

# 1 キャピラリー電気泳動法

## 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 1. 基本原理

5 キャピラリー電気泳動法は、毛細管内の電解質液中に存在す  
6 る荷電試料が直流電場の影響下で移動することに基づいた物理  
7 的な分析法である。

8 電場  $E$  における移動速度は、試料の電気泳動移動度と毛細管  
9 内の緩衝液の電気浸透移動度により決まる。電気泳動移動度  
10  $\mu_{ep}$  は試料の特性(電荷、分子の大きさ)と緩衝液の特性(電  
11 解液の種類とイオン強度、pH、粘性及び添加剤)に依存する。  
12 球形を想定した物質の電気泳動速度  $v_{ep}$  は、次式により与えら  
13 れる。

$$14 \quad v_{ep} = \mu_{ep} E = \left( \frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left( \frac{V}{L} \right)$$

15  $q$  : 粒子の有効電荷  
16  $\eta$  : 緩衝液の粘度  
17  $r$  : 溶質イオンのStokes半径  
18  $V$  : 電圧  
19  $L$  : 毛細管の全長

20 緩衝液で満たされた毛細管に電圧を印加すると、電気浸透流  
21 と呼ばれる溶媒の流れが毛細管内に発生する。電気浸透流の速  
22 度は毛細管内壁の電荷密度及び緩衝液の特性に依存する電気浸  
23 透移動度  $\mu_{eo}$  により決まる。電気浸透速度  $v_{eo}$  は次式により与  
24 えられる。

$$25 \quad v_{eo} = \mu_{eo} E = \left( \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \right) \left( \frac{V}{L} \right)$$

26  $\varepsilon$  : 緩衝液の誘電率  
27  $\zeta$  : 毛細管内壁のゼータ電位

28 試料の移動速度( $v$ )は次式により与えられる。

$$29 \quad v = v_{ep} + v_{eo}$$

30 試料の電気泳動移動度と電気浸透移動度は試料の電荷により、  
31 同方向又は反対方向に働く。通常のキャピラリー電気泳動法で  
32 は陰イオンは電気浸透流と逆方向に泳動され、移動速度は電気  
33 浸透流より遅い。陽イオンは電気浸透流と同方向に泳動され、  
34 移動速度は電気浸透流より速い。試料イオンの電気泳動速度と  
35 比べて速い電気浸透流が存在する条件下では、陽イオン、陰イ  
36 オンの両者を一斉分析することが可能である。

37 毛細管の試料導入末端から検出部までの距離(有効長、 $l$ )を  
38 試料が移動するのに要する時間( $t$ )は、次式により与えられる。

$$39 \quad t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l \times L}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) V}$$

40 通常、内面未処理の溶融シリカ毛細管は、pH 3以上で内壁  
41 に存在するシラノール基が解離することにより負電荷を帯びる。  
42 したがって、陽極側から陰極側へと向かう電気浸透流が発生す  
43 る。試料の移動速度において高い再現性を得るために電気浸透  
44 流を一定に保つ必要がある。分析の目的によっては、毛細管の

45 内壁を修飾したり、緩衝液の濃度、組成及びpHを変えること  
46 により電気浸透流を抑制することが必要な場合がある。

47 試料導入後、各試料成分イオンは、それぞれのゾーンとして  
48 電気泳動移動度に応じて電解質内を移動する。ゾーンの分散、  
49 すなわちそれぞれの試料バンドの広がりはいろいろな現象によ  
50 って起こる。理想的な条件では試料ゾーンの広がりに対する唯  
51 一の原因は毛細管に沿った方向への試料成分の分子拡散(軸方  
52 向拡散)である。理想的な場合のゾーンの分離効率 $N$ は、理論段  
53 数( $N$ )として次式により表される。

$$54 \quad N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times V \times l}{2 \times D \times L}$$

55  $D$  : 緩衝液中での試料の分子拡散係数

56 実際には、熱放散、毛細管壁への試料吸着、試料と緩衝液間  
57 の伝導率の不均一性、試料プラグ(層)の長さ、検出セルのサイ  
58 ズ、泳動液槽の水位差なども、ゾーンの広がり原因となりう  
59 る。

60 二つのバンド間の分離(分離度 $R_s$ として表される)は、試料の  
61 電気泳動移動度、キャピラリー内に発生する電気浸透移動度を  
62 変更して各試料イオンのゾーンの分離効率を向上することによ  
63 り達成される。

$$64 \quad R_s = \frac{\sqrt{N} (\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

65  $\mu_{epa}$ 及び $\mu_{epb}$  : 分離した2種類の試料イオンの電気泳動移動  
66 度

67  $\bar{\mu}_{ep}$  : 2種類の試料イオンの電気泳動移動度の平均

$$68 \quad \bar{\mu}_{ep} = \frac{1}{2} (\mu_{epb} + \mu_{epa})$$

### 69 2. 装置

70 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。

- 71 (1) 電圧可変高電圧電源
- 72 (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  
73 二つの泳動液槽
- 74 (3) 泳動液槽に浸され、電源に接続した一対の電極(陰極と  
75 陽極)
- 76 (4) 光学検出用ウインドウを設けた分離用毛細管(通常溶融  
77 石英製)。毛細管の両端は泳動液槽中に置かれる。この毛細管  
78 は各条で規定する溶液で満たされる。
- 79 (5) 適切な試料導入システム
- 80 (6) 所定の時間に毛細管の検出部を通過する目的物質の量を  
81 モニターできる検出器。通常、紫外可視吸光度測定法あるいは  
82 蛍光光度法によるが、分離目的によっては電導度測定、電流測  
83 定又は質量分析による検出も有用である。紫外吸収又は蛍光性  
84 を持たない化合物には間接的な検出法が用いられる。
- 85 (7) 再現性のよい分離が得られるように毛細管内の温度を一  
86 定に保つことのできる温度調節システムが勧められる。
- 87 (8) レコーダー及び適切なインテグレーター又はコンピュー  
88 ター

89 注入操作とその自動化は正確な定量分析のために重要である。  
90 注入方法として、落差法、加圧法あるいは吸引法及び電氣的な  
91 導入法がある。電氣的に導入される各試料成分の量は、各々の  
92 電気泳動移動度に依存し、この試料導入法の採否を決定する要  
93 素となる。

94 各条に規定された毛細管，泳動液，毛細管の分析前処理法，  
95 試料溶液及び分析条件を用いる．分析中に検出を妨害したり，  
96 気泡が発生して通電が遮断されることを防ぐため，泳動液はろ  
97 過及び脱気を行う．泳動時間について，高い再現性を得るため  
98 には，各分析法において厳密な毛細管の洗浄手順を設定してお  
99 くべきである．

### 100 3. キャピラリーゾーン電気泳動法

#### 101 3.1. 原理

102 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  
103 まない緩衝液のみを満たした毛細管内で試料を分離する．この  
104 方法では，試料中のそれぞれの成分が，異なる速度で不連続の  
105 バンドとして移動することにより分離が起こる．各バンドの移  
106 動速度は毛細管内での溶質の電気泳動移動度と電気浸透流に依  
107 存する(1.基本原理参照)．シリカ表面に吸着しやすい物質の分  
108 離能を高めるために内面修飾された毛細管も使用できる．

109 本分離モードを用いて，低分子試料( $M_r < 2000$ )並びに高分  
110 子試料( $2000 < M_r < 100000$ )を分析できる．キャピラリーゾ  
111 ン電気泳動法の高い分離効率により，質量電荷比が僅かしか異  
112 ならない分子間の分離も可能となる．この分離法ではキラルセ  
113 レクター(chiral selectors)を分離用緩衝液に加えることによ  
114 ってキラル化合物の分離も可能となる．

#### 115 3.2. 分離の最適化

116 複数のパラメーターが分離に関与する場合には，分離条件の  
117 最適化が複雑になる．この分離法の条件設定では，装置及び電  
118 解質溶液が主要なパラメーターである．

##### 119 3.2.1. 装置に関するパラメーター

120 (1) 電圧 印加電圧及びカラム温度の決定には，ジュール熱  
121 プロットが有用である．分離時間は印加電圧に反比例する．し  
122 かし，電圧を上げると過剰な熱が発生し，毛細管内部の緩衝液  
123 の温度が上昇し泳動液の粘度にむらが生じる．結果としてバン  
124 ドが広がり，分離度を低下させる．

125 (2) 極性 電極の極性については通常の電圧印加(試料導入  
126 側が陽極，廃液側が陰極)で，電気浸透流は陰極側へ流れる．  
127 極性を逆にした場合には電気浸透流は廃液側から導入側へ向か  
128 って発生し，電気浸透流よりも速い電気泳動移動度を持つ試料  
129 のみが検出部を通過する．

130 (3) 温度 温度の影響は主に，泳動液の粘度と導電率に対し  
131 て見られ，移動速度に影響を与える．場合によっては毛細管温  
132 度の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  
133 間や分離効率が変化することもある．

134 (4) 毛細管 毛細管の寸法(長さ及び内径)は分析時間，分離  
135 効率及び試料容量に影響を与える．全長の増加は電場を減少  
136 (定電圧時)させ，有効長さ及び全長の増加により泳動時間が長  
137 くなる．緩衝液と電場が一定ならば，熱放散効率は毛細管内径に  
138 より異なる．したがって，それによって起こされる試料バンド  
139 の拡散は毛細管の内径によっても変化する．また，使用する検  
140 出法にもよるが，内径が変わると試料導入量が変化するため，  
141 検出限界にも影響を及ぼす．

142 毛細管内壁への試料成分の吸着が分離効率を低下させるため，  
143 分離法の設定で吸着を防ぐ方法を考慮する必要がある．特にタ  
144 ンパク質を試料とする場合，吸着を防ぐ幾つかの方法が工夫さ  
145 れている．その方法として緩衝液組成の工夫(pHの調節や陽イ  
146 オン性添加剤の内壁への吸着)をするだけでタンパク質の吸着  
147 を防ぐ方法もある．その他，タンパク質と負電荷を帯びたシリ

148 カ表面との相互作用を防ぐために，毛細管内壁を共有結合によ  
149 りポリマーで被覆する手法がある．この目的のために，親水性  
150 の中性ポリマーや陽イオン性又は陰イオン性ポリマーで修飾さ  
151 れた毛細管を入手することができる．

##### 152 3.2.2 電解質溶液に関するパラメーター

153 (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  
154 緩衝液は，使用するpH範囲内で適当な緩衝能を持ち，また，  
155 電流発生を最少に抑えることができる低移動性のものである．

156 可能ならば緩衝液イオンの移動度を溶質の移動度に合わせる  
157 ことにより，ピーク形状のゆがみを最少にすることができる．  
158 分離効率を高め検出感度を向上するために，キャピラリー内  
159 におい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  
160 ある．

161 一定のpHにおいて緩衝液濃度を高くすると電気浸透流及び  
162 試料の移動速度は減少する．

163 (2) 緩衝液のpH 緩衝液のpHは，試料や添加剤の電荷及び  
164 電気浸透流に影響するので，試料の分離に影響を及ぼす．タン  
165 パク質及びペプチドの分離において，緩衝液のpHを試料の等  
166 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，  
167 試料の正味の電荷が負から正に変化することになる．一般に，  
168 緩衝液のpHを高めると電気浸透流は速くなる．

169 (3) 有機溶媒 試料又は泳動液添加剤の溶解度を高めたり，  
170 試料成分のイオン化度を変えるために水性緩衝液に有機溶媒  
171 (メタノール，アセトニトリルなど)を添加する場合がある．一  
172 般にこれらの有機溶媒の緩衝液への添加は電気浸透流を低下さ  
173 せる．

174 (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  
175 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  
176 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，  
177 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  
178 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  
179 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  
180 いるキラルセクターの種類により著しく異なる．そのため，  
181 必要な分離を得るために，内腔の大きさの異なるシクロデキ  
182 ストリン類( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -シクロデキストリン)，中性基(メ  
183 チル，エチル，ヒドロキシアルキルなど)又は極性基(アミノメ  
184 チル，カルボキシメチル，スルホブチルエーテルなど)を持つ  
185 シクロデキストリン類を用いることができる．修飾シクロデキ  
186 ストリンを使用するとき，製品間で修飾率にばらつきがあるた  
187 め，キラル分離に影響を及ぼすことがあるので，注意する必要  
188 がある．キラル分離で分離度に影響を与えるそのほかの因子と  
189 して，キラルセクターの濃度，緩衝液の組成とpH，及び分  
190 析温度がある．メタノール又は尿素のような有機系添加剤の使  
191 用も分離度に影響を与える．

### 192 4. キャピラリーゲル電気泳動法

#### 193 4.1. 原理

194 キャピラリーゲル電気泳動法では，分子ふるい効果を持つゲ  
195 ルを充填した毛細管内で分離が行われる．類似した質量電荷比  
196 を持つ分子において，分子サイズの小さい成分が大きい成分よ  
197 りもゲルのネットワーク内を自由に移動できることから，小分  
198 子が大分子よりも速い速度で泳動されることで分離が達成され  
199 る．キャピラリーゲル電気泳動法は類似した質量電荷比を持つ  
200 生体高分子(例えばタンパク質及びDNA断片)をそれらの分子量  
201 に従って分離できる．

## 202 4.2. ゲルの特徴

203 二種類のゲルが用いられる。固定型ゲルと流動型ゲルである。  
204 架橋されたポリアクリルアミドゲルのような固定型ゲルは、毛  
205 細管内でモノマーを重合させて調製する。通常ゲルは溶融シリ  
206 カ内壁と結合しているため、毛細管を破壊しない限り取り去る  
207 ことはできない。ゲルを還元条件下でタンパク質の分析に使用  
208 するときは、泳動液は通常ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含  
209 み、試料を導入する前にSDSと2-メルカプトエタノール又は  
210 ジチオスレイトールの混液と加熱して変性させる。非還元的条  
211 件の分析(例えば未変性の抗体)では、2-メルカプトエタノール  
212 及びジチオスレイトールを使用しない。架橋されたゲル中で  
213 の分離において(「3.キャピラリーゾーン電気泳動法」で述べ  
214 たように)、泳動液の調節やゲル調製時のアクリルアミドの濃  
215 度や架橋剤の比率を変更してゲルのポアサイズを調節すること  
216 によって最適化できる。一般に、ポアサイズが小さい場合は試  
217 料の移動度も小さくなる。ゲルは強固なため試料導入は電氣的  
218 方法を利用する必要がある。

219 流動型ゲルとして、直鎖ポリアクリルアミド、セルロース誘  
220 導体、デキストランなどの水溶性ポリマーも分子ふるいの効果  
221 を有する。これらの分離媒体は、架橋されたポリマーと比べて  
222 調製が容易である。バイアル中で調製し、電気浸透流が発生し  
223 ないように内壁が修飾された毛細管に圧力によって充填すること  
224 ができる。一般に試料を導入する前にゲルを交換することによ  
225 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  
226 度で)を使うか、ポリマー濃度(一定の分子量で)を低くすること  
227 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  
228 サイズを小さくすると同一緩衝液では試料の移動度は小さくな  
229 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、  
230 試料の導入は落差法及び電氣的導入法のいずれでも行える。

## 231 5. キャピラリー等電点電気泳動法

### 232 5.1. 原理

233 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  
234 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  
235 れたpH勾配中で、試料分子はそのpI以外のところでは電荷を  
236 持つため電場の影響下で移動する。

237 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  
238 (loading)、集束(focusing)及び移動(mobilization)である。

239 (1) 試料添加 二つの方法を利用できる。

240 (i) ワンステップ添加：試料を両性電解質と混和し、加圧又  
241 は吸引により毛細管に導入する。

242 (ii) 連続的な添加：リーディング緩衝液(leading buffer)、両  
243 性電解質、両性電解質と混和した試料、両性電解質、最後にター  
244 ミナル緩衝液(terminating buffer)の順に毛細管に導入する。  
245 試料の容量はpH勾配を乱さないように少量でなければならな  
246 い。

247 (2) 集束 電圧を印加すると、両性電解質はそれぞれの電荷  
248 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  
249 (高いpH)へpH勾配が形成される。同時に分離する成分は、そ  
250 れらの等電点(pI)に対応するpHのところに移動し、集束する  
251 と電流が著しく低下する。

252 (3) 移動 分離した成分のバンドを検出部まで移動させる。  
253 三種の方法を利用できる。

254 (i) 第1の方法では、電気浸透流により集束中に成分移動が  
255 達成される。ただし、成分を集束させるために電気浸透流を小

256 さくする必要がある。

257 (ii) 第2の方法では、集束終了後に圧力を用いて移動させる。

258 (iii) 第3の方法では、集束終了後に陰極又は陽極側の泳動液  
259 (移動させたい方向により選択)に塩類を加えて電圧を印加する  
260 と毛細管中のpHが変化し、成分が移動する。pHが変化するに  
261 つれてタンパク質と両性電解質は塩類を加えた液槽の方向へ移  
262 動し、検出器を通過する。

263 得られる分離はpH勾配( $dpH/dx$ )、異なる等電点を持つ両  
264 性電解質の数、分子拡散係数 $D$ 、電場の強さ $E$ 及びそのpHにお  
265 ける試料の電気泳動移動度の変化( $-d\mu/dpH$ )から $\Delta pI$ によ  
266 り表すことができる。

$$267 \Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D (dpH/dx)}{E (-d\mu/dpH)}}$$

## 268 5.2. 最適化

269 分離条件を決定する主要なパラメーターを以下に示す。

270 (1) 電圧 キャピラリー等電点電気泳動法では集束時に300  
271 ~ 1000 V/cmの高電場を利用する。

272 (2) 毛細管 試料を検出部まで移動させる方法(上記参照)に  
273 よっては電気浸透流を消失若しくは最小限に抑えなければなら  
274 ない。内面修飾された毛細管は電気浸透流を抑えるものが多い。

275 (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  
276 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  
277 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  
278 が、陰極側には水酸化ナトリウムがしばしば使用される。

279 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  
280 ると、粘性が増すことによって対流や電気浸透流が抑制される。  
281 市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  
282 pH範囲が必要なときには、混和して使用する。広いpH範囲は  
283 試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  
284 度を上げるために用いられる。標準タンパク質マーカーの等電  
285 点と移動時間の関係からpHを校正することができる。

286 必要ならば、グリセリン、界面活性剤、尿素、両性イオン緩  
287 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  
288 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  
289 てはタンパク質を変性させてしまう。

## 290 6. ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)

### 291 6.1. 原理

292 ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)では、臨界ミセル濃  
293 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  
294 行われる。試料分子は水性緩衝液とミセルからなる疑似固定相  
295 へ、試料の分配係数に基づいて分配される。したがって、この  
296 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。

297 MEKCは、キャピラリー電気泳動の効率、スピード及び装置  
298 への適応性を兼ね備え、かつ中性及び荷電した試料の両者の分  
299 離に利用できる電気泳動法である。MEKCで最も広く用いら  
300 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  
301 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  
302 る。

303 MEKCにおける分離のメカニズムは以下のとおりである。  
304 中性及びアルカリ性pHにおいては、強い電気浸透流が発生し、  
305 泳動液は陰極方向に移動する。SDSを用いると負電荷を持つ  
306 ミセルは電氣的に逆の陽極方向へ移動する。その結果、泳動液  
307 に比べてミセルの移動速度は遅くなる。中性物質の場合には、

308 ミセルと水性緩衝液の間で分配が起こり、電気泳動されないため、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に電気浸透流マーカーのピークとミセルのピークの間が存在する（これらの二つのピーク間はseparation windowと呼ばれる）。電荷を持つ試料の場合、その移動速度はミセルと水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動度との両者に依存する。

316 中性又は弱くイオン化した試料のMEKCにおける分離原理は本質的にはクロマトグラフィーであるので、試料の移動度と分離度は保持係数( $k'$ )、すなわちミセル中の溶質のモル数と移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できる。中性の場合の $k'$ は次式のとおりである。

$$321 \quad k' = \frac{t_R - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right)} = K \frac{V_S}{V_M}$$

322  $t_R$ : 試料の移動時間

323  $t_0$ : 保持されない物質の移動時間(ミセルに取り込まれない電気浸透流マーカー、例えばメタノールの移動時間)

324  $t_{mc}$ : ミセルの移動時間(ミセルに常時取り込まれて、ミセルと共に移動するズダンIII (Sudan III)のようなミセルマーカーの移動時間)

325  $K$ : 試料の分配係数

326  $V_S$ : ミセル相の容積

327  $V_M$ : 移動相の容積

331 同様に、2種類の隣接して移動する試料間の分離度( $R_s$ )は次式で得られる。

$$333 \quad R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k'_b}{k'_b + 1} \times \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right) k'_a}$$

334  $N$ : 一方の成分の理論段数

335  $\alpha$ : 選択性

336  $k'_a, k'_b$ : 両成分の保持係数( $k'_b > k'_a$ )

337 同様の関係から、電氣的に荷電した試料に対する $k'$ 値及び $R_s$ 値が得られる。

## 339 6.2. 最適化

340 MEKCにおける分析条件を決定する際に考えられる主なパラメーターとして以下に示すものがある。

### 342 6.2.1. 装置に関するパラメーター

343 (1) 電圧 分析時間は電圧に反比例する。しかし電圧を上げると熱を発生し、毛細管の断面で熱及び粘度の勾配が生じる。この効果はミセルを含むような高導電性の泳動液で著しく起こりやすい。熱放散が不十分な場合にはゾーンの拡散を引き起こし、分離度が低下する。

348 (2) 温度 毛細管の温度の変動は試料の緩衝液とミセルへの分配係数、臨界ミセル濃度及び泳動液の粘度に影響を及ぼす。

349 これらのパラメーターは試料の移動時間に影響する。適切な冷却システムを用いることで試料の移動時間の再現性が改善される。

353 (3) 毛細管 キャピラリーゾーン電気泳動法におけるように、

354 毛細管の寸法(長さ及び内径)が分離時間及び分離効率に影響を与える。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。内径は(同一泳動液及び同一電場下で)熱放散に関与し、結果として試料ゾーンの拡散にかかわる。

### 359 6.2.2. 電解質溶液に関するパラメーター

360 (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、中性化合物の $\log k'$ 値は直線的に増加する。 $k'$ が $\sqrt{t_m/t_0}$ 値に近づくとMEKCにおける分離度は最大に達するので、移動相中の界面活性剤の濃度が変わると分離度は変化する。

366 (2) 緩衝液のpH pHはイオン化していない試料の分配係数を変えないが、コーティングしていない毛細管中の電気浸透流を変化させる。MEKCにおいて、pHが下がると電気浸透流が減少し、そのため分析時間が長くなり、中性試料の分離度が向上する。

371 (3) 有機溶媒類 疎水性化合物のMEKCにおける分離を改善するため、電解質溶液にメタノール、プロパノール、アセトニトリルなどを添加することができる。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が減少する。有機溶媒の添加は臨界ミセル濃度に影響を与える。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、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、イオン性の界面活性剤モノマーと中性の試料との疎水性相互作用により電気泳動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。

382 (4) キラル分離用添加物質 MEKCで鏡像異性体を分離す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、泳動液に添加するなどしてミセル分離系に加える。キラル識別できる部位を持つミセルには $N$ -ドデカノール-L-アミノ酸塩、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。

389 (5) その他の添加剤 泳動液に化学物質を添加して、選択性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を添加してミセルと疎水性試料間の相互作用を競合させ、選択性を高めることもできる。

393 ミセルに吸着する化合物を加えて試料とミセル間の相互作用を調節し、MEKCにおける分離を改善できる。これらの添加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て混合ミセルを形成したり、ミセルに溶けて試料と錯体形成が可能な金属陽イオンを加えることもできる。

## 398 7. 定量分析

399 ピーク面積は、以下の理由から対応するピークの泳動時間で除して得られる補正ピーク面積を用いる。

401 (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正

402 (2) 異なる泳動時間で観察される試料成分間のレスポンスの補正

403 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クが内標準物質のピークと重ならないことを確認する。

## 407 7.1. 計算

408 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  
409 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%  
410 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  
411 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  
412 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。

## 413 8. システム適合性

414 キャピラリー電気泳動システムのチェックには適合性パラメ  
415 ーターを使用する。これらのパラメーターは用いるキャピラリ  
416 ー電気泳動法の分離モードにより選択する。保持係数( $K'$ , ミ  
417 セル動電クロマトグラフィーの場合のみ), 理論段数( $N$ ), シ  
418 ンメトリー係数( $A_s$ )及び分離度( $R_s$ )がある。 $N$ 及び $R_s$ に関する  
419 理論的説明は上述のとおりであるが、電気泳動図から次式によ  
420 ってこれらのパラメーターを算出することができる。

## 421 8.1. 理論段数

422 理論段数( $N$ )は次式により計算することができる。

$$423 \quad N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

424  $t_R$ : 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  
425 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  
426 インに沿った距離

427  $w_h$ : ピークの半値幅

## 428 8.2. 分離度

429 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( $R_s$ )  
430 は次の式で表される。

$$431 \quad R_s = \frac{1.18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$$432 \quad t_{R2} > t_{R1}$$

433  $t_{R1}$ ,  $t_{R2}$ : 泳動時間又は試料注入点から隣り合う二つのピー  
434 クのそれぞれの頂点から垂直に下した各線のベースライ  
435 ンに沿った各点までの距離

436  $w_{h1}$ ,  $w_{h2}$ : 各ピークの半値幅

437 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  
438 ( $H_v$ )と小さい方のピークの高さ( $H_p$ )を測定し、ピークバレー比  
439 ( $p/v$ )を計算して分離度を算出してもよい。

$$440 \quad p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

## 441 8.3. シンメトリー係数

442 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  
443 算することができる。

$$444 \quad A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

445  $w_{0.05}$ : ピーク高さの1/20におけるピーク幅

446  $d$ : ピーク頂点から垂直に下した点とピーク高さの1/20に  
447 おけるピークの立上がり部分との距離

448 面積の再現性(面積又は面積と移動時間の比の標準偏差)及び  
449 移動時間の再現性(移動時間の標準偏差)の試験を適合性パラメ  
450 ーターに加えるべきである。移動時間の再現性は、毛细管の洗  
451 浄操作の適合性の試験になる。移動時間の再現性が低い場合に  
452 は、内標準物質と相対移動時間を用いて再現性を補うことがで

453 きる。

454 標準試料に対するシグナルノイズ比(SN比)を調べる(又は定  
455 量限界の測定)試験も有用である。

## 456 8.4. シグナルノイズ比(SN比)

457 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  
458 上に相当する。SN比は次式を用いて計算する。

$$459 \quad S/N = \frac{2H}{h}$$

460  $H$ : 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  
461 に相当するピークの高さ、ピークトップから半値幅の20  
462 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  
463 を測定する。

464  $h$ : プランクの注入後に得られた電気泳動図で、規定の標準  
465 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  
466 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  
467 後の範囲を観察したときの、バックグラウンドの幅。

468