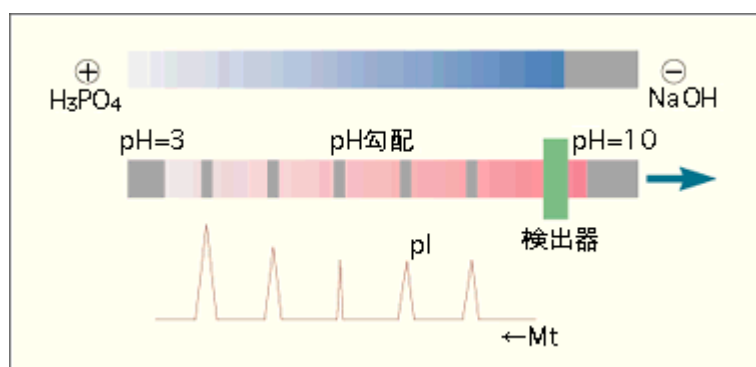
【入門】キャピラリー電気泳動

キャピラリーゲル電気泳動 (capillary gel electrophoresis) が、それです。キャピラリー電気泳動の利点の一つは、媒体を自由に詰め替えることです。しかし、ゲルを形成してしまうと、詰め替えはできません。しかも、ゲルの性能は急速に劣化するので、繰り返し使用には不向きです。

ところで、高分子溶液は、“分子ふるい”としてゲルに類似した機能を果たすことができます。キャピラリー中では、対流が起こり難いので、高分子溶液がゲルの代役を立派に果たすことができます。条件の設定次第では、高分子溶液には代役以上の働きさえも、期待することができます。この方式はキャピラリー高分子溶液電気泳動 (capillary polymer solution electrophoresis) と呼ぶべきでしょうか。

(4) 等電点

キャピラリー内に、様々な等電点を持つ両性電解質 (ampholyte) と試料の混合物を満たします。プラス極は酸に浸します。それは、両性電解質の中で最も等電点が低いものより、さらに酸性の強いものでなければなりません。マイナス極には、塩基を満ちさせます。こちらでは、最も等電点の高い両性電解質よりも塩基性が強いことが、求められます。両電極に電場を掛けると、酸性のものはプラス極へ、塩基性のものはマイナス極に泳動します。これは、添加した両性電解質と試料成分の何れについても云えることです。やがて、各両性電解質と試料各成分は自己の荷電がゼロになる pH の位置で停止します。この様にして、試料各成分を、それらの等電点に基づいて分離することが可能です (図6)。



【 図6 】

試料各成分を含む媒体は、はキャピラリー内に止まります。そこで、媒体をポンプを用いて押し出す、あるいはプラス極側の電極液をマイナス極側のそれに替える、あるいは逆を行って、媒体の pH を変化させて、試料各成分を電気泳動によって移動させる、といった処置によって、検出が行われます。この方式は、タンパク質あるいはペプチドの混合物を対象として行われることが多いようです。種類によって、種々様々な等電点を持つ点では、タンパク質やペプチドの右に出るものはありません。分離ばかりでなく、タンパク質の等電点の決定にも活用されています。

【入門】キャピラリー電気泳動

(5) 等速電気泳動

試料混合物の前端に何れの成分よりも速やかに電気泳動するイオンを含む媒体、後端に逆の性格の媒体、試料液は両者の中間という設定で電気泳動を行います。最終的には、電気泳動移動度を異にする試料成分は、それらの絶対値が大なものから順に並んで、同じ速度で移動することになります。条件を選ぶことによって、目的の成分を濃縮する、あるいは成分間に一種のスペーサーを配置して分離の効率を高めることができます。

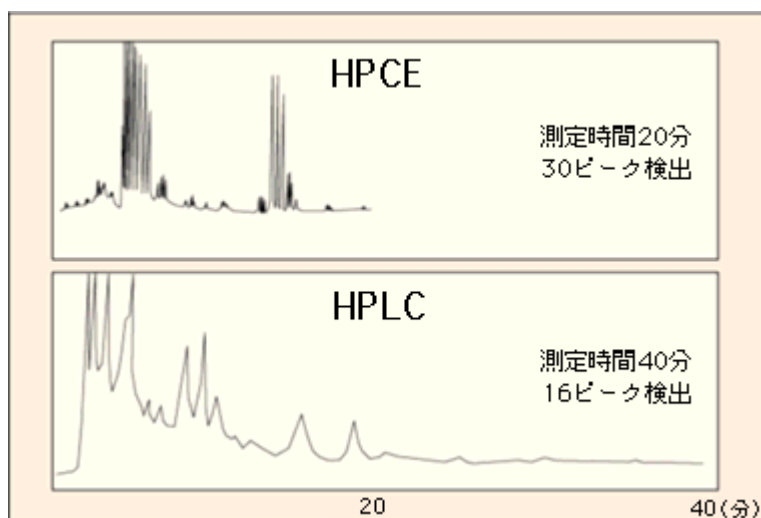
3. キャピラリー電気泳動のメリットは？

キャピラリーは細い管です。その管の内部で電気泳動をおこなうため、サンプルは少量ですみます。また、高電圧をかけることができるため、短時間に高分離能で測定が可能という特長を持っています。他の分離分析法と比較しても、多くのメリットを持っています。例えば、

1. 前処理の簡略化
2. 同一サンプル中の陽イオン・陰イオンの連続分析可能
3. 多モード連続自動分析可能

などです。加えて、高価な有機溶媒を使用しないため経済的であり、廃液処理の問題も非常に少なくすみます。

■ 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）との比較



【 図 7 】 漢方薬の分析

【入門】キャピラリー電気泳動

	HPCE	HPLC
測定時間	短い	長い
分離能（理論段数）	数千～数万	数千～数百万
最小試料量	数 μL ～	数 mL～
インジェクト量	4nL～	数 μL ～
溶離液	少量（緩衝液）	多量（溶媒）

■ イオンクロマトグラフィー（IC）との比較

	HPCE	IC
測定時間	陰イオンで 2～8 分	陰イオンで 5～30 分
前処	右欄のような前処理は不要	妨害有機物、カウンタイオンの除去 カラム保護のための前処理を要する場合もある
陰イオン・陽イオン同時分析	緩衝液、印加極性切り換えで 容易に可能	不可 カラム交換が必要
一価・二価陽イオン分析 遷移金属・希土類分析	緩衝液切り換えで容易に可能	溶離液、カラム、検出器などの交換が必要
ランニングコスト	緩衝液の使用量が少ないので経済的	溶離液の使用量が多い (1～2mL/min)

<関連製品>



キャピラリー電気泳動システム Agilent7100

高分離能・短時間・微量分析を実現するキャピラリー電気泳動システムです。