

第9回電気泳動シンポジウム (細管・等速電気泳動)

講演要旨集

M. Kobayashi

主 催	日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会
共 催	日本化学会, 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	平成元年 12 月 7 日 (木) 13:00~17:00 平成元年 12 月 8 日 (金) 9:00~16:15
会 場	専修大学 神田校舎 東京都千代田区神田神保町 3-8

ELECTROPHORESIS SYMPOSIUM

第9回 電気泳動シンポジウム (細管・等速電気泳動)

講演要旨集

主 催 日本分析化学会電気泳動分析研究懇談会
共 催 日本化学会，電気泳動学会，日本薬学会，
日本生化学会，日本農芸化学会

第9回 電気泳動シンポジウム(細管・等速電気泳動)

プログラム

第1日目 12月7日(木)

13:00-

座長 藤下 修 (九州大医)

- | | | |
|---|------|---------------------|
| 1. PG微分法による等速電気泳動図の解析
(4)調製用等電点電気泳動における分離 | 城西大理 | ○小林英三郎・小山るみ
本間久美 |
| 2. 等速電気泳動法における分離過程(3)
走査型UV検出器による4成分系分離過程の解析 | 広島大工 | ○横田泰朗・広川 健
木曾義之 |
| 3. 等速電気泳動法における分離過程(4)
微量成分の分離過程の解析 | 広島大工 | ○広川 健・横田泰朗
木曾義之 |

座長 広川 健 (広島大工)

- | | | |
|---|----------------|--------------------|
| 4. ホスト・ゲストケミストリーを応用した
細管式等速電気泳動法 | 神戸商船大
宇部高専 | ○福士恵一
日色和夫 |
| 5. シクロデキストリン添加ミセル動電クロ
マトグラフィー | 京都大工 | ○宮下陽介・寺部 茂 |
| 6. ミセル動電クロマトグラフィーの生薬分
析への応用
(1)グリチルリチンの定量 | 大阪府公衛研
京都大薬 | ○岩上正蔵・沢辺善之
中川照真 |

15:10-

座長 真鍋 敬 (都立大理)

- | | | |
|------------------------------|-----------------|----------------------------------|
| 7. キャピラリーゾーン電気泳動による単糖
の分析 | 近畿大薬 | ○本田 進・岩瀬重文
能勢明美・牧野明子 |
| 8. キャピラリー電気泳動による同位体の分
離 | 京都大工
京都工繊大繊維 | ○伊勢村次秀・八島利幸
寺部 茂
田中信男・荒木長男 |

座長 本田 進 (近畿大薬)

- | | | |
|--|-------------------|---------------------------------|
| 9. タンパク質のキャピラリーゾーン電気泳
動 | 都立大理
日本パイオ・ラッド | ○泉 友則・山本秀子
真鍋 敬・奥山典生
長堀崇重 |
| 10. 全自動高速液体クロマトグラフィーキャ
ピラリー・電気泳動共役系によるタンパ
ク質の分析法 | 都立大理 | ○山本秀子・真鍋 敬
奥山典生 |

17:00-19:00

懇 親 会

第2日目 12月8日(金)

9:00-

座長 寺部 茂 (京都大工)

11. IP-PIXE法による希土類元素の分析(2) 広島大工 ○胡 建英・広川 健
西山文隆・木曾義之

12. IP-PIXE法によるAl中微量元素の分析 広島大工 ○池田浩美・広川 健
西山文隆・木曾義之

座長 福士恵一 (神戸商船大)

13. IP-PIXE法による海水中微量元素の分析 広島大工 ○中川利久・広川 健
西山文隆・木曾義之

14. 錯形成反応並びに還元反応を利用した金属イオンのキャピラリー等速電気泳動分析 島津製作所 ○日根 隆

15. 無水フタル酸誘導体を用いるアルコール類の誘導体化に関する研究(6) 徳島文理大薬 ○佐藤英生・石井淳一
細管式等速電気泳動法によるパンテノール及びパントテン酸誘導体の分析 香西重忠・赤田良信

11:00-

座長 赤田良信 (徳島文理大薬)

16. プロパルギルグリシン投与ラットの組織及び尿中プロパルギルグリシンの定量 高知医大化 ○溝淵詔子・揚田富子
児玉裕敬

17. 細管式等速電気泳動法によるDNA分析の試み 新潟大医 ○小野政孝・山内春夫
内藤笑美子

座長 山内春男 (新潟大医)

18. 細管式等速電気泳動法による免疫ウサギ血清の観察 専修大法 ○吉田治弘

19. ケラチン蛋白の電気泳動分析による動物毛の種属鑑別 科学警察研究所 ○三宅文太郎
佐藤 元

13:30-

特別講演

座長 児玉裕敬 (高知医大)

細管式等速電気泳動法によるイオン分子量・分子体積の推定の試み 九州大医 ○藤下 修

14:30-

座長 津田淑江 (共立女子短大)

20. 細管式等速電気泳動による冷凍すり身中の水溶性蛋白質の分析 日本大農獣医 ○鈴木公一

21. ニンジンの冷凍処理が硬さと組織形態の変化及びリンゴ酸の煮汁への流出に及ぼす影響について 広島大・学校教育 ○田村咲江

15:30-

座長 小林英三郎 (城西大理)

22. 細管式等速電気泳動法によるカット野菜(キャベツ)中のアスコルビン酸の定量 共立女短大 ○津田淑江

23. 細管式等速電気泳動によるアントラキノン系植物生薬成分の分離・分析及びその生薬中Sennosideの検出及び定量への応用 杏林大保健 ○平岡 厚・三浦勇夫

THE 9TH ELECTROPHORESIS SYMPOSIUM

7-8, December, 1989 TOKYO JAPAN

Organizer: Japan Discussion Group of Electrophoresis, The Japan Society for Analytical Chemistry

Program

Dec.7 Afternoon (13:00)

- | | | |
|--|---|--|
| 1) Analysis of isotachopherogram by PG differentiation. (4)
Separation on preparative isoelectrofocusing | H. Kobayashi
R. Koyama
H. Honma | Department of Chemistry,
Faculty of Science,
Josai University |
| 2) Separation process of isotachophoresis (3)
Analysis of the separation process of four components system using UV-scanning detector | Y. Yokota
T. Hirokawa
Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry,
Faculty of Engineering,
Hiroshima University |
| 3) Separation process of isotachophoresis (4)
Analysis of the separation process of minor components | T. Hirokawa
Y. Yokota
Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry,
Faculty of Engineering,
Hiroshima University |
| 4) Application of host-guest chemistry to capillary isotachophoresis | K. Fukushi

K. Hiiro* | Research Institute for Marine
Cargo Transportation, Kobe
University of Mercantile Marine
Department of Industrial
Chemistry, Ube Technical
College* |
| 5) Separation of hydrophobic compounds by cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography | Y. Miyashita
S. Terabe | Faculty of Engineering,
Kyoto University |
| 6) Micellar electrokinetic chromatography for the analysis of crude drugs
(1) Determination of glycyrrhizin | M. Iwagami
Y. Sawabe
T. Nakagawa* | Osaka Prefectural Institute of
Public Health
Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kyoto University* |
| 7) Analysis of monosaccharides by capillary zone electrophoresis | S. Honda,
S. Iwase, A. Nose
A. Makino | Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Kinki University |
| 8) Isotopic separation by capillary electrophoresis | T. Isemaru
T. Yashima
S. Terabe
N. Nakata*
T. Araki* | Faculty of Engineering, Kyoto
University

Faculty of Textile Science
Kyoto Institute of Technology* |
| 9) Capillary zone electrophoresis of proteins | T. Izumi,
T. Nagahori*
H. Yamamoto
T. Manabe
T. Okuyama | Department of Chemistry,
Faculty of Science, Tokyo
Metropolitan University
Nippon Bio-Rad Laboratories* |
| 10) Hyphenated system of high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for analysis of complex protein mixtures | H. Yamamoto
T. Manabe
T. Okuyama | Department of Chemistry,
Faculty of Science, Tokyo
Metropolitan University |

Dec. 8 Morning (9:00)

- | | | |
|--|---|---|
| 11) Analysis of rare earth elements in misch metal by IP-PIXE method | H. Jian-Ying
Y. Yokota
F. Nishiyama
Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry,
Faculty of Engineering,
Hiroshima University |
| 12) Analysis of trace elements in Al by IP-PIXE method | H. Ikeda
T. Hirokawa
F. Nishiyama
Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry,
Faculty of Engineering,
Hiroshima University |
| 13) Analysis of trace elements in sea water by IP-PIXE method | T. Nakagawa
T. Hirokawa
F. Nishiyama
Y. Kiso | Applied Physics and Chemistry,
Faculty of Engineering,
Hiroshima University |
| 14) Analysis of metal ions by using complex and reducing reaction in capillary isotachopheresis | T. Hine | Analytical Applications
Department, Shimadzu Corp. |
| 15) Studied on derivatization of alcohols by phthalic anhydride derivatives (VI). Determination of panthenol and pantothenic acid phthalates by capillary isotachopheresis | H. Satoh
J. Ishii
S. Kouzai
Y. Akada | Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Tokushima Bunri
University |
| 16) Determination of propargylglycine in various tissues and urine of propargylglycine treated rats | N. Mizobuchi
T. Ageta
H. Kodama | Department of Chemistry,
Kochi Medical School |
| 17) Analysis of DNA with capillary isotachopheresis | M. Ono
H. Yamanouchi
E. Naitoh | Department of Legal Medicine,
Niigata University School of
Medicine |
| 18) Analytical observation of rabbit immune sera by capillary isotachopheresis | H. Yoshida | Laboratory of Physiology
Sensyu University |
| 19) Species identification of animal hairs by electrophoretic analysis of hair proteins | B. Miyake
H. Satoh | National Research Institute of
Police Science |

Dec. 8 Afternoon (13:30)**SPECIAL LECTURE**

- | | | |
|--|------------------------|--|
| Estimation of the molecular weight, molecular volume of ions by isotachopheresis | O. Fujishita | Department of Hospital
Pharmacy, Kyushu University
Hospital |
| 20) Determination of water-soluble proteins in frozen surimi by capillary isotachopheresis | K. Suzuki | College of Agriculture &
Veterinary Medicine, Nihon
University |
| 21) Effects of freezing on firmness and morphological features of carrot and on outflow of malic acid into cooking media | S. Tamura | Faculty of School Education,
Hiroshima University |
| 22) Determination of ascorbic acid in coleslaw by isotachopheresis | T. Tsuda | Kyouritsu Women's University |
| 23) Capillary-isotachopheretic analysis of anthraquinolic plant constituents and its application to detection and determination of sennosides in the crude drugs | A. Hiraoka
I. Miura | Kyorin University School of
Health Sciences |

1 PG 微分法による等速電気泳動図の解析

(4) 調製用等電点電気泳動における分離

城西大学・理・化 ○小林 英三郎・小山 るみ・本間 久美

はじめに

タンパク質を等電点電気泳動の原理を用いて大量に精製するには、従来はカラムを用いた方法が多用されているが、垂直に立てたカラム内で等電点に達したサンプルが沈澱し形成されたゾーンを乱す場合がある。最近、等電点で沈澱を起こしても他のゾーンに影響を与えにくいようにすること、および蔗糖などで密度勾配を形成させなくてもすむ調整用の等電点電気泳動装置として隔壁を装備した水平カラムを回転しながら電気泳動を行うものが発売されている。この装置の場合でも従来行われている等電点電気泳動と同様にキャリアアンフォライトを用い pH 勾配を形成させてタンパク質の等電点の差による分離を行っている。

今回、我々は上記装置によって形成された分画したものに付いて、細管式等速電気泳動 (CITP) を用い分析し、構成される両性電解質の分析することを目的とした。

装置

調製用等電点電気泳動装置 : BIO-RAD 製 ROTOFOR CELL
精密安定電源装置 : アトー社製 コンスタパワー 3500
IIP 分析装置 : 島津細管式電気泳動分析装置 1P-2A

方法

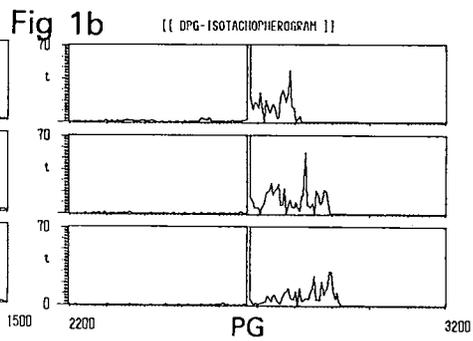
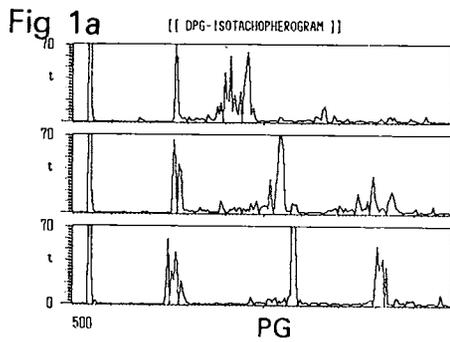
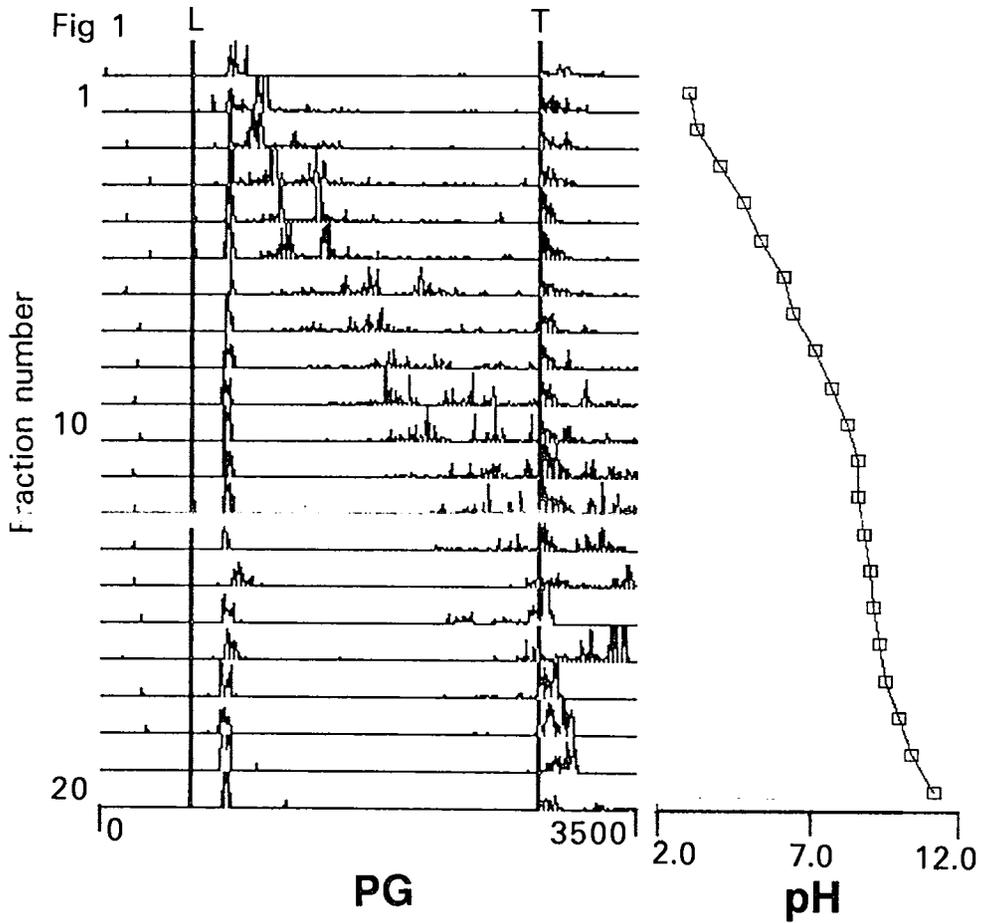
キャリアアンフォライト : Sepaline pH 3.5-10 2%
Ampholine pH 2.5-4.5 2%
pH 9-11 2%
total 40 ml
泳動条件 (IEF) : 12 W 定電力 240 min
(CITP) : Leading 5mM HCl, 2-AMP (pH 9.0)
: Terminating 50 mM Arginine
: 1st 150 uA (10 min) 2nd 50 uA
: Precolumn 1.0*80, Analytical column 0.5*300

結果

方法に示したキャリアアンフォライト 40 ml を定電力 (12 W) で 240 min 泳動を行い 20 分画した。各分画の pH は Fig 1 の右に示したように使用したキャリアアンフォライトから予想される pH 領域 (2~11) で勾配を示した。この各分画の 2 倍希釈したもの 5 u1 を CITP により分析した結果を同図の左に DPG ISOTACHOFEROGAM として表してある。最上段は CITP の BUFFER によるブランクであり、陽極側から陰極側へ分画番号を示してある。第一分画は陽極の隔壁イオン膜に接しているチャンバーであるので微量の燐酸イオンが含まれている。陰極側から陽極側に進むにつれて低い PG 値から高い PG 値を示す成分で構成されていることがわかる。この結果は昨年報告した¹⁾ゲルを用いた IEF で得られた CITP 分析と同様であったが、今回はゲルからの抽出操作は不用であったのでより詳細な分析結果を得たものと考えられる。また、Fig 1a には酸性領域の分画 2 から

4まで Fig 1b には塩基性領域の分画 17 から 19 までの DPG ISOTACHOPHEROGRAM を拡大したものを示した。酸性領域のものは比較的よい分離を示していたが、塩基性領域のものはここで用いた CITP の条件では分離が不十分であったと思われる。また、各分画は多成分から構成されていることからここで示される pH はこれらの成分に基づくものと考えられるが、分画されたものを再 IEF することにより詳細な分析が出来ると考え目下再分画、再分析を継続中である。

1) 小林英三郎 第 8 回電気泳動シンポジウム (1988)



PTFE → シリカ 0.5 0.7 320mm 16000 / 3 位置 DrXu
 100mm/sec 4分 T_vXm + D_vXu / S_s
 5333 data 7.025 sec / 1 rev
 sampling rate 0.06 μm / data

2

等速電気泳動の分離過程 (3)
 走査型UV検出器による4成分系分離過程の解析

(広島大工) ○横田泰朗、広川健、木曾義之

1. 演者らは第8回電気泳動シンポジウムに於て走査型UVゾーン検出器の製作と解析例について報告した。本装置は、UV光源と検出器を一体化したユニットをパルスモーター駆動のリニアヘッドに取り付け、分離管上を走査するものである。昨年時点ではPTFE製分離管を使用し、SMP (SPADNS, モノクロ酢酸, ピクリン酸) 3成分系の解析を行った。検出器固定型に比べ、走査型の場合S/N比が低下しやすい。従来はスペクトルを差分処理してこれに対処していたが、より多成分系の解析には、さらに高感度化、ローノイズ化することが必要である。今回我々はこの問題を解決するため、分離管に石英チューブを採用し高感度、高S/N比を実現した。その結果スペクトルの差分処理が不用になり、直接解析が可能となった。また、データ取り込み法の最適化を行い、精度及び分解能を向上させた。このような改良により、今回初めて4成分系の分離過程を測定する事ができ、MSPRモデルによるシミュレーションの評価が可能になった。

2. 使用した石英チューブは、ガスクロ工業製 AG83530 (0.66mm O.D. × 0.53mm I.D.) である。この製品は、ポリイミドコーティングが施されているので、皮膜をガスバーナーで焼いて除去後、PTFE管 (1.0 × 0.5) を介して接続した。石英チューブの採用により、PTFE管に比べ感度は2~3倍向上、S/N比はSPADNSで100以上となった。走査距離は320mmで、このときパルスモーターには16000パルスが転送される (0.02mm/pulse)。このパルス3個おきに5333データ取り込む事で、従来のソフトウェアの実行速度に依存したサンプリングに比べ、サンプリングの精度が向上した。ゾーン長の分解能は0.06mmである。

実験には、リーディング液として5mM HCl (pH=3.6, β-アラニン)、ターミナル液に10mMカブロン酸を使用した。試料としては、SMP系に2,4-ジヒドロキシ安息香酸 (以下、Dと略す。) を加えたSMPD 4成分系を用いた。

3. シミュレーションによると、SMPD (1:1:1:1) 4成分系の分離ダイアグラムは、図-1のようになると推測される。図中S, M, P, Dは各成分の単独ゾーン、SM, MP, ... はそれらの混合ゾーンである。そこで、S:M:P:D = 1:1:1:1 (各25nmol/10μl), 2:1:1:1 (40, 20, 20, 20nmol/10μl), 5:1:1:1 (62.5, 12.5, 12.5, 12.5nmol/10μl) の各試料について分離過程を追跡し解析を行った。図-2に得られた分離過程のフェログラムをL/S界面の位置を揃えて示した。またこれらのフェログラムを解析して得られた分離時間とシミュレーションの結果を表-1に示した。

偏差は20%以下で4成分系においてもこの

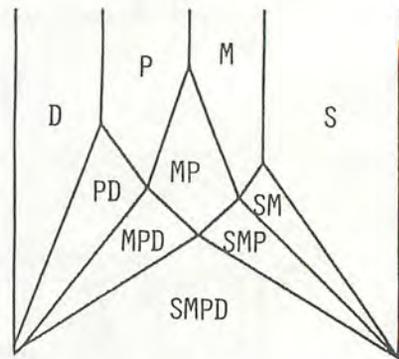


図-1 SMPD 4成分系の分離ダイアグラム

よこたやすろう、ひろかわたけし、きそよしゆき

Sim > obs

シミュレーション法の妥当性が確認された。これらの実験結果及びシミュレーションから、SPADNSの混合比が大きくなるとSM混合ゾーンの解消時間は遅れるが、他の混合ゾーンの解消時間はあまり変化しない事が判った。これは、マトリックス系の等速電気泳動分離について一つの示唆を与えるものである。

分離時間は、試料の注入初期状態に影響される。注入初期状態の挙動を正確に予想する事は、分離過程のシミュレーションに不可欠である。そこで、本装置を用いて解析を試みた。詳細については講演で報告する。

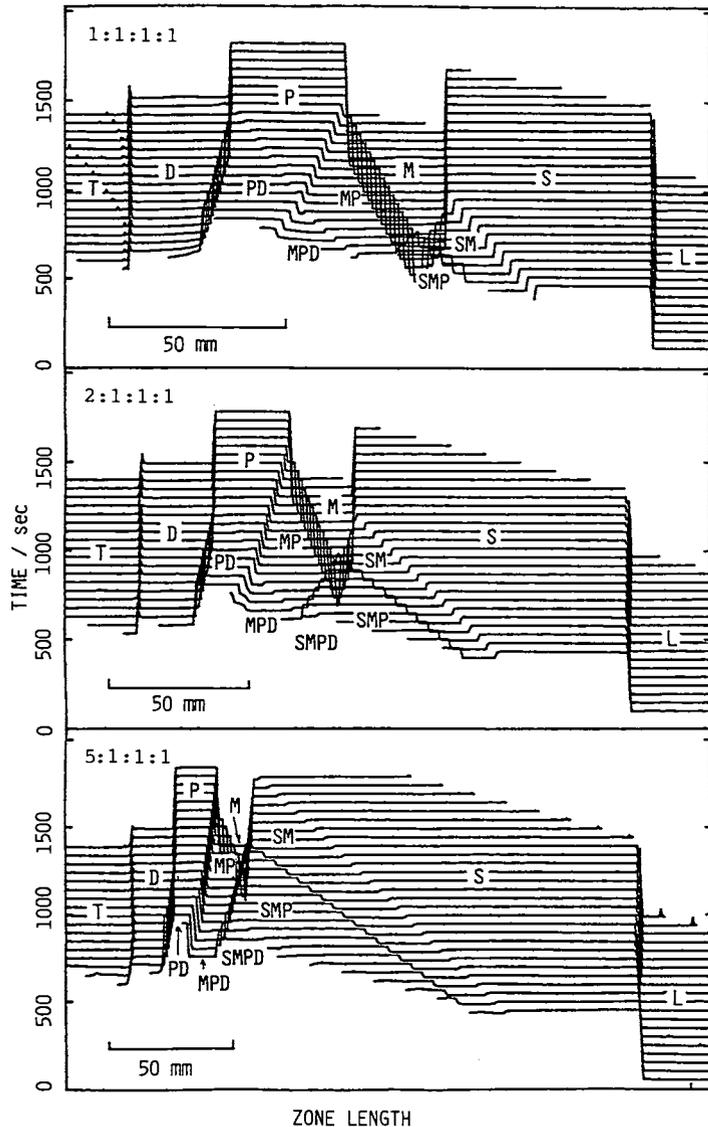


図-2 走査型UV検出器によるSMPD
4成分系のフェログラム

表-1 各混合ゾーンの解消時間

MIXED ZONE	RES. TIME(sec)		DEV. (%)
	obs.	sim.	
1:1:1:1			
SM	1198	1356	13.2
MP	1896	1966	3.7
PD	1469	1560	6.2
SMP	1014	1125	10.9
MPD	1109	1153	4.0
SMPD	--	859	--
2:1:1:1			
SM	1526	1762	15.5
MP	1908	2009	5.3
PD	1548	1583	2.3
SMP	1279	1427	11.6
MPD	1220	1256	3.0
SMPD	--	1064	--
5:1:1:1			
SM	2118	2474	16.8
MP	2049	2244	9.5
PD	1614	1673	3.7
SMP	1715	1932	12.7
MPD	1401	1347	- 3.9
SMPD	1275	1385	8.6

1) 第8回電気泳動シンポジウム要旨集、横田泰朗、広川健、西山文隆、木曾義之(1988)

under estimate)
 の混合ゾーンが解消
 2成分系



1) $i \propto E_L, E_{AB}$
 2) Leading PH
 (成分比)
 m_B/m_A
 E_{AB}

3 等速電気泳動法における分離過程の解析 (4)
 微量成分の分離過程

(広島大工) ○広川健、横田泰朗、木曾義之

1. 等速電気泳動法における微量成分の分離過程を明らかにすることは、実試料の分離最適化にあたって極めて重要である。本法でマトリックス中の微量成分を分析する際、成分の割合が実際よりは低く見積られる事がある。この現象の直接的な原因として、このような試料系で生成する混合ゾーンの諸性質がマトリックス成分のゾーンと酷似しているため、PGやUV検出器によるフェログラム上で定常状態になっているかどうか(混合ゾーンが解消しているかどうか)を確認しにくい事があげられる。これに対して等モルの成分を混合したような試料系の混合ゾーンは定常状態のゾーンとは区別し易く、このような問題は起こりにくい。

演者らは微量成分の分離過程を明らかにするため、いくつかのモデル混合物の分離過程をシミュレートして得られた結果に基づき、分離能、分離時間、検出限界およびフェログラムの解析に関する実際的な問題について検討したので報告する。

2. 分離過程のシミュレーションには演者らの開発したコードSIPSRを使用した。本コードでは6成分までの混合試料の分離過程が解析可能である。シミュレーションの結果、分離時間に対する組成比の影響は2成分系と3成分系以上では全く異なっている事がわかった。

初めに2成分系混合試料を考える。成分をA, B強電解質イオン、移動度を $m_A > m_B$ 、試料のモル数を n_A, n_B とし、定常状態におけるAおよびBの時間に基づくゾーン長を t_A, t_B とし、適当な近似を導入すれば、分離時間は次のような極めて簡単な式で表わすことができる。

$$\left(t_{res, AB}(2) = \frac{m_A + N_R m_B}{m_A - m_B} t_A \right) \quad 1)$$

$$N_R = n_B / n_A \quad 2)$$

$$t_A = \frac{F n_A}{i} (1 + m_0 / m_A) \quad 3)$$

ここに N_R は成分のモル数(n_A, n_B)の比、 m_B はBイオンの絶対移動度、 t_A は定常状態におけるゾーンAの時間に基づくゾーン長、 F はファラデー定数、 i は泳動電流、 m_0 はpHバッファーとして用いられるカウンターイオンの絶対移動度である。

電位勾配 E_{AB} は E_A をもちいて次のように書ける。

$$E_{AB} = \frac{(1 + N_R) m_A}{m_A + N_R m_B} E_A \quad 4)$$

Aが主成分である場合 ($n_A \gg n_B$): $t_{res} = \frac{m_A}{m_A - m_B} t_A \quad 5)$

Bが主成分である場合 ($n_A \ll n_B$): $t_{res} = \frac{m_B}{m_A - m_B} t_B \quad 6)$

以上の式より、試料の総量が同じで移動度の差があまり大きくなければ、2成分系の分離時間は試料成分のモル比にほとんど関係しない事がわかる。一方、混合ゾーンの電位勾配(E_{AB})は E_A と E_B の間の値をとるが、どちらが主成分であるかによって次のように変化する。

$n_A \gg n_B$ の場合 : $E_A \leq E_{AB} < E_B \quad 7)$

$n_A \ll n_B$ の場合 : $E_A < E_{AB} \leq E_B \quad 8)$

分離時間および電位勾配の組成に対する依存性を種々の移動度の場合について表-1に示した。リーディング電解液は10mM HCl/Histidine (pH = 6)で、電流は100 μ A、細管の内径は0.5mmとした。

ひろかわたけし、よこたやすろう、きそよしゆき

混合ゾーン
マトリックス
電位勾配

表-1 2成分系混合ゾーンの電位勾配(E)と分離時間(tres)

$m_A, m_B = A, B$ 成分の絶対移動度 $\times 10^5 / \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$

$n_A, n_B = A, B$ 成分の量/nmol

m_A/m_B	E_A	E_B	$n_A=2, n_B=98$		$n_A=50, n_B=50$		$n_A=98, n_B=2$	
			E_{AB}	tres	E_{AB}	tres	E_{AB}	tres
60/59	69.5	70.8	70.8	8065	70.2	8075	69.6	8120
60/55	69.5	76.1	76.0	1533	72.7	1577	69.7	1625
60/50	69.5	84.1	83.8	719	76.4	765	69.8	810
30/29	143.8	149.1	149.0	5232	146.5	5247	144.0	5293
30/25	143.8	174.6	174.0	964	158.5	1011	144.4	1057
30/20	143.8	221.9	220.0	433	179.0	481	145.1	528

一方3成分以上を含む試料系の分離時間は成分比によりかなり影響を受ける。一例として、6成分系の場合について試料成分の総量が100nmolで(A)等モルの場合、(B)2:1:1:1:1の場合、(C)5:1:1:1:1の場合についてシミュレートした分離過程のダイアグラムを図-1に示した。試料成分の絶対移動度は $60 \cdot 10^{-5}$ 、 $55 \cdot 10^{-5}$ 、 $50 \cdot 10^{-5}$ 、 $45 \cdot 10^{-5}$ 、 $40 \cdot 10^{-5}$ および $35 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ である。図より明らかのように特にAB混合ゾーンの分離時間が大きく増加していること、BC混合ゾーンの分離時間はほとんど変化していないこと、他の混合ゾーンについては分離時間が短くなっていることがわかる。

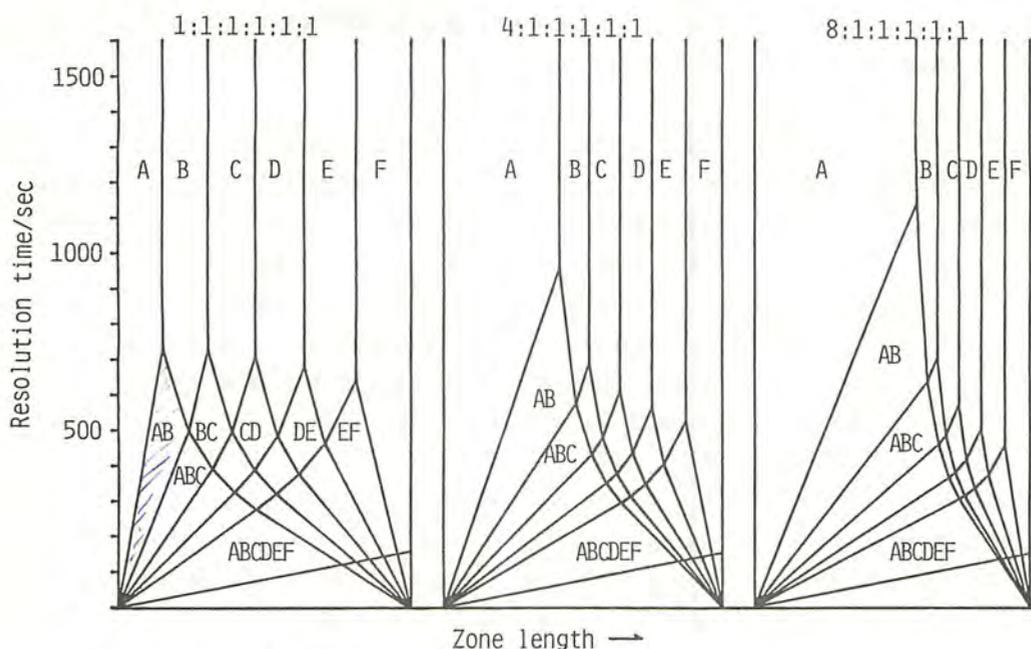


図-1 6成分系の分離過程のダイアグラム(シミュレーション)
(試料総量=100nmol、電流=100 μ A)

$$2 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{V} / \text{sec e}$$

$$pH < pK_a$$

$$pK_a - pH > \sim 1 \text{ は 化学平衡}$$

4 ホスト・ゲストケミストリーを応用した細管式等速電気泳動法

あしひら ちさこ

(神戸商船大・宇部高専) ○ 福士 恵一・日色 和夫

1. 緒言 細管式等速電気泳動法により、移動度が近接しているイオンを分離するために、リーディング液にシクロデキストリン(CD)を添加し、CDと各分析目的イオンとの相互作用の強さの差を利用する試みが以前より行われている。しかし、その分析対象イオンのほとんどは有機イオンであり、無機イオンの分離に用いられた例は少ない¹⁾。一方、亜硝酸・硝酸イオン、シアン酸・チオシアン酸・セレンシアン酸イオン、塩素酸・過塩素酸イオン、ハロゲンイオンなどは、移動度が近接しているため、分離することが難しいと言われている。そこでCDを用い、これらイオンの分離定量を試みた。さらに他の無機陰イオンについてもCDを添加することによるPU値の変化について調べた。また18-crown-6もCDと同様の目的でアルカリ・アルカリ土類金属イオンの分離に用いられている¹⁾。一方、鉛・タリウムイオンなどは通常の条件でも分離可能であるが、比較的移動度が近接しているため、試料導入量が増大した場合には定量性が悪くなることが予想される。そこで18-crown-6を用い、これらイオンの分離定量を試みた。以上の結果について報告する。

2. 実験 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置IP-2A型を使用した。泳動管は内径1.0 mm、長さ10~20 cmのPTFE製チューブに、内径0.5 mm、長さ15 cmのFEP製チューブを接続したものであり、検出器は電位勾配検出器を用いた。陰イオン分析におけるリーディング液は一定量のCDと0.01% Triton X-100とを含む5 mMヒスチジン塩酸塩であり、ターミナル液は10 mM酢酸ナトリウムである。泳動電流は最初の14分間150 μ Aとした後、50 μ Aに切り換えた。また陽イオン分析におけるリーディング液は一定量の18-crown-6と0.01% Triton X-100とを含む5 mM塩酸であり、ターミナル液は塩酸でpH 4.0に調整した10 mMヒスチジンである。泳動電流は最初の7分間200 μ Aとした後、100 μ Aに切り換えた。

3. 結果 リーディング液中の α -CDの濃度を50 mMまで増加し、試料として1 mMの各イオンを含む溶液5 μ lを装置に導入し、各イオンのPU値の変化を調べた。その結果、 α -CDの濃度が増加するにつれて、硝酸・塩素酸イオンのPU値はわずかに増大する傾向があり、チオシアン酸・セレンシアン酸・過塩素酸・ヨウ化物・過ヨウ素酸イオンのPU値はほぼ直線的に増大した。一方、亜硝酸・シアン酸・ヨウ素酸イオンのPU値はほぼ一定であった。なお臭化物イオンについては、 α -CDの濃度を100 mMまで増加しても塩化物イオンから分離することは出来なかった。さらに β -CDあるいは γ -CDの濃度が増加するにつれて、過ヨウ素酸・テトラチオン酸イオンのPU値はほぼ直線的に増大した。これらの結果の一部をFig. 1に示す。これらの結果を用い、各イオンの混合溶液についてほぼ満足できる分離定量結果が得られた。イソタコフログラムの一例をFig. 2に示す。またリーディング液中の18-crown-6の濃度を1.0 mMまで増加し、タリウム・鉛イオンのPU値の変化を調べた。その結果 Fig. 3に示すように、タリウムイオンのPU値は、18-crown-6の濃度が約0.4 mMまではわずかに増大する傾向があり、それ以上ではほぼ一定であった。一方鉛イオンのPU値は、約0.4 mMまではほぼ直線的に増大し、それ以上ではわずかに増大する傾向があった。その

結果、18-crown-6を0.8 mM含むリーディング液を用いた場合には、これを含まないリーディング液を用いた場合と比べて、タリウム・鉛イオンの混合溶液の試料導入量を約2.7倍に増大することが可能となった。これらイオンの分離定量結果をTable 1に示す。

1) M. Tazaki, M. Takagi and K. Ueno, Chem. Lett., 1982, 639.

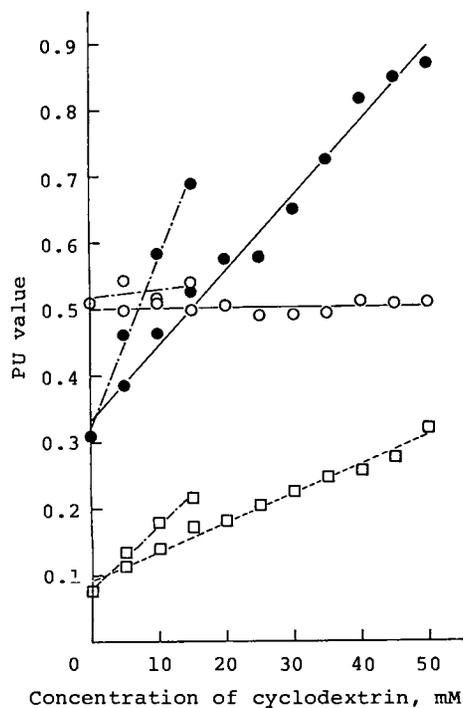


Fig. 1 Effect of CD concentration on the PU values of various anions. O, IO_3^- ; ●, IO_4^- ; □, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$; —, α -CD; ---, β -CD; ···, γ -CD.

Table 1 Analytical results for Tl^+ and Pb^{2+}

Mixture	Added, mM		Found, mM		Error, %	
	Tl^+	Pb^{2+}	Tl^+	Pb^{2+}	Tl^+	Pb^{2+}
1	0.50	3.0	0.42	2.9	-16	-3.3
2	1.0	1.0	1.2	1.0	+20	± 0.0
3	1.0	2.5	1.0	2.5	± 0.0	± 0.0
4	1.5	2.0	1.7	2.0	+13	± 0.0
5	2.0	1.5	2.1	1.5	+5.0	± 0.0
6	2.5	1.0	2.9	1.0	+16	± 0.0
7	3.0	0.50	3.4	0.53	+13	+6.0

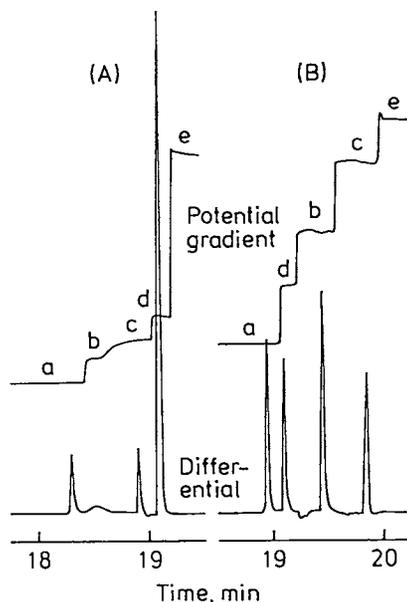


Fig. 2 Isotachopherograms for the separation of OCN^- , NCS^- and NCS^- . (A), without α -CD; (B), 45 mM α -CD; a, Cl^- ; b, NCS^- (1.0 mM); c, NCS^- (1.0 mM); d, OCN^- (1.0 mM); e, CH_3COO^- .

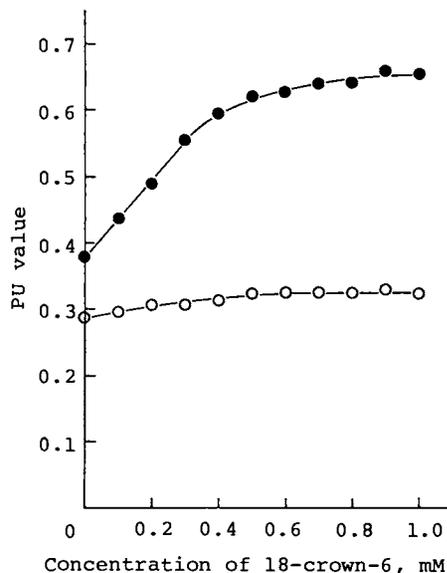


Fig. 3 Effect of 18-crown-6 concentration on the PU values of Tl^+ and Pb^{2+} . O, Tl^+ ; ●, Pb^{2+} .

5 シクロデキストリン添加ミセル動電クロマトグラフィー

(京大・工) ○宮下 陽介 · 寺部 茂

1. はじめに

動電クロマトグラフィー(EKC)とは、キャピラリー電気泳動の実験手法を利用しクロマトグラフィーの原理に基づいて分離を行う分離分析法である。演者らは、これまでシクロデキストリンの分子識別能を動電クロマトグラフィーに利用するためにシクロデキストリンを誘導体化して用いる方法について報告してきた。今回ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)系にシクロデキストリンを誘導体化せずに添加することにより、その分子識別能を利用することを試みたところいくつかの知見を得たので報告する。

2. 実験

装置は、これまで報告してきたものと同様のものを使用した。電気泳動溶液としては、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)とシクロデキストリン(CD)をホウ酸塩緩衝液(pH 8.0)に溶解したものを用いた。試料注入は、落差法によって行い、実験は室温・定電圧で行った。また検出は210nmの紫外吸収を測定することによって行なった。

3. 結果および考察

シクロデキストリン添加ミセル動電クロマトグラフィー(CD・MEKC)系は次の二つの特徴を持つと考えられる。ひとつはSDSの逆相的保持挙動とシクロデキストリンの分子識別能を同時に利用することが出来るということであり、もうひとつは疎水性が大きくミセルに完全に可溶化されてしまうためMEKC系では分離が困難だった試料を分離することができるということである。

この系の分離機構は以下のように考えることができる。電荷を持たないシクロデキストリンは電気浸透流と同じ速度で泳動し、負電荷を持つSDSミセルは電気浸透流と異なる速度で泳動する。シクロデキストリンはその外壁が親水性であるためミセルに取り込まれることはなく、またミセルもその大きさからシクロデキストリンの内部空洞に包接されることはない。よってキャピラリーの一端に注入された試料は、シクロデキストリンに包接されているときは電気浸透流と同じ速度で泳動し、ミセルに取り込まれているときはミセルの電気泳動速度で泳動することになる。したがってこの系ではSDSミセルとシクロデキストリンとの間での分配に基づく分離が可能であることがわかる。

試料として、ダンシルアミノ酸、ポリクロロベンゼン、ジメチルナフタレンなどを用いて実験を行った。通常のキャピラリー電気泳動ではほとんど分離しないダンシルアミノ酸10種がMEKC系では完全に相互分離され、CD・MEKC系では光学分割が可能であっ

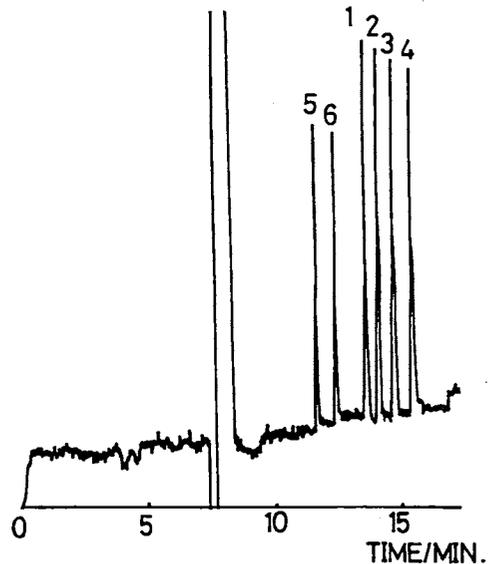


Fig. 1 Separation of Three Enantiomeric Dansyl-Amino acids: 1, DNS-D-Nva; 2, DNS-L-Nva; 3, DNS-D-Nle; 4, DNS-L-Nle; 5, DNS-D-Phe; 6, DNS-L-Phe. Capillary, 700 mm in total length; applied voltage, 20 kV; electrophoretic solution, 30 mM γ -cyclodextrin and 50 mM SDS in borate buffer.

た。その例を図1に示す。この場合、緩衝液にシクロデキストリンを加えただけの系では相互分離、光学分割ともにほとんど出来なかった。また α 、 β 、 γ -シクロデキストリンのうち γ -シクロデキストリンの添加が最も効果的だった。図2(a)はMEKC系によるポリクロロベンゼンの分離クロマトグラムである。この系ではジクロロベンゼン、トリクロロベンゼンの位置異性体はほとんど分離されておらず、テトラクロロベンゼン、ペンタクロロベンゼン、ヘキサクロロベンゼンはミセルの溶出位置と同じところに溶出しておりミセルに完全に可溶化されていることがわかる。このような場合CD-MEKC系で分析するとシクロデキストリンの添加量が増すにつれて試料の容量比は減少し位置異性体間の分離も可能となった。(b)はその一例である。また、ジメチルナフタレンの位置異性体も良好な分離が得られた。以上から疎水性の高い試料を分析する場合本法が有効であることが明らかとなった。

2種類以上の分配機構を同時に効率的に利用出来ることは、系が均一溶液系であるEK Cの長所の一つであるから今後これ以外の組み合わせによるEK C系が開発されることが期待される。

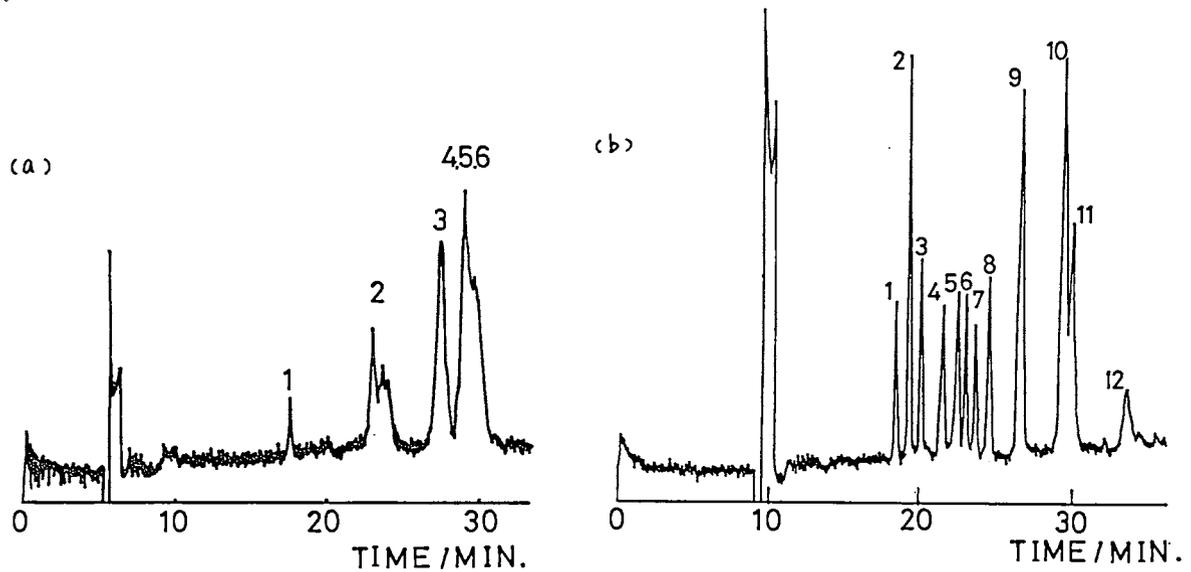


Fig.2 Separation of Chlorobenzenes: (a) 1, chloro; 2, dichloro; 3, trichloro; 4, tetrachloro; 5, pentachloro; 6, hexachloro: capillary tube, 700 mm in total length; applied voltage, 18 kV; electrophoretic solution, 100 mM SDS and 2M urea in 100 mM boric buffer (pH 8.0): (b) 1, 1,2,3,5-tetrachloro; 2, 1,2,3-trichloro; 3, 1,3,5-trichloro; 4, 1,2-dichloro; 5, 1,2,4,5-tetrachloro; 6, chloro; 7, 1,3-dichloro; 8, 1,2,4-trichloro; 9, 1,2,3,4-tetrachloro; 10, pentachloro; 11, 1,4-dichloro; 12, hexachloro: applied voltage, 20 kV; electrophoretic solution, 100 mM SDS, 40 mM γ -CD and 2M urea in 100 mM boric buffer (pH 8.0).

6 ミセル動電クロマトグラフィーの生薬分析への応用

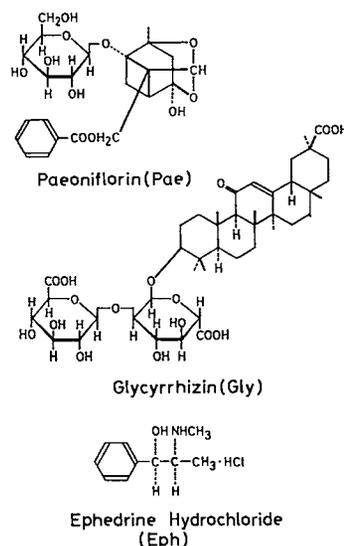
1. グリチルリチンの定量

(大阪府公衛研) ○ ^{いわみ せいぞう} 岩上正蔵・^{さわ よしゆき} 沢辺善之 (京大・薬) ^{なかがわ てるみち} 中川照眞

緒言

生薬は天然物であるために、同一の生薬であっても自然条件や産地などによって成分組成や含有量が異なってくる。また、製剤化に際して成分の分解、変化などが生じることもある。しかし、医薬品として常に安定した薬効が保証されるためには、成分の種類と含有量ができるだけ一定に保たれるように品質管理されていることが重要である。有効成分の種類と含有量がすべて判明しているような生薬は一つとしてない現状では、個々の生薬についてはそれぞれ特定の成分の分析を行ない、また医療用漢方エキス製剤については処方生薬中の二つ以上の指標成分を分析することによって品質管理の指標としている。漢方エキス製剤中の指標成分の分析については、一つの処方中の指標成分の同時定量法か、あるいは一つの指標成分について、その生薬を含むできるだけ多くの処方に適用できるような測定法が品質管理業務を行なう上で有用である。これらの成分分析には、共存する多くの成分との相互分離が可能な高分離能をもつ分析法が要求される。

一方、寺部らによって開発された動電クロマトグラフィーは、イオン性界面活性剤ミセル等のキャリアーへの試料物質の分配現象と、毛細管ゾーン電気泳動法とを組み合わせた新しいタイプの分離分析法であり、短時間で高い理論段数が得られるため、生薬のような多成分系の分析には最適であると考えられる。今回我々は、ミセル動電クロマトグラフィーを用いて甘草および甘草を含有する漢方エキス製剤中のグリチルリチンの定量を試みると共に、葛根湯中のペオニフロリン、エフェドリンの溶出挙動についても合わせて検討した。



実験

高圧直流電源には松定プレジジョン・ディバイセズのHSR-25Pを用いた。分離用毛細管には、内径50 μ m、長さ700mmの内面無処理のフューズシリカ管(信和化工)を使用し、検出は正極側から500mmのところ、被覆樹脂を取り除いてオンカラムで行なった。検出器には島津SPD-6Aをセルブロックを改造して用いた。支持電解質溶液としては0.02M四ホウ酸ナトリウム溶液および0.02Mリン酸二水素ナトリウム溶液を混合し、pH7~9の緩衝液を調製して用いた。この緩衝液中にイオン性界面活性剤として硫酸ドデシルナトリウム(SDS)を濃度を変えて溶解した。試料の導入は毛細管の正極側に落差法を用いて注入する方法(落差5cm、15秒間)で行なった。試料(甘草または甘草含有漢方エキス製剤)の調製は、その一定量を取り、50%メタノールで振とう、超音波抽出したものをを用いた。内標準物質にはp-ヒドロキシ安息香酸プロピルを使用した。実験はすべて室温で行ない、印加電圧は12.5kV一定とした。

結果

① グリチルリチン、ペオニフロリン、エフェドリンの溶出挙動 これら3成分(標準品)の溶出挙動を Fig.1,2 に示す。緩衝液のpHが7から9へ変化するにつれて、また緩衝

液中の SDS 濃度が増加するにつれて、電流値は少しずつ増加したが、溶液中に SDS を含む場合 (Fig.2) には、SDS 濃度の増加につれて移動速度はともに減少した。このことは、これら 3 成分が SDS に可溶化されることを示している。可溶化の程度はエフェドリンで著しかったのに対し、グリチルリチンではわずかであった。これはグリチルリチンの 3 個のカルボキシル基がこの条件下ではすべて解離しているためと考えられる。これら 3 成分と葛根湯中の共存成分との分離の例 (pH 7, SDS 0mM) を Fig.3 に示す。グリチルリチン、ペオニフロリンについては共存成分と重なっており、pH を 8、9 と変化させてもペオニフロリンは共存成分と重なったままで全く分離されなかった。一方、グリチルリチンは pH 9 ではピークもシャープになり、分離もかなり改善された。さらに pH 9 の溶液に SDS を添加した場合、SDS 濃度 25 mM ではペオニフロリンと葛根湯中の共存成分との分離がほぼ可能となったが、SDS 濃度がそれ以上高くなると、共存成分と再び重なり合った。また、エフェドリンは SDS の添加により可溶化されて溶出が大幅に遅れ、共存成分のピークと重なり合ったままであった。グリチルリチンと共存成分との分離は SDS 濃度の増加につれて改良された。この結果、今回実験した条件下では葛根湯中のグリチルリチン、ペオニフロリン、エフェドリンの同時定量はできなかったものの、溶液中の SDS 濃度と検出波長を選択することによって、これら 3 成分を個別に分析することが可能であることがわかった。そこで今回は、まずグリチルリチンの定量を行った。

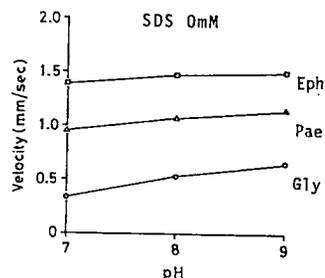


Fig.1 Relationship between pH of Supporting Electrolyte Solution and Migration Velocity

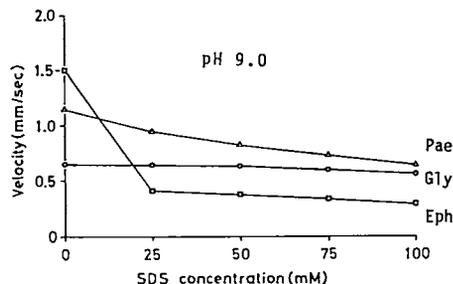


Fig.2 Effect of SDS Concentration on Migration Velocity

② 漢方エキス製剤中のグリチルリチンの定量 グリチルリチンと葛根湯中の共存成分との分離状態を Fig.4 に示す。この条件下において葛根湯をはじめ計 6 種の漢方エキス製剤 (同一社製) についてグリチルリチンの分離を検討した結果、いずれの場合にも適用できることがわかった。また、内標準物質として p-ヒドロキシ安息香酸プロピルを用いて検量線を作成したところ、グリチルリチン濃度 50 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲でピーク高さ比、ピーク面積比とも良好な直線性 (相関係数はともに 0.999) が認められた。この条件下で、ピーク高さ比を用いて 6 種の漢方エキス製剤中のグリチルリチンの定量を行ったところ、ほぼ満足すべき結果が得られた。

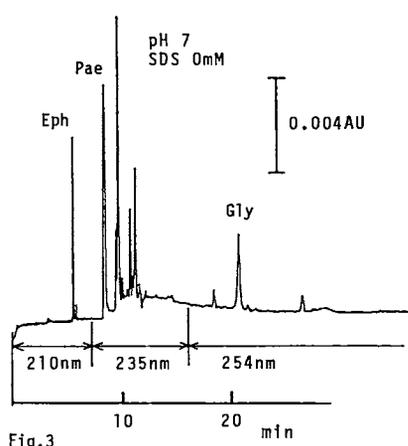


Fig.3

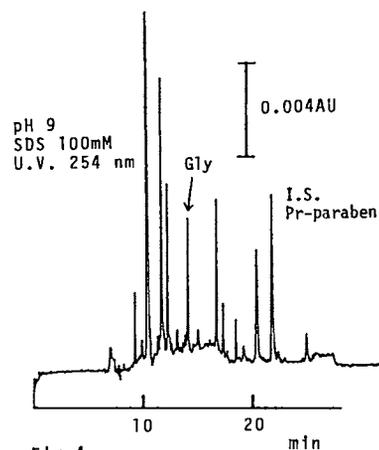


Fig.4

7 キャピラリーゾーン電気泳動による 単糖の分析

(近畿大・薬) 本田 進、岩瀬重文、能勢明美、牧野明子

はじめに

キャピラリーゾーン電気泳動 (Capillary Zone Electrophoresis, CZE) は高い分離能と優れた定量性を特徴とする新しい分離分析法であるが、試料 v のイオン性成分しか分析出来ないという欠点をもっている。これを中性成分にも適用できるようにするには、① キャリアーに界面活性剤を添加してミセルを形成させ、このミセルへの分配を利用する、② キャリアー中に試料成分と速やかに反応してイオンを生成する物質を添加し、生成物の荷電を利用して動的状態で泳動を行う、などが考えられる。本演題においては、② の一例として、ホウ酸塩による陰イオン性錯体形成を利用した単糖の分析について述べる。

方法

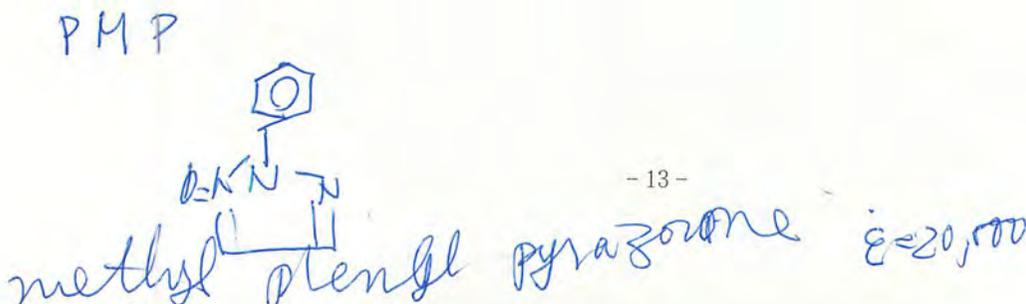
キャピラリーゾーン電気泳動 高圧電源には松定プレジジョン製 HFR-30PI 装置を用い、キャピラリーには Scientific Glass Engineering 製の2種のフューズドシリカ管を使用した。検出は日本分光製 UVIDEC 100-V 型または島津 SPD-6A 型高速液体クロマトグラフィー用紫外検出器のセルブロックを部分改造したものを用いて行った。キャリアーには種々の濃度と pH 値をもつホウ酸緩衝液を用い、試料導入は手動式落差法によった。単糖の標識 還元的ピリジルアミノ化 (PA 化) は Hase らの方法¹ を一部改良した方法² を用いて行い、1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone 化 (PMP 化) は Honda らの方法³ によって行った。

結果

単糖の分離 ホウ酸塩を含むキャリアー中では単糖はホウ酸錯体と平衡状態にあり、錯体のモル分率が高いものほど電気泳動の移動度は大きくなる。単糖の水酸基とホウ酸塩との反応はキャリアーの液性に依存し、その影響の受けやすさは糖種によって異なる。したがって糖種によって錯体のモル分率が変わり、それにともなって移動度に差ができ単糖が分離されることになる。Fig. 1 は 種々の単糖の AP 誘導体についてホウ酸錯体の移動度がどのように pH に依存するかを示したものである。いずれの糖種も pH の上昇とともに移動度が増加し、その増加の割合は糖種ごとに若干異なることが示されている。塩濃度も単糖の分離に若干影響を与えるが、その割合は pH にくらべて小さい。これらの因子について詳細に検討した結果、PA 誘導体については 200 mM ホウ酸緩衝液 (pH 10.5)、PMP 誘導体については 200 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) が最適であることが明らかになった。

Fig. 2 は種々の単糖を PA 誘導体として分析した例を示す。Glc と Man の分離は不完全であったが、その他の天然に存在するほとんどすべての単糖は互いによく分離された。Fig. 3(a) および Fig. 3(b) はそれぞれアルドパントースおよびアルドヘキソースを PMP 誘導体として分析した場合の泳動図を示す。それぞれのグループの異性体はいずれもほぼ完全に分離されている。

単糖の定量 キャピラリーゾーン電気泳動ではオンカラム検出できるため信頼性の高い定量が可能



である。既に演者らがケイ酸誘導体をモデルにした実験で明らかにしたように⁴、 用手落差法においても適切な内部標準を選択することにより再現性の高い分析値が得られた。内部標準としては PA 誘導体では cinnamic acid (CA) が、また PMP 誘導体では amobarbital (AB) が適当であった。この結果に基づいて行った種々の糖質の単糖組成分析ではいずれにおいても再現性の良いデータが得られ、それらの値は高速液体クロマトグラフィーによる分析値と良い相関を示した。

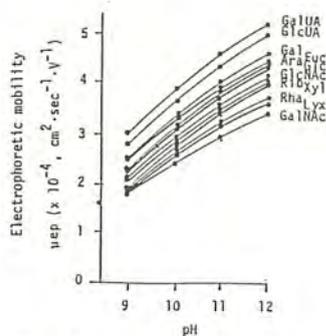


Fig. 1. pH Dependence of electrophoretic mobility.

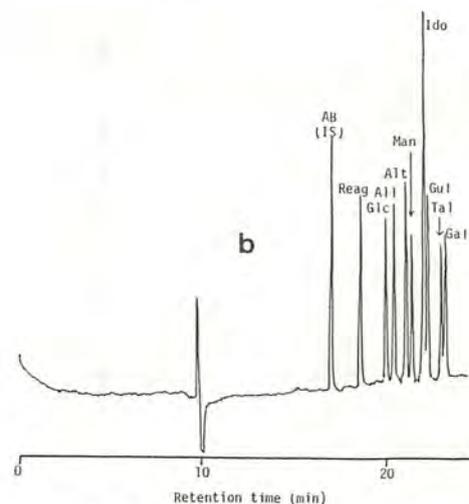
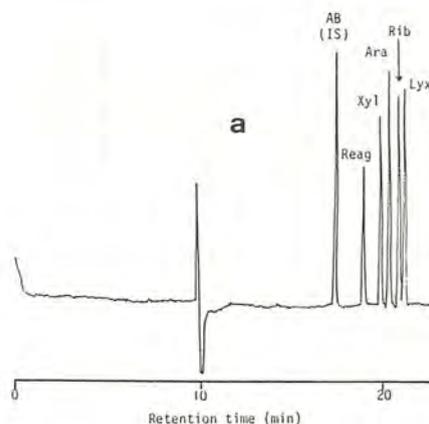


Fig. 3. Analyses of aldopentoses (a) and aldohexoses (b) as borate complexes of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. Capillary, fused silica (50 μ m i.d., 78 cm); carrier, 200 mM borate buffer (pH 9.5); applied voltage, 15 KV; detection, UV 245 nm.

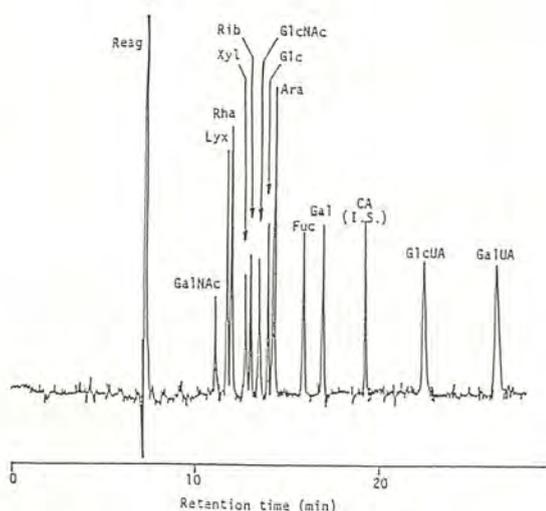


Fig. 2. Analysis of naturally occurring monosaccharides as borate complexes of reductively pyridylaminated derivatives. Capillary, fused silica (50 μ m i.d., 65 cm); carrier, 200 mM borate buffer (pH 10.5); applied voltage, 1b KV; detection, UV 240 nm.

文献

- 1 S. Hase, T. Ikenaka, and Y. Matsushima, *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, 85, 257 (1978).
- 2 S. Honda, S. Iwase, A. Makino, and S. Fujiwara, *Anal. Biochem.*, 176, 72 (1989).
- 3 S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, and J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, 180, 351 (1989).
- 4 S. Fujiwara and S. Honda, *Anal. Chem.*, 58, 1811 (1986).

J. Biochem

85 217 (K79)

NH₂

TAA analysis

8 キヤピラリー電気泳動による同位体の分離

(京大・工) 伊勢村 次秀、八島 利幸、寺部 茂
(京工繊大・織) 田中 信男、荒木 長男

1. 緒言

同位体の分離は、長いカラムまたはリサイクル法を用いる液体クロマトグラフィーでも可能であるが、分離に数時間以上という長時間を要する¹⁾。キャピラリー電気泳動を用いて同位体を迅速分離する試みとして、すでに酸素が同位体である安息香酸について報告した²⁾。今回は試料として、フェノールの酸素に同位体を持つ p-ニトロフェノール、窒素が同位体であるアニリン誘導体およびフタルイミドを採用した。これらの化合物も、¹⁶Oと¹⁸Oまたは¹⁴Nと¹⁵Nの同位体間で解離定数にわずかの差を生じるので、この解離の差が電気泳動においては移動度の差となり分離が可能となる。

2. 理論

これまでに次の式の誘導を報告した²⁾。

$$R_s = \left(\frac{V}{32D} \right)^{1/2} \left(\frac{l}{L} \right)^{1/2} \frac{\Delta\mu_{ep}}{(\bar{\mu}_{ep})^{1/2}} \frac{1}{(1+x)^{1/2}} \quad (1)$$

$$\frac{\Delta\mu_{ep}}{(\bar{\mu}_{ep})^{1/2}} = (\bar{\mu}_{ep}(0))^{1/2} \frac{\Delta\alpha}{\alpha^{1/2}} \quad (2)$$

R_s : 分離度, V : 印加電圧, D : 溶質の拡散定数, l : 検出器までの管長,
 L : 管の全長, $\Delta\mu_{ep}$: 同位体間の電気泳動移動度の差,
 $\bar{\mu}_{ep}$: 溶質の平均電気泳動移動度, x : $\mu_{eo}/\bar{\mu}_{ep}$ (μ_{eo} : 電気浸透移動度),
 $\bar{\mu}_{ep}(0)$: 完全にイオン化した溶質の平均電気泳動移動度, α : 解離度

また、フタルイミドを例にとると、 K_a 値の同位体間の比は、次式から求めた。

$$\frac{{}^{14}K_a}{{}^{15}K_a} = \frac{1}{[H^+]} \left\{ \frac{{}^{14}\mu_{ep}}{{}^{15}\mu_{ep}} ([H^+] + {}^{14}K_a) - {}^{14}K_a \right\} \quad (3)$$

K_a : 解離定数

Table I に各試料の解離定数と同位体間の比、および最適 pH 値を示す。最適 pH 値は、それぞれの K_a 値に対して (2) 式の値を最大にするように計算で求めた pH である。

3. 結果と考察

装置、方法はこれまで報告したものと同様である²⁾。(1)式より、電圧は高いほうが有利なため、装置的に限界と考えられる 40kV を印加した。毛細管は、内径 50 μ m のフューズドシリカ管を用い、有効長の全長に対する比も大きい方が有利なため、全長を長く (~1200mm)、有効長も出来るだけ長くした。

(i) p-ニトロフェノール キヤピラリー電気泳動では、対称形のピークを得るためには、試料の電気泳動移動度と、緩衝液中のアニオンの電気泳動移動度がほぼ等しいことが必要である。リン酸塩緩衝液を用いた場合に、比較的対称なピークを得た。ヒドロキシプロピルセルロ

Table I. The pKa value, Ka ratio of isotopic compounds, and the optimum pH for isotopic separation.

	pKa	K_a^1/K_a^2	pH(opt)
p-O ₂ NC ₆ H ₄ OH	7.149	1.018	6.85
C ₆ H ₅ NH ₂	4.596	1.019	4.90
C ₆ H ₅ NHCH ₃	4.848	(1.016)	5.15
C ₆ H ₅ N(CH ₃) ₂	5.150	1.014	5.45
C ₆ H ₄ (CO) ₂ NH	9.930	1.015	9.63

解離定数の差
(直接的) K_a (間接的)

ース(HPC)を添加して浸透流を止めた場合と、内面をコーティングした管を用いて適当な浸透流を与えた場合について検討した。前者の結果をFig.1 A)に示す。同位体間のKaの比を求めると1.014となり、Tableの値より少し小さくなった。電気浸透流を与えた場合は、ほぼ完全な分離を得たものの、ピークがブロードになり(〜3万段)、改善の余地がある。

(ii)アニリン誘導体 アニリン誘導体は比較的移動度が小さく、緩衝液の陽イオンとして、テトラブチルアンモニウムイオンを用い、リン酸でそれぞれの試料の最適pHになるよう調製した。アニリンの最適pHでの分離クロマトグラムをFig.1 B)に示した。この場合は泳動方向と逆向きの適当な速さの電気浸透流を与えるために、長鎖アルキルアンモニウムイオンを添加した。ジメチルアニリンの場合は特に、Kaの比が1に近く、分離に長時間(〜2時間)を要した。計算によるKaの比はTableの値と一致した。

(iii)フタルイミド 緩衝液の陰イオンとしては、移動度の比較的小さなCAPS(3-cyclo-hexylaminopropanesulfonic acid)を用い、水酸化ナトリウムで適当なpHに調製した。また、適当な浸透流を与えるために、この場合も長鎖アルキルアンモニウムイオンを添加した。分離例をFig.1 C)に示した。アルカリ条件下での分離は、液体クロマトグラフィーでは難しいが、毛細管電気泳動では、問題とならない。Kaの比は、1.011で、Tableの値より若干小さめになった。

このように、高分離能を利用したキャピラリー電気泳動での同位体の分離は、短時間分離が可能であるが、電気浸透流の制御等検討中の課題もある。

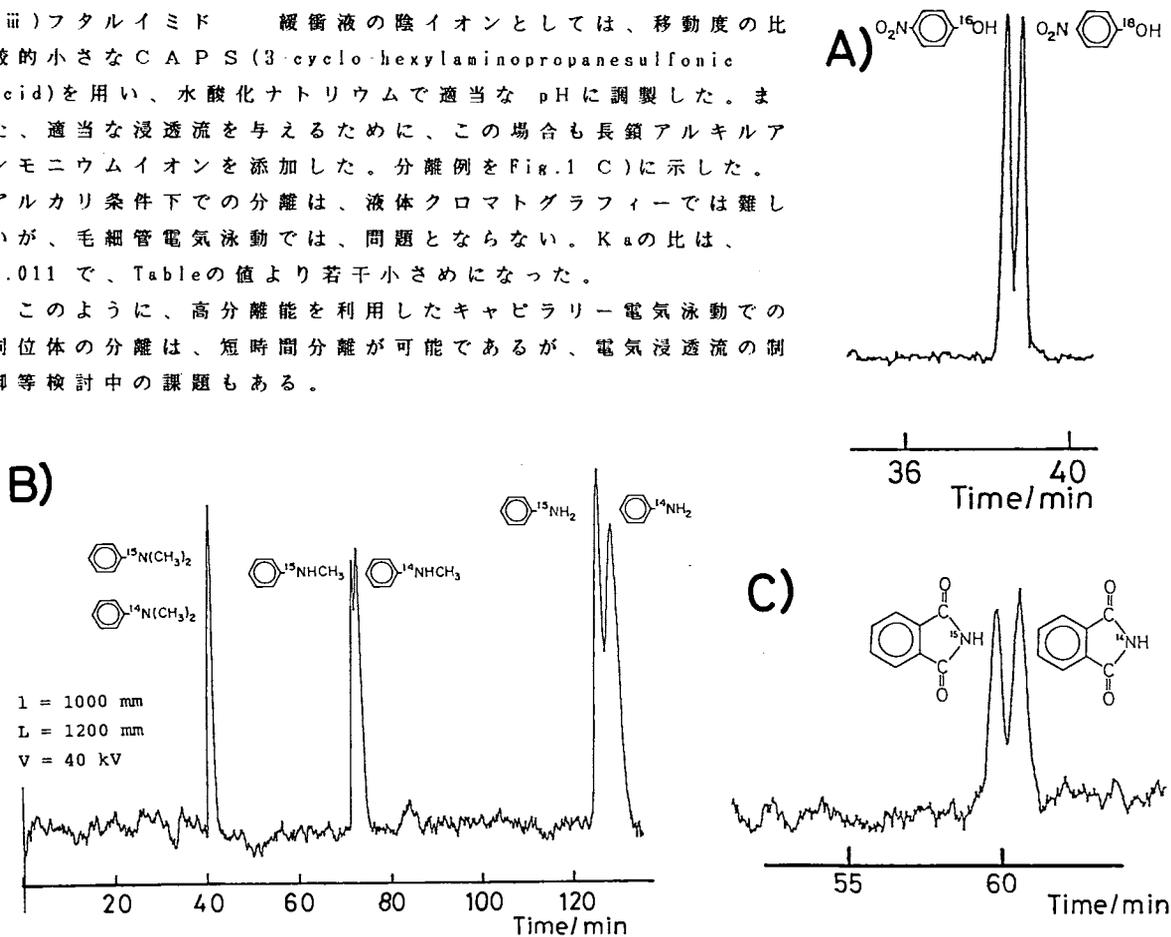


Fig.1. Electropherograms of isotopic separations; A) p-nitrophenols; buffer solution; 0.01 M phosphate buffer containing 0.1 % HPC pH 6.85; capillary tube, 50 μm i.d. x 1180 mm ($l = 1000$ mm); applied voltage and current, 40 kV, 8.9 μA . B) aniline derivatives; tetra-n-butylammonium hydroxide and phosphoric acid pH 4.91, 2.25 mM n-decyltrimethylammonium chloride; 50 μm i.d. x 1200 mm ($l = 1000$ mm); 40 kV, 16.5 μA . C) phthalimides; CAPS and sodium hydroxide pH 9.63, 2 mM decyltrimethylammonium chloride; 50 μm i.d. x 1200 mm ($l = 1000$ mm); 40 kV, 5.3 μA .

- (1) Tanuka et al. J.Chromatogr., 352, 307 (1986).
- (2) Terabe et al. Anal.chem., 60, 1673 (1988).
- (3) Terabe et al. Anal.chem., 56, 111 (1984).

○泉 友則、 山本 秀子、 真鍋 敬、
 奥山 典生 (都立大・理・化)
 長堀 崇重 (日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ)

(はじめに)

現在、タンパク質の分析は、支持体を用いたゲル電気泳動が主流であるが、その操作の煩雑さや分析時間の長さから、無担体キャピラリー電気泳動法の有用性が見なおされつつある。しかし、実際には、無機イオンやアミノ酸、ペプチドなどの低分子イオンの分析に用いられているのがほとんどで、高分子イオン、すなわちタンパク質、そして、それらの複雑な混合物である生体液については、十分適用されているとはいえない。今回、我々は市販のキャピラリー電気泳動装置を用いて、ゾーン電気泳動の条件でのタンパク質の分析について検討した。

(実験方法)

装置及び標準泳動条件： キャピラリー電気泳動装置は、BIO-RAD HPE 100 を用いた。泳動管は、BIO-RAD HPE カートリッジ (ガラス製 25 μ m I.D. x 20cm, 50 μ m I.D. x 50cm) の内壁がHPMCで被覆されているものを用いた。電極槽液は、0.1M リン酸ナトリウム-0.05% HPMC緩衝液 (標準分析条件では、pH 2.5) を用いた。電気泳動は、定電圧6kV 8 秒間試料導入の後、定電圧6kV で、陽極から陰極方向へ泳動することを標準とし、分析には、10 μ lの試料を用いた。

試料： チトクロームC、BSA、トランスフェリン、IgG、カルモデュリン、及びその混合物を標準分析試料とした。また、血清、及び脳抽出液の陰イオン交換クロマトグラフィー分画を複雑なタンパク質混合物の例として、ペプチド試料には、カルモデュリンのトリプシン消化物を用いた。

(結果)

1. 試料導入条件

(1)試料塩濃度の導入量への影響

チトクロームC、BSA、トランスフェリン、IgG、カルモデュリンの混合標準試料 (各0.1mg/ml) を 0M、0.001M、0.01M、0.05M、0.1M、0.15M の NaCl 水溶液で調製し標準泳動条件での導入量を比較した。(Fig.1) 試料塩濃度が高くなると導入量は減少し、NaCl 0.1M では、0Mと比較して1/10以下になった。しかし、高濃度の塩を含む試料でも、脱塩装置で処理 (約10分間) することにより分析が可能であった。

(2)試料pHの導入量への影響

混合標準試料 (各0.1mg/ml) を pH 2.5、3、4、5、6、7、8、9 の 0.075M リン酸ナトリウム緩衝液で調製し、標準泳動条件での導入量を比較した。(Fig.2) 試料pHが高くなるとpIの低い試料の導入量は減り、pI<pHとなる試料は導入されなかった。

(3)試料導入量の再現性

混合標準試料の非連続6回の分析より、各ピーク間の高さの比の変動を求めた。チトクロームC、BSA、トランスフェリンは、3~8%の変動であったが、IgG、カルモデュリンでは、20%程度になった。

2. 泳動条件

(1)キャピラリー長による分離への影響

長さ20cm、及び50cmのキャピラリーについて、血清、脳抽出液分画の分離を比較した。両方の試料とも50cmのキャピラリーの方で分離が向上した。

(2)標準泳動条件での分離

・ペプチド

pH 2.5 の緩衝液中で陽イオンとして泳動する条件では、カルモデュリンのトリプシン消化ペプチドは、18分間で10個以上のピークに分離された。(Fig. 3)

・タンパク質混合物

血清は、大きく分けて5 分面に、脳抽出液分面は、2 分面に、それぞれ10分間以内で分離された。(Fig. 4)

・泳動時間の再現性

標準泳動条件でのチトクロームCの泳動時間を用いて再現性を検討した。非連続7回の分析において、標準偏差より 3.202 ± 0.053 分となり、1.7%の誤差で再現性が得られた。

(3)タンパク質分析への適用

pH 7.0 の緩衝液中で陰イオンとして泳動する条件では、血清は、約10個の分面に、脳抽出液分面は、20個以上のピークに、それぞれ約30分間で分離された。(Fig. 5)

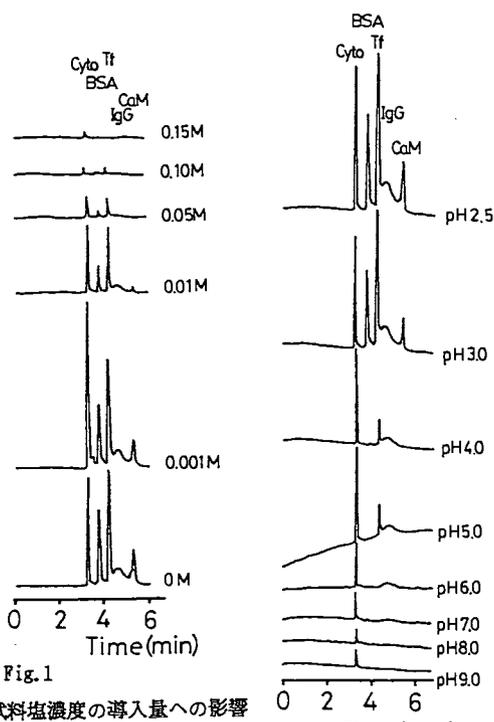


Fig. 1

試料塩濃度の導入力への影響

Fig. 2

試料pHの導入力への影響

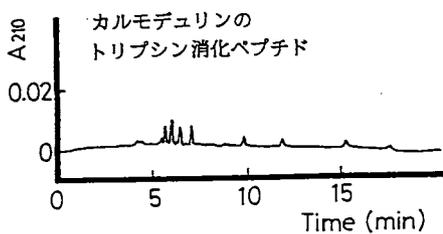


Fig. 3 ペプチドの分離

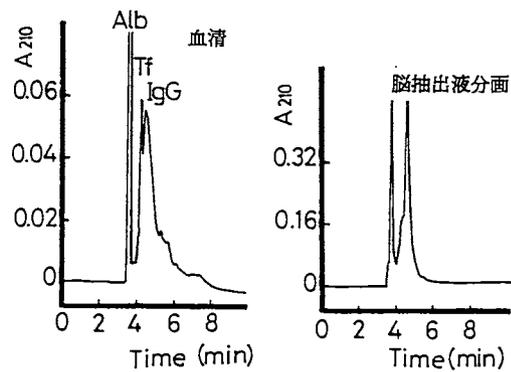


Fig. 4 標準泳動条件での分離

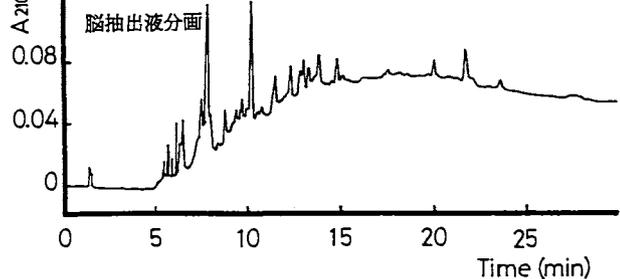
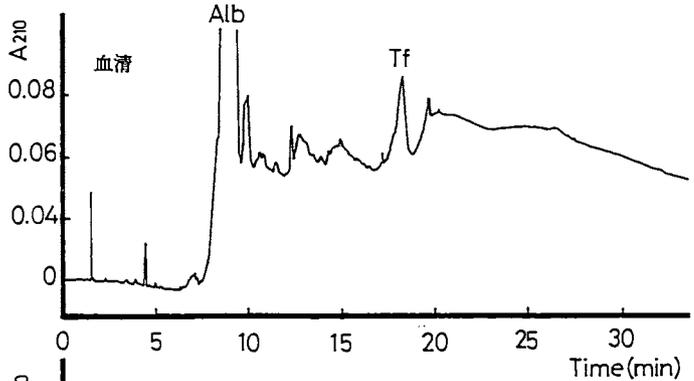


Fig. 5 タンパク質分析への適用

10 全自動高速液体クロマトグラフ・キャピラリー電気泳動共役系
によるタンパク質の分析

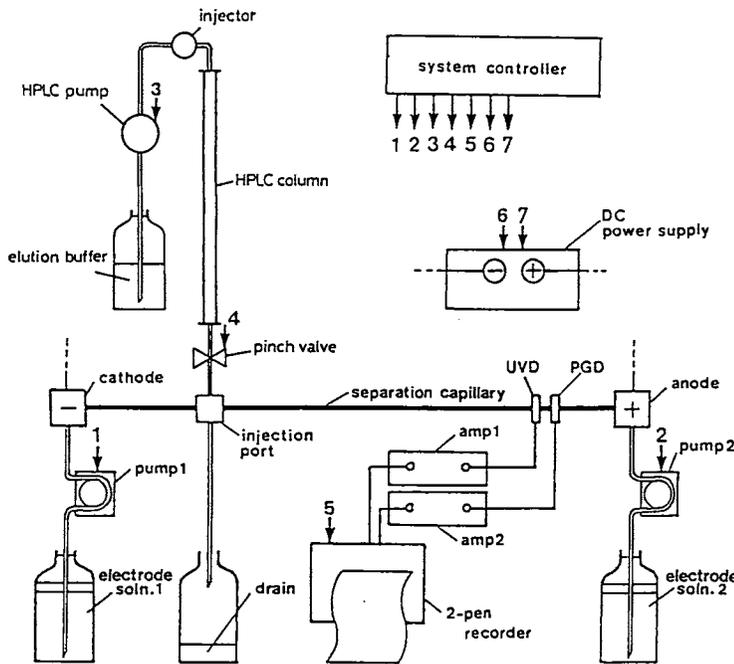
○山本 秀子、 真鍋 敬、 奥山 典生 (都立大・理・化)

はじめに

複雑なタンパク質混合物を分析するためには、異なる分離様式をもつ二種類の分離法を組み合わせた二次元分離法が一般に用いられる。二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法もそのひとつであるが、非常に高い分離能を持つ反面、操作法が複雑であり、また定量のための特別な操作を必要とする。そこでポリアクリルアミドゲル電気泳動法に匹敵する分離能をもつキャピラリー電気泳動法を高速液体クロマトグラフィー法と組み合わせた全自動二次元分離装置を開発し、この二次元分離系によるタンパク質の分析について検討した。

全自動高速液体クロマトグラフ-キャピラリー電気泳動装置

装置の模式図を図1に示す。高速液体クロマトグラフィーシステムは、一般に使用されている高圧ポンプ、インジェクター、ガラスカラム(内径4mm、長さ500mm)を用い配管はステンレス管を用いた。カラム充填材は、ゲル濾過HPLC用充填材、Asahipak GS-520を用いた。キャピラリー電気泳動装置は、すでに報告した全自動装置¹⁾を自動試料添加部(サンプラー、小型ペリスタポンプ)を外して用いた。HPLC系と電気泳動装置の接続は次のように行った。接続のための配管はテフロン管を用い、カラム出口からの管と電気泳動装置の試料注入口からの管をシリコン管で接続した。この際シリコン管の中央部分を電磁ピンチバルブにはさみ込んだ。これは、HPLC系への電流のリークを防ぐため、電気泳動中はバルブを閉めておくことにより電気泳動装置とHPLC系が絶縁される。全自動分析のために、HPLCポンプ、電磁ピンチバルブ、電極槽液送液用しごきポンプ、高電圧電源、レコーダの動作タイミングをマイクロコンピュータで制御した。



¹⁾ T. Manabe, et al.
Electrophoresis, 10
(1989) 172.

図1 全自動HPLC-キャピラリー電気泳動装置

分析条件、分析スキーム

クロマトグラフィー溶離液は0.25%アンホライン-0.00625%ナトリウムアジド、電気泳動用陽極槽液は5mM HCl-10mM 2-amino-2-methyl-1-propanol、陰極槽液は50mM tranexamic acid-KOH (pH 10.8)を用いた。HPLCカラムを平衡化したのち試料溶液をカラムに添加する。これ以後の分析操作は全て自動で行われる。スキームは以下のとおりである。

1)陽極槽液を送液(2ml/2min)し、2)陰極槽液を送液する(0.75ml/3min)。3)電磁ピンチバルブを開放し、4)クロマトグラフィー溶離液をカラムに送液する(70 μ l/30sec)。カラム溶離液は電気泳動装置の試料注入口に導入される。5)電磁ピンチバルブを閉め、6)高電圧を電極間にかける。7)レコーダをオンにし(12.5分間)記録終了後、8)高電圧電源、レコーダをオフにし1)に戻り、このサイクルを繰り返す。1サイクルに要する時間は23分である。

血清タンパク質、ウシ脳可溶性タンパク質の分析

血清を5倍に希釈した試料溶液30 μ lをこの二次元分離系により分析した。分析サイクル数は、90とした。90得られた電気泳動図のうち血清成分の分離ピークの検出されたサイクルの泳動図を図2-Aに示す。各サイクルで分離ピーク数およびピーク高さが異なっており、1次元目のゲル濾過HPLCで分離された血清タンパク質(図2-B)を2次元目のキャピラリー電気泳動(等速電気泳動)により移動度の違いでさらに分離することができた。また同時に、血清中の低分子をタンパク質と区別して分析することができた。ウシ脳可溶性タンパク質画分についても同様の結果が得られた。この分離系の分離能は、1次元目のゲル濾過におけるタンパク質の分離能は2次元目のキャピラリー電気泳動に比べて低く、さらに分離能を向上させるためには、HPLCの分離様式を逆相系などの他のものに換えて検討することも必要であると考えられた。

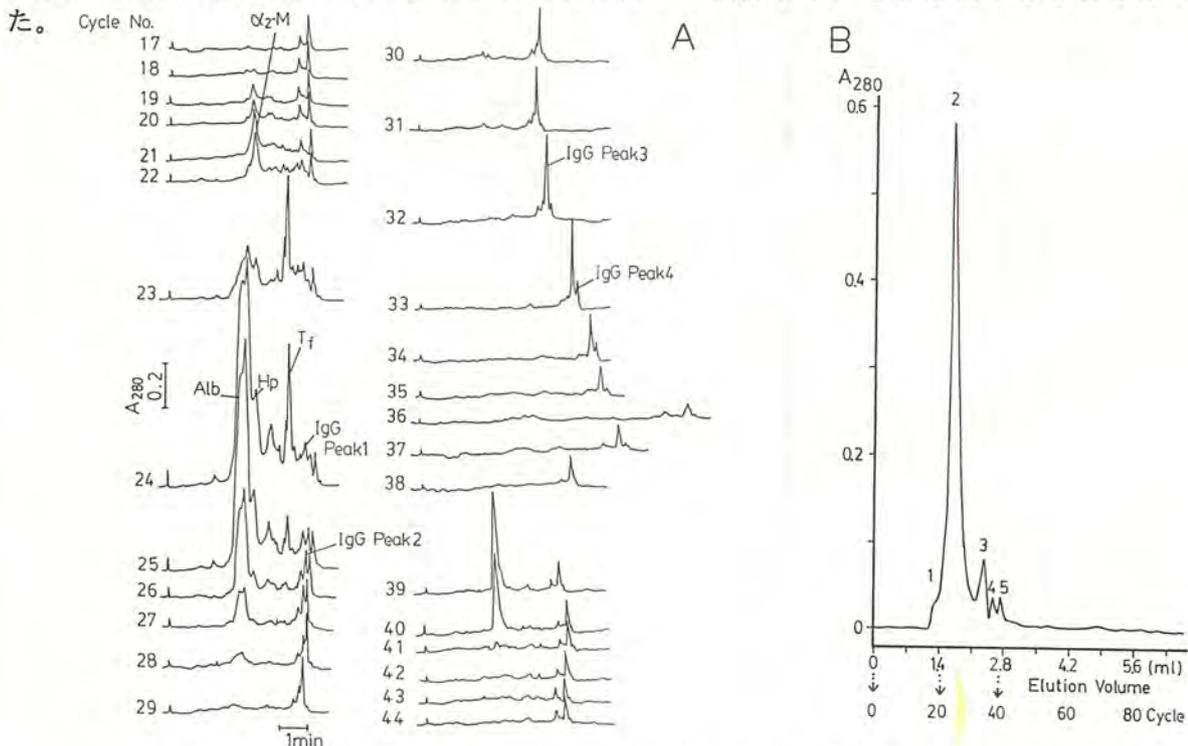


図2 全自動HPLC・キャピラリー電気泳動共役系による血清の二次元分離
A) 2次元分離により得られた電気泳動図 B) 1次元ゲル濾過HPLC溶離図

Particle Induced X-ray Emission

粒子誘起X線放射

11

IP-PIXE法による希土類元素の分析(2)

(広島大工) 胡建英、広川健、西山文隆、木曾義之

1. IP法で分取を行なうことの利点はいくつか挙げられるが、我々は①試料ゾーンが連続しているため分取した際無駄なフラクションが出ないこと、②原理的には回収率が100%であること、③微量成分に対して濃縮効果があり他の分析法の試料とした場合に感度の向上が期待できることなどの利点に注目し、マトリックス中の微量成分の分析に本法の適用を試みている。

分取した試料に対して、PIXE法のような多元素同時分析法を適用すると、IP法が本質的に分離分析法であるために生じる欠点をカバーできる(例えば、マトリックス中の微量成分を分離する場合しばしば微量成分の量が少なく評価されてしまう:講演3)。

PIXE法は加速したプロトンなどを試料に照射し内殻電離により、発生する特性X線のスペクトルを解析して、定性定量を行う分析法である。条件が良い場合には微量(mg-μg)の試料で~10ng程度までの微量元素が検出できる。ただし今回取り扱った希土類混合物のように原子番号が隣あってスペクトルがオーバーラップするような試料系や、多量のマトリックス中の微量元素の分析では数%以下の成分については分析困難で、マトリックス除去の前処理が不可欠である。このように、IP法で前処理した試料をPIXE分析する方法は双方の欠点を埋め合わせる事ができる(IP-PIXE法)¹⁾。

本講演ではIP-PIXE法の適用限界などに関する知見を得るため、Laをマトリックスとする14種の希土類を試料とし、マトリックス中の微量成分の分離挙動、分取時の回収率に対する分取装置の操作や通電する電気量の影響などについて検討した。

2. 図-1に分取用IP装置の概略図を示した。試料はinj1より注入し5mm管で分離する。B1-B2(2mm I.D.)、V7-V8(1mm I.D.)とV8-B3(0.5mm I.D.)間の分離管長さは可変であるが、今回の実験ではそれぞれ25cm、30cm、30cmであった。今回の実験は分離間長さを検討するため、V7-V8間が約2.5cmの場合についても検討した。分離された試料は、微量シリンジポンプによるリーディング電解液のカウンターフローによりB3部で、ターゲットホルダー上に滴下させる(一滴約5.4μl)、カウンターの線速度は等速電気泳動速度の約8倍(約12μl/分)、泳動電流は5mm、2mm、1mm、0.5mm管部でそれぞれに5mA、3mA、300μA、150μAとした。試料注入から分取終了までに要する時間は約6時間である。使用したリーディング電解液(L1)は1mMKOHを含む19mMNH₄OHで、錯形成剤として10mMHIBを使用し酢酸によりpH=4.8に調製した。ゾ

ン境界を乱す熱対流を抑えるために、リーディング電解液に1%(L1)および0.2%HPC(L3)を加えた。なおターミナル液(T)としては10mM塩酸カルニチンを使用した。試料の調製には純度99.9%の希土類塩化物(東京化成Co.)を使用した。分取開始のマーカーストとしてアストラゾンピンク(AP)及びトルイジンブルー(TB)をごく微量加えた。分取した試料はそのままデシケーター中で乾燥させ、PIXE分析のターゲットとした。PIXE分析には本学工学部のVan de Graaf型加速器(日新ハイボルテージ製AN-2500型)を使用した。

3. 試料の総量が一定の条件(5μmol、約700μg)で成分比を変化させ、

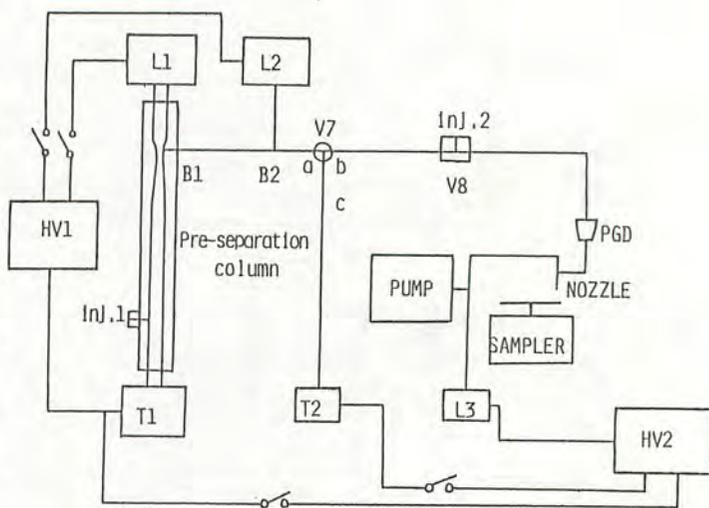
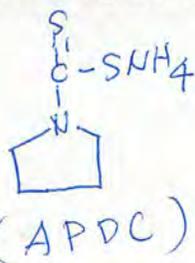
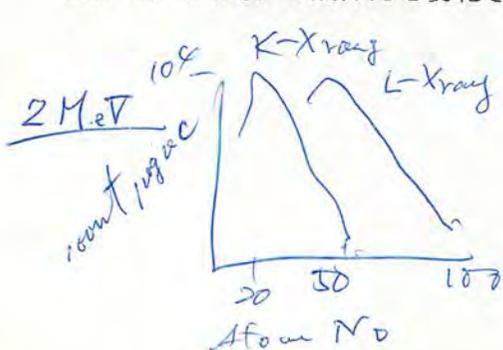


Fig.1 Schematic diagram of preparative IP equipment

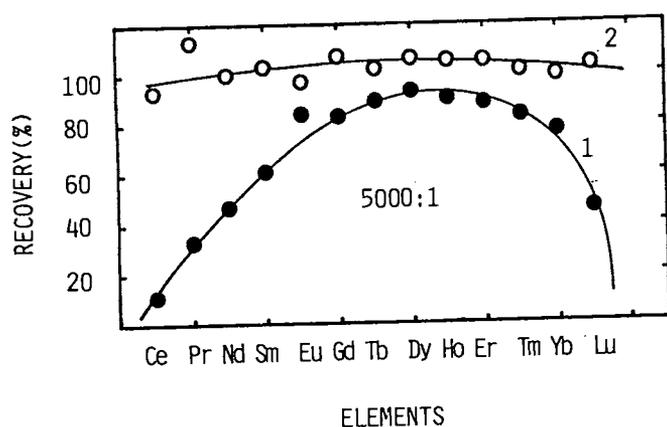


回収率に対する影響について検討するため、La:その他の希土類の比が500:1から10000:1の4種の混合試料を分取しPIXE分析により回収率を求めた(表-1)。表-1より明らかのように、500:1および1000:1の試料ではCe、Pr、Ndなどの回収率があまり良くないが、他の回収率はほぼ100%であった。回収率が低い元素がある理由は、大過剰のLaをL1およびL2で廃棄した際、一緒に廃棄されたものと推定され、成分比に応じて廃棄操作のタイミングを考えなければならない事を意味している。しかし1/10000程度の微量成分でも問題なく回収できることが明らかになった事は興味深い。今回の結果から判断する限り、微量成分の総量は少ないほど回収率が良いという結果を得た。成分比の上限はPIXE法の検出限界(~10ng)より決まるので、試料の量が5μmol程度なら50000:1試料の分析も可能であろう。

5000:1試料についてLa廃棄時の操作の違いによる回収率の相違を図-2に示した。(1)は、La以外の元素がTB, AP間に全て含まれていると仮定して操作したものである。この場合は、Ce, Pr, Nd, Sm, YbとLuの回収率が低い。そこで、(2)はTB, AP間の前後にもLa以外の元素が存在していると考え、この部分を取り残さないように操作した。その結果(1)の場合に回収率が低かった元素もほぼ100%回収できた。詳しい操作および実試料の分析例については、講演で報告する。

TABLE 1.
The recovery of lanthanoides analyzed by IP-PIXE method

ELEMENT RATIO	AMOUNTS(ug) INJECTED				AMOUNTS(ug) IP-PIXE				RECOVERY(%)			
	500:1	1000:1	5000:1	10000:1	500:1	1000:1	5000:1	10000:1	500:1	1000:1	5000:1	10000:1
La	676.9	685.7	692.7	693.7	1.839	4.4245	8.9306	7.4910	(0.3)	(0.6)	(1.3)	(1.1)
Ce	1.366	0.692	0.140	0.070	0.214	0.4446	0.0746	0.0746	16	63.3	93	103
Pr	1.393	0.696	0.141	0.071	0.900	0.6033	0.1636	0.0753	62	85	113	103
Nd	1.406	0.720	0.144	0.072	1.280	0.6403	0.1470	0.0764	91	87	100	103
Sm	1.466	0.742	0.150	0.075	1.495	0.8053	0.1578	0.0826	103	105	103	107
Eu	1.481	0.750	0.152	0.076	1.560	0.7990	0.1496	0.0833	103	103	97	107
Gd	1.533	0.776	0.157	0.079	1.664	0.9060	0.1734	0.0914	105	114	107	112
Tb	1.549	0.786	0.159	0.080	1.670	0.8410	0.1650	0.0858	105	105	102	105
Dy	1.584	0.802	0.163	0.081	1.700	0.8020	0.1782	0.0905	105	105	106	109
Ho	1.608	0.814	0.164	0.082	1.768	0.9155	1.7650	0.0908	107	109	105	109
Er	1.631	0.826	0.167	0.084	1.758	0.9006	0.1773	0.0885	105	106	105	103
Tm	1.647	0.834	0.169	0.085	1.772	0.9201	0.1744	0.0805	105	107	101	103
Yb	1.687	0.854	0.173	0.086	1.753	0.8860	0.1748	0.0925	102	102	99	105
Lu	1.706	0.864	0.175	0.087	1.782	0.9244	0.1829	0.0925	103	105	103	103



文献

- 1) 木曾義之、広川健、西山文隆、木村剛二、池田浩美、胡建英
第50回分析化学討論会
(島根大学、1989)

Fig.2 Effect of the operation on recovery

12 I P - P I X E法によるAl中微量元素の分析

(広島大工) ○池田浩美、広川健、西山文隆、木曾義之

1. I P - P I X E法(講演11)による分析の一環として、金属Al中の微量成分の分析を試みた。P I X E法は元来、非破壊多元素同時分析法であるが、圧延しないままのAl金属をターゲットとして直接P I X E分析を行うことは、X線分析で常に問題となる吸収効果などの影響で、スペクトル解析が困難となり微量元素の定量に関しての精度が劣ってしまうことは否定できない。このような試料の場合、I P法などの化学的前処理が必要となる。

I P法は分離分析であるために、分離条件が適当でない場合、微量成分が過少評価されることがある。本講演では、微量成分の等速電気泳動分離の条件を検討した。Al中に存在の予想される同族元素のGaは、Feなどと同様に水酸化物となり易く、リーディング電解液のpHや錯形成剤の選択については過去に例がない。

2. 使用した電解液系を表-1に示した。電解液系1は希土類などの分離に適した系で、錯形成剤 α -H I Bの作用で複雑な試料系の分離も可能である。一方電解液系2はFeなど、水酸化物を生じやすいイオンの分析に適した系であるが、この電解液系では多種類のイオンの分離は難しい。標準試料をもちいて微量成分の分離挙動について検討したのち、実試料として市販アルミ板を分析した。試料は塩酸に溶解させた後、蒸発乾固させ、超純水に溶解させてI P用に調製した。なお実際の分取に当たっては、分取開始のマーカとしてアストラゾンピンクおよびトルイジンブルーをごく微量加えた。分取した試料はそのままデシケーター中で乾燥させ、ターゲットとした。P I X E分析には本学工学部のVan de Graaff型加速器(日新ハイボルテージ製AN-2500型)を使用した。スペクトル解析には演者らの解析プログラムP I X Sを使用した¹⁾。

表-1 電解液条件

系	リーディング電解液	ターミナル電解液
1	10mM KOH 5mM H I B pH 4.8 (buffer Acetate) H P C 0.02wt%	10mM ϵ -アミノカプロン酸 pH 4.8 (Acetate)
2	10mM H C l H P C 0.02wt%	10mM T r i s pH 4.8 (Acetate)

3. 種々の元素についての分離挙動を調べるために、標準試料(Al、Co、Ni、Zn、Ga、Pb、Cuの等モル溶液)を分析した。電解液系1および2を用いて測定したフェログラムを図-1-aおよびbに示した。はじめに電解液系1を使用して上記標準試料を分離分取し、P I X E分析によって回収率を求めた(表-2)。電解系1ではGaの回収率が0.8%と低く、大部分は等速電気泳動していないようである。なおAlは、今回使用したGe検出器では検出されない。実試料を分離分取した各フラクションのP I X Eスペクトルを図-2に示した。Co、Ni、Zn、Cu、Pb等が検出されており、泳動の順序も前述の標準試料の分析実験と一致しているが、電解液のブランクと比較したところ、これらの元素は電解液系にも含まれていたため、現在高純度試薬等を用いて検討中である。

いけだ ひろみ、ひろかわ たけし、にしやま ふみたか、きそ よしゆき

しかし、Znのピークの左肩に、ブランクからは検出されなかった微量のGaのピークが見えており、スペクトルフィットによる定量の結果、Al板270 μ g中に20ppmに相当する6ngのGaが検出された。標準試料の分析結果からGaのこの電解液系での回収率は、0.8%であるから、実際のAl板中には検出された20ppmの125倍に相当する2500ppm程度のGaが含まれていると考えられる。回収率から存在量の予測は可能であるが、この電解液系では定量精度に疑問が残る。HIBの量を0-5mMと変化させて実験したが、回収率は殆ど変化しなかった。そこで電解液系2を用いたところGaの回収率が大幅に改善された。IP-PIXE分析の詳細については講演に於て報告する。

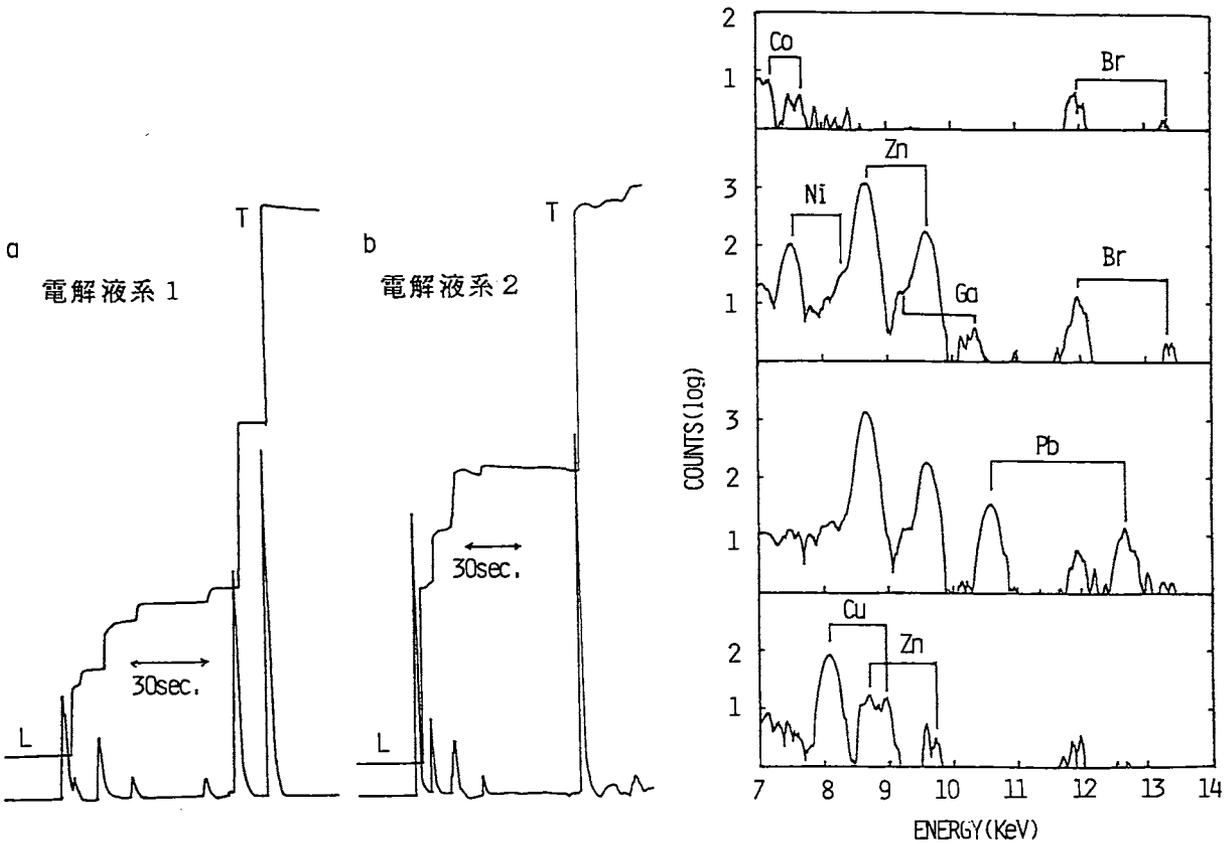


図-1

図-2

表-2 標準試料のフラクションの組成と回収率(電解液系1)

element	Co	Ni	Zn	Ga	Pb	Cu
inj.(ng)	118	117	131	160	414	127
fraction						
1	67.4	25.6	3.8	-	-	-
2	33.3	84.6	135	1.3	220	-
3	1.0	1.8	1.7	-	0.4	-
4	0.5	1.4	1.0	-	4.5	101
5	0.7	1.1	0.7	-	1.5	7.6
yields(ng)	102.9	114.5	142.2	1.3	226.4	108.6
recovery(%)	87.2	97.9	109	0.8	54.7	79.5

参考文献

1) T.Hirokawa, F.Nishiyama, and Y.Kiso, Nucl.Instr.and Meth. B31(1988)5 25.

(広 大 工) 中 川 利 久、 広 川 健、 西 山 文 隆、 木 曾 義 之

(1) P I X E 法は、 加 速 器 を 必 要 と す る 特 殊 性 が あ る も の の 多 元 素 同 時 分 析 が 迅 速 に 行 え る こ と よ り 近 年 注 目 を 集 め て い る。 条 件 の 良 い 場 合 は μg の 試 料 で ppm オ ー ダ ー の 分 析 が 可 能 で あ る。 し かし マ ト リ ッ ク ス 中 の 微 量 元 素 の 分 析 に お い て は、 発 生 す る X 線 の 自 己 吸 収、 ビ ー ム エ ネ ル ギ ー の 不 均 一 な ど に よ り、 著 し く 精 度 が 低 下 す る こ と が あ る (マ ト リ ッ ク ス 効 果)。 こ の よ う な 場 合 は、 X 線 の 減 衰 量 を 計 算 に よ り 補 正 し な け れ ば な ら ない が、 精 度 の 高 い 補 正 の た め に は 試 料 の 組 成 が 既 知 で な け れ ば な ら ない と い う 矛 盾 を 生 じ る。 そ の た め に な ら ぬ 方 法 で マ ト リ ッ ク ス を 除 去 し な け れ ば な ら ない が、 典 型 的 な 例 と し て

J o h a n s s o n ら¹⁾ に よ る 海 水 の 分 析 が あ げ ら れ る。 N a C l マ ト リ ッ ク ス か ら 微 量 元 素 を 抽 出 す る た め、 錯 形 成 剤 (A P D C : A m m o n i u m P y r r o l i d i n e d i t i o c a r b a m a t e、 D D T C : S o d i u m d i e t h y l d i t h i o c a r b a m a t e) の 選 択 的 錯 形 成 反 応 生 成 物 を 活 性 炭 に 吸 着 さ せ、 そ れ を タ ブ レ ッ ト 状 に 加 工 し て P I X E 法 の タ ー ゲ ッ ト と す る 方 法 が 報 告 さ れ て い る。 し かし こ の 方 法 で は タ ー ゲ ッ ト が 厚 み を 持 っ た た め に (t h i c k t a r g e t)、 X 線 の 自 己 吸 収 が お こ り 正 確 に 分 析 す る た め に は、 標 準 添 加 法 を 使 用 し な け れ ば な ら ない な どの 問 題 が あ る。

演 者 ら は P I X E 法 に よ る 海 水 中 の 微 量 元 素 の 分 析 の 迅 速 化 と 高 精 度 化 を 目 指 し て 種 々 の 方 法 に つ い て 検 討 し て き た が、 今 回 ニ ュ ー ク リ ポ ア フ ィ ル タ ー を 用 い た t h i n t a r g e t 調 製 の 簡 便 法 に つ い て 検 討 し た の で 報 告 す る。

(2) 従 来 使 用 し て き た 溶 媒 抽 出 法 の フ ロ ー チ ャ ー ト を 図 1 - A に 示 し た。 こ の 方 法 で は マ ト リ ッ ク ス で あ る 塩 化 ナ ト リ ウ ム は、 ほ ぼ 除 去 で き る と い う 利 点 は あ る が、 作 業 の 手 順 が 複 雑 で あ り、 時 間 が か か る こ と、 ま た 回 収 率 を コ ン ス タ ン ト に す る こ と が 困 難 で あ る な どの 不 利 な 点 が あ る。 そ の 原 因 の 一 つ は 乾 固 さ せ る た め に 熱 を 加 え る こ と に よ り 錯 形 成 剤 が 金 属 を 取 り 込 ん だ ま ま 変 性 し た た め と 考 え ら れ る。

こ れ ら の 問 題 を 解 決 す る た め に、 図 1 - B に 示 し た よ う に 沈 澱 し た 錯 体 を N u c l e p o r e フ ィ ル タ ー で 直 接 ろ 過 し て マ ト リ ッ ク ス で あ る N a C l と 濾 別 し、 硝 酸 で 沈 澱 を 分 解 し 乾 固 後 一 定 量 の 純 水 (2 0 0 μl) を 加 え て 試 料 と す る 方 法 を と っ た。 標 準 試 料 を 用 い た 予 備 実 験 で は こ の 試 料 を I P 法 お よ び P I X E 法 で 分 析 し、 回 収 率 に つ い て 検 討 し た。 I P 分 析 装 置 と し て は 島 津 I P - 2 A を 使 用 し た。 使 用 し た リ ー デ ィ ン グ 電 解 液 は 1 0 m M K O H、 5 m M H I B (α - ヒ ド ロ キ シ イ ソ 酪 酸 : 錯 形 成 剤)、 酢 酸 バ ッ フ ェ ー (p H = 4 . 8)、 タ ー ミ ナ ル 液 は 1 0 m M 塩 酸 カ ル ニ チ ン で あ る。

(3) 錯 形 成 剤 を 用 い て 分 析 を 行 う 場 合、 各 元 素 の 錯 形 成 能 が 一 定 で は な い た め、 そ れ ぞ れ の 回 収 率 を 求 め て お く 必 要 が あ る。 溶 媒 抽 出 法 (図 1 - A) に よ る 方 法 で は こ の 回 収 率 を コ ン ス タ ン ト に 求 め る こ と が 困 難 で あ っ た。 し かし、 N u c l e p o r e フ ィ ル タ ー ろ 過 法 (図 1 - B) で は 操 作 手 順 が 減 少 し た た め 不 純 物 が 混 入 す る 可 能 性 が 少 な く な り、 ま た 乾 固 さ せ る 際、 熱 を 加 え な く な っ た た め に 熱 に よ る 錯 形 成 剤 の 変 性 が な く な っ た。 こ の た め に 回 収 率 お よ び 再 現 性 と も に 可 成 り 向 上 し た。

な かが わ と し ひ さ、 ひ ろ か わ た け し、 に し や ま ふ み た か、 き そ よ し ゆ き

図2にCuの場合についてIP法で分析した結果を示す。図にはNaCl(84g/l)が含まれている場合とそうでない場合とについて示した。塩化ナトリウムが存在しない場合は、添加された銅が効果的に回収されているが、塩化ナトリウムが大量に存在する場合60μgで頭打ちになっている。PIXE分析でも同様な結果が得られた。きわめてイオン強度の高い雰囲気での程度錯形成剤を添加すれば良いかについては更に検討する必要がある。なお塩化ナトリウムが存在する場合に回収量が増加しているのは、塩化ナトリウム中に含まれていた不純物のためと考えられる。

IP法で金属イオンの分析を行う場合、種類によっては移動度の差が十分な条件で分析できないことがある。その結果互いに混合ゾーンを形成しやすいため(図3-A、B)、分離分析法であるIP法だけでは正確な分析を行うことが難しい場合がある。このような場合、分取用IP装置を使用して各フラクションのPIXE分析を行えば、たとえIP法で分離不十分のため分析不可能な場合でも分析可能となるだけでなく、マトリックスの除去も行えるという利点がある。このため現在IP-PIXE法による分析も検討を重ねているが、詳細は講演で報告する。

図1. サンプル調製法フローチャート

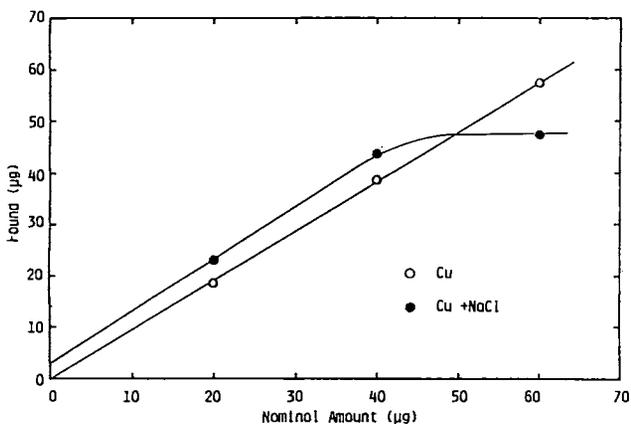
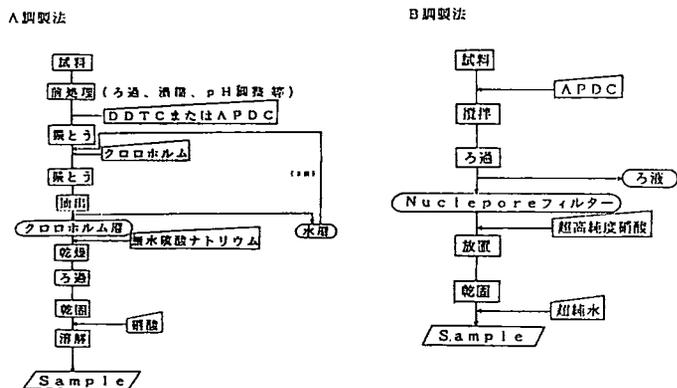


図2. Cuの回収率 (前処理試料全量は2l)

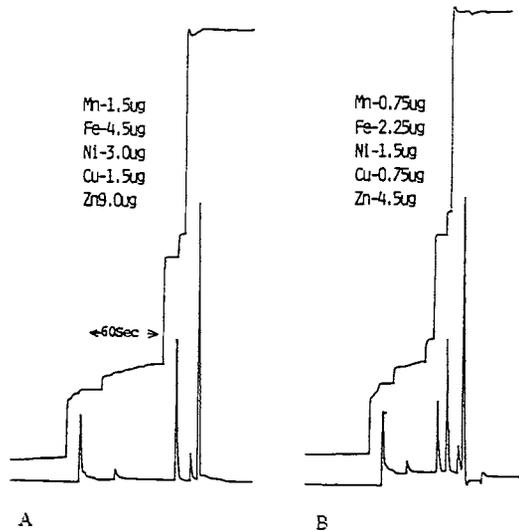


図3. 5種金属元素混合サンプルのイソタコフェログラム

(参考文献)

1) E.M Johansson, S.A.E Johanson, Nucl. Instr. and Meth. B3(1984)154-157

14 錯形成反応ならびに還元反応を利用した金属イオンのキャピラリ等速電気泳動分析

○ね たかし

㈱島津製作所 応用技術部

○日根 隆

1. はじめに

昨年の第8回電気泳動シンポジウムにおいて、Fe(III)を直接導入して分析できるリーディング電解液またはターミナル電解液について報告をおこなった。すなわち、Fe(III)と強い錯体を形成するキレート試薬の一つであるEDTAをあらかじめターミナル電解液に添加しておき、Fe(III)を金属キレートのEDTA・Feに変えて分析する方法《反応1》と、リーディング電解液にアスコルビン酸を添加しておきFe(III)をFe(II)に還元して分析する方法《反応2》について述べた。これらの反応は速やかにキャピラリチューブ内でおこなわれ、前者では陰イオンとして分析され、後者は陽イオンとして分析される。

今回、《反応1》の方法を発展させ、キレート試薬と金属イオン種を増して検討をおこなった。《反応2》については、Fe(II)への還元の再現性等を検討した。

2. 実験

装置は島津キャピラリ等速電気泳動装置：IP-3A型、データ処理装置：ITP-R5A型を用いた。検出器はPGDを使用し、キャピラリチューブには内径0.7mm、長さ80mm(PTFE製)と内径0.5mm、長さ160mm(FEP製)とを直列に接続した。

《反応1》リーディング電解液は10mM HCl/L-ヒスチジン(pH6.0)を使用し、ターミナル電解液は10mM MES/Tris(pH7.2)水溶液に、各種キレート試薬を0.2~0.5mM添加して調製した。キレート試薬としてTiron、EDTA、NTAおよびCyDTAのいずれかを使用した。試料はCu、Ni、Ca、Ba、Pb、Al、Co、Sn(IV)、Fe(III)、Mgの各水溶液を用いた。

《反応2》リーディング電解液には10mM KOH/アスコルビン酸、酢酸(pH4.0~5.0)水溶液、ターミナル電解液は10mM アスコルビン酸水溶液を使用した。試料は、塩化第二鉄水溶液を用いた。

3. 結果および考察

《反応1》EDTAを用いたとき10種の金属キレート全てが検出され、CyDTAはFe、Sn、Al、Pb、Mg、Caの6種が、NTAではAl、Fe、Pb、Sn、Ba、Ca、Ni、Coの8種が、TironはFe、Al、Sn、Ba、Ca、Ni、Cuの7種が検出された。図1に、4種類のキレート試薬を使用したときのFe、Al、Sn、Pb、Mgの5種類の金属キレートのRE値の変化を示した。RE値は酢酸で補正した。このときの金属イオンのRE値は、あらかじめ前処理で金属キレートを形成させた試料と同じ値を示した。このことはキャピラリチューブ内で速やかな錯形成反応がおこなわれ、安定な金属キレートが形成されていると推定される。従来分析条件では分離が困難であったFe(III)およびSn(IV)もNTAによって分離が達成された。図2にNTAを使用したときのSn(IV)、Fe(III)およびAl(III)の泳動図を示した。

《反応2》図3に、リーディング電解液の安定性を見るためにFe(II)のゾーン長

の変化を示した。10 mM KOHにアスコルビン酸のみを添加してpH 5.0に調製した場合、日数が経つにつれてFe(II)のゾーン長は減少したが、更に酢酸を加えてpH 4.0に調製した場合には、Fe(II)のゾーン長の減少はほとんど見られなかった。このことは、カウンターイオンのアスコルビン酸が酸化され濃度が減少してpHが変化するのに対し、酢酸を加えた場合はリーディング電解液の緩衝能が高くその変化が抑制されるためと考えられる。一方、2~3時間の短時間におけるFe(II)のゾーン長の再現性は、pH 5.0のリーディング電解液ではCV値1.3~3.7%、pH 4.0ではCV値が1.1~1.8%となった。

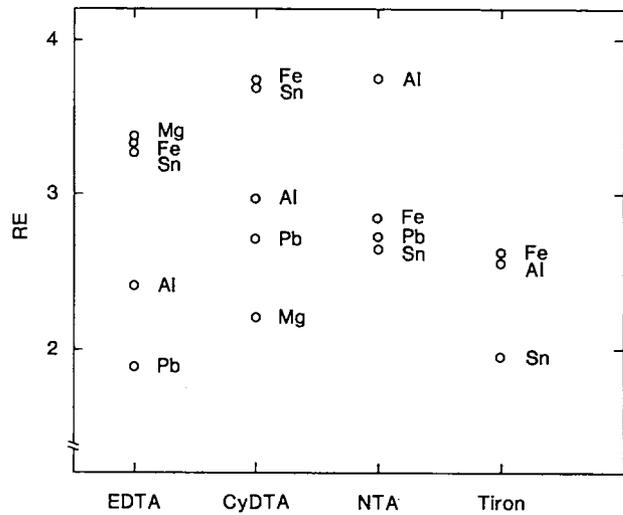


図1 キレート試薬による金属イオンのRE値の変化

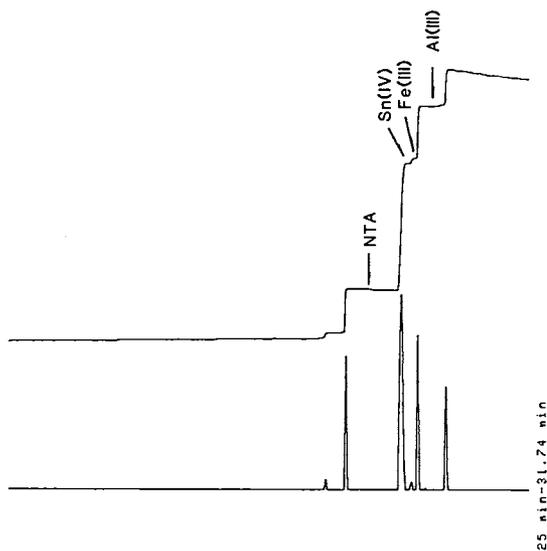


図2

Sn(IV)、Fe(III)、Al(III)の泳動図

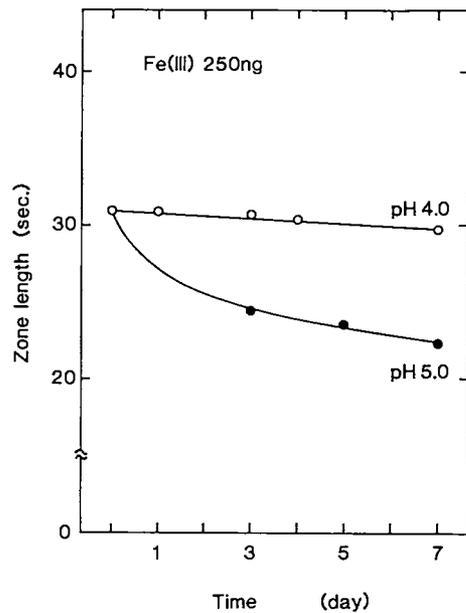


図3

Fe(II)のゾーン長の変化

参考文献

1. 日根、第8回電気泳動シンポジウム講演要旨集、p25(1988)
2. Y.Hirama and H.Yoshida、J.Chromatogr.、322(1985)139
3. S.Tanaka,T.Kaneta and H.Yoshida、J.Chromatogr.、447(1988)383

15 無水フタル酸誘導体を用いるアルコール類の誘導体化に関する研究(第6報)細管式等速電気泳動法によるパンテノール及びパントテン酸誘導体の分析

徳島文理大・薬 ○佐藤英生、石井淳一、香西重忠、赤田良信

〔緒言〕細管式等速電気泳動法は、イオン性物質の優れた分析法と考えられるが、非イオン性物質に適応することは出来ない難点を持っている。従って、本法による非イオン性物質の分析には、イオン性物質に変えるための誘導体化が必要になる。しかし、細管式等速電気泳動法のための誘導体化の検討はなされていない。一方、演者らは、アルコール類と無水フタル酸の無水ピリジン溶液を加熱すると、アルコール類の酸性フタル酸エステルが定量的に生成することを見出した。そこで、この反応によるパンテノール及びパントテン酸の誘導体化を行い、細管式等速電気泳動法によるパンテノール及びパントテン酸カルシウムの分析の基礎的条件を検討することを目的とした。

〔実験〕パンテノール及びパントテン酸と無水フタル酸との反応液又は、水希釈液の一定量をそのまま装置に導入した。注射剤は、その一定量を量り、減圧下で濃縮乾固し無水ピリジンに溶解し、無水フタル酸と反応させた。錠剤及び顆粒剤は、粉末とした後、その一定量を精密に量り、水を加えて超音波抽出し、遠心分離して得られた上澄液を注射剤と同様に処理した。分析条件—装置：島津製IP-2A型細管式等速電気泳動装置、検出器：PGD-2A型電位勾配検出器とUVD-10型紫外吸収検出器(254 nm)を併用した。泳動管：プレカラムとして1.0 mm i.d. x 150 mm (PTFE製)、分析カラムとして0.5 mm i.d. x 140mm (FED製)を使用した。泳動電流：250 μ A \rightarrow 100 μ A、電解液：10 mM 塩酸に β -アラニンを加えてpHを3.0又は3.2に調整し、0.2%になるようにHECを添加した液をL液とし、10mMヘキサ酸ナトリウム水溶液をT液とした。

〔結果及び考察〕反応液又はその水希釈液の一定量をそのまま注入したが、生成物であるパンテノール及びパントテン酸の酸性フタル酸エステルに比べ、試薬より多量に生成するフタル酸のため、通常の泳動条件では分析に長時間を要することがわかった。そこで、試料液中に存在するフタル酸量と通電時間の検討を行い、初期電流の通電時間を長くし、大部分のフタル酸ゾーンをカットする泳動条件を採用した。また、各ゾーンの境界を明瞭にするため粘性剤としてHECを添加した。演者らが設定した分析条件によって得られたイソタコフェログラムから、本反応により生成するパンテノール及びパントテン酸の酸性フタル酸エステルは、2種類であることがわかった。また、濃度の異なる各標準品について誘導体化反応を行い、定量性の検討を行ったところ、注入量とゾーン長の間には、良好な直線性が得られた。次に、製剤分析への適用を試みた。図1に、パンテノール含有注射剤を本法により誘導体化し得られたイソタコフェログラムを示した。配合されているパンテノールに由来する2つのゾーンと注射剤中に無痛化剤として同時処方されているベンジルアルコールの酸性フタル酸エステルのゾーンが認められた。図2は、パントテン酸カルシウム含有の総合ビタミン剤に本法を適用したときのイソタコフェログラムである。総合ビタミン剤のような複雑な処方の製剤についても本法が適用できることがわかった。また、酸性フタル酸エステルの紫外吸収を利用する有用性が示唆された。

Fig. 2 Isotachopheretic separation of vitamin preparation by this method

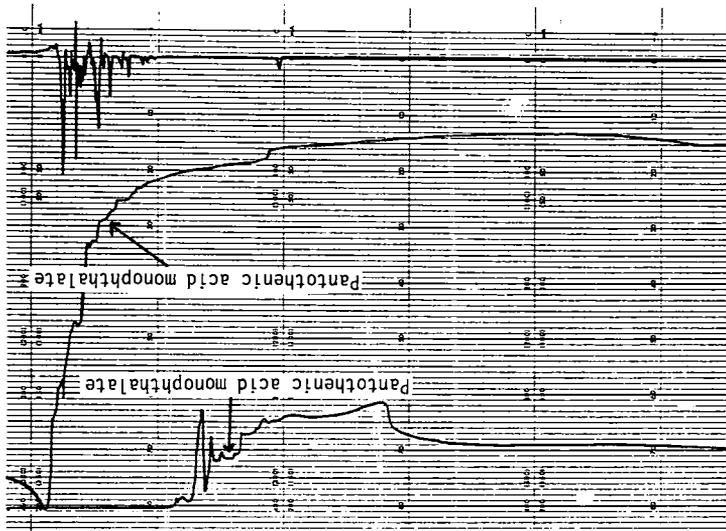
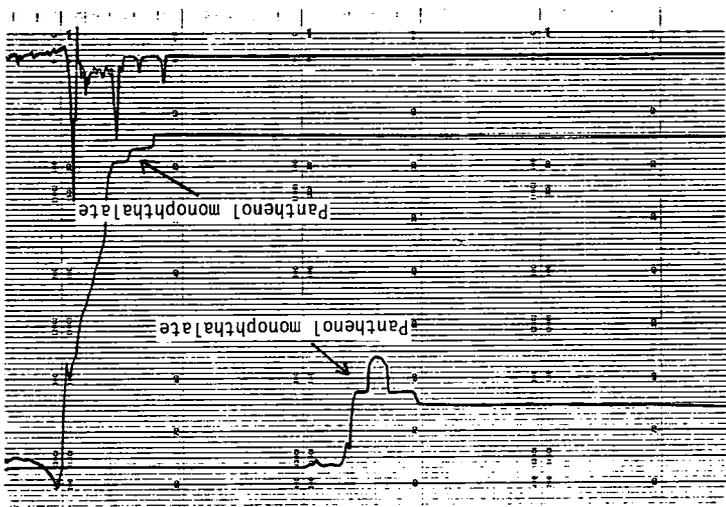


Fig. 1 Isotachopheretic separation of injection by this method



高知医科大学 化学

○ 溝淵 詔子、揚田 富子、児玉 裕 敬

Propargylglycine ($\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$) は cystathionine γ -lyase 活性を阻害することが知られている。そこでこの物質をラット腹腔に投与すると、実験的シスタチオニン尿症をラットにおこすことができた。しかし、実験的シスタチオニン尿症ラットの組織中における propargylglycine の蓄積及び尿中排泄についての詳しい報告はない。そのため、この物質の定量方法を細管式等速電気泳動により確立し、ラットの各種組織中及び尿中排泄の変化について検討した。

実験方法：

実験動物としては体重約200gの雄性Wistar系ラットを用いた。体重200gあたり20mgの propargylglycine を投与し、定められた時間にラットを殺し、それぞれの組織を取り、また採尿し、propargylglycine の定量を行なった。

組織及び尿中 propargylglycine の定量：

肝臓、腎臓等の臓器組織は屠殺後、速やかに分離し、各組織を5倍容の2% sulfosalicylic acid で homogenate し、3,000rpm で遠心し、除蛋白を行なった。その上清を Diaion SK-1 (H-form) にかけて水洗し、2N-NH₄OH で溶出し、それを減圧乾固し、一定量に溶解した後、等速電気泳動により定量した。尿は除蛋白を除いて組織の処理方法と同じであった。イソタコの泳動条件は先行液として 0.01M HCl + Amediol (pH 8.9) または 0.01M HCl + Amediol (0.01M CuCl₂:pH 8.9)、終末電解液として 0.01M β -alanine + Ba(OH)₂ (pH 10.9) を用いた。chart speed: 10mm/min.

propargylglycine と cystathionine はシグマ製品を、他の薬品は和光純薬の製品を用いた。

— 結果 —

Leading electrolyte として 0.01M HCl + Amediol (pH 8.9)、terminal electrolyte として 0.01M β -alanine + Ba(OH)₂ (pH 10.9) を用いて分析すると propargylglycine のゾーンが検出された。しかし propargylglycine を投与したラットの組織及び尿中には cystathionine の存在が考えられるので、cystathionine の分析を同様の分析条件で分析したところ、propargylglycine と cystathionine が混合ゾーンとなって検出された。そこでこの両者を分離するために、Cu²⁺イオンを leading solution に加えて分析すると cystathionine のゾーンは完全に消失し、propargylglycine のみが検出されることが明らかとなった。(Fig.1)、Cu²⁺イオン濃度と cystathionine 及び propargylglycine のゾーン長の関係が Fig. 2 に示してある。

上記のように Cu²⁺イオンの存在下で propargylglycine が定量できることが明らかになったので、この方法を用いて、尿中及び組織中の propargylglycine の定量を行なった。その結果が Fig. 3 に示されている。

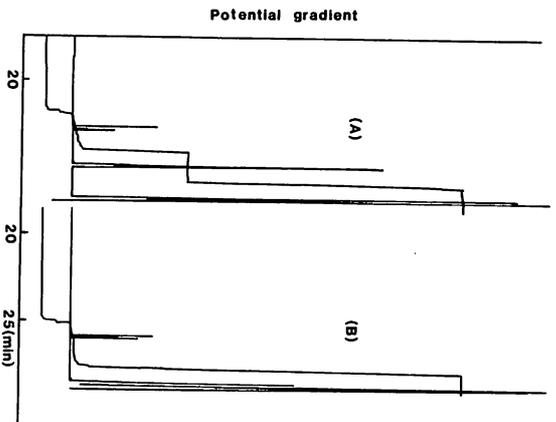


Fig. 1. Isoelectric runs of authentic D-propargylglycine (A) and cystathionine (B).
 Leading electrolyte was 0.01 N hydrochloric acid and 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol (amido) containing 5 % polyvinylalcohol and 0.01N CaCl_2 (pH 8.9).
 Terminating electrolyte was 0.01 N β -alanine and Ba(OH) $_2$ (pH 10.9).
 Chart speed, 10 ml/min.

Changes of D,L-propargylglycine concentration (%)

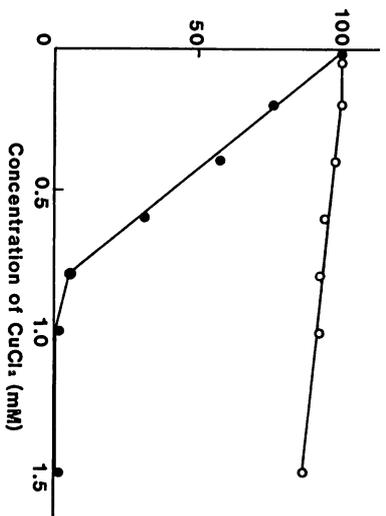


Fig. 2. Effect of amount of CaCl_2 added to the electrolyte for analyses of D,L-propargylglycine and cystathionine. Analytical conditions as in Fig. 1.
 O—O: D,L-propargylglycine, ●—●: cystathionine

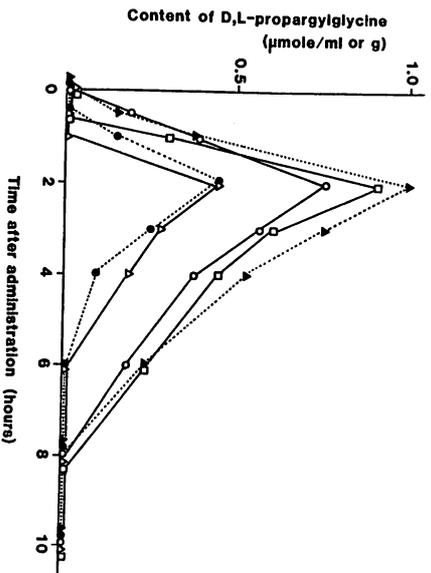


Fig. 3A. Accumulation of D,L-propargylglycine in various rat tissues and serum after the administration of D,L-propargylglycine.
 ▲—▲: liver, □—□: kidney, O—O: kidney, ●—●: serum and Δ—Δ: brain.

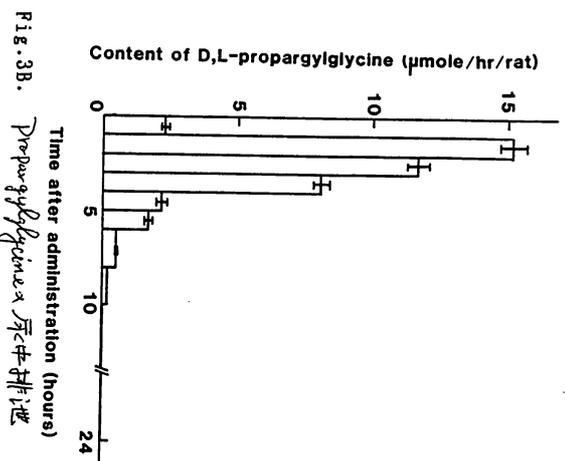


Fig. 3B. Excretion of D,L-propargylglycine in rat urine.

17 細管式等速電気泳動法 によるDNA分析の試み

新潟大学医学部法医学教室 小野政孝、山内春夫、内藤笑美子

我々は、これまで細管式等速電気泳動法（イソタコ）により、ヒト血清及びヒト尿などについて分析を行ってきた。今回、これまで行ってきた血清蛋白の分析とほぼ同じ条件を用いてヒトDNAについてイソタコによる分析を行った。

[方法]

1. ヒトDNAは、7例の末梢血及び2例の精液からDNAの抽出を行い、制限酵素HaeⅢで消化させたものを用いた。また、各試料のDNA量については、あらかじめアガーロースのミニゲルを使用して泳動を行い、泳動終了後、エチジウムブロマイドによる染色を行い、UVトランスイルミネーター上で各試料のDNAの濃度を推定しておいた。
2. イソタコは島津のIP-3Aで内径0.5mmのPEP製キャピラリーチューブを用いた。
3. リーディング液は、5mM HCl-10mM Ammediol-0.1% HPMC 4000、ターミナル液は、10mM 6-Aminocaproic acid-10mM Ammediol(pH10.8)、スパーサー液は、数種類の0.2mM アミノ酸にpH 3.5~9.5のAmpholine(LKB社)が2%となるように加えたものを用いた。
4. エッペンドルフチューブにDNAとスパーサーとを1:3の割合に混ぜ、蒸留水で2倍に希釈して、その2 μ lをイソタコに注入した。
5. リーディング電極-ターミナル電極間で、5分間 150 μ A、次に75 μ Aの定電流で12~20分の泳動を行い、254nmでのUV吸収を記録し、泳動パターンとしてUV吸収を検討した。

[結果及び考察]

1. HaeⅢ消化のヒト末梢血からのDNAの分析では、すべての試料で低電位の領域から高電位の領域にかけ、主なピークとして、それぞれA、B、C及びDの4本のピークが認められた。(Fig.1)
2. DNA量の異なる試料についてイソタコによる分析を行ったところ、DNA量の多いものほどBのピークは高くなる傾向がみられた。
3. 各試料のDNAを95 $^{\circ}$ C、10分間加熱し、急冷したものを直ちにイソタコによる分析を行ったところBのピークの高さが増加する傾向がみられ、A及びDのピークの高さの増加は、殆どみられなかった。(Fig.2)Bのピークの高さの増加については、2本鎖が1本鎖に変性された結果と考えられた。
4. 精製DNAのPlasmid PBR 322(TOYOBO社)についてイソタコによる分析を行ったところ、ヒトDNAのイソタコグラムに一致するピークが認められた。(Fig.3)即ち、このピークは、DNAのピークと考えられた。さらに、PBRの定量性を検討したところ約100ng/ μ lまで直線性が認められた。(Fig.4)
5. UV吸光度法によるDNAの定量では、RNAの混在が問題となる。そこでYeast RNA(25ng)についてイソタコによる分析を行ったところ、ヒトDNAでみられると同様のA、B、C及びDの4本のピークが認められた。(Fig.5)今後、これらピークについて検討を行ってきたい。
6. イソタコによる同一人からの血液と精液からのDNAの分析では、ほぼ同一なパターンが得られた。(Fig.6)

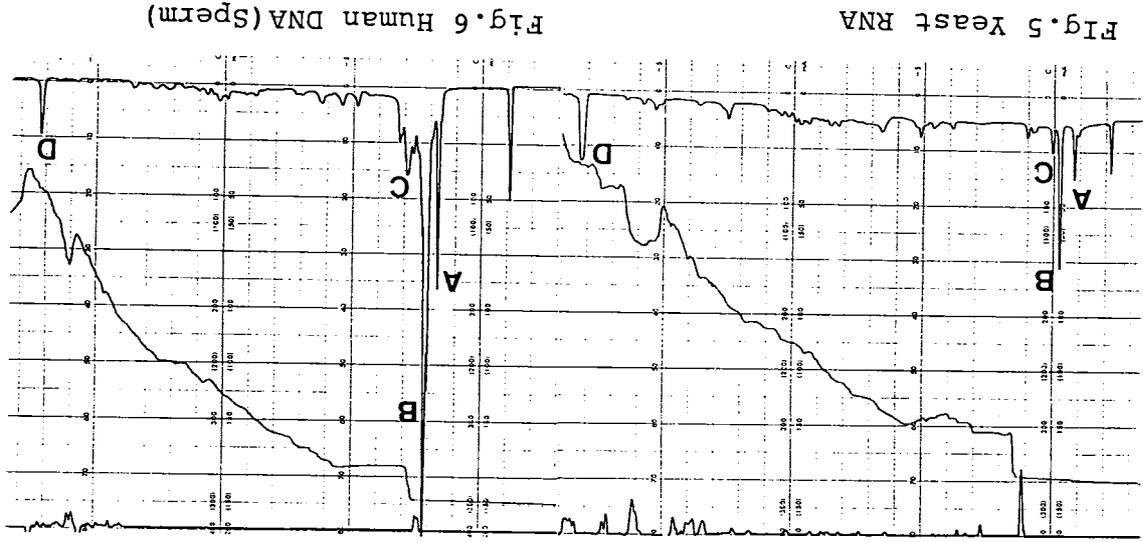


Fig. 5 Yeast RNA
Fig. 6 Human DNA (Sperm)

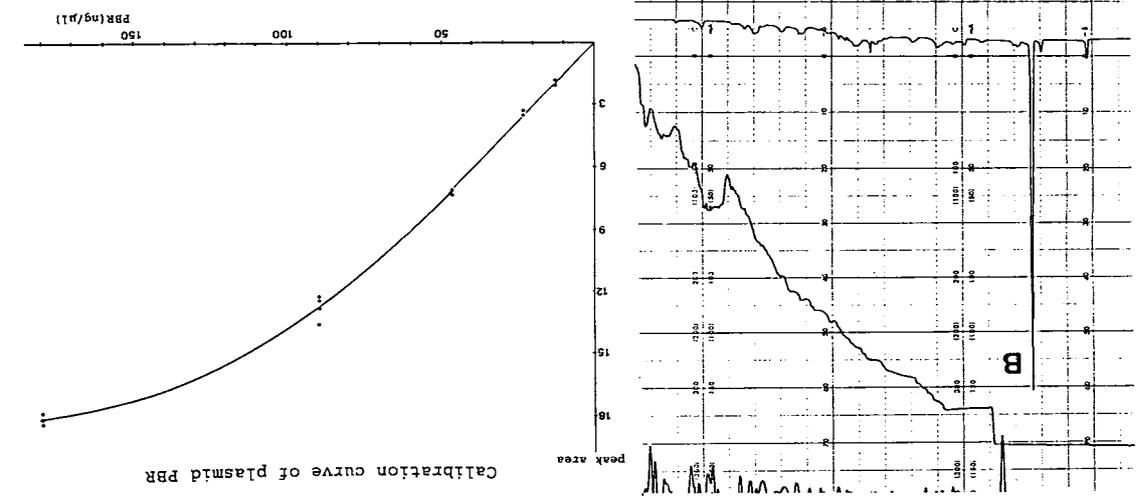


Fig. 3 PBR
Calibration curve of plasmid PBR

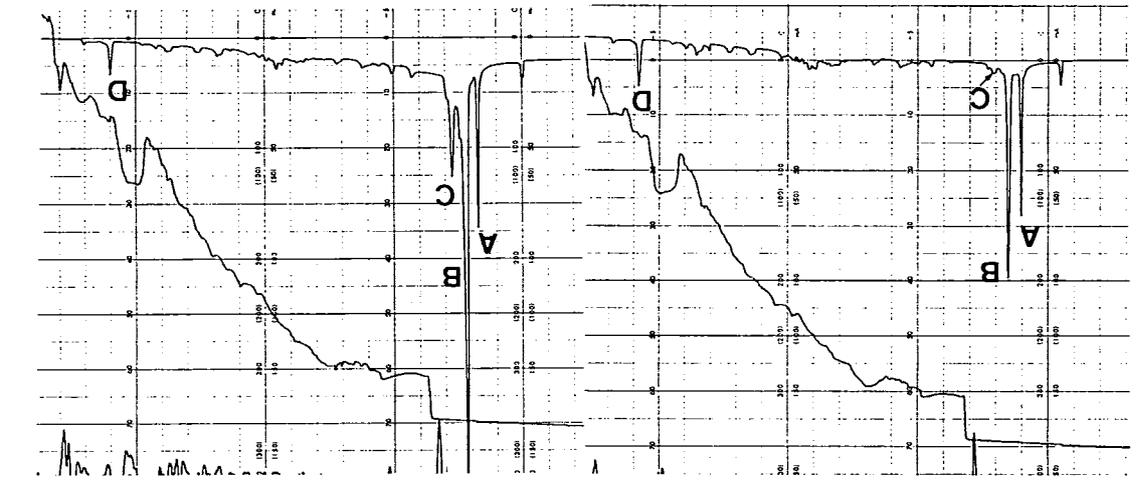


Fig. 1 Human DNA (Blood)
Fig. 2 Denatured human DNA (Blood)

専修大・法 吉田治弘

ヒト血清や各種の動物血清を細管式等速電気泳動法により分析し、血清学的に有用な知見を得ている。特に、白血病、多発性骨髄腫、自己免疫疾患の患者血清では、蛋白量の変化が顕著であった。現在、抗体作製は、モノクロナール抗体が主流になった感が強い。しかし、感染に対する生体側の反応を、血清を指標に観察し、新たな情報を見いだすことも可能である。

実験的にウサギを免疫し、抗体産生に至る、血清成分の変動を細管式等速電気泳動により観察した。また、各種抗原で抗体作成を行なったウサギ血清についての比較を試みた。

実験材料および方法

抗体産生には、体重4 kg以上の白色家兎を用いた。抗原には、カイワレ大根種子抽出液とイヌ血清を等量混合した沈澱、オクタロニー法の沈降線などにコンプリート・アジュバントを加え、1週毎に3回免疫した。採血と免疫のスケジュールは図1にまとめた。また、すでに作成したウサギ免疫血清として抗-ジャガイモ塊茎抽出液、抗-ヒト精漿+虎豆抽出液沈澱(Sementトラ)、抗-M₃(抗-M赤血球)などを用いた。

細管式等速電気泳動装置は1P-2A型(島津)を使用した。分析条件は、リーディング液にHCl-Ammediol-HPMC系を、ターミナル液にはεACA-Ammediol-Ba(OH)₂を用い、プレカラムは10cm x 1.0φ、分析用カラムは30cm x 0.5φとした。試料は7種のアミノ酸とAmpholine pH3.5-9.5などを含むスパーサー溶液にウサギ血清を加え、これらの1μlを添加した。通電は、125μAで15分、さらに75μAで13-15分間実施した。280nmのUV吸収を4cm/min.の速度で記録した。

実験結果

1. 抗体産生過程の血清の観察

ウサギを免疫し、免疫抗体産生時の生体情報として、血清をCITPで分析し、蛋白のUV吸収パターンを図2に示した。免疫前を正常とすると、1週間後にHpに増加が見られたが、Ig域の変化はほとんど認められない。2,3,4週後は、Hpは顕著に増大し、IgM、G域も増加していた。5週間後に、ある個体では血清濃度が上昇した様に、濃縮した血清パターンが見られた。6週間後には、IgM域が若干減少していた。7週間後に、Hpに若干減少が見られた。抗体価をチェックし全放血した。Hpの初期における上昇は、生体内での炎症が考えられる。一般に、まずIgMが産生され、続いてIgGが増大することになっているが、今回は、アジュバントを使用したことで持続的な抗原刺激を受け、明確なIgMの増大を検出できなかった。

2. ウサギ免疫血清の比較

免疫抗体を作製する際に、ウサギの個体差、あるいは免疫法により産生される抗体の力価、血清性状に差異が在る。そこで、アジュバントを用いた抗血清、ならびに赤血球だけで10-20回免疫した抗血清などを比較し、図3に示した。すなわち、正常血清に比して、抗-ジャガイモはHp、IgM、IgG域の増加が観察された。抗-Sementトラは、Hpは少し増加がみられ、IgM、IgG域は顕著な増加を示していた。抗-Mは、Hpは増加が見られたが、IgM、IgGの増加はさほど顕著ではなかった。

図1. ウサギの採血と免疫のスケジュール

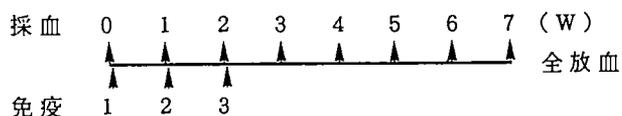


図2. 抗体産生中のウサギ血清のCITP-U V 吸収パターン

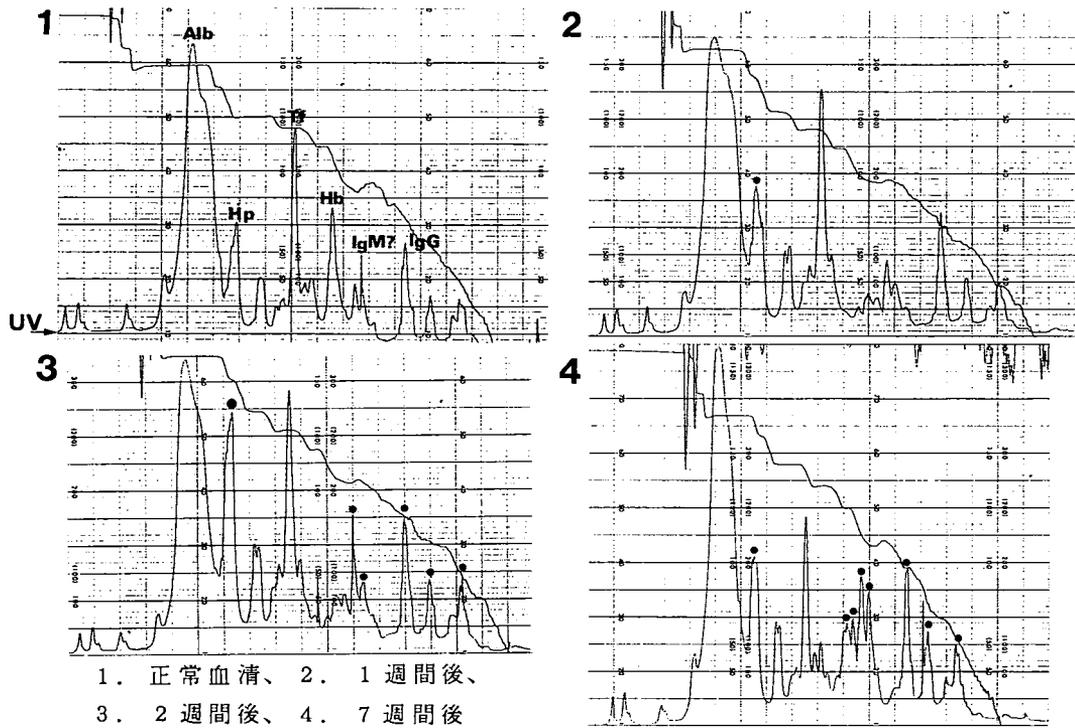
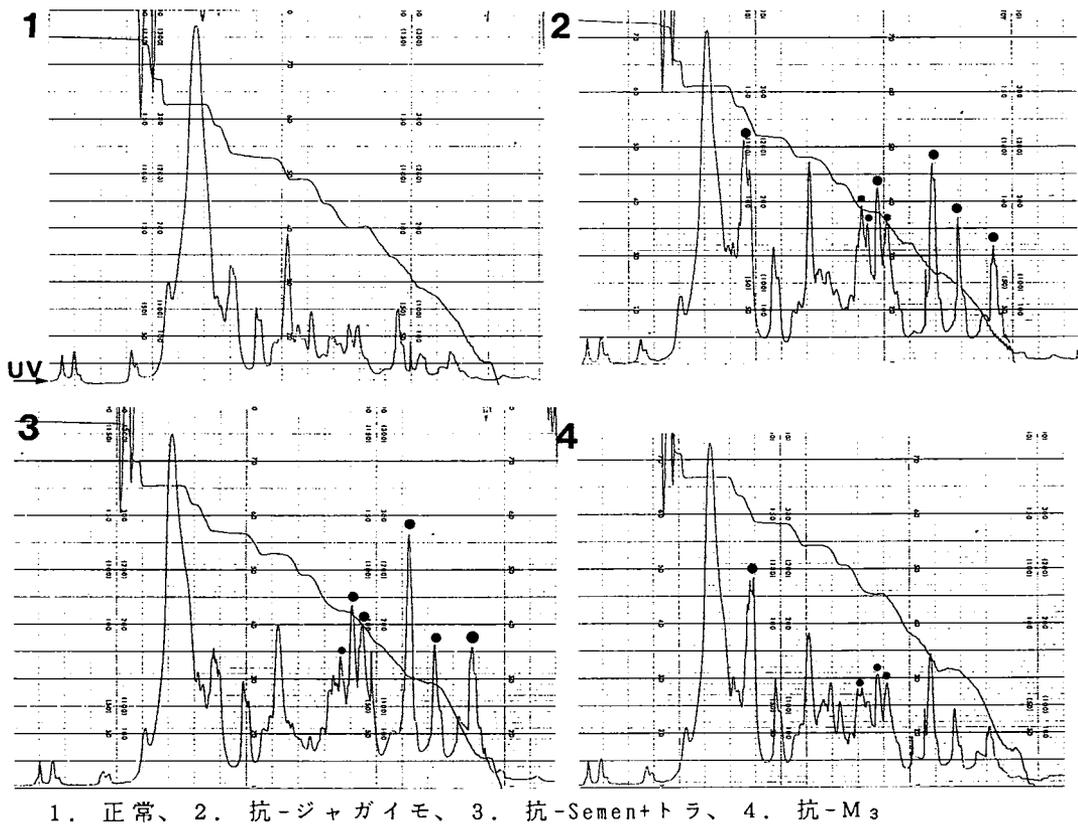


図3. ウサギ免疫血清のCITP-U V 吸収パターンの比較



みやけぶんたろう

さとうはじめ

科学警察研究所 ○三宅文太郎、佐藤元

目的

法科学における毛髪への鑑定は、人毛についての個人間の異同識別を目的とすることが多いが、動物毛の場合には動物の種属の鑑別が主たる目的となる。動物毛の種属鑑別は主として顕微鏡を用いた形態観察により行われているが、動物の体幹を被う毛のうちの上毛については形態的特徴のみで鑑別可能であるが、下毛については種間の形態的類似性が高く、種の判別が困難である。そこで、毛髪を構成しているケラチン蛋白に着目し、すでに、澱粉ゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、二次元電気泳動などによる動物毛の種属鑑別法が報告されている。しかし、微量な資料を用いる鑑別法としては、放射性同位元素を用いるなど、施設の規制、手法の煩雑さがあり実用性に欠ける面もあった。今回、我々は手軽で高感度な細管式等速電気泳動法により、動物毛の種属鑑別が可能かどうかを検討し、SDS-PAGE法とも比較した。

材料及び方法

資料は犬、猫、マウス、モルモット、兎、山羊、羊、鹿、馬、豚、牛の体毛及びヒトの頭毛を用いた。資料を中性洗剤で洗浄後、エタノール、エーテルで脱脂し、この資料10mgについて10mlの0.2M Amediol (pH 10.0, 0.2M 2-メルカプトエタノール、8M尿素を含む)で50℃3時間浸漬した後ガラスホモジナイザーで毛を潰し、15000rpmで30分遠沈した。上清を0.8gのヨード酢酸でアルキル化し、ミニコンB-15で1mlに濃縮後、0.01M Tris溶液に対して透析し、S-カルボキシメチル蛋白(SCMK)溶液を得た。

細管式等速電気泳動装置は島津IP-3A型を用いた。試料溶液は、アミノ酸(Gly, Val, Leu, Glu, Asp, β -Ala, Tricineの各10mg/10ml)溶液0.4mlとPharmalyte(3-10)0.05ml及び蒸留水0.55mlを混和したものをスプレーサーとし、蛋白溶液と1:1に混和したものを1~3 μ l注入した。リーディング液には5mM塩酸-10mM Amediol-0.2% HPMC4000 (pH 8.9)を、ターミナル液には10mM EACA-10mM Amediolを水酸化バリウムでpH10.8になるように調製したものをを用いた。分析カラムはプレカラム1 ϕ x 10cm、分析カラム0.5 ϕ x 30cmで130 μ A 12分、75 μ Aで約15分泳動した。蛋白質の検出は280nmのUV検出器を用いて行った。

結果及び考察

いずれの資料も20~30のピークを示すイソタコフェログラムを示し、動物種間の顕著な差は認めにくかったが、詳細な差異により、種属の鑑別は可能ではないかと考えられた。図1に犬、猫及び人のイソタコフェログラムを示す(矢印の部分がそれぞれ特徴的なパターン)。しかし、緩衝液交換後における微妙な再現性の不安定性も認められるので、同一条件で対照資料も同時に分析する必要がある。今後さらに緩衝液、スプレーサー等のより最適な条件の設定が必要であると考えられる。

また、SDS-PAGEと比較してみたところ、SDS-PAGEでは蛋白バンドの易動度の差や、バンドの太さの差等、明瞭な動物種間の差が認められた。図2に犬、猫及び

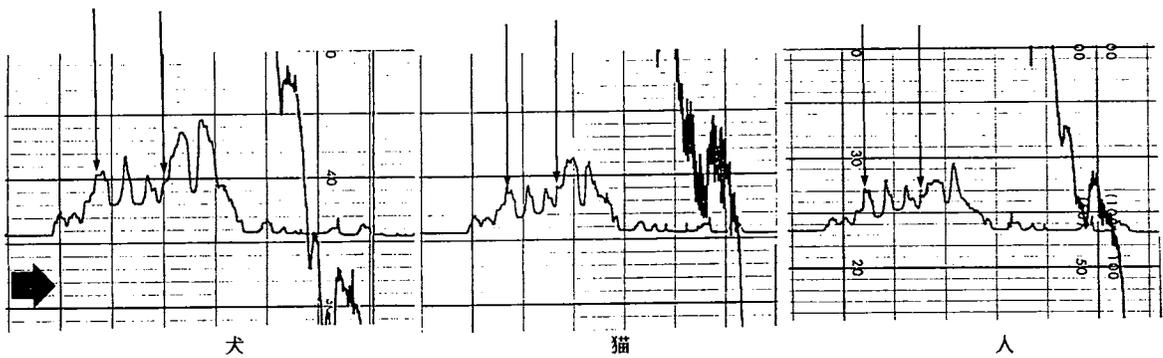


図1 犬、猫及び人の毛のケラチン蛋白のイソタコフェログラム

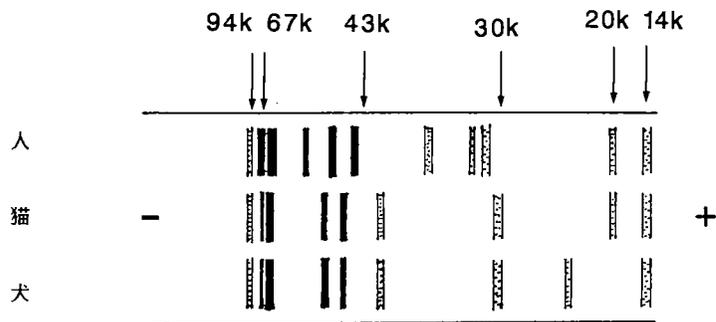


図2 犬、猫及び人の毛のケラチン蛋白のSDS-PAGEパターン(10%PAG)

人の毛のSCMKについてのSDS-10%PAGEの蛋白バンドの差をシェーマで示した。しかし、イソタコではスパーサーを用いるため、基本的にはどの動物毛にもすべてのピークが共通に存在し、差異はその強さ(UV吸光度)になって現れるのみで、微妙な差は実験誤差の中に入り、明瞭な差は見出し難いものと考えられた。ヒト毛髪ケラチンには高硫黄ケラチン(低分子量ケラチン)と低硫黄ケラチン(高分子量ケラチン)に分画できるが(動物毛には、このほか高チロシン-グリシンケラチンがある)、これらに分画し、単独にイソタコ分析したところ、イソタコフェログラム上での全蛋白共通の各ピークを示し(やや偏りはあるが)、高硫黄ケラチンと低硫黄ケラチンはこれらすべてのピークに共通に関与しており、ゲル電気泳動のような明瞭な分離のパターン(例えば分子量順)とは異なった分離のパターンを示し解析が難しいものと考えられた。

特 細管式等速電気泳動法によるイオン分子量・分子体積の推定の試み

九州大学病院・薬剤部 藤下 修

細管式等速電気泳動のチャートと、イオン分子量・分子体積との関係を式で表すのに、どのような定性指標が最もふさわしいか、そして分子量・分子体積の指数、電荷の意味などについて検討し、定性指標と分子量・分子体積の相関式を示した。¹⁻⁸⁾

[1] 相関式の定性指標

細管式等速電気泳動のチャートとして現れるステップの高さは、単位長さあたりの電圧(E)の大きさを表しているので、オームの法則($I = E/R$)により、電流(I)の大きさが変われば、容易に変化してしまう値である。

またPU値は、⁹⁾電流(I)が0の、基点から測定された値ではないので、イオン移動時の抵抗(R)を表す定性指標としては不向きであると考えられる。それにPU値は、ターミナル液を基準にした値なので、同じpHの電解液(ターミナル液)であっても、その組成によって変化してしまう値である。¹⁰⁾

そこで、陰イオン分析のリーディング液として、比較的良好に用いられるCl⁻イオンの高さ(h_L)と、サンプルイオン(h_S)との相対的なステップの高さ($h_R = h_S/h_L$: relative step height)を定性指標とした。¹⁾ 広川らの報告した R_E 値は、これをさらに内部標準物質(酢酸)で補正した、より正確な値であるので、定性指標としてもちいた。
($R_E = (h_S + \Delta h)/(h_L + \Delta h)$)¹⁰⁾

[2] 分子量あるいは分子体積の指数

電気泳動法における、球状粒子の移動度と分子量との関係で、分子量にかかる指数は、1964年、Jokl によって、1/2と報告された。¹¹⁾これは、加速度とストークスの法則から、速度に対して分子量の1/2乗が反比例する、という関係によるものである。

一方、1966年、Offordは、ストークスの法則の、速度に対する半径rの関係から、移動度mと半径 $M^{1/3}$ 、あるいは表面積 $M^{2/3}$ との関係を報告している。¹²⁾しかし、球の体積Vが $4/3 \pi r^3$ であることから、半径rは分子量 $M^{1/3}$ の関数ではなく、分子体積 $V^{1/3}$ の関数である。また、細管式等速電気泳動は、細管という自由空間内での現象であるから、球状以外の物質の抵抗は、流体力学的に、断面積 $V^{2/3}$ との関数として表すのが適当であろう。^{3,5)}

従って、 $M^{1/2}$ あるいは、 $V^{2/3}$ が、移動度あるいは、定性指標(h_R や R_E)の関数として適当であると考えられる。ただし、比重(d)の大きなNO₂基やハロゲン基などを含む有機系イオン性物質では、分子量(M)と分子体積(M/d)とでは下記のような差があることに留意することが大切である(N=115)。^{3,5)}

$$R_E = 1.308 + 0.008 \quad M/|Z| \quad (r=0.719)$$

$$R_E = 1.004 + 0.014 (M/d)/|Z| \quad (r=0.918)$$

また、比重の値が文献¹³⁾によって得られない物質の分子体積は、個々の原子または基の van der Waals Volume ($V_A: \text{\AA}^3/\text{個}$)を加算して求める方法を示した。⁴⁾

[3] 電荷と移動度

ストークスの式の中に、電荷は速度に比例する、と表現されているように、^{11,12)}電荷は、抵抗の大きさを表す定性指標(h_R や R_E)に反比例する。この電荷を相関式に入れ

IPNE 1978 147 (Su #)

ることによって、多価のイオンも、1 価のイオンと同時に扱うことができる。^{1,5,8)} また、これらの式によって描ける $pH-h_R$ 曲線あるいは、 $pH-R_E$ 曲線により、前もって泳動結果を予測することも可能である。^{1-3,6,10,14,15)}

しかし、完全に解離していない状態での、電荷を正確に計算するには、移動度の値が必要である。^{2,3)} この移動度 m_0 は、完全解離状態の R_E 値から、 $m_0 = m_{0,cl} / R_E = 79.08 / R_E$; $m_0 : cm^2 s^{-1} v^{-1} \times 10^5$) によって、近似的に求めることも可能である。^{3,7)} このため、以下の式には、 R_E と m_0 の両方の式を示した。そして、完全解離状態の R_E 値が得にくいアミノ酸やジペプチドについては、 m_0 の式のみを示した。逆に、 R_E 値が必要な場合も上記の式をもちいれればよい。

[4] 相関式の例²⁻⁸⁾ (1) 有機酸

(i) $C_l H_m O_n$ で表せる有機酸²⁾ $R_E = 0.294 + 0.213 M^{1/2} / |Z|$ ($r = 0.961$)
 $(N = 101)^{10}$ $m_0 = 2.357 + 318.0 |Z| / M^{1/2}$ ($r = 0.970$)

(ii) それ以外の元素も含む有機酸(文献¹³⁾により比重の値が得られるもの³⁻⁶⁾
 $(N = 115)^{10}$ $R_E = 0.680 + 0.081 (M/d)^{2/3} / |Z|$ ($r = 0.940$)
 $m_0 = 12.8 + 452 |Z| / (M/d)^{2/3}$ ($r = 0.962$)

(iii) 同(van der Waals Volume により分子体積を求めたもの)^{4,6)}
 $(N = 111)^{10}$ $R_E = 0.544 + 0.083 V_A^{2/3} / |Z|$ ($r = 0.953$)
 $m_0 = 8.44 + 572 |Z| / V_A^{2/3}$ ($r = 0.976$)

(2) アミノ酸^{4,7)} ($N = 22$)¹⁴⁾ $m_0 = 7.4 + 530.4 |Z| / V_A^{2/3}$ ($r = 0.955$)

(3) ジペプチド^{4,7)} ($N = 28$)¹⁵⁾ $m_0 = 7.6 + 570.5 |Z| / V_A^{2/3}$ ($r = 0.985$)

(4) β -ラクタム系抗生物質

(i) セフェム系^{4,7)} ($N = 5$) $R_E = -0.08 + 0.092 V_A^{2/3} / |Z|$ ($r = 0.939$)

(ii) ペニシリン系⁸⁾ ($N = 4$) $R_E = -0.12 + 0.090 V_A^{2/3} / |Z|$ ($r = 0.998$)

[謝辞] 本研究に際し、貴重なデータおよび御助言を頂きました広島大学工学部 広川 健博士、木曾義之教授に感謝の意を表します。また、御指導、御助言を頂きました九州大学病院薬剤部 青山敏信教授、樋口 駿助教授をはじめ、共同研究者の方々に感謝致します。

[文献] (1) Chem. Pharm. Bull., 31, 2134 (1983). (2) Chem. Pharm. Bull. 34, 1344 (1986).

(3) Chem. Pharm. Bull., 34, 5026 (1986). (4) Chem. Pharm. Bull. 36, 3985 (1988).

(5) 第5回細管式等速電気泳動分析シンポジウム講演要旨, pp. 13-14 (1985).

(6) 第6回細管・等速電気泳動分析シンポジウム講演要旨, pp. 1-2 (1986).

(7) 第7回細管・等速電気泳動分析シンポジウム講演要旨, pp. 1-2 (1987).

(8) 第8回電気泳動分析シンポジウム(細管・等速電気泳動)講演要旨, pp. 37-38 (1988).

(9) H. Miyazaki, K. Katoh, J. Chromatogr., 119, 369 (1976).

(10) T. Hirokawa, M. Nishino, N. Aoki, Y. Kiso, Y. Sawamoto, T. Yagi, J. Akiyama, J. Chromatogr., 271, D1 (1983).

(11) V. Jokl, J. Chromatogr., 13, 451 (1964). (12) R. E. Offord, Nature, 211, 591 (1966).

(13) 日本化学会編, "化学便覧基礎編I" 第1版, 丸善, 東京, 1966, pp. 165-360; M. Windholz (ed.), "The Merck Index", 10th ed., Merck and Co., Inc., U.S.A., 1983.

(14) T. Hirokawa, T. Gojo, Y. Kiso, J. Chromatogr., 369, 59 (1986).

(15) T. Hirokawa, T. Gojo, Y. Kiso, J. Chromatogr., 390, 201 (1987).

鈴木公一 (日本大農獣医)

目的: 冷凍すり身の品質は、冷凍法に依る規格・等級が水分含量・添加物量・品質(ヒリ一強度)に依り決められている。また、すり身製造業者による自社格付が示されてくる。その実際は、原料魚の添獲後の経過日数により分類され、原料魚の添獲時期の違い、原料処理の際の臭気等による違いがあるように思われるが、品質の項目のみに依り、原料の範囲の広い、第一性に欠ける格付になる。このため、冷凍すり身を原料として食品加工を行、使用する際は、原料使用の程度必要の加工を行、その品質・物性をチェックした後、本製造を行、おなじみの手間と経費を要する。そこで、冷凍すり身の格付に依り、第一性を保持させること、利用者側の品質チェックを簡便化することを、すり身の品質を大きく左右する蛋白質に着目し、蛋白質の差異と物性との相関を検討し、現行の格付に対する比較を行い、イソグルコース品質測定が可能と性を検討した。

実験方法: 実験に用いたすり身は、洋上加工品 SA 級と A 級とを陸上加工品 2 級の等級の異なる 3 品目を使用した。

冷凍すり身は、すり身重量の 2.8% の塩を加え、10% のでんぷんを加え、水分含量 13% になるように調整し、撹拌後に直径 25mm のケーシングに詰め、内圧をハードネススグーを用いて同一内圧に整え、90℃20 分間の加熱処理を行い、冷却後不動産工業社製 L オキローを用いて物性値測定を行った。

電気泳動用試料の調整は、冷凍すり身に対し、0.06M バルビツール緩衝液とグリセロールを等量混合した緩衝液 5 倍量を用いてホモゲナイズし、12000 回転 5 分間の遠心分離の後、上澄液にホリスクリルミド粒子を用いて濃縮し、ゲルを 3 過分離して得た。

イソグルコース分析条件は、先行液として 0.1% トロピコキプロピル・メチルセルロース-スルフィド、5mM・2E(ホリスクリル)・エグジスルホリ酸を 10mM・2E(ホリスクリル)を溶解、さらに、この先行液 100ml に対し、キヤリテッドホライト(商品名バキオール)を溶解、さらに、この先行液 100ml を 0.5ml 混合し pH 調整を行った。終末液は、5mM・6E(ホリスクリル)を 10mM・2E(ホリスクリル)を溶解し、pH 調整した。

キヤリテッドホライト-チューブには、内径 1mm で長さ 40mm のアクリル管内径 0.5mm で長さ 300mm のキヤリテッドホライト-チューブを挿入して用いた。

泳動電流は、初期電流として 125 μ A を 14 分間流した後 15 μ A の電流を流して行った。結果及び考察: 先行液にキヤリテッドホライトを混合した事により、アクリル管において少しの UV 吸収が見られたが、試料の UV 吸収が大きい分析に影響はなく、試料調整が簡易に行えた。

カズボコ製造途中の粘度測定では、SA 級で 440 \pm 373、A 級で 521 \pm 410、2 級では 385 \pm 300 ポイントを記録し、A 級が最も粘度が高かった。製造後の物性値測定では、ヒリ一強度が SA 級で 1014.9 \pm 1207.9、A 級で 1252.7 \pm 1284.3、2 級で 987.0 \pm 967.3 であり、物性値から依り製品製造特性を考慮すると 3 品目の内で A 級が最も良好であり、次いで SA 級、2 級の順であった。しかしながら、冷凍すり身製造業者による格付は考慮される

と、SA級が最も特性が高く、次いでA級、2級の順であるわけで、格付けの不適合とが見られた。

SA級は、PI3付近に小さなピークがあり、PI5付近に最も高いピークが見られPI6付近までに大小5つのピークが認められた。A級は、PI5以下には、きりと2つのピークが認められた。最も高いピークはSA級と同じであり、それよりも高いPIを持つ、たピークが大小やはり5つ見られ、量的にはSA級よりもかなり多かった。2級では、PI4付近のピークが少し大きく見られ、PI5付近の最も高いピークは前品目と同様であり、それよりも高いPIをもつピークについては、量的にSA級よりは少し多いがA級よりはあきらかに少なかった。

3品目のイソタコフェログラムを比較してみると、三者ともピークの数は大小合わせて10程度認められ、そのPIは3~7付近までであり、アルカリ側にはピークは明瞭には認められなかった。しかも各ピークは3品目とも類似しており、等電点電気泳動により魚種判別が可能であることから考え、原料魚のすけそうだら由来の蛋白質ピークと考えられる。

また、3品目間でのピークの大小の違いは蛋白質の量の割合の違いであり、しいては物性値の差として品質の差になつて現われているものと思われる。このイソタコ分析による結果と、レオメーターによる物性値測定の結果を合わせて考え、PI値の低い水溶性蛋白質の中には加熱によるゲル化を生じないものがあると、山田氏報告しているが、この加熱によつてもゲル化しない蛋白質は、ジェリー強度に対し負の影響を与えるものと考えられる。今回の場合PI3あるいはPI4付近の蛋白質の量がジェリー強度をそこない、逆にPI5~6における蛋白質はゲル化することから、ジェリー強度に正に付与すると考えると、3品目の冷凍すり身の物性測定値と相関があるように見受けられた。すなわち、A級が最もジェリー強度が高かつたわけ、PI3及び4付近のピークは認められても小さく、PI5~6付近のピークは3品目中最も多かった。次いでジェリー強度を持った物はSA級であったが、PI3及び4付近のピークは最も小さかつたが、PI5~6のピークも小さかつた。ジェリー強度の最も低かつた2級は、PI3及び4付近のピークが3品目中最も大きく、しかもPI5~6付近の蛋白質の量は多くなかつた。以上の事から、PI3及び4というより酸性域に等電点を持つ蛋白質の量とPI5~6付近の加熱によりゲル化する蛋白質の量によりジェリー強度は変化するものと思われた。

また、ポリアクリルアミドゲルによる等電点電気泳動も併せて行つたが、PI3及び4付近の蛋白質のバンドが明瞭でなく、分析時間も長くかつた。イソタコを用いることにより、より詳細な分離が短時間で得られることが確認された。

以上のことから、イソタコを用いての冷凍すり身の品質判定が、PI4以下の蛋白質量とPI5以上の蛋白質量の比率により表現できるのでないかと思われた。

本実験を行うにあたり、試料調達に多大な御助力をいただいた、株式会社丸善及び東京研究所の皆様はこの紙面をかりて御礼申し上げます。

21 ニンジンの冷凍処理が硬さと組織形態の変化及びリンゴ酸の煮汁への流出に及ぼす影響について

広島大学 学校教育学部 田村咲江

1. はじめに

植物細胞の持つ細胞壁は組織に硬さを与える一種の骨格のような役割をしているが、それを野菜として考えた場合、細胞壁の性状がその野菜の触感を大きく左右することになる。野菜の中でもニンジンにはしばしば冷凍貯蔵して用いられるが、冷凍処理を行うと著しい軟化をきたし、野菜特有の歯ごたえを失う。今回、冷凍ニンジンにある程度の硬さを残すために、水で60℃30分予加熱を行ったのち冷凍し、予加熱が硬さと組織形態に及ぼす影響を調べた。更に、組織の崩れと低分子の呈味成分の損失との関係を検討するために、ニンジン中に比較的多量に存在する有機酸であるリンゴ酸の煮汁への流出量を測定した。

2. 実験材料及び方法

五寸ニンジンの一定部位から1cmの輪切りを切り出して放射状に切り分けて用い、硬さの測定及び組織観察は皮層部で行った。リンゴ酸の流出量の測定には皮層・篩部から1cmの角切りを切り出して用いた。

予加熱は水中で60℃30分、煮熟は熱水で2.5, 5, 10分、冷凍処理は-31℃で2日間行い、その後緩慢解凍して更に5分煮熟した。硬さは2mmφ円柱状アダプターをつけたレオメーター(NRM2002J)により測定した。組織観察試料は、試料片の外表面から1mm³角を切り出し、グルタルアルデヒドとオスミウム酸で二重固定したのち、エポキシ樹脂に包埋した。光学顕微鏡観察のためには1μm厚さの切片をトルイジンブルー染色し、透過型電子顕微鏡観察のためには酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色を行った。

リンゴ酸の測定のためには、ニンジン60gを200mlの熱水で加熱した。測定は細管式等速電気泳動装置IP-3Aで行い、テフロン細管はi.d.φ0.7mm(80mm)とi.d.φ0.5(160mm)、リーディング液は2mM CaCl₂を加えた10mM HCl、Creatinine(pH 5.0)、ターミナル液は10mM Sodium Caproateを用いた。他に予加熱の前後のニンジン中のリンゴ酸を定量して、予加熱中にリンゴ酸が増すかどうかを確かめた。

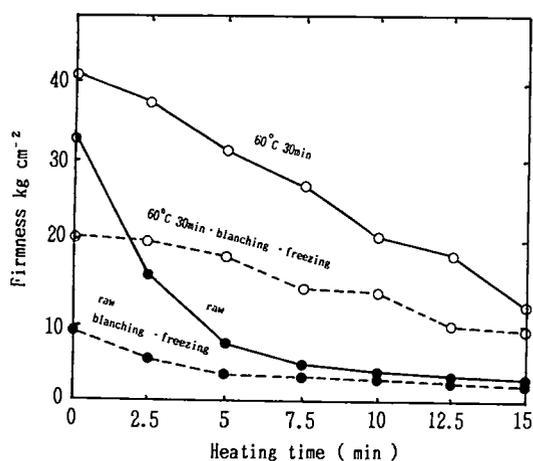


Fig. 1 Changes in firmness of carrot pieces cooked in water

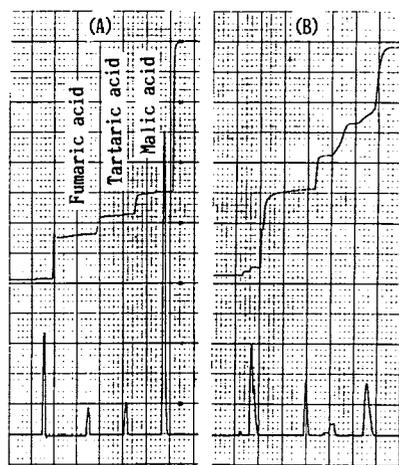


Fig. 2 Isotachopherograms of acids(A) and extractive from carrot pieces boiled in water for 10 min(B)

3. 結果及び考察

① 硬さの変化 ニンジンを熱水で煮熟すると時間の経過とともに軟化し、10分以後ではほぼ一定となった(Fig.1)。ブランチング(煮熟2.5分)後冷凍したものは、解凍直後で生鮮時の硬さの30%となり、その後煮熟5分で生の10分煮と同等の硬さとなった。一方60℃30分予加熱したものでは、生鮮時以上の硬さとなり、その後の冷凍・煮熟によっても無処理に比べて著しく高い硬度を示した。

② 組織形態の変化 ニンジンの皮層部柔組織は直径約60 μ mの細胞からなり、細胞内のほとんどは巨大な液胞で占められている(Fig.4a)。細胞間を仕切る細胞壁は、各細胞の第一次壁が中層で密着されて一枚の壁をなしている。水で10分煮熟すると細胞壁の中層での分離が起こり、組織の軟弱化を示す像を呈した。ブランチング後冷凍し、解凍後5分煮熟したもの(Fig.4b)では、細胞内に氷結晶の跡と考えられる空隙を生じるとともに、柔細胞間の顕著な分離が認められた。一方、60℃30分予加熱・2.5分ブランチング・冷凍・解凍後5分煮熟では、氷結晶生成による空隙はあるものの細胞壁の損傷がきわめて少なく、このことが軟化が抑制された原因と考えられた(Fig.4c)。透過型電子顕微鏡観察においても同様の結果が裏付けられた。

③ リンゴ酸の煮汁への流出 上記の測定条件によりリンゴ酸の分離測定が可能であったので(Fig.2)、各種処理を施したニンジンの煮汁のリンゴ酸量を測定した(Fig.3)。煮熟によりかなりの量のリンゴ酸が流出するが、冷凍処理により更に溶出が大となった。これは組織の崩壊が原因と考えられる。しかし60℃30分予加熱したものでは、組織の保存がよく高い硬度を示したにもかかわらず、溶出量は大きであった。細胞内の低分子成分の流出には、細胞壁ばかりでなく細胞膜の変性が大きく関係していることが示唆された。

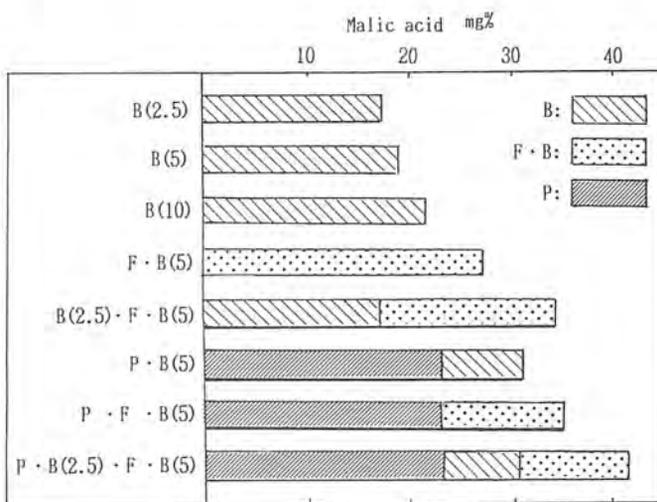
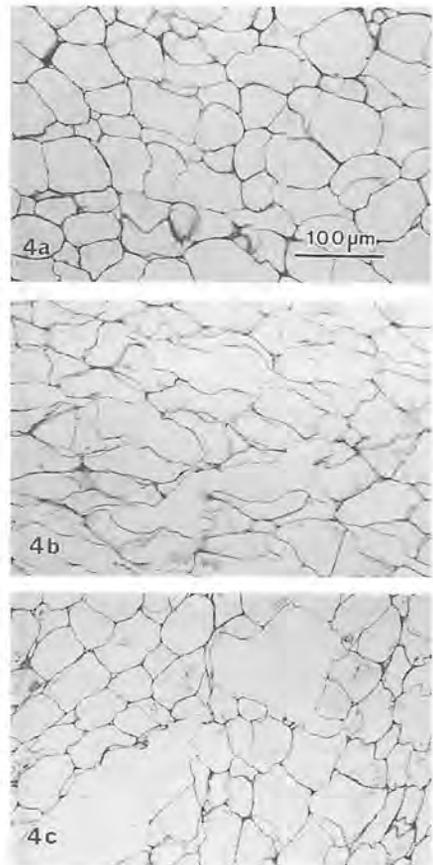


Fig. 3 Outflow of malic acid from carrot pieces into cooking media
B: Boiled (min), F: Frozen, P: Pretreated at 60°C for 30 min.



Figs. 4a~4c Light micrographs showing cortex parenchyma from carrot
(a):raw, (b):blanched for 2.5 min, frozen, and boiled for 5 min, (c): pretreated at 60°C for 30 min, blanched for 2.5 min, frozen, and boiled for 5 min.

共立女子短期大学

○津田 淑江

(目的) 現在の食生活において加工食品の占める割合は高くなってきている。特に単身赴任、核家族化の進行、主婦の職場進出などにより惣菜を購入する機会が増加してきた。これらの内で薬物野菜（キャベツやレタスなど）を千切りなどに細かくカットしたカット野菜はビニールの袋に詰められただけの簡易包装で売られている。またファーストフード、ファミリーレストランなどでも業務用のカット野菜はかなり利用されており、現在の食生活に深く浸透してきている。しかしこれほど現在の食生活と密接になってきたにも関わらず、その品質について懸念する向きある。野菜にはビタミン類、中でもアスコルビン酸が多く含まれているのが特徴である。しかしアスコルビン酸は放置、調理による損失率は高く、また紫外線や酸素などの存在により容易に酸化されることが知られている。一方カット野菜は前処理、カット、洗浄、冷却、脱水、包装の工程で行われている。そこでキャベツの切り方、処理方法の違い、加熱時間の違いがキャベツ中のアスコルビン酸量にどのような影響を与えているか検討してみた。また自家製カット野菜を作り、その中のアスコルビン酸の定量を行い、市販カット野菜との比較検討を行った。

(試料及び実験方法) 試料としてはキャベツを千切り、短冊切りにし切り方、浸水時間、加熱時間の違いによりキャベツ中のアスコルビン酸の残存量を測定した。また千切りキャベツを市販カット野菜と同様ビニール袋に密封した自家製カット野菜と市販カット野菜中のキャベツに含まれるアスコルビン酸の定量を製造日より4日目まで経日的に行った。

アスコルビン酸の測定は従来法のインドフェノール法及び細管式等速電気泳動法(I.P.法)により行った。

試料からのアスコルビン酸の抽出はインドフェノール法により定量する場合はメタリン酸を用いた。I.P.法による定量には2%チオ尿素-0.01N HClを用いて抽出を行った。これはメタリン酸の移動度がクロロイオンとアスコルビン酸の移動度の間にあり、しかも抽出に

Table 1 Isotachoelectrophoretic condition for analyses of AsA.

Leading electrolyte	
Anion	Cl ⁻
Concentration	0.01 N
Counter ion	β-Alanine
pH	3.6
Terminal electrolyte	
Anion	Caproic acid
Concentration	0.01 N
pH	3.4
Electric current (μA)	50
Additive	PVA 2,000 0.05%
Capillary tube	0.5%, 20 cm
Controlled temperature (°C)	20

PVA: Polyvinyl alcohol

Table 2 Isotachoelectrophoresis conditions for analysis of ascorbic acid.

Leading electrolyte	
Anion	Cl ⁻
Concentration	0.01 N
Counter ion	Ethanolamine
pH	9.4
Terminal electrolyte	
Anion	β-Alanine
Concentration	0.01 N
pH	10.0
Electric current (μA)	100
Additive	HPC 0.1%
Capillary tube	φ 0.5 mm, 20 cm
Controlled temperature (°C)	20

酸化

DHA



市販

カットASA 262 巻7

ASA
R

用いるため、溶液中に多量に存在し、アスコルビン酸のゾーン出現までに長時間を要してしまうためである。

I.P.法の泳動条件はTable 1及び2に示すようにリーディング液として0.01N塩酸-β-アラニン (pH 3.6) を、ターミナル液として0.01N n-カプロン酸を用いる系と、リーディング液を0.01N 塩酸-エタノールアミン (pH9.4)、ターミナル液 0.01N β-アラニン-エタノールアミン (pH10.0) を用いる系の二系で行った。

(結果及び考察)

1) 切り方、処理方法の違いによるアスコルビン酸の残存量の変化

キャベツを千切り、短冊切りにし室温放置、浸水、加熱の操作を行いキャベツ中のアスコルビン酸が経時的にどのように変化するかを見た。その結果Fig.1に示した通り未操作、短冊切り10分浸水、千切り10分室温放置、千切り10分浸水千切り3分加熱、千切り30分加熱の順にアスコルビン酸が減少の傾向を示し、アスコルビン酸は酸素、熱、アスコルビン酸化酵素などの存在により破壊されやすい水溶性のビタミンであることが確認された。

2) カット野菜中のアスコルビン酸量

市販品カット野菜の製造日から4日目までのキャベツの中に含まれるアスコルビン酸量の測定を行った結果経日的なアスコルビン酸量の変化は少なかったが、市販のキャベツ中アスコルビン酸含有量の約60%に減少していた。しかしキャベツより作った自家製カット野菜のアスコルビン酸の損失量は約6.7%にすぎなかった。

野菜はカットされ空気中の酸素にふれるだけでアスコルビン酸量が減少する。市販カット野菜は野菜の日持ちを良くするためカットした後さらに洗浄するという処理が行われているためアスコルビン酸残存量は少なくなっていた。

Fig.1 調理方法の違いによるV-Cの残存量

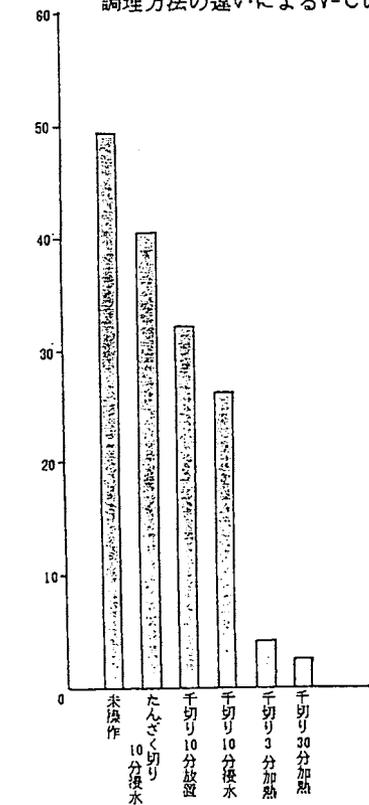


Table 3 カット野菜のアスコルビン酸量と価格

	1パック中の キャベツ量 g	100g中の V-C量 mg	1パック当り のV-C量 mg	価格 円	1mg当り の価格 円
A店	32.35	27.98	9.05	100	11.05
B店	54.10	30.57	16.54	200	12.09
C店	45.30	28.83	13.08	98	7.50
D店	80.50	30.36	24.44	188	8.87
自家製	50.00	49.85	24.97	25	1.00

太林大 保健 平岡 厚, 三浦 勇夫
(ひらおか たくし, みづら いさお)

ダイオウ (*Rheum palmatum* 等の鱗茎) 及びセンナ (*Cassia angustiflorum* 等の葉) は, 下剤として使用される植物性生薬として著名であり, その有効成分は, 広義のanthraquinone系化合物であるanthrone 2量体であるsennoside類であることが知られている。現在までに, のべ6種類のsennoside化合物 (sennosides A-F)が, 他のmonoanthraquinone系成分とともに両生薬から単離同定されているが, 主成分はいずれも2,2-dicarboxyl基を持つstereoisomerの関係にあるsennoside A及びB)である (Fig. 1)。故に, 両生薬中のsennoside含量, 特にsennoside AとBを検出 定量することは, それらの生薬の品質の評価等植物化学・生薬学的研究において重要である。現在行なわれている方法には, 呈色反応やUV, ポーラログラフイー等で全sennoside (aglyconeとして) 含量を定量するもの及びTLC, PC, HPLC等で各成分を分離した後, 主成分のsennoside AとBを定量するものがある。我々はここに, 細管式等速電気泳動法を後者の一つとして検討することにした。

[材料] ダイオウ及びセンナの乾燥粉末は, 東京(両生薬), ホンコン及び台湾の台北 高雄の漢方薬専門店(ダイオウ)にて購入した。sennoside類は銅含有amine oxidase阻害物質の検索の研究において両生薬より得られたもの¹⁾及びフナコシの標品で, うちsennoside D,Fは, sennoside C,Eよりisomerization²⁾によって得たものである。

[方法] 装置は島津IP-2A (PGD-2 Potential Detector 付)であり, 分離は20°Cに維持されたテフロン細管 (0.5mm X 4cm + 1mm X 15 cm)の中で, Leading液に0.01M HCl-tris (pH 8.5)(最終濃度66.7%のメタノールを含む), terminal液に0.01M valine-triethanolamine (pH 9.9)を使用して行なった。試料は各生薬材料を10倍量 (ml/g)の60%メタノールにより50°C, 2時間抽出して得た粗抽出液及びそれらより所定の方法で精製して得たsennoside含有画分又は標品の0.5%NaHCO₃水溶液 (<1mg/ml)で, 0.5-5 µlを注入して200 µA, 8分→100µAで泳動し, 検出は電位勾配によった。chart speedは20又は40mm/minであった。

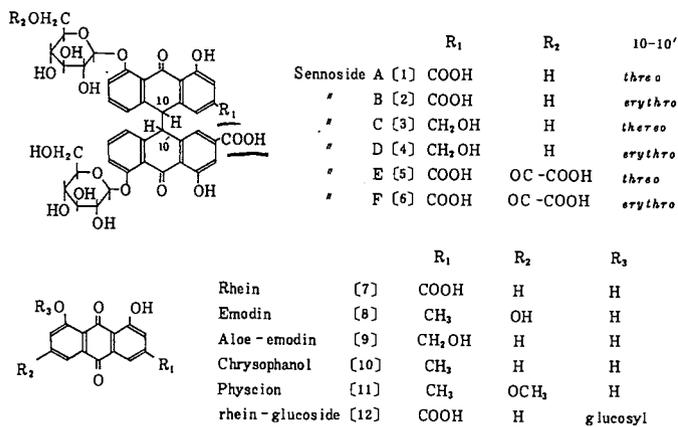


Fig. 1 Structures of sennosides and related compounds

[結果及び考察] 用いられた泳動条件下で、sennoside類はE,F,A,B,C,Dの順に大きな移動度(小さなPU値)を示して各々のzoneに分離した(Fig. 2)。生薬粗抽出液では、主成分のsennosideA(PU: 0.40)及びB(PU: 0.47)が標品とのmixed chargingに於けるzone長の延長によって同定され(Fig. 3)、又、その他の微量成分(sennoside C,D,D,F)も精製されたsennoside含有画分のisotachopherogram上には検出された。sennosideA,Bに関しては、両生薬とも粗抽出液中含量が高く(濃度として、数十 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上)、他のanion性成分(有機酸, polyphenoles, monoanthraquinones等)ともPU値が異なっており、又、標品を用いて定量性を調べたところ0.5 μg の範囲で良好であった。そこで、ロットの異なる材料の粗抽出液を用いて、両主sennoside成分(A,B)の上記細管式等速電気泳動法による定量を行なった。その結果、初期の研究者の報告と同様に、センナ(B: 0.07-0.11 wt%, A: 0.03-0.05 wt%)とダイオウ(A: 0.05-0.40 wt%, B: 0.02-0.14 wt%)で両者の含量比が大きく異なっていること及びダイオウはsampleにより主sennoside成分総量にかなりの差異があることが示された。ダイオウの産地によるsennosideA,B含量の変異及びTLC法(silica-gel G plateを用いてethyl acetate:isopropanol:H₂O=4:3:3の溶媒系で展開後、Rf=35(A)及びRf=0.23(B)付近をかきとり一定量の0.5%NaHCO₃で抽出し270nmの吸光度を測定)による値との比較についても検討を加える予定である。

[参考文献]

- 1) Hiraoka, A. et al.: Chem. Pharm. Bull., 37, 2744 (1989)
- 2) Oshio, H. et al.: Chem. Pharm. Bull., 22, 823 (1974)

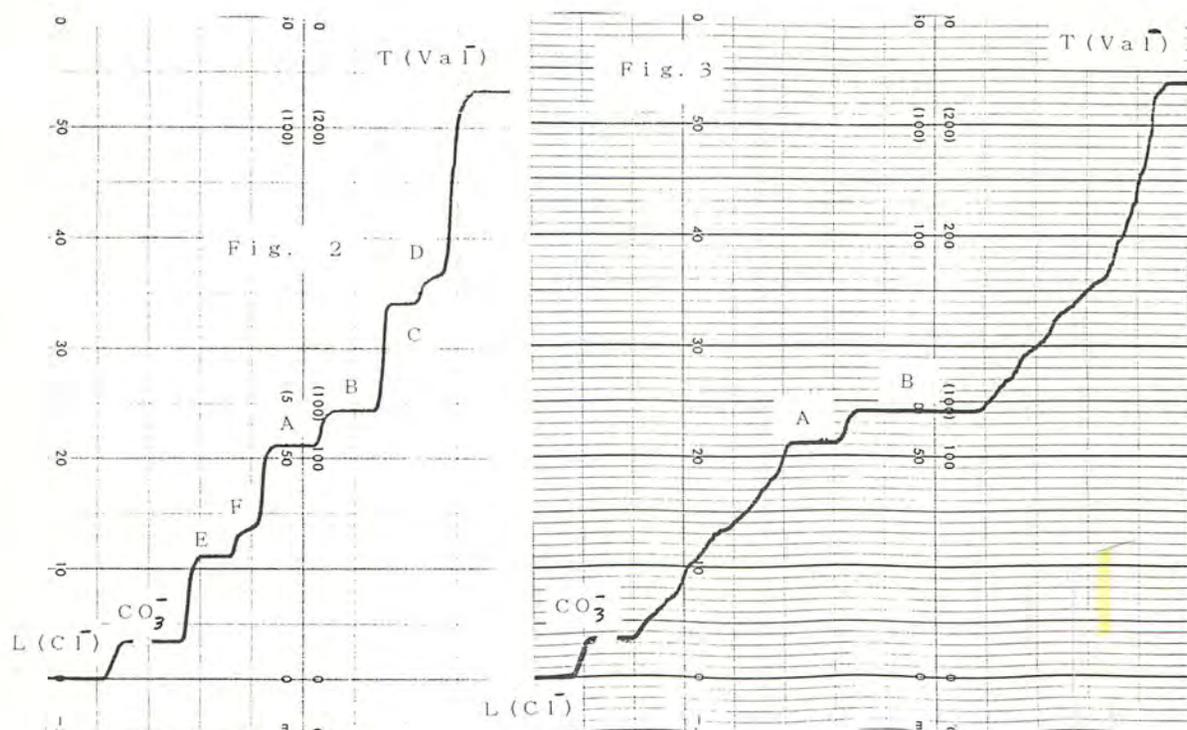


Fig. 2. Isotachopherograms of sennosides

Fig. 3. Isotachopherograms of the mixture of a daiou crude extract and an authentic sennoside B solution (粗抽出液中のみではsennosideA Bであった(本文)が、標品とのmixed chargingでは後者のzone長が増大して逆転している)

