

# 第5回等速電気泳動シンポジウム

昭和60年12月11日(水) 13:00~16:50

12日(木) 9:30~16:15

## プログラム

きつこ前かがりマキウ行後  
びふろ

### 第1日 12月11日(水)

- |               |  |                  |                                      |
|---------------|--|------------------|--------------------------------------|
| (13:00)       | 開会の辞   | 広大・工             | ○木曾義之                                |
| (13:10~14:10) |  |                  |                                      |
| 1.            | フューズドシリカキャピラリを用いた新しい等速電気泳動分析装置                             | 島津・計測            | ○小林章一・水野俊英<br>八木孝夫・秋山純一              |
| 2.            | 等速電気泳動法における分離過程の解析(2)                                      | 広大・工             | ○高羽 均・広川 健<br>木曾義之                   |
| 3.            | PG微分処理法による等速電気泳動図のマイコンによる解析                                | 城西大・理            | ○小林英三朗                               |
| (14:10~15:30) |  |                  |                                      |
| 4.            | 高電圧キャピラリー電気泳動による分離(4)                                      | 名工大・工            | ○津田孝雄                                |
| 5.            | キャピラリ電気浸透クロマトグラフィーによるけい皮酸関連化合物の分析                          | 鐘紡薬品研<br>近畿大・薬   | ○藤原 茂<br>本田 進                        |
| 6.            | 等速電気泳動法におけるホルムアルデヒドの効果                                     | 島津・応技            | ○八木孝夫・児嶋佳世子                          |
| 7.            | 細管式等速電気泳動法によるイオン分子量の推定—相関式の精度に及ぼす電荷および比重の影響—               | 九大病院・薬剤          | ○藤下 修・福岡龍一<br>平川雅章・樋口 駿<br>青山敏信・堀岡正義 |
| (15:30~16:50) |  |                  |                                      |
| 8.            | 細管式等速電気泳動法による海水中のストロンチウムの定量                                | 神戸商船大<br>大工試     | ○福士恵一<br>日色和夫                        |
| 9.            | 水溶性染料および中間体の等速電気泳動挙動                                       | 大阪府・工研           | ○蔵本暢浩・浅尾勝哉                           |
| 10.           | 等速電気泳動法によるトマトのアスコルビン酸定量について                                | お茶の水女子大<br>共立女子大 | ○津田淑江<br>福場博保                        |
| 11.           | 細管式等速電気泳動法による2-methyl-4-amino-5-amino-methyl pyrimidineの定量 | 山口女子大            | ○二五田公俊・西村妙子<br>松尾美春                  |
| (17:30~20:00) |  | 懇 親 会            |                                      |

第2日 12月12日(木)

(9:30~10:30)		
12. 等速電気泳動法による清酒のキャラクタリゼーション	広島県食工技セ 広大・工	○清水加津子・天道俊孝 広川 健・木曾義之
13. 細管式等速電気泳動法による製剤中のグルクロノラクトンの定量	大洋薬品	○近藤紀巳・長谷川孝人 大平一夫
14. 細管式等速電気泳動法の医薬品分析への応用(第8報)生薬分析への適用について	徳島文理大・薬	○香西重忠・赤田良信
(10:30~11:10)		
15. 細管式等速電気泳動法によるパラコート の分析(その2)	島津・応技	○日根 隆
16. 細管式等速電気泳動法による内部標準法を用いたリン酸塩の分析	神戸大・教養 神戸女薬大	○本岡 達・中崎和実 成相裕之, 津波古充朝
(11:10~12:10)		
17特. 等速電気泳動分離のシミュレーションシステム(SIPS)について	広大・工	○広川 健
(12:10~13:10)	昼 休 憩	
(13:10~14:10)		
18. ジヌクレオチド類の等速電気泳動とDNA認識型小分子の影響	九大・工	○道津邦彦・高木 誠
19. フラボノイドの等速電気泳動による分離	杏林大・保健 信州大・理	○平岡 厚 吉玉国二郎
20. メシル酸デフェロキサミンの測定について	白鷺病院	○山本忠司・山川 真
(14:10~15:10)		
21. 細管式等速電気泳動による尿中cystine, homocystine, cystathionineの定量について	高知医大・化学	○溝淵詔子・三笠洋明 児玉裕敬
22. ラット脳内choline, acetylcholineの同時定量について	高知医大・化学	○児玉裕敬・西村明子
23. 細管式等速電気泳動法によるシアンメトヘモグロビンの分析	島根県警・科捜研 鳥取大・医療短大	○稲垣 徹 古徳 迪
(15:10~16:10)		
24. 細管式等速電気泳動法によるアレルギー性鼻炎罹患TDI被曝作業員鼻汁の分析	東レ・安全研 自治医大	○奥泉仁一・田中健一 吉田治弘・池本卯典
25. CITPによる精漿蛋白質の分析について	自治医大	○吉田治弘・池本卯典 富田功一
26. 血清タンパク質の等速電気泳動	都立大・理	○奥山典生・真鍋 敬 樋口規子
(16:10~16:15)	閉会の辞	○木曾義之

A METHOD FOR THE DETERMINATION OF DISSOCIATION CONSTANT

ALLAHABAD UNIVERSITY

A. K. BAJPAI

内面に  
コーティングして → 粘度を下げたり  
こわくみをとる

# 1 フェーズドシリカキャピラリを用いた新しい等速電気泳動分析装置

島津製作所 〇小林章一・水野俊英・ハ木孝夫・秋山純一

食品分析・水質の管理・生化学分野・薬品分析・各種工業分野等幅広い分野に等速電気泳動分析法が普及してくるにつれ、試料の前処理がほとんどいらない、あるいは最小限の前処理で良いというイタコの利点を生かしながら、より感度の高い、又成分間の濃度差のより大きい試料の分析に対する要求が強くなってきている。

我々は、内径0.2mmのフェーズドシリカキャピラリを用いた高感度でダイナミックレンジの広い等速電気泳動分析装置を新しく開発したので報告する。

フェーズドシリカキャピラリは、内径0.2mmという小さな穴径でも精度の高いものが得られる、肉厚が薄いもので高耐圧が実現できる、肉厚が薄くてもフィッティング時にくびれが生じる心配がない、紫外光が透過する等数多くの、イタコのキャピラリとしての利点を持っている。しかしながら、特に高いpHの領域における電気浸透流の影響により、イタコのキャピラリとしては利用されていなかった。今回、我々は、内面にメチルシリコン及びフェニルシリコンの化学結合のコーティングを有するフェーズドシリカキャピラリを用いることにより、この問題を解決することが出来た。

酸性側の電解液を用いた場合には、コーティングを施していないフェーズドシリカも良好な分離が得られるが、例えばpH8.7においては、コーティングを施していないものでは、分離を維持・再現することが出来なかった。しかし、上記のコーティングを施したフェーズドシリカキャピラリでは、pH3~9の広い領域でくり返し、良好な分析結果を得る事が可能であった。これは、高いpH領域においてフェーズドシリカの内面に発生すると考えられるDH<sup>-</sup>イオンを化学結合相が部分的にスクリーンする効果及び、化学結合相内で電解液が動きにくいので、内壁付近の粘性が大きくなり液の流れをよさえる効果の1つである。あるいは両方の影響により電気浸透流がよさえられているものと考えられる。

0.2mmの内径のフェーズドシリカキャピラリは、予想通り、従来の0.5mmの内径のキャピラリに比べ6倍強のゾーン長を得ることが出来ることか確認された。

これに加えて、泳動電流を小さく出来ることにより、ジニール錯の発生がよさえられ、トータルとして約10倍の検出感度を得ることが可能となった。

内径の小さいキャピラリでは、成分のゾーン長が短くなり、それだけ検出感度も向上する。しかし、反面、注入時の試料ゾーンもなかり、分離にはそれだけ長いキャピラリが必要となる。従って、内径の大きいキャピラリの持つ分離能と、内径の小さいキャピラリの持つ検出感度の良さを生かすために、内径0.7, 1.0, 1.2mmのPTFEまたはFEPチューブ(以下分離用キャピラリ)と内径0.2mmのフェーズドシリカキャピラリ(検出用キャピラリ)を組み合わせた、ハイブリッドチューブ方式を用いた。又、内径の大きく異なるチューブの組み合わせを有効に生かすために、新たにヘルセンが電極を追加し、従来のリーディング・ターミナル各電極とあわせて3電極として、分析の効率化を図った。

数頁の1頁 - 有F頁の23頁

まて可能と

この方法では、電極の切換のタイミングが重要であるが、試料を注入し、予備的な流動により、流動電圧の変化を自動的に検出し、このタイミングをQ値( $Q(t) = \int_0^t i(x) dx$  ただし 流動電流を*i*とする)で記述し、以後の試料分析の際にこの値を用いて自動的に電極の切換を行なうことにより、切換のために特別な検出器を用いることなく、効率的な切換が可能となった。この切換タイミングの自動検出は、内径の異なる流動管が直列に接続されている場合に、定電流の流動においてリーディングとターミナルの境界面から内径の異なる部分を通過する際に流動電圧の上昇の速度が変化することを利用している。

流動時間と一般化したQ値(MA·MIN)を用いて制御することにより、定電流と定電圧の組み合わせ、あるいは異なる流動電流の組み合わせで流動する場合に便利になった。

検出器としては、電位二重極検出器・及び紫外吸収検出器を0.2mm用に改良したものを利用した。

マレイン酸・リンゴ酸・乳酸・コハク酸・酢酸の等量混合試料を用いて検量線を作成したところ、合流用キャピラリーとして内径 $1.2 \text{ mm}$ 、長さ $80 \text{ mm}$ のPTFE使用時に、11 $\mu\text{g}$ の成分と、17 $\mu\text{g}$ とも $25 \mu\text{g}$ から $7.5 \mu\text{g}$ まで良好なダイナミックレンジが得られた。成分間の濃度比の大きい試料としては、リンゴ酸と乳酸を用いて評価をしてみた。

pH 3.6において、両者の実効移動度の差はそれほど大きくないが、合流用キャピラリーとして、内径 $1.2 \text{ mm}$ 、長さ $160 \text{ mm}$ のFEPチューブを用いることにより、濃度比1:500(リンゴ酸50ppm, 乳酸2.5%)の試料の合流定量が可能となった。

## 2 等速電気泳動法における分離過程の解析 (2)

(広島大工) ○高羽 均・広川 健・木曾 義之

1. 演者らは、等速電気泳動法における分離最適条件を動的な観点から検討するため、分離過程をシミュレートするプログラムを作成し、4つの電位勾配検出器(PGD)をもつIP装置を用いた実験と比較検討している<sup>1)</sup>。2成分系試料についてはこの装置により得られた分離過程の情報とシミュレーションの結果は良く一致する事がわかった<sup>2)</sup>。ある試料が分離に要する時間はリーディング溶液のpH ( $pH_L$ )と注入する試料のpH ( $pH_S$ )によって決まる。しかしこれらのpHには無限の組み合わせが考えられるため、最適条件を検討するには何らかの適当な表示法が必要となる。ここでは分離時間、 $pH_L$ 、 $pH_S$ を3次元にグラフィック表示する事により分離に適当な条件を示すプログラムを開発したので報告する。

2. 数値計算にはMS120(NEC)、計算結果の解析にはPC-9801E(NEC)を使用した。

図-1に等速電気泳動平衡時のTris, Creatinine,  $\epsilon$ -Aminino caproic acid (AMC)の実効移動度の $pH_L$ 依存性を示した。シミュレーションには6種のバッファーを使用し $pH_L$ を3から10まで変化させた(Asp 3.4~4.4, Glu 3.8~4.8, 酢酸 4.2~5.2, コハク酸 5.0~6.0, Mes 5.6~6.6, クレゾール 6.8~8.0, Gly-Gly 7.8~9.0, Val 9.1~10.3,  $\beta$ -Ala 9.6~10.8)。

図-1は定常状態であるから、初期のpHは無関係である。この状態に達するまでに必要な時間は混合ゾーンが解消するのに要する時間(分離時間 $T_{res}$ )に等しい。図-2(A)にTrisとAMCの2成分系の分離過程の様子を(B)には(A)中の点線の位置(約5cm間隔)にPGDを置いた時に得られると思われるチャートを示した。リーディングとターミナルの間に試料を注入し、泳動を始めると移動度の早いTrisのゾーンとTrisとAMCの混合ゾーン、移動度の遅いAMCのゾーンが形成される。この混合ゾーンが解消しゾーン長が一定になると定常状態となる。

分離時間( $T_{res}$ )は、次式で表わされる。

$$T_{res} = l_{Tris} / (V - V_{Tris/mix}) \quad (1)$$

ここに $l_{Tris}$ はTrisゾーンの長さ、 $V$ は等速電気泳動速度、 $V_{Tris/mix}$ はTris/混合ゾーン界面の速度である。一般に混合ゾーンのpHは定常状態の各ゾーンのpHの間の値となるため、混合

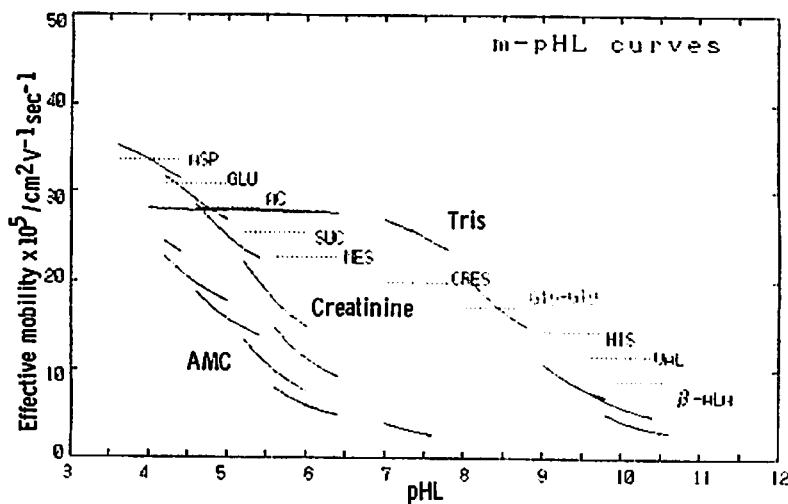
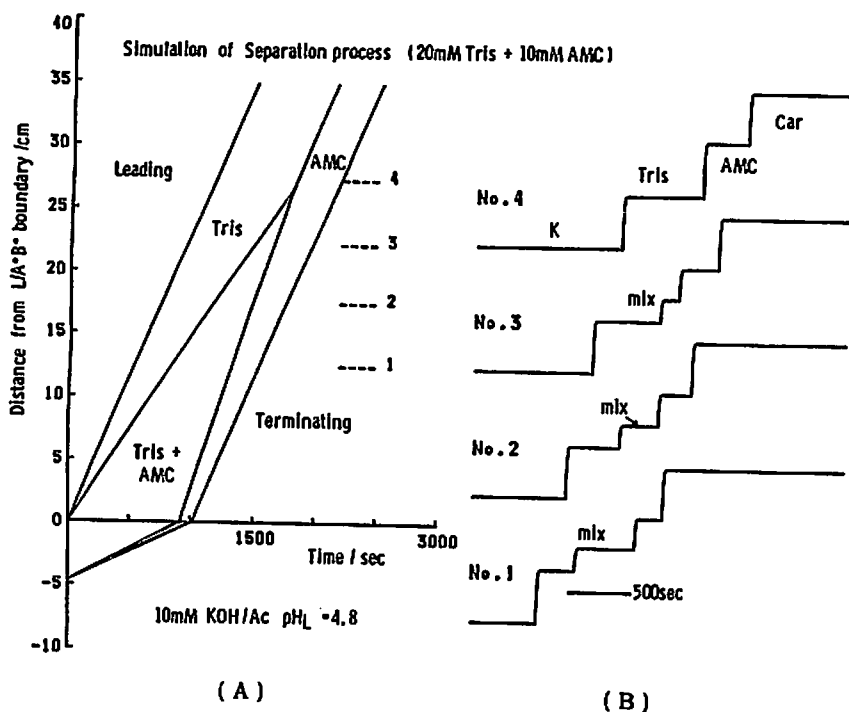


図-1 定常状態における実効移動度の $pH_L$ 依存性

ゾーン中におけるTrisとAMCの実効移動度( $\bar{m}$ )の関係は図-1からも推定できるように常に $\bar{m}_{Tris} > \bar{m}_{AMC}$ となる。分離時間短縮には両者の差が大きいほど良いので、 $pH_L$ 、 $pH_S$ 共に高い程良い事が明らかである。

先述した6種のバッファーで $pH_S$ を3から10まで変化させた時の分離時間のシミュレーションを3次元表示して図-3に示した。 $pH_L$ がある程度高くなると $pH_S$ にはほとんど無関係に分離でき、 $pH_L$ と $pH_S$ が高くなる

○たかば ひとし・ひろかわ たけし・きそ よしゆき



(A) (B)  
 図-2 2成分系の分離過程

ほど分離時間が短くなることがわかる。一方図-1に示したTrisとCreatinineの組み合わせでは定常状態の $\bar{m}$ からは $pH_L$ が約4.8で分離不可能と思われるが、分離過程のシミュレーションでは $pH_L$ が4.4付近で混合ゾーン中での $\bar{m}$ が等しくなり両者の間に微妙な違いがあり、分離過程のシミュレーションの必要性が明らかである。図-4に示したように4.4付近で分離時間が大変大きくなりこれより大きい $pH$ では再び分離が可能となる。ただし検出される順番は逆転する。また $pH_0$ については特に4.4近傍で顕著である。この前後の $pH_L$ では $pH_0$ が高い程短時間で分離可能となる。

講演では、以上のシミュレーションと実測結果についても比較検討する予定である。

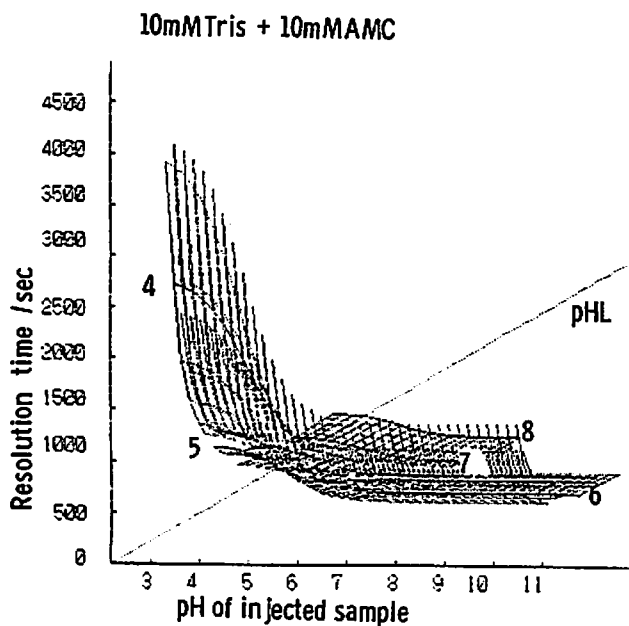


図-3 Tris, AMCの分離時間のシミュレーション (バッファーは、本文参照)

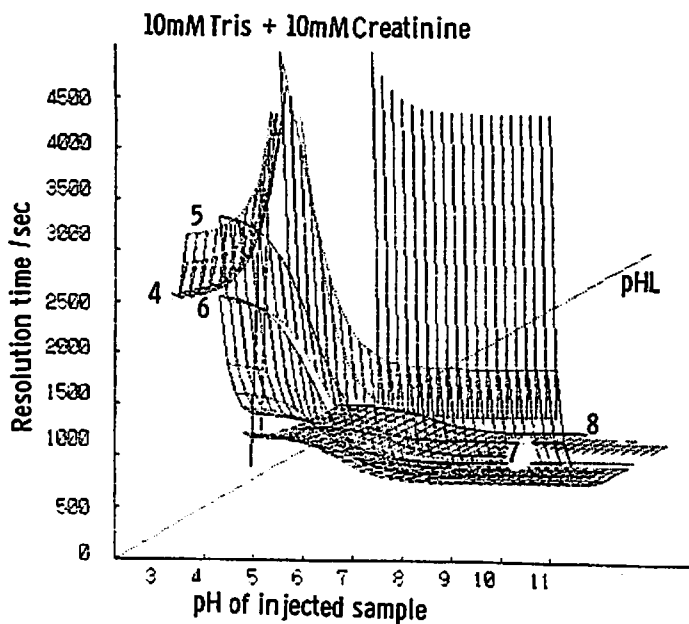


図-4 Tris, Creatinineの分離時間のシミュレーション (バッファーは、本文参照)

(参考文献)

- 1) 第5回イソタコシンポジウム, 広川, 木曾 (1984)
- 2) 第50回日化春季年会, 高羽, 広川, 木曾 (1985)

### 3 PG微分処理法による等速電気泳動図のマイコンによる解析

城西大学理学部化学科

小林 英三郎

細管式等速電気泳動で得られるイソタコフェログラム (ITPG) をポテンシャルグラジエント (PG) で微分し PG に対しゾーンの長さをプロットすれば得られた波形を一般のクロマトグラムと同様な解析ができる事をすでに報告してある。<sup>1),2)</sup>

ここでは

- I. イソタコフェログラムのモデル波形とその  $\alpha$ PG 微分処理
- II. 実際のデータを処理する上の問題点

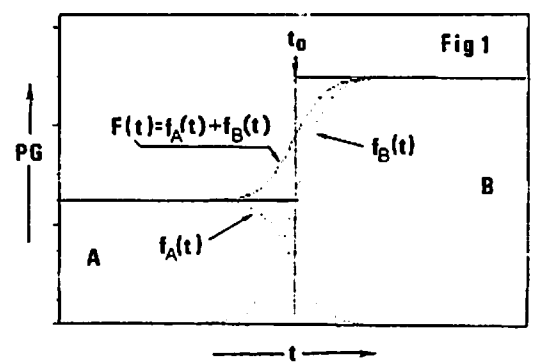
について考察する。

I. ITPG の波形は、理想的等速状態が完成し、ゾーンの成分が他のゾーンと混合しない場合には、Fig 1 の右で示す位置で実線のように階段状になる。一方、非理想状態では各ゾーン成分が界面で互に混合した境界を形成すると考えると、Fig 1 に示した A ゾーンによる  $f_A(t)$ 、および B ゾーンによる  $f_B(t)$  の合成された  $F(t) = f_A(t) + f_B(t)$  を取扱う事になる。この関数  $F(t)$  が示す ITPG を Fig 1 と Fig 2a に示した。

通常の ITPG の解析を行なうには Fig 2b に示すように、 $\alpha$ PG による微分波形を得、その極大値が境界面であるとし、次に続く境界面にはさまれるゾーン長を定量値とし、またそのゾーンの PG 値を得 RE 値の計算を行い定性指標としている。

PG 微分処理法においては、Fig 3a に示すように、Fig 2a の  $\alpha$ -PG に対し PG- $\alpha$  の象限にある ITPG を考える。L で示したリーディングゾーンの PG 値が一定である場合  $\alpha$ PG の微分は不可能であり、この状態は ITPG 曲線の白丸で示した所まで進行する。

この点より次の A で示したゾーンに致るまでは  $\alpha$ PG 微分可能な領域となる。微分不可能な領域のゾーン長を直線で、また微分可能な領域を微分で得られる曲線とし、L, A, B および T の各ゾーンについて処理した結果を Fig 3b に示した。直線の PG 値はゾーンの PG 値であり定性指標 RE 値を求める事ができる。また各ゾーンの直線部分はゾーン長の計算結果であり、微分曲線



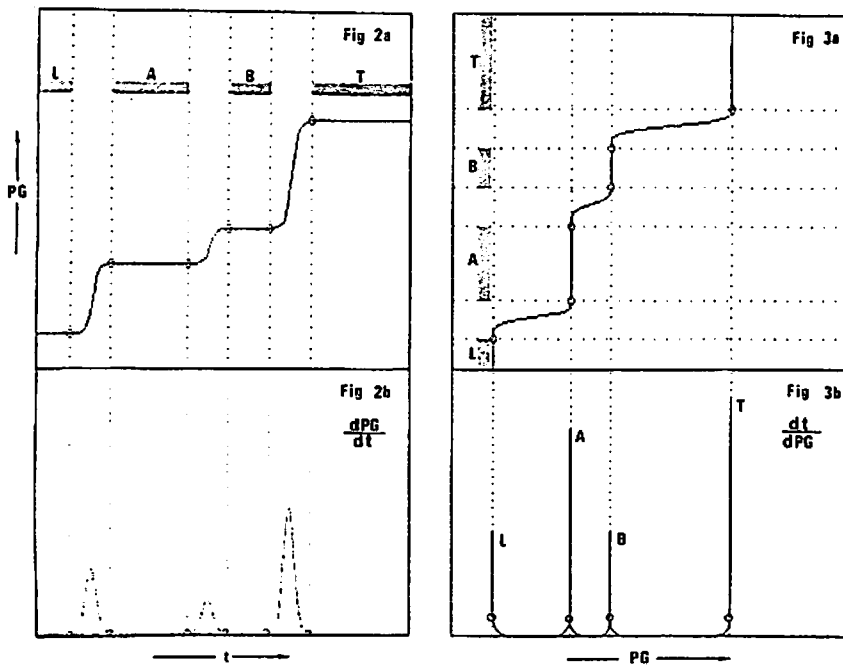
こばやし ひでさぶろう

とPG軸に囲まれる面積との和は、各ゾーンの定量値を与える。Fig 3aのITPGが理想状態であれば微分可能な領域は消失しL-A, A-B, B-Tのゾーン間に存在する境界域はなくなり階段状となる。この状態ではFig 3bの曲線部分は消失し各ゾーンのPG値とゾーン長を示す棒グラフとなる。このように処理結果をPG-t象限上のクロマトグラム図として表わす事ができるので、ゾーンの形成の程度や複雑な成分によるゾーン境界の解析をするのに有効な処理方法となる。

II. 実際の装置から得られるPG信号は完全な連続曲線ではないので、 $\Delta PG$ 値を設定し処理する必要がある。また次に上げる点は個々に対処しなければならない。

1. ゾーンのPG値がドリフトする場合 …… 本来一定とされるべき領域が微分可能となり境界領域と判断されるので、微分開始および終了の閾値を設定し微分を行なわず一定範囲のPG値をもつゾーンとして処理する。
2. enforced 効果によるゾーンが他のゾーンのものと同一PG値を示す場合は先に現われたゾーン長に加算される。…… 時間履歴をもつy軸を設定し先行したゾーンと判別しやすいようにする。

- 1) 小林英三郎 オ3回細管式等速電気泳動シンポジウム p12 (1983)
- 2) 小林英三郎 オ4回細管式等速電気泳動シンポジウム p7 (1984)



こばやし ひでさぶろう



(名工大・エ) 津田 孝雄

High Voltage Capillary Zone electrophoresis (NO.4)  
Takao Tsuda, Nagoya Institute of Technology,  
Gokiso, Showa, Nagoya 466, JAPAN

○ は 1990 年 10 月 10 日 現在 まで の 資料 による

1. ゾーン電気泳動の媒体を自由溶液で行なう手法は ジュール熱の揮散又は全熱量を小さくおさえることができる毛管カラムの採用により、可能となってきた。従来のゾーン電気泳動は媒体中で溶質の移動を終らせるが、本法では溶出させてしまうので、「溶出型ゾーン電気泳動」とも言える。またこの溶出は移動度の他に浸透流による動的な流れを利用しているため、「動的なゾーン電気泳動」とも言える。流れの場を利用しているためクロマトグラフィーの概念が導入し得るから「電気浸透流クロマトグラフィー」とも考えられる。

中空毛细カラムの幾何学的特徴により本法が可能になったので、「細管式ゾーン電気泳動」とも呼び得るだろう。ただこの場合「キャピラリー」の言葉はアクリルアミドゲル中に存在する「キャピラリー」との混同をさける必要がある。

全体的な特長は 従来のゲルを媒体とするゾーン電気泳動に比して、より「細管式等速電気泳動」に近い形状と特長をもったゾーン電気泳動といえる。

本法の手法を比較するため表1にまとめた。

エレクトロフェーゼス - 電位と電流の  
関係について

表I キャピラリー電気泳動の比較

	TSUDA	Jorgenson	TERABE	従来のゾーン電気泳動	等速電気泳動
カラム	中空細管 FEP, パルックス	中空細管 溶融シリカチューブ	中空細管 溶融シリカチューブ	スラフ および 円筒ガラス管	中空細管 FEP (0.5, 0.7 0.2 mm)
媒体	自由溶液	自由溶液	自由溶液	ゲル, パーパー	自由溶液
移動度	○	○	○	○	○
電気浸透流の利用	○	○	○	×	×
溶出型	○	○	○	×	○
連続的検出	○	○	○	×	○
検出法	PGD, UV	蛍光	UV		PGD, UV
注入法	注入器	Down Hill	Down Hill	Spotting	Microsyringe
注入量	0.3 μl				
検出感度	ng レベル				
注入絶対量					
注入の操作に必要の 必要量					

0.2, 0.3 mm FEP

2. 本研究では 之の実用的な応用を考え、細管の口径をなるべく大きくし、試料負荷量を増やすことを考えた。検出は主にPGD(島津製)を用いた。電源は定電圧電源(松定アレジション製)を用いた。注入器は試作品を用いた。

3. Fig.1-3に結果の一部を示した。カラムは FEP 0.2mm, 0.3mm, 長さ約20cm, 50cmを用いた。ピークの波形状は一般に鋭いピークを有するが、試料の注入量を増やすと台形のピークが生じた。

浸透流の制御は添加する界面活性剤の種類と濃度を変え、カラム内壁面への表面吸着種および量を変えることにより調節しうる。

等速電気泳動法では希釈された試料を大量注入した場合試料の濃縮が生じるが、本法では希釈試料の大量注入ではピークが幅広くなってしまう。

Fig.1, 2 では 金属イオンの分離例を示し、Fig.3ではフリーポリアミン類の分離を示した。後者では 癌(又は細胞増殖の場合)の場合 その存在量が正常人と異なるので、一つの癌のマーカとしても注目されている物質である。

本法の実用化については 注入部の工夫、注入量の増加、再現性等の進歩と共に、分離(対象試料と溶離液の組合せ)の検討が進まなければならない。

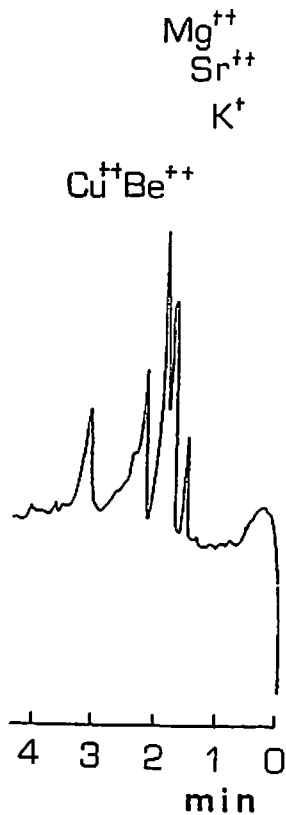


Fig.1

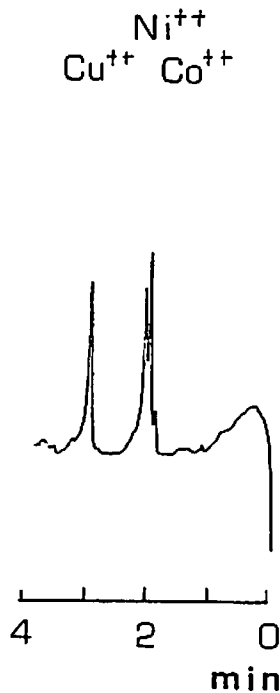


Fig.2

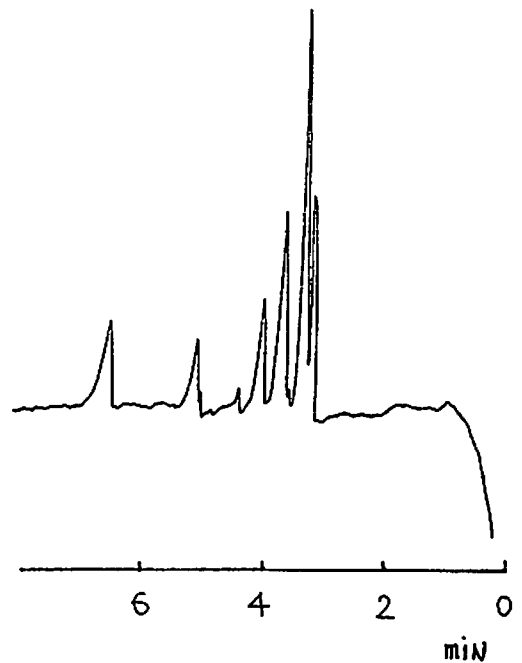


Fig.3 フリーポリアミン類の分離

月見の▽検出

HPLC 付録

佐々木 2)

0.25 μM/g

5

キャピラリー電気浸透クロマトグラフィーによる  $\gamma$ -2-スト

けい皮酸関連化合物の分析

(鐘紡・薬品研) ○藤原 茂 (近畿大・薬) 本田 進

シクカ キョウテラキ

〔目的〕 電気浸透流を利用したクロマトグラフィーは、Jorgensonら(1)によって始められ、津田ら(2)および寺部ら(3)により生体成分や各種異性体の分離に応用され、分離手段として優れていることが実証されたが、定量性については未だ充分な検討がなされていない。今回、我々はけい皮酸関連化合物をモデルとして、キャピラリー電気浸透クロマトグラフィーを定量法として利用することについての基礎的な検討を行い、血漿中の医薬品代謝物の定量についても若干の応用を試みた。

〔実験〕 試料 3,4-Dimethoxycinnamic acid(DMCA), 3-methoxycinnamic acid(MCA), cinnamic acid(CA), 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid(ferulic acid, FA)および4-hydroxycinnamic acid(HCA)は市販の特級品を用い、 $10^{-2} \sim 10^{-4}$ Mのメタノール溶液として使用した。 装置 電源には島津IP-1B型等速電気泳動装置の電極部を、検出には日立633型高速液体クロマトグラフ付属の紫外検出器を用いた。ピーク面積は島津クロマトパックC-R1Bによって測定した。 カラム 内径0.2mm、長さ80cmのフューズドシリカ管を用い、管の一端から50cmの部分の被覆樹脂を一部を取り除き、その部分でオンカラム法により254nmの吸収を測定した。 分離液  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液あるいは $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液を用いた。 操作法 試料注入は落差法(標準的には5cmの高さで5秒間)によって行った。試料実注入量は、試料が検出器を通過した後キャピラリー内溶液を落差法で押し出し、別の紫外検出器に導入して、検量線法により測定した。

〔結果および考察〕 分離挙動 (1)pHの影響 上記化合物はDMCA, MCA, CA, FA及びHCAの順に溶出したが、分離液のpHを6-10まで変化させたところ、pHの低下に伴ってフェノール性水酸基を有するFAとHCAの溶出時間が短くなり、pH7以下ではそれぞれDMCA, MCAとほぼ同一の溶出時間になった。(2)分離液濃度の影響  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液の濃度を0.01-0.04Fまで変化させた場合、濃度の増加とともに分離度は上昇した。分離液の濃度が0.025F、pHが9.4のときのクロマトグラムをFig. 1に示す。(3)注入量および体積の影響 落差法における試料注入時の時間を5.0~15secに変化させた時の理論段数と分離度を、DMCAとFAの $1.0 \times 10^{-4}$ Mおよび $5.0 \times 10^{-4}$ M溶液を用いて検討した。Table I に比較したように、注入時の時間を長くする(注入量および体積を増やす)と理論段数と分離度はともに低下した。しかし、 $5.0 \times 10^{-4}$ M, 5.0secの方が $1.0 \times 10^{-4}$ M, 15secより注入量が多いにもかかわらず、理論段数、分離度ともに大きくなった。一方、注入時間を固定し、試料濃度を増加させて注入量を増やすと、Fig. 2に示すように理論段数および分離度がともに減少した。

定量性 (4)検量線 DMCAとFAの $10^{-2} \sim 10^{-4}$ Mのメタノール溶液を用い、注入時間を5.0secに固定して、試料濃度を変化させた時の注入量とピーク面積ならびにピーク高さとの関係を検討したところ、注入量が約3ng~300ngの範囲において、ピーク面積と注入量との間には直線性が得られた。しかし、ピーク高さは30ngまでの注入量ではほぼ直線になったものの、それ以上では直線性は得られなかった。一方、DMCAに対して各化合物のモル比を0.125~4.0まで変化させた時の検量線をピーク面積法とピーク高さ法によって求めたところ、各化合物ともいずれの方法においても測定したすべての範囲で良い直線性を示した。(5)再現性 注入時間5.0secで各化合物の $10^{-4}$ M溶液を繰り返し(n=6)注入し、DMCAを内部標準とした時の各化合物のピーク面積比

ふじわら しげら ほんだ すずさ

ならびにピーク高さ比の再現性を検討した。その結果、C.V.値は前者では1.2~2.1%, 後者では0.9~2.8%であった。

**血漿中FA濃度の測定** FAは自律神経機能調整薬である  $\gamma$ -oryzanolの構成成分をなすが、 $\gamma$ -oryzanolを投与した後の血漿中FA濃度を測定する目的で、2, 3の実験を行った。血漿中濃度は極めて低かったが、本法はこのような低濃度薬物の分析にも有用であることが示された。

〔引用文献〕 1) J.W.Jorgenson, K.D.Lukacs, *Anal. Chem.*, 53, 1298(1981). 2) e.g. T. Tsuda, G.Nakagawa, M.Sato, K.Yagi, *J. Appl. Biochem.*, 5, 330(1983). 3) S.Terabe, K.Otsuka, K.Ichikawa, A.Tsuchiya, T.Ando, *Anal. Chem.*, 56, 113(1984).

〔謝辞〕 本研究に際し、有益な御助言を頂いた京都大学工学部 寺部 茂, 名古屋工業大学 津田 孝雄の両氏に深謝します。

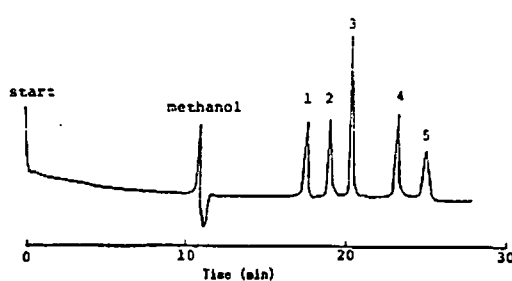


Fig.1. Chromatogram of cinnamic acid and related compounds, separated by electrokinetic migration and detected by ultraviolet absorption. Capillary: fused silica(0.2 mm i.d., 80 cm); resolving solution: 0.025 F phosphate buffer(pH 9.4); applied voltage: 7.5 kV; current: 200  $\mu$ A; wavelength for detection: 254 nm; sample scale: 0.1  $\mu$ l of a methanolic solution containing  $10^{-6}$ M each of compounds. Peak assignment: 1=DHCA, 2=HCA, 3=CA, 4=FA, 5=HCA.

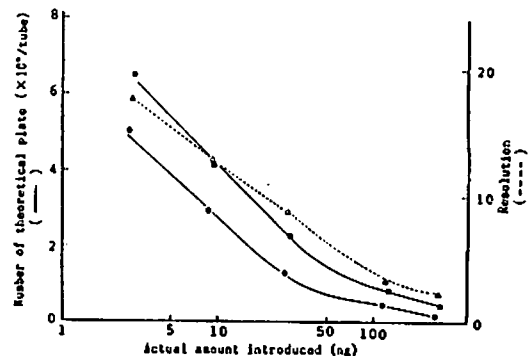


Fig.2. Effect of sample amount on peak broadening and resolution.  $\bullet$ - $\bullet$  number of theoretical plate for DHCA,  $\circ$ - $\circ$  number of theoretical plate for FA,  $\circ$ - $\circ$  resolution between DHCA and FA. Experimental conditions were the same as those described in Fig.1, except that the concentrations of samples were varied between  $10^{-6}$ M and  $10^{-8}$ M.

Table 1. Effects of sampling time on peak broadening and resolution

Sampling time (sec)	Concentration of the sample solution(M)	Actual amount introduced (ng)	Number of theoretical plate ( $\times 10^4$ /tube)	Resolution
5.0	$1.0 \times 10^{-6}$	DHCA 2.9	6.53	17.7
		FA 2.7	5.06	
10	$1.0 \times 10^{-6}$	DHCA 4.9	4.79	12.9
		FA 4.6	3.33	
15	$1.0 \times 10^{-6}$	DHCA 7.2	1.56	9.7
		FA 6.7	1.28	
5.0	$5.0 \times 10^{-6}$	DHCA 9.5	4.21	12.8
		FA 8.8	2.85	

## 6 等速電気泳動におけるホルムアルデヒドの効果

(島津・応技) ○八木 孝夫・児嶋 佳世子

1. 等速電気泳動法において、実行移動度を変化させる方法に pH 効果、溶媒効果、カウンターイオンや中性配位子による錯体効果がよく採用されている。また、分析対象物質と化学反応し、異種物質を生成する中性化合物をリーディング液に添加することにより、実行移動度の変更も可能である。この試みとして、異性体のエフェドリンとブソイドエフェドリンがホルムアルデヒドとの反応を利用して分離されている。<sup>1)</sup>しかし、この実験でホルムアルデヒドの濃度が18.5%と反応に必要な量にたいして、大過剰の添加がなされている。むしろ、溶媒効果の要素がかなり作用していると考えられる。

イオン化していないアミノ基とホルムアルデヒドとのメチロール生成反応をアミノ酸について行い、陰イオンとして移動度の近接したアミノ酸種の分離および陽イオンとしての分析系において、低移動度物質への移行による泳動ゾーンの消失が、同定の補助手段に応用できることの可能性について、検討したので報告する。

2. 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置：IP-2A型、検出器：PGDを用いた。泳動管：I.D.1.0mm X L.60mm + I.D.0.5mm x L.100mm、泳動電流：200  $\mu$ A(6 or 9min  $\rightarrow$  50  $\mu$ A、チャートスピード：20 or 40mm/minとした。

リーディング液：リーディングイオンに5 or 9mM-ギ酸、カウンターイオンに、トリス、アメジオール、アンモニウム、トリエタノールアミン、トリメチルアミンの各々を個別に用い、粘性剤に0.1% HPMCを添加した。

ターミナル液：10mM-フェノール + Ba(OH)<sub>2</sub> pH 10.9 を用いた。試料：中性アミノ酸 (Val, Thr, Gln, Met, Phe) と塩基性アミノ酸 (Arg, His) を用いた。

3. リーディングイオンにギ酸を用いた理由は、ホルムアルデヒドの酸化やカニツアロ反応により、生成するギ酸を考慮した。カウンターイオンとして、pH 8 近傍に緩衝能を有するもので、ホルムアルデヒドとの反応性を調べた。当初 pH 8 に調整した各緩衝液に、ホルムアルデヒドの濃度を変えて添加し、その pH を測定したところ、トリエタノールアミンには、pH の変化は見られなかった。一方、トリス、アメジオールアンモニウムにおいては、0.5% の添加で pH 4 ~ 5.5 に減少した。これらの物質の塩基がホルムアルデヒドと反応していることを示している。

ギ酸とトリエタノールアミンの組み合わせで、pH 8 に調整したリーディング液にホル

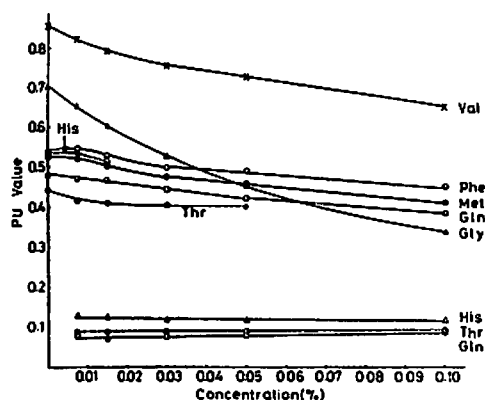


図1 ホルムアルデヒドの添加量とアミノ酸のPU値の関係

やぎ たかお ・ こじま かよこ

ホルムアルデヒドの濃度を変えて添加した場合、各種アミノ酸のPU値に及ぼす影響を図1に示した。ホルムアルデヒドが無添加のとき、Met、His、PheのPU値は接近しており、分離されない。この3者は、pHを変化させても分離しない。けれども、添加濃度を0.0075%にするとHisはPU値0.53と0.13に2つのゾーンが見られる。さらに濃度を0.030%にすると、PU値0.13のゾーンのみとなり他の2者と分離する。その後、添加量を0.1%に増してもPU値は変化せず、メチロール化合物が生成されたと考えられる。これに対して、MetとPheのPU値は添加量が増加するに従って、徐々に減少してくる。両者の混合物を泳動した場合、0.1%の添加では分離が悪い。しかし0.2%にすると良く分離する。この条件でのイソタコフェログラムを図2にしめす。その他のアミノ酸では、Thrが0.0075~0.05%の添加範囲で2つのゾーンを形成する。

検討したアミノ酸のなかでホルムアルデヒドの添加量が0.2%以下において、PU値の異なる2つのゾーンを形成するものについて、無添加時のゾーンの減少を関係する2つのゾーン長の和に対する比率で表し図3に示した。Hisに見られるようにメチロール化合物に全て変化しているとすれば、反応は一定方向に進んでいることになる。それならば、試料段階でホルムアルデヒドを混合して、ホルムアルデヒドを含まないリーディング液中を泳動させても、メチロール化合物として存在すると考えられる。Hisは、あらかじめ0.025%と混合して導入すると75.8%がメチロール化合物由来のゾーンをしめす。また0.5%で91.4%となり、より高濃度に保っても変化なかった。Metは、0.5%との混合で11.1%の変化を見たが、より低濃度でも同様の変化であった。

メチロール化合物への反応はOH<sup>-</sup>存在下で生じることが知られているので、ホルムアルデヒドを0.2%添加したリーディング液のpHを7.5~9.5に変化させ、PU値をプロットしたところ相互間に顕著な差は見られなかった。pH7.5以上で十分反応している。

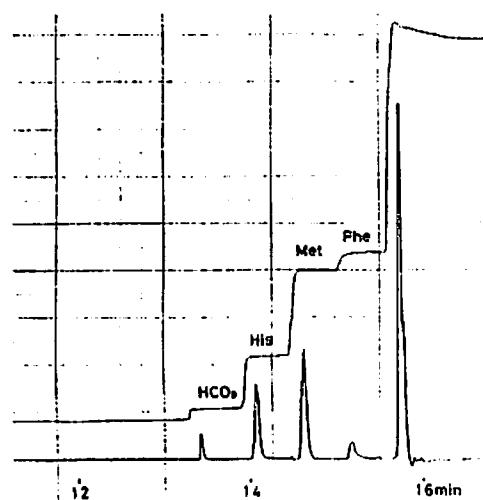


図2 ホルムアルデヒド添加時のイソタコフェログラム

1)木下昌彦、他、日本薬学会第101年会

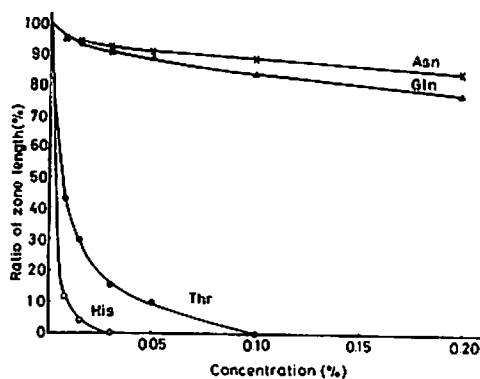


図3 ホルムアルデヒド濃度とアミノ酸の減少率

(九大病院・薬剤部) 藤下 修, 福岡 龍一

平川 雅章, 樋口 駿, 青山 敏信, 堀岡 正義

(緒言) 演者らは、細管式等速電気泳動のチャートとして表されるステップの高さから、イオン分子量を推定するために相関式の誘導を検討し、カルボン酸<sup>1)</sup>およびアミノ酸<sup>2)</sup>の分子量(M)と相対的ステップ高さ( $h_R$ :リーディングイオン  $Cl^-$ との比)との関係を  $h_R = a + b M^n / |Z|$  の一般式で表すことができることを報告した。一方、広川ら<sup>3)</sup>によって数多くのイオン性物質に関する詳細なシミュレーションデータが発表され、また彼らの用いた定性指標  $R_E = E_S / E_L = (h_S + \Delta h) / (h_L + \Delta h)$  は演者らの用いた  $h_R = h_S / h_L$  を補正した形を示すものであった。今回、演者らは上記の相関式の精度に及ばずイオンの電荷(Z)<sup>4)</sup>および比重(d)の影響について検討したので報告する。

(計算) 計算に用いたイオン性物質の  $R_E$  値および電荷は広川ら<sup>3)</sup>が報告したのものを用いた。またそれぞれの相関の有意性についてはt検定により検定した。  $R_E$  - 移動度の比

(結果および考察) (1) 電荷の影響

(1)  $pH_L 3.0 - 10.0$ の間で電荷が最大となる  $pH_L 10.0$  の場合において、分子式を  $C_l H_m O_n$  で表すことのできる有機酸 ( $N=101$ ) の分子量と  $R_E$  値との相関式は次のようになった。

$$R_E = 0.580 + 0.016 M / |Z| \quad (r=0.935, p<0.0001) \quad (1)$$

$$R_E = 0.346 + 0.092 M^{2/3} / |Z| \quad (r=0.965, p<0.0001) \quad (2)$$

$$R_E = 0.294 + 0.231 M^{1/2} / |Z| \quad (r=0.961, p<0.0001) \quad (3)$$

図1に式(1)の有機酸各群の相関を示す。2価、3価の有機酸も、分子量を電荷で割ることにより、1価の有機酸とほぼ同一直線上に並ぶことが確認でき、これらの相関式の一般型の妥当性を示すものと考えられる。

(2) 上記の一般型が個々のイオンにも適応することを確認するためフェノール ( $N=15$ ) およびカプリン酸 ( $N=31$ ) の電荷を  $pH_L 3.0$  から  $pH_L 10.0$  まで変化させた場合の、相関式は次の様になった。

$$R_E = 0.268 + 0.023 M / |Z| \quad (r=0.999, p<0.0001; M=94.11) \quad (4)$$

$$R_E = 0.298 + 0.020 M / |Z| \quad (r=0.999, p<0.0001; M=172.27) \quad (5)$$

電荷(Z)と  $R_E$  値との間の非常によい相関は、 $pH_L 3.0 - pH_L 10.0$  の間で電荷が最大および最小となる  $pH_L 10.0$  と  $pH_L 3.0$  の2点のみで相関式が得られることを示す。脂肪族飽和モノカルボン酸とフェノールの場合を図2に示す。これらの関係式による直線  $R_E = a + b M / |Z|$  が原点を通る ( $a=0$ ) と仮定するとき、直線の傾きは  $b' = |Z| R_E / M$  と表すことができ、 $pH_L 10.0$  など  $Z=1$  になる場合には  $b' = R_E / M$  となり、この直線の傾きは分子量に対するイオンの抵抗性またはイオンの構造を示すことが推察される。

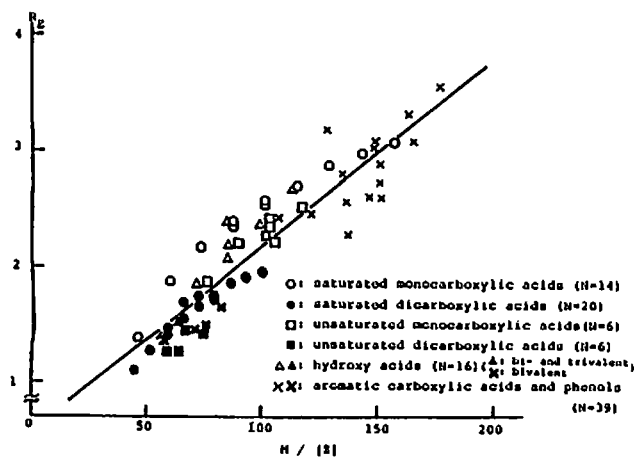


図1 Relationship between the Molecular Weight per Electric Charge and  $R_E$  for Organic Acids ( $pH_L 10.0$ )

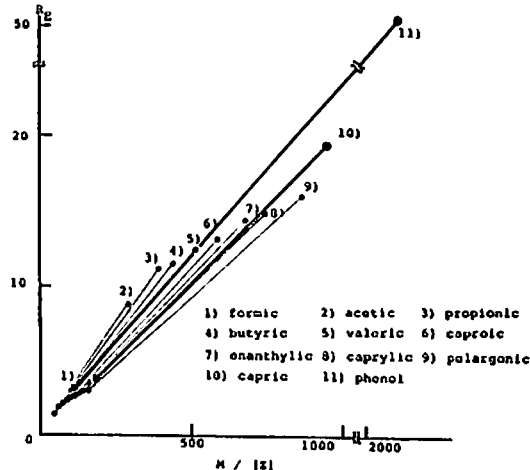


図2 Relationship between the Molecular Weight per Electric Charge and  $R_E$  for Aliphatic Saturated Monocarboxylic Acids and Phenol

(2) 比重の影響

(1) 直線の傾きとイオンの抵抗性またはイオンの構造との関係を検討するには、イオンの体積を求めることが必要となる。分子体積は分子量/密度=分子量/比重として表すことができ、文献<sup>5)</sup>により比重が明らかなNO<sub>2</sub>基, ハロゲン基, などを含むイオン性物質(N=115)の、pH<sub>L</sub>10.0の場合におけるR<sub>E</sub>値と分子量および分子体積の相関式は次の様になった。

$$R_E = 1.308 + 0.008 \quad M/|Z| \quad (r=0.719, p<0.0001) \quad (6)$$

$$R_E = 1.004 + 0.014 \quad (M/d)/|Z| \quad (r=0.918, p<0.0001) \quad (7)$$

これらのイオン性物質のR<sub>E</sub>値は分子量(M)よりも分子体積(M/d)と、有意に高い相関を示すことが確認できた(p<0.0001)。

(2) 前述のb' = R<sub>E</sub>/Mが比重によりb' = R<sub>E</sub>/Vで表されるならば、イオンの抵抗性または構造に流体力学的な関係の成立が推察される。流体力学的な抵抗はD = 1/2 ρ U<sup>2</sup> S · C<sub>D</sub>で表すことができる。<sup>6)</sup>いまサンプルイオンの抵抗をCl<sup>-</sup>の抵抗との比(R<sub>D</sub>)で表すとき、同一細管での等速電気泳動中はρ, Uは等しいからR<sub>D</sub> = S<sub>S</sub>C<sub>Ds</sub>/S<sub>Cl</sub>C<sub>DCl</sub>(S: 基準面積, C<sub>D</sub>: 抵抗係数)で表すことができる。Clは分子量35.45, 比重1.557であるから体積は22.77となりClを球と考えると半径は1.76となる。表に示したモデル物体のC<sub>D</sub>を用いてR<sub>D</sub>を計算すると表の右のようになった。図3が示すように上記のイオン性物質の相関式による直線群(図の点線部分)は、表に示したモデル物体(1-5)の流体力学的な抵抗と構造との関係とはほぼ一致した。またR<sub>D</sub>はV<sup>2/3</sup>の関数であることから、R<sub>E</sub>もV<sup>2/3</sup>の関数として表すことが適当と考えられる。その場合の上記のイオン性物質(N=115)の相関式は次のようになった。

$$R_E = 0.680 + 0.081 \quad (M/d)^{2/3}/|Z| \quad (r=0.940, p<0.0001) \quad (8)$$

表. 種々の物体の抵抗係数C<sub>D</sub>およびR<sub>D</sub>

物体 <sup>6)</sup>	C <sub>D</sub> <sup>6)</sup>	R <sub>D</sub> = b · V <sup>2/3</sup>
1. 円柱 $u \equiv \begin{matrix} \text{(流れの方向)} \\ \text{Re} < \text{Re}_c \\ l/d = 1 \end{matrix}$	0.63	R <sub>D</sub> = 0.162 V <sup>2/3</sup>
2. 球 $u \equiv \text{O} \text{Re} < \text{Re}_c$	0.47	R <sub>D</sub> = 0.124 V <sup>2/3</sup>
3. 円柱 $u \equiv \begin{matrix} \text{(流れの方向)} \\ l/d = 2 \end{matrix}$	0.85	R <sub>D</sub> = 0.108 V <sup>2/3</sup>
4. 円錐 $u \equiv \begin{matrix} \text{(流れの方向)} \\ \alpha = 30^\circ \end{matrix}$	0.34	R <sub>D</sub> = 0.094 V <sup>2/3</sup>
5. 円柱 $u \equiv \begin{matrix} \text{(流れの方向)} \\ l/d = 1 \end{matrix}$	0.87	R <sub>D</sub> = 0.070 V <sup>2/3</sup>

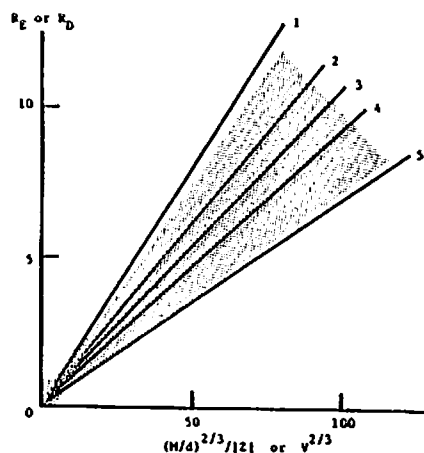


図3 Relationships between (M/d)<sup>2/3</sup>/|Z| and R<sub>E</sub> for Anionic Substances, and V<sup>2/3</sup> and R<sub>D</sub> for some Model Bodies

1) O.Fujishita, S.Higuchi, M.Yoshikawa, T.Aoyama and M.Horioka, Chem.Pharm.Bull., 31, 2134 (1983).  
 2) 藤下 修, 平川 雅章, 福岡 龍一, 樋口 駿, 青山 敏信, 堀岡 正義, 日本薬学会第105年会, 講演要旨集, 金沢, 1985年4月, p.366.  
 3) T.Hirokawa, M.Nishino, N.Aoki, Y.Kiso, Y.Sawamoto, T.Yagi and J.Akiyama, J. Chromatogr., 271, D1 (1983).  
 4) O.Fujishita, R.Fukuoka, M.Hirakawa, S.Higuchi, T.Aoyama and M.Horioka, Chem. Pharm. Bull., 投稿中.  
 5) 日本化学会編, “化学便覧基礎編1”, 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.  
 6) 富田幸雄, “流体力学序説”, 第4版, 養賢堂, 東京, 1978, pp.286-291; 高野 暉, “流体力学”, 岩波書店, 東京, 1975, pp.72-80



## 8 細管式等速電気泳動法による海水中のストロンチウムの定量

(神船大・阪工試) ○福土忠一・日色和夫

1. 目的 演者らは今年の分析化学会第34年会において、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 溶離-細管式等速電気泳動法による海水中のHg及びCaイオンの定量について発表した。今回、本法を海水中のSrの定量に応用し、分析条件を確立するために研究した。細管式等速電気泳動法ではSr-EDTAとCa-EDTAとの分離は困難であると考えられる。そこで前処理分離法としてイオン交換法を応用することとし、かつ等速電気泳動法でSrとCaとの分離可能な溶離用キレート剤について検討し、溶離液を直接等速電気泳動装置に導入し、SrとCaとを分離できるようにした。

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、泳動管は内径1.0mm、長さ10cmのPTFE製チューブに、内径0.5mm、長さ40cmのFEP製チューブを接続したものである。検出器は電位勾配検出器を用い、泳動電流は約18分間200 $\mu$ Aで通電した後、100 $\mu$ Aに切り換えて泳動させた。カラムはNa型にしたDowex 50WX-8 (100-200メッシュ)陽イオン交換樹脂をOmni-fit社製クロマト管(内径3mm、長さ10cm)に充填したものである。ポンプはアトー社製SJ-1220型、フラクションコレクターは東洋科学産業社製SF-160Kを使用した。

3. 結果 はじめに、EDTA、シクロヘキサレンジアミン四酢酸 (CyDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)、グリコールエーテルジアミン四酢酸 (GEDTA)、トリエチレンテトラアミン六酢酸 (TTHA) 及びジアミノプロパン四酢酸 (Hethyl-EDTA) とSr、Ca、Ba及びHgとのキレートを生成し、装置に導入した。その結果、GEDTAを用いればSr、Ca及びBaの分離が可能であることがわかった (Fig.1 参照)。なおHgはGEDTAとはキレートを生成しなかった。ついで溶離液濃度、pH及び溶離速度等Sr及びCaの溶離条件について検討した結果、最適定量操作法を以下のように決定した。まずNa型陽イオン交換樹脂カラムにpH8の3% NaCl溶液10mlを流し、カラム内を海水と類似の状態にしておく。ついで孔径0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターでろ過した海水10.0mlを1.0ml/minの流速で流し、Srを吸着させる。同時にCa及びHgも吸着される。蒸留水10mlでカラムを洗浄した後、1N NaOH溶液でpH6.6に調整した $5.0 \times 10^{-3}$ N EDTA溶液100mlを2.0ml/minの流速で流し、Caを溶離する。この時Hgも少しずつ溶離されてくる。さらに蒸留水10mlでカラムを洗浄した後、同様にpH10.0に調整した $5.0 \times 10^{-3}$ N GEDTA溶液を1.0ml/minの流速で流し、Srを溶離する。最初の1.0mlを捨て次の2.0mlを採り、この溶出液10 $\mu$ lを装置に導入する。先行液として0.01N塩酸-0.1% HPMC-トリヌ (pH9.0)、後続液として

ふくしけいじ・ひいろかずお

0.01 M カブロン酸ナトリウムを用いた。本法により、Srを2.0-16mg/l添加した人工海水について検量線を作成したところ、Fig.2 に示すように直線性の良い検量線が得られた。本法の繰り返し精度はn=8 で相対標準偏差パーセントで4.6%であり、回収率はほぼ一定で102 ± 7%であった。本法を実海水試料の分析に適用した。Table 1 からわかるように本法は実試料にも応用できるし、標準添加法でも再現性のある値が得られた。

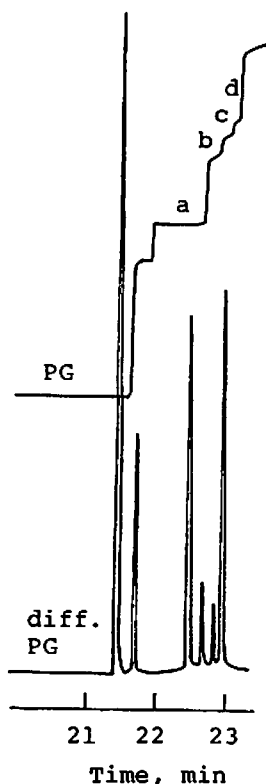


Fig.1 Isotachopherogram of the solution containing GEDTA, Ca-GEDTA, Sr-GEDTA and Ba-GEDTA  
a:GEDTA;b:Ca-GEDTA(25mg/l);c:Sr-GEDTA(50mg/l);d:Ba-GEDTA(100mg/l)

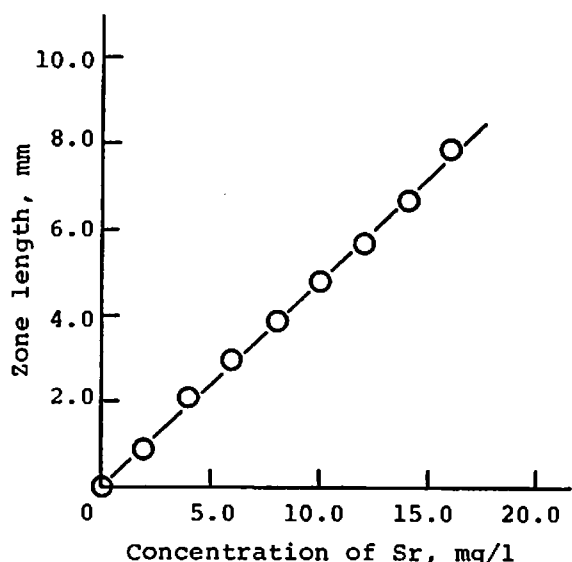


Fig.2 Working curve of strontium

Table 1 Analytical results of strontium in sea water samples

Sample	Temperature(°C)	pH	Salinity(‰)	Sr		
				Added(mg/l)	Found(mg/l)	Error(%)
The pond of KUMM	29.0	8.25	21.5	—	6.4	—
Rokko island	28.9	8.03	24.4	—	6.4	—
No.4 Maya pier	29.5	8.05	24.5	—	6.4	—
Port of Kobe	28.6	8.15	25.7	—	6.4	—
Nishinomiya harbor	29.7	8.82	18.0	—	4.1	—
Port of Amagasaki	29.2	8.51	14.9	—	2.0	—
Suma beach	28.9	8.46	27.0	—	6.4	—
Suma beach(2 times diluted)				—	3.2	—
Suma beach(2 times diluted)				4.0	6.4	-25
Suma beach(2 times diluted)				8.0	11	-6.3
Suma beach(2 times diluted)				12	15	-6.3

Sampling date:September 10, 1985;KUMM:Kobe University of Mercantile Marine

(阪府工技研) ○蔵本暢浩, 浅尾勝哉

1. 染料およびその合成中間体にはスルホン基、カルボキシル基など親水性基を有するものが多いが、一般にこれらの分離分析には多大の前処理や複雑な操作を要する。等速電気泳動 (IP) 法は、このような電荷物質の分離分析が簡便に行ない得ることから注目され、染料関連分野においてもナフタレンスルホン酸類や食用色素などの分析例がすでにみられる。ここでは、合成中間体のうちあまり検討されていない置換ベンゼンスルホン酸類の異性体分離を目的として、その泳動挙動におよぼす  $P$ -置換基の影響、無電荷配位子の添加効果などについて調べた。また、酸性および直接染料の分析条件の検討も行なった。

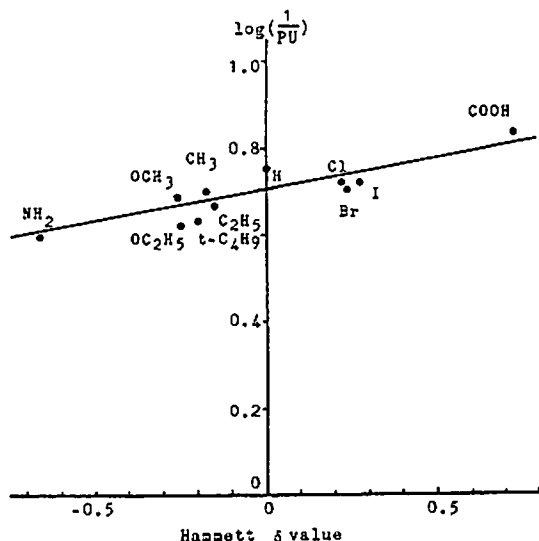
2. 装置は島津細管式等速電気泳動装置 IP-2A 形を用い、泳動管には  $4\text{ cm}$  (PTFE 製 内径  $1.0\text{ mm}$ ) のものと長さ  $15.0\text{ cm}$  (FEP 製、内径  $0.5\text{ mm}$ ) のものを連結して用いた。泳動電流は、主として  $200\text{ }\mu\text{A}$  で通電したのち  $100\text{ }\mu\text{A}$  に切り換える方法によった。実験に用いた試料は、置換ベンゼンスルホン酸類 ( $R = \text{O}, \text{m}, \text{p}, \text{NH}_2, \text{OCH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{CH}_3, \text{OH}, \text{H}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{COOH}, \text{NO}_2$ ) およびアゾ、アントラキノン系の染料を使用した。

3. 置換ベンゼンスルホン酸類の泳動挙動に及ぼす  $P$ -置換基の種類による影響を電解液 I を用いて調べ、ハメット則の置換基定数  $\sigma$  値と  $\log(\frac{1}{PU})$  との関係プロットしたところ、おおむね直線上に乗ることが認められた (図 1)。また、同一置換基をもつ  $\text{O}, \text{m}, \text{p}$ -体の泳動挙動を電解液 I のリーディング液の  $\text{pH}$  を  $3 \sim 5$  に変化させて調べたところ、 $R = \text{NH}_2$  の場合の 3 異性体は強酸性側で各々の  $P$  値差が大きく、 $3 \sim 4.5$  の  $\text{pH}$  領域で良好に分離でき (図 2)、 $R = \text{OH}$  の  $\text{O}, \text{p}$ -体も  $\text{pH} 4 \sim 4.5$  の領域で分離可能であった。しかしながら、他の置換基をもつ化合物では、 $\text{pH}$  によって  $PU$  値が大きく変化するものの、3 異性体の  $PU$  値には殆ど差がなく分離するのは困難であった。

つぎに、電解液 III のリーディング液中に無電荷配位子である  $\beta$ -シクロデキストリン ( $\beta\text{-CD}$  と略) を  $1 \sim 5\text{ mM}$  量添加して泳動させたときの挙動を調べた。ヨードベンゼンスルホン酸の場合 (図 3)。

Table 1 電解液の組み合わせ

	Leading electrolyte	Terminating electrolyte
I	0.01M HCl, $\beta$ -Alanine PVA, pH 3.6	0.01M n-Caproic acid, pH 3.2
II	0.01M HCl, $\beta$ -Alanine 0.2% Triton X-100 pH 3.6	0.01M n-Caproic acid, pH 3.2
III	0.01M HCl, $\beta$ -Alanine 0.01% Triton X-100 pH 3.6	0.01M n-Caproic acid, pH 3.2
IV	0.01M HCl, 0.05M $\beta$ - Alanine, 50% $\text{CH}_3\text{OH}$ pH 5.0	0.01M n-Caproic acid, 50% $\text{CH}_3\text{OH}$ pH 4.2

図 1  $P$ -置換ベンゼンスルホン酸ナトリウムの IP 挙動における置換基効果

くらのものびひろ、あさおかつや

$\beta$ -CD を含まない電解液では  $O, m, p$ -体は殆ど同じ移動度をもつたため分離できないが、 $\beta$ -CD の添加により著しく影響を受けて異性体の分離が可能となることわかった。 $\beta$ -CD との相互作用は  $R = -I > -COOH > -CH_3 > -Cl$  の順で効果が大きく、また異性体間では  $R = Cl$  の場合を除いて、 $p > m > o$ -体の順で作用効果が大きかった。これは各々の分子構造と  $\beta$ -CD の空洞との相互作用<sup>2)</sup> のちがひによるものと推察される。 $OCH_3, Br, NO_2$  基をもつ化合物ではこの方法によっても異性体を分離するのは難しかった。

つぎに、構造の比較的類似する幾つかのアゾ系酸性染料の泳動挙動を電解液 III, IV および電解液 V のリーディング液中に  $\alpha, \beta, \gamma$ -CD を  $4mM$  量添加した条件下で調べ、各々の場合の PU 値を表 2 に示した。また、アントラキノ系の Acid Blue 43 の結果も合わせて記した。メタノールを含む電解液 IV を用いたときには、いずれの染料でも電解液 II や III の場合よりも大きな PU 値を示した。また、電解液 III に、結合しているグルコースの数により空洞の大きさが異なると言われている  $\alpha, \beta, \gamma$ -CD を添加したときの挙動は、 $\alpha$ -CD の添加ではあまり大きな変化は見られず、 $\beta$ -あるいは  $\gamma$ -CD を添加した場合に PU 値が増大する傾向がみられた。特に、Acid Orange 7, Acid Red 88 や Acid Blue 43 の染料では大きな空洞が期待される  $\gamma$ -CD の添加で PU 値が著しく大きくなり、これら染料と  $\gamma$ -CD との間での相互作用が示唆される。以上のようなことから、 $\beta$ -CD の添加が有効であった置換ベンゼンスルホン酸類の場合とは異なり、分子構造の大きいこれら染料の IP 分析には  $\beta$ -CD よりも  $\gamma$ -CD の添加が有望と思われる。なお、アゾ系染料の無機塩添加による錯体化の影響についても報告する。

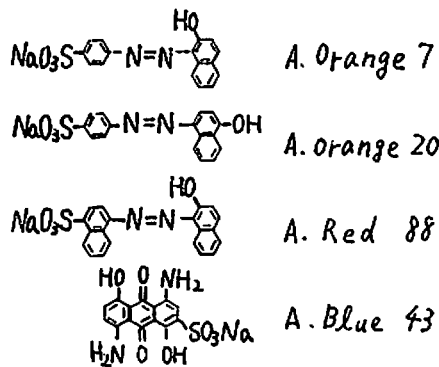


Table-2 酸性染料の PU 値とシクロデキストリンの添加効果

Dye C.I.	Electrolytic Soln. (IV)	Electrolytic Soln. (III)			
		—	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Acid Orange 7	0.387	0.149	0.092	0.356	0.417
Acid Orange 20	0.422	0.205	0.113	0.216	0.337
Acid Red 88	0.344	0.122	-	0.130	0.408
Acid Orange 10	0.174	0.130	0.092	0.113	0.155
Food Yellow 3	0.194	0.086	0.072	0.120	0.174
Acid Red 18	0.125	0.071	0.049	0.094	0.102
Acid Yellow 17	0.233	0.133	0.120	0.245	0.272
Acid Blue 43	0.163	0.055	0.060	0.060	0.354

$\alpha, \beta, \gamma$ -Cyclodextrin  $4mM$

1) 島津アプリケーションニュースダイジェスト No.1, P15

2) 田崎ら, 第3回ホシゴジウム講演会(198)

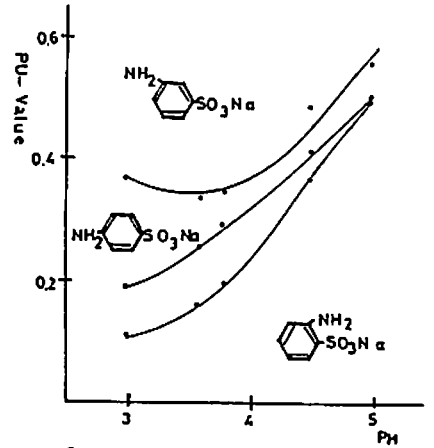


図2 PU値とPHの関係

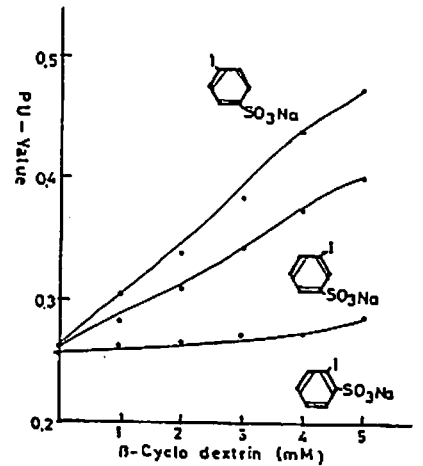


図3  $\beta$ -シクロデキストリンの添加効果

98.1 E

お茶の水女子大学  
共立女子大学

福場博保

アスコルビン酸 ○ 津田淑江  
グルタミン酸 ミックスゾーン

目的 Leading 液に HCl-β-alanine (pH 3.6), Terminal 液に n-Caproic acid の組み合わせシステムを用いて、等速電気泳動法でアスコルビン酸 (AsA) を簡易迅速に分離定量することが出来ることを確認した。しかし、本定量法の実用性について検討したところ、トマトにおいては、その測定値が 2,4,-Dinitrophenylhydrazine 法による測定値より高い値となった。これは、同じ移動度を持つ物質とミックスゾーンを形成していることによるもので、紫外吸収測定法によれば、分析は可能となる。しかし、これら物質を相互に分離して、AsA の定量性を増加させるためには最適な Leading solution, Terminal solution の組み合わせ及び pH を選択し、各イオンの移動度を変える必要がある。そこで、コンピューターを用いて AsA と共存物質の移動度の変化とその Simulation を行ない、分離に適した条件の検討を行なった。

実験結果および考察 トマトの AsA が等速電気泳動法で高い測定値となったのは AsA が同じ移動度を持つ物質とミックスゾーンを形成しているものと推定し、この部分を分取装置を用いて分取した。この分取液の薄層クロマトグラフィーを行ない、ミックスゾーン物質を検討したところ、グルタミン酸 (Glu) と AsA とが本泳動系で同一移動度を持つことを確認した。そこで HCl-β-alanine (pH 3.6)、n-caproic acid の組み合わせで、AsA と Glu の Simulation を行なったところ、本泳動条件下では分離し難いことが確認された。

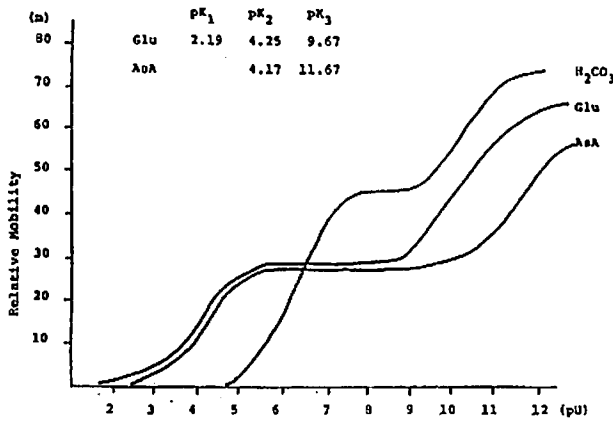


Fig. 1 Dependence of Mobility upon pH

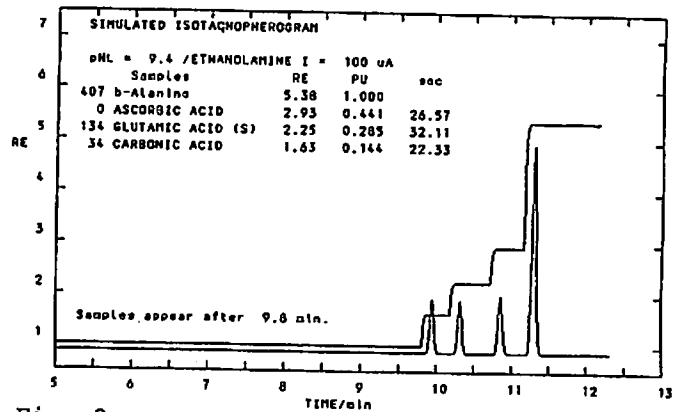


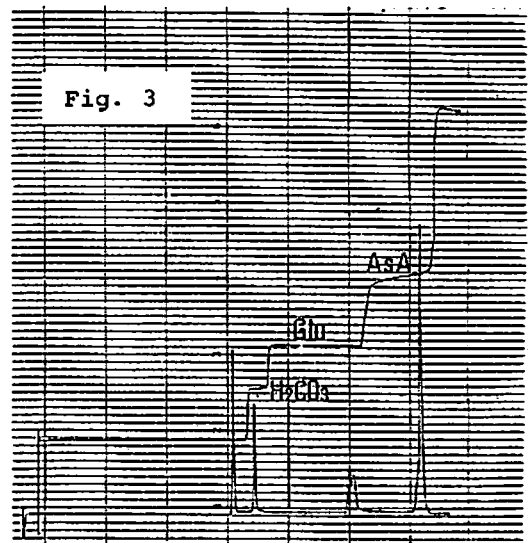
Fig. 2

両イオンを分離させるためには、pHの変化、溶媒の選択、錯体形成、粘性効果などの利用が試みられている。そこで今回はpHを変化させ、AsAとGluの間に移動度差を生じさせるような電解液の組み合わせ条件の選択をSimulation法によって検討した。AsAとGluのpHによる移動度の変化は、Fig. 1のように考えられる。pH 9-10付近がイオンの解離度から推定し分離に適しているように思われた。このため、それぞれカウンターイオンとしてヒスチジン、トリス、エタノールアミンを用いて、pHを7.5, 8.5, および9.4としてSimulationを行なった。その結果、pH9.4においてSimulationした場合Fig. 2のように分離可能であることが推測された。また、実際にTable 1に示すような泳動条件で、AsA, Gluの標準品を泳動させたところFig. 3のようにAsAの $RE=2.90$ , Gluの $RE=3.49$ となり、両者を分離することができた。

本来AsAの自動酸化は、pHによる影響が大きく、pH 7以下の酸性側では銅イオンなどの重金属触媒が存在しない限り、それほど速くは進まないが、アルカリ域では特に速いとされている。しかし無酸素条件下でアルカリを用いてAsAを滴定すると、AsAは2価の酸としての挙動を示し、ラクトン環の開裂はみられないとされている。等速電気泳動で泳動する場合は、試料液をleading液とterminal液の境界面に注入し、ただちに定電流を通電することにより泳動させるため、酸素相は存在せず、短時間でもあるため、アルカリの泳動条件においてもAsAは安定であり、定量性も認めることが出来た。さらにこの条件を用いてトマトの搾汁を泳動したところ、AsAとGluは分離することができ、Gluによって妨害されることなく、AsAを定量することが出来ることを確認した。

Table 1

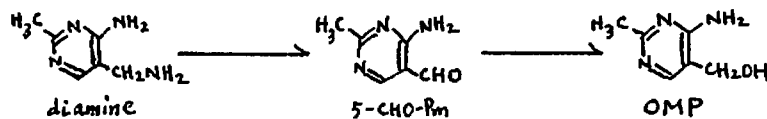
Leading electrolyte	
Anion	$Cl^-$
Concentration	0.01N
Counter ion	Ethanolamine
pH	9.4
Terminal electrolyte	
Anion	$\beta$ -alanin
Concentration	0.01N
pH	10.0
Electric current ( $\mu A$ )	100
Additive	HPC 0.1%
Capillary tube	$\phi$ 0.5mm, 20cm
Controlled temperature( $^{\circ}C$ )	20



(山口女子大・家政) °二五田公俊・西村妙子・松尾美春

## 1. はじめに

2-methyl-4-amino-5-aminomethyl pyrimidine (以下 diamine) は *Neurospora* のチアミン (ビタミン B<sub>1</sub>) 要求性変異株で 5-ホルミルピリミジン誘導体と共に生成することが知られている。また酵母抽出液により diamine は 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethyl pyrimidine (OMP) へ変換されるが、このとき 5-ホルミルピリミジン体を経ると推測されている。



こうした変換経路の研究に、生成した OMP のみを定量する方法がとられている。これらの酵素系の解析のためには OMP の定量のみでは不充分であり、diamine そのものの定量も欠かせない。

diamine の定量法としては Pifer あるいは水上らによるニンヒドリンを用いる比色法や植松による色素縮合法の報告がみられるが、これらの方法は感度が低く、また特異性も劣っている。今回私達は酵素反応系中の微量の diamine の定量に適用する目的で、等速電気泳動法による diamine の定量を試み、併せて *Ent. aerogenes* PD-1 の無細胞抽出液による diamine の OMP への酵素的変換反応を調べた。

## 2. 実験

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。検出器は電位勾配検出器 (PGD) を用いた。泳動チューブは内径 1.0 mm 長さ 5 cm と内径 0.5 mm 長さ 10 cm と直列に接続したものを用了。泳動電流は 250~300  $\mu\text{A}$  で、2~15 分間通電させた後 (1<sup>st</sup> stage)、75  $\mu\text{A}$  に下げて分析 (2<sup>nd</sup> stage) を行った。検討した陽イオン分析用電解液の組み合わせを表 1 に示した。

## 3. 結果

表 1 の電解液の組み合わせの中で、条件 9、10、通電条件は 1<sup>st</sup> stage 300  $\mu\text{A}$ , 2~5 分、2<sup>nd</sup> stage 75  $\mu\text{A}$  が diamine の分析に最適であり、0.5~1 nmol 程度まで検出できた。他の条件では単一試料を泳動させたにも拘らず、2~3 成分系を思わせる分離ゾーンがみられたり、不明確あるいは再現性がとぼしく、また条件 9 の液組成でも、電解液の pH が分離像に顕著に影響する結果が得られた。

*Ent. aerogenes* PD-1 の無細胞抽出液を用いる diamine の変換を、IP 法による diamine の定量と OMP 要求性大腸菌変異株である *E. coli* 70-17 を用いた bioautography 法とを併用して調べた結果、酵素反応系の解析のための diamine の定量手段として IP 法を用いることが可能であることを

にこた　きみとし

明らかにした。

表 1

Examination of Leading Electrolyte and Terminating Electrolyte

No	Leading Electrolyte	Terminating Electrolyte	Result
1	5 wt Sodium hydroxide 20 wt L-Glutamic acid	10 wt L-Histidine (HCl)	良好な結果 再現性あり
2	5 wt Sodium hydroxide 22 wt L-Glutamic acid 20% Acetone	10 wt L-Histidine (HCl)	良好な結果
3	5 wt Sodium hydroxide 18 wt L-Glutamic acid	10 wt L-Histidine (HCl)	良好な結果 再現性あり
4	5 wt Sodium hydroxide 12 wt L-Glutamic acid 0.5% Triton X-100	10 wt L-Histidine (HCl)	良好な結果 再現性あり
5	5 wt Sodium hydroxide 10 wt L-Glutamic acid 1% Carboxymethyl Cellulose	10 wt L-Histidine (HCl)	良好な結果 再現性あり
6	5 wt Sodium hydroxide 10 wt L-Glutamic acid 1% Carboxymethyl Cellulose 5% Acetone	10 wt L-Histidine (HCl)	良好な結果 再現性あり
7	10 wt Sodium hydroxide 22 wt Methionine	20 wt Tris 5 wt HCl	良好な結果
8	10 wt CH <sub>3</sub> COOH-CH <sub>3</sub> COONa 0.1% Triton 5% Ethanol	10 wt β-Alanine (acetic acid)	良好な結果 再現性あり
9	10 wt Potassium acetate (acetic acid)	10 wt L-Histidine (acetic acid)	良好な結果
10	5 wt Potassium acetate (acetic acid)	10 wt L-Histidine (acetic acid)	良好な結果

図 1

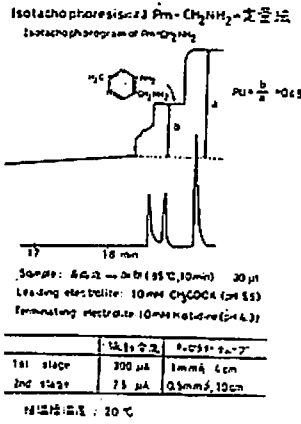


図 2

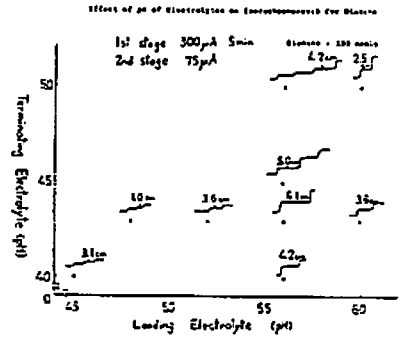


図 3

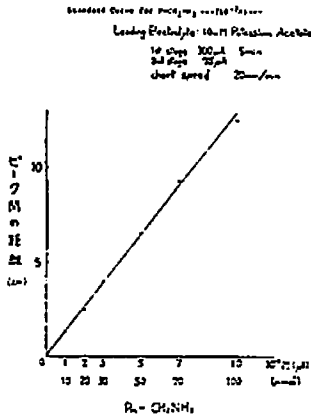


図 4

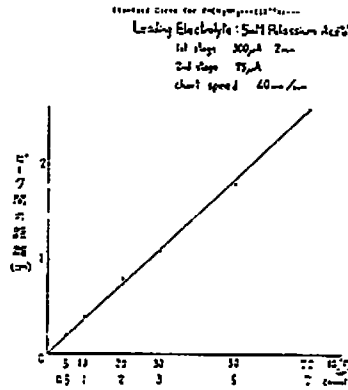


図 5



図 6

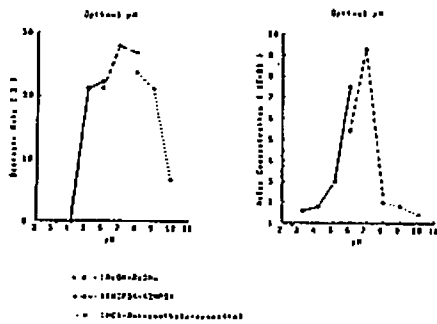


図 7

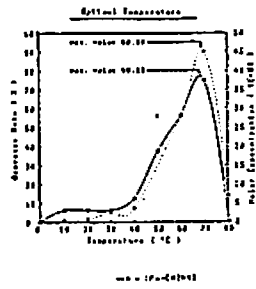
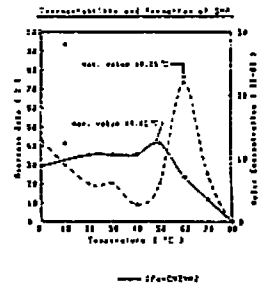


図 8





## 12 等速電気泳動法による清酒のキャラクタリゼーション

(広島県食工技セ) ○清水加津子、天道俊孝  
(広大工) 広川 健、木曾義久

(緒言) 清酒の品質評価は、味、緩衝能、化学組成の三要素から成りたっている。香味による評価は従来から必ず実施されて来たが、その他はアルカリ滴定値等により推定されるのが通例である。化学成分組成の解明は、製品の品質評価ばかりでなく、製造面で必要なので、各種の装置を用いて測定が行われているが、かなり複雑な操作と時間と設備費を必要とするため、日常の品質管理用としては実用化されていない。細管式等速電気泳動法はイオン性物質の分析に最適の方法であり、清酒の品質管理の可能性を探るために分析を行い、清酒のキャラクタリゼーションを行った。

(実験) 清酒は、非イオン性物質であるエタノールを15~18%含有し、エキスを3~7%含有している。エキスは非イオン性物質の糖やエステル、イオン性物質の有機酸、アミノ酸、ポリペプチド、核酸、ミネラル、含硫化合物等から成り、味や緩衝能を左右している。清酒の有機酸としては、乳酸、コハク酸、リンゴ酸、グルコン酸が多く、ピルビン酸も含まれていることがある。図1に清酒中のアニオン物質の $R_E$ - $pH_L$ 図を示した<sup>1)</sup>。比較的少量に含まれている物質を太線で、少量又は微量しか含まれていない物質を細線で示した。有機酸の他にリン酸や、酸性アミノ酸であるグルタミン酸も少量に含まれていることが知られている<sup>2)</sup>。これらの混合試料の最適分析条件は $pH_L=3.50$ であることが図1から

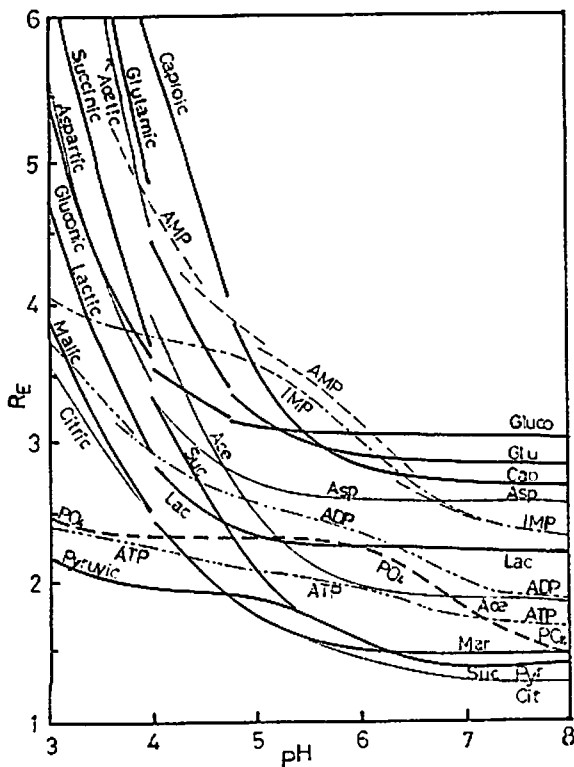


図1. 清酒中のアニオンの $R_E$ - $pH_L$ 図

表1. 清酒中アニオンの定性定量指標<sup>1)</sup>

Anion	Qualita tive, $R_E$	Quant itative, T ( sec /10n mol)	Kol.Wt.	mg % in SAKE <sup>2)</sup>
T Caproic acid	9.38			
Valeric acid	8.89	25.41	130.14	
Isobutyric acid	8.42		88.01	0.07-0.18
Butyric acid	8.24	22.18	88.01	0.14-0.31
Propionic acid	7.99	20.98	74.08	0.10-0.16
Levulinic acid	6.87	22.40	116.12	
Adipic acid	6.74	29.04	146.14	
Glutamic acid	6.55	25.71	147.13	26-66
Acetic acid	6.38	19.50	60.05	5.7-31.2
Succinic acid	4.86	23.41	118.09	12-92
Aspartic acid	4.55	24.52	133.10	2-33
Gluconic acid	4.32	26.09	126.16	25-45
Lactic acid	3.68	21.53	90.08	23-157
Glycolic acid	3.26	19.75	76.05	2.7-14.7
Malic acid	3.09	24.76	134.69	0.69-39
Citric acid	2.97	27.87	192.12	0-13.2
2-Keto-glutaric acid	2.53	24.41	146.10	0-8.8
Picnic acid	2.41	28.14	116.07	0-7.5
Phosphoric acid	2.41	22.80	98.00	28
Tartaric acid	2.34	27.63	150.09	
Formic acid	2.30	17.11	46.03	0-2.9
Malonic acid	2.20	20.87	104.06	0-3.7
Pyruvic acid	2.02	20.24	88.06	0-8
Oxalic acid	1.62	24.23	90.04	0-3.3
L Chloride	1.09			

L : Leading ion,

T : Terminal ion

わかる。リーディング液の条件として0.01M 塩酸、 $\beta$ -アラニン緩衝剤、0.2% ポリビニルアルコール、 $pH$  3.50, ターミナル液の条件として0.01M カプロン酸、トリス、 $pH$  7~8 で清酒を前処理なしで4 $\mu$ l 注入し、一次電流150 $\mu$ A を印加し、12分後に二次電流100 $\mu$ A に切換え、泳動を続けると、14分前後から試料ゾーンが検出され始め、17~19分後にターミナルイオンを検出して測定を終る

(結果と考察) 市販清酒34試料について測定した中から10試料のイソタコフェログラムについて図2に示した。これらのパターンから、化学成分含有量や組成の差が明瞭に読みとれる。データの解析に常用できる指標表(表1)に基づいて解析を行った中から先の10試料についての結果を表2に示した。34試料については、有機酸等アニオン性物質の合計量が135~264 mg%の範囲、未知物質を含めた合計量が試料4 $\mu$ l 当り118~243 secのゾーン長範囲にあり、含有量合計とゾーン長合計は殆んど比例していることがわかった。

(まとめ) 構成イオン種の緩衝能は各々特徴があり、mg%算出は、清酒の酸組成による緩衝能の推定に役立つが、簡易な日常の品質管理にはイソタコフェログラムのゾーン長の比較だけでも充分であり、品質管理用測定法として実用的であることがわかった。

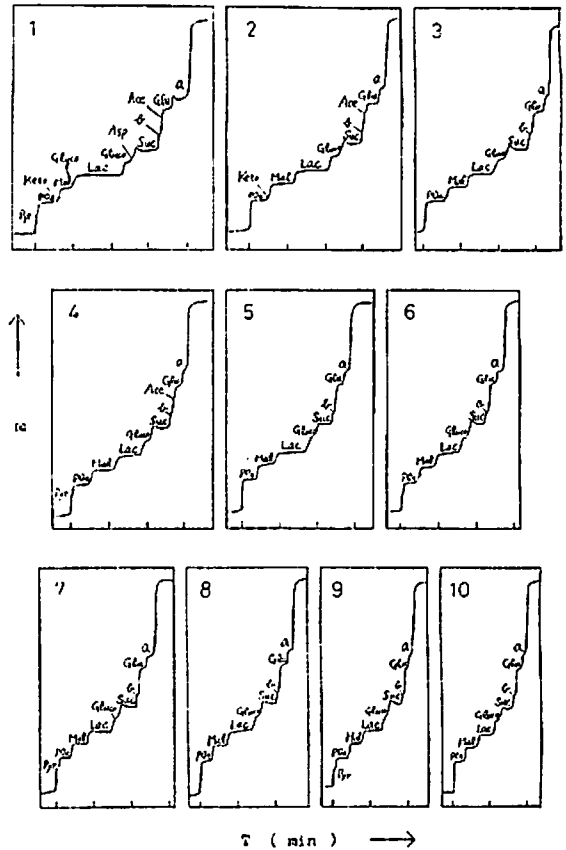


図2. 市販清酒のイソタコフェログラム

表2. 市販清酒の有機酸等アニオンの組成

(文献)

1) T. HIROKAWA,  
Y. KISO et al.  
J. of Chromatography  
271 (1983) D1-D106

2) 国稅庁所定分析法  
注解

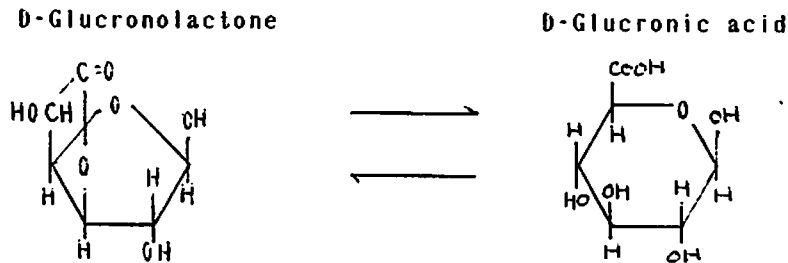
試料	有機酸とリン酸 (C) (mg%)										酸性リン酸 (N) (mg%)		未知物質 (X) (sec)		合計 C+N (mg%)	合計 C+X (sec)
	乳酸	コハク酸	リン酸	リン酸	グルコン酸	ヒルコン酸	外加糖類	グルコサミン酸	リン酸	リン酸	a	b				
1	3.68	4.86	3.07	2.41	4.32	2.02	2.53	3.26	6.38	6.55	4.55	7.47	5.60	258.0	243.3	
2	77.8	49.6	29.7	33.8	25.4	3.3	3.1	3.5	1.8	24.8	5.3	24.0	3.9	246.6	213.9	
3	54.0	40.1	52.8	31.3	26.5	0	3.1	1.7	2.3	28.3	6.5	9.0	4.2	228.7	197.4	
4	42.0	42.4	45.9	34.5	25.4	0	4.0	0	1.4	27.0	6.1	8.1	4.2	207.8	181.5	
5	38.9	35.9	50.8	30.3	18.6	2.6	2.7	2.9	1.8	18.0	5.3	8.1	3.6	191.5	171.0	
6	51.5	32.9	37.4	24.2	15.8	1.6	2.2	2.0	1.1	17.1	5.7	9.6	3.9	182.7	163.8	
7	40.8	32.5	34.9	25.8	16.4	1.3	3.6	1.7	1.6	18.4	3.0	12.0	3.0	172.4	157.5	
8	43.9	31.8	33.3	19.3	12.4	5.2	4.0	1.4	1.1	14.1	5.7	12.6	3.9	167.3	149.1	
9	43.3	30.3	32.5	20.3	15.2	0	2.2	0	0.7	17.6	5.3	9.9	4.2	145.1	129.0	
10	33.9	25.0	28.4	20.6	13.5	4.6	2.7	0	0	14.6	2.4	6.6	3.0	134.9	117.9	
10	27.3	27.2	27.2	17.4	12.4	0	3.1	0	0	17.6	5.7	6.3	2.7			

大洋薬品工業株式会社 ○近藤 紀巳、長谷川 孝人、大平 一夫

《目的》

グルクロノラクトン (GL) は医薬品として汎用されているが、その定量法は非常に困難である。そこで著者等は GL の定量法をイソタコフォレスス (IP) により検討したので報告する。

(GL) はグルクロン酸 (GA) がラクトン環を形成したものである。水溶液中では両者は一定成分比で平衡状態にある。



GL をイソタコフォレスス (IP) で分析するためには GL は中性物質であるために IP で分析可能な形にする必要がある。そこで GL を GA に転換し、測定する処理法を検討した。

又、GL の定量法としては GC、HPLC 及び比色法等が用いられているが どの方法も高濃度の糖類の存在下では妨害を受け、分析は困難である。そこで今回製剤中、特に高濃度の糖類存在下での IP 分析について検討した。

《実験方法》

装置：島津細管式等速電気泳動装置 (IP-1B)

電位勾配検出器：PGD-1型

泳動管：内径 0.5 mm × 長さ 200 mm

泳動電流：50 μA

電解液システム：リーディング液

0.01 M 塩酸

β-アラニン

pH 3.4

0.5% トリトン x-100

ターミナル液

0.01 M n-カプロン酸

こんどう としみ、はせがわ たかひと、おおひら かずお

試料：内服液剤

和光純薬試薬特級 グルクロノラクトン  
半井化学試薬特級 D-グルクロン酸ナトリウム  
日局白糖

試料の調整

D-グルクロン酸ナトリウムは前処理を行わず水溶液として測定した。

GL及び内服液剤は、第一段階の反応として水酸化ナトリウム処理を行いpH12以上とした。次に、第二段階の反応として塩酸又は強酸性イオン交換樹脂にて中性付近とし測定を行った。

《結果及び考察》

1) GLのIP注入前の処理について検討を行った結果、GL溶液を水酸化ナトリウムにてpH12以上とし、その後pH4~5とすることによりIPにて分析可能となった。第一段階の反応がpH12以下ではGLからGAへの変換が不完全であった。又、第二段階の反応では、塩酸を使用せず強酸性イオン交換樹脂の使用の方が良好な結果を得た。この方法によりGLを前処理して0.02%~0.15%の濃度範囲で検量線を作成したところ、相関係数0.9979の良好な直線性が得られた。

2) 15%白糖水溶液にてGLの添加回収実験を行ったところ、平均回収率98.0%、標準偏差2.8%の良好な回収率が得られた。

3) 下記処方の内服液剤について定量を行ったところ平均98.5%、標準偏差2.0%の良好な結果が得られた。

〔内服液剤組成〕

白糖	15.0 g
ハチミツ	3.0 g
ニコチン酸アミド	0.01 g
アミノエチルスルホン酸	1.0 g
グルクロノラクトン	0.5 g
L-アスパラギン酸Mg・K	0.2 g
クエン酸	0.225 g

精製水にて 100 ml

以上の結果から高濃度の糖類或は多成分中のGLも、2段階のpH操作を行うことでIPによる定量が精度よく行うことが可能となった。

14 細管式等速電気泳動法の医薬品分析への応用  
(第8報) 生薬分析への適用  
(徳島文理大・薬) ○香西重忠・赤田良信

演者らの研究室においては、その研究の一環として、漢方方剤の理化学的及び生物学的品質評価法の検討を十数年来行っている。そのなかで、理化学的品質評価については、高速液体クロマトグラフィーを中心とした汎用性の高い分析法の開発を行っているが、生薬を含むこれら漢方方剤は、非常に多成分からなる複雑な組成を持つため、そのクロマトグラムの解析に長時間を要し、且一定量のための標準物質の精製に多大の労力を費やす場合が多い。一方、これら漢方方剤中の各含有成分を同定し定量するという従来の観点から、発想の転換を行い、パターン分析法の概念を適用し、その理化学的品質評価を行う場合においても、分析条件やカラムの再現性など種々考慮すべき問題点を残しているのが現状である。そこで、演者らは、すぐれたイオン成分の分析手段である細管式等速電気泳動法に着目し、漢方方剤中の多岐にわたる含有成分の内、分析対象物質をイオン成分に限定し、そのイソタコフェログラムによるこれら方剤の品質評価の可能性につき検討を加えている。

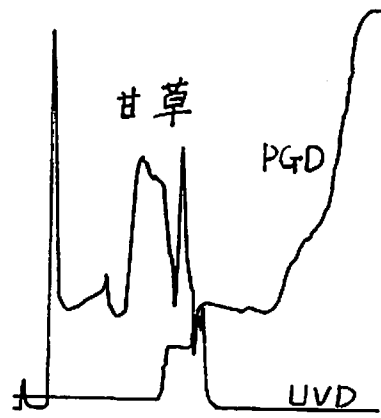
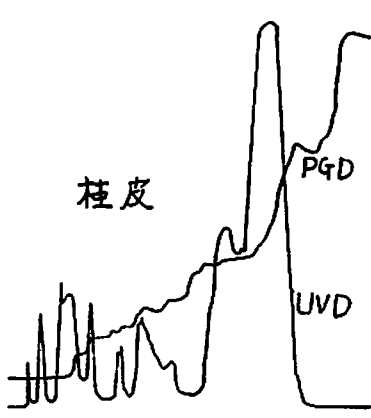
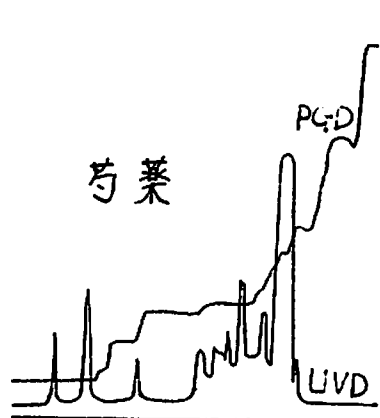
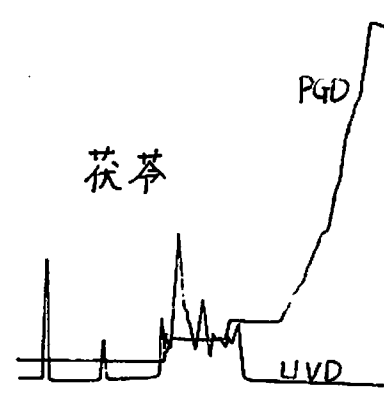
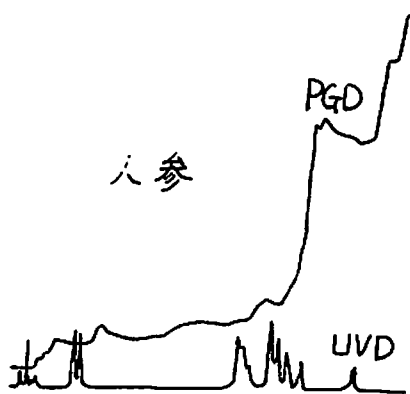
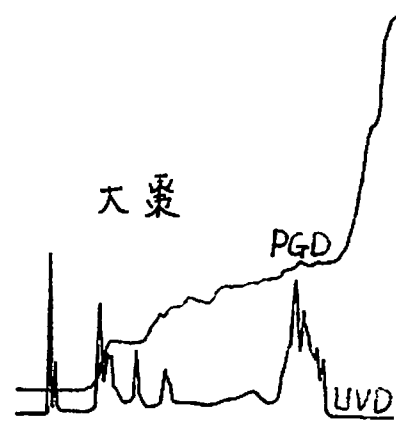
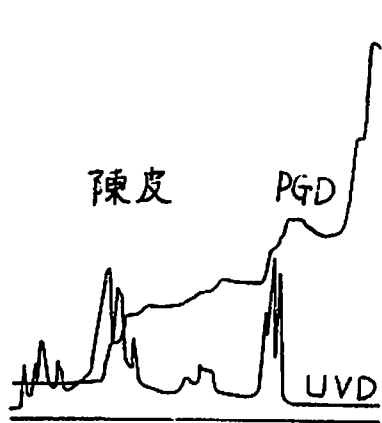
今回、漢方方剤によく処方されている生薬中のイオン成分のなかで、アニオン成分に着目し、又液性の異なる数種類のリーディング液とターミナル液を用いて得られたイソタコフェログラムより、生薬間の差異について検討したので報告する。

演者らが用いた生薬は、黄耆(17)、黄芩(35)、黄柏(14)、黄連(19)、甘草(138)、桔梗根(21)、枳實(20)、杏仁(12)、荆芥(11)、桂皮(61)、香附子(13)、厚朴(24)、柴胡(31)、山梔子(16)、地黄(27)、芍薬(65)、縮砂(11)、生薑(102)、川芎(33)、蒼朮(13)、蘇葉(10)、大黃(28)、大甞(64)、澤瀉(20)、陳皮(39)、当帰(54)、桃仁(13)、人參(51)、麥門冬(15)、薄荷(11)、半夏(47)、白朮(47)、茯苓(69)、防風(17)、牡丹皮(14)、麻黄(16)、木香(10)、及び連翹(10)計38種の局方収載生薬であり、汎用漢方方剤10種以上に処方されているものを中心とした。カッコ内に示した数字は、その生薬が処方されている漢方方剤の数を示した。生薬の一定量を量り、水を加え常法に従って半量になるまで煎じ、得られた煎液をそのまま試料液とした。試料液の一定量をそのまま装置に導入し、得られたイソタコフェログラムの254nmを検出波長としたときの紫外部吸収を生薬間の差異を判定する主たる指標とした。

演者らが設定したIP条件を以下に示す。

装置：IP-2A型島津細管式等速電気泳動装置、検出器：PGD-2型電位勾配検出器とUVD-10型紫外吸収検出器(254nm)を併用した。泳動管：1.0mm i.d. X 80mm(PTFE製) + 0.5mm i.d. X 140mm(FEP製)、泳動電流：250 $\mu$ A $\rightarrow$ 100 $\mu$ A、カート速度：20~80mm/min。

また、若干の方剤についても、本法を適用したので併せて報告する。



# 15 細管式等速電気泳動法による パラコートの分析 (その2)

島津製作所 応用技術部 日根 隆

## 1. はじめに

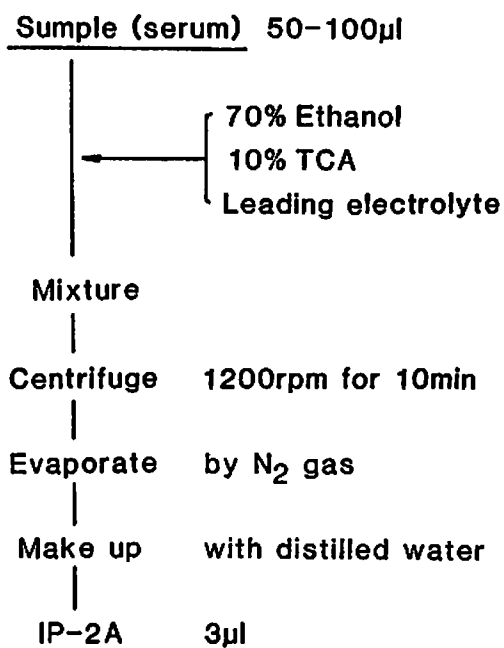
第四級アンモニウム塩系除草剤の一種であるパラコート (1,1'-ジメチル-4,4'ジピリジニウム塩) は近年盛んに使用されるようになってきたが、中毒や服毒による事故も数多く報告され大きな社会問題となってきた。種々の試料に含まれるパラコートの測定には、一般に塩基性下におけるヒドロサルファイトナトリウムの青色発色による定量分析が主におこなわれており、分離分析ではわずかに高速液体クロマトグラフィ (HPLC) の報告があるにすぎない<sup>1)</sup>。しかしながら、これらの方法は試料の前処理に複雑な操作を要している。そこで、昨年<sup>2)</sup>の第4回等速電気泳動シンポジウムにおいて血清中のパラコートを前処理せずに直接分析する方法について報告をおこなったが、今回はあらかじめ血清中のタンパクを除いてからパラコートの測定をおこない、両者の比較を目的として検討をおこなった。

## 2. 実 験

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。検出器は紫外線吸収検出器 (UVD: 254 nm) と電位勾配検出器 (PGD) とを直列に接続して用いた。泳動チューブは内径1.0mm 長さ4~20cm (PTFE製) と、内径0.5mm 長さ15cm (FEP製) を直列に接続し、泳動電流は100~250  $\mu$ Aで10~18分間通電させた後に100  $\mu$ Aに下げて分析を行った。電解液の組み合わせは、前回の報告したリーディング液 (0.01M-塩酸、0.1%-PVA) とターミナル液 (0.01M-トリスバッファー) を用いた。島津データ処理装置：C-R2Aを使用してUVDの信号の面積を測定し、定量分析をおこなった。除タンパクの試薬として10%トリクロロ酢酸 (TCA)、70%エタノール、あるいはリーディング液のみを用いた。検討のための試料としてコントロール血清にパラコートを添加して使用した。

## 3. 結 果

図1に除タンパクの操作を示した。試料は血清中で50 ppmとなるようにパラコートを添加し調製をおこなった。10% TCAと試料の混合比を1対3 (A) の割合で、70%エタノールと試料の混合比を2対1 (B)、1対1 (C) の割合、リーディング液とは2対1 (D) の割合でそれぞれ混合し、除タンパクをおこなった。このとき、AとBの状態を混合した場合ほぼ完全にタンパクの沈殿を



確認することができた。除タンパク後の溶液を3  $\mu$ l 分析に供しバラコートの濃度を測定した。表1に、それぞれの試薬でおこなったときのバラコートの定量値を示した。その結果、A、Bの順にバラコートの回収率が良く90%前後の値を得た。また、除タンパクが不完全であったC、Dの状態では混合した場合や、除タンパク操作をせずに直接分析したときの回収率も80%以上の値を得ることができた。一方、バラコートは種々の成分と結合し易いことが知られているので、血清中のバラコートを添加したときの時間経過による回収率の変化も合わせて検討した。コントロール血清にバラコートを添加し、一定時間後に10% TCAをAの割合で加え回収率を求めた。図2に時間によるその変化を示した。最初の15分間では急激に回収率が低下するものの、その後は一定の値を示すことがわかった。また、試料注入時における電解液の影響を調べるためにターミナル液を塩基性のトリスバッファーから中性の塩化リチウムに換えてバラコートの濃度を測定したが値に差は見られなかった。以上これらの結果から、血清中のバラコートはタンパクなどにより影響を受けるがその量はわずかであり、また除タンパクの有無によっても大きな差はなく、細管式等速電気泳動法では血清を直接導入しても十分に精度良く測定できると考えられる。

《参考文献》

- 1) R.Gill, S.C.Qua & A.C.Moffat, *J.Chromatogr.*, **255** 483-490 (1983)
- 2) 日根, 第4回等速電気泳動シンポジウム講演要旨集 16-17 (1984)

表1 各種除タンパク試薬による回収率

Method		Recovery ratio
(A)10% TCA	(1:3)	91.3%
(B)70% Ethanol	(2:1)	87.1%
(C)70% Ethanol	(1:1)	81.9%
(D)Leading electrolyte	(2:1)	80.9%
Direct		81.7%

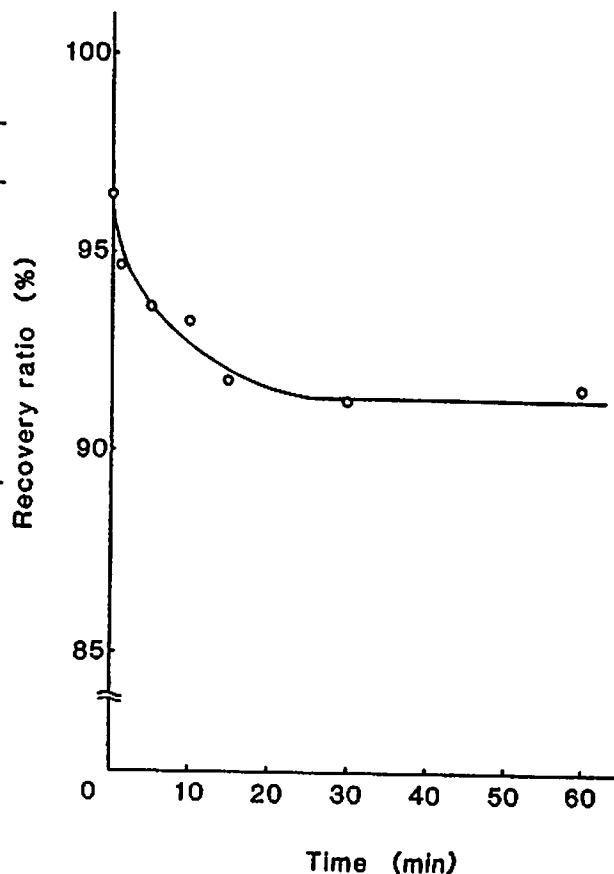


図1 時間による回収率の変化



(神戸大学・神戸女学院)

○本園 達・中崎和美・成相裕三・津波石充朝

[緒言] 細管式等速電気泳動法による種々のリン酸塩の総体検量線法による分析について  
はすでに報告してゐるが、本法では EDTA, シュウ酸ナトリウム, 酢酸ナトリウムを  
内部標準物質とした内部標準法によって分析した結果を中心にして述べる。

[実験]  $2.5 \times 10^{-2} M$  ( $P_{mol}/L$ ) の種  
々のリン酸塩  $2 ml$  と  $1.25 \times 10^{-2} M$   
の内部標準物質 (EDTA,  $(COONa)_2$ ,  
 $CH_3COONa$ )  $5 ml$  を種々の比 ( $P$ /  
標準物質 =  $1/4, 1/3, 1/2, 1,$   
 $2, 3, 4$ ) に混合し、純水で全量  
を  $25 ml$  とし、表 1 の条件で  
電気泳動を行う。

細管式等速電気泳動装置は島津製  
IP-2A にイソタコパック I-E1B  
と接続して用いた。

[結果] 図 1 に EDTA を内部標準とした場合の代表的リン酸塩の混合物 ( $P_1, P_2, P_3,$   
 $P_{3m}, P_{4m}$ ) のイソタコグラムを示す。これらの  $P$  値は互に十分離れてゐるの  
で十分分離してゐる。  $CH_3COONa$  を内部標準にした場合も全てよく分離するが、 $(COONa)_2$   
を用いた場合は  $P_{3m}$  と  $(COONa)_2$  の  $P$  値が類似してゐるため、 $P_{3m}$  の走査には適さない。

図 2 のは EDTA を内部標準とした  $P_1$  の内部標準法検量線を示した (グラフ内の小図は  
 $1/4, 1/2, 1/3, 1/4$  の拡大 (拡大))。検量線は良好な直線性を示してゐる。

Table 1 Operational system for separation of phosphates

	Electrolyte	
	Leading	Terminating
Anion	0.01M $Cl^-$	Hexanoate $^-$
Counter ion	Histidine $^+$	$Na^+$
pH	5.5	6.9
Additive	0.1% Triton-X100	
Capillary tube	1.0x100mm + 0.5x100mm	
Current	200 $\mu A$ (12min) $\rightarrow$ 100 $\mu A$	
Detector	PGD	
Temperature	25 $^\circ C$	
Chart speed	20mm/min	

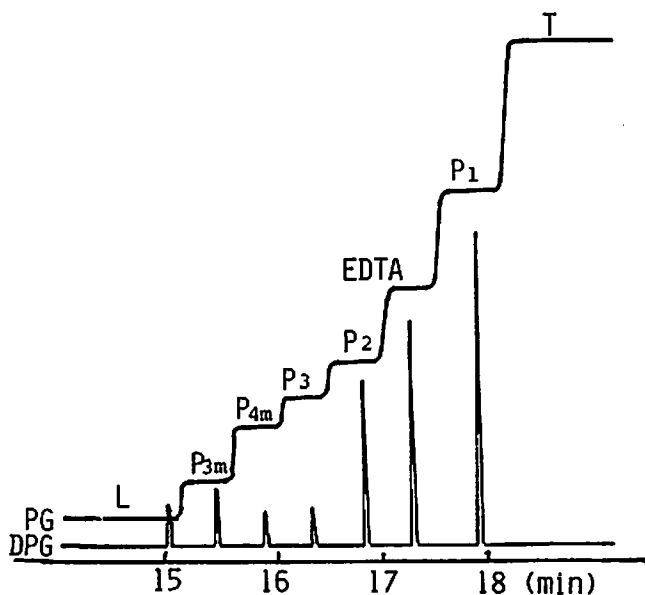


Fig.1 Isotachopherogram of various phosphates and EDTA

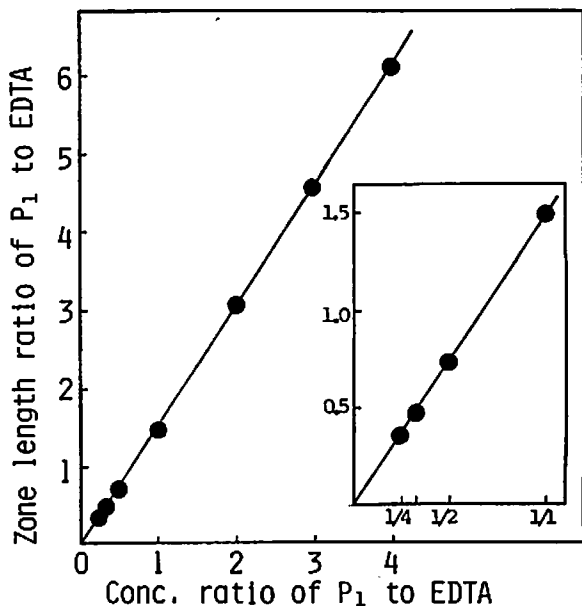


Fig.2 Calibration curve of P<sub>1</sub>

表2に変動係数(%)を示すが内部標準法の場合3%以下である。標準検量線法の場合(表2の最終欄に併記)は2%以下であるので、本法の内部標準法はバラン等の点を少し劣っている。しかし、マイクロシリンジでの試料注入にそれほど注意を払わなくてもよいのは本法の大きな利点である。

図3にP<sub>1</sub>以外の縮合リン酸塩のEDTAによる内部標準法の検量線を示す。可べてリン酸塩について良好な直線性を示し、1/4倍量から4倍量まで定量が可能である。(COONa)<sub>2</sub>およびCH<sub>3</sub>COONaを内部標準として用いた場合も同様に良好な直線性を示した。

次に内部標準法の特殊な応用例について述べる。一般に縮合リン酸塩は種々の金属イオンが共存すると加水分解し易い性質がある。この特殊場合には共存する金属イオンをマスクしておくことがよく行われる。EDTAや(COONa)<sub>2</sub>はマスク作用を持つので、その液相は内部標準物質と同時にマスク剤の役割も果たすので便利である。図4は5×10<sup>-3</sup>M ジホスホン酸トリウム p-O-P (比較的加水分解し易い)の溶液中に2×10<sup>-5</sup>M Fe<sup>3+</sup>が共存する試料(○印)および2×10<sup>-3</sup>M EDTA(△印)または(COONa)<sub>2</sub>(□印)を共存させた試料のp-O-Pのゾーン長の経時変化を示す。Fe<sup>3+</sup>のみが共存する場合はp-O-Pは加水分解してゾーン長が短かくたっている。これに対し、EDTAや(COONa)<sub>2</sub>も共存する場合は加水分解が抑制されゾーン長は変化しない。このことから実際にFe<sup>3+</sup>などの金属イオンが共存する試料を分析する場合は試料調整の段階で加水分解が起り正しい定量値が得られるようにEDTAや(COONa)<sub>2</sub>を添加しておくことである。

Table 2 Coefficient of variation

Ratio (P <sub>1</sub> /I.S.)	Internal standard			Abs. method
	EDTA	Oxalate	Acetate	
1	2.39%	2.41%	1.74%	1.07%
2	2.54	2.89	1.53	1.43
3	2.95	2.47	1.44	0.80
4	2.85	0.43	2.10	0.56
1/2	2.17	2.33	1.81	1.69
1/3	1.95	1.00	2.93	0.95
1/4	2.84	0.75	2.38	1.84

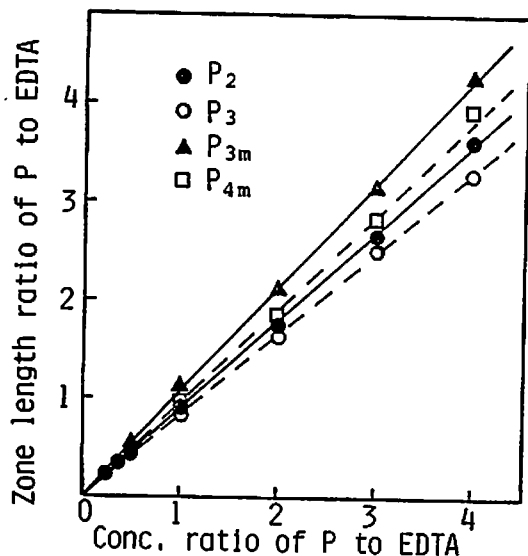


Fig.3 Calibration curves of various phosphates with EDTA as I.S.

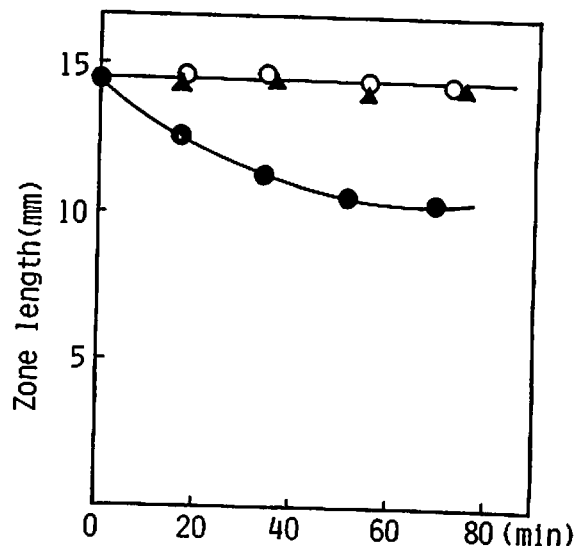


Fig.4 Suppression of hydrolysis of P-O-P by EDTA and oxalate

- 1) T.Yagi, K.Kojima, H.Narial, I.Motooka, Bull.Chem.Soc.Japan, 55, 1831(1982)
- 2) H.Narial, K.Nakazaki, M.Tshako, I.Motooka, J. Chromatogr., 248, 135(1982)
- 3) I.Motooka, H.Narial, K.Nakazaki, M.Tshako, J. Chromatogr., 295, 533(1984)

(広島大工) 広川 健

1. 緒言

等速電気泳動法 (IP法) は他の電気泳動法と同様にイオン性物質の電場における泳動しやすさ (移動度) のちがいを利用する分離分析法である。しかし他の電気泳動法やクロマトグラフ法では適当な支持体または充填剤を使用するのに対して、IP法における分離は充填材を使用しない細管中で行われるので、系は自由溶液とみなしてよい。このため本法には分離過程及び分離後の溶液内平衡を比較的簡単な理論により取り扱えるという特徴がある。演者らはこの点に着目し、実験で得られるイソタコフェログラムを理論計算により予測するプログラム (SIPS) を開発し、この手法を実際の実験分析における分離条件の設定などに応用している。

IP法では他のクロマトグラフ法のように充填剤の強力な分離能に頼れないために、適当な分離条件を設定する上で原理的なアプローチが必要である事が多い。IP装置の分離能を十分に発揮させるソフトウェアとしてSIPSの有用性は高いと考えられる。ここではSIPSの機能とシミュレーションの応用例を紹介する。

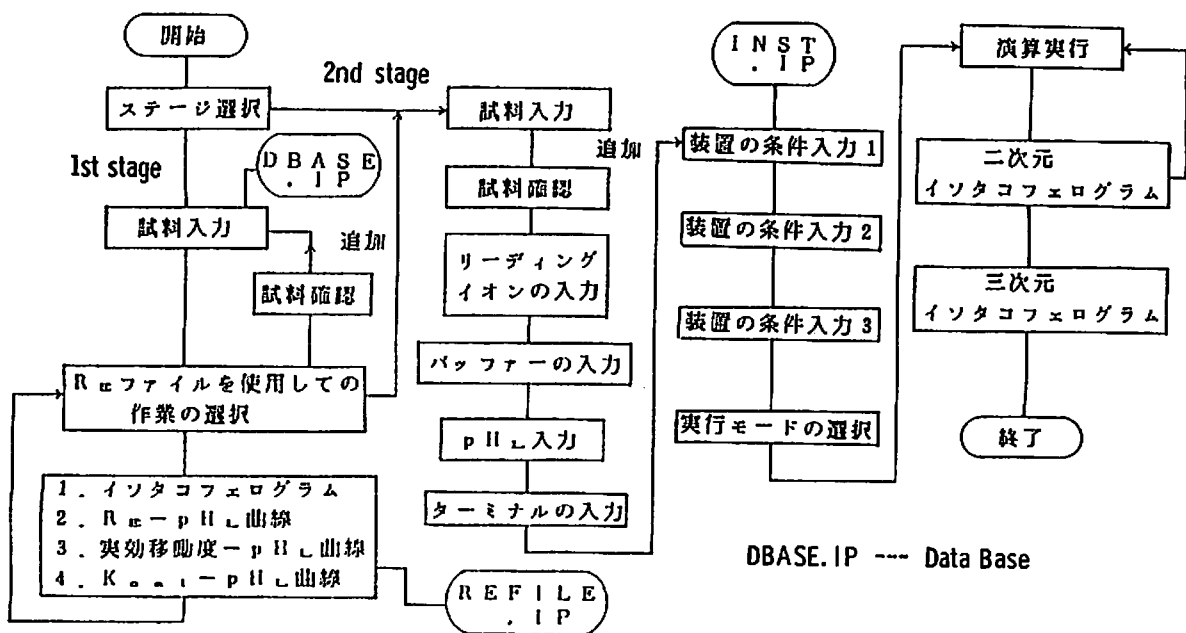
2. SIPSの構成と機能

SIPSの流れを図-1に示した。使用しているマイコンはNEC PC9801Eである。

シミュレーションには試料および使用する電解液成分の移動度やpKaなどが必要である。これらを一一つ入力するのは大変な作業になるのでSIPSでは約500種のアニオンおよびカチオンについてあらかじめデータベースを作成しており、入力を簡便化している。

SIPSは大きく二つのステージに分けられる。第一のステージでは異なるpH条件 (pH-3-10, 0.2pH間隔) で定性および定量指標をあらかじめ計算したファイル (REFILE) を使用する<sup>3)</sup>。ここでは既に計算済みの結果を利用するため即座にイソタコフェログラムや、R<sub>e</sub>、実効移動度、検量線の勾配 (100 uA時) などのpH<sub>L</sub>依存性をグラフ表示でき、広いpH領域で分離最適条件を検討できる。第二のステージでは試料量、電解液、装置関係の条件を任意にセットでき、より現実的な実験条件において分離をシミュレートできる。

Flow chart of SIPS



DBASE.IP --- Data Base



(九大工) O道津邦彦 片山佳樹 高木 誠

1. 等速電気泳動

(IP)法によるヌクレオチド類の分離分析は数多く報告されているが、分析対象物はモノヌクレオチド体に限られている。今回、演者

らはリボジヌクレオシドモノリン酸類の分離分析を検討した。また、図1に構造を示す3種のアクリジン系化合物がリボジヌクレオシドモノリン酸の移動度に与える影響についても検討した。これらの複素環化合物は、核酸塩基間に挿入(インターカレーション)するような相互作用によって、また側鎖と核酸塩基間の水素結合によって核酸の種類を認識することが期待される。

2. 化合物1, 2はアクリジン骨格とβ-アラニン誘導体との反応により得た。IP測定には島津IP-2A型装置を用い、また、泳動管は40mm長のプレカラム及び150mm長のFEPチューブを用いた。化合物の定性指標としてPU値を用いた。リボジヌクレオシドモノリン酸の構造 図2に示す。

3. 表1にアクリジン系化合物を添加しない系におけるリボジヌクレオシドモノリン酸類のPU値及びリーディング溶液、ターミナル溶液の組成を示した。GpC, CpGに比べてGpA, UpA, ApUの3種は小さなPU値を与えた。図3にGpCとGpA及びCpGとUpAの分離を示した。しかしCpGとGpC, UpAとApUの分離はで

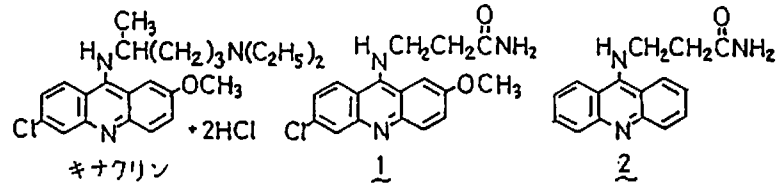


図1. 種々アクリジン系化合物の構造

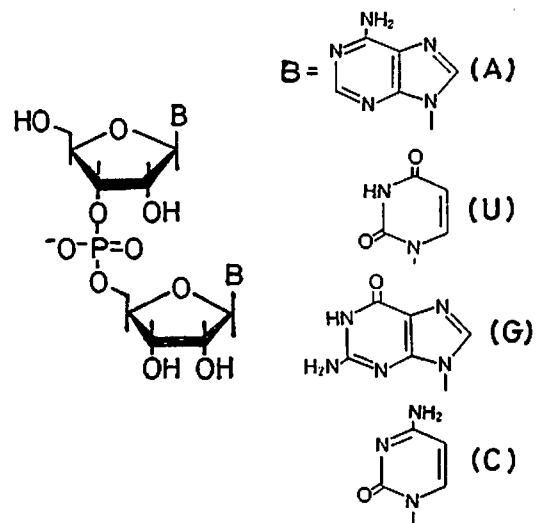


図2. 種々リボジヌクレオシドモノリン酸の構造

表1. 種々リボジヌクレオシドモノリン酸のPU値

	PU		PU
GpC	0.56	UpA	0.39
CpG	0.59	ApU	0.38
GpA	0.43		

L: 5mM HCl 7.5mM β-Alanine  
0.05% Triton X-100 (H<sub>2</sub>O/MeOH=1)  
T: 10mM Caproic acid

どうつ くにひこ

きなかった。

図4(a)にキナクリンの濃度を変えたとき、種々リボジヌクレオシドモノリン酸が示すPU値を示した。CpG, GpA, UpAの3種いずれも、キナクリン濃度が高くなるにつれてPU値が大きく(移動度が低く)なっている。しかしこの3種のリボジヌクレオシドモノリン酸においては移動度の変化に特に選択性は見られなかった。

図4(b)に化合物1の濃度変化に対する種々リボジヌクレオシドモノリン酸のPU値変化を示した。化合物1を1mMで用いる時は、キナクリンほど大きなPU値変化を示さなかったが、濃度を低くするにつれて大きなPU値変化を示した。この結果は化合物1がキナクリンに比べて水溶液中で強い自己会合をしていることを示唆する。

今回の実験より、アクリジン系化合物の添加はリボジヌクレオシドモノリン酸の移動度を変化させることがわかったが、GpCとCpGなどの配列異性体間での分離を達成することができなかった。この原因のひとつとしては測定条件がpH = 約4.0と弱酸性条件であったため、小分子とヌクレオチド間の水素結合ができず、おもに静電相互作用に基づいて相互作用を行っているためと考えられる。従って、今後、中性領域での実験などが必要と思われる。

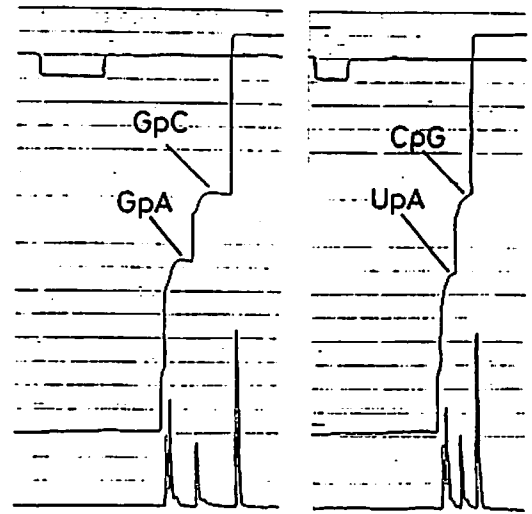


図3. GpCとGpA及びCpGとUpAの等速電気泳動による分離

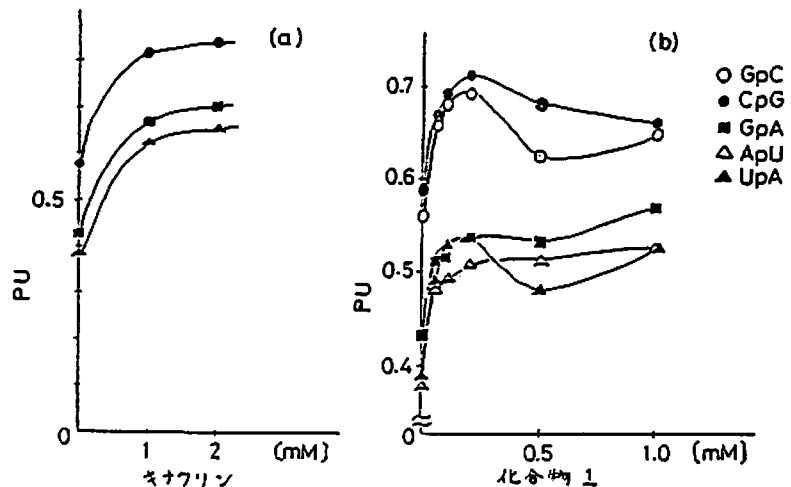
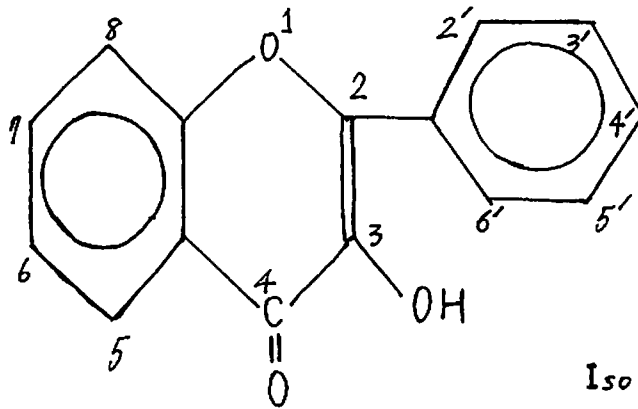


図4. アクリジン系化合物に対する種々リボジヌクレオシドモノリン酸のPU値変化

(°杏林大・保健, 信州大・理・生物)

○平岡 厚, 吉玉 国二郎

フラボノイド (flavonoid) は, 植物の第2次代謝産物の一つであり,  $C_6-C_3-C_6$  の基本骨格を有する化合物の総称である。2つのベンゼン環を連結する  $C_3$  の部分の構造及び母核の *hydroxylation*, *methoxylation*, *glycosylation* 等のパターンに差異にもとづき, 非常に多種類の, 又, 構造の微妙に異なる物質が, 植物界に存在している。前回の大会において, 我々は, 広義のフラボノイドに属し, 又, 高等植物の花弁や果実等の赤色から紫色にかけての色調の土台となっている物質であるアントシアニン類を, 細管式等速電気泳動法によって分離・同定に成功したことを報告した。今回は, 高等植物の花弁や葉に広く分布し, 黄色系の花色素ともなっているフラボノール (flavonol) 配糖体類を中心とする他の一般形フラボノイド類についての分析系を確立すると共に, 特定の化合物 (ルチン=クエルセチン-3-ラムノグルコシド, Fig. 1参照) の存否を指標とする分類・系統学的研究への応用を試みたので報告する。



Kaempferol

4', 3, 5, 7-tetra OH

Quercetin

3', 4', 3, 5, 7-penta OH

Myricetin

3', 4', 5', 3, 5, 7-hexa OH

Isorhamnetin

4', 3, 5, 7-tetra OH 3'-OCH<sub>3</sub>

Fig. 1 Structures of Flavonols

材料及び方法

sampleには, クエルセチン系配糖体数種を含むフラボノール配糖体等の標品の他, 「イソクエルチリン(クエルセチン-3-グルコシド)は持つがルチンはない。」が, それとも「ルチンも有する。」かが, その種生物学的研究の上での重要な指標となっている(例 雑種性の検定等<sup>4)</sup>) イネ科ノガリヤス (*Calamagrostis*) 属数種の, ルチンの有無が在来の方法で確かめられている葉 extracts (各 0.6g dry weight より抽出) を, 各々 50% x 9) ールに溶解して使用した。等速電気泳動は, 長さ 4cm, 内径 1mm の細管 (テフロン製) をつけた島津 IP-2A 型を用い, leading 液に 0.01M HCl-L-histidine (pH 5.8), terminal 液に 0.01M MES-Tris (pH 7.2) を用いる中性条件及び leading 液に 0.01M HCl-Tris (pH 8.3), terminal 液に 0.01M EACA-B<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>

○ひらおが あつし, よしたま くにじろう

(pH 10.9) を用いるアルカリ性条件の2条件下で行ない、電流は最初の6分間は200 $\mu$ A、以降は100  $\mu$ Aに stabilizeして、UV (254 nm) 及び PGD により検出した。Chart speed は、20又は40 mm/minであった。

### 結果及び考察

中性 (Fig. 2) 及びアルカリ性条件下で得られた各標品フラボノイドの isotachopherogram は十分な再現性を有し、混合液中の各物質も、各々のゾーンに分離した。ただし、中性条件下の分離では、freeなフェノール性OH基の多い、又、分子量の小さい(従って、PU値の比較的小さい)物質どうしが、比較的良好に分離していたのに対し、freeなフェノール性OH基の少ない、又、分子量の大きい(PU値の大きい)物質は、terminationの近くにあり、分離が充分でなかった。一方、アルカリ性条件下では、PU値の大きい物質どうしでよい分離が得られたが、PU値の小さい物質どうしでは、ゾーンが重なってしまい、逆に分離不十分となった。更に、植物 extract (フラボノイド配糖体分画) 中のイソクエルチトリン (及び種によっては更にルチン) も、標品との混合分析におけるゾーンの長さの増加により同定され、それは、在来の方法 (2次元PC, TLC, HPLC) による検定結果と一致した。以上より、本法は、多数の微量植物材料中のルチンその他のフラボノイドの存在の有無を検査することが必要な生物学的研究において、演者らがかつて同じ目的で開発した HPLC を用いる系<sup>2)</sup> と共に有効な方法であるように思われた。

### 参考文献

- 1) T. Tateoka et al, Bot. Mag. Tokyo 90: 193-209 (1977)
- 2) M. Maeda et al, Bot. Mag. Tokyo 97: 271-274 (1984)

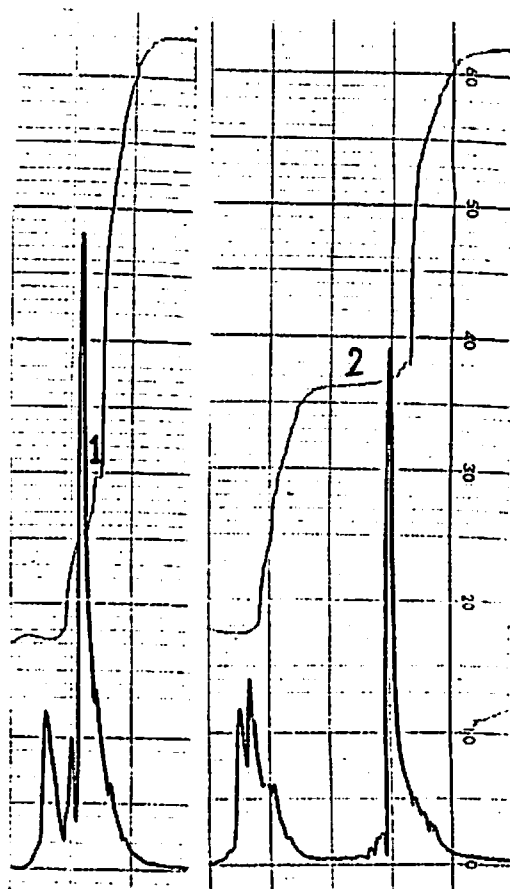


Fig. 2 Isotachopherograms of Isoquercitrin = Quercetin-3-glucoside (1) and Rutin = Quercetin-3-rhamnogluco-  
side (2)

L: 0.01M HCl-L-Histidine (pH 5.8)

T: 0.01M MES-Tris (pH 7.2)

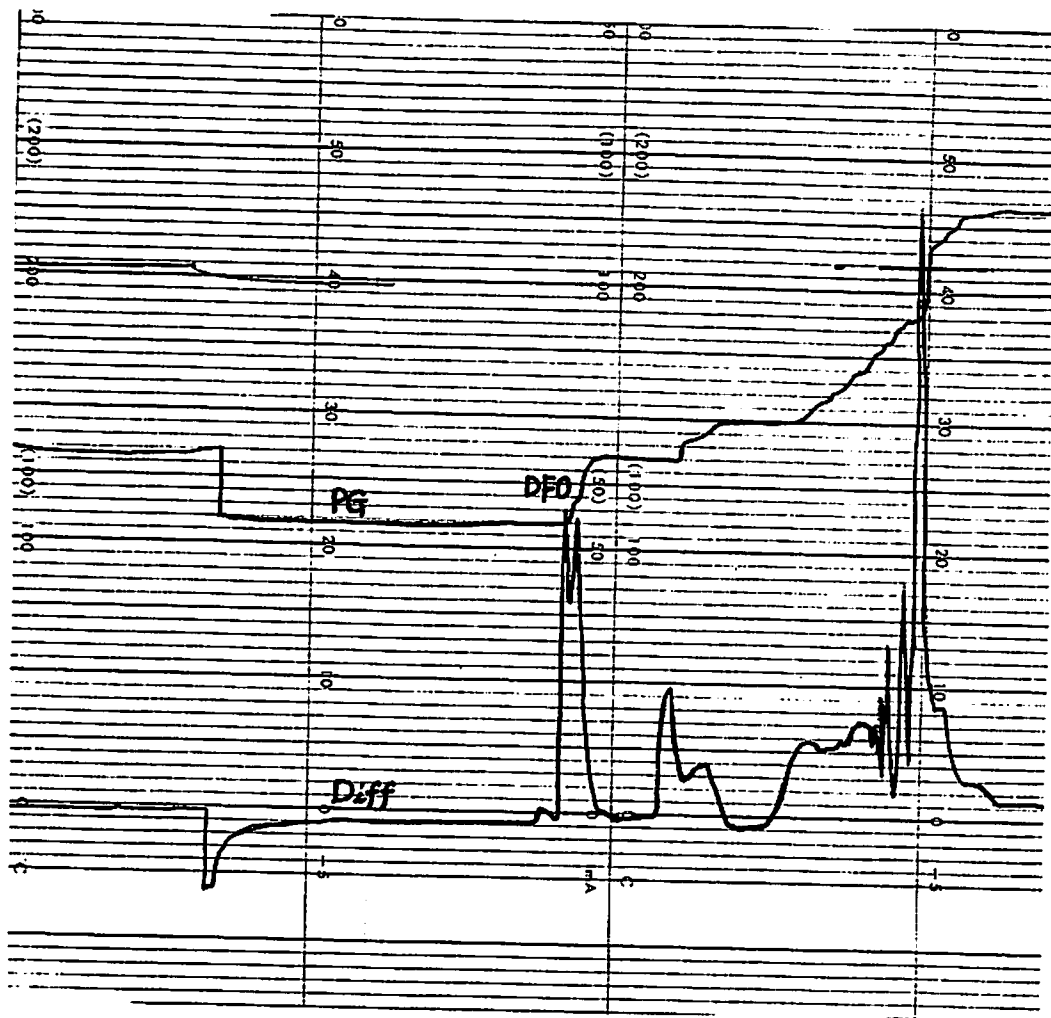


腎不全、特に慢性血液透析患者にしばしばみられる高リン血症は、骨以外でのリン酸カルシウムの沈着や骨障害の原因となる長期透析患者の大きな問題の一つである。高リン血症の治療には、phosphate binder であるアルミニウム製剤が用いられるが、その副作用として高アルミニウム血症や体組織へのアルミニウム蓄積が問題となっている。最近になって、このアルミニウム沈着によって発症する脳障害等にはメシル酸デフェロキサミン (DFO) が効果のあることが知られる様になった。メシル酸デフェロキサミンは元来、3価の鉄イオンと結合し鉄過剰症に対して用いられるものであるが、アルミニウムとも結合しアルミニウムとの化合物 (以下、DFO-AI) として血液透析で体内から除去される。しかしメシル酸デフェロキサミンの確立された測定法はなく体内動態はよく分っていない。今回、我々は血中メシル酸デフェロキサミンの等速電気泳動にて測定を試み若干の知見を得たので報告する。

方法：対象は白鷺病院で血液透析療法を受けている3名の患者で、いずれもアルミニウム製剤を長期に服用しており血中アルミニウム濃度は平均  $15 \mu\text{g/dl}$  と高値を示している。これらの患者群に  $30\text{mg/kg}$  のメシル酸デフェロキサミンを投与し経時的にメシル酸デフェロキサミンと DFO-AI を測定した。メシル酸デフェロキサミンの測定は IP-1B を用い、先行液は  $0.01\text{M HCl} + \text{aniline}$  (pH 4.6) 後続液には  $0.01\text{M glutamic acid}$  を用いた。DFO-AI の測定は原子吸光分析によりアルミニウムとして測定した。

結果：メシル酸デフェロキサミンは有機酸分析の電解液系で分析可能であった。血中に存在する他の有機酸との分離は先行液の pH を変えることにより可能であった。血中メシル酸デフェロキサミン濃度は投与後一過性に  $1.5\text{mMol/l}$  まで上昇したが、漸次低下し48時間後では  $0.8 \text{mMol/l}$  であった。しかし、血中 DFO-AI 濃度はメシル酸デフェロキサミン投与後は低く、48時間後に最も高値 ( $20 \mu\text{g/dl}$ ) を示した。

考案：アルミニウムの体内沈着は主に骨にあり、アルミニウムの血中濃度と体内蓄積量は必ずしも相関しないとされている。今回の我々の結果も示した様に、メシル酸デフェロキサミン投与直後には DFO-AI の濃度は上昇しなかった。このことは、メシル酸デフェロキサミンはまず組織内に移行し徐々に血中に DFO-AI として溶出してくることを示唆している。メシル酸デフェロキサミンは血中ではアルブミン、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  等と結合しており、今回測定したメシル酸デフェロキサミンは大部分が先行液中で解離したものと考えられる。メシル酸デフェロキサミンのイオンとの結合度や体内動態をみるには血中と同じ pH で泳動するのが望ましいが、現在検討中である。



Leading electrolyte :0.01M HCl+aniline (pH 4,6)  
 Terminating electrolyte :0.01M glutamic acid  
 Sample:10 $\mu$ l(blood)                      Current:100 $\mu$ A  
 Chart speed:20mm/min

アミノ酸の代謝異常によつておこるシスチン、ホモシスチン、シスタチオニン尿症は早期発見が大切であり、新生児のスクリーニング検査として重要である。

アミノ酸アナライザー（以下AAと記す）による定量が行われているが、本研究では細管式等速電気泳動（イソタコ）による定量を検討したので報告する。

### 〔方法〕

尿1mlを弱酸性とした後、Diaion SK-1 (H-form) の5mlを含むカラムにかけ、水洗した後、2N-NH<sub>3</sub> 30mlで溶出した。その溶出液を減圧下で乾燥し、その残渣を脱イオン水1mlに溶解させ検体とした。この一定量をAAおよびイソタコにより定量した。イソタコの泳動条件は、先行電解液として0.01M HClと2-アミノ-2-メチルプロパンジオール（アメデオール）および5%ポリビニルアルコール（pH 8.9）終末電解液は0.01M アーアミノ酪酸とBa(OH)<sub>2</sub>（pH 10.9）であつた。泳動電流は75μA、chart speedは10mm/min、そして電極の温度は20°Cであつた。

L-シスチンは半井、DL-ホモシスチンは和光およびL-シスタチオニンはシグマ製を使用した。

### 〔成績〕

Fig. 1Aはシスチン、ホモシスチンおよびシスタチオニンの純品の混合液（6μl）の泳動パターンである。シスチン(a)、シスタチオニン(b)、ホモシスチン(c)の順に泳動された。それぞれ2nmolの濃度である。正常人尿へシスチン、ホモシスチン、シスタチオニンを添加し回収率をみた（n=5）。シスチン=101±2%、ホモシスチン=94±1%シスタチオニン=100±3（Mean±SE）で良好であつた。

シスチン尿症の尿へシスチンを、シスタチオニン尿症の尿へシスタチオニンを添加し回収率をみた（n=5）。シスチン102±3%シスタチオニン100±3（Mean±SE）で良好であつた。

3つの純品の検量線は20nmol迄直線を示した。シスチン尿症の尿（Fig. 1B）にシスチンの純品を加え泳動した結果、シスチンのゾーンの増加がみられた（Fig. 1C）。シスタチオニン尿症の尿（Fig. 2A）へシスタチオニンの純品を加え泳動した結果、シスタチオニンのゾーンの増加がみられた（Fig. 2B）。

これらの結果は純品を加えることによつて延長されたゾーンがそれぞれの物質のゾーンである事を意味している。

次にAAとイソタコによりそれぞれの物質の定量を比較検討した。その結果イソタコではAAの値よりも少し高値を示した。そこでサンプルを加水分解したのちに分析をすると、

AA の値と殆んど同値を示し、良好な結果が得られた。尚正常人ではシスチン、ホモシスチン、シスタチオン等は検出されなかつた。

〔結語〕

本法はわずかなサンプルで測定でき、短時間で結果が得られ、上記の様な患者のスクリーニング検査として有用であると思われる。

DETERMINATION OF CYSTINE, HOMOCYSTINE AND CYSTATHIONINE  
IN THE URINE

Samples	Isotachophoretic analyzer (nmol)	Amino acid analyzer (nmol)
Cystine	—	22.9
Control Homocystine	—	—
Cystathionine	—	4.2
Cystinuria	560 ± 40 (640)	559.5
Homocystinuria	—	—
Cystathioninuria	2120 ± 60 (2866.7)	2281.5

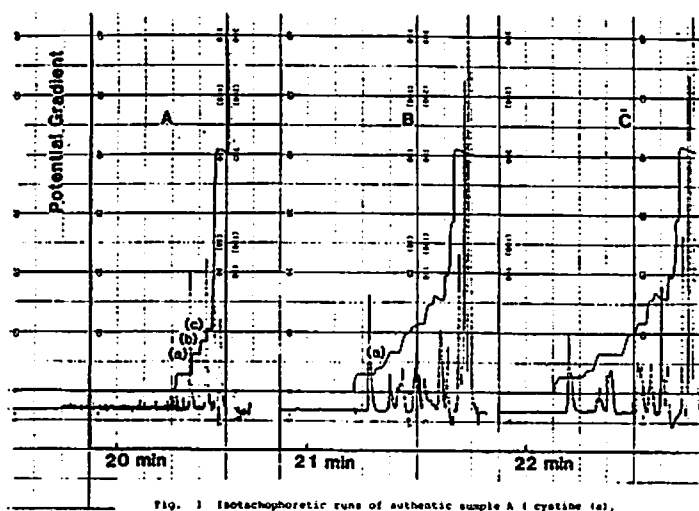


Fig. 1 Isotachopheric runs of authentic sample A (cystine (a), homocystine (c)) and cystathionine (b) 1., the urine of cystinuria B and B + cystine C.

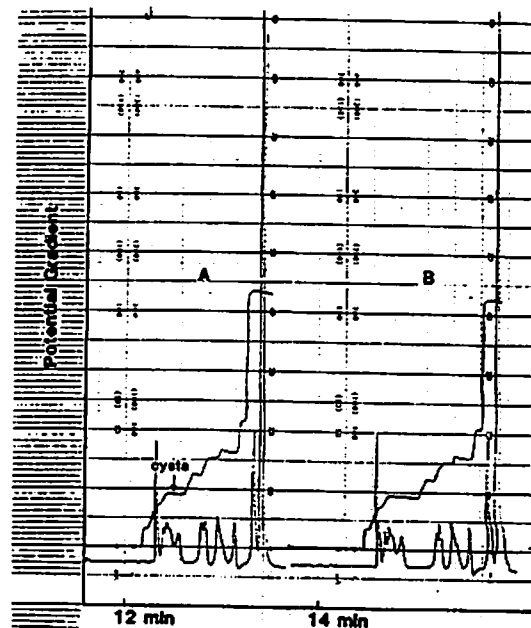


Fig. 2 Isotachopheric runs of the urine of cystathioninuria A and A + cystathionine B.

高知医科大学 化学

○児玉裕敬, 西村明子

コリン, アセチルコリンは末梢および中枢神経系において, 神経伝達物質としてよく知られており, 神経機構の解明にしばしば使用される物質である。現在これらの物質の定量のために種々の工夫がなされている。化学的方法には, 比色法, 蛍光法, 同位元素を用いる方法, ガスクロマトグラフィー (GC) および GC と質量分析とを組み合わせた方法, 酵素反応を利用した方法などがある。前回のシンポジウムでは細管式等速電気泳動法を用いて精液中の choline の定量について報告したが, 今回は本法を用いて choline と acetylcholine の同時定量について検討した。

#### 実験方法:

標準品及び脳の一部量をギ酸-アセトン混合溶液 (15:85 $\text{V}_V$ ) の 7 倍量で homogenate し, 1,000g で 10 分間遠心し, その上清を減圧下に乾燥する。その残渣を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し, 3-ヘプタノンテトラフェニルボロンソジウム溶液を加え, 振とうし, 1,000g で 10 分間遠心し, ヘプタン層に 4M AcOH を 2 倍量加え, 振とうし, 1,000g で 10 分間遠心する。2 M 酢酸層を減圧下に乾燥し, その一部量を細管式等速電気泳動で分析する。

脳内 choline 及び acetylcholine の同時定量を目的として先ず標準品の choline と acetylcholine を分離出来る条件を見出すために前回の choline の分析条件と全く同じく Leading electrolyte として, 0.01M Potassium acetate+酢酸 (pH 4.0), Terminal electrolyte として 0.01M DL-carnitine chloride を用いて分析すると Fig 1 (A) に示すように非常によい結果が得られた。

尚 choline, acetylcholine とオーバーラップする可能性のあるエタノールアミン, GABA, 塩基性アミノ酸について同時分析を行なつたが, これらの物質とも完全に分離することが解つた。(Fig. 1 (B)(C))

次に choline と acetylcholine の検量曲線は Fig 2 に示すように, どちらも直線となつた。

本法での標準品の回収率は choline が 90~95% acetylcholine は 75~80% であつた。現在脳内 choline と acetylcholine の定量を行なつている。

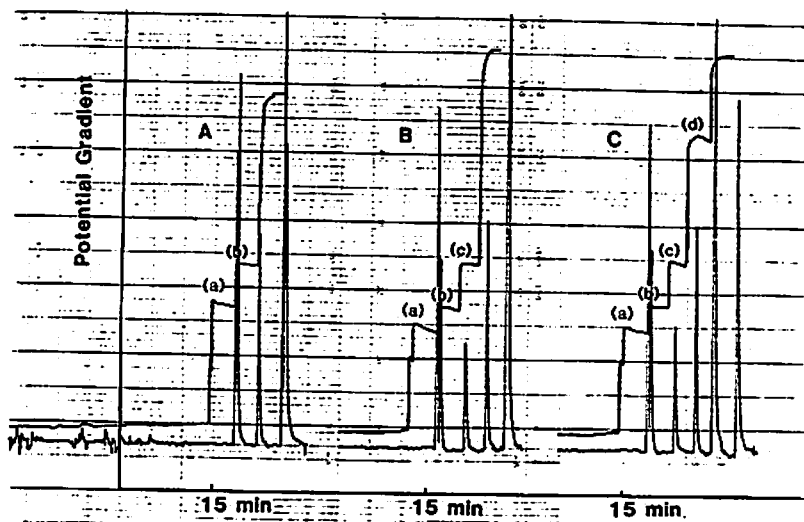


Fig. 1 Isotachoretic runs of authentic choline (a), acetylcholine (b), ethanolamine (c) and GABA (d). The leading electrolyte was 0.01 M potassium acetate titrated with acetic acid to pH 4.0. The terminating electrolyte was 0.01 M carnitine chloride. The migration current was 75  $\mu$ A. Chart speed was 10 cm/min.

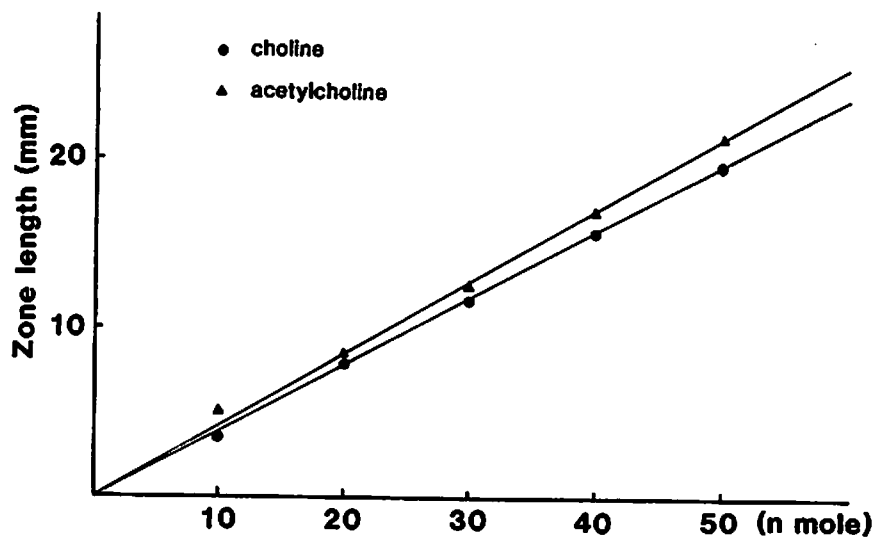


Fig. 2 The standard curves of authentic choline and acetylcholine were dissolved in water, and known amounts of the solution were analyzed by an isotachophoretic analyzer. Analytical conditions are as in Fig. 1.

○稲垣 徹(島根科捜研)

古徳 進(鳥大・医短)

衣類や家具類とくに含窒素高分子化合物からなる製品が熱分解を受けると、一酸化炭素と同様に条件によっては、かなりの量(8~193mg/g)のシアン化水素(HCN)が発生し、生命に危険をもたらせることが報告されている。HCNは呼吸等により体内にとりこまれると各種の酵素、なかでもチトクロームオキシダーゼの触媒作用を阻害し、これらを含む細胞の呼吸を急速に停止させることがその毒作用の主なものと考えられている。従って、焼死体に対する諸検査には一酸化炭素の検査以外にもこのシアンイオンの検査も必要と思われる。しかし、実際には体内における代謝が速いことと検査法が煩雑であることなどのために、一般にはこの検査はあまり行なわれていないようである。細管式等速電気泳動法(CITP)は、試料の前処理が不要であり分析時間も短いという長所をもって、この点でシアン化合物の検出に適した装置といえる。このCITPによりシアンイオン並びに他の関連陰イオンの定性・定量について検討した。

### 1. 実験材料並びに実験方法

(1). 装置: 島津細管式等速電気泳動装置 I P-2 A (泳動管として1.0mmφ×5cmのプレカラムと0.5mmφ×10cmの細管を使用。検出器は電位勾配検出器)

(2). 試料

①シアン化カリウム(KCN): 0.1MKCN水溶液を標準液とし目的に応じて希釈、使用した。

②ヘモグロビン(1)液(Hb-1): 成人男性の静脈血10mlを生理食塩水で3回洗浄・遠沈し、得られた血球部分2mlに倍量の水を加えて溶血した。

③ヘモグロビン(2)液(Hb-2): 人ヘモグロビン(Lot Na15102, Nutritional Biochemicals)の0.28gを水で溶解して10mlとした。

④一酸化炭素ヘモグロビン(HbCO): Hb-1およびHb-2の各2mlにCOガス(定量用標準ガスCO-99.9%ガスライ工業)を充分通じて作製した。

⑤メトヘモグロビン(MetHb): Hb-1およびHb-2の各2mlに5%フェリシアン化カリウム溶液数滴を加えて作製した。

⑥シアンメトヘモグロビン(MetHbCN): MetHb 1mlに0.1MKCNを加えた。

⑦その他の陰イオンとしては、フェリシアン化カリウム、フェロシアン化カリウム、チオシアン酸アンモニウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムを各々約1%の水溶液とした。

(3). 分析条件

リーディング液は、pH7.5の0.005M HCl, 0.006M Tris, 0.5%HPMC混合液を使用し、ターミナル液は、Ba(OH)でpH10に調整した0.005M Phenolを使用した。泳動電流は、最初200μAで5分間泳動し、次に100μAで泳動を行った。恒温槽の温度は25℃に設定した。

(4). 検量線

検量線は、0.1MKCN標準液を水で適宜希釈した場合と、MetHb液に0.1MKCN標準液を適量添加した場合について、各々その添加量と電位勾配のゾーン長から検量線を作成した。

## II. 結果

(1). 検量線及び検出限界

0.005~13 μg/μlのシアンイオンを含む各濃度の水溶液について検討した結果、検出限界は0.02μg/μlであり、0.02~0.98 μg/μlの範囲で良好な直線性(Y=12.432X+0.21, r=0.998, n=15)を示した。MetHbCNについては、CN濃度として0.013μg/μlが検出限界であり、0.013~0.680 μg/μlの範囲で良好な直線性(Y=0.021X+0.76, r=0.996, n=9)が得られた。

(2). 各種陰イオンの Potential Unit Value (PU) 及び Relative Potential Gradient Value (RPG)

各種イオンの定性に必要なPU値とRPG値を表-1に示す。尚、表-1には炭酸イオンの電位勾配を基準とし各イオンの電位勾配を標準化した値をRPG-2として同時に記載した。

### III. 考 察

本法による、HCN及びMetHbCNの検出限界はCNとして各々0.02mg/mlと0.013mg/mlでありGCによる感度よりおとつてはいるものの、生体試料中のシアンイオンの定量に、迅速簡便さの点で優れている。又、本条件によってはフェリシアンイオンやフェロシアンイオンは易動度の違いの為か検出されずシアンイオンの定性妨害イオンとならなかった。HbOとHbCOのPU値は、同様な値を示し、両者の識別は困難であったが、これはHbに対する酸素と一酸化炭素の結合機構の類似性によるものと考えられる。

表-1. 各種イオンのPU, RPG

Substance	PU	RPG-1	RPG-2
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	—	—	—
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	—	—	—
$\text{NCS}^-$	0.006	1.1	0.61
$\text{PO}_4^{3-}$	0.058	3.0	0.62
$\text{HCO}_3^-$	0.096	2.0	0.71
$\text{CO}_3^{2-}$	0.120	2.9	1.00
$\text{CN}^-$	0.243	9.67	3.37
MetHbCN	0.397	6.2	3.60
HbO	0.551	15.9	5.32
HbCO	0.551	16.0	5.33
MetHb	0.774	20.8	6.93



## 24 細管式等速電気泳動法による

### アレルギー性鼻炎モデルの涙液蛋白成分の検討

○奥泉仁一・田中健一（東レ・安全研）・吉田治弘・池本卯典（自治医大）

#### 1. 目的

鼻アレルギー患者にしばしば流涙のみられる現象についてはよく知られているが、涙液の化学的性状についての報告は数少ない。

今回、化学物質を取り扱う労働環境下において、しばしば喘息様症状を作業者に惹起させることで知られている" Toluene Diisocyanate (以下TDIと略す) を用い、これを有機溶剤に溶解させたものをモルモット鼻前庭部分に塗布したところ、動物に5分前後をピークとし呼吸困難やクシャミ、おびただしい涙液と多量の鼻汁など、人の鼻アレルギーと類似した症状を起すことが観察<sup>2)</sup>された。

そこで、TDIによるモルモット鼻アレルギーモデルから得られた涙液の蛋白成分と、ヒトの涙液を対比させ、細管式等速電気泳動的解析を行ったので報告する。

#### 2. 実験材料および方法

##### 2-1. 実験動物

静岡県実験動物農業協同組合から購入したHartley系雄性モルモット(体重300~600g)を用いた。動物は、空調された飼育室で健康状態の確認および馴化のために1週間の予備飼育を行った後、実験に供し、固型飼料(CG-3、日本クレア株式会社)および飲料水は自由に摂取させた。

##### 2-2. 検体

実験に用いたTDI(片山化学製)は、2.4TDIと2.6TDIとの混合比4:1のもので、それに酢酸エチル(和光純薬製)に、その都度溶解させて作製した。

##### 2-3. 対象及び試料

モルモット鼻アレルギーの惹起は、既報の<sup>2)</sup>喘息作成法に準じて行った。すなわち、極細耳鼻科用綿棒の先端を10%TDI溶液に浸漬し、左右の鼻腔に5 $\mu$ lずつ、1日1回連続5日間、モルモットに塗布し、惹起6回目と惹起18回目に採取し得た涙液を用いた。

##### 2-4. 細管式等速電気泳動法

細管式等速電気泳動は、島津IP-2Aを使用し分析した。電解液は、日根(1982)のリーディング液(L)、5mM HCl、-10mM Ammediol -0.1%HPMC、PH8.95とし、ターミナル液(T)として、10mM $\epsilon$  ACA-10mM Ammediolの混合液と、Ba(OH)<sub>2</sub>でPH11.0に調整した。

スパーサー溶液には、Valine Glycine, Tricine, Aspartic acid, Leucine, Glutamic acid,  $\beta$ -alanineを各10mg/10mlの0.4ml、PH3.5~9.5のAmyholine 50 $\mu$ lを溶解し、蒸

留水で1 mlとした。スパーサー溶液30 $\mu$ lに試料10 $\mu$ lを加えて混合し、1 $\mu$ lを分析した。通電は、最初の12分間を150 $\mu$ A、続いて75 $\mu$ Aで16分間行った。分析パターンは、13~28分間の電位差と280 nm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。

### 3. 実験結果

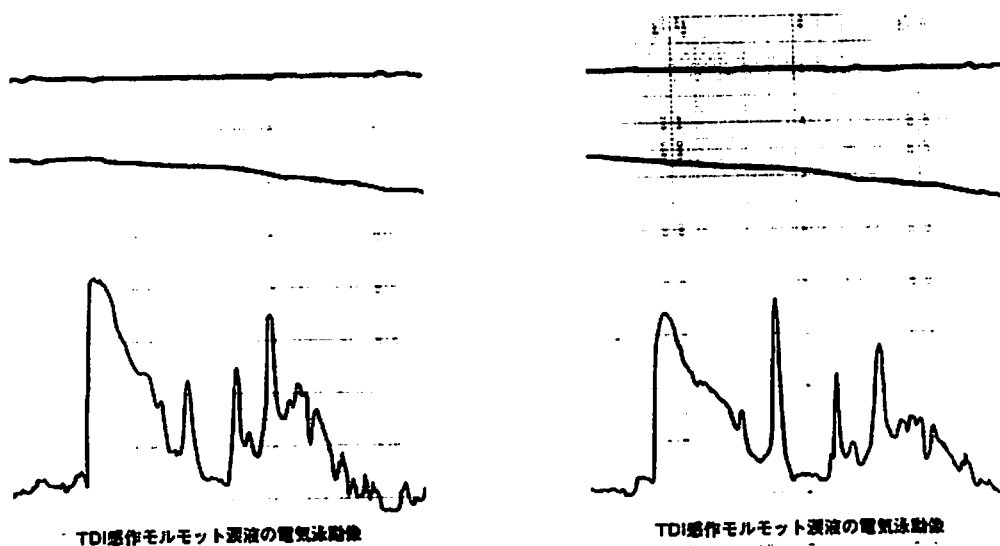
モルモット鼻前庭部分にTDIを、耳鼻科用綿棒で塗布するという簡易な方法によって、動物にヒトの鼻アレルギーと同様の症状が観察されることを確認した。特にモルモットにTDIを塗布し、惹起6回目と惹起18回目に得られた涙液の泳動像では共通のパターンが認められるものの惹起18回目に更に強い活性が認められた。また、これらはPH3.0~4.0の酸性領域に認められ、Molecular weightは、10,000~47,000の低分子であることが明らかとなった。

以上の実験成績は、我々によって作成された鼻アレルギーモデルと、ヒトの鼻アレルギーとの生体内に生ずる何らかの変化を反映しているものとして注目される。

現在、酸性領域に存在する泳動パターンの、化学的性状およびヒト鼻アレルギー涙液の蛋白成分との関連について検討中である。

#### 参考文献

- 1) National Institute Occupational safety and Health : Criteria for a recommended standard .....Occupational exposure to toluene diisocyanate (1973)
- 2) 第4回イソタコシンポジウム講演要旨集 (1984)
- 3) 田中健一 他 ; アレルギー-31、1004-1007 (1982)



TDI感作モルモット涙液の電気泳動像

TDI感作モルモット涙液の電気泳動像

○吉田 治弘・池本 卯典・富田 功一(自治医大)

ヒトの精漿蛋白質と男子不妊症，個人識別，動物精漿蛋白質と精液保存，蛋白凝固など検討すべき点は多く，従来，ゲル電気泳動法により定性的追究を続けていた。また，細管式等速電気泳動法により，精漿蛋白質について分析を試みたところ，2，3の興味ある知見が得られた。

#### 材料及び方法：

ヒト精液は不妊症を主訴とする産婦人科外来患者の夫，コンドームで採取したもの及び用手法などにより採取したものをを用いた。これらを4℃で7000r.p.m.20分間遠沈し，その上清を検査用精漿とした。動物の精液はブタ，イヌ，ニワトリから採取し，ヒトの場合と同様に精漿を分離した。

細管式等速電気泳動装置(以下 CITP)は島津製作所製IP-2A型を使用し，リーデン液は5 mM HCl-10 mM Ammediol-0.2% HPMC-15000 pH8.9，ターミナル液は10 mM 6-ACA-10 mM Ammediol-Ba(OH)<sub>2</sub> pH10.8とし，プレカラムは10 cm×1φ，分析用カラムは30 cm×0.5φを用い，分析用の試料調整用のスパーサー溶液(アミノ酸溶液(Gly, Ala, Leu, Glu, Val, Asp, Tricine 各10 mg/10 ml) 0.4 ml, pH3.5-9.5 Ampholine 0.05 ml, 蒸留水0.55 ml) 30 μlに精漿10 μlを加え，よく混和した後，その1 μlを分析用試料とした。

通電はまず125 μAで15分，続いて75 μAで13~15分間行い，検出は280 nmでのUV吸収(×8)，及びPGdiff(×4)，PG(×32)により，4 cm/min.の速度で通電開始16分から終了まで記録した。

#### 結果：

1. ヒト精漿をCITPで分析すると，図1に示す様なUV吸収パターンを示し，A~E, Fの5~6分画として検出される。図1. 1), 2)から解かる様にA~Eの各分画内の各々のピークの数，高さの差異により個人差を識別することもできる。これをDisc-PAGE, PAGIEF, M2D PAGEなどで泳動したものと比較してみると，A分画は酸性の低分子域，B分画はAcp, Alb域，C分画はβ-glob; Tf域，D分画はIg域，E分画はIg, γ-Sm域などと推定された。各分画内の個々のピークについての既知精漿蛋白質との同定については現在検討中である。約40例について解析を行ったところ，B-2のピークの高いものは8例，B-3のピークの高いものは10例，C-3のピークの高いものは27例，Eの高いものは18例などであった。これらは各種のゲル電気泳動法によって示されるバンドと比較するとその強弱と一致していた。特にC-3についてはTfの可能性があり，健康人の精漿中のTf量は血清の約1/50程度で，市販のPartigen Plateなどでは定量不能であり，RIを標識して定量しているのに比して，CITPで定量が可能になるのなら極めて有用なものとなる。

2. 精漿の種属差を検討したところ，図2に示す様に種属間の差異は顕著であった。

3. ブタ精漿について，既に各種の電気泳動法，植物抽出液とのゲル内沈降反応により個体差及び蛋白質沈降(凝固)因子の有無を見出ししている。今回，CITPにより解析したところ，図3に示す様なF分画を有するものと，それを欠くものが観察された。このピークの有無は蛋白沈降(凝固)因子の有無によく一致していた。

以上の様に精漿をCITPで分析すると従来知られなかった所見が得られ，さらに検討することにより生殖学上の精液機能，法医学上の個人識別などに有用な情報を提供する可能性を示唆するものであった。

Fig.1. Isotachopherograms of human seminal plasma

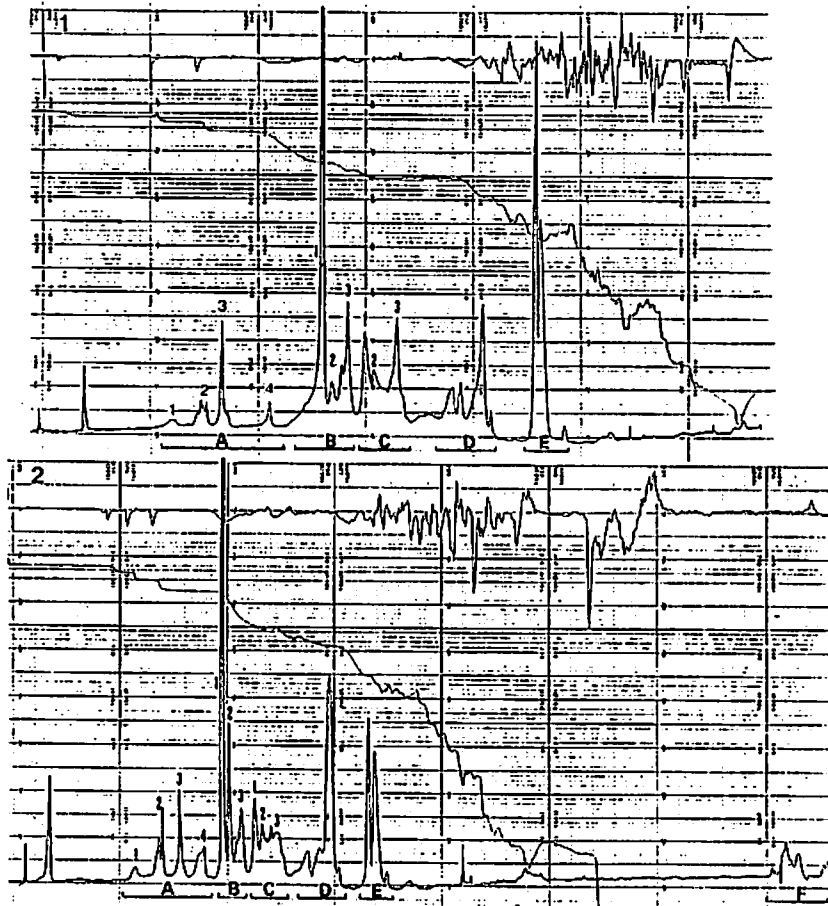


Fig.2. Isotachopherograms of the seminal plasma samples of Cock, Boar and Dog

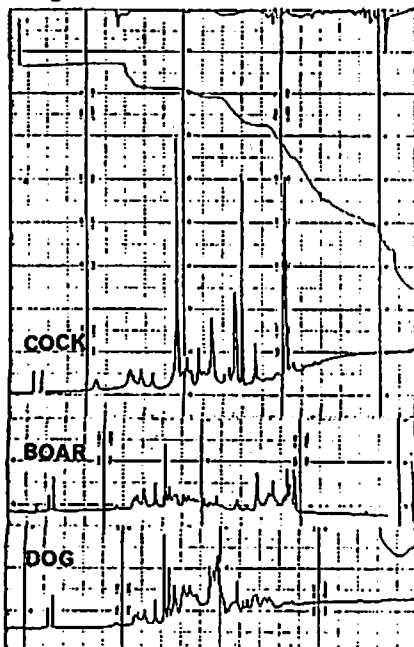
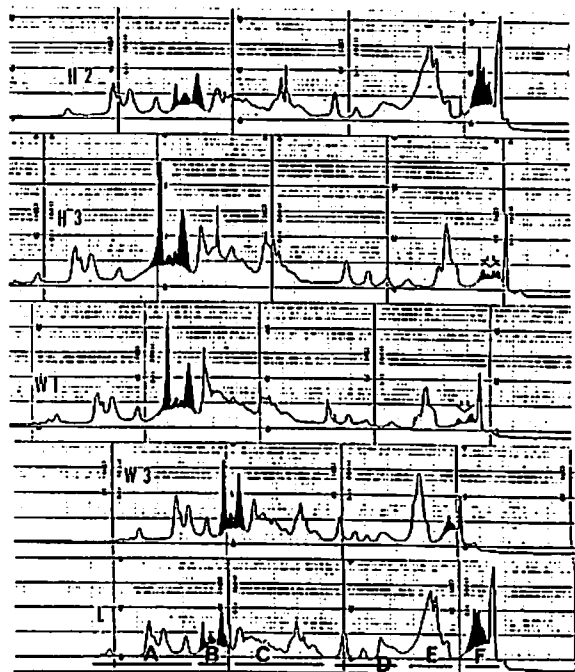


Fig.3. Comparison of the isotachopherograms on Boar seminal plasma

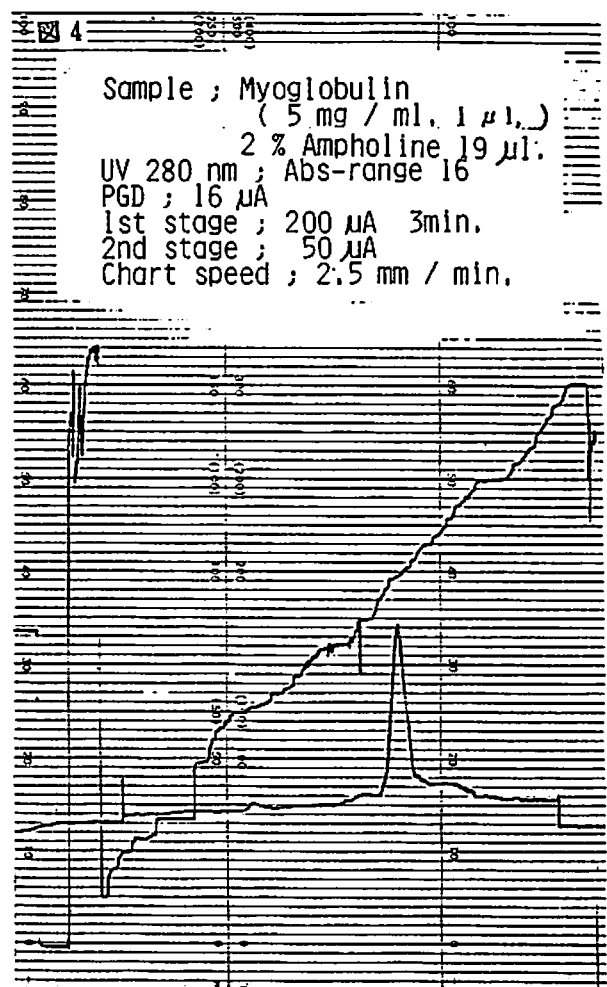
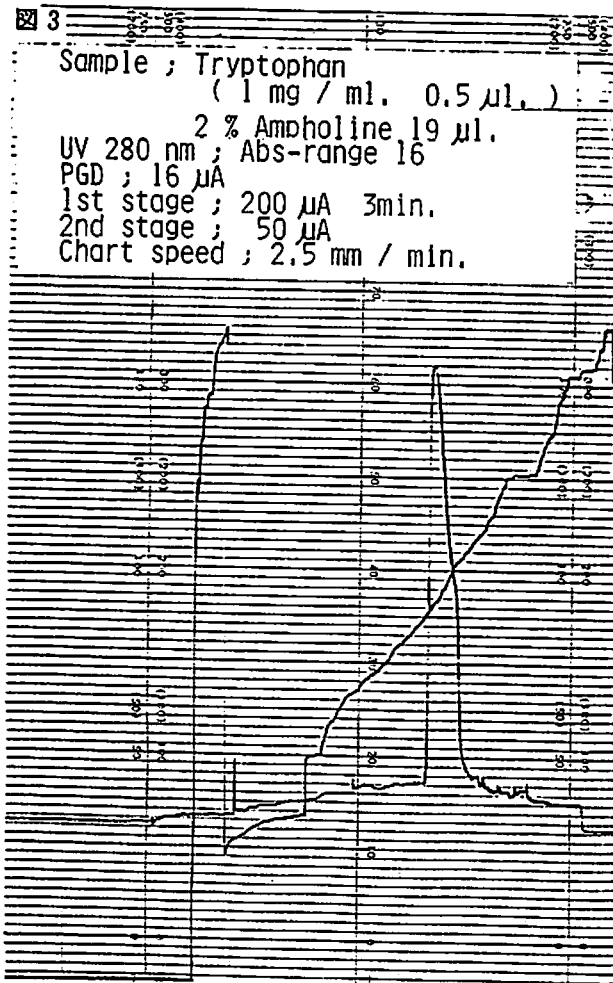


奥山 典生、山本 秀子、真鍋 敬、

## 1. はじめに

いわゆる 細管式等速電気泳動装置によるタンパク質の分析に関しては、この数年間にいろいろな研究が進み、分析条件の設定が、非常に容易になってきた。すなわち、アンホラインを用いるタンパク質の分析においては、リーディング液とターミナル液の間に生じた pH グラジエント中で試料物質を、Electro focusing 様に泳動すると考えられる。この様な条件下では、各種の物質は pKa の順序に泳動する。

UV 吸光度をもつ数種類の化合物をその marker として、数年前に提案したが、この報告では、各種の精製タンパク質を用いて、その泳動状態について考察を行った。



## 2. 装置

島津細管式等速電気泳動装置 (IP - 2A) を 図1 に示す様な方式に改変して用いた。

すなわち、送液は窒素圧のかわりに 2 個のしごきポンプを用いた。その操作は図 2 にまとめた。キャピラリイは内径 1 mm 長さ 10 cm、リーディング液には、5 mM-HCl 0.01 % -HPMC アメジオールで pH 9.3 としたものを、ターミナル液としては 10 mM -アミノカブロン酸 10 mM-アメジオールを水酸化バリウムで pH 10.8 としたものを使用した。

試料 1 ~ 5  $\mu$ l に 2 % -アンホライン溶液 10 ~ 15  $\mu$ l を添加して注入した。200  $\mu$ A 9000 V で 3 分間の予備泳動の後、50  $\mu$ A (3000 V  $\rightarrow$  8450 V) で約 40 分間泳動を行った。

図 1

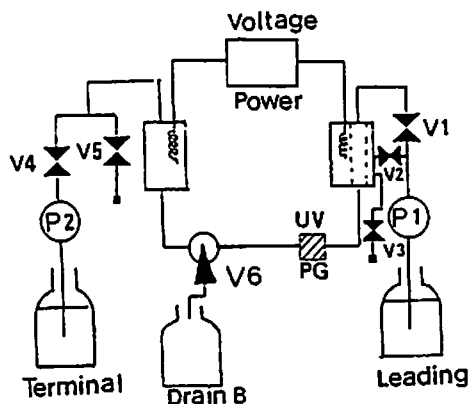


図 2

### Operation of Isotachopheresis

- (1) RINSE P1 Pump 2 min. ( 20 drops )
- (2) FILL P2 Pump 2 min. ( 20 drops )
- (3) INJ Sample ( Ampholine 2 % 15  $\mu$ l. )  
5  $\mu$ l.
- (4) RUN Start button on

## 3. 結果

図 3、及び図 4 に低分子 pK marker の例と、タンパク質についての代表的な例について示した。

この結果から、まず検出限界としては、UV の測定範囲 2 においてトリプトファンの場合では、約 0.007  $\mu$ g、リゾチームの様なタンパク質の場合には、約 0.5  $\mu$ g 程度であると考えられる。また、この設定条件においては、Peak capacity としては 20 と考えられた。

A METHOD FOR THE DETERMINATION  
OF DISSOCIATION CONSTANT.  
ALLAHABAD UNIVERSITY A. K. BAJPAI

A method involving use of "Ionophoretic technique" is described for assessment of dissociation constant of some  $\alpha$ -amino acid viz. Aminobutyric acid, Isoleucine, homoserine. This technique is based on movement of spot of amino acids on paper strips with variation of pH of background electrolyte containing 0.1M perchloric acid. A plot of pH against mobility gives information about nature of dissociation and helps in calculating them. The same principle has been utilized for study of binary and ternary systems. In binary system background electrolyte containing only  $1 \times 10^{-2} M$  respective amino acid at different pH values while that in ternary system two complexant added in background electrolyte at 8.5 pH. Concentration of primary ligand (NTA) Isoleucine was varied. The plot of  $\log$  (Isoleucine) against mobility were used to obtain information of mixed complex and to calculate its stability constants. Calculated dissociation constant of these amino acid have been found (log K) 2.30, 9.63, 2.65, 9.62, 2.27, 9.28 respectively. Isoleucine complexes of metal Th (IV), Fe(III), Cr(III) are  $Th(isoleu^-)^{3+}$ ,  $Fe(isoleu^-)^{2+}$ ,  $Fe(isoleu^-)^+$ ,  $Fe(isoleu^-)_3$ ,  $Cr(isoleu^-)^{2+}$ ,  $Cr(isoleu^-)_2$ ,  $Cr(isoleu^-)_3$ , formed whose stability constant are found to be 8.67, 8.52, 15.14, 20.26, 8.46, 15.09, 20.11 respectively and stability constant of metal-NTA Isoleucine have been found to be 6.83, 6.28, 5.83 at 35°C.

ARUN KUMAR BAJPAI