

ISOTACHOPHORESIS SYMPOSIUM
第2回 等速電気泳動シンポジウム

講演要旨集

N. Kobayashi

主催 イソタコ研究会
共催 日本化学会, 日本分析化学会, 日本電気泳動学会
日時 昭和57年 11月26日(金) 9:30 ~ 16:40
会場 東京都立大学学館ホール
東京都目黒区八雲 1-1-1

第2回等速電気泳動シンポジウム

プログラム

午前の部

昭和57年11月26日(金) 9:30~16:30

9:30

開会の辞

都立大・理 奥山典生

演題番号

9:35

1. 等速電気泳動法におけるコンピューターシミュレーション
I. 定性分析への応用

広大・工・応用理化学 ○広川 健・木曾 義之

9:50

2. 等速電気泳動法におけるコンピューターシミュレーション
II. 定量分析の理論と応用

広大・工・応用理化学 ○木曾 義之・広川 健

10:05

3. 強電解質の等速電気泳動におけるゾーン界面のイオンの分布状態について

東医歯大・教養・物理 ○島尾 和男

10:20

4. フェノールとNaClOとの希薄水溶液内反応細管式等速電気泳動法によるフェノール環開裂物質の検討

東京理科大・薬 ○小野寺祐夫・宇田川武彦
石倉 俊治・鈴木 静夫

10:35

5. イソタコフォレシスによるジチオカルバメート類の分析

摂南大・教養・化学 ○鉄見 雅弘・高村 博次
松本 忠世

10:50

6. イソタコフォレシスによるポリリン酸塩の分子鎖長の測定

神戸大・教養・化学 ○本岡 達・成相 裕之
中崎 和美・津波 古朝

11:05

休憩(20分)

11:25

7. 細管式等速電気泳動法による水溶性ボールペン用インク液中の塩化物イオンおよび硫酸イオンの同時定量

神奈川県工業試験所 ○村井 省二・小沢 隆美
堀川 邦彦・牧 康行

11:40

8.

11:55

9. 細管式等速電気泳動法によるリジノアラニンの定量

お茶の水女子大 ○福場 博保
共立女子短大* 津田 淑江*

12:10

10. 生葉中無機アニオンおよび有機酸の分布

島津製作所応用技術部京都分 〇児嶋佳世子・八木 孝夫
析センター
岡 大 ・ 薬 奥田 拓男

12:25~12:55

特別講演 等速電気泳動の理論

東医歯大・教養・物理 島尾 和男

12:55~14:00 休憩

午 後 の 部

演題番号

- 14:00
11. 等速電気泳動によるヌクレオチドの分析のための至適条件の検索 白 鷺 病 院 ○山本 忠司・山川 真
- 14:15
12. 吸入麻酔剤ハロセンの代謝産物(TFA)の測定 広 大 ・ 医 ・ 麻 酔 学 ○多幾山礼子・沖田 元一
藤井 宏融・菊地 博達
盛生 倫夫
- 14:30
13. 細管式等速電気泳動によるラット脳GABA及びイミノペプチド尿症患者の尿中イミノペプチドの定性 高 知 医 大 ・ 化 学 ○児玉 裕敬・三笠 洋明
揚田 富子
- 14:45
14. 等速電気泳動によるタンパク質分析—その基礎的検討— 日 本 化 薬 ○加藤 和夫・宮崎 浩
- 15:00 休憩(20分)
- 15:20
15. 血清蛋白の細管式等速電気泳動分析—リーディングイオン, スペーサーイオン等の分離への影響— 島津製作所応用技術部東京分 析センター ○日根 隆
- 15:35
16. 血清タンパク質の等速電気泳動と等電点電気泳動 都 立 大 ・ 理 ・ 化 ○小島 清嗣・真鍋 敬
奥山 典生
- 15:50
17. 無担体電気泳動装置によるタンパク質の等速電気泳動及び分取 都 立 大 ・ 理 ・ 化 ○安川 薫・小島 清嗣
真鍋 敬・奥山 典生
- 16:05
18. 高圧マイクロキャピラリー電気泳動による生体成分等の分析 名 工 大 ・ 合 化 ○津田 孝雄・中川 元吉
名 大 ・ 医 ・ 第 一 生 化 * 佐藤道比古*・八木 國夫*
- 16:20 総合討論(20分)
- 16:40 閉会の辞 奥 山 典 生

1 等速電気泳動法におけるコンピューターシミュレーション

I. 定性分析への応用

(広大工) ○広川 健, 木曾義之

I. 自由溶液における等速電気泳動法(IP)では分離ゾーン内の解離平衡をコンピューターを用いてシミュレートすることが可能である。筆者らはこの特徴に注目し実際のIP分析に役立つコンピューターシステムの開発を行ってきた。シミュレーションの有用性は、試料の絶対移動度(m_0)と pK_a 等の決定及び混合試料分離の最適条件の推定等に要約できる^{1,2}。現在のシステムでは約500種の試料について予め m_0 と pK_a をディスクに収納してあるので任意の電解液条件(水溶液系)における迅速なシミュレーションが可能で、必要ならば予測されるイリタコプログラムを画くこともできる。本システムをより実用的なものとする目的で現在定性分析の自動化を試みている。定性指標の実測値とシミュレーションにより得られた値を比較検討し定性分析を行なおうとするもので、本講演ではその目的のために作製した定性指標のファイル(REBANK)の有用性と試料検策の例について報告する。

II. IP法による定性分析においては標準試料との直接的比較により同定されることが多い。この方法は確実であるが成分が多い場合は時間がかかる。筆者らに依頼された試料には成分が不明の場合もあったがこの場合特にシミュレーションが有用で短時間の内に試料名を限られた数に絞ることが可能となる。一般にIPによる定性分析では何点か pH_L を変化させて定性指標を測定するのが望ましいがその際使用する指標が問題となる。本研究では次式で定義される電位こう配(E)の比 RE を用いた。

$$RE = E_s / E_L = \mu_s / \mu_L = \bar{m}_L / \bar{m}_s \quad \text{--- 1)}$$

ここに μ はイリタコプログラムのステップハイト、 \bar{m} は実効移動度、 L 及び s はリーディング及び試料ゾーンを表す。よく使用されているPU値と RE 値の間には次の関係が成立する。

$$PU = (\mu_s - \mu_L) / (\mu_T - \mu_L) = (RE(s) - 1) / (RE(T) - 1) \quad \text{--- 2)}$$

ここに $RE(T)$ はターミナルイオンの RE 値である。 RE とPUの違いを明らかにするため、過塩素酸($m_0 = 69.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$; $pK_a = -2$), クエン酸(31.0, 53.4, 70.8; 3.128, 4.761, 6.396), 酒石酸(34.6, 60.5; 3.036, 4.366), 酢酸(42.4; 4.756), 乳酸(36.5; 3.860)について

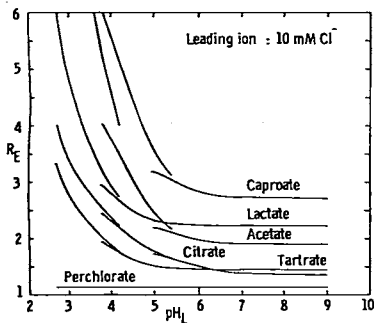


図-1 RE の pH_L 依存性

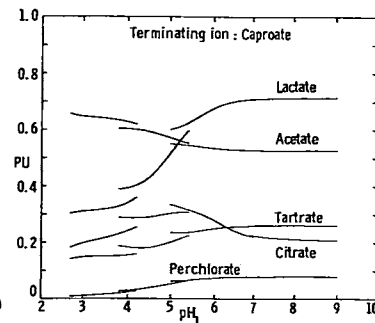


図-2 PU の pH_L 依存性

表-1 REBANKに使用したバッファー

pH _L	BUFFER	pK _a	M ₀
3.00 - 3.75	B-ALANININE	3.552	31.0
4.00 - 4.50	E-AMINOCAP.	4.373	28.8
4.75 - 5.25	CREATININE	4.828	37.2
5.50 - 6.25	HISTIDINE	6.04	29.6
6.50 - 7.25	IMIDAZOLE	7.15	52.0
7.50 - 8.25	TRIS	8.076	29.5
8.50 - 9.25	AMEDIOL	8.78	29.5
9.50 - 10.0	ETHANOLAMINE	9.498	44.3

酸(42.4; 4.756), 乳酸(36.5; 3.860)について RE と PU の pH_L 依存性を図-1及び図-2に示した。使用したバッファーはβ-アラニン(pH_L 2.7~4.2), E-アミノカプロン酸(3.8~5.4), ヒスチジン(5~7)及びトリヌ(6.9~9)でリーディングイオンは10mMCl, ターミナルイオンはカプロン酸である。図-1,2より明らかのように、 PU 値は広い pH_L 領域では試料ごとに変化が不規則的である。更に PU はターミナルイオンが異なると同じ pH_L でも値が異なってくる。以上の点を考慮し RE 値を定性分析の指標とし、実測値とシミュレーションにより得られた値を比較する。現在アニオンについては約270種についてシミュレーションできるが、もし測定する pH_L が任意

26 CAPROIC ACID				C6H12O2				3.00	3.25	3.50	3.75		
-1				30.2				4.857	116.16	13.177	11.054	9.442	8.028
4.80	4.25	4.50	4.75	5.00	5.25	5.50	5.75	6.00	6.25	6.50	6.75		
5.711	5.136	4.555	3.845	3.503	3.224	3.003	2.729	2.509	2.837	2.788	2.743		
19.43	19.27	19.12	21.84	21.79	21.75	19.12	19.11	19.10	19.10	19.10	26.81		
0.464	0.517	0.585	0.636	0.767	0.835	0.905	0.935	0.959	0.976	0.988	0.988		
4.767	4.859	4.976	5.186	5.341	5.527	5.798	5.977	6.191	6.424	6.738			
6.75	7.00	7.25	7.50	7.75	8.00	8.25	8.50	8.75	9.00	9.25			
2.729	2.719	2.712	2.734	2.731	2.728	2.725	2.729	2.726	2.723	2.720			
26.80	26.80	26.79	19.06	19.06	19.07	19.09	19.11	19.15	19.23	19.36			
0.993	0.995	0.998	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000			
6.976	7.221	7.469	7.661	7.910	8.159	8.409	8.661	8.912	9.162	9.414			
9.50	9.75	10.00	pH	(MEMO)									
2.710	2.705	2.700	RE										
24.89	25.49	26.65	t										
1.000	1.000	1.000	Z										
9.721	9.977	10.239	pH _B										

表-2 REBANK 出力の一例

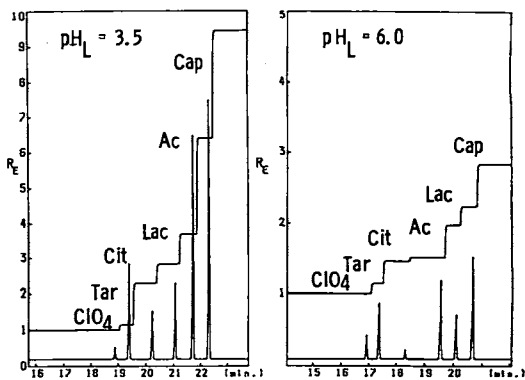


図-3 図-1 中試料のイオングラム(シミュレーション)

であるとその都度計算しなくてはならない。

そこで表-1のように pH_L 3~10 の領域を 0.25 pH 毎に 8 種のバッファーでカバーし予め RE 値を計算しディスクに収納しておくことにより上記の 29 点の pH_L で行なわれた実験であれば迅速な比較検討が可能とした。このデータファイルを REBANK と呼んでいる。一例をカプロン酸について表-2 に示した。REBANK には pH_L, RE, 100 μA 通電時の試料 (10 nmol) のゾーン長 t (sec.), 実効電荷 (Z), 試料ゾーンの pH (pH_B) 等が計算に使用した m₀, pK_a と共に収納してある。

コンピューターを使用する同定法は次のとおりである。① N₀ の異なる pH_L での m₀ の RE の実測値を入力する。② ある pH_L での各 RE について少量 S がある値 A より小さい試料を検索する。

$S = (RE(obs) - RE(calc))^2 / (RE(obs))^2$ ----- 3) A の値は RE 値の再現性により決定する。A を大きくすると 1 つの RE 値に該当する試料の数が増加する。③ N₀ の pH_L での試料を検索し終えた後各 pH_L で共通している試料名を選択する。④ 共通する試料について N₀ の pH_L を考慮し S の和の最小値が A の値の N 倍以下の試料を検索する。⑤ 上記の条件を満たす試料と残った試料を出力して終了。計算機実験の一例を図-1 に示した試料で行なった。測定 pH_L は 3.5, 4.5, 6 とするとイオングラムは図-3 のようになる(便宜上試料名を付けた)。検索の結果を表-3 に示す。殆ど計算値に等しい値を入力したので正しい試料名が Target として得られている。その他 3 試料が候補に挙がっているがプロモ酢酸は明らかに除外できる。しかし残りの 2 試料については他の見地から判断が必要である。この REBANK の検索による定性分析を実際に適用するには特にシミュレーションに使用する m₀, pK_a の精度を向上させること及び定性指標が再現性良く測定できる

表-3 検索結果の一例

ことが重要となる。RE 値は PU 値と異なり m₀ の変動が値に大きく影響することには注意する必要がある。しかし RE 値が表-2 のようにターミナルもしくは適当な内部標準について明らかであればかなり精度を向上できる。又シミュレーションに必要なマイコン等が使用できない場合でも REBANK がテーブルとしてあれば定性分析以外にも種々の用途が考えられる。例えば RE 値の比較による分離の可否の判定、最適分離条件の推定、時間軸の測定値より概略の定量等が可能となる。

ABSOLUTE QUALITATIVE ANALYSIS BY ISOTACHOPHORESIS FOR ANIONS					
USED ELECTROLYTE SYSTEMS : 3					
pH _L = 3.50		pH _L = 4.50		pH _L = 6.00	
SYSTEM No. 3	- OBSERVED RE	VALUES AT pH _L = 3.50	RE = 2.270	RE = 1.140	
RE = 6.400	RE = 3.690	RE = 2.830			
SYSTEM No. 7	- OBSERVED RE	VALUES AT pH _L = 4.50	RE = 1.640	RE = 1.140	
RE = 3.110	RE = 2.510	RE = 2.020			
SYSTEM No. 13	- OBSERVED RE	VALUES AT pH _L = 6.00	RE = 1.490	RE = 1.140	
RE = 2.240	RE = 1.970	RE = 1.490			
TARGETS ARE :					
166	C3H5O3	LACTIC ACID	RE = 2.243 (6.00)	S = 0.000002	
RE = 3.693 (3.50)		RE = 2.513 (4.50)			
1	C2H4O2	ACETIC ACID	RE = 1.980 (6.00)	S = 0.000000	
RE = 6.402 (3.50)		RE = 3.111 (4.50)			
54	C6H8O7	CITRIC ACID	RE = 1.513 (6.00)	S = 0.000002	
RE = 2.827 (3.50)		RE = 2.024 (4.50)			
238	C4H6O6	TARTARIC ACID	RE = 1.459 (6.00)	S = 0.000001	
RE = 2.273 (3.50)		RE = 1.640 (4.50)			
200	HClO4	PERCHLORIC ACID	RE = 1.137 (6.00)	S = 0.000020	
RE = 1.137 (3.50)		RE = 1.137 (4.50)			
OTHER CANDIDATES :					
15	C2H3BrO2	BROMOACETIC ACID	RE = 1.998 (6.00)	S = 0.000103	
RE = 2.253 (3.50)		RE = 2.030 (4.50)			
150	C6H8O7	ISOCITRIC ACID	RE = 1.509 (6.00)	S = 0.000540	
RE = 2.892 (3.50)		RE = 2.008 (4.50)			
243	HSCN	THIOCYANIC ACID	RE = 1.159 (6.00)	S = 0.000936	
RE = 1.161 (3.50)		RE = 1.160 (4.50)			

Time : 483 sec.

1) T.Hirokawa and Y.Kiso, J.Chromatogr., 242(1982)227, 2) T.Hirokawa and Y.Kiso, ibid., 248(1982)341.

2 等速電気泳動法におけるコンピューターシミュレーション II. 定量分析の理論と応用

(広九工) ○木曾義之, 広川健

等速電気泳動法で得られるイソタコフェログラムのゾーン長(時間)は定量指標として通常の分析法と同じ手法, すなわち検量線を作成して定量が行なわれている。この際この検量線のこう配がもし分析試料について算出できるならば, 検量線の作成は原理的に不必要となる。Everaertsらは, このこう配の因子(Kcal Calibration constant)を提唱し, 実験的にこの値を求めているが, 理論的には不明確である。我々の理論からこのKcalは, $\pi r^2 v$, すなわち半径 r の細管中を, 単位時間に泳動するゾーンの流量に対応する量で, 検量線のこう配とは違っている。

Iの講演で述べた様に, R_E のシミュレーションと同時にゾーン長(sec)も計算できる。本講演ではゾーン長を規定する主因子の相関関係を示し, 厳密なシミュレーション(イオン強度による移動度 m , 酸解離定数 K の補正, ゾーン内の pH (pH_S)の計算)によるゾーン長をモデルイオンについて述べ, 最後にEveraertsらの実測値と比較した結果について述べる。

等速電気泳動平衡におけるリーディング(L)および後続ゾーン(S)の等速性, 各分離ゾーン間にオームの法則, ゾーン内の成分イオン種の電気的中性の3条件が満足すると仮定し, いま n 段のプロトン解離するアニオン(その成分イオンの移動度を m_i , 酸解離定数を K_i とする)のゾーン長(sec)は次の式で表現できる。

$$T = \frac{FN}{i} \left(1 + \frac{m_a (1 + 2K_2/C_H + 3K_2K_3/C_H^2 + \dots)}{m_1 (1 + \beta_2 K_2/C_H + \beta_3 K_2K_3/C_H^2 + \dots)} + \frac{(\beta_2 K_2/C_H + 2\beta_3 K_2K_3/C_H^2 + \dots)}{(1 + \beta_2 K_2/C_H + \beta_3 K_2K_3/C_H^2 + \dots)} \right) \quad (1)$$

ここで F ;ファラデー定数, N ;試料注入量, i ;泳動電流, m_a ;バッファイオンの移動度, m_1 ; 1価イオンの移動度, $\beta_i = m_i/m_1$ (通常 $\beta_2 = 1.4 \sim 2$), C_H はゾーン内の水素イオン濃度($C_{H,S}$)。であって, リーディングの水素イオン濃度と異なり, アニオンの場合はリーディングより低い値となる。

(1)式より, 2価以上のアニオンでは, $K_2K_3 \dots$ と C_H により, 複雑な式となるが, 1価のアニオンの場合は K_1 と C_H に無関係な(2)式となる。

$$T = \frac{F}{i} \left(1 + \frac{m_a}{m_s} \right) \cdot N = \frac{F \cdot N}{i \cdot t_s} \quad (t_s = \frac{m_s}{m_s + m_a} : \text{輸率}) \quad (2)$$

いま T (sec), N (nmol), i (μA)で(2)式を表わすと,

$$T = \frac{0.96487}{i} \cdot (1 + m_a/m_s) \cdot N \quad (3)$$

ここで厳密なシミュレーション(イオン強度による m , K の補正, 低 pH や高 pH での比電導度に H^+ , OH^- 影響を考慮)による値と(3)式により求められた値を比較すると, $4 < \text{pH}_S < 9$ の場合, T はかなりの精度で一致する。ただし m_a/m_s が1より大きくなるか, 小さくなるに従って誤差が大きくなるが数%以内である。 T に大きく影響を与える因子は m_a/m_s の比である。この比は, 検量線でこう配に差を生じる。多価アニオンの場合は, この m_a/m_1 の他に $K_i/C_{H,S}$ によって $|\text{pH}_S - \text{p}K_i|$ が T に大きく影響を与える。さらに β_i も関係する。

図1はEveraertsらが T の実測に使用した試料, Succinic acid, Acetic acid, Adipic acid, Formic acid, Iodic acid, Lactic acid, Sulfamic acid, Tartaric acid, Maleic acid, Hydrofluoric acidの1価と2価のアニオンについて, これらアニオンの移動度と $\text{p}K$ 値およびバッファイオ

ントしては、前報の表Iに示したpH_Lの範囲で7種のバッファーイオンのm₀, pK₂を用いてシミュレーションをした。その結果を図1に示す。1価アニオンであるSul, IO₃, Ac, IO₃は(3)式で示したように、pH_L, pK₂に無関係でm₀/m_sの大小関係でTの値が大きく影響していることが分かる。バッファーイオンがcreatinineとimidazoleの場合、Tが大きいのはM₀が他のバッファーイオンに比べて大きいためである。pH_Lの上昇に伴ってTが増加している2価のアニオンは(1)式のK₂とpHの影響である。

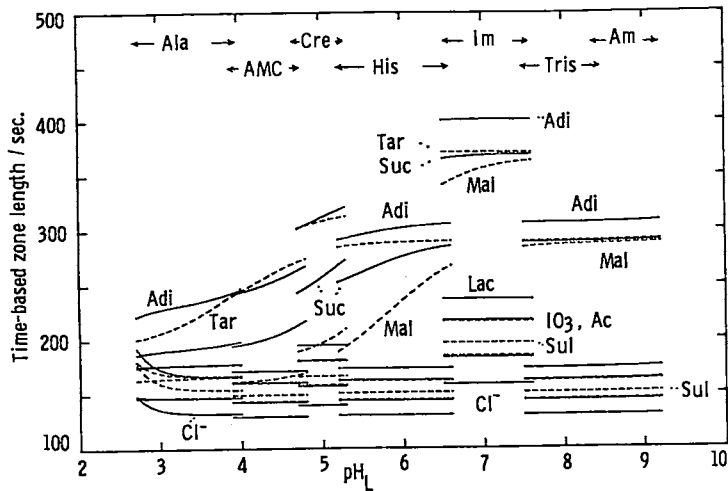


図1

表1

THE OBSERVED* AND SIMULATED TIME-BASED ZONE LENGTH OF SEVERAL ANIONS AT pH_L 6.02 (HISTIDINE BUFFER) and 7.05 (IMIDAZOLE BUFFER).

Samples	pH _L = 6.02				pH _L = 7.05			
	Sample amount nmol (μl)	Time-based zone length obsd	Time-based zone length calcd	dev (%)	Sample amount nmol (μl)	Time-based zone length obsd	Time-based zone length calcd	dev (%)
Ac	150 (3)	358.5	347.3	-3.1	150 (3)	467	463.1	-0.8
	100 (2)	234	232.5	-0.6	100 (2)	308	308.7	0.2
	50 (1)	120	115.8	-3.5	50 (1)	154	154.4	0.3
Adi	75 (3)	335	323.8	-3.3	75 (3)	407	429.3	5.5
	50 (2)	223	215.9	-3.2				
For	150 (3)	311	310.1	-0.3	150 (3)	398	395.9	0.5
	50 (1)	105	103.4	-1.5	100 (2)	255	264.0	3.5
IO ₃	150 (3)	350	348.7	-0.4	150 (3)	465	465.7	0.2
	100 (2)	231	232.4	0.6				
Lac	93 (3)	222	230.4	3.8	102.9 (3)	340	347.9	2.3
	75 (3)	320	309.5	-3.3	75 (3)	416	397.1	-4.5
Tar	50 (2)	213	206.3	-3.1				
	100 (2)	349	338.6	-3.0	150 (3)	735	764.8	4.1
Mal					100 (2)	491	509.9	3.8
Suc	40 (4)	163	157.9	-3.3				
	30 (3)	119	118.4	-0.5				
Sul	150 (3)	335	323.9	-3.3				
					150 (3)	409	393.2	-3.9

* Observed by Beckers and Everaerts; the values were taken from ref. 3. The driving current was 70 μA.

Everaertsらは上記アニオンを、ヒスチジン(pH_L 6.02)とimidazole(pH_L 7.05)をバッファーとして70μAの泳動電流で試料量を数点変えてゾーン長を測定している。この実測値を計算値と比較した結果を表1に示した。2塩基酸の場合、少し実験値と計算値の間に差があるが、この程度の誤差は試料注入量においても生じる変動誤差である。ただし、1価イオンについては両者の値は大変よく一致を示している。

以上の結果から、定量軸であるゾーン長を精度よく測定することによって単なる定量ではなく、試料イオンの移動やpK値の決定も可能であることが分かる。実際の実験では、R_E値とTを同時に測定できるため、両者の値を同時に解析することによってより精度の高いm₁, K₂の値が得られることが期待できる。

<参考文献>

J. L. Becker and F. M. Everaerts, J. Chromatogr., 71, (1972), 329

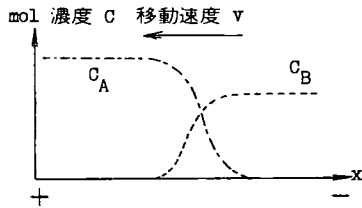
3 強電解質の等速電気泳動におけるゾーン界面のイオンの分布状態について

東京医科歯科大学教養部物理学教室 ○島尾和男

I. はじめに

等速電気泳動の理論では、先行ゾーンの組成から後続ゾーンの組成を論ずることが主として行われており、ゾーンの界面で先行イオン、後続イオンおよびカウンターイオンの濃度がどのように変化するかを取扱ったものは見られないようである。ゾーン界面でのイオンの濃度は、等速泳動の原理の説明図でよく見られるように、階段状に変化しているわけではなく、拡散と電気泳動のバランスから、ある範囲でなめらかに変化して先行ゾーンから後続ゾーンに移行すると考えるべきである。取扱いの一番簡単な強電解質イオンの場合について、このような見地から理論的な検討を加えた結果を報告する。

II. 理論



図は強電解質陰イオンの等速電気泳動のゾーン界面の先行イオン A および後続イオン B の分布状態を模式的に示したものである。モル濃度を C, 成分を添字で表わしてある。電気的中性の条件から、カウンターイオン (C) の濃度は A と B の濃度の和に等しいので、この系を記述するのに必要な独立変数としては $C_A(x, t)$ および $C_B(x, t)$ を用いればよい。x は陰極方向に測った距離、t は時間である。電流密度を I, 易動度を U, 伝導率を κ , と書くと、x と x + dx で囲まれる部分の A および B の質量

バランスを表わす式

$$\left[-C_1(x, t)U_1 \frac{I}{\kappa(x, t)} + C_1(x+dx, t)U_1 \frac{I}{\kappa(x+dx, t)} + D_1 \left(-\frac{\partial C_1(x, t)}{\partial x} + \frac{\partial C_1(x+dx, t)}{\partial x} \right) \right] dt = [C_1(x, t+dt) - C_1(x, t)] dx \quad 1 = A, B$$

からえられる

$$\frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{I}{\kappa(x, t)} U_1 C_1(x, t) + D_1 \frac{\partial C_1(x, t)}{\partial x} \right] = \frac{\partial C_1(x, t)}{\partial t}$$

が C_A および C_B をきめる方程式である。 C_A も C_B も $x+vt$ の関数なので、 $X=x+vt$ とおくと

$$\frac{\partial C_1}{\partial x} = \frac{dC_1}{dX}, \quad \frac{\partial C_1}{\partial t} = v \frac{dC_1}{dX} \quad \text{となるので、上式から}$$

$$\frac{I}{\kappa} U_A C_A + D_A \frac{dC_A}{dX} = v C_A \quad (1.1)$$

$$\frac{I}{\kappa} U_B C_B + D_B \frac{dC_B}{dX} = v C_B \quad (1.2)$$

となる。これがこの報告の基本方程式である。

(1.1) と (1.2) から κ を消去すると (拡散係数による電流の効果を示す)

$$D_A U_B C_B \frac{dC_A}{dX} - D_B U_A C_A \frac{dC_B}{dX} = v (U_B - U_A) C_A C_B$$

となり、両辺を $U_A U_B C_A C_B$ で割って

$$\frac{D_A}{U_A} \frac{1}{C_A} \frac{dC_A}{dX} - \frac{D_B}{U_B} \frac{1}{C_B} \frac{dC_B}{dX} = v \left(\frac{1}{U_A} - \frac{1}{U_B} \right)$$

がえられる。この式を積分してえられる

$$\frac{D_A}{U_A} \log C_A - \frac{D_B}{U_B} \log C_B = v \left(\frac{1}{U_A} - \frac{1}{U_B} \right) X + \text{const.}$$

からゾーン境界のひろがり論ずることもできるが、ここでは (1) の数値積分による方法を用いることにする。

III. 方程式 (1) の数値解

強電解質の溶液では、電気的中性の条件のため、濃度こう配のもとでの陽イオンと陰イオンの拡散は相伴って生じる。従って、陰陽イオンによる拡散電流は相殺して 0 となるから、 κ は均一溶液の場合と同じで

$$\kappa = \frac{F}{1000} (c_A (U_A + U_C) + c_B (U_B + U_C)) \quad (2)$$

で与えられる。

また、同じ理由で拡散係数 $D_{A,B}$ は、塩 AC, BC の拡散係数で、易動度との間に下記の Nernst の式が近似的に成立つと考えられる。

$$D_A = \frac{2RT}{F} \frac{U_A U_C}{U_A + U_C}, \quad D_B = \frac{2RT}{F} \frac{U_B U_C}{U_B + U_C} \quad (3)$$

ただし、 F は Faraday 定数、 R は気体定数、 T は絶対温度である。

また、(1) 式の v は、先行ゾーンでの A イオン、後続ゾーンでの B イオンの泳動速度で、

$$v = \frac{1000 I}{F} \frac{U_A}{c_A^\alpha (U_A + U_C)} = \frac{1000 I}{F} \frac{U_B}{c_B^\beta (U_B + U_C)} \quad (4)$$

である。これらの式を用いると、 X と $X + \delta X$ における c_A および c_B の関係を表わす式として、

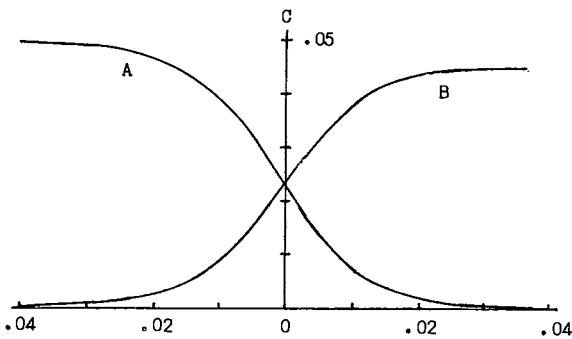
$$c_A(X + \delta X) = c_A(X) + \frac{1000 I}{F} U_A c_A \left(\frac{1}{c_A^\alpha (U_A + U_C)} - \frac{1}{c_A (U_A + U_C) + c_B (U_B + U_C)} \right) \delta X$$

$$c_B(X + \delta X) = c_B(X) + \frac{1000 I}{F} U_B c_B \left(\frac{1}{c_B^\beta (U_B + U_C)} - \frac{1}{c_B (U_B + U_C) + c_A (U_A + U_C)} \right) \delta X$$

がえられる。

(1) の数値解を求めろためには、 $X=0$ で、 $c_A=c_B=a$ と仮定して上式を用いて X に沿っての c_A および c_B を求める。 a の値が適当でない場合は、 c_A や c_B が 0 より小さくなったり c_B^β より大きくなったりするので、試行錯誤をくり返して a の正しい値を求めることができる。

下図はこの方法を用いた計算結果の 1 例であり、移行域の広がり図の条件下では $1/10$ mm のオーダーであり、これが理想的な条件下での等速電気泳動分析法の分解能を与えるものと考えられる。



数値積分の条件

	U	D	$C(\infty)$ or $C(-\infty)$
A	8	1.37	0.05
B	6	1.23	0.045
C	4		

$$U : 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$D : 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$$

$$C : \text{mol l}^{-1}$$

$$I = 5 \cdot 10^{-5} \text{ A cm}^{-2} \approx 200 \mu\text{A} / 0.7 \text{ mm}^2$$

$$\delta X = 2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}$$

$$\text{No. of steps} = 2 \cdot 10^4$$

4 フェノールと次亜塩素酸との反応：細管式等速電気泳動法によるフェノール環の酸化開裂物質の定性および定量

東京理科大学 薬学部

○小野寺祐夫, 宇田川武彦, 石倉俊治, 鈴木静夫

有害化学物質を含む産業廃水の環境への放出およびこれらの飲料水への混入をコントロールするため、各種の水処理技術が開発され、実施されている。フェノールは典型的な環境汚染物質のひとつであるが、これによる河川の汚濁事故がこれまで数多く報告されている。演者らは浄水又は排水処理過程で多量の塩素が使用されている事実注目し、この処理過程で起ると考えられるフェノールと塩素との反応について、そのメカニズムの解明を目的としてガスクロマトグラフィー (GLC) による検討を行ない、その成果を若干報告した。本報告では、これらの結果に加えて、反応の最終生成物と考えられるフェノール環の酸化開裂物質：塩素化有機酸の細管式等速電気泳動法 (イソタコと略す) による定性及び定量を検討したので以下にのべる。

試料の調製：イソタコ用の試料溶液は次のようにして調製した。即ち、pHの緩衝された次亜塩素酸 (HOCl) 水溶液 1 ml にフェノールのメタノール溶液を加え ($5 \times 10^{-5} M$)、このときを反応の開始として、20°Cで、混合攪拌した。反応終了後、これにHOClの除去剤 0.1 N Na₂S₂O₃ 少量を加え、塩酸酸性 (pH 2.0) としたのち、反応生成物をエーテル (200 ml x 3回) で抽出した。エーテルを減圧下 (40°C) で留去したのち、残渣を Table I に示した Leading 液 1 ml に溶かし、イソタコ用の検液とした。

装置及び実験方法：イソタコ装置と Table I. Electrolyte System for Isotachopheretic Analysis of Chloro-derivatives of Phenol and Carboxylic Acids

System	Leading electrolyte	Terminating electrolyte	Electric current, μA
A	0.005 M -alanine + HCl pH 3.0	0.01 M n-caproic acid pH 3.1	75
B	0.01 M histidine·HCl 0.01 M histidine pH 6.1	0.01 M glutamic acid pH 6.0	100

して、Potential Gradient Detector (PGD) 及び UV Absorption Detector (UVD), I.D. 1 mm x 4 cm のアレカラム, I.D. 0.5 mm x 10 cm のキャピラリーカラムを装着した島津 IP-2A を使用し Table I に示した泳動条件で試料の分析を行なった。これらの試料のイソタコパターンはチャートスピード 5 又は 10 mm/min で記録した。PGD を用いたイソタコにおける分離成分の定性指標として Deml et al.²⁾ によって提唱された Potential Unit (PU) 値を用い、UVD パターンを参考にした。又、試料中に含まれる分離成分の定量にはゾーン長を用いることにした。

結果及び考察 低濃度のフェノール ($5 \times 10^{-5} M$) に、常温、中性の条件で過剰モル量の HOCl を作用させると、フェノールによる HOCl の消費が最初の 30 分間で急激に起るが、その後も、緩慢な HOCl の消費反応の続くことが観察される (24 時間塩素消費量 = 13.5 moles HOCl/phenol)。緩衝作用のない水溶液中では、フェノールによる HOCl の消費反応に続き、更に、溶液 pH の酸性側への移行も観察される (24 時間塩素消費量 = 8.5 moles HOCl/phenol)。この反応で生じるエーテル可溶の塩素化物を GLC によって追跡した結果、次のようなメカニズムで反応が進行しているように思われた。即ち、1) フェノール環の活性 o- 及び p- 位における水素原子と塩素との逐次置換反応による塩素化フェノール (A) の生成、2) 化合物 A の p- 位における脱塩素-酸化反応による塩素化 p-ベンゾキノン (B) の生成、3) 化合物 B の加水分解又は重合による塩素化有機酸又は dimer (C) の生成につながると考えられる。

緩衝剤の存在しない水溶液又は弱酸性水溶液中でフェノールとHOClとを反応させると、高濃度の化合物Bを検出することができるとは、しかし、化合物Bは、溶液pHを中性にすることにより、更に、HOClを消費して消失するため、事実上、化合物B自身及びその先行化学物質をGLCによって定性・定量することが困難となった。化合物A及びBは、一般に、魚毒性の高いことで知られているが、最近、化合物C中にAmes Testにおいて変異原活性を示す物質(構造未定)が存在することを確認した³⁾。

以上の実験結果から、これまでその毒性に対して特別の注意が払われていない化合物C中に含まれている物質の化学構造を明らかにすることが重要であると考え、有機酸の分析に威力を発揮することが知られているイソタクコを使用して検討することにした。Fig. 1はフェノールとHOClとの反応混合物から得られたエーテル抽出物のイソタクコパターンを示す。エーテル抽出物中にはイソタクコによって検出することができる2つの有機酸I及びIIが存在することがわかる。化合物IはUV₂₅₄吸収を示し、IIはこの吸収がみられない。別に測定した酢酸、アクリル酸、プロピオン酸等の塩素化誘導体のPU値の比較から、化合物Iはクロロマレイン酸(CMA)、IIはトリクロロ酢酸(TCA)であろうと推定される。又、エーテル抽出物の0.1N HCl及び0.1N NaOHにおけるポーラログラムの測定から、イソタクコによる推定を支持する結果が得られた。なお、この実験で、エーテル抽出物中にLeading液又はポーラログラム電解液に不溶の物質が存在することを観察した。これらの観察は、Table IのLeading液を用いたイソタクコにおいてエーテル抽出物の一部が分析の対照からはずれていることを示す。しかし、これについては、くわしい検討をしなかった。

次いで、反応混合物中に存在することが確認できたCMA及びTCAを定量するため、検量線の作成及びこれら化合物の回収テストを行なった。得られた結果を、それぞれ、Fig. 2及びTable IIに示す。CMA及びTCAの検量線

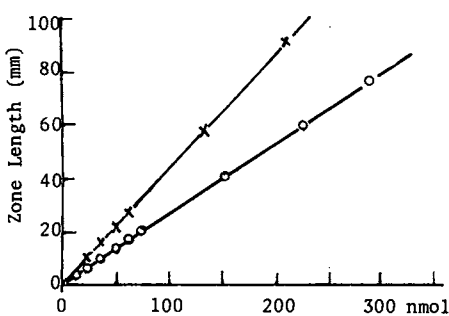


Fig. 2. Calibration Curves of Chloromaleic Acid (x) and Trichloroacetic Acid (o). Operational conditions as in Table I (B). Chart speed: 10 mm/min. Temperature of Electrolyte: 20°C.

ることが推定される。

参考文献 1) 小野寺, 他, 衛生化学, 23, 331 (1977); 28, 446 (1982); J. Chromatogr., 200, 137 (1980). 2) Deml et al., J. Chromatogr., 109, 49 (1975). 3) 小野寺, 他, 衛生化学, 28, 160 (1982)

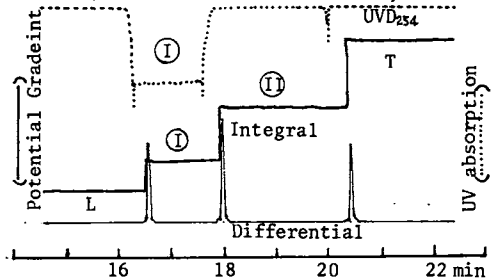


Fig. 1. Isotachopheric Pattern of Ether Extract obtained from Phenol Solution after Treatment with Excess HOCl at pH 7 for 24 h. Operational conditions as in Table I (B). L: Leading electrolyte, T: Terminal electrolyte. (I): chloromaleic acid, (II): trichloroacetic acid.

は、0~300 nmol の範囲で、原点を通る良い直線性を示す (Fig. 2)。一方、エーテルによる回収テストでは、DCMAを除き、いずれも回収率 (63~72%) が低い (Table II)。これらの回収率を考慮し、24時間後の反応混合物中に存在するCMA及びTCAを定量したところ、フェノール環の酸化開裂から予測される化学量論量の約40%となることがわかった。希薄なHOCl溶液中では、CMA及びTCAが比較的安定であることから、残り60%が塩素化有機酸とは異なる化学種として存在している

Table II. Results of Recovery Test for Chloroacetic and maleic Acids from HOCl Solution.

Compound	Concentration (ppm)	Recoveries (%)
Chloroacetic acid	50	72 ± 5.5
Dichloroacetic acid	50	63 ± 1.5
Trichloroacetic acid	50	65 ± 5.0
Chloromaleic acid	20	67 ± 3.5
Dichloromaleic acid	20	96 ± 2.0

5 イソタコフォレシスによるジチオカルバマート類の分析

(摂南大学) ○鉄見 雅弘・高村 博次・松本 忠也

さきに、演者らは数種のジアルキルジチオカルバミン酸ナトリウム (R_2NCS_2Na) の電気化学的挙動をポーラログラフを使用して研究し、その半波電位は、アルキル基 (R) の大きさ (電子吸引性) の順に、より負側に移動することを見出した¹⁾。ここでは、 R_2NCS_2Na および複素環状ジチオカルバミン酸ナトリウム ($Hetero \cdot C S_2 Na$) の等速電気泳動の挙動について報告する。

島津製細管式等速電気泳動装置 (IP-IB) と電位勾配検出器 (PGD-1) を使用し、泳動管 (PTFE製): 内径 0.57 mm, 長さ 20 cm, 泳動電流 75 μA , 恒温槽; 20°C に設定し実験を行った。

ジチオカルバミン酸ナトリウム類 ($NaDTC$) は既報¹⁾ と同じように、ヨウ素滴定法および電位差滴定法でその純度を決定した。 $NaDTC$ は酸性測では不安定なので試料 ($NaDTC$) の溶解には、0.1 N-水酸化ナトリウムを加えて、pH を 9 付近にした。つぎに、リーディング液とターミナル液の組合せについて、秋山氏ら²⁾ の組合せを参考にして検討した。リーディング液は 0.008 M-塩酸 + 0.5% (w/v)-PVA-2000 + アメジオール (pH = 10), ターミナル液は 0.008 M- β アラニン + $Ba(OH)_2$ (pH = 11) を組合せた溶液を使用して、泳動を測定した。また、カウンターイオンであるアメジオールの代わりに 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノールを使用した場合についても検討した。

図 1 に R_2NCS_2Na のイソタコフェログラムを示す。また、図示しないが、 $Hetero \cdot C S_2 Na$ も同様によいイソタコフェログラムが得られる。移動度と分子量の関係、($1/PU$ と $Z \cdot M^{-2/3}$) すなわち、 PU 値の逆数と荷電数と分子量の⁻²乗の積の間には、直線関係が得られた。その結果を図 2 に示す。モルフォリンジチオカルバミン酸ナトリウム ($Mo \cdot C S_2 Na$) だけが直線からはずれている。この直線関係から、これら分子の移動度は、分子の形状にかかわらず分子量の大きさに従って小さくなっていくことがわかる。なお、 $n-Pr$ と $i-Pr$ および $n-Bu$ と $i-Bu$ のそれぞれは、同じ PU 値を示すが、半波電位の値はそれぞれ異なっている。また、 $Mo \cdot C S_2 Na$ が図 2 に見るように直線からはずれるのは、複素環中に窒素以外に酸素原子を含み、環内の電気陰性度を高めるためと推察される。

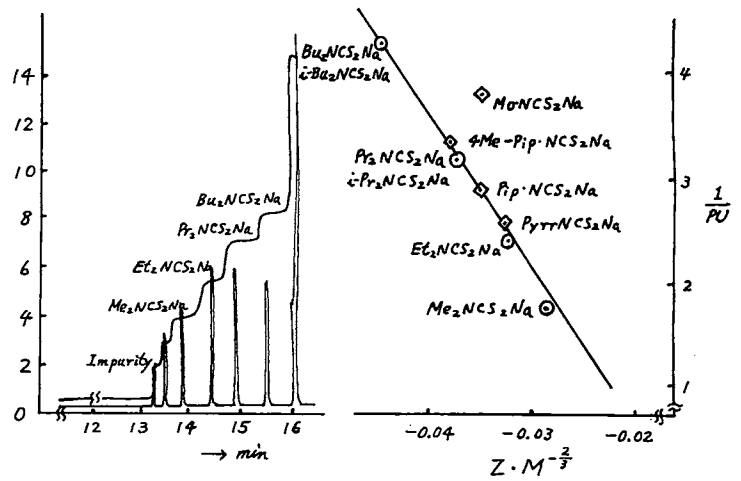


図 1 R_2NCS_2Na のイソタコフェログラム 図 2 $NaDTC$ の分子量と PU 値の関係

(文献) 1) 鉄見雅弘ら, 日化, 1982, p1175

2) 秋山純一ら, 島津評論, 3, 111 (1977)

6 イソタコフォレシスによるポリリン酸塩の分子鎖長の測定

神戸大学教養部 ○本岡 達・成相裕之・中崎和美
神戸女子薬科大学 津浪吉充朝

1. 緒言

ポリリン酸塩は一般式 $M_{n+2}P_nO_{3n+1}$ (M は 1 個の金属に相当) で表わされる。 n が 1~3 の短鎖長のものは容易に合成もでき、分離定量も容易であるが、 n が 4 以上の鎖長のものになると合成物も混合物となり、分離定量もペーパーあるいはイオン交換クロマトグラフィーなどを用いねばならず、かなりの労力と時間を必要とする。そこで、イソタコフォレシスによる簡便な分離定量の方法を検討した。

2. 実験

イソタコフォレシス：島津細管式等速電気泳動分析装置 I P - 2 A (検出器 P G D) を用い、表 1 のような条件で行った。

ポリリン酸塩の作成とその平均分子鎖長の測定：
 NaH_2PO_4 と Na_2HPO_4 を種々のモル比で混合し、その 15% を $800^\circ C$ で 1 時間加熱し、その溶解物を冷却したステンレススチール上に流して急冷し、種々の平均分子鎖長をもつポリリン酸塩を作った。つまり、この 1% を 100 ml の水に溶解し、その 10 ml を H 型の陽イオン交換樹脂に通したのち 0.1 N NaOH 溶液で pH 測定し、pH 4.6 までの滴定値 (A) と pH 4.6 ~ 9.6 までの滴定値 (B) から、 $\bar{n} = 2A/B$ の式により求めた。なお、 P_1 や P_m を含むものについては後述の (1) 式により補正した。

Table 1 Operational system

Parameter	Electrolyte	
	Leading	Terminating
Anion	Cl^-	Hexanoate ⁻
Concentration	0.01 M	0.01 M
Counter ion	Histidine ⁺	H^+
pH	5.5	3.4
Additive	0.1% Triton X-100	
Capillary tube	100 × 1.0 mm - 100 × 0.5 mm	
Current	200 μA (12 min) → 100 μA	
Temperature	25 $^\circ C$	
Chart speed	40 mm min ⁻¹	

3. 結果と考察

n が 1~3 のリン酸塩については表 2 のように、P U 値も十分に離れているので容易に分離定量することが出来る (既報)。しかし、 n が 4 以上になると P U 値が接近し、本報の実験条件下では分離することが困難であった。

一般に、 n が 4 以上のポリリン酸塩はオリゴリン酸塩の混合物として生成することが多く、平均分子鎖長 (\bar{n}) がよく用いられる。

そこで表 2 から n の増大とともにイソタコフェログラムのゾーン長 (Equivalent response) が減少することに着目して、平均分子鎖長とゾーン長との間の関係について検討した。

図 1 にポリリン酸塩 (オリゴリン酸塩混合物) のイソタコフェログラムを示す。a は P_1 、b は P_m 、c はその他のリン酸塩の各ゾーン長である。一般に、加熱により合成されたオリゴリン酸塩混合物は若干の環状リン酸塩 (主として P_m) を含んでおり、鎖状のリン酸塩 (ポリリン酸塩) を議論する場合には除外して考える必要がある。図 1 のように、 P_m は P U 値が最も小さく、しかもよく分離しているため、容易に除外することが出来る。なお、イソタコフェログラムでは P_m 以上の環状のリン酸塩は c のゾーンに入り、分離することはでき

Table 2 PU value and zone length of short chain phosphates

Phosphate	PU value	Zone length	
		Molar response (mm mol ⁻¹)	Equivalent response (mm equl. ⁻¹)
P_1	0.669	1.28×10^9	1.28×10^9
P_2	0.306	2.11 "	1.06 "
P_3	0.227	2.80 "	0.93 "
P_4	0.233	3.20 "	0.80 "

さながら、幸い P_{3m} がほとんどないので、 P_{3m} 以上の環状リン酸塩は無視することにした。

そこで、 P_{3m} を除いた平均分子鎖長とゾーン長の関係を探るに結果、 $\log \bar{n}_c$ と C_c との間に図2のような関係があった。 \bar{n}_c が7附近を境にして勾配の異なる二本の直線が得られた。 \bar{n}_c が7附近で折れ曲がるのは、この鎖長より短い鎖状リン酸塩アニオンは rigid form、より長いものは flexible form をとるためであろう。

一方、ポリリン酸塩（オリゴリン酸塩混合物）の平均分子鎖長は pH 滴定による末端基滴定法により決定されることが多い。この場合、オルトリン酸塩 (P_1) と環状リン酸塩（主に P_{3m} ）が含まれる場合は次式にしたがって、その補正をする必要がある。

$$\bar{n} = 2(\text{total P} - P_{3m}) / (\text{end-group P} + P_1) \quad (1)$$

しかし、本法を用いると、 P_1 は図2の $\log \bar{n}_c - C_c$ の直線上にあり、図1からわかるように P_{3m} はゾーンcから除外されているので、その補正を必要としない。

以上のように、イソタコフォレシスにすると、労力が少なく、簡便にポリリン酸塩の平均分子鎖長を決定することが出来る。

4. 応用

本法を市販のポリリン酸塩の平均分子鎖長の測定に適用した。表3にその結果を示すが、イソタコフォレシス (IP) の \bar{n}_c と末端基滴定法 (ET) の \bar{n} はよい一致を示す。しかし、後者の方がやや大きく、特に試料1, 2 および6ではその傾向が著しい。これは試料中に P_1 や P_{3m} が含まれており（表3）、特に1, 2 および6の試料では相対的に多く含まれている（特に P_1 ）ためである。上述のように pH 滴定では、 P_1 や P_{3m} が含まれていても正しい平均分子鎖長が得られないので、(1) 式を用いて補正すると、表3の $\bar{n}(P_1, P_{3m})$ の値になり、本法の値とよく一致する。

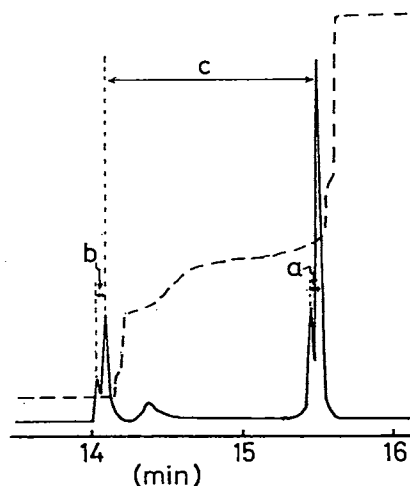


Fig. 1 Isotachopherogram of polyphosphate including P_1 and P_{3m}

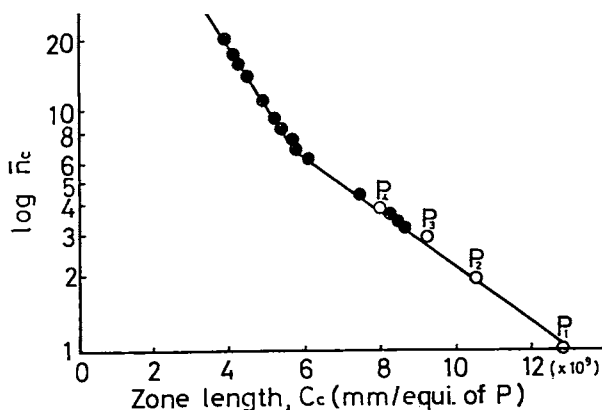


Fig. 2 Relationship between average chain length and zone length

Table 3 Comparison of IP and ET results for some commercial samples

Sample	IP	ET		P_1 (%)	P_{3m} (%)
	\bar{n}_c	\bar{n}	$\bar{n}(P_1, P_{3m})^*$		
1	3.0	4.1	3.1	14.8	2.4
2	6.9	9.1	7.3	4.2	4.2
3	12.3	13.4	12.8	—**	4.3
4	10.5	11.0	9.9	1.4	3.7
5	11.2	11.9	11.5	—**	3.9
6	6.4	8.7	5.9	9.3	3.8
7	13.0	14.6	12.6	1.4	5.0

* Average chain length corrected for P_1 and P_{3m}

** Below the limit of detection (0.3%)

7 細管式等速電気泳動法による水溶性ボールペン用 インク液中の塩素イオン及び硫酸イオンの定量

神奈川県工業試験所

村井省二

小沢隆美

堀川邦彦

牧 康行

1 緒言

細管式等速電気泳動法(IP法)は、無機イオン、有機イオンを問わずに同時定量ができ、かつ前処理や分析操作が簡便な方法である。特に試料溶液が著しく着色し、比色法等では分析が困難な場合、IP法は有効な手段と考えられる。こうした例として著者らは、ボールペンに用いる水溶性インク液中の無機陰イオン(Cl^- , SO_4^{2-})の分離定量にIP法を適用した。インク液中の Cl^- , SO_4^{2-} は、製造工程上問題となる不溶性沈殿物の発生や「かすれ」等の原因となる。そのためこれらの量を知る事は、インク液の品質管理上重要であるが、液中の染料の妨害により比色法等による定量は容易でない。そこでIP法で検討したところ、比較的簡便にインク液中の Cl^- , SO_4^{2-} を同時に分離定量することができたので以下報告する。

2 実験

装置；島津細管式等速電気泳動装置(IP-2A)を用い、検出は電位勾配検出器(PGD)を用いた。

標準溶液(Cl^- , SO_4^{2-})；特級塩化ナトリウムおよび硫酸ナトリウムを水に溶かし、適宜の濃度に調整した。

試料；A社製水溶性ボールペン用インクのうち、黒インク(3ロット、液体)と、赤、黄、青インク(各1ロット、粉末)を適宜水で希釈して用いた。

電解液；表1に示す電解液を用いた。

泳動チューブ；ポリカラム $1\text{mm}\phi \times 4\text{cm}$ 、メインカラム $0.5\text{mm}\phi \times 10\text{cm}$ を用いた。

泳動条件；泳動電流 $50\sim 300\mu\text{A}$ 、泳動部、測定部温度 15°C とした。

実験操作；黒インクを水で $2\sim 5\%$ に、その他のインクを水で 1% に希釈し、その適量($100\mu\text{L}$ 以下)をマイクロシリンジでIP装置に注入した。なお泳動時間は $15\sim 30$ 分であった。

3 結果

表1に示す、いずれの電解液を用いても標準溶液の Cl^- , SO_4^{2-} を同時に分離定量できる。図1に Cl^- , SO_4^{2-} の分離に及ぼす溶媒(アセトン、エタノール)の効果を示す。電解液Iのリーディング液中のアセトン混合率を高くすると、 Cl^- , SO_4^{2-} の分離はより明確になり、PU値も高くなる。 Cl^- のPU値はアセトン無添加に比べ、20%混合では約4倍に、50%混合では約10倍になる。また SO_4^{2-} のPU値は20%混合では約5倍に、50%混合では約8倍になる。黒インクの Cl^- , SO_4^{2-} は、アセトンの混合率が20%以下になると明確に分離され、染料の妨害は見られない。(しかし、アセトンの混合率が30%以上になると SO_4^{2-} は Cl^- とは分離できるが、染料との分離が不明確になり定量できない。

電解液IIも、リーディング液中のエタノール量を増加すると Cl^- , SO_4^{2-} はより明確に分離されPU値も高くなる。 Cl^- のPU値はエタノール無添加に比べ、10%混合では約3倍に20%混合以上では約5倍でほぼ一定の値を示した。また SO_4^{2-} のPU値は20%混合では約5倍に、50%混合では約9倍になる。この電解液では、黒インク中の Cl^- , SO_4^{2-} はエタノール

の混合率が20%以下では明確に分離されるが、30%以上の混合率にすると Cl^- は分離されるが SO_4^{2-} と染料は分離できない。

希釈された試料の水素イオン濃度は黒でPH 8.9~9.5に、その他の試料で6.3~7.6である。一方電解液I・IIは液性が酸性のため、試料(特に黒インク)の分析回数が増えると、試料中のスルホン酸系染料が泳動チューブや検出器に付着してよごれ、出力ノイズが大きくなっていく。これはIP装置の泳動部および検出部が非常に細いため、非水溶性化した染料の「つまり」や「よごれ」によって起こる現象である。そこで電解液IIIを用いアルカリ側で検討した。この場合の Cl^- のPU値は、電解液Iで、アセトンを50%混合した値と、 SO_4^{2-} のPU値はアセトンを30%混合した時の値とほぼ等しい。また各イオンの分離も明確で、泳動チューブおよび検出器の染料によるよごれもほとんど見られない。

以上の結果、比色法等では定量困難であるインク液中の Cl^- 、 SO_4^{2-} をIP法により簡便に同時定量できる。また電解液は、酸性、アルカリ性のどちらでも目的イオンを分離定量できるので、IP装置の保守も容易となる。

各インクの Cl^- 、 SO_4^{2-} の定量結果を表2に示す。またイソタコフェログラムの一例を図2に示す。(試料; 黒1、電解液III、泳動電流; 100 μ A、注入量; 5% 20 μ l) なおこれらの実験条件下での Cl^- 、 SO_4^{2-} の定量限界は電解液I・II・IIIとも各々約3ppmである。

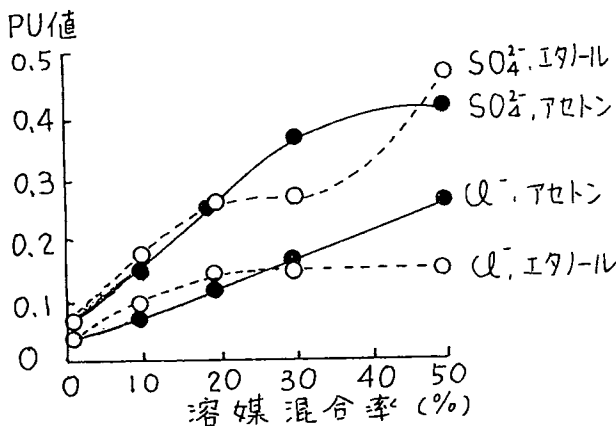


図1 溶媒の混合率とPU値の関係

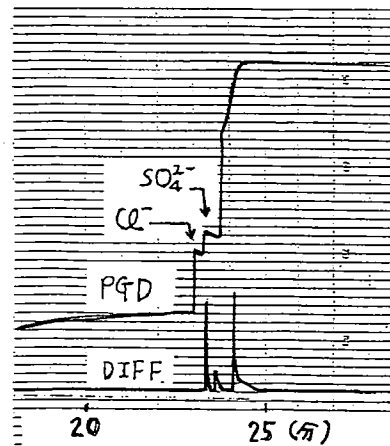


図2 黒インクの分析例

表1 電解液(I・II・III)

	リーディング液	ターミナル液
I	5mM硝酸カルシウム水溶液+アセトン	5mM n-カボン酸水溶液
II	5mM硝酸カルシウム水溶液+エタノール	5mM n-カボン酸水溶液
III	5mM水酸化カルシウム水溶液	5mM n-カボン酸水溶液

表2 インク中の Cl^- 、 SO_4^{2-} 量

試料	黒1	黒2	黒3
電解液	III	I	III
Cl^- (%)	0.23	0.85	0.19
SO_4^{2-} (%)	0.31	0.90	0.22
PH(試料濃度)	9.4(5%)	8.9(2%)	9.5(5%)
試料	赤	黄	青
電解液	I	III	II
Cl^- (%)	2.4	0.79	0.17
SO_4^{2-} (%)	0.81	0.50	0.38
PH(試料濃度)	7.1(1%)	7.6(1%)	6.3(1%)

9 細管式等速電気泳動法によるリジノアラニンの定量

お茶の水女子大学 福嶋 博保
英立女子短大 ○津田 淑江

蛋白質をアルカリ処理することにより、テヒドロアラニン残基とリジン残基とが、クロスリンクし、リジノアラニンが生成されることは、すでに多くの報告がある。

食品を貯蔵する際に、あるいは食品の調理過程において、蛋白質をアルカリ条件下で加熱処理することは充分考えられる。また最近では、何らアルカリ処理を経ない身近な調理食品や市販食品中にもリジノアラニンを検出したとの報告もあり、蛋白質のクロスリンクは、食品の分野においても注目されてきている。このようなリジノアラニンの生成によって蛋白質食品の栄養価の低下が明らかにされているので、この反応生成物を正確、簡易に定量することが必要となる。しかしその量が、他のアミノ酸あるいはジペプチドに比べ、少ないため定量上の問題が多い。

従来、リジノアラニンの測定法としては、アミノ酸アナライザー、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーなどが知られている。

しかしアミノ酸アナライザー法による時は、リジノアラニンはリジンの直前に検出され、他のアミノ酸に比べ総量が少なく、ピークが小さいため、少しの条件の違いにより、リジンやオルニチンなどの他のアミノ酸に影響されることもある。その他、それぞれの定量法には、一長一短がある。

そこで細管式等速電気泳動法を用いて、他のアミノ酸に影響されることもなく、しかも迅速に測定する方法を検討した。機種は島津製 IP-1B を用い、定性、定量は電位勾配検出器とその微分により行った。

リジノアラニンはマイルス社製を水溶液として用いた。

I. 泳動条件の検討

リジン、アルギニンのような塩基性アミノ酸および、それを含むペプチド類は、アルカリ領域では陽イオンとして存在しており、陽イオンとして分析することが適当とされ、Kopwillemらは、リジン、アルギニンを、リーディングイオンを0.005Mバリウムイオン、カウンターイオンをバリウムとするリーディング液(pH 9.75)で、ターミナル液としては、トリス-塩酸(pH 8.0)を用いて分離している。

著者らは、リジノアラニンにおいてもこの条件下での泳動を試みた。リジン、アルギニンはKopwillemらと同様分離定量することが出来たが、リジノアラニンのゾーンは現れなかった。そこで、リーディングイオン、カウンターイオン、ターミナルイオンを変え、またpHを3から9まで変えてリジノアラニンの泳動を行った。

その結果ターミナル液としてはトリスより易動度の小さいベタインおよびカルニチンをターミナルイオンとして用いた場合、リジノアラニンを分離することが出来た。その定性値(Potential Unit Value)を得ることが出来た。しかし、ベタインをターミナルイオンに用いた場合は、ベースラインが不安定となるため、ベタインは不適当と思われ、ターミナル液はカルニチンを用いることにした。また、リーディング液として、水酸化カリウム-カコジル酸系を用いた場合には、良い定性値が得られたが、リーディング液に沈殿が生じやすいが水酸化カリウム-酢酸系は安定性のある定性値を得ることが出来、定量性もすぐれていることを認めた。pHはこの系で安定な5.0を用いた。

したがって Table 1. に示した泳動条件を操作を行なうことにした。また本条件下で泳動させた時のリジノアラニンおよび各種アミノ酸について Table 2. に示すような P.U. 値を得た。リジノアラニンの P.U. 値は 0.44 を示し、他のアミノ酸は 0.27~0.30 を示し、リジノアラニンより先に泳動して来た。

この条によるリジノアラニンの定量性を検討したところ、1nmol から 25nmol まで、カーン幅との間に直線性があり定量性を認めることが出来た。

なお試料注入量は 2 から 10 μ l を行なった。

II. ラット小腸内容物および胃内容物中のリジノアラニンの定量

リジノアラニンを添加した飼料を摂取したラットの、小腸内容物、胃内容物中のリジノアラニン量を従来のアミノ酸アナライザーを用いた場合と本定量法を用いた場合につき、その測定値を比較検討した。

小腸、胃内容物は 110°C、24 時間加水分解し試料とし、両方法によってそのリジノアラニン量を求めた。定量値を比較するとそれぞれ大変近い数値を示し、本法を実際のリジノアラニンの定量に用いることが出来た。

III. 食品中のリジノアラニンの定量

さらに同方法を用いて食品中のリジノアラニンの定量を試みた。

試料は市販ピータンを用いた。ピータンはその製造工程中、アルカリ液を用いるため、リジノアラニンが生成されることはすでに知られている。

ピータンの卵黄部分と卵白部分に分け、110°C、24 時間加水分解後試料とした。

その結果の数値は文献値に近い値が得られ、本法が食品中のリジノアラニン定量にも応用できることが認められた。

Table 1
Operation Conditions for Analyses of
LAL and Amino Acids

	Leading Electrolyte	Terminal Electrolyte
Cation	K ⁺	Carnithine
Concentration	0.01 N	0.01 N
pH	5.0	
Electric Current	75 uA	
Capillary Tube	0.5 mm ϕ x 20 cm	
Additive	0.5% Triton X 100	
Controlled Temperature	20°C	

Table 2

Compounds	P.U.V	Compounds	P.U.V.
LAL	0.44	Aspartic acid	0.29
Lysine	0.32	Glutamic acid	0.29
Ornithine	0.28	Threonic acid	0.29
Histidine	0.30	Methionine	0.29
Arginine	0.32	L-Alanine	0.29
Proline	0.29	Serine	0.27
Valine	0.29		

10 生薬中無機アニオンおよび有機酸の分析

島津・分析
岡大・薬

児嶋佳世子, 八木孝夫
奥田拓男

IP法は前処理が簡単なこと, 分析時間が短いことなどから生薬中有効成分(アルカロイド, 配糖体, タンニン)の分析に応用されてきた。しかし, 近年は有効成分に余り関係がないとされてきた低分子物質の存在が注目され始め, 特にアニオンに関しては, アルカロイド等と塩を形成して存在すると考えられ, 漢方々剤の分析においてこの影響は無視できないとされてきている。しかし, 無機アニオンや有機酸についての報告例は少ない。これら生薬中低分子アニオンの分析法としてIPによる検討を行った。

(1) ショクヤク中無機アニオン (生薬誌, 36, 280 (1982))

芍薬栽培品, 市場品の水抽出物を用い, その中に含まれるハロゲン, SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- を測定したところ, 3種類の電解液系で定量できることがわかった。この実験から, F, Br, I⁻ は検出されず, その他のイオンは表Iに示すように約500 ppm含まれるが, かなり検体間のバラツキがあることが明らかになった。また4~6月と採取時期の異なる芍薬を調べたところ, PO_4^{3-} において5月に高く, 4~6月に低いという顕著な差がみられた。このことは植物栽培における施肥などの土壌管理に役立つのではないかと考えられる。

表I. 芍薬中無機アニオン平均濃度 (ppm)

	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻	NO ₃ ⁻
京都栽培品 (20検体)	463	489	612	501
茅野栽培品 (20検体)	363	505	631	514
市場品 (19検体)	406	832	735	529

(2) ウメ果実および製品中のシアニドイオン (生薬誌, 36, 196 (1982))

未熟のまま落ちた梅の実(以下落梅と略す)や梅の緑色の果実(青梅)および梅の実を加工した烏梅, 梅肉エキス等を沸騰水中で煮沸抽出し, CN⁻ を分析したところ, リーディング液としてHCl-Ammonediol (pH 7.5) を用いるのが最適であった。

(図1参照) この条件で測定したCN⁻ 定量結果を

表II. 梅およびその製品中のCN⁻ 濃度 (ppm)

	落梅		青梅		梅干		烏梅	梅肉エキス
	果肉	種子	果肉	種子	果肉	種子		
IP	1,570	5,270	392	1,830	N.D.	2.3	N.D.	N.D.
JIS	1,380	5,720	399	1,900	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

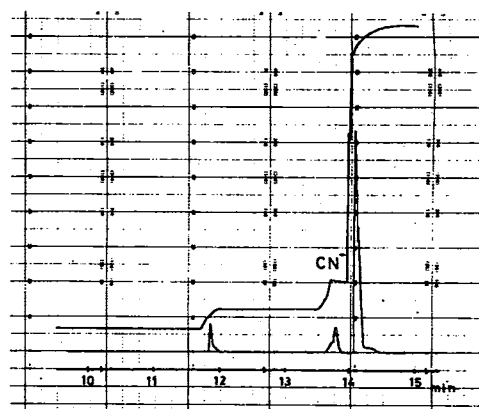


図1. 落梅中のCN⁻ 分析イソタコフェログラム

JIS-K0101収載のピリジン-ピラゾロン法と比較して表Ⅲに示すが、両者の値は極めて近似している。また、種子中の量が多いと果肉中でも多くなる傾向が個々の梅についてみられた。

CN⁻測定と同一検液を用いて、有機酸(梅中主成分のリンゴ酸、クエン酸)を測定し、これを表Ⅲに示すが、成熟度の劣る落梅ではシアン量が多いのに対し、有機酸量が極めて少ないという結果を得た。これは有機酸の生合成が貧弱である一方、アミグダリンの分解によるシアン生成が多いためではないかと考えられる。以上の結果は、梅を加工した製品では中毒しないが、落梅を食べると中毒しやすいという説を裏付けている。

表Ⅲ. 梅およびその製品中のリンゴ酸、クエン酸およびシアン濃度 (ppm)

	落梅	青梅	梅干	烏梅	梅肉エキス	プラム
リンゴ酸	630	4,600	12,300	17,700	200,000	5,000
クエン酸	950	7,760	20,900	95,300	403,000	3,700
シアン	1,570	392	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.

(3) イタドリ等のシュウ酸

イタドリ、ホウレンソウなどは、シュウ酸が含まれているため、多量に食べると血中Caと難水溶性塩を形成し、血中のCa不足を生じるとされている。これら植物を加熱抽出し、シュウ酸を測定したところ、イタドリでは成長に従ってシュウ酸量が増加した。抽出残渣を1N HClで抽出し、難水溶性塩を形成しているシュウ酸を測定したが、微量検出しただけであった。カタバミ、スイバ等シュウ酸を多量に含んでいるものは別として、ホウレンソウ、イタドリでは余程大量に食べない限り問題ないよう考えられる。

表Ⅳ. 植物中シュウ酸濃度 (ppm)

イタドリ			ホウレンソウ	カタバミ	スイバ
4/10	5/1	5/12			
184	653	716	1,340	2,130	2,890

(4) タンニン含有生薬の有機酸

タンニンを多く含むゲンノショウコやバンカ、サンシュユ等にも有機酸は含まれており、古く朝比奈ら(薬誌, 38, 405 (大正7))がゲンノショウコ中にコハク酸が存在することを報告しているが、その他クエン酸等含まれていることがわかった。バンカは最近ゲアバなどと別名をつけられたりして保健飲料として売り出されているが、クエン酸を多量に含んでいる。また、図2に示すようにサンシュユ中では酒石酸やリンゴ酸等の有機酸が多量に含まれていることが明らかになった。

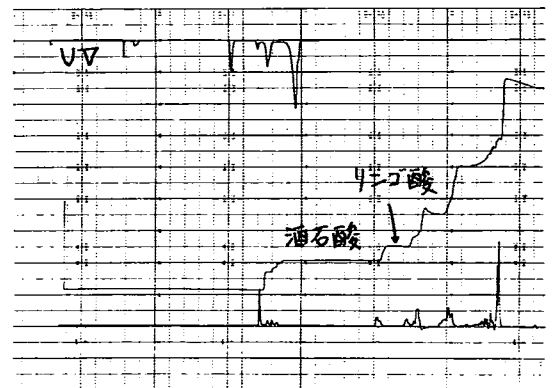


図2. サンシュユ中の有機酸分析イソトコフェログラム

I. 等速電気泳動の理論の基本式

等速電気泳動(ITP)の理論の基本式は

1. 先行ゾーン, α , での先行イオン, A, の泳動速度と後続ゾーン, β , での後続イオン, B, の泳動速度が等しいことを表わす等速泳動の式と,

2. カウンターイオンおよびその他のイオンの質量バランスを表わす式である.

ITPの式は, 伝導率を κ , 易動度を U , ゾーンを右肩の添字, イオンを右下の添字で表わすと,

$$\frac{U_A^\alpha}{\kappa^\alpha} = \frac{U_B^\beta}{\kappa^\beta} = v \quad (1)$$

カウンターイオン, 1 (1種類とは限らない) についての質量バランスの式は, mol濃度を C として,

$$C_1^\alpha \frac{U_1^\alpha}{\kappa^\alpha} - C_1^\beta \frac{U_1^\beta}{\kappa^\beta} = v (C_1^\beta - C_1^\alpha)$$

であるが, (1) 式の v を用いると,

$$\frac{C_1^\alpha}{\kappa^\alpha} (U_A^\alpha + U_1^\alpha) = \frac{C_1^\beta}{\kappa^\beta} (U_B^\beta + U_1^\beta)$$

となり, 更に, (1) 式と辺々除して

$$C_1^\alpha \left(1 + \frac{U_1^\alpha}{U_A^\alpha} \right) = C_1^\beta \left(1 + \frac{U_1^\beta}{U_B^\beta} \right) = L_1 \quad (2)$$

と表わすことができ, L_1 はゾーンの不変量である.

A や B と同符号のイオン, j (1種類とは限らない) についての質量バランスの式は同様にして

$$C_j^\alpha \left(1 - \frac{U_j^\alpha}{U_A^\alpha} \right) = C_j^\beta \left(1 - \frac{U_j^\beta}{U_B^\beta} \right) = M_j \quad (3)$$

であり, v , L_1 , M_j がゾーンの不変量である.

(3) から, 試料と同符号の共存イオンの易動度は, どのゾーンでも試料イオンよりも大きいのか小さいかのどちらかでなければならないことが知られる.

κ^α は $C_A^\alpha, C_1^\alpha, C_j^\alpha$, κ^β は $C_B^\beta, C_1^\beta, C_j^\beta$ の関数であるが, A, B, 1, j が強電解質か弱電解質かによってその関数形は異なる.

II. 強電解質の ITP で, 試料と同符号のイオンが共存する場合

カウンターイオンを R, 共存イオンは 1種類として, これを j とする. 強電解質では, U_A, U_B, U_R, U_j はどのゾーンでも同じ値をもつものとして取扱う. 伝導率の $F/1000$ 倍 (F は FARADAY 定数) を κ としても, (1) ~ (3) はそのまま成立つので, 以後はこれを用いることにする.

$$\kappa^\alpha = C_A^\alpha U_A + C_j^\alpha U_j + C_R^\alpha U_R = C_A^\alpha (U_A + U_R) + C_j^\alpha (U_R + U_j) \quad (2.1)$$

$$\kappa^\beta = C_B^\beta U_B + C_j^\beta U_j + C_R^\beta U_R = C_B^\beta (U_B + U_R) + C_j^\beta (U_R + U_j) \quad (2.2)$$

である. 先行ゾーンの組成から後続ゾーンの組成を求めるには, (2) および (3) を用いて

$$C_R^\beta = C_R^\alpha \frac{U_B}{U_A} \frac{U_A + U_R}{U_B + U_R} \quad (2.3)$$

$$C_j^\beta = C_j^\alpha \frac{U_B}{U_A} \frac{U_A - U_j}{U_B - U_j} \quad (2.4)$$

が求められる, 電気的中性の式, $C_B^\beta = C_R^\beta - C_j^\beta$ から

$$c_B^\beta = \frac{U_B}{U_A} \left(c_R^\alpha \frac{U_R + U_A}{U_R + U_B} - c_j^\alpha \frac{U_j - U_A}{U_j - U_B} \right)$$

えられる。計算例を表に示した。
 易動度の大きなイオンを共存させて、κ を大きくすることにより、小さい電圧のもとで易動度の小さいイオンの分析を行いうるものと考えられる。

	α-ゾーン				β-ゾーン			
	A	j	R	κ	B	j	R	κ
1)	0.10	0.00	0.10	3.8	0.086	0.000	0.086	2.85
2)	0.08	0.02	0.10	4.2	0.074	0.012	0.086	3.15
3)	0.05	0.05	0.10	4.8	0.056	0.030	0.086	3.60
U	20	40	18		15			

U, κなどは相対値。

III. 酸性域での弱酸の分析 — 水素イオンの電気伝導の取扱い —

β-アラニンをカウンターイオンとする多塩基性弱酸の分析で、pH4以下の系では水素イオンの運ぶ電流を無視することができない。この系はカウンターイオンと同符号のイオンが共存する系である。ゾーンの不変量 $\kappa^\alpha/U_A^\alpha = \kappa^\beta/U_B^\beta$ は、 H^+ に対する不変量(2)を L_H と書くと

$$\frac{\kappa^\alpha}{U_A^\alpha} = \frac{U_A^- A^- + 2U_{A^{2-}} A^{2-} + \dots + U_{R^+} R^{+\alpha}}{U_A^\alpha} + L_H - H^{+\alpha}$$

と書くことができるので

$$N = \frac{U_A^- A^- + 2U_{A^{2-}} A^{2-} + \dots + U_{R^+} R^{+\alpha}}{U_A^\alpha} - H^{+\alpha} = \frac{U_B^- B^- + 2U_{B^{2-}} B^{2-} + \dots + U_{R^+} R^{+\beta}}{U_B^\beta} - H^{+\beta} \quad (3.1)$$

も不変量となる。 U_A^- , A^- ,などは1個のAイオンの易動度とモル濃度.....などで

$$U_I^v = (U_{I^-} I^- + U_{I^{2-}} I^{2-} + \dots) / c_I^v \quad I = A, B \quad v = \alpha, \beta$$

の関係がある。

弱酸の電離定数、各個のイオンの易動度、濃度とpHが与えられると不変量Nを求めることができる。この関係を利用して、αゾーンのAの濃度とpHからβゾーンのpHと組成を次のようにして求めることができる。

1. αゾーンについての計算

1-1. c_A^α および pH^α から電気的中性の条件により、 c_R^α を求める。

1-2. 不変量Nを求める。

2. βゾーンについての計算

2-1. $pH_1 = 1$, $pH_3 = 14$ とおく。

2-2. $pH^\beta = \frac{1}{2}(pH_1 + pH_3) = pH_2$ と仮定する。

2-3. U_B^β を求める。

2-4. Rに対する(2)を用いて c_R^β を求める。

2-5. 電気的中性の条件から c_B^β を求める。

2-6. これらを用いてβゾーンについての $N = N^\beta$ を求める。

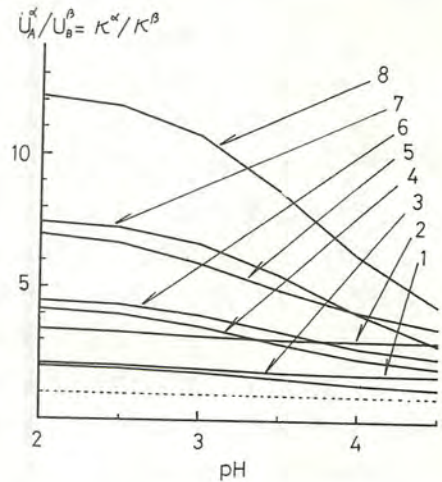
2-7. $D = (N/N^\beta) - 1$ とする。

2-8-1 $D < \delta$ (δ は例えば 10^{-6}) ならば $pH^\beta = pH_2$ とする。

2-8-2 $D > \delta$ ならば pH_2 を pH_1 として2-2以下をくりかえす。

2-8-3 $D < -\delta$ ならば pH_2 を pH_3 として2-2以下をくりかえす。

計算例を図および表に示した。



	pK			U-	U--	U---	
Cl ⁻				72			
Oxalic	1.08	3.75		36	64		1
Phosph.	1.97	6.90	11.76	24	35	43	2
Pyruvic	2.39			42			3
Tartaric	2.92	4.08		20	40		4
Citric	3.06	4.44	5.78	14	23	27	5
Lactic	3.68			33			6
Acetic	4.70			43			7
Caproic	4.85			30			8
β-Ala.	3.60			33 (U+)			

11 等速電気泳動によるヌクレオチドの分析のための至適条件の検索

(阪大・医) ○山本 忠司, (白鷺病院) 山川 真

1. 目的 臨床化学分野におけるヌクレオチドの分析には、酵素法が多く行われているが、今回我々はイソタコによる分析を試み、その分離条件及び臨床応用に関して、若干の知見を得たので報告する。

2. 方法 Adenosine triphosphate (ATP), Adenosine diphosphate (ADP), Adenosine monophosphate (AMP) に関して、pH効果、溶媒効果、錯体効果における実効移動度を検討した。電解液システムは、系1: 0.01M HCl + β -alanine (pH 3.2), 0.01M *n*-capronate 系2: 0.01M HCl + β -alanine (pH 3.6), 0.01M *n*-capronate, 系3: 0.01M HCl + creatinine (pH 4.2), 0.01M *n*-capronate を用い、系1のシステムに、溶媒効果として Acetone を10~50%添加、また錯体効果として、塩化カルシウム、塩化亜鉛、塩化コバルト、塩化銅(II)、塩化バリウム、塩化鉄(III) を各2mM添加した。装置はIP-1B、泳動管は0.5mm ϕ x 200mm、泳動電流は50~100 μ A、恒温槽温度は13 $^{\circ}$ Cである。分離能の評価は、IRM及びPU値によって行い、またUV吸収による測定も同時に施行した。試料はATP-2Na, ADP-Na, AMP-Na (Sigma) をそれぞれ用い、また臨床応用という目的から、生体中に多量に存在する有機酸等との分離の比較の為に、前回報告した有機酸のIRM及びPU値を引用した。

3. 結果 pH効果では、系1, 系2によるATP, ADP, AMPの分離は可能であったが、系3ではAMPの検出はできなかつた。また、pH 3.2では、ATPとクエン酸、リンゴ酸、pH 3.6ではATPとピルビン酸の分離が困難であった。錯体効果では、ATP, ADP, AMPの分離はすべてのイオン種で可能であったが、 Zn^{2+} ではADPと乳酸、 Ba^{2+} ではATPとクエン酸、 Fe^{3+} ではATPと α -ケト酸、 Ca^{2+} ではADPと乳酸の分離が困難であった。溶媒効果では、すべての場合でATP, ADP, AMPの分離は可能であったが、10%ではADPとリンゴ酸、30%ではATPと α -ケト酸、40%ではATPと α -ケト酸、50%ではADPとリンゴ酸の分離が不可能であった。UV吸収による測定では、254nmにおいてATP, ADP, AMPはすべて検出できたが、酵素法による測定と濃度比較した場合、AMPが、イソタコで数10倍高値を示した。

4. 考察 今回我々の使用した電解液系では、Leading: 0.01M HCl + β -alanine (pH 3.2) + 20% Acetone, Terminating: 0.01M *n*-capronate が最も良好な分離を示した。この系において、我々は人赤血球中のヌクレオチドの分析を行つたが、赤血球中のATPの正常値は135 μ mol/100ml RBC, ADPは21.6 μ mol/100ml RBC, AMPは2.1 μ mol/100ml RBCであり、検出限界はATP, ADPまでと承えられる。UVを使用した場合、AMPの検出は可能であるが、結果でも述べた様に、高濃度に検出されることがあり、注意を要する。この原因に関しては、血中の微量金属イオンとヌクレオチドの反応によるUV吸収帯のシフトと承えている。現在、UVを使用したATP, ADP, AMPの同時分析を検討中である。

$\sim 100 \mu\text{mole/l}$

12 吸入麻酔薬ハロセンの代謝産物(TFA)の測定

大島大学医学部麻酔学教室

○ 島崎山丸子, 神田元一, 藤井宏融, 菊地博達, 盛生倫夫

(総言)

トリフルオロ酢酸(CF_3COOH , 以下、TFA)は、現在、臨床麻酔において、広く使用されている吸入麻酔薬ハロセン(CF_3CHBr_2)の主たる最終代謝産物である。

ハロセンは、合成された当初、生体にとって、不活性で、安全な麻酔薬でありとされてきたが、臨床使用の増加に伴い、ハロセンに起因すると思われる肝障害例が報告され、また、生体内で、分解、代謝を受けることが明らかにされ、その代謝産物と、肝障害の関係が指摘されるに至っている。現在では、ハロセンは、嫌氣的条件下では、呼気中に、 CF_3CHCl , CF_3CH_2Cl として排泄され、好氣的条件下では、尿中に、TFAとして排泄されることが知られている。したがって、好氣的条件下—すなわち、通常の臨床麻酔下—の最終代謝産物であるTFAの測定は、ハロセン代謝の一端を知るうえで、極めて有用である。しかしながら、現在まで、その定量報告は、非常に少ない。その理由として、従来、TFAの測定には、ガスクロマトグラフィー、ガスクロマト質量分析計、及び、パーパーコマトグラフィーが用いられてきたが、これらによる測定は、TFAの前処理が煩雑であったり、回収率が低かったり、定量測定が困難であったり、また、測定に長時間要する等が、挙げられる。

そこで、今回、著者等は、等速電気泳動法を用い、無処理尿中のTFAを測定することを試みたので、報告する。

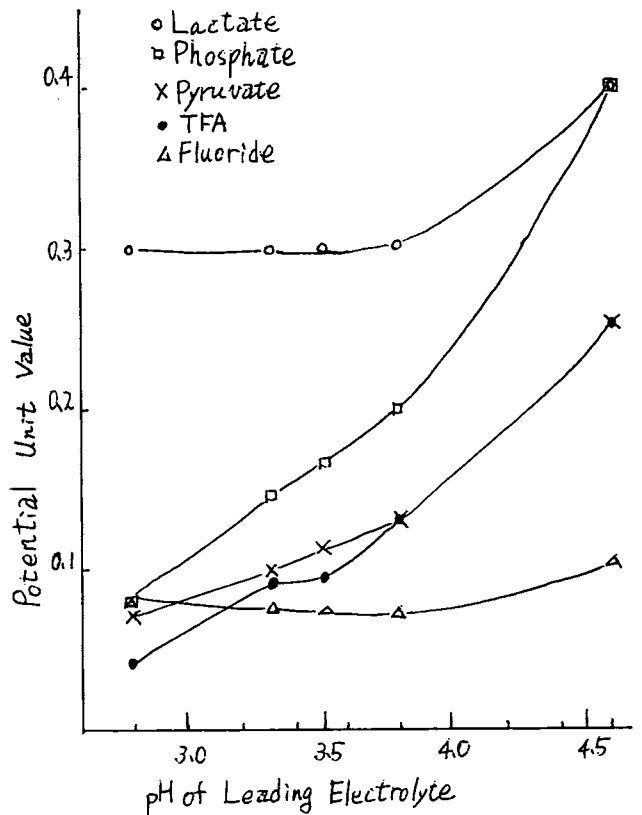
(定性)

分析には、島津細管式電気泳動装置IP-2Aを用い、電位勾配機出器によってPU値(Potential Unit Value)を求め、その値を用いて、定性を行った。

恒温槽は、 $20^{\circ}C$ に、泳動電流は、 $50\mu A$ に設定した。

リーディング液、及び、ターミナル液は、有機酸測定用の分析系として多用されている、 $0.01M$ 塩酸、及び、 $0.01M$ カプロン酸を用いた。リーディング液には、粘性剤として、 0.1% トリトンX-100を添加した。

この分析系を用いて、無麻酔症例の尿を分析すると、有機酸として、乳酸、リン酸、ピルビン酸が、泳動分離された。また、ハロセンの代謝産物であり、正常尿中にも存在するフッ素イオンも、この分析系において、泳動されるため、これらの物質(乳酸、リン酸、ピルビン酸、



フッ素)と、TFAが、最もよく、分離される条件を求めた。

リーディング液のカウンターイオンとして、 $\text{pH} 2.8$ では、グリニルグリニン、 $\text{pH} 4.5$ にはアニリン、その他は、 β -アラニンを使用した。図の如く、乳酸、リン酸、ピロリン酸、TFA、Fは、リーディング液の $\text{pH} 3.4$ から $\text{pH} 3.7$ 付近で、最もよく分離した。

(定量)

以上より求めたリーディング液(0.01M塩酸、 β -アラニン、0.1%トリトンX-100、 $\text{pH} 3.5$)と、ターミナル液(0.01Mカプロン酸)を用いて求めたTFAの検量線は、 $y=15.1x-0.46$ ($x: \text{min.}$, $y: 10^{-9} \text{ mols}$, $r=0.994$)となった。

(ハロセン麻酔後、尿中TFAの測定)

対象として、糖尿病、麻酔歴、酵素誘導薬投与歴のない、ASA分類 $\text{Risk} 1$ の患者を選んだ。チオバルビタール 4 mg/kg 、サクシニルコリンクロライド 1 mg/kg の静注で、気管内挿管した。術中、麻酔維持は、平均濃度 $0.33 \sim 1.49\%$ のハロセンと、 50% 笑気、 50% 酸素でおこなった。採尿は、麻酔前、麻酔中、麻酔後 $7 \sim 14$ 日間おこなう。細管カテーテル電気泳動法を用いて、TFAの測定をおこなった。

麻酔前、麻酔中の尿からは、TFAは検出されなかったが、麻酔施行翌日には、尿中、TFA排泄の割合が最大となり、麻酔後4日から、最長症例では14日間、TFAの定量が可能であった。

また、カンセン等の方法を用いて推定したハロセン摂取量(x)と、尿中TFA総排泄量(y)との間には、 $y=0.08x+3.48$, $r=0.7522$ ($n=12$)であらわされる有意な相関があった。(P<0.01)

また、推定ハロセン摂取量に対する尿中TFA総排泄量を、TFA排泄率と名づけると、全症例のTFA排泄率の平均は、 $10.69 \pm 4.65\%$ であった。

(まとめ)

ハロセンの主な最終代謝産物であるトリフルオロ酢酸を、等速電気泳動法を用いて測定した。本方法は、従来の方法に比べ、前処置等煩雑な操作がいらぬ、簡便で、かつ、正確であることが確認された。尿中TFAの分析条件としては、リーディング液として β -アラニンをカウンターイオンとして $\text{pH} 3.4 \sim 3.7$ の0.01M塩酸、ターミナル液として、0.01Mカプロン酸が、最適であることがわかった。

また、ハロセン麻酔患者の尿中TFAの測定より、ハロセン摂取量の少くとも約 $1/2$ はTFAとして代謝され、麻酔後 $4 \sim 14$ 日間、尿中へ排泄されることがわかった。

13 ラット脳中 GABA の定量と imino peptides の定性について。

高知医科大学 化学教室

場田富子 三笠洋明 ○児玉裕敬

GABA (*γ*-amino butyric acid) の定量については高速液体クロマトグラフィー、酵素による方法等があるが、細管式等速電気泳動法によるこの物質の定量についてはこれまでに報告されていなかった。そこで我々はこの方法を利用して脳中 GABA を定量するための条件を検討した。

先ず GABA を陰イオンとして検出する条件を種々検討したが適当な分析条件を見出すことが出来なかった。そのため GABA を陽イオンとして検出する方法を考え、色々な条件で行なった結果、Leading electrolyte : 0.01M 酢酸カリウム + 酢酸 (PH 4.5), Terminal electrolyte : 0.01M 塩化カルニチンを用いて分析したところ非常によくこの物質を分離することが出来た。(Fig 1A) この方法をラット脳中の GABA の定量に応用してみた。

方法：脳を 4 倍容の 2% SSA 溶液でホモジエネイトシ、遠心分離した後、その Supernatant をダイヤイオン SK-I のカラムにかけ、水洗後 2N-NH₃ で溶出した。その溶出液を減圧乾固し、残渣を一定量の水に溶解し、Isotacho により分析を行なった。その結果、標準品の GABA と同じ Potential gradient を持つ明瞭なゾーンが検出された。又標準品を同時に泳動すると完全に単一のゾーンが得られた。(Fig 1B,C) 次にアミノ酸分析器による定量と比較したところ両者の値は非常によく一致した。(Table I) このことは Isotacho が生体物質の GABA の定量に十分に利用出来ることを示している。

次に iminopeptiduria の尿中に排泄される iminopeptides の定性分析及びこの様な患者のスクリーニングに Isotacho を応用してみました。分析条件は Leading electrolyte として 0.01M 塩酸 + 2-amino-2-methyl-1-propanol (PH 7.50), Terminal electrolyte として 0.01M GABA + Ba(OH)₂ (PH 10.90) を用いて、正常人及び患者の尿を分析すると両者の間に明瞭な相違が見られた。(Fig 2) 又次に正常人及び患者の尿を Chellex-100 のカラムにかけ、Peptides のみを分離しそのサンプルを Isotacho で分析すると正常人では殆んどゾーンは検出されなかったが、患者尿では色々な Peptides のゾーンが検出された。(Fig 3) 又その患者の尿中の Peptide のゾーンを同定するためにそれらの Peptide を Paper chromatography によって分離し、合成品と比較することによって同定をした。Fig 3 にその例を示している。Fig 3A に(患者の Peptide fraction) Authentic Gly-pro を加えて、電気泳動すると C のゾーンが長くなりこのゾーンは Gly-pro を含むゾーンがあることが解る。この様にして、それぞれのゾーンを調べると a = Gly-pro + Asp-pro, b = Ser-pro, c = Gly-pro, Leu-pro, Ileu-pro, d = Thr-pro, e = propro であることが判明した。この方法を利用してすべての iminopeptides を定量することは不可能であるがこの様な患者のスクリーニングに十分応用出来るものと考えている。

Table I

Comparison of GABA contents in rat brain determined by isotachopheretic and amino acid analyzer

Samples	GABA contents (μ moles/g wet weight)	
	Isotachopheretic analyzer	Amino acid analyzer
1	2.78	3.02
2	2.16	2.40
3	2.01	2.20
4	1.66	1.76
5	1.83	1.88

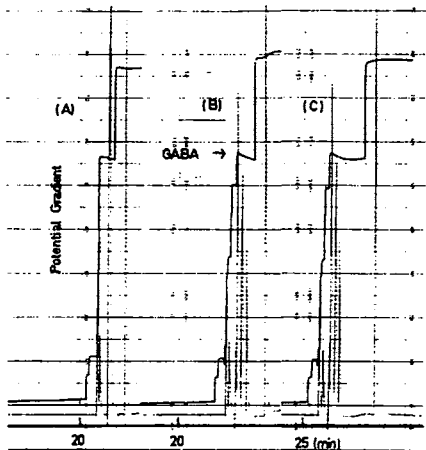


Fig. 1.

Isotachopheretic runs of authentic GABA(A), brain sample(B) and the mixture of authentic GABA and brain sample(C).

Analytical conditions; The leading electrolyte was 0.01 M potassium acetate and acetate, pH 4.5 (containing 0.02 % polyvinyl alcohol).

The terminal electrolyte was 0.01 M carnitine chloride. The migration current was $100 \mu\text{A}$.

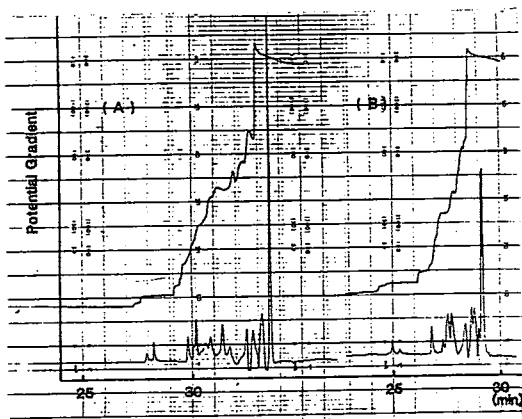


Fig. 2.

Isotachopheretic runs of the urines of a patient with iminopeptiduria (A) and normal human (B).

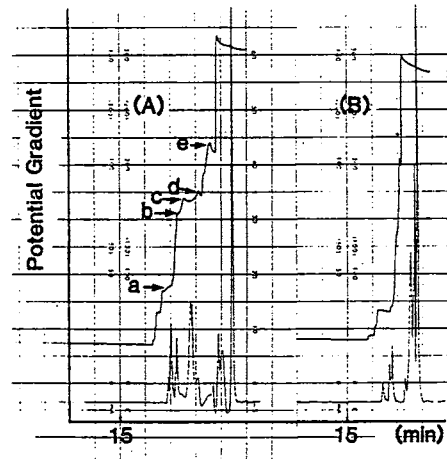


Fig. 3.

Isotachopheretic runs of the peptides fractions of the urine of a patient with iminopeptiduria (A) and normal human (B).

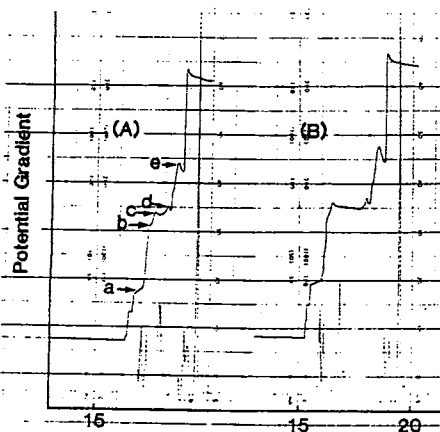


Fig. 4.

Isotachopheretic runs of the peptides fraction of the urine of a patient with iminopeptiduria (A) and (A) + Gly-pro.

Publ
Suzuki
Am.

14 等速電気泳動によるタンパク質分析

—その基礎的検討—

日本化薬・薬品研 ○加藤和夫 宮崎 浩

〔目的〕 細管式等速電気泳動による蛋白質の分離分析のほじまりは Delmotte¹⁾ が 1977年血清蛋白質を対象とした応用例の中で、電解液条件およびスーパーイオンについて報告したときといっても過言ではなからう。そのとき提出された条件などはその後、所謂 Delmotte の条件として現在高く利用されている。最近では血清のような成分を含んだ蛋白質の分離分析以外に特定の蛋白質に焦点を絞って応用例が報告されはじめたが、まだその普及は有機酸やアミノ酸などの低分子物質を対象とした応用例と比較し遙かに遅れているのが実状である。そこで本報では、酸性および塩基性蛋白質の代表的な例として、カリクレイン(K)、スーパーオキシジスムターゼ(SOD)およびウロキナーゼ(UK)を選び、これら蛋白質の分離に適当な電解液条件および各種キャリアー-アミノ酸やUW吸収のないアミノ酸などの低分子物質をスーパーイオンとしてその本法による分離を検討した。ここで得られた等速電気泳動の結果と従来から使用されているアクリルアミドゲル等速電気泳動、さらに最近開発された高速クロマトグラフィーなどの結果の比較検討を行った。

〔装置〕 等速電気泳動(C-IPE): 島津細管式等速電気泳動装置 IP-2A型, 検出器; 紫外線吸収検出器 UVD-10A (254nm), 電位勾配検出器 PGD-2, 分取付加装置 IPP-2A
等速電気泳動(IEF): マリソル産業(株) KS-802 MSE型 マイクロスラゲル泳動装置, 定電流定電圧装置, アト(株) コンスタパワー SJ-1065型, 検出: クマジンブルー染色, 活性染色
高速クロマトグラフィー(FPLC): フルマシア FPLC システム, Mono P HR5/20カラム, 検出: 紫外線吸収 (280nm), 活性染色

〔試料, 試薬〕 蛋白質試料であるブタ膵臓およびヒト尿性カリクレインはハリエル社およびミドリ十字(株)より購入し, 牛肝およびヒト赤血球スーパーオキシジスムターゼはシグマ社より購入し当研究室においてさらに精製を加えにものを用いた。ウロキナーゼは人尿より精製した当社バルフで比活性 $10.4 \times 10^4 \text{ U/mg}$ の高分子型および低分子型ウロキナーゼを用いた。スーパーイオンおよび pH 勾配形成のためのキャリアー-アミノ酸として Servalyte, Pharmalyte, Biolyte および Ampholine の各種 pH のものを用いた。

〔結果〕

SOD: 牛肝およびヒト赤血球由来 SOD は Cu, Zn を含有した金属蛋白質で, pI 4.5~6.0 の範囲に数成分あると云われている。²⁾ そこで SOD を anion として泳動を行うため, pH 8~9.5 の範囲でモルブリンエタンソルホン酸あるいは塩素イオンを先行イオンとした電解液に種々の界面活性剤を添加し, 又 ε-アミノカプロン酸および ε-アミノカプリン酸を pH 10~11 に調整した終末電解液で検討を行った。図1は牛肝(A) およびヒト赤血球 SOD (B) の等速電気泳動を Delmotte の電解液条件で試料 (7mg/ml) 10 μl と Delmotte のスーパーイオン 50 μl 混合液を 3 μl 注入したときの泳動図である。図2は等速電気泳動を pH 4~7 で行ったときの結果である。IEF では牛肝 SOD の活性成分は 5 つ 検出され, それぞれ, a = pI 6.15, b = 5.65, c = 5.28, d = 5.11 および e = 5.03 であり, 中でも pI 5.28 (c) が major component であり, pI 6.15 (a) は minor component であり, 一方 C-IPE で標準品添加法などにより求めたところ, a~e の 5 成分は図1(A) に示したように IEF の結果と良く一致を示した。FPLC での測定を pH 4~7 の範囲で行ったところ, いずれの成分も上記 2 分析法と比較し高い pI 値を示した。

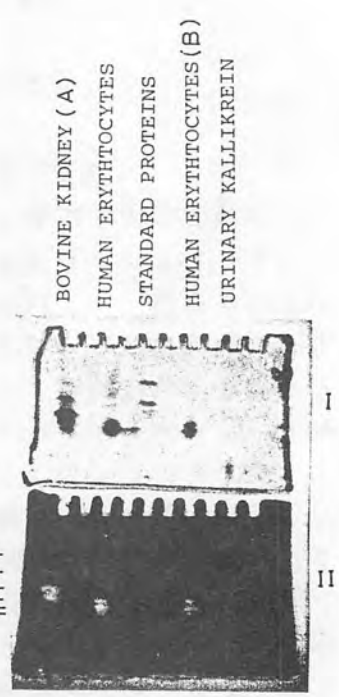
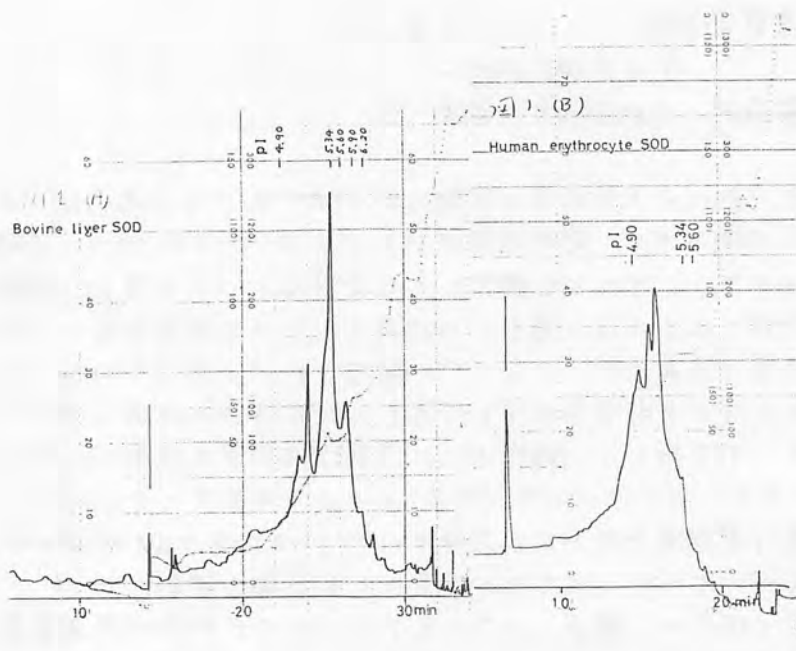


図2
ISOELECTRIC FOCUSING (pI 4-6)
I Coomassie brilliant blue stain
II Active stain

牛肝とヒト赤血球SODのC-ITPとIEFを比較したところ、いずれの分析においても牛肝SODでは検出され成分a, b, cはヒト赤血球SODでは検出されず、d, e成分に加えて新たにf成分が検出され、ヒト赤血球SOD成分がより酸性側に等しい蛋白質であることを確認した。

UK: 塩基性蛋白質であるUKのC-ITPは既にMiwaら³⁾により陽イオンにより試みられており、筆者らは彼らの方法に若干の改良を加えた条件下でC-ITP, IEFおよびFPLCを行った。UKには高分子型(MW 54K)と低分子型(32K)があり、その結果はSODと同様にC-ITPおよびIEFより得られるpI値は良く一致したがFPLCによるpI値は前者より若干高い値を示した。

【参考文献】

- 1) P. Delmotte, *Sci. Tools* 24, 3, 33 (1977)
- 2) B. Lönnerdal et al, *Fieb's letters*, 108, No. 1, 51-55 (1979)
- 3) N. Miwa et al, *Chem. Pharm Bull*, 29 (2), 463-471 (81), 30 (4), 1513-1516 (82)

15 血清蛋白の細管式等速電気泳動分析

— リーディングイオン、スペーサーイオン等の分離への影響 —

(株)島津製作所応用技術部 ○日根 隆

1. 目的

細管式等速電気泳動法 (IP法) は、低分子から高分子までの広範囲のイオン成分が簡便に分析できるため、近年さまざまな分野で利用されている。無機イオン、有機酸、界面活性剤などの比較的 low molecular weight イオンについては数多くの報告がなされており、高分子イオンでは、たんぱくや酸性多糖類 (コンドロイチン硫酸、CMC等) などの生体成分、工業製品の分析例がみられる。この内、血清たんぱくについては Delmotte²⁾ によって報告がされているが、粘性剤の種類、リーディングイオンやスペーサーイオンなどの違いによってどのように泳動状態が変化するかについては詳しく報告されていない。著者は、血清たんぱくの泳動状態およびそれらの分離に対する影響について検討し、その結果について若干の知見を得たので報告する。

2. 実験

装置は島津細管式等速電気泳動装置: IP-2A型を用い、検出器は紫外線吸収検出器 (UVD) と電位勾配検出器 (PGD) とを併用した。

粘性剤の影響を調べるために、トリトンX-100 (Triton)、ポリビニルアルコール (PVA)、ヒドロキシエチルセルロース (HEC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) を使用し、Triton、PVAは0.2%、HEC、HPMCは0.1%濃度に調製し、リーディング電解液に供した。リーディング電解液は5mM-MES、10mM-アミノカプロン酸、10mM-アミノカプロン酸混合水溶液 (pH8.8)、ターミナル電解液は10mM-6アミノカプロン酸、10mM-アミノカプロン酸混合水溶液を水酸化バリウムでpH調整 (pH10.8) したものを使用した。たんぱく試料として、オリエンタル酵母社製の等電異マーカートをアンフォライン (pH3.5~10) と混合して用いた。泳動チューブは、粘性剤相互間の影響を防ぐためにアレカラム、キャピラリーチューブ共に粘性剤の種類を換えるごとに取替えた。

次に、リーディングイオンの影響を検討するために、4.5mM-HCl、4.5mM-乳酸、4.5mM-MESに10mM-アミノカプロン酸をそれぞれ添加した水溶液 (pH9.1) を用いた。粘性剤はHPMC (0.1%) を加え、ターミナル電解液は前述のものを使用した。試料はコントロール血清 (日本トラベール社) をアンフォラインと混合して用いた。

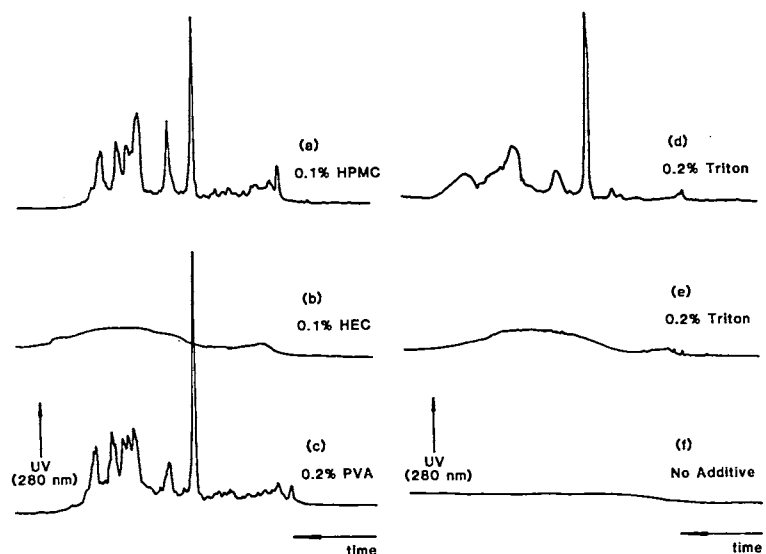


図-1 各種粘性剤による等電異マーカートの泳動図 (UVD測定)

3. 結果

等電異マーカ-の各種粘性剤におけるUVD (280nm)での泳動結果を図-1に示す。粘性剤を使用しない場合は全くたんぱくが検出されず(図-1(f))またHEC(図-1(b))、Triton(図-1(e))でも同様な結果であった。しかし、PVA(図-1(c))、HPMC(図-1(a))を用いた場合は分離に向上が見られた。HPMCを使用したあと泳動チューブを交換せずにTritonに換えて泳動をおこなってみると、図-1(d)のように分離に変化が見られた。これはHPMCがキャピラリーチューブ等の内壁に残存し、その効果が得られたためと考えられる。さらに粘性剤濃度の影響についても検討をおこなった。

リーディングイオンの種類による血清たんぱく(アンブライオン pH 3.5~10を混合)の泳動結果を図-2に示す。易動度は塩素イオン、乳酸イオン、MESイオンと順に小さくなるため、易動度の大きいたんぱく、例えばアルブミン付近の泳動状態に変化が見られた。リーディングイオンの易動度が小さくなるにつれてアルブミンの前に検出されるイオン成分の泳動時間が早くなり、MESでは全く検出されなくなった。このことは、このイオン成分がMESイオンよりも易動度が大きくなったためと考えられ、同時に重炭酸イオンなどの易動度の大きい目的以外のイオン成分も検出させなくすることができた。同時にリーディングイオンの易動度が小さくなるに従い、感度が増加する傾向が見られた。また、アンブライオンのpH領域を変えて血清たんぱくの泳動状態への影響も検討をおこなった。

参考文献)

- 1) Delmotte, P.:
Science Tools, 24, 33, (1977)

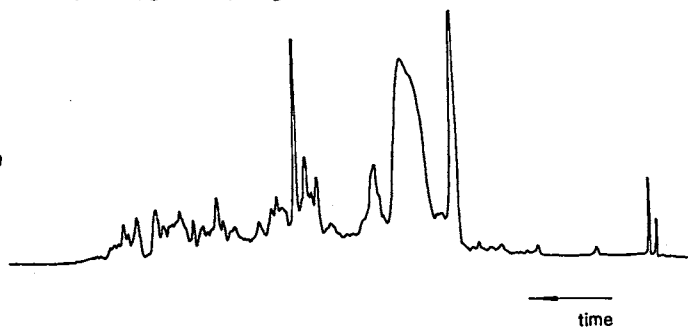


図-2(a) 塩素イオンを用いた場合

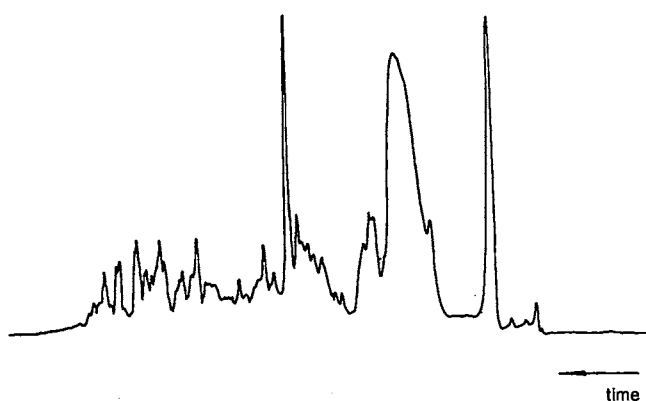


図-2(b) 乳酸イオンを用いた場合

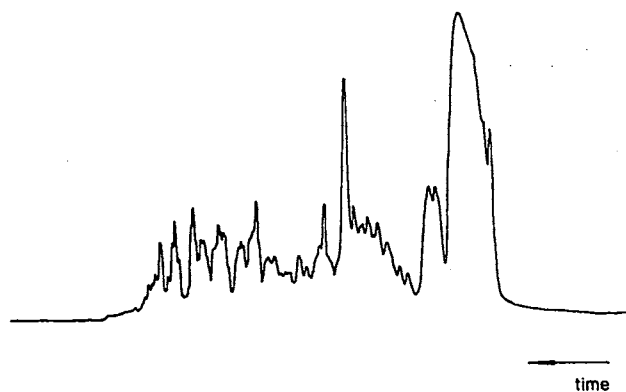


図-2(c) MESイオンを用いた場合

16 血清タンパク質の等速電気泳動と等電点電気泳動

都立大・理・化

小島 清嗣, 真鍋 敬, 奥山 典生

はじめに

細管式等速電気泳動法は、迅速な分析法として、有機酸など低分子の分析には多くの報告が見られる。しかし、タンパク質の分析にはまだ少数の報告^{1), 2)}しか見られぬ。この理由として、タンパク質は移動度が小さく分離が困難なことがあげられる。このため、分離能の向上を目的としてキャリアー・アンフォライトが用いられている。一方、キャリアー・アンフォライトを用いた電気泳動法としては、すでに等電点電気泳動法がある。本報告では、マイクロ二次元電気泳動法の1次元目に、等速電気泳動法と等電点電気泳動法を各々使い、両者の比較を行なった。また、HPMC(ヒドロキシプロピルキセルロース)を添加剤として用いた細管式等速電気泳動において、血清タンパク質分離パターンの検討を行なった。

実験方法

1. ミクロ二次元電気泳動

1-1. 等速電気泳動

先行液には0.005M MESにpH 9.0にしたもの、後続液には0.01M ε-アミノカプロン酸-0.01M pXジオールに水酸化バリウムを加えてpH 10.8にしたものを用いた。ゲルは直径1.3mm、長さ3cmの4%ポリアクリルアミドゲルで、先行液が含まれている。試料は、2%アンフォライン(pH 3.5-10)と40%ショ糖を含む血清2μlに0.1%BPB溶液1μlを加えたものを用いた。電気泳動は30V定電圧で、BPBのバンドがゲル末端にくるまで行なった。

1-2. 等電点電気泳動

ゲルは、2%アンフォライン(pH 3.5-10)を含み、先行液は含まないという点以外は、等速電気泳動法で用いたものと同じである。陽極液は0.005M MES、陰極液は等速電気泳動の後続液と同一のものを用いた。試料には等速電気泳動に用いたものと同じ人の血清(40%ショ糖を含む)2μlを用いた。保護液として2%アンフォライン-20%ショ糖水溶液を重ねた。電気泳動は50V定電圧で10分、その後100V定電圧で3時間行なった。

1-3. 2次元目の分離

2次元目のゲルは4~17%の直線密度勾配平板ゲル(40mm×40mm×1mm)を用いた。1次元目のゲルは、泳動終了後ただちに2次元目ゲル上に密着させ泳動した。電極槽液にはBPBを含むトリス-グリシン緩衝液(pH 8.6)を用い、5mA定電流でBPBバンドがゲル末端にくるまで泳動した。タンパク質の染色には、0.025%CBG(R-250)-50%メタノール-7%酢酸で1時間、脱染色は7%酢酸で一晩行なった。

2. 細管式等速電気泳動

装置は、島津IP-2A(細管-φ0.5mm×20cmのテフロン製)、LKBの2127 Tachophor(細管-φ0.5mm×23cmのテフロン製)を用いた。試料の検出にはUVと電位勾配(LKBの装置では熱検出)の両方を用いた。先行液は0.01M Cl⁻にpXジオールを加えてpH 9.0にしたもの、後続液は0.01M ε-アミノカプロン酸-0.01M pXジオールに水酸化バリウムを加えてpH 10.8にしたものを用いた。先行液にはBrij 35を0.1%(4%)

になるように加えた。泳動は200 μ A定電流で5分間、続いて100 μ A定電流で行なった。HPMCは先行液に0.4% (w/v) 添加したもの、及び添加しないものについて比較した。

結果

1. ミクロ二次元電気泳動による等速電気泳動と等電点電気泳動の比較

Fig. 1-aは、1次元目に等速電気泳動を行なったもの、Fig. 1-bは、等電点電気泳動を行なったものである。後者はゲル全体にタンパク質が分布しているのに対し、前者では狭い範囲に泳動されていた。両方の二次元目ゲル下端に染色されたアンフォラインが見られたが、その範囲は各々のタンパク質泳動範囲に対応していた。ただし、等速電気泳動の場合はアンフォラインがタンパク質より先行して泳動されていた。

Fig. 1-a

Isotachopheresis



Fig. 1-b

Isoelectric Focusing



2. HPMCを添加したときの血清タンパク質の分離パターン

Fig. 2-aは、HPMCを添加していない先行液を用いた場合の、ヒト血清1 μ l (アンフォラインは10%のもの (pH 3.5-10) 0.2 μ lを用いた) の分離パターンである。アルブミン (Alb), トランスフェリン (Tf), γ -グロブリン (γ -G) は精製した単品の泳動結果から同定した。Fig. 2-bはHPMC 0.4%添加した先行液を用いたときのヒト血清分離パターンである。Fig. 2-aに比べて細かきピークが増えた。しかし、細かき針状のピークには再現性がほとんどなく、図中に矢印で示した12のピークについて再現性があった。再現性のあるピークについて、HPMCを用いていない場合と比べて、HPMC添加時の方が分離が良かった。

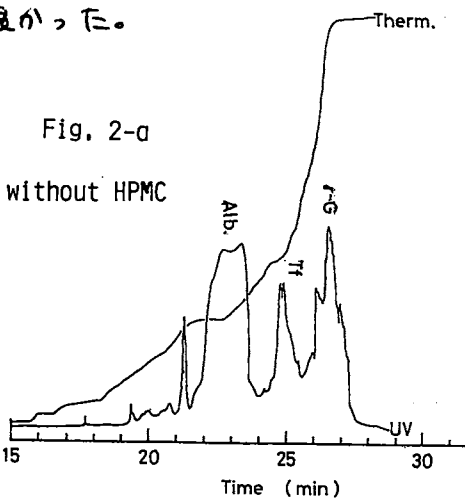
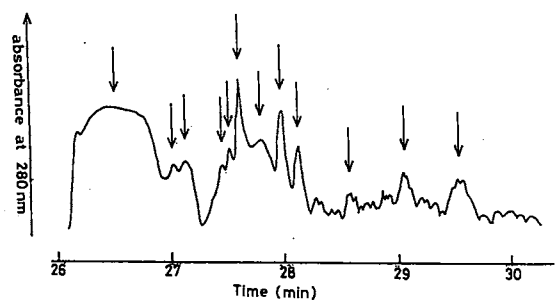


Fig. 2-a
without HPMC

Fig. 2-b with HPMC (0.4%, w/v)



1) Delmotte, P.; Science Tools, 24, 33 (1977) 2) 小島清嗣; 第1回細管式等速電気泳動分析シンポジウム予集 P. 3 (1981)

17 無担体電気泳動装置によるタンパク質の等速電気泳動及び分取

○安川薫、小島清嗣、真鍋敏、奥山典生
都立大 理 化

《はじめに》

アクリルアミドゲルなどのような支持体を用いない無担体電気泳動装置を用いて、これまで可溶性タンパク質、膜成分タンパク質についての等電点電気泳動、分取分画の自動化・高速化への基礎条件の検討を行った。この等速電気泳動の分析及び分取の装置として本装置を用い、タンパク質の等速電気泳動及び分取の条件について検討した。

《実験方法》

○装置 無担体等電点電気泳動に用いたものを使用した。この装置は上部電極槽(a)、下部電極槽(b)、泳動槽(c) (透析膜(d)を両端に設けた内径5mm、長さ160mmのポリエチレン管を用いた)、冷却槽(e)、及び支持部より構成する。Fig-1左に泳動槽3本を装着した場合を示した。

○電源 東洋科学産業のPS-1510直流安定電源を用いた。

○電極槽液 濃縮のための電極槽液は、先行液として0.001 M Cl^- にアキジオールを加えてpH 9.0にしHPMC (hydroxypropyl methyl cellulose) を0.5% (W/V)、シロ糖を20% (W/V) にするように加えた。後続液は、0.001 M E^- アミノ酸 - 0.001 M アキジオールに水酸化バリウムを加えてpH 10.8に調整して用いた。

○泳動試料 ヘモグロビンは、ウシ血液より遠心分離した血球を溶血後エーテルによりリポタンパク質を除き、EtOH法により再結晶した標品を用いた。セルロース、ウシ血液より硫酸分画、DEAE-Sephadex A-50 イオン交換マトリックスにより精製した標品を用いた。

○泳動装置のセッティング ポリエチレン管の泳動槽(c)を装置本体にシリコンゴム製の押え(d)を用い固定した。先行液に浸しておいた透析膜(b)をシリコンリング(c)を用いて泳動槽下端に固定した。注射針1.5mm x 180mm付きの注射器を用いて泳動槽に先行液を気泡を入れないように注入した。先行液の上に後続液を界面を乱さないように重層した。上端は後続液に浸しておいた透析膜(b)をシリコンリング(c)を用いて固定した。上下電極槽に先行液、後続液を注入し装置に電源を接続した。

○泳動試料の添加 泳動試料は、マイクログリッドを用いて上部透析膜をつき破り、先行液と後続液との間に添加した。

○泳動条件 600V定電圧で行った。

○分取分画 等速になった時点でFig-1に示した自動分取分画装置を用いて分離したタンパク質ゾーンを取り出した。また泳動装置前面にあるテフロンのパイプ(K)に注射針を差し込み、ポリエチレン管の泳動槽を穿刺し、ペリスタティックに2液を流出し、U検出器を通し、ラジオシンクロメーターに分画した。

《結果》

タンパク質濃縮のための泳動条件の検討

○電極液の組成については、Delmotte a.0.1 M系ではゾーンが乱れやすい。この場合電圧を下げるにより防ぐことが出来る。発熱量を下げるためには、それぞれ10分の1の電極槽液を作製した。

① HPMC の濃度については、タンパク質の分散を助ぐために 0.5% (W/V) 添加した。

② ショ糖の濃度については、タンパク質を容易にするため 20% (W/V) 添加した。

③ ウシ肝結晶ヘモグロビン 1.0 ml (1.85 mg/ml) の場合約 4 分で試料中は 63 mm から 4 mm に約 16 倍に濃縮された。Fig- II に各時間における試料巾と電流値を示した。

④ ウシ肝結晶ヘモグロビン 50 μ l (46 mg/ml) とウシセルロース α ミニ 50 μ l (71.4 mg/ml) の混合物を泳動した場合を Fig- III に示した。

Fig - I

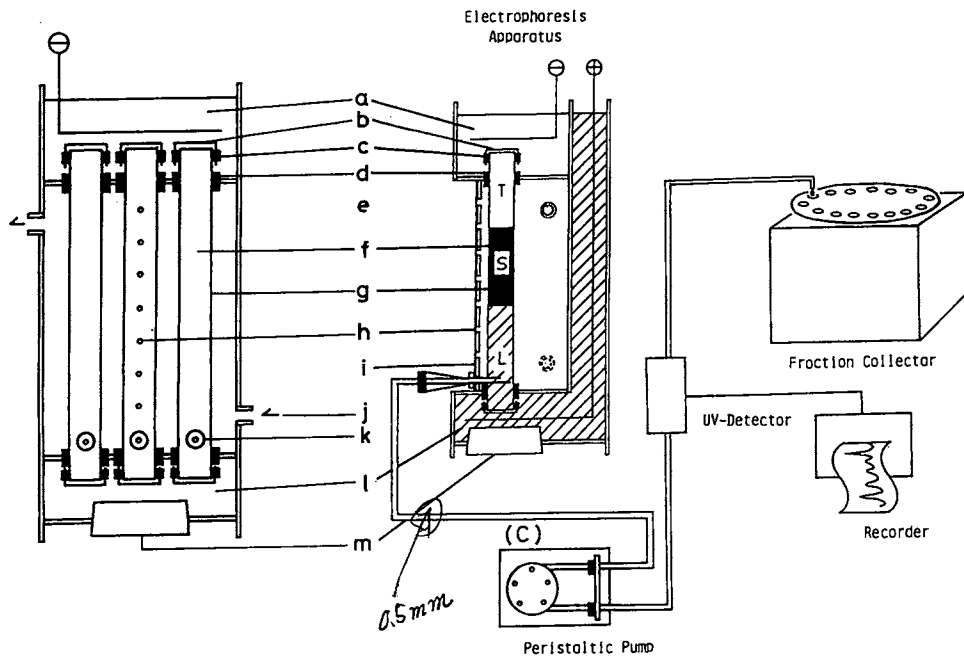


Fig - II

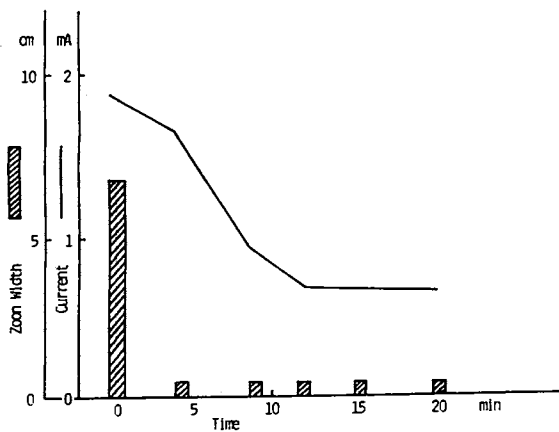
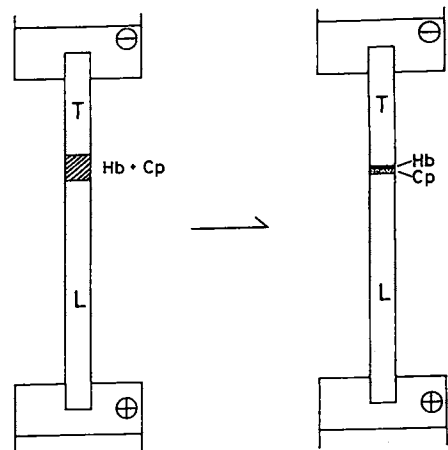


Fig - III



- 1) 安川薫、小島清嗣、真鍋敏、奥山典生：生化学，53，601，(1981)
- 2) 安川薫、小島清嗣、真鍋敏、奥山典生：生物物理化学，26，38，(1982)
- 3) 安川薫、小島清嗣、真鍋敏、奥山典生：生化学，54，817，(1982)

18 高压マイクロキャピラリー-電気泳動による生体成分等の分析

(名工大) 津田 孝雄, 中川 元吉,
(名大・医・第一生化) 佐藤 道比古, 小本 國夫

1 等速電気泳動法は 0.5 mm 内外の細管をカラムとして用い、粘性の小さな媒体中 (たとえば水溶液) で 10~20 kV の高電圧下で迅速分離を行ない、非常に有効な手法となっている。

生体成分等の分析法としてゾーン電気泳動はすぐれた手段の一つで広く研究・臨床に用いられてきており、通常アガロースやポリアクリルアミドゲル、濾紙等の支持体を用い、カラム長 10 cm に対して 100 V から最高 3000 V の電圧をかけて行う。

本研究は上記のポリアクリルアミドゲルなど粘度のある支持体を用いず、媒体としてはほぼ等速電気泳動法に近いもの (たとえば 0.02 M リン酸水溶液) を用い、また電圧としては等速電気泳動法とほぼ同一の 5~20 kV の高電圧を用いる方法であるが、展開形式としては先行電解液、終末電解液などを用いず均一な媒体中で行なうゾーン電気泳動法である。これまでの研究として、Everaerts 氏 [J. Chromatogr. 169, 11 (1979)] は内径 0.2 mm のテフロン管、また Jorgenson 氏 [Anal. Chem. 53, 1298 (1981)] は内径 0.08 mm のガラスキャピラリー-管をそれぞれカラムに用い電気泳動を行ない高分離を得ている。本研究は高電圧を用いたゾーン電気泳動法の実験条件を検討し、本法をスルホン酸、ピリジニウム塩、ヌクレオチド類等の分離に適用した。

2 毛细管カラムとして内径 30~200 μm 、長さ 30~120 cm のガラスキャピラリー-管などを用いた。検出は高津 UV 検出器 (UVD-2) を用い上記毛细管カラムの末端部をそのまま直接セルとして用いた。電源は高津製作所製のものを使用した。試料注入法は落差を用いる方法 又は 電気浸透流を利用して行った。

Fig. 1 に装置の概略を示した。

細いカラムを用いることは試料の広がりをおさえることと通電にともなう発生する熱がカラム外へ逃げやすいことの二つの面から有利である。

3 電気泳動を行なえば必ず電気浸透流が発生する。Table 1 にパイレックスキャピラリー-管 (内径 132 μm 、長さ 60 cm) を用い定電流 200 μA (電圧は 302~96 V/cm) のもとで測定したデータを 100 V/cm に換算して示した。この電気浸透流はパイレックスガラスをカラムとする場合非常に分離分析に重要な役割を果たす。すなわち表より 0.025 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{H}_2\text{O}$ ではその移動

Fig. 1 System of High Voltage Capillary Electrophoresis

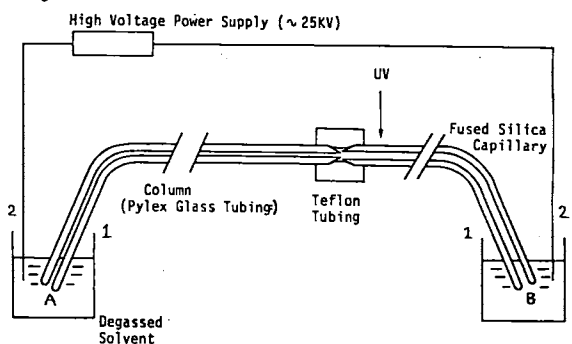


Table 1 Linear flow velocity of electro-osmosis at 100 V/cm

Solvent	Linear velocity (cm/sec)
0.01M $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{H}_2\text{O}$	0.13
0.025M $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{H}_2\text{O}$	0.093
0.05M $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{H}_2\text{O}$	0.087
0.075M $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{H}_2\text{O}$	0.077
0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{H}_2\text{O}$	0.057

速度は負極に向って $9.3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ と流れが早く、これは溶質の移動度を上まめる場合が多い。

そのため負の電荷をもった溶質を負極側に溶出させることができてくる (Fig. 4)。

一方ピリジニウム塩類の分離では溶質は正の電荷をもっているため、各溶質固有の移動度に浸透流が加算されるため早い分離分析ができる (Fig. 2)。

しかしながらスルホン酸の分離条件 (弱酸性, $0.05 \text{ M KH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$) では電気浸透流は電気泳動による試料移動速度の絶対値より遅く検出器側を負に設定した場合スルホン酸は溶出しなかった。

Fig. 3 ではスルホン酸をプラス側へ溶出分離している。この場合トリスルホン酸, ジスルホン酸, モノスルホン酸の順で溶出する。

他方 Fig. 4 では負の電荷をもったヌクレオチド類を負側に溶出させているため溶出順はモノホスフェート, ジホスフェート, トリホスフェートと上記スルホン酸の場合と逆の順序になる。

浸透流はカラム材質, 電解質濃度, カラム口径等に依存するのでこれらの因子によりその速度を調節すればよりよい分離条件の設定ができるであろう。

Fig. 2~4 は標準試料の分析例であるが、実際試料への適用例として Male albino rat (wt. 120g) の血漿, 肝臓, 腎臓中のヌクレオチド類の分離を行い AMP, ADP, ATP の定量を行った。前記の実験は臓器についてはドライアイス上でただちに冷凍した後、TCA 溶液を加えてホモジエナイズし、遠心後 TCA をエチルエーテルで除去しついで pH 6.5-7.5 に調整した。

Fig. 4 の No.4 のピークは理論段数として約 5 万である。

