

ISOTACHOPHORESIS SYMPOSIUM

第6回 細管・等速電気泳動シンポジウム

講演要旨集

主催 イソタコ研究会
共催 日本分析化学会, 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6回 細管・等速電気泳動シンポジウム

プログラム

第1日 12月11日(木)

(13:00から)

開 会

津田孝雄

- | | | | |
|--|--|--------------------------------------|------|
| 1. 細管式等速電気泳動法によるイオン分子量の推定(4) 分子体積と移動度, R_E 値との関係 | 九大医
付属病院薬剤部 | ○藤下 修・平川雅章
福岡龍一・樋口 駿
青山敏信・掘岡正義 | … 1 |
| 2. 瞬間マルチ測光検出器を用いる溶融石英細管式等速電気泳動分析法 | 名大省エネセ [®]
名大工 | ○後藤正志 [®] ・上田 豊
石井大道 | … 3 |
| 3. 32チャンネルUV検出装置による分離過程の解析(1) | 広島大工
応用理化学 | ○中原 清・広川 健
木曾義之 | … 5 |
| 4. 高分離能等速電気泳動装置の開発 | 広島大工
応用理化学 | ○高羽 均・広川 健
木曾義之 | … 7 |
| 5. PG微分法による等速電気泳動図のマイコンによる解析I. アンフオライトを用いたタンパク質の分析 | 城西大理・化学 | ○小林英三郎・東 伸俊
河原美紀 | … 9 |
| 6. 消去法によるリン酸イオンの細管式等速電気泳動分析 | 島津・応用技術部 | ○日根 隆・八木孝夫 | … 11 |
| 7. 細管式等速電気泳動法による海水中の硫化物の定量 | 神戸商船大
船貨輸送研究施設 [®]
工業技術院大阪工業
技術試験所 | ○福士恵一 [®] ・日色和夫 | … 13 |
| (15:25~15:40) | 休 憩 | | |
| (15:40から) | | | |
| 8. IP-PIXE法による希土類元素の分析 | 広島大工
応用理化学 | ○木曾義之・広川 健
岩本一範・西山文隆 | … 15 |
| 9. 等速電気泳動法によるめっき浴の分析 | 島津・応用技術部 [®]
京都市工業試験場 | ○児島佳世子 [®] ・篠原長政 | … 17 |
| 10. アンフオライト液分析への細管式等速電気泳動法の応用 | 新日本製鉄
第一技術研 | ○佐藤英次・村田朋美 | … 19 |
| 11. 等速電気泳動法による染料関連物質の分析 | 大阪府・工技研 | 蔵本暢浩 | … 21 |

懇 親 会

第2日 12月12日(金)

(9:30から)

- | | | | |
|--|-----------------|----------------------|------|
| 12. キャピラリ電気泳動法による分離分析
(5) : ポリアミンについて | 名工大・工 | ○津田孝雄・小林泰文 | … 23 |
| 13. キャピラリ電気泳動用試料注入装置の
試作 | 近畿大・薬*
錠紡薬品研 | ○本田 進*・岩瀬重文*
藤原 茂 | … 25 |
| 14. ミセル溶液を用いる界面動電クロマトグ
ラフィー | 京大工・工化 | ○大塚浩二・寺部 茂
安藤貞一 | … 27 |

(10:³⁰~10:45)

休 憩

(10:45から)

- | | | | |
|--|-------------------|--------------------|------|
| 15. アスコルビン酸の銅酸化時にイソタコグ
ラムに現れる未知化合物について | 共立女子大*
お茶の水女子大 | ○津田淑江*・福場博保 | … 29 |
| 16. 等速電気泳動法によるアスコルビン酸及
びその関連化合物の分析 | 徳島文理大・薬 | ○香西重忠・赤田良信 | … 31 |
| 17. 細管式等速電気泳動による尿中 γ -
carboxyglutamic acidの定量 | 高知医科大・化学 | ○児玉裕敬・揚田富子 | … 33 |
| 18. 実験的シスタチオニン尿症ラットの組織
中のシスタチオニンの同時定量について | 高知医科大・化学 | ○溝淵詔子・寺尾 倫
児玉裕敬 | … 35 |
| 19. レンズを劣化する糸状菌について | 東京国立文化財研*
日本光学 | ○新井英夫*・金子則夫 | … 37 |

(12:25~13:30)

昼 休 み

(13:30から)

特別講演

細管式等速電気泳動法の血清、精漿蛋白
質多型研究への利用

自治医科大
法医学

吉田治弘

… 39

(14:30から)

- | | | | |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------|------|
| 20. 細管式等速電気泳動法によるホル
マリン固定肝臓蛋白の分析 | 宮崎医科大
法医学 | ○菊田由美・高濱桂一 | … 41 |
| 21. イヌ血清ハプトグロビンの細管式等速電
気泳動法による観察 | 自治医科大
法医学
人間生物学研 | ○吉田治弘・池本卯典
富田功一 | … 43 |

(15:10~15:25)

休 憩

(15:25から)

- | | | | |
|--|-----------------|-------------------------|------|
| 22. 細管式等速電気泳動法による魚肉タンパ
クの研究 | 日大農獣医
食品工学 | ○鈴木公一・鈴木和威 | … 45 |
| 23. アレルギー性鼻炎モデルの涙液タンパク
について | 東レ・安全研*
自治医大 | ○奥泉仁一*・吉田治弘
池本卯典 | … 47 |
| 24. ヒト血清タンパク質の無担体一等電点電
気泳動法による高感度一短時間分析 | 東京都立大
化学 | ○山本秀子・真鍋 敬
奥山典生 | … 49 |
| 25. トラネキサム酸を終末イオンに用いたタン
パク質の細管式等速電気泳動 | 東京都立大理
化学 | ○山本秀子・奥山典生
真鍋 敬・宮寺彰彦 | … 51 |

閉 会

奥山典生

THE 6TH SYMPOSIUM FOR CAPILLARY AND ISOTACHOPHORESIS

December 11–12, 1986, NAGOYA JAPAN

Organizer: Japan Discussion Group of Isotachophoresis

PROGRAM

Dec. 11 Afternoon (13:00)

- | | | |
|--|---|--|
| 1. Estimation of the molecular weight of ions by isotachophoresis. IV. Relationships between molecular volume and the mobility, R_E value. | O. Fujishita, M. Hirakawa, R. Fukuoka, S. Higuchi, T. Aoyama and M. Horioka | Hospital Pharmacy, Faculty of Medicine, Kyushu University |
| 2. Fused silica capillary tube isotachophoresis using multichannel photodiode array detector. | M. Goto, U. Ueda and D. Ishii | Research Center for Resource and Energy conversation and Faculty of engineering, Nagoya University |
| 3. Separation process of isotachophoresis analyzed by thirty two channeled UV-detector. | K. Nakahara, T. Hirokawa and Y. Kiso | Faculty of Engineering, Hiroshima University |
| 4. Development of a high performance isotachophoretic analyzer. | H. Takabe, T. Hirokawa and Y. Kiso | Faculty of engineering, Hiroshima University |
| 5. Computer Analysis of isotachopherogram by PG differentiation. I. Analysis of some proteins with ampholite. | H. Kobayashi, N. Higashi and M. Kawahara | Faculty of Science, Josei University |
| 6. Determination of phosphate ions by elimination method in isotachophoresis | T. Hine and T. Yagi | Analytical Applications Department, Shimadzu Corp. |
| 7. Determination of sulfide in sea-water by capillary type isotachophoresis | K. Fukushi and K. Hiroy | Reserch Institute for Marine Cargo Transportation, Kobe University and Government Industrial Research Institute, Okasa |
| 8. Analysis of rare earth elements by IP-PIXE Method | T. Hirokawa, K. Iwamoto, F. Nishiyama and Y. Kiso | Faculty of Engineering, Hiroshima University |
| 9. Analysis of plating bath by isotachophoresis | K. Kojima and N. Shinohara | Application Laboratory, Shimadzu Corp. and Kyoto Municipal Research Institutute for Industry |
| 10. Application of isotachophoresis for the analysis of anolite | A. Sato and T. Murata | Fundamental Research Lab. III, Nippon Steel Corp. |
| 11. Isotachophoretic analysis of some days and its related materials | N. Kuramoto | Osaka Prefectural Industrial Research Institute |

Dec. 12 Morning (9:30)

- | | | |
|---|------------------------------------|---|
| 12. Capillary zone electrophoresis 5: Polyamines in human fluids | T. Tsuda and Y. Kobayashi | Nagoya Institute of Technology |
| 13. Preparation of an apparatus for sample introduction for capillary electrophoresis | S. Honda, S. Iwase and S. Fujiwara | Faculty of pharmaceutical Sciences, Kinki University and Pharmaceuticals Research Center, Kanebo Ltd. |
| 14. Electrokinetic chromatography with micellar solution | K. Otsuka, S. Terabe and T. Ando | Faculty of Engineering, Kyoto University |

- | | | | |
|-----|--|--------------------------------------|--|
| 15. | Unknown compounds formed by the oxidation of ascorbic acid with cupric ion and detected on isotachogram. | Y. Tsuda and H. Fukuba | Kyoritsu Woman's University and Ochanomizu University |
| 16. | Determination of ascorbic acid and related compounds by isotachophoresis. | S. Kosai and Y. Akada | Faculty of pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University |
| 17. | Determination of γ -carboxyglutamic acid in human urine by isotachophoretic analyzer. | T. Ageta and H. Kodama | Department of Chemistry, Kochi Medical School |
| 18. | Simultaneous determination of cystathionine and N-acetyl-cystathionine in various tissues of rats with uptathioniunuria. | A. Mizobuchi, H. Terao and H. Kodama | Department of Chemistry, Kochi Medical School |
| 19. | On lens-deteriorating fungi. | H. Arai and N. Kaneko | Tokyo National Research Institute of Cultural Porperties and Nippon Kogaku Co. |

Afternoon (13:30)

SPECIAL LECTURE

Application of capillary typed isotachophoresis to the polymorphisms of serum and seminal proteins

- | | | | |
|-----|--|--|--|
| 20. | Analysis of human liver protein by capillary-type isotachophoresis. | Haruhiro Yoshida | Department of Legal Medicine, Jichi Medical School |
| 21. | Observation of haptoglobin proteins in dog serum with capillary type isotachophoresis. | K. Takahama and U. Kikuta | Department of Legal Medicine, Miyazaki Medical College |
| 22. | Studies on fish muscle protein with capillary type isotachophoresis. | H. Yoshida, S. Ikemoto and K. Tomita | Department of Legal Medicine and Laboratory of Human Biology, Jichi Medical School |
| 23. | Tear proteins of animal model of allergic rhinitis. | K. Suzuki and K. Suzuki | Department of Food Technology, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University |
| 24. | Highly sensitive and rapid analysis of human serum proteins by carrier-free isotacho-electrofocusing method. | H. Yoshida and S. Ikemoto | Toxicology Laboratory, Research and Development Planning Department, Toray Industries, Inc. and Department of Legal Medicine, Jichi Medical School |
| 25. | Tranexamic acid as terminating ion in protein carrier-free isotachophoresis. | T. Manabe and T. Okuyama | Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University |
| | | H. Yamamoto, T. Manabe, T. Okuyama and A. Miyadera | Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University |

1 細管式等速電気泳動法によるイオン分子量の推定 (4)
分子体積と移動度、 R_E 値との関係

(九大病院・薬剤部) ○藤下 修、平川 雅章
福岡 龍一、樋口 駿、青山 敏信、堀岡 正義

M の単位
 $1 \text{ dalton} = 1.66 \times 10^{-24} \text{ g}$
 $M \times 1 \text{ mol} (6.02 \times 10^{23} / \text{mol})$
 $= M \text{ g/mol}$

【緒言】先に演者らは、有機系イオン性物質の分子体積 (=分子量/比重) の2/3乗が、細管式等速電気泳動における定性の指標 R_E 値と次のような相関性を示すことを報告した:
 $R_E = 0.680 + 0.081 (M/d)^{2/3} / |Z|$ ($r=0.940$, $N=115$).^{1a,d} Z はイオンの電荷を表し、その計算には絶対移動度 m_0 の値が必要である。^{1b-d} しかし、一般にイオン性物質の比重 d の値は与えられていない場合も多いので、²⁾ 示性式または構造式からその分子体積を計算して m_0 あるいは R_E 値を求める方法を検討した。

$t \times \text{重} \div \text{容積} d \eta$
 単位 g/cm^3
 M/d の単位
 cm^3/mol

【計算】式を導くための絶対移動度 m_0 、 R_E 値 および電荷 Z の値は広川³⁾ が報告した値を用い、分子体積は Bondi⁴⁾ が報告した van der Waals Volume V_W (cm^3/mole) の値を \AA^3 に変換して計算した。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。

V_W の単位
 cm^3/mol
 $1 \text{ cm}^3 = 10^{24} \text{\AA}^3$

【結果および考察】 [1] $V_W - M/d$ の関係

有機系イオン性物質の分子体積 M/d は V_W と次のような相関性を示した。

$$V_W = 9.69 + 1.03 M/d \quad (r=0.910, N=111) \quad (1)$$

図1に示すように1価の脂肪族カルボン酸(●)の M/d と V_W の相関は非常に良いが ($r=0.999$)、例えば 比重の大きな2価のカルボン酸(○)や、アミノ酸(Δ) の V_W は M/d より大きく、全体としての相関は式(1)のようにやや悪くなった。これらの点はさらに検討する余地があるが、比重の値が与えられていない物質の分子体積をより簡便に表す方法として、 M/d のかわりに V_W を用いることにした。

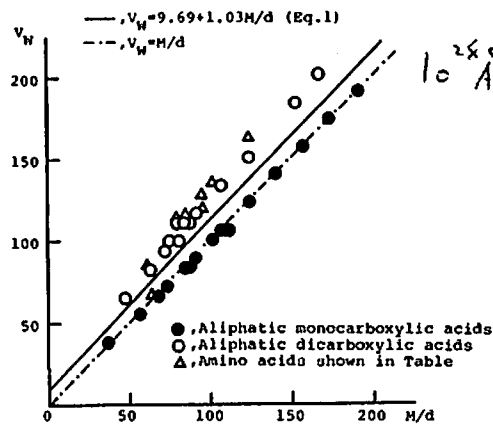


Fig. 1 Relationship between M/d and V_W for some acids

[2] $m_0 - V_W$ および $m_0 - M/d$ の関係

1価、2価および3価のイオンの電荷がそれぞれ1、2および3のときの m_0 の値を用いて、分子体積 V_W と絶対移動度 m_0 ($\text{cm}^2 \text{v}^{-1} \text{s}^{-1} \times 10^5$) の関係を求めると以下ようになった。

$$m_0 = 8.44 + 572 |Z| / V_W^{2/3} \quad (r=0.976, N=111) \quad (2)$$

なお、比重の値が与えられている有機系イオン性物質²⁾ の m_0 と分子体積 M/d の関係は次のようになり、これらの物質の m_0 は次式によっても推定が可能と考えられる。

$$m_0 = 12.8 + 452 |Z| / (M/d)^{2/3} \quad (r=0.962, N=115) \quad (3)$$

[3] $R_E - V_W$ の関係

分子体積 V_W と $\text{pH} 10.0$ の場合の R_E 値との関係は以下ようになった。

$$R_E = 0.544 + 0.083 V_W^{2/3} / |Z| \quad (r=0.953, N=111) \quad (4)$$

上記の式によって、比重の値が与えられていない有機系イオン性物質の R_E 値が、示性式または構造式から計算した分子体積 V_W から推定できると考えられる。

これはわかっている

[4] アミノ酸の V_W , M/d および m_0

比重の値が与えられているアミノ酸²⁾の分子体積 V_W と M/d (図1)および式(2)と(3)によって得られたアミノ酸の m_0 と広川らのデータ⁵⁾を表に示す。

amino acid	V_W	M/d	$m_0(V_W)$	$m_0(M/d)$	m_0 ⁵⁾
Ala	84.24	62.22	38.2	41.6	32.4
Asn	115.46	85.63	32.6	36.1	31.8
Asp	111.31	80.12	33.2	37.1	29.8
			57.9	61.4	56.5
Glu	128.30	95.66	30.9	34.4	27.4
			53.4	56.0	54.3
Gly	67.27	64.66	43.0	40.9	37.6
Leu	135.19	101.44	30.2	33.6	26.8
Tyr	163.82	124.44	27.5	30.9	20.3
			46.7	49.1	39.9
Val	118.20	95.24	32.2	34.5	28.6

比重の大きなアミノ酸の V_W の値は M/d の値よりもかなり大きいですが、これらの値によって式(2)および(3)から求めた m_0 の値は $m_0(V_W)$ の方が $m_0(M/d)$ よりも、広川らの値に近いものが得られた。

図2に式(4)によって求めたAsp(-)の $R_E - pH_L$ 曲線と広川らのデータ³⁾(●)を示す。 $pH_L 10$ の場合の誤差がそのまま全体の誤差となっているが、各 pH_L における R_E 値の概略は推測が可能と思われる。なお式(4)の Z を求めするために $m_0(V_W)$ の値を用いたが、この計算の段階で m_0 の値を変化させても R_E 値にはほとんど影響を及ぼさなかった。

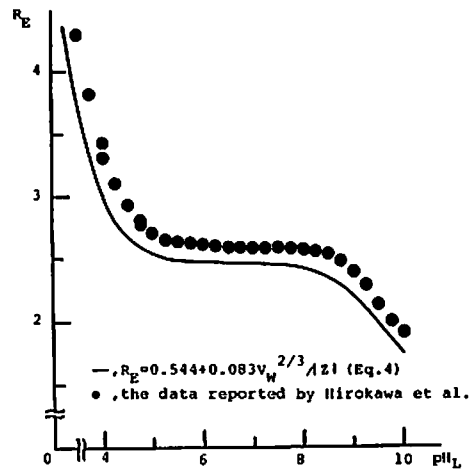


図2 $R_E - pH_L$ Curves for Aspartic acid

【謝辞】貴重なデータ⁵⁾を提供下さいました広島大学工学部の広川健博士および木曾義之教授に感謝の意を表します。

【文献】1) a) 第5回等速電気泳動シンポジウム, 京都, 1985年12月, pp.13-14; b) 日本薬学会第106年会, 千葉, 1986年4月, p.95 c) Chem. Pharm. Bull., 34, 1344 (1986); d) Chem. Pharm. Bull., 印刷中. ← 1986, 12)

2) "化学便覧基礎編I", 第1版, 丸善, 1966, pp.165-360; "The Merck Index", U.S.A., 1983.

3) T. Hirokawa et al., J. Chromatogr., 271, D1 (1983).

4) A. Bondi, J. Phys. Chem., 68, 441 (1964).

5) 広川, 木曾, 島津科学器械ニュース, 25, No.5, 24 (1984); 広川, 第5回等速電気泳動シンポジウム, 京都, 1985年12月, pp.33-34.

2 瞬間マルチ測光検出器を用いる溶融石英細管式等速電気泳動分析法

(名大省エネセ・名大工*) ○俊藤正志・上田 豊*・石井大道*

1. 我々は、泳動管として内径0.25mmのフューズドシリカ管を用い、検出器として瞬間マルチ測光検出器を用いる等速電気泳動分析法について基礎検討を行ない、すでに有機酸及びヌクレオチド類分析に応用した。今回は、

(1) 陽イオン染料を試料とした本法におけるイオンペア剤の分離に及ぼす影響

(2) 金属のフェナントロリン錯体を試料とした本法によるマイクロ吸収スペクトル分析について検討したので報告する。

2.40 ~ 8.0 nm まで

1.4 nm 分解度

2. 実験

装置としては細管式等速電気泳動分析装置(島津, IP-2A)の泳動管の部分の内径0.25mm, 長さ47cmのフューズドシリカ管に取り換えて使用し、検出器には瞬間マルチ測光検出器(ユニオン技研, MGPD-350)を用いた。この検出器は従来用いられている光学系のミラー・レンズの数をできるだけ減らし、光源とフォトダイオードアレイとの距離を短かくするなど改良してある。フローセルには、フューズドシリカ管の出口部分の被覆を取り除きそのままオンラインセルとして用いた。試料には、メチレンブルー(MB), ニュートラルレッド(NR), ピロニンY(PY), ビスマルクブラウン(BB), ベーシックフクシン(BF)の5成分混合液, または0-フェナントロリンと鉄(II)イオンを4:1のモル比で混合した標準溶液を用いた。先行液には、イオンペア剤としてオクタンサルホン酸ナトリウム0~0.15%及びポリビニルアルコール(PVA)1%を含む1.5 mM酢酸カリウム/酢酸(pH 4.75)を用い、終末液には、1% PVAを含む1.5 mMカルニチンの塩酸塩(pH 2.90)を用いた。

セル 0.21 μl
体積

3. 結果及び考察

(1) 陽イオン染料の分離に及ぼす先行液中のイオンペア剤濃度の影響

先行液中のイオンペア剤濃度を变化させた場合の流速500nmにおける等速電気泳動図の例を図1に示す。イオンペア剤を添加しないと至には、MBとNR, NRとPYの分離が不完全であるが、イオンペア剤を添加していくにつれてこれらの分離が改良され

約0.10%のイオンペア剤の添加によ、完全に分離すること became clear. 本検出器による完全分離された際の三次元等速電気泳動図を図2に示す。A及びB図はそれぞれ、45°及び90°の角度で三次元プロットしたものである。従来の単一液長における等速電気泳動図はそれぞれ別のゾーン成分を同定することから困難であるが、三次元プロットをすることによ、それぞれ

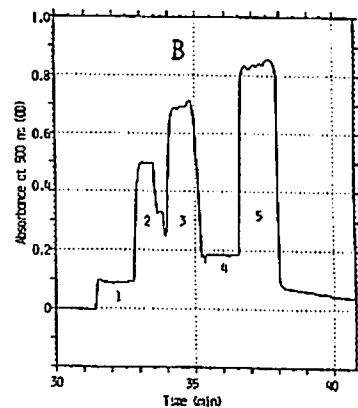
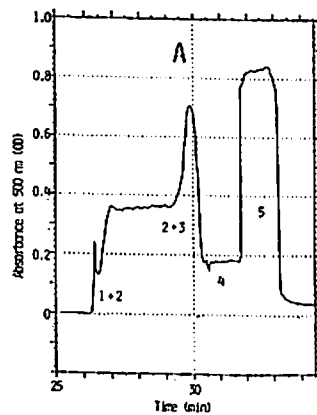


図1 陽イオン染料の分離に及ぼす先行液中のイオンペア剤濃度の影響

イオンペア剤濃度(%): (A) 0, (B) 0.10, ヴン: 1=MR, 2=NR, 3=PY, 4=BB, 5=BF, 試料注入量: 6μl, 泳動電流値: 10mA.

FEI 0.25 μM である

FEI 管内面は 4-17-18 の通り → 72-21-21 の通り
 カリウムイオンが 得にくく
 表面が スクレーパー

成分を容易に同定することが出来る。図3はこの等速電気泳動図を等高線的に表示したものであり、このように表示することにより、各ゾーンの純度を知ることが出来る。液体クロマトグラフィーにおける等高線図が円形を示すのに対して、等速電気泳動のそれは四角形を示すのが特徴で、BBゾーンの前にその不純物によるゾーン6が存在することが明瞭にわかる。

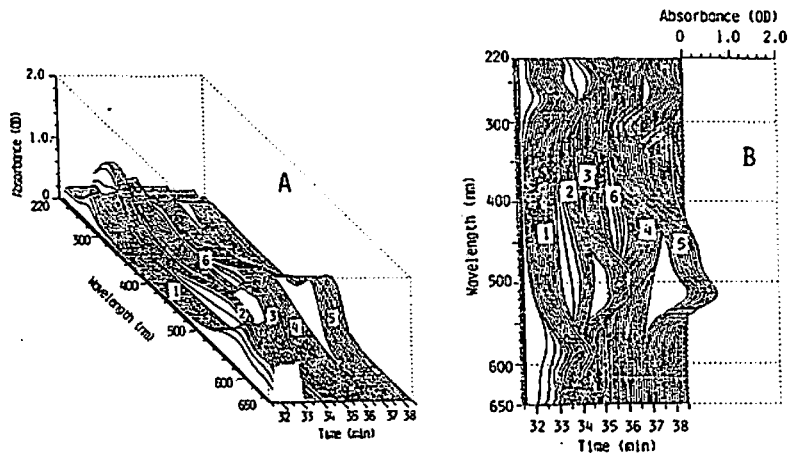


図2 陽イオン染料の三元等速電気泳動図

(A): 45°フロント, (B): 90°フロント, イオン強度: 0.10%

(2) 鉄(II)-フェナントロリン錯体を試料とするマイクロ吸収スペクトル分析

液体クロマトグラフィー-ゾーン電気泳動法では注入された試料は分離過程で拡散等により、必ず希釈されるのに対して、等速電気泳動法では注入された試料の濃度が先行イオン濃度より低いときには逆に濃縮される特徴がある。この分離過程における試料の濃縮効果を利用して等速電気泳動法による極低濃度金属イオンの検出法及び極微量試料量での吸収スペクトル測定による定性法の開発を試みた。試料として鉄(II)-フェナントロリン錯体を用い、先行イオンとして1.5 mM カリウムイオンを用いて検討した。まず、鉄(II)イオン濃度として5 μM の試料について、試料注入量とピーク幅の関係を調べた結果、注入量が50 μl までピーク幅は試料注入量に比例した。次に、試料注入量を50 μl と一定にして、試料濃度とピーク幅の関係を調べた結果、0.5 ~ 100 μM の濃度範囲で両者の間に比例関係が成立した。本法による鉄(II)イオンの検出限界は約0.2 μM である。

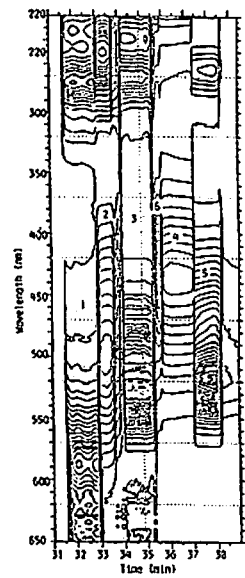


図3 陽イオン染料の等速電気泳動における等高線図

鉄(II)イオン濃度が0.5 μM の試料を50 μl 注入したときの等速電気泳動図を図4に示す。この場合に注入された鉄(II)イオンの純度は1.4 mg であり、図4のBより約0.5 mg の試料量で完全な吸収スペクトルが得られることが明らかになった。

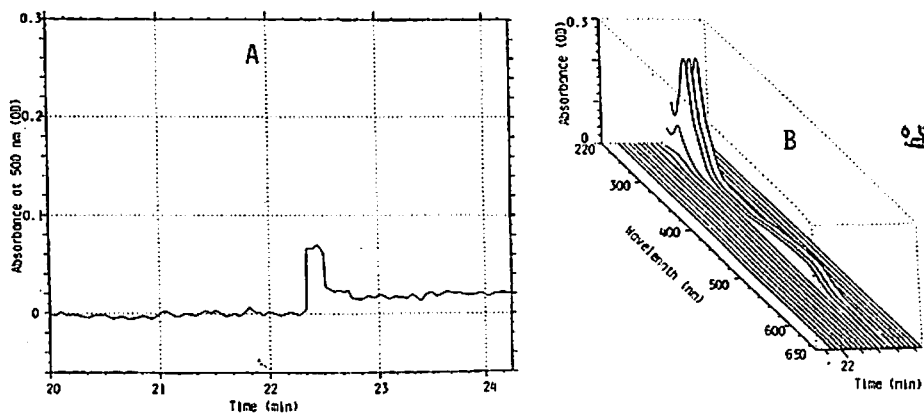


図4 0.5 μM 鉄(II)-フェナントロリン錯体の等速電気泳動図

(A): 500nm における泳動図, (B): 三元等速電気泳動図, 泳動電流値: 5 μA

◎ PVA 0.5% 以上
 電気泳動後は本記事
 記載が PVA 以上かつ

◎ 試料は FEI 管内面は 4-17-18 の通り
 本記事 72-21-21 の通り 217 吸音する

◎ L 濃度 1 μM 以下は 分析が 困難

(広島大工) 中原 潤・広川 健・木曾義之

1. 等速電気泳動法における分離の可否は、注入された試料ゾーンより生成する混合ゾーンにおける移動度に差があるかどうかにより決定される。既に報告したようにこの混合ゾーンの解析は2成分系についてはかなり精度良くシミュレートできる事が明らかになっているが、3成分系以上での実用的なシミュレーションはいまだに報告されていない。生成、消滅する混合ゾーンの界面の速度も従来実測された例はない。3成分系以上での実用的な解析を可能にする理論的背景について検討する上で混合ゾーンの界面速度の実測値は不可欠である。このため著者は4チャンネルPGD装置、16チャンネルUV検出装置を作成してきたが、理論計算で使用する近似を吟味するにはさらに精度の高い測定が必要となった。そのためある程度多量の試料を扱う必要があり、16チャンネルでも不十分であったので今回32チャンネルの同様な装置を新たに作製した。本研究では3成分系の分離過程の実測の例およびUV吸収のない物質の分析例について報告する。

2. 装置全体の概略図を図-1に示す。電極およびバルブ類にはIP-1B用のものを使用した。光源としては重水素ランプ(浜松ホトニクスL1626)を2本使用し、UVフィルターを透過させた後、32本の光ファイバー(藤倉電線製、コア径500 μ m、クラッド径850 μ m)により分離用細管(0.5mm i. d., 1.0mm o. d.)に照射する。透過光はシリコンフォトダイオード(PD, 浜松S1226)で検出した。32個のPDは約5mm間隔で配列してある(16.6cm/32)。PDの出力はリニアアンプを介してスイッチャーに入力する。スイッチャーはマイコン(SORD M223)の指示により各チャンネルのデータをRS-232C回線(9600baud)によりマイコンにデータを転送する。

転送されたデータはフロッピーディスクに書き込み、オフラインで処理する。現在32チャンネル分のデータを1回取り込むのに必要な時間は2.03秒である。

3. 作製した装置を使用してSPADNS、モノクロロ酢酸(MCA)、ピクリン酸(PIC)各10mMの等量混合物を試料とし、3成分系の分離過程を解析した。リーディング液としては10mM HCl/ β -アラニン(pH=3.6)、ターミナル液として10mMカブロン酸を使用した。試料注入量は6-15 μ lである。完全分離した状態の電位勾配検出器によるフェログラムの例(泳動電流100 μ A)を図-2に、本装置で実測したフェログラムの例を図-3に示した(試料6 μ l、各20nmol、試料15 μ l、各50nmol)。図-3では各チャンネルで検出された吸収帯の位置を一致させてある。さらに便宜のため試料量の違いを補正してある。MCAはUV吸収を示さず混合ゾーンが消滅してMCAゾーンが生成する様子が明らかである。また本装置によって初めてSPADNS+MCAとSPADNS+MCA+PICの界面やSPADNSとSPADNS+MCAの界面が観測できた。これらの実測結果にもとずいて描いた分離過程の模式図を図-3に示した。今回の実験ではやや

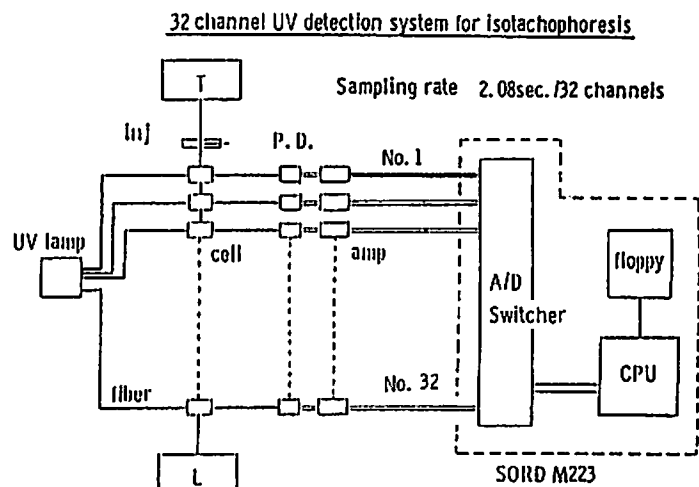


図-1 試作した装置の概略図

なかはら きよし・ひろかわ たけし・きそ よしゆき

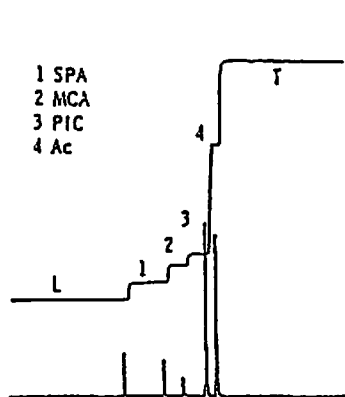


図-2 電位勾配検出器による試料のイソタコフェログラム

時間分解能が不十分であるが、測定された各ゾーン界面の速度をシミュレーションによる値と共に表-1に示した。かなり良く一致しているものと10%以上の誤差があるものがあるが、これは今回のシミュレーションが2成分系モデルによるものである事およびリーディングゾーンと試料ゾーンの混合ゾーンを考慮していない事の影響によるものと考えられる。表-1のシミュレーションの空欄は対応する界面を考慮していない事を示す。

なお6 μ l注入した場合と15 μ l注入した場合で、PICとPIC+MCAの界面の実測値が大幅に異なっている理由については不明であり今後さらに検討を要する。

今後更に時間分解能を向上させ、本装置を使用して3成分系の分離過程を詳細に検討しシミュレーションを改良したいと考えている。

なお本装置ではリーディング液に微量のUV吸収性のカウンターイオンを混入させて泳動する事によりUV吸収のない物質の分析も可能であり、講演ではその例についても報告する予定である。

(参考文献)

- 1) 第5回イソタコシンポジウム、高羽、広川、木曾(1985)
- 2) 第52回日本化学会春季年会、中原、広川、木曾(1986)

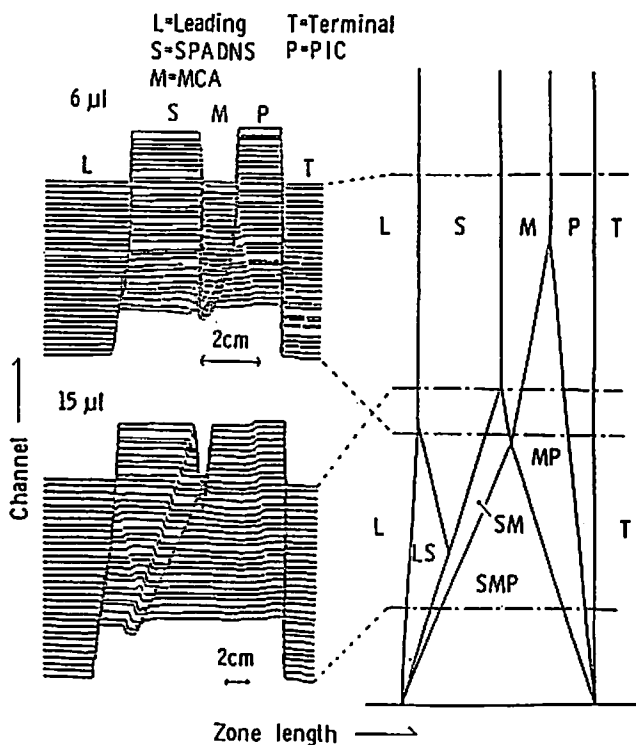


図-3 本装置による試料のイソタコフェログラム

表-1 界面速度 ($\times 10^2 / \text{cm sec}^{-1}$)

BOUNDARY	OBSERVED		SIMULATED
	15 μ l	6 μ l	
L/LS	2.61	2.99	—
LS/S	3.95	—	—
LS/SN	2.26	—	—
S/SM	2.26	—	2.34
SM/SMP	2.08	—	—
M/SH	3.20	—	3.35
PM/SMP	3.38	—	—
M/PH	2.64	—	2.94
P/PK	2.20	3.37	3.42
L/S	3.21	3.09	3.12
S/H	—	3.09	3.12
P/H	—	3.06	3.12
T/P	2.94	3.12	3.12

4 高分解能等速電気泳動装置の開発

(広島大工) 高羽 均・広川 健・木曾義之

1. 既に報告してきた様に、等速電気泳動法では分離の場が自由溶液とみなせるため、分離の可否についてのシミュレーションが可能であるという他のクロマトグラフ法には期待できない特徴がある。演者らは単純な2成分系では実効移動度が $1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{Vs}^{-1}$ だけ異なれば泳動電流 $100 \mu\text{A}$ の時約1500秒で 10 nmol の試料が分離できる事を明らかにしたが^{1, 2)}、試料成分が複雑になる程、試料の量が増加する程、この差は大きくなければならない。一般に多くの試料の混合系を扱う時には、一種の電解液系で全ての試料を分離する事が困難である事が多い。もし可能であっても処理できる試料のダイナミックレンジはあまり大きくないのが普通である。一般にIP分析の分離能は他のクロマトグラフ法よりも小さいとされているがこの理由の一つとして、HPLC等では一種のカラムに対して種々の溶離液を使用できるような装置的に工夫されているのが普通であるのに対してIP法では一回のRUNでは一種の電解液系しか使用しない事があげられよう。そこでIP法でも分離能の向上およびシミュレーションの結果をより積極的に利用する意味から種々の電解液を使用して連続的な分析が可能な装置の開発が期待される。ここでは以上の目的のために試作した5種の電解液が使用できるIP装置について実用化の問題点について報告する。

2. 異なる電解液を使用する装置としては種々の構造が考えられるが、まず最も単純なタンデム型を試作した。図-1に試作装置の構成を示した。装置は5種のリーディング電極(L1-L5)、2種のターミナル電極(T1, T2)を供えている。試料注入バルブ(IP-1Bのものを使用)から注入された試料は内径0.5mmのPTFEチューブで分離され5基の電位勾配検出器(PGD)により順次検出される。PGDの間隔はそれぞれ約10cmである。試料注入からL5での検出が終了するまでに要する時間は約1時間である(泳動電流 $100-50 \mu\text{A}$)。始めL1-T1, L2-T1間を通电した後、L3-T2, L4-T2, ...と通电する。この間バルブ操作により試料をPGD1-PGD5で検出する。2種のターミナル電極を使用したのはできるだけ高電圧の上昇をさけるためと、別種のターミナル液の使用を可能にするためである。1種のTのみの場合には気泡の発生などで分析を中断せざるを得ない現象が頻発したが2種にして殆どこの現象は起こらなくなった。

3. 本装置はタンデム型構造のため、ある電解液条件で一度配列した試料は次の電解液条件で再配列する。この現象は通常の均一な混合試料を一つの電解液系で分析する場合には考えられない現象であり、この間に均一な溶液からの分離よりは余分に時間がかかる事が予想され、この再配列がうまく行われるかどうかがこのタイプの装置では重要となる。試作した装置のテストとして10種アニオンの分離を試みた。試料はシュウ酸、臭素酸、亜リン酸、臭化酢酸、コハク酸、2-ヒドロキシイソラク酸(HIB)、安息香酸、酢酸、グルタミン酸、ラク酸の10mM溶液の等量混合物である。図-2は等速電気泳動法のシミュレーションプログラムSIPSにより得られた、これらの試料の $m-pH_L$ 曲線である。図-2は重なりを避けて分割してあるが、

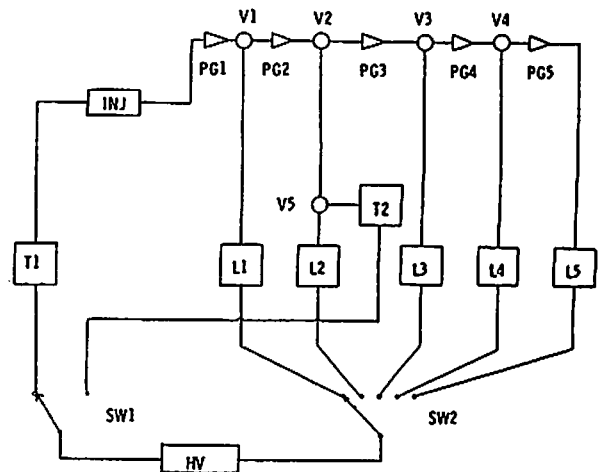


図-1 試作した装置の概略図

たかば ひとし・ひろかわ たけし・きそ よしゆき

pH = ~4.4でこれらの全分離が可能であると推定された。ここで取り扱った試料のうちHIB、安息香酸、ラク酸の3種は6以上のpHでは実効移動度が非常に接近してくる。これらの事を考慮して図-1に示した装置のL1-L5にpH_L = 3.2 (Buffer: Gly-Gly)、3.6 (β-Ala)、4 (β-Ala)、4.4 (ε-aminocaproic acid)、4.8 (creatinine)のリーディング液を充填し、分離挙動を検討した。これらの電解液条件のうち、3.2、4、4.4で実測したフェログラムをシミュレーションの結果と共に図-3に示した。pH = 4で酢酸(8)とグルタミン酸(9)に

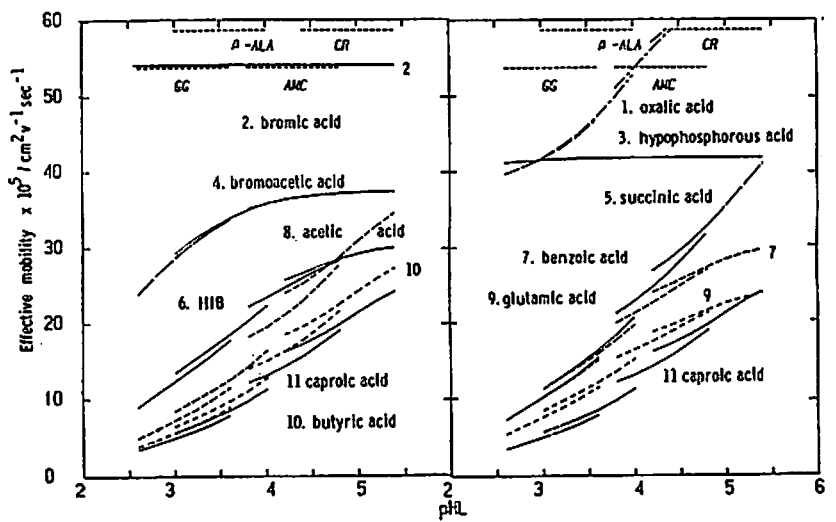


図-2 試料の実効移動度 - pH_L 依存性

Enforced isotachopheresisの現象が見られる他は両者は良く一致していると言える。ゾーンの逆転の問題に関しては、例えばpH = 4と4.4のフェログラム上、コハク酸(5)とHIB(6)に見られるが、均一系からの分離に比べこの場合やや分離に時間がかかるようであった。装置としての問題点としては1) 流路が長くなるため泳動電圧が上昇し、トラブルの原因となりやすい 2) 多数のバルブが必要となり操作が繁雑となり自動化が難しい 3) 高電圧やPGDの切り替えの自動化が難しいなどの点があげられる。今後流路を単純化する方向で改良を重ねていきたいと考えている。

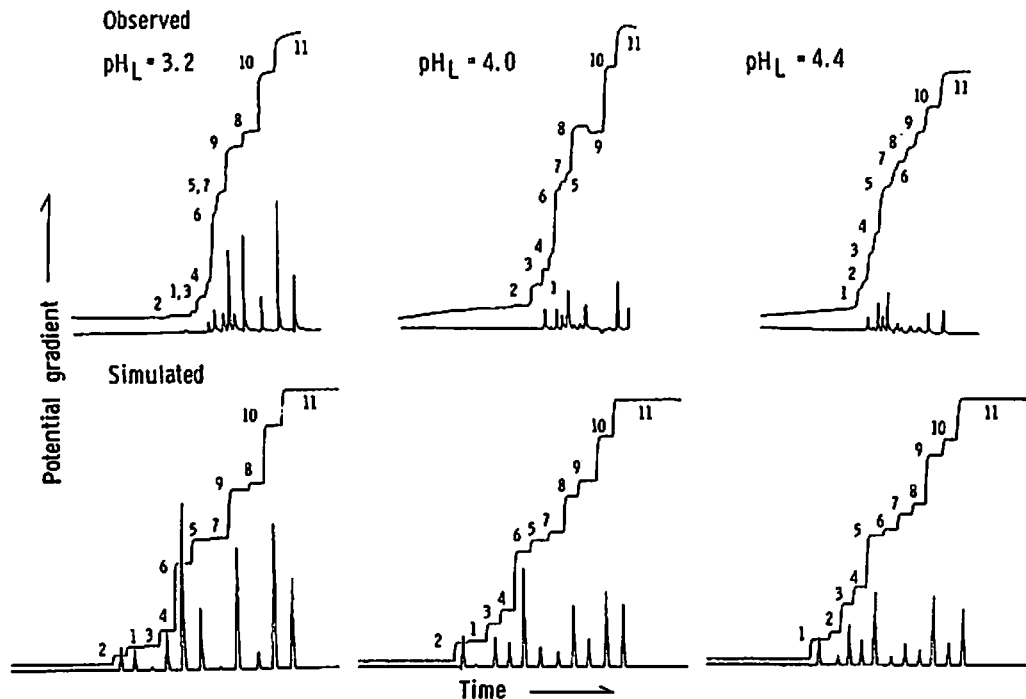


図-3 実測イソタコフェログラムとシミュレーション

(参考文献)

- 1) 第5回イソタコシンポジウム、高羽、広川、木曾(1985)
- 2) 第52日本化学会春季年会、高羽、広川、木曾(1986)

5 PG 微分析法による等速電気泳動図のマイコンによる解析

I. アンフォライトを用いたタンパク質の分析 (城西大・理・化)

○小林 英三郎・東 伸俊・河原美紀

通常のイソタコフェログラムを模式的に Fig 1 a に示す。a, b, d の各成分はゾーン形成が完成されているが、キャリア-アンフォライトのような連続した移動度をもつ多成分系では c で示す傾斜したイソタコフェログラムとなる。このイソタコフェログラムを dt/dPG 処理すれば Fig 1 b で示すように、ゾーン形成が完成している a, b, d の各成分は上方軸で示すオ時間のゾーン長をもつ棒グラフとなり、成分 c 領域は ΔPG に属する成分量のゾーン長が一定であれば、同じオ量をもつものとして表わす事ができる。1), 2), 3)

一オ a および d 成分が UV 吸収をもつ物質であれば ΔPG に属する成分の UV 吸収総量として Fig 1 b の下方軸 A の座標をもつ A, B の各棒グラフとして示す事ができ、UV D 信号の dt/dPG 処理をしたものとして考える事ができる。

これらの波形処理を実行するには、UV Detector と PG Detector の分析カラム上の位置がはなれて いるため両信号が同期されていないので次の手続を行なわなければならない。

1. PGD と UV D の両信号に共通なマーカー物質を選択する。
2. マーカーによる信号の時間的ずれを合わせ PGD と UV D から得られる両信号の同期をとる。
3. dt/dPG 処理をし ΔPG に属するゾーン長オと UV 吸収総量 A をカウントする。
4. ΔPG に対してオ, A の各量を各軸に従い表わす。

以降に報告するデータは全てこの dt/dPG イソタコフェログラム処理によって表わしたものである。

I. 泳動装置および泳動条件

島津細管式等速電気泳動装置 (IP-2A)

プレカラム i.d. 1.0mm x 40mm

分析カラム i.d. 0.5mm x 100mm

リーディング 5mM HCl-AMP (pH 9.2) 0.1% HPMC

9-ミネイテング 50mM Arginine

Fig 1a

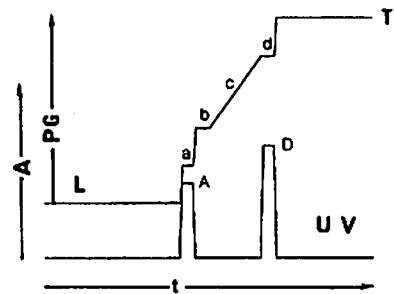


Fig 1b

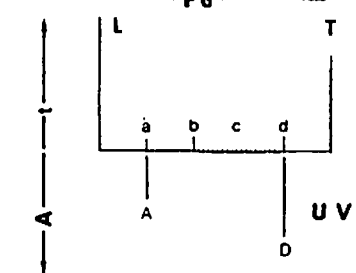


Fig 2

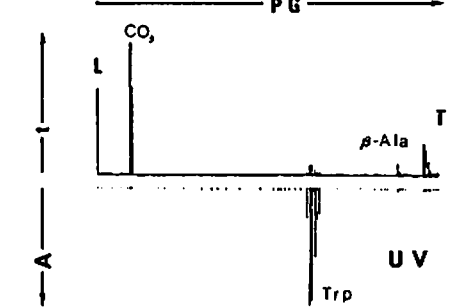
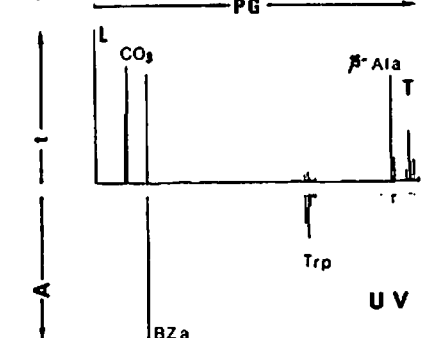


Fig 3



電流 1st 200 μ A 4min 2nd 50 μ A

II. Fig 2 に Trp と β -Ala を泳動したものを示す。Trp は PG 信号で判断すればやや広がったゾーンとなっている。その結果 UV 信号においてもその吸収領域は広がっているが定量するためにはこの領域の A を積算すればよい。また Fig 3 に示す BZa (Benzoic acid) は PG 産物から明らかであるようにゾーン形成は完成しており、UV 領域でも単一の棒グラフとして示されこの高さ A から定量値を得る事ができる。UV 吸収をもつ BZa と Trp を用い PG D と UV D の同期用マーカーとして次の分析に用いた。

III. タンパク質を分析する場合にはスーパーイオンとして多成分系両性電解質であるアンフォライトが多用されている。Fig 4 は Sepaline に β -Ala を加え分析したものであるが広い PG 範囲に渡って紫外吸収物質の存在が認められる。

これは UV 吸収を利用してタンパク質の分析をする際には大きなバックグラウンドとなるので信号処理上消去しておかなければならない。

Sepaline と BZa および Trp をマーカーとして泳動したもの (Fig 5) は BZa が炭酸イオンと Sepaline の両領域に含まれている事を示している。この dA/dPG イソタコフェログラムをバックグラウンドとして BSA を加えたもの (Fig 6) では、BSA のゾーンが PG, UV 各領域共にシャープなゾーンを中心とし高値の PG 方向へ分布している事がわかる。Fig 6 と Fig 5 の差は BSA に基づく PG および UV の dA/dPG イソタコフェログラムとして解析する事ができる。

時間軸に対して UV 吸収強度を表わす通常の UV 吸収パターンで構成成分の解析を試みようとするれば、成分量の変化は UV 吸収の大きさではなくゾーン中に比例するのであるから、成分の量比によっては複雑な判断をしなければならぬ。

本方法で示した dA/dPG イソタコフェログラムでは UV 吸収をもつ成分の PG 値を特定することができるので、バックグラウンドの消去も正確に行え物質の真のイソタコフェログラムを示す事ができる。成分量比の異なる系の高感度微量分析にも十分な解析効果をもつと考える。

1) 細管式等速電気泳動シンポジウム (第3回) p12 (1983) 2) *ibid.* (第4回) p7 (1984) 3) *ibid.* (第5回) p5 (1985)

Fig 4

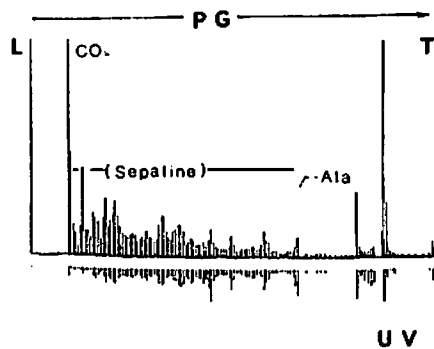


Fig 5

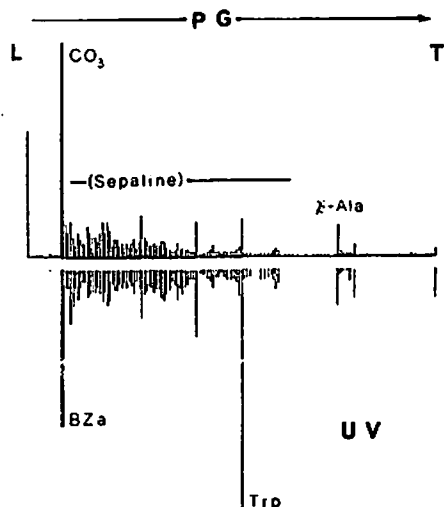
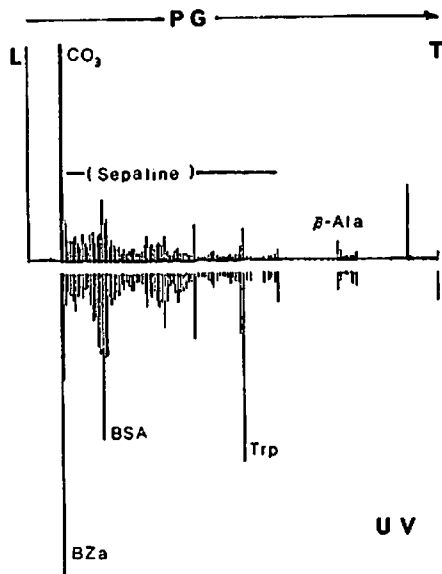


Fig 6



6 消去法によるリン酸イオンの 等速電気泳動分析

島津製作所 応用技術部

日根 隆、○八木孝夫

1. はじめに

リン酸イオン分析法として細管式等速電気泳動法が優れていることが示されている¹⁾が、人工透析患者血清や清酒等の多成分のイオンを含んだ試料の場合、リン酸イオンと電位勾配値が一致や近似するイオンが存在し、リン酸イオンの定性定量の精度を低下させることがある。この様な場合、一般にはリーディング液のpHや溶媒種の選択あるいは錯形成反応を用いて分離を試みるが、十分な効果を得ることができないこともある。

今回、演者らはリン酸イオンと選択的に化学反応し、リン酸イオンのゾーンを消去させるような化合物を試料液に添加し、ゾーンの消失とその長さから定性定量を行う方法を検討し、実用に適する化合物を見出したので報告する。

2. 実 験

装置は島津細管式等速電気泳動分析装置：IP-3A形を使用し、検出器は紫外線吸収検出器(UVD: 254nm)と電位勾配検出器(PGD)とを併用した。泳動チューブは内径0.7mm長さ80cm(PTFE製)と、内径0.5mm長さ160cm(FEP製)を直列に接続し、泳動電流は100~300 μ Aとした。リーディング液は0.01M-塩酸、 β -アラニン、0.1%トリトンX-100(pH3.8)を用い、ターミナル液は0.01M-カブロン酸ナトリウムを用いた。また、塩酸と β -アラニン(pH3.0)、 ϵ -アミノカプロン酸(pH4.0)、クレアチニン(pH5.0)、ヒスタチン(pH6.0)、イミダゾール(pH7.0)、トリス(pH8.0)、アスゾール(pH9.0)を用いて試料を溶解した。試料はオルソリン酸、各種有機酸、人工透析患者血清、清酒等を用いた。リン酸イオンに対する反応性化合物塩として塩化第一スズ、水酸化スズおよび硝酸鉛を使用した。

3. 結 果

リン酸イオンを含んだ溶液に等濃度の塩化第一スズ、水酸化スズおよび硝酸鉛を添加しその上澄液を分析したところ、塩化第一スズと硝酸鉛においてリン酸イオンのゾーン長の著しい減少を認めた。一方、人工透析患者血清や清酒等には有機酸やスクレオチド等が共存しており、リン酸イオンやこれらのイオンの分離にはpH3~5のリーディング液が有効である。そこでこれらのイオンの代表として酒石酸、リンゴ酸、乳酸、コハク酸、酢酸を用い、リン酸イオンや有機酸に及ぼす塩化第一スズと硝酸鉛との影響について更に検討した。その結果、硝酸鉛では酒石酸やリンゴ酸に著しいゾーン長の減少を認めた。従って以下の実験では塩化第一スズを用いることとし、水酸化スズの生成を抑制するために塩化第一スズ・塩酸溶液を調製し、試料溶液に添加して分析を行った。表1にリン酸イオンと5種類の有機酸に及ぼす塩化第一スズの影響をコハク酸のゾーン長を100とした比率で示す。塩化第一スズを添加することによりリン酸イオンとの沈殿物が生じるが、このとき酒石酸、リンゴ酸や乳酸とも結合しそれらのゾーン長が減少する。まず第一番目にリン酸イオンとの結合が起こり、等モルでは約50%のリン酸イオンが除去できる。塩化第一スズの添加の割合を増していくと更にリン酸イオンの減少は進み、3倍のモル濃度になると

7 細管式等速電気泳動法による海水中の硫化物の定量

(神船大・阪工試) ○福士恵一・日色和夫

1. 目的 近年、海水中の硫化物に起因すると思われる海水の白濁化現象が問題となっている。硫化物イオンの定量法にはメチレンブルー吸光光度法とヨウ素滴定法があるが、各々、多少問題点があると思われる。一方、最近になって気液分離膜を用いて環境水中の硝酸イオン及びアンモニウムイオンの定量が行なわれている。そこで気液分離膜を用いて海水中の硫化物を選択的に分離濃縮した後、細管式等速電気泳動法により定量する方法について検討したので報告する。

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、泳動管は内径1.0 mm、長さ10-30 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る。検出器は電位勾配検出器を用い、泳動電流は最初150 μ Aとし、途中で50 μ Aに切り換えた。気液分離管は、外径6.0 mmのガラス管の中に内径2.0 mm、外径2.8 mm、長さ20 cmのチューブ状のフッ素樹脂系多孔質膜が入った二重管構造になっている。ポンプはアトー社製SJ-1220型しごきポンプを使用した。海水のpH、塩分、溶存酸素は各々電気化学計器社製HPH-22型pHメーター、Yellow Springs Instrument社製33型塩分計、Yellow Springs Instrument社製58型溶存酸素計を用いて測定した。表面海水は紐をつけた試薬瓶で採水し、底付近の海水は離合社製バンドーン採水器により採水した。海水試料は溶存酸素測定瓶に入れて持ち帰り、ただちに分析した。

3. 結果 はじめに硫化水素イオンの分析に最適な電解液について検討した結果、リーディング液としてHPMCを0.1%添加した5 mM水酸化ナトリウム溶液、ターミナル液として10 mM酢酸ナトリウム溶液を用いることとした。ついで試料に添加する硫酸の量、発生した硫化水素を吸収する水酸化ナトリウム溶液濃度、試料を循環させるときの流速、循環時間、気液分離管を入れた水浴温度、等速電気泳動装置への試料導入量等について検討した。その結果、海水中の硫化物の最適定量操作法を以下のように決定した。まず海水試料を孔径0.45 μ mのメンブランフィルターでろ過する。ろ過した海水45 mlを50 mlのメスフラスコに採り、(1+1)硫酸0.5 mlを加え、蒸留水で標線に合わせて振り混ぜ、硫化水素を発生させる。一方気液分離管は40 $^{\circ}$ Cに調整した水浴中に固定し、内側に10 mM水酸化ナトリウム溶液を充填しておく。上記メスフラスコ中の溶液10 mlを気液分離管の外側に流速9.0 ml/minで10分間循環させ、発生した硫化水素を気液分離膜をとおして水酸化ナトリウム溶液に吸収させる。この吸収液中には海水中に多量に含まれている炭酸水素イオンも同時に吸収されており、等速電気泳動法による分析の際妨害となる。そこで吸収液をすべて押し出したあと、バリウム型にしたDowex 50WX-8 (200-400メッシュ)陽イオン交換樹脂約0.5 gを加えて約3分間振り混ぜ吸引口過し、炭酸バリウムとして除去した。ついでろ液150 μ lを等速電気泳動装置に導入する。本法により、硫化ナトリウムを硫黄として2.0 mg/lまで添加した人工海水について検量線を作成したところ、Fig.1に示すように直線性のよい検量線が得られた。なおFig.2は、硫化ナトリウム5.0 mg/lを添加した人工海水について本法で処理した溶液100 μ lを等速電気泳動装置に導入したときのイソタコフェログラムである。本法の繰り返し精度は、検量線の各点について硫化物濃度1.0 mg/l当たりのゾーン長から求めたところ、

相対標準偏差パーセントで2.8% (n=5)であった。また本法の感度として、0.1 mmのゾーン長を読み取ることができるとした場合を計算すると、試料中の硫化物濃度 7.3×10^{-3} mg/lが最低定量限界となる。なお硫化物の回収率はほぼ一定で $42 \pm 2\%$ であった。ついで1986年9月16日-19日に大阪湾沿岸で採水した表面及び底付近の海水試料中の硫化物を本法により分析した。また六甲アイランドで採水した表面海水試料に硫化ナトリウム0.50-1.5 mg/lを添加し、分析した。これらの結果をTable 1に示すが、標準添加法でも再現性のある値が得られた。西宮ヨットハーバーの海底付近の試料中の硫化物濃度が高いが、ここは海水のよどんだ閉鎖性の海域であり、海底堆積物中で硫化水素が発生していることが考えられる。以上により、本法は海水中の硫化物定量法として感度、精度とも比較的良好で簡便な方法であることがわかった。

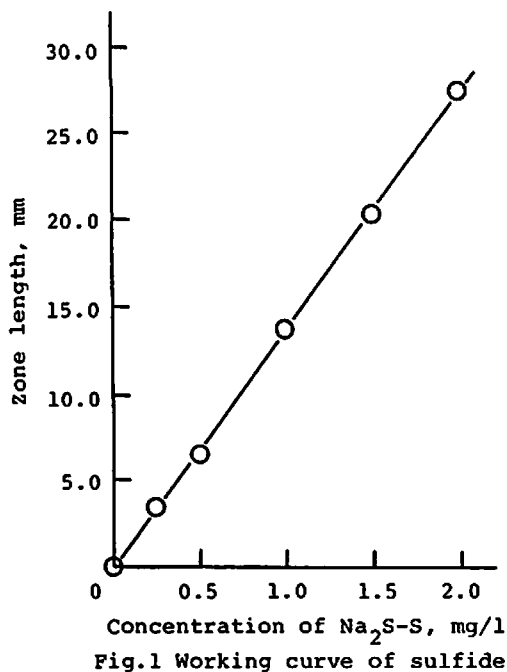


Fig.1 Working curve of sulfide

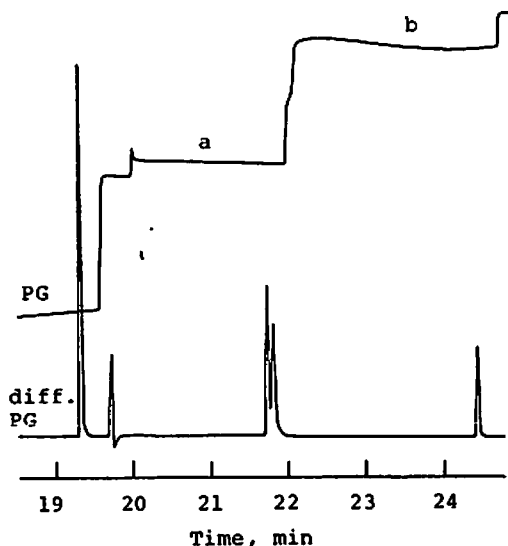


Fig.2 Isotachopherogram of artificial seawater sample treated by the proposed method
a:HS⁻; b:CO₃²⁻

Table 1 Analytical results of sulfide in seawater samples

Sampling site	Depth (m)	Temp. (°C)	pH	Salinity (‰)	DO (mg/l)	Sulfide		
						Added (mg/l)	Found (mg/l)	Error (%)
Pond of KUMM	0	25.4	8.18	27.0	8.83	—	ND	—
Pond of KUMM	5.0	24.9	7.84	28.9	4.46	—	ND	—
Nishinomiya harbor	0	24.9	8.76	24.3	10.51	—	ND	—
Nishinomiya harbor	3.0	25.4	7.82	28.9	3.11	—	1.6	—
Maya pier	0	24.4	7.95	23.4	6.57	—	ND	—
Maya pier	4.0	24.6	7.83	27.4	4.71	—	ND	—
Port of Kobe	0	24.1	7.95	29.0	5.39	—	ND	—
Port of Kobe	4.5	24.1	7.96	29.0	5.08	—	ND	—
Rokko island	0	24.5	7.80	28.1	4.83	—	ND	—
Rokko island						0.50	0.49	-2.0
Rokko island						1.0	1.1	+10
Rokko island						1.5	1.6	+6.7
Rokko island	5.5	24.2	7.80	29.1	3.32	—	0.10	—
Port of Amagasaki	4.5	24.5	7.53	23.8	1.72	—	ND	—
Koshien ferry terminal	4.0	24.4	7.63	28.6	3.38	—	ND	—

Sampling date: September 16-19, 1986; KUMM: Kobe University of Mercantile Marine; ND: Not detected in isotachopherogram

(広島大工) 広川 健・西山文隆・岩本一範・木村剛二・三好辰男・木曾義之

ひろかわ たけし・にしやま ふみたか・いわもと かずのり・きむら こうじ

1. P I X E (Particle Induced X-ray Emission) 法¹⁾は加速した粒子 (H^+ など) を試料に照射し、発生する元素の特性 X 線スペクトルを解析して定性、定量を行う分析法である。加速器を必要とするため現在では一般的な分析法とは言えないが、少量の試料で同時に多くの微量元素を分析できる点で近年注目を集め、 $1 \mu g$ の試料で ppm オーダーの分析が可能であると言われている。しかし他の分析法と同様に大量の matrix 中の微量元素の分析に関しては、たとえ目的元素と matrix の特性 X 線スペクトルが十分離れている場合でも発生した X 線が試料のなかで吸収され、通常高い分析精度は期待できない。このため海水中の微量元素の定性分析などにおいては錯化剤を使用して抽出等の化学操作が行われている。また目的元素の原子番号が接近している場合にはスペクトルが重畳して観測されるためこれらを分離して解析する必要があり、この段階でも分析精度が低下する。特に本法で取り扱った希土類元素のように多数の L-X 線が広いエネルギー領域に渡って現われる元素については解析が困難とされ、これらの混合系に対する PIXE 分析は従来殆ど試みられていない。これらの問題を解決し、PIXE 法により希土類元素等の分析を可能にするには、適当な分離分取法による試料の前処理と重畳した L-X 線の解析のためのソフトウェアの開発が不可欠である。我々は IP 法により希土類元素が分離でき²⁾、濃縮されて連続したゾーンを形成する点に注目し、これらの分離されたゾーンを連続的に分取して PIXE 分析の試料とする方法および X 線の理論強度を使用した Fitting 法を開発したので報告する。

2. 分取用 IP 装置としては IP-1B を改造して使用した。連続してゾーンを分取するため、試料を細管より押し出す方式を採用した (図-1)。図-1 中のポンプより等速電気泳動における体積速度よりも速くリーディング液を圧送する。この溶液は試料が T 字型の分岐部に到達するまで分取用ノズルから滴下・排出される。試料の先端を色素で確認した後は一滴毎をフラクションとして PIXE 分析用の試料ホルダーに滴下する。このホルダーには Nuclepore filter (厚さ $5 \mu m$) が張り付けてあり、滴下後はオートサンプル機構により次のホルダーと交換する。IP 分析用の電解液としてはリーディング液として $20mM K OH$ に α -Hydroxyisobutyric acid (HIB) を $10mM$ 添加し酢酸で $pH=4.8$ に調整して使用した。ターミナル液としては Carnitine hydrochloride の $10mM$ 溶液をそのまま使用した。

P I X E 分析には日新ハイボルテージ製 Van de Graaff 型加速器を使用し $2.5MeV$ で加速した H^+ を試料に $20 \mu C$ 照射しスペクトルを得た (測定時間は約 1000 秒)。X 線の検出には高純度 Ge 半導体検出器を使用した。得られたスペクトルの解析には、Scofield³⁾ の計算した理論強度の補正因子を最小二乗法により全希土類についてあらかじめ求め、

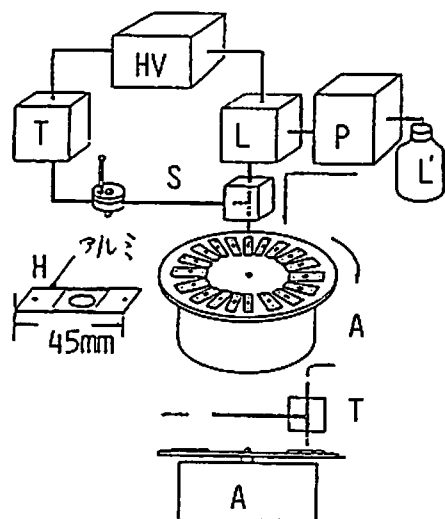


図-1 分取用 IP 装置の概略図

- L: リーディング電極、T: ターミナル電極
- S: 分離用細管 (0.5mm i. d. x 30cm)
- HV: 高電圧電源
- P: リーディング液 (L') 送液ポンプ
- A: オートサンプラー
- T: 分取用 T 型分岐部、H: 試料ホルダー

ひろかわ たけし・にしやま ふみたか・いわもと かずのり・きむら こうじ
みよし たつお・オキそ よしゆき

約20本のGaussianを重ねてスペクトルをシミュレートする方法を使用し、各フラクションの組成分析に供した。

3. テスト試料としてCe, Sm, Dy, Tmの塩化物各5mMの溶液の混合液を用いた。図-2はこの溶液20 μ l(各25nmol)をIP-2Aで分離した時のフェログラムである(泳動電流150 μ A)。一方図-3は同試料20 μ lを図-1の分取装置

により分離・分取した25のフラクションの組成とX線スペクトルのピーク面積を示したものである。試料注入からこれらのフラクションの分取開始まで25分、分取終了まで30分であった。試料先端の確認にはトリイシンプルーを使用した。この場合のリーディング液の送液速度は18 μ l/minで、これ以下の送液量では分解能が低下した。今回の1フラクションの体積は約3 μ lである。図-2に示したKは試料の押し出しに使用したリーディング液中に含まれているもので、カウント数がほぼ一定である事は分取が等量ずつ精度良く行われた事を示している。なお図-4はCe, Sm, Dy, Tm塩化物の等量混合物のPIXESペクトルである。これら

の元素にもとづくL-X線が重畳して観測されている。このスペクトルにCeをfitさせた様子を共に示した。なお図中の点線はL-X線の成分を示したものである。

本実験により、本法が希土類に限らずIP法単独では分析困難な微量元素の定性、定量分析に有用となり得る事が明らかになった。今後幅広い分野で応用可能であると考えられる。

講演ではLa, Ce, Nd, Smの他、微量の希土類元素が含まれている塩化希土の実試料の分析結果についても報告する予定である。

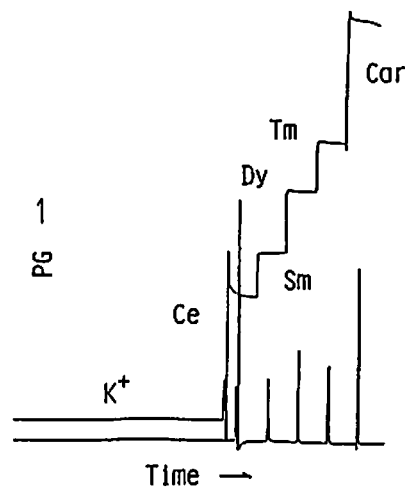


図-2 Ce, Sm, Dy, Tmのイソトプフェログラム

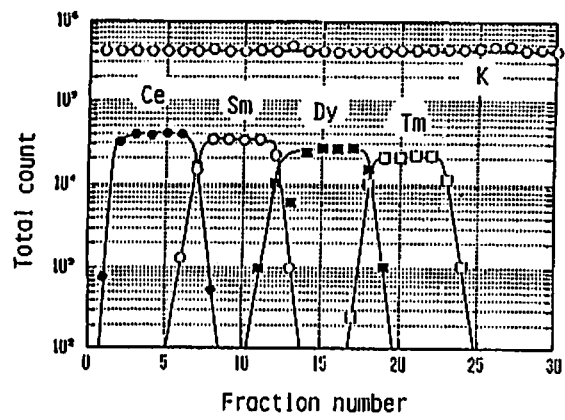


図-3 Ce, Sm, Dy, Tm混合物のIP装置による分取結果—フラクションの組成とトータルカウント

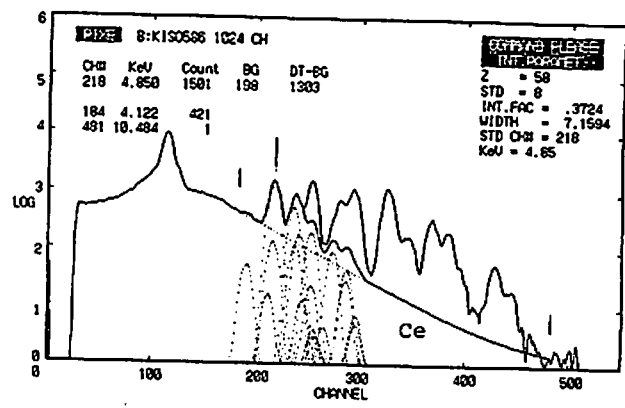


図-4 Ce, Sm, Dy, Tm混合物のPIXESスペクトル

(参考文献)

- 1) S. A. E. Johansson and T. B. Johansson. Nucl. Instr. and Meth., 137(1976), 473.
- 2) T. Hirokawa, N. Aoki and Y. Kiso. J. Chromatogr., 312(1984) 11.
- 3) J. H. Scofield. Phys. Rev., 179(1969), 9.

9 等速電気泳動法による

めっき浴の分析

島津・応技術部 見嶋佳世子, 京都市工試 藤原長政
 (用) 当 局

1. はじめに

ニッケルめっきは装飾あるいは機能めっきとして広く用いられ、銅めっきはプリント配線板などに用いられており、両者ともその需要が高まると共に重要性も高まっている。これらのめっきでは、めっき時間と共にめっき浴組成が変化し、その組成により機械的性質などの物性まで変わるため、きめ細かな浴管理が必要である。このため、めっき浴を構成している金属塩、pH緩衝剤、還元剤、錯化剤、光沢剤など多成分の迅速分析が要求される。分析法としては、吸光光度法、滴定法、ポーラログラフィーなどがあるが、必ずしもこの目的を満足しているとはいえない。

そこで、無機、有機を問わず迅速なイオン分析のできる等速電気泳動法によって、めっき浴中のさまざまな成分の分析への適用性を見いだすため、微量添加物を含めた各成分の分離条件等を検討した。

II. 実験方法

①装置：島津細管式等速電気泳動分析装置 IP-2A, 3A ②泳動管：PTFE製とFEP製をつないだ二電極方式もしくはPTFE製とフューズドシリカ製をつないだ三電極方式 ③検出器：PGD, UVD ④電解液 表1に電気ニッケルめっき浴の成分分析に用いる電解液を例として示す。

5M H₂CO₃

表1 電解液システム

	リーディングイオン	カウンターイオン	ターミナルイオン	分析対象
I	OH ⁻	Ca ²⁺	カブロン酸	Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , 酢酸 スルファミン酸
II	MES ⁻	ジエタノールアミン	β-アラニン	ホウ酸
III	Na ⁺	酢酸 酒石酸	ε-ACA	金属 ビリジンなど
IV	Cl ⁻	ε-ACA	酢酸	ナフタレンスルホン酸 サッカリンなど

(0.3g/L)
 9.2
 3.02g/L
 4.07g/L

2.5g/L 酢酸

III. 分析結果

無電解ニッケルめっき浴中のニッケルを定量した結果をEDTA滴定法と比較して表2に示す。等速電気泳動法による定量結果とEDTAキレート滴定法による結果はよく一致しており、金属分析に適用できることがわかった。

次に、電気ニッケルめっき浴の中で代表的なワット浴に酢酸塩を加えた酢酸ニッケル浴中の酢酸を金属塩を形成している塩化物イオンや硫酸と同時分析した例を図に示す。また、こ

表2 ニッケル定量結果

	(g/L)	
	IP法	滴定法
建浴	7.61	7.67
使用浴	6.73	6.75
廃棄浴	6.97	6.94

のときの酢酸の定量結果を緩衝能を利用した滴定法⁴⁾と比較して表3に示す。ニッケル塩添加時の誤差は両者ともほとんど差がなかった。これに対してナトリウム塩を加えた場合IP法では差がないが滴定法では負に大きな誤差がでた。なお、このときのワット浴組成はニッケル・6水和物 300g/L, 塩化ニッケル・6水和物 50g/L, ホウ酸 20g/Lであった。IP法ではわずかな試料量ですむ上、塩の種類によらず幅広い濃度域において定量できることがわかった。

その他、無電解ニッケルめっき浴中のpH緩衝剤である有機酸はガスクロマトグラフィー質量分析計で確認し、無電解銅めっき浴中の還元剤のホルムアルデヒドはガスクロマトグラフィーで測定した。

次にめっき膜の性質に大きな影響を与える微量添加物や不純物について検討した。表1 IIIの条件でニッケルの1000分の1の濃度のコバルトや亜鉛などの2価金属を検出することができた。

電気ニッケルめっき浴に含まれるワット浴中ナフタレンジスルホン酸やサッカリン、ピリジルスルホン酸などの光沢剤が表1 IVで分析できた。

以上のようにめっき浴のさまざまな成分が分析できたが、無電解の試験浴を作り、温度pH、添加物を変えてめっき試験も行った。その結果、温度、pHだけでなく、銅めっき浴ではアミノ酸の種類によって、めっき速度におおきな差のあることなどもわかった。

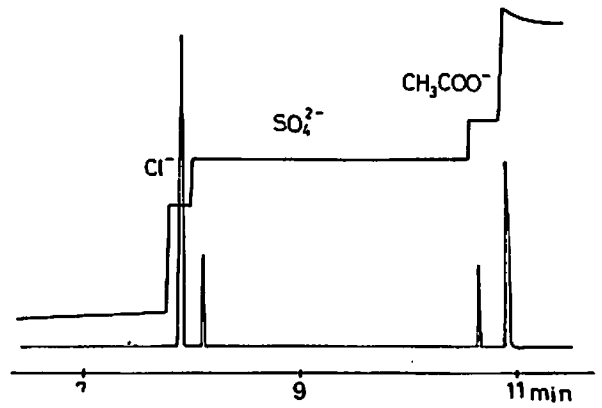
IV. 結論

等速電気泳動法を用いてめっき浴中の各種成分の分析をおこなったが、次のことが明らかになった。

- (1) 金属塩、還元剤ならびにその酸化物、pH緩衝剤、錯化剤などがめっき浴を直接もしくは水で希釈するだけで精度良く短時間に分析できた。
- (2) 電着応力などの電気的性質や硬さなどの機械的性質に影響を与える微量添加物についても測定可能でこれら微量物質についても管理ができ、めっき浴を幅広い面でとらえることができた。

V. 参考文献

- (1) 児嶋佳世子, 八木孝夫, 金属表面技術, 36,104(1985)
- (2) 児嶋佳世子, 八木孝夫, 篠原長政, 金属表面技術, 37,195(1986)
- (3) 児嶋佳世子, 篠原長政, 第35回分析化学会講演要旨集, 745(1986)
- (4) 篠原長政, 水谷泰, 金属表面技術協会第66回講演要旨集, 118(1982)



無電解ニッケルめっき浴主成分の分析例

表3 酢酸定量結果

①酢酸ニッケル添加 (g/L)			
酢酸ニッケル	計算値	IP法	滴定法
0.04M	4.80	4.77	4.82
0.08M	9.61	9.51	9.65
0.16M	19.22	19.27	18.91
0.24M	28.82	28.69	28.42

②酢酸ナトリウム添加 (g/L)			
酢酸ナトリウム	計算値	IP法	滴定法
0.04M	2.40	2.40	2.34
0.08M	4.80	4.82	4.67
0.16M	9.61	9.57	9.22
0.24M	14.41	14.52	13.56

新日本製鉄(株)第一技術研究所
特別基礎第三研究センター

とやまへい
佐藤栄次, 村田朋美

1. 初めに

中性塩溶液環境条件におけるステンレス鋼の応力腐食割れの多くは、材料因子と環境因子の相互作用に基づく局部腐食の生成に支配されている。局部腐食(例えば孔食、隙間腐食、腐食割れ)が生じる場合、腐食の進行している局部と沖合の間の物質移動が起こりにくいことから、局部的な金属の溶出部の溶液組成は極度に変化し、金属イオン、塩化物イオンの濃縮、および金属イオンの加水分解によるpH低下が生じることが知られている。¹⁾²⁾ 小川³⁾久松⁴⁾小野山⁵⁾は溶出金属イオンの錯イオンとそれらに配位する水分子によるpH低下を説明している。また、Cl濃縮条件について物質移動に着目した計算から電気的中性条件からの説明がなされている。⁶⁾ いずれも局部腐食により濃縮されて塩化物濃度は、8~12規定と高く、Cl⁻がフリーClとしてではなく、金属イオンや水を含む錯体イオンとして存在するものと考えられている。³⁾⁴⁾⁵⁾ これらの存在比や形態についての実験的な報告は少ない。水流らはモデルセルを用いて、セル内の溶出金属イオンの流束を泳動のみに依存するとして化学分析による解析を行い、錯イオンの存在状態についての提案を行っている。⁷⁾ 本報告では孔食等の局部液性解析(錯体イオンの存在比や形態等)の実証的な解析手段として細管式等速電気泳動法によるアノーライト液解析を試みた結果について報告する。

2. 実験方法

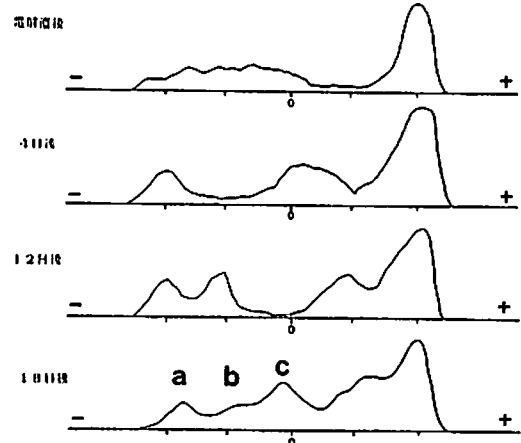
2. 1. 装置: 等速電気泳動装置(島津IP-2A型)を用い、泳動電流 250μA (10min) - 100μA で、温度25℃一定条件で行った。また、一部高圧濾紙電気泳動法による分析も合わせて行った。
2. 2. 試薬: ステンレス鋼の合金成分のうち主要な錯体形成元素は、Crイオンであることからクロム系の錯体形成物質を標準試薬に用いた。特級K₂Cr₂(SO₄)₄・Cr₂(SO₄)₃、およびCrCl₃の1モル溶液を用いた。リーチング液には、0.01MCH₃COOH、CH₃COOH (pH=5.1)、ターミナル液には、0.01M Carnitine・Clを用いた。
2. 3. 試験液: 0.5モルクロム酸液の電解還元により得た3価Cr、及びSUS304鋼を3%NaCl中、+300mV×15min 保定により求めたアノーライト液を用いた。

3. 実験結果

3. 1. 高圧濾紙電気泳動法によるアノーライト液解析

クロム酸電解処理において浴中にアニオン添加することによりCr³⁺と添加アニオンが錯体イオンを形成することが知られ、これが鋼表面でのクロメート、さらに金属クロム析出に役立つものと考えられている。定電流陰極分極曲線の第2枝の電位範囲ではCr⁶⁺-Cr³⁺の反応が著しく進み、ペネレートしうる陰イオン(SO₄²⁻、SeO₄²⁻など)が存在すると、Cr³⁺-SO₄²⁻またはSeO₄²⁻錯体イオンを形成する。さらに生成されたCr³⁺の電極表面でのolation が進行する。この液の濾紙泳動法によって分離解析を試みた結果を図-1に示した。

K₂Cr₂(SO₄)₄の標準試料との対応から、
a: [Cr(OH)₂(SO₄)₂]²⁺
b: [Cr₂(OH)₂(SO₄)₂]²⁺
c: [Cr₂(OH)(SO₄)₂]⁺と考えられる。
このクロム酸電解液は時効により、刻々と変化する事が追跡された。この変化過程から液中イオンの存在状態も追跡する事が可能と思われる。しかし、SUS304鋼の3%NaCl液中



泳動条件: 0.025MKNO₃-0.025MHNO₃(1:1)
濾紙: WHATMAN (NO. 1), 5mmw
電圧: DC400V、電流: <5mA
時間: 1時間
発色条件: 10%NaOH噴霧後5%H₂O₂で発色

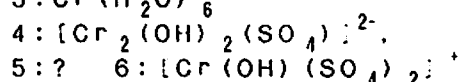
図1 クロム酸電解液のろ紙泳動法による泳動結果

試料: 0.5M CrO₃+SO₄(0.01M)
定常分極曲線第2枝の電位で還元を行った

での電解液（以下アノーライトという）の場合、図2に示したようにに Cr^{3+} クロム酸錯体と比べて、分離能が悪く、プロファイルはブロードとなる。ろ紙泳動法の場合錯体間の分離能が悪く、定量化が難しいと思われる。この欠点を補完するものとして細管式等速電気泳動法による解析を試みた。

3. 2細管式等速電気泳動法によるクロム酸錯体の分離解析の試み

図3は細管式等速電気泳動法による標準試薬、及びSUS304鋼の電解液の泳動プロファイルを示す。ろ紙泳動法との対応を考えると、 $K_2Cr_2(SO_4)_3$ の場合、3、4、5はそれぞれ



に対応し、 $CrCl_3$ の場合には

$Cr(H_2O)_6^{3+}$, $[CrCl(H_2O)_5]^{3+}$, および $[CrCl_2(H_2O)_3]^{2-}$ の水和異性体を生成する事が知られており、それぞれ前記3、4及び5に対応すると考えられる。

SUS304鋼の3%NaCl中電解液（アノーライト液）の泳動結果はろ紙泳動法の場合と異なり明確な分離ピークが現れてくる。SUS304鋼の場合、Fe, Cr, Niを含んでおり、標準試薬の組成と異なる為、単純には対応関係を明確に出来ないが、3、4及び5は明らかに標準サンプルと同種のものと考えられる。そのほかのピークについては分取により組成分析をあわせ行う事により同定可能と考えられるが今後の課題であろう。

5. まとめ

孔食、隙間腐食等の局部被食性解析、特に溶出金属イオンや塩化物イオンの存在比や形態などの実証的解析法の1つとしてアノーライト液の解析を試みた。その結果、ろ紙泳動法と比べて錯体イオンの分離能の優れた細管式等速電気泳動法が有効である事を示した。

文献:

- 1) C. T. Fujii: Localized corrosion, (1974) P144 [NACE]
- 2) T. Suzuki et al: Corrosion, 29(1973) P18
- 3) 小川: 鉄と鋼, 63(1977) p605, および66(1980) p1385
- 4) 久松: 鉄鋼基礎共同研究報告書, 鉄鋼の応力腐食割れ, 昭和55年5月, p44
- 5) 小野山: 防食技術, 28(1979) p532
- 6) J. R. Galvele: Corrosion Science, 21(1981) p551
- 7) 水波: Proc. of US-Japan seminar(1979) 日光

図3 細管式等速電気泳動法による標準試薬、およびSUS304鋼電解液の泳動結果

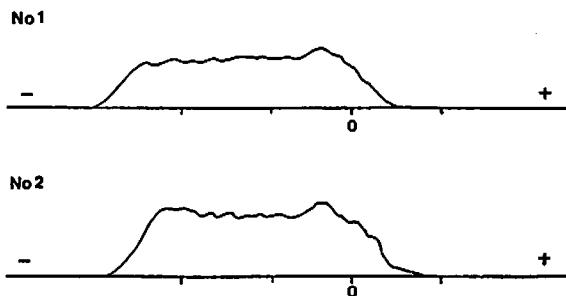
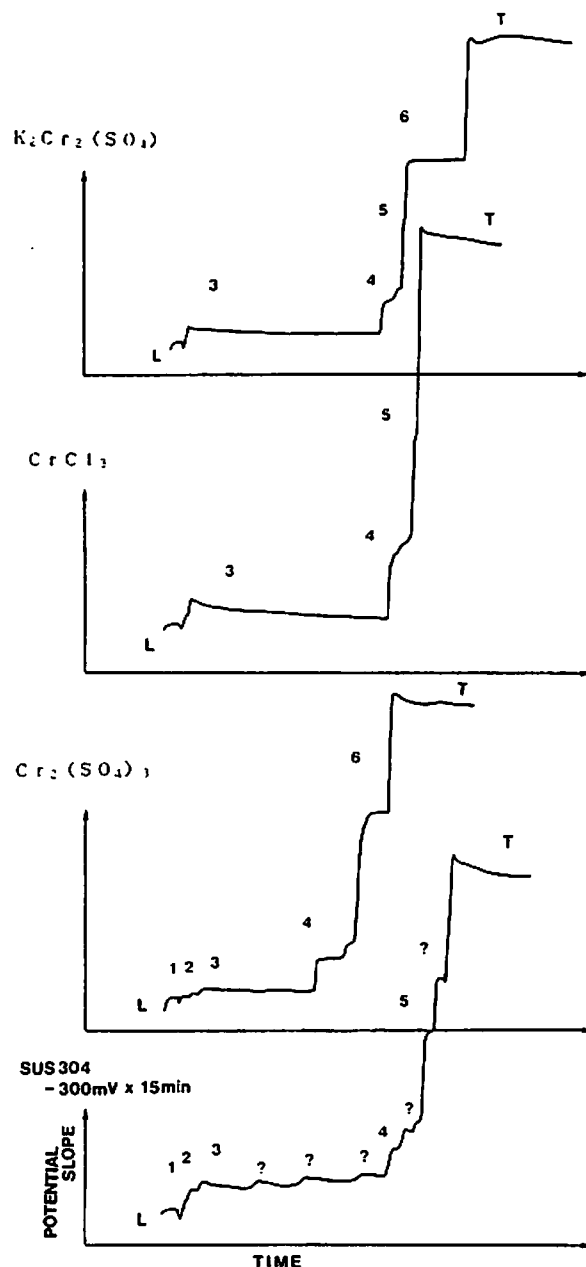


図2 ろ紙泳動法によるSUS304鋼アノーライト液の泳動結果



(大阪府工技研) 藤本 暢浩

1. 染料関連物質にはスルホン基やカルボキシル基などの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前処理に煩雑な操作を要する。演者は先に^{1,2)}、染料合成中間体である置換ベンゼンスルホン酸類の位置異性体の分離分析にIP法を応用し、無電荷配位子の一つであるシクロデキストリン(CD)を添加して包接化合物を形成させことにより、 α 、 β 位置異性体が簡便に精度よく分析できることを報告した。今回引き続いて、ナフトレンスルホン酸やナフトールスルホン酸類の位置異性体の分離におよぼすCDの添加効果について検討した。また、ナフトールあるいはナフトールスルホン酸をカップリング成分とするアゾ系酸性染料のIP分析条件、CD添加によるPU値におよぼす影響などについて検討した。

2. 装置は島津細管式等速電気泳動装置IP-2A型を用い、泳動管にはPTFE製の長さ4cm(内径1.0mm)のもの、FEP製の15cm(内径0.5mm)のものとを連結して用いた。実験に用いた芳香族スルホン酸類は試薬特級品であり、また染料類は合成品あるいは市販品である。なお、電解液は表1に示した組み合わせのものを使用した。

3. 1-および2-ナフトレンスルホン酸のPU値は電解液I~IIIのいずれの条件下でもほぼ同一の値を示し、これら混合物の分離は困難であった。しかし、電解液IIIのリードイング液中に β -CDを1~4mM濃度に加え、それぞれの場合のPU値変化を調べるところ、1-異性体では殆ど変化が認められなかったのに対し、2-異性体ではホスト-ゲスト相互作用を受けて顕著に変化し、 β -CDの濃度が増加するにつれてPU値も大きくなり混合物の分離が可能となった(図1)。

ナフトレンスルホン化物では、2, 6-あるいは2, 7-ジスルホン酸イオンが β -CDの影響を受けてPU値が大きくなるが、1, 5-体の場合には β -CDの添加量を増加してもPU値は変わらなかった(図2)。すなわち、スルホン基がナフトレン骨格の β -位のみにある化合物は、包接化合物を形成し易くPU値に変化が現われるが、スルホン基の1個あるいは2個とも α -位に結合した化合物では立体特異的に包接化合物を形成し難いことが、これら異性体のIP分析に有効に作用しているものと思われる。

Table 1 電解液の組合せ

	Leading electrolyte	Terminating electrolyte
I	0.01M HCl, β -Alanine PVA, pH 3.6	0.01M n-Caproic acid, pH 3.2
II	0.01M HCl, β -Alanine 0.2% Triton X-100 pH 3.6	0.01M n-Caproic acid, pH 3.2
III	0.01M HCl, β -Alanine 0.01% Triton X-100 pH 3.6	0.01M n-Caproic acid, pH 3.2
IV	0.01M HCl, 0.05M β -Alanine, 50% CH ₃ OH pH 5.0	0.01M n-Caproic acid, 50% CH ₃ OH pH 4.2
V	0.01M HCl, 0.02% Triton X-100, Amediol pH 9.0	0.01% β -Alanine Ba(OH) ₂ pH 10.9

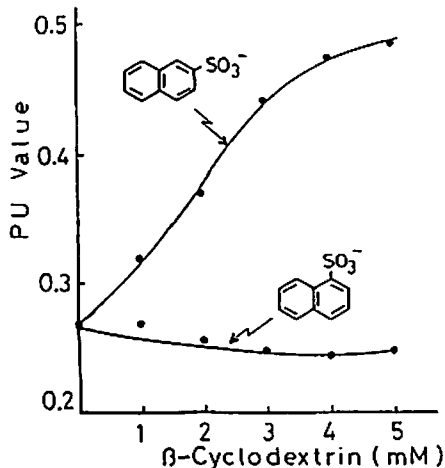


Fig.1 Influences of β -cyclodextrin on the PU values of 1- and 2-naphthalenesulfonic acids

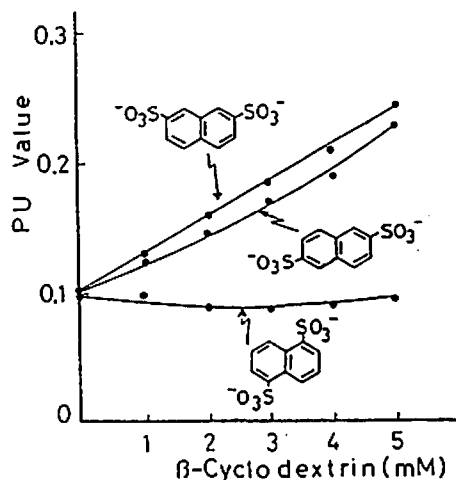


Fig.2 Effect of β -cyclodextrin on the separation of some isomers of naphthalenedisulfonic acid

同様の挙動は、ナフトールスルホン酸類においても認められ、1-ナフトール-4-スルホン酸イオンでは β -CDの影響を受けないが、2-ナフトール-6-スルホン酸イオンの場合には β -CDの4 mM量の添加によってPU値が0.294から0.463と大きくなり、両者の分離が可能であった。

また、内径の大きさが異なる α -あるいは γ -CDをリーディング液中に4 mM量加え、 β -CDの場合と比較したところ、内径の小さい α -CDの添加ではいずれの場合も殆ど変化を示さなかった。一方、内径の大きい γ -CDを添加した場合には各異性体のPU値差がやや大きくなり異性体分離に寄与するが、本目的のためには β -CDの方が有利であった。

つぎに、1-または2-ナフトール類をカップリング成分とする2、3のアゾ染料をモデル化合物としてそのIP挙動を調べたところ、例えばAcid Orange 20(染料1)をI~Vの電解液を用いて分析したときのPU値はそれぞれ0.461、0.205、0.422および0.238で、電解液IIのほか50%メタノールを含むIVやアルカリ性電解液Vの条件下でも精度よく検出できた。このような単一の染料系では他の染料の場合も同様に検出できる。しかし、これら染料の混合試料については、染料(1)と(2)、(3)と(5)のPU値差が小さく分離することが難しかった。ところが、この混合染料系試料に β -CDを添加するとそれぞれのPU値に差が生じ、特に(1)と(2)では β -CDの添加によってかなりの差がみられ、十分に分離することができた(図3)。 γ -CDを共存させた場合にも分離度向上効果がみられた。包接化合物の構造についてはなお検討を要するが、CDの添加がこれらアゾ系染料の分離にも有効であることがわかった。

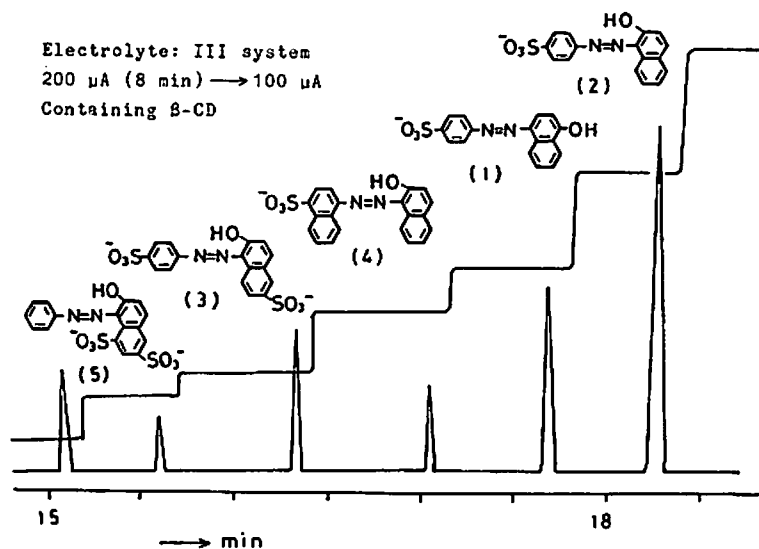


Fig.3 Isotachopherogram for a mixed sample of some azo-dyes

1) 蔵本暢浩、浅尾勝也、第5回等速電気泳動シンポジウム、要旨集 p. 17 (1985)

2) 同、大阪府立工業技術研究所報告、No. 88. 18 (1986)

PU
値

— 27 図の分離度
が下がった

pH

12 キャピラリー電気泳動法による分離分析(5):

ポリアミンについて

(名工大・I) ○津田孝雄・小林泰文

Capillary zone electrophoresis 5: Polyamines in
human fluids Takao TSUDA and Yasufumi KOBAYASHI:
Nagoya Institute of Technology

1. はじめに

腫瘍マーカーはCEA, α フェトプロテイン, フェリチンなど多くのものが実用化されている。しかしながら, 目下の段階では完璧なマーカーはなく, それぞれの特色を生かし, 目的に応じて組合せて用いられているのが実情である。

ポリアミンは特定のガンに高値を示す特異性はないものの, あらゆる種類のガンで高値を示し, 適用範囲が広く, スクリーニング等にも応用しやすい。早期癌には陽性率は低い, stageの進行とともに高値を示し, 増殖度の強いものに高値を示す傾向があるとされている。また, 手術切除された癌患者尿のポリアミンは低値を示し, 化学療法の影響例では癌細胞の壊死により一時的に尿中へ多量に排泄されることにより効果判定の応用が考えられている。このようにポリアミンは診断, 経過観察, 治療の効果判定, 再発の予知等に広く応用が出来ると考えられる。測定法として実用上最も重要なことは, 測定が容易な事, 短時間で行なえること, 多検体処理できることである。

最近, 酵素法が開発され臨床応用されている。しかしながら, 診断能向上のため最近注目されているアセチル結合体の分画測定は酵素法では出来ない。この面では精度よく測定出来るHPLC法が一般的である。HPLC法では測定時間が比較的長いことが欠点である。

高電圧キャピラリー電気泳動法は研究途上にあるが, その原理が簡単であり迅速分離定量ができる可能性もある。

2. 第5回本シンポジウムではポリアミンのキャピラリー電気泳動による分離を報告したが, その際検出器PGDを用いた。今回はキャピラリー電気泳動の蛍光検出, ホストカラム反応後による蛍光検出について検討した。対称試料としてポリアミンについて行なった。

キャピラリー電気泳動について蛍光検出法としてレーザー, Xeアーフ光源を用いたオンカラム検出法についてはJorgensonらの報告がこれであるが, これらはキャピラリー電気泳動用に特別な検出器を工夫して用いている。

本実験では市販の液体クロマトグラフィ用検出器をそのまま用いて検出した。流路構成をFig. 1に示す。

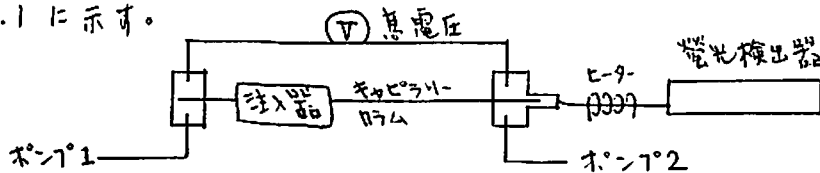


Fig. 1 流路図

注入器の構造については Fig. 2 に示した。ポンプ1を用い 電気泳動を行なっているときも低流速での送液を行ないうる。ポンプでは 反応試薬、又は ミクサー用の送液を行なった。加熱は必要に応じて加えた。

3. プレカラム反応試薬として DNS-Cl, Fluorescamine を用い、ポストカラム反応試薬として OPA を用いた。蛍光検出に用いた波長は DNS-Cl (EX 345nm, EM 520nm), OPA (EX 340nm, EM 455nm), Fluorescamine (EM 390nm, EX 475nm) である。

DNS-Cl, Fluorescamine のプレカラム反応試薬としては DNS-Cl の方が検出感度が高い。ポストカラム反応試薬の OPA を用いて蛍光検出を行なった場合と、通常の HPLC の蛍光検出との 絶対感度を比較すれば、流量条件等は異なるが ほぼ同一であった。

しかしながら HPLC に比較して 試料注入量が10分の1以下少ないので、この点が以前として問題である。

Fig. 3 に DNS-Cl 誘導体のアトレッシンとスバルミジンの分離例を示した。

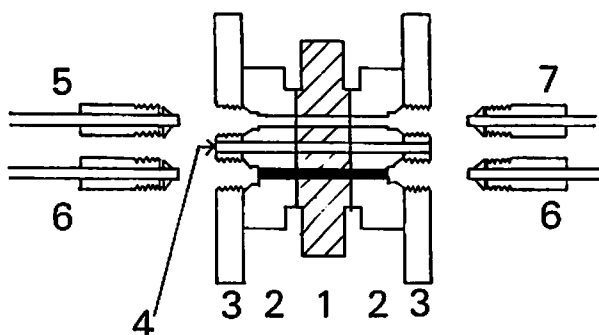


Fig. 2



Fig. 3

13 キャピラリー電気泳動用試料注入装置の試作

(近畿大学) ○ 本田進、岩瀬重文、藤原茂

《 緒言 》

キャピラリー高圧電気泳動は電気泳動の一つの方式であり、ろ紙やポリアクリルアミドゲルを担体とする電気泳動が泳動と同時に発生する電気浸透流を抑えようとしているのに対し、逆に分離されたイオンに対するdriving forceとしてこれを積極的に利用しようとする方式である。この方式はEveraertら(Eindhoven Univ. Technol. ref., e.g.1), Jorgensonら(Univ. North Carolina, ref., e.g.2), 津田ら(名工大 ref., e.g.3), 寺部ら(京大工 ref., e.g.4) Lauerら(Hewlett Packard Lab., ref., 5)および本田ら(近畿大 業 ref., e.g.6)によって検討され、極めて高い分離能をもつ分離分析法に発展しつつある。しかも寺部らの研究(4,7)により、界面活性剤を含む系を用いて動的状態における疎水性相互作用を利用すれば、イオンばかりでなく中性分子も容易に分離できることが明らかになり、その適用範囲が広がりつつある。しかし、この方式による分析においては装置の自動化が進まず、このため信頼できる定量性が得られなかった。装置の自動化に關して最も困難な問題は超微量(100 nl以下)の試料溶液を再現性よくキャピラリーに注入する問題である。そこで演者らはこの問題の解決のため種々の検討を行った結果、実用的に使用できる自動注入装置を試作することができた。

《 装置の概要 》

キャピラリーに超微量の試料溶液を注入する方法としては次の四つの方法が考えられる。

- (1) バルブの切り換えによる方法
- (2) 電気浸透流を利用する方法
- (3) スプリット方式による方法
- (4) 落差を利用する方法

しかし、試料の注入はキャピラリー液体クロマトグラフィーの場合と違って数万ボルト-数十万ボルトの高電圧からの絶縁化に行わなければならないという条件があるため、

(1) - (3) はそれぞれの難点を含んでおり、(4) が最も実現し易いという結論に達した。

(4) の落差を利用する方法については、キャピラリーの両端の高さに差をつける手法としてキャピラリーの一端を自動的に上下お

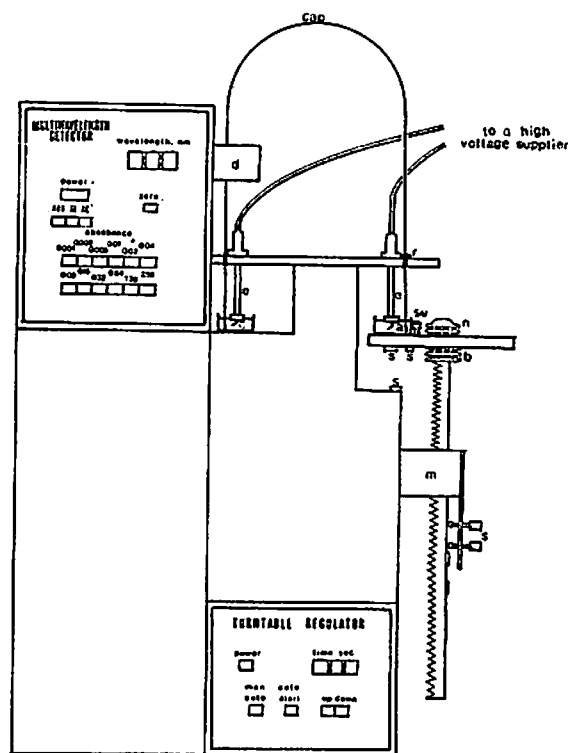


Fig. 1. Automatic sampler based on downhill flow. a, anode; b, ball bearing; c, cathode; cap, capillary tube; d, detector; e, electrode; m, motor; n, nut; s, switch; sv, sample vial.

よび左右運動させる手法と電極液および試料溶液を上下および左右運動させる手法が考えられるか、今回はより安定した成績を与える後者の手法を具体化したものについて述べる。Fig.1はその装置の前面を図解したものである。陰極側の電極槽は終止同一レベルにあるが、陽極側の電極槽はターンテーブル上に設置されているため、タイマーとマイクロスイッチの動きにより次の運動を繰り返す。

1 2 3 4 5 6
 下降 → 回転 → 上昇 → 下降 → 回転 → 上昇

2および5の行程で電極槽と試料容器が互いに置き換えられるので、3の行程で陽極槽と並んでターンテーブル上にある試料溶液と陰極液の間に落差を生ずることになる。この落差により試料が陽極側のキャピラリー先端から注入される。試料注入時間は可変である。

《装置の性能》

本装置を使ってモデル試料(benzylalcohol)を溶解シリカ毛細管に注入し、254 nmにおける紫外吸収を測定した。ピーク高さの変動係数はTable 1に示すように極めて小さく、用手法について得られた対応値の約1/5程度であった。この試料は中性であるから陽極から検出器まで電気浸透流により移動したことになるが、その間の拡散に伴って起こるピーク高さのハラツキもこれらの値に含まれる。従って試料注入のみに関する変動係数はさらに小さいものと推定される。

このように、本装置は極めて再現性もよく試料を自動注入できるため、キャピラリー高圧電気泳動の定量性を保証することができ、この方式による分離分析の実用化に極めて有効であると考えられる。

本講演においては、本装置を用いた若干の分析例を示す。

Table 1 Reproducibility of sample introduction

Sampling time (sec)	Coefficient of variation (%) of peak height (n=12)		Capillary: fused silica, 80 cm x 0.25 mm i.d. Carrier: 0.01 M Na ₂ HPO ₄ Applied current: 125 μA Voltage: 11 KV Sample: 0.1 M benzylalcohol Detection: UV 254 nm
	Automatic sampler	Manual operation	
1	2.4	6.5	
5	0.84	4.4	

《文献》

- 1 Mikkers, F. E. O.: Everaerts, F. M.: Verheggen, Th. P. E. M. J. Chromatogr., 1979, 169, 1-10.
- 2 Jorgenson, J. W.: Lukacs, D. D. Anal. Chem., 1981, 53, 1298-1302.
- 3 Tsuda, T.: Nomura, K.: Nakagawa, G. J. Chromatogr., 1982, 264, 385-392.
- 4 Terabe, S.: Otsuka, K.: Ichikawa, K.: Tsuchiya, A.: Ando, T. Anal. Chem., 1984, 56, 111-113.
- 5 Lauer, H. H.: McManigill, D. Anal. Chem., 1986, 58, 166-170.
- 6 Fujiwara, S.: Honda, S. Anal. Chem., 1986, 58, 1811-1814.
- 7 Terabe, S.: Otsuka, K.: Ando, T. Anal. Chem., 1985, 57, 834-841.

14 ミセル溶液を用いる 界面動電クロマトグラフィー

おおつか こうじ てらべ しげる あんどうていいち
(京大工) ○大塚 浩二・寺部 茂・安藤 貞一

1. 緒言

ミセル溶液を用いる界面動電クロマトグラフィー (Electrokinetic Chromatography) は、中空毛细管内にイオン性界面活性剤のミセル溶液を満たし、ミセル可溶化現象による溶質のミセル-水相間への分配と毛细管ゾーン電気泳動の手法とを組み合わせた新しい型の液体クロマトグラフィーである。我々はこれまで、本手法の基礎的性質 [1,2] といくつかの応用例 [3-5] について報告し、本手法が高性能分離分析法として有用であることを明らかにしてきた。ここでは、主として、本法における定量性および再現性 [6] についてさらに検討した結果を述べる。

2. 実験

界面活性剤には硫酸ドデシルナトリウムを用い、リン酸塩-ホウ酸塩緩衝液 (pH 7.0) に 0.10M 濃度に溶解してミセル溶液とした。高電圧直流電源には島津等速電気泳動分析装置 IP-2A の電源部を、データ処理装置には同クロマトバック C-R3A を使用し、実験は 50 μ A の定電流条件で 35°C に設定した空気恒温槽内で行った。

定量性の検討は、内部標準法 [6] で行った。試料には、Table に示すように 5 種類のクロロフェノールを、また内部標準物質としてフェノールを用い、メタノール溶液として注入した。定量性の検討に際しては、各試料物質のフェノールに対する相対濃度と、相対ピーク面積および相対ピーク高さとの関係を調べた。合わせて、各試料の保持時間の再現性について検討した。

他の装置・実験方法については、既に報告したものの [1] と同じである。

3. 結果・考察

用いた試料のクロマトグラムの一例を、Fig.1 に示す。ここで、Yellow OB (No.7) はミセルのトレーサー [4] であり、その保持時間はミセルの溶離時間 t_{mc} を表している。

相対ピーク面積 (A_r) を相対濃度 (c_r) に対してプロットしたものを、Fig.2 に示す。このように、 c_r がおよそ 4 桁の範囲にわたって、いずれの試料についてもほぼ傾き 1 の直線が得られた。ここで、 $c_r=1$ に対応する濃度は、6.5mg/ml である。また、 c_r と相対ピーク高さ (H_r) の間にも同様の関係が得られたが、その直線性には差が認められた。Table には、これら両プロットについての相関係数 (r) を示した。それらの値から、直線性は c_r-A_r プロットの方が良い

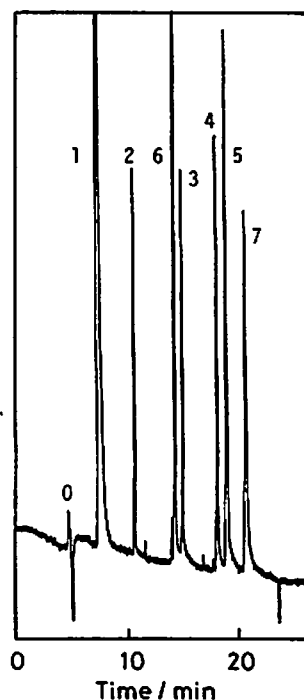


Fig. 1. Electrokinetic chromatogram of some test solutes. Conditions are given in Table.

ことが分かり、本系における定量操作では、ピーク面積を利用することがより望ましいと言える。

一方、逆に、濃度既知の2,5-ジクロロフェノールを試料として Fig.2 の検量線を用いてその相対ピーク面積から試料中の濃度を求めたところ、相対誤差1.5%程度の正確さで定量可能であることが明らかとなった。

さらに、Table には、メタノールおよびフェノールと各溶質の保持時間の再現性に関するデータとして、平均値 (AV)・標準偏差 (SD)・変動係数 (CV) を合わせて記載した。ここで、メタノールはミセルには全く可溶化されず [2]、その溶離時間は保持されない物質の溶離時間 t_0 を表している。このように、SD値は保持時間が長くなるにつれて大きくなる傾向が認められるが、CV値は t_0 については0.3%、また他の試料についても保持時間にはよらず0.6~1.1%程度であり、従来の高速液体クロマトグラフィーと比較しても十分満足できる結果であると言える。

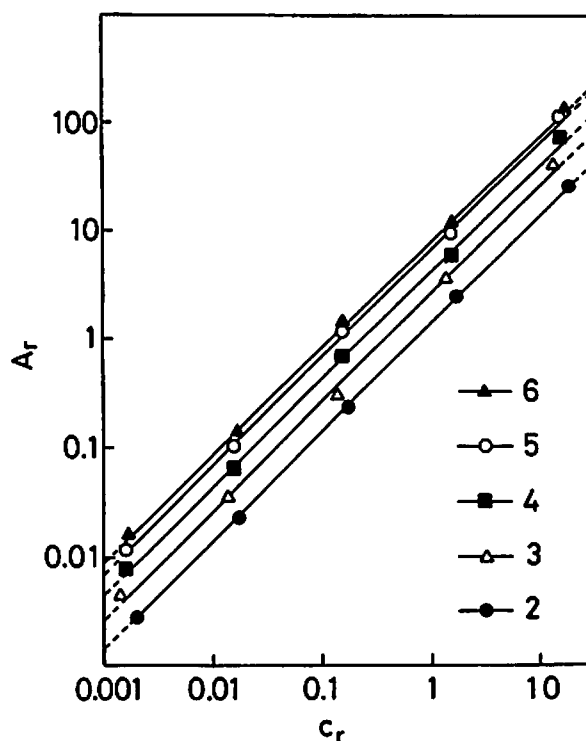


Fig. 2. Dependence of relative peak area (A_r) on relative concentration (C_r).

Table. Correlation Factors and Retention Data of Test Solutes

Peak Number Solute	1	2	3	4	5	6	0	7
	Phenol	Chlorinated Phenols					Methanol	Yellow OB
		2-	2,5-	2,4,5-	2,3,4,5-	Penta-		
$r (C_r - A_r)$	--	0.9996	0.9983	0.9991	0.9992	0.9995	--	--
$r (C_r - H_r)$	--	0.9956	0.9958	0.9982	0.9982	0.9963	--	--
Retention Time							(t_0)	(t_{mc})
AV / min	7.44	10.65	14.98	18.08	18.94	14.37	4.84	20.55
SD / min	0.080	0.101	0.139	0.171	0.162	0.091	0.015	0.237
CV / %	1.080	0.950	0.925	0.945	0.855	0.633	0.314	1.150

0.10 M SDS, pH 7.0; 0.05 mm i.d. x 500 mm; 220 nm; 35 °C; 50 μ A.

- [1] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando: Anal. Chem., **56**, 111 (1984).
- [2] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando: *ibid.*, **57**, 834 (1985).
- [3] K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando: J. Chromatogr., **332**, 219 (1985).
- [4] K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando: *ibid.*, **348**, 39 (1985).
- [5] 大塚、寺部、安藤: 日本化学会誌, 950 (1986).
- [6] 大塚、寺部、安藤: 日本化学会第50春季年会, 4L37, (1985).

共立女子大学
お茶の水女子大学

○ 津田 淑江
福場 博保

アスコルビン酸(AsA)は、ごく微量の金属、ことに銅イオンなどで容易に酸化され、デヒドロアスコルビン酸(DHA)、ジケトグルロン酸(DKG)を形成していく。そこで各種酸化触媒を用いてAsAを酸化させた際のアスコルビン酸生成物を等速電気泳動法を用いて分離定性する試みを行った。

銅イオンとしては硫酸銅を用い、硫酸銅とAsAの等モル混合液を作成し、混合直後および一定時間後、混合液を泳動装置に注入し、リーディング液としてN/100 HCl-β-アラニン(pH 3.8)を、またターミナル液としてn-カプロン酸を用い泳動した結果、RE値 5.89のAsAの他に分解物としてRE = 3.18, 2.05, 1.56の酸化物が泳動分離されてきた。また混合後の時間経過とともにFig. 1に示すような傾向を示し、RE=5.89のAsAによるゾーンは小さくなり、逆にRE=3.18, 2.05および1.56の部分は増加していった。ことにRE=3.18のゾーンの増加は著しく増大した。これらの分解物をpH 3.00, 3.60, 4.08, 6.00, 7.50において泳動させたところ Table 1のようなRE値の変化を見た。この中のNo. 1はAsA No. 2はDKGと思われた。しかし 2.05および 1.56のいずれがDHAであるか特定は出来なかった。

DHAによるゾーンを見る目的で、AsA溶液にインドフェノール溶液を滴下し、AsAの完全酸化に至る途中段階で酸化を停止しこの液を本泳動装置に注入し、泳動を行った。

Table 1
Changes of R_E Values of Compounds obtained by
 Cu^{++} Oxidation of Ascorbic Acid with pH_L

pH _L Zone No.	3.00	3.60	4.08	6.00	7.50
No. 1	8.66	5.89	4.43	3.15	3.09
No. 2	3.30	3.18	2.50	2.49	1.66
No. 3	2.82	2.05	1.96	1.21	1.32
No. 4	1.72	1.56	1.39	1.31	1.32

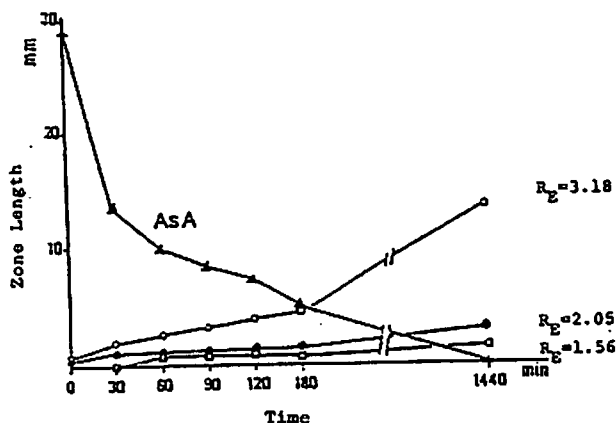


Fig. 1
Time Course of AsA Oxidation by Cu^{++}

この場合も、AsA は時間の経過に伴って減少しDKGは増加の傾向を示した。しかし24時間後にはAsA は完全に消失しているにも拘らず、他の酸化生成物量を合計してもその量は、もとのAsA 全量の1/3程度であった。その差は酸化によって生成したDHA 量であると思われる。しだいに増加するDKG はDHA が時間経過とともに開環していったものと考えられるが同条件においてもDHA と思われるゾーンは現れず、本法によってはDHA の定量は不可能であることを暗示する結果と言えよう。

等速電気泳動法のコンピューター シミュレーションは既知の物理化学的数値(Mo、pKa)を利用して有機、無機イオンの最適分離条件を捜すために用いられている。一方、試料中の未知の物質を同定する場合、泳動したイソタコフログラムのRE値から、物質名、Mo、pKa のいずれかを推定することが出来る。そこでAsA の銅イオン、インドフェノールなどでの酸化液を泳動した場合に現われた物質の推定とそのMoやpKa をコンピューターを用いて予測を行った。Table 1のRE-pHLの関係より、pHL 3.60の条件下でRE値1.56を示す物質(No.4)はシュウ酸のゾーンと推定された。DKG'は酸性溶液中での脱炭酸によるキシロン酸やリキソン酸の形成及びシュウ酸、スレオン酸への分解が報告されている。上記のように銅イオン酸化生成物にシュウ酸の存在が認められたことからAsA はDKG よりさらに分解されているものと思われた。

そこでキシロン酸、リキソン酸およびスレオン酸をL-キシロース、L-リキソースおよびAsA より調製し、それらをpHL 3.00、3.60、6.00、7.75、9.40のリーディング液を用い泳動させた時のRE値はTable 2のようであった。AsA を各種酸化法によって酸化した場合、未知物質によるゾーンとしてRE=2.05、1.56のものが得られていたが、RE=1.56のものはシュウ酸であり、また2.05のものはスレオン酸と推定できる。これらのRE-pHLの関係からAsA 酸化生成物のMoとpKaを予測した結果はTable 3に示すようであった。

Table 2
Changes of R_E Values of Br-Oxidation Compounds of Ascorbic Acid and related Compounds with pH_L

Terminal ion Leading pH	n-Caproic Acid			MES		β -Alanine
	3.00	3.60	4.08	6.00	7.50	9.40
Sample						
DKG	3.38	3.10	2.83	2.46	2.10	---
AsA	6.66	5.89	4.33	3.15	3.09	3.02
L-Xyonic Acid	5.26	4.00	3.54	2.80	----	----
L-Lyxonic Acid	5.20	3.89	3.46	2.70	----	----
L-Threonic Acid	2.88	1.87	1.91	1.51	----	----
Oxalic Acid	1.77	1.53	1.39	1.29	----	----

Counter ion : pH 3.00 (Glycylglycine)
pH 3.60 (β -Alanine)
pH 4.08 (β -Alanine)
pH 6.00 (Histidine)
pH 7.50 (Imidazol)
pH 9.40 (Ethanolamine).

Table 3
Computer Simulated Values of Mo and pKa of Ascorbic Acid and its Oxidized Compounds

Compound	Mo	pKa
ASA	1	26.61
	2	5.20
DKG		26.79
L-Lyxonic Acid		26.82
L-Xyonic Acid		26.23
L-Threonic Acid		26.60
Oxalic Acid	1	42.40
	2	77.00

16 等速電気泳動法によるアスコルビン酸及びその関連化合物の分析

(徳島文理大・薬) ○香西重忠, 赤田良信

〔目的〕アスコルビン酸(AsA)は、コラーゲン生成への関与、出血傾向の改善やメラニン色素生成の抑制等、その生理作用に関する多くの報告があり、医薬品のみならず化粧品中にもよく処方されている代表的なビタミンの一種である。しかし、その不安定性のため、より安定なAsA誘導体の開発が望まれている。現在、AsAのサルフェート(AsS)やフォスフェート(AsP)が実用化され、化粧品等に配合されている。演者等は、AsA及びその関連化合物の分析法について種々検討しているが、今回、その一環として、細管式等速電気泳動法(IP法)によるAsA、AsS及びAsPの同時定量条件の検討を行なった。

〔実験〕IP条件—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型紫外吸光検出器(254nm)を併用, 泳動管: 1.0mm i.d. X 80mm (PTFE製) + 0.5mm i.d. X 140mm (FEP製), 泳動電流: 300 μ A (8min) \rightarrow 50 μ A, チャート速度: 20~80mm/min, リーディング液: 10mM塩酸(β -アラニンを加えてpHを2.8に調整)-メタール(4:1), ターミナル液: 10mMカプロン酸ナトリウム液。標準品, 試薬及び試料—AsS及びAsPは演者等が合成したものを, また, AsA及び試薬は, いずれも試薬特級品をそのまま使用した。試料は, 市販品を用いた。試料液の調製—液体試料はそのまま, また, 粉末試料は, その一定量に水を加えて, 超音波抽出し, 遠心分離して得られた上澄液をそのまま用いた。また, クリームの場合は, 試料に水及びクロロホルムを加え, 振とう分配後, 遠心分離して得られた水層を試料液とした。

〔結果及び考察〕AsA, AsS, AsP及びAsPの分解により生じることが予想されるリン酸イオンの一斉分析のための条件検討を行なった結果, 10mMカプロン酸ナトリウム液をターミナル液とし, pHを2.8に調整し, 20%メタールを加えた10mM塩酸と β -アラニン系のリーディング液を用いることにより4成分が約30分以内に分離することがわかった(Fig. 1)。

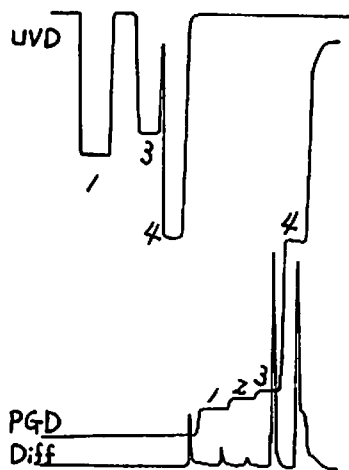


Fig. 1 4種標準品の
1: イソタコフェログラム
2: AsS 3: Na₂HPO₄

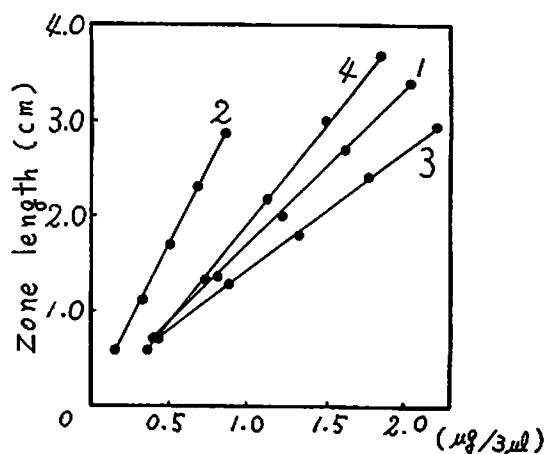


Fig. 2 4種標準品の検量線
3: AsP 4: AsA

また、種々の濃度に調製した標品混合液の一定量を注入し、得られた微分ピーク間の距離をもとにして作成した検量線は、いずれの成分についても相関係数0.999の良好な直線性をもつことがわかった (Fig. 2)。さらに、標品混合液を10回くり返し注入し、その再現性の検討を行ったが、4成分共に、相対標準偏差として約1.5%以内となり、満足のいく結果が得られた。Fig. 3に実試料の分析例を示した。

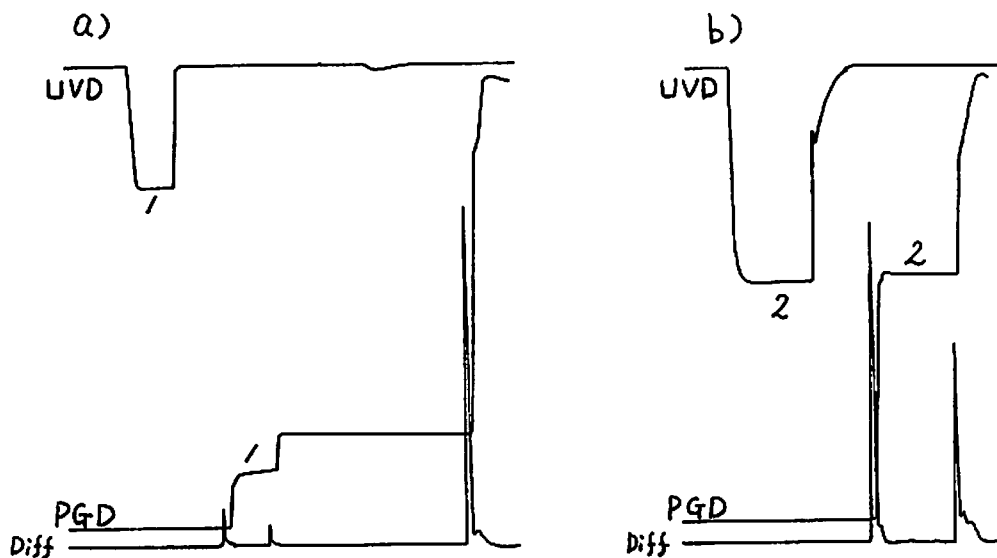


Fig. 3 実試料のイソタコフェログラム

a): 実試料1 b): 実試料2 1: AsP 2: AsA

高知医科大学化学教室

揚田 富子 ○児玉 裕敬

γ -carboxyglutamic acid は Vitamin K 依存性血液凝固因子の中に発見され、このアミノ酸の生合成は Vitamin K を補助因子として glutamic acid から合成されることが明らかになった。血液凝固因子中の γ -carboxyglutamic acid は蛋白質分解酵素等により、free のアミノ酸に分解され、尿中に排泄される。

尿中に排泄された γ -carboxyglutamic acid の定量はイオン交換クロマトグラフィー、比色定量法、高速液体クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーによって行なわれてきた。

我々はこのアミノ酸の定量に細管式等速電気泳動法の応用を試みた。

(方法)

尿 2 ml を弱酸性とした後、Diaion SK-I (H-form) の 5 ml を含むカラムにかけ、30 ml の蒸留水を流す。Diaion SK-I の非結合と水洗部分を一緒にして、減圧乾固し、少量の水に溶解し、Diaion SA (OH-form) のカラムにかけ、水洗し、10% ギ酸の 5 ml で洗ったのち、10% ギ酸の 15 ml で溶出する。

その溶出液を減圧乾固し、その残渣を蒸留水の 1 ml に溶解し、その溶液を 2 つに分け、一方は直接分析を行なった。残渣は塩酸を加えて 3 規定とし、沸騰浴上で 60 分間加水分解し、それを減圧乾固し、0.5 ml の蒸留水に溶解し、細管式等速電気泳動法によって分析を行なった。

イソタコの泳動条件は先行電解液として 0.01 M 塩酸と β -alanine (pH 3.1) を終末電解液として 0.01 M カブロン酸を用いた。泳動電流: 10 μ A chart speed: 10 mm/min であった。

γ -carboxyglutamic acid は Carbiochem-Behring 社製のものを使用した。

(成績)

Fig.1 は合成品の γ -carboxyglutamic acid の検量線を示したものであるが、その結果は非常に良い直線性を示した。Fig.2 は尿中の γ -carboxyglutamic acid の含量とその尿中に加えた γ -carboxyglutamic acid の回収率を調べたものである。尿量に対する γ -carboxyglutamic acid の含量は尿量に比例して増加し、尿中に加えた γ -carboxyglutamic acid の回収曲線も良い直線性を示した。

尿中に加えた γ -carboxyglutamic acid の回収率は 93 - 98% であった。

Fig.3 は合成品の γ -carboxyglutamic acid (A) と γ -carboxyglutamic acid と glutamic acid の混合物 (B) 及び γ -carboxyglutamic acid の加水分解 (C) and (D) の泳動パターンを示しており、 γ -carboxyglutamic acid は 2 規定の塩酸ではほとんど分解を受けず、6N 規定の塩酸で 100 °C、1 時間加水分解すると完全に glutamic acid に分解された。

Fig.4 は尿中 γ -carboxyglutamic acid (A) とその加水分解物 (B) の泳動を示している。

(A) では γ -carboxyglutamic acid のゾーンが検出されるが、そのゾーンは加水分解によって完全に消失しなかった。この事は、 γ -carboxyglutamic acid のゾーンに何か他の物質が重なっていることを示している。

従って尿中 γ -carboxyglutamic acid の定量は加水分解前の γ -carboxyglutamic acid と同じ UP 値をもつゾーンの長さから加水分解後に残るゾーンの長さを差引いた長さを γ -

carboxyglutamic acid として定座した。

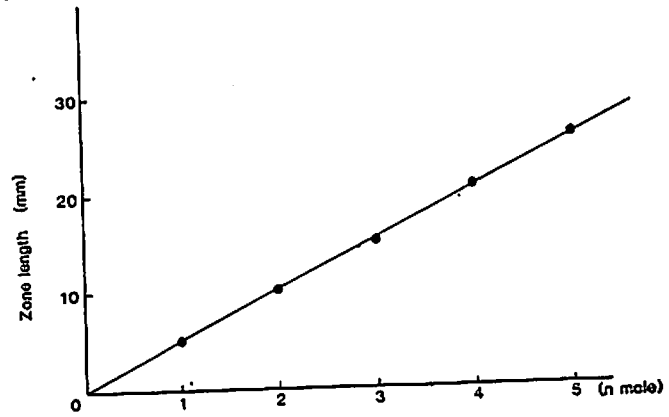


Fig. 1 Standard curve of authentic γ -carboxyglutamic acid. The leading electrolyte was 0.01M HCl titrated with β -alanine to pH3.1. The terminal electrolyte was 0.01M caproic acid. The migration current was 10 μ A. Chart speed was 10mm/min.

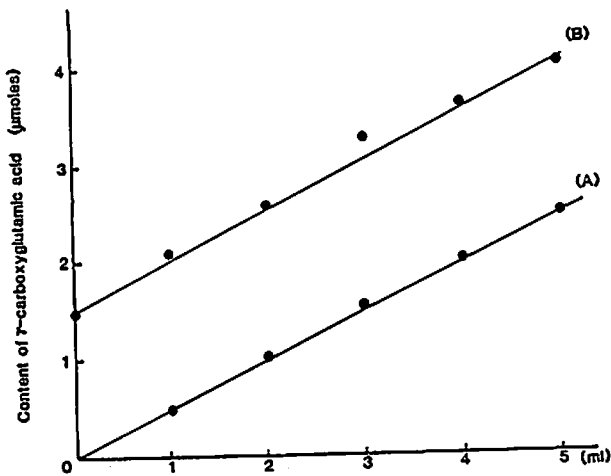


Fig. 2 Isotachopheretic detection of authentic γ -carboxyglutamic acid in the presence of different amounts of concentrated urine. (A), urine (B), (A)+ γ -carboxyglutamic acid.

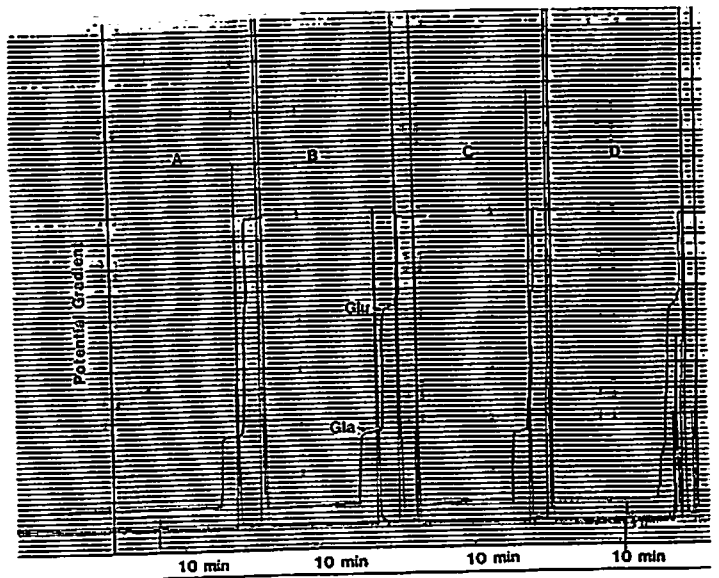


Fig. 3 Isotachopheretic runs of authentic γ -carboxyglutamic acid (A), mixture of γ -carboxyglutamic acid and glutamic acid (B), hydrolysate of γ -carboxyglutamic acid (C): 5min at 60°C in 2NHCl and (D): 30min at 100°C in 8NHCl.

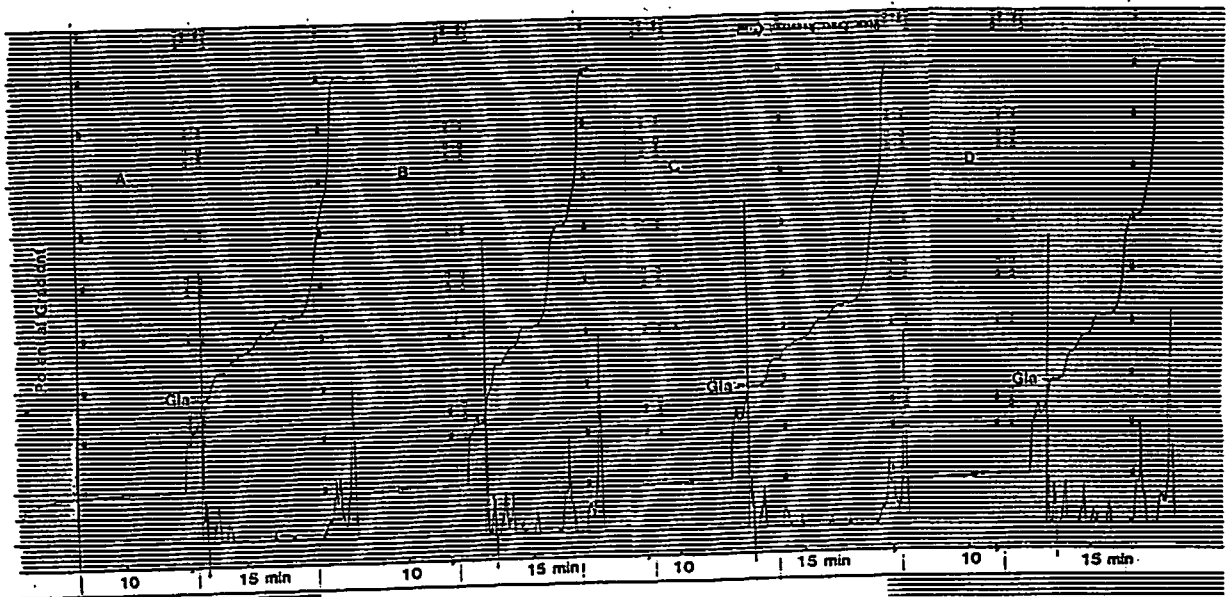


Fig. 4 Isotachopheretic runs of human urine (A), hydrolysate of human urine (B), (A)+ γ -carboxyglutamic acid (C), and (B)+ γ -carboxyglutamic acid (D).

18 実験的シスタチオニン尿症ラットの組織中の cystathionine と N-acetylcystathionine の同時定量。

高知医科大学 化学教室

○ 溝淵 紹子, 寺尾 倫, 児玉 裕 敬

Cystathionine は methionine から L-cysteine を合成する硫黄転移経路の中間代謝産物として重要な物質であり、哺乳動物の脳に遊離のアミノ酸として含まれており、特に小脳に多く含有されていることが報告されている。

Cystathionine は cystathionine γ -lyase により分解されるが、この酵素が欠損すると尿中に多量の cystathionine 及び N-acetylcystathionine が排泄されることが報告され、又最近 cystathionine γ -lyase の自殺基質である D,L-propargylglycine をラット腹腔に投与することにより実験的にシスタチオニン尿症をつくることができ、そのラットの尿中及び組織中に cystathionine と N-acetylcystathionine 検出されている。

Cystathionine の定量はアミノ酸分析器、比色法及び細管式等速電気泳動法で行われていたが N-acetylcystathionine は主としてアミノ酸分析器を利用して来た。そこで我々は cystathionine と N-acetylcystathionine の同時定量を細管式等速電気泳動法を用いて検討した。方法：

1. ラット臓器組織中の cystathionine 及び N-acetylcystathionine の定量

実験動物には体重 200g の雄性 wistar 系ラットを用いた。cystathionine 尿症は D,L-propargylglycine (10, 20, 30 mg) をラット腹腔内に投与して作り、投与 20 時間後に断頭により殺した。正常および cystathionine 尿症ラットの臓器組織は屠殺後、速やかに分離し、各組織の 1g を 3 倍容の蒸留水で homogenize し、同容の 2% sulfosalicylic acid を加えたのち、3,000 r.p.m で遠心し除蛋白した。その上清を Diaion SK-1 (H-form) につけ、水洗し、2N NH_3 で溶出し、その溶出液を減圧乾固した。その残渣を 1 ml の蒸留水で溶解し、その一定量をアミノ酸分析器と細管式等速電気泳動法で分析した。

2. 分析方法

アミノ酸分析器は日立 835 型を用いた。細管式等速電気泳動装置は島津 IP-1B を用い、Leading electrolyte に 0.01M HCl+amediol ; pH7.0 terminal electrolyte には 0.01M GABA + $\text{Ba}(\text{OH})_2$; pH 10.9 を用い、泳動電流は 75 μA であった。

成績

Fig 1 は合成品の cystathionine 及び N-acetylcystathionine の検量線を示したものである。両者ともよい直線性を示した。

Fig 2(A) は合成品の cystathionine と N-acetylcystathionine の分析結果を示している。両者は非常によく分離されている。Fig 2(B) は cystathioninuria の患者の尿の分析で、Fig (C) は ② に cystathionine と N-acetylcystathionine を加えたものである。現在、D,L-propargylglycine を投与したラットの尿中、及び組織中の cystathionine と N-acetylcystathionine の定量について検討中である。

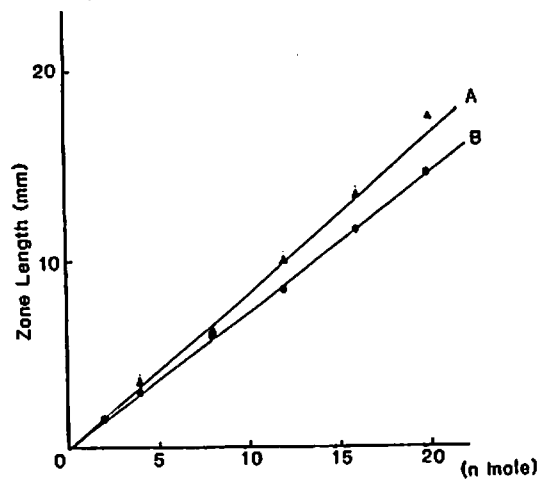


Fig.1 Standard curves of authentic cystathionine (A) and N-acetylcystathionine (B). The leading electrolyte was 0.01M HCl titrated with amédiol (5% polyvinylalcohol) to pH3.1. The terminal electrolyte was 0.01M GABA titrated with Ba(OH)₂ to pH10.9.

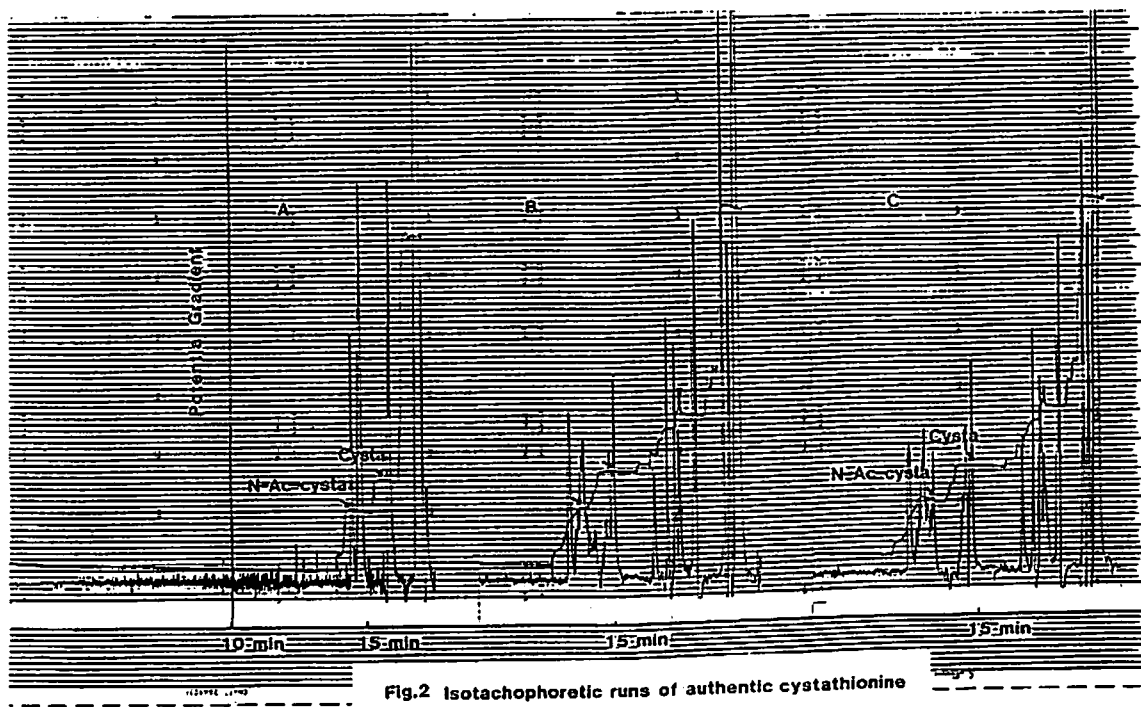


Fig.2 Isotachopheric runs of authentic cystathionine and N-acetylcystathionine (A), the urine of a patient with cystathioninuria (B) and (B)+cystathionine and N-acetylcystathionine (C).

19 レンズを劣化する糸状菌について

東京国立文化財研究所 新井英夫
日本光学 K. K. 金子則夫

1. はじめに

わが国のレンズの糸状菌の研究は、光学器械のレンズ表面に発生する糸状菌の研究に始まった。すなわち、大原利武氏が、明治44年(1911)3月の水交社記事に「鏡玉の黴菌並びに鏡玉保存手入法」を發表し、中村清二教授が、大正6年(1917)に「硝子と糸状菌」の報告書を陸軍砲兵工廠に提出した。次いで、手島安太郎氏が、レンズの糸状菌について本格的に取り組み、昭和4年(1929)にメモ、昭和9年(1934)にはオ11回日本医科機械学会総会で、光学器械のレンズ面に発生する糸状菌およびその予防法の演題で詳細な報告を行った。この後、昭和15年(1940)2月に発足した光学器械防曇対策委員会において、大槻虎男教授らが「カビによる光学器械の曇り及び其の対策」を担当し、研究を実施して5年後に昭和20年(1945)8月15日を迎えたのである。同教授は、戦後も本研究を継続し、「硝子に発生する糸状菌の研究」として昭和25年(1950)にオ1報を發表して以来、同26年(1951)にオ2報、同28年(1953)にオ3報、同37年(1962)にオ4, 5報、同41年(1966)にオ6報までの一連の發表を行った。その間オ5報では、レンズから分離した糸状菌を *Aspergillus vitricolae* Ohtsuki' と *Eurotium tonophilum* Ohtsuki' と同定した。

筆者らは、レンズの糸状菌の研究は、昭和41年までで完成し、その後には研究する余地はないものと思っていた。ところが、近年も国の内外で比較的高い頻度で、糸状菌がレンズを劣化する現象が存在しているので、筆者らは、糸状菌の発生したレンズを収集して、レンズの劣化要因糸状菌の分離・同定と分離菌株の生理的性質として、これら糸状菌の代謝生成する有機酸の分析等基礎的研究を実施したので、その結果を報告する。

2. 糸状菌の水分活性

微生物は、繁殖するときに水分の存在が必須の条件である。微生物の繁殖する物体とその環境下の水と微生物の関係を表わすのに、水分活性(water activity)の概念を導入すると考えやすくなる。水分活性(以後 A_w と略す)は、純水の蒸気圧を P_0 とし、水溶液の蒸気圧を P とし、 $A_w = P/P_0$ で表わされる。したがって、 P が純水の場合は、 $A_w = 1$ であるが、水分を吸収する物質が加わるとその物質に応じて P の値が低下する。また、 P が無水物の場合は $A_w = 0$ となる。

糸状菌は、繁殖に100%の水分を必要とするもの、水分が100%以下でないと繁殖できないもの、その中間の性質をもつもの、の3群に大別することができる。筆者らは、これに非好稠性糸状菌、絶対好稠性糸状菌、条件的好稠性糸状菌と称して区別している。レンズや絵画等美術工芸品には、主として絶対好稠性と条件的好稠性に属する糸状菌が発生している。絶対好稠性糸状菌の分離や実験には、通常の糸状菌とは異なる方法を工夫する必要がある。

3. 実験方法

3. 1. レンズから糸状菌の分離法

レンズ上に発生した糸状菌は、ゼラチンレプリカ法を用いて分離した。すなわち、あらかじめ無菌的に作成した $1 \times 1 \text{ cm}$ のゼラチン膜を、 $A_w = 1.00$ の環境中に約数時間保った後、これをレンズ表面に生育した糸状菌上に圧着し2, 3分後にはがすと、ゼラチン膜上に分生子および菌糸を直接写し取ることができる。このゼラチン膜を $A_w = 0.94$ または 0.84 , 25°C に保って分離した。

分離菌株のなかから、代表的菌株を選んでこれを供試菌株とし、菌類分類学の定法にしたがって、形態学的性質と生理的性質に基づいて種を同定した。

3. 2. 水分活性の測定

供試菌株の水分活性は、直径 1 cm 高さ 2 cm の水分活性測定ビン中に $A_w = 0.94$, 0.84 , 0.75 , 0.60 , 0.55 に調整する飽和塩類溶液を加え、その上をカバーガラスで密封して各水分活性の環境を作成した。カバーガラスの内側にゼラチン液を1滴置いて各水分活性と平衡にした後、ゼラチン膜上に供試菌株の分生子等を接種し、 15 , 25 , 35°C で2週間観察して、各菌株の A_w 生育限界を求め、クリモグラフを作成した。

3. 3. 有機酸の測定

供試菌株が代謝生成する有機酸は、供試菌株を接種・培養したゼラチン膜から蒸留水に抽出、濃縮したものを試料とし、島津細管式等速電気泳動装置 IP-2A で分析した。

4. 結果

4. 1. レンズに発生する糸状菌の種類

わが国で収集したレンズからは、主として Aspergillus penicilloides Spezzini が分離された。しかし、収集した地域、光学器械の発生部位により、糸状菌の種に差が認められた。

4. 2. 供試菌株の好稠性

レンズから分離した Asp. penicilloides のクリモグラフは、明らかに絶対好稠性糸状菌に属し、 $A_w = 1.00$ では生育しなかった。

4. 3. 供試菌株の生成する有機酸

レンズから分離した Asp. penicilloides は、フマル酸、リンゴ酸、グルコン酸、酢酸、乳酸を生成し、なかでもリンゴ酸の生成量が他の有機酸に比べて著しく多いという特徴を示した。

特 細管式等速電気泳動法の血清、精漿蛋白質多型研究への利用

○吉田治弘 (自治医大・法医学)

各種電気泳動法(Horizontal-, Disc-, SDS-disc-, IEF-, 2D-PAGE, Starchgel など)を利用し、人および各種動物の血液系遺伝標識の遺伝的多型性形質の検索、集団遺伝学的調査および体液の個体識別などの検討を続けている。これらの泳動法は、蛋白質、酵素の分離能はすぐれているものの、一般に泳動に数時間を要し、染色、脱色にさらに数時間を必要とする。蛋白質量の推定には染色されたバンドの濃淡、スポットの大小などを肉眼あるいはデンストメトリーなどを利用しており、検査結果を急ぐ場合には若干の問題がある。そこで、新しい多型性形質の検索と従来の多型性形質の判定の迅速化を目的として、細管式等速電気泳動法(以下CITP)による分析を試みたところ、試料の微量化、分析時間の短いこと、分析能の優れていることから、CITPは遺伝学的、法医学的に利用度の高い機器であると思われた。ここでは、演者の経験した遺伝的多型性形質の分析結果と、その周辺の話題を紹介する。

1. トランスフェリン型について

ヒト血清をCITPで分析し、280nmでのUV吸収パターンを観察すると、リーディング液、ターミナル液のロット差は多少あるものの、Alb、Tf、Ig などを中心とした血清特有のパターンを検出できる。特にTfについては、BC、C、CD、BD型などの判定は極めて容易であり、等電点電気泳動法(IEF)でのTf型以外を検出した際の確認に有用であった。また、IEFでのTf型判定の際にFe³⁺との結合基が欠落していたのか、一般の血清と異なったIEFパターンを示したTf異常例については、CITPのUVパターンでAlbの前のピークが一般の血清に比して、極めて小さくなっているのを見いだした。ウマ血清のCITPのUV吸収パターンでは、多様なTfのピークが検出出来、そのTf型の判定は、比較的容易であり、ゲル電気泳動法によっては識別出来なかった稀なTf型を検出することが出来、またウシ、ヒツジなどのさらに多様なTf型を呈する動物への利用も可能と思われる。

2. ハプトグロビンについて

ハプトグロビンは遺伝的多型性形質であり、Hp1-1、2-1、2-2型の3型としてdisc-page などにより分類されているが、CITPではHpの型的分類は出来ないので、量的差異の検出には利用可能であった。すなわち、白血病患者39名の血清について、バルチゲンプレートでHp量を測定したところ欠損例7名、50mg/dl以下5名と欠損例の頻度は約18%と高く、奇井らは献血者60,912例で20名のHp欠損例約0.03%を見いだしているが、演者の検討した例は、疾患によるHpの欠損あるいは減少と考えられFröhlanderの報告にも同様の結果を見ており、CITPでAlbのUVピークについて検出されるピークがHpと推定され、そのピークの大きさはバルチゲンプレートにより推定されたHp量に相関しており、CITPによりHp量推定の可能性は大である。

3. 体液の識別と精漿蛋白質の個体差について

体液については、各専門領域での研究対象となるものの、法医学的な物体検査として、体液痕の識別、個体識別のための血液型検査および蛋白質、酵素型の多型性の検査を実施している。CITPにより鼻汁、耳下腺唾液、精漿、腔内容液、血清などを分析し、UVパターンを比較すると、各々の体液には特有のピーク(精液では γ -Sgなど)を検出し、識別が可能であった。精漿については、種属鑑別も容易に識別が可能であり、人では酸性ホスファターゼとAlbの中間ピーク、Tfのピークに顕微的な個人差を見いだすことが出来、法医学的、生殖生物学的な応用も可能と思われる。

CITPでの分析は以上のほかにも、遺伝学的、臨床医学での利用も検討し、試料の性状などにとらわれずに利用可能な分析機器で、今後さらに対象分野を広げて行きたいものと考えている。

宮崎医科大学法医学教室 ○菊田 由美、高浜 桂一
ユキタ ヨミ タカハマ ケイイチ

ホルマリン固定臓器の病態診断は、一般に、組織学的に行なわれており、化学的分析によって病態解明を試みた研究成果は、これまで殆どない。ホルマリン固定肝臓の蛋白定量(Lowry法)を行なった結果、生の肝臓に比べて、約100分の1量程度の水可溶性蛋白の得られることがわかった。そこで、我々は、ホルマリン固定肝臓より抽出した蛋白の分析を、細管式等速電気泳動法によって行ない、蛋白構成と病態との関連について解明を試みた。

〔実験方法〕

1. 装置

分析装置は、島津細管式等速電気泳動装置IP-3A形を用いた。検出器には、電気勾配検出器PGDと紫外線吸光検出器UVD-3A形(280nm)とを併用した。記録計は3ペン式(R-123I形)を用い、データ処理装置には島津クロマトパックE1Aを用いた。

2. 試薬

電解液調製用として、2(N-モルホリノ)-エタンスルホン酸(MES)、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール(Ammediol)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース4000(HPMC4000cps)、ε-アミノ-n-カプロン酸(EACA)、水酸化バリウムを夫々用いた。

3. 電解液システム

リーディング液は、5mM-MES+10mM-Ammediolを用い、粘性剤として0.1%-HPMC4000cpsを、又、溶媒には蒸留水を用いた。

ターミナル液は、5mM-EACA+10mM-Ammediolを用い、溶媒には蒸留水を用いて、水酸化バリウムでpH10.8に調整した。

4. 試料

検体として、組織検査上異常の認められたホルマリン固定肝臓22検体を用いた。ホルマリン固定肝臓5gを流水で48時間水洗して十分に脱ホルマリンした後、20%ホモジネートを作り、これを遠心分離して、その上清を更に濾過して蛋白抽出液とした。分析には、蛋白抽出液に、その3培容のアミノ酸スパーサー(トリシン、アスパラギン、グルタミン、グリシン、バリン、ロイシン及びβ-アラニンの各8mgを蒸留水に溶解し、全量を10mlとしたもの)を加え、注入試料とした。

5. 分析条件

泳動チューブには、内径0.7mm、長さ80mm(テフロン製)のものと、内径0.5mm、長さ168mm(6ふっ化エチレンプロピレン製)のものを直列に接続し、前記の如く調製した電解液システムを用いて、図1の条件で泳動を行なった。検出器にはPGDとUVD(280nm)とを夫々用いたが、UVDによる測定を主に行なった。チャートスピードは20mm/minで記録した。注入試料2μlを分析装置に導入し、得られたイソタコフェログラムの結果を比較検討した。即ち、先に述べたスパーサーにより、8ピークが得られるが、既に我々の教室から報告した研究成果にのっとり、ピー

ク1とピーク2をフラクション1、ピーク3とピーク4をフラクション2、ピーク5~8をフラクション3として、全体を3ピークに分けた。この各分画のピーク面積の相対比を求め、病態との関連性を比較検討した。

〔結果及び考察〕

検体を組織検査して、以下の3群に分類した。即ち、A. 脂肪沈着が顕著に認められるもの(13検体)、B. 細胞浸潤が顕著に認められるもの(14検体)、C. 繊維化が顕著に認められるもの(6検体)である。その分析結果を表1に示した。一方、組織検査上異常の認められなかったホルマリン固定肝臓についての同様の分析結果を表2に示した。

表1、2を比較して解することは、組織検査上異常を認めた肝臓の分析値では、フラクション1の面積比が大きいのに比べ、正常な肝臓の分析値では、フラクション3が大きくなっていることである。

各分析結果で、標準偏差が大きいことについては、個体差、病態差、或いはホルマリン固定状態の差などの関与が考えられる。病態差については、今後、さらに詳細な分類を行なう事が必要かと思われる。現在なお実験進行中で、当教室だけでは剖検試料数に制限があるため、未だ明確な結論を得るには至っていないが、他教室の協力を得て、ホルマリン固定肝臓の化学的分析を進める一方、その成果を踏まえて、他の臓器組織についても分析を進めていくつもりである。

表1 (A) 脂肪沈着の顕著に認められる肝臓 (36)

Sample Number	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
2	50.5	42.7	6.9
3	53.7	37.1	9.2
5	54.9	29.2	15.9
7	47.8	31.8	20.4
12	69.0	21.8	9.2
13	74.1	21.2	4.7
14	57.1	19.8	23.1
15	66.7	24.4	7.7
18	69.6	25.4	5.0
19	51.3	44.6	4.1
20	56.7	28.3	13.0
21	58.9	26.0	15.1
22	73.2	23.2	3.6
Mean±S.D.	60.4±8.7	28.9±7.7	10.6±6.1

図1

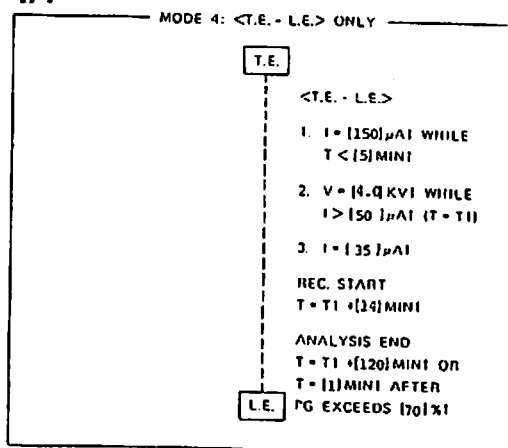


表1 (B) 細胞浸潤の顕著に認められる肝臓 (36)

Sample Number	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
1	50.2	30.8	19.1
3	53.7	37.1	9.2
5	54.9	29.2	15.9
6	49.3	33.9	16.8
8	52.3	31.7	16.0
9	35.6	30.8	33.6
10	35.5	31.6	32.9
11	45.9	31.1	23.0
12	69.0	21.6	9.2
14	57.1	19.8	23.1
16	63.7	22.2	14.2
17	62.4	22.2	15.4
19	51.3	44.6	4.1
20	56.7	28.3	13.0
Mean±S.D.	52.8±9.2	29.6±6.4	17.5±8.1

表1 (C) 繊維化の顕著に認められる肝臓 (36)

Sample Number	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
4	61.2	25.9	12.9
5	54.9	29.2	15.9
8	52.3	31.7	16.0
9	35.6	30.8	33.6
12	69.0	21.8	15.9
15	66.7	24.4	7.7
Mean±S.D.	56.6±11.1	27.3±3.6	17.0±8.0

表2 正常肝臓 (ホルマリン固定) (36)

Sample Number	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
23	11.6	18.1	70.4
24	19.2	13.6	67.2
25	19.4	21.4	59.2
Mean±S.D.	16.7±3.6	17.7±4.7	65.6±4.7

吉田治弘、土田峰一、熊本功典、高田功（自治医科大学・法医学・人間生物学）

電気泳動法による血清蛋白質の動態の観察には、採血後迅速に検査を実施したとしても数時間を要するのが現状である。演者らは、すでに紙管式等速電気泳動法(以下CITPと略記)により血清を分析し、H₂O型の型判定およびH₂Oや他の蛋白質の量的変化の観察に利用可能なことを明らかにしている。そこで、手術侵襲や薬・毒物投与後の生体内の生理的変化のマーカーとして血清蛋白質の変動を実験的にイヌ血清をCITPにより検討したところ興味ある知見を得たので報告する。

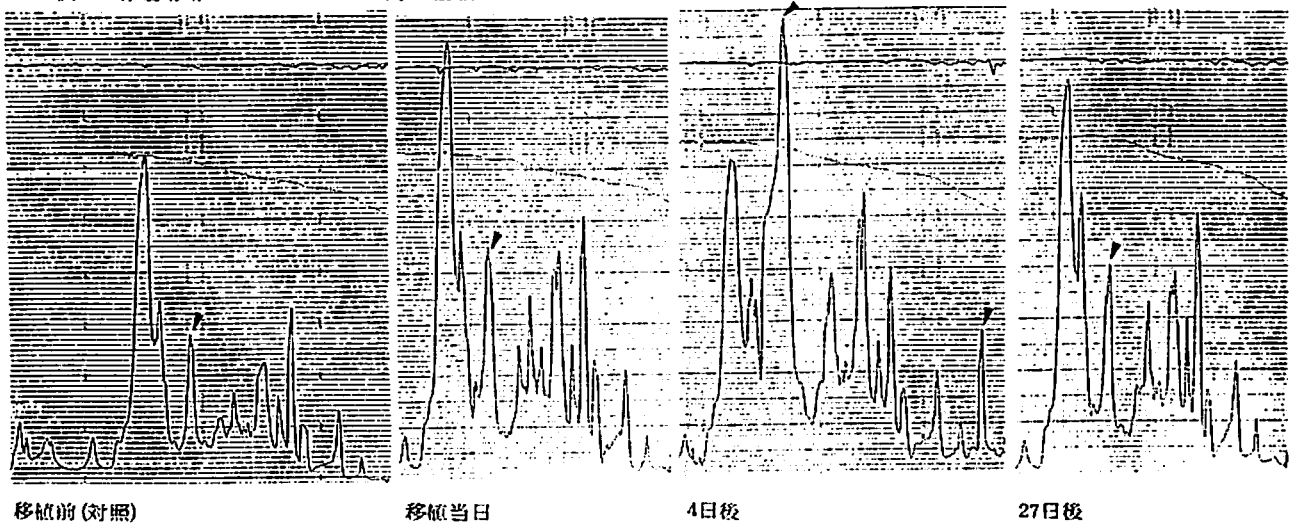
実験材料および方法

手術侵襲を観察する試料としては、実験的な骨髄移植のレシービエント犬5頭の血清について検討した。毒物投与の影響については、パラコート投与犬5頭の血清について検討した。血清の分析は、島津製作所製IP-2A型を使用し、1φ×100mmのプレカラム、0.5φ×300mmの分析用カラムにより、先行液には5mM HCl-10mM Ammediol-0.1%HPMC pH8.9、後続液には10mM EACA-10mM Ammediol-Da(OH)₂ pH10.8とした。通電は125μA 15min、続けて75μA 13minとした。試料は血清5μlに15μlのスペーサー溶液(3.5~9.5 Ampholine 50μl、アミノ酸溶液(Asp, Glu, Val, Leu, β-Ala, Gly, Tricine 各10μg/10μl) 0.4ml、蒸留水で1μlとした)を加え、よく混和したものを1μlを注入した。検出は280nmのUV吸収で行い16minから4cm/minで記録した。

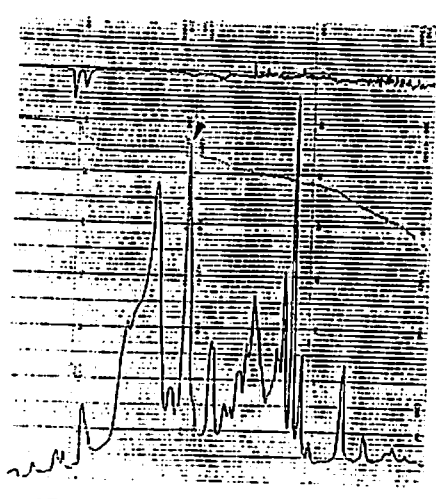
実験結果

骨髄移植のレシービエント犬の血清をH₂O⁻、Disc-PAGEなどで検討したところ5頭のうち4頭はH₂O(+)⁻型で、1頭はH₂O(-)⁻型であった。H₂O(+)⁻型について、移植後の血清の蛋白質動態は図1に示すように、移植前に比してH₂Oピークが高く、量的な増大が示唆され、移植後27日目位で正常値に近くなることが観察された。この傾向はH₂O(-)⁻型と判定された個体においても観察され、従来H₂O(-)⁻と判定していたものは、H₂Oの欠落ではなくクマシー染色やCITPなどでは検出不能な程度の低濃度と推定される。パラコート投与犬の投与後の血清の動態の1例は図2に示す様に、H₂Oのピークの増大と免疫グロブリン蛋白質域の新しいピークの出現が観察できた。これらの結果は、H₂O-PAGE、免疫電気泳動の結果ともよく一致していた。すなわち、CITPを利用して抗凝固剤を使用して採血した血漿を試料とすると分析時間が25~27分で良く、採血後30~40分後には結果が得られ、事前に対照血漿を分析しておくことで、それらとの比較検討により血漿蛋白質動態の分析が極めて迅速に完了することが可能である。

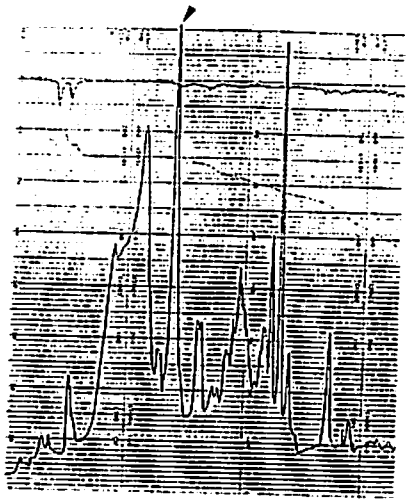
図1 骨髄移植レシービエント犬の血清のCITPパターン



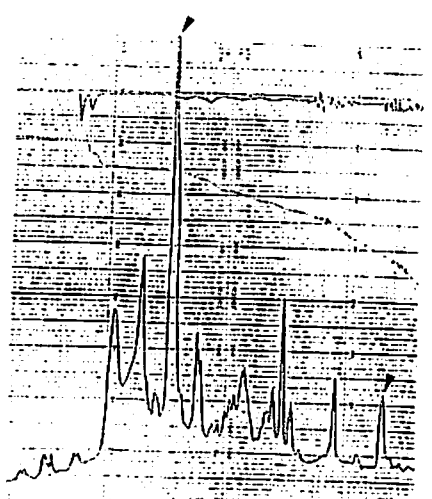
マダモト トラコート投与犬の心電図の印刷パターン



パラコート投与前(対照)



1日後



3日後

鈴木 公一・鈴木 和威

日本大学農獣医学部食品工学科

イソタコは、近年種々の分析に利用されてきているが、比較的 low molecular weight 物質を対象に行われることが多く、高分子物質であるタンパク質については、あまり行われていない。また、魚肉の鮮度低下に関しては、K 値の測定が low molecular weight 物質の測定ということになり、イソタコを用いて可能であることはずで知られているが、試料の調整及び、リーディング液・ターミナル液の交換が必要となる等、操作が繁雑となる。これらの問題点を少なからず解消できるものかと考え、イソタコを用いて、魚肉タンパク質の死後変化について実験を行って見た。

材料および方法

①試料魚 鯉を実験試料魚とした。養魚場より購入し、縦 140 cm、横 110 cm、深さ 80 cm の水槽にて飼育しながら実験に供した。なお水深は 65 cm とし、循環式浄化装置およびエアポンプを取りつけ終日稼働させた。飼料は、日本ペットフード社の物（スイミー）を与えた。

②イソタコ用試料の調整 鯉を断頭即殺し、直ちに背部筋肉部分より採肉した。この肉片を細砕した後、冷却しながら乳鉢を用いて、10 倍量のリン酸緩衝液 (pH 6.98) を徐々に加え磨砕し、更にホモジナイザーを用いて乳化液とした。この時点から死後経過 0 時間とし、乳化試料を冷蔵庫 (+3°C ± 1°C) で保存しながら、1 時間毎に取り出し、2 倍量の純水を加え希釈混合の後ろ過してイソタコ用試料とした。また一方、純水のかわりに、メチルアルコールを加え除タンパクした試料も同様に調整した。

③装置 装置は、島津製作所製 IP-2A を使用した。

④分析条件 今回実験に用いたリーディング液とターミナル液は、以下の物を用いた。

リーディング液

L-890 : 10 mM 塩酸・2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール (pH 8.90)

L-900 : 10 mM 塩酸・トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (pH 9.00)

L-910 : 5 mM 2-(N-モノホリノ) エタンスルホン酸・10 mM 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール・ヒドロキシエチルセルロース (pH 9.10)

ターミナル液

T-100 : 10 mM フェノール・水酸化バリウム (pH 10.00)

T-108 : 5 mM L-アミノカプロン酸・10 mM 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール・水酸化バリウム (pH 10.80)

T-109 : 10 mM β-アラニン・水酸化バリウム (pH 10.90)

実験 1 は、L-900 と T-100 を、実験 2 は、L-900 と T-109 を、実験 3 は、L-910 と T-108 を、そして実験 4 では、L-890 と T-109 を用いて行なった。

結果および考察

乳化液を純水で希釈し過した試料は W で、メチルアルコールを用いて除タンパクした試料は A で示す。

①実験 1. W・A とのイオンピークは、5 個検出された。両試料のピークとも pI 値に大差がなかった。A は除タンパクした試料であることから、タンパク質のイオンピークでは、

まいと思われる。死後経過時間については、24時間以上行、たが、両試料とも頭初の5つのイオンビークが見られ、またPU値も大した変化はみられなかつた。

2) 実験2. 試料Wを用いた場合、イオンビークは5個検出された。試料Aの方は、イオンビークが4個検出された。Wの方のイオンビーク1個は、タンパク質と思われるがPU値にバラつきが多く良好な検出が得られなかつた。また、W・Aとも死後経過20時間の間ビーク数に変化は見られなかつた。

3) 実験3. 試料Wを用いた場合、イオンビークは4個、試料Aはイオンビーク5個が検出された。PU値はかなり安定しており良好な分離検出がなされた。しかしながら、Aの方にビーク数が多いこと、さらに両試料とも1昼夜の死後経過時間に共なる変化は見られなかつた。

4) 実験4. 試料Wを用いた場合、イオンビークが6個検出された。試料Aを用いた場合のもそれは、5個であった。このことは、Aの方では除タンパクされ検出されなかつたものと思われる。したがって、タンパク質によるイオンビークを考慮される。死後経過時間における変化としては、0時間から3時間までのビーク数は6個であったが、それ以後ビーク数は5個に減少した、そしてこれらのPU値は、試料AにおけるビークのPU値とほぼ同じであった。今回の実験4でのビークのPU値は、安定しており再現性が良好であった。

以上のことから、今回の実験においては、リーディング液にL-890、ターミナル液にT-109を用いた方法が検出能力・再現性共に良好であった。また死後経過時間に共ない、タンパク質レベルでのイオンビークの消失をとらえることができた。ただし死後3時間前後の変化であり、またその変化があまり明瞭でない等問題点を残している。魚肉の死後変化は、鮮度判定を主に種々研究されているが、インテグロによる方法も、今回の実験のように操作の簡便と合わせて、さらに適した分析条件が見いだされれば、魚肉の鮮度判定の為にルーチンワークとして可能性があると思われた。

○奥泉仁一（東レ・安全研）・吉田治弘・池本卯典（自治医大）

はじめに

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¹⁾ 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などがみられるようになり、そしておびたしい涙液と多量の鼻汁など、ヒトの鼻アレルギーと類似した症状を起こすことが観察²⁾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タンパク成分と、ヒトの涙液を対比させ、マイクロ多検体二次元電気泳動法のほか、併せて細管式等速電気泳動的解析を行ったので報告する。また、分子量の確認にはSDS電気泳動法を用いた。

1 実験材料および方法

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)および飲料水は自由に摂取させた。

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、そのつど溶解させて作製した。

3. 対象および試料

モルモット鼻アレルギーの惹起は、既報の³⁾の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5μl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。

また、ヒト涙液として、タマネギの刺激によって漏出された涙液をプラスチック製キャピラリー管に採取し、直ちに実験に供した。

4. マイクロ多検体二次元電気泳動法

マイクロ多検体二次元電気泳動法は富士理研製OMS型を使用し、泳動方法は真鍋ら^{4~6)}の方法に準じて行い、すなわち、低分子量のタンパク検出のため、二次元目の泳動時間は約60分、マーカーのBPBがゲル下端に達するまでとした。

染色は、0.1%クマシブルー-R 250、50%メタノール、7%酢酸中で振盪しながら15分間行い、脱染色は、70%メタノール7%酢酸中で振盪しながら2時間行った。

5. 細管式等速電気泳動法

細管式等速電気泳動法は、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)に5mM HC1・10mM ammonium・0.1%HPMC、pH8.95とし、ターミナル液(T)として、10mM ACA・10mM ammoniumの混合液と、Ba(OH)₂でpH11.0に調整した。

スプレー溶液には、valine glycine, tricine, aspartic acid, leucine, glutamic acid, β-alanine を各10mg/10mlの0.4ml、pH3.5~9.5のamyholinc 50μlを溶解し、蒸留水で1mlとした。スプレー溶液30μlを分析した。

通電は、最初の12分間を150μA、続いて75μAで16分間行った。分析パターンは、13~28分間の電位差と280nm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。

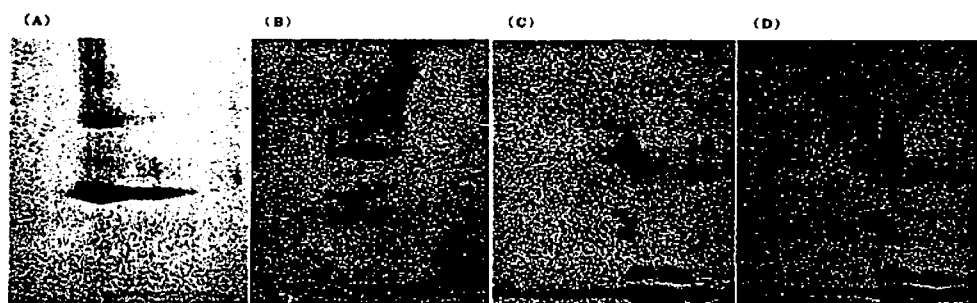


Fig. 1 Micro two-dimensional electrophoresis of human and guinea pig tear proteins. Samples (A.) Human tear protein and (B) (C) (D) guinea pig model for allergic rhinitis, respectively.

Ⅰ 結果および考察

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、とくにヒトの鼻アレルギーの診断基準となっている鼻汁中の好酸球が、TDI塗布後5日目のモルモット鼻汁中に観察されたことはすでに報告している。今回、とくにモルモットにTDIを塗布し、惹起6回目と惹起18回目に得られた涙液の電気泳動像では、共通のパターンがマイクロ多検体二次元電気泳動および細管式等速電気泳動法より確認され注目された。また、涙液特有と考えられる著しく高いピークと活性の強いパターンは、それぞれpH 3.0~4.0の酸性領域に認められ、この分子量は10,000~47,000の低分子であることが、SDS電気泳動法の分析で明らかとなり注目された。

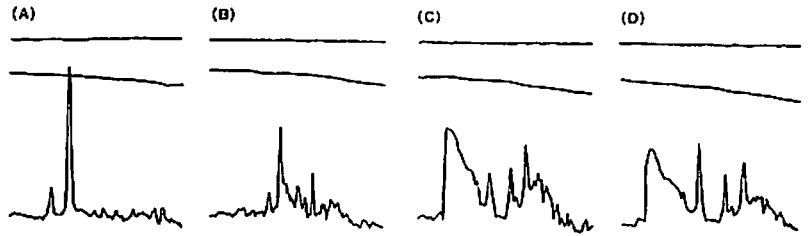


Fig. 2 Isotachoelectrophoretic analysis of tear discharge. Sample (A) Human tear protein and (B) (C) (D) guinea pig model for allergic rhinitis, respectively.

以上の実験成績は、筆者らによって作成された

鼻アレルギーモデルと、ヒト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タンパク成分との関連について検討中である。

参 考 文 献

- 1) Asherson, G.L. & Ptak, W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. *Immunology* 15 : 405 (1968)
- 2) 奥泉仁一ほか：第4回細管式等速電気泳動分析シンポジウム講演要旨集、p 37~38 (1984)
- 3) 田中健一ほか：Toluene Diisocyanate (TDI) によるモルモット喘息惹起の試みについて、アレルギー-31 : 1004~1007 (1982)
- 4) Manabe, T. et al. : Microscale multisample two-dimensional electrophoresis of proteins in human serum, cerebrospinal fluid, and urine. *Clin. Chem.* 28 : 84~827 (1982)
- 5) 真鍋 敬ほか：人体液蛋白質のミクロスケール2次元電気泳動-血清、脊髄液、尿の蛋白質の分析。生物物理化学25 : 161 (1981)
- 6) 真鍋 敬ほか：組織蛋白質の検索表のための2次元電気泳動-蛋白質マップとポリペプチドマップ。生物物理化学27 : 7 (1983)

24 ヒト血清タンパク質の無担体等速—等電点電気泳動法による高感度— 短時間分析

○山本 秀子, 真鍋 敬, 奥山 典生,
東京都立大学 理学部 化学科

< はじめに >

血清タンパク質の様な、多数成分のタンパク質試料を出来るだけ効率良く分離するには、平滑なpH勾配中で泳動する必要がある。また、高感度に検出するには、試料ゾーンの長さを出来るだけ短くしなければならない。さらに、短時間に分析する為には高電圧下で泳動し、短いcapillary tubeを用い、pH勾配も急にすることが必要である。

当研究室では、平滑なpH勾配を形成する為にアンホラインのみを用い、短時間—高感度分析を行う為に出来るだけ少量のアンホラインとその量に適した量のヒト血清を用いて等速—等電点電気泳動を行った。

さらに、平滑なpH勾配を自在に調節出来るように、既知のUV280nmの吸収の無い低分子化合物の混合液のみを用いて平滑なpH勾配を形成しヒト血清の分析を行い、その泳動状態を考察する為に一次元目に等速電気泳動を用いたマイクロポリアクリルアミド二次元電気泳動を行った。

< 方法 装置 >

1. 細管式等速電気泳動

装置は、島津細管式等速電気泳動装置IP-2Aの送液部をペリスタポンプに改変して使用した。細管は内壁をHPMC処理した $\phi 0.5\text{ cm} \times 23\text{ cm}$ を用い、タンパク質の検出は主にUVD 280 nmを、pH勾配の測定にはPGDを用いた。先行液は、5 mM - HCl, 10 mM - 2-Amino-2-methyl-1-propanol、終末液は、50 mM - 6-Amino-n-capric acid (KOHでpH 10.8に調整)を使用した。両液ともヘキサンを2 cmの厚さに重層して炭酸ガスの溶け込みを押さえた。200 μA 8500 Vで3分間予備泳動した後、分析泳動は50 μA 3200 Vで約10分間で終了した。

2. ミクロポリアクリルアミド二次元電気泳動

一次元目の等速電気泳動は、小島らの方法を適用した。先行液は5 mM - HCl, 10 mM - 2-Amino-2-methyl-1-propanol、終末液は50 mM - Tranexamic acid (KOHでpH 10.8に調整)を用いた。ゲルは1.3 cm x 3.5 cmの4%ポリアクリルアミドゲルで先行液が同濃度で含まれている。4倍希釈ヒト血清(40%蔗糖を含む)1 μl を添加した後、下記のspacer溶液14 μl を添加し30 V定電圧でBPBのバンドがゲル下端にくるまで約1時間泳動した。

二次元目は、4 ~ 17%の直線密度勾配平板ゲル(40 mm x 40 mm x 1 mm)を用い、電極槽液はBPBを含むTris-Glycine緩衝液(pH 8.6)を使用した。ゲル1枚につき10 mAの定電流でBPBで青く染まったAlbuminがゲル下端から1 cmのところにくるまで泳動した。銀染色により検出した後、当研究室で開発したテレビカメラ—マイコンシステムで泳動図を解析した。

(spacer 溶液)

1. 4% Ampholine (pH 3.5 - 10) 16 μl + 蒸留水 9.6 μl
+ 0.1% BPB 溶液 (40%蔗糖を含む) 2 μl
2. Soln. 1, 2, 4 (表1) 各 6.4 μl + 蒸留水 6.4 μl
+ 0.1% BPB 溶液 (40%蔗糖を含む) 2 μl

< 結果 >

1) 2% アンホライン (pH 3.5 - 10)の量を 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 μ lと少なくするに従い、ヒト血清由来の分離ピークは鋭くなり検出感度はあがった。2% アンホライン 0.25 μ lを用いた場合ヒト血清で 1/48 μ lで検出できた。

2) Alb, HDL, Hp, IgA の各ヒト血清タンパク質素画分、及び精製ヒト血清タンパク質 Tf, IgG の Isotachopherogramより、ヒト血清の Isotachopherogram上のそれぞれのタンパク質ピークを同定した。(図1)

3) 表1の混合溶液を用いる事によりアンホラインと同様のポテンシャルグラジエントを得る事ができ、その際のヒト血清の Isotachopherogramは(図2)の様になった。

4) 一次元目に等速電気泳動を用いたポリアクリルアミド二次元電気泳動図(図3)によって表1の混合溶液はアンホラインと類似したpH勾配を形成していることが示された。

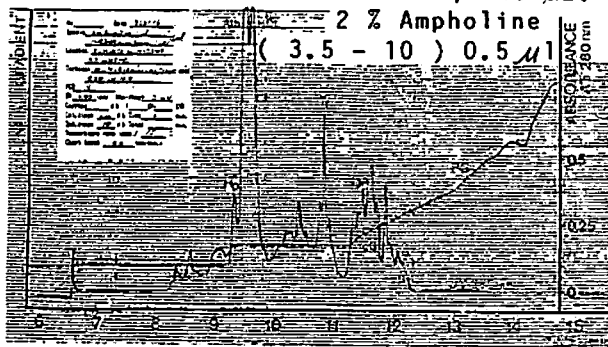
< おわりに >

細管式等速電気泳動は、短時間に高感度分析が出来る事からタンパク質の分析に非常に有効な手段と考えられる。

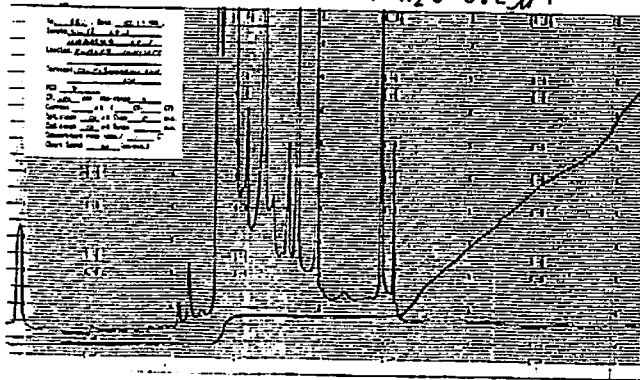
また、既知の低分子化合物のみを用いて平滑なpH勾配を形成する方法は、Hollowayなどによって行われているアミノ酸混合液をしきりとして用いた方法よりも、多数成分のタンパク質試料の分析に適し、さらにpH勾配を自在に調節出来るという点からアンホラインを用いる方法よりも優れた方法である。

(図1)

Isotachopherogram of Human Serum
(Diluted with 11-fold water, 0.5 μ l.)



(図2) Isotachopherogram of Human serum
(Diluted with 11-fold water, 0.5 μ l)
Soln 1, 2, 4 each of them 0.2 μ l
+ H₂O 0.2 μ l



(図3) ミクロポリアクリルアミド二次元電気泳動

1. 4% Ampholine (pH 3.5 - 10)

2. Soln. 1, 2, 4 (表1)

(表1)

List of amino acids, peptide and et al.
for spacer solution

Soln. 1	Soln. 2	Soln. 4
1 β -Alanine	1 Isoleucine	1 Arginine
2 Leucine	2 N-Alanine	2 Lysine
3 Valine	3 Glutamine	3 GABA
4 HEPES	4 N-Acetyl-Leucine	4 ϵ -Amino-n-caproic acid
5 TAPS	各 2 mg/ml	5 Proline
6 Glycine		各 2 mg/ml
7 Tricine		
8 Serine		
9 MES		
10 Glycyl-Glycine	Soln. 3	
11 Taurine	1 Lactic acid	
12 Glutamic acid	2 Phosphoric acid	
13 Aspic acid	3 Sodium Glycerophosphate	
14 PIPES	各 0.2%	
各 2 mg/ml		



25 トラネキサム酸を終末イオンに用いたタンパク質の細管式等速電気泳動

○山本 秀子, 真鍋 敬, 奥山 典生, 宮寺 彰彦
東京都立大学 理学部 化学科

タンパク質の陰イオン分析において初期の頃は、終末イオンにフェノールを用いていたが、時間がたつに伴い溶液が変色することから使われなくなり、現在、多くの研究者たちは、終末イオンとして 6-Amino-n-capric acid (EACA) を使う様になった。また、pHを塩基性側に調整するのに水酸化バリウムを用いて、電極槽液に溶け込む炭酸ガスを炭酸バリウムにして沈殿させて分析に炭酸ガスの影響がでない様になっている。

しかし、この終末液には次の様な難点がある。

- 1) 炭酸バリウムが沈殿して Terminal 電極槽やその付近のラインにたまって、つまりよごれの原因になる。
- 2) pHの調整がしにくい。
- 3) EACAの pKaから pI 8 以上の塩基性のタンパク質の分析ができない。
- 4) EACAの純度が低い。

この様な難点を解決するには、

- a) 水酸化バリウムを使わずにヘキサンを厚さ 2 cm 位重層して炭酸ガスが溶け込むのを押さえる。
- b) 水酸化カリウムなど他のアルカリを用いて pH 調整を行う。
- c) 表1の様な pKaの高い物質を終末イオンとして用いる。
- d) 純度の高い試薬を使用する。

などの方法が考えられる。

また、細管式等速電気泳動にはつぎの様な特徴がある。

- 感度が高い。 ヒト血清で 1/48 - 1/120 μ l (図1)
2-Thiobarbital 1.5 pM
Barbital 14 pM
Hypoxanthine 3.5 pM (図2)

— 15分以内と短時間に分析が出来る。

— クロマトグラムと同じ方法で泳動図を解析出来る。

特に、感度が高いという点をいかしてタンパク質の泳動を行うには、次の様な点に注意しなければならない。

— 純度の高い試薬を使用する。

— UV 280 nm 付近に吸収のない試薬を使用する。特にアンホライトには注意する。

アンホライトのかわりに UV 280 nmの吸収のない、既知の低分子化合物の混合液を用いる。(図3,4)

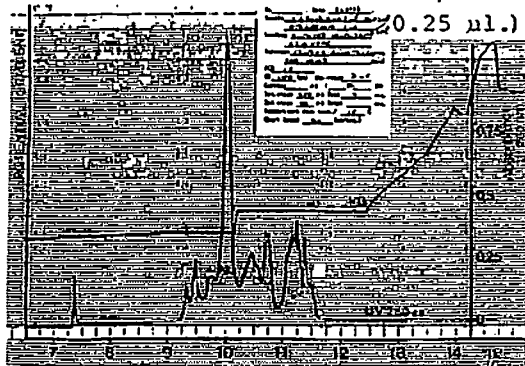
— 分析系、特に電極槽や injection port にタンパク質試料が残らない様に先行液に直接HPMCを添加せずに、かわりに HPMC 処理した capillary tube を使用する。

— 分析系のなかのよごれの溜りやすい部分を調べだし、洗浄法を見つけだす。

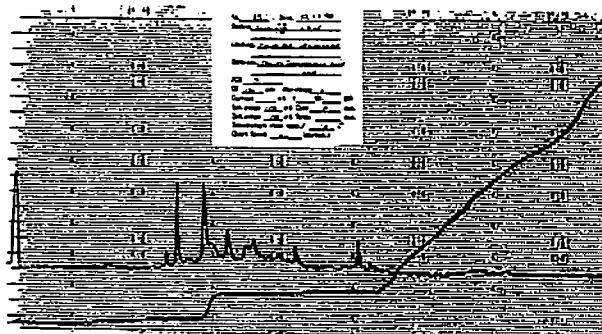
(図5)

(図1)

Isotachopherogram of Human Serum
(Diluted with 11-fold water,



(図3) 既知の低分子化合物の混合液による pH 勾配
と background

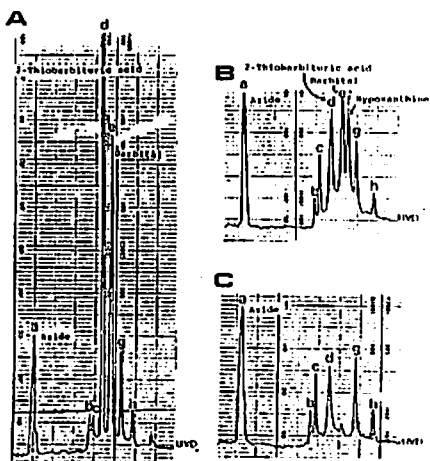


(図2) Isotachopherogram of
pK marker substances

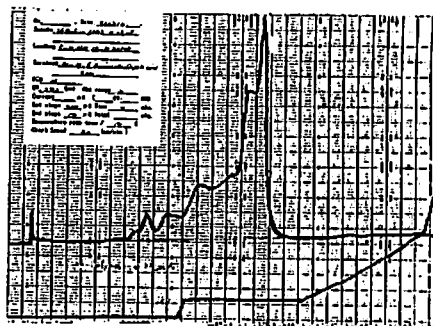
Loading electrolyte : 5 mM-Cl, 18 mM-2-amino-2-methyl-1-propanol
Terminating electrolyte : 30 mM-succinic acid brought up to
pH 10.8 with KOH
Loading electrolyte and Terminating electrolyte were covered
with hexan. Capillary tube coated with 1.5 μm of
0.1% of amino acid solution (Soln. 1, Soln. 2) and Soln. 6 mixed,
and diluted to 0.5 mg/ml each amino acid at at:1 was used for
each analysis.

A) 2-Thiobarbituric acid 3.2 mg
Aspirin 3.1 mg
C) No sample

B) 2-Thiobarbituric acid 122.7g
Nerthial 2.33 mg
Niposanthin 2.2 mg

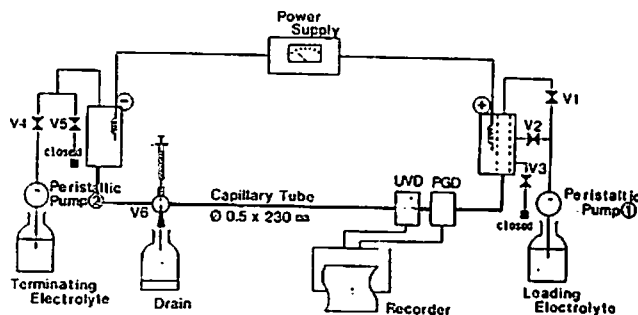


(図4) アンホライトの UV 280 nm の吸収



(図5)

Block-diagram of Shimadzu IP-2A
(Improved from an N₂ gas charging system
to pumping system)



(表1)

終末イオン	pKa	構造式
EACA	pK ₁ 4.43 pK ₂ 10.75	H ₂ N(CH ₂) ₅ COOH
Arginine	pK ₁ 2.18 pK ₂ 9.09 pK ₃ 13.2	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{H} \\ & & \\ \text{HOOC}(\text{CH}_2)_3\text{NCH}_2 & & \text{NH}_2 \\ & & \\ \text{NH}_2 & & \text{NH} \end{array}$
Lysine	pK ₁ 2.20 pK ₂ 8.90 pK ₃ 10.28	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HOOC}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Tranexamic acid		HOOC-CH ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ NH ₂
Aminododecoic acid		NH ₂ (CH ₂) ₁₁ COOH
Boric acid	pH 5.1 (1M)	H ₃ BO ₃

- 1) Terminal電極槽 - 1N 水酸化カリウムで洗うと UV 280 nm の吸収がふえる。
- 2) Injection port - 黒カビがはえる。変性したタンパク質などが沈殿する。
- 3) Detector - 泳動された変性タンパク質がひっかかる。
- 4) Leading 電極槽 -
- 5) Leading 電極槽の filter外部 - UV 280 nm の吸収の無い移動度の小さい物質がたまる。
- 6) capillary tube - 交換しても background はほとんど減少しない。