

1 キャピラリー電気泳動法 (G3-7-190)

2 次のように改める.

3 本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。
 4 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医
 5 療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

6 1. 基本原理

7 キャピラリー電気泳動法は、キャピラリー内の電解質液中に
 8 存在する荷電した分析対象物が直流電場の影響下で移動するこ
 9 とに基づいた物理的な分析技術である。

10 電場 E における移動速度は、分析対象物の電気泳動移動度と
 11 キャピラリー内の緩衝液の電気浸透移動度により決まる。電気
 12 泳動移動度 μ_{ep} は物質の特性(電荷, 分子の大きさ)と緩衝
 13 液の特性(電解質の種類とイオン強度, pH, 粘性及び添加剤)
 14 に依存する。球形を想定した物質の電気泳動速度 v_{ep} は、次式
 15 により与えられる。

$$16 \quad v_{ep} = \mu_{ep} E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left(\frac{V}{L} \right)$$

17 q : 物質の有効電荷
 18 η : 電解質溶液の粘度
 19 r : 物質のStokes半径
 20 V : 電圧
 21 L : キャピラリーの全長

22 緩衝液で満たされたキャピラリーに電圧を印加すると、電気
 23 浸透流(EOF)と呼ばれる電解質溶液の流れがキャピラリー内に
 24 発生する。EOFの速度はキャピラリー内壁の電荷密度及び緩
 25 衝液の特性に依存する電気浸透移動度 μ_{eo} により決まる。電気
 26 浸透速度 v_{eo} は次式により与えられる。

$$27 \quad v_{eo} = \mu_{eo} E = \left(\frac{\epsilon \zeta}{\eta} \right) \left(\frac{V}{L} \right)$$

28 ϵ : 緩衝液の誘電率
 29 ζ : キャピラリー内壁のゼータ電位

30 物質の移動速度(v)は次式により与えられる。

$$31 \quad v = v_{ep} + v_{eo}$$

32 分析対象物の電気泳動移動度と電気浸透移動度は物質の電荷
 33 により、同方向又は反対方向に働く。通常のキャピラリー電気
 34 泳動法では陰イオンはEOFと逆方向に泳動され、移動速度は
 35 EOFより遅い。陽イオンはEOFと同方向に泳動され、移動速
 36 度はEOFより速い。物質イオンの電気泳動速度と比べて速い
 37 EOFが存在する条件下では、陽イオン、陰イオンの両者を一
 38 斉分析することが可能である。

39 キャピラリーの試料導入末端から検出部までの距離(有効長,
 40 l)を物質が移動するのに要する時間(t)は、次式により与えられ
 41 る。

$$42 \quad t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l \times L}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) V}$$

43 通常、内面未処理のフューズドシリカキャピラリーは、pH

44 3以上で内壁に存在するシラノール基が解離することにより負
 45 電荷を帯びる。その結果、陽極側から陰極側へと向かうEOF
 46 が発生する。物質の移動速度において高い再現性を得るため
 47 は、分析間でEOFを一定に保つことが推奨される。分析の目
 48 的によっては、キャピラリー内壁を修飾したり、緩衝液の濃度、
 49 組成及びpHを変えたりすることによりEOFを抑制することが
 50 必要な場合がある。

51 試料導入後、試料中の各分析対象イオンは、それぞれのゾー
 52 ンとして電気泳動移動度に応じて電解質内を移動する。ゾー
 53 ンの拡散、すなわちそれぞれの物質バンドの広がりには様々な現象
 54 によって起こる。理想的な条件では物質ゾーンの広がりに対す
 55 る唯一の原因はキャピラリー軸方向への物質の分子拡散(軸方
 56 向拡散)である。理想的な場合のゾーンの分離効率、理論段
 57 数に相当する分離パラメーター N として次式により表される。

$$58 \quad N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times V \times l}{2 \times D \times L}$$

59 D : 電解質中での物質の分子拡散係数

60 実際には、熱放散、キャピラリー内壁への試料成分の吸着、
 61 試料と緩衝液間の導電率の不均一性、試料プラグの長さ、検出
 62 セルのサイズ、泳動液槽の水位差なども、ゾーンの広がりの方
 63 原因となりうる。

64 二つのバンド間の分離(分離度 R_s として表される)は、分析対
 65 象物の電気泳動移動度、キャピラリー内に発生する電気浸透移
 66 動度を変化させて各分析対象物ゾーンの分離効率を向上するこ
 67 とにより達成される。

$$68 \quad R_s = \frac{\sqrt{N} (\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

69 μ_{epa} 及び μ_{epb} : 分離した2種類の分析対象物の電気泳動移動
 70 度

71 $\bar{\mu}_{ep}$: 2種類の分析対象物の電気泳動移動度の平均

$$72 \quad \bar{\mu}_{ep} = \frac{1}{2} (\mu_{epa} + \mu_{epb})$$

73 2. 装置

74 キャピラリー電気泳動装置は下記のものから構成される。

- 75 (1) 電圧可変高電圧電源
- 76 (2) 規定の陽極液及び陰極液を入れ、同じ水位に保持された
77 二つの泳動液槽
- 78 (3) 泳動液槽に浸され、電源に接続した一対の電極(陽極と
79 陰極)
- 80 (4) 光学検出用ウインドウを設けた分離用キャピラリー(通
81 常フューズドシリカ製)。キャピラリーの両端は泳動液槽中に
82 置かれる。このキャピラリーは各条で規定する溶液で満たされ
83 る。
- 84 (5) 適切な試料導入システム
- 85 (6) 所定の時間にキャピラリーの検出部を通過する目的物質
86 の量をモニターできる検出器。通常、紫外可視吸光度測定法あ
87 るいは蛍光光度法によるが、分離目的によっては導電率測定、
88 電流測定又は質量分析による検出も有用である。紫外吸収や発
89 蛍光性を持たない化合物には間接検出法が用いられる。
- 90 (7) 再現性のよい分離が得られるようにキャピラリー内の温
91 度を一定に保つことのできる温度調節システムを備えることが
92 望ましい。

93 (8) データ処理装置

94 試料導入操作とその自動化は正確な定量分析のために重要で
95 ある。導入方法として、圧力導入法及び電氣的導入法がある。
96 電氣的に導入される各試料成分の量は、各々の電気泳動移動度
97 に依存し、この試料導入法の採否を決定する要素となる。

98 2.1. 圧力導入法

99 試料はキャピラリー両端の圧力差(Δp)によってキャピラリー
100 内に導入される。導入される試料量はハーゲン・ポワズイユの
101 式から算出できる。

$$102 \quad V_{inj} = (\Delta p d_i^4 \pi t_{inj}) / (128 \eta L)$$

103 t_{inj} : 導入時間

104 η : 緩衝液の粘性率

105 d_i : キャピラリーの内径

106 L : キャピラリーの全長

107 この式より、一定圧力ではキャピラリー全長が長くなると導
108 入量は減少する。一方、キャピラリーの内径(d_i)は導入量に大
109 きな影響を与え、キャピラリーの内径を二倍にすると、同じブ
110 ラグ長(l_{inj})とした場合には4倍量の試料を導入することになる。

$$111 \quad l_{inj} = (\Delta p d_i^2 t_{inj}) / (32 \eta L)$$

112 2.2. 電氣的導入法

113 この導入モードでは、キャピラリーに電場(E)を印加するこ
114 とで分析対象物を導入する。中性の分析対象物はEOFとともに
115 キャピラリーに移動し、帯電した分析対象物はそれぞれの電
116 気泳動移動度とEOF ($\mu_{ep} + \mu_{eo}$)によって移動する。分析対象
117 物の導入量はその見かけの移動速度に依存する。圧力導入法と
118 は対照的に、これこそが区別されるべき点であり、分析対象物
119 の濃度は導入後に変化するので、試料バイアルは一回しか使用
120 できないことになる。

121 各分析対象物の導入量(Q_{inj})は、次式から計算できる。

$$122 \quad Q_{inj} = (E k_b \mu_{app} t_{inj} \pi d_i^2 c_s) / 4 k_s$$

123 μ_{app} : みかけの電気泳動移動度(= $\mu_{ep} + \mu_{eo}$)

124 t_{inj} : 導入時間

125 k_b/k_s : 泳動液と試料の伝導率の比

126 c_s : 試料溶液中の分析対象物の濃度

127 ブラグ長 (l_{inj}) はキャピラリーの内径に依存せず、次式より
128 求められる。

$$129 \quad l_{inj} = E (k_b/k_s) \mu_{app} t_{inj}$$

130 25 μm 、50 μm 及び75 μm のフューズドシリカキャピラリー
131 の内径の許容誤差は、それぞれ $\pm 2 \mu\text{m}$ 、 $\pm 3 \mu\text{m}$ 及び $\pm 3 \mu\text{m}$ であ
132 る。

133 各条に規定されたキャピラリー、泳動液、キャピラリーの分
134 析前処理法、試料溶液及び分析条件を用いる。

135 泳動液は微粒子を除去するためのろ過及び気泡の発生を防ぐ
136 ための脱気を行い、検出が妨害を受けたり、分析中に通電が遮
137 断されたりしないようにする。物質の移動時間について、高い
138 再現性を得るためには、各分析法において厳密なキャピラリー
139 の洗浄手順を設定しておくべきである。

140 3. キャピラリーゾーン電気泳動法

141 3.1. 原理

142 キャピラリーゾーン電気泳動法では、対流を防ぐ支持体を含
143 まない緩衝液のみを満たしたキャピラリー内で分析対象物を分
144 離する。この方法では、試料中のそれぞれの成分が、異なる速
145 度で不連続のバンドとして移動することにより分離が起こる。
146 各バンドの移動速度はキャピラリー内での物質の電気泳動移動
147 度とEOFに依存する(1.基本原理参照)。キャピラリー内壁に吸
148 着しやすい物質の分離能を高めるために内面修飾されたキャピ
149 ラリーも使用できる。

150 本分離モードを用いて、低分子試料($M_r < 2000$)並びに高分
151 子試料($2000 < M_r < 100000$)を分析できる。キャピラリーゾ
152 ン電気泳動法の高い分離効率により、電荷とサイズの比が僅か
153 しか異ならない分子間の分離も可能となる。なお、ここでのサ
154 イズとは流体力学的な大きさあるいは体積を意味する。この分
155 離法ではキラルセクターを分離用緩衝液に加えることによっ
156 てキラル化合物の分離も可能となる。

157 3.2. 分離の最適化

158 複数のパラメーターが分離に大きく関与するので、分離条件
159 の最適化が複雑になる。分離法の開発で考慮すべき主要な因子
160 には、装置及び電解質溶液に関するパラメーターがある。

161 3.2.1. 装置に関するパラメーター

162 (1) 電圧 印加電圧及びキャピラリー温度の決定には、ジ
163 ュール熱プロットが有用である。分離時間は印加電圧に反比例す
164 る。しかし、電圧を上げると過剰な熱が発生し、キャピラリー
165 内部の緩衝液の温度が上昇して、粘度の勾配が生じる。結果と
166 してバンドが広がり、分離度を低下させる。

167 (2) 極性 電極の極性については通常電圧印加(試料導入
168 側が陽極、廃液側が陰極)で、EOFは陰極側へ流れる。極性を
169 逆にした場合にはEOFは廃液側から導入側へ向かって発生し、
170 EOFよりも大きな電気泳動移動度を持つ分析対象物のみが検
171 出部を通過する。

172 (3) 温度 温度の影響は、主に泳動液の粘度や導電率に表れ、
173 移動速度に影響を与える。場合によってはキャピラリー温度の
174 上昇がタンパク質の立体構造を変化させ、それらの移動時間や
175 分離効率が変化することもある。

176 (4) キャピラリー キャピラリーの寸法(長さ及び内径)は分
177 析時間、分離効率及び試料の導入量に影響を与える。全長の増
178 加は電場を減少(定電圧時)させ、有効長及び全長の増加により
179 移動時間が長くなる。所定の緩衝液と電場条件では、熱放散と
180 これに伴う試料バンドの広がりやキャピラリー内径により異な
181 る。また、使用する検出法にもよるが、内径が変わると試料導
182 入量が増えるため、検出限界にも影響を及ぼす。

183 キャピラリー内壁への試料成分の吸着が分離効率を低下させ
184 るため、分離法の開発において吸着を防ぐ方法を考慮する必要
185 がある。特にタンパク質を試料とする場合、吸着を防ぐ幾つか
186 の方法が工夫されている。その方法として緩衝液組成を工夫
187 (pHの調節や陽イオン性添加剤を内壁へ吸着)するだけでタン
188 パク質の吸着を防ぐ方法もある。その他、タンパク質と負電荷
189 を帯びたシリカ表面との相互作用を防ぐために、キャピラリー
190 内壁にポリマーを共有結合させて被覆する手法がある。この目
191 的のために、親水性の中性ポリマーや陽イオン性又は陰イオン
192 性ポリマーで化学修飾されたキャピラリーを入手することがで
193 きる。

194 3.2.2. 電解質溶液に関するパラメーター

195 (1) 緩衝液の種類と濃度 キャピラリー電気泳動法に適した
196 緩衝液は、使用するpH範囲内で適当な緩衝能を持ち、また、
197 電流発生を最少に抑えることができる移動度の低いものが良い。
198 緩衝液イオンの移動度を物質の移動度に合わせることができ
199 ると、ピーク形状のゆがみを最少にすることができる。分離効
200 率を高め検出感度を向上させるために、キャピラリー内におい
201 て試料ゾーンの収束を図る上で、試料溶媒の種類も重要である。
202 一定のpHにおいて緩衝液濃度を高くするとEOF及び物質の
203 移動速度は減少する。

204 (2) 緩衝液のpH 緩衝液のpHは、分析対象物や添加剤の電
205 荷及びEOFに影響するので、試料の分離に影響を及ぼす。タン
206 パク質及びペプチドの分離において、緩衝液のpHを物質の
207 等電点より高いpHから等電点より低いpHに変えることにより、
208 物質の正味の電荷が負から正に変化することになる。一般に、
209 緩衝液のpHを高めるとEOFは速くなる。

210 (3) 有機溶媒 物質又は泳動液添加剤の溶解度を高めたり、
211 試料成分のイオン化度を変えたりするために水性緩衝液に有機
212 溶媒(メタノール、アセトニトリルなど)を添加する場合がある。
213 一般に有機溶媒の緩衝液への添加はEOFを低下させる。

214 (4) キラル分離のための添加物質 鏡像異性体を分離するた
215 めには、泳動液にキラルセクターを添加する。最も一般的に
216 用いられるキラルセクターはシクロデキストリン類であるが、
217 クラウンエーテル類、多糖類若しくはタンパク質が使用される
218 場合もある。キラル認識はキラルセクターとそれぞれの鏡像
219 異性体との相互作用が異なることによるため、その分離度は用
220 いるキラルセクターの種類により著しく異なる。キラル分離
221 で分離度に影響を与えるそのほかの因子として、キラルセク
222 ターの濃度、緩衝液の組成とpH、及び分析温度がある。メタ
223 ノール又は尿素のような有機系添加剤の使用も分離度に影響を
224 与える。そのため、必要な分離を得るために、内腔の大きさの
225 異なるシクロデキストリン類(α -, β -, γ -シクロデキス
226 トリン)、中性基(メチル、エチル、ヒドロキシアルキルなど)又
227 はイオン性の極性基(アミノメチル、カルボキシメチル、スル
228 ホブチルエーテルなど)を持つシクロデキストリン類を用いる
229 ことができる。修飾シクロデキストリンを使用するとき、製品
230 間で修飾率にばらつきがあるため、キラル分離に影響を及ぼす
231 ことがあるので、注意する必要がある。

232 4. キャピラリーゲル電気泳動法

233 4.1. 原理

234 キャピラリーゲル電気泳動法は、分子ふるい効果を持つゲル
235 を充填したキャピラリー内でEOFが抑制された条件下で分離
236 が行われる。小さな分子は、大きな分子よりもゲルのネットワ
237 ーク内を自由に移動でき、より速く泳動されるため、電荷とサイ
238 ズの比が類似した分子は分子サイズに応じて分離される。キャ
239 ピラリーゲル電気泳動法は類似した電荷とサイズの比を持つ
240 生体高分子(例えばDNA断片及びSDS処理タンパク質)をそれ
241 らの分子の大きさに従って分離できる。

242 4.2. ゲルの特徴

243 二種類のゲルが用いられる。架橋型ゲルと直鎖ポリマー溶液
244 である。架橋型ゲルは、キャピラリー内でモノマーを重合させ
245 て調製する。通常ゲルはキャピラリー内壁と結合しているの
246 で、キャピラリーを破壊しない限り取り去ることはできない。ゲル
247 を還元条件下でタンパク質の分析に使用するとき、泳動液は

248 通常ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含み、分離前に試料を導
249 入する前にSDSと2-メルカプトエタノール又はジチオスレイ
250 トールの混液とともに加熱して変性させる。非還元的条件の分
251 析(例えば未変性の抗体)では、2-メルカプトエタノール及び
252 ジチオスレイトールを使用しない。架橋されたゲル中での分離
253 において(「3.キャピラリーゾーン電気泳動法」で述べたよう
254 に)、タンパク質の分離は泳動液の組成やゲル調製時のアクリ
255 ルアミドの濃度や架橋剤の比率を変更してゲルのポアサイズを
256 調節することによって最適化できる。一般に、ポアサイズが小
257 さい場合は物質の移動度も小さくなる。ゲルは強固なため試料
258 導入は電気的導入法を利用する必要がある。

259 直鎖ポリアクリルアミド、セルロース誘導体、デキストラン
260 など親水性ポリマーを含む直鎖ポリマー溶液を泳動液に加える
261 と分子ふるいとしても機能する分離媒体となる。これらの分離
262 媒体は、架橋されたポリマーと比べて調製が容易である。これ
263 らはバイアル中に用意し、キャピラリーに圧力によって充填す
264 ることができる。一般に試料導入ごとにゲルを交換することに
265 より分離の再現性は高くなる。高分子量のポリマー(一定の濃
266 度)を使うか、ポリマー濃度(一定の分子量)を低くすること
267 で、ゲルのポアサイズを大きくすることができる。ゲルのポア
268 サイズを小さくすると同一緩衝液では物質の移動度は小さくな
269 る。これらのポリマーは緩衝液に溶解しても粘性は低いので、
270 試料の導入は圧力導入法及び電気的導入法のいずれでも行える。

271 5. キャピラリー等電点電気泳動法

272 5.1. 原理

273 等電点電気泳動法では、分離緩衝液に溶解した広範囲の等電
274 点(pI)を持つ両性電解質(ポリアミノカルボン酸)により形成さ
275 れたpH勾配中で、試料分子はそれらの等電点に対応するpHに
276 達するまで電場の影響を受けて移動する。

277 等電点電気泳動法の三つの基本的なステップは、試料添加、
278 収束、必要ならばこれに移動が加わる。

279 (1) 試料添加 二つの方法を利用できる。

280 (i) ワンステップ添加：試料を両性電解質と混和し、加圧又
281 は吸引によりキャピラリーに導入する。

282 (ii) 連続的な添加：リーディング緩衝液、両性電解質、両性
283 電解質と混和した試料、両性電解質、最後にターミナル緩衝液
284 の順にキャピラリーに導入する。試料の導入量はpH勾配を乱
285 さないように少量を維持する。

286 (2) 収束 電圧を印加すると、両性電解質はそれぞれの電荷
287 により陰極あるいは陽極へと移動し、陽極(低いpH)から陰極
288 (高いpH)へpH勾配が形成される。同時に分離する成分は、そ
289 れらの等電点(pI)に対応するpHのところに移動し、収束する
290 と電流が著しく低下する。

291 (3) 移動 イメージングを用いない場合は、分離した成分の
292 バンドを検出部まで移動させる。三種の方法を利用できる。

293 (i) EOFにより収束中に成分移動が達成される。ただし、移
294 動中に成分が収束できるようにEOFを十分に小さくする必要
295 がある。

296 (ii) 収束終了後に検出器方向に加圧することにより移動させ
297 る。

298 (iii) 収束終了後に陰極又は陽極側の泳動液(移動させたい方向
299 により選択)に塩類を加えて電圧を印加するとキャピラリー中
300 のpHが変化し、成分が移動する。pHが変化するにつれてタン
301 パク質と両性電解質は塩類を加えた液槽の方向へ移動し、検出

302 器を通過する。

303 得られる分離はpH勾配($d\mu/dx$)、異なる等電点(pI)を持つ
304 両性電解質の数、分子拡散係数 D 、電場の強さ E 及びそのpHに
305 おける分析対象物の電気泳動移動度の変化($-d\mu/dpH$)から
306 ΔpI により表すことができる。

$$307 \Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D (d\mu/dx)}{E (-d\mu/dpH)}}$$

308 5.2. 最適化

309 分離条件を決定する主要な因子を以下に示す。

310 (1) 電圧 キャピラリー等電点電気泳動法では収束時に300
311 ~ 1000 V/cmの高電場を利用する。

312 (2) キャピラリー 試料を検出部まで移動させる方法(上記
313 参照)によってはEOFを消失若しくは最小限に抑える必要があ
314 る。内面修飾されたキャピラリーはEOFを抑えるものが多い。

315 (3) 溶液類 陽極槽には等電点が最も酸性の両性電解質の等
316 電点より低いpHの液を満たし、陰極槽には最も塩基性の両性
317 電解質の等電点より高いpHの液を満たす。陽極側にはリン酸
318 が、陰極側には水酸化ナトリウムがしばしば使用される。

319 両性電解質液にメチルセルロースのようなポリマーを添加す
320 ると、粘性が増すことによって対流やEOFが抑制される。市
321 販の両性電解質にはいろいろなpH範囲のものがあり、広いpH
322 範囲が必要なときには、混和して使用する。広いpH範囲は試
323 料の等電点を推定するために用い、狭い範囲のものは測定精度
324 を上げるために用いられる。標準タンパク質マーカの等電点
325 と移動時間の関係からpHを校正することができる。

326 必要ならば、グリセリン、界面活性剤、尿素、両性イオン緩
327 衝剤などを緩衝液に添加することにより等電点でタンパク質が
328 沈殿することを防ぐことができる。しかし、尿素は濃度によっ
329 てはタンパク質を変性させてしまう。

330 6. ミセル動電クロマトグラフィー (MEKC)

331 6.1. 原理

332 ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)では、臨界ミセル濃
333 度(cmc)以上の濃度で界面活性剤を含む電解質溶液中で分離が
334 行われる。物質分子は水性緩衝液とミセルからなる疑似固定相
335 へ、物質の分配係数に基づいて分配される。したがって、この
336 方法は電気泳動とクロマトグラフィーの両者の特徴を有する。

337 MEKCは、キャピラリー電気泳動の特性、スピード及び装置
338 への適応性を兼ね備え、かつ中性及び荷電した物質の両者の分
339 離に利用できる電気泳動法である。MEKCで最も広く用いら
340 れる界面活性剤は陰イオン性のSDSであるが、セチルトリメ
341 チルアンモニウム塩のような陽イオン性界面活性剤も用いられ
342 る。

343 MEKCにおける分離のメカニズムは以下のとおりである。
344 中性及びアルカリ性pHにおいては、強いEOFが発生し、泳動
345 液は陰極方向に移動する。SDSを用いると負電荷を持つミセル
346 は電氣的に逆の陽極方向へ移動する。その結果、泳動液に比
347 べてミセルの移動速度は遅くなる。中性物質の場合には、分析
348 対象物はミセルと水性緩衝液の間で分配され、電気泳動されな
349 いため、その移動速度はミセルと水性緩衝液間の分配係数のみ
350 に依存する。電気泳動図において、中性物質由来のピークは常
351 にEOFマーカのピークとミセルのピークの間が存在する(こ
352 れらの二つのピーク間の時間の範囲はseparation windowと呼
353 ばれる)。電荷を持つ物質の場合、その移動速度はミセルと水
354 性緩衝液間の分配係数とミセルが存在しない場合の電気泳動移

355 動度との両者に依存する。

356 中性又は弱くイオン化した物質のMEKCにおける分離原理
357 は本質的にはクロマトグラフィーであるので、物質の移動度と
358 分離度は保持係数(k)、すなわちミセル中の物質のモル数と移
359 動相中のモル数の比である質量分布比(D_m)で一般化することが
360 できる。中性の場合の k は次式のとおりである。

$$361 k = \frac{t - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t}{t_{mc}}\right)} = K \frac{V_S}{V_M}$$

362 t : 物質の移動時間

363 t_0 : 保持されない物質の移動時間(ミセルに取り込まれない
364 EOFマーカ、例えばメタノールの移動時間)

365 t_{mc} : ミセルの移動時間(常時ミセルに取り込まれて、ミセル
366 と共に移動するズダンIII (Sudan III)のようなミセルマーカ
367 ーの移動時間)

368 K : 物質の分配係数

369 V_S : ミセル相の容積

370 V_M : 移動相の容積

371 同様に、2種類の隣接して移動する物質間の分離度(R_s)は次
372 式で得られる。

$$373 R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_b}{k_b + 1} \times \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right) k_a}$$

374 N : 一方の物質の理論段数

375 α : 選択性

376 k_a, k_b : 両物質の保持係数($k_b > k_a$)

377 同様の関係から、荷電した物質に対する k 値及び R_s 値が得ら
378 れる。

379 6.2. 最適化

380 MEKCにおける分離条件の開発で考慮すべき主要な因子に
381 装置及び電解質溶液に関するパラメーターがある。

382 6.2.1. 装置に関するパラメーター

383 (1) 電圧 分析時間は電圧に反比例する。しかし電圧を上げ
384 ると熱を発生し、キャピラリーの断面で熱及び粘度の勾配が生
385 じる。この効果はミセルを含むような高導電性の泳動液で起こ
386 りやすい。熱放散が不十分な場合にはゾーンの拡散を引き起こ
387 し、分離度が低下する。

388 (2) 温度 キャピラリーの温度の変動は物質の緩衝液とミセル
389 への分配係数、臨界ミセル濃度及び泳動液の粘度に影響を及
390 ぼす。これらのパラメーターは物質の移動時間に影響する。適
391 切な冷却システムを用いることで物質の移動時間の再現性が改
392 善される。

393 (3) キャピラリー キャピラリーゾーン電気泳動法と同様に、
394 キャピラリーの寸法(長さ及び内径)が分離時間及び分離効率に
395 影響を与える。有効長及び全長を長くすると(定電圧下では)電
396 場が低くなり、移動時間が長くなるため分離効率が向上する。
397 内径は(同一泳動液及び同一電場下)熱放散に関与し、結果と
398 して試料ゾーンの拡散にかかわる。

399 6.2.2. 電解質溶液に関するパラメーター

400 (1) 界面活性剤の種類と濃度 界面活性剤の種類はクロマト
401 グラフィーの固定相と同様に分離の選択性を変えるので分離度
402 に影響を与える。界面活性剤の濃度の増加に伴い、中性化合物
403 の $\log k$ 値は直線的に増加する。 k が $\sqrt{t_{mc}/t_0}$ 値に近づくと

404 MEKCにおける分離度は最大に達するので、移動相中の界面
405 活性剤の濃度が変わると分離度は変化する。

406 (2) 緩衝液のpH pHはイオン化していない物質の分配係数
407 を変えないが、内面未処理のキャピラリー中のEOFを変化さ
408 せる。MEKCにおいて、pHが下がるとEOFが減少し、そのた
409 め分析時間が長くなり、中性物質の分離度が向上する。

410 (3) 有機溶媒類 疎水性化合物のMEKCにおける分離を改
411 善するため、電解質溶液にメタノール、プロパノール、アセト
412 ニトリルなどを添加することができる。

413 これらの溶媒の添加により一般に移動時間及び分離の選択性
414 が変化する。有機溶媒の添加は臨界ミセル濃度に影響を与える。
415 有機溶媒濃度を高くするとミセル形成が阻害されるので、
416 MEKCの分配メカニズムが失われるような高濃度では使用で
417 きない。高濃度の有機溶媒の存在によるミセルの消失が必ずし
418 も分離を不可能にするということではなく、イオン性の界面活
419 性剤モノマーと中性の物質との疎水性相互作用により電気泳動
420 的に分離可能な親溶媒性の複合体が形成される場合もある。

421 (4) キラル分離用添加物質 MEKCで鏡像異性体を分離す
422 るためにはキラルセクターを界面活性剤と共有結合させたり、
423 泳動液に添加したりするなどしてミセル分離系に加える。キラル
424 識別できる部位を持つミセルにはN-ドデカノイル-L-ア
425 ミノ酸塩、胆汁酸塩などがある。キラル分離は、キラル認識能
426 のない界面活性剤を含む電解質溶液にシクロデキストリン類の
427 ようなキラルセクターを添加することによっても達成される。

428 (5) その他の添加剤 泳動液に化学物質を添加して、選択性
429 を変更させる方法が幾つかある。数種のシクロデキストリン類
430 を添加してミセルと疎水性物質間の相互作用を競合させ、選択
431 性を高めることもできる。

432 ミセルに吸着する化合物を加えて物質とミセル間の相互作用
433 を調節し、MEKCにおける分離を改善できる。これらの添加
434 剤にイオン性あるいは非イオン性の他種の界面活性剤を添加し
435 て混合ミセルを形成したり、ミセルに溶解する金属陽イオンを
436 加えて物質と配位錯体を形成させたりすることもできる。

437 7. 定量分析

438 等電点電気泳動を除くと、一般的に、次の目的のため、ピー
439 ク面積を対応するピークの移動時間で除して、補正ピーク面積
440 を得る。

441 (1) 分析ごとの移動時間の変動によるピークレスポンスの補
442 正

443 (2) 異なる移動時間で観察される試料成分間のレスポンスの
444 補正

445 内標準物質を使用する場合は、定量しようとする物質のピー
446 クが内標準物質のピークと重ならないことを確認する。

447 7.1. 計算

448 得られた値から目的成分の含量を算出する。処方されている
449 試料の場合は、測定しようとする一成分又は複数成分の含量%
450 を、溶媒や添加剤以外の全ピークの補正した総面積に対する目
451 的ピークの面積%として求める。自動積分システム(インテグ
452 レーター又はデータ読み込み処理装置)の使用が推奨される。

453 8. システム適合性

454 キャピラリー電気泳動システムのチェックにはシステム適合
455 性パラメーターを使用する。これらのパラメーターには用いる
456 キャピラリー電気泳動法の分離モードにより選択する。パラメ
457 ーターには保持係数(k)、ミセル動電クロマトグラフィーの場合

458 のみ)、理論段数(N)、シンメトリー係数(A_s)及び分離度(R_s)が
459 ある。 N 及び R_s に関する理論的説明は上述のとおりであるが、
460 電気泳動図から次式によってこれらのパラメーターを算出する
461 ことができる。

462 理論段数

463 理論段数(N)は次式により計算することができる。

$$464 N = 5.54 \left(\frac{t}{w_h} \right)^2$$

465 t : 目的成分のピークの移動時間又は試料導入点から目的成
466 分のピークの頂点から垂直に下ろした点までのベースライ
467 ンに沿った距離

468 w_h : ピークの半値幅

469 分離度

470 ほとんど同じピーク高さを持つ2種類の成分間の分離度(R_s)
471 は次の式で表される。

$$472 R_s = \frac{1.18 (t_2 - t_1)}{w_{h1} + w_{h2}}$$

473 $t_2 > t_1$

474 t_1, t_2 : 移動時間又は試料導入点から隣り合う二つのピーク
475 のそれぞれの頂点から垂直に下ろした各線のベースライン
476 に沿った各点までの距離

477 w_{h1}, w_{h2} : 各ピークの半値幅

478 一部分離しているピークの場合は二つのピーク間の谷の高さ
479 (H_v)と小さい方のピークの高さ(H_p)を測定し、ピークバレー
480 比(p/v)を計算して分離度を算出してもよい。

$$481 p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

482 シンメトリー係数

483 ピークの対称性を示すシンメトリー係数(A_s)は次式により計
484 算することができる。

$$485 A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

486 $w_{0.05}$: ピーク高さの1/20におけるピーク幅

487 d : ピーク頂点から垂直に下ろした点とピーク高さの1/20
488 におけるピークの立上がり部分との距離

489 再現性

490 ピーク面積の再現性(面積又は面積と移動時間の比の標準偏
491 差)及び移動時間の再現性(移動時間の標準偏差)の試験を適合性
492 パラメーターに加えるべきである。移動時間の再現性は、キャ
493 ピラリーの洗浄操作の適合性の試験になる。移動時間の再現性
494 が低い場合には、内標準物質との相対移動時間を用いて再現性
495 を補うことができる。

496 シグナルノイズ比(SN比)

497 検出限界値及び定量限界値はそれぞれSN比3以上及び10以
498 上に相当する。SN比は次式を用いて計算する。

$$499 S/N = \frac{2H}{h}$$

500 H : 規定の標準試料溶液で得られた電気泳動図中の目的成分
501 に相当するピークの高さ、ピークトップから半値幅の20
502 倍に相当する範囲から推定できるベースラインまでの距離
503 を測定する。

504 h : ブランクの導入後に得られた電気泳動図で、規定の標準
505 試料溶液から得られた泳動図中のピークの半値幅の20倍
506 に相当する時間範囲で、かつこのピークが現れる位置の前
507 後の範囲を観察したときの、バックグラウンドの幅。

508 類縁物質の測定には標準試料に対するシグナルノイズ比(SN

509 比)を調べる(又は定量限界の測定)試験も有用である。

510 9. キャピラリー電気泳動法の操作条件の調整

511 医薬品各条に記載された操作条件は医薬品各条作成時に既に
512 バリデートされている。システム適合性基準への適合は、試験
513 条件が純度試験等や定量を実施するために十分な性能を示すよ
514 うに設定されているかどうかを確認するために必要とされる。

515 キャピラリーの長さはキャピラリー電気泳動装置のサイズに
516 合わせて調整することができる。長さの異なるキャピラリーを
517 使用する場合は、適合性を評価する。

518 装置又はキャピラリーの長さの違いにより意図した分析性能
519 が得られない場合、それらの調整が使用者によって適切に評価
520 され、医薬品各条の手順を根本的に変更しない場合に限り、以
521 下については分析性能を満足するよう調整してもよい。

522 (i) 電圧

523 (ii) 洗浄条件

524 (iii) 温度設定

525 (iv) 試料導入側及び廃液側の電解質溶液のリフレッシュ頻度

526 (v) 導入条件

527 ただし、追加の検証試験や再バリデーションが必要となる場
528 合がある。医薬品各条で別に規定するもののほか、これ以上の
529 変更はできない。

530

531