

第3回細管式等速電気泳動分析シンポジウム

講演要旨集

主 催	イソタコ研究会
共 催	日本化学会，日本分析化学会，電気泳動学会 日本薬学会，日本生化学会，日本農芸化学会
日 時	昭和58年12月14日（水） 9：00～17：00
会 場	阪急ターミナルビル14階 島津製作所 大阪支社 大阪市北区芝田1丁目1-4

第3回等速電気泳動シンポジウム

プログラム

午 前 の 部

昭和58年12月14日(水) 9:00~17:00

9:00

開会の辞

広

大

工

木

曾

義

之

演題番号

9:05

1. 等速電気泳動法による1価アニオンの移動度とその分離挙動に対する溶媒効果

広

大

工

○津吉

徹・

広川

健

木曾

義之

9:20

2. 分離能におよぼす溶媒効果

島

津

製

作

所

○八木

孝夫・

児嶋佳世子

9:35

3. 細管式等速電気泳動法における低分子イオンに及ぼす粘性剤の効果

島

津

製

作

所

日根

隆

9:50

4. 等速電気泳動法における無電荷配位子の利用

九

大

工

・

熊

工

大

工

上村

忠司・

藤野

泰光

早下

隆士・

高木

誠

○田崎

正人・

筒井

宰司

長浜

静男

10:05

5. 高電圧キャピラリー電気泳動法による分析

名

工

大

○津田

孝雄・

中川

元吉

10:20

6. 等速電気泳動における自動測定
I. 定量およびPU・RE値の測定

城

西

大

理

小林英三郎

10:35

7. 等速電気泳動における自動測定
II. 等分割法による測定

城

西

大

理

小林英三郎

10:50

休憩(10分)

11:00

- 〔特別講演〕 縮合リン酸塩とその分析

神

戸

大

教

養

本岡

達

11:30

8. 細管式等速電気泳動法によるアルギン酸の泳動挙動

資

生

堂

○山本

信也・

太田

忠男

森川

良広・

横内未知夫

11:45

9. リン酸ジルコニウムアミド誘導体の合成
—等速電気泳動法によるアミド化量の測定—

広

大

工

○豊田

修至・

山中

昭司

服部

信・

広川

健

木曾

義之

12:00

10. 環状リン酸塩のイソタコフォレシス

神

戸

大

教

養

・

神

戸

女

子

薬

科

大

○成相

裕之・

中崎

和美

津波

古

充

朝

・

本岡

達

午 後 の 部

演題番号

13:20

11. 細管式等速電気泳動法によるテトロドトキシンの定量 山 口 女 子 大 ○島田 和子・大鶴 勝
山口 務・二五田公俊

13:35

12. 等速電気泳動によるフィチン酸の分析 ノートルダム清心女子大 ○高橋 正侑・菊永 茂司

13:50

13. 細管式等速電気泳動法による嫌気性消化プロセスの有機酸分析法 広 大 工 広川 健・○酒井 泰孝
木曾 義之・砂原 広志

14:10

- 〔特別講演〕 タンパク質及びポリペプチドの Carrier Free Electrophoresis 都 立 大 理 奥 山 典 生

14:40

14. 無担体等速電気泳動とゲルクロマトグラフィーを組み合わせたタンパク質分離システム 都 立 大 理 ○安川 薫・真鍋 敬
奥山 典生

14:55

15. 等速電気泳動法の蛋白質分析への応用 日 本 化 薬 加藤 和夫

15:10

16. 等速電気泳動法のタンパク質分析への応用 東レ・リサーチセンター 平野 昌彦

15:25

17. イヌ血清酸性糖蛋白質の遺伝的変異のイソトコフォレシスによる検出 自 治 医 科 大 ○吉田 治弘・池本 卯典
富田 功一

15:40 休憩 (20分)

16:00

18. 細管式等速電気泳動法によるヒト体液蛋白の死後消長 宮 崎 医 科 大 ○中島 紀子・高浜 桂一

16:15

19. マイクロウェーブ照射による細管式等速電気泳動分析用血液試料の調製 岡 大 医 ○山田 輝夫・板野義太郎
小坂二度見

16:30

20. 人及びラット赤血球におけるProlidase 活性の測定 高 知 医 科 大 ○児玉 裕敬・三笠 洋明

16:45

21. 精液中のポリアミンの定量 高 知 医 科 大 ○津々見 明・児玉 裕敬
石津日出雄

17:00

閉会の辞

木 曾 義 之

1 等速電気泳動法における一価アニオンの絶対移動度と 分離挙動に対する溶媒効果 (広大工) ○津吉 徹, 広川 健, 木曾 義之

1. 諸言 我々の研究室では、水溶液系における約500種のイオン種について、絶対移動度(m_0)、酸解離定数(pK_a)等をマイコンのデータバンクに収納し、イソタコフェログラムのシミュレーションや最適分離条件の設定等の可能なシステムを開発している。このシステムをより実用的にするには溶媒効果も考慮する必要があるが、有機溶媒で m_0 , pK_a が既知である試料は非常に少ない。既に報告したように等速電気泳動(IP)法によると、イオン性物質の定性・定量分析のみならず、定性指標の解析により m_0 等の物理化学定数を決定することができる。そこで今回、約100種の有機及び無機アニオンについてメタノール溶媒としてpHを4~5点変化し、その定性指標(RE)を実測し、そのうち64種の1価アニオンについて m_0 と pK_a を求めた。さらに、 m_0 を水溶液中の値と比較すると共に分離挙動の相違について検討したので報告する。

2. 実験 リーディング電解液としては、1: 10 mM HClO₄ + 15 mM トリエタノールアミン(TEA), $pH^* = 7.76$. 2: 10 mM HClO₄ + 20 mM TEA, $pH^* = 8.06$. 3: 10 mM HClO₄ + 20 mM TRIS, $pH^* = 9.21$ 4: 10 mM HClO₄ + 20 mM シクロヘキシルアミン(CHA), $pH^* = 10.25$ 5: 10 mM HClO₄ + 40 mM CHA, $pH^* = 10.72$ を。ターミナル電解液としては、10 mM パルミチン酸ナトリウムを用いた系でIP分離を行い、定性指標であるREを測定した。使用したメタノールは、試薬特級(山化学)で99.8%の純度であった。IP装置として、島津製IP-2Aを、解析には、ミニコンピューター(NEC MS120)を用いた。

3. 結果と考察 測定したREを最小二乗法を用いて解析すると表1に示した m_0 が得られ、文献とよく一致することがわかった。図1は、 $100/\sqrt{FW}$ を横軸に取り水溶液系の m_0 を○印でメタノール系の m_0 を●印で示し、溶媒による m_0 の違いを示した。メタノール溶媒における無機アニオンの m_0 は大部分が水溶液系の m_0 に比べ小さな値を示し、一方有機アニオンの m_0 は、35~45付近に集中しており全般に水溶液系より大きな値を示すことがわかった。また、メタノール系の pK_a は水溶液系に比べ4前後高くシフトした。

分離挙動の相違を示すため、今回 m_0 と pK_a を決定した1価アニオンのうち適当に11種選択した。

これらの水溶液系とメタノール系におけるRE-pH曲線を図2に示す。11種のアニオンを分離するにはREに適当な差が必要で、メタノール系における最適分離pHは約8であり、水溶液系で分離困難(図3-A)な1(Br⁻)と2(Cl⁻), 3(Picrate⁻)と5(Naphtaleme Sulfonate⁻)の相互分離が可能である。最適分離条件でのイソタコフェログラムのシミュレートとその実測チャートをそれぞれ図3-B, 図3-C

Table 1. Evaluated absolute mobilities and literature-cited ones.

anion	obs.	lit. ²⁾	lit. ³⁾	lit. ⁴⁾	lit. ²⁾
Cl ⁻	54.3*	54.3	54.3	53.1	56.1
Br ⁻	57.5	58.6	58.4	58.5	61.5
CNS ⁻	63.5	64.5	-	63.2	67.6
I ⁻	64.7	65.0	65.1	63.1	68.1
Picrate ⁻	48.6	48.6	48.9	48.2	51.0

* standard

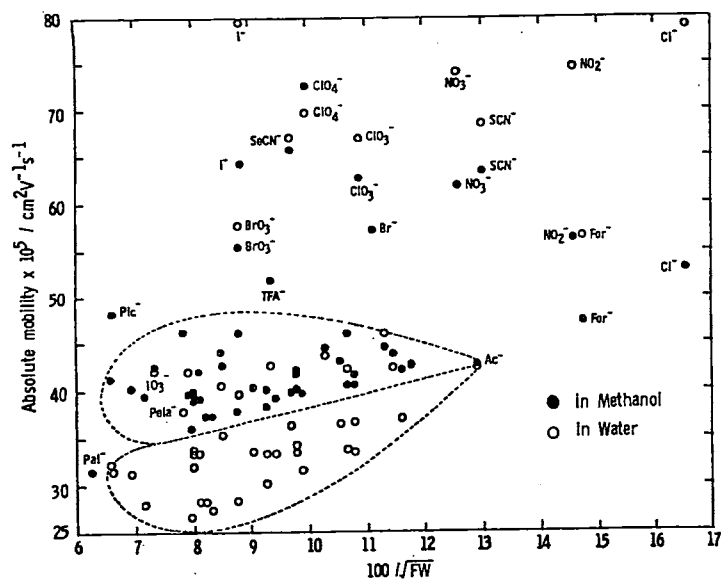


Fig. 1.

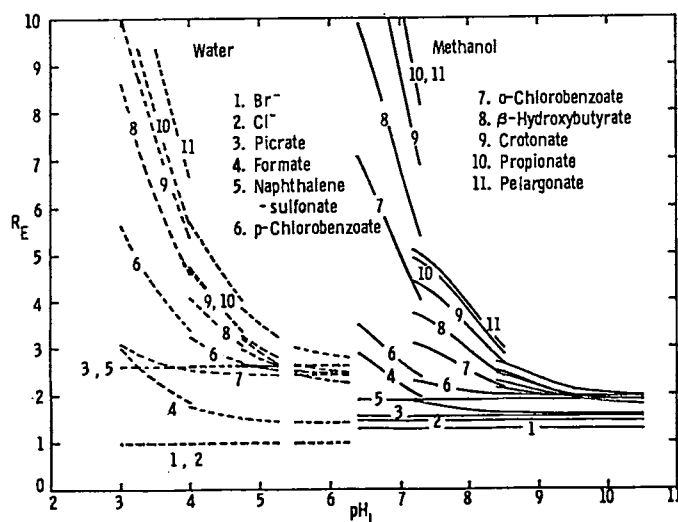


Fig. 2.

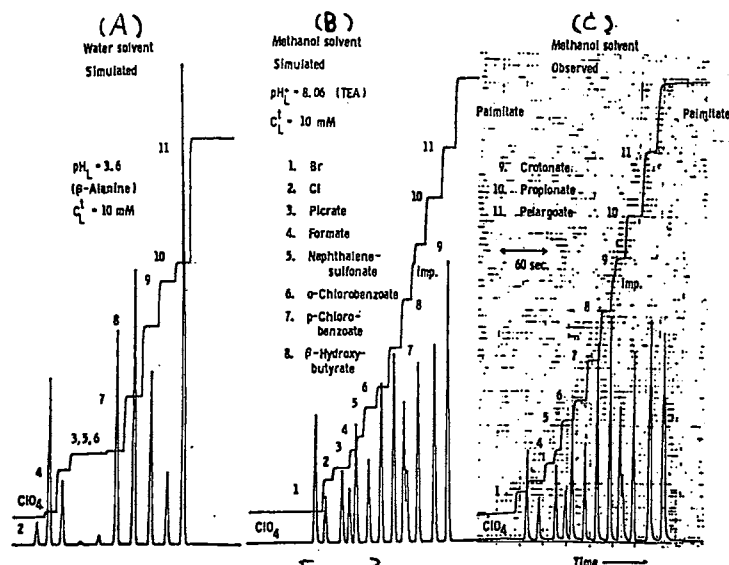


Fig. 3.

に示す。これらのシミュレーションと実測したイソタコフェログラムは、非常によく一致しており、これは今回決定した m_0 と pK_a の精度が良いことを示すだけでなく、メタノール系においても水溶液系同様 m_0 と pK_a が既知であれば、そのシミュレートや分離条件の最適化も検討できるようになったことを意味している。

なお分離に関しては、メタノール中で m_0 と pK_a が接近してくる一連の α -カルボン酸のような例もあり、必ずしもメタノール系のほうが水溶液系より優れているわけではなく、試料に応じて両者を使いわけることが必要であると考えられる。この目的のために、既に報告した定性及び定量指標の表⁵⁾と類似の表をメタノール系においても作成する予定である。

Fig.1. Absolute mobilities vs. 100 $I/\sqrt{FW}$ (○ water, ● methanol).

Fig.2. R_E vs. pH_L in water (---) and methanol(—) solvent.

Fig.3. A) Simulated isotachopherogram in aqueous solvent.

B) Simulated isotachopherogram in methanol solvent.

C) Observed isotachopherogram in methanol solvent.

- 1) T.Hirokawa and Y.Kiso, J. Chromatogr., 252(1982)49.
- 2) Landolt-Börnstein, 6. Aufl. Bd. II/7 653.
- 3) R.L.Kay, D.F.Evans, J. Phys. Chem., 70(1966)2325.
- 4) B.E.Conway, "Electrochemical Data", (1952)162.
- 5) T.Hirokawa and Y.Kiso, J. Chromatogr., 271(1983)D1.

2 分離能におよぼす溶媒効果

(島津製作所・応用技術部) ○ 八木孝夫 ・ 児嶋佳世子

1. イソタコフォレシスにおいて、分離能の向上手段に、電解液に水溶性有機溶媒を添加する方法が知られている。有機溶媒の添加により、相対移動度差の拡大、溶解度の上昇および電気浸透の抑制などの効果が期待できる。これらの効果を応用して、Ca, Mg, Naの分離¹⁾、フタル酸類の分離²⁾、界面活性剤の分析³⁾、高級リン酸エステルのモノとジ体の分析⁴⁾および硫黄オキソ酸イオンの分析^{5,6,7)}などが行われている。いずれも、試料は移動度差や水に対する溶解度の小さいものが対象とされており、有機溶媒の添加濃度が30~50%の電解液が用いられている。一方、移動度差や溶解度の大きい試料にもみかわらず、分離境界面が不明確な場合もある。このような条件において、有機溶媒の添加が分離能におよぼす影響について検討されていない。

そこで、今回は陰イオンを対象とし、解離しやすいアルカリ性の電解液システムで、分離境界面が不明確となり、電位勾配の微分信号がテーリング状ピークとして得られる条件において、添加する有機溶媒種と濃度が、テーリングの形状におよぼす影響を調べたので報告する。

2. 装置は島津細管式等速電気泳動装置IP-2形を用いた。泳動チューブ: i.d. 1.0 mm x l. 50 mm + i.d. 0.5 mm x l. 150 mm, 泳動電流: 200 μ A (8 min) $\rightarrow$ 100 μ A, チャートスピード: 80 mm/min, リーディング液として、10 mM-HCl-20 mM-Ammediol (pH 8.8) に有機溶媒 (Methanol, Ethanol, n-Propanol, i-Propanol, t-Butanol および Acetone) を添加して用いた。ターミナル液として、10 mM-L-Histidine + Ba(OH)₂ (pH 10.9) を用いた。試料として、10 mM-Sodium Caproate 水溶液を用いた。

テーリング度は Peak Asymmetry Factor⁸⁾ として求めた。

3. この分析条件では、電解液中の Bicarbonate, 試料の Caproate およびターミナルイオンの Histidine の微分ピークが得られる。Fig 1 に水系電解液と n-Propanol を10%添加したときのイソタコフェログラムを示す。Propanol 添加時に、Histidine の微分ピークのテーリングが著しく改善されている。電位勾配の絶対値が異なるのは、電解液の電気

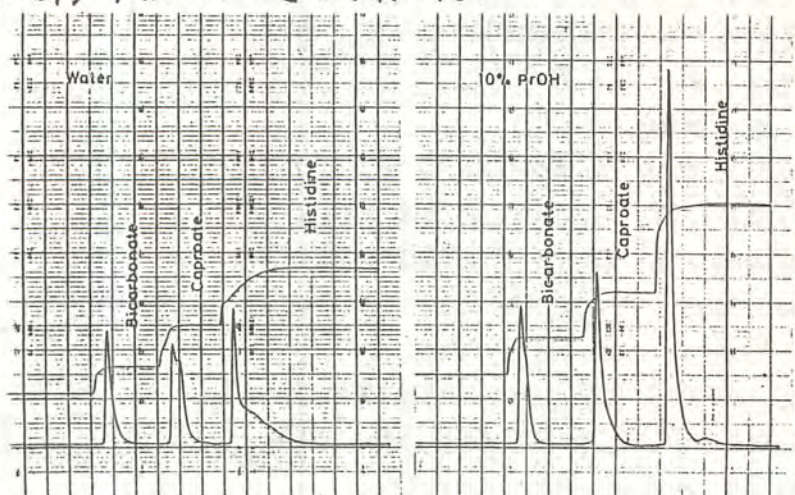


Fig 1. Isotachopherograms for Different Electrolyte Solutions

I. 定量および P_U , R_E 値の測定

(城西大学理学部化学科)

小林 英三郎

細管等速電気泳動を用いた分析では、試料の先行イオンに対する電位こう配比 (R_E 値) または先行、終末イオンの各電位こう配値に対する相対値であるポテンシャルユニット (P_U 値) が定性指標として使われている。広川、木曾らは R_E 値を指標とし広範囲にわたる物質検索が可能である事を示している⁽¹⁾。一方、宮崎、加藤らが定義した P_U 値⁽²⁾ は、同一分析条件であれば、変動しやすい電位こう配値が補償されており、再現性の高い指標となる。両指標は次式に示されるように、先行 (P_{GL})、終末 (P_{GT}) および試料 (P_{GS}) の各電位こう配値 (P_G 値) より得られる。これら指標を使い試料成分の同定を行なうた

$$R_E = P_{GS} / P_{GL} \quad , \quad P_U = (P_{GS} - P_{GL}) / (P_{GT} - P_{GL})$$

めには、 R_E 値、 P_U 値 いづれの場合も P_G 値を正確に測定する事が必要である。

今回は、イソタコフェログラムから得られる P_G 値の高精度自動測定、 R_E 値 P_U 値を使用した検索、同定および各種定量法を可能とする BASIC プログラムによる処理法について報告する。

I. 使用システム 測定およびデータ処理は Fig 1 に示す細管等速電気泳動装置 (IP-2A) とクロマト波形処理装置 (C-R2AX) (いづれも島津製作所製) を使用した。PGD, DIFF 信号は 2 チャンネル同時処理付属装置 (INP-2A) を用い、それぞれチャンネル 2、および 1 に入力し、各波形はプロッターで記録する。測定データおよび同定データはカセットレコードメモリ (CMT) に保存する。BASIC プログラムは、C-R2AX のユーザー RAM エリア 18 K を使用した。

II. 処理法 ソフトウェアの構成は Fig 2 に示した。Method には i) P_G 値測定法である Average, Top, modified Top 法 ii) R_E , P_U による検索 iii) イソタコフェログラムのプリントの有無 iv) 百分率法、内部標準法、絶対検量線法の指定、Format にはレポートモードを指定する。 P_G 値の読み取りは、Width, Slope, DR-level で処理される DIFF 信号により開始、終了が決定される。分析開始からの不要部分は Lock time で、また終了レベルと時間は Stop time で設定する。分析終了後は R_E 値、 P_U 値を計算しこれに基づき R_E , P_U Scale を書き込んだ後、指定された同定法で ID table にファイルした R_E , P_U 値を検索し定量

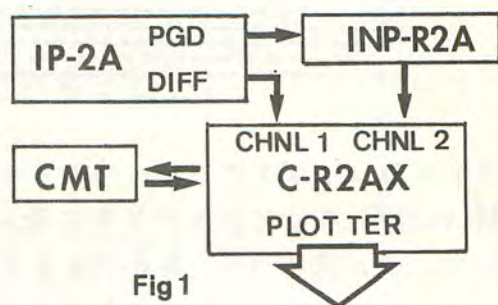


Fig 1

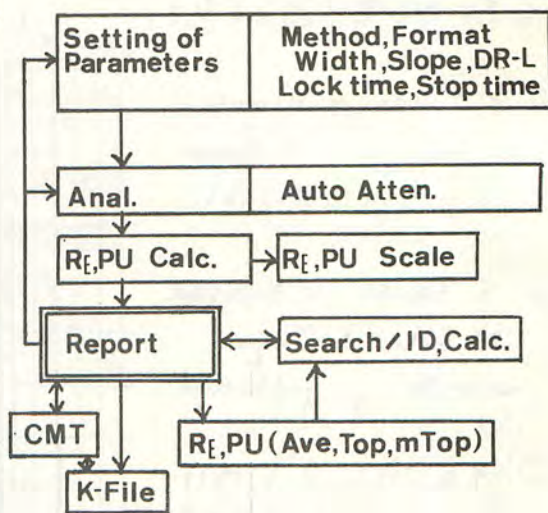


Fig 2

結果をレポートする。再分析するまでは PG 値の読み取り開始、終了、および平均値と定量値は全て保存されており、全ての PG 値処理法、同定法で再検索、再計算が可能である。構築されたデータは K-file に保存が可能であり、生データと共に CMT にメモリしておく事ができる。CMT からのアナログ信号を分析した例を Fig 3 に示す。

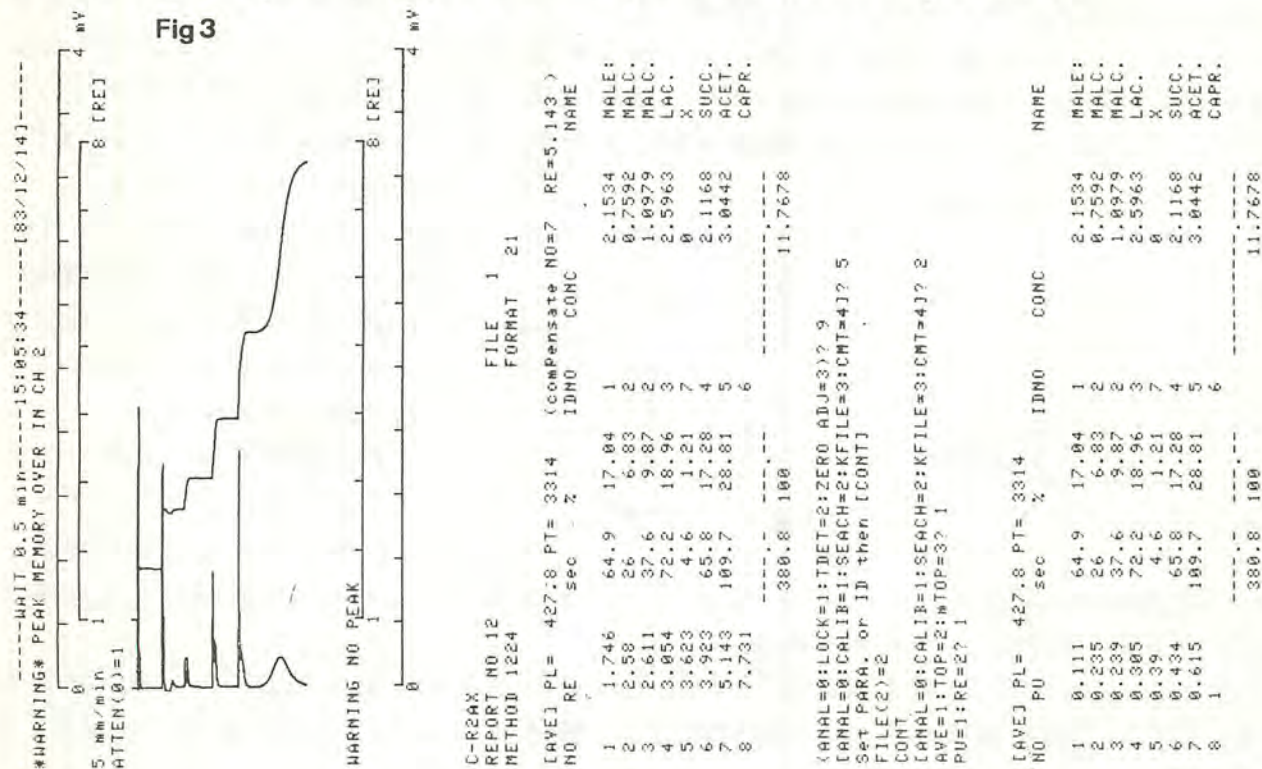


Table I

	PL(uV)	1(P 1)	2(P 2)	2(P 3)	3(P 4)	7(P 5)	4(P 6)	5(P 7)	6(P 8)	PT(uV)	
RePo NO 1	427.8	1.7404	2.5833	2.6154	3.0588	3.6008	3.9284	5.1356	7.7487	3315	[AVE]
RePo NO 3	427.9	1.7481	2.5871	2.6156	3.0581	3.6272	3.9282	5.1392	7.7472	3315	[AVE]
RePo NO 5	427.9	1.7483	2.5798	2.6151	3.0585	3.6009	3.9287	5.138	7.749	3315.5	[AVE]
RePo NO 7	427.9	1.7478	2.58	2.615	3.0581	3.6271	3.929	5.1418	7.7468	3315	[AVE]
RePo NO 9	427.8	1.7476	2.5856	2.6155	3.0581	3.6194	3.9302	5.1427	7.75	3315.5	[AVE]
Average	427.9	1.748	2.5832	2.6153	3.0583	3.6151	3.9289	5.1395	7.7483	3315.2	
S.Deviatn	0.0483	0.0003	0.0032	0.0003	0.0003	0.0133	0.0008	0.0029	0.0013	0.2739	
C.Variatn	0.011	0.019	0.126	0.01	0.011	0.369	0.02	0.056	0.017	0.008	

Table II

	PL(uV)	1(P 1)	2(P 2)	2(P 3)	3(P 4)	7(P 5)	4(P 6)	5(P 7)	6(P 8)	PT(uV)	
RePo NO 2	427.8	0.1109	0.2346	0.2394	0.3051	0.3054	0.4339	0.6128	1	3315	[AVE]
RePo NO 4	427.9	0.1109	0.2352	0.2395	0.305	0.3094	0.434	0.6135	1	3315	[AVE]
RePo NO 6	427.9	0.1109	0.2341	0.2393	0.305	0.3054	0.4339	0.6131	1	3315.5	[AVE]
RePo NO 8	427.9	0.1108	0.2342	0.2394	0.3051	0.3094	0.4341	0.6139	1	3315	[AVE]
RePo NO10	427.8	0.1108	0.2349	0.2393	0.3049	0.3081	0.4341	0.6137	1	3315.5	[AVE]
Average	427.9	0.1109	0.2346	0.2394	0.305	0.3075	0.434	0.6134	1	3315.2	
S.Deviatn	0.0483	*	0.0005	*	*	0.002	*	0.0004		0.2739	
C.Variatn	0.011	★	0.205	★	★	0.521	★	0.072		0.008	

Table I, II は Fig 3 と同様に 5 回分析した K-file でレポートしたものである。過渡状態である PK5 を除いて、RE 値 (Compensate は実行しない)、PU 値 共に良好な測定結果を得た。なおこの測定に際しては DIFB の波形がそれと異なるので Slope プログラムを設定して行った。

* <0.0001
★ <0.001

II 等分割法による測定

(城西大学理学部化学科)

小林 英三郎

従来の等速電気泳動の解析は、Iの講演で示したように、定性指標の R_E , P_U 値を求めるためにゾーンの PG 値を測定する事、および、定量法においてはゾーン長を求めるために PG 値を時間 t で微分曲線 (dPG/dt) の頂点-頂点間の時間を測定する事が行なわれている。(Fig1) ここで、 PG, t の軸を交換して時間 t を PG で微分すると、 dt/dPG

曲線が得られる。(Fig 2)

dt/dPG 曲線は縦軸が t であり、ゾーン長(定量値)横軸が PG 値を示す事になり、最初のピークからの長さは PG_L から PG_S の ΔPG 値となる。

この変換結果は、ガスクロマトグラム、液体クロマトグラム等と比較すると t は物質濃度、

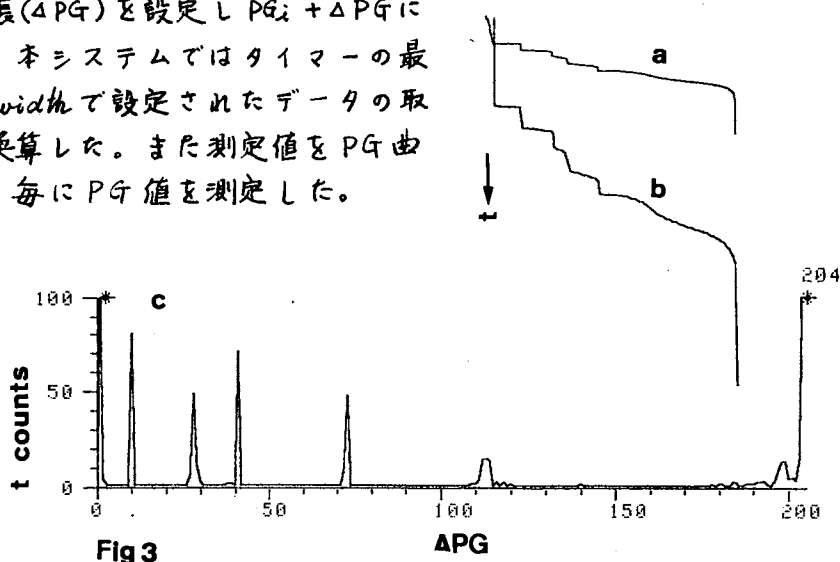
PG は保持時間に相当し、イソタコフェログラムをクロマトグラム一般的解析法で理解する事ができる可能性を示すものである。

本報告は dt/dPG 曲線を用いる「 PG 微分法」によるイソタコフェログラムの解析の可能性を提示し、既存機種を使用した検討結果と、新たなハードウェアの開発への提言をするものである。

I. 使用システム 講演Iの Fig1 で示したシステムのうち IMP-R2Aをはずし、さらに PGD 信号をチャンネル1に入力した。DIFF 信号は用いない。

II. 処理法 1) PG 値の分割長(ΔPG)を設定し $PG_i + \Delta PG$ に至るまでの時間 t を測定する。本システムではタイマーの最小設定時間が1秒であるので *width* で設定されたデータの取り込み回数をカウントし時間換算した。また測定値を PG 曲線と比較するために、各 ΔPG 毎に PG 値を測定した。

II. 結果 Fig3bcは3aの PG 曲線処理したものである。3bは測定値を用い再現した結果であり t 方向へは拡大してある。3cは dt/dPG 曲線であり、ピークのすそが広いものはゾーン形成が不完全



である事を示している。ピークのリーディング、テールリングの状能から、隣接ゾーンとの影響を判断する事ができる。この $d\alpha/dPG$ 曲線により全ての解析を行なうためには若干の問題点がある。3bは3aとかなり良い一致を示しているが3cで

明らかなようにPG値の変化が急激なものは ΔPG カウンタ数が少なくなっている。この事実はFig4でも示されている。この場合はターミナル付近でのノイズとPG値の下降のためオカウ数が大きく変動している。PG値の下降は ΔPG が負としてソフトで処理可能であるがノイズに呼応したオカウ数は平滑処理をする必要がある。

Fig 5は $d\alpha/dPG$ 曲線プロットを行ないながらピーク検出した例である。ピーク位置の数字は ΔPG カウンタ番号である。ピークの始点終点は検出可能であるので積算する事により全オカウ数を求め定量値とする事ができる。

Fig 4dはプロッターを停止させて得たものである。4cに比べ若干の実行速度の増加が見られるがこの場合でも理論値の20%程度の ΔPG カウンタしか実行していない。

以上の結果より、完全な「PG微分法」を実行するためにはBASICではなくアセンブラ言語でプログラムする必要がある。

さらに一歩進めて、アナログ信号をハードで ΔPG 処理すれば、 $d\alpha/dPG$ の単信号だけでイソタコフエログラムの完全な解析ができる事が予測される。

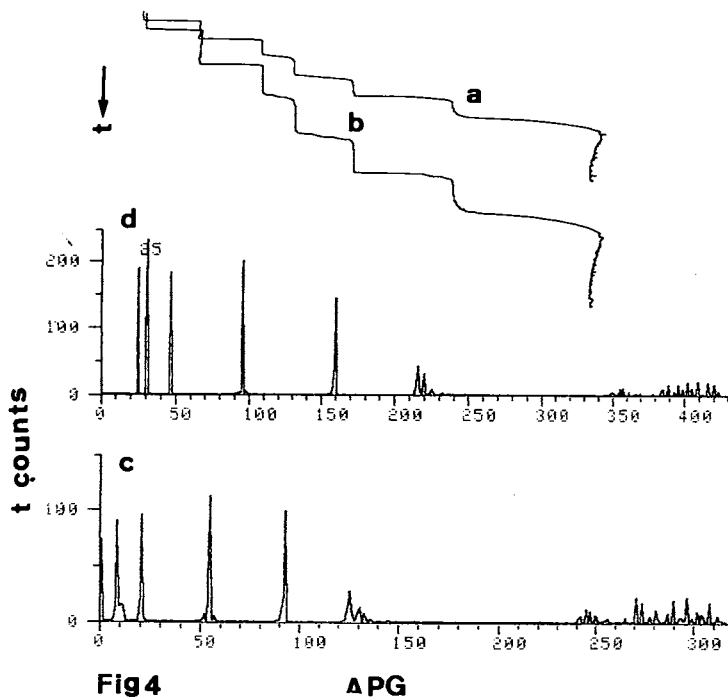


Fig4 ΔPG

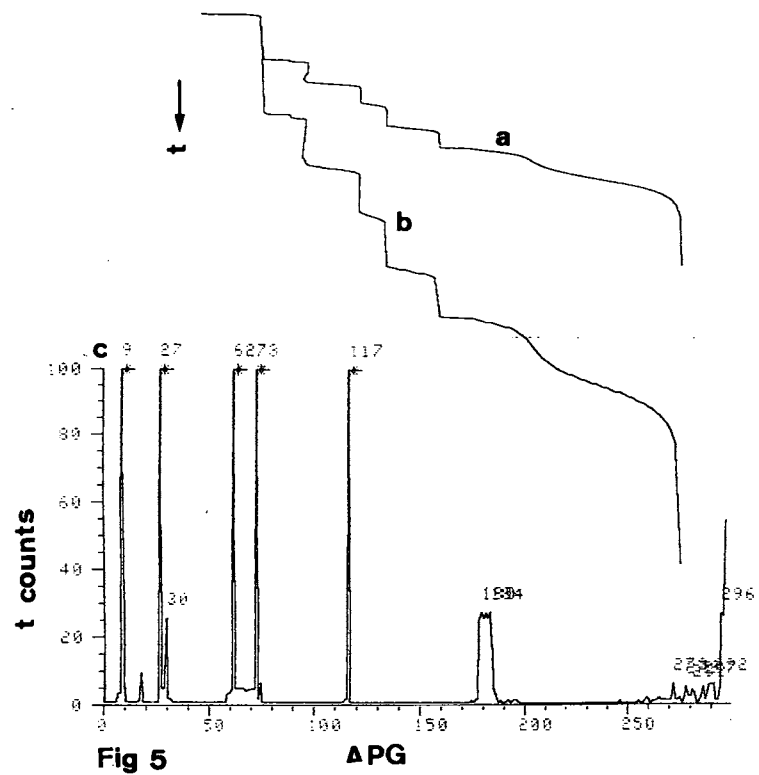


Fig 5 ΔPG

縮合リン酸塩とその分析

(神戸大学教養部化学教室) 本岡 達

縮合リン酸塩には非常に多くの種類があり、ポリリン酸塩、メタリン酸塩およびウルトラリン酸塩の3つに大別できる。これは組成上および構造上から特徴づけられる。

まず、組成上から分類すると、図1のように三成分系を示すと、□DEFがポリリン酸(塩)(オルトを含む)領域、DEがメタリン酸(塩)領域、△ADEがウルトラリン酸(塩)領域である。モル比 $R = (M_2O + H_2O) / P_2O_5$ を示すと、 $1 < R \leq 3$ がポリリン酸(塩)、 $R = 1$ がメタリン酸(塩)、 $R < 1$ がウルトラリン酸(塩)である。

一方、構造上からは、ポリリン酸塩は下のような鎖状構造で、(1)式の一般式で示される。

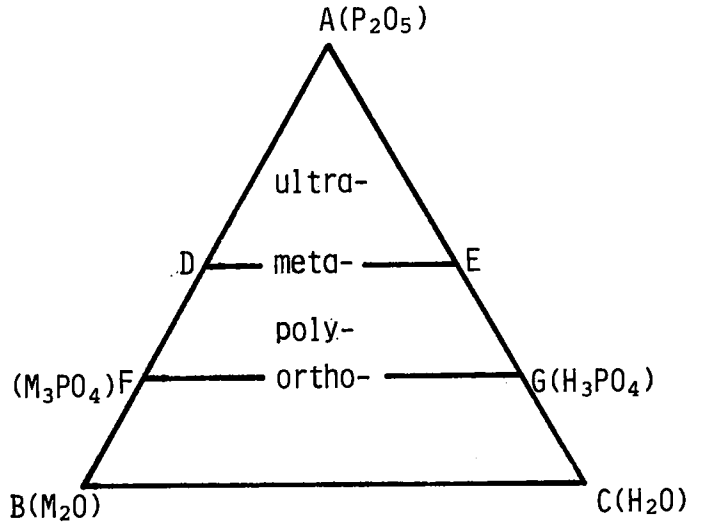
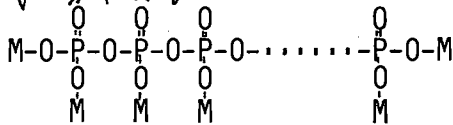
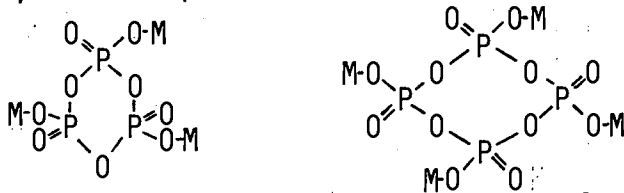


Fig. 1 P_2O_5 - M_2O - H_2O system

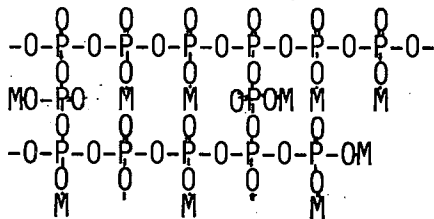
$$M_{n+2}P_nO_{3n+1} \quad (1)$$

メタリン酸塩は下のような環状構造で、一般式は(2)式で示される。



$$M_nP_nO_{3n} = (MPO_3)_n \quad (2)$$

ウルトラリン酸塩は下に示されるように、網目構造になっており、一般式は(3)式で示される。(これは全リン酸塩の一般式でもある)。



$$M_nR P_n O_{n(5+R)/2} \quad (3)$$

以上のように、縮合リン酸塩には多くの種類があるが、次のような略記号が用いられることが多々ある。(低酸化数のリン酸オキシ酸(塩)を含む)。

ポリリン酸(塩): $P_1, P_2, P_3, \dots, P_n$ メタリン酸(塩): $P_{3m}, P_{4m}, P_{5m}, \dots, P_{nm}$
 低酸化数のリン酸オキシ酸(塩): $\overset{1}{P}, \overset{2}{P}, \overset{2}{P}-\overset{4}{P}, \overset{4}{P}-\overset{4}{P}, \overset{3}{P}-O-\overset{3}{P}, \overset{3}{P}-O-\overset{5}{P}, \overset{3}{P}-O-\overset{4}{P}-\overset{4}{P}, \text{etc.}$

さて、リン酸オキソ酸(塩)相互の分離定量には次のような chromatography が用いられる。(1) paper chromatography, (2) ion-exchange chromatography, (3) thin-layer chromatography, (4) gel chromatography, (5) electrophoresis (paper electrophoresis & isotachopheresis)

以下、isotachopheresis について述べる。リン酸イオンと他の陰イオンとの分離についてはいくつかの報告があるが、リン酸(塩)相互の分離に関する報告は極めて少ない。以下で紹介すると、図2は低酸化数のリン酸オキソ酸を含めて、種々のリン酸(塩)と相互分離したものである。図3は1分子中に2個のリン原子を持つリン酸オキソ酸(塩)の分離定量を検討したもので、これを利用してこれらのオキソ酸(塩)中の不純物の定量あるいはこれらのオキソ酸(塩)の加水分解の追跡を行うことができる。図4は鎖状リン酸(塩)の平均分子鎖長(元)とゾーン長の関係を示したものであり、これにより容易に元の測定を行うことが出来る。通常の元測定法(pH滴定法)にはない特徴を持っている。その他、 P_2 と P_3 の加水分解の追跡、工業用の P_2 や P_3 の分析、メッキ浴中の P_1 と P_2 の測定、ビタミンB1中の P_1 , P_2 , P_3 の測定、さらには種々のリン酸(塩)の分離におけるカウンターイオンの効果についての研究などがある。

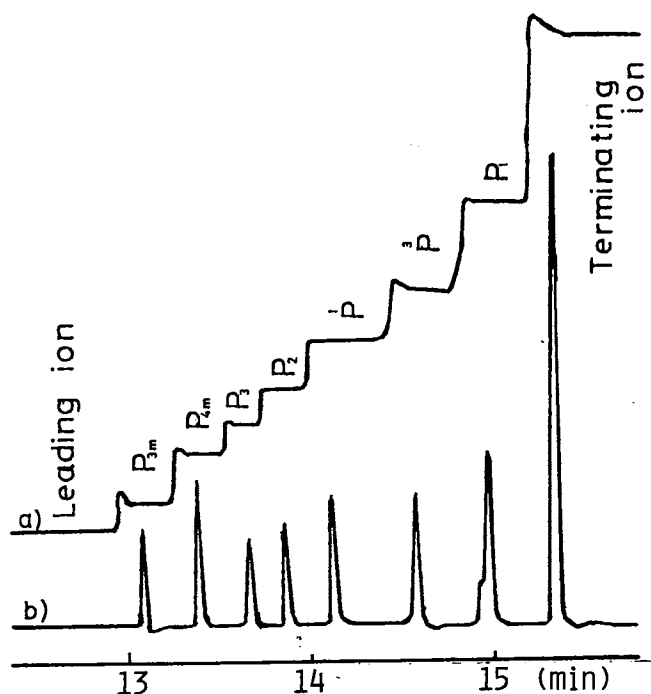


Fig. 2 Isotachopherogram of various phosphorus oxoacids

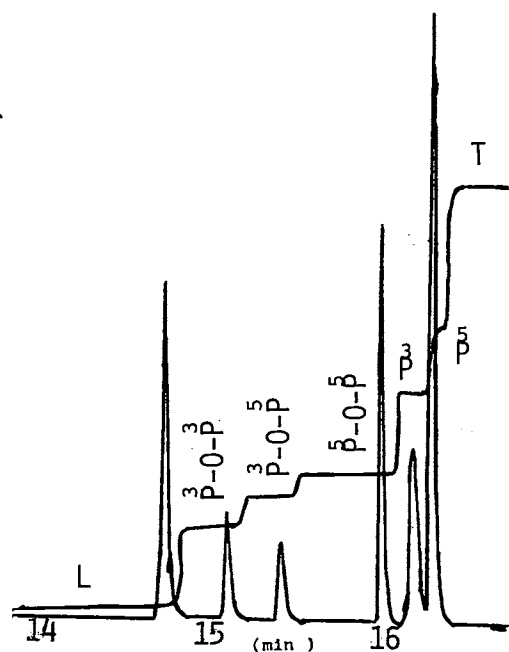


Fig. 3 Isotachopherogram of P_3-O-P_3 , P_3-O-P_5 and P_5-O-P_5

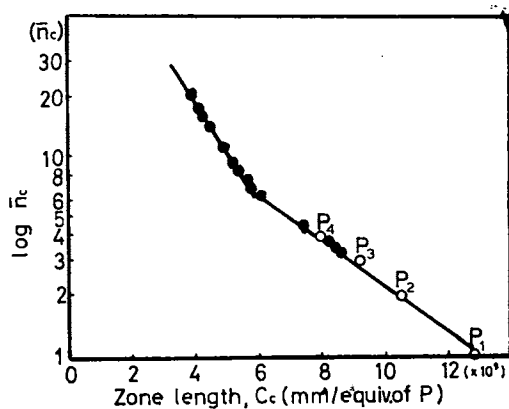


Fig. 4 Determination of average chain length of polyphosphate

8 細管式等速電気泳動法によるアルギン酸の泳動挙動

資生堂研究所・資生堂大船工場*

○山本信也*・太田忠男・森川良広・横内未知夫*

1. 緒言 演者らは最近、荷電性物質の分離分析に幅広く利用されている細管式等速電気泳動法を高分子領域に適用すべく、化粧品中のコンドロイチン硫酸の定量¹⁾、ヒアルロソ酸の泳動挙動²⁾について検討を行なってきた。特に後者において、高分子試料の構成単位当りの解離基量が同じであれば、実効移動度は分子量に無関係であることを示した。さらに、分子量10万以上になると、本法が細管内を自由泳動することから、高分子特有の泳動の遅れが生じ、この現象は定量性と分子量、高分子相互の分離に影響を及ぼすことがわかった。今回は、この継続として、ポリウロン酸であるアルギン酸ナトリウム(SA)を供試料に選び、泳動の遅れの存在を確認した。さらに、この現象を反映する分子量的差異について、水系GPCとの比較検討を行なった。また、有機溶媒含有の電解液系におけるSAの泳動挙動についても検討を加えたので、これらの結果を合わせて報告する。

2. 実験 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置EP-1B型を使用した。泳動管(PTFE製)は内径0.57mm、長さ30cmであり、恒温槽は20℃に設定した。GPCにはWaters社製6000A型高圧ポンプ、UGK型ユニバーサルインジェクター及びR401型示差屈折検出器をそれぞれ接続して用いた。カラムは内径7.5mm、長さ60cmである東洋曹達工業製G5000PWとG3000PWを連結した。分子量の異なる5種のSAは鴨川化成製のものを常法により、精製して用いた。これらのGPC-光散乱による重量平均分子量を右表に示す。

Molecular weight of SA

Sample Weight ave.

○SA-1 ——— 2.16 × 10⁵

●SA-2 ——— 2.60 × 10⁵

●SA-3 - - - - - 3.19 × 10⁵

●SA-4 ——— 3.27 × 10⁵

●SA-5 - - - - - 3.79 × 10⁵

3. 結果及び考察 一般に高分子試料の場合、その電位分配曲線は明確な階段信号を与えず、特有な線形を示す。酸性電解液条件における5種のSAの電位分配曲線をFig.1に示す。このときの試料負荷量は5μgであるが、PU値0.16にゾーンを形成したものは、粘性の低いSA-1、SA-2のみであり、しかも、これらのゾーン長は異なり、他についてはゾーンを形成し得なかった。この図より、試料ゾーンが現われた後の電位分配曲線は、高分子量になるに従い、この傾きは小さくなることわがかる。これは高分子試料のもつ粘性による泳動の遅れのためと思われ、この傾向は高分子量になる程、顕著に現われることをSAについても認めた。そこで、次に5種のSAをそれぞれ(5~50)μg導入したときの得られたエレクトロフェログラムについて、リーディングとターミナルの電位分配間を10等分し、それぞれの分画

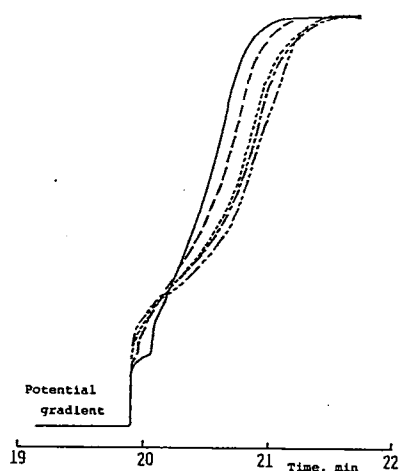


Fig.1 Electropherogram of SA

Leading electrolyte:HCl(0.01M), TritonX-100(0.1%), β-Alanine, pH3.2; Terminal electrolyte:Caproic acid(0.01M); 100μA;

さて、リン酸オキソ酸(塩)相互の分離定量には次のような chromatography が用いられる。(1) paper chromatography, (2) ion-exchange chromatography, (3) thin-layer chromatography, (4) gel chromatography, (5) electrophoresis (paper electrophoresis & isotachopheresis)

以下、isotachopheresis について述べる。リン酸イオンと他の陰イオンとの分離についてかなりの報告があるが、リン酸(塩)相互の分離に関する報告は極めて少ない。いくつか紹介すると、図2は低酸化数のリン酸オキソ酸を含めて、種々のリン酸(塩)と相互分離したものである。図3は1分子中に2個のリン原子を持つリン酸オキソ酸(塩)の分離定量を検討したもので、これを利用してこれらのオキソ酸(塩)中の不純物の定量あるいはこれらのオキソ酸(塩)の加水分解の追跡を行う。図4は鎖状リン酸(塩)の平均分子鎖長(元)とゾーン長の関係を示したものであり、これにより容易に元の測定を行うことができ、また通常の元決定法(pH滴定法)にはない特徴を持っている。その他、 P_2 と P_3 の加水分解の追跡、工業用の P_2 や P_3 の分析、メッキ浴中の P^+ と P^{++} の測定、ビタミンB1中の P_1 , P_2 , P_3 の測定、さらに種々のリン酸(塩)の分離におけるカウンターイオンの効果についての研究などがある。

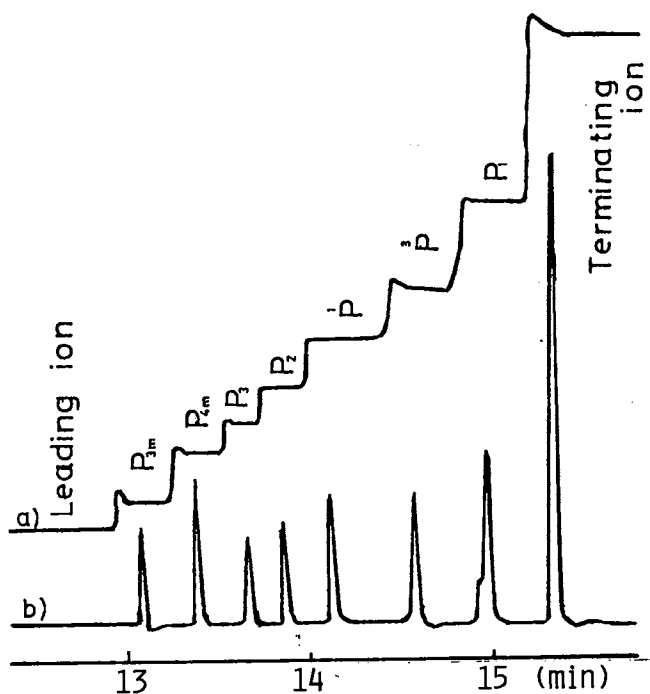


Fig. 2 Isotachopherogram of various phosphorus oxoacids



Fig. 3 Isotachopherogram of P_3-O-P_3 , P_3-O-P_5 and P_5-O-P_5

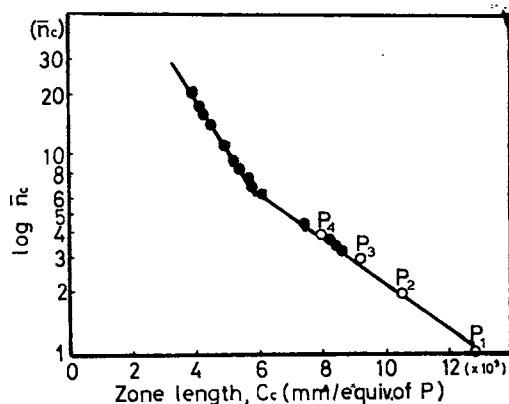


Fig. 4 Determination of average chain length of polyphosphate

8 細管式等速電気泳動法によるアルギン酸の泳動挙動

資生堂研究所・資生堂大船工場*

○山本信也*・太田忠男・森川良広・横内未知夫*

1. 緒言 演者らは最近、荷電性物質の分離分析に幅広く利用されている細管式等速電気泳動法を高分子領域に適用すべく、化粧品中のコンドロイチン硫酸の定量、ヒアルロソ酸の泳動挙動について検討を行ってきた。特に後者において、高分子試料の構成単位当りの解離基量が同じであれば、実効移動度は分子量に無関係であることを示した。さらに、分子量10万以上になると、本法が細管内を自由泳動することから、高分子特有の泳動の遅れが生じ、この現象は定量性と分子量、高分子相互の分離に影響を及ぼすことがわかった。今回は、この継続として、ポリウロン酸であるアルギン酸ナトリウム(SA)を供試料に選り、泳動の遅れの存在を確認した。さらに、この現象を反映する分子量的差異について、水系GPCとの比較検討を行なった。また、有機溶媒含有の電解液系におけるSAの泳動挙動についても検討を加えたので、これらの結果を合わせて報告する。

2. 実験 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置EP-1B型を使用した。泳動管(PTFE製)は内径0.57mm、長さ30cmであり、恒温槽は20℃に設定した。GPCにはWaters社製6000A型高圧ポンプ、UGK型ユニバーサルインジェクター及びR401型示差屈折検出器をそれぞれ接続して用いた。カラムは内径7.5mm、長さ60cmである東洋曹達工業製G5000PWとG3000PWを連結した。分子量の異なる5種のSAは鴨川化成製のものを常法により、精製して用いた。これらのGPC-光散乱による重量平均分子量を右表に示す。

Molecular weight of SA

Sample Weight ave.

○SA-1 ——— 2.16 × 10⁵

●SA-2 ——— 2.60 × 10⁵

●SA-3 - - - - - 3.19 × 10⁵

●SA-4 ——— 3.27 × 10⁵

●SA-5 - - - - - 3.79 × 10⁵

3. 結果及び考察 一般に高分子試料の場合、その電位分配曲線は明確な階段信号を与えず、特有な線形を示す。酸性電解液条件における5種のSAの電位分配曲線をFig.1に示す。このときの試料負荷量は5μgであるが、PU値0.16にゾーンを形成したものは、粘性の低いSA-1、SA-2のみであり、しかも、これらのゾーン長は異なり、他についてはゾーンを形成し得なかった。この図より、試料ゾーンが現われた後の電位分配曲線は、高分子量になるに従い、この傾きは小さくなることわがかる。これは高分子試料のもつ粘性による泳動の遅れのためと思われ、この傾向は高分子量になる程、顕著に現われることをSAについても認めた。そこで、次に5種のSAをそれぞれ(5~50)μg導入したときの得られたエレクトロフェログラムについて、リーディングとターミナルの電位分配間を10等分し、それぞれの分画

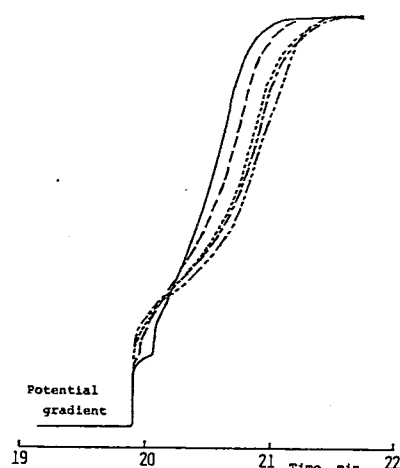


Fig.1 Electropherogram of SA

Leading electrolyte:HCl(0.01M), TritonX-100(0.1%), β-Alanine, pH3.2; Terminal electrolyte:Caproic acid(0.01M); 100μA;

の長さをプロットした。この結果より、泳動の遅れを反映する分画3以降のゾーンは、高分子量になるに従って長くなるが、試料負荷量が10倍になっても、それらの長さは、ほとんど変化せず、同じパターンを示すことがわかった。なお、泳動の遅れの測定に際しては、これがキャピラリチューブの壁面の熱坑によるものと思われるので、ブランク泳動において、リーディングイオンとターミナルイオンの界面は十分に正立していることが必要である。また、試料負荷量とPU値0.16に現われるゾーン長の関係を求め、最小二乗法により算出した検量線をFig. 2に示す。なお、本実験においてもSAの実効移動度は、分子量に依存せず一定のPU値を示した。作成した回帰式の相関係数は、すべて0.999以上の良好な

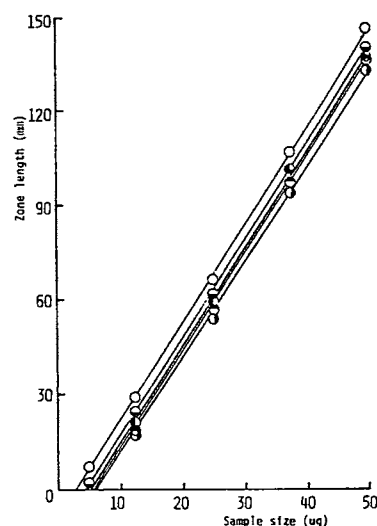


Fig. 2 Calibration curve of SA

直線関係にあったが、これらは一致せず、高分子量になるに従い、その切片は大きな負の値を示した。以上の結果より、泳動の遅れは試料負荷量に関係なく、ほぼ一定の値を示すことがわかり、この図においては、検量線の切片が泳動の遅れに消費された量と思われる。このように本法を利用しての定量分析では、分子量の影響を無視することができない。しかしながら、一方では泳動の遅れを測定することにより、高分子電解質の分子量的知見が得られることも考えられる。一般に、高分子電解質のGPCでは、イオン排斥効果のために排除限界付近に溶出し、非イオン性の標準ポリエチレンオキシドを検量線に用いると、異常に高い分子量を手える。本実験でも分子量の低い3種のSAについては分布の差がみられたが、高分子量のSA-3からSA-5については、すべて排除限界に溶出し、分子量の差をみることはできなかつた。これに対して本法では、高分子量になるに従い、泳動の遅れが大きくなるために、イオン排斥効果の高い試料について、水系GPCでは得られない有用な分子量的知見を手えるものと思われる。³⁾

また、アセトンを40%含む中性電解液条件により、SAは析出して泳動することを認めた。SA水溶液を試料として導入すると、系の中では貧溶媒であるアセトンの組成が多いために、SAは析出する。この状態において、SAの移動度は極端に小さくなり、ターミナルイオンの中を泳動する。SAをアルシアソブルーで染色すると、泳動の様子は鮮明に観察することができる。析出状態での電位分配曲線はノイズが大きくなり、SAが検出器付近に到達すると、電位は著しく不安定になるが、他イオンの R_E 値、ゾーン長を測定することは可能であり、しかも他イオンは析出状態で泳動するSAに関係なく、等速泳動されることがわかった。これを利用し、通常の電解液条件ではSAとの分離が難しいリソニウムイオンの定性・定量を行なうことができる。

(文献)

- 1) 山本信也, 太田忠男, 森川良広: 分析化学, 31, 251 (1982)
- 2) 同上: 分析化学, 31, 557 (1982)
- 3) 同上: 本シンポジウム第1回講演要旨集 p13 (1981)

9 リン酸ジルコニウムアミド誘導体の合成

— 等速電気泳動法によるアミド化量の測定 —

(広大工) ○ 豊田修至・山中昭司・服部 信・広川 健・木曾義之

〔緒言〕 無機イオン交換体として知られる α -リン酸ジルコニウムは図1に示すようにジルコニウムからなる原子面の上下からリン酸水素基が結合した層状構造を持っている。演者らは、このリン酸ジルコニウムをアンモニア気流中500～900℃の高温で処理すると結晶構造を保持したまま、結晶中にアミド態窒素が増加することを見い出している。本研究では、等速電気泳動法を用いて層間に生成したアミドリリン酸種の同定と定量を行なった。

〔実験〕 アンモニア気流中で反応させた α -リン酸ジルコニウム試料を1N NaOH中で煮沸してアンモニウム態窒素を除き、同時に加水分解を行なった。生成した水酸化ジルコニウムを濾別し、濾液に含まれる全アミド態窒素量の測定および等速電気泳動法によるアミドリリン酸種の分析を行なった。等速電気泳動分離には、島津IP-1B型装置(0.5mm ϕ × 250mmキャピラリーチューブ)を使用した。

〔結果と考察〕 α -リン酸ジルコニウムのアミド化は、層間リン酸水素基の縮合が始まる400℃より急激に進む事から、アミド化は層間に生成したP-O-P結合をアンモニア分子が攻撃する事により進行すると推定される。加水分解により生成すると思われるオルトリン酸、ピロリン酸、モノアミドリリン酸、イミドジリン酸を比較標準試料として準備し、等速電気泳動法による分離の可能性を検討した。その結果、ターミナル液に0.005M MES⁻, pH 7.00 (2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール), リーディング液に0.01M Cl⁻, pH 6.00 (L-ヒスチジン)を用いた時、図2に見られるような良好な分離図が得られることがわかった。泳動電流は50 μ Aである。リーディング液のpH値をさらに下げると、アミドリリン酸、イミドジリン酸は加水分解されオルトリン酸になるため、6.00以下では分析できなかった。またpH 7.00 (イミダゾール)およびpH 8.93 (L-アルギニン)を用いた場合には、ピロリン酸とイミドジリン酸の分離が不明瞭となった。

以上の分離条件を適用して、アンモニア処理したリン酸ジルコニウムの分析を行なった。その結果、500℃ではアミド態窒素はモノアミドリリン酸として存在するが、600℃以上ではモノアミドリリン酸、オルトリン酸が減少し、イミドジリン酸が増加することがわかった。ゾーンの長さをもとに求めた500℃処理試料の組成は、 $Zr(NH_2PO_3)_{0.67}(HPO_4)_{1.33}$ であり、全アミド態窒素量の分析値ともよく一致している。

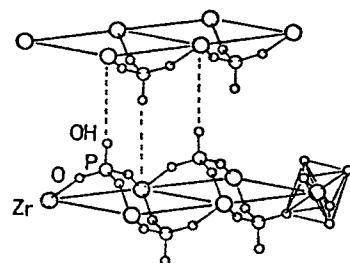


図1. α -リン酸ジルコニウムの構造

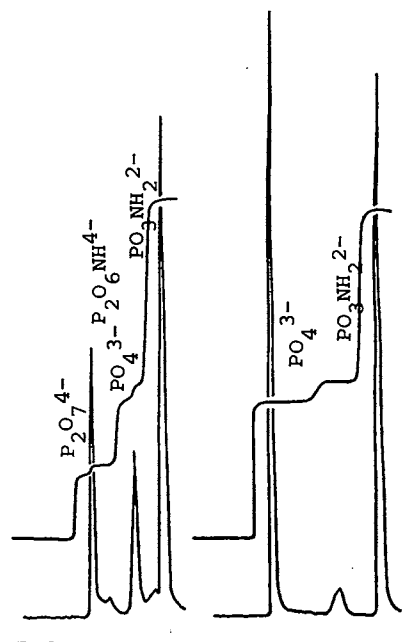


図2 等速電気泳動分離図

(神戸大教養) 成相裕之・中崎知美・本岡 達

(神戸女薬大) 津波吉亮朝

1. 緒言 リンのオキソ酸アニオンのイソタコフォレシスによる分析の一環として、本報では環状の縮合リン酸塩の相互分離定量を行うことを目的とした。

現在、リン酸塩の分離定量にはパーパーあるいはイオン交換クロマトグラフィなどが用いられているが、かなりの時間と労力を費す(高速自動分析化の研究もあるが一般化していない)。イソタコフォレシスによると、その欠点を除くことができる。しかし、イソタコフォレシスではPU値が接近していると分離できないので、適当なリーディング液の選択と条件の設定が必要である。本報では、従来用いているヒスタジン・塩酸塩系のリーディング液に少量の金属塩を添加して、最適分離条件を見出そうとした。

2. 実験 1) 環状リン酸塩の調製 P_{3m} : リン酸二水素ナトリウムを 500°C で3時間加熱する。水に不溶性成分を沈別した後、エタノールを加え、 $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の結晶を得た。3回再結晶した。 P_{4m} : 五酸化リンを冷水に徐々に添加した後、エタノールを加えて $\text{Na}_4\text{P}_4\text{O}_{12} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ の結晶を析出させた。さらに3回再結晶した。 P_{6m} : 85%リン酸に炭酸リチウムを加え反応させる。このスラリーを白金皿に入れ 200°C で1時間、さらに 275°C で5時間加熱する。よく粉砕した後、水に溶かし不溶性成分を沈別する。沈液を陽イオン交換樹脂(H型)に通した後、炭酸ナトリウムで中和する。メタノールを加え沈殿を作る。3回再結晶し $\text{Na}_6\text{P}_6\text{O}_{18} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を得る。 P_{8m} : 硝酸鉛水溶液とテトラメタリン酸ナトリウム水溶液を混合し、テトラメタリン酸鉛の沈殿を作る。 150°C で2時間加熱後、粉砕し、再び 310°C で30分間加熱する。よく粉砕した後、水に懸濁させ酸化ナトリウム水溶液を加え、ナトリウム塩に変えた後、酸化鉛を沈別後、沈液よりエタノールを加え分別沈殿させる。3回再結晶し $\text{Na}_8\text{P}_8\text{O}_{24} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を得る。

2) イソタコフォレシス 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置IP-2Aを使用した。泳動管はフレカラム内径1.0mm、長さ10cmと主カラム内径0.5mm、長さ10cmを連結して用い、泳動電流は $200\mu\text{A}$ を12分間流した後、 $100\mu\text{A}$ に切りかえた。リーディング液は、 0.01M ヒスタジン・塩酸塩にヒスタジンを加えpHを5.5とし、TritonX-100を0.1%になるよう添加した。金属塩を含有する場合は、 0.1M あるいは 0.01M の各塩化物を添加した。ターミナル液は 0.01M カプロン酸を用いた。

3. 結果と考察 4つの環状リン酸塩(P_{3m} , P_{4m} , P_{6m} および P_{8m})の分離に、従来よりリン酸塩の分離に使用しているリーディング液(ヒスタジン塩酸塩-ヒスタジン-TritonX-100 (pH5.5))を用いると、 P_{3m} , P_{4m} , P_{6m} はよく分離できるが、 P_{6m} と P_{8m} は分離できない。そこで種々の金属イオン(Mg, Ca, Sr, Ba, Cu, Niなど)との錯体形成による分離を試みた。 Ca^{2+} イオンをリーディング液に添加すると、図1に示すようにPU値が変化する。 Ca^{2+} イオン濃度がうすいと、 P_{6m} と P_{8m} のPU値の差が小さく、濃くなると、 P_{6m} と P_{8m} のゾーン境界が不明瞭となること、および P_{4m} と P_{6m} の間のPU値が接近するので

4つの環状リン酸塩の相互分離に最適の Ca^{2+} イオン濃度は 0.25 mmol/l であった。(図2) molar response ($\text{mm}^2/\text{n mol}$)は $\text{P}_{3\text{m}}$ (2.71), $\text{P}_{4\text{m}}$ (2.91), $\text{P}_{6\text{m}}$ (3.23) および $\text{P}_{8\text{m}}$ (3.64) であり, 分子量の増大とともに大きくなる。 Ca 以外の金属塩を添加した場合はアルカリ土類(Mg , Sr , Ba)は Ca の場合と同様であったが, その他の Cu , Ni などは分離不十分であった。

次に, $\text{P}_{3\text{m}}$ を定量する場合, 従来のリーディング液を用いると, $\text{P}_{3\text{m}}$ はPU値が小さい(0.079)ため, $\text{P}_{3\text{m}}$ 量が 8 n mol 以上になるとリーディングイオンの Cl^- とmix zoneを形成する。(図3) 金属イオンを添加すると, 図1のようにPU値が大きくなるので, Cl^- イオンとmix zoneを形成しにくくなり,

$\text{P}_{3\text{m}}$ の定量可能範囲が広がる。例えば, Ca^{2+} イオンを 1 mmol 添加したリーディング液を用いると, PU値は 0.146 となり, 80 n mol まで定量できた。

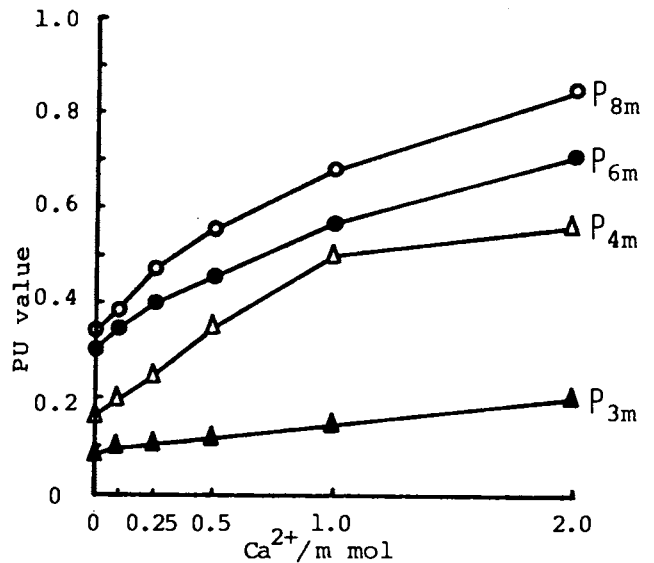


図1. Ca^{2+} ion 添加によるPU値の変化

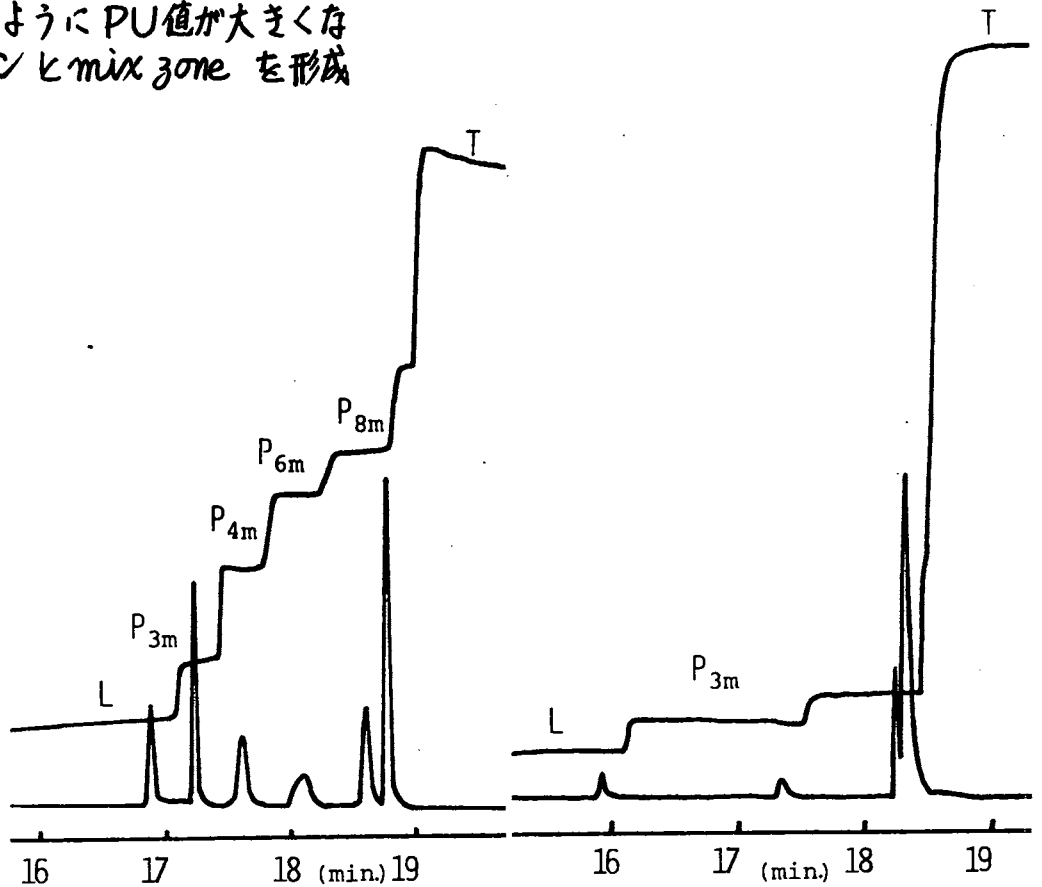


図2. Ca^{2+} ion (0.25 mmol/l) 添加した場合のイソコフエログラム

図3. $\text{P}_{3\text{m}}$ の混合ゾーン $\text{P}_{3\text{m}}: 20 \text{ n mol}$

11 細管式等速電気泳動法によるテトロドトキシンの定量

山口女子大食物、上越教育大学*

○島田和子、大鶴 勝、山口 務、ニ五田公俊

1. 目的 フグ毒テトロドトキシシン(TTX)の定量は、主に、マウスによる生物学的試験法でなされている。しかし、このマウス法は煩雑であるので、他の物理化学的定量法が開発されつつある。そこで、我々は細管式等速電気泳動法(EP法)によりTTXの定量を試みた。また、フグの粗抽出液中にはTTXのアニヒドロエピ体(毒力はTTXの約1/500)が含まれていると言われている。そこで、TTXとアニヒドロエピ体(エピ体)の分別定量を試みた。

2. 方法 試料はフグの各組織から酢酸メタノール法で抽出し、粗抽出液とした。このフグ粗抽出液と標準TTXをEP法により定量し、マウス法を使用した動物実験の結果と比較した。標準TTX溶液を塩酸処理するとエピ体が生じてくるとセルローズアセテート膜電気泳動法で確認した。TTXはアルカリ条件下で分解するが、一オ、エピ体は安定である性質を利用して、EP法でエピ体量を定量した。

3. 結果 標準TTXを用いて電気泳動条件の検討をおこなった結果、リーディング液として、5 mM $\text{CH}_3\text{COOK}-\text{CH}_3\text{COOH}$ (pH 6.0), 50% ジオキサン、0.2% トリトンX-100, ターミナル液として、10 mM β -アラニン(pH 4.5)を使用すると、TTXはカチオンとして泳動される($\text{pU}=0.32$)ことが認められた。フグ粗抽出液中のTTX含量は、標準TTXによる検量線を用いて算出された。EP法とマウス法による測定値は、ほぼ一致した。

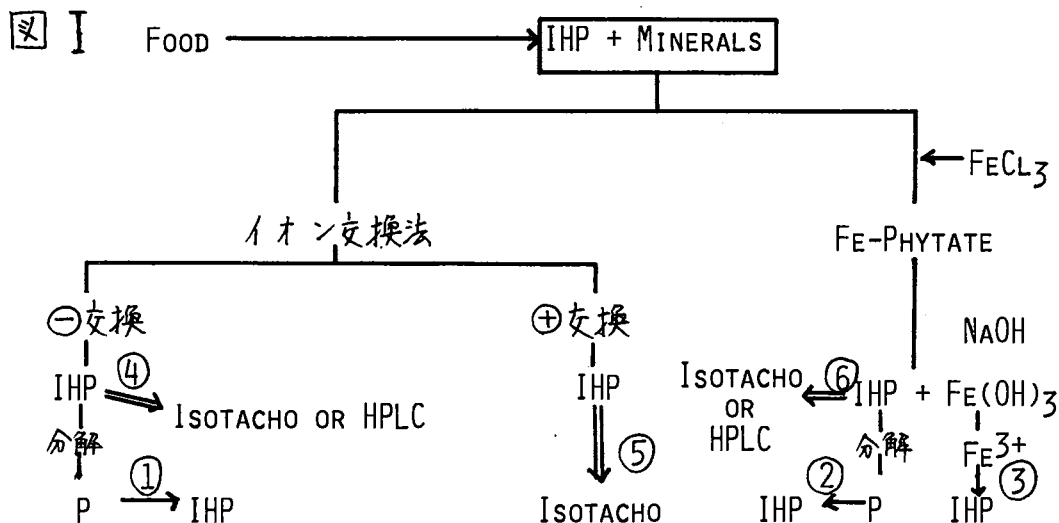
TTXとエピ体はEP法で分離できないので、もしフグ粗抽出液中に多量のエピ体が存在しているならば定量性が劣ると考えられる。TTXとエピ体は強酸性条件下で平衡状態にあると言われている。そこで、標準TTXを用いて、モデル的にTTXとエピ体の平衡反応について検討した。TTX溶液を、強酸性条件、高温下で長時間放置すると、エピ体のオに平衡が傾いた。しかし、あまり極端な酸性条件では、かえってエピ体の生成が押えられた。また、TTXの初濃度によって両者の濃度比に変動は見られなかった。フグ組織からの通常のTTX抽出操作は、酢酸弱酸性条件でおこなわれているので、平衡がエピ体のオへ傾くとは思われない。そこで、標準TTXの水溶液ならびにフグ粗抽出液中のエピ体をEP法で分別定量すると、それらは、ほぼ同じ割合(約14%)のエピ体が含まれていた。従って、定量標準TTX溶液にも同じ割合のエピ体が含まれているので、EP法によるフグ粗抽出液中のTTXの定量性には問題はないと考えられた。従来のTTX定量法であるマウス法とEP法の結果を比べても値に差はないことから裏付けられる。

ノートルダム清心女子大学 高橋正倫・菊永茂司・有森三和子

フィテン酸 (myo-Inositolhexaphosphate : 以下 IHP と省略する) は種々のミネラルと結合して塩 (Phytate) を形成し、さらにある種のタンパク質と複合体を成して完熟した穀類や豆類中に広く分布している。このような食物を摂取すると、腸管内で IHP が Ca や Mg、Zn、Fe と結合して不溶化し、これらミネラルの吸収を阻害するために、場合によってはある種のミネラル欠乏を惹起することがあるとされている。このことから、ミネラル代謝に対する IHP 作用に関する研究が盛んに進められているが、現在に至るまでも IHP の正確かつ簡便な定量法が確立せず、IHP の代謝研究の進捗を妨げている。

そこで著者らは、IHP 自体を直接測定する方法として細管式等速電気泳動法 (Isotacho) の適用を試み、概知の IHP 定量法と比較検討した。図 I に、現在用いられている IHP の定量法並びに著者らが検討を加えた方法を略記した。食物中の IHP と HCl あるいは TCA 溶液で抽出した後に、①陰イオン交換樹脂を用いて IHP を分離して分解し、IHP の P を定量する。抽出液に FeCl_3 液を加えて Fe-Phytate を作り、これを NaOH 液で IHP と $\text{Fe}(\text{OH})_3$ に分離して、② IHP を分解して P を定量する。また、③ $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の Fe^{3+} を定量する。この①、②、③の方法が現在多用されているが、これらは P または Fe から IHP を逆算して求める間接的定量法であり、IHP 以外のリン酸化合物の影響や、Fe-phytate 中の Fe 含量比が一定しないことなどの難点がある。ところが近年、④-HPLC、陰イオン交換法で分離した IHP を HPLC で直接定量する方法が報告されている。しかし、いずれの報告においても IHP が V_0 近くに溶出しており、IHP の保持に問題があり、食物中の IHP の測定に用いるには不適当であると考えられる。

以上のことを考慮して、①、②、③、④-HPLC、⑥-HPLC と IHP の測定に Isotacho を用いた④-Isotacho、⑤-Isotacho、⑥-Isotacho を実施した。



〔方法〕 Isotacho の分析器機には、島津 1P-1B 型分析装置および 1P-1B 型電位勾配検出器島津 PGA-1 型を使用し、Teflon capillary tube (0.5 mm x 20 cm) 150 μ A $\rightarrow$ 50 μ A、1/128 attenuation の条件で、先行電解液に 0.01 M HCl、L-Histidine (pH 5.0)、後続電解液に 0.01 M n-Capric acid (pH 3.4) を用いた。また、図 I の方法で IHP を処理するにあたり、標品に Na-Phytate (SIGMA 社製)、試料としてみけぼの種玄米 (岡山県産)、交換樹脂に DOWEX 1-X8、Cl form (200 400 mesh)、DOWEX 50W-X8、H form (100 200 mesh) を用いた。さらに Isotacho で分離した玄米中 IHP ピークの同定には PU 値と IHP の分解酵素 Phytase (SIGMA 社製) を用いた。IHP の HPLC による分離定量には ALC/GPC 244 型、Protein column I-60 (7.8 mm x 30 cm)、RI 検出器、移動相にトリエチルアミンフオスフェイト (pH 2.5)、流速 1.0 ml/min と適用した。

〔結果〕 Isotacho で IHP の標品を分析した結果、PU 値は 0.23 で $Y(\text{cm}) = 0.3163 X + 0.0597$ 、($X = \mu\text{g/ml}$) の直線を得、定量性のあることが確認できた。さらに、Isotacho による IHP のピークは Phytase によって消失することから、IHP 単一物質のピークであることが示された。また、IHP の標品を用いて図 I に示した各方法で処理定量したところ、②と⑥ - Isotacho で 100 % の回収率であったが、①でこれに近く、④ - Isotacho では IHP の分解産物が同定され、IHP を直接測定するには適しないと考えられる。③によって IHP と逆算する方法は②、⑥ - Isotacho に比べて Fe/P 比が一定しないために、問題の多い定量法であることが再確認できた。そして、玄米試料を用いて図 I の方法で添加回収試験をふくめて処理した。②と⑥ - Isotacho では標品で行ったときと同様に 100 % の回収率を示した。また、①で IHP 以外のリン酸化化合物の影響が、④ - Isotacho と⑤ - Isotacho で IHP と同じ初動度を示す未知物質が観察され、ともに過大値を示し、試料の処理法としては不適である。そして、Isotacho で分析した④と⑥の値と HPLC による④、⑥の結果をそれぞれ比較すると、HPLC による試料中 IHP の分離は可能であるが、測定法等に問題があると考えられ、Isotacho の約 1/10 の回収率であった。

〔結論〕 (1) 穀類などの試料の IHP を Isotacho または LC を用いて定量する場合の前処理法として、イオン交換法と Fe-Phytate 分離法があるが、後者の回収率が高く優れていた。(2) Isotacho 法による IHP の定量は、Fe-Phytate 中の Fe の定量の場合より直接定量が可能で、しかも高回収率であった。(3) Isotacho 法と LC の定量法と比較検討した結果、現段階ではリン酸、myo-Inositol-monophosphate、myo-Inositol-diphosphate、myo-Inositol-hexaphosphate など Isotacho 法で分離が可能であり、検出限界についても LC 法に比べ Isotacho 法で 10 倍高かった。

13 細管式等速電気泳動法による嫌気性消化プロセスの有機酸分析法

(広島大・工) 広川 健, ○酒井泰孝
木曾 義之, 砂原広夫

1. 有機系の微生物分解可能な廃液や廃棄物および下水処理場の余剰汚泥を利用し嫌気性消化プロセスによるメタン系バイオガスエネルギーとの転換過程において、このプロセスを最適化することが重要である。本研究に用いた嫌気性消化プロセスは酸生成相とメタン生成相の二相分離式53℃高温嫌気性消化システムでFig.1に示すごとく、T₂, T₄がそれぞれ酸生成とメタン生成相の各槽である。このプロセスを最適にするためには、各相のプロセスの自動計測制御システムの適用と共にT₂, T₄の揮発性有機酸(VFA)の情報も取ることが必要となる。T₂, T₄の試料液はORP=-400~-520mVを示す嫌気性状態で、種々な阻害剤、未分解、分解途上の種々な有機物を含む、塩濃度の高い毒性を有する。

嫌気性消化プロセスにおける対象とするVFAはギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸、吉草酸等が主体であり、何らかの前処理後、ガスクロマトグラフ、液体クロマトグラフにより分析している。前者はかなり複雑な前処理法を必要とし、かつ連続試料注入によりカラム内および気相配管内の汚染により変動係数の増加、回収率の両面性がわるくなる。後者は注入試料量はわずかであるが、カラム内の汚染があり両面性をわるくする。このため分離用カラムを用いる細管式等速電気泳動法により検討した所、簡単な前処理法と共に分析可能であり結果を報告する。

2. 本研究で用いる基質は合成し尿(SNS)と食品工業廃棄物の混合液である。T₂およびT₄の試料液を採取し遠心分離した後の液を対象として表1に示す実験番号Exp.1, 2, 3の条件を検討した。Exp.1と2は試料液を水で希釈し、Exp.3はメタノールで希釈した。リーディングおよびターミナル液等の分析条件は表1に示した。

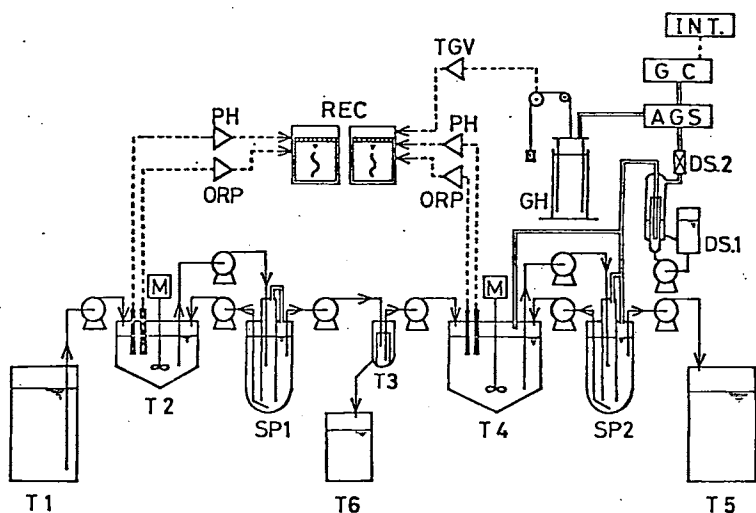


Fig 1, Flow Sheet of Anaerobic Digestion in Two-Tank Separation System

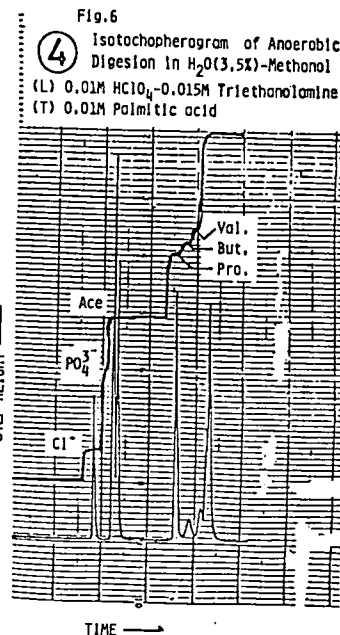
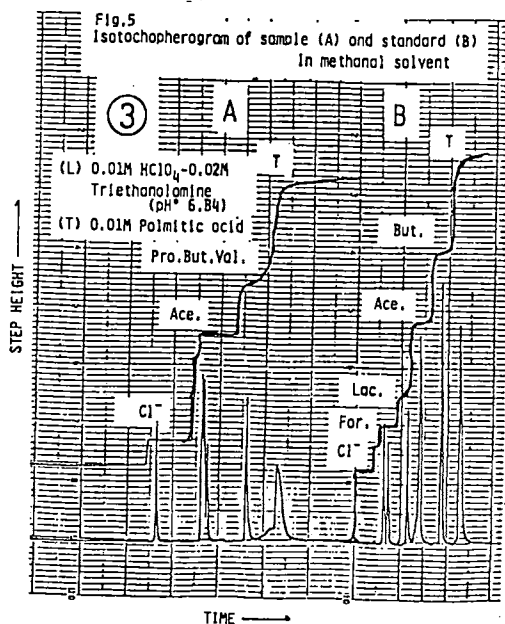
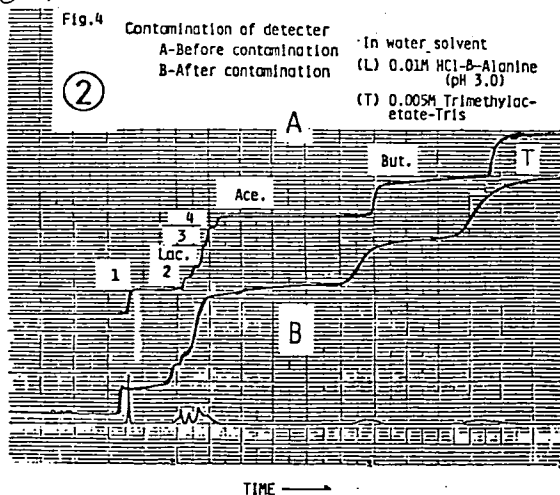
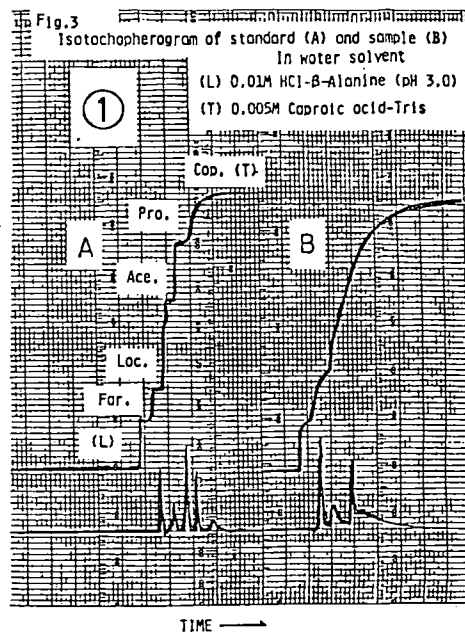
Table 1 ANALYTICAL CONDITIONS

	Exp.1	Exp.2	Exp.3
Pre-Treat. for sample	Centrif. 30 min 3,500 rpm No filtration No dilution	Centrif. 15 min. 7,000 rpm Filtration with 0.45 μ m Dilution with H ₂ O	Centrif. 15 min. 7,000 rpm Filtration with 0.45 μ m Dilution with Methanol
Leading-Buffer	0.01 M HCl + β -Alanine pH = 3.0	0.01 M HCl + β -Alanine pH = 3.0	0.01 M HClO ₄ + 0.02 M Triethanol- amine pH = 6.84
Terminal-Buffer	0.005 M Cap- roic acid + Tris.Buff.	0.005 M Tri- methylacetate	0.01 M Palmitic Acid
Constant polarized current	100 μ A	100 μ A	75 μ A
Contamination of Detector	Contamination Repeating wash with H ₂ O	Contamination Repeating wash with H ₂ O	No contamination
Analytical times	1 hour	1 hour	30 min

3. Table 1のExpt. 1に示す前処理を適用した試料液の結果をFig. 3のBに示す。Fig. 3のAはギ酸、乳酸、酢酸、プロピオン酸の各標準化合物のデータである。水10倍に希釈した試料50μlの注入はBの如く明確に分離して見ることがわかる。

Expt. 2の前処理法は7,000 rpmの遠心分離後、0.45μmのミリポアフィルターで処理し水10倍に希釈したものを50μl注入したデータFig. 4のAである。Expt. 1と異なる点はターミナル液に0.005 M Trimethylacetate, pH=3を用いている。乳酸、酢酸、酪酸は分離されているが、1, 2, 3, 4の成分は不明である。同じ試料を再度注入するとFig. 4のBの如く各成分は不明確なデータを示している。これは毛細管の試料液による汚染と考え、0.1M HCl-β-ヒドロキシ酪酸液で洗浄した後試料液を注入すると初回はきれいなデータが得られるが、次回は不明確となり再現性がよくなくなり、洗浄回数を重ねると再現性の悪いデータとなることがわかった。試料中に存在する硫化物、不明な高分子化合物、蛋白質の共存による毛細管および検出器の汚染を来している。

Expt. 3の結果はFig. 5, 6に示すごとく、7,000 rpmの遠心分離後、0.45μmのミリポアフィルターで処理し、メタノールで10倍に希釈した試料を用いたものである。リーディング液は0.01M HClO₄ + 0.02M Triethanolamineのメタノール溶液、ターミナル液は0.01M Palmitic acidのメタノール溶液である。Fig. 5に示すように、Bはギ酸、乳酸、酢酸、酪酸の標準化合物のデータであり、Aは実際の試料液である。酪酸、プロピオン酸、ギ酸が分離されている。Fig. 6は35%の水を含むメタノールを用いたデータでプロピオン酸、酪酸、ギ酸が分離されている。



14 無担体等速電気泳動とゲルクロマトグラフィーを組み合わせたタンパク質分離システム

(都立大・理・化) ○安川 薫, 真鍋 敬, 奥山 英生

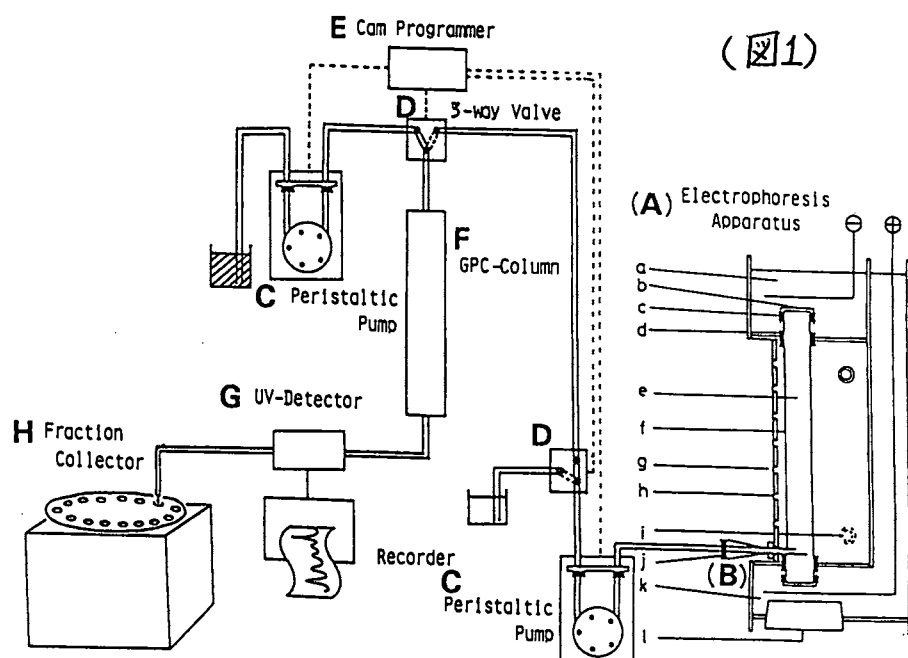
無担体電気泳動装置を用いたタンパク質の等速電気泳動法による分離について報告してきた。今回は、無担体電気泳動装置とゲルパーミエーションクロマトグラフィーカラムとを連結し、主として電荷の差により電気泳動で分離されたタンパク質を、ひきつづき分子量の差でクロマトグラフィーにより分離するシステムと、その自動化を試みつつあるので、このシステムの使用上の問題点等について検討した結果を報告する。

〔方法〕

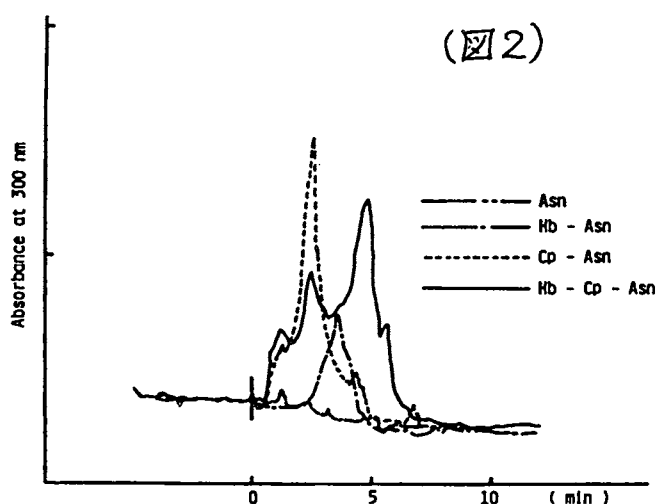
装置の配置を図1に示した。Aは無担体電気泳動（等速電気泳動および等電点電気泳動）用の装置、Bは泳動後の試料吸い出し部、Cはペリスタポンプ、Dは三方電磁弁、Eは時間プログラムのためのカムプログラマー、FはToyo-Pearl HW-55 superfineを充てんしたカラム、GはUV検出器、Hは試料分取のためのフラクションコレクターである。等速電気泳動の条件は昨年の本シンポジウムで報告した。

〔結果〕

図2に無担体等速電気泳動によるタンパク質の分離後、ペリスタポンプにより吸い出し、UV検出器で検出した例を示す。ペリスタポンプから吸い出した後、直ちにクロマトグラフィーにかけるための緩衝液の切り替えのプログラムを作成した。このシステムを用いたタンパク質の分取例を報告する。



(図1)



(図2)

15 等速電気泳動法の蛋白質分析への応用

(日本化薬) 加藤和夫

〔はじめに〕

細管式等速電気泳動がガスフローマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーにつづくオズの分離分析法として世の中に登場して以来、低分子荷電物質においては、迅速で、簡易な分析手段であることが、多くの研究者の応用報告例で明らかとなり、本法の有用性が実証されてきた。しかし、蛋白質分析への応用はどうであろうか? Delmotte¹⁾が1977年に血清蛋白質への応用を報告して以来、彼の提出した諸条件は今も、多くの研究者によって使用されているが、これを越えに条件が見出されていないのが実状である。このことは、一方では彼の条件が如何に優れたものであるかを示すものであるが、アンボリンをスパーサーとして用い分離能を向上させた反面、"isotachopheresis oriented" ではないという明確な実証が充分でない等の問題点を残している。

演者は前回のシンポジウムから蛋白質の本法の応用を検討するに当り、酸性蛋白質としてカリクレイン(K)、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、又塩基性蛋白質としてウロキナーゼ(UK)を代表蛋白質として選り、基礎的検討を加えてきた。殊に前回につづき、スパーサーとしてアンボリンを極力用いず、低分子ペプチドやアミノ酸などを用い、その蛋白質の分離を上記各蛋白質の単離した各成分を用いて検討した。又電解液条件の検討についても行ったが Delmotte の条件を越えるものは現時点では見出されなかった。本法での各蛋白質の分離と他の電気泳動法による分離およびクロマトフォーカシング分離との比較も合せ行ったので報告する。

〔装置〕

等速電気泳動装置(C-ITP) : 島津細管式等速電気泳動装置 IP-2A, IP-IB型, 検出器 : 紫外線吸収検出器 UFD-10A (254nm), 電位勾配検出器 PGD-2, 分取付加装置, IPP-2A

等電点電気泳動(IEF) : マリソル産業(株) KS-802 MSE型マクロスラゲル泳動装置, 定電流定電圧装置 アトー(株)インスタパワー ST-1065型, LKB マルティフォーラ能電気泳動装置

〔試料, 試薬〕

蛋白質試料であるカリクレインはブタ膵臓由来および人尿由来のものをバリエル社およびミドリナテ(株)より購入し、さらに精製したものをを用いた。ウロキナーゼは人尿より製した当社バルクの高分子型と精製により除去される低分子型を用いた。又、牛肝およびヒト赤血球スーパーオキシドジスムターゼはシゲマ社のものを当研究室にてさらに精製したものをを用いた。各蛋白質の成分単離には各種クロマトフォーカシング用担体及び試薬をメルマシア社より購入した。

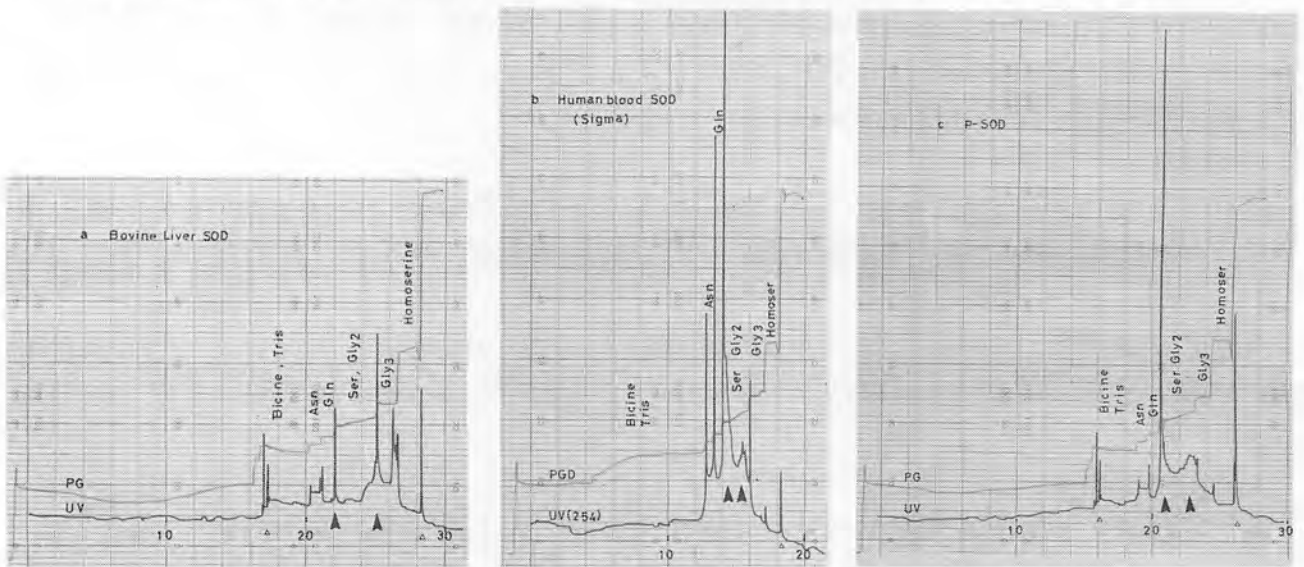
〔結果〕

(ウロキナーゼ)

ウロキナーゼは人尿より製せられる塩基性蛋白で、高分子型(HUK)と低分子型(LUK)の2つの型があり、精製方法等によりこれら比率が異なって得られることが知られている。両型はさらに等電点の異なる約5成分から成り立っている。HUKはpI 8.7~9.4の範囲に、LUKは7.5~9.7の範囲にあり、各成分のpI差はHUKの方が小さく、最大で0.1である。そこでそれ以外のウロキナーゼをさらにクロマトフォーカシングにより分離した材料を用い、Delmotteの電解液条件下、種々のアミノ酸およびペプチドなどの物質について各pI値差毎の分離に最適パースーの探索を行った。その結果、pI値の比較的大きいLUKについて良好なパースーが見出された。

(スーパーオキシドジスムターゼ)

SODはウロキナーゼと異なり酸性蛋白類で、pI 4.5~6.0の範囲に数成分の活性型があることが知られている。SODをanionとして泳動する条件検討については前回のシンポジウムでも報告したので、今回はDelmotteの条件下、主にパースーの探索に焦点を絞り検討を加えた。図はその一例で、(a)は牛肝由来、(b)は人血由来、(c)は(b)の精製品の泳動図である。(図中、▲印はSODを、△印はブライン由来を示し、他のピークは不純蛋白)牛肝SODは人血SODよりpI値が高く、セリン或いはグリシルグリシンがパースーとして良好であり、人血SODではアスパラギンやグルタミンが不純蛋白との分離に際し良パースーとなっていることが分る。又、精製した人血SODの精製状況がよく理解できる。各種SODについても他の泳動技術との比較を行い、良好な結果が得られるので今後報告する。



1) P. Delmotte, Sci. Tools 24, 3, 33 (1977)

16 等速電気泳動法のタンパク質分析への応用

平野昌彦 (東レ・リサーチセンター)

1. はじめに

等速電気泳動法は電荷をもつ物質なら、低分子イオンから核酸、タンパク質にいたる種々の物質をそれぞれの移動度の差に基づいて分離できる。そして食品、医薬品、化成品等の工業製品や生体成分のうち比較的 low molecular weight の、無機および有機イオンについてはその分析例が増加しつつある。しかし分子量が 10,000 以上のタンパク質については、その移動度が小さく分離が困難なため、限られた範囲でしか用いられていないのが現状である。

本報告ではタンパク質分析法としての等速電気泳動法に関し、その利点を生かした測定対象について検討した。

2. 材料と方法

装置は島津細管式等速電気泳動装置 (IP-2A) に紫外線吸収検出器 (280 nm) を装着して使用した。電解液系は、リーディング液として 5mM MES, 10mM Amediol, 0.15% Hydroxypropylmethyl cellulose pH 9.0 を、またターミナル液として 10mM ϵ -amino caproic acid (又は ω -amino caprylic acid), 10mM Amediol, Ba(OH)₂ pH 10.8 の組み合わせを用いた。スパーサーイオンはアンホライン pH 3.5 - 10 又は pH 5 - 8, 8 - 9, 9 - 11 (LKB 社) を用いて調製した。分析は 25°C で行ない、まずブレイカラムで 200 μ A, 12 分間分離を行なった後、分離カラムで 75 μ A 等速分離を行なった。検出は 280 nm のタンパク吸収による。

3. 結果と考察

(1) 各種ウシ血清の分析

ウシは胎児牛, 新生児牛, 仔牛, 成牛の順に成長が進むが、それぞれの血清 FCS,

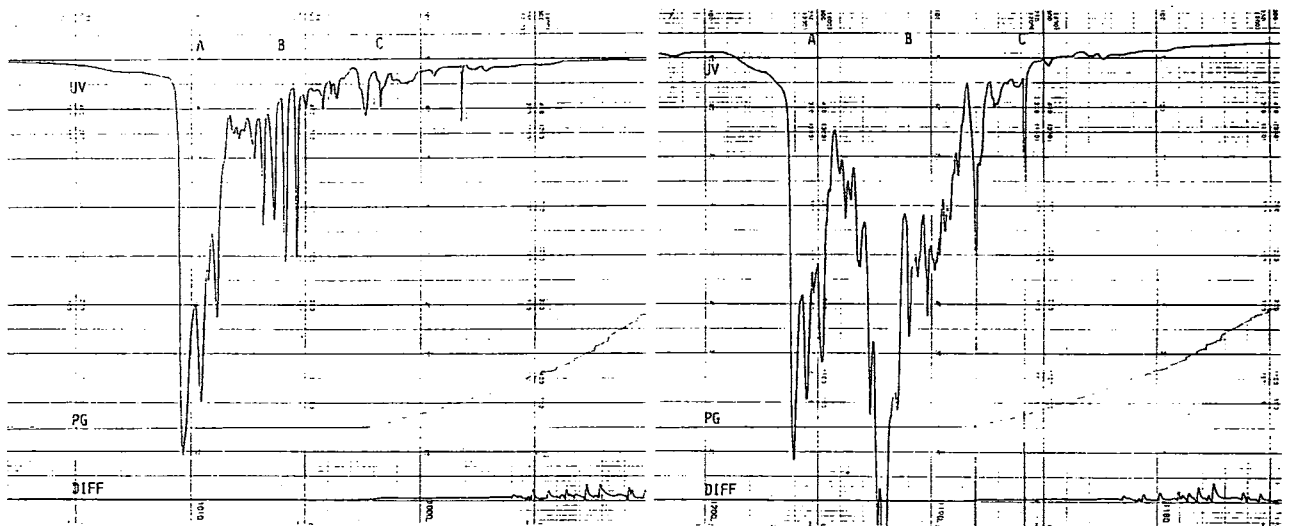


Fig. 1 Isotachograms of JCS (Left) and BS (Right).

JCS, NCS, BSについて分析を行なった。図1にJCS, BSの分離パターンを示す。大きく三領域(A, B, C)に分けられ, A領域はアルブミン, ハプトグロブリン, B領域はトランスフェリン, α_2 マクログロブリン等, C領域はイムノグロブリン類が存在すると考えられる。ウシ血清タンパク質はその成長に伴い, B領域が著しく増加する。また誕生後の成長の過程で産生されるイムノグロブリンの含量(C領域)の増加も反映している。

(2) ウシ血清アルブミン(BSA)の分析

市販の精製BSA(fraction V & crystallized)を分析すると, バンドは接近した三成分より成り, (1)のA領域の分離とよく一致する。SDSホリアクリルアミドゲル電気泳動法による純度検定では, 分子量68,000の単一バンドで存在するため, BSAは分子量的には均一であっても性質(等電点)の異なる成分から成ることが推定された。このことは, BSAの会合しやすい性質を反映していると考えられる。

(3) イムノグロブリンG(IgG)の純度検定

タンパク質の精製過程における純度検定への応用例を示す。図2はマウス腹水中で産生したモノクロナール抗体(IgG)を45%硫酸で分画し, その精製度を分析した結果である。精製によりIgGを示すD領域が増大し, 著しく精製度が上がっていることが確認された。

(4) 等電点分離法としての等速電気泳動法

等速電気泳動法はその原理より, 不連続なpH勾配形成による一種の等電点電気泳動法とも考えられ, 両性担体共存下でタンパク質はpI値の順に分離されることが期待される。そこでまず市販のpIマーカーの分離を行ない, 各ピークの同定を試みた。

4. おわりに

等速電気泳動法のタンパク質分析への応用は遅れており, その原因として分離ピークの同定および各フラクションの分取が困難な点が上げられる。しかし血清タンパク質の分析や, タンパク質の純度検定等の応用には充分使用できるレベルにあり, 今後の展開が期待される。

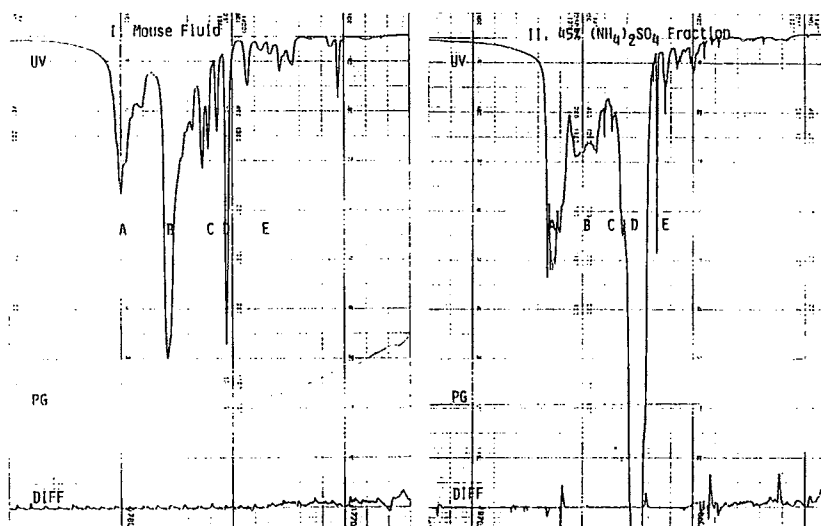


Fig. 2 Isotachograms of crude IgG (Left) and purified IgG (Right).

自治医大 ○吉田 治弘、池本 卯典、富田 功一

イヌの血液系遺伝標識には赤血球型、白血球型、血清蛋白、酵素型、赤血球蛋白、酵素型などがあり、すでに約50種が報告されている。演者らはかつてイヌ血清をSDS-デイスコポリアクリルアミドゲル電気泳動法により泳動し、アルブミンよりも陽極寄りに認められる分子量約34000の蛋白質の個体変異を見出し、その表現型および遺伝子頻度を明らかにしている。この蛋白質の個体変異の検出は免疫電気泳動によっても可能で、自家製の抗イヌ全血清を用い、沈降線を形成させると、アルブミンの一部から α_1 域にかけての沈降線の有無を見い出せた。さらに、細管式等速電気泳動装置を用いて検出したところ、検出時間は短縮され、分離能も良好であり、この変異蛋白の確認試験としても極めて優れた検査法であったので紹介する。

材料と方法：イヌ血清は雑種犬100頭と輸血用供血犬として日本獣医畜産大学に飼育されている5家系(20頭)について検査した。SDS-デイスコポリアクリルアミドゲル電気泳動法はWeberらの方法に従い、免疫泳動法はGraberらの方法に従った。細管式等速電気泳動装置は島津IP-2Aを使用し、電解液系は(I) Delmotte (1977) のリーディング液は5mM-MES、10mM-アメジオール、0.4%-HPMC-15000混合水溶液、ターミナル液は10mM-εアミノカプロン酸、10mM-アメジオールの混合水溶液を水酸化バリウムでpH10.8に調整した。(II) 日根(1982)の報告をわずかに変更し、リーディング液は5mM-HCl、10mM-アメジオール、0.2%HPMC-15000とし、ターミナル液は(I)と同じものを使用した。スパーサ溶液はvaline、glycine、alanineの3種のアミノ酸に(I)ではpH5~8、8~9.5、9~11のAmpholineを混合し、(II)ではpH3.5~9.5のAmpholineを混合した。

結果：演者らの見出したイヌ血清の遺伝的変異蛋白は糖蛋白質であり、免疫電気泳動によっては α_1 域に認められた。そこで、単離した変異蛋白をデイスコポリアクリルアミドゲル電気泳動、澱粉ゲル、等電点および二次元電気泳動を行ったところ、トランスフェリンよりもわずかに速い移動度を示し、等電点は4.1~4.2で酸性を示す糖蛋白質であった。二次元電気泳動によってはハプトグロビンではなかろうかと推定された。そこで、細管式等速電気泳動では分離能、検出時間と併せてヒトのハプトグロビン型との比較対照試験を実施した。(I)の条件での陽性例と陰性例を図に示した。Albのすぐあとの矢印で示す部位が変異蛋白分画である。図でわかるようにトランスフェリン域の分離も良く、トランスフェリン変異の検討も期待される。(II)の条件ではPre alb、Alb域の分離は良いがトランスフェリン域は狭く、トランスフェリン域の検討には不適當のように思われる。

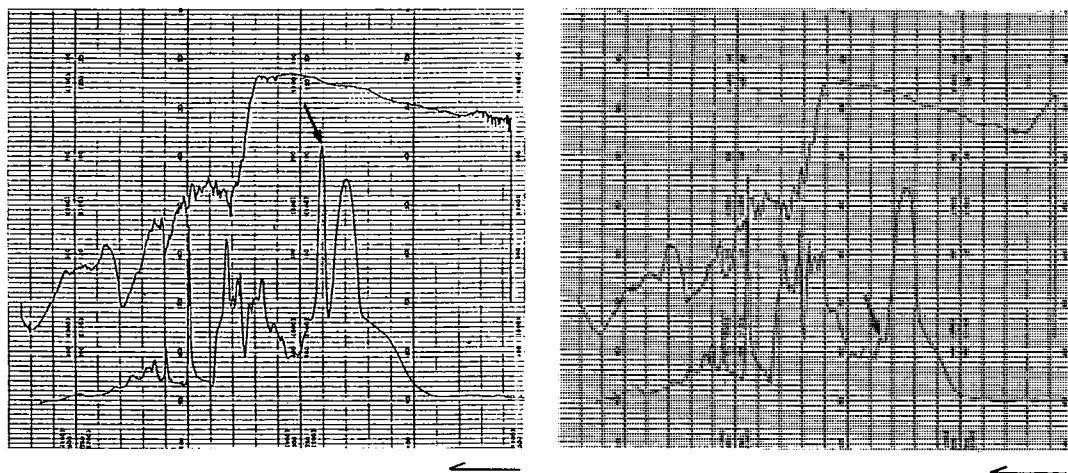


図. イヌ血清の細管式等速電気泳動パターン

よしだ はるひろ、いけもと しげのり、とみた こういち

18 細管式等速電気泳動法によるヒト体液蛋白の死後消長

(宮崎医大) ○中島紀子・高浜桂一

今日幅広い領域で、細管式等速電気泳動(C-ITP)の有用性が明らかにされているが、法医学領域でも、解剖体体液中の蛋白成分が、死後経過に伴ってどのような変化を生じ、又各体液間にどのような相互関係が生じるかに注目し、C-ITPによるこれら体液の分析を試みに結果、早期死体の死後経過時間推定に有効な成績を得ることにできたので報告する。

実験方法

試料は、死後みよそ2日以内の比較的短い死後経過時間があるかじめ判明している剖検死体で、しかも髄液、心嚢液、血清の3種の体液を全て採取するにこのぞきだものについて、試料採取後たばらに -20°C 以下で凍結保存し、用時にはこれを解凍して遠心分離を行ない、その上澄部を、濃縮などの前処理を行わず直接使用し、280nmのUV吸収ピークの変化について検討した。又別に、 4°C 、室温、 37°C の3環境下における放置実験を行ない、蛋白成分の経日変化と同様に検討した。

結果と考察

髄液についての経時的変化の概要は、Alb分画の相対的減少と、Trfe分画及びIgA, IgG分画の相対的增加であり、心嚢液では全体的に見て髄液ほどの変化性には乏しいが、ほぼ同様の傾向を示した。また血清では、他の体液と比較して変化が著明で、特にTrfe分画部の増加が顕著であった。他方放置実験では、蛋白含量の絶対量が減少してゆく傾向にあるが、各分画の相対的比率は、先の採取実験にほぼ類似の傾向を示した。

以上の実験結果にデータ処理を行ない、UV吸収のピーク面積を各分画毎に相対的比率として算出し、体液別に表わしたのがFig. 1.である。解剖体の条件によっては、3種の体液のうち2種、あるいは1種しか得られなくとも、一応の予測は可能で、従来死斑や死後硬直からの死後経過時間推定の一助として、法医学の鑑定上十分に利用し得るものと予想される。

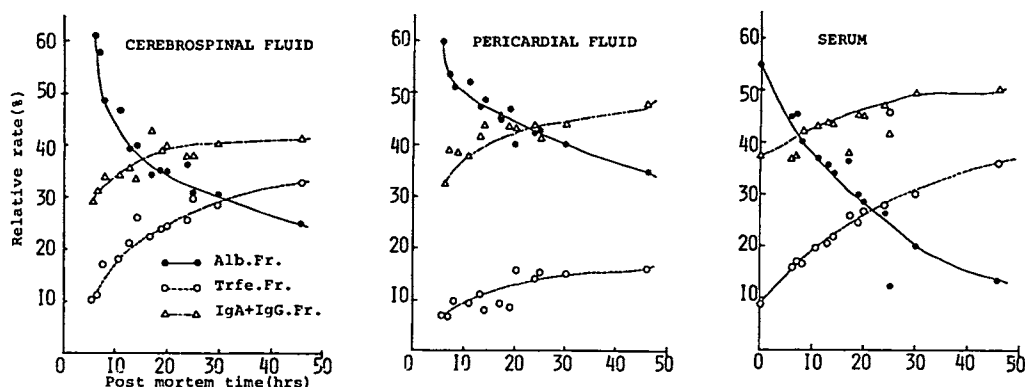


Fig. 1. Time lapse changes of proteins in body fluids.

岡山大学医学部麻酔学教室

○山田輝夫 板野義太郎 小坂二度見

〔はじめに〕細管式等速電気泳動法 capillary tube isotachopheresis (以下, CTIP と略す) を用いて, 赤血球成分を分析した報告には, 赤血球の溶血液を直接分析した方法, 溶血液を沸騰湯浴中にて加熱して除蛋白した上清 (以下, 加熱処理液と略す), および, 溶血液を microwave 照射により除蛋白した上清 (以下, M. W. 処理液と略す) を分析した方法などがある。

本研究は, 赤血球の一つの成分である 2,3-diphosphoglycerate (以下, 2,3-DPG と略す) の分析を例にとり, CTIP 分析用試料の除蛋白操作の必要性について検討した。

〔方 法〕血液は, ヒトよりヘパリン加した注射筒に採血した。採血液の一部は, ベーリンガー・マンハイム・山之内社の 2,3-DPG 測定キットを用いて全血中 2,3-DPG 量を測定し, 残りは, 遠心分離 (3,000rpm, 15min) して赤血球を集めた。集められた赤血球は, 0.25M sucrose を用いて 3 回洗浄した後, 洗浄赤血球は, 等重量の蒸留水を加えて溶血液を作製した。溶血液は, M. W. 処理 (450 W, 5 sec), 加熱処理 (100 °C, 5min), 100 % EtOH の等容添加 (以下, EtOH 処理と略す), および, 終濃度 10% の TCA 添加 (以下, TCA 処理と略す) の 4 種類の除蛋白操作を行った。

溶血液, および, 4 種類の除蛋白液については, 次の①～④の分析を行った。

- ①蛋白定量分析 (Bradford 法)。溶血液は除く。
- ②M. W. 処理液 5, 10, および 20 μ l を分析し, CTIP 分析時の試料容量による定量性を検討。
- ③溶血液, M. W. 処理液, 加熱処理液, および EtOH 処理液のそれぞれ 10 μ l を分析し, CTIP 分析パターンの違いを検討した。
- ④溶血液, M. W. 処理液, および, 蒸留水の各 1 ml に, 10mM-2,3-DPG 標準水溶液 (以下, 標準液と略す) を 50, 100, 150, および 200 μ l 添加したもの, さらに, 溶血液 1 ml に標準液を同様に添加した後, それぞれを M. W. 処理したものについて CTIP 分析した結果と, ①～③の結果から CTIP 分析用試料の最適条件を検討した。

CTIP 装置は, 島津製 IP-1B 型に, 島津製 ipp-1 型の分取用 potential gradient detector を装着して使用した。分析条件は, 先行液に 10mM HCl- β -alanine (pH 4.2), 後続液に 10mM n-caproic acid 水溶液を用い, 試料量 10 μ l, 通電量 100 μ A とした。

〔結果および考按〕溶血液の 4 種類の除蛋白操作によるそれぞれの上清中の蛋白量は, TCA 処理液が最も少なく, 次いで, M. W. 処理液, 加熱処理液そして, EtOH 処理液と増加した。

M. W. 処理液 5, 10, および 20 μ l を CTIP で分析した時の 2,3-DPG のゾーン長は, 直線的に増加し, 試料量 20 μ l までは, 使用した IP-1B 型 CTIP 装置は, 分析に再現性が認められた。

溶血液, M. W. 処理液, 加熱処理液, および EtOH 処理液のそれぞれの 10 μ l を CTIP で分析した結果, M. W. 処理液と加熱処理液は, 同じパターンを示し, 2,3-DPG ゾーン長は, 溶血液, EtOH 処理液に比べて最も長かった。

M. W. 処理液に標準液を添加したもの, および溶血液に標準液を添加した後, M. W. 処理した上清は, 蒸留水に標準液を添加したものを CTIP で分析した結果と 2,3-DPG ゾーンの延長は一致し, かつ, ゾーン長は一定していた。しかし, 溶血液に標準液を添加しただけで CTIP 分析を行うと, 2,3-DPG ゾーン長は, M. W. 処理液の 40 % であり, さらに, ゾーン長にばらつきが認められた。

以上より、CTIP分析用血液試料としては、除蛋白が必要であることが、明らかとなった。その除蛋白法は、有機溶媒ことにTCAを用いると試料が希釈され、かつ、Clが多量に加わることからCTIP分析用試料としては好ましくなく、熱変性法の中でも、最も残存蛋白量の少ないM.W.処理法が、最も良いと考えられる。

本研究で、溶血液やM.W.処理液をCTIP分析した時の2,3-DPGの成分決定、および先行液のpHを4.2にしたことの理由は、参考文献を参照願いたい。

〔参考文献〕

1. T. Yamada, et al.: Direct withdrawal of zones during preparative capillary type isotachopheresis., Acta Med. Okayama 36. (5), 399 ~ 406, 1982.
2. A. Talbot, : Measurement of adenosine triphosphate and some other metabolites in blood cells by isotachopheresis. I. Preparative technique and enzymatic confirmation. Acta Med. Okayama 36 (5), 407 ~ 417, 1982.

※
(高知医科大学・化学教室・皮膚科学教室)

※
○児玉裕敏・三笠洋明・荒田次郎

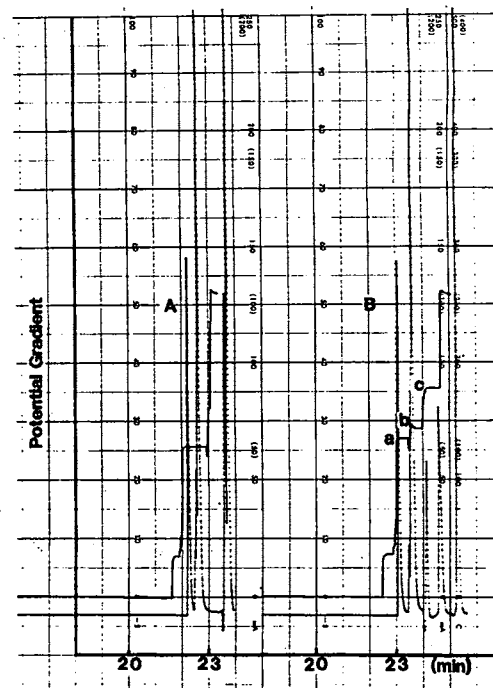
Prolidase(EC 3.4.3.7)は X-Pro , X-Hyp のように Pro , Hyp を C 末端にもつイミノジペプチドを加水分解する酵素である (X-Pro $\rightarrow$ X+Pro)。したがってこの酵素が欠損すると X-Pro , X-Hyp などのイミノジペプチドを遊離のアミノ酸に分解できないため尿中に多量のイミノジペプチドを排泄することが知られている。この酵素活性の測定は Gly-pro の 220nm における吸光度の減少及び Chinard's method による Proline の定量によって主として行なわれていた。我々はこれまでに種々の生体物質の定量に細管式等速電気泳動法を応用してきた。本実験は Gly-pro を Gly+pro に分解する Prolidase 活性の測定に Isotachophoresis を応用してみた。

方法：Prolidase deficiency の患者及びその母の血液をヘパリン中に採血し、生理的食塩水中に 6 % のデキストランを含む溶液の同容と混合し、室温で 1 時間放置し、白血球と赤血球を分離した。赤血球を生理的食塩水で 3 回洗った後、凍結、融解をくり返し、赤血球の膜を破壊した。次に 4 °C で 0.1mol , トリス、塩酸 (pH 8) に対して一晚透析し、その内液を 0.01 mol MnCl_2 で 37 °C , 1 時間ブレインキュベートした後、プロリダーゼ活性の測定に用いた。酵素反応は酵素 0.5ml と 0.05M , トリス、塩酸 (pH 7.4) に 1mM MnCl_2 と 10mM の iminopeptide (Gly-pro) を含む溶液 0.5ml を混合し、37 °C で 30 分間インキュベートし、沸騰浴中で 5 分間 heat することによって酵素反応を止めた。それを遠心し、その上澄中の Proline を Chinard's method によって定量した。Gly-pro , Gly は Isotachophoresis によってそれぞれ定量を行ない、酵素活性の測定を行なった。細管式等速電気泳動には島津 IP-1B を用いた。Leading electrolyte は 10mM $\text{HCl} \cdot 2\text{-amino-2-methyl-1-propanol}$ (pH 7.5)。Terminal electrolyte は 10mM $\text{GABA} \cdot \text{Ba}(\text{OH})_2$ (pH 10.9) であった。上記のような分析条件のもとで Gly-pro , Gly-Hyp , Gly と Hyp が細管式等速電気泳動によって分析された。その結果が Fig 1 に示されている。この条件では Gly-pro と Gly-Hyp が同一のゾーンとなり、Proline は検出されなかった。しかし Fig 1B に示されているように Gly-pro (Gly-Hyp) Gly と Hyp の分離はよい結果を与えた。従って、この方法による Prolidase 活性の測定は Gly-pro と Gly を定量することによって行なった。Prolidase deficiency の患者及びその母の赤血球の Prolidase 活性の測定が Fig 2 に示されている。その結果母の赤血球は 60 分間の反応で Gly-pro の約 70 % が分解されていた。しかし患者の赤血球の場合は全く分解されなかった。Table 1 に Chinard's method と Isotachophoresis による Prolidase 活性の測定の比較が示されている。これらの方法によって測定された値は非常によく一致していた。この方法が Prolidase deficiency のような患者のスクリーニング及び酵素活性の測定に十分に応用出来ると、考えられる。

Legends to Figures

Fig. 1. Isotachophoretic runs of authentic Gly-pro(A), Gly-Hypro (B;a), Gly (B;b) and Hypro (B;c). Analytical conditions as follows; The leading electrolyte was 0.01M hydrochloric acid and 2-amino-2-methyl-1-propanol(pH 7.5). The terminal electrolyte was 0.01M γ -aminobutyric acid and $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (pH 10.9). The chart speed was 10 mm/min. The migration current was 75 μA .

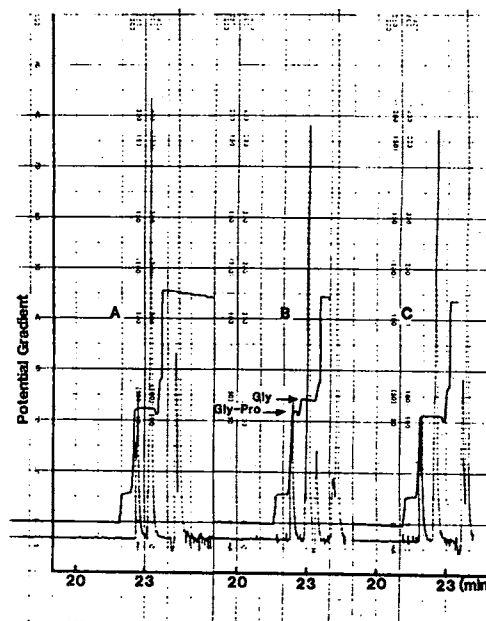
Fig. 2. Isotachophoretic runs of reaction mixture of mother erythrocyte lysate at 0 min (A) and 60 min (B) of incubation time and erythrocyte lysate of a patient with iminopeptiduria at 60 min of incubation time (C). 4 μl of each reaction mixture was analyzed by an isotachophoretic analyzer under the same conditions as in Fig. 1.



Comparison of prolidase activity in red cells of a patient with iminopeptiduria and her mother determined by Chinard's method and an isotachophoretic analyzer

	Chinard's method		Isotachophoresis			
	proline values		glycine values		Gly-pro values	
Incubation time (min)	patient	mother	patient	mother	patient	mother
0	0	0	0	0	5.0	5.0
15	0	1.46	0	1.57	4.98	3.33
30	0	2.20	0	2.15	4.95	2.65
60	0	3.17	0	3.40	4.95	1.59

Values of proline, glycine and gly-pro represents $\mu\text{moles/ml}$.



21 細管式等速電気泳動による精液中のポリアミンの定量

高知医科大学 法医学教室・化学教室*

○津々見 明，児玉 裕敬*，石津 日出雄

ヒト精液中には spermine(Sp), spermidine(Spd), putrescine(Put), cadaverine(Cad)等のポリアミンが含まれている。これらのポリアミンはガスクロマトグラフィー，高速液体クロマトグラフィー，アミノ酸アナライザーによって定量されていたが，従来の方法では操作が煩雑であり分析時間が長いなどの問題があった。今回我々は細管式等速電気泳動法(Isotacho)を利用して精液中のポリアミン特に Sp の定量を行なった。

材料および方法

当大学病院中央検査部より得たヒト精液を3倍容の2% TCA 溶液で除タンパクし，遠心分離した後，その上清をダイヤイオンSK-1(H^+ -form)のカラムにかけ，水および2N-HClで洗った後6N-HCl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(島津IP-1B)により分析を行なった。分析条件は leading electrolyte: 0.005M $Ba(OH)_2$ +valine(pH10.0), terminal electrolyte: 0.01M tetra ethylene diamine とした。

結果および考察

精液からは標準品の Sp と同じ potential gradient のゾーンが検出された。又精液抽出物に標準品を加えて泳動すると完全に単一のゾーンが得られた(Fig.1)。

次に Sp を定量するため検量線の作成および Sp の回収テストを行なった(Fig.2)。Sp の検量線は，10～50 nmol の範囲で原点を通る良い直線性を示した。一方回収テストでは精液量が0.01～0.3 mlの間で95～100%の高い回収率を示した。

さらにヒト正常精液(精子数 40×10^6 /ml以上)と無精子症精液(10×10^6 /ml以下)における Sp の濃度について検討したが，両者の間に差は認められなかった。

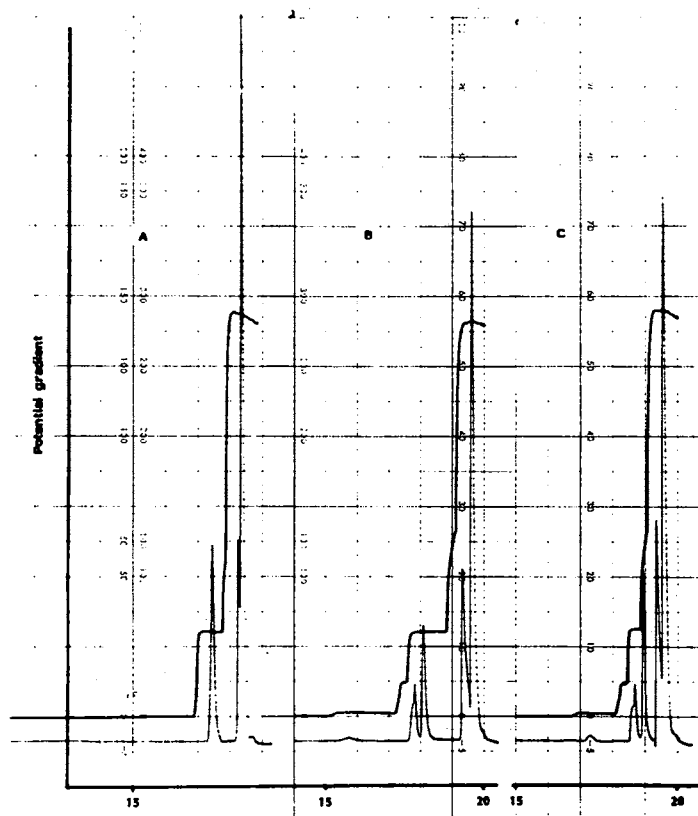


Fig. 1. Isotachopheric runs of authentic spermine(A), seminal sample(B) and a mixture of authentic spermine and seminal sample(C). The leading electrolyte was 0.005M Ba(OH)₂-valine (pH10.0). The terminating electrolyte was 0.01M ethylene diamine. The migration current was 75 μ A.

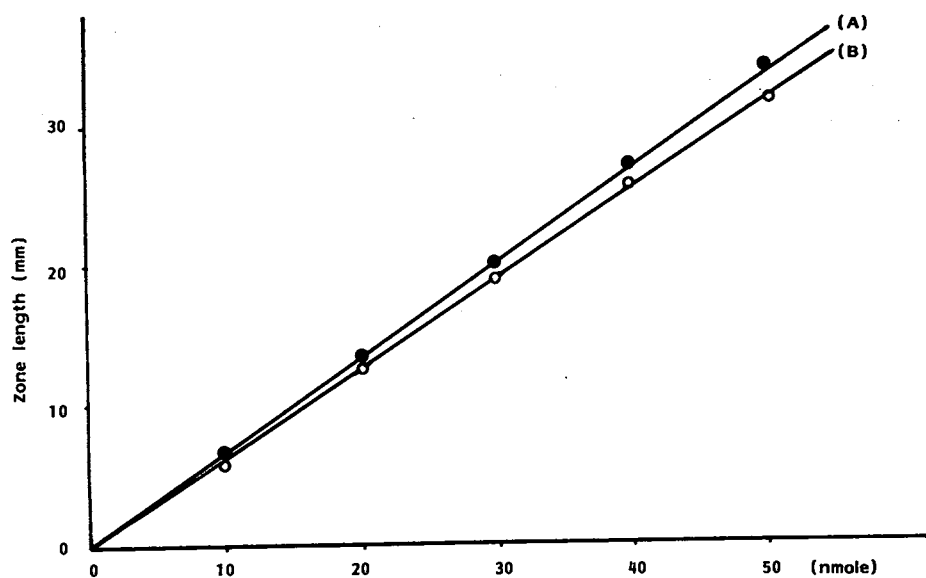


Fig.2. Standard curves of authentic spermine(A) and spermine obtained after treatment of Diaion SK-1(B). Analytical conditions as in Fig.1.

Fig. 1

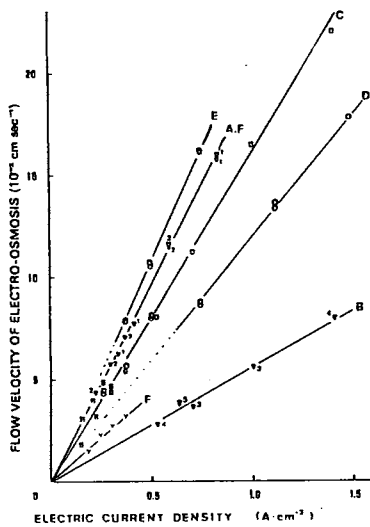
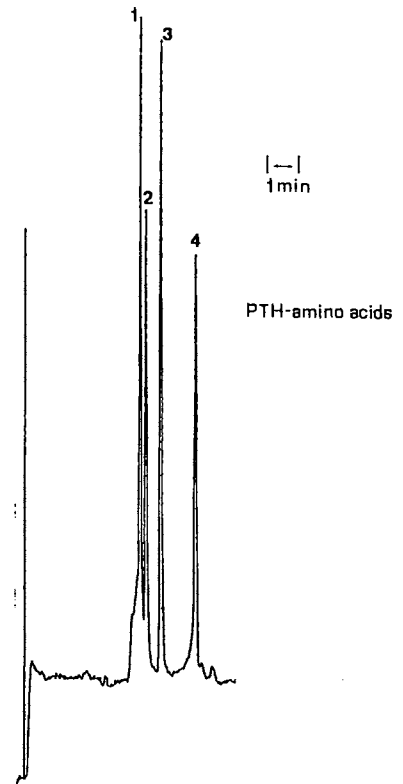


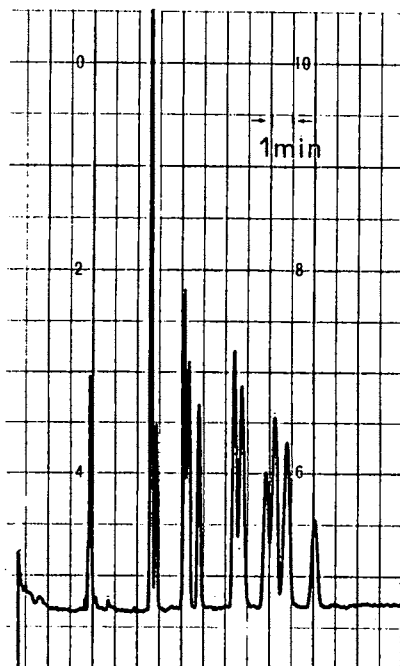
Fig. The relationship between electro-osmotic flow and electric current density. A and B, Pyrex glass capillaries (∇) of 88 (1), 208 (2), 60 (3), 85 (4) and 200 μ m I.D. (5); C E, fused-silica capillaries ($\circ$) with 195, 92 and 72 μ m, I.D., respectively; F, FEP with 323 (∇) and 500 μ m I.D. (2); C also shows ($\square$ and $\square$) combined tubings of Pyrex glass and fused-silica capillary, 85 and 195 μ m I.D. ($\square$) and 208 and 195 μ m I.D. ($\square$), respectively. The solution was 0.02 M phosphate buffer, pH 7, with 0.5% ethylene glycol, except in the case of B, where it was 0.05 M Na_2HPO_4 . Solutes were benzene or pyridine.

Fig. 2

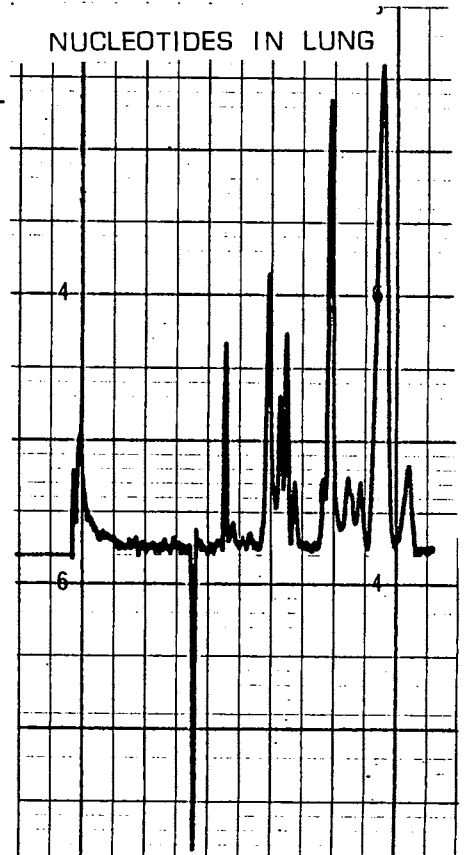


アデニン、グアニン、ウリジンのサイクリック-、モ-、ジ-、トリ-フォスフェート計16成分にピリドキサミンを添加した分離剤である。Fig. 3は pH 7.83で行なう2おり、この場合ジ-、トリ-フォスフェートの分離に適しており、これはほぼ完全分離している。サイクリック-、モ-ホスフェートの分離はもう少しアルカリ側が適当になる。

Fig. 3 Fig. 4



Standard Nucleotides



① T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa, J. Chromatogr. 264 (1983) 385.

② T. Tsuda, G. Nakagawa, M. Sato, K. Yagi, submitted for publication.

③ 津田, 源也, 高木, 佐竹, 第56回日本生化学会大会, 9月28日~10月2日, 1983, 福岡

I. 定量および P_U , R_E 値の測定

(城西大学理学部化学科)

小林 英三郎

細管等速電気泳動を用いた分析では、試料の先行イオンに対する電位こう配比 (R_E 値) または先行、終末イオンの各電位こう配値に対する相対値であるポテンシャルユニット (P_U 値) が定性指標として使われている。広川、木曾らは R_E 値を指標とし広範囲にわたる物質検索が可能である事を示している¹⁾。一方、宮崎、加藤らが定義した P_U 値²⁾ は、同一分析条件であれば、変動しやすい電位こう配値が補償されており、再現性の高い指標となる。両指標は次式に示されるように、先行 (P_{GL})、終末 (P_{GT}) および試料 (P_{GS}) の各電位こう配値 (P_G 値) より得られる。これら指標を使い試料成分の同定を行なうた

$$R_E = P_{GS} / P_{GL}, \quad P_U = (P_{GS} - P_{GL}) / (P_{GT} - P_{GL})$$

めには、 R_E 値、 P_U 値 いずれの場合も P_G 値を正確に測定する事が必要である。

今回は、イソタコフェログラムから得られる P_G 値の高精度自動測定、 R_E 値 P_U 値を使用した検索、同定および各種定量法を可能とする BASIC プログラムによる処理法について報告する。

I. 使用システム 測定およびデータ処理は Fig 1 に示す細管等速電気泳動装置 (IP-2A) とクロマト波形処理装置 (C-R2AX) (いずれも島津製作所製) を使用した。PGD, DIFF 信号は 2 チャンネル同時処理付属装置 (INP-R2A) を用い、それぞれチャンネル 2、および 1 に入力し、各波形はプロッターで記録する。測定データおよび同定データはカセットレコードメモリ (CMT) に保存する。BASIC プログラムは、C-R2AX のユーザー RAM エリア 18 K を使用した。

II. 処理法 ソフトウェアの構成は Fig 2 に示した。Method には i) P_G 値測定法である Average, Top, modified Top 法 ii) R_E , P_U による検索 iii) イソタコフェログラムのプリントの有無 iv) 百分率法、内部標準法、絶対検量線法の指定、Format にはレポートモードを指定する。 P_G 値の読み取りは、Width, Slope, DR-level で処理される DIFF 信号により開始、終了が決定される。分析開始からの不要部分は Lock time で、また終了レベルと時間は Stop time で設定する。分析終了後は R_E 値、 P_U 値を計算しこれに基づき R_E , P_U Scale を書き込んだ後、指定された同定法で ID table にファイルした R_E , P_U 値を検索し定量

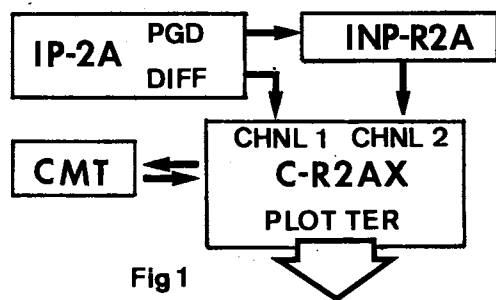


Fig 1

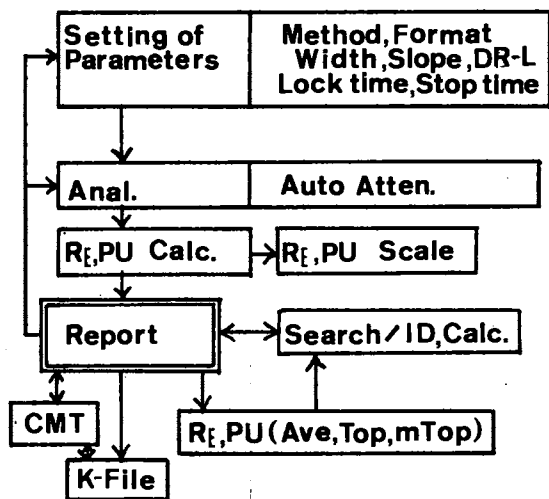
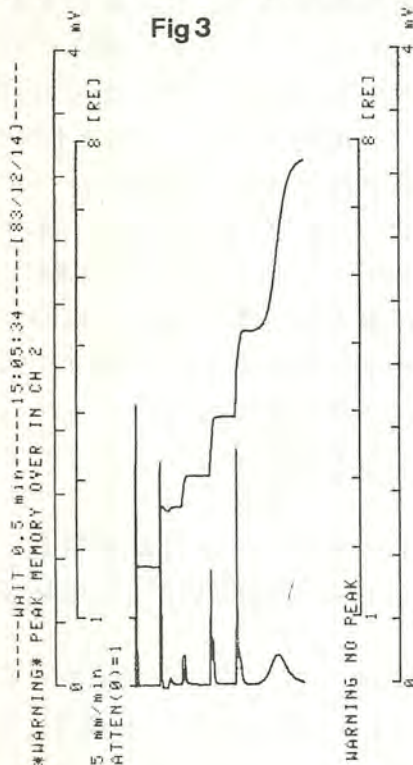


Fig 2

結果をレポートする。再分析するまでは PG 値の読み取り開始、終了、および平均値と定量値は全て保存されており、全ての PG 値処理法、同定法で再検索、再計算が可能である。検索されたデータは K-file に保存が可能であり、生データと共に CMT にメモリしておく事ができる。CMT からのアナログ信号を分析した例を Fig 3 に示す。



```

C-RCAH REPORT NO 12 METHOD 1224
FILE 1
FORMAT 21
[AVE] PL= 427.8 PT= 3314 (Compensate NO=7 RE=5.143)
NO RE sec % IDNO CONC NAME
1 1.746 64.9 17.04 1 2.1534 MALE:
2 2.58 26 6.83 2 0.7592 MALC:
3 2.611 37.6 9.87 3 1.0979 MALC:
4 3.054 72.2 18.96 3 2.5963 LAC:
5 3.623 4.6 1.21 7 0 X
6 3.923 65.8 17.28 4 2.1168 SUCC:
7 5.143 109.7 28.81 5 3.0442 ACET:
8 7.731 --- --- 6 3.0442 CAPR:
--- --- --- --- 11.7678
380.8 100
(ANAL=0:LOCK=1:IDET=2:ZERO ADJ=3)? 9
[ANAL=0:CALIB=1:SEARCH=2:KFILE=3:CMT=4]? 5
Set PARA. or ID then (CONT)
FILE(2)=2
CONT
[ANAL=0:CALIB=1:SEARCH=2:KFILE=3:CMT=4]? 2
AVE=1:TOP=2:WTOP=3? 1
PU=1:RE=2? 1
[AVE] PL= 427.8 PT= 3314 IDNO CONC NAME
NO PU sec % IDNO CONC NAME
1 0.111 64.9 17.04 1 2.1534 MALE:
2 0.235 26 6.83 2 0.7592 MALC:
3 0.239 37.6 9.87 3 1.0979 MALC:
4 0.305 72.2 18.96 3 2.5963 LAC:
5 0.39 4.6 1.21 7 0 X
6 0.434 65.8 17.28 4 2.1168 SUCC:
7 0.615 109.7 28.81 5 3.0442 ACET:
8 1 --- --- 6 3.0442 CAPR:
--- --- --- --- 11.7678
380.8 100

```

Table I

	PL(uV)	1(P 1)	2(P 2)	2(P 3)	3(P 4)	7(P 5)	4(P 6)	5(P 7)	6(P 8)	PT(uV)
RePo NO 1	427.8	1.7404	2.5833	2.6154	3.0588	3.6000	3.9284	5.1356	7.7487	3315 [AVE]
RePo NO 3	427.9	1.7481	2.5871	2.6156	3.0581	3.6272	3.9282	5.1392	7.7472	3315 [AVE]
RePo NO 5	427.9	1.7483	2.5798	2.6151	3.0585	3.6009	3.9287	5.138	7.749	3315.5 [AVE]
RePo NO 7	427.9	1.7478	2.58	2.615	3.0581	3.6271	3.929	5.1418	7.7468	3315 [AVE]
RePo NO 9	427.8	1.7476	2.5856	2.6155	3.0581	3.6194	3.9302	5.1427	7.75	3315.5 [AVE]
Average	427.9	1.748	2.5832	2.6153	3.0583	3.6151	3.9289	5.1395	7.7483	3315.2
S.Deviatn	0.0483	0.0003	0.0032	0.0003	0.0003	0.0133	0.0008	0.0029	0.0013	0.2739
C.Variatn	0.011	0.019	0.126	0.01	0.011	0.369	0.02	0.056	0.017	0.008

Table II

	PL(uV)	1(P 1)	2(P 2)	2(P 3)	3(P 4)	7(P 5)	4(P 6)	5(P 7)	6(P 8)	PT(uV)
RePo NO 2	427.8	0.1109	0.2346	0.2394	0.3051	0.3854	0.4339	0.6128	1	3315 [AVE]
RePo NO 4	427.9	0.1109	0.2352	0.2395	0.305	0.3894	0.434	0.6135	1	3315 [AVE]
RePo NO 6	427.9	0.1109	0.2341	0.2393	0.305	0.3854	0.4339	0.6131	1	3315.5 [AVE]
RePo NO 8	427.9	0.1108	0.2342	0.2394	0.3051	0.3894	0.4341	0.6139	1	3315 [AVE]
RePo NO10	427.8	0.1108	0.2349	0.2393	0.3049	0.3881	0.4341	0.6137	1	3315.5 [AVE]
Average	427.9	0.1109	0.2346	0.2394	0.305	0.3875	0.434	0.6134	1	3315.2
S.Deviatn	0.0483	*	0.0005	*	*	0.002	*	0.0004		0.2739
C.Variatn	0.011	★	0.205	★	★	0.521	★	0.072		0.008

Table I, II は Fig 3 と同様に 5 回分析し K-file でレポートしたものである。過渡状態である PK5 を除いて、RE 値 (Compensate は実行していない)、PU 値 共に良好な測定結果を得た。なおこの測定に際しては DIFB の波形がそれぞれ異なるので Slope プログラムを設定して行った。

* <0.0001
★ <0.001

(1) 広川木曾 オ2回等速電気泳動シンポジウム 講演要旨集 P1 ('82) (2) H. Miyazaki, K. Katoh J. Chromatogr. 119 381 ('76)

II 等分割法による測定

(城西大学理学部化学科)

小林 英三郎

従来の等速電気泳動の解析は、Iの講演で示したように、定性指標の R_E , P_U 値を求めるためにゾーンの PG 値を測定する事、および、定量法においてはゾーン長を求めるために PG 値を時間 t で微分曲線 (dPG/dt) の頂点-頂点間の時間を測定する事が行なわれている。(Fig1) ここで、 PG, t の軸を交換して時間 t を PG で微分すると、 dt/dPG

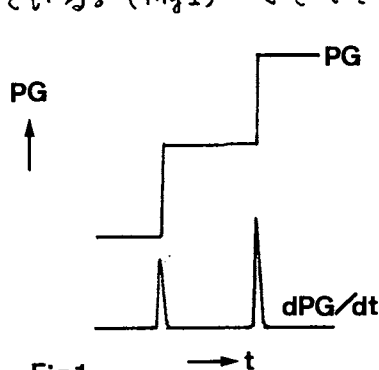


Fig 1

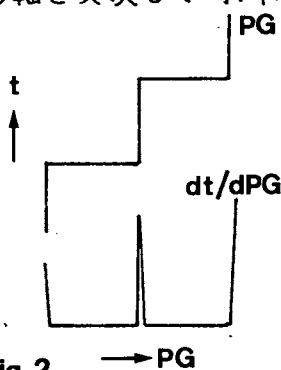


Fig 2

曲線が得られる。(Fig 2)

dt/dPG 曲線は縦軸が t であり、ゾーン長(定量値)横軸が PG 値を示す事になり、最初のピークからの長さは PG_L から PG_S の ΔPG 値となる。

この変換結果は、ガスクロマトグラム、液体クロマトグラム等と比較すると t は物質濃度、

PG は保持時間に相当し、イソタコフェログラムをクロマトグラム一般的解析法で理解する事ができる可能性を示すものである。

本報告は dt/dPG 曲線を用いる「 PG 微分法」によるイソタコフェログラムの解析の可能性を提示し、既存機種を使用した検討結果と、新たなハードウェアの開発への提言をするものである。

I. 使用システム 講演Iの Fig 1 で示したシステムのうち IMP-R2Aをはずし、さらに PGD 信号をチャンネル1に入力した。DIFF 信号は用いない。

II. 処理法 1) PG 値の分割長(ΔPG)を設定し $PG_i + \Delta PG$ に至るまでの時間 t を測定する。本システムではタイマーの最小設定時間が1秒であるので *width* で設定されたデータの取り込み回数をカウントし時間換算した。また測定値を PG 曲線と比較するために、各 ΔPG 毎に PG 値を測定した。

II. 結果 Fig 3bcは3aの PG 曲線を処理したものである。3bは測定値を用い再現した結果であり t 方向へは拡大してある。3cは dt/dPG 曲線であり、ピークのすそが広いものはゾーン形成が不完全

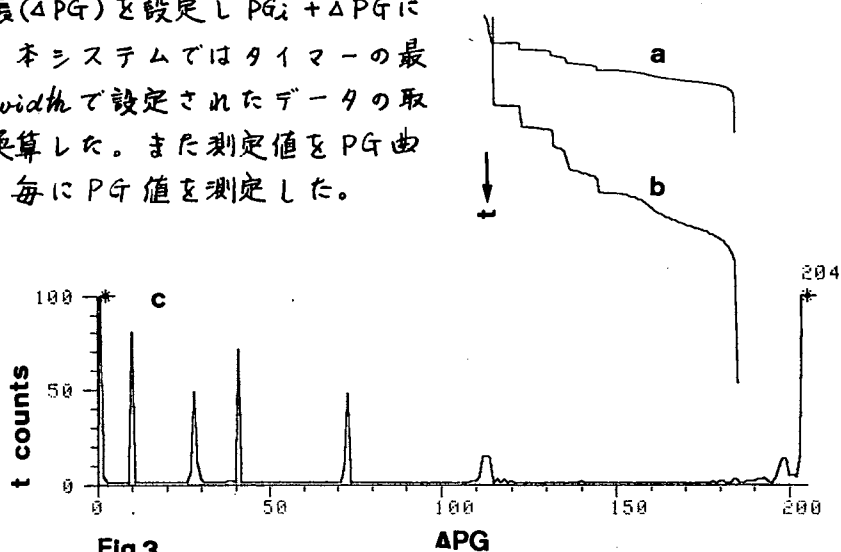


Fig 3

である事を示している。ピークのリーディング、テールリングの状能から、隣接ゾーンとの影響を判断する事ができる。この $d\alpha/dPG$ 曲線により全ての解析を行なうためには若干の問題点がある。3bは3aとかなり良い一致を示しているが3cで

明らかなようにPG値の変化が急激なものは ΔPG カウンタ数が少なくなっている。この事実はFig4でも示されている。この場合はターミナル付近でのノイズとPG値の下降のためオカウが大きく変動している。PG値の下降は ΔPG が負としてソフトで処理可能であるがノイズに反応したオカウは平滑処理をする必要がある。

Fig 5は $d\alpha/dPG$ 曲線プロットを行ないながらピーク検出した例である。ピーク位置の数字は ΔPG カウンタ番号である。ピークの始点終点は検出可能であるので積算する事により全オカウを求め定量値とする事ができる。

Fig 4dはプロッターを停止させて得たものである。4cに比べ若干の実行速度の増加が見られるがこの場合でも理論値の20%程度の ΔPG カウンタしか実行していない。

以上の結果より、完全なPG微分法を実行するためにはBASICではなくアセンブラ言語でプログラムする必要がある。

さらに一歩進めて、アナログ信号をハードで ΔPG 処理すれば、 $d\alpha/dPG$ の単信号だけでイソタコフエログラムの完全な解析ができる事が予測される。

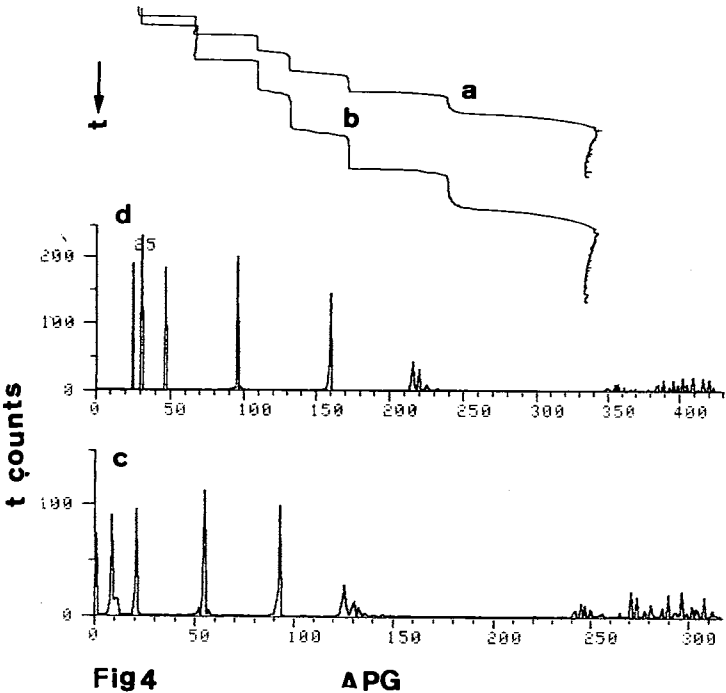


Fig4 ΔPG

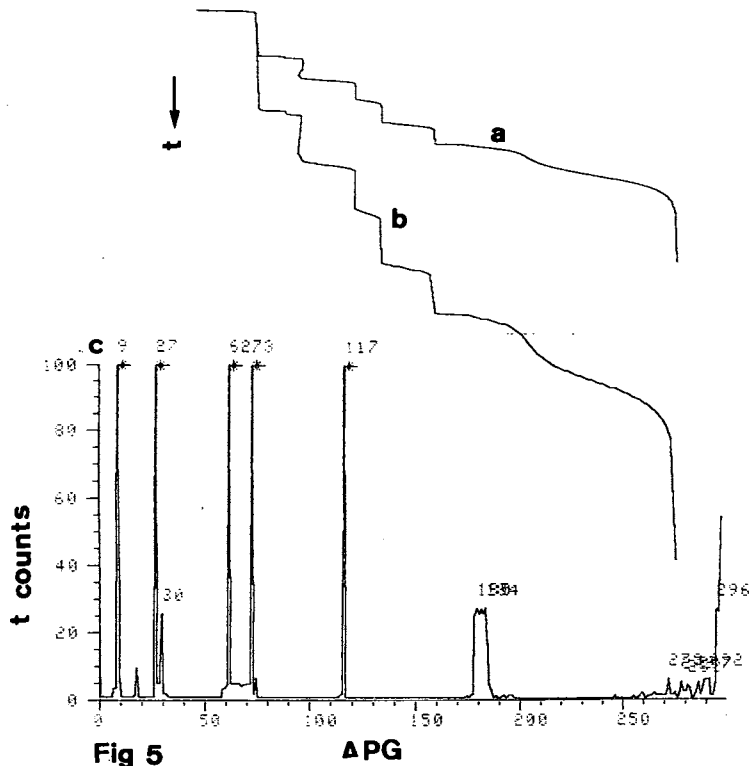


Fig 5 ΔPG

縮合リン酸塩とその分析

(神戸大学教養部化学教室) 本岡 達

縮合リン酸塩には非常に多くの種類があり、ポリリン酸塩、メタリン酸塩およびウルトラリン酸塩の3つに大別できる。これは組成上および構造上から特徴づけられる。

まず、組成上から分類すると、図1のように三成分系を示すと、 $\square$ D E F がポリリン酸(塩)(オルトを含む)領域、 $\overline{DE}$ がメタリン酸(塩)領域、 $\triangle A$ D E がウルトラリン酸(塩)領域である。モル比 $R = (M_2O + H_2O) / P_2O_5$ を示すと、 $1 < R \leq 3$ がポリリン酸(塩)、 $R = 1$ がメタリン酸(塩)、 $R < 1$ がウルトラリン酸(塩)である。

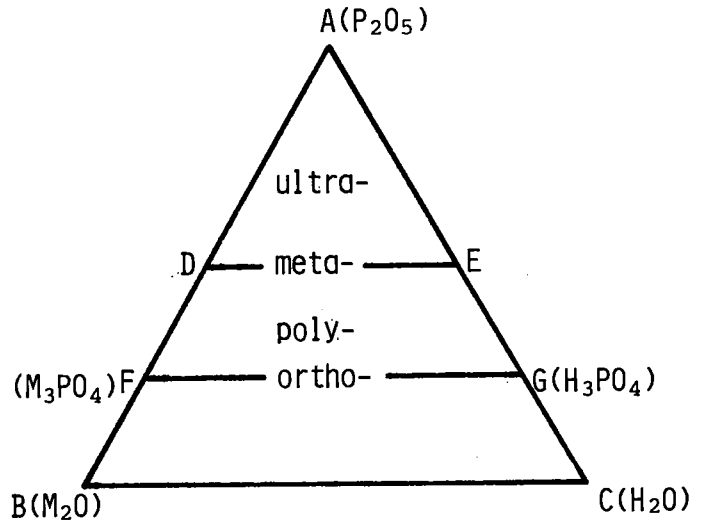
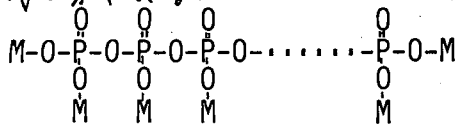


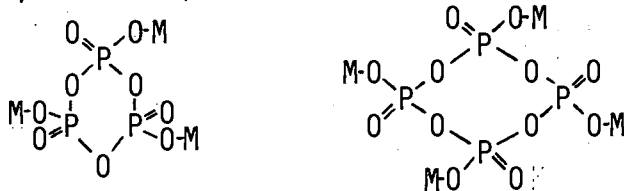
Fig. 1 P_2O_5 - M_2O - H_2O system

一方、構造上からは、ポリリン酸塩は下のような鎖状構造で、(1)式の一般式で表される。



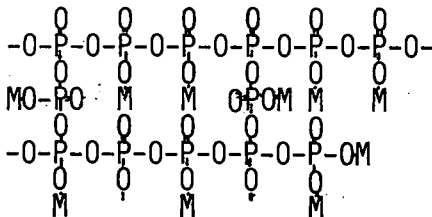
$$M_{n+2}P_nO_{3n+1} \quad (1)$$

メタリン酸塩は下のような環状構造で、一般式は(2)式で表される。



$$M_nP_nO_{3n} = (MPO_3)_n \quad (2)$$

ウルトラリン酸塩は下に示されるように、網目構造になっており、一般式は(3)式で表される。(これは全リン酸塩の一般式でもある)。



$$M_nR P_n O_{n(5+R)/2} \quad (3)$$

以上のように、縮合リン酸塩には多くの種類があるため、次のような略記号が用いられることが多々ある。(低酸化数のリン酸オキシ酸(塩)を含む)。

ポリリン酸(塩): $P_1, P_2, P_3, \dots, P_n$ メタリン酸(塩): $P_{3m}, P_{4m}, P_{5m}, \dots, P_{nm}$
 低酸化数のリン酸オキシ酸(塩): $\overset{1}{P}, \overset{2}{P}, \overset{2}{P}-\overset{4}{P}, \overset{4}{P}-\overset{4}{P}, \overset{3}{P}-\overset{3}{P}, \overset{3}{P}-\overset{5}{P}, \overset{3}{P}-\overset{4}{P}-\overset{4}{P}, \text{etc.}$